

Nuevos genes
involucrados en la
inducción de la
conidiación en
Aspergillus nidulans.



Oier Etxebeste

Donostia 2008



Biokimika II
Kimila Aplikatua
Kimika Fakultatea
Donostia



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
The University of the Basque Country

Nuevos genes involucrados en la
inducción de la conidiación en
Aspergillus nidulans.

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

Oier Etxebeste
Donostia
2008

*Amari adorea zor diot, lau seme alaba aurrera ateratzeko indarra;
Jexux eta Verori, beraienean hasieratik seme bezala hartu izana;
Ainhoari, ezintasunak gainditzeko bultzada;
Aitorri, norbera dena harrotasunez agertzeko ausardia;
Olatzi, maitasuna egoera zailenetan ere ederra denaren lezioa. Allotz, horren fruitua;
Josu eta Elsari, Azkoien eta Olaztiko egunak;
Lagunei, bizitza ederrago egiten lagundu izana;
Gaizka eta Garat; Aratz eta Maren; Allotzi, etorkizuna;*

*Nekane eta Joseba, Iñaki eta Irunerri, borrokatzeko indarra zor diet.
Joseba eta Eliri, eredia eta irria;*

*Unairi, aukera;
A Eduardo, toda la ayuda;*

*Historiari garena zor diot, garen horri ahotsa zor zaion bezala;
Egindako akatsei, ikasteko beharra zor diet;
Etsaiei, aurrera egiteko indarra.*

Arrateri, Aitari, bizitza osoa.

*Donostia
2007.ean zehar*

ESKERRAK/AGRADECIMIENTOS.

Tesi hau Euskal Herriko Unibertsitateak aitorturiko beka predoktoralaren bidez izan da finantzatua eta Donostiako Kimika Fakultateko Biokimika II laborategian burutu da. Nire eskerrik beroena azaldu nahi nioke erakunde honi eta baita Gipuzkoako Foru Aldundia eta Hezkuntza eta Zientzia Ministeritzari ere proiektu honen kofinantzazioan parte hartzeagatik.

Tesi hau burutzeko momentuan Unai Ugalde Doktorea izan dut zuzendari. Besarkada bero bat eta nire eskerrik beroena berari, lehenik bizitzan gaztetatik landu nahi izan dudan zientziaren alorrean, Biologia Molekularrean, lan egiteko aukera emateagatik eta, bigarrenik, denbora honetan guztian zehar jaso dudan babesagatik eta irakatsi didan guztiagatik, bai ikerkuntzaren inguruan baina, baita bizitzaren inguruan ere. Mila esker guztiagatik, Unai!

La presente tesis ha sido financiada por una beca predoctoral concedida por la Universidad del País Vasco, habiéndose desarrollado en el laboratorio Bioquímica II de la Facultad de Ciencias Químicas de San Sebastian. Me gustaría trasladar mi agradecimiento más sincero a esta Institución, así como, a la Diputación Foral de Gipuzkoa y el Ministerio de Educación y Ciencia, por haber participado en la cofinanciación de este proyecto.

Durante el desarrollo de la presente tesis he tenido el placer de contar con el Dr. Unai Ugalde como director. A él un sentido abrazo y mi más sincero agradecimiento, en primer lugar, por haberme dado la oportunidad de trabajar en la disciplina de la Ciencia en la que he querido trabajar desde joven, la Biología Molecular; y en segundo lugar, por todo el apoyo recibido y por todo lo que me ha enseñado, tanto en torno a la investigación como sobre la vida. ¡Gracias por todo, Unai!

A Eduardo Espeso, codirector de mi proyecto de tesis doctoral, no sabría enumerarle la interminable lista de cosas que tengo que agradecerle. En primer lugar, la ayuda desinteresada que me proporcionó al principio de la tesis y los conocimientos básicos necesarios que me transmitió para manipular *Aspergillus nidulans*. En segundo lugar, el haberme permitido realizar estancias en su laboratorio, lo que me ha dado la oportunidad de obtener resultados que no hubiera logrado sin su ayuda. Pero sobre todo, gracias por las lecciones de compañerismo que me ha transmitido, probablemente sin darse cuenta, tras lo cual lo aprecio y admiro tanto en lo profesional como en lo personal. ¡Gracias de verdad, Edu!

Asímismo, no puedo olvidar agradecer a todos los compañeros que he tenido la oportunidad de conocer en su laboratorio y el de Miguel Ángel Peñalva. Gracias sobre todo a Elena Reoyo y Lidia Araujo pero, también a Miguel Angel por sus consejos, y por su ayuda a Javi, América, Olga, Antonio, Juan Francisco, Ane, Juan Carlos, José Manuel y a los que se me pasan sin mencionar. Ha sido muy enriquecedor conocerlos y trabajar junto a vosotros, y si hay suerte, lo seguirá siendo.

Ezin dut ahaztu, era berean, lau urte hauetan Donostian kide izan dudan jende guztia. Bai izandakoak bai direnak. Shandra, Isabel, Eider, Renée, Ana, Erika, Arkaitz, Mikel, Gaizka, Susana eta Idoiari, mila esker eskeinitako laguntzagatik. Eskerrak bereziki Aitorri, elkarrekin lanean ikasi eta sufritutako guztia hor geratzen delako. Bestetik, Alfonso Arevalillori ere eskertu nahi dizkiot era eskuzabalean informatikaren inguruan irakatsitako guztiak eta zortetik onena opa diot bere proiektuekin.

Igualmente, no puedo olvidar a todos los compañeros que he tenido estos cuatro años en el laboratorio de Donostia. A los que han sido y a los que son. Shandra, Isabel, Eider, Renée, Ana, Erika, Arkaitz, Mikel, Gaizka, Susana e Idoia. Gracias sobre todo a Aitor, porque todo lo que hemos aprendido y sufrido trabajando juntos queda ahí. Por otro lado, quiero agradecer a Alfonso Arevalillo todos los conocimientos de informática transmitidos de forma desinteresada y le deseo lo mejor en sus proyectos.

Bukatzeko, ezin dut ahaztu Madrileko Pilar, han egon naizen bitartean hainbeste arratsaldetan elkarrizketa lagun izan dudana. Ezin ditut ahaztu ere, nola ez, senideak, azkenaldian hainbeste sufritu duten lagunak, eta batez ere, hainbeste lagundu didan, hainbeste jasan nauen eta hainbeste maite dudan Arrate.

Zuon guztion laguntzarik gabe ez zen posible izango. Mila esker guztioi!

No puedo terminar sin agradecer a Pilar de Madrid las amenas conversaciones de las que he podido disfrutar durante mis estancias allí. Y, cómo no, es imposible olvidar a los familiares y a los amigos que tanto están sufriendo últimamente. Pero sobre todo, no puedo olvidar a Arrate, que tanto me ha ayudado, que tanto me ha soportado y a la que tanto quiero.

Donostia 2007.ean zehar

INDICE GENERAL.

1.Introducción.	1
1.1. Introducción a <i>Aspergillus nidulans</i> : Características generales.	3
1.2. Crecimiento vegetativo.	5
1.3. Reproducción asexual.	11
1.3.1. Estímulo inductor de la conidiación.	12
1.3.2. Inducción temprana de la conidiación.	14
1.3.3. Ruta central y producción de conidióforos.	17
1.4. Otras fases del ciclo vital: El ciclo sexual y parasexual.	23
1.5. Objetivos experimentales.	25
2.Caracterización fenotípica de dos mutantes aconidiales de <i>Aspergillus nidulans</i> y localización en el genoma de sus mutaciones.	27
2.1. Introducción.	29
2.2. Materiales y Métodos.	30
2.2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.	30
2.2.2. Amplificación de la genoteca en base al plásmido autoreplicativo pRG3-AMA-NotI.	34
2.2.3. Transformación de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i> .	35
2.2.3.1. Obtención de protoplastos.	35
2.2.3.2. Transformación de protoplastos.	37
2.2.4. Extracción de DNA genómico.	38
2.2.5. Transformación de <i>E. coli</i> .	39
2.2.6. Extracción de DNA plasmídico.	39
2.2.6.1. Extracción plasmídica a partir de cultivo en medio líquido.	39
2.2.6.2. Extracción plasmídica a partir de cultivo en medio sólido.	39
2.2.7. Clonaje de AN0721.3 y AN7542.3: Oligonucleótidos y procedimientos utilizados.	40
2.3.Resultados.	41
2.3.1. Crecimiento de los mutantes BD12 y BD13 en medio sólido.	41

2.3.2.	BD12 y BD13 presentan mutaciones recesivas.	42
2.3.3.	Análisis fenotípico de los mutantes BD12 y BD13 en medio sólido con agotamiento de nutrientes.	43
2.3.4.	Análisis fenotípico de los mutantes BD12 y BD13 en medio con KCl.	44
2.3.5.	Experimentos de vecindad.	45
2.3.6.	Técnicas de genética clásica para la localización de las mutaciones de BD12 y BD13.	48
2.3.7.	Clonaje de genes que complementan el fenotipo aconidial de BD12 y BD13.	50
2.4.	Discusión.	54
 3.Caracterización de FlbB y rasgos fenotípicos del mutante $\Delta flbB$ y los mutantes BD11, BD12 y BD14.		57
3.1.	Introducción.	59
3.2.	Materiales y métodos.	60
3.2.1.	Cepas utilizadas, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.	60
3.2.2.	Transformación de protoplastos.	62
3.2.3.	Amplificación y secuenciación del cDNA de <i>flbB</i> .	62
3.2.4.	Extracción de DNA genómico.	63
3.2.5.	Extracción de RNA total.	63
3.2.6.	Generación de la construcción genómica para la obtención del mutante $\Delta flbB$.	64
3.2.7.	Obtención de imágenes.	65
3.2.8.	Hibridación DNA-DNA mediante técnica de Southern-Blot.	65
3.2.9.	Hibridación RNA-DNA mediante técnica de Northern-Blot.	67
3.2.10.	Obtención del plásmido de sobreexpresión.	69
3.2.11.	Software empleado.	69
3.2.12.	Número de acceso de <i>flbB</i> .	69
3.3.	Resultados.	70
3.3.1.	AN7542.3 es identificado como <i>flbB</i> (=vegA).	70
3.3.2.	<i>flbB</i> codifica un posible factor de transcripción tipo bZIP.	70
3.3.3.	Análisis de las mutaciones de las cepas BD11, BD12 y BD14.	74

3.3.4. Generación del mutante nulo $\Delta flbB$.	74
3.3.5. Análisis fenotípico de los mutantes en $flbB$ en medio sólido.	75
3.3.6. Análisis fenotípico de los mutantes en $flbB$ en medio líquido.	77
3.3.7. Estudio de la expresión de $flbB$ y $brlA$ en fondos genéticos silvestre y $\Delta flbB$.	79
3.3.8. La sobreexpresión de $flbB$ causa la inhibición de la conidiación en una cepa silvestre.	80
3.4. Discusión.	81
4. Estudio de la capacidad de unión al DNA del dominio bZIP de FlbB.	85
4.1. Introducción.	87
4.2. Materiales y Métodos.	88
4.2.1. Cepas utilizadas, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.	88
4.2.2. Construcción y purificación de las fusiones GST::FlbB _{bZIP} y GST::FlbB _{bZIPG70R} .	89
4.2.3. Electroforesis de poliacrilamida.	90
4.2.4. Anillamiento de oligonucleótidos para ensayos de retardamiento en gel.	90
4.2.5. Marcaje radioactivo de sondas para Ensayos de Movilidad Electroforética.	91
4.2.6. Ensayos de retardamiento en gel.	91
4.2.7. Obtención de extractos proteicos.	92
4.2.8. Obtención de la fusión GST::FlbB _{bZIPG70R} .	92
4.2.9. Construcción de plásmidos para el análisis de la unión del bZIP de FlbB a promotores específicos.	93
4.3. Resultados.	93
4.3.1. La región de unión al DNA dentro del dominio bZIP de FlbB se encuentra conservada respecto a la de Pap1.	93
4.3.2. El bZIP de FlbB une <i>in vitro</i> las secuencias diana definidas para el factor de transcripción Pap1.	95
4.3.3. La fusión GST::FlbB _{bZIP} presenta una baja especificidad Respecto a las secuencias diana definidas para Pap1.	96
4.3.4. El residuo Gly70 de FlbB se requiere para una correcta unión del bZIP al DNA	97

4.3.5.GST:: <i>FlbB</i> _{bZIP} forma varios complejos de retardamiento Inespecíficos con fragmentos del promotor de <i>brlA</i> .	98
4.3.6.EMSAs con extractos protéicos de <i>A. nidulans</i> .	102
4.4.Discusión.	103
5.Estudio de la localización subcelular de FlbB.	107
5.1.Introducción.	109
5.2.Materiales y Métodos.	110
5.2.1.Cepas utilizadas, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.	110
5.2.2.Obtención de imágenes.	113
5.2.3.PCR de fusión.	113
5.2.4.Generación de cepas a analizar mediante fluorescencia.	113
5.3.Resultados.	114
5.3.1.Las proteínas quiméricas GFP:: <i>FlbB</i> y <i>FlbB</i> ::GFP son funcionales.	114
5.3.2.Localización subcelular de <i>FlbB</i> en hifas vegetativas.	115
5.3.3. <i>FlbB</i> se localiza en la célula mediante procesos energía- dependientes.	119
5.3.4.La localización subcelular de <i>FlbB</i> depende del del citoesqueleto de actina, pero no de los dímeros de tubulina.	119
5.3.5.Localización subcelular de <i>FlbB</i> en mitosis	121
5.3.6.Localización subcelular de <i>FlbB</i> en fondo genético Δ <i>sfgA</i> .	122
5.3.7.Localización subcelular de <i>FlbB</i> en fondo genético Δ <i>fluG</i> .	124
5.3.8.Localización subcelular de <i>FlbB</i> tras la exposición al medio aéreo.	126
5.3.9.Localización subcelular de <i>FlbB</i> durante la producción de conidióforos.	126
5.4.Discusión.	146
6.Discusión general.	133
6.1.Una visión renovada del proceso de inducción temprana	135
6.2.Relación entre secuencia peptídica de <i>FlbB</i> y su localización apical.	137
6.3.Importación de <i>FlbB</i> al núcleo y unión al DNA.	139

6.4. Procesos celulares en los que podría participar FlbB: Análisis Filogenético del dominio bZIP.	142
6.5. Conidiación en <i>Aspergillus nidulans</i> : Estímulo inductor y posibles Funciones de los factores de inducción temprana.	145
7. Conclusiones.	151
8. Bibliografía.	155
9. Anexos.	

INDICE FIGURAS.

1.Introducción.

Figura 1.1: Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .	4
Figura 1.2: Morfogénesis en <i>Aspergillus nidulans</i> .	5
Figura 1.3: Componentes de complejos protéicos implicados en el crecimiento polar en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	7
Figura 1.4: Ciclo de elongación y reducción de los microtúbulos.	9
Figura 1.5: <i>Spitzenkörper</i> en <i>Aspergillus nidulans</i> .	10
Figura 1.6: Diferentes etapas morfológicas en el proceso de formación de conidióforos maduros.	18
Figura 1.7: <i>Locus brlA</i> .	19
Figura 1.8: Estructuras ligadas a la reproducción sexual.	23

2.Caracterización fenotípica de dos mutantes aconidiales de *Aspergillus nidulans* y localización en el genoma de sus mutaciones.

Figura 2.2.1: Amplificación de la genoteca pRG3-AMA-NotI.	35
Figura 2.2.2: Esquema de situación de fases en primera etapa de purificación de protoplastos.	37
Figura 2.3.1: Crecimiento radial de los mutantes BD12 y BD13.	42
Figura 2.3.2: Fenotipo de los diploides formados por BD64/BD58 y GR5.	42
Figura 2.3.3: Efecto de la dilución del medio mínimo en glucosa en el fenotipo de BD13 y BD12.	44
Figura 2.3.4: Efecto en el fenotipo de BD13 y BD12 de la adición al medio mínimo de KCl.	45
Figura 2.3.5: Experimentos de complementación extracelular.	46
Figura 2.3.6: Efecto de mutaciones en el <i>locus argB</i> en los experimentos de complementación extracelular.	47
Figura 2.3.7: Transformantes conidiantes de las cepas BD101 y BD109.	50
Figura 2.3.8: Región genómica identificada a partir de la secuenciación de plásmidos que revierten el fenotipo aconidial de la cepa BD101.	51
Figura 2.3.9: Fenotipo de transformantes del parental BD101.	51
Figura 2.3.10: Región genómica identificada a partir de la secuenciación	

de un plásmido capaz de revertir el fenotipo aconidial de la cepa BD109.	52
Figura 2.3.11: Región genómica identificada a partir de la secuenciación de tres plásmidos que revierten el fenotipo aconidial de la cepa BD109.	53
3.Caracterización de FlbB y rasgos fenotípicos del mutante $\Delta flbB$ y los mutantes BD11, BD12 y BD14.	
Figura 3.2.1: Esquema representativo del proceso de PCR de fusión para la generación del mutante nulo de <i>flbB</i> .	64
Figura 3.3.1: Secuencia del cDNA de <i>flbB</i> .	70
Figura 3.3.2: Predicción para la estructura espacial del bZIP de FlbB.	71
Figura 3.3.3: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbB.	72
Figura 3.3.4: Árbol filogenético de los dominios bZIP identificados en hongos filamentosos y levaduras.	73
Figura 3.3.5: Generación del mutante nulo de <i>flbB</i> .	75
Figura 3.3.6: Caracterización fenotípica de mutantes de <i>flbB</i> en medio sólido.	76
Figura 3.3.7: Caracterización fenotípica de mutantes de <i>flbB</i> en medio líquido.	78
Figura 3.3.8: Expresión de <i>flbB</i> y <i>brlA</i> en fondos genéticos silvestre y $\Delta flbB$.	80
Figura 3.3.9: Sobreexpresión de <i>flbB</i> en fondo genético silvestre.	81
4.Estudio de la capacidad de unión al DNA del dominio bZIP de FlbB.	
Figura 4.3.1: Alineamiento respecto al dominio bZIP de homólogos de Pap1 y FlbB.	94
Figura 4.3.2: Alineamiento de las regiones responsables de la unión al DNA de las proteínas de <i>A. nidulans</i> con elevada conservación respecto al mismo dominio de Pap1	95
Figura 4.3.3: Ensayo de unión de la fusión GST:: <i>FlbB</i> _{bZIP} a las secuencias AP-1 y PLD.	95
Figura 4.3.4: Ensayo de unión de la fusión GST:: <i>FlbB</i> _{bZIP} a las secuencias AP-1 mutantes.	97

Figura 4.3.5: Ensayo de retardamiento en gel con las fusiones GST::FlbB _{bZIP} y GST::FlbB _{bZIPG70R} y las sondas AP-1 y PLD.	98
Figura 4.3.6: EMSAs analizando la posible unión de GST::FlbB _{bZIP} a secuencias de los promotores de <i>brlA</i> y AN7223.3 o AN10909.3.	101
Figura 4.3.7: EMSAs con extractos protéicos recogidos a las 18 horas de crecimiento vegetativo, con sondas AP-1 o PLD e inhibidores específicos poli(dIdC) y poli(dAdT).	102

5. Estudio de la localización subcelular de FlbB.

Figura 5.3.1: Marcaje con GFP de FlbB.	116
Figura 5.3.2: Localización subcelular de FlbB en hifas vegetativas.	117
Figura 5.3.3: Localización subcelular de FlbB en germínulas e hifas vegetativas de diferente antigüedad.	118
Figura 5.3.4: Localización subcelular de FlbB en medios con acida y fluoruro sódicos, latrunculina B y benomilo.	120
Figura 5.3.5: Localización subcelular de FlbB en mitosis.	122
Figura 5.3.6: Localización subcelular de FlbB en fondo genético Δ <i>sfgA</i> .	124
Figura 5.3.7: Localización subcelular de FlbB en fondo genético Δ <i>fluG</i> .	125
Figura 5.3.8: Localización subcelular de FlbB tras la exposición al medio aéreo.	126
Figura 5.3.9: Localización subcelular de FlbB en diferentes estadios de la producción de conidióforos.	128

6. Discusión general.

Figura 6.1: Posible NLS bipartita de FlbB.	140
Figura 6.2: Árbol filogenético de los dominios bZIP identificados en <i>Aspergillus nidulans</i> .	143

7. Conclusiones.

8. Bibliografía.

9. Anexos.

Figura A.1: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbA.

Figura A.2: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbC.

Figura A.3: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbD.

ÍNDICE TABLAS.

1.Introducción.

2.Caracterización fenotípica de dos mutantes aconidiales de *Aspergillus nidulans* y localización en el genoma de sus mutaciones.

Tabla 2.2.1: Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas.	30
Tabla 2.2.2: Medios de cultivo y disoluciones de partida.	31
Tabla 2.2.3: Soluciones empleadas en la obtención y transformación de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i> .	36
Tabla 2.2.4: Soluciones y volúmenes añadidos en la preparación de la solución de lisis para la extracción plasmídica a partir de cultivo sólido.	40
Tabla 2.2.5: Oligonucleótidos utilizados.	40
Tabla 2.3.1: Número de haploides aislados a partir de cuatro diploides formados entre BD57 o BD65 y FGSCA68 o FGSC283.	48
Tabla 2.3.2: Resultados estadísticos de la segregación de los marcadores <i>pyroA4</i> y <i>riboB2</i> de las cepas maestras respecto al fenotipo aconidial de BD57 y BD65.	49
Tabla 2.3.3: Valores y porcentajes globales para los marcadores <i>pyroA4</i> y <i>riboB2</i> .	49

3.Caracterización de FlbB y rasgos fenotípicos del mutante *ΔflbB* y los mutantes BD11, BD12 y BD14.

Tabla 3.2.1: Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas.	60
Tabla 3.2.2: Oligonucleótidos utilizados.	60
Tabla 3.3.1: Mutaciones caracterizadas en las cepas BD11, BD12 y BD14.	74

4.Estudio de la capacidad de unión a DNA del dominio bZIP de FlbB.

Tabla 4.2.1: Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas.	88
Tabla 4.2.2: Oligonucleótidos utilizados.	88
Tabla 4.3.1: Clasificación de los genes que portan en sus promotores las secuencias AP-1 o PLD.	99

5. Estudio de la localización subcelular de FlbB.

Tabla 5.2.1: Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas. 110

Tabla 5.2.2: Oligonucleótidos utilizados. 111

6. Discusión general.

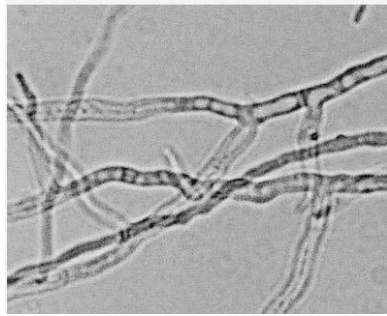
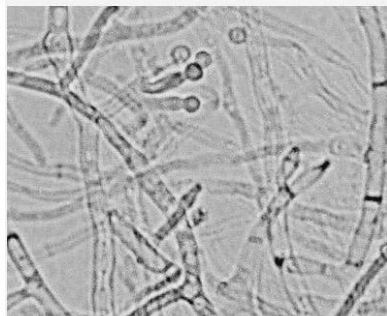
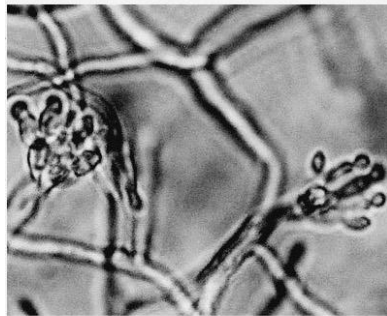
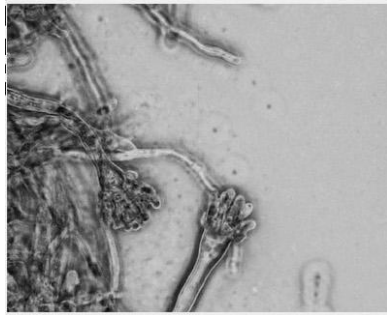
7. Conclusiones.

8. Bibliografía.

9. Anexos.

ABREVIATURAS.

(c)DNA	Ácido Desoxirribonucleico (complementario)
(m)RNA	Ácido Ribonucleico (mensajero)
3'UTR	Región 3' no transcrita
bZIP	Dominio de cremallera de leucina
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-Diamidino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina-5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato
DIG	Digoxigenina
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de Movilidad Electroforética (Retardo en Gel)
EtOH	Etanol
GFP/mRFP/YFP	Proteína fluorescente verde/monomérica roja/amarilla
GST	Glutación-S-transferasa
GTP/GDP	Guanosín 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]etanosulfónico
MMA	Medio mínimo <i>Aspergillus</i>
MMR	Medio mínimo de regeneración
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico
NLS/NES	Señal de localización/exportación nuclear
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PSA	Persulfato amónico
RNAse	Ribonucleasa
ROS	Especie reactiva de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TEMED	N,N,N,N-tetrametilendiamina



1. Introducción.

1.1. INTRODUCCIÓN A *Aspergillus nidulans*: CARACTERÍSTICAS

GENERALES.

Aspergillus nidulans (*Emericella nidulans*) se incluye entre las 12.500 y 15.000 especies estimadas en la división de los Ascomycetos. Dentro de la clase Eurotiomycetos, pertenece a la familia Trichocomaceae (Pontecorvo *et al*, 1953; Thorn y Raper, 1945). Su genoma ha sido secuenciado y consta de 30,06 millones de pares de bases (Galagan *et al*, 2005), calculándose alrededor de 10700 genes codificantes a lo largo de sus ocho cromosomas. Los datos disponibles en torno a su genoma se encuentran accesibles en la base de datos del Instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html).

Es la única especie dentro de su género capaz de formar esporas sexuales mediante meiosis (ver más adelante) y su naturaleza homotálica permite el cruce sexual entre dos cepas cualesquiera, incluso la entrada en este ciclo dentro de la misma colonia (Dyer *et al*, 2003). Ha sido utilizado en estudios de genética y biología celular en eucariotas, y las técnicas de biología molecular disponibles en el organismo permiten diferentes abordajes experimentales como, por ejemplo, el etiquetado y reemplazamiento génicos, análisis de la localización subcelular de proteínas o análisis proteómicos (Nayak *et al*, 2006; Yang *et al*, 2004). Por ello, constituye el modelo genético de referencia para otros miembros asexuales y heterotálicos de gran interés económico dentro de su género, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en medicina, como *A. fumigatus*. También ha sido objeto de estudios fundamentales como la recombinación y reparación del DNA, control de ciclo celular y del metabolismo tanto primario como secundario (Nierman *et al*, 2005), permitiendo, en este último caso, la identificación de genes implicados en enfermedades metabólicas de origen genético en humanos (Peñalva, 2001).

El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* se caracteriza por la presencia de cuatro estadios bien definidos (Pontecorvo *et al*, 1953; Timberlake, 1990; Adams *et al*, 1998; Todd *et al*, 2007a; Todd *et al*, 2007b) que quedan esquematizados en la figura 1.1: crecimiento vegetativo (figura 1.1C), reproducción asexual (figura 1.1D), reproducción sexual (figura 1.1A), y el ciclo parasexual (figura 1.1B).

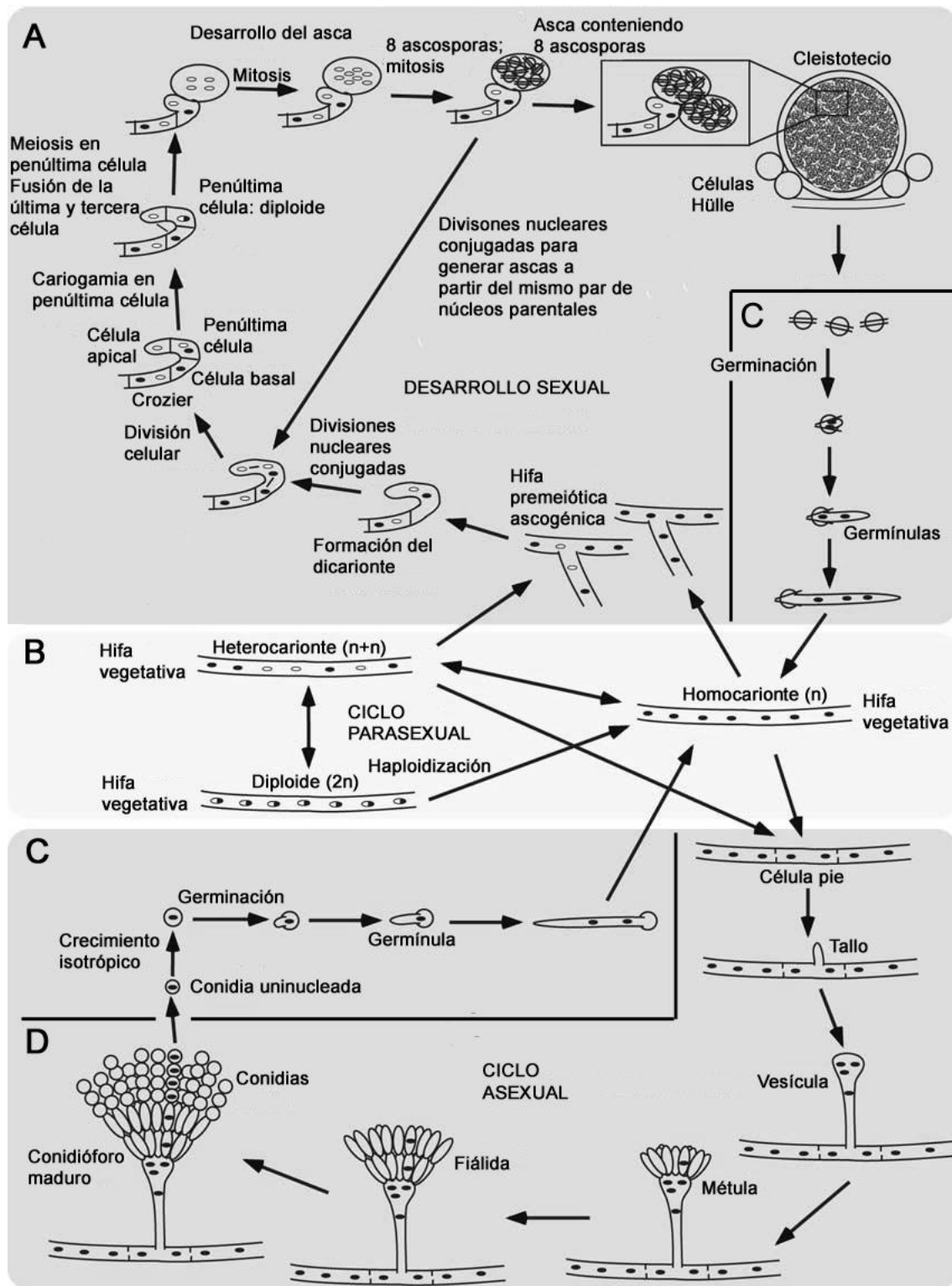


Figura 1.1: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. A) Desarrollo sexual: esquema del proceso de formación de cleistotecios conteniendo ascosporas en su interior; B) Ciclo parasexual: formación de diploides o heterocariotes; C) Crecimiento vegetativo, o polar, a partir de una espóra asexual o sexual; D) Ciclo asexual: proceso de formación de conidióforos. Modificado a partir de Todd *et al* (2007a).

1.2. CRECIMIENTO VEGETATIVO:

El ciclo vegetativo en *Aspergillus nidulans* se inicia tras la germinación de una espóra con el establecimiento de la polaridad (figura 1.2; Harris, 1997; Momany, 2002; Harris y Momany, 2004). Ello conlleva el transporte de toda la maquinaria necesaria hasta un punto concreto (d'Enfert, 1997; Osherov y May, 2001). Generada la polaridad, emerge el tubo de la germínula y la hifa se extiende apicalmente a través de la adición de nuevo material a la pared celular en la punta (Momany, 2002). Las hifas vegetativas de *Aspergillus nidulans* son sincitios multinucleados que mantienen el crecimiento polar o apical durante la mitosis (Riquelme *et al*, 2003; Horio y Oakley, 2005; Horio, 2007).

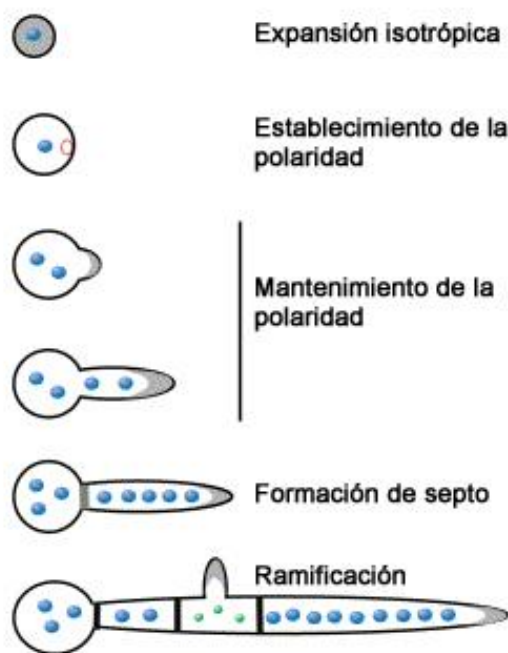


Figura 1.2: Morfogénesis en *Aspergillus nidulans*. Las zonas grises señalan las zonas de crecimiento. Los círculos azules representan núcleos en interfase y los verdes núcleos en mitosis. El círculo rojo abierto señala el punto de establecimiento de la polaridad. Modificado a partir de Momany (2002).

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 (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 que puede resultar en la interconexión de diferentes ramificaciones mediante anastomosis, dando lugar al micelio (Hickey *et al*, 2002; Glass *et al*, 2004). La formación de septos requiere la participación de otros factores como las septinas (Westfall y Momany, 2002), el

citoesqueleto de actina (Momany y Hamer, 1997), y las forminas (Harris *et al*, 1997). El citoesqueleto de actina y las forminas participan también en el mantenimiento del crecimiento apical y serán más ampliamente tratados más adelante.

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, 2007a). En *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los efectores clave en la activación del crecimiento polar es Cdc42 (Pruyne y Bretscher, 2000). Esta GTPasa tipo Rho es activa cuando se encuentra unida a GTP pero inactiva con GDP.

En primer lugar, el factor Cdc24 es reclutado en el punto seleccionado para el establecimiento del crecimiento polar (figura 1.3; Zheng *et al*, 1995). Es este factor el que, a su vez, recluta a Cdc42-GDP y promueve el intercambio para generar la forma Cdc42-GTP activa (Richman *et al*, 2002; Ziman *et al*, 1993). En este momento Cdc42-GTP recluta el adaptador Bem1, encargado de estabilizar a Cdc24 en el punto de polarización (Butty *et al*, 2002; Gulli *et al*, 2000; Sohrmann y Peter, 2003). La señal de Cdc42-GTP es transmitida a multitud de efectores que finalmente activan la formación del citoesqueleto necesario para un correcto crecimiento polar. Finalmente, las proteínas activadoras de la actividad GTPasa Rga1, Bem2 y Bem3 estimulan la hidrólisis de GTP a GDP, inactivando Cdc42 e inhibiendo el crecimiento polar (Stevenson *et al*, 1995; Kim *et al*, 1994; Knaus *et al*, 2007).

Esta maquinaria para el establecimiento del crecimiento polar está altamente conservada en hongos filamentosos. Sin embargo, la importancia de ciertos elementos como Cdc42 varía en cada organismo. Así, en hongos dimórficos y filamentosos cercanos evolutivamente a *S. cerevisiae*, como *Ashbya gossypii* o *Candida albicans*, mutaciones en los homólogos de Cdc42 son en muchos casos letales. En hongos más distantes evolutivamente como *A. nidulans*, *Magnaporthe grisea*, *Penicillium marneffeii*, *Ustilago maydis* o *Wangiella dermatitidis*, no parece que Cdc42 sea esencial (Harris y Momany, 2004). En estos casos se ha identificado una segunda proteína con actividad GTPasa Rho, denominada Rac, la cual, sí parece ser esencial para el crecimiento polar. No se han identificado homólogos de Rac en *S. cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, y aunque no existen pruebas concluyentes al respecto, se ha planteado la posibilidad de que Rac y Cdc42 presenten una actividad redundante en estos

organismos, pudiendo llegar el primero a compensar parcialmente la pérdida de Cdc42 (Harris y Momany, 2004). Normalmente, la redundancia de actividades es el prelude de la generación de nuevas actividades especializadas, y aunque no se hayan identificado aún, es posible que Rac y Cdc42 ya cumplan funciones divergentes en algún proceso morfogénico no específico de hongos filamentosos, como puede ser la formación del conidióforo.

Una de las consecuencias de la activación del complejo Cdc42 en levadura es la formación del citoesqueleto de actina. El 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 (figura 1.3; 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).

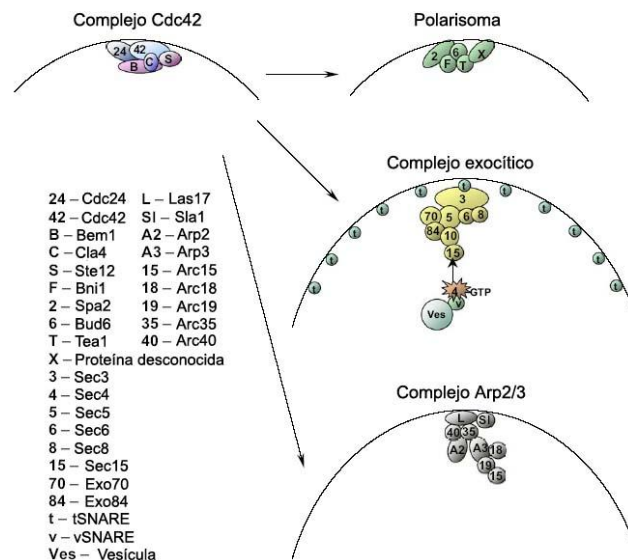


Figura 1.3: Componentes de los complejos implicados en el crecimiento polar en *S. cerevisiae*. El complejo Cdc42 interacciona con los otros tres complejos señalados. La nomenclatura se describe en la imagen. Modificado a partir de Virag y Harris (2006a).

La mayoría de componentes del polarisoma se encuentran conservados en *A. nidulans*. La formina SepA es la homóloga de Bni1 (Sharpless y Harris, 2002). SepA es mantenida en los puntos de polarización por la proteína exclusivamente fúngica MesA, (Pearson *et al*, 2004), y los homólogos de otros componentes del polarisoma en levadura, como Spa2 y Bud6, han sido recientemente caracterizados también (SpaA y

BudA; Virag y Harris, 2006b). SepA y BudA se localizan también en los puntos de septación (Harris, 2001; Viragy Harris, 2006b), por lo que, a pesar del alto grado de conservación de muchos de los componentes del complejo, existen también diferencias entre los mecanismos de levadura y hongos filamentosos.

El complejo Arp2/3 regula la formación de filamentos de actina ramificados que se ensamblan en las inmediaciones de la membrana plasmática del ápice que se extiende. Los componentes de este complejo en levadura como Las17/Bee1, Arp2 o Arp3, o Myo3 (figura 1.3; Lechler *et al*, 2001), también parecen estar altamente conservados en *A. nidulans*. Así, por ejemplo, MyoA, homólogo de Myo3 de levadura, se requiere para el establecimiento de la polaridad y organización del citoesqueleto de actina en *A. nidulans* (McGoldrick, 1995). MyoA pertenece a otra familia de proteínas denominadas miosinas. Esta familia se encarga del transporte de vesículas y moléculas a través de los cables de actina, siendo capaces de unirlos y moverse a lo largo de ellos (McGoldrick *et al*, 1995). Las miosinas están involucradas en procesos de exo y endocitosis a través de los cables de actina (Steinberg, 2007b), procesos esenciales para el mantenimiento del crecimiento polar (Pruyne *et al*, 2004). Todas las miosinas presentan un dominio motor que confiere movilidad, pero, las secuencias C y N-terminal alrededor de este dominio pueden tener diferente naturaleza. Se distinguen así varias familias de miosinas, y una de ellas, la clase XVII, es exclusivamente fúngica (Hodge y Cope, 2000).

Por otro lado, el complejo exocítico participa en el anclaje de vesículas y su fusión con la membrana plasmática (figura 1.3; Lipschutz y Mostov, 2002). En levadura este complejo consta de ocho proteínas que interactúan con otros complejos, como por ejemplo Cdc42. En hongos filamentosos se han identificado homólogos de los componentes del complejo exocítico de levadura, indicando un alto grado de conservación. Mutaciones en estos genes afectan a diferentes aspectos del establecimiento y mantenimiento del crecimiento polar (Seiler y Plamann, 2003). La especificidad de la fusión de las diferentes vesículas a la membrana apical es conferida por diferentes tipos de proteínas SNARE (Gupta y Heath, 2002).

Todas estas analogías en cuanto a los complejos proteicos descritos (polarisoma, Arp2/3 o el complejo exocítico) sugieren una conservación mecánica en levadura y

hongos filamentosos en cuanto al ensamblaje de los filamentos de actina y el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polar (Harris y Momany, 2004), aunque no se deben obviar especificidades de cada tipo de organismo.

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 RNA y otros complejos protéicos (Steinberg, 2007a). La importancia de estas estructuras en el crecimiento polar varía en cada organismo; en *Aspergillus nidulans* contribuyen a un correcto crecimiento polar, pero no parecen ser imprescindibles para ello (Horio y Oakley, 2005). En mitosis median en una correcta segregación cromosómica, mientras que en la interfase, forman largas estructuras que llegan hasta el ápice. Se forman al unirse las subunidades α y β en un punto determinado de nucleación y se elongan mediante la adición de dímeros (α/β) en el extremo plus (figura 1.4; Desai y Mitchison, 1997), mientras que los extremos minus suelen ser menos activos. El desensamblaje de los microtúbulos también se da en el extremo plus, en un proceso llamado catástrofe (figura 1.4). Al final se puede dar la desaparición total del microtúbulo o la recuperación de su crecimiento.

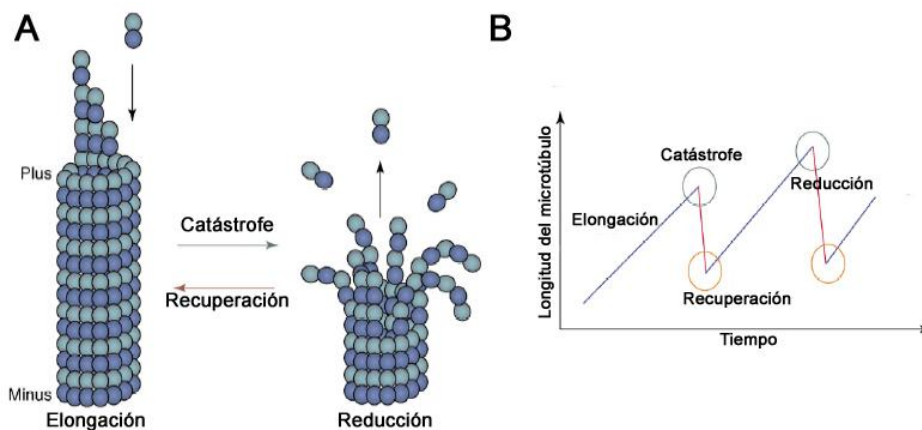


Figura 1.4: Ciclo de elongación y reducción de los microtúbulos. A) Estructuración y desestructuración de microtúbulos según fase catastrófica o de recuperación, siempre a partir de su extremo plus. B) Mismo proceso a lo largo del tiempo. Adaptado a partir de Steinberg (2007a).

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 plus del microtúbulo, mientras que las Dineínas lo hacen en sentido contrario.

Ambos tipos de moléculas, Quinesinas y Dineínas, son necesarias entre otras para un correcto establecimiento del *Spitzenkörper* (figura 1.5; Seiler *et al*, 1997; Riquelme *et al*, 2002; Konzack *et al*, 2005). Éste es una zona definida inicialmente como cuerpo apical (Girbardt, 1957) que coincide espacial y temporalmente con los componentes relacionados con el crecimiento polar en el ápice de las hifas y que desaparece cuando el crecimiento polar cesa (figura 1.5; Virag y Harris, 2006a). Sus movimientos preceden y dirigen el crecimiento de la punta (Reynaga-Peña, 1997; Riquelme *et al*, 2000), siendo esencial para el crecimiento polar (Bartnicki-García, 1995).

El *Spitzenkörper* acumula multitud de micro (30-40nm) y macrovesículas (70-120nm) transportadas desde las zonas distales de la célula a través de los microtúbulos. Dentro del *Spitzenkörper*, en cambio, serían los microfilamentos de actina los que controlarían la organización de vesículas y su transporte a la membrana plasmática (figura 1.5; Harris *et al*, 2005). En este sentido, el *Spitzenkörper* podría percibirse como el punto encargado de la organización y el suministro de vesículas al ápice (Bartnicki-García *et al*, 1989), en el que se pasa de un transporte basado en los microtúbulos a uno basado en los microfilamentos de actina (Harris *et al*, 2005).

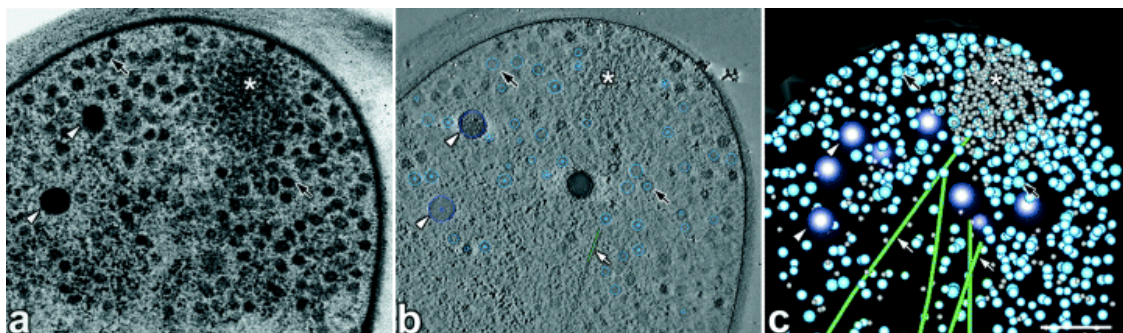


Figura 1.5: *Spitzenkörper* en *Aspergillus nidulans*. Imágenes mostrando el cuerpo apical (cuyo eje se señala mediante asterisco) y el citoplasma que lo rodea en una hifa silvestre de *Aspergillus nidulans*. A) Imagen TEM estándar (200nm de grosor; 200kV); B) Corte de alrededor de 5nm a lo largo del eje Z. Las vesículas apicales se señalan mediante flechas negras, los microtúbulos mediante flecha blanca y los cuerpos de Woronin, sobre los que se desconoce si guardan relación con el crecimiento polar, mediante puntas de flecha blancas; y C) Modelo mostrando una distribución en tres dimensiones del citoplasma apical. Barra de escala: 250nm. Modificado a partir de Harris *et al*, 2005; y Hohmann-Marriott *et al*, 2006.

Aunque la composición del *Spitzenkörper* en un mismo ápice puede ser variable en el tiempo y la especie (Virag y Harris, 2006a), se ha descrito la presencia en él de filamentos de actina, microtúbulos, y complejos protéicos descritos anteriormente, como el polarisoma. También hay multitud de ribosomas y se ha demostrado, por un lado, que muchas de las vesículas que recibe provienen del aparato de Golgi a través de un proceso de exocitosis controlada; y, por el otro, que en diferentes organismos hay varios factores implicados en un correcto crecimiento polar que son trasladados selectivamente a los puntos de polarización en forma de mRNA y que son traducidos *in situ* (Aronov *et al.*, 2007; Zarnack y Feldbrugge, 2007; Inglis y Johnson, 2002; Becht *et al.*, 2006). Por todo ello, se ha planteado que el *Spitzenkörper* es una estructura dinámica compuesta por diferentes complejos protéicos interaccionando de cara al mantenimiento del crecimiento polar (Harris *et al.*, 2005), aunque se desconozca su relación exacta con él.

En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que, aunque el crecimiento vegetativo es la suma de las extensiones del conjunto de las hifas en un micelio, éste se comporta como una unidad, coordinando a través de diferentes mecanismos las distintas formas celulares y los procesos morfogenéticos.

1.3. REPRODUCCIÓN ASEXUAL:

El ciclo asexual en *Aspergillus nidulans* tiene por objeto la propagación del organismo. Esto se consigue con la producción de conidióforos, que a su vez generan hasta 10.000 esporas cada uno (Adams *et al.*, 1988). Las esporas asexuales, o conidias cuentan con un bajo contenido en agua, escaso movimiento citoplásmico, y una alta pigmentación, las cuales les permiten soportar condiciones adversas asociadas a su método de dispersión (Gregory, 1966).

Aproximadamente 16 horas después de la germinación, algunas hifas que emergen al medio aéreo muestran las primeras evidencias fenotípicas de especialización, diferenciándose los primeros conidióforos (Champe y Simon, 1992; Lee y Adams, 1994b). Este proceso culmina en 6-8 horas tras la exposición al aire con la formación de nuevas esporas (Champe y Simon, 1992).

A medida que la colonia se expande radialmente, nuevas hifas van emergiendo al medio aéreo, produciéndose la consiguiente generación de nuevos conidióforos. Así, el inicio de la diferenciación asexual va dejando los conidióforos más antiguos en el centro y los más recientes en los extremos, unos dos milímetros por detrás del frente de la colonia, constituido por células vegetativas (Adams *et al*, 1998).

El ciclo de reproducción asexual puede dividirse en tres etapas: Recepción del estímulo inductor, inducción temprana de la conidiación y producción de conidióforos. A continuación se describirá brevemente cada una de ellas.

1.3.1. Estímulo inductor de la conidiación.

En la bibliografía se han descrito diferentes estímulos inductores que desencadenan la conidiación, como la emergencia a un medio aéreo, el agotamiento de nutrientes o altas presiones osmóticas. A través del estudio de estos estímulos se han planteado diferentes hipótesis en torno a los mecanismos por los que el proceso puede inducirse (Adams *et al*, 1998). La exposición del micelio al medio aéreo es probablemente el estímulo más fuerte a la hora de inducir la conidiación (Morton, 1961). En condiciones que inducen el crecimiento y al igual que la mayoría de hongos, *Aspergillus nidulans* no conidia en medio líquido, pero, sí es capaz de hacerlo en medio sólido, tras su exposición al aire. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de inducción de la conidiación sincronizados que entrañan el paso del cultivo líquido al sólido (Axelrod, 1972; Law y Timberlake, 1980), y que han sido empleados también con éxito en esta tesis.

Para explicar la inducción por emergencia al medio aéreo se han planteado diferentes hipótesis. En un principio se postuló que la emergencia al medio aéreo suponía una nueva situación de estrés para la hifa (Klebs, 1896) y en la misma línea se encuadra un aumento en los niveles de ROS observados en hifas aéreas de *Neurospora crassa* (Hansberg y Aguirre, 1990). Si bien, estudios en *A. nidulans* indican que en ciertas etapas de la reproducción sexual o en la germinación de esporas se da un aumento en los niveles de ROS, no hay evidencia de ello en relación con la conidiación (Lara-Ortiz *et al*, 2003).

Otros estudios han planteado que el estímulo inductor para la conidiación tras la exposición a un medio aéreo tiene que ver con la acción de un metabolito de carácter endógeno, y no a efectos de estrés. En este sentido, Lee y Adams (1994a) obtuvieron un mutante *fluffy* (aconidial con hifas aéreas permanentes) mutado en el gen *fluG* que era deficiente en la producción de un metabolito extracelular. El contacto con una cepa silvestre rescataba el fenotipo silvestre en la cepa *fluG*⁻, aún cuando el contacto tuviera lugar a través de una membrana de diálisis con un diámetro de poro de 6-8kDa. Por otra parte, Roncal *et al* (2002) consiguieron aislar un diterpeno denominado *conidiogenona* que cumplía una función equivalente en *Penicillium cyclopium*. Según estos autores, tras la exposición al medio aéreo, la conidiogenona se acumularía en la superficie de las hifas, alcanzando una concentración suficiente como para provocar una respuesta conidante (Roncal y Ugalde, 2003). De forma análoga, el metabolito inductor de la conidiación en *Aspergillus nidulans* ligado a la acción de FluG ha sido parcialmente caracterizado (Cordobés, 2005). En consecuencia, parece imponerse la concepción de que la emergencia al aire constituye un estímulo incorporado dentro del ciclo de vida del hongo sin necesidad de causar estrés (Adams *et al*, 1992; Roncal *et al*, 2002), aunque no se pueda aún descartar que especies reactivas de oxígeno participen en alguna etapa del proceso.

En varias especies fúngicas, la exposición a un medio aéreo incorpora también la exposición a la luz (Mooney y Yager, 1990; Lauter y Russo, 1991; Betina, 1995). En el caso de *Aspergillus nidulans*, se ha descrito la necesidad de irradiación con luz roja (máximo efecto inductor a 680nm) para que la conidiación tenga lugar (Mooney y Yager, 1990). Esta dependencia respecto a la luz es suprimida por la mutación *veA1*, de manera que las cepas con dicha mutación son capaces de conidiar tanto en presencia como en ausencia de luz. Se ha demostrado que VeA tiene en su secuencia peptídica una señal de localización nuclear funcional y que su importe al núcleo depende de la importina α (KapA; Araujo-Bazán *et al*, 2007) y de la exposición bajo luz (Stinnett *et al* 2007). VeA presenta mayor localización nuclear cuando el hongo es cultivado en oscuridad respecto al cultivo bajo exposición de luz blanca (Stinnett *et al*, 2007). De esta manera, se confirmó que, en ausencia de luz, VeA actúa como represor de la conidiación (Yager *et al*, 1998), y que la luz inhibe dicha represión. En cualquier caso, se ha demostrado que VeA, o sus homólogos están implicados también en otros procesos de diversa naturaleza como la síntesis de metabolitos secundarios (Kato *et al*,

2003; Sprote y Brakhage, 2007), síntesis de manoproteínas (Jeong *et al*, 2003) o la activación de la reproducción sexual en detrimento de la asexual (Kim *et al*, 2002), lo cual indica que su acción es mucho más general.

El agotamiento de nutrientes, y en especial el de la fuente de nitrógeno o carbono, también ha sido descrito como estímulo inductor de la conidiación, tanto en medio líquido como en sólido. Así, en experimentos realizados en cultivo líquido se describieron las pautas de conidiación seguidas por diferentes cepas de *Aspergillus nidulans*, tanto al eliminar la glucosa del medio como al eliminar la fuente de nitrógeno (Skromne, 1995). En ambos casos, se describió una respuesta conidante por parte de la cepa silvestre. Al eliminar la glucosa del medio se generaban conidióforos simplificados mientras que al eliminar la fuente de nitrógeno las estructuras mantenían su complejidad, pero, disminuían en número. Estos resultados llevaron a plantear la posibilidad de que la conidiación también surgiera como respuesta ante algunas situaciones de estrés. En esta línea, una elevada osmolaridad también ha sido identificada como estímulo inductor de la conidiación en diversos miembros del género *Penicillium* (Morton, 1961), y en *Aspergillus nidulans*, se puede inducir en cultivos líquidos mediante la adición de NaCl (0,8M) al medio (Lee y Adams, 1996). En medio sólido, también se puede inducir en ciertos mutantes aconidiales (Adams *et al*, 1998), y se ha descrito la existencia de osmosensores involucrados en la señalización de la conidiación, como el sistema de dos componentes formado por *tcsA* y *tcsB* (Virginia *et al*, 2000; Furukawa *et al*, 2002). Estas evidencias permiten concluir que existen diversas vías para inducir la conidiación, en las que intervienen factores distintos.

1.3.2. Inducción temprana de la conidiación.

Los diversos estímulos mencionados anteriormente deben ser percibidos por sensores celulares y traducidos a señales intracelulares que propicien una respuesta morfogénica compleja. Entre la recepción de los estímulos y la expresión de los primeros genes específicos de la respuesta, se han identificado elementos que, si bien se expresan en la fase de crecimiento vegetativo, son esenciales para el proceso. Estos elementos definen la ruta de inducción temprana de la conidiación (Adams *et al*, 1998). Muchos de los mutantes aconidiales se encuentran afectados en esta etapa de inducción temprana (Martinelli y Clutterbuck, 1971). Entre todos estos elementos de inducción temprana, se han identificado seis cuyos mutantes presentan un fenotipo comunmente

denominado “*fluffy*”, en el que el rasgo común es un crecimiento vegetativo sin diferenciación, formando colonias que recuerdan a una forma algodonosa (Dorn, 1970; Martinelli y Clutterbuck, 1971; Tamame *et al*, 1983; Wieser *et al*, 1994). Los mutantes en los genes *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE* y *fluG* (Lee y Adams, 1994a; Wieser *et al*, 1994) han sido caracterizados en mayor o menor medida, si bien su relación con el proceso de inducción es mayormente desconocida hasta la fecha.

fluG ha sido descrito como el elemento conocido que actúa mas cerca del estímulo. Los mutantes en *fluG* presentan un fenotipo aconidial que puede ser revertido si entran en contacto con una cepa conidiante. Este efecto se ha adjudicado a la incapacidad de producir un metabolito responsable de señalar la emergencia al aire (Lee y Adams, 1994). La sobreexpresión de *fluG*, por el contrario, provoca la conidiación en cultivo líquido (Lee y Adams, 1996; D’Souza, 2001).

La señal ligada a la actividad de FluG inactiva la represión ejercida por los factores Sfg (Seo *et al*, 2006). Sus mutantes actúan como supresores de *AfluG* (Seo *et al*, 2003). Las mutaciones identificadas se agruparon en cuatro grupos, cada uno de ellos definido por alelos de los *loci sfgA*, *sfgB*, *sfgC* y *sfgD* (supresor of fluG mutation). *sfgA* es el único elemento caracterizado hasta la fecha. Codifica un posible regulador transcripcional con dominio de dedo de zinc tipo Zn(II)₂Cys₆ (Schjerling y Holmberg, 1996; Seo *et al*, 2006) y su sobreexpresión inhibe la conidiación. Su expresión se da principalmente durante el crecimiento vegetativo, y en niveles inferiores durante la reproducción asexual.

SfgA regula negativamente la expresión de *flbA*, por un lado, y la de *flbB*, *flbC* y *flbD*, por el otro, efecto que es inhibido por la acción del metabolito ligado a FluG (Seo *et al*, 2006). Los mutantes en *flbA* se caracterizan por una autólisis general (Wieser *et al*, 1994) que puede ser revertida mediante cultivo en medio con NaCl (0.8M; Lee y Adams, 1996), produciendo esporas viables. *flbA* se expresa durante todo el ciclo de vida de *A. nidulans* (Lee y Adams, 1994b) y se propuso una regulación post-transcripcional de su expresión, extremo que no ha sido confirmado.

flbA codifica una proteína con dominio RGS. Las proteínas con este dominio actúan como reguladores de la señal de una proteína G. En el caso relacionado

con FlbA, la proteína G heterotrimérica está formada por *fadA*, codificando la subunidad α (Yu *et al*, 1996), *sfaD*, codificando la subunidad β (Rosen *et al*, 1999) y *gpgA*, que codifica la subunidad γ (Seo *et al*, 2005), y es activa cuando se encuentra uniendo GTP. De esta manera, se permite la proliferación del micelio y se inhibe la conidiación (Yu *et al*, 1996). Sin embargo, la actividad GTPasa de FlbA ejerce un control negativo sobre la proteína G heterotrimérica. De esta manera, impidiendo su unión a GTP, se inhibe la proliferación del micelio y se promueve la conidiación. Así, cabe hablar de dos vías de señalización antagónicas: crecimiento vegetativo y reproducción asexual. Otra proteína con dominio RGS, RgsA, controla negativamente la actividad de *ganB*, en una ruta paralela a la señalizada por FlbA en la que se controla la activación de la conidiación en función de los niveles de carbono y situaciones de estrés (Han *et al*, 2004). El nivel de expresión de *rgsA* es mayor durante el crecimiento vegetativo que durante la reproducción asexual o sexual, ciclos durante los cuales también se expresa. Al igual que *flbA*, se ha planteado que la regulación de su expresión se da a través de un mecanismo post-transcripcional (Han *et al*, 2004), extremo que tampoco ha sido confirmado. En cualquier caso, la existencia de esta ruta paralela añade más complejidad y más incógnitas en cuanto a las diferentes rutas genéticas que confluyen en la activación de la ruta central de conidiación (apartado 1.3.3).

Los mutantes en *flbB*, *flbC* y *flbD* fueron identificados como mutantes de esporulación retardada (Wieser *et al*, 1994). En estos casos, la conidiación tiene lugar en el centro de la colonia mientras que las zonas periféricas mantienen un fenotipo característico “*fluffy*”. Los mutantes en estos genes, son capaces de esporular en contacto con una cepa silvestre, y a su vez, provocar extracelularmente la reversión del fenotipo aconidial de mutantes *fluG⁻* (Lee y Adams, 1996). Estos datos indican la existencia de al menos una segunda señal implicada en la inducción de la conidiación. Todos los genes codifican proteínas con dominios de unión a DNA, por lo que se postulan como posibles reguladores transcripcionales (Adams *et al*, 1998).

flbD ha sido parcialmente caracterizado (Wieser y Adams, 1995). Su dominio de unión a DNA es del tipo c-myb (Majello *et al*, 1986; Lüscher y Eiseman, 1990), y al igual que en los casos de *flbA* o *rgsA*, se expresa durante el crecimiento vegetativo. Se ha propuesto que su expresión está regulada a nivel post-transcripcional, pero esto no ha sido confirmado. *flbB* se caracteriza en la presente tesis y el único dato

conocido sobre *flbC* es que codifica una proteína con un dominio de dedo de zinc del tipo C2H2 (Adams *et al.*, 1998; Iuchi, 2001).

flbE actuaría a la misma altura que *sfgA*, y aguas arriba de *flbB*, *flbC* y *flbD* (Seo *et al.*, 2006). Los mutantes en este gen también han sido definidos como de esporulación retardada y no se han hallado dominios funcionales conocidos en la secuencia peptídica que se deriva del gen (Wieser *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1998). Sin embargo, y en base al fenotipo de los mutantes *flbE*, su actividad es imprescindible para una correcta inducción de la conidiación.

La posición relativa de los genes *flb* en la ruta de inducción temprana fue definida en base al estudio del fenotipo de todos los dobles mutantes posibles y en base a experimentos de sobreexpresión de *flbD* en los fondos genéticos mutantes del resto de genes *flb* (Wieser, 1994; Wieser y Adams, 1995). De esta manera se planteó que *flbD* y *flbB* actuaban en una misma ruta y en este orden; que *flbC* actuaba paralelamente a ellos, y que *flbA* actuaba en una tercera ruta paralela de la manera descrita previamente. La posición en la ruta de *sfgA* respecto a los genes *flb*, en cambio, se planteó únicamente en base a experimentos de epistasia, atendiendo a los rasgos fenotípicos de dobles mutantes $\Delta sfgA$; $\Delta flbB-E$ (Seo *et al.*, 2006). De esta manera, se situó a *flbE* a su misma altura. Sin embargo, los resultados obtenidos no parecen ser suficientes para asumir tal esquema. No se han realizado experimentos sobreexpresando el resto genes *flb* en los fondos genéticos mutantes, tal y como se hizo con *flbD*. Tampoco se ha analizado la posible relación de estos genes con respecto a otros elementos que, aunque en principio pertenecen a otras rutas de inducción, son necesarios para activar la expresión de *brlA*; ni tampoco se ha analizado la posible relación de estos elementos respecto a otros estímulos inductores de la conidiación.

1.3.3. Ruta Central y Producción de conidióforos.

Tras la recepción de los estímulos inductores, la ruta de inducción temprana permite activar, la síntesis de todas las estructuras ligadas a la formación de conidióforos en *Aspergillus nidulans*. Este proceso comprende varias etapas, cada una ligada a la consecución de un cambio morfológico determinado (Timberlake, 1990; Adams *et al.*, 1998). Así, se comienza con la formación del tallo, que emerge mediante extensión apical a partir de la denominada célula pie (figura 1.6A; Adams *et al.*, 1998).

El tallo es 1-2 μ m más ancho que las células vegetativas y, al contrario que éstas, no suele formar ramificaciones. Su longitud puede alcanzar los 100 μ m en *A. nidulans* (Mims *et al*, 1988).

Tras la formación del tallo, el crecimiento apical cesa y en la punta comienza a formarse una protuberancia, la vesícula (figura 1.6B), que alcanza hasta los 10 μ m de diámetro. No existe septación entre la vesícula y el tallo, por lo que éstos, junto con la célula pie, forman una única estructura.

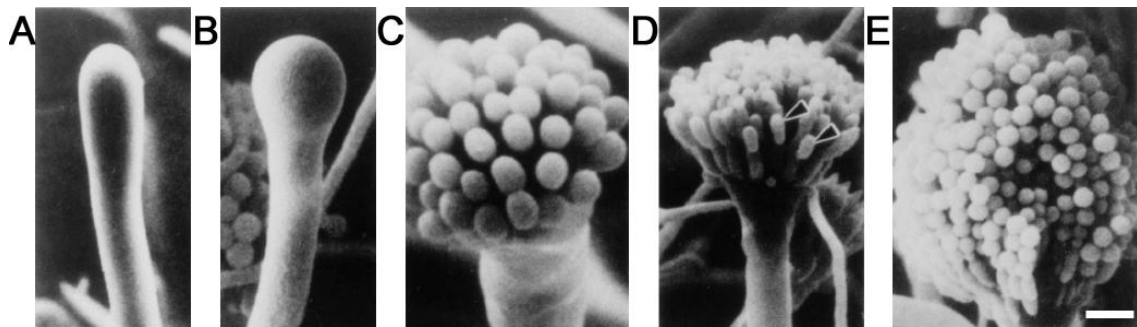


Figura 1.6: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a las diferentes etapas morfológicas en el proceso de formación de conidióforos maduros. A) Tallo; B) Vesícula; C) Métula; D) Fiálida; E) Conidióforo maduro. Modificado a partir de Mims *et al*, 1988.

A partir de cada vesícula se forman alrededor de 60 métulas, cada una de ellas formada por una célula uninucleada (figura 1.6C; Mims *et al*, 1988). Las métulas se dividen para formar una capa de alrededor de 120 fiálidas, en un proceso que tiene lugar de manera polarizada, por lo que las dos fiálidas producidas a partir de cada métula se generan en la parte más alejada de la vesícula (figura 1.6D). A su vez, a partir de las fiálidas se generan, por división, cadenas de esporas uninucleadas o conidias, las cuales, mantienen su propia autonomía (figura 1.6E). Cada fiálida puede llegar a generar más de cien conidias, por lo que cada conidióforo puede albergar más de 10000.

La formación de conidióforos requiere la activación controlada de la expresión de numerosos genes, así como la represión de otros (Timberlake, 1980; Timberlake, 1990). El factor de transcripción *brlA* constituye el elemento central de la ruta genética de conidiación, puesto que se trata del primer gen que se activa en el proceso de conidiación específicamente, el primero que es común a todos los estímulos, y finalmente, el gen cuya activación es imprescindible para que tengan lugar todos los cambios morfogénéticos sucesivos. El fenotipo de los mutantes nulos de *brlA* ha sido

definido como “*bristle*”, debido a que se bloquea la formación de la vesícula, de manera que el desarrollo queda bloqueado en el tallo, dando una apariencia de cerdas o pelos gruesos que emergen de la superficie (figura 1.7A; Clutterbuck, 1969).

brlA codifica una proteína con dominio de dedo de zinc tipo C2H2 (Adams *et al*, 1988; Adams *et al*, 1990; Iuchi *et al*, 2001), y se ha demostrado que su expresión es necesaria y suficiente para inducir la conidiación (Adams y Timberlake, 1990).

La regulación de la expresión de *brlA* es un complejo proceso en el que se han identificado dos transcritos, llamados *brlA α* y *brlA β* , los cuales, se acumulan en niveles detectables a partir de la formación de vesículas (Prade y Timberlake, 1993). La transcripción de *brlA β* comienza alrededor de 1Kb aguas arriba de la de *brlA α* , la cual, a su vez, comienza entre las secuencia intrónicas de *brlA β* (figura 1.7B; Prade y Timberlake, 1993).

brlA β codifica dos secuencias, una de longitud limitada denominada μ ORF, y otra, aguas abajo, que codifica el mismo polipéptido que *brlA α* , pero, con 23 aminoácidos adicionales en la región N-terminal. Aunque mutaciones en cada uno de estos transcritos causan un desarrollo anormal, la sobreexpresión de cualquiera de ellos compensa la ausencia del otro. En cualquier caso, se desconocen tanto el mecanismo de acción de cada uno de los péptidos derivados de dichos transcritos como la relación funcional entre ellos.

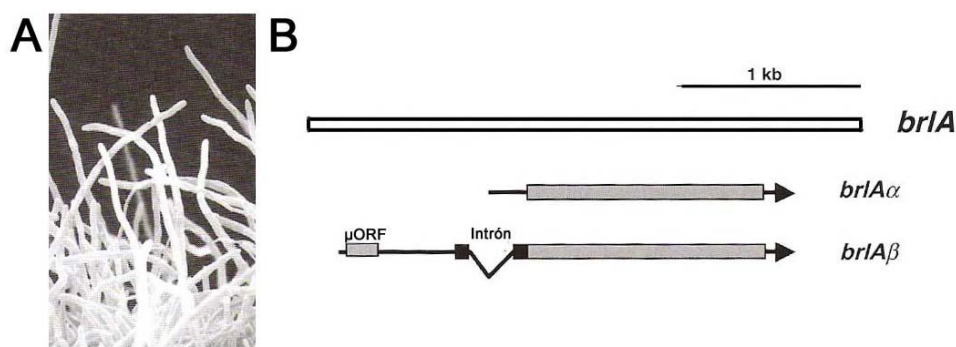


Figura 1.7: Locus *brlA*. A) Fenotipo del mutante nulo de *brlA*, formando únicamente el tallo. B) Diagrama representativo del locus correspondiente a *brlA*. Los transcritos se señalan mediante flecha y las secuencias codificantes se señalan mediante recuadros grises. La extensión aguas arriba de *brlA β* , interrumpida por un intrón, se señala mediante recuadro negro. Modificado a partir de Kües y Fischer, 2006.

Situado aguas abajo de *brlA*, otro elemento importante en la ruta de conidiación es *abaA*. Codifica un péptido con dominio de unión a DNA tipo ATTS (Andrianopoulos y Timberlake, 1991), por lo que se postula como otro posible regulador transcripcional de la ruta. El mutante nulo de *abaA* es incapaz de formar fiálidas, dando lugar a un fenotipo denominado “*abacus*”, en el que se forman conidióforos aconidiales (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al*, 1990b).

La activación de la expresión de *abaA* conlleva la de otros genes involucrados en este proceso como *wetA*, cuyo mutante nulo muestra un fenotipo denominado “*wet-white*”. Estos mutantes generan conidióforos pero, las conidias formadas no presentan pigmentación y sufren un fenómeno autolítico (Sewall *et al*, 1990a). Por ello, aunque en su secuencia peptídica no se ha hallado ningún dominio funcional conocido, se ha planteado que la actividad de WetA es requerida en etapas más tardías de la conidiación, para la síntesis de diferentes componentes de la pared celular de las esporas, actuando así como regulador de la expresión de genes específicos de éstas (Boylan *et al*, 1987; Marshall y Timberlake, 1991).

Estos tres genes, *brlA*, *abaA* y *wetA*, constituyen la ruta central de conidiación, y en coordinación con otros elementos permiten un correcto control de la morfogénesis (Boylan *et al*, 1987; Mirabito *et al*, 1989). *brlA* debe ejercer un control sobre la expresión de *abaA* y *wetA*, ya que, mutaciones en el gen bloquean la expresión de estos últimos (Boylan *et al*, 1987). Por otro lado, además de ser necesario para la formación de vesículas, la expresión de *brlA* también es requerida en etapas posteriores de la conidiación (Clutterbuck, 1970; Mirabito *et al*, 1989)

Una vez activada su síntesis durante la producción de mótulas y fiálidas, AbaA une las secuencias consenso 5'-CATTCY-3', donde Y es una pirimidina (Andrianopoulos y Timberlake, 1994). Se han identificado varios genes conteniendo en su región promotora esta secuencia diana, entre ellos el propio *abaA*, pero también *brlA* y *wetA*, u otros genes que se presentarán más adelante, como *yA* o *rodA*.

Así, por un lado AbaA regula su propia expresión y la de *wetA*. Por el otro, la sobreexpresión de *abaA* provoca la activación de la expresión de *brlA*, mientras

que en mutantes nulos de *abaA*, *brlA* está sobreexpresado. Ello indica que AbaA presenta actividad tanto represora como inductora respecto a *brlA*. Por ello, se planteó un posible papel de AbaA en un mecanismo de regulación hacia atrás de la expresión de *brlA*. Aguirre (1993) propuso que AbaA reprime la expresión de *brlA* en bajas concentraciones pero, la activa a elevadas concentraciones. Por último, la sobreexpresión de *wetA* no activa la de *brlA* ni la de *abaA*, y es incapaz de inducir la conidiación (Marshall y Timberlake, 1991).

Recientemente, ha sido caracterizado el gen *vosA* como un factor de transcripción involucrado en la regulación tanto de la reproducción asexual como sexual (Ni y Yu, 2007). Su delección provoca una activación incontrolada de la reproducción asexual, mientras que su sobreexpresión la bloquea. Por ello, se ha propuesto que *vosA* es un regulador negativo de la conidiogénesis.

La acción de los genes descritos en la ruta central de conidiación es refinada o modificada por la acción de diferentes genes reguladores auxiliares, como, por ejemplo *stuA* o *medA* (Aguirre, 1993; Busby *et al*, 1996; Miller *et al*, 1991; Miller *et al*, 1992). *stuA* codifica un regulador transcripcional con un dominio APSES de unión a DNA (Miller *et al*, 1991; Iyer *et al*, 2002). Las mutaciones en *stuA* (“*stunted*”) provocan la formación de conidióforos extremadamente cortos que carecen de métula y fiálidas, produciendo conidias directamente a partir de la vesícula (Clutterbuck, 1969). La expresión temporal de los genes de la ruta central, *brlA*, *abaA* y *wetA*, es normal en mutantes *stuA*⁻, pero, se genera una expresión deslocalizada de estos genes. Por ello se concluyó que *stuA* participa en el establecimiento de una distribución celular adecuada de estas proteínas (Miller *et al*, 1992).

Igual que en el caso de *brlA*, la regulación de la expresión de *stuA* es compleja, generándose dos transcritos diferentes, *stuA α* y *stuA β* (Miller *et al*, 1992). La transcripción de *stuA α* comienza dentro del primer intrón de *stuA β* , y de forma análoga a *brlA*, ambos transcritos presentan mini ORFs (Miller *et al*, 1992).

Los mutantes en *medA* producen capas múltiples de métulas y fiálidas antes de producir conidias. Ocasionalmente, estos mutantes producen conidióforos

secundarios que a veces producen conidias. Este fenotipo ha sido comunmente denominado “*medusa*” (Busby *et al*, 1996).

Se ha propuesto una regulación post-traducciona también para *medA*, ya que, igual que *brlA* o *stuA*, presenta dos transcritos con diferentes mini ORFs (Miller, 1993). Los niveles de estos transcritos son altos durante el crecimiento vegetativo y disminuyen tras la inducción de la conidiación (Miller, 1993).

En los mutantes *medA*⁻ se han detectado diferencias en los patrones de expresión de *brlA* con respecto a la cepa silvestre. Por un lado, sus dos transcritos son detectados en estadios más tempranos; por otro, los niveles del mRNA de *brlAβ* continúan aumentando durante la morfogénesis, y, por último, el ratio *brlAα/brlAβ* disminuye (Aguirre, 1993; Busby *et al*, 1996; Miller, 1993). Por todo ello, se ha propuesto que *medA* es requerido para la correcta expresión temporal de *brlA*. Además, en algunos mutantes de *medA* se reduce drásticamente la expresión de *abaA* (Busby *et al*, 1996).

Además de los ya mencionados, se han descrito otros elementos que actúan en diferentes niveles de la producción de conidióforos, como la pigmentación o la síntesis de membrana en las esporas. En el primer caso cabe citar a *wA* e *yA*. El primero codifica una policétido sintasa y los mutantes en este gen producen esporas de color blanco que carecen de melanina y una capa externa formada por α -1,3-glucano de la pared de la spora (Mayorga y Timberlake, 1990; Mayorga y Timberlake, 1992). *yA* codifica una *p*-difenol oxidasa conocida como lacasa conidial, y los mutantes en este gen producen esporas amarillas (Clutterbuck, 1972; Law y Timberlake, 1980; Aramayo y Timberlake, 1990). Las mutaciones en *wA* son epistáticas respecto a mutaciones en *yA*, por lo que se planteó que *wA* participa en la síntesis de un policétido amarillo, que es convertido a una forma de color verde a través del producto de *yA* (Mayorga y Timberlake, 1990), proporcionando a las conidias su color característico. Este policétido no ha sido caracterizado aún en *A. nidulans*, pero, sí se ha llegado a aislar y caracterizar un octacétido a partir de una cepa deficiente en lacasa de *Aspergillus parasiticus* (Brown *et al*, 1993).

Por último, *rodA* y *dewA* codifican hidrofobinas (Wessels, 1994) necesarias para conferir a las esporas su carácter hidrofóbico, de cara a una correcta dispersión aérea (Stringer *et al*, 1991; Stringer y Timberlake, 1995). El mutante nulo en *rodA* muestra un fenotipo comunmente denominado “*rodletless*”, en el que las conidias son fácilmente humedecibles debido a la pérdida de una capa de la pared compuesta por hidrofobinas. Ello confiere un color oscuro a la colonia debido a la acumulación de líquido en las conidias. Los mutantes en *dewA* muestran un fenotipo parecido pero, menos extremo, ya que, en este caso sí se mantiene cierta integridad de la capa de hidrofobinas de la que carecen los mutantes *rodA*.

1.4 OTRAS FASES DEL CICLO VITAL: EL CICLO SEXUAL Y PARASEXUAL.

La reproducción sexual en *Aspergillus nidulans* se observa en zonas maduras de la colonia (Pontecorvo *et al*, 1953), y culmina con la producción de ascosporas. El proceso se inicia con la formación de una célula diploide en una estructura característica denominada *crozier* (Figura 1.1A). A partir de la célula diploide se generarán 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*, 2007a). Los cleistotecios se encuentran habitualmente rodeados de grupos de células denominadas células Hülle (figura 1.8). Su función no ha quedado establecida hasta el momento, pero se especula que pueden aportar azúcares y otros nutrientes al cleistotecio.

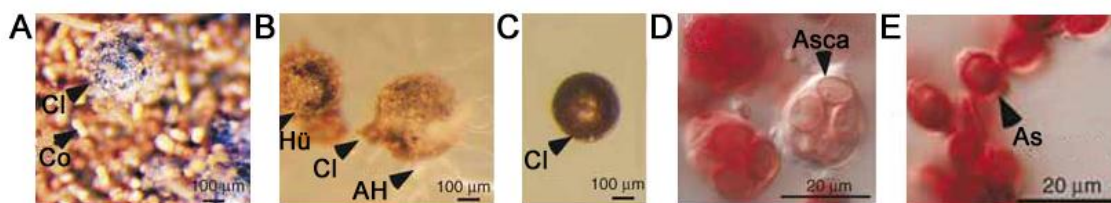


Figura 1.8: Diferentes estructuras ligadas a la reproducción sexual. A) Cleistotecio (Cl) rodeado de conidias (Co); B) Cleistotecios (Cl) rodeados de células Hülle (Hü) e hifas aereas (AH); C) Cleistotecio (Cl) aislado; D) Asca conteniendo ascosporas; E) Ascosporas (As) libres. La barra de escala se define en cada panel. Adaptado a partir de Todd *et al*, 2007a.

Se han identificado y caracterizado diversos genes actuando en diferentes etapas y necesarios para una correcta reproducción sexual. Algunos de ellos, además, son importantes efectores en otros procesos como la reproducción asexual (*medA*: Busby *et*

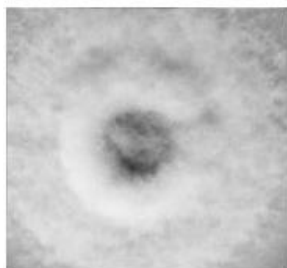
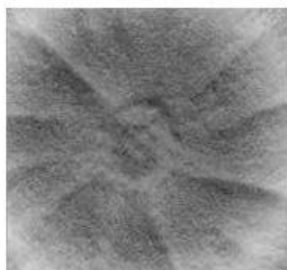
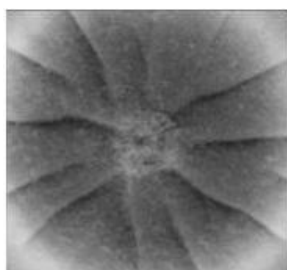
al, 1996; *stuA*: Wu y Miller, 1997; o *flbA*: Han *et al*, 2001), el crecimiento polar (*tubB*: Kirk y Morris, 1991; o *apsA*: Bouhouche *et al*, 2004) o la respuesta al estrés oxidativo (*noxA*: Lara-Ortiz *et al*, 2003). Además, se ha identificado una serie de sustancias de carácter endógeno involucradas en la regulación del balance entre desarrollo sexual respecto al asexual. Dichas sustancias son una serie de oxilipinas (ácidos grasos polienólicos insaturados), denominados factores *psi* (**p**recocious **s**exual **i**nducer), que son derivados hidroxilados (*psiB*: 8'-hidroxi-; *psiC*: 5',8'-dihydroxy-; y *psiA*: anillo de lactona en posición 5') del ácido oléico (*psiβ*), ácido linoléico (*psiα*) y ácido linolénico (*psiγ*) (Tsitsigiannis *et al*, 2004a; Tsitsigiannis *et al*, 2004b; Tsitsigiannis *et al*, 2005; Tsitsigiannis y Keller, 2007).

El ciclo parasexual en *Aspergillus nidulans* (figura 1.1B) se caracteriza por la fusión entre hifas maduras durante la fase vegetativa, dando lugar a un intercambio de material por anastomosis (Hickey *et al*, 2002; Glass *et al*, 2004). El mecanismo desencadenante de dicha fusión es desconocido, pero, se ha planteado la posibilidad de que esté controlado por el comportamiento dinámico del *Spitzenkörper* (Glass *et al*, 2004). 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). Por otro lado, también se puede producir la fusión de núcleos haploides, dando lugar a núcleos diploides, los cuales, pueden ser de nuevo haploidizados a través de la adición de sustancias que interfieren en la segregación cromosómica en la mitosis como, por ejemplo, el benomilo (Upshall *et al*, 1977).

1.5. OBJETIVOS EXPERIMENTALES:

La presente tesis parte de dos mutantes aconidiales aislados tras un programa de mutagénesis con nitrosoguanidina. La selección de dichos mutantes se realizó al observar que su fenotipo era consecuencia de la incapacidad de sintetizar algún factor o molécula necesaria para activar la reproducción asexual (Cordobés, 2005), por lo que su estudio podría permitir profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la activación de la conidiación. Con todo ello, los objetivos perseguidos en el presente proyecto se resumen de la siguiente manera:

- 1-. Caracterización preliminar de los dos mutantes aconidiales aislados en lo respectivo a su comportamiento en terminos de conidiación ante varios de los estímulos inductores descritos en la introducción.
- 2-. Localización en el genoma de *Aspergillus nidulans* de los genes donde se encuentran las mutaciones de los dos mutantes objeto del estudio. Análisis primario de las secuencias genómica y peptídica, y análisis de la presencia de dominios funcionales conocidos.
- 3-. Caracterización de FlbB. Análisis de la secuencia protéica de FlbB, caracterización a nivel genotípico y fenotípico de los mutantes *flbB* disponibles; y estudios de expresión y de diferentes aspectos como la localización subcelular o la capacidad de unión a DNA.
- 4- Revisión, en base a los resultados obtenidos, de los datos disponibles en torno a la ruta de inducción temprana de la conidiación.



2-. Caracterización fenotípica de dos mutantes aconidiales de *Aspergillus nidulans* y localización de sus mutaciones en el genoma.

2.1. INTRODUCCIÓN.

En un estudio anterior, un programa de mutagénesis con nitrosoguanidina en el que se analizaron 35.000 colonias permitió el aislamiento de dos mutantes “*fluffy*” o aconidiales de *Aspergillus nidulans* que fueron denominados BD12 y BD13. Ambos recuperaban el fenotipo conidiante en la zona de contacto con una cepa silvestre conidiante (Cordobés, 2005). Por otro lado, eran capaces de complementar extracelularmente mutantes aconidiales *fluG*, provocando su conidiación en la zona de contacto con ellos. Curiosamente, la zona de contacto entre las dos cepas no resultaba en complementación, al igual que en los controles con dos cepas idénticas. Este efecto de complementación extracelular fue descrito incluso cuando las colonias se encontraban separadas a través de una membrana de diálisis, descartando así la formación de heterocariontes. En el mismo trabajo, se demostró que el fenotipo aconidial de BD12 y BD13 se debía a mutaciones monogénicas localizadas en *loci* diferentes, las cuales, no fueron mapeadas.

En este capítulo se aborda una caracterización más profunda de los mutantes BD12 y BD13. Por un lado, se ha llevado a cabo una caracterización preliminar, describiendo su patrón de crecimiento radial, y su comportamiento en diferentes condiciones inductoras de la conidiación como el agotamiento de nutrientes (Skromne *et al*, 1995) o el estrés salino (Lee y Adams, 1996). También se ha efectuado una revisión de los experimentos de complementación extracelular realizados previamente (Cordobés, 2005). Por el otro lado, se ha abordado la localización en el genoma de *A. nidulans* de cada una de las mutaciones. Para ello, se han diseñado diversos experimentos de genética clásica combinados con procedimientos de biología molecular. En el primer caso, se han realizado haploidizaciones inducidas con benomilo de diploides formados a partir de los mutantes BD12 o BD13 y cepas conteniendo un marcador genético en cada cromosoma. En el segundo caso, se ha realizado una serie de transformaciones de protoplastos de las cepas objeto de este estudio con una genoteca basada en el plásmido autoreplicativo pRG3-AMA-NotI (Oshero *et al*, 2000).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

Las cepas utilizadas en el presente capítulo quedan descritas en la tabla

2.2.1.:

Cepa	Genotipo	Fuente
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
TTA127.4	<i>pabaA1; yA2; ΔfluG::trpC; veA1</i>	Lee y Adams (1994a)
GR5	<i>pyrG89; wA; pyroA4; veA1</i>	Waring <i>et al</i> (1989)
RMSO11	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>	Stringer <i>et al</i> (1991)
MAD782	<i>pyrG89, yA2, pabaA1, biA1; veA1</i>	Eduardo Espeso, CIB-CSIC
BD12	<i>biA1; veA1; mutación aconidial 1</i>	Cordobés, 2005 Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD13	<i>biA1; veA1; mutación aconidial 2</i>	Cordobés, 2005
BD57	<i>ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1; mutación aconidial 1 (progenia de BD12 x RMSO11)</i>	Cordobés, 2005
BD58	<i>yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1; mutación aconidial 1 (progenia de BD12 x RMSO11)</i>	Cordobés, 2005
BD64	<i>pabaA1, yA2; trpC801; veA1; mutación aconidial 2 (progenia de BD13 x RMSO11)</i>	Cordobés, 2005
BD65	<i>ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1; mutación aconidial 2 (progenia de BD13 x RMSO11)</i>	Cordobés, 2005
FGSC A68	<i>suA1ade20; yA2; ade20; acrA1; phenA2; pyroA4; lysB5; sB3; nicB8; riboB2; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
FGSC A283	<i>suA1ade20; yA2; ade20; acrA1; galA1; pyroA4 (ssb+); facA303; sB3; nicB8; riboB2; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
BD101	<i>pyrG89, biA1; ΔargB::trpCΔB; mutación aconidial 2 (progenia de BD65 y MAD782)</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD109	<i>pyrG89, yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; mutación aconidial 1 (progenia de BD57 y MAD782)</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD98	<i>pyrG89, biA1; ΔargB::trpCΔB; mutación aconidial 1 (progenia de BD57 y MAD782)</i>	Este estudio
BD100	<i>pyrG89, pabaA1, biA1; mutación aconidial 2 (progenia de BD65 y MAD782)</i>	Este estudio

Tabla 2.2.1.: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en el presente capítulo.

Los medios y disoluciones utilizados se describen en la tabla 2.2.2.:

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 glucosa (10x)	200g glucosa; Esterilizada por autoclavado.
Disolución de MgSO ₄ (20x)	10,4g MgSO ₄ .7 H ₂ O; Esterilizada por autoclavado.
Medio mínimo sólido con nitrato (MMA sólido).	6,0g NaNO ₃ ; 1,5g KH ₂ PO ₄ 0,5g KCl; 15g agar; 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
Disolución de tartrato amónico (100x)	92g tartrato amónico; 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.
Medio mínimo con tartrato amónico (MMA-tartrato)	20ml de solución de sales; 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 (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 LB	10g triptona; 5g extracto de levadura; 10g NaCl; 15g agar (solo para LB sólido); ajustar a pH=7,0 con NaOH; Esterilizada por autoclavado.

Tabla 2.2.2.: Medios de cultivo y disoluciones de partida utilizados.

Las cepas utilizadas fueron cultivadas en MMA (Käfer, 1965) o MCA, adecuadamente suplementado con los nutrientes necesarios en el caso de mutantes auxótrofos (<http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/supplement.html>). Los experimentos de agotamiento de nutrientes en medio sólido se llevaron a cabo diluyendo el MMA a la mitad y a un tercio en la concentración de glucosa, de nitrato sódico o de todos los componentes a la vez.

Los experimentos bajo estrés salino se llevaron a cabo añadiendo al MMA KCl (0,6M, Sigma) y MES (ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico, Sigma; 0,05M), este último como tamponante del pH del medio (pH=6,5).

Para la realización de las pruebas de complementación extracelular se inocularon las dos cepas a analizar en cada caso en MCA, a una distancia de unos dos centímetros la una de la otra en la misma placa de Petri. Tras 3, 4 y 5 días de cultivo a 37°C, se fotografió la zona de contacto entre ambas colonias con una cámara Nikon

Coolpix8400, acoplada a un binocular Nikon SMZ800. Se utilizaron siempre cepas con diferente color de esporas, de manera que resultaba simple conocer qué colonia conidiaba en cada caso y se evitaban falsos positivos por posible formación de heterocariontes. En los casos en los que fue descrita, la reversión del fenotipo aconidial se dio aun separando las colonias analizadas con una membrana de diálisis (no mostrado en el apartado de resultados), aunque la intensidad de la respuesta obtenida era menor.

Las recombinaciones meióticas se llevaron a cabo según Pontecorvo *et al* (1953), Clutterbuck (1969), Morris (1975) y Käfer (1977). Brevemente, se inocularon los parentales en placas MCA suplementadas con los nutrientes adecuados en el caso de mutantes auxótrofos. Se transfirieron bloques de los bordes fusionados a placas MMA (en caso de que ambas cepas tuvieran alguna auxotrofia común, añadiendo el nutriente asociado a ella). A menudo, el heterocarionte se forma o no en función de la fuente de nitrógeno utilizada, por lo que, se prepararon, por un lado, placas MMA conteniendo nitrato sódico como fuente de nitrógeno, y por el otro, placas MMA conteniendo tartrato amónico. Se cultivó el heterocarionte y, tras ello, se sellaron y se incubaron las placas durante 15 días a 37°C. Se limpiaron algunos cleistotecios formados durante este período y se reventó cada uno de ellos en un tubo de 1,5ml con 300µl de agua estéril, obteniendo una suspensión de ascosporas. En placas MCA con todos los nutrientes necesarios, se inocularon alícuotas de estas suspensiones y tras 2 días de incubación, las colonias obtenidas fueron transferidas a placas nuevas de MCA, bien numeradas en una cantidad de 25 colonias por placa. Tras cultivar las colonias, cada una de ellas se transfirió a placas MMA, en cada caso con todos los nutrientes ligados a las auxotrofías excepto uno, de cara a obtener los genotipos de cada una de las colonias.

Para la construcción de diploides (BD57 o BD65 con FGSCA68 y FGSC283, por un lado; y, BD64 o BD58 con GR5, por el otro) se obtuvo el heterocarionte formado por las cepas parentales y, tras ello, se recogieron y suspendieron en agua estéril las esporas de dicho heterocarionte. Alícuotas de estas suspensiones se mezclaron con MMA sólido selectivo y fundido, y se plaquearon en MMA. Tras solidificarse, se añadió otra capa de agar sobre la primera, de manera que únicamente las esporas que contenían los dos núcleos de las cepas parentales pudieran continuar creciendo.

Para su haploidización, los diploides formados se inocularon en placas con benomilo (1-3µg/ml de medio; Upshall *et al*, 1977; <http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/supplement.html>) y todos los nutrientes asociados a los marcadores de las cepas parentales. Las colonias aconidiales obtenidas se transfirieron secuencialmente dos veces a placas MMA para, después, transferirlas de nuevo a placas de MMA con diferentes suplementos para conocer su genotipo.

Para el estudio estadístico de la segregación de los marcadores de los cruces o haploidizaciones realizados, se empleó el test de χ^2 , con un margen de confianza del 95% y los grados de libertad adecuados en cada caso.

Los diámetros de colonia y de esporulación de las colonias en cada medio ensayado se calcularon a partir de tres medidas y se calcularon las desviaciones estándar respectivas en cada caso. Los diámetros de colonia o de esporulación se midieron determinando el número de píxeles de las imágenes digitales obtenidas.

2.2.2. Amplificación de la genoteca en base al plásmido autoreplicativo pRG3-AMA-NotI.

Se obtuvo una alícuota de la genoteca a utilizar a través del Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net>). Tras confirmar mediante electroforesis de agarosa su buen estado, se procedió a la determinación de la eficiencia de las células de *E. coli* a utilizar en su amplificación (Library Efficiency[®] DH5 α Competent Cells, Invitrogen), obteniendo $5,5 \cdot 10^7$ colonias transformantes por µg de plásmido pUC19 (Invitrogen).

Tras ello, se transformaron las células competentes citadas con la genoteca a amplificar, obteniendo $3,44 \cdot 10^5$ colonias transformantes por µl de genoteca. Para su amplificación, se consideran necesarios 40 equivalentes genómicos. Así, considerando un tamaño medio de plásmido de unos 10Kb y un tamaño de genoma de *A. nidulans* de $3 \cdot 10^7$ pares de bases (Galagan *et al*, 2005), aplicando la fórmula de Clarke y Carbon (1976), se obtiene que un equivalente genómico es igual a 13500 colonias. De modo que, para obtener los 40 equivalentes, se debían obtener un total de $5,5 \cdot 10^5$ colonias transformantes. Para ello, se transformaron 100µl de las células de *E.*

coli utilizadas con 1,8µl de genoteca, se plaqueó toda la mezcla en placas Petri de 14cm con 50ml de medio LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron a 37°C, durante 16 horas.

Una vez desarrolladas las colonias, se recogieron todas ellas con un portaobjetos esterilizado y se resuspendieron en 300ml de medio LB con ampicilina, precalentado a 37°C. Se midió la densidad óptica y se dejó incubando hasta duplicarla. La extracción se realizó utilizando el kit GenElute High Pure Plasmid Maxiprep Kit (Sigma), almacenando las alícuotas obtenidas a -80°C tras verificar el buen estado de la genoteca amplificada (figura 2.2.1).



Figura 2.2.1: Amplificación de la genoteca pRG3-AMA-NotI. Comparación entre la alícuota de la genoteca pRG3-AMA-NotI obtenida a través del Fungal Genetics Stock Center (calle 1, 1µl) y su amplificación (calles 2, 3 y 4) con 1, 2 y 3µl, respectivamente.

2.2.3. Transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans*.

La obtención y transformación de protoplastos se llevó a cabo según Tilburn *et al*, 1983, introduciendo ciertas modificaciones:

2.2.3.1 Obtención de protoplastos:

Se inocularon matraces Erlenmeyer de 1000ml., conteniendo 300ml de MMA líquido y los nutrientes necesarios en caso de mutantes auxótrofos, con suspensiones de conidias de la cepa a transformar a una concentración final de 10^6 conidias/ml.

La suspensión se incubó a 37°C durante 15 horas. El cultivo fue filtrado con Miracloth estéril (Calbiochem) y lavado con agua destilada. 3,0-4,0g de micelio fueron repartidos en dos tubos Falcon estériles de 50ml con 10ml de solución 2 (tabla 2.2.3) cada uno de ellos. Tras la adición de GlucanX (100mg/g micelio; Enocentro S.L., Noblejas, Toledo, España), las mezclas se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 100ml.

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 3 (50ml) MgSO ₄ ·7H ₂ O (1.5M)	18.6g 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 2.2.3.: Soluciones empleadas en la obtención y transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans*.

La mezcla de digestión se incubó a 30°C en un baño de agua, con agitación suave, hasta que la mayor parte de la suspensión de células se compuso de protoplastos libres (~90 min).

Para la purificación de protoplastos, cada una de las mezclas de digestión se pasó a un tubo de polipropileno de 50ml y se diluyó a la mitad añadiendo 10ml de solución 2 (tabla 2.2.3). La mezcla fue transferida a dos tubos Corex (Scharlau) de 30ml (10ml en cada uno) a los que previamente se les habían añadido 8ml de solución 3. Tras ello, y muy lentamente, se añadieron 6ml de solución 5 (figura 2.2.2).

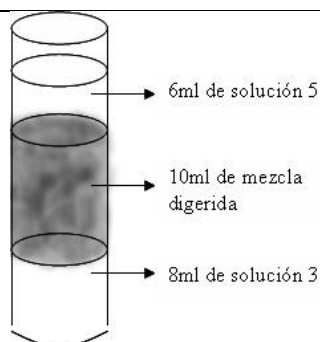


Figura 2.2.2.: Esquema de la situación de cada una de las fases en la primera etapa de purificación de los protoplastos.

Los tubos fueron centrifugados durante 13min, a 4700rpm y 4°C en un rotor Sorvall HS-4. Tras ello, la banda de protoplastos formada en la interfase superior fue transferida a nuevos tubos Corex, añadiendo solución 6 (tabla 2.2.3) en una relación de volúmenes 1(suspensión de protoplastos):2 (solución 6). Una segunda centrifugación durante 10min, a 4000rpm y 4°C provocó la precipitación de los protoplastos que, tras retirar el sobrenadante, fueron suavemente resuspendidos en 1ml de solución 6, en tubos de 1,5ml.

Se lavaron los protoplastos mediante tres centrifugaciones durante 3min, a 4000rpm y se resuspendieron en la cantidad adecuada de solución 7 (tabla 2.2.3) para obtener alrededor de 10^7 protoplastos/ml.

2.2.3.2. Transformación de protoplastos:

Para la transformación, se añadieron a un tubo de polipropileno de 50ml:

- 50µl de solución 8 (tabla 2.2.3).
- El volumen equivalente a alrededor de 300ng de la genoteca pRG3-AMA-NotI 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, 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 diluyó esta mezcla con más medio MMR-TOP precalentado hasta un volumen total de 200ml, utilizando tantos tubos de polipropileno de 50ml como fueran necesarios. Se mezcló y se plaqueó en MMR selectivo (sin uridina ni urácilo) y una placa de MMR no-selectivo (con uridina y urácilo) a modo de control por cada mezcla de transformación.

Tras 20-24 horas de cultivo a 37°C, al observar la germinación de los protoplastos y para evitar la esporulación de los transformantes debido al estrés inducido por sacarosa, se añadieron por encima 7ml de MCA selectivo fundido. Tras enfriar se volvió a incubar a 37°C durante 24 horas más. En una primera selección, aquellos transformantes conidiantes o los sectores conidiantes de transformantes aconidiales se inocularon en placas de MMA sólido selectivo y MCA tanto selectivo como no-selectivo, utilizando siempre los parentales BD101 y BD109 a modo de control, sin transformar y transformados con el plásmido pRG3 vacío. Se seleccionaron los transformantes que conidiaban en medio selectivo o los sectores conidiantes de los transformantes aconidiales. Dichos sectores fueron inoculados en placas nuevas hasta conseguir aislarlos y conseguir colonias homogéneas.

2.2.4. Extracción de DNA genómico:

La extracción de DNA genómico se realizó inoculando matraces Erlenmeyer de 100ml con 30ml de medio mínimo líquido a los que se les habían añadido los nutrientes adecuados. Tras la adición del volumen adecuado de una suspensión de esporas de la cepa a manipular (concentración final: 10^6 esporas/ml), la mezcla se mantuvo a 37°C y 250rpm, durante 15 horas.

A partir del micelio filtrado con Miracloth estéril, lavado con agua destilada y liofilizado, se realizó la extracción de DNA utilizando el Kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Se confirmó la correcta extracción mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) al observar la banda correspondiente al DNA genómico de *A. nidulans* a la altura de 23Kb.

2.2.5. Transformación de *E. coli*:

Se utilizaron células competentes de las cepas *DH1* y *DH5 α* de *E. coli* para su transformación. En un tubo de 1,5ml, se mezclaron 100 μ l de células competentes y la cantidad adecuada de DNA. En términos generales se añadieron unos 100ng de plásmido. En el caso de ligaciones, se añadió todo el volumen de la mezcla y en el caso del DNA extraído a partir de los transformantes conidiantes de *A. nidulans* (conteniendo DNA genómico y plasmídico) se realizaron diferentes transformaciones con cantidades de DNA total entre 0,5 y 2 μ g.

La mezcla se mantuvo en hielo durante 20min, se incubó a 37°C durante 2min 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 plaqueados sobre medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml). En el caso de las ligaciones, y las mezclas de DNA plasmídico y genómico extraída de los transformantes conidiantes, se plaqueó toda la mezcla. En el caso de la amplificación plasmídica, se plaquearon entre 50 y 100 μ l.

2.2.6. Extracción de DNA plasmídico:

2.2.6.1. Extracción plasmídica a partir de cultivo en medio líquido:

La colonia bacteriana con DNA plasmídico a extraer fue inoculada con la ayuda de un palillo estéril en un tubo de polipropileno de 50ml conteniendo 10ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 μ g/ml). Con el tapón del tubo ligeramente desenroscado para una correcta aireación, se cultivó la mezcla a 37°C y 250rpm, durante 15 horas. Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó el Kit GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma). La correcta extracción fue verificada mediante electroforesis de agarosa (0,8% p/v).

2.2.6.2. Extracción plasmídica a partir de cultivo en medio sólido:

Se dispensaron, en un tubo Eppendorf de 1,5ml, 40 μ l de solución de lisis (tabla 2.2.4). Se tomó una muestra de la colonia a analizar con un palillo estéril y, tras mojar ligeramente la punta en la solución de lisis, ésta se apretó contra las

paredes del tubo. Tras mezclar suavemente, se incubó a temperatura ambiente durante 15min, se añadieron 3µl de HCl (1N) y 5µl de tampón de carga de electroforesis. Se verificó que la solución presentaba un color azul; en caso de observar un color verde, debía haberse añadido más solución de lisis hasta que se recuperara el color azul. Se congeló la mezcla a -80°C durante 15min, se centrifugó a 13000rpm y 4°C, durante 10min, y se cargó la mitad del sobrenadante en un gel de agarosa (0,8% p/v) para su análisis.

Componente	Volumen (µl) para 1ml de mezcla
Tris HCl (1M; pH=8,0)	10
EDTA (0,5M; pH=8,0)	20
NaOH (10M)	10
H ₂ O estéril	860
SDS (10%)	100

Tabla 2.2.4: Soluciones y volúmenes añadidos en la preparación de la solución de lisis para la realización de minis de colonia.

2.2.7. Clonaje de AN0721.2 y AN7542.3. Oligonucleótidos y procedimientos utilizados.

Para la secuenciación de los plásmidos extraídos a partir de los transformantes conidiantes de las cepas BD101 y BD109 se utilizaron oligonucleótidos estándar diseñados a partir de los extremos del sitio de clonaje del plásmido pRG3 (tabla 2.2.5):

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Objetivo
pRG3up	GAA TTC GAG CTC GGT ACC	Secuenciación de los extremos del inserto en pRG3.
pRG3 down	AAG CTT GCA TGC GCG GCC	Secuenciación de los extremos del inserto en pRG3.
0721kpn+1	GG (GGTACC) CGC AAA TGC AGA CAA GG	Construcción del plásmido AN0721.3-pRG3
0721kpn-1	GG (GGTACC) CCA TCT TGT CTG ATG GCC	Construcción del plásmido AN0721.3-pRG3
AN0721-1	CAG CTT GGC AGA ATG G	Secuenciación de AN0721.3
AN0721-2	AGG ACC GTT AAC GAT GG	Secuenciación de AN0721.3
AN7542-1	GGT GAG GGT AGA AAG GG	Secuenciación de AN7542.3
AN7542-2	GAC AGG GTG ATT CCA GC	Secuenciación de AN7542.3
AN7542-3	GGG TTT TTC TGA CGT CG	Secuenciación de AN7542.3

Tabla 2.2.5: Oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo. Entre paréntesis queda señalado el sitio de restricción KpnI introducido en los oligonucleótidos 0721kpn+1 y 0721kpn-1.

Para generar las construcciones de *AN0720.2* y *AN0722.2* con pRG3, se realizó la digestión del plásmido 65TG3SE con *BamHI*. Se generaron dos fragmentos, uno de 4KB, conteniendo *AN0722.2* y que fue ligado (ligasa T4, Biolabs) al plásmido pRG3, previamente digerido con *BamHI* y fosfatasa alcalina de gamba (Roche). El segundo fragmento, de 13KB, contenía la secuencia de pRG3 y *AN0720.2*, y fue religado.

Para la construcción entre *AN0721.2* y pRG3, se amplificó un fragmento de 2,2Kb por PCR (GeneAmp[®] PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster City, CA, EEUU), introduciendo una diana de restricción *KpnI* en cada extremo y utilizando los oligonucleótidos 0721kpnI+1 y 0721kpnI-1. Para la amplificación se utilizó la polimerasa AccuTaq[™] LA DNA Polymerase (Sigma). El fragmento amplificado fue ligado a pRG3 previamente digerido con *KpnI* primero y fosfatasa alcalina en segundo lugar.

Para las ligaciones se añadieron a la mezcla de ligación el inserto y el vector en una relación aproximada en moles de 7(inserto):1(vector). En caso de utilizar para la ligación un sitio de restricción igual en ambos extremos, se digirieron unos 300ng de vector con 0,5µl (0,5U) de fosfatasa alcalina (Roche), incubando la mezcla 7min a 37°C, e inactivando el enzima 15min a 65°C. Tras ello, se prepararon las mezclas de ligación en la relación inserto:vector citada y añadiendo 0,5 µl (200U) de DNA ligasa T4 (Biolabs). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 45min. Tras ello, se transformó *E. coli* con toda la mezcla de ligación.

La secuenciación de *AN0721.2* se realizó utilizando los oligonucleótidos *AN0721-1* y *AN0721-2*. En el caso de *AN7542.3*, se utilizaron para su secuenciación los oligonucleótidos *AN7542-1*, *AN7542-2* y *AN7542-3*.

2.3. RESULTADOS.

2.3.1. Crecimiento de los mutantes BD12 y BD13 en medio sólido.

La observación de los dos mutantes en MMA sólido mostró que la extensión radial alcanzada tras 72 horas era diferente con respecto a la cepa silvestre. En

el caso de BD13 la extensión radial alcanzada era un 5% menor en el radio respecto a FGSC26 y en el caso de BD12, un 8,5% menor (figura 2.3.1).



Figura 2.3.1: Crecimiento radial de los mutantes (A) BD13, (B) BD12 y (C) FGSC26, en medio mínimo a las 72 horas desde la inoculación. Barra de escala: 1.0cm.

2.3.2. BD12 y BD13 presentan mutaciones recesivas.

Datos anteriores demostraron que el fenotipo aconidial de BD12 y BD13 se debía a mutaciones monogénicas en *loci* diferentes (Cordobés, 2005); sin embargo, se desconocía si dichas mutaciones eran dominantes o recesivas. Por ello, se obtuvieron diploides de las cepas BD58 y GR5, por un lado, y BD64 y GR5, por el otro. En el caso de mutaciones dominantes, sería de esperar un fenotipo aconidial, similar al de los parentales BD12 o BD13. Sin embargo, ambos diploides mostraron un fenotipo silvestre con esporas verdes, por lo que se concluyó que BD12 y BD13 portaban mutaciones recesivas (figura 2.3.2)

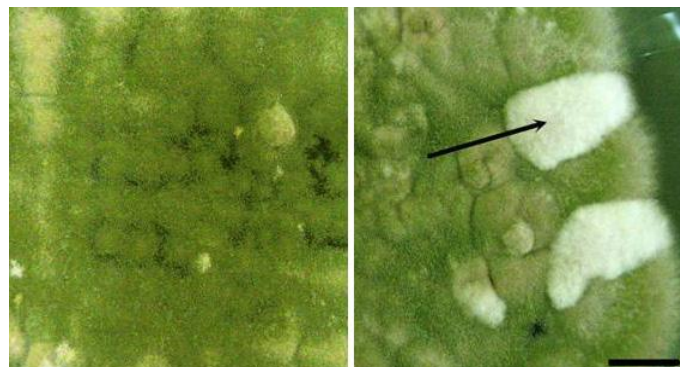


Figura 2.3.2: Fenotipo de los diploides de las cepas BD64 y GR5 (izquierda) y BD58 y GR5 (derecha). La flecha señala uno de los sectores aconidiales. Barra de escala: 1.0cm.

También se observaron sectores aconidiales formados por haploidización espontánea (flecha negra en figura 2.3.2). Estos sectores eran estables en el caso del diploide formado entre BD58 y GR5, por lo que se planteó la posibilidad de que la mutación de BD12 estuviera localizada en uno de los cromosomas donde GR5 presenta sus marcadores (*pyrG89*: cromosoma I; *pyroA4*: cromosoma IV).

2.3.3. Análisis fenotípico de los mutantes BD12 y BD13 en medio sólido con agotamiento de nutrientes.

En cultivo líquido, la eliminación de la fuente de carbono y nitrógeno del medio genera una respuesta conidiante por parte de la cepa silvestre de *A. nidulans*, (Skromne *et al*, 1995). En medio sólido, en cambio, este efecto no se observa por separado, ya que la conidiación es normalmente consecuencia de la exposición de las hifas vegetativas al medio aéreo, siendo éste el estímulo inductor principal. Sin embargo, en general los mutantes de fenotipo “*fluffy*”, y en concreto BD12 y BD13, no conidian en medio sólido tras la exposición al aire. Por ello, es posible estudiar el efecto inductivo que provoca en ellos el agotamiento de diferentes nutrientes del medio sólido.

Así, al diluir el MMA proporcionalmente en todos sus componentes, se observó que ninguno de los dos mutantes conidiaba. Tampoco se produjo cambio alguno en el diámetro de la colonia con respecto al medio mínimo no diluido dentro del rango de diluciones estudiado (no mostrado).

Sin embargo, cuando se analizó el efecto que la dilución por separado de diferentes componentes del medio mínimo provocaba sobre el fenotipo de ambos mutantes, se obtuvieron resultados diferentes. Al diluir el medio en la fuente de nitrógeno o en otros componentes como el sulfato magnésico o los iones dihidrogenofosfato, no se observó esporulación alguna (no mostrado). En el caso de BD12 sí se observó la formación de esporas aisladas asociadas a la dilución del medio en elementos traza. Por último, la dilución en glucosa hizo que ambos mutantes conidiaran en una zona central donde las hifas vegetativas desaparecían, aparentemente a través de un proceso autolítico. Al aumentar la dilución del medio en glucosa, se observó que el diámetro de la zona de esporulación también aumentaba (figura 2.3.3).

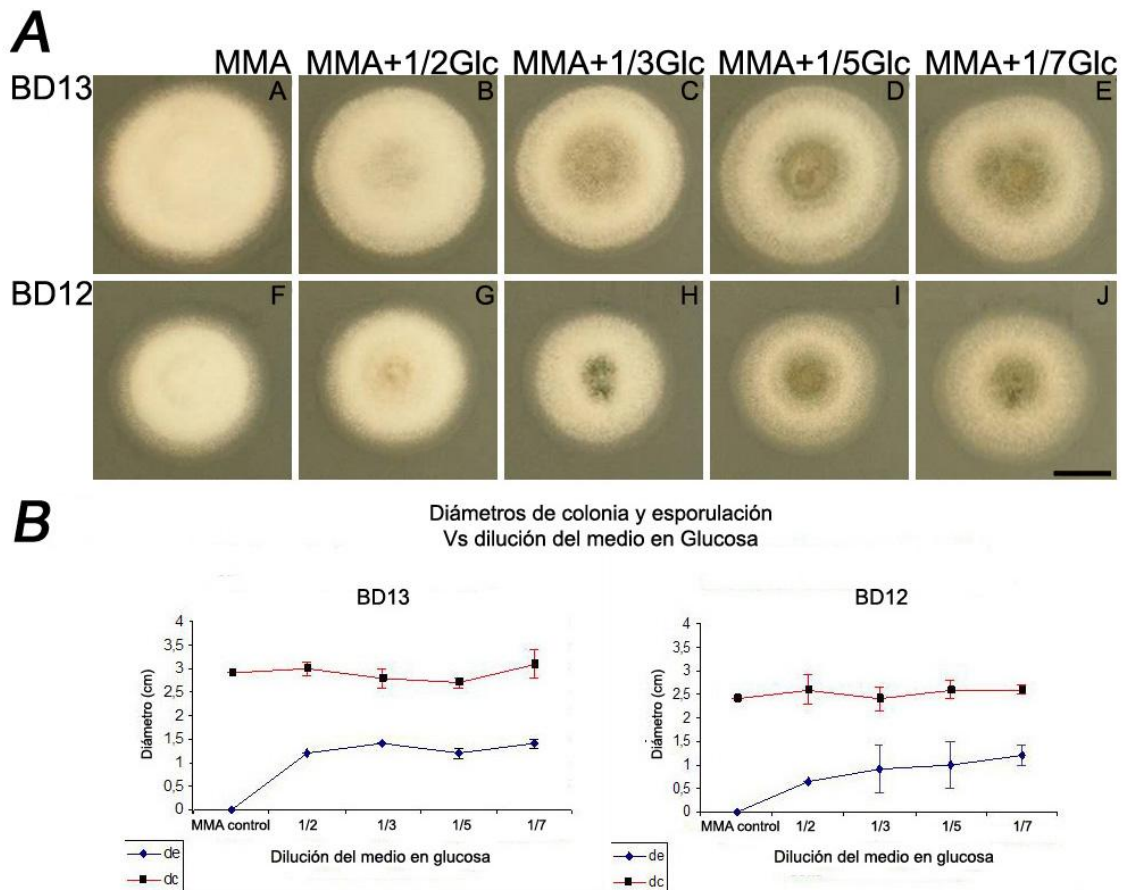


Figura 2.3.3: Efecto de la dilución del medio mínimo en glucosa. A) BD13 (fila superior) y BD12 (fila inferior), a las 72 horas desde la inoculación. A-F) MMA; B-G) MMA diluido en Glucosa a la mitad; C-H) MMA diluido en Glucosa al tercio; D-I) MMA diluido en Glucosa al quinto; E-J) MMA diluido en Glucosa al séptimo. B) Diámetros de colonia y de la zona de esporulación, con sus respectivas desviaciones estándar para BD13 (izquierda) y BD12 (derecha), para cada dilución del MMA en Glucosa. De izquierda a derecha, aumenta la dilución del medio en glucosa. Los valores son la media de tres medidas. dc: Diámetro de colonia; de: Diámetro de la zona de esporulación. Barra de escala: 1.0cm.

2.3.4. Análisis fenotípico de los mutantes BD12 y BD13 en medio con KCl.

El estrés osmótico es otro estímulo inductor de la conidiación en *Aspergillus nidulans*. En cultivo líquido se puede inducir este proceso mediante la adición de NaCl (Lee y Adams, 1996). En medio sólido, también se ha descrito la posibilidad de revertir el fenotipo aconidial y obtener esporas viables de mutantes en *fluG* o *flbA* añadiendo NaCl (0.8M; Lee y Adams, 1996). En el caso de los mutantes BD12 y BD13, ambos mostraron su capacidad de conidiar al cultivarlos en placas con KCl (figura 2.3.4).

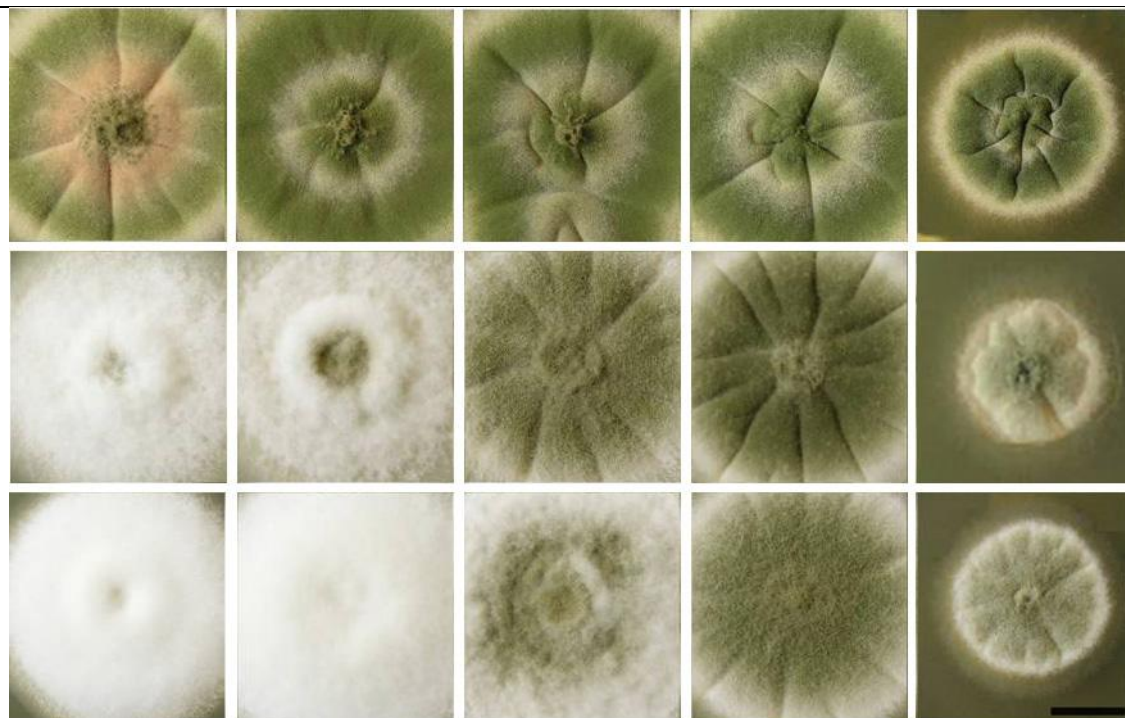


Figura 2.3.4: Efecto de la adición de KCl al medio mínimo. FGSC26 (fila 1), BD12 (fila 2) y BD13 (fila 3), cultivados en placas MMA con KCl, durante 72 horas. Concentraciones de KCl en columnas: 1: 0M (MMA); 2: 0.15M; 3: 0.3M; 4: 0.6M; 5: 1.2M. Barra de escala 1.0cm.

Un aumento progresivo de la concentración de KCl hacía que la zona de esporulación aumentara paulatinamente en diámetro. En el caso de BD12, esta zona de esporulación se generaba a concentraciones menores de KCl que en el caso de BD13, llegando incluso a recuperar prácticamente el fenotipo salvaje a concentraciones de KCl entre 0.3 y 0.6M. A concentración superior (1.2M) el crecimiento de las cepas se veía especialmente afectado.

2.3.5. Experimentos de vecindad:

La figura 2.3.5 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de complementación extracelular realizados con diferentes mutantes (ver Materiales y Métodos, apartado 2.2.1). La cepa silvestre era capaz de provocar la reversión del fenotipo aconidial en la zona de contacto con los mutantes BD12 y BD13 (figura 2.3.5A, filas 1 y 2). A su vez, ambos mutantes provocaban la esporulación de la cepa TTA127.4 (*fluG*), pero, no al revés (figura 2.3.5A, filas 3 y 4). No se observó esporulación alguna entre las cepas BD12 y BD13 (figura 2.3.5A, fila 5), ni tampoco cuando cada una de ellas entraba en contacto con si misma (no mostrado).

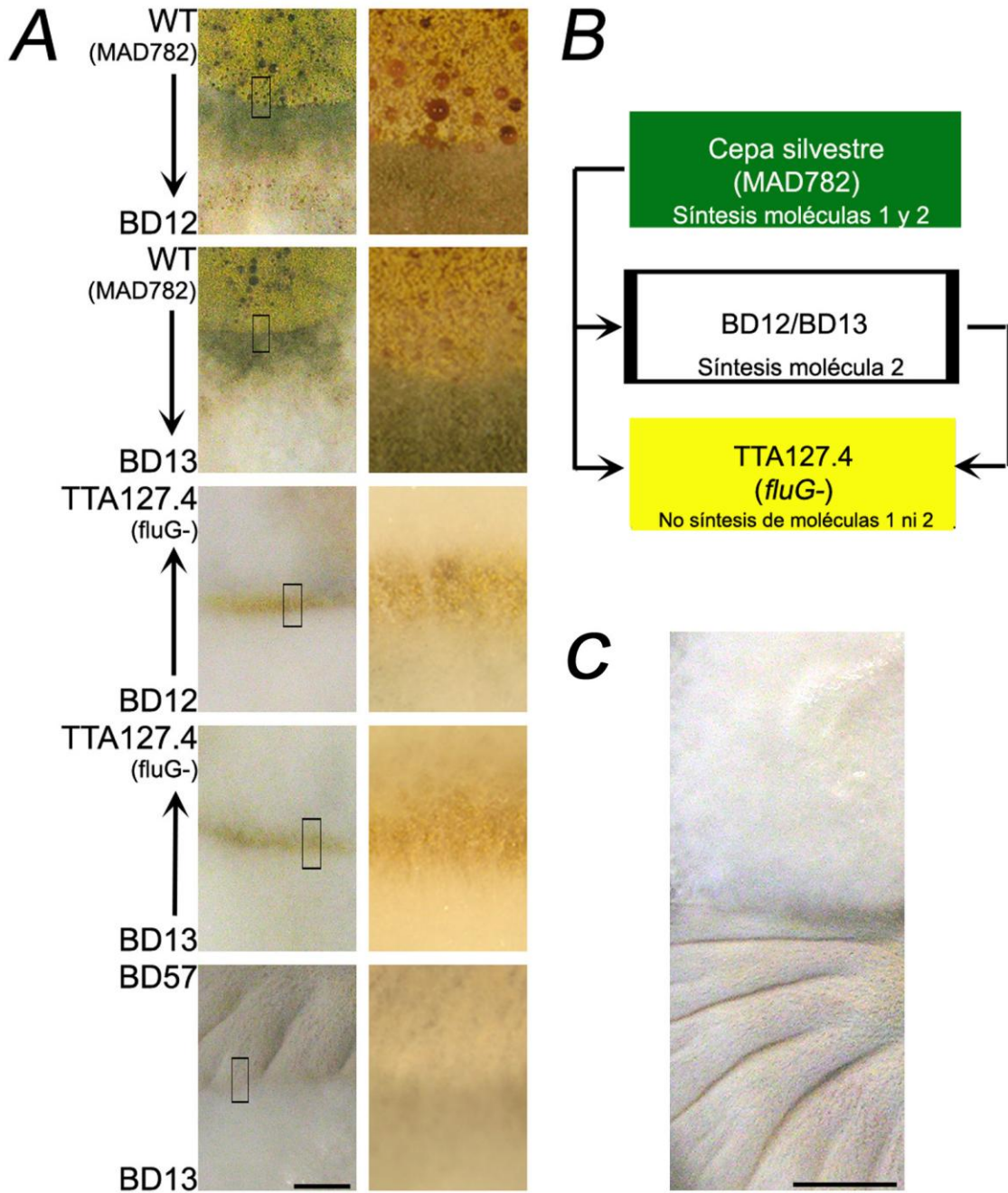


Figura 2.3.5: Experimentos de complementación extracelular. A) Las cepas BD12 y BD13 provocan la conidiación de la cepa TTA127.4 (*fluG*⁻) en zonas de contacto. Por otro lado, ambos mutantes conidian en contacto con la cepa silvestre MAD782. Las flechas señalan la dirección de la complementación. No existe complementación entre BD57 (descendiente de BD12) y BD13. Los paneles de la columna de la derecha son magnificaciones (~10x) de los de la izquierda y la zona amplificada queda rodeada en cada caso. Barra de escala= 0,5cm. B) Esquema de complementación de los donantes analizados. Adaptado a partir de Cordobés, 2005. C) Fenotipos de las cepas BD12 (colonia superior) y BD57 (*argB*; colonia inferior) en medio sólido. Barra de escala= 1cm.

La actividad de FluG es requerida para la síntesis de una señal extracelular de la conidiación (Lee y Adams, 1994a). Los mutantes BD12 y BD13 son

capaces de sintetizar esta molécula provocando la reversión del fenotipo de la cepa *fluG*⁻ al entrar en contacto con ella. Sin embargo, la reversión del fenotipo aconidial de BD12 y BD13 provocado por el contacto con una cepa silvestre pone de manifiesto la existencia de otra molécula señalizadora cuya síntesis está afectada en estos mutantes.

Estos resultados apuntan hacia un sistema de señalización consistente de dos señales sucesivas: la primera, dependiente de un alelo funcional de *fluG*, y una segunda, actuando aguas abajo, y sólo en el caso de que se activase *fluG*, la cual dependería de alelos funcionales los mutantes BD12 y BD13 (esquema en figura 2.3.5B).

Por otro lado, se observó que las cepas aconidiales descendientes de BD12 y BD13, y portando alelos *argB*⁻ presentaban un fenotipo en el que se generaban aún menos conidias, con una menor intensidad en la pigmentación. También se producía un gran número de células Hülle pero, no se observó que este fenómeno estuviera asociado a una producción prematura de órganos sexuales. La diferencia fenotípica entre ambos fondos genéticos se puede observar en la figura 2.3.5C. Cuando la cepa silvestre que debiera actuar como donante portaba la auxotrofia *argB2* o se encontraba delecionada en *argB*, dicha capacidad era anulada (figura 2.3.6B). Además, la cepa salvaje *argB*⁻ producía esporas con una intensidad en la pigmentación menor que la cepa silvestre en dicho marcador.

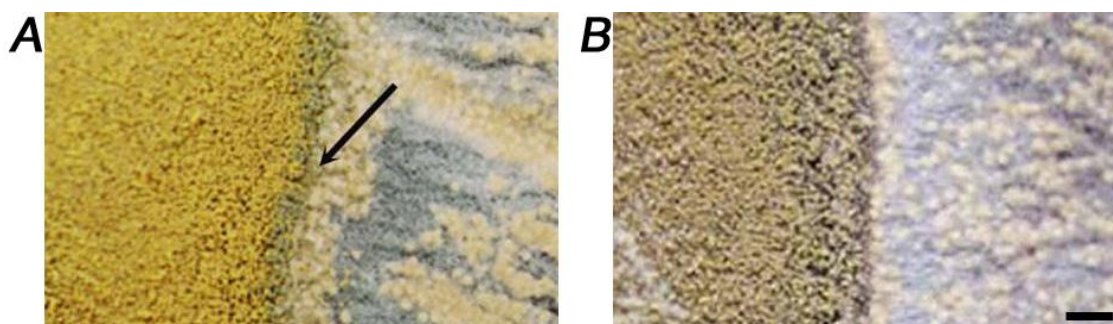


Figura 2.3.6: Efecto de mutaciones en el *locus argB* en los experimentos de complementación extracelular. **A)** Cepa silvestre (esporas amarillas) frente a BD57 (esporas verdes). **B)** Cepa conidiante *argB*⁻ (esporas amarillas) frente a BD57 (esporas verdes). Barra de escala= 0,25cm.

2.3.6. Técnicas de genética clásica para la localización de las mutaciones BD12 y BD13.

Trabajos anteriores determinaron que el fenotipo aconidial de BD12 y BD13 se debía a mutaciones localizadas en *loci* diferentes de cromosomas distintos (Cordobés, 2005), y que en ninguno de los dos casos, ese cromosoma era el III. Para localizar dichas mutaciones en el genoma de *A. nidulans*, se diseñó una estrategia basada en la transformación de protoplastos de los mutantes con una genoteca del plásmido autoreplicativo pRG3-AMA-NotI (ver apartado 2.3.7). Sin embargo, con el objetivo de prevenir una posible ineficacia de esta estrategia, se decidió utilizar también técnicas de genética clásica que permitieran determinar en qué cromosoma se hallaba cada mutación y poder así, en caso de necesitarlo, utilizar los mapas genéticos para rastrear estas mutaciones.

Así, se generaron cuatro diploides, dos de ellos logrados a partir del heterocarionte formado por BD57 y las cepas maestras FGSC283 o FGSCA68; y otros dos a partir de BD65 y las mismas cepas maestras. Tras la complementación de los genomas implicados en el cruce, los cuatro diploides presentaron un fenotipo conidiante debido a la recesividad de las mutaciones de BD57 y BD65 (no mostrado).

Se indujo la haploidización de los cuatro diploides formados cultivándolos en placas con benomilo (1-3µg/ml de medio; <http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/supplement.html>; Upshall *et al.*, 1977), además de todos los nutrientes necesarios en cada caso. La adición de este compuesto provoca el desensamblaje en la mitosis de los dímeros de alfa y beta tubulina, forzando la pérdida aleatoria de cromosomas. De este modo, se obtuvieron numerosos sectores haploides con diversas combinaciones cromosómicas y, por consiguiente, con diferente genotipo y fenotipo (no mostrado).

Diploide	Número de haploides aconidiales
BD57xFGSC283	82
BD57xFGSCA68	84
BD65xFGSC283	114
BD65xFGSCA68	67
Total	347

Tabla 2.3.1: Número de haploides aconidiales aislados a partir de cada uno de los cuatro diploides obtenidos.

De entre todos estos haploides, se analizó la segregación de marcadores en las cepas de fenotipo aconidial (tabla 2.3.1), las cuales, debían poseer el cromosoma portador de la mutación relacionada con este fenotipo. En consecuencia y como denominador común, todas debían mostrar la ausencia del marcador que se encuentra en el mismo cromosoma que las mutaciones de BD57 y BD65.

En el caso de BD57, todos los haploides aconidiales aislados presentaron un genotipo silvestre en *pyroA*, por lo que se dedujo que la mutación responsable de su fenotipo se localizaba en el cromosoma IV (tablas 2.3.2 y 2.3.3). En el caso de BD65, ocurrió lo mismo con el marcador *riboB*, situando la mutación responsable de su fenotipo en el cromosoma VIII. La distribución de los marcadores correspondientes al resto de cromosomas fue aproximadamente del 50% en todos los casos (resultados no mostrados).

Marcador (Crom.)	BD57xFGSC283		BD57xFGSCA68		Marcador (Crom.)	BD65xFGSC283		BD65xFGSCA68	
	+	-	+	-		+	-	+	-
pyroA4 (IV)	82	0	84	0	riboB2 (VIII)	67	0	114	0

Tabla 2.3.2: Resultados estadísticos de las segregaciones de los marcadores *pyroA4* y *riboB2* de las cepas maestras con respecto al fenotipo “fluffy” de BD57 y BD65. (+): *pyroA* o *riboB* silvestres; (-) mutantes *pyroA4* o *riboB2*.

Cepa	Marcador <i>pyroA4</i>			
	Num. colonias <i>pyroA</i> silvestre	% colonias <i>pyroA</i> silvestre	Num. colonias <i>pyroA4</i>	% colonias <i>pyroA4</i>
BD57	166	100	0	0
Cepa	Marcador <i>riboB2</i>			
	Num. colonias <i>riboB</i> silvestre	% colonias <i>riboB</i> silvestre	Num. colonias <i>riboB2</i>	% colonias <i>riboB2</i>
BD65	181	100	0	0

Tabla 2.3.3: Valores y porcentajes globales obtenidos para los marcadores *pyroA4* y *riboB2*. El 100% de los haploides obtenidos a partir del parental BD57 eran silvestres respecto al marcador *pyroA*. Lo mismo ocurría con los aislados a partir del parental BD65 y el marcador *riboB*.

2.3.7. Clonaje de genes que complementan el fenotipo aconidial de BD12 y BD13.

Para la determinación de los *loci* donde se hallan las mutaciones de BD12 y BD13, se diseñó una estrategia basada en la transformación de protoplastos con una genoteca en base al plásmido pRG3-AMA1-NotI (Gems *et al*, 1991; Oshero *et al*, 2000). Una de las características de este tipo de genoteca es el carácter autoreplicativo o no-integrativo del vector utilizado, facilitando su posterior rescate a partir de los transformantes seleccionados.

Así, mediante recombinaciones meióticas se obtuvieron las cepas BD101 y BD109, descendientes de BD57 y BD65, respectivamente, y portando el marcador *pyrG89*. El vector pRG3 tiene integrado el gen *pyr4* de *Neurospora crassa*, el cual, es capaz de complementar la mutación *pyrG89* en *A. nidulans*, de modo que, las colonias transformantes obtenidas podrían crecer sin uridina ni uracilo.

De un total de 10.000 colonias transformantes analizadas para cada uno de los mutantes, se aislaron 7 y 10 transformantes conidiantes, para BD101 y BD109 respectivamente (figura 2.3.7). La concentración de protoplastos a transformar osciló entre $1 \cdot 10^7$ y $5 \cdot 10^7$ protoplastos/ml para BD101 y entre $5 \cdot 10^6$ y $1 \cdot 10^7$ protoplastos/ml para BD109. La eficacia de las transformaciones, definida como el porcentaje de protoplastos que adquirieron plásmido respecto al total de protoplastos añadidos a la mezcla de transformación, fue del 0,02-0,08% para BD101 y del 0,007-0,01% para BD109.



Figura 2.3.7: Transformantes conidiantes de BD101 (A) y BD109 (B) en placas de medio completo (fila superior) y medio mínimo (fila inferior) cultivadas durante 72 horas. En cada caso, en la primera columna se muestra el fenotipo de las colonias obtenidas a partir de la transformación de los parentales con el plásmido pRG3 vacío. Barra de escala: 1.0cm.

Tras la extracción de DNA (genómico y plasmídico), se transformó la cepa *DH5 α* de *E. coli* (apartados 2.2.4 y 2.2.5). Las colonias transformantes se seleccionaron en un medio con ampicilina, y de ellas se obtuvieron diversos plásmidos, los cuales fueron analizados y secuenciados, resultando en las siguientes conclusiones:

-**BD101**: Todos los plásmidos secuenciados condujeron a la misma región del genoma de *Aspergillus nidulans* (figura 2.3.8).



Figura 2.3.8: Región identificada a partir de la secuenciación de los insertos de los diferentes plásmidos aislados a partir de BD101. Se señalan el inicio y final de los insertos de cada plásmido secuenciado.

La región que se identificó estaba localizada en el contig. 1.11, en el cromosoma VIII. Para saber cuál de los tres genes presentes en la región era el responsable de la reversión del fenotipo se generaron distintas construcciones ligando fragmentos con cada uno de los tres genes a pRG3 (apartado 2.2.7). Finalmente, se pudo determinar que era *AN0721.3* el responsable de la reversión del parental BD101 (figura 2.3.9, columna 4).



Figura 2.3.9: Fenotipo de transformantes del parental BD101, en medio completo (fila superior) y medio mínimo (fila inferior), con los siguientes plásmidos: Columna 1: pRG3 vacío; c2: Plásmido pRG3 conteniendo los tres genes mostrados en la figura 2.3.8; c3: Plásmido AN0720.3-pRG3; c4: AN0721.3-pRG3; c5: AN0722.3-pRG3.

La base de datos del Instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) predijo

para *AN0721.3* una ORF de 682 pares de bases (609pb en la secuencia codificante), que daría lugar a una secuencia peptídica de 203aa. Con dos exones (de 558 y 51bp) y un intrón (de 73pb), los primeros análisis realizados (www.expasy.org) no permitieron identificar ningún dominio funcional conocido.

Por otro lado, la secuenciación del gen *AN0721.2*, a partir de los genomas tanto de la cepa mutante BD13 como de FGSC26, permitió localizar una mutación consistente en una sustitución de un par -CG- por una -T-. El cambio se daba en el extremo amino terminal del gen, concretamente en la base situada en la posición 58. Ello provocaría un cambio en el marco de lectura a partir de la posición 20 de la secuencia peptídica predicha (sustitución R20W), apareciendo un codón stop en la posición 28; así, BD13 definiría probablemente un alelo afuncional de *AN0721.3*, provocando la pérdida completa de la actividad de la proteína derivada. En cualquier caso, estos resultados deben verificarse a partir de la obtención de la secuencia del cDNA de este gen.

-BD109: En este caso se identificaron dos regiones diferentes:

a) Uno de los plásmidos secuenciados nos situó en el contig. 1.153 del cromosoma V. La región identificada contenía los *loci AN8501.3* y *AN8502.3*. Este último se hallaba incompleto pero, el fragmento no presente era de 115bp, por lo que no se podía eliminar como candidato a ser el causante de la reversión (figura 2.3.10).



Figura 2.3.10: Región genómica identificada a partir de la secuenciación del inserto de uno de los plásmidos aislados a partir de los transformantes de BD109. El final del inserto queda reflejado en la imagen, a modo de referencia.

Los Blast realizados (<http://www.expasy.org>) indicaron que *AN8501.3*, *locus* no descrito hasta el momento en la bibliografía, podría dar lugar a una proteína con un dominio de dedos de zinc en el extremo N-terminal (Schjerling y Holmberg, 1996), por lo que podría tratarse de un regulador transcripcional.

En el caso de *AN8502.3*, los Blast realizados indicaron que podría dar lugar a una proteína transportadora, perteneciente a la familia MFS (Major

Facilitator Superfamily). Esta familia de transportadores suele transportar azúcares y moléculas de bajo peso molecular (Pao *et al.*, 1998).

Sin embargo, aunque convendría determinarse cuál de los dos genes es el causante de la reversión del parental BD109, al secuenciar esta región a partir de las cepas BD12 y FGSC26 no se halló mutación alguna. Así, es posible que el gen causante de la reversión sea un supresor de la mutación presente en BD12.

b)La secuenciación de los insertos del resto de plásmidos permitió identificar el gen *AN7542.3* como otro *locus* que provocaba la reversión del parental BD109, ya que, éste era el único gen presente en todos ellos (figura 2.3.11).

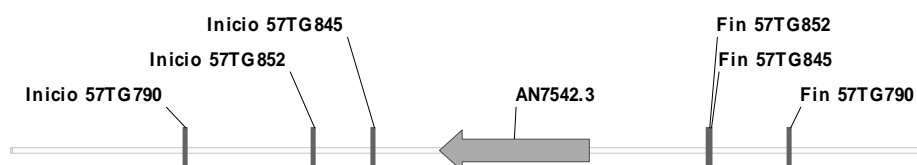


Figura 2.3.11: Región genómica identificada a partir de la secuenciación de los insertos de tres plásmidos aislados a partir de los transformantes de BD109. En la figura se muestran los puntos de inicio y fin de cada uno de los insertos secuenciados.

AN7542.3 está localizado en el contig 1.129, en el cromosoma IV del genoma de *A. nidulans*. Con un ORF de 1624 pares de bases (1281pb en su secuencia codificante) la base de datos de Broad Institute (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) predijo una secuencia peptídica de 426aa. Con 5 exones (de 91, 93, 88, 528 y 481bp, respectivamente en dirección 5´-3´) y 4 intrones (de 200, 49, 46 y 48bp, respectivamente, también en dirección 5´-3´), las bases de datos predijeron la presencia de un dominio de cremallera de leucina (bZIP, basic zipper, número de acceso PFAM PF00170), entre los residuos 79 y 113 (Vinson *et al.*, 1989; Vinson *et al.*, 2006).

La secuenciación del gen *AN7542.3*, a partir de los genomas tanto de la cepa mutante BD12 como de FGSC26, permitió localizar una mutación consistente en una sustitución de una -G- por una -A-. Este cambio se daba en el extremo C-terminal del gen, concretamente en la base situada en la posición 1143. Esta posición correspondía al extremo 5´ aceptor (-AG-) del último intrón del gen.

2.4. DISCUSIÓN.

Los experimentos realizados en este primer capítulo han permitido obtener una caracterización fenotípica preliminar de los mutantes aconidiales BD12 y BD13, describiendo su comportamiento ante diferentes estímulos descritos en la bibliografía como inductores de la conidiación. Por otro lado, se han logrado localizar en el genoma de *Aspergillus nidulans* las mutaciones responsables del fenotipo de ambos mutantes, permitiendo identificar genes implicados en la inducción temprana de la conidiación, definiendo alelos mutantes para cada uno de ellos y abriendo la puerta a la caracterización y análisis de la posible función que podrían desempeñar dentro de esta ruta genética.

AN0721.3, localizado en el contig 1.11 del cromosoma VIII, es el gen donde se localiza la mutación de BD13. Este gen no ha sido previamente relacionado con la inducción de la conidiación en la bibliografía y, según la base de datos de *A. nidulans* del Instituto Broad, carece de dominio funcional conocido en la secuencia peptídica predicha. Atendiendo al fenotipo conidante del diploide formado entre BD64 y GR5, se puede afirmar que la mutación de BD13 en *AN0721.3* es recesiva. Ello sugiere una pérdida de función para el alelo de *AN0721.3* definido por BD13, aunque este extremo deba ser confirmado mediante la obtención del mutante nulo. En cualquier caso, la proteína mutante mantendría únicamente los primeros 19 aminoácidos con respecto a los 203 aminoácidos de la secuencia peptídica silvestre predicha. Por ello, lo más probable es que la funcionalidad de la proteína sea prácticamente nula.

Estos resultados nos sitúan ante un elemento novedoso dentro del entramado genético que desemboca en la activación de *brlA*. Aunque experimentalmente se deba partir de una caracterización inicial, con un análisis básico de su secuencia y su posible función, el papel de *AN0721.3* es imprescindible para inducir la conidiación. Sin embargo, este gen será objeto de otra tesis doctoral.

En el caso de BD12 tenemos, por un lado, un inserto sin mutación alguna que contiene dos genes, de los cuales, uno debe ser el responsable de la supresión de la mutación de BD12. Por el otro lado, y al igual que en el caso de BD13, también se ha conseguido localizar la mutación que provoca el fenotipo aconidial de BD12. En base al

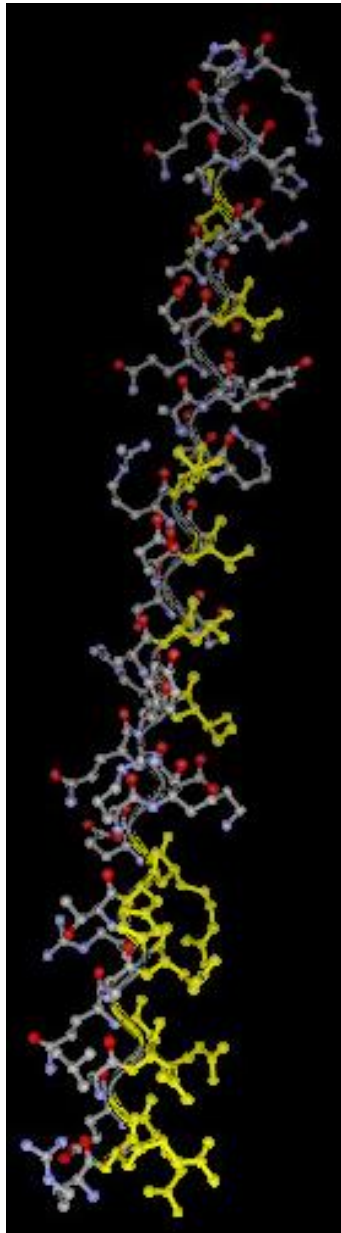
fenotipo del diploide formado entre las cepas BD58 y GR5, esta mutación en *AN7542.3* también es recesiva, sugiriendo una pérdida de función en la proteína mutante, extremo que debe ser confirmado con la obtención del mutante nulo. El *locus AN7542.3* se encuentra en el contig 1.129 del cromosoma IV y según las bases de datos consultadas, la secuencia peptídica derivada presentaría un dominio tipo bZIP de unión a DNA (Vinson *et al*, 1989; Vinson *et al*, 2006), por lo que nos hallamos ante un posible regulador transcripcional.

En la bibliografía se describió la existencia de otro gen que codifica una proteína con dominio bZIP relacionada con la inducción de la conidiación. Este gen, denominado *vegA* o *flbB* (Aguirre *et al*, 1993; Wieser *et al*, 1994; Adams *et al*, 1998) también fue localizado en el cromosoma IV del genoma de *A. nidulans*, pero, su localización no fué precisada y no se había realizado caracterización alguna de su función. Una consulta sobre la secuencia del cDNA de *flbB* al Dr. Jae-Hyuk Yu, de la Universidad de Wisconsin (EEUU), confirmó que se trataba de *AN7542.3* (ver capítulo 3, apartado 3.3.1). Ambas secuencias también coincidieron con la predicción realizada por la base de Datos del Instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html). Por lo tanto, *AN7542.3* es *flbB*. Así, teniendo en cuenta el interés que despierta y las posibilidades que ofrece el estudio de un regulador transcripcional, los siguientes capítulos se centrarán en la caracterización de *F1bB*.

En cualquier caso, tanto *AN7542.3* como *AN0721.3* son genes de la ruta de inducción temprana necesarios para la activación de *brlA* en respuesta a la exposición a un medio aéreo. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que también son necesarios para responder ante otros estímulos inductores. BD12 y BD13 conidian en un medio sólido diluido en glucosa o en un medio con KCl, pero, son incapaces de hacerlo en medio diluido en la fuente de nitrógeno, al menos en el rango de concentraciones estudiado. Además, mutaciones en el *locus argB* provocan un cambio fenotípico en los mutantes BD12 y BD13, en el que se producen menos esporas y se generan multitud de células Hülle no asociadas a la producción de estructuras sexuales. Por otro lado, la reversión del fenotipo conidiante de estos mutantes en contacto con una cepa silvestre es anulada cuando esta última también porta mutaciones en el *locus argB*. Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un nexo entre la inducción de la

conidiación, la síntesis de metabolitos señalizadores y el metabolismo del nitrógeno, más concretamente el de la ornitina, donde participa el enzima codificado por *argB* (Serlupi-Crescenzi *et al*, 1983; Upshall *et al*, 1986).

La implicación de *AN7542.3* y *AN0721.3* en la respuesta ante dos estímulos diferentes como la exposición a un medio aéreo o el agotamiento de la fuente de nitrógeno, hace plantear la posibilidad de que ambos constituyan posibles nexos entre rutas de respuesta a diversos estímulos. Además, la similitud fenotípica entre BD12 y BD13 sugiere que ambos genes actúan al mismo nivel genético, pudiendo existir una relación funcional entre ambos. Dicha relación se refuerza con la constatación de que ambos genes participan en la síntesis de la misma molécula señalizadora.



**3-. Caracterización de FlbB y rasgos
fenotípicos de los mutantes
ΔflbB, BD11, BD12 y BD14.**

3.1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior se ha concretado la localización de las mutaciones de *BD12* y *BD13* en el genoma de *Aspergillus nidulans*. Esta localización puede considerarse como un punto de partida para el estudio de la función de los genes identificados y la profundización en el papel que desempeñan en la inducción de la conidiación.

El fenotipo aconidial de *BD13* indica que *AN0721.3* desempeña un papel imprescindible en la señalización de la conidiación. La causa de este fenotipo es una mutación que genera una proteína que conserva únicamente los primeros 19 aminoácidos respecto a la proteína silvestre. Por su parte, se ha establecido que la mutación de *BD12* se halla en el *locus AN7542.3* y que dicho mutante puede presentar un posible defecto en el procesamiento del mRNA. *AN7542.3* codifica un posible regulador transcripcional que como se podrá ver en este capítulo ya ha sido parcialmente caracterizado en la bibliografía con el nombre de *flbB* o *vegA* (Wieser *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 1993).

Con todo ello, y teniendo en cuenta la escasez de información entorno a *AN0721.3* y la imposibilidad de poder realizar un análisis en profundidad de todos los *loci* hallados en el capítulo anterior, en contraposición con el interés que despierta el análisis de un posible regulador transcripcional y la importancia que éste pueda tener en la regulación de la expresión de otros genes involucrados en la señalización de la conidiación, se ha considerado prioritario centrarse en *AN7542.3* (= *flbB*=*vegA*).

Así, el presente capítulo tratará de analizar la secuencia peptídica de FlbB, incluyendo el estudio detallado de su dominio de unión a DNA. Se presentarán las búsquedas realizadas *in silico* para identificar homólogos y las realizadas para identificar proteínas conteniendo el mismo dominio de unión a DNA, por el otro. Todo ello con el objetivo de conocer la presencia de regiones conservadas en la secuencia peptídica y establecer una distribución evolutiva. También se presentarán los estudios geno y fenotípicos realizados con diferentes mutantes de *flbB* de los que se dispone y los resultados de los análisis de los niveles de expresión de *brlA* o el propio *flbB* en diferentes fondos genéticos y en diferentes intervalos del crecimiento vegetativo así como de la reproducción asexual.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Cepas utilizadas, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.

Las cepas utilizadas en el presente capítulo quedan descritas en la tabla

3.2.1.:

Cepa	Genotipo	Fuente
BD11	<i>biA1; flbB_{P305L:P306fs}; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD12	<i>biA1; flbB_{L267fs}; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD14	<i>biA1; flbB_{G70R}; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD143	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; ΔflbB::pyrG, pyroA4; veA1</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
TN02A3	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; pyroA4; veA1</i>	Nayak <i>et al</i> , 2006
FGSCA4	<i>Wild type (veA⁺)</i>	Pontecorvo <i>et al</i> , 1953
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Kafer, 1965
FGSC33	<i>biA1; pyroA4</i>	Fungal Genetics Stock Center
FGSC773	<i>pyrG89; wA3; pyroA4</i>	Fungal Genetics Stock Center
RNI24.5	<i>biA1; alcA(p)::flbB::pyroA⁺</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
TNI22.1	<i>biA1; pJW53::pyroA⁺</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008

Tabla 3.2.1.: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en el presente capítulo.

Los oligonucleótidos utilizados, se detallan en la tabla 3.2.2.:

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Objetivo
AN7542cDNA1	GGT CGC ATT TCA ACC TCC	Amplificación y secuenciación del cDNA de <i>flbB</i>
AN7542cDNA2	AGT AAA TGG GAA ATA AGG GC	Amplificación y secuenciación del cDNA de <i>flbB</i>
AN7542-1	GGT GAG GGT AGA AAG GG	Secuenciación de alelos BD11, BD12 y BD14.
AN7542-2	GAC AGG GTG ATT CCA GC	Secuenciación de alelos BD11, BD12 y BD14.
AN7542-3	GGG TTT TTC TGA CGT CG	Secuenciación de alelos BD11, BD12 y BD14.
flbB-GSP3	TGA CCT GAC AGC TCG CTT TTT TTC TGA GCT TTC TAA TGC	Generación del mutante nulo <i>ΔflbB</i>
flbB-GSP4	GAA AGG TGC GTG GGT TCG AAT CCC ACC	Generación del mutante nulo <i>ΔflbB</i>
flbB-PP1	GTT TTC TGG TCC TCG GTC AAC	Generación del mutante nulo

	CGG TGG	$\Delta flbB$
flbB-PP2	CAT GGT GGT CGA GCT GTG AAT AGC GGA GAA	Generación del mutante nulo $\Delta flbB$
flbB-SMP1	TTC TCC GCT ATT CAC AGC TCG ACC ACC ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Generación del mutante nulo $\Delta flbB$
flbB-GFP2	GCA TTA GAA AGC TCA GAA AAA AAG CGA GCT GTC AGG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Generación del mutante nulo $\Delta flbB$
OMN233	TCC AAT CCT ATC ACC TCG CCT CAA A ATG ACT TCG ATC AGT AGG C	Sobreexpresión de <i>flbB</i>
OMN234	CG GGATCC GCT CGA TAA GGA GTG AG	Sobreexpresión de <i>flbB</i>
OMN212	GTT AAC TAG TGG CAG TGC AAC C	Sobreexpresión de <i>flbB</i>
OJA143	AGA AGT TAA CAC CGT AGA	Generación sonda <i>brlA</i>
OJA142	CTG GCA GGT GAA CAA GTC	Generación sonda <i>brlA</i>
OMN227	CGA GCT GTC AGG TCA TGA ATA C	Generación sonda <i>flbB</i>
OMN213	TGA TCT GTC CAT AGA ACA TCG C	Generación sonda <i>flbB</i>
OJA141	CCG TTC TGC TTA GGG TA	Extremo 5' del promotor de <i>alcA</i>
OJA106	TTT GAG GCG AGG TGA TAG GAT TGG A	Extremo 3' del promotor de <i>alcA</i>
OJA108	CG GGA TCC AGT GGT TCG GTA ATC	Extremo 5' del promotor de <i>alcA</i> con sitio BamHI

Tabla 3.2.2: Oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo.

Los medios de cultivo utilizados han sido descritos en el apartado 2.2.1. del capítulo anterior. Para los experimentos de agotamiento de nutrientes en medio sólido, se diluyó el MMA a un quinto de la cantidad necesaria de glucosa o nitrato. Para los experimentos bajo estrés salino se añadieron a las placas KCl (0,6M) y MES (0,05M).

Las pruebas en medio líquido se llevaron a cabo tal y como queda descrito en Skromme *et al*, 1995. Las cepas fueron cultivadas durante 18 horas en medio mínimo líquido (10^6 esporas/ml) a 37°C y 250rpm. Tras este periodo, los micelios de las cepas a analizar se filtraron, lavaron con el medio mínimo de destino y

se transfirieron a medio fresco con KCl y MES, y con y sin glucosa o nitrato sódico. Se analizó la morfología del micelio tras 10 y 20 horas de cultivo.

Para los análisis de muerte celular en cultivo líquido sin nitrógeno mediante tinción con fluoresceína, se siguió el protocolo descrito por Roncal *et al*, 1993. Brevemente, se tomó una muestra de micelio y se le añadió diacetato de fluoresceína (Sigma) a una concentración final de 20 μ M. Se dejó el cultivo a 25°C durante 5min, se filtró (Milipore, $d_p=0.45\mu$ m) con vacío y se limpió con abundante agua destilada. Tras ello, se analizó y fotografió en el microscopio.

La inducción de la conidiación se llevó a cabo según métodos ya descritos (Aguirre, 1993; Law y Timberlake, 1980) de la siguiente manera: Tras 18 horas de cultivo en medio mínimo líquido, en las condiciones arriba descritas, se filtraron los micelios de las cepas a analizar y se depositaron en placas de medio mínimo sólido sobre membranas de nitrocelulosa (Milipore, $d_p=0.45\mu$ m), cultivando durante 6, 12, 24 y 48 horas previo procesamiento para análisis de hibridación DNA-RNA mediante técnica de Northern Blot. Las muestras recogidas se guardaron en nitrógeno líquido hasta la extracción de RNA total.

3.2.2. Transformación de protoplastos.

La obtención y transformación de protoplastos se desarrolló según lo detallado en el apartado 2.2.3 del capítulo anterior (Tilburn *et al*, 1983). Para la transformación se utilizaron entre 300 y 600ng de la construcción generada por PCR de fusión (Yang *et al*, 2004), conteniendo las regiones promotora y terminadora de *flbB* fusionadas al gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*.

3.2.3. Amplificación y secuenciación del cDNA de *flbB*.

A partir de una genoteca de RNA total extraída a partir de una cepa silvestre cultivada durante 24 horas, se amplificó el cDNA de *flbB* utilizando los oligonucleótidos AN7542cDNA1 y AN7542cDNA2 (tabla 3.2.2) y el kit AMV-First strand cDNA synthesis kit (Invitrogen). La secuenciación del producto de PCR permitió la identificación de AN7542.3 como *flbB* (Wieser *et al*, 1994; previamente descrito como *vegA* Aguirre *et al.*, 1993), con cuya secuencia se contaba gracias a la colaboración con el Dr. J. H. Yu de la Universidad de Wisconsin (EEUU).

3.2.4. Extracción de DNA genómico.

Las extracciones de DNA genómico se llevaron a cabo a partir de micelio cultivado en medio mínimo líquido (10^6 esporas/ml) con los nutrientes adecuados en cada caso, durante 16 horas, a 37°C y 250rpm. Tras este periodo, se filtraron, lavaron y liofilizaron (Telstar Cryodos). En la extracción de DNA se utilizó el kit GenEluteTM Plant Genomic DNA Extraction Kit (Sigma), añadiendo 50 unidades de RNAsa (Sigma) a la mezcla de lisis.

3.2.5. Extracción de RNA total.

Las muestras recogidas en diferentes etapas y tiempos del ciclo de vida de *A. nidulans*, y guardadas en nitrógeno líquido, se molieron en mortero (también con nitrógeno líquido) y transfirieron a tubos de 2ml. A cada tubo se le añadió 1ml de solución TriReagent (Fluka) y se mezcló por vortex hasta mojar todo el micelio.

Para la separación en fases, se dejaron incubar los tubos 5min a temperatura ambiente, invirtiéndolos periódicamente. Se añadió 0,2ml de cloroformo y, tras mezclar, los tubos se dejaron reposar 3min, de nuevo a temperatura ambiente. Tras la centrifugación a 12000g, durante 15min, a 4°C , se transfirió la fase acuosa, superior, a tubos nuevos de 2ml. Se les añadieron de nuevo 0,75ml de solución TriReagent para repetir el proceso.

Tras la separación de la fase acuosa, se añadió 0,5ml de isopropanol y se incubó durante 10min a temperatura ambiente, mezclando periódicamente por inversión. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 12000g, durante 10min a 4°C , tras los cuales, precipitó el RNA.

Como último paso en la extracción, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1ml de una solución de etanol en agua al 75% (v/v) tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma). Tras mezclar y disolver el pellet de RNA, se centrifugaron las muestras a 7500g, durante 5min, a 4°C . Se volvió a eliminar el pellet con vacío y se redisolvieon las muestras en 20-200 μl de agua tratada con DEPC (libre de RNAsa). Se incubó a $55-60^{\circ}\text{C}$ para redisolver bien el pellet. Se midió la cantidad de RNA total extraído en cada muestra mediante el sistema QuBitTM (Invitrogen).

3.2.6. Generación de la construcción genómica para la obtención del mutante nulo de *flbB*.

Para la generación de la construcción conteniendo las regiones promotora (1,50Kb) y terminadora (1,55Kb) de *flbB* fusionadas al gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*, se siguió el protocolo descrito por Yang *et al.* (2004). Dicho protocolo consta de dos etapas (figura 3.2.1). En la primera se amplificaron en diferentes reacciones de PCR, por un lado, la región correspondiente a alrededor de 1,5Kb de promotor de *flbB* (oligonucleótidos *flbB-PP1* y *flbB-PP2*, detallados en la tabla 3.2.2, y DNA genómico silvestre como molde), la correspondiente a alrededor de 1,5Kb de terminador de *flbB* (oligonucleótidos *flbB-GSP3* y *flbB-GSP4* y DNA genómico silvestre como molde) y el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* (oligonucleótidos *flbB-SMP1* y *flbB-GFP2*, con extremos complementarios a los oligonucleótidos *flbB-PP2* y *flbB-GSP3*, respectivamente; y utilizando el plásmido pFN03 como molde). En las reacciones se utilizó la mezcla de enzimas Triplemaster (Eppendorf).

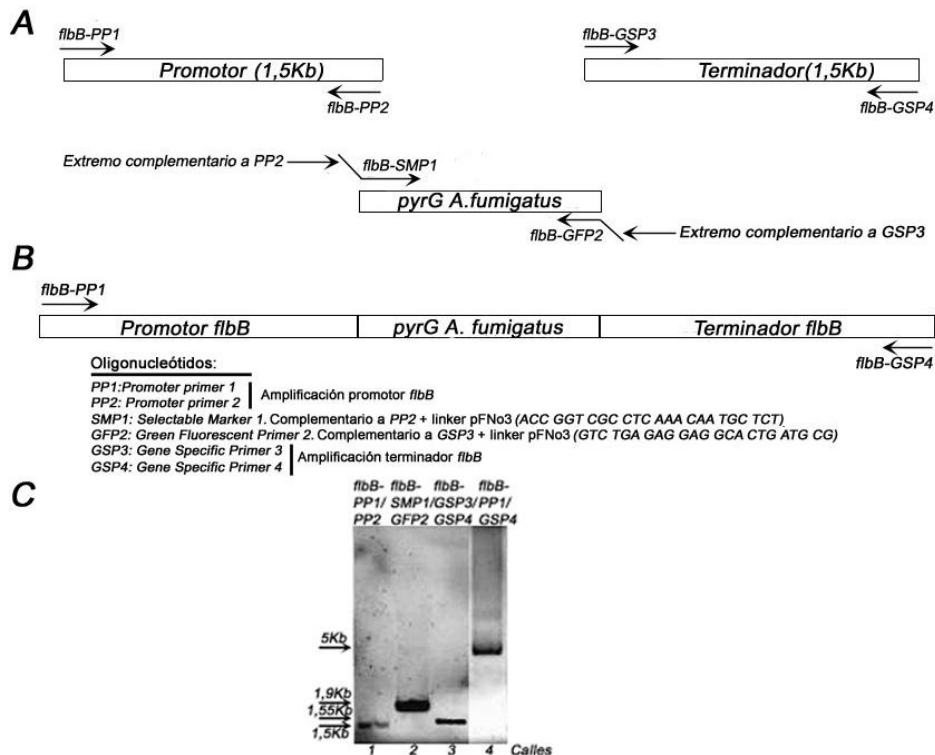


Figura 3.2.1: Esquema representativo del proceso seguido para la generación por PCR de la construcción conteniendo el promotor y terminador de *flbB* fusionados al marcador *pyrG* de *A. fumigatus*. A) Amplificación de cada uno de los tres fragmentos a fusionar. B) Generación de la construcción. C) Gel de agarosa conteniendo cada uno de los productos de PCR. Calle 1: *flbB-PP1/PP2* (1.5Kb); c2: *flbB-SMP1/GFP2* (1.9Kb); c3: *flbB-GSP3/GSP4* (1.55Kb); c4: *flbB-PP1/GSP4* (5Kb).

En una segunda etapa, utilizando como molde los fragmentos generados en la primera (figura 3.2.1A), y los oligonucleótidos *flbB-PP1* y *flbB-GSP4*, se realizó una segunda PCR para fusionar los tres fragmentos y generar la construcción de interés (figura 3.2.1B). Cada uno de los fragmentos generados se puede observar en la figura 3.2.1C.

3.2.7. Obtención de imágenes.

Los cultivos líquidos con agotamiento de nutrientes o adición de KCl fueron analizados con un microscopio Nikon Optiphot, en modo de campo claro o fluorescencia. Las imágenes se tomaron con una cámara Nikon FX-35DX conectada al citado microscopio.

Las placas en medio sólido se analizaron con una lupa binocular Nikon SMZ800, y las imágenes se tomaron con una cámara Nikon Coolpix8400.

3.2.8. Hibridación DNA-DNA mediante técnica de Southern Blot.

La correcta inserción de las diferentes moléculas de DNA con las que se transformaron las cepas de *A. nidulans* utilizadas se confirmó mediante la técnica de Southern Blot, utilizando el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), basado en la hibridación de una sonda de DNA marcada con digoxigenina-dUTP al DNA genómico complementario, al que se le confiere y amplifica luminiscencia a través de un anticuerpo y moléculas quimioluminiscentes específicas.

Una vez extraído el DNA (apartado 3.2.4), se digirió con el enzima de restricción adecuado, en un volumen final de 40μl. Para la transferencia se realizó una electroforesis de agarosa cargando en cada pocillo el volumen total de las mezclas de digestión, y añadiendo en una de las calles el marcador de peso molecular (Roche). Tras correr el gel a 80V, durante alrededor de 80min (dependiendo del tamaño de los fragmentos a observar), se expuso el gel bajo radiación Ultravioleta (Vilber Lourmat, TFX-20.M, 312nm), durante 10min. Para una mayor higiene, se posicionó el gel encima de una placa de Petri. Tras ello, en un baño se realizaron la desnaturalización del gel, durante 45min, y con agitación suave (Stock: 87,66g/l de NaCl y 20g/l de NaOH); y la

neutralización, realizando dos baños de 30min (Stock: 60,60g/l de Trizma Base y 175,30g/l de NaCl, ajustado a pH=7,5 con HCl). Se dejó el gel homogenizando en solución SSC20x (175,30g/l NaCl y 88,22g/l citrato sódico, ajustado a pH=7,0 con HCl). La membrana a la que el DNA fue transferido (nylon cargado positivamente, Roche) se mojó en agua destilada y se homogenizó también en solución SSC20x, mientras se preparaba la transferencia.

Para ello, en un recipiente adecuado, se colocó verticalmente, en este orden, abundante papel de filtro, dos trozos de papel de filtro Gel Dryer (Bio-Rad) de igual tamaño al del gel, el propio gel (con los pocillos orientados hacia abajo), la membrana convenientemente homogenizada, y de nuevo papel Gel Dryer y abundante papel de filtro. Se añadió solución SSC20x hasta mojar todo el papel de filtro de la parte inferior y se aplicó presión en la parte superior para mejorar la transferencia. Se dejó transferir la preparación durante toda una noche. Tras ello, se enjuagó la membrana en solución SSC2x, se dejó secar al aire y se expuso bajo luz ultravioleta (Vilber Lourmat, BLX-E254, exposición a 254nm y 120mJ) para conseguir una correcta fijación del DNA a la membrana.

Para generar la sonda de DNA, se utilizó alrededor de 1µg de DNA (en el caso de la generación del mutante nulo de *flbB*, se utilizó el fragmento de PCR *flbB-PP1/PP2*, debidamente purificado). Se diluyó hasta 16µl con agua para biología molecular (Sigma), se desnaturalizó a 95°C durante 10min y se dejó enfriar en hielo. Tras ello, se añadieron 4µl de solución DIG-High Prime (Roche), conteniendo oligonucleótidos aleatorios, nucleótidos, digoxigenina-dUTP, fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y las soluciones tamponantes adecuadas. Se incubó la mezcla a 37°C, durante 16 horas. Tras este período, se inactivó la reacción añadiendo 2µl de EDTA (0.2M; pH=8.0) y calentando a 65°C durante 10min. Se verificó la luminosidad de la sonda, así como su límite de detección, exponiendo diferentes diluciones de la solución generada (no mostrado).

La hibridación se realizó a 42°C. Para ello, se introdujo la membrana conteniendo el DNA correctamente fijado en una bolsa de hibridación (Roche), la cual fue sellada tras ello. De cara a una optimización de la hibridación, se añadió a la bolsa de hibridación solución DIG Easy Hyb (Roche) precalentada a 42°C (10ml/100cm² de

membrana), y se dejó incubar a 42^oC durante 90min. Tras ello, se retiró dicha disolución y se añadieron 4ml de DIG Easy Hyb con sonda (25ng de sonda/ml DIG Easy Hyb) desnaturalizada a 95^oC durante 5min. Se mantuvo la hibridación durante toda una noche a 42^oC con agitación suave.

Para la exposición se extrajo la membrana de la bolsa y se le realizaron dos baños, durante 5min a temperatura ambiente en SSC2x y SDS 0,1%. Tras ello, otros dos baños, durante 15min a 65^oC en SSC0,5x y SDS 0,1%. Posteriormente, se limpió la membrana con una solución conteniendo ácido maléico (0.1M), NaCl (0.15M) y tween 20 (0,3% Acros Organics), ajustada a pH=7.5 con NaOH, durante 5min. Luego 30min en 100ml 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). Se repitió el baño pero, en este caso, añadiendo anti-digoxigenina (75mU/ml) a un volumen total de 20ml de solución bloqueante (1x). Se limpió nuevamente dos veces en 100ml de la solución de ácido maléico descrita y, tras ello, se equilibró la membrana durante 5min en solución de detección, conteniendo Trizma base (0.1M, Sigma) y NaCl (0.1M), ajustado a pH=9.5 con HCl.

Para producir la reacción luminiscente, se introdujo la membrana entre dos láminas de plástico y se añadió 1ml de solución CSPD, dejando incubar 5min a temperatura ambiente, mojando bien toda la superficie y evitando la generación de bolsas de aire. Se secó la membrana al aire y se incubó a 37^oC durante 10min. Se expuso la membrana para obtener los resultados. En el caso del mutante nulo de *flbB*, se pueden revisar los resultados obtenidos en la figura 3.3.5.

3.2.9. Hibridación RNA-DNA mediante técnica de Northern Blot.

Para la realización de los análisis de expresión mediante técnica de Northern Blot, en primer lugar se preparó el gel desnaturalizante de formaldehido, conteniendo, en un volumen total de 100ml, 1.2g de agarosa, 72ml de agua tratada con DEPC, 10ml de MOPS (10x: 0.4M MOPS, Sigma; 0.1M acetato sódico; 0,01M EDTA), y 18ml de formaldehido, añadido este último cuando el resto de la mezcla ha sido precalentada y se encuentra a unos 50^oC. Todo el material a utilizar en esta electroforesis fue previamente limpiado con RNase ZAP (Sigma), para evitar la presencia de RNAsa alguna.

Para la carga de las muestras en el gel, en base a la concentración en RNA total de cada una de ellas, deben calcularse las cantidades relativas para que todos los pocillos contengan finalmente alrededor de 10µg de RNA. La equivalencia se verificó mediante electroforesis de agarosa (1.2%). Para la preparación de las muestras a cargar, se añadieron a tubos de 1,5ml, 12,5µl de formamida, 4µl de formaldehído (33%), 2,5µl de MOPS (10x) y el volumen adecuado, en un total de 10µl con agua tratada con DEPC, de cada muestra de RNA. 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.

Tras tinter el gel en bromuro de etidio, se realizaron varios baños en agua y se preparó la transferencia de forma paralela a lo expuesto en el apartado anterior (3.2.8). Para la fijación, se enjuagó la membrana colocándola sobre papel de filtro mojado en SSC2x y se fijó mediante exposición bajo luz ultravioleta (Vilber Lourmat, BLX-E254, exposición a 254nm y 120mJ). Se dejó secar al aire y se pasó la muestra por agua primero, y SSC2x después. En caso de almacenaje de la membrana a -20°C, esta se rehidrató con SSC2x.

Así, se incubó la membrana durante dos horas en solución de prehibridación a 42°C (62,5ml SSC20x; 25ml solución Denhardt's 50x; 35ml agua destilada; 125ml formamida; 2,5ml 10% SDS, para un volumen total de 250ml. La solución Denhart contiene, para un volumen final de 500ml en agua, 5g de Ficoll Lipo400; 5g polivinilpirrolidona; 5g Seroalbúmina bovina). A la solución de prehibridación se le añadió DNA de hebra simple de esperma de salmón (Roche), para evitar hibridaciones inespecíficas entre la sonda utilizada y otras moléculas de RNA fijadas en la membrana. Este DNA se hirvió a 95°C durante 5min y se enfrió en hielo durante 1min, antes de añadirlo a la mezcla de prehibridación.

Para el marcaje de la sonda se llevaron 50-100ng de DNA hasta 9µl con agua destilada. Se calentó la solución a 95°C durante 10min, y se dejó en hielo durante otros 2min. Se centrifugó brevemente. Se añadieron 3µl de dNTPs (sin dCTP), 2µl de solución Reaction Mixture (Roche), 3-5µl de dCTP α ³²P (30-50µCi) y 1µl de Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche), se mezcló, se centrifugó brevemente y se

incubó durante una hora a 37°C. Se añadieron 2µl de EDTA (0,2M) y 28µl de solución STE (Roche). Se purificó la mezcla pasando los 50µl totales por una columna con Sephadex-G50 como fase estacionaria (Amersham), centrifugando 2min a 2.000rpm.

De este modo, se retiraron 10-15ml de la solución de prehibridación y se añadió la sonda, dejando la mezcla a 42°C durante alrededor de 16 horas. Tras la hibridación, se realizaron dos lavados de 10min cada uno a temperatura ambiente en solución SSC2x conteniendo SDS (0,1%), seguido de un tercer lavado a 42°C en solución SSC0,5x conteniendo SDS (0,1%). Tras ello, se comprobó la limpieza de la membrana pasando el contador Geiger. En caso necesario se realizaron nuevos baños hasta una limpieza adecuada. Se expuso a -80°C durante el tiempo necesario.

3.2.10. Obtención del plásmido de sobreexpresión.

La construcción *alcA(p)::flbB* se generó según Yu *et al*, 2004. Dicha construcción se insertó en el sitio BamHI del plásmido pJW53 (Bok y Keller, no publicado), generando el plásmido pNI41. La cepa FGSC33 fue transformada con dicho plásmido, generando la cepa TNI16.2. Ésta fue cruzada con FGSC773 para generar la cepa RNI24.5. Por otro lado, y para generar la cepa control (TNI22.1), FGSC33 también fue transformada con pJW53.

3.2.11. Software empleado.

Los alineamientos se realizaron utilizando el software Genedoc, versión 2.6.003; www.psc.edu/biomed/genedoc; y para generar el árbol filogenético de los dominios bZIP identificados en *A. nidulans*, *C. immitis*, *N. crassa*, *M. grisea*, *S. pombe* y *S. cerevisiae* se utilizó el programa MEGA3.1 (Kumar *et al*, 2004). Las imágenes correspondientes a la predicción de la estructura espacial del dominio bZIP de FlbB se obtuvieron con el software 3D-Mol viewer (vector NTI Advance 9.1.0, Invitrogen, 2004).

3.2.12. Número de acceso de *flbB*.

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica se depositaron en la base de datos EMBL (European Molecular Biology Laboratory, <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>) bajo el número de acceso AM494477.

3.3. RESULTADOS.

3.3.1. AN7542.3 es identificado como *flbB* (=vegA).

La amplificación del cDNA de AN7542.3 (ver Materiales y Métodos) y su secuenciación (figura 3.3.1) permitieron establecer, en primer lugar, que la predicción realizada por la base de Datos del Instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) era correcta; y, en segundo lugar, que la secuencia del cDNA de AN7542.3 coincidía con la de *flbB* (amablemente proporcionada por Jae-Hyuk Yu, Universidad de Wisconsin, EEUU). *flbB*, también denominado *vegA* (Aguirre *et al*, 1993) ya había sido citado en la bibliografía como elemento involucrado en la señalización de la conidiación (Wieser *et al*, 1994; Adams *et al*, 1998), pero, su localización exacta en el genoma, detallada por primera vez en esta tesis, era desconocida y no se había realizado caracterización alguna de su función.

```

ATGACTTCGATCAGTAGTAGGCCAATACCCTTGGATCTGAACGGATGGACTCCTTGAATAGACAAAGCTTAGCG : 75
CAGAGTGCTTCACCTGCAGGCCAAGATACGCCGGTATGAGGGGTTCAATCAGCACGGACTTCTTCAAGTTCTTT : 150
GGCGCTGGAGGACAGGCTAAGAAGACTACTCGAGACGGGCAACCTGCCAAACGAAGAGGACCAAAACCCGATAGC : 225
AAACCAGCTCTTACGCGGGCACAAGAGTTGAACCGTCAAGGCGCAGAGGACACATCGTGAGCGGAAGGAGCAATAC : 300
ATCAGAGCGTTGGAGAGCGAAGTTGCGCGGTTGCGGGGAAAGCGTACACTCAGGAGATATCTGCTGCGAACCTTGCT : 375
GTTACCAACATCGTGAAATGGCCAACTCCATATCGGAGGAAAAACAACATGTTGAAAGAGATCCTAGTGGCCAC : 450
AATATCAATTACGATGCTGAATGGAACGCCGAGAGCGGACAGATGGGATCGGGATCCACTCCAGTCCC : 525
GTTGGAGCTGGGAGCGTTGGATCGCAGACGGGCATCGCTTCCGCTTACGGCGCATACTTACAGCACGCCGCAACG : 600
ACGGTGTGCATCAGGAATGAGCCCGAAATTTAATGGAGTGGAAAAGTTCGACTTCTCGTCAGTTCGGACGTCGGG : 675
CCGAACAATCAGGGTATGCTACAGTACCGTGTGATGCACTTGC CGCCATAGACCGTCGCCGCGCGATTCAAGGA : 750
GCGGGGATATTTGAAGACAATCCCCAGCTTCAGATTGACTTCATCTAGCGCTGGAATCACCCCTGTCGAGATCAT : 825
ACCGACTACCTCTGCCGACGATCCATCACTGAAGCCGATGATGAGGACATGCCATTTTCAGGGCACGCGCTGAT : 900
GCCACCTGCCACCGCCAAGCTACATCGCCAATACTACGAGCGGACAAACATATCCGCACAAGACCTACGACCTG : 975
CCGCATGCTAACCTCACAACGCTACTCAATCTTAGCCGACAACCTAGTCACTGAGGGACAGGTTACCCCGATAATG : 1050
GCACTCCAGGCTCTAAAGAACCATGAGATGTATACGAAGTTGACGCGGGACGACGTTAAACTGATCATGGACACG : 1125
CTTGAGAACAAGGTGCGCTGCTACGGATTGCGGGCGGTCCTAGAGGACTTTGAACTCATGGACTGCTTTAGCAGC : 1200
GTCCTGGGGTCAAAAGTGGAGGTTCCGGCCCGTCGGCGTTGCGTTTTCCCGGCATGCTGATGAGACGATGTAT : 1275
TCATGA : 1281
    
```

Figura 3.3.1: Secuencia del cDNA de *flbB* obtenida mediante su secuenciación tras ser amplificado a partir de una genoteca de mRNA de una cepa salvaje cultivada durante 24 horas. Las líneas de colores indican la extensión de cada exón.

3.3.2. *flbB* codifica un posible factor de transcripción tipo bZIP.

El ORF de *flbB* consta de 1624bp (1281 en la secuencia codificante). La figura 3.3.1 muestra los cinco exones que posee. Los intrones 2, 3 y 4 son de tamaño usual, con 49, 46 y 48 pares de bases, respectivamente, mientras que el intrón 1 es más grande de lo habitual, con 200pb (no mostrado).

La secuencia peptídica consta de 426 aminoácidos, con una predicción para su masa y punto isoelectrico de 46,8kDa y pH 5,98, respectivamente. La base de datos PFAM únicamente reconoce la presencia de un dominio tipo bZIP (Basic Zipper; Vinson *et al*, 1989; Vinson *et al*, 2006). Los factores de transcripción pertenecientes a esta familia, contienen en su dominio bZIP una región básica consistente en la repetición de cuatro o cinco grupos de 7 aminoácidos numerados de la “a” a la “g” y llamados heptadas, los cuales, forman una α -hélice (Landschultz *et al*, 1988). Esta región básica es necesaria para que se formen los dímeros (homo u heterodímeros), conformando así la región de unión al DNA que reconoce secuencias palindrómicas o pseudopalindrómicas (Fujii *et al*, 2000). El dímero queda orientado en perpendicular respecto al DNA (Ellenberger *et al*, 1992). La figura 3.3.2 muestra la predicción de la estructura espacial realizada para el bZIP de FlbB, el cual, se encuentra localizado entre los residuos 79 y 113 (figura 3.3.3).

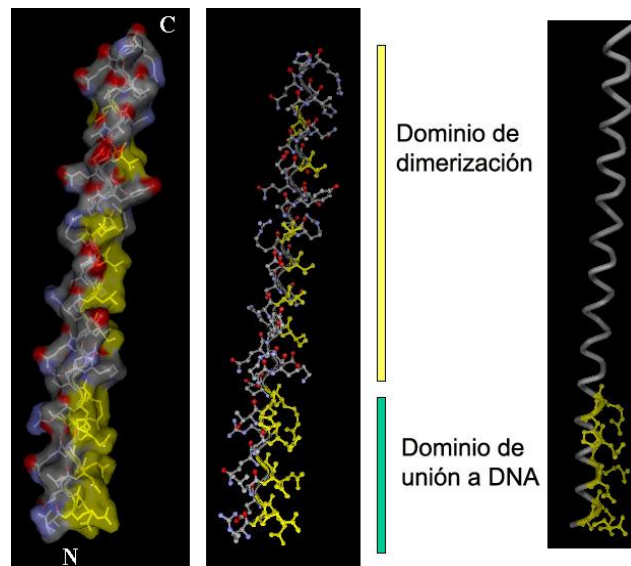


Figura 3.3.2: Predicción para la estructura espacial del bZIP de FlbB. Las barras amarilla y verde delimitan los dominios de dimerización y unión a DNA, respectivamente. C: Extremo carboxilo terminal. N: Extremo amino terminal.

Las búsquedas realizadas en las bases de datos (www.expasy.org) permitieron identificar posibles homólogos en otras especies del género *Aspergillus*, como *A. terreus*, *A. fumigatus* o *A. oryzae*, al igual que en otros hongos filamentosos como *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum*, *Neurospora crassa*, *Botrytis cinerea*, *Coccidioides immitis*, *Sclerotia sclerotiorum* o *Stagonospora nodorum* (figura 3.3.3). El posible homólogo de *B. cinerea*, por un lado, y aquel designado como Cimm2 de *C. immitis*, por el otro, presentan menor similitud con respecto a FlbB en la región

previa al bZIP, y mayor similitud en las regiones conservadas del extremo C-terminal. Por ello, es posible diferenciar un subgrupo de posibles homólogos de FlbB con menor conservación de secuencia en esta región N-terminal.

Por otro lado, no se ha identificado ninguna proteína con similitud suficiente en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* o *Schizosaccharomyces pombe*, o eucariotas superiores como *Homo sapiens* o *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo una distribución filogenética de los posibles homólogos de FlbB restringida a hongos con capacidad conidiante.

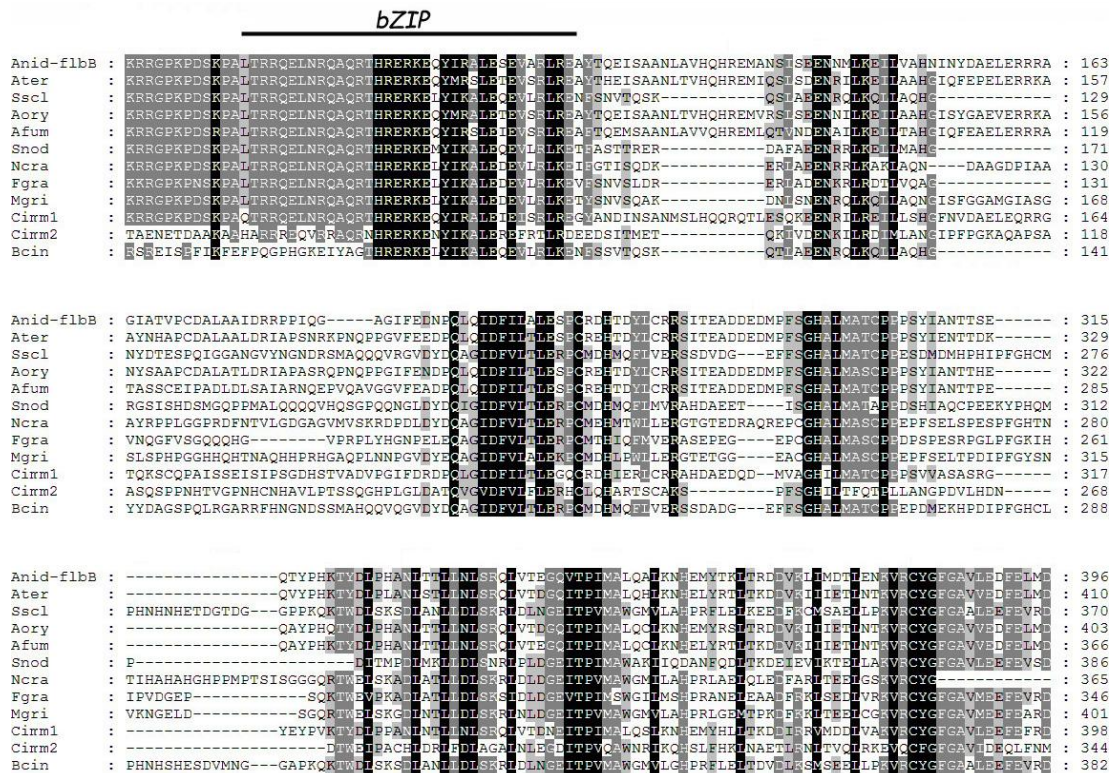


Figura 3.3.3: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbB. La línea indica la extensión del dominio bZIP. Las regiones con bajo nivel de conservación han sido excluidas de la imagen. Nomenclatura: Anid: *A. nidulans*; Ater: *A. terreus*; Bcin: *B. cinerea*; Sscl: *S. sclerotium*; Aory: *A. oryzae*; Afum: *A. fumigatus*; Cimm: *C. immitis*; Snod: *S. nodorum*; Ncra: *N. crassa*; Fgra: *F. graminearum*; Mgr1: *M. grisea*.

Con la intención de profundizar en esta idea, se realizó una búsqueda para identificar todas las proteínas con dominio bZIP a lo largo de los genomas de diferentes hongos filamentosos (*A. nidulans*, *C. immitis*, *M. grisea* y *N. crassa*) y de levaduras (*S. cerevisiae* y *S. pombe*). En *A. nidulans* fueron identificadas 23 proteínas, de entre las cuales, ha sido definida una función para las siguientes: AN1812.3/JlbA

(Strittmatter *et al*, 2001), AN2911.3/AtfA (Aguirre *et al*, 2005); AN3675.3/CpcA (Hoffmann *et al*, 2001), AN4361.3/MetR (Natorff *et al*, 2003), AN4900.3/MeaB (Polley y Caddick, 1996), AN7513.3/NapA (Asano *et al*, 2007), AN8251.3/HapX (Tanaka *et al*, 2002) y AN9397.3/HacA (Saloheimo *et al*, 2003). El árbol filogenético resultante muestra que el bZIP de FlbB pertenece a un brazo del cual los bZIP de levadura quedan excluidos (figura 3.3.4). Los análisis *in silico* sugieren, por tanto, una función restringida a hongos filamentosos para FlbB, y probablemente para otras proteínas con dominio bZIP como AN4900.3/MeaB, AN0951.3 o AN8772.3.

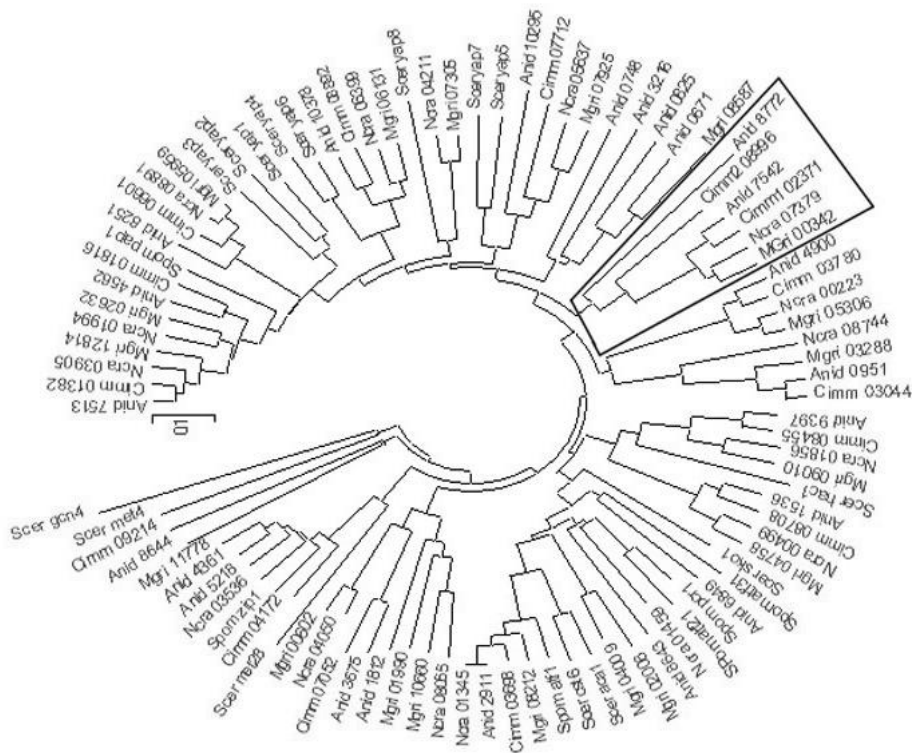


Figura 3.3.4: Árbol filogenético de los dominios bZIP identificados en hongos filamentosos y levaduras. El brazo del árbol al que pertenece el bZIP de FlbB queda encuadrado en negro. Nomenclatura: Anid: *A. nidulans*; Cimm: *C. immitis*; Nera: *N. crassa*; Mgr: *M. grisea* ; Spom: *S. pombe*; Scer: *S. cerevisiae*. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el software MEGA 3.1 (método Neighbor-Joining, con un “bootstrap” de 50000 replicados y el modelo amino p-distance).

Por último, análisis realizados mediante diferentes programas disponibles en www.expasy.org (HMMTOP, PredictProtein, SOSUL, TMAP, TMHMM, Tppred, TopPred y PSORT) no predijeron la presencia de ningún dominio transmembrana o residuos de cisteína susceptibles de prenilación (PrePS), lo cual, sugiere que FlbB no se encuentra directamente asociado a membrana.

3.3.3. Análisis de las mutaciones de las cepas BD11, BD12 y BD14.

Los experimentos realizados y discutidos en el capítulo anterior con la cepa BD12 han servido para poder localizar la mutación responsable de su fenotipo aconidial en el genoma de *A. nidulans*. Sin embargo, en Cordobés (2005) se describen los cruces realizados entre las cepas BD53, BD57, BD71 y BD63, para determinar que todas ellas portaban mutaciones que definían alelos del mismo gen. Todas estas cepas son progenie de las cepas BD11, BD12 y BD14. Por lo tanto, y atendiendo a los resultados obtenidos con BD12, se puede concluir que BD11 y BD14 portan mutaciones recesivas que definen nuevos alelos de *flbB*.

Para confirmar esta hipótesis se amplificó por PCR la región correspondiente a *flbB* a partir de los genomas de BD11, BD14 y FGSC26. La secuenciación de los productos permitió identificar nuevas mutaciones en *flbB*, a añadir a la hallada en BD12 (tabla 3.3.1). BD11, presenta la mutación puntual C1255T (911 en la secuencia codificante), más la delección C1257Δ. Ello provoca por un lado, la sustitución P305L, previo a un cambio en el marco de lectura, añadiendo 36 aminoácidos fuera de fase antes de un codón stop. BD12 es un posible mutante defectuoso en procesamiento del mRNA, resultando en una forma truncada de FlbB a partir del residuo 267, con una pequeña cola de cuatro residuos antes de un codón stop. Por último, BD14 presenta el cambio puntual G456A (208 en la secuencia codificante). Ello provoca la sustitución G70R en la secuencia peptídica. Las tres mutaciones producen un fenotipo aconidial cuyas características serán desarrolladas en el presente capítulo.

Alelo	Cambio en DNA	Proteína mutante	Cambio en proteína
BD11	C1255T;Δ1257	1-304+L+35	P305L;P306fs *
BD12	G1143A	1-267+YVLR	L267fs * ^a
BD14	G456A	1-426	G70R

Tabla 3.3.1: Mutaciones caracterizadas en las cepas BD11, BD12 y BD14. fs* indica un cambio en el marco de lectura seguido de un codón stop; el superíndice “a” indica una terminación rápida.

3.3.4. Generación del mutante *ΔflbB*.

Para un correcto estudio y caracterización de *flbB*, se generó su nulo por reemplazamiento génico, sustituyendo el *locus flbB* por la construcción generada mediante PCR de fusión (Yang *et al*, 2004) consistente en el gen *pyrG* de *A. fumigatus* con el promotor (1,5Kb) y terminador (1,5Kb) de *flbB* (ver apartado 3.2.6).

La correcta inserción se verificó mediante técnica de Southern Blot (figura 3.3.5), utilizando, por un lado, una sonda para *pyrG* y, por otro, una sonda para el promotor de *flbB*. El mutante nulo generado se denominó *BD143*.

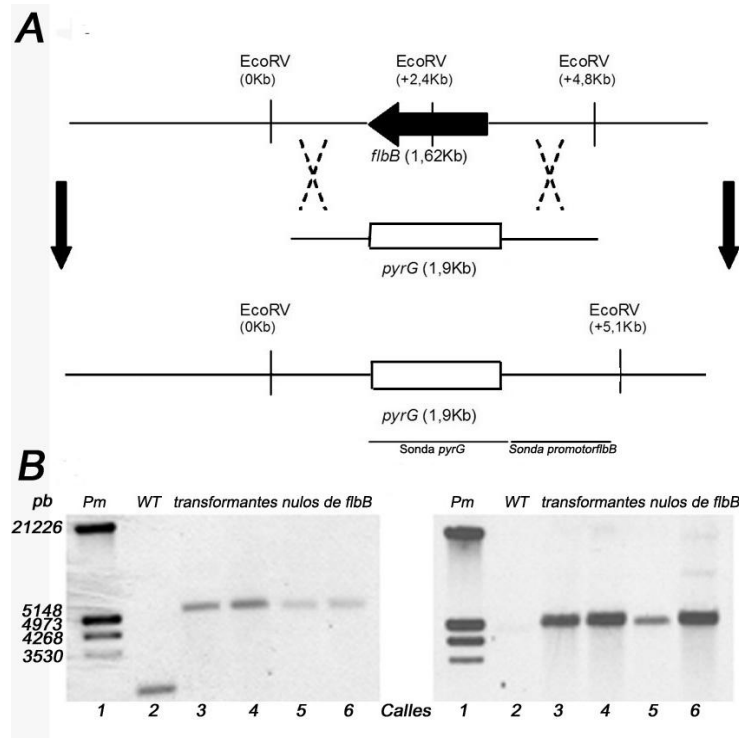


Figura 3.3.5: Generación del mutante nulo de *flbB*. A) La inserción del producto de PCR provoca la pérdida de un sitio de restricción para *EcoRV*, dejando un único fragmento *EcoRV-EcoRV* en la región. B) Análisis de hibridación DNA-DNA mediante técnica de Southern Blot para los transformantes candidatos a mutantes nulos de *flbB*. El DNA genómico fue digerido con *EcoRV*. Se realizaron dos ensayos, uno con una sonda para el promotor de *flbB* (imagen izquierda) y otro con una sonda para *pyrG* de *A. fumigatus*. En el primer caso, se observa un cambio en el tamaño de las bandas, de 2,4Kb (calle 2) hasta 5,1Kb (calles 3-6). En el segundo, la banda de 2,4Kb no está presente, ya que, el genoma de la cepa salvaje (TN02A3) no contiene el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Todos los transformantes son mutantes nulos de *flbB*, al presentar una única banda de 5,1Kb.

3.3.5. Análisis fenotípico de los mutantes en *flbB* en medio sólido.

Una vez caracterizadas las mutaciones de las cepas *BD11*, *BD12* y *BD14*, y generado el mutante nulo de *flbB* (*BD143*), todos los mutantes disponibles fueron analizados fenotípicamente en diferentes condiciones inductoras. El objetivo era analizar si se daban diferencias fenotípicas entre los mutantes y poder relacionar así las regiones funcionales definidas por cada uno de ellos con la respuesta ante dichas condiciones inductoras.

Todos los mutantes de *flbB* disponibles presentaron fenotipo aconidial en MMA sólido (figura 3.3.6, columna nombrada como MMA). La reducción del medio en glucosa a un quinto de la cantidad establecida para el MMA, por su parte, provocó niveles bajos de conidiación acompañada de un fenómeno autolítico en el centro de la colonia (región más antigua) en el caso de $\Delta flbB$ (BD143). BD14 presenta una mayor conidiación que el mutante nulo y esta respuesta es mucho más pronunciada en el caso de BD11 y BD12 (figura 3.3.6, columna nombrada como MMA-C).

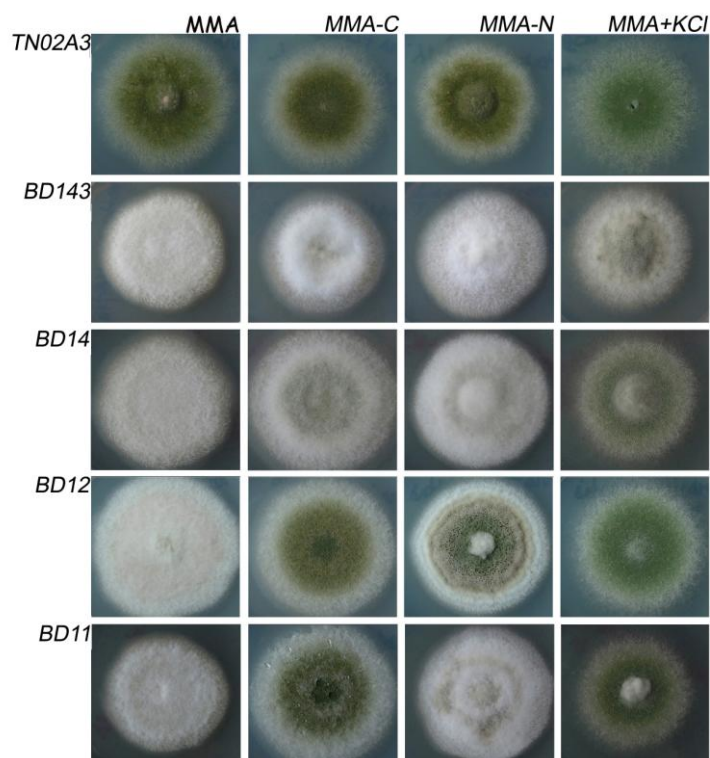


Figura 3.3.6: Caracterización fenotípica de los mutantes de *flbB* en medio sólido. Se muestran los fenotipos de la cepa salvaje (TN02A3), $\Delta flbB$ (BD143), BD14, BD12 y BD11 (desde la mutación más N-terminal hacia el C-terminal) en medio mínimo (MMA), medio mínimo con dilución de glucosa y nitrato al quinto (MMA-C y MMA-N) y medio mínimo con KCl (MMA+KCl), a las 72 horas desde la inoculación. Barra de escala: 1.0cm.

En medio mínimo con reducción de nitrógeno al quinto, ni el mutante nulo ni BD14 presentan un fenotipo conidiante. Sin embargo, en el caso de BD11 sí se observa conidiación aunque no de forma muy intensa; por último, es BD12 el mutante que presenta la respuesta conidiante más intensa. En los dos últimos casos, se aprecian anillos de conidiación (figura 3.3.6, columna nombrada como MMA-N).

Por último, bajo condiciones de estrés salino, inducidas mediante la adición de KCl (0,6M) y MES (0,05M) al medio mínimo, el mutante nulo presenta conidiación dispersa sobre un patrón de crecimiento típicamente “*fluffy*” o aconidial. Sin embargo, *BD11* y *BD12* conidian de forma similar a la cepa silvestre (*TN02A3*), mientras que *BD14* responde a este estímulo inductor pero, con menor intensidad (figura 3.3.6, columna nombrada como MMA+KCl).

3.3.6. Análisis fenotípico de los mutantes en *flbB* en medio líquido.

Los mutantes de *flbB* disponibles también fueron caracterizados en medio líquido, 10 y 20 horas después de transferir el micelio desde MMA a medio fresco sin glucosa o nitrógeno (figura 3.3.7A; Skromne *et al*, 1995). A modo de control, los micelios de las cepas analizadas también se transfirieron a MMA líquido fresco, y en estas condiciones, todos los mutantes mantuvieron un patrón de crecimiento vegetativo (figura 3.3.7A, columna +C+N).

En medio sin glucosa, en cambio, la cepa silvestre produce conidióforos simplificados, tal y como se describió por Skronme *et al* (1995; figura 3.3.7A, columna -C). Por el contrario, tanto el mutante nulo como *BD14* presentan unas estructuras aún más simples y muy poco abundantes, basadas en conidias aisladas que emergen a partir de hifas de un diámetro menor de lo normal (aproximadamente 1,5µm) (figura 3.3.7A, señalado con puntas de flecha). Los mutantes *BD11* y *BD12* presentan una respuesta intermedia entre la cepa salvaje y el mutante nulo (o *BD14*).

En condiciones de agotamiento de nitrógeno, mientras que la cepa salvaje genera conidióforos (Skronme *et al*, 1995), ninguno de los mutantes de *flbB* analizados responde a este estímulo conidiando (figura 3.3.7A, columna -N). Además, muestran un fenotipo autolítico confirmado mediante tinción con fluoresceína (Roncal *et al*, 1993) (figura 3.3.7B).

En medio con KCl, mientras la cepa salvaje produce conidióforos, ninguno de los cuatro mutantes de *flbB* es capaz de conidiar. Únicamente en el caso de *BD12* se han llegado a observar vesículas aisladas (señaladas con puntas de flecha) formándose a las 20 horas tras el cambio a medio con KCl (figura 3.3.7A, columna +KCl).

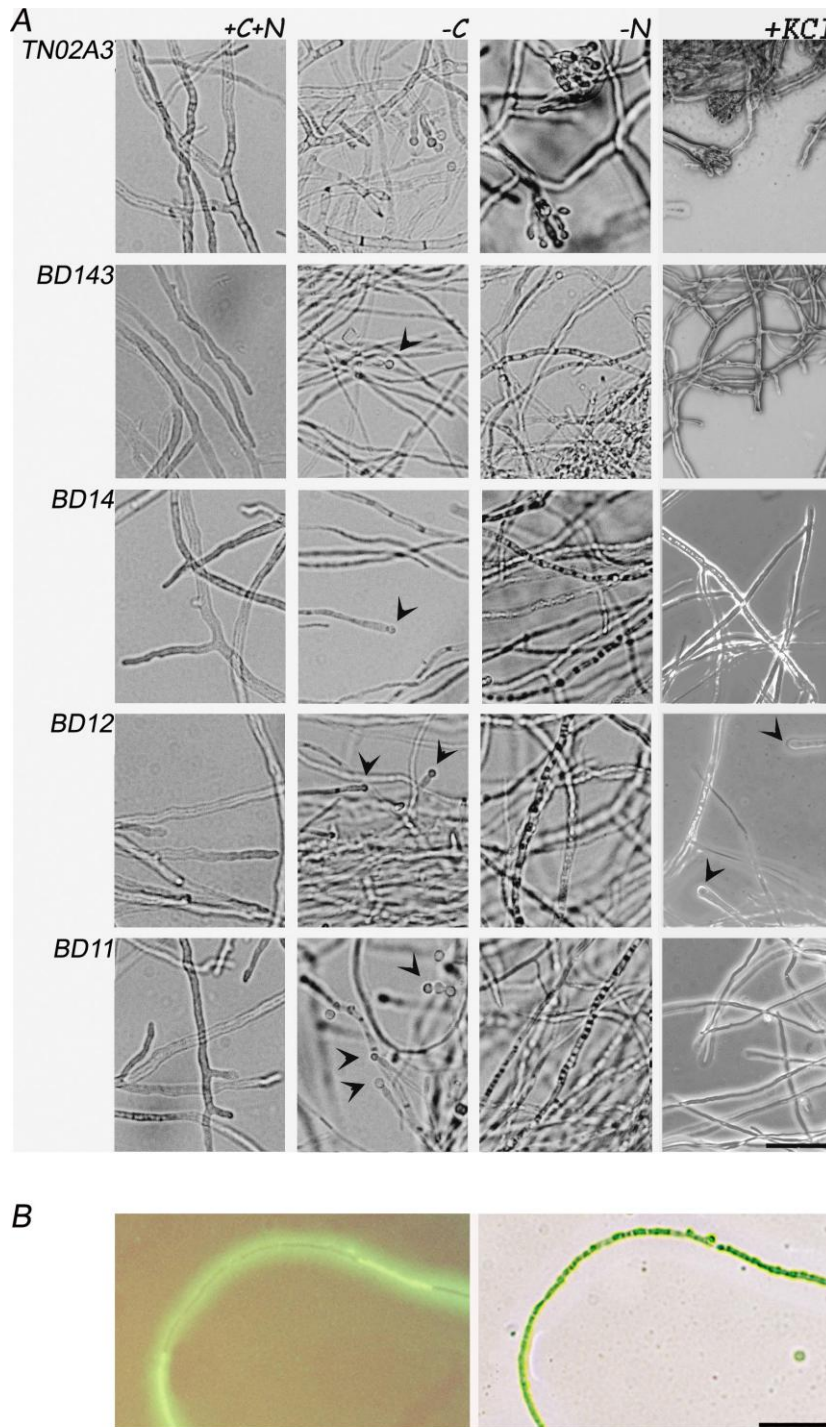


Figura 3.3.7: Caracterización fenotípica de los mutantes de *flbB* en medio líquido. A) Se muestran los fenotipos de la cepa salvaje (TN02A3), $\Delta flbB$ (BD143), BD14, BD12 y BD11 (desde la mutación más N-terminal hacia el C-terminal) en medio mínimo (MMA), medio mínimo sin glucosa (-C) y sin nitrato (-N) y medio mínimo con KCl (+KCl), a las 20 horas desde la transferencia a dichos medios (ver Materiales y Métodos). Barra de escala: 30 μ m. B) Tinción con fluoresceína del cultivo de la cepa BD12 a las 20 horas tras el cambio a medio sin nitrato. El tinte no es retenido a lo largo de una elevada superficie de las hifas, demostrando la degradación de la pared celular. Barra de escala: 40 μ m.

3.3.7. Estudio de la expresión de *flbB* y *brlA* en fondos genéticos silvestre y $\Delta flbB$.

Con el objetivo de conocer los niveles de mRNA de *flbB* alcanzados en diferentes etapas del ciclo de vida (crecimiento vegetativo y reproducción asexual), tanto en la cepa salvaje como en los mutantes de *flbB*, se realizaron experimentos de hibridación RNA-DNA mediante la técnica de Northern Blot.

Así, se observó que la expresión de *flbB* durante el ciclo de vida de *A. nidulans* comienza durante el crecimiento vegetativo y continúa en etapas tempranas de la reproducción asexual (6 horas) (figura 3.3.8A), desapareciendo por completo en las etapas tardías de dicho ciclo (a partir de las 12 horas) y durante la reproducción sexual. El descenso en los niveles de expresión del mRNA de *flbB* coincide con el comienzo de la transcripción de *brlA*.

Estos resultados no aclaran si FlbB actúa como activador o represor de la expresión de *brlA*, por lo que se analizó el mutante nulo de *flbB* (figura 3.3.8B, panel derecho). La ausencia de niveles detectables de mRNA de *brlA*, demuestra que FlbB es necesario para su activación, confirmando, además, como adecuada la nomenclatura utilizada para designar a AN7542.3 (*flbB*: fluffy low brlA expression; Wieser *et al*, 1994).

Por último, no se hallaron diferencias significativas en el patrón de expresión de *flbB* entre los fondos genéticos *veA* salvaje (FGSC4) (figura 3.3.8A) y mutante *veA1* (FGSC26) (figura 3.3.8B, panel izquierdo), sugiriendo que la expresión de *flbB* no está condicionada por el regulador de la conidiación dependiente de luz, VeA (Mooney y Yager, 1990).

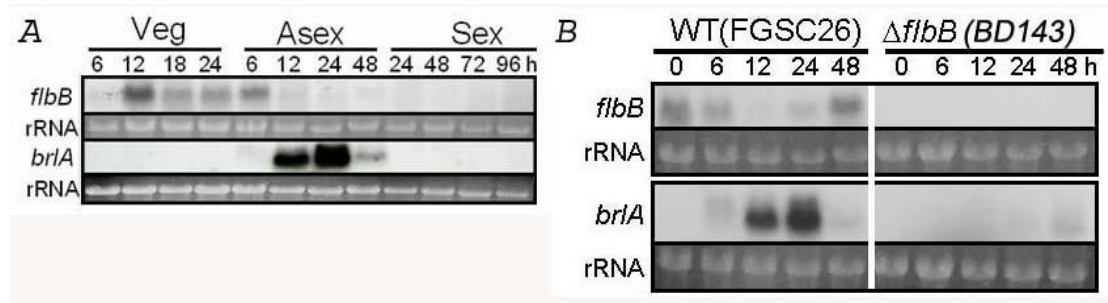


Figura 3.3.8: Expresión de *flbB* y *brlA* en fondos genéticos silvestre y $\Delta flbB$. A) Durante el ciclo de vida de la cepa FGSC4 (*veA* silvestre); B) Tras la inducción de la conidiación en los fondos genéticos *veA1* (FGSC26) y $\Delta flbB$. Veg: Crecimiento vegetativo; Asex: Reproducción asexual; Sex: Reproducción sexual. t=0h: inducción de la conidiación (ver Materiales y Métodos).

3.3.8. La sobreexpresión de *flbB* causa la inhibición de la conidiación en una cepa silvestre.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la función de FlbB en la inducción de la conidiación, se generó la cepa de sobreexpresión uniendo al promotor *alcA*, el ORF de *flbB* (Gwynne *et al*, 1987).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, en el sentido de una función activadora de la expresión de *brlA* por parte de FlbB, era de esperar un fenotipo hiperconidiante. Sin embargo, la sobreexpresión de la fusión *alcA::flbB* forzada en medio inductor con treonina, provocó un fenotipo aconidial (figura 3.3.9A y 3.3.9C), en el que los niveles del mRNA de *brlA* quedan anulados con respecto a la cepa control (figura 3.3.9B).

Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de FlbB en la célula deben estar controlados, ya que, tanto la sobreproducción como la disminución en sus niveles provocan una inhibición de la expresión de *brlA*. FlbB pudiera actuar en forma de complejo junto con otro(s) factor(es), de una forma estequiométricamente muy definida. La cantidad requerida de cada elemento del complejo, y por ello, de FlbB, sería un factor limitante en su actividad, de modo que, tanto el exceso como la falta de alguno de ellos perjudicaría su funcionalidad resultando en la inhibición de la expresión de *brlA*.

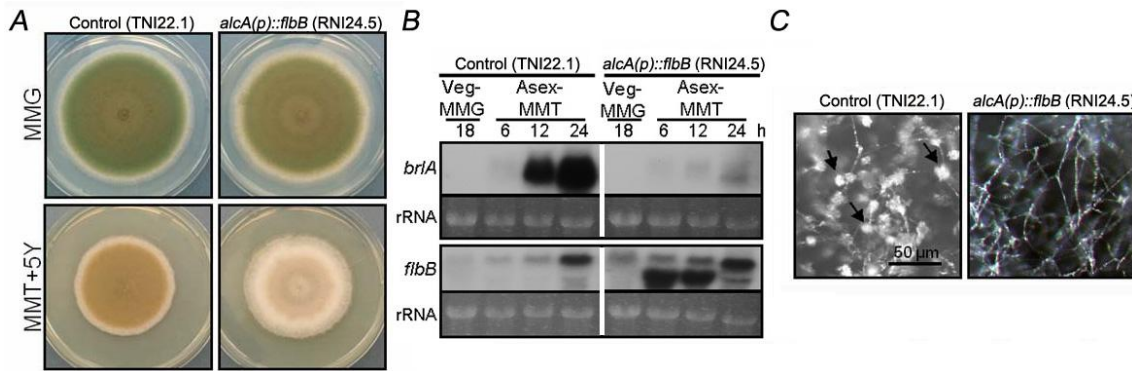


Figura 3.3.9: La sobreexpresión de *flbB* en un fondo genético silvestre inhibe la conidiación.

A) Imágenes de las cepas control (TNI22.1) y *alcA(p)::flbB* (RNI24.5) en medio mínimo no inductor (MMG: medio mínimo con glucosa) e inductor (MMT+5Y: Medio con treonina y extracto de levadura, 5g/l) a los cinco días desde la inoculación, a 37°C. La sobreexpresión de *flbB* provoca la inhibición de la conidiación. **B)** Las cepas control (TNI22.1) y *alcA(p)::flbB* (RNI24.5) fueron cultivadas en medio líquido con glucosa, a 37°C, 250rpm durante 18 horas y se transfirieron a medio sólido con treonina (MMT) como única fuente de carbono. Las muestras se recogieron a las 18 horas de crecimiento vegetativo (Veg-) y a las 6, 12 y 24 horas a partir de la inducción asexual (Asex-) en medio con treonina. Se extrajo RNA de cada muestra y se analizaron los niveles de mRNA de *brlA* y *flbB* mediante técnica de Northern Blot. A modo de control se midió la cantidad de rRNA en cada calle mediante tinción con bromuro de etidio. **C)** Cepas control (TNI22.1) y *alcA(p)::flbB* (RNI24.5) cultivadas en medio con treonina tras 48 horas tras la transferencia a MMT. La cepa control (TNI22.1) produce conidióforos (señalados mediante flechas), mientras que la cepa *alcA(p)::flbB* (RNI24.5) crece de forma vegetativa.

3.4. DISCUSIÓN.

FlbB es un posible factor de transcripción con un dominio de unión al DNA tipo bZIP (Vinson *et al*, 1989; Vinson *et al*, 2006) en su extremo N-terminal y otras regiones en el extremo C-terminal altamente conservadas entre sus posibles homólogos (figura 3.3.3). Para estas regiones las bases de datos no reconocen ningún dominio funcional conocido, pero basándose en el fenotipo aconidial de los mutantes BD11 y BD12, se puede afirmar que son imprescindibles para que FlbB pueda desempeñar su función correctamente.

La presencia de homólogos de FlbB queda restringida únicamente a hongos filamentosos que además se reproducen por conidiación y no a levaduras o eucariotas superiores. Además, y al igual que ocurre con AN8772.3, AN4900.3/MeaB (Polley y Caddick, 1996; Wong *et al*, 2007) o AN0951.3, el dominio bZIP de FlbB pertenece a una subfamilia de cremalleras de leucina que también es exclusiva de hongos

filamentosos conidiantes y de la que los bZIPs de levadura quedan excluidos (figura 3.3.4). Estos resultados implican una función altamente especializada evolutivamente para FlbB, como puede ser en este caso, la conidiación en hongos filamentosos.

En cuanto al comportamiento de los mutantes *flbB*⁻ en diferentes medios de cultivo estudiados, cabe afirmar que la región FlbB_(K67-A78) y las regiones de la mitad C-terminal son necesarias para una correcta conidiación en medio sólido (exposición aérea). En medio líquido, por otro lado, donde los diferentes estímulos inductores pueden ser analizados por separado, se ha observado una respuesta específica en cada caso. Así, en condiciones de agotamiento en la fuente de carbono (Skronme *et al*, 1995), la región FlbB_(K67-A78) es esencial para una correcta respuesta conidante. Por el contrario, no parece que las regiones del extremo C-terminal definidas por las mutaciones de BD11 y BD12 jueguen un papel tan central (figuras 3.3.6 y 3.3.7).

En condiciones de agotamiento en la fuente de nitrógeno, por otro lado, todos los dominios son imprescindibles en medio líquido, mientras que en medio sólido, el truncamiento a partir del residuo 267 (BD12) no parece provocar una gran pérdida de actividad. Sin embargo, el truncamiento de FlbB a partir del residuo 305 (BD11) sí tiene un efecto notable en la actividad, lo que lleva a plantear la posibilidad de interacciones complejas entre diferentes dominios, o de éstos con otras proteínas.

En medio sólido salino, al contrario que el mutante con la sustitución G70R, el cual, presenta un fenotipo similar al del mutante nulo, aquellos mutantes afectados en la mitad C-terminal muestran todavía una respuesta conidante evidente. Ello indica que la región FlbB_(K67-A78) se presenta como esencial para una respuesta conidante ante este estímulo en medio sólido. En medio líquido, por último, se requieren todas las regiones, ya que, ninguno de los mutantes de *flbB* es capaz de conidiar (únicamente, aunque de forma retardada, BD12 parece ser capaz de comenzar a generar estructuras asexuales; figura 3.3.7A, fila 4 y columna 4).

Así, en términos generales, sí parece haber una relación entre los diferentes dominios definidos por los mutantes *flbB*⁻ caracterizados y los mecanismos de respuesta ante los estímulos inductores analizados. La región FlbB_(K67-A78) parece necesaria en todos los casos analizados, probablemente porque la unión a los

promotores adecuados en cada caso se ve afectada, disminuida o anulada. Las otras dos regiones (a partir de los residuos 267 o 305) parecen guardar relación con mecanismos concretos de respuesta, aunque, lo único afirmable hasta el momento es que esta relación es compleja.

Por otro lado, y aunque el hecho de que la expresión de *brlA* comience justo cuando finaliza la de *flbB* podría hacer pensar que FlbB actúa como represor transcripcional de *brlA*, no se ha detectado expresión alguna de *brlA* en el mutante nulo de *flbB*, por lo que se concluye que FlbB es requerido, directa o indirectamente, como su activador transcripcional.

Además, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con la cepa de sobreexpresión, permiten afirmar que la regulación de la expresión de *flbB* debe estar controlada muy finamente para un desarrollo asexual correcto (figura 3.3.9). Como ya se ha visto, tanto la hipo como hiperfuncionalidad de FlbB provocan la inhibición de la conidiación. Ello puede ser explicado a través de la hipotética formación de un complejo protéico del que formara parte FlbB, pero, en el que la estequiometría de los monómeros deba ser controlada de forma muy específica. La ausencia de FlbB podría provocar un ensamblamiento incorrecto o inexistente de dicho complejo, mientras que en el caso de sobreproducción de FlbB, éste pudiera ocupar posiciones en el complejo reservadas a otros monómeros. En ambos casos, el resultado sería una pérdida de actividad del hipotético complejo, derivando en una disminución o anulación de la capacidad conidiante.

Se ha observado también que a las 48 horas tras la inducción de la conidiación, *flbB* vuelve a expresarse (figura 3.3.8B). Así, cabe plantear la posibilidad de que FlbB actúe de forma cíclica, a modo de sensor, de cara a reconfirmar o recordar que la conidiación debe continuar a medida que las hifas avanzan en el medio, ocupan nuevos espacios y emergen al medio aéreo. En un patrón de crecimiento radial, las hifas periféricas mantienen el crecimiento vegetativo y las del interior de la colonia son las que conidian tras la emergencia al aire. Con el avance del frente de la colonia, las hifas que eran periféricas y vegetativas, pasan a ser hifas aéreas y a conidiar, lo que requeriría la nueva inducción de la expresión de *brlA* en ellas. Para confirmar este extremo deberían analizarse tanto la expresión de *flbB* como la de *brlA* en un intervalo de tiempo

mayor tras la inducción asexual y diferenciando zonas geográficas dentro de la colonia (Levin *et al*, 2007). En este sentido, existen otros factores que se comportan de manera similar, como *brlA* o *abaA* (Clutterbuck, 1970; Mirabito *et al*, 1989).

Por último, y como se puede observar en la figura 3.3.8, no existen diferencias en los niveles de expresión de *flbB* entre las cepas *veA* silvestre (FGSC4; figura 3.3.8A) y *veA1* (FGSC26; figura 3.3.8B, panel izquierdo), de modo que se excluye la posibilidad de que la expresión de *flbB* esté regulada por VeA.



**4-. Estudio de la capacidad de unión
al DNA del dominio bZIP de FlbB.**

4.1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior se ha descrito a FlbB como un posible factor de transcripción (TF) debido a la presencia de un dominio de unión a DNA del tipo bZIP. En este dominio, la región presuntamente involucrada en el reconocimiento específico y la unión a las bases del DNA guarda una elevada similitud con respecto a la misma región del TF Pap1 de *S. pombe* u otras proteínas con dominio bZIP de *A. nidulans*.

El homólogo de Pap1 en *A. nidulans* no es FlbB sino AN7513.3, recientemente caracterizado como NapA (Asano *et al*, 2007). La comparación de la estructura primaria de esta región entre FlbB y Pap1 ha permitido elaborar una hipótesis de trabajo en la que se propone que FlbB es capaz de unir a secuencias de DNA similares a las que reconoce Pap1, como son las que poseen las dianas PLD (5'-TTACGTAA) y AP-1 (5'-TTAGTCA) (Toda *et al*, 1992). Para verificar esta hipótesis, se ha expresado en bacteria una forma truncada de FlbB que contiene el dominio bZIP fusionado a la glutatión-S-transferasa (GST::FlbB_{bZIP}). La región seleccionada posee como limite inferior (más carboxilo terminal) el aminoácido situado después de la putativa región de cremallera de leucinas, el residuo Asn140 (ver figura 3.3.3). El limite superior (más amino terminal) se ha establecido en el residuo Lys67. Para ello, se ha tenido en cuenta el fenotipo aconidial causado por la sustitución Gly70Arg en la cepa mutante BD14. Este residuo de glicina está conservado entre los posibles homólogos de Pap1 y los de FlbB (ver alineamiento en figura 4.3.1). Por otro lado, se ha demostrado que la región donde se localiza la glicina 70 de FlbB forma parte de un dominio funcional en el factor de transcripción tipo bZIP AN8251.3/HapX (Tanaka *et al*, 2002).

La proteína de fusión GST::FlbB_{bZIP} se ha utilizado en ensayos de cambio de movilidad electroforética de DNA (Electrophoretic Mobility Shift Assay, **EMSA**; Fried y Crothers, 1981; Garner y Revzin, 1981) para demostrar la capacidad de unión del bZIP de FlbB a las secuencias nucleotídicas reconocidas por Pap1 y para analizar tanto la afinidad como la especificidad en esta unión al DNA. Además, se ha generado una segunda fusión conteniendo la sustitución Gly70Arg hallada en la cepa aconidial BD14 (GST::FlbB_{bZIPG70R}), para analizar, dada su proximidad al dominio bZIP, un hipotético papel de este residuo en la unión al DNA.

Se han realizado EMSAs para visualizar actividades de unión a DNA dependientes de FlbB en extractos crudos de *Aspergillus nidulans* obtenidos de células en fase vegetativa de crecimiento. Por último, se ha analizado la unión de FlbB-bZIP al promotor del gen maestro de la ruta de conidiación *brlA*, puesto que FlbB ha sido clásicamente propuesto como el efector final de la ruta de inducción temprana que ha de regular directamente su expresión (Seo *et al*, 2006).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1. Cepas y oligonucleótidos utilizados.

Las cepas de *A. nidulans* utilizadas en el presente capítulo se describen en la tabla 4.2.1:

Cepa	Genotipo	Fuente
BD11	<i>biA1; flbB_{P305L;P306fs} *; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD12	<i>biA1; flbB_{L267fs} *; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD14	<i>biA1; flbB_{G70R}; veA1</i>	Cordobés, 2005; Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD143	<i>pyrG89; AnkuA::argB; argB2; ΔflbB::pyrG, pyroA4; veA1</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
ΔflbD	<i>pyrG89; AnkuA::argB; argB2; pyroA4; ΔflbD::pyrG, veA1</i>	Garzia <i>et al</i> , no publicado
TN02A3	<i>pyrG89; AnkuA::argB; argB2; pyroA4; veA1</i>	Nayak <i>et al</i> , 2006

Tabla 4.2.1.: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en el presente capítulo.

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 4.2.2:

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Objetivo
flbB_{ZIP(+1)}	CGG GAT CCA AAC GAA GAG GAC CAA AAC CCG ATA GC	Amplificación del bZIP de FlbB (K67-N140)
flbB_{ZIP(-1)}	CGG AAT TCT CAG TTT TCC TCC GAT ATG GAG TTG GCC	Amplificación del bZIP de FlbB (K67-N140)
AP1-A	GGT TTG AAT AGG ATT AGT CAG AAA TGG TTC AAT TTT	Generación sonda AP-1
AP1-B	GGA AAA TTG AAC CAT TTC TGA CTA ATC CTA TTC AAA	Generación sonda AP-1
PLD-A	GGA TGA ACC AAA GGT AGT TTA CGT AAT CTT GGT AAT CAA	Generación sonda PLD
PLD-B	GGT TGA TTA CCA AGA TTA CGT AAA CTA CCT TTG GTT CAT	Generación sonda PLD
APIAMut1	GGT TTG AAT AGG ATT AGT AAG	Generación sonda AP-1 mutante

	AAA TGG TTC AAT TTT	(-TTAGT <u>AA</u> -)
APIBMut1	GGA AAA TTG AAC CAT TTC TTA CTA ATC CTA TTC AAA	Generación sonda AP-1 mutante (-TTAGT <u>AA</u> -)
APIAMut2	GGT TTG AAT AGG ATT AAT AAG AAA TGG TTC AAT TTT	Generación sonda AP-1 mutante (-TTA <u>AT</u> <u>AA</u> -)
APIBMut2	GGA AAA TTG AAC CAT TTC TTA TTA ATC CTA TTC AAA	Generación sonda AP-1 mutante (-TTA <u>AT</u> <u>AA</u> -)
bZIP_{G70R(+1)}	CC AAA CGA AGA CGA CCA AAA CCC GAT AGC	Generación de la construcción GST::FlbB _{bZIPG70R}
bZIP_{G70R(+1)}	GCT ATC GGG TTT TGG TCG TCT TCG TTT GG	Generación de la construcción GST::FlbB _{bZIPG70R}
7223(+1)	GAC TAG TCA TCT CGG CCA TTT CGG G	Amplificación de la región intergénica entre AN7223.3 y AN10909.3
7223(-1)	GAC TAG TCG TGA AGG ACA TTA TGC ACT CGC	Amplificación de la región intergénica entre AN7223.3 y AN10909.3
brlAp1Up	CCC CCG GGG TCT TCG AGC GAC GGG GC	Amplificación del promotor de <i>brlA</i>
brlAp1Dw	GCT CTA GAG GTC GTG CAT TCC TCA GGG C	Amplificación del promotor de <i>brlA</i>
brlAp2Up	GCT CTA GAC CAC AAT GGC TGA TAC CGG ACC	Amplificación del promotor de <i>brlA</i>
brlAp2Dw	CGG GAT CCG AGG AAG TGG TAA ACT GGC GGA TGG	Amplificación del promotor de <i>brlA</i>

Tabla 4.2.2: Oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo.

4.2.2. Construcción y purificación de las fusiones GST::FlbB_{bZIP} y GST::FlbB_{bZIPG70R}.

Utilizando los oligonucleótidos flbB_{bZIP(+1)} y flbB_{bZIP(-1)} (ver tabla 4.2.2), se amplificó un fragmento *EcoRI-BamHI* del cDNA de *flbB*, el cual, codifica para la región (Lys67-Asn140) que contiene el dominio bZIP. Este fragmento fue ligado al plásmido pGEX-2T (Pharmacia; Smith y Johnson, 1988) en sus sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*, generando el plásmido pGEX-2T::FlbB_{bZIP}. El plásmido pGEX-2T::FlbB_{bZIPG70R} para la expresión de GST::FlbB_{bZIPG70R} se obtuvo como se describe en el apartado 4.2.8.

Una vez generados los plásmidos, las proteínas se expresaron en la cepa DH1 de *E. coli*. La expresión de las fusiones fue inducida añadiendo al medio (LB con ampicilina, 100µg/ml) una concentración final de 0.1mM IPTG (Sigma). Las proteínas se purificaron tras una hora de inducción, siguiendo el protocolo definido por Pharmacia con ciertas modificaciones. Se utilizó un volumen de 200µl de Glutation Sefarosa 4B (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). La resina se estabilizó en el soporte durante 15min a 4°C, y se lavó tres veces con un volumen de resina del tampón 1xPBS a 0°C. A continuación se pasó dos veces por la columna el extracto de bacteria a una velocidad de flujo de aproximadamente 0.5ml/min. La resina se lavó dos veces con 1x PBS a 0°C. Para la elución, se utilizaron dos concentraciones de Glutation reducido, 10mM ó 40mM, además de, DTT (2mM) y Tris-HCl (50mM, pH=8.0). Se añadió la solución de elución a la columna, se dejó estabilizar durante tiempos variables entre los 20min y las 15 horas, y se eluyó recogiendo fracciones de 200-300µl, siempre a 4°C. A continuación se midió la concentración de las proteínas en las muestras eluidas mediante el ensayo de Bradford (1976) y se verificó la presencia de la fusión de interés mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

4.2.3. Electroforesis de poliacrilamida.

Se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al* (1989). La electroforesis se realizó utilizando la celda Mini Protean 3 de Bio-Rad, con un amperaje constante de 30mA por gel. Las muestras, mezcladas o resuspendidas en tampón de carga de Laemli (Cracking-buffer), se hirvieron a 95°C durante 5min, se enfriaron en hielo durante 2min y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5min antes de cargarlas en los pocillos del gel. Los geles se tiñeron con la solución Biosafe Coomassie Staining (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se secaron en un secador Bio-Rad modelo 583 durante 60min a 80°C.

4.2.4. Anillamiento de oligonucleótidos para Ensayos de Retardamiento en Gel.

Los oligonucleótidos de doble hebra conteniendo las secuencias PLD o AP-1 fueron preparados siguiendo el protocolo descrito por Orejas *et al* (1995), anillando cantidades equimolares de los oligonucleótidos de hebra simple (PLD-A y PLD-B, AP1-A y AP1-B, AP1Mut1-A y AP1Mut1-B, o AP1Mut2-A y AP1Mut2-B;

ver tabla 4.2.2), en una solución de Tris-HCl (50mM; pH=7,5), 10mM MgCl₂, 5mM DTT y 1mM de espermidina. El DNA fue desnaturalizado calentando las mezclas a 85°C durante 3min y el anillamiento de las hebras se obtuvo 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 desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% y siguiendo el método “Crush and Soak” de Maxam y Gilbert (1980). Las concentraciones de los fragmentos de DNA se estimaron midiendo la densidad óptica de las soluciones a 260nm.

4.2.5. Marcaje radioactivo de sondas para Ensayos de Movilidad Electroforética (EMSA).

El marcaje radioactivo de sondas se realizó mediante relleno de extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, en presencia de una mezcla de dNTPs conteniendo [α -³²P]dCTP. En cada reacción se marcaron 100ng de fragmento o 3µg de digestión plasmídica, disueltos en un volumen de 13µl de solución TE (Trizma-base: 10mM, pH=8.0 con HCl, EDTA: 1mM). Se añadieron 2µl de tampón Klenow 10x (Tris-HCl: 500mM, pH=7.5; MgCl₂: 100mM; DTT: 10mM; BSA: 500µg/ml), 1µl de dATP (0.5mM), 1µl de dTTP (0.5mM), 1µl de dGTP (0.5mM), 2µl de dCTP³² (3000 Ci/mmol), agua hasta 20µl y 1 unidad de fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche). Se dejó la reacción a temperatura ambiente durante 30min antes de añadir 4µl de dCTP (0.5mM) para, en 10min, finalizar las reacciones de relleno. Se añadió solución TE (pH=8.0) hasta 100µl y se purificó la sonda marcada con columnas Sephadex G50 (Healthcare) equilibradas en solución TE (pH=8.0), centrifugando 2min a 2000rpm.

4.2.6. Ensayos de retardamiento en gel.

Los ensayos de retardamiento en gel se llevaron a cabo de la forma descrita por Eisen *et al* (1988) y Espeso y Peñalva (1994), en una cubeta Hoeffer, resolviendo las muestras en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 4% en tampón de electroforesis 0,5x TBE (Stock 5x: Trizma-Base: 54g/l, pH=8.0 con HCl; Ácido Bórico: 27,5g/l; EDTA disódico: 3,72g/l). La reacción se preparó en tubos enfriados a 4°C mezclando: las diluciones adecuadas de las muestras protéicas a cargar y 11,5µl por reacción de una mezcla conteniendo poli(dIdC) o poli(dAdT) (Amersham; stock: 1µg/ml) como competidor inespecífico, Glicerol al 60%, solución de

retardamiento (10X: Hepes: 250mM, pH=7.9 con KOH; KCl: 500mM; MgCl₂: 50mM; EDTA: 1mM, pH=8.0; DTT: 10mM) y 1ng de sonda radioactiva (1μl/reacción). Una vez realizada la mezcla, la electroforesis se puso en marcha en vacío durante 30min a 200V y 4°C, y las reacciones de EMSA se mantuvieron incubando en hielo. Tras cargar las reacciones en el gel se desarrolló la electroforesis a voltaje constante de 200V durante un tiempo variable en función del tamaño de las sondas utilizadas (por ejemplo, 90 minutos para las sondas sintéticas de 30 pb). Finalizada la electroforesis, el gel se secó cubierto con celofán y sobre papel de filtro en el secador Bio-Rad, modelo 583, y se expuso con película sensible a la radioactividad a -80°C.

4.2.7. Obtención de extractos proteicos.

Para la obtención de extractos proteicos de células en crecimiento vegetativo, se germinaron las conidiosporas en medio líquido (10⁶ esporas/ml). El micelio obtenido tras 18 horas de cultivo se recogió por filtración y se almacenaron alícuotas de 250-300mg de micelio de cada cultivo a -80°C hasta disponer de todas las muestras. Éstas fueron liofilizadas durante 15 horas, y el micelio se rompió utilizando una FastPrep[®] (Savant Bio101 Inc.) a velocidad 4, durante 20seg y una bola de cerámica de 0,5mm. El micelio triturado se resuspendió en 1ml de solución A50 (25mM Hepes-K (pH=7.5, 0.5M); 50mM KCl (1M); 5mM MgCl₂ (1M); 0.1mM EDTA (0.5M, pH=8.0); 10% Glicerol; 0,5mM DTT (1M); 1mM Pfa-Block (100mM), 1μM Pepstatina (1mg/ml en EtOH); 0.6μM Leupeptina (1mg/ml en agua) y agua destilada hasta 10ml; Mingot *et al*, 2001) o solución “Drubin” (5mM Hepes-K (pH=7.5, 0.5M); 0,1% NP-40 (10%); 20mM KCl (1M); 1mM EDTA (0.5M, pH=8.0); 0,5mM DTT (1M); 1mM Pfa-Block (100mM); 1μM Pepstatina (1mg/ml en EtOH); 0.6μM Leupeptina (1mg/ml en agua) y agua destilada hasta 10ml; Drubin *et al*, 1988). Se incubó a 4°C durante 90min, en constante agitación por inversión utilizando una rueda giratoria. El extracto de proteínas se obtuvo retirando los restos celulares no solubles por centrifugación durante 30min a 14000 rpm y 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos enfriados a 0°C y se midió la cantidad total de proteína mediante el test de Bradford (1976), siendo almacenadas las muestras a -80°C hasta su utilización.

4.2.8. Obtención de la fusión GST::FlbB_{bZIP70R}.

Para la obtención de la fusión GST::FlbB_{bZIP70R}, se realizó una PCR mutagénica a partir del plásmido pGEX2T::FlbB_{bZIP} y los oligonucleótidos bZIP_{G70R(+1)}

y bZIP_{G70R(-1)}, utilizando polimerasa con actividad correctora (Pfu: Promega). Parte del producto de PCR se digirió con el enzima de restricción *DpnI* (Roche), para seleccionar las moléculas plasmídicas mutantes (no metiladas) respecto a las silvestres (metiladas) o híbridas (hemimetiladas). Se digirieron alrededor de 1-1,5µg de DNA plasmídico con 10 unidades de enzima *DpnI* durante dos horas a 37°C y se transformó *E. coli* (cepas DH1 o DH5α) con la mitad de la mezcla de digestión. Se extrajeron los plásmidos de los transformantes (apartado 2.2.6) y se verificó la presencia de la mutación mediante secuenciación.

4.2.9. Construcción de plásmidos para el análisis de la unión del bZIP de FlbB a promotores específicos.

La región intergénica entre *AN7223.3* y *AN10909.3* se amplificó utilizando los oligonucleótidos 7223(+1) y 7223(-1). El promotor de *brlA* se dividió en dos fragmentos solapantes que fueron amplificados mediante PCR con las parejas de oligonucleótidos *brlAp1Up* y *brlAp1Dw*, o *brlAp2Up* y *brlAp2Dw* (ver tabla 4.2.2). Este promotor se extiende 3,5kb desde el ATG inicial de *brlAa* (Boylan *et al*, 1987; Adams *et al*, 1988; Prade y Timberlake, 1993). Los fragmentos fueron introducidos en el plásmido pGEM-T-easy (Promega), generando los plásmidos pGEM-7223p (3,5Kb), *brlAp1-pGEM*(4,4Kb) y *brlAp2-pGEM* (5,2Kb). Los plásmidos se digirieron con *BamHI*, *AvaI* y *EcoRI* (pGEM-7223p), por un lado; *XbaI* y *AvaI* (*brlAp1-pGEM*), por otro; y *XbaI*, *AvaI* y *BamHI* (*brlAp2-pGEM*), por último. Estas digestiones generaron una colección de fragmentos que fueron posteriormente marcados radiactivamente y ensayados en EMSAs (ver apartados 4.2.5 y 4.2.6): pGEM-7223p: 7 fragmentos de 423, 37, 109, 226 (conteniendo una secuencia PLD), 232, 178, y 287pb, respectivamente. *brlAp1-pGEM*: 4 fragmentos de 100, 210, 530 y 550pb, respectivamente. *brlAp2-pGEM*: 7 fragmentos de 104, 146, 220, 249, 406, 483 y 595pb, respectivamente.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. La región de unión al DNA dentro del dominio bZIP de FlbB se encuentra conservada con respecto a la de Pap1.

En el capítulo anterior se ha descrito brevemente el mecanismo general de dimerización y de unión al DNA de los bZIP (ver apartado 3.3.2), a través del cual, son capaces de regular la expresión de sus genes diana. Una importante familia de

proteínas con dominio bZIP es la denominada AP-1 (Glover y Harrison, 1995), para la cual, se ha descrito una secuencia peptídica consenso encargada de la interacción con el DNA: **NXXAAXXCR** (siendo X un aminoácido cualquiera). Esta secuencia es variable, de modo que en el caso del TF involucrado en la respuesta a estrés oxidativo Pap1 (*S. pombe* **AP-1**; Castillo *et al*, 2002), se ha demostrado que es la región **NXXAQXXFR** la encargada de interacción con sus secuencias diana (Fujii *et al*, 2000), identificadas como **TTACGTAA** o secuencia PLD y **TTAGTCA** o secuencia AP-1 consenso (Toda *et al*, 1992).

La figura 4.3.1 muestra el elevado grado de conservación existente, respecto a la región de unión al DNA del bZIP, entre los homólogos de FlbB y aquellos posibles homólogos de Pap1 (en *A. nidulans* el homólogo de Pap1 es AN7513.3/NapA, situado al igual que *flbB* en el contig 1.129 del cromosoma IV; Asano *et al*, 2007). Debido a esta conservación en la estructura primaria, se planteó la posibilidad de que FlbB fuera capaz de unir las mismas dianas nucleotídicas de Pap1, extremo que será tratado en el siguiente apartado.

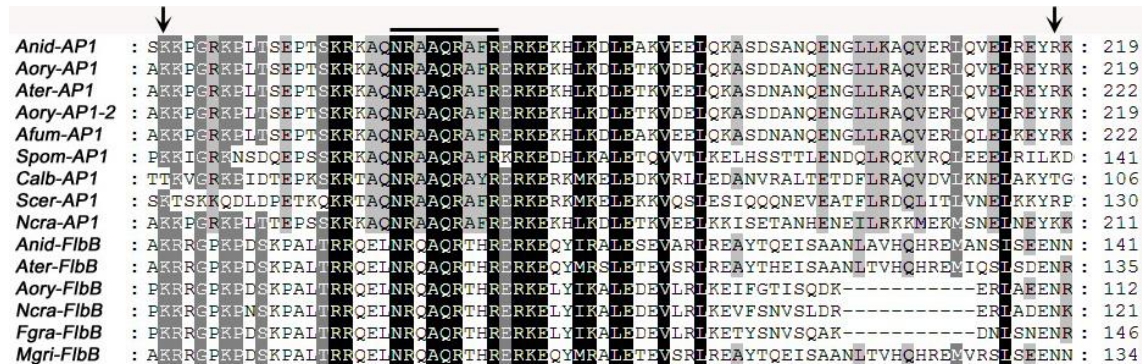


Figura 4.3.1: Alineamiento, respecto al dominio bZIP, de homólogos de Pap1 y FlbB. Nomenclatura: Anid: *A. nidulans*; Ater: *A. terreus*; Aory: *A. oryzae*; Afum: *A. fumigatus*; Ncra: *N. crassa*; Fgra: *F. graminearum*; Mgri: *M. grisea*; Spom: *S. pombe*; Calb: *C. albicans*; Scer: *S. cerevisiae*. Las flechas negras indican los límites establecidos para la unión del bZIP de FlbB a glutatión-S-transferasa. La línea negra, la extensión del dominio de unión al DNA.

Además, se hallaron en *A. nidulans* otras proteínas con dominio bZIP, en las cuales, la región peptídica supuestamente responsable de la unión al DNA se encontraba conservada en su totalidad respecto a la secuencia **NXXAQXXFR** (figura 4.3.2). En comparación con ellas, en FlbB la secuencia peptídica consenso cambia en un solo residuo: F93H.

```

AN7542.3 : -----DSKPALTRRQELNRFQAQFTHREKKEQYIFALESEVARIK-----
AN7513.3 : -----TSKRKAQNRAAQRAFREKREKHLKDLKAVVEELQ--KA
AN8251.3 : -----TDTPPTKRKAQNRAAQRAFREKREKHLKDLKAVVEELQ--DH
AN4562.3 : -----AQSKRKAQNRAAQRAFREKREKHLKDLKAVVEELQ--QE
AN10378.3 : -----KRPLSTSKRKAQNRAAQRAFREKREKHLKDLKAVVEELQ--VM
    
```

Figura 4.3.2: Alineamiento de las regiones responsables de la unión al DNA de las proteínas de *A. nidulans* con elevada conservación respecto al mismo dominio de Pap1.

4.3.2. El bZIP de FlbB une *in vitro* las secuencias diana definidas para el factor de transcripción Pap1.

Para analizar la capacidad de unión del bZIP de FlbB a las secuencias AP-1 o PLD, se generó y purificó una fusión entre GST y el bZIP de FlbB (figura 4.3.3B). Asimismo, se generaron las sondas nucleotídicas denominadas AP-1 y PLD (ver apartado 4.2.4 y 4.2.5; figura 4.3.3A) y se ensayaron en EMSA (figura 4.3.3C).

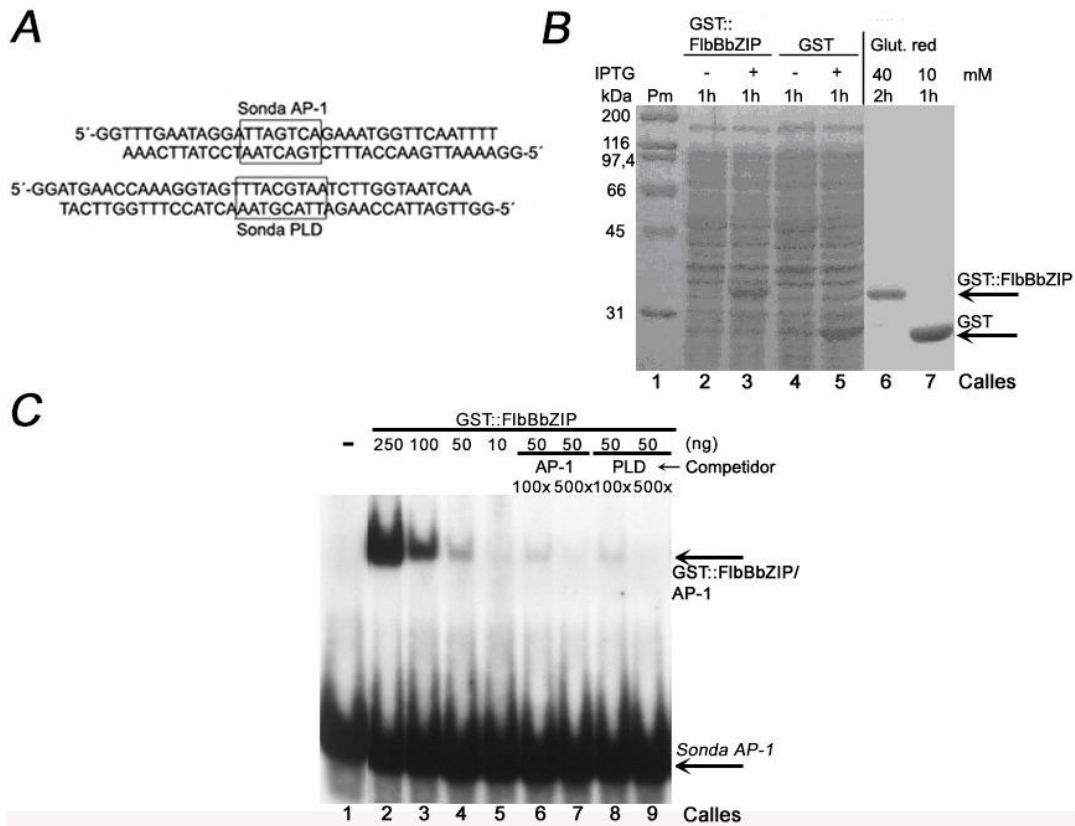


Figura 4.3.3: Ensayo de unión de la fusión GST::FlbB_{bZIP} a las secuencias AP-1 y PLD. A) Sondas generadas, conteniendo la secuencia AP-1 o PLD, enmarcadas en negro. B) Gel de poliacrilamida mostrando la expresión y purificación de GST::FlbB_{bZIP} (calles 3 y 6, respectivamente) y el control GST (Calles 5 y 7, respectivamente) en *E. coli*, en comparación con los cultivos sin IPTG (Calles 2 y 4, respectivamente). C) EMSA mostrando la formación de un complejo de retardamiento entre GST::FlbB_{bZIP} y la sonda AP-1 (calles, 2-5); y la competición entre las sondas AP-1 y PLD por la unión con GST::FlbB_{bZIP} (calles 6-9). Las cantidades de proteína y competidor se señalan en la imagen. El signo “-” se refiere a la calle con la sonda AP-1 libre.

El experimento de EMSA que se muestra en la figura 4.3.3C demuestra que el bZIP de FlbB era capaz de unir a las secuencias AP-1 y PLD. La intensidad del complejo de retardamiento era proporcional a la cantidad de GST::FlbB_{bZIP} añadida a la reacción (carriles 2-5). Los carriles 6 y 7 muestran la capacidad de competición en la unión a la sonda marcada al añadir exceso de fragmento AP-1 no marcado, siendo necesaria una concentración 500 veces superior para competir completamente dicha unión. Para probar la capacidad de unión a la sonda PLD, entre otros experimentos, se realizó un experimento de competición. Como se observa en los carriles 8 y 9, de forma similar a lo observado en la competición con fragmento AP-1, se precisaron 500 veces la cantidad de sonda marcada para competir dicha unión. Este resultado muestra que GST::FlbB_{bZIP} reconoce ambas secuencias de unión de Pap1 y sugiere que posee una afinidad similar por ambas dianas.

4.3.3. La fusión GST::FlbB_{bZIP} presenta una baja especificidad respecto a las secuencias diana definidas para el factor de transcripción Pap1.

Una vez demostradas la capacidad de unión y similar afinidad del bZIP de FlbB con respecto a las secuencias AP-1 y PLD, se realizaron nuevos EMSAs para analizar la especificidad de estas uniones. Para ello, se generaron nuevas sondas conteniendo mutaciones en la secuencia reconocida por AP-1 en la sonda homónima (figura 4.3.4A). Dichas mutaciones fueron diseñadas a partir del trabajo realizado por Fujii y colaboradores (2000), donde se describe la estructura cristalina del bZIP de Pap1 y se definen las interacciones que ocurren entre los aminoácidos de la región de unión al DNA y las bases de la secuencia diana, determinando la especificidad de reconocimiento de secuencia (ver apartado 4.4).

Para establecer la especificidad de reconocimiento de secuencia, se realizaron experimentos de competición con las nuevas sondas mutantes AP-1Mut1 y AP-1Mut2 (figura 4.3.4B). En los carriles 3 a 6 se muestran como control competiciones con las sondas silvestres AP-1 y PLD. Al añadir AP-1Mut1 o AP-1Mut2 (carriles 7-9 y 10-12, respectivamente) se observó que ambos fragmentos competían por la unión con la proteína de forma similar a lo observado con las dianas silvestres AP-1 y PLD, por lo que se concluyó que la fusión GST::FlbB_{bZIP} era capaz de unir con similar

afinidad a estas dianas mutantes. Ello supondría que, a pesar de la notable afinidad, la especificidad *in vitro* de estas interacciones proteína-DNA es reducida.

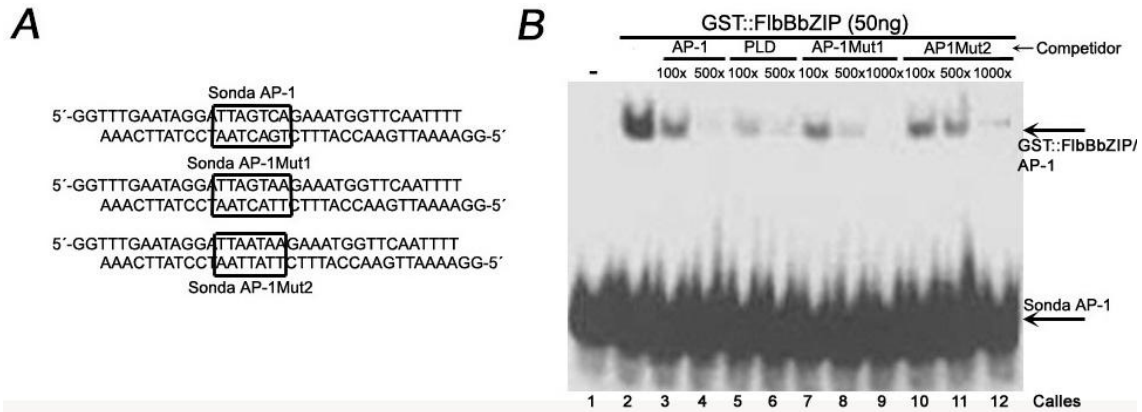


Figura 4.3.4: Ensayo de unión de la fusión GST::FlbB_{bZIP} a las secuencias AP-1 mutantes. A) Sondas generadas, conteniendo las secuencias AP-1 silvestre y AP-1 mutantes, enmarcadas en negro. La sonda AP1-Mut1 presenta la sustitución de la C por una A, mientras que AP-1Mut2, además de ésta, sustituye la G por otra A. B) EMSA mostrando la competición por la fusión GST::FlbB_{bZIP} entre las sondas AP-1 (calles 3 y 4), PLD (calles 5 y 6), AP-1Mut1 (calles 7, 8 y 9) y AP-1Mut2 (calles 10, 11 y 12). Las cantidades de proteína y competidor se señalan en la imagen. El signo “-” se refiere a la calle con la sonda AP-1 libre.

4.3.4. El residuo G70 de FlbB se requiere para una correcta unión del bZIP al DNA.

Para la fusión del bZIP de FlbB a GST, se establecieron los límites C- y N-terminal en los residuos Asn140 y Lys67 (ver apartado 4.1; ver figura 4.3.1). El primero señala el final de la putativa región de dimerización del bZIP, mientras que la elección del segundo límite se fundamentó en el hecho de haber obtenido una mutación de pérdida de función en FlbB en el residuo de glicina 70. El análisis del papel que pudiera desempeñar el residuo Gly70 en la unión a DNA podría explicar el fenotipo de la cepa aconidial BD14, donde este residuo se sustituye por una Arg.

Para verificar esta hipótesis se generó por PCR mutagénica la fusión GST::FlbB_{bZIPG70R}, a partir del plásmido con la secuencia silvestre (ver apartado 4.2.8). Tras confirmar su correcta expresión en bacteria, se purificó y se realizaron EMSAs para analizar la capacidad de unión de la nueva fusión a las secuencias AP-1 y PLD (ver figura 4.3.5).

El ensayo muestra cómo, sin llegar a anularse, la intensidad de la banda correspondiente al complejo formado por AP-1 o PLD y GST::FlbB_{bZIPG70R} era menor que en el caso del formado por la fusión silvestre (figura 4.3.5B). Estos resultados confirman un papel del residuo G70 en la unión a DNA del bZIP de FlbB, el cual, será planteado en la discusión de este capítulo.

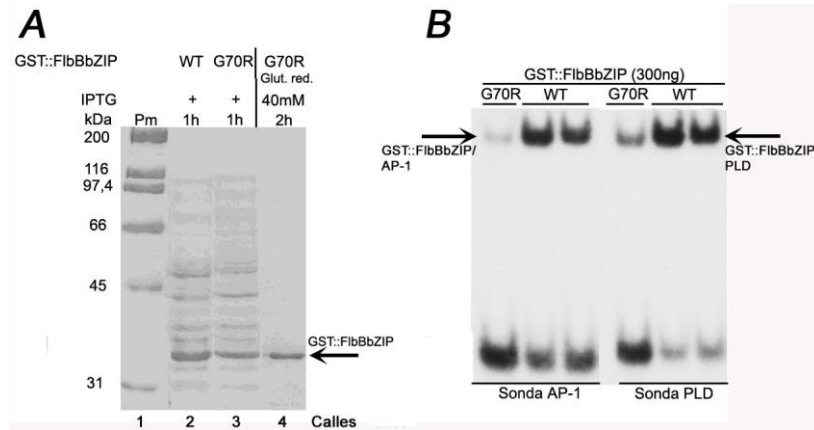


Figura 4.3.5: Ensayo de retardamiento en gel con las fusiones GST::FlbB_{bZIP} y GST::FlbB_{bZIPG70R}, y las sondas AP-1 y PLD. A) Gel de poliacrilamida mostrando la expresión en *E. coli* (calle 3) y purificación (calle 4) de la fusión GST::FlbB_{bZIPG70R}. B) EMSA mostrando la variación en la capacidad de unión a las sondas AP-1 o PLD de la fusión GST::FlbB_{bZIPG70R} (G70R) con respecto a la fusión silvestre (WT). Se utilizaron 300ng de fusión en cada carril. En el caso de la fusión silvestre (WT), la columna derecha corresponde a la misma cantidad de fusión pero, con la misma dilución que en el caso de G70R.

4.3.5. GST::FlbB_{bZIP} forma varios complejos de retardamiento inespecíficos con fragmentos del promotor de *brlA*.

Teniendo en cuenta la elevada afinidad del bZIP de FlbB por las secuencias AP-1 y PLD, se realizaron análisis *in silico* para identificar promotores que contuvieran en sus primeras mil bases cada una o ambas secuencias. En el caso de la secuencia PLD, se localizaron 43 promotores, mientras que en el de la secuencia AP-1, las bases de datos permitieron identificar 478 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/MultiDownloads.htm). Los promotores se clasificaron en diferentes clases atendiendo a la actividad del gen que regulan (ciertos promotores se incluyeron en más de un grupo; Tabla 4.3.1):

Clasificación funcional de los promotores según el gen que regulan	Portadores de la secuencia PLD	Portadores de la secuencia AP-1
Proteínas implicadas en la Regulación Transcripcional	3	43
Proteínas de unión a RNA o proteínas ribosomales	5	26
Transportadores, receptores o proteínas de membrana	7	58
Proteínas implicadas en el metabolismo del DNA	2	37
Proteínas implicadas en el metabolismo primario (carbono y nitrógeno), secundario, cadena respiratoria o estrés oxidativo.	12	130
Proteínas implicadas en la degradación de otras proteínas o interacción proteína-proteína.	5	75
Proteínas sin dominio funcional conocido.	7	120
Proteínas implicadas en otros tipos de procesos	2	24
Total	43	513

Tabla 4.3.1: Clasificación de los genes que portan en sus promotores (primeras 1000 bases; http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/MultiDownloads.html) las secuencias PLD o AP-1.

El número de genes con estas secuencias en sus primeras 1000 bases de promotor constituye alrededor del 4,5% del total de 10700 genes estimados en *A. nidulans*. Entre ellos, el promotor de AN7513.3/NapA (Asano *et al*, 2007) presenta una secuencia tipo AP-1; sin embargo el promotor de FlbB carece de ellas. Si NapA y FlbB reconocen las mismas secuencias, sería posible que ocurriese una corregulación de dichos genes, entre ellos el propio AN7513.3/NapA. Esta es una posibilidad interesante para estudiar en el futuro. Sin embargo, a pesar del elevado porcentaje de genes con estas secuencias, entre ellos no se ha hallado ningún gen conocido de la ruta de inducción temprana ni de la ruta central de conidiación, los cuales deberían ser, *a priori*, candidatos a ser regulados por FlbB. Entre estos candidatos ausentes está *brlA*, para cuya expresión transcripcional se ha demostrado que FlbB es requerido (ver apartado 3.3.7). FlbB ha sido clasificado clásicamente como uno de los efectores sobre los que actuaría la ruta *flb* y que derivaría en la adecuada expresión de *brlA* (Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006). Por ello, y a pesar de no haber encontrado las secuencias AP-1 y PLD, se analizó la posibilidad de que FlbB uniera directamente al promotor del *brlA*.

Este promotor fue dividido en dos fragmentos mediante técnicas de PCR y cada uno de ellos fue ligado al plásmido pGEM-T-easy (ver apartado 4.2.9; figura

4.3.6A). Los fragmentos generados a partir de la digestión de los plásmidos brlAp1-pGEM y brlAp2-pGEM (figura 4.3.6A) se marcaron radiactivamente. A modo de control, se utilizó el promotor bidireccional entre los genes *AN7223.3* y *AN10909.3*, dado que contiene una secuencia del tipo PLD (ver apartado 4.2.9). El plásmido pGEM-7223p se digirió y los fragmentos se marcaron radiactivamente (figura 4.3.6C).

Los resultados obtenidos mostraron que la fusión GST::FlbB_{bZIP} era capaz de formar, en elevadas cantidades (0,5-1µg) y en las condiciones ensayadas, complejos de retardamiento con varios fragmentos del promotor de *brlA* (figura 4.3.6B). Sin embargo, la especificidad de las uniones debía ser baja, ya que, en la mayoría de los experimentos no fue posible saber qué fragmento participaba en cada complejo de retardamiento. Únicamente en el caso de la banda G (595pb) se observó una disminución en su intensidad al aumentar la cantidad de fusión GST::FlbB_{bZIP}. Sin embargo, en este caso tampoco se pueden desechar posibles uniones de GST::FlbB_{bZIP} con los otros fragmentos (bandas E-I) de brlAp2-pGEM, ya que, se observan varios complejos de retardamiento. En el caso del promotor control se observan dos complejos mayoritarios, señalados en la figura 4.3.6D. Es muy probable que dichos complejos estén formados por los fragmentos G y D (287 y 226pb, respectivamente) puesto que son los que se observan con menor intensidad al incrementar la cantidad de proteína en el ensayo (los fragmentos B y C señalados con asterisco en figura 4.3.6D no se observan dado que en el experimento mostrado han salido del gel).

El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento G del promotor control permitió identificar una secuencia 5'-TTAGTTT (figura 4.3.6C), situada a 19pb del ATG iniciador de *AN10909.3*. En el caso de la banda G del promotor de *brlA*, para la que se describió una disminución en su intensidad, se halló una secuencia 5'-TTTCGCAA, que podría ser la unida por GST::FlbB_{bZIP}. También se hallaron a lo largo del promotor de *brlA* múltiples secuencias similares a AP-1 o PLD, con uno o dos cambios. Es posible que los complejos de retardamiento inespecíficos que se formaron fueran consecuencia de la unión de GST::FlbB_{bZIP} a este tipo de secuencias pero, la confirmación exige la generación de nuevas sondas solapantes de menor tamaño dentro de los fragmentos retardados y la realización de nuevas pruebas. En cualquier caso, se pueden extraer dos conclusiones generales que serán discutidas en el apartado 4.4: a) la especificidad de la unión entre GST::FlbB_{bZIP} y las sondas PLD o AP-1 es reducida y b)

los resultados obtenidos en EMSA no permiten determinar de forma concluyente la regulación directa de *brlA* por la unión de FlbB al promotor.

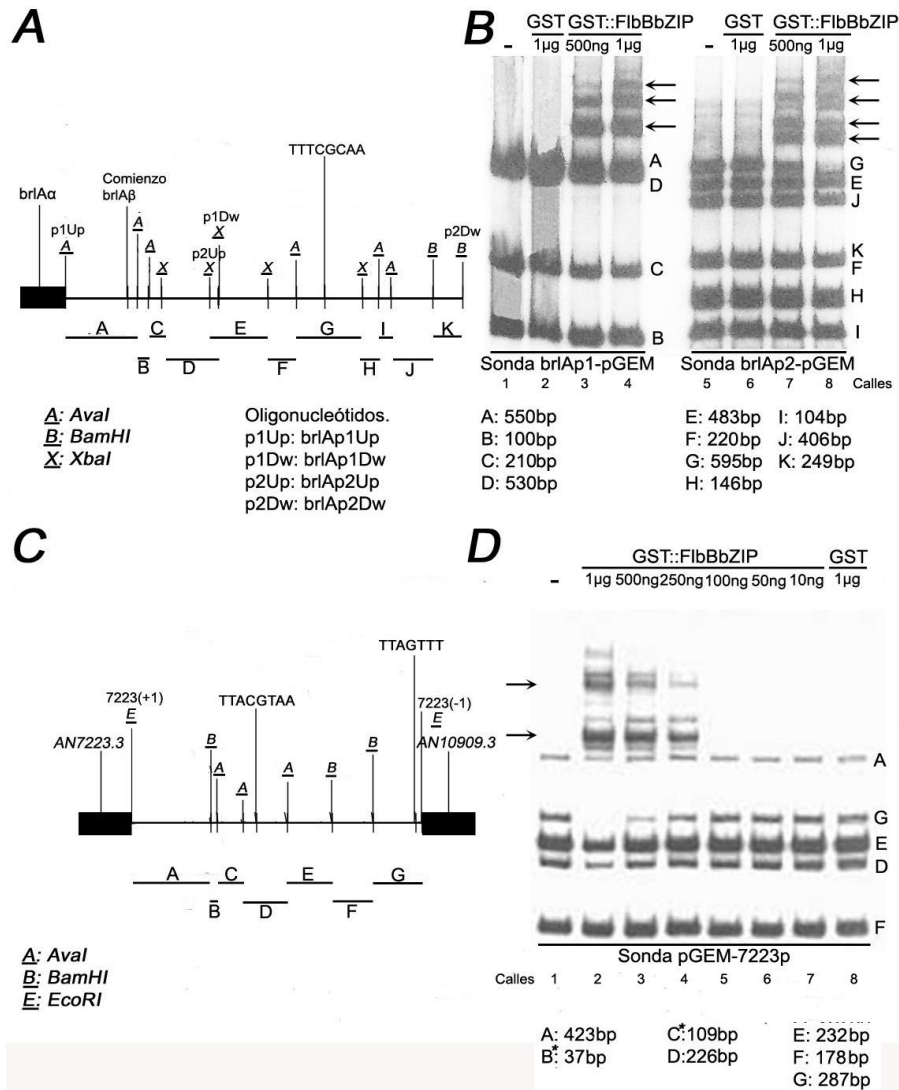


Figura 4.3.6: EMSAs analizando la posible unión de GST::FlbB_{bZIP} a secuencias de los promotores de *brlA* y *AN7223.3* o *AN10909.3*. A) Representación del promotor de *brlA*, indicando la posición de los oligonucleótidos utilizados para su amplificación, el sitio de comienzo del transcrito *brlAβ*, los sitios de restricción *BamHI*, *AvaI* y *XbaI* y una secuencia, TTTCGCAA, contenida en el fragmento G. B) EMSA con GST::FlbB_{bZIP} y los fragmentos generados con el promotor de *brlA*. Los tamaños de los fragmentos y la cantidad de proteína añadida a cada carril quedan reflejados en la figura. El signo “-” señala la sonda libre. Los complejos de retardamiento se señalan mediante flechas negras. C) Representación de la región intergénica de los *loci* *AN7223.3* y *AN10909.3*. Quedan señalados los oligonucleótidos, 7223(+1) y 7223(-1), utilizados para su amplificación, los sitios *EcoRI*, *BamHI* y *AvaI*, el sitio PLD (TTACGTAA) y una secuencia, TTAGTTT, contenida en el fragmento G. D) EMSA analizando la posible unión entre GST::FlbB_{bZIP} y los fragmentos generados con la región del panel C. Los tamaños de los fragmentos y la cantidad de proteína añadida a cada carril quedan reflejados en la figura. El signo “-” señala la sonda libre y las flechas negras los dos complejos de retardamiento mayoritarios.

4.3.6. EMSAs con extractos proteicos de *A. nidulans*.

A partir de los análisis de expresión de *flbB* se pudo observar que su mRNA se acumulaba de forma apreciable a partir de las 12 horas de crecimiento vegetativo en medio líquido (ver apartado 3.3.7). Con estos niveles de expresión, se consideró posible que el mRNA se tradujera y se generara alguna forma de FlbB, por lo que se obtuvieron diferentes extractos crudos durante el crecimiento vegetativo (ver apartado 4.2.7) que fueron ensayados en nuevos EMSAs. El objetivo era visualizar la actividad de unión a DNA de la proteína nativa de FlbB o en su defecto, algún complejo dependiente de una forma activa de FlbB. Para estos ensayos se utilizaron las cepas descritas en la tabla 4.2.1.

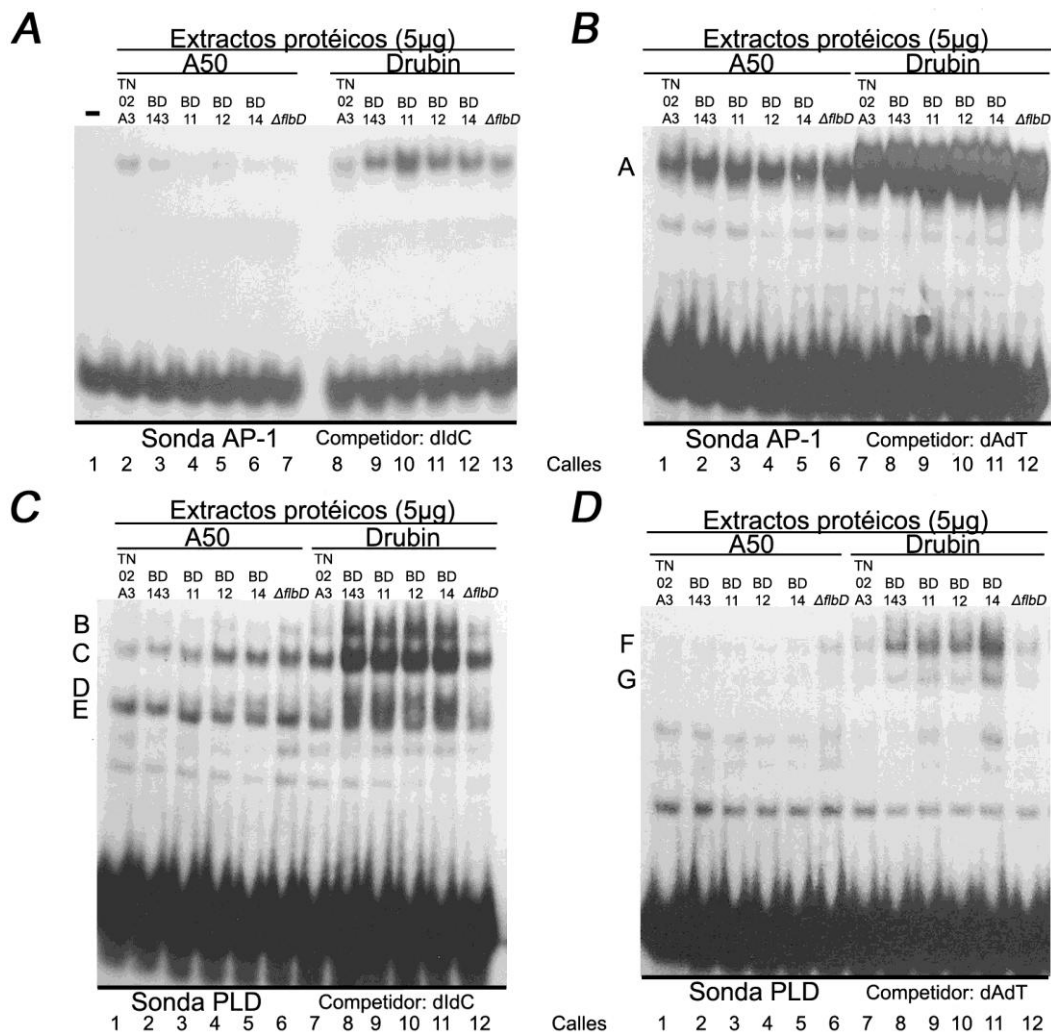


Figura 4.3.7: EMSAs para extractos proteicos recogidos a las 18 horas de crecimiento vegetativo, con sondas AP-1 o PLD e inhibidores inespecíficos poli(dIdC) o poli(dAdT). Las cantidades de extracto añadidas, la solución utilizada para la extracción, así como los carriles correspondientes a cada cepa se reflejan en la figura. El signo “-” se refiere a la sonda libre. Las letras en los laterales, señalan complejos de retardamiento cuya intensidad aumenta en los carriles correspondientes a mutantes *flbB*.

Comparando la formación de complejos de retardamiento entre los extractos obtenidos con el tampón A50 y “Drubin”, se evidencia que el segundo (Drubin *et al*, 1988) permitió obtener una mejor extracción de las proteínas que formaban parte de estos complejos, mejorando la unión a DNA y aumentando así la intensidad de las bandas. Además, se observaron cambios en el patrón de bandas en dependencia de los competidores inespecíficos utilizados, poli(dA-dT) y poli(dI-dC), lo que sugiere que algunos de estos complejos se forman por proteínas que reconocen secuencias ricas en pares A-T o G-C, respectivamente, y que podrían reconocer otras regiones de las sondas utilizadas.

Por otro lado, la formación de varios complejos de retardamiento sugiere la presencia en los extractos ensayados de varias proteínas capaces de unir las sondas utilizadas. Ninguno de ellos parecía asignable a una unión directa de FlbB con las sondas, ya que, no se observaron complejos que desaparecieran (en el caso del extracto de la cepa nula $\Delta flbB$) o disminuyeran en intensidad o cambiaran de movilidad en los carriles correspondientes a los mutantes $flbB^-$. Sin embargo, se observó que ciertas bandas (señaladas de la A a la G en la figura 4.3.7) aumentaban en intensidad en los carriles correspondientes a los mutantes $flbB^-$. Este efecto es específico de la pérdida de función de FlbB, dado que con extractos de la cepa nula $\Delta flbD$ no se observa, aunque este TF haya sido situado corriente arriba de FlbB en la ruta de inducción temprana (figura 4.3.7; Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006). Es tentador sugerir que pudiera existir una regulación negativa por parte de FlbB sobre otro TF que una a estas secuencias.

4.4. DISCUSIÓN.

En concordancia con la hipótesis planteada al comienzo del capítulo, el dominio bZIP de FlbB es capaz de unir *in vitro* al DNA, formando complejos de retardamiento con las secuencias AP-1 y PLD, dianas definidas por Toda y colaboradores (1992) para el TF Pap1 de *S. pombe*. La capacidad de unión a estas secuencias es consecuencia del elevado grado de conservación que mantienen las regiones de unión al DNA de FlbB y Pap1 respecto a la secuencia **NXXAQXXFR** (ver figura 4.3.1). El único cambio en la estructura primaria es la presencia en la posición 93 de FlbB de una His en lugar de la Phe93 de Pap1.

Fujii y colaboradores (2000) definieron varias subfamilias de bZIP basándose en la naturaleza de los aminoácidos responsables de la unión al DNA. Una de estas familias es la definida por los bZIP de la familia AP-1, entre los que se encuentra Pap1. FlbB no puede ser incluido dentro de las subfamilias definidas en ese trabajo, por lo que se puede definir un nuevo subgrupo de bZIPs estrechamente relacionado con la familia AP-1. En el mismo trabajo, se definieron también las interacciones que se establecen entre los aminoácidos de la secuencia **NXXAQXXFR** y las bases de la secuencia diana PLD (Fujii *et al*, 2000). La conservación de secuencias sugiere que las interacciones entre las cadenas laterales de estos aminoácidos y las bases del DNA se mantendrían en el caso de FlbB y que la única excepción podría venir definida por la presencia de un residuo de histidina (His93) en lugar de una fenilalanina en la posición previa a la arginina. En Pap1, la Phe93 interacciona con grupos metilo de las primeras dos timinas de la secuencia PLD (Fujii *et al*, 2000). Es posible que, a pesar de la polaridad de su cadena lateral, la His93 de FlbB mantuviera la interacción con las citadas timinas pero, en este caso, se podría establecer un puente de hidrógeno entre el grupo imidazol de la His y los grupos –C=O del anillo de pirimidina de las timinas. Cabe la posibilidad de que esta variación en el mecanismo de unión afectara a la especificidad del bZIP de FlbB respecto a las secuencias AP-1 y PLD y fuera la causa de la formación de complejos inespecíficos descritos en varios de los casos analizados en este capítulo, como por ejemplo, la unión del bZIP de FlbB a las secuencias AP-1 mutadas.

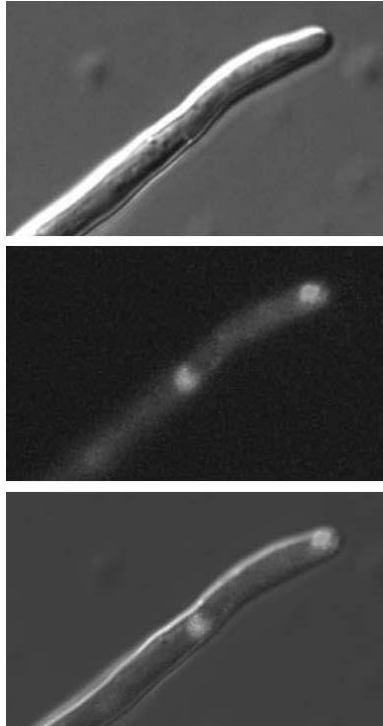
Toda y colaboradores (1992) describieron que la expresión del gen *p25*, la cual se encuentra regulada por Pap1 tras su unión a las secuencias PLD y AP1 de su promotor, se inhibe al introducir mutaciones específicas en ambas secuencias genómicas. Esta elevada especificidad se contrapone a la descrita en el caso de FlbB, aunque deberían realizarse pruebas con las sondas mutantes generadas en este capítulo para poder realizar una comparación sólida entre ambas proteínas. En cualquier caso, la baja especificidad observada al analizar la unión del bZIP de FlbB al promotor de *brlA*, no permite confirmar ni desmentir una posible regulación directa de su expresión por parte de FlbB. En el caso de una regulación indirecta, habría otro factor actuando corriente abajo de FlbB capaz de unir al promotor de *brlA*. En este sentido, parece haber varios factores cuya capacidad de unión al DNA depende de la actividad de FlbB (ver figura 4.3.7) y pudiera ser alguno de ellos el responsable de la activación de *brlA*. Se

precisan experimentos enfocados en determinar la capacidad de unión de FlbB en extractos y en la búsqueda de genes cuyos promotores están bajo el control de FlbB. En este sentido, dos de estas proteínas que forman complejos de retardamiento con las sondas AP-1 o PLD (ver figura 4.3.7) podrían ser AN4562.3 o AN10378.2. Estos dos factores, junto con AN8251.3/HapX poseen una región de unión al DNA idéntica a la de Pap1 si se atiende a la secuencia **NXXAQXXFR** (figura 4.3.2). Por ello, se puede plantear que los bZIP de AN4562.3 y AN10378.3 pudieran unir las mismas secuencias diana definidas para Pap1 (AN8251.3/HapX presenta un mecanismo de acción diferente descrito por Tanaka *et al*, 2002, y que será descrito más adelante). FlbB no está presente en ninguno de estos complejos, ya que, ninguno de ellos desaparece, disminuye en intensidad o cambia de movilidad electroforética en los carriles correspondientes a los mutantes *flbB*. Se podría pensar que las soluciones utilizadas para la extracción de proteínas no son adecuadas para la extracción de FlbB o que la cantidad de FlbB extraída es limitada. Sin embargo, Garzia *et al* (comunicación personal) han logrado extraer y detectar a FlbB en experimentos de Western Blot. Este resultado sugiere un posible mecanismo de regulación de la actividad de FlbB a través de su capacidad de unión al DNA. Es posible formular dos hipótesis, una en la que FlbB no una al DNA en ausencia de señal de conidiación (es decir durante el crecimiento vegetativo) o que lo haga a secuencias diferentes de las descritas anteriormente debido a la interacción con otras proteínas (ver más abajo). El trabajo futuro revelará las características de la maquinaria de activación de FlbB.

La presencia de la secuencia AP-1, PLD o ambas, en las primeras mil bases de más de 500 promotores, supondría que alrededor del 5% de los 10700 genes estimados en el genoma de *A. nidulans* podrían estar regulados por los factores que retardan estas sondas (figura 4.3.7). Es poco probable que a nivel biológico todos estos factores se encuentren uniendo a estas dianas genómicas al mismo tiempo, por lo que debería haber algún otro factor que confiriera especificidad a la unión Proteína-DNA, como podría ser la formación de complejos protéicos específicos o la participación de otros factores que mejoraran la unión al DNA. Se ha demostrado que dentro de la región (K67-A78) de FlbB, el residuo Gly70 es imprescindible para que éste pueda ejercer su función correctamente (ver fenotipo mutante BD14, figuras 3.3.6 y 3.3.7). En esta posición se halla localizada en la cepa BD14 la mutación puntual Gly70Arg. Trabajos anteriores describen la presencia de una secuencia similar en AN8251.3/HapX (Tanaka *et al*,

2002), en la cual, también hay una Glicina altamente conservada. Esta región se precisa para el reclutamiento de HapX en el complejo Hap y el posterior reconocimiento de los promotores que contienen la secuencia diana CCAAT (McNabb y Pinto, 2005). Así, de forma similar a HapX, FlbB podría ser parte de un complejo en cuya formación sería necesaria esta región flanqueante al bZIP.

En este capítulo se ha demostrado que este residuo de glicina participa también en otros mecanismos como la unión proteína-DNA. Sin embargo, la fusión GST::FlbB_{bZIPG70R} es aún capaz de unir a las secuencias AP-1 y PLD, por lo que su exclusión de la fusión con GST probablemente no hubiera provocado una ausencia de unión al DNA. La glicina 70 incrementa la afinidad por el DNA y este hecho explicaría en cierta medida el fenotipo de la cepa mutante BD14. El comportamiento de esta cepa en los diferentes medios ensayados en el capítulo 3 de esta tesis ha sido muy similar al del mutante nulo *ΔflbB*. Se podría decir que *in vivo* la funcionalidad de FlbB se pierde casi completamente al sustituir la glicina en la posición 70 por una Arg. Así, es probable que, además de mejorar la unión a DNA, esta región de FlbB sea necesaria en otros mecanismos que permitan una correcta actividad de FlbB, como la formación de complejos protéicos específicos como en el caso del complejo Hap, u otros procesos como la mejora de la dimerización de los dominios bZIP, o su correcta importación al núcleo.



5-. Estudio de la localización subcelular de FlbB.

5.1. INTRODUCCIÓN.

FlbB une al DNA y se precisa, directa o indirectamente, para la regulación transcripcional de *brlA*. Por lo tanto, formalmente, FlbB es un Factor Transcripcional (TF). Por norma general, los TF, una vez sintetizados en el citoplasma, han de ser importados al núcleo para llevar a cabo su función, siendo un punto de control clave para algunas de estas proteínas y para la regulación de la expresión génica (Kaffman y O'Shea, 1999).

La importación al interior del núcleo de un TF debe tener lugar en el momento adecuado para llevar a cabo su función reguladora. Generalmente, los TF presentan secuencias de localización nuclear (NLS). Las NLSs son reconocidas por unas proteínas especializadas llamadas carioferinas que median el transporte del TF al núcleo a través del complejo del poro nuclear (Gorlich y Kutay, 1999; Fried y Kutay, 2003). Existen diferentes tipos de NLS pero las mejor estudiadas son las reconocidas por la carioferina Importina α , siendo de dos tipos: monopartita (Kalderon *et al*, 1984) y bipartita (Robbins *et al*, 1991), denominándose en cualquier caso como NLS clásicas (cNLS). Al efecto de las NLS se contraponen el de las señales de exportación nuclear (NES), que mediante la interacción con carioferinas especializadas, llamadas exportinas, median la salida del núcleo o la exclusión nuclear de los TFs. También, se han descrito mecanismos mediante los cuales determinados TFs son retenidos fuera del núcleo, como son la formación de complejos con proteínas citosólicas, la unión a receptores de membrana (Kaffman y O'Shea, 1999), o bien la unión directa a la membrana plasmática (Zupicich *et al*, 2001; Brown *et al*, 2000; Ye *et al*, 2000). Sobre los TFs pueden actuar uno o, de forma concertada, varios mecanismos de entrada y/o salida del núcleo además de retención citoplásmica, como ocurre con el TF NirA que posee un mecanismo de exclusión nuclear mediado por la exportina general KapK/Crm1p que está regulado por el metabolito que induce la ruta de asimilación del nitrato y que se impone a un sistema constitutivo de entrada al núcleo (Bernreiter *et al*, 2007).

En este capítulo se estudiará la localización subcelular de FlbB mediante fusiones a la proteína fluorescente verde (GFP). El análisis de la secuencia peptídica de FlbB no sugiere la presencia de señales de entrada o salida del núcleo clásicas; además, indican que no es probable que esté unido directamente a membrana (ver apartado 3.3.2). En vista de las incógnitas que plantea el mecanismo de acción de este factor, se

analizó la localización subcelular de FlbB durante interfase y en mitosis del crecimiento vegetativo, ciclo en el cual, se ha detectado expresión de *flbB* (ver apartado 3.3.8). También se ha observado su localización tras la inducción de la conidiación y durante la producción de conidióforos. Para determinar los mecanismos que deben actuar sobre FlbB regulando su localización en la célula se ha estudiado el papel de los citoesqueletos de actina y de dímeros de tubulina, y el efecto de mutaciones en genes localizados aguas arriba de *flbB* en la ruta de inducción temprana, como son *fluG* (Lee y Adams, 1994a; Lee y Adams, 1994b; Adams *et al*, 1998) y *sfgA* (Seo *et al*, 2006).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.2.1. Cepas utilizadas, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en el presente capítulo quedan descritas en la tabla 5.2.1.:

Cepa	Genotipo	Fuente
BD143	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; ΔflbB::pyrG, pyroA4; veA1</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD167	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; flbB::gfp/pyrG, pyroA4; veA1</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
BD185	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; gfp::flbB, pyroA4; veA1</i>	Etxebeste <i>et al</i> , 2008
TN02A3	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; argB2; pyroA4; veA1</i>	Nayak <i>et al</i> , 2006
BD85.6	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; ΔfluG::trpC; veA1</i>	Este estudio
BD181	<i>pabaA1, yA2, pyrG89; abpA::mrfp/pyrG; veA1</i>	Araujo-Bazán <i>et al</i> , 2008
BD182	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; ΔfluG::trpC; flbB::gfp/pyrG; veA1</i>	Este estudio
BD183	<i>pyrG89; ΔnkuA::argB; ΔsfgA::pyrG; argB2; gfp::flbB, pyroA4; veA1</i>	Este estudio
BD184	<i>pabaA1, yA2, pyrG89; ΔnkuA::argB; gfp::flbB, pyroA4; abpA::mrfp/pyrG; veA1</i>	Este estudio

Tabla 5.2.1.: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en el presente capítulo.

Los oligonucleótidos utilizados, por otro lado, se detallan en la tabla 5.2.2.:

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Objetivo
flbB-PP1	GTT TTC TGG TCC TCG GTC AAC CGG TGG	Generación de <i>gfp::flbB</i>
flbB-PP2	CAT GGT GGT CGA GCT GTG AAT AGC GGA GAA	Generación de <i>gfp::flbB</i>
flbB-gfpSP	TTC TCC GCT ATT CAC AGC TCG ACC ACC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTCACT GGA GTT	Generación de <i>gfp::flbB</i>
flbB-gfpFP	GTT CAG ATC CAA GGG TAT TGG CCT ACT ACT GAT CGA AGT CAT TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TGT	Generación de <i>gfp::flbB</i>
flbB-geneSP	ATG ACT TCG ATC AGT AGT AGG CCA ATA CCC TTG GAT CTG AAC	Generación de <i>gfp::flbB</i>
flbB-GSP4	GAA AGG TGC GTG GGT TCG AAT CCC ACC	Generación de <i>gfp::flbB</i> y <i>flbB::gfp/pyrG</i>
flbB-GSP3	TGA CCT GAC AGC TCG CTT TTT TTC TGA GCT TTC TAA TGC	Generación de <i>flbB::gfp/pyrG</i>
flbB-GSP1	CCT CTT GTG GAT GCA CTC TGG AAT GTG GGC	Generación de <i>flbB::gfp/pyrG</i>
flbBGSP2	TGA ATA CAT CGT CTC ATC AGC ATG CCG GGT	Generación de <i>flbB::gfp/pyrG</i>
flbB-GFP1	TCC CGG CAT GCT GAT GAG ACG ATG TAT TCA GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC	Generación de <i>flbB::gfp/pyrG</i>
flbB-GFP2	GCA TTA GAA AGC TCA GAA AAA AAG CGA GCT GTC AGG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Generación de <i>flbB::gfp/pyrG</i>
sfgA-PP1	GGC AGA AAC GAA CCC TTG GAA CC	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>
sfgA-PP2	CAT GGA GAG AAA GAT CGA CGG TGG	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>
sfgA-GSP3	TGA CCG GAC CAT ACA CCT CGC	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>
sfgA-GSP4	GGT AAT CCG AGT TGG CTT GAC TAC GG	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>
sfgA-SMP1	CCA CCG TCG ATC TTT CTC TCC ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>
sfgA-GFP2	GCG AGG TGT ATG GTC CGG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Generación de <i>ΔsfgA::pyrG</i>

Tabla 5.2.2: Oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo.

La localización intracelular de FlbB se analizó *in vitro* en cultivos a temperatura ambiente, inoculando cuidadosamente una suspensión de conidias sobre un cubreobjetos sumergido en una placa de Petri con medio mínimo líquido con los nutrientes y requerimientos necesarios. Tras incubar a temperatura ambiente a distintos

tiempos, se fijaron las muestras con p-formaldehído al 4% (p/v) en PBS, a 4°C durante 18 horas. Se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con DAPI (Stinnett *et al*, 2007; Bernreiter *et al*, 2007; Peñalva, 2005). Tras ello, el cubreobjetos se montó sobre un portaobjetos y se analizó la localización subcelular de FlbB mediante microscopia de fluorescencia.

En cultivos *in vivo* a 37°C, la fluorescencia de FlbB en diferentes fondos genéticos se analizó inoculando 15µl de una suspensión de conidias en 1ml de medio de cultivo WMM (**W**atch **M**inimal **M**edium; Peñalva, 2005). Se incubó durante 4 horas hasta observar la germinación de las esporas, momento en el que se comenzó a observar la localización de la fluorescencia manteniendo el cultivo a 37°C.

Para el análisis de la localización subcelular de FlbB tras la inducción de la conidiación y durante la producción de conidióforos, se inocularon placas de Petri con medio mínimo sólido fundido. Una vez solidificado, se retiró parte del medio y se inocularon esporas de la cepa a analizar en la conjunción entre la base de la placa y el medio sólido. Tras incubar durante 16-24 horas a 37°C, se añadió a la zona de la placa vacía medio líquido sin fuente de nitrógeno (para mantener las condiciones inductoras) precalentado a 37°C y se analizó la localización de FlbB.

Para el análisis de la dependencia del transporte de FlbB respecto al citoesqueleto de actina, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con Latrunculina B (Calbiochem) en una concentración final de 100µM. Tras 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 FlbB. Para estudiar el papel del citoesqueleto de microtúbulos en el transporte y localización de FlbB se añadió al medio Benomilo (Aldrich; 2,4µg/ml). El envenenamiento de los circuitos energéticos de la célula se realizó añadiendo al medio una mezcla de acida sódica (NaCN) y fluoruro sódico (NaF), a una concentración final de 15mM para cada producto.

La cepa BD184 (*gfp::flbB; abpA::mrfp/pyrG*) se obtuvo por recombinación meiótica, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1. La selección del genotipo *abpA::mrfp/pyrG* se hizo en base al fenotipo *pyrG*⁺, ya que, al

presentar ambas cepas parentales del cruce el marcador *pyrG89*, únicamente aquellas colonias con el genotipo *abpA::mrfp/pyrG* debían ser capaces de crecer en medio sin uridina ni urácilo. Dicho genotipo fue confirmado mediante fluorescencia, al igual que el genotipo *gfp::flbB* (apartado 5.2.2).

5.2.2. Obtención de imágenes.

Las imágenes de las cepas expresando las fusiones GFP::FlbB y FlbB::GFP se tomaron, por un lado, con un microscopio Nikon Eclipse E-600, equipado con un objetivo de inmersión 60x Apo 1,4 N.A. (Nikon), una lámpara de mercurio de 100W y filtros Nikon, B2-A (excitación 495nm; emisión 530nm) y UV-2A (excitación 360nm; emisión 460nm) para la detección por GFP y DAPI, respectivamente (Stinnett *et al*, 2007; Bernreiter *et al*, 2007; Peñalva, 2005). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics), y procesadas utilizando los programas Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Universal Image).

Las imágenes de los cultivos *in vivo*, a 37°C, se tomaron utilizando un microscopio Leica DMI6000b, equipado con un objetivo 63x Plan Apo 1,4 N.A., una lámpara de mercurio de 100W y filtros GFP (excitación 470nm; emisión 525nm), Txred (excitación 562nm; emisión 624nm) y D (UV; excitación 355nm; emisión 470nm). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics), y procesadas utilizando los programas Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Universal Image). Las películas fueron generadas a partir de imágenes de fluorescencia tomadas cada dos minutos, utilizando el programa Metamorph (Universal Image).

5.2.3. PCR de fusión.

Las construcciones para la generación del mutante nulo en *sfgA*, o aquellas para la generación de las cepas expresando las fusiones GFP::FlbB o FlbB::GFP fueron generadas mediante PCR de fusión (apartado 3.2.6; Yang *et al*, 2004) utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 5.2.2.

5.2.4. Generación de las cepas a analizar mediante fluorescencia.

Para generar las cepas expresando fusiones entre GFP y FlbB, se transformaron los protoplastos de diferentes cepas mutantes (apartado 2.2.3) con 300-600ng de las construcciones generadas por PCR de fusión.

En el caso de la cepa que expresa la fusión GFP::FlbB, se transformó el mutante nulo BD143 en la forma descrita, con una construcción conteniendo GFP justo tras el codón inicial de FlbB y sin incluir ningún marcador genético. La inserción de esta construcción en el genoma provocó la pérdida del marcador *pyrG*, utilizado en la sustitución del *locus flbB* para la generación del mutante nulo (tabla 5.2.1). Así, la selección de los transformantes se realizó añadiendo a las placas de regeneración de protoplastos 2mg/ml de ácido fluororótico (Sigma), primando el crecimiento de las colonias con el marcador genético *pyrG89*.

El mutante nulo de *sfgA* se generó una vez localizado el *locus* en el genoma (AN8129.3), sustituyendo, en la cepa que expresa la fusión GFP::FlbB (BD185), el gen *sfgA* por la construcción consistente en el gen *pyrG* de *A. fumigatus* con el promotor (1,25Kb) y terminador (1,46Kb) de *sfgA* (ver apartado 3.2.6; Yang *et al*, 2004).

Los transformantes obtenidos fueron analizados mediante técnica de Southern Blot con el objetivo de verificar la correcta inserción de las construcciones en las cepas transformadas (apartado 3.2.8).

5.3. RESULTADOS.

5.3.1. Las proteínas quiméricas GFP::FlbB y FlbB::GFP son funcionales.

Las cepas que expresan las fusiones GFP::FlbB y FlbB::GFP se obtuvieron siguiendo la estrategia representada en el esquema de la figura 5.3.1A y 5.3.1B. Con los oligonucleótidos señalados en el esquema (tabla 5.2.2), cada uno de los fragmentos necesarios se amplificó por PCR y por separado, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.2.6. Como molde se utilizó DNA genómico excepto en el caso de los fragmentos correspondientes a *gfp* y a *gfp/pyrG*, que tuvieron como molde el plásmido pFN03 (Yang *et al*, 2004). Siguiendo el protocolo de PCR de fusión (Yang *et al*, 2004) se lograron las construcciones *gfp::flbB* y *flbB::gfp/pyrG* (figura 5.3.1C), con las que se transformaron los protoplastos de la cepa BD143 (*AflbB*; Etxebeste *et al*, 2008) y TN02A3 (Nayak *et al*, 2006), respectivamente. La correcta

inserción de las construcciones se verificó mediante Southern Blot (figura 5.3.1.D). Se obtuvieron así las cepas BD185 y BD167, respectivamente. El fenotipo conidiante de las cepas obtenidas, similar al de la cepa silvestre, es prueba de la funcionalidad de las proteínas quiméricas (figura 5.3.1E).

5.3.2. Localización subcelular de FlbB en hifas vegetativas.

Una vez generadas las cepas que expresaban las fusiones GFP::*FlbB* y *FlbB*::GFP, y dada su capacidad para conidiar indicando que eran quimeras funcionales (figura 5.3.1E), se procedió al análisis de la localización subcelular de *FlbB*. El marcaje en ambos extremos se realizó para ver si se observaban diferencias significativas entre ambos etiquetados.

La observación de la distribución de la fluorescencia en germínulas mostró que *FlbB* se hallaba predominantemente en el ápice de la hifa (figura 5.3.2), tanto para el marcaje amino como carboxilo terminal con GFP. En hifas con más de 16 horas de crecimiento se comenzó a observar fluorescencia en el núcleo más apical, de acuerdo con su hipotética función como TF y su capacidad de unir al DNA. Es interesante reseñar que en determinadas ocasiones fue posible observar fluorescencia en el segundo núcleo más apical, pero siempre el núcleo más cercano a la punta era el que mostraba mayor intensidad de fluorescencia. Prácticamente la totalidad de las hifas mostraron la localización descrita, tanto en el caso de la proteína GFP::*FlbB* como *FlbB*::GFP (Fig 5.3.2, Paneles A y B). Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo muy específico que debe controlar la localización celular de *FlbB*, siendo capaz de diferenciar el núcleo apical del resto de núcleos.

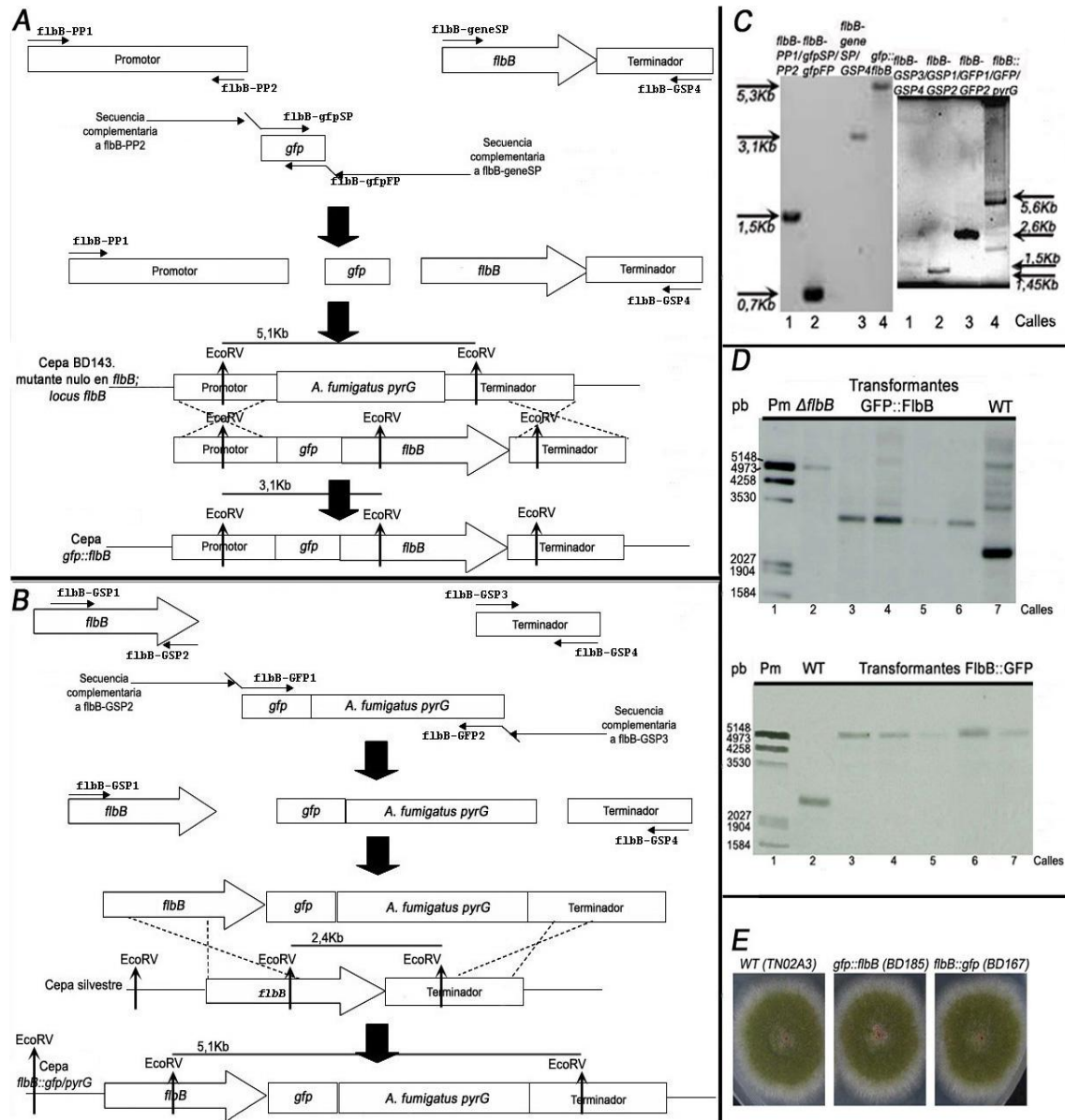


Figura 5.3.1: Marcaje con GFP de FlbB. Representación esquemática de la estrategia para el etiquetado de FlbB con GFP A) en posición N-terminal, y B) en C-terminal (ver apartado 3.2.6). C) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos y construcciones amplificados por PCR. D) Confirmación de la correcta inserción de las construcciones mediante técnica de Southern Blot. Panel superior: GFP::FlbB. El DNA genómico fue digerido con *EcoRV* y se utilizó como sonda el fragmento *flbB-PP1/PP2*. Se produce una sustitución del gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* de la cepa BD143 por la construcción generada. La digestión con el enzima *EcoRV* da lugar a un cambio de tamaño en el fragmento de 5,1Kb (calle 2) a 3,1Kb (calles 3-6), de mayor tamaño que el gen sin etiquetar, vease la hibridación con DNA de la cepa silvestre (banda de 2,4Kb) (calle 7). Panel Inferior: FlbB::GFP. El DNA fue digerido con *EcoRV* y se utilizó como sonda el fragmento *flbB-GSP3/GSP4*. La inserción de la construcción *flbB::gfp/pyrG* incrementa el tamaño de la banda *EcoRV* de 2,4Kb (calle 2) hasta 5,1Kb (calles 3-7). E) Comparación del fenotipo de la cepa conidiante TN02A3 (izquierda), la cepa que expresa GFP::FlbB (centro) y la cepa que expresa FlbB::GFP (derecha). No hay diferencia fenotípica entre las últimas dos respecto a la cepa silvestre.

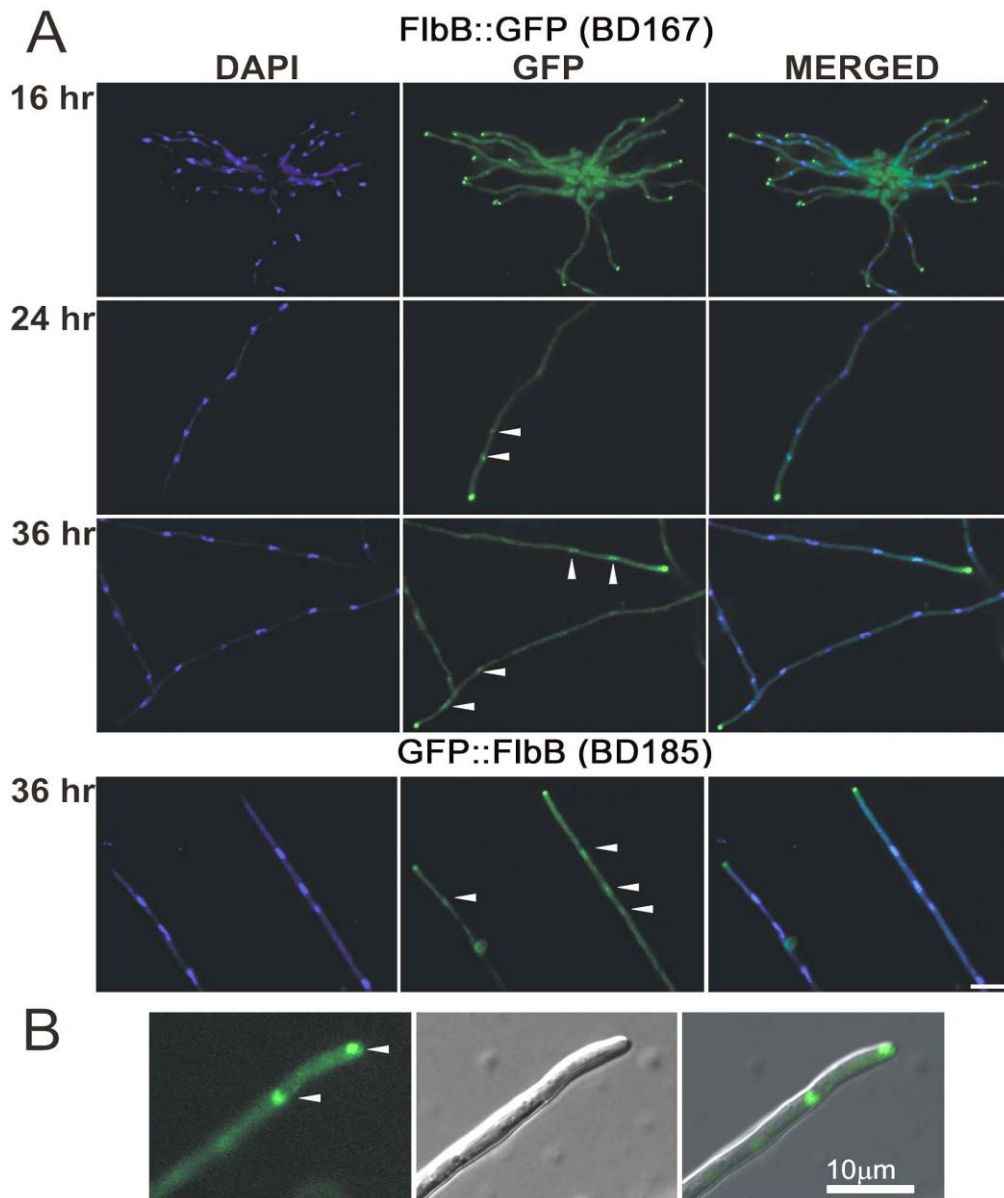


Figura 5.3.2: Localización subcelular de FlbB en hifas vegetativas. A) La fusión FlbB::GFP se acumulaba en el ápice tras 16 horas de cultivo a 25°C en medio mínimo estático. Tras 24 y 36 horas, la fluorescencia se observó también en el núcleo más apical y ocasionalmente en núcleos más alejados (indicados con puntas de flecha). La tinción con DAPI indica la posición de los núcleos en la hifa. En el caso de la fusión GFP::FlbB se obtuvieron los mismos resultados, mostrándose únicamente las imágenes tomadas a las 36 horas. B) Proximidad de FlbB al ápice de la célula. Las cabezas de flecha señalan la localización de FlbB en el ápice y en el núcleo más apical. Barra de escala = 10μm.

Para determinar el momento en el que FlbB debe migrar al ápice de la hifa, se procedió a observar las cepas que expresan las fusiones a GFP desde la germinación de las conidias. La figura 5.3.3 muestra cómo FlbB se localiza ya en el ápice de germínulas en las que el primordio de tubo hifal tiene escasos micrones (Panel

A, primera fotografía) y se mantiene en esta localización celular durante los diferentes estadios de crecimiento vegetativo analizados (panel A, resto de fotografías). FlbB parece estar muy próximo a la zona más apical de la hifa donde se localiza el orgánulo específico de hongos filamentosos denominado *Spitzenkörper* (Girbardt, 1957). Recientemente, se ha estudiado la posición de la maquinaria de endocitosis en *A. nidulans* utilizando, entre otras, la proteína AbpA (Actin binding protein; figura 1B; Araujo-Bazán *et al*, 2008) como marcador celular. AbpA se localiza en la proximidad del ápice formando un anillo y dejando una zona de exclusión próxima a la punta de la hifa (figura 5.3.3, Panel B, señalada como AbpA::mRFP). Se generó la cepa doblemente etiquetada, (AbpA::mRFP; GFP::FlbB), para determinar la posición de FlbB respecto a la maquinaria de endocitosis. Las restantes imágenes del Panel B de la figura 5.3.3 muestran como FlbB se localiza en la región más próxima a la punta de la hifa, donde previsiblemente se encuentra el *Spitzenkörper*. Este resultado sugiere una posible hipótesis para un modelo de regulación de FlbB en el que este TF mantiene una posición en el ápice en espera de ser señalado para su posterior transporte al núcleo y determinar así un cambio morfológico en el hongo desde una hifa en crecimiento activo hacia una hifa especializada en formar una estructura para la reproducción asexual del hongo.

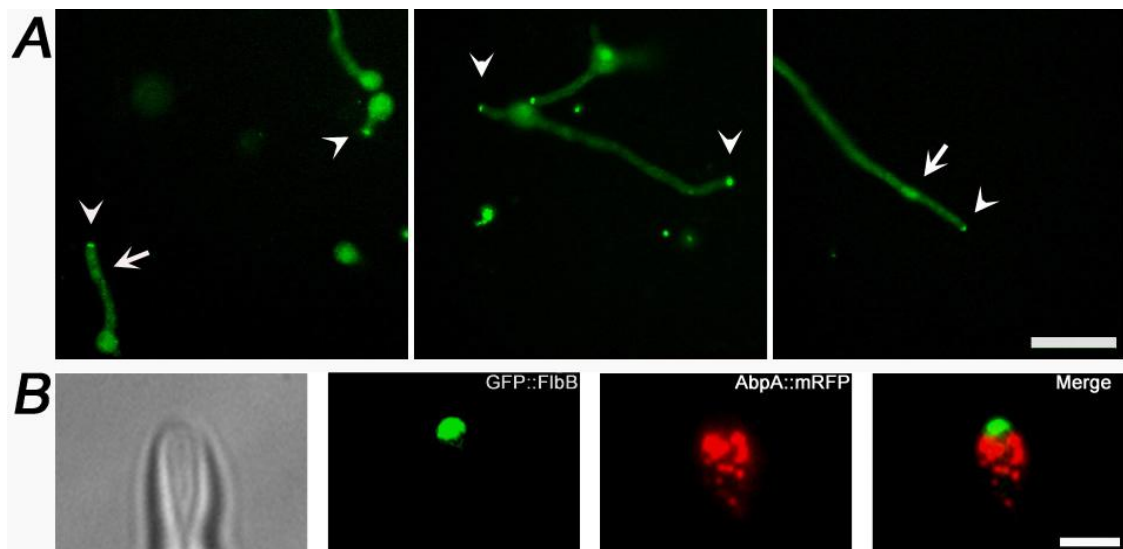


Figura 5.3.3: Localización subcelular de FlbB en germínulas e hifas en diferentes estadios de crecimiento vegetativo. A) FlbB se localiza en el ápice (puntas de flecha blancas) desde los primeros momentos de la germinación de las esporas (panel izquierdo), y también en hifas en crecimiento muy activo de varias micras de longitud. Las flechas blancas muestran la fluorescencia en el núcleo más apical. Barra de escala= 15μm. B) Imagen de óptica Nomarsky de la zona más apical de la hifa y las respectivas fotografías de la fluorescencia de la fusión GFP::FlbB (en verde), AbpA::mRFP (en rojo) y la superposición de ambas (Merge). Barra de escala= 3μm.

5.3.3. FlbB se localiza en la célula mediante procesos energía-dependientes.

La acida sódica (NaCN) y el fluoruro sódico (NaF) son dos compuestos que añadidos al medio de cultivo impiden el acceso a las fuentes de energía (Peñalva, 2005). Por ello, se analizó la localización subcelular de FlbB en estas condiciones y se observó que se perdían tanto su localización apical y como la nuclear (figura 5.3.4A). FlbB pasaba a localizarse en forma de cúmulos distribuidos a lo largo de todo el citoplasma. Así, se concluyó que la localización de FlbB en la célula no es pasiva o dependiente de un anclaje por interacciones con orgánulos, macromoléculas o estructuras celulares como ocurre con PacC, NapB o la nucleoporina An-Nic96 (Araujo-Bazán et al, 2008) sino que está sometida a un control por mecanismos dependientes de energía.

5.3.4. La localización subcelular de FlbB depende del citoesqueleto de actina, pero, no de los dímeros de tubulina.

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de transporte de FlbB en la célula se estudió su localización en función de la organización de cada uno de los citoesqueletos de *A. nidulans*. El citoesqueleto de filamentos de actina es un elemento clave en el transporte de multitud de macromoléculas al ápice de las hifas (apartado 1.2; Steinberg, 2007a; Steinberg, 2007b), y puede desensamblarse mediante la adición de Latrunculina B (LatB) al medio de cultivo (Peñalva, 2005). El efecto de esta droga sobre la localización de FlbB puede observarse en la figura 5.3.4B. La localización nuclear y apical de FlbB se pierde con la adición de LatB (figura 5.3.4B, panel 2), recuperándose en el ápice a los pocos minutos de eliminarla del medio (panel 3, señalado mediante punta de flecha blanca). Igual que en la figura 5.3.3A, en la que se observaba que FlbB estaba presente en el ápice nada más producirse la germinación de las esporas, éste vuelve a aparecer en el ápice nada más recuperarse el crecimiento polar. Los resultados sugieren que la localización de FlbB es dependiente del citoesqueleto de actina.

Por otro lado, los microtúbulos son estructuras dinámicas que se precisan para mantener la forma celular y están involucrados en el transporte de membranas, organelas, moléculas de RNA y otros complejos protéicos, utilizando para ello motores moleculares denominados dineínas y quinesinas (Horio y Oakley, 2005; Steinberg,

2007a). Este transporte puede ser en ambas direcciones, desde las zonas más distales de la célula hasta la proximidad del ápice y viceversa. Por ello, se decidió analizar la posible dependencia del transporte de FlbB con respecto a los microtúbulos añadiendo benomilo a cultivos *in vivo* (apartado 5.2.1; Peñalva, 2005), compuesto que desorganiza los dímeros α/β de tubulina (figura 5.3.4C).

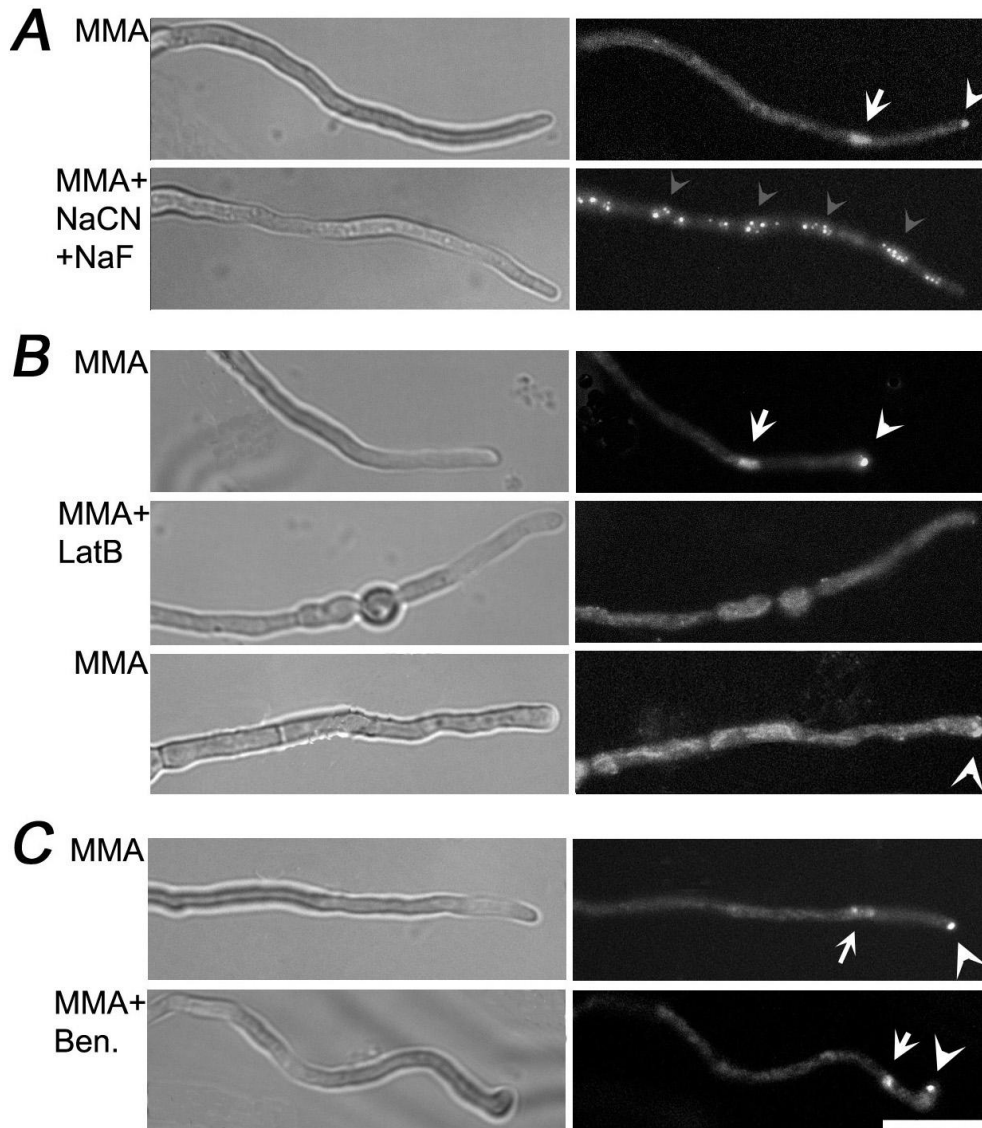


Figura 5.3.4: Localización subcelular de FlbB en: A) MMA con acida y fluoruro sódicos (panel inferior). Las puntas de flecha grises señalan varios agregados que forma FlbB. B) MMA con latrunculina B (panel 2) y MMA fresco añadido tras retirar el medio con LatB (panel 3); y C) MMA con benomilo (panel inferior). Las puntas de flecha blancas señalan la presencia de FlbB en el ápice; las flechas blancas, en el núcleo apical. Barra de escala = 10 μ m.

La localización subcelular de FlbB no se vio afectada por la adición de benomilo al medio de cultivo. A pesar de la morfología anormal que presentaban las hifas debido a la pérdida de la polaridad en el crecimiento, FlbB seguía estando presente

en el ápice y en el núcleo más apical. Por ello, se concluyó que el transporte de FlbB no dependía de la correcta funcionalidad de los dímeros de tubulina.

5.3.5. Localización subcelular de FlbB en mitosis.

Un momento crítico para el tráfico nucleo-citoplásmico durante el ciclo celular en *A. nidulans* es la mitosis, dado que el desensamblaje parcial del Complejo del Poro Nuclear (NPC) causa la parada del transporte activo a través de este complejo. Consecuentemente, determinadas proteínas nucleares pueden ver afectada su localización nuclear o citoplásmica (por ejemplo, An-Nic96, NapB, AnRanGAP; Araujo-Bazán *et al*, 2007; Osmani *et al*, 2006). Además, durante mitosis los citoesqueletos de actina y tubulina, sobre todo este último, sufren cambios drásticos que afectan al crecimiento polar de las hifas (Horio y Oakley, 2005).

Debido a la localización altamente polarizada y nuclear de FlbB, se ha estudiado si durante la mitosis se modifica este patrón de localización subcelular. Para ello, se procedió a observar mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* el crecimiento de diferentes hifas vegetativas. La figura 5.3.5 muestra las imágenes, tomadas cada dos minutos, de la localización de la proteína fluorescente GFP::FlbB en una hifa en crecimiento activo. Durante los primeros minutos (imágenes 1-3) se observa un núcleo apical fluorescente en el que durante las imágenes 4-7 se deja de observar la fluorescencia, para posteriormente volver a ser recuperada (imágenes 8-14). Esta serie de imágenes muestra que hay un espacio de tiempo, coincidente con la mitosis del núcleo apical, durante el cual FlbB no posee localización nuclear. Sin embargo, la fluorescencia apical se mantiene a lo largo de las diferentes exposiciones realizadas. Por lo tanto, a diferencia de lo observado con PacC (Araujo-Bazán *et al*, 2008), el TF FlbB no permanece unido al DNA durante la mitosis del núcleo apical. Así mismo, la distribución apical no depende del estadio de crecimiento vegetativo ni del momento del ciclo celular.

Es interesante resaltar que, tras producirse la división nuclear, FlbB reaparecía en el interior de los núcleos hijos, pero se acumulaba principalmente en el más apical (figura 5.3.5A, imágenes 8-14). Posteriormente, la fluorescencia de este segundo núcleo desaparecía quedando FlbB localizado únicamente en el núcleo más apical (no mostrado). En este sentido, es posible observar un flujo de fluorescencia

desde el ápice hasta el núcleo más próximo (figura 5.3.5B). Como ya se ha indicado previamente, estos resultados evidencian un mecanismo de transporte nuclear extremadamente regulado para este TF hacia un núcleo concreto de la célula.

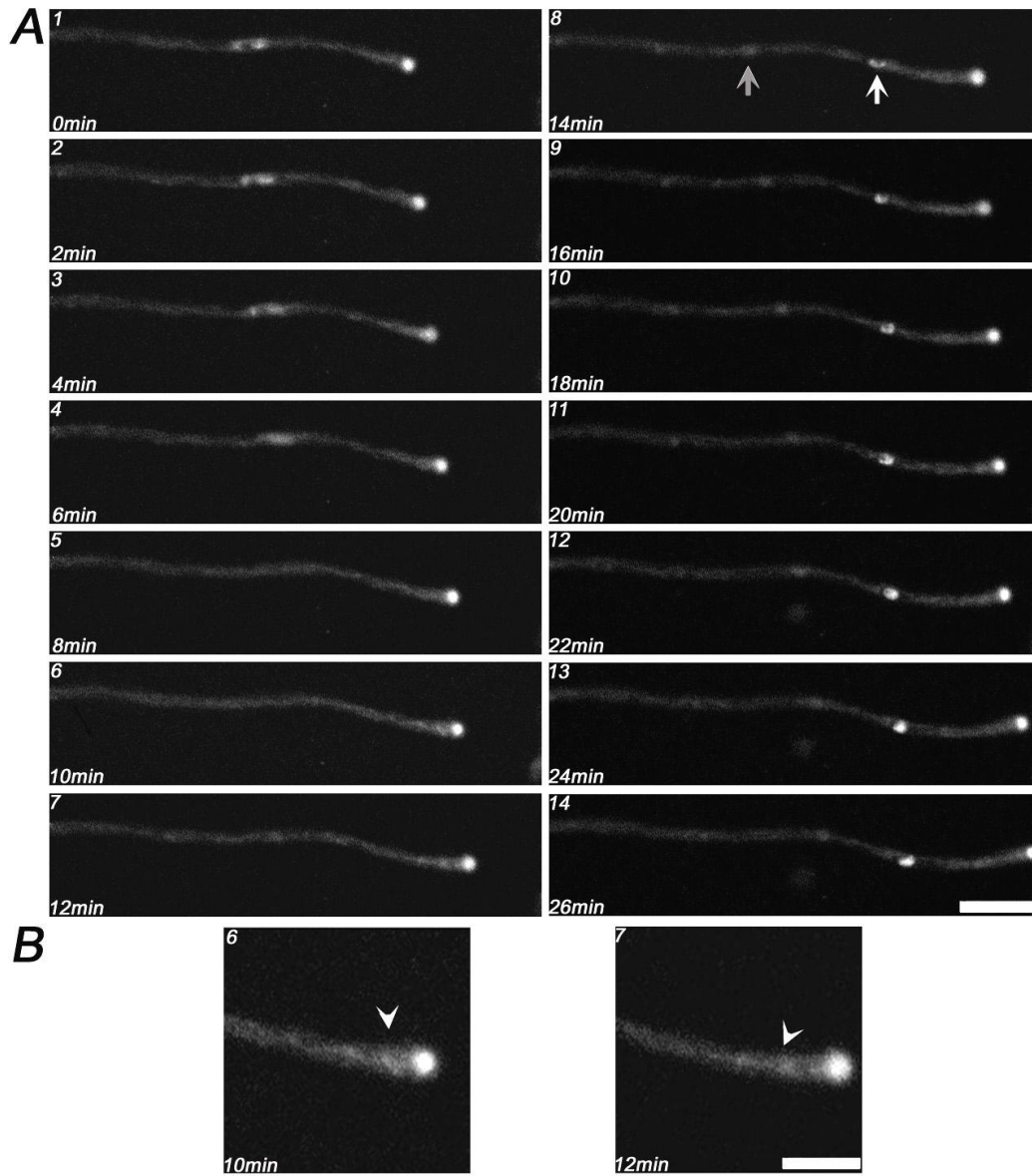


Figura 5.3.5: Localización subcelular de FlbB en mitosis. A) Secuencia de imágenes mostrando la localización de FlbB durante la división del núcleo apical de una hifa vegetativa. Se indica en cada imagen el tiempo transcurrido. La flecha blanca señala el núcleo hijo apical; la gris, el menos apical. Barra de escala= 10 μ m. B) Detalle de las imágenes 6 y 7 del panel A (aumentadas 2x), donde se observa cómo parece formarse un flujo de fluorescencia partiendo desde el ápice hacia el núcleo más apical (puntas de flecha blancas). Barra de escala = 5 μ m.

5.3.6. Localización subcelular de FlbB en fondo genético *ΔsfgA*.

SfgA es un TF en el que mutaciones de pérdida de función causan la supresión del fenotipo aconidial de los mutantes *fluG*⁻ (SfgA: Supressor of fluG

mutation; ver apartado 1.3.2; Seo *et al*, 2003; Seo *et al*, 2006). Así, el fenotipo de la cepa doble mutante (*ΔfluG*; *ΔsfgA*) es similar al de la cepa silvestre, formándose conidióforos normales. El análisis genético clásico, basado en relaciones de epistasia, ha situado al producto del gen *sfgA* corriente arriba del de *flbB* en la ruta de inducción temprana de *brlA* (Seo *et al*, 2006). Sin embargo, no se ha analizado si existe alguna relación funcional directa entre ambos.

Puesto que no se disponía de una cepa con una pérdida de función en el gen *sfgA*, se procedió a generar un alelo nulo por reemplazamiento génico, para lo cual, se transformó la cepa BD185 con la construcción adecuada (ver apartado 5.2.4; figura 5.3.5B) para obtener la cepa BD183. La observación de la quimera FlbB fluorescente en fondo genético *ΔsfgA* muestra una localización subcelular de FlbB diferente al fondo silvestre. FlbB se mantiene en el ápice, sin embargo, se observa fluorescencia en otros núcleos más distales al ápice (figura 5.3.5D). Teniendo en cuenta este cambio en la localización subcelular de FlbB en el citado fondo genético, y dado que SfgA es un factor de transcripción con dedos de zinc es posible hipotetizar que participe en la regulación de la síntesis de una molécula que ayude o regule en el transporte celular de FlbB. La naturaleza de esta relación funcional y el mecanismo por el cual se establece son temas que se abordarán en un futuro próximo.

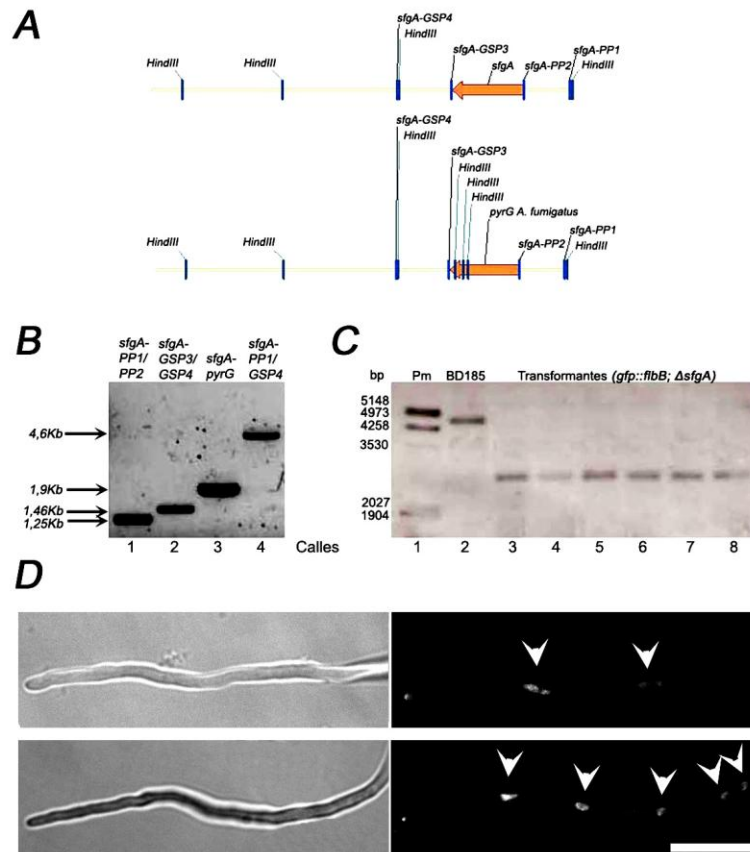


Figura 5.3.6: Localización subcelular de FlbB en fondo genético $\Delta sfgA$. A) Representación de la región genómica alrededor del locus *sfgA/AN8129.3*, antes del reemplazamiento génico (panel superior) y después (panel inferior). B) Productos de PCR para la generación del mutante nulo de *sfgA*. Los fragmentos de cada carril y su tamaño quedan señalados en el panel. C) Confirmación de la correcta inserción de la construcción *sfgA-PP1/GSP4* mediante técnica de Southern Blot. El DNA genómico fue digerido con *HindIII* y como sonda se utilizó el fragmento *sfgA-PP1/PP2*. En el caso de la cepa parental (calle 2) se observa una banda de 4,6Kb, la cual, pasa a ser de 2,7Kb al insertar la construcción e introducir nuevos sitios *HindIII* en el genoma (calles 3-8). D) Análisis de la localización subcelular de FlbB en la cepa BD183. El panel superior muestra una hifa donde se pueden ver dos núcleos (en fase G2 o S, señalados mediante puntas de flecha blancas). En el inferior pueden observarse hasta cinco núcleos. Barra de escala=10 μ m.

5.3.7. Localización subcelular de FlbB en fondo genético *AfluG*.

Al ser el elemento de la ruta de inducción temprana de la conidiación situado más cerca del estímulo inductor (Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006), se consideró interesante analizar los posibles cambios en la localización subcelular de FlbB en un fondo genético *AfluG* respecto a un fondo silvestre. La ausencia total de actividad de FluG suponía, además, la carencia total de la molécula inductora con cuya síntesis había sido relacionado este TF y, por consiguiente, una pérdida de la capacidad conidiante.

Para generar la cepa adecuada, se transformó la cepa aconidial BD85.6 (tabla 5.2.1) con la construcción *flbB::gfp/pyrG*. La correcta inserción de la construcción se verificó en un total de 24 colonias mediante Southern Blot (figura 5.3.6A). De entre estos transformantes se seleccionaron aquellas colonias con el patrón de restricción esperado y se analizó la localización de la proteína FlbB fluorescente. En el fondo genético $\Delta fluG$, FlbB seguía sintetizándose y manteniéndose en la localización descrita para el fondo silvestre (figura 5.3.6B). Sin embargo, tras 10-12 horas de incubación, FlbB perdía totalmente su localización.

Siendo FluG un elemento previo a FlbB (Lee y Adams, 1994a; Adams *et al*, 1998) y atendiendo a los resultados obtenidos, parece que es importante una correcta actividad de FluG para que FlbB desarrolle su función a lo largo del ciclo vegetativo. Es posible que la pérdida de la localización subcelular de FlbB esté relacionada con la acción del metabolito inductor ligado a la actividad de FluG, aunque no pueden excluirse otro tipo de dependencias con respecto a este factor.

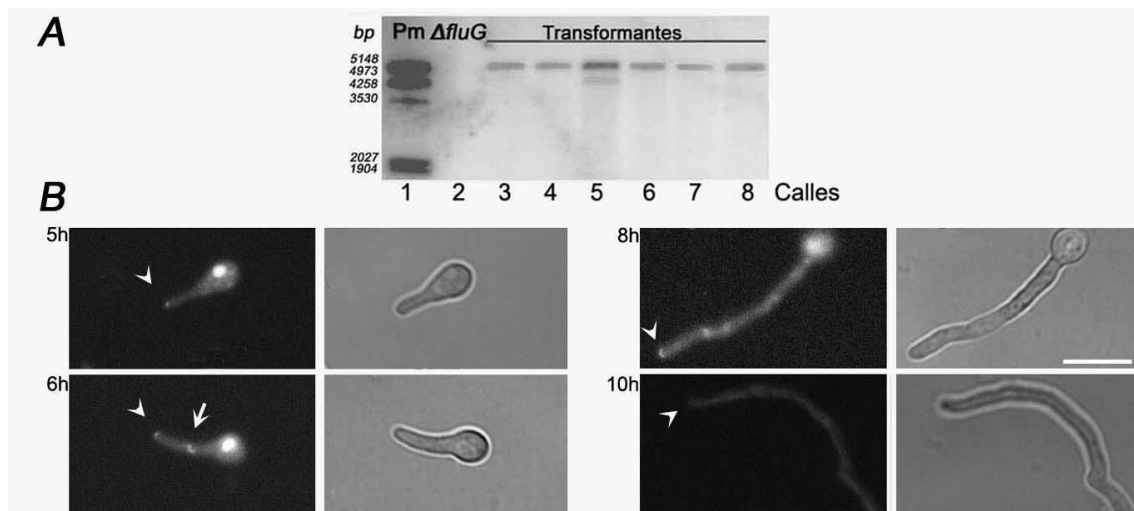


Figura 5.3.7: Localización de FlbB en fondo $\Delta fluG$. A) Confirmación mediante técnica de Southern Blot de la correcta inserción en la cepa BD85.6 de la construcción *flbB::gfp/pyrG*. El DNA genómico fue digerido con *EcoRV* y como sonda se utilizó el fragmento *flbB-GFP1/GFP2*, conteniendo el gen de *pyrG* de *A. fumigatus*. En la cepa parental BD85.6 no se observa la banda de 2,4Kb, ya que, al no haber adquirido la construcción, no hay hibridación posible con la sonda utilizada. En los casos en los que la construcción se ha insertado correctamente se observa una única banda de 5,1Kb (calles 3-4 y 6-8; ver pie de figura 5.3.1D, panel inferior). B) Localización subcelular de FlbB en fondo genético $\Delta fluG$ en diferentes momentos del crecimiento vegetativo. La fluorescencia en el ápice se mantiene pero, tras 10 horas de cultivo, FlbB deja de observarse en la célula. Los tiempos se refieren a horas (h) desde la inoculación. Barra de escala= 10 μ m.

5.3.8. Localización subcelular de FlbB tras la exposición al medio aéreo.

La exposición al medio aéreo ha sido descrito como el estímulo inductor más importante de la conidiación. La presencia de FlbB descrita en hifas vegetativas sugiere que desempeña una función en la señalización de la conidiación antes de la recepción de dicho estímulo. En cambio, la figura 5.3.8 muestra cambios en la localización de FlbB tras la exposición al medio aéreo, en los cuales, se observa cómo FlbB se acumula en todos los núcleos de las hifas mostradas. Es interesante señalar que la localización apical de FlbB no es uniforme sino que en determinadas ramificaciones se mantiene, mientras que en otras no. La regulación de esta localización en este tipo celular no se ha investigado en detalle en este trabajo.

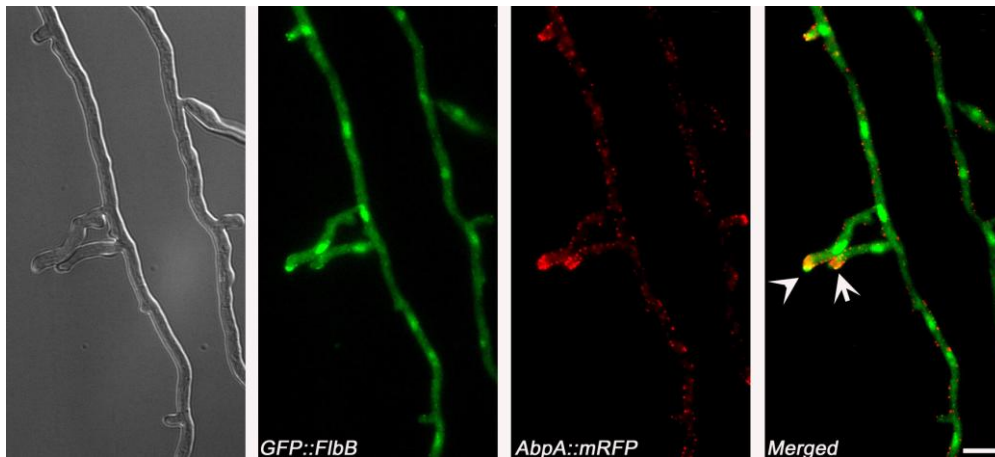


Figura 5.3.8: Localización subcelular de FlbB tras la inducción de la reproducción asexual por exposición al medio aéreo. En las hifas que se muestran FlbB se acumula todos los núcleos. La localización apical es mantenida en algunas ramificaciones (punta de flecha blanca) mientras que en otras no (flecha blanca). Barra de escala= 10 μ m.

5.3.9. Localización subcelular de FlbB durante la producción de conidióforos.

Durante el proceso de formación de conidióforos se requiere la activación y represión de los genes implicados, cada uno en límites temporales y espaciales específicos (Adams et al, 1998). TFs como StuA o MedA actúan, respectivamente, como reguladores de esta expresión espacial y temporal (Miller *et al*, 1992; Miller, 1993; Busby *et al*, 1996). De forma similar, el factor de transcripción BrlA es necesario no sólo para activar el proceso sino que se requiere también en estadios posteriores (Clutterbuck, 1970; Mirabito *et al*, 1989).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia obtenidas en diferentes estadios del proceso de generación de conidios muestran que FlbB no posee una localización próxima a membrana plasmática en la vesícula, aunque se observan acumulaciones en el interior de la célula que podrían ser núcleos, extremo que no ha podido ser comprobado (figura 5.3.8A, panel 1). En el comienzo del desarrollo de las méntulas, FlbB está presente de forma polarizada en los puntos de la vesícula donde comienzan a generarse estas estructuras y se mantiene en su ápice hasta su completo desarrollo (figura 5.3.8A, paneles 2-5; 5.3.8B, panel superior). De manera similar a lo observado durante el crecimiento vegetativo, en este caso también, FlbB vuelve a situarse por delante de la maquinaria de endocitosis, la cual parece volver a ser reclutada y ensamblada en las méntulas (figura 5.3.8B, panel superior). Una vez que las méntulas dejan de crecer para formar las fiálidas, FlbB desaparece de ellas (no mostrado). Tampoco se observa la presencia de FlbB en conidióforos maduros (figura 5.3.8B, panel inferior). Otra posibilidad ha sido analizar el desarrollo de conidióforos simplificados causados por el agotamiento en la fuente de carbono (Skronme *et al*, 1995), en los que se puede observar la presencia de FlbB, siempre en méntulas en proceso de crecimiento, pero no cuando ya se han generado las conidias (figura 5.3.8C).

5.4. DISCUSIÓN.

Los experimentos de Northern Blot descritos en el apartado 3.3.7, mostraron niveles detectables de expresión de *flbB* durante todo el ciclo vegetativo. Estos niveles se traducen en la presencia de FlbB a partir de la germinación de la espora y también en estadios posteriores como la inducción de la conidiación y determinadas etapas de la producción de conidióforos. La variación en la localización de FlbB en los tipos celulares analizados sugiere la existencia de un mecanismo específico de regulación espacio/temporal de su actividad. Por ello, mientras la discusión del capítulo 3 se centró en establecer una relación entre las regiones de FlbB definidas por las cepas BD11, BD12 y BD14 con la respuesta conidante ante diferentes condiciones de estrés, este apartado permite especular en torno al papel que las diferentes regiones conservadas de FlbB pueden jugar en los mecanismos que determinan su localización en cada momento y tipo celular.

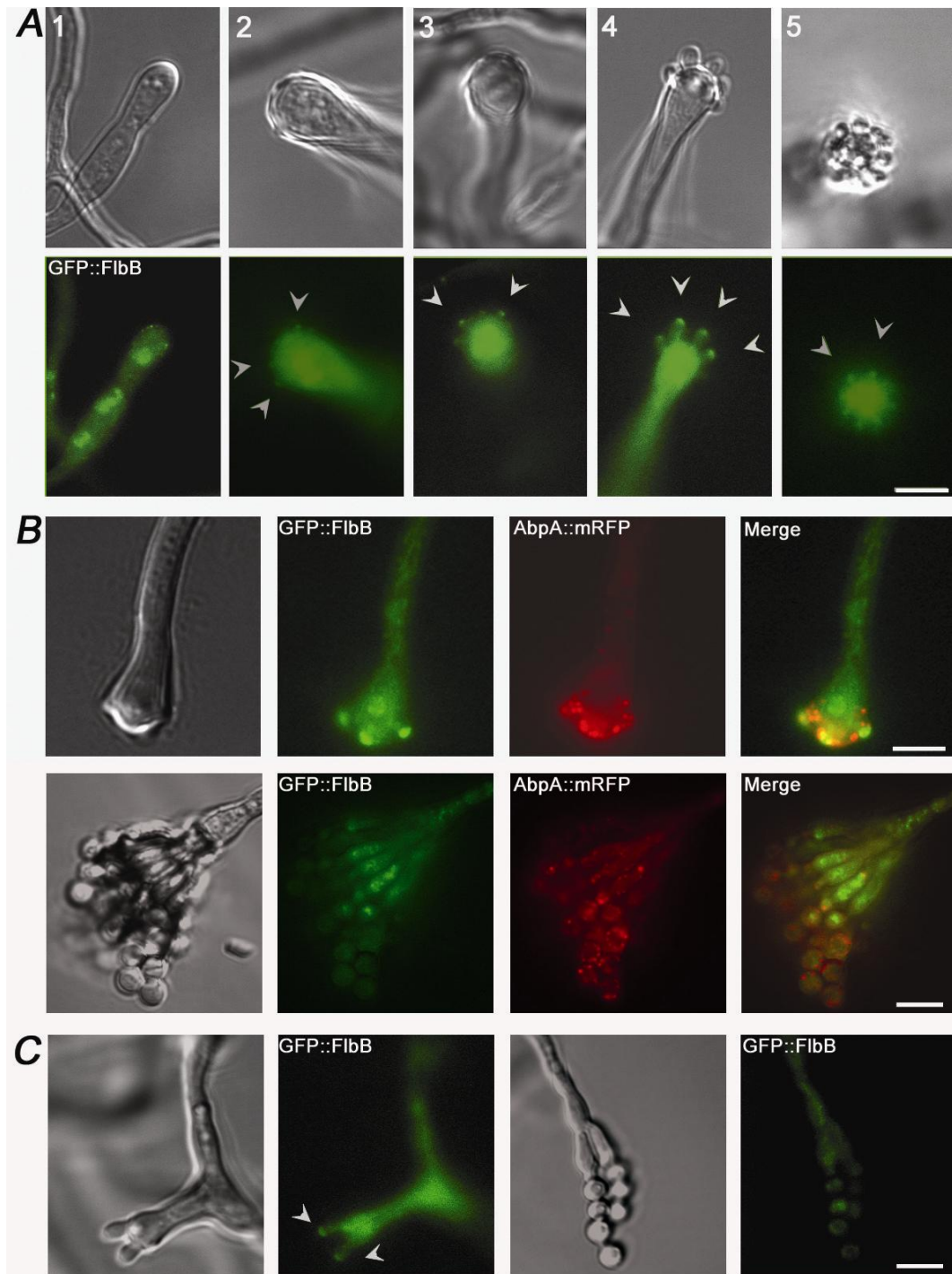


Figura 5.3.9: Localización subcelular de FlbB en diferentes estadios de la producción de conidióforos. A) FlbB no se localiza en el tallo ni en la vesícula (panel 1) pero, sí lo hace en el ápice de las métulas que comienzan a formarse o se encuentran en fase de elongación (paneles 2-5). Barra de escala=10 μ m. B) Panel superior: FlbB se sitúa en el ápice que se elonga en las métulas, delante de la maquinaria de endocitosis, la cual, vuelve a ser reclutada. Panel inferior: FlbB no se localiza en fiálidas o conidias de conidióforos maduros. Barra de escala = 10 μ m. C) Localización de FlbB en conidióforos simplificados formados debido al agotamiento en la fuente de carbono. Barra de escala= 10 μ m. Se obtuvieron los mismos resultados en el caso de las cepas expresando las fusiones GFP::FlbB o FlbB::GFP.

En la secuencia de FlbB es posible diferenciar las mitades N- y C-terminal. La primera, además de conferir la capacidad de unión a DNA y, por consiguiente, de regulación transcripcional, podría contener las señales que determinaran su localización nuclear (NLS). La segunda posee varios dominios conservados necesarios para una correcta funcionalidad de FlbB a los que es posible atribuir la participación en las interacciones necesarias para el transporte de FlbB al ápice u otras interacciones no descubiertas hasta el momento que podrían tener lugar en el ápice de las hifas vegetativas (o de las mótulas en elongación).

La localización nuclear de FlbB y su capacidad de unir al DNA implican la presencia de una NLS. La región anterior (más N-terminal) al dominio bZIP podría contener esta señal pero, sobre ella se discutirá más ampliamente en el siguiente capítulo. En cualquier caso, deben diferenciarse dos apartados relacionados: por un lado, la discriminación que tiene lugar en hifas vegetativas entre el núcleo apical y el resto y, por el otro, el mecanismo de importación de FlbB a este núcleo.

En el primer caso, debería analizarse cuál es el papel que pudiera desempeñar SfgA (Seo *et al*, 2006), ya que sin su actividad se pierde esta capacidad selectiva. La relación puede ser directa (complejo SfgA-FlbB) o indirecta (SfgA regula la transcripción de elementos que participan en este mecanismo), pero la necesidad de este factor abre una línea de trabajo que podría aportar datos en torno a nuevos mecanismos a través de los cuales se acotan márgenes geográficos diferenciados dentro de una misma hifa. Un ejemplo similar es la formación y desorganización de los dímeros de tubulina durante la mitosis. En las zonas lejanas al ápice de hifas maduras con un crecimiento polar normal, los dímeros citoplasmáticos de tubulina se desensamblan completamente durante mitosis. Sin embargo, es imprescindible mantener la estructura de ciertos microtúbulos en las cercanías del ápice (por lo menos uno en 37 de los 42 casos analizados por Horio y Oakley, 2005) para continuar con el crecimiento polar.

La localización de FlbB (nuclear y apical) también parece depender de FluG, pero no de forma constitutiva sino a partir de un momento determinado del ciclo vegetativo. Es posible que la ausencia del metabolito inductor ligado a su actividad (Lee y Adams, 1994a), impida a su vez la acumulación de la molécula ligada a FlbB. Para profundizar en esta idea se podría analizar el patrón de expresión de *flbB* en un fondo

genético *AfluG*. Sin embargo, se ha descrito la existencia de mutaciones en el *locus fluG* con capacidad supresora de la mutación *veA1* (Mooney *et al*, 1990), sugiriendo que FluG desempeña otras funciones en la célula. Por ello, no se pueden excluir otro tipo de causas que expliquen esta dependencia.

Independientemente de la fusión estudiada (FlbB::GFP o GFP::FlbB), la localización subcelular de FlbB ha sido en todos los casos estudiados la misma. Ello sugiere que su importación al núcleo no tiene lugar tras un truncamiento como ocurre, por ejemplo, con PacC y cabe pensar en otro tipo de mecanismo. En este sentido, FlbB presenta varias cisteínas conservadas a lo largo de su secuencia peptídica (C272, C382 y C303). No parece que estos residuos sean susceptibles de miristoilación o palmitoilación, ya que, las imágenes de fluorescencia apical de FlbB no sugieren una unión directa a membrana. Se puede pensar en un mecanismo de control similar al de Pap1. Este TF presenta dos regiones ricas en cisteínas, una central y la otra en C-terminal denominada CRD (**C**ysteine **R**ich **D**omain), la cual interacciona con la exportina Crm1 determinando su localización citoplásmica basal (Castillo *et al*, 2002). La exposición a condiciones de estrés oxidativo inducidas por H₂O₂ o dietilmaleato inhibe, a través de diferentes mecanismos, la interacción de la región CRD con Crm1, provocando la importación de Pap1 al núcleo. Tampoco puede excluirse una modificación de interacciones hipotéticas que podrían establecerse en este caso en el ápice entre FlbB y otros factores, como en el caso del factor de transcripción de tipo bZIP Atf1 de *S. pombe*, cuya actividad está regulada por la proteína Sty1 y la competición ejercida respecto a la homodimerización de Atf1 por el también factor tipo bZIP Pcr1 (Lawrence *et al*, 2007).

La importación de FlbB al núcleo apical es un proceso activo que depende de la F-actina, ya que es inhibido por la Latrunculina B y el fluoruro y acida sódicos (figura 5.3.4A y B). Esta localización nuclear de FlbB es homogénea (como ocurre en los casos de NapB o PacC; Araujo-Bazán *et al*, 2007; Fernández-Martínez *et al*, 2003) y no limitada a la envoltura nuclear como ocurre en el caso de las nucleoporinas (Osmani *et al*, 2006). Por ello, se puede confirmar un proceso activo de translocación de FlbB al núcleo a través del NPC, mediado por el importador/carioferina que reconocería su NLS. En mitosis, el NPC es parcialmente desensamblado y el transporte dentro y fuera del núcleo no ocurre de forma activa sino por difusión (De Souza y Osmani, 2007). Según

lo observado en la figura 5.3.5, FlbB pierde su localización nuclear en mitosis, diluyéndose probablemente a lo largo de todo el citoplasma y confirmando que en fase M no se encuentra uniendo al DNA como ocurre, por ejemplo, con formas truncadas del TF PacC (PacC²⁷; Fernández-Martínez *et al*, 2003; Peñalva y Arst, 2004). Ello hace plantear si FlbB se encuentra realmente uniendo al DNA en el núcleo apical de hifas vegetativas o si, por el contrario, la unión únicamente tiene lugar en condiciones inductoras tras la recepción de las señales necesarias. Esta cuestión deberá ser estudiada en un futuro.

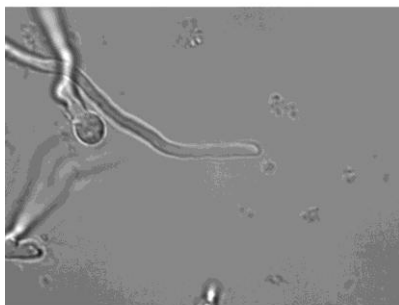
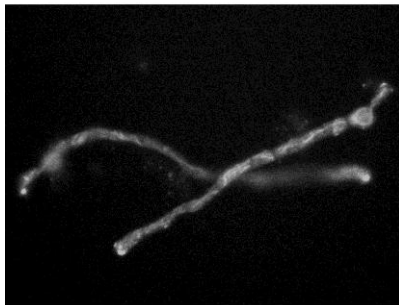
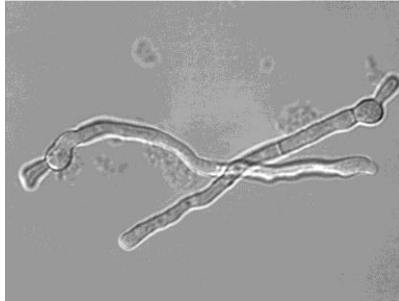
La figura 5.3.5 muestra un flujo de fluorescencia que parece proceder del ápice antes de observar el núcleo apical en fase G₁ (panel B). Ello permite plantear que la importación de FlbB puede ser consecuencia de un transporte activo desde la punta de la hifa. Esta localización apical de FlbB se establece nada más producirse la germinación de la espora. Recientemente, se ha descrito que genes relacionados con la conidiación como *fluG*, *dewA* o *stuA* aumentan o disminuyen sus niveles de expresión en la germinación de las esporas (Breakspear y Momany, 2007). Debido a ello, los autores hipotetizan sobre un posible papel de estos factores en el establecimiento de la polaridad tras la fase de crecimiento isotrópico. Es posible que la localización apical de FlbB responda a una función en este sentido, pero, su mantenimiento en esta región durante todo el ciclo vegetativo parece indicar que se debe a una participación en un mecanismo sensorial encargado de monitorizar las condiciones del medio de crecimiento y decidir si se debe conidiar o no. Esta posibilidad será tratada más extensamente en el siguiente capítulo.

Se plantean dos hipótesis de trabajo que expliquen el transporte de FlbB al ápice: Una síntesis en el Retículo Endoplasmático y posterior transporte al ápice o una síntesis *in situ* tras el transporte de su mRNA a dicha región. En este último caso, se está caracterizando un número cada vez mayor de factores que siguen este mecanismo. En *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas SHE2 y LOC1 se unen al mRNA de *ash1*, transportándolo al citoplasma y formando la partícula ribonucleoprotéica (mRNP). SHE3 se asocia a dicha partícula permitiendo que sea transportada por MYO4 (=SHE1) a la célula hija a través de los cables de actina, donde es traducida e importada a su núcleo (Jansen *et al*, 1996; Beach y Bloom, 2001; Cosma, 2004; revisado en Zarnack y Feldbrugge, 2007). De forma paralela, regiones específicas del mRNA de *flbB*

interaccionarían con los factores que lo transportarían al citoplasma, donde sería reconocido por su motor molecular requiriendo quizá otro factor actuando en TRANS. Cualquiera de los dos posibles mecanismos planteados depende del citoesqueleto de actina, ampliando el espectro de procesos en los que su actividad es requerida como, por ejemplo, en una correcta morfología y el movimiento de las mitocondrias (Suelmann y Fischer, 2000), en la septación (Momany y Hamer, 1997), el transporte de orgánulos (Xiang y Plamann, 2003) o en el caso de FlbB, la conidiación.

Una vez en el ápice, FlbB interaccionaría con las proteínas de la ruta de señalización de la conidiación directamente relacionadas con él, y en condiciones inductoras, sufriría las modificaciones pertinentes que determinarían, en primer lugar, su transporte a todos los núcleos de hifas como las mostradas en la figura 5.3.8 y, en segunda instancia, la regulación en estas condiciones de la transcripción de sus genes diana. Por el momento no se conoce ningún gen cuya expresión regule FlbB y menos el mecanismo a través del cual actúa, lo cual, debería ser estudiado de cara a un mejor conocimiento de los mecanismos de regulación a través de los cuales participa FlbB en la señalización de la conidiación.

El papel de FlbB en este proceso morfogénico continúa en la etapa de formación de las mótulas, donde se halla en el ápice que se elonga. Se plantean dos posibilidades. En primer lugar, FlbB podría desempeñar un papel morfológico en la formación de mótulas. En ese caso, los mutantes *flbB*⁻ deberían mostrar conidióforos no desarrollados completamente, con algún tipo de anomalía en las mótulas, rasgo no observado en ninguno de los casos en los que dichos mutantes son capaces de conidiar. La segunda posibilidad sería que justo en este estadio FlbB participara en un nuevo tipo de “*checkpoint*” para confirmar que la conidiación debe continuar. Sin embargo, esta posibilidad se contrapone al carácter irreversible que clásicamente se ha asumido para la conidiación una vez activada la expresión de *brlA* (Prade y Timberlake, 1993). En cualquier caso, hasta ahora no se había descrito en la bibliografía ningún caso en el que algún factor de inducción temprana tuviera una función previa a o tras la activación de la expresión de *brlA*. Estas son las primeras evidencias en este sentido, por lo que se abre una nueva línea de trabajo que podría añadir nuevos datos en torno a los mecanismos de control de la conidiación y su posible relación con la maquinaria de control del crecimiento polar.



6-. Discusión general:

6-. DISCUSIÓN GENERAL:

Aspergillus nidulans ha sido empleado como sistema modelo para estudios de tipo básico y aplicado durante más de cinco décadas (ver apartado 1.1; Martinelli y Kinghorn, 1994). Hoy en día, se considera que la reproducción asexual en este ascomiceto homotálico es el proceso morfogénico mejor documentado hasta el momento (Kües y Fischer, 2006).

A los trabajos fisiológicos y genéticos realizados en este campo en la década de los 70, y de corte progresivamente molecular de los años 80 y 90, les ha sucedido la caracterización de nuevos genes llevada a cabo en los últimos años, en muchos casos incorporando técnicas modernas de análisis molecular, como la localización subcelular a través de microscopía de fluorescencia, o estudios bioinformáticos. Sin embargo, y a pesar de estos avances, las cuestiones fundamentales sobre los procesos celulares que acaecen durante la conidiación distan mucho de estar bien descritos y comprendidos.

El estudio de dos mutantes aconidiales (BD12 y BD13), y la posterior caracterización y análisis de la localización subcelular de FlbB, han permitido aportar nuevos datos en torno a los mecanismos de inducción, pero sobre todo, han abierto en esta tesis la oportunidad de localizar parte de la maquinaria encargada ello. A continuación, se discutirán los puntos más destacables de esta tesis doctoral:

6.1. UNA VISIÓN RENOVADA DEL PROCESO DE INDUCCIÓN TEMPRANA.

En la revisión más actualizada sobre el control del crecimiento y el desarrollo en *Aspergilli*, Jae Hyuk Yu y colaboradores (2006) dividen el proceso de conidiogénesis en dos etapas: una primera, llamada fase de inducción temprana, en la que se incorporan los factores FluG y FlbA-E, entre otros (ver apartado 1.3.2; Yu *et al*, 2006), y la llamada ruta central de conidiación, que se inicia con la activación de *brlA* (ver apartado 1.3.3). En cuanto a los factores de inducción temprana, una característica común son unos niveles sostenidos de expresión durante la fase vegetativa (Lee y Adams, 1994b; Wieser y Adams, 1995; Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006). Su papel dentro del proceso de inducción es aún indeterminado, si bien algunos estudios sugieren una participación en la integración de diversos estímulos externos que desemboca en la activación de la ruta central. En cualquier caso, la visión proyectada parece centrarse en un único itinerario

morfogenético que tiene lugar de manera secuencial (hifas> célula pie> tallo> vesícula> métula> fiálida> conidia; Adams *et al*, 1998).

Como consecuencia del trabajo realizado en esta tesis, ha surgido una nueva visión sobre el proceso de conidiación que se puede sintetizar en los siguientes dos puntos:

1-. Cada proceso morfogenético comprende la generación de células que pueden tener, a su vez, distintos itinerarios. Por ejemplo, durante el crecimiento vegetativo, Levin y colaboradores (2007) han identificado variaciones importantes en la expresión génica de hifas en función de su posición en el micelio. Por otro lado, en un sistema similar como *N. crassa*, durante la reproducción sexual se han identificado 28 tipos celulares diferentes (Pöggeler *et al*, 2006). Otras observaciones indican que junto a estructuras como el conidióforo ocurren procesos de autólisis controlada en células adyacentes. Además, fenotipos de conidiación fallidos observados en ciertos mutantes a menudo desembocan en un proceso autolítico (Wieser *et al*, 1994; ver apartado 3.3.6). En consecuencia, la comprensión de los mecanismos de inducción de la conidiación exige el reconocimiento de todos los itinerarios celulares que tienen lugar y la incidencia de cada factor en cada uno de ellos.

2-. La observación de factores relacionados con la inducción de la conidiación en el ápice revela que esta región alberga no sólo la maquinaria responsable de la extensión celular de las hifas vegetativas, sino también una maquinaria complementaria cuya función comprendería la captación y procesado de estímulos, con el objeto de dirigir los itinerarios morfogenéticos correspondientes a distintos programas. Dentro de esta maquinaria complementaria se incorporaría FlbB, objeto de estudio en esta tesis, y posiblemente otros factores como FlbA, un regulador de la señal de la proteína G (ver apartado 1.3.2; Lee y Adams, 1994a) que impide la unión a GTP del complejo heterotrimérico formado por *fadA*, *sfaA*, y *gpgA* (subunidades α , β y γ , respectivamente; Yu *et al*, 1996; Rosen *et al*, 1999; Seo *et al*, 2005). La consecuencia de esta represión es la inhibición del crecimiento vegetativo. En base a ello, se puede concebir la actividad de FlbA como un mecanismo de coordinación que en condiciones inductoras activa la reproducción asexual frente al crecimiento vegetativo. Puesto que éste último tiene lugar en la zona apical y, en principio, la proteína G heterotrimérica debería estar unida a uno de los 16 receptores específicos de membrana tipo GPCR

identificados en *A.nidulans* (GPCR: **G**-**P**rotein **C**oupled **R**eceptor; Lafon *et al*, 2006; Yu, 2006), es posible que FlbA presente también una localización apical.

FlbC y FlbD son otros dos TFs involucrados en la inducción de la conidiación, con un dominio de dedo de zinc del tipo C2H2 y c-myb, respectivamente (ver apartado 1.3.2; Wieser y Adams, 1995; Adams *et al*, 1998). Ambos factores presentan homólogos únicamente en hongos con capacidad conidiante y presentan, además del dominio regulador en una de las mitades de la proteína, varias regiones conservadas en la otra mitad (ver alineamientos en Anexos). Por último, también AN0721.3/FlbF se acumula en el ápice de las hifas vegetativas. En este caso, además, se ha descrito una dependencia mutua entre FlbB y FlbF para una correcta localización (Garzia *et al*, en preparación).

Por todo ello, se puede especular con una hipotética localización apical de estos factores de inducción temprana, por lo que sería conveniente obtener cepas que expresaran fusiones entre cada uno de estos elementos y GFP. También sería necesario determinar su posible organización en complejos. Hasta el momento, únicamente se han realizado experimentos de epistasia para establecer el orden relativo de estos genes en la ruta de inducción (Wieser y Adams, 1995; Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006). Así, FlbD y FlbB fueron situados secuencialmente, en una ruta paralela e independiente respecto a FlbA o FlbC. Sin embargo, estos resultados no aportan información en torno a posibles relaciones funcionales más complejas y su localización celular.

6.2. RELACIÓN ENTRE SECUENCIA PEPTÍDICA DE FlbB Y SU LOCALIZACIÓN APICAL.

La posible localización apical de los factores de inducción temprana abre la puerta a una nueva concepción de esta región como una estructura que integra elementos involucrados en distintos programas morfogénicos. Aunque esta localización es especulativa en el caso del resto de factores de inducción, en el de FlbB implica la presencia de dos elementos imprescindibles, sobre los cuales se discutirá a continuación: 1-. Su secuencia peptídica debe contener una señal que permita el transporte a esta región. 2-. Debe existir un mecanismo encargado de su conducción, con una serie de factores responsables de ello.

1-. Con los resultados obtenidos en esta tesis, cabe proponer que los dominios conservados en la mitad C-terminal participan, entre otras posibles funciones, en la localización de FlbB (ver figura 3.3.3). Además, la presencia de un subgrupo de homólogos de FlbB con menor conservación en el extremo N-terminal, pero, manteniendo un elevado grado de conservación en la mitad C-terminal, podría indicar una especialización evolutiva de las funciones desempeñadas por los dominios conservados en esta región de FlbB y sus homólogos. Futuros estudios en los que se generaran nuevas formas de GFP::FlbB conteniendo truncamientos en el extremo C-terminal, permitirán determinar los posibles cambios en la localización subcelular de FlbB, y asignar funciones de localización a alguno de los dominios antes citados.

2-. El transporte de FlbB al ápice es un proceso dependiente de energía en el que es fundamental un correcto ensamblaje de la F-actina. Sin embargo, los cables de actina constituyen el “andamiaje” por el que se desplazan los factores que realmente son los encargados del transporte de diferentes elementos. Es la familia de proteínas denominada Miosinas la responsable de este transporte a través de los cables de actina (McGoldrick *et al*, 1995). Se ha descrito la existencia de diferentes subfamilias de miosinas y, en los hongos filamentosos cuyo genoma ha sido secuenciado, se ha identificado la presencia de cuatro de estas familias (Steinberg, 2007b). Así, debería intentarse determinarse cuál de estas cuatro familias de miosinas es la encargada de transportar a FlbB a través de los cables de actina. En este sentido, igual que FlbB, una de estas cuatro familias (la cual posee un dominio quitina sintasa) es exclusivamente fúngica (Hodge y Cope, 2000).

Por otro lado, la interacción de las cargas (en este caso FlbB) con los transportadores puede tener lugar de forma directa (en CIS) o a través de otros elementos que actúen como intermediarios (en TRANS). En el caso de FlbB, por el momento ambas opciones son posibles. Además, dado que la falta de una forma funcional de AN0721.3 (fondo genético Δ AN0721.3) provoca la pérdida de la localización apical de FlbB, es posible que éste fuera un elemento actuando en TRANS (Garzia *et al*, en preparación). Sin embargo, la dependencia es mutua, ya que, siendo AN0721.3 también una proteína apical, dicha localización se pierde en un fondo genético Δ flbB. Por ello, de forma alternativa, se puede plantear la posibilidad de que FlbB y AN0721.3 fueran parte de un complejo multimérico apical encargado de la

señalización de la conidiación cuyo ensamblaje sería imposible a falta de formas funcionales de estos factores.

Para finalizar este apartado cabe decir que en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en la identificación, tanto en levadura como en hongos filamentosos, de factores que participan en el crecimiento polar (Virag y Harris, 2006a), o factores que son transportados a los puntos de polaridad. Algunos de estos factores son transportados en forma de mRNA a su destino. Este tipo de mecanismo fue descrito por primera vez en levaduras haploides con el factor de transcripción Ash1, represor de la endonucleasa HO, requerida para la interconversión entre sexo α y α . Esta conversión se puede dar únicamente en la célula madre mientras que en las células hijas es Ash1 el que la reprime. Para ello, la proteína es transportada en forma de mRNA y traducida *in situ* (Zarnack y Feldbrugge, 2007). Tras este hallazgo, se han identificado varios factores que siguen un mecanismo similar (revisados en Zarnack y Feldbrugge, 2007). Un hipotético transporte de este tipo requeriría en principio, la presencia de “zipcodes”, secuencias necesarias para la formación de la llamada partícula ribonucleoprotéica (mRNP) y la correcta migración del mRNA a su destino (Jambhekar *et al*, 2005). Los “zipcodes” suelen estar localizados en la región 3' UTR, pero en *S. cerevisiae* se han identificado varios situados dentro de la región codificante. Aunque, se han intentado determinar las secuencias consenso dentro de los “zipcodes” que sirven para la unión del mRNA a las proteínas encargadas de su transporte y localización, todavía no han sido desarrollados modelos matemáticos que permitan su predicción e identificación en una secuencia de mRNA determinada (Jambhekar *et al*, 2005). Por ello, la forma más adecuada de estudiar un hipotético transporte del mRNA de *flbB* al ápice sería seguir el protocolo descrito por Aronov y colaboradores (2007), donde se analiza la localización de factores como Cdc42 generando una construcción que permite detectar tanto la proteína como su mRNA en la célula.

6.3. IMPORTACIÓN DE FlbB AL NÚCLEO Y UNIÓN AL DNA.

Los apartados anteriores han tratado sobre el mecanismo a través del cual FlbB es transportado al ápice y el papel que podría desempeñar en esta región junto al resto de elementos de inducción temprana. Otro aspecto a considerar es la mecánica de su importación al núcleo desde el ápice (ver figura 5.3.5). A continuación, se discutirán diferentes aspectos relacionados con la localización nuclear de FlbB.

1-. La importación de los TFs al núcleo es un proceso clave en la regulación de la expresión génica. Algunos factores se localizan en el núcleo constitutivamente (por ejemplo, PacC; Fernández-Martínez *et al*, 2003), mientras que otros son transportados a su interior en respuesta a estímulos concretos (por ejemplo, TFs retenidos mediante unión a membrana, revisados en Zupicich *et al*, 2001). FlbB puede corresponder a este segundo tipo, pero en todo caso, la importación nuclear requiere la presencia de una región de la secuencia peptídica implicada en ello. En este sentido, se ha observado que la región (G54-K72) guarda cierta similitud con una NLS clásica bipartita (Robbins *et al*, 1991). Estas señales suelen estar formadas por dos grupos constituidos principalmente de lisina y arginina, siguiendo generalmente la disposición: KR/KK-X(10-12)-KRRK (Fontes *et al*, 2003). En el caso de FlbB es posible que en esta región anterior a su dominio bZIP se localice una NLS clásica bipartita aunque no se ajuste al consenso y se vea alterada a KK-X(8)-KRRG. Las NLS clásicas suelen ser reconocidas por la importina α y transportadas por el heterodímero importina α/β 1, por lo que se podrían realizar experimentos de doble híbrido para determinar si existe esta interacción. Además, esta región de FlbB contiene el residuo de Gly mutado en la cepa BD14 (G70), el cual, está implicado en la unión del bZIP al DNA (ver apartado 4.3.4). Sin embargo, es posible que residuos pertenecientes a una NLS participen también en la unión a DNA (Pokorska *et al*, 2000). En tal caso, a partir del plásmido utilizado para generar los alelos truncados en el extremo C-terminal (ver apartado 6.2), se podrían generar cepas expresando fusiones entre GFP y formas mutadas de FlbB en esta región de interés. La pérdida de localización nuclear sería indicativa de una función de estos residuos en su importación.

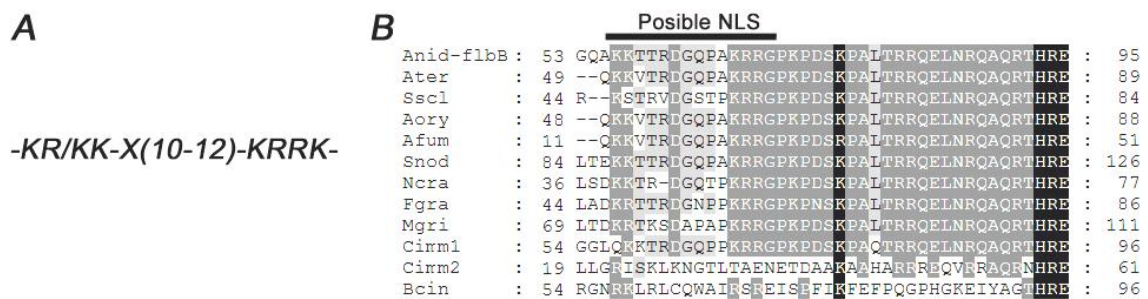


Figura 6.1: Posible NLS bipartita de FlbB. A) Consenso definido para las NLS bipartitas clásicas (Fontes *et al*, 2003) B) Alineamiento de los homólogos de FlbB respecto a la posible NLS. Nomenclatura: Anid: *A. nidulans*; Ater: *A. terreus*; Sscl: *S. sclerotium*; Aory: *A. oryzae*; Afum: *A. fumigatus*; Snod: *S. nodorum*; Ncra: *N. crassa*; Fgra: *F. graminearum*; Mgri: *M. grisea*; Cirm: *C. immitis*; Bcin: *B. cinerea*.

Sin embargo, la importación de FlbB al núcleo también podría estar condicionada por algún tipo de modificación post traduccional de su secuencia peptídica. Parecen poco probables truncamientos de la cadena peptídica, ya que, la localización de las dos proteínas quiméricas analizadas, GFP::FlbB y FlbB::GFP, ha sido en todos los casos estudiados la misma. Sin embargo, no puede excluirse otro tipo de modificación en forma de fosforilación de alguna de las tres cisteínas conservadas presentes en la mitad C-terminal de FlbB (C272, C382 y C303). También hay una tirosina (Y383) altamente conservada que podría ser susceptible de fosforilación. Se puede considerar, por último, un cambio de plegamiento de FlbB o una competición de éste por la unión con FlbF y otro factor de importación. El primer caso (FlbB/FlbF) generaría una localización apical mientras que el segundo (FlbB-Transportador) provocaría la importación de FlbB al núcleo.

2-. Una vez en el núcleo, FlbB debe ser capaz de unir a los promotores de los genes cuya expresión debe regular. El bZIP de FlbB es capaz de unir al DNA aunque no se conoce ningún gen cuya expresión esté regulada por él. Es conocido que los bZIP son capaces de homo o heterodimerizarse para unir al DNA (Vinson *et al*, 2006) y se han desarrollado métodos de predicción en otros organismos para determinar la estabilidad de estas interacciones (Fong *et al*, 2004). También se ha demostrado que a nivel biológico es frecuente la formación de dímeros tras la unión al DNA, los cuales no se podrían formar sin esta premisa (Vinson *et al*, 1993; Metallo *et al*, 1997). Por último, también hay casos en los que determinadas proteínas aumentan o mejoran la dimerización y la capacidad de regulación transcripcional de ciertos bZIP (Schneider y Schepartz, 2001; Virbasius *et al*, 1999). Todas estas posibilidades permanecen abiertas en el caso de FlbB y son rasgos que deben determinarse para conocer y comprender el mecanismo de regulación a través del cual actúa. Estudios de microscopia de fluorescencia contribuirían, en primera instancia, a conocer si FlbB homo o heterodimeriza *in vivo*. Para ello, a partir de dos cepas, cada una de ellas expresando la fusión entre FlbB y una de las mitades de YFP, se generaría una cepa diploide (Hu *et al*, 2002; Hoff y Kück, 2005). La presencia de fluorescencia en esta cepa sería indicativa de un mecanismo de homodimerización, en cuyo caso, los resultados de los experimentos de retardamiento en gel realizados y discutidos en el capítulo 4 cobrarían valor a nivel biológico. La ausencia de fluorescencia, en cambio, sería indicativa de un mecanismo de heterodimerización. En ese caso, debería hallarse el bZIP con el que interacciona

antes de o tras unir al DNA. Ello podría llevarse a cabo mediante experimentos de doble-híbrido o marcaje con YFP, pero, siempre con proteínas candidatas. También podría intentar aislarse, a partir de extractos protéicos determinados, proteínas capaces de interactuar con el dominio bZIP de FlbB (Kato *et al*, 1998). Es posible que en respuesta a diferentes estímulos FlbB forme en ciertas ocasiones homodímeros y en otras heterodímeros, lo que permitiría formular nuevos mecanismos de acción que conferirían a FlbB un carácter multifuncional.

3-. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran diferencias en la localización nuclear de FlbB en las siguientes condiciones: En cultivo sumergido, la presencia de FlbB queda limitada al núcleo apical (apartado 5.3.2). Sin embargo, en hifas aéreas se observan variaciones, con algunas hifas presentando una localización nuclear característica del crecimiento vegetativo, mientras que otras presentan acumulación en todos los núcleos (ver apartado 5.3.8). Se desconoce, dentro del cultivo aéreo, cuál es el tipo de célula que presenta esta localización de FlbB o los mecanismos que permiten diferenciar unas células de las otras. Sin embargo, la diferencia entre un caso y el otro debe responder a la consecución de programas morfogénéticos diferentes. Por todo ello, se requiere un extenso análisis citológico y la definición de los tipos celulares que se generan tras la exposición de las hifas vegetativas al medio aéreo, como paso previo a la formación de la célula pie.

6.4. PROCESOS CELULARES EN LOS QUE PODRÍA PARTICIPAR FlbB: ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL DOMINIO bZIP.

La capacidad de FlbB de unión al DNA y de regulación transcripcional son rasgos contenidos en su dominio bZIP. Esta clase de dominio comprende, a su vez, una primera región de dimerización (Landschultz *et al*, 1988) y un segundo dominio que es el de unión al DNA (Fujii *et al*, 2000). Se ha observado que en FlbB este último dominio guarda un elevado grado de conservación con bZIP de otros genes, como la familia AP-1 (ver apartado 4.3.1; Glover y Harrison, 1995). Por el contrario, los análisis filogenéticos realizados muestran que, junto con otros aspectos que se detallan a continuación, en su conjunto, el bZIP de FlbB pertenece a una subfamilia típica de hongos (ver figura 3.3.4).

Se han identificado 23 proteínas con dominio bZIP en *A. nidulans*, de las cuales, solamente han sido caracterizadas nueve, incluyendo a FlbB (apartado 3.3.2). Tres de ellas, JlbA (Strittmatter *et al*, 2001), CpcA (Hoffmann *et al*, 2001) y MeaB (Polley y Caddick, 1996), están principalmente implicadas en diferentes aspectos del metabolismo del nitrógeno. Dos de ellas, AtfA (Aguirre *et al*, 2005) y NapA (Asano *et al*, 2007), son proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. Las cuatro restantes participan en procesos de diferente naturaleza, como MetR en el metabolismo del azufre (Natorff *et al*, 2003), HapX en la formación del complejo protéico Hap (Tanaka *et al*, 2002), HacA en la activación de las rutas genéticas que regulan el plegamiento, control de calidad y transporte de las proteínas secretadas (Saloheimo *et al*, 2003), y el propio FlbB en la inducción de la conidiación (este trabajo; Etxebeste *et al*, 2008). Los restantes 14 posibles bZIP permanecen sin ser caracterizados.

Los análisis de filogenia muestran que el bZIP de *A. nidulans* evolutivamente más cercano al de FlbB es el de MeaB/AN4900.3 (figura 6.2), el cual, junto a AN0951.3 o AN8772.3, también pertenece a una subfamilia de bZIP exclusivamente fúngica (ver figura 3.3.4).

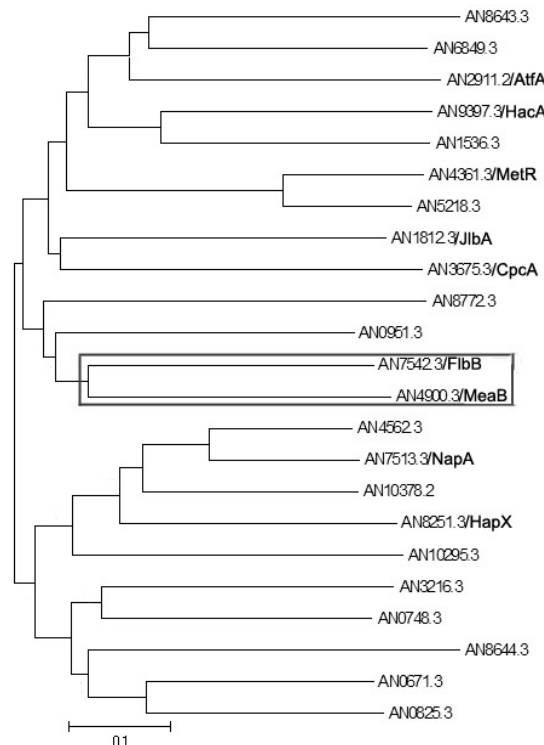


Figura 6.2: Árbol filogenético de los dominios bZIP identificados en *A. nidulans*. El brazo del árbol al que pertenecen los bZIP de FlbB y MeaB queda encuadrado en negro. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el software MEGA 3.1 (método Neighbor-Joining, con un “bootstrap” de 50000 replicados y el modelo amino p-distance).

Estos resultados permiten plantear la posibilidad de que ambos bZIP, el de FlbB y MeaB, procedan de un ancestro común y que FlbB mantuviera algún tipo de nexo con los procesos celulares en los que participa MeaB. Este factor de transcripción está involucrado en la activación directa de la expresión de NmrA, a través de la unión a una secuencia conocida y localizada de su promotor (Wong *et al*, 2007). NmrA es, a su vez, un represor de la actividad de AreA (Kudla *et al*, 1990), regulador transcripcional de la familia GATA responsable de la activación de genes implicados en la utilización de las diferentes fuentes de nitrógeno. En medios con niveles suficientes de amonio o glutamina, la actividad de AreA se encuentra inhibida; en cambio, en medios con agotamiento de la fuente de nitrógeno o con alanina, su actividad es promovida (Wong *et al*, 2007). En este sentido, se ha planteado que el factor determinante de la actividad de AreA son los niveles intracelulares de glutamina (Margelis *et al*, 2001).

Son varios los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la regulación de la actividad de AreA (Small *et al*, 1999; Morozov *et al*, 2000; Morozov *et al*, 2001; Small *et al*, 2001; Todd *et al*, 2005;). NmrA participa en uno de ellos. Así, sus niveles de expresión vienen definidos también por los niveles intracelulares de las fuentes de nitrógeno pero, el patrón de expresión es opuesto al de *areA* (Wong *et al*, 2007). Es aquí donde MeaB participa en la activación de *nmrA*, siendo necesario para su expresión en medios con concentraciones suficientes de amonio o glutamina. En cualquier caso, se ha descrito que MeaB también debe estar implicado en otro tipo de actividades relacionadas con el metabolismo del nitrógeno (Polley y Caddick, 1996; Wong *et al*, 2007).

Un rasgo común observado en todos los mutantes *flbB*⁻, es el fenotipo aconidial y autolítico que muestran en medio líquido con agotamiento de nitrógeno (ver figura 3.3.7). En los trabajos referentes a MeaB no se hace mención de la capacidad conidante de los mutantes ensayados en los diferentes medios pero, los resultados obtenidos, permiten plantear que el papel de FlbB en la inducción de la conidiación podría estar relacionado con rutas genéticas que enlazan en diferentes etapas con el metabolismo del nitrógeno. Una profundización en torno a esta posible relación podría completar la visión actual que se tiene sobre FlbB y, en general, sobre el proceso de inducción de la conidiación. En este sentido, en *A. fumigatus* se ha caracterizado un mutante ($\Delta Afatg1$)

con una capacidad autofágica restringida debido a la delección del homólogo del gen *ANI632.3* de *A. nidulans* (Richie *et al.*, 2007). Además de esta limitación, la cepa presenta un fenotipo aconidial en el que se generan conidióforos con fiálidas anormales y, el cual, puede ser suprimido mediante cultivo en medios con concentraciones elevadas de amonio o nitrato (40mM). Por ello, se propuso que la conidiación en situaciones de estrés depende de un proceso autofágico que aporta el nitrógeno suficiente para la formación de conidióforos. En la misma línea, los resultados obtenidos en esta tesis, han revelado posibles nexos entre *flbB*, conidiación, respuesta a estrés, autólisis y metabolismo del nitrógeno. Así, la exposición al medio aéreo podría generar una situación de estrés en el que la asimilación de las fuentes de nitrógeno del medio se viera limitada mientras que los niveles de especies del metabolismo del nitrógeno provenientes de un proceso autofágico inducido por estrés aumentarían. Este cambio generaría una respuesta conidiante en la que FlbB sería un efector imprescindible.

6.5. CONIDIACIÓN EN *Aspergillus nidulans*: ESTÍMULO INDUCTOR Y POSIBLES FUNCIONES DE LOS FACTORES DE INDUCCIÓN TEMPRANA.

Los resultados y la discusión generados en esta tesis propician una nueva visión en torno a las funciones de los diversos factores implicados en el proceso de inducción de la conidiación. Esta nueva visión se puede centrar en dos aspectos: 1-. La integración de señales en la respuesta conidiante. 2-. El papel o papeles desempeñados por los factores de inducción temprana en este proceso.

1-. Históricamente, la inducción de la conidiación ha sido concebida básicamente como la respuesta a un determinado parámetro o estímulo ambiental o endógeno (ver apartado 1.3.1; Hansberg y Aguirre, 1990; Mooney y Yager, 1990; Lee y Adams, 1994a; Skromne *et al.*, 1995; Lee y Adams, 1996, Roncal *et al.*, 2002). Por otro lado, en algunos estudios se apunta hacia la posible integración de diversas señales en una respuesta morfogénica unitaria. En este sentido, la recopilación de la información disponible en torno a los fenotipos y los procesos celulares con los que guardan relación diferentes mutantes *bld* (“*bald*”) y *whi* (“*white*”) de *Streptomyces coelicolor*, llevaron a Chater (2001) a plantear la existencia de un sistema de monitorización (*checkpoint multiplex*) en el que la conidiación se vería condicionada por chequeos metabólicos,

morfológicos, homeostáticos y relacionados con condiciones de estrés. El caso de FlbB, en el que se requiere una forma funcional para las respuestas ante estímulos como el hambre de nitrógeno, el de carbono o la emergencia al medio aéreo, fortalece este último punto de vista. Ello significaría que las rutas genéticas de respuesta conidiante podrían estar interconectadas. A través de este sistema se integrarían en *A. nidulans* todas las señales o estímulos que definen el medio de crecimiento, permitiendo al hongo responder de forma unitaria y seleccionar finalmente una de las dos opciones: conidiar o no. Cabría pensar que uno de los estímulos pueda ser clave o prioritario ante el resto a la hora de determinar cuál será la respuesta del hongo. Sin embargo, ello no implica que el resto de estímulos no fueran monitorizados, señalizados e integrados en la respuesta general; y tampoco que el peso relativo de cada estímulo en la respuesta global pudiera ser variable en función de las condiciones del medio. En cualquier caso, este hipotético sistema de chequeo debería ser previo a *brlA*, ya que, la activación de su expresión es suficiente para desencadenar la conidiación (Adams *et al*, 1988; Prade y Timberlake, 1993). Por todo ello, aunque FlbB había sido tradicionalmente situado en la ruta de respuesta a la exposición a un medio aéreo (Adams *et al*, 1998; Seo *et al*, 2006), dicho esquema y la forma de entender la inducción de la conidiación deberían ser revisados.

2-. Los factores de inducción temprana son efectores imprescindibles en la activación de *brlA* en respuesta a condiciones inductoras del medio de crecimiento. Debido a esta definición, tradicionalmente ha sido asumido que su acción se enmarca dentro de un intervalo temporal entre la recepción de las condiciones inductoras y el comienzo de la expresión de *brlA*. Probablemente como consecuencia de esta asunción, rasgos comunes como su expresión durante el crecimiento vegetativo fueron explicados aduciendo posibles regulaciones post-transcripcionales (Lee y Adams, 1994b; Wieser y Adams, 1995). Sin embargo, esta hipótesis no fue demostrada, puesto que en ningún caso se analizó si había traducción o si estos niveles de expresión derivaban en formas funcionales de las respectivas proteínas.

En este trabajo se ha demostrado que FlbB está presente en la célula tan pronto como germinan las esporas y que además continúa estándolo durante todo el crecimiento vegetativo (ver apartado 5.3.2). Por lo tanto, en ausencia de evidencias que asocien a FlbB con otro tipo de procesos, debe concluirse que en el crecimiento vegetativo participa en el control de la conidiación frente a diversos estímulos de signo

indeterminado. Teniendo en cuenta los patrones de expresión descritos, es muy posible que, de forma análoga a FlbB, los demás elementos de inducción temprana también sean traducidos durante el crecimiento vegetativo y desempeñen alguna función en el control de la conidiación en esta fase. El marcaje con proteína fluorescente de todos estos elementos y el análisis de su localización subcelular permitiría responder a esta cuestión. La información obtenida a través de fraccionamientos de extractos protéicos muestra que FluG presenta una localización citoplasmática (Lee y Adams, 1994a). Sin embargo, no se pueden descartar acumulaciones en localizaciones celulares concretas como es el ápice en el caso de FlbB.

La presencia de FlbB durante la elongación de las méntulas implica una función aún desconocida en este estadio. Podría responder a una función morfológica en la formación de méntulas o podría deberse a la participación de FlbB en un sistema que verificara la progresión de la conidiación (ver Discusión en capítulo 5). En cualquier caso, esta es la primera vez que se describe la presencia de uno de estos factores durante la conidiación, por lo que debería estudiarse la función a la que responde. Además genera la necesidad de revisar el segundo límite temporal en el que se ha enmarcado clásicamente la acción de los factores de inducción temprana.

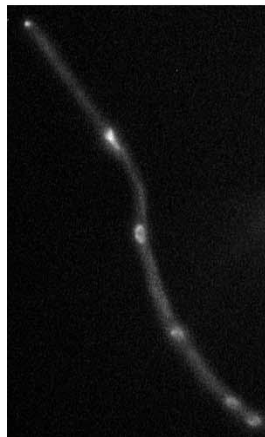
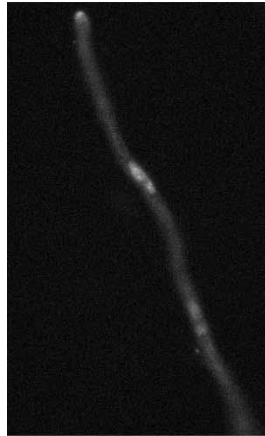
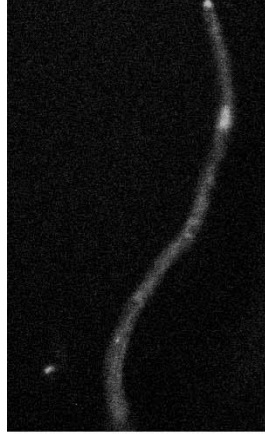
Tras la consecución de este trabajo cabe realizar una serie de reflexiones finales sobre el posible papel desempeñado por FlbB en la inducción de la conidiación.

Los datos obtenidos apuntan hacia FlbB como un factor que participa en un hipotético sistema sensorial localizado en el ápice de las hifas cuya función consistiría en el control de señales que desembocan en la conidiación. Estas señales estarían acompañadas por otras que inhiben el crecimiento vegetativo (Yu *et al*, 2006). El signo de la acción de FlbB con respecto a estas señales es desconocido por el momento.

Su localización apical depende, entre otros, de energía metabólica y del citoesqueleto de actina, así como de la correcta funcionalidad de FlbF. Durante el crecimiento vegetativo, FlbB procesaría señales no inductoras, manteniéndose en el ápice y en el núcleo apical, en este último caso, de una manera presuntamente dependiente de SfgA. En estas condiciones FlbB no promovería la expresión de *brlA* y la consecuencia sería el mantenimiento de la maquinaria responsable del crecimiento vegetativo.

Una vez que el sistema sensorial detectara condiciones inductoras, estas señales serían procesadas a través de FlbB, provocando la activación de la expresión de *brlA*. Esta activación no es directa, y tiene lugar a través de la acción de un intermediario metabólico específico. Por otro lado, FlbB participaría en el establecimiento de los diferentes itinerarios morfogénicos que tienen lugar en este estadio.

Por último, durante la conidiación, FlbB sigue sintetizándose para formar parte de estructuras específicas del conidióforo, lo cual, implica una diversidad funcional de este factor.



7-. Conclusiones.

7-. **CONCLUSIONES.**

- a) Los factores AN7542.3/FlbB y AN0721.3 participan en la síntesis de un metabolito desconocido necesario para inducir la conidiación.
- b) FlbB es un regulador transcripcional capaz de unir DNA.
- c) Los mecanismos de regulación de FlbB varían en función del tipo de célula.
- d) FlbB está probablemente implicado en un mecanismo sensorial encargado de la señalización de la conidiación localizado en el ápice de las hifas vegetativas.
- e) La conidiación en *Aspergillus nidulans* es una respuesta unitaria del hongo que requiere la integración de las rutas genéticas relacionadas con los diferentes parámetros (estímulos) que definen las condiciones del medio de crecimiento.



8-. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Adams, T. H., H. Deising, y W. E. Timberlake.** 1990. *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol.Cell.Biol.* **10**:1815-1817.
2. **Adams, T. H. y W. E. Timberlake.** 1990. Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87** :5405-5409.
3. **Adams, T. H., W. A. Hide, L. N. Yager, y B. N. Lee.** 1992. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol.Cell.Biol.* **12**:3827-3833.
4. **Adams, T. H., M. T. Boylan, y W. E. Timberlake.** 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**:353-362.
5. **Adams, T. H., J. K. Wieser, y J. H. Yu.** 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:35-54.
6. **Aguirre, J., R. Ortiz, J. Clutterbuck, R. Tapia, y M. Cardenas.** 1993. *vegA* and *cfwA* define two new developmental genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Newslett* **40A** :68.
7. **Aguirre, J.** 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol.* **8**:211-218.
8. **Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt, y W. Hansberg.** 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* **13**:111-118.
9. **Andrianopoulos, A. y W. E. Timberlake.** 1991. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**:747-748.
10. **Andrianopoulos, A. y W. E. Timberlake.** 1994. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol.Cell.Biol.* **14**:2503-2515.

11. **Aramayo, R. y W. E. Timberlake.** 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. Nucl.Acids Res. **18**:3415.
12. **Araujo-Bazan, L., M. A. Penalva, y E. A. Espeso.** 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol J.
13. **Araujo-Bazan, L., J. Fernandez-Martinez, V. M. d. I. Rios, O. Etxebeste, J. P. Albar, M. A. Penalva, y E. A. Espeso.** NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin α . Fungal Genetics and Biology **In Press, Corrected Proof**.
14. **Aronov, S., R. Gelin-Licht, G. Zipor, L. Haim, E. Safran, y J. E. Gerst.** 2007. mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical Endoplasmic Reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol.Cell.Biol. **27**:3441-3455.
15. **Asano, Y., D. Hagiwara, T. Yamashino, y T. Mizuno.** 2007. Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. Biosci.Biotechnol.Biochem. **71**:1800-1803.
16. **Axelrod, D. E.** 1972. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol **73**:181-184.
17. **Bartnicki-Garcia, S., D. D. Bartnicki, G. Gierz, R. Lopez-Franco, y C. E. Bracker.** 1995. Evidence that *Spitzenkörper* behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. Exp.Mycol **19**:153-159.
18. **Bartnicki-Garcia, S., F. Hergert, y G. Gierz.** 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. Protoplasma **153**:46-57.
19. **Beach, D. L. y K. Bloom.** 2001. ASH1 mRNA localization in three acts. Mol.Biol.Cell **12**:2567-2577.

20. **Becht, P., J. König, y M. Feldbrügge.** 2006. The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**:4964-4973.
21. **Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernandez-Martinez, H. Berger, L. Araujo-Bazan, E. A. Espeso, R. Pachlinger, A. Gallmetzer, I. Anderl, C. Scazzocchio, y J. Strauss.** 2007. Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Cell.Biol.* **27**:791-802.
22. **Betina, V.** 1995. Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol* **40**:219-224.
23. **Bouhouche, K., D. Zickler, R. Debuchy, y S. Arnaise.** 2004. Altering a gene involved in nuclear distribution increases the repeat-induced point mutation process in the fungus *Podospora anserina*. *Genetics* **167**:151-159.
24. **Boylan, M.T., P. M. Mirabito, C. E. Willett, C. R. Zimmerman, y W. E. Timberlake.** 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* **7**:3113-3118.
25. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
26. **Breakspear, A. y M. Momany.** 2007. *Aspergillus nidulans* conidiation genes *dewA*, *fluG*, and *stuA* are differentially regulated in early vegetative growth. *Eukaryotic Cell* **6**:1697-1700.
27. **Brown, D., F. Hauser, y J. Salvo.** 1993. Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus*. *Tetrahedron lett.* **34**:419-422.
28. **Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson, y J. L. Goldstein.** 2000. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**:391-398.

29. **Busby, T. M., K. Y. Miller, y 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.
30. **Butty, A. C., N. Perrinjaquet, A. Petit, M. Jaquenoud, J. E. Segall, K. Hofmann, C. Zwahlen, y M. Peter.** 2002. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J* **21**:1565-1576.
31. **Castillo, E. A., J. Ayte, C. Chiva, A. Moldon, M. Carrascal, J. Abian, N. Jones, y E. Hidalgo.** 2002. Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Molecular Microbiology* **45**:243-254.
32. **Champe, S. P., y L. D. Simon.** 1992. Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*, p. 63-69. In E. F. Rossomando and S. Alexander (ed.), *Morphogenesis: an analysis of the development of biological form*. Marcel Dekker, Inc, New York.
33. **Chater, K. F.** 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology* **4**:667-673.
34. **Clarke, L., y J. Carbon.** 1976. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9** :91-99.
35. **Clutterbuck, A. J.** 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**:317-327.
36. **Clutterbuck, A. J.** 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* **16**:303-316.
37. **Clutterbuck, A. J.** 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **70**:423-435.
38. **Cordobés, S.** 2005. Estudio de la conidiación en hongos filamentosos causada por moléculas señalizadoras. Euskal Herriko Unibertsitatea-Universidad del País Vasco.

39. **Cosma, M. P.** 2004. Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep.* **5**:953-957.
40. **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.
41. **D'Souza, C. A., B. N. Lee, y T. H. Adams.** 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **158**:1027-1036.
42. **De Souza, C. P. C. y S. A. Osmani.** 2007. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell* **6**:1521-1527.
43. **Desai, A. y T. J. Mitchison.** 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**:83-117.
44. **Dorn, G. L.** 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **66**:267-279.
45. **Drubin, D. G., K. G. Miller, y D. Botstein.** 1988. Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J.Cell Biol.* **107**:2551-2561.
46. **Dyer, P. S., M. Paoletti, y D. B. Archer.** 2003. Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**:2301-2303.
47. **Eisen, A., W. E. Taylor, H. Blumberg, y E. T. Young.** 1988. The yeast regulatory protein ADR1 binds in a zinc-dependent manner to the upstream activating sequence of ADH2. *Mol.Cell.Biol.* **8**:4552-4556.
48. **Ellenberger, T. E., C. J. Brandl, K. Struhl, y S. C. Harrison.** 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**:1223-1237.
49. **Espeso, E. A. y M. A. Penalva.** 1994. In vitro binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent. *FEBS Letters* **342**:43-48.

50. **Etxebeste, O., M. Ni, A. Garzia, N. J. Kwon, R. Fischer, J. H. Yu, E. A. Espeso, y U. Ugalde.** 2008. Basic-Zipper-Type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7**:38-48.
51. **Fernandez-Martinez, J., C. V. Brown, E. Diez, J. Tilburn, H. N. Arst, M. A. Penalva, y E. A. Espeso.** 2003. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *Journal of Molecular Biology* **334**:667-684.
52. **Fong, J. H., A. E. Keating, y M. Singh.** 2004. Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions. *Genome Biol* **5**:R11.
53. **Fontes, M. R. M., T. Teh, D. Jans, R. I. Brinkworth, y B. Kobe.** 2003. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by Importin- α . *J.Biol.Chem.* **278**:27981-27987.
54. **Fried, H. y U. Kutay.** 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **60**:1659-1688.
55. **Fried, M. y D. M. Crothers.** 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucl.Acids Res.* **9**:6505-6525.
56. **Fujii, Y., T. Shimizu, T. Toda, M. Yanagida, y T. Hakoshima.** 2000. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Mol Biol* **7**:889-893.
57. **Furukawa, K., Y. Katsuno, T. Urao, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, H. Yamada-Okabe, Y. Yamagata, K. Abe, y T. Nakajima.** 2002. Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:5304-5310.
58. **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, y B. W. Birren.** 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**:1105-1115.
59. **Garner, M. M. y A. Revzin.** 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucl.Acids Res.* **9**:3047-3060.
60. **Gems, D., I. L. Johnstone, y A. J. Clutterbuck.** 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**:61-67.
61. **Girbardt, M.** 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta* **50**:47-59.
62. **Glass, N. L., D. J. Jacobson, y P. K. T. Shiu.** 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**:165-186.
63. **Glass, N. L., C. Rasmussen, M. G. Roca, y N. D. Read.** 2004. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology* **12**:135-141.
64. **Glover, J. N. M. y S. C. Harrison.** 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**:257-261.
65. **Gorlich, D. y U. Kutay.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**:607-660.
66. **Gregory, P. H.** 1966. The fungus spore: what it is and what it does., p. 1-13. *In* M. F. Madelin (ed.), *The fungus spore*. Butterworths, London.
67. **Gulli, M. P., M. Jaquenoud, Y. Shimada, G. Niederhauser, P. Wiget, y M. Peter.** 2000. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-

- like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Molecular Cell* **6**:1155-1167.
68. **Gupta, G. D. y I. Brent Heath.** 2002. Predicting the distribution, conservation, and functions of SNAREs and related proteins in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **36**:1-21.
69. **Gwynne, D. I., F. P. Buxton, S. Sibley, R. W. Davies, R. A. Lockington, C. Scazzocchio, y H. M. Sealy-Lewis.** 1987. Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **51**:205-216.
70. **Han, K. H., K. Y. Han, J. H. Yu, K. S. Chae, K. Y. Jahng, y D. M. Han.** 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **41**:299-309.
71. **Han, K. H., J. A. Seo, y J. H. Yu.** 2004. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (α) signalling. *Molecular Microbiology* **53**:529-540.
72. **Hansberg, W., y J. Aguirre.** 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor. Biol* **142**:201-221.
73. **Harris, S. D., L. Hamer, K. E. Sharpless, y J. E. Hamer.** 1997. The *Aspergillus nidulans sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *EMBO J* **16**:3474-3483.
74. **Harris, S. D.** 1997. The duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **22**:1-12.
75. **Harris, S. D.** 2001. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Current Opinion in Microbiology* **4**:736-739.
76. **Harris, S. D. y M. Momany.** 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology* **41**:391-400.

-
77. **Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, y M. Momany.** 2005. Polarisome meets *Spitzenkörper*: Microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryotic Cell* **4**:225-229.
78. **Hickey, P. C., D. J. Jacobson, N. D. Read, y N. L. Glass.** 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **37**:109-119.
79. **Hodge, T. y M. J. Cope.** 2000. A myosin family tree. *J Cell Sci* **113**:3353-3354.
80. **Hoff, B. y U. Kück.** 2005. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet* **47**:132-138.
81. **Hoffmann, B., O. Valerius, M. Andermann, y G. H. Braus.** 2001. Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **12**:2846-2857.
82. **Hohmann-Marriott, M. F., M. Uchida, A. M. L. van de Meene, M. Garret, B. E. Hjelm, S. Kokoori, y R. W. Roberson.** 2006. Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytologist* **172**:208-220.
83. **Horio, T. y B. R. Oakley.** 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **16**:918-926.
84. **Horio, T.** 2007. Role of microtubules in tip growth of fungi. *Journal of Plant Research* **120**:53-60.
85. **Hu, C. D., Y. Chinenov, y T. K. Kerppola.** 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* **9**:789-798.
86. **Inglis, D. O. y A. D. Johnson.** 2002. Ash1 Protein, an asymmetrically localized transcriptional regulator, controls filamentous growth and virulence of *Candida albicans*. *Mol.Cell.Biol.* **22**:8669-8680.

87. **Iuchi, S.** 2001. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) **58**:625-635.
88. **Iyer, L. M., E. V. Koonin, y L. Aravind.** 2002. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. Genome Biol **3**:RESEARCH0012.
89. **Jambhekar, A., K. McDermott, K. Sorber, K. A. Shepard, R. D. Vale, P. A. Takizawa, y J. L. DeRisi.** 2005. Unbiased selection of localization elements reveals cis-acting determinants of mRNA bud localization in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences **102**:18005-18010.
90. **Jansen, R. P., C. Dowzer, C. Michaelis, M. Galova, y K. Nasmyth.** 1996. Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional Myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. Cell **84**:687-697.
91. **Jeong, H. Y., H. Kim, D. M. Han, K. Y. Jahng, y 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.
92. **Kafer, E.** 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics **52**:217-232.
93. **Kafer, E.** 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Adv Genet. **19**:33-131.
94. **Kaffman, A. y E. K. O'Shea.** 1999. Regulation of nuclear localization: A key to a door. Annual Review of Cell and Developmental Biology **15**:291-339.
95. **Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson, y A. E. Smith.** 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell **39**:499-509.
96. **Kato, M., A. Aoyama, F. Naruse, Y. Tateyama, K. Hayashi, M. Miyazaki, P. Papagiannopoulos, M. A. Davis, M. J. Hynes, T. Kobayashi, y N. Tsukagoshi.** 1998. The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a

heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Gen Genet **257**:404-411.

97. **Kato, N., W. Brooks, y A. M. Calvo.** 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. Eukaryotic Cell **2**:1178-1186.
98. **Kim, H. S., K. Y. Han, K. J. Kim, D. M. Han, K. Y. Jahng, y K. S. Chae.** 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology **37**:72-80.
99. **Kim, Y. J., L. Francisco, G. C. Chen, E. Marcotte, y C. S. Chan.** 1994. Control of cellular morphogenesis by the Ip12/Bem2 GTPase-activating protein: possible role of protein phosphorylation. J.Cell Biol. **127**:1381-1394.
100. **Kirk, K. E. y N. R. Morris.** 1991. The *tubB* alpha-tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. Genes Dev. **5**:2014-2023.
101. **Klebs, G.** 1896. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen.
102. **Knaus, M., M. P. Pelli-Gulli, F. van Drogen, S. Springer, M. Jaquenoud, y M. Peter.** 2007. Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. EMBO J J.
103. **Konzack, S., P. E. Rischitor, C. Enke, y R. Fischer.** 2005. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. Mol.Biol.Cell **16**:497-506.
104. **Kudla, B., M. X. Caddick, T. Langdon, N. M. Martinez-Rossi, C. F. Bennett, S. Sibley, R. W. Davies, y H. N. Arst, Jr.** 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J **9**:1355-1364.
105. **Kumar, S., K. Tamura, y M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform **5**:150-163.

106. **Kües, U. y R. Fischer.** 2006. Asexual sporulation in mycelial fungi, p. 263-292. In U. Kües and R. Fischer (ed.), *The Mycota vol.I: Growth, differentiation and sexuality.* Springer-Verlag, Berlin .
107. **Lafon, A., K. H. Han, J. A. Seo, J. H. Yu, y C. D'Enfert.** 2006. G-protein and cAMP-mediated signaling in *Aspergilli*: A genomic perspective. *Fungal Genetics and Biology* **43**:490-502.
108. **Landschulz, W. H., P. F. Johnson, y S. L. McKnight.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**:1759-1764.
109. **Lara-Ortiz, T., H. Riveros-Rosas, y J. Aguirre.** 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **50**:1241-1255.
110. **Lauter, F. R. y V. E. A. Russo.** 1991. Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucl.Acids Res.* **19**:6883-6886.
111. **Law, D. J. y W. E. Timberlake.** 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* **144**:509-517.
112. **Lawrence, C. L., H. Maekawa, J. L. Worthington, W. Reiter, C. R. M. Wilkinson, y N. Jones.** 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J.Biol.Chem.* **282**:5160-5170.
113. **Lechler, T., G. A. Jonsdottir, S. K. Klee, D. Pellman, y R. Li.** 2001. A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *J.Cell Biol.* **155**:261-270.
114. **Lee, B. N., y T. H. Adams.** 1994a. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev.* **8**:641-651.

-
115. **Lee, B. N., y T. H. Adams.** 1994b. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol.* 1994 Oct;14(2):323-34 **14**:323-334.
116. **Lee, B. N., y T. H. Adams.** 1996. FluG and FlbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *EMBO J* **15**:299-309.
117. **Levin, A. M., R. P. de Vries, A. Conesa, C. de Bekker, M. Talon, H. H. Menke, N. N. van Peij, y H. A. Wosten.** 2007. Spatial differentiation in the vegetative mycelium of *Aspergillus niger*. *Eukaryotic CelIEC.*
118. **Lipschutz, J. H. y K. E. Mostov.** 2002. Exocytosis: The many masters of the Exocyst. *Current Biology* **12**:R212-R214.
119. **Luscher, B. y R. N. Eisenman.** 1990. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev.* **4**:2235-2241.
120. **Majello, B., L. C. Kenyon, y R. Dalla-Favera.** 1986. Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**:9636-9640.
121. **Margelis, S., C. D'Souza, A. J. Small, M. J. Hynes, T. H. Adams, y M. A. Davis.** 2001. Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *J.Bacteriol.* **183**:5826-5833.
122. **Marshall, M. A. y W. E. Timberlake.** 1991. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol.Cell.Biol.* **11**:55-62.
123. **Martinelli, S. D., y A. J. Clutterbuck.** 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **69**:261-268.
124. **Martinelli, S. D. y J. R. Kinghorn.** 1994. *Aspergillus*: 50 years on. Elsevier, Amsterdam; New York.
125. **Maxam, A. M. and W. Gilbert.** 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**:499-560.

126. **Mayorga, M. E. y W. E. Timberlake.** 1990. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. *Genetics* **126**:73-79.
127. **Mayorga, M. E. y W. E. Timberlake.** 1992. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol Gen Genet* **235 IP - 2-3**:205-212.
128. **McGoldrick, C. A., C. Gruver, y G. S. May.** 1995. *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J.Cell Biol.* **128**:577-587.
129. **McNabb, D. S. y I. Pinto.** 2005. Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**:1829-1839.
130. **Metallo, S. J., y A. Schepartz.** 1997. Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat Struct Biol* **4**:115-117.
131. **Miller, B.** 1993. The *medA* gene of *Aspergillus nidulans*. *J.Cell.Biochem.* **17C**:44.
132. **Miller, K. Y., T. M. Toennis, T. H. Adams, y B. L. Miller.** 1991. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Molecular and General Genetics* **227**:285-292.
133. **Miller, K. Y., J. Wu, y B. L. Miller.** 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* **6**:1770-1782.
134. **Mims, C. W., W. D. Richardson, y W. E. Timberlake.** 1988. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **244**:132-141.
135. **Mingot, J. M., E. A. Espeso, E. Diez, y M. A. Penalva.** 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol.Cell.Biol.* **21**:1688-1699.
136. **Mirabito, P. M., T. H. Adams, y W. E. Timberlake.** 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**:859-868.

-
137. **Momany, M., y J. E. Hamer.** 1997. Relationship of actin, microtubules, and crosswall synthesis during septation in *Aspergillus nidulans*. Cell Motil.Cytoskeleton **38**:373-384.
138. **Momany, M.** 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. Current Opinion in Microbiology **5**:580-585.
139. **Mooney, J. L. y L. N. Yager .** 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. Genes Dev. **4**:1473-1482.
140. **Mooney, J. L., D. E. Hassett, y L. N. Yager.** 1990. Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. Genetics **126**:869-874.
141. **Morozov, I. Y., M. G. Martinez, M. G. Jones, y M. X. Caddick.** 2000. A defined sequence within the 3' UTR of the *areA* transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation. Molecular Microbiology **37**:1248-1257.
142. **Morozov, I. Y., M. Galbis-Martinez, M. G. Jones, y M. X. Caddick.** 2001. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. Molecular Microbiology **42**:269-277.
143. **Morris, N. R.** 1975. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. Genet Res **26**:237-254.
144. **Morton, A. G.** 1961. The induction of sporulation in mould fungi. Proc.R.Microsp.Soc.B. **153**:548-569.
145. **Natorff, R., M. Sienko, J. Brzywczy, y A. Paszewski.** 2003. The *Aspergillus nidulans metR* gene encodes a bZIP protein which activates transcription of sulphur metabolism genes. Molecular Microbiology **49**:1081-1094.
146. **Nayak, T., E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani, y B. R. Oakley.** 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. Genetics **172**:1557-1566.
147. **Ni, M. y J.-H. Yu.** 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. PLoS ONE **2**:e970.

148. **Nierman, W. C., G. May, H. S. Kim, M. J. Anderson, D. Chen, y D. W. Denning.** 2005. What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med.Mycol* **43 Suppl 1**:S3-S5.
149. **Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst, y M. A. Penalva.** 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**:1622-1632.
150. **Osharov, N., J. Mathew, y G. S. May.** 2000. Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **31**:181-188.
151. **Osharov, N. y G. S. May.** 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters* **199**:153-160.
152. **Osmani, A. H., J. Davies, H. L. Liu, A. Nile, y S. A. Osmani.** 2006. Systematic deletion and mitotic localization of the Nuclear Pore Complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **17**:4946-4961.
153. **Pao, S. S., I. T. Paulsen, y M. H. Saier, Jr.** 1998. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1-34.
154. **Pearson, C. L., K. Xu, K. E. Sharpless, y S. D. Harris.** 2004. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **15**:3658-3672.
155. **Penalva, M. A.** 2001. A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: Alkaptonuria and beyond. *Fungal Genetics and Biology* **34**:1-10.
156. **Penalva, M. A. y J. Arst.** 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology* **58**:425-451.
157. **Penalva, M. A.** 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* **42**:963-975.

-
158. **Pokorska, A., C. Drevet, y C. Scazzocchio.** 2000. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *Journal of Molecular Biology* **298**:585-596.
159. **Polley, S. D. y M. X. Caddick.** 1996. Molecular characterisation of *meaB*, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Letters* **388**:200-205.
160. **Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. McDonald, y A. W. Bufton.** 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* **5**:141-238.
161. **Pöggeler, S., M. Nowrousian, y U. Kück.** 2006. Fruiting-body development in Ascomycetes, p. 325-355. *In* U. Kües and R. Fischer (ed.), *The Mycota vol.I: Growth, differentiation and sexuality.* Springer-Verlag, Berlin.
162. **Prade, R. A., y W. E. Timberlake.** 1993. The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**:2439-2447.
163. **Pruyne, D. y A. Bretscher.** 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113**:365-375.
164. **Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, y C. Boone.** 2002. Role of formins in Actin assembly: Nucleation and barbed-end association. *Science* **297**:612-615.
165. **Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong, y A. Bretscher.** 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**:559-591.
166. **Reynaga-Pena, C. G., G. Gierz, y 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.
167. **Richie, D. L., K. K. Fuller, J. Fortwendel, M. D. Miley, J. W. McCarthy, M. Feldmesser, J. C. Rhodes, y D. S. Askew.** 2007. Unexpected link between metal

- ion deficiency and autophagy in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryotic Cell **6**:2437-2447.
168. **Richman, T. J., M. M. Sawyer, y D. I. Johnson.** 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. Eukaryotic Cell **1**:458-468.
169. **Riquelme, M., G. Gierz, y 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.
170. **Riquelme, M., R. W. Roberson, D. P. McDaniel, y S. Bartnicki-Garcia.** 2002. The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology **37**:171-179.
171. **Riquelme, M., R. Fischer, y S. Bartnicki-Garcia.** 2003. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. Protoplasma **222**:211-215.
172. **Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey, y C. Dingwall.** 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell **64**:615-623.
173. **Roncal, T., U. O. Ugalde, y A. Irastorza.** 1993. Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclopium*: calcium triggers cytosolic alkalization at the hyphal tip. J Bacteriol. **175**:879-886.
174. **Roncal, T., S. Cordobes, O. Sterner, y U. Ugalde.** 2002. Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. Eukaryotic Cell **1**:823-829.
175. **Roncal, T. y U. Ugalde.** 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. Research in Microbiology **154**:539-546.

-
176. **Rosen, S., J. H. Yu, y 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 J* **18**:5592-5600.
177. **Sagot, I., A. A. Rodal, J. Moseley, B. L. Goode, y D. Pellman.** 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**:626-631.
178. **Sagot, I., S. K. Klee, y D. Pellman.** 2002. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol* **4**:42-50.
179. **Saloheimo, M., M. Valkonen, y M. Penttila.** 2003. Activation mechanisms of the HAcI-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular Microbiology* **47**:1149-1161.
180. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
181. **Schjerling, P. y S. Holmberg.** 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucl.Acids Res.* **24**:4599-4607.
182. **Schneider, T. L. y A. Schepartz.** 2001. Hepatitis B Virus Protein pX Enhances the Monomer Assembly Pathway of bZIP.DNA Complexes. *Biochemistry* **40**:2835-2843.
183. **Seiler, S., F. E. Nargang, G. Steinberg, y M. Schliwa.** 1997. Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**:3025-3034.
184. **Seiler, S. y M. Plamann.** 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol.Biol.Cell* **14**:4352-4364.
185. **Seo, J. A., Y. Guan, y J. H. Yu.** 2003. Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**:1083-1093.

186. **Seo, J. A., K. H. Han, y 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.
187. **Seo, J. A., Y. Guan, y J. H. Yu.** 2006. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**:1535-1544.
188. **Serlupi-Crescenzi, O., M. B. Kurtz, y S. P. Champe.** 1983. Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **129**:3535-3544.
189. **Sewall, T. C., C. W. Mims, y W. E. Timberlake.** 1990. *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**:731-739.
190. **Sewall, T. C., C. W. Mims, y W. E. Timberlake.** 1990. Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Developmental Biology* **138**:499-508.
191. **Sharpless, K. E. y S. D. Harris.** 2002. Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol.Biol.Cell* **13**:469-479.
192. **Skromne I, Sanchez O, y Aguirre J.** 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology*. **141**:21-28.
193. **Small, A. J., R. B. Todd, M. C. Zanker, S. Delimitrou, M. J. Hynes, y M. A. Davis.** 2001. Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **265**:636-646.
194. **Small, A. J., M. J. Hynes, y M. A. Davis.** 1999. The TamA protein fused to a DNA-binding domain can recruit AreA, the major nitrogen regulatory protein, to activate gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **153**:95-105.
195. **Smith, D. B. y K. S. Johnson.** 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67** :31-40.

-
196. **Sohrmann, M. y M. Peter.** 2003. Polarizing without a C(1)ue. Trends in Cell Biology **13**:526-533.
197. **Sprote, P. y 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.
198. **Steinberg, G.** 2007a. Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. Trends in Microbiology **15**:14-21.
199. **Steinberg, G.** 2007b. Hyphal Growth: a Tale of Motors, Lipids, and the *Spitzenkörper*. Eukaryotic Cell **6**:351-360.
200. **Stevenson, B. J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J. R. Pringle, G. Ammerer, y G. F. Sprague.** 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. **9**:2949-2963.
201. **Stinnett, S. M., E. A. Espeso, L. Cobeno, L. Araujo-Bazan, y A. M. Calvo.** 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. Molecular Microbiology **63**:242-255.
202. **Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, y W. E. Timberlake.** 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. Genes Dev. 1991 Jul;5(7):1161-71 **5**:1161-1171.
203. **Stringer, M. A., y W. E. Timberlake.** 1995. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. Mol Microbiol **16**:33-44.
204. **Strittmatter, A. W., S. Irniger, y G. H. Braus.** 2001. Induction of *jlbA* mRNA synthesis for a putative bZIP protein of *Aspergillus nidulans* by amino acid starvation. Curr Genet. **39**:327-334.
205. **Suelmann, R., y R. Fischer.** 2000. Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Cell Motil.Cytoskeleton **45**:42-50.

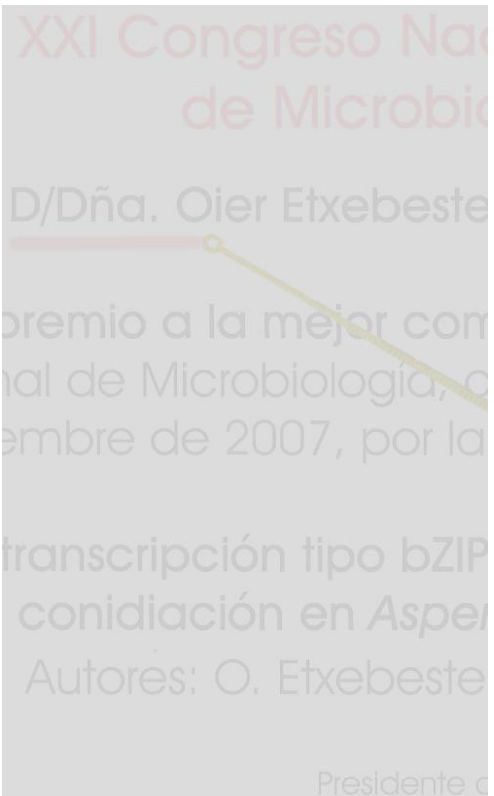
206. **Tamame, M., F. Antequera, J. R. Villanueva, y T. Santos.** 1983. High-frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene. *Mol.Cell.Biol.* **3**:2287-2297.
207. **Tanaka, A., M. Kato, T. Nagase, T. Kobayashi, y N. Tsukagoshi.** 2002. Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1576**:176-182.
208. **Thom, C. y K. B. Raper.** 1945. A manual of the *Aspergilli*.
209. **Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington, y R. W. Davies.** 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**:205-221.
210. **Timberlake, W. E.** 1990. Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annual Review of Genetics* **24**:5-36.
211. **Timberlake, W. E.** 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology* **78**:497-510.
212. **Toda, T., M. Shimanuki, Y. Saka, H. Yamano, Y. Adachi, M. Shirakawa, Y. Kyogoku, y M. Yanagida.** 1992. Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Mol.Cell.Biol.* **12**:5474-5484.
213. **Todd, R. B., J. A. Fraser, K. H. Wong, M. A. Davis, and M. J. Hynes.** 2005. Nuclear Accumulation of the GATA Factor AreA in Response to Complete Nitrogen Starvation by Regulation of Nuclear Export. *Eukaryotic Cell* **4**:1646-1653.
214. **Todd, R. B., M. A. Davis, y M. J. Hynes.** 2007a. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat.Protocols* **2**:811-821.

-
215. **Todd, R. B., M. A. Davis, y M. J. Hynes.** 2007b. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat.Protocols* **2**:822-830.
216. **Tsitsigiannis, D. I., T. M. Kowieski, R. Zarnowski, y N. P. Keller.** 2004. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **3**:1398-1411.
217. **Tsitsigiannis, D. I., R. Zarnowski, y N. P. Keller.** 2004. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J.Biol.Chem.* **279**:11344-11353.
218. **Tsitsigiannis, D. I., T. M. Kowieski, R. Zarnowski, y N. P. Keller.** 2005. Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**:1809-1821.
219. **Tsitsigiannis, D. I. y N. P. Keller.** 2007. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology* **15**:109-118.
220. **Upshall, A., T. Gilbert, G. Saari, P. P. J. O'Hara, P. Weglenski, B. Berse, K. Miller, y W. E. Timberlake.** 1986. Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **204**:349-354.
221. **Upshall, A. B., B. Giddings, y I. D. Mortimore.** 1977. The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J.Gen.Microbiol.* **100**:413-418.
222. **Vinson, C. R., P. B. Sigler, y S. L. McKnight.** 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**:911-916.
223. **Vinson, C. R., T. Hai, y S. M. Boyd.** 1993. Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev.* **7**:1047-1058.
224. **Vinson, C., A. Acharya, y E. J. Taparowsky.** 2006. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1759**:4-12.

225. **Virag, A. y S. D. Harris.** 2006a. The *Spitzenkörper*: a molecular perspective. *Mycological Research* **110**:4-13.
226. **Virag, A. y S. D. Harris.** 2006b. Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryotic Cell* **5**:881-895.
227. **Virbasius, C. M., S. Wagner, y M. R. Green.** 1999. A human nuclear-localized chaperone that regulates dimerization, DNA binding, and transcriptional activity of bZIP proteins. *Molecular Cell* **4**:219-228.
228. **Virginia, M., C. L. Appleyard, W. L. McPheat, y 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.
229. **Waring, R. B., G. S. May, y N. R. Morris.** 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene* **79**:119-130.
230. **Wessels, J. G. H.** 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology* **32**:413-437.
231. **Westfall, P. J. y M. Momany .** 2002. *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol.Biol.Cell* **13**:110-118.
232. **Wieser, J., B. N. Lee, J. 3rd Fondon, y T. H. Adams.** 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* **27**:62-69.
233. **Wieser, J., y T. H. Adams.** 1995. *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.* **9** :491-502.
234. **Wolkow, T. D., S. D. Harris, y J. E. Hamer.** 1996. Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J Cell Sci* **109** :2179-2188.

-
235. **Wong, K. H., M. J. Hynes, R. B. Todd, y M. A. Davis.** 2007. Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **66**:534-551.
236. **Wu, J. y B. L. Miller.** 1997. *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol.Cell.Biol.* **17**:6191-6201.
237. **Xiang, X. y M. Plamann.** 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **6**:628-633.
238. **Yager, L. N., H. O. Lee, D. L. Nagle, y J. E. Zimmerman.** 1998. Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**:1777-1786.
239. **Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies, C. P. C. De Souza, X. Dou, A. Perez-Balaguer, y 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.
240. **Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown, y J. L. Goldstein.** 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell* **6**:1355-1364.
241. **Yu, J. H., J. Wieser, y T. H. Adams.** 1996. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* **15**:5184-5190.
242. **Yu, J. H., Z. Hamari, K. H. Han, J. A. Seo, Y. Reyes-Dominguez, y C. Scazzocchio.** 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**:973-981.
243. **Yu, J. H., J. H. Mah, y J. A. Seo.** 2006. Growth and Developmental Control in the Model and Pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryotic Cell* **5**:1577-1584.
244. **Yu, J. H.** 2006. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **44**:145-154.

245. **Zarnack, K. y M. Feldbrügge.** 2007. mRNA trafficking in fungi. *Molecular Genetics and Genomics* **278**:347-359.
246. **Zheng, Y., A. Bender, y R. A. Cerione.** 1995. Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **270**:626-630.
247. **Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J. M. O'Brien, D. Botstein, y D. I. Johnson.** 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP- binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol.Biol.Cell* **4**:1307-1316.
248. **Zupicich, J., S. E. Brenner, y W. C. Skarnes.** 2001. Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. *Genome Biol* **2**:RESEARCH0050.



9-. Anexos

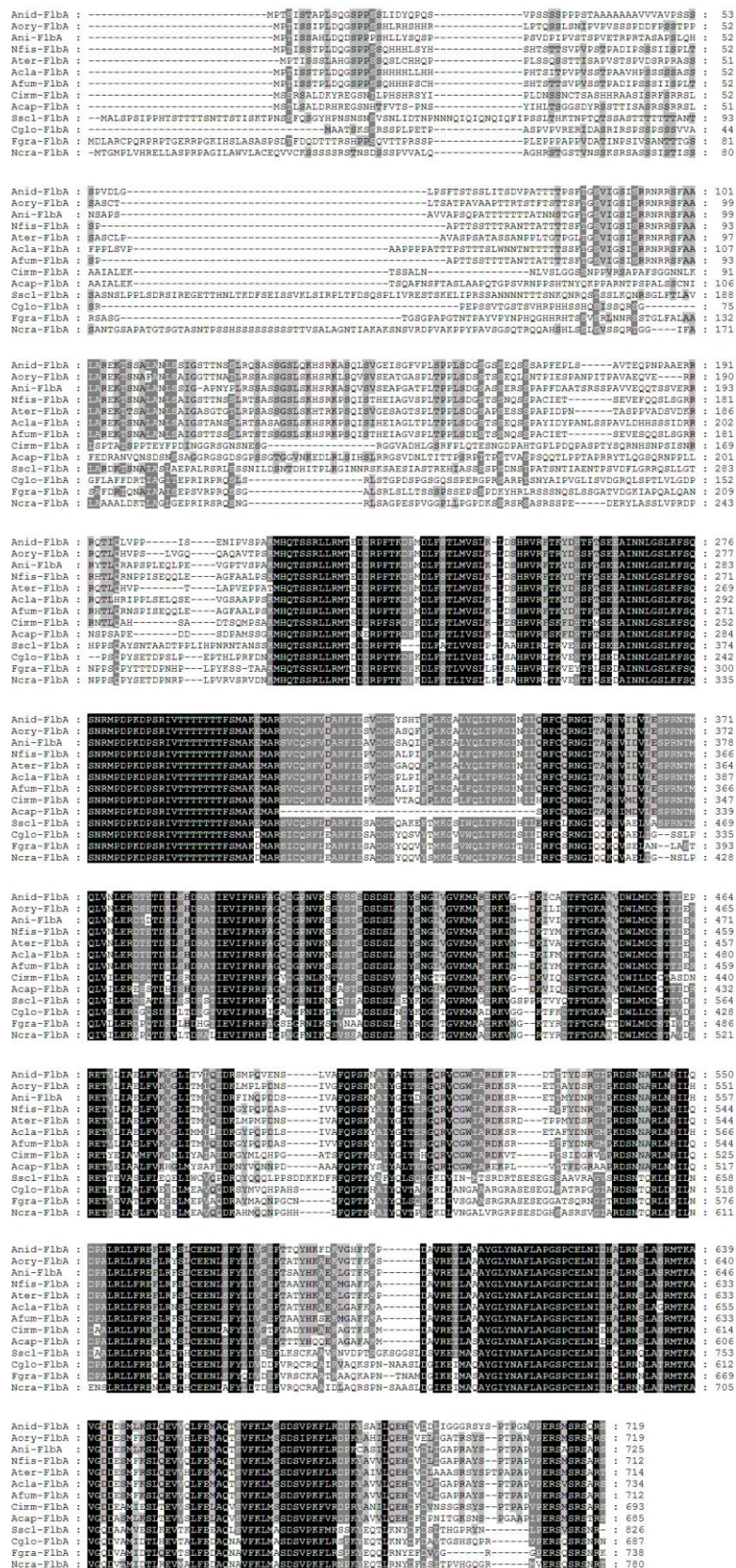


Figura A.1: Alineamiento de los posibles homólogos de F1bA. Nomenclatura: Anid: *A. nidulans*; Aory: *A. oryzae*; Ani: *A. niger*; Nfis: *N. fischeri*; Ater: *A. terreus*; Acla: *A. clavatus*; Afum: *A. fumigatus*; Cimm: *C. immitis*; Acap: *A. capsulatum*; Ssel: *S. sclerotium*; Cglo: *C. globosum*; Fgra: *F. graminearum*; Ncra: *N. crassa*.

Anid-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 87
 Aory-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Nfis-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Anig-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Afum-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Ater-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Acla-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 79
 Cirm-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Acap-FlbD : MAPTHRRGPWVEDEDQILLQLVREQCINN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 69
 Sscl-FlbD : MSSSHRRGPWSEAEEDSYLVQLVHTQCALN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Bfuc-FlbD : MSSSHRRGPWSEAEEDSYLVQLVHTQCALN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 86
 Pnod-FlbD : -MVAHRRGPWSEAEEDSYLVQLVHTQCALN--WVRIISCHMHYSPKQCRERFHQNLKPSLNREPISAEGLMIERMVNMCKRWAEIAR : 85

Anid-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--QSSINSSPHS-----RPHGRTEAPYHRASIGGTSPIFRSR---LPSVSY : 154
 Aory-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--PTSSSTHIS-----RPHGRTEAPYHRASVLSLSPTRSR---FTSIST : 152
 Nfis-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--SAATTSPS-----RPHGRTEAPYPRASTALSPBINRPR---FSLSH : 150
 Anig-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--PTSSSPHAG-----RPHGRTEAPYHRASLSMSPISGR---YSSISN : 152
 Afum-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--SAATTSPS-----RPHGRTEAPYPRASTALSPIDRPR---FSLSH : 150
 Ater-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--PASTSTSTSSPS-----RPHGRTEAPYHRASLSLSPTRSR---RFSISH : 155
 Acla-FlbD : ---RSDNAVKNWNGSMNRKRRG--SVSAASPS-----RPHGRTEAPYPRASMLSPPSRSG---YSISH : 139
 Cirm-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--APTREPAS-----RPHGRTEAPYPRASVSPFRQAQLRDGQAPWLLT : 154
 Acap-FlbD : RIGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--AIQARERLSPSS-----RPHGRTEAPYPRASVSPFRQAQLRDGQAPWLLT : 141
 Sscl-FlbD : RIQGRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--LRRRTSSSHSHSFNEQS-----ETLSFARPAHSYSHLTSRQID--FSSRIHGSLSFSPSV : 164
 Bfuc-FlbD : RIQGRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--LRRRTSSSHSHSFNEQS-----ETLSFARPAHSYSHLTSRQID--FSSRIHGSLSFSPSV : 164
 Pnod-FlbD : RIQGRSDNAVKNWNGSMNRKRRG--LRRRTSSSHSHSFNEQS-----ETLSFARPAHSYSHLTSRQID--FSSRIHGSLSFSPSV : 172

Anid-FlbD : DRE-----YTSWTSRSPSSRRRESFSTASTFSCQLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 204
 Aory-FlbD : DRE-----RSDSTSTSLDGPRLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 196
 Nfis-FlbD : DRE-----LTSWTN--SSIQTRRESAAVSDCPRCLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 199
 Anig-FlbD : DRE-----LTSWTK--SPSSRRDSFSAASIDCPRCLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 201
 Afum-FlbD : NRE-----LTSWTN--SSIQTRRESAAVSDCPRCLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 199
 Ater-FlbD : DRE-----LTAWTTKSSSRDRDSCSTASVSDGPRCLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 205
 Acla-FlbD : DRE-----LTSWTD--SPIEARRD--SSAGCSRCLTEIYTLPAUNRPVEAPLTSF--- : 186
 Cirm-FlbD : DCE-----QSARASYIREDWERERSSVVAHHRSLPFLTPDSS--SHIEPLTSF--- : 203
 Acap-FlbD : QKESWVSSPQRGQQQLSVRLQYHADPRERRGPHSFTPEYGYGSLQLEWSRPEVDHRSPTSRQRLSEIVTVYMPFMHTEGAMFSS--- : 226
 Sscl-FlbD : SEAS-----RAESLDGAPSLISDTCNFSISPRVASSSLELPLTS--FNRLDARRP--- : 214
 Bfuc-FlbD : SEAS-----RAESLDGAPSLISDTCNFSISPRVASSSLELPLTS--SSFDRLNSRRP--- : 215
 Pnod-FlbD : FEYYPGSRPQ-----PLDMSAFSHPASAARAGFETPMPSPSPGYS--IVSADGAE--ITDTGESRSEIRGI : 235

Anid-FlbD : -----AFSDTSNAPSLDEPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDMRQQYGFRRQSTSDDIYAYH---- : 274
 Aory-FlbD : -----AYSEASHTPSLEPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDTRQQYGFRRQSSLLDDVYIWSSSKKS : 264
 Nfis-FlbD : -----AFSDVS-----PMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDLRRQSHGSDGYVSHHTYSSLKIMEP : 261
 Anig-FlbD : -----AFSEAS---SMEPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDMRQQYGFRRQSTSDDIYAYH---- : 261
 Afum-FlbD : -----SFSVDS-----PMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDLRRQSHGSDGYVSHHTYSSLKIMEP : 261
 Ater-FlbD : -----AFSDAS---NLEPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDTRQQYGFRRQSSDDIYVASASYP- : 269
 Acla-FlbD : -----TYSASRAPSLGSPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--GDFRRQSQGLEDDVYVYV--HPYARKLVLEP : 253
 Cirm-FlbD : -----CYSSEVSTRTSAGPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VDIHPSDYDERRRGSAPVVGETSQNHAY : 271
 Acap-FlbD : -----TTSERSHSTAGPMSVSDHNSVSSASE-----RTVASEFQLLPL--VEILPGQDLRRRGSAPTLSQSPSSAGLD : 294
 Sscl-FlbD : -----SLPQLGFRSNTCTYATEFEAQSCHSEPERESYYTHMHSKSTIKSECHNRG--SVANTSVNYPHRRRPEQYPCSLPLPSPRP : 295
 Bfuc-FlbD : -----SLPQLGFRSNTCTYATEFEAQSCHSEPERESYYTHMHSKSTIKSECHNRG--SVANTSVNYPHRRRPEQYPCSLPLPSPRP : 296
 Pnod-FlbD : ASPLDITLAPLVGNRDERKHSSTRYLPAATGFAPEDDSYSPSHFDSYR--RRTSFCPLPPLHRSEAPAPARSALQEPGYERPERPQLLTQP : 322

Anid-FlbD : -----SGLFSDPKPRWAPEQRPCWAS-----EKEVPRRDSRMCDNLLN : 314
 Aory-FlbD : D-----NFADLPFKPRWSDNQPSQHSSTLSQTWLVAPES--HPEAPKAESPRDSRMCDNLLN : 323
 Nfis-FlbD : -----FSDVASKPRWVDPDRHREWSHPTASLTPAWATP----EPCRSEQPDRDSRMCDNLLN : 314
 Anig-FlbD : -----DLSLKQRWISDHQWQWQHSF-----LSPTWS--APIEDKTEAPDRDSRMCDNLLN : 309
 Afum-FlbD : -----FSDVASKPRWVDPDRHREWSHPTASLTPAWATP----EPCRSEQPDRDSRMCDNLLN : 314
 Ater-FlbD : -----APKPLEPLADPSPSRWMAEAPSWSHPAYAQPWIEESRPEIKAESTRDSRMCDNLLN : 326
 Acla-FlbD : -----FSDAASKPRWVDPDRHREWSHPTASLTPAWATP----EPCRSEQPDRDSRMCDNLLN : 304
 Cirm-FlbD : SSIAGAK-----SMEILAGSSPIRDWRSSTSDPHHHPHNPVPAYQHRPQSVDPDKTHSINTQDRDSRMCDNLLN : 343
 Acap-FlbD : ESYYSKNIIECFPEPAVLRQWGFIDSTVHSHSHEPHRHQHWKHEHNSAPHNQFTPALGSRQAPSPPPDRDSRMCDNLLN : 375
 Sscl-FlbD : HHQN-----EYIIS--ERAQQTFRSAAQLTAPPSPQHIQLAPIRISPLNTCSVEAKERDRMSCTNLL : 360
 Bfuc-FlbD : HHQN-----EYIIS--ERAQQTFRSAAQLTAPPSPQHIQLAPIRISPLNTCSVEAKERDRMSCTNLL : 362
 Pnod-FlbD : ATQLVHHHSLPLSAPLSVQQRALPAFHSLAEPTLSTSSSATSPSARQLPSPYARPALPSDIKTAAPVSEPKMKNKNTM- : 402

Figura A.3: Alineamiento de los posibles homólogos de FlbD. Nomenclatura: Anid: A. nidulans; Aory: A. oryzae; Nfis: N. fischeri; Anig: A. niger; Afum: A. fumigatus; Ater: A. terreus; Acla: A clavatus; Cimm: C. immitis; Acap: A. capsulatum; Sscl: S. sclerotium; Bfuc: B. fuckeliana; Pnod: P. nodorum.

Basic-Zipper-Type Transcription Factor FlbB Controls Asexual Development in *Aspergillus nidulans*[†]

Oier Etxebeste,¹ Min Ni,³ Aitor Garzia,¹ Nak-Jung Kwon,³ Reinhard Fischer,⁴ Jae-Hyuk Yu,³ Eduardo A. Espeso,² and Unai Ugalde^{1*}

Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, San Sebastian 20018, San Sebastian, Spain¹; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maezú 9, 28040 Madrid, Spain²; Departments of Bacteriology and Genetics, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706³; and Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Microbiology, University of Karlsruhe, Hertzstrasse 16, Karlsruhe, D-76187 Germany⁴

Received 14 June 2007/Accepted 30 October 2007

The fungal colony is a complex multicellular unit consisting of various cell types and functions. Asexual spore formation (conidiation) is integrated through sensory and regulatory elements into the general morphogenetic plan, in which the activation of the transcription factor BrlA is the first determining step. A number of early regulatory elements acting upstream of BrlA (*fluG* and *flbA-E*) have been identified, but their functional relations remain to be further investigated. In this report we describe FlbB as a putative basic-zipper-type transcription factor restricted to filamentous fungi. FlbB accumulates at the hyphal apex during early vegetative growth but is later found in apical nuclei, suggesting that an activating modification triggers nuclear import. Moreover, proper temporal and quantitative expression of FlbB is a prerequisite for *brlA* transcription, and misscheduled overexpression inhibits conidiation. We also present evidence that FlbB activation results in the production of a second diffusible signal, acting downstream from the *FluG* factor, to induce conidiation.

The mycelium is a very successful colony form capable of displaying different cell types and functions, and this attribute has led to the realization that it is governed by a complex chemosensitive system (43). The production of asexual spores is an integral part of the mycelial colony plan and the principal means of dispersal among the filamentous fungi (23, 55). *Aspergillus nidulans* is a homothallic ascomycete which has been used as a model system for molecular genetic studies due to its versatile life cycle, its amenability to genetic manipulation, and the open availability of its genome sequence (13, 24). It is also a reference for basic studies in fungal morphogenesis (12).

After the germination of a spore, an initial period of vegetative growth ensues, consisting of apical extension of the hyphae. Any of a number of suitable environmental stimuli (emergence to the atmosphere, osmotic and nutrient stress) provokes the halting of hyphal extension and subsequent formation of asexual spore-bearing structures called conidiophores (2, 6). Molecular analysis of this process has revealed that stimuli are sensed and transduced as intracellular signals that converge in the transcriptional activation of *brlA*, which encodes a C₂H₂ zinc finger transcription factor. This first common step also marks the start of an irreversible central developmental cascade of downstream regulators leading to sporogenesis (1, 10).

Among the various possible upstream regulatory branches responding to the above-mentioned stimuli, the principal one, involving air exposure, starts with the biosynthesis of an unidentified low-molecular-weight diffusible *FluG* factor (21). The *FluG* signal is proposed to inactivate a repressor of conidiation (*SfgA*) that negatively regulates a number of development-specific functions required to activate *brlA* (35). It has been proposed that such *FluG*-mediated derepression leads to the activation of other *Flb* (fluffy low *brlA* expression) components: *FlbA*, a protein which inhibits vegetative growth signaling mediated by *G α* (*FadA*) (22, 51, 54), and potential transcription factors (TFs) *FlbD*, *FlbB* and *FlbC* (48, 2, 49). Simultaneous inhibition of vegetative signaling and activation of *Flb* TFs are required for the conidiation program to progress. However, detailed functional characterization of *FlbB* and *FlbC* remains to be done.

In this report, we present the identification and characterization of *flbB* (first described as *vegA* [4]) and demonstrate that *FlbB* is a potential transcriptional activator with a basic leucine zipper (bZIP) (44) and other conserved domains. The deletion of *flbB* results in the blockage of the synthesis of an extracellular signaling compound required for conidiation. The expression pattern of *flbB* shows elevated mRNA steady-state levels during the early phases of vegetative growth, which fall with the initiation of asexual development and remain low or undetectable during sexual development. *FlbB* initially localizes at the hyphal tip and then relocates to the nuclei proximal to the cell apex during vegetative growth. The complex regulatory roles played by *FlbB* in *brlA* transcriptional activation and developmental progression are further discussed.

* Corresponding author. Mailing address: University of The Basque Country, Biochemistry II, Manuel de Lardizabal 3, 20018, San Sebastian, Spain. Phone: 0034 943018180. Fax: 0034 943015270. E-mail: opegmau@ehu.es

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://ec.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 9 November 2007.

TABLE 1. *Aspergillus nidulans* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
FGSCA4	Wild type (veA ⁺)	31
FGSC26	biA1 veA1	17
FGSCA68	suA1 adE20 yA2 adE20 acrA1 pheA2 pyroA4 hysB5 sB3 nicB8 riboB2 veA1	17
FGSCA283	suA1 adE20 yA2 adE20 acrA1 galA1 pyroA4 (usb ⁺) facA303 sB3 nicB8 riboB2 veA1	Fungal Genetics Stock Center
FGSC33	biA1 pyroA4	Fungal Genetics Stock Center
FGSC773	pyrG89 wa3 pyroA4	Fungal Genetics Stock Center
TTA127.4	pabaA1 yA2 ΔfluG:arpC veA1	21
RMS011	pabaA1 yA2 ΔargB:arpCΔB trpC801 veA1	39
GR5	pyrG89 wa3 pyroA4 veA1	46
MAD782	pyrG89 pabaA1 biA1 yA2 veA1	Eduardo Espeso (CIB-CSIC, Madrid, Spain)
TN02A3	pyrG89 ΔnkuA::argB argB2 pyroA4 veA1	27
TN02A21	ΔnkuA::argB argB2 pyroA4 riboB2 veA1	27
TN02A25	pyrG89 pabaB22 ΔnkuA::argB argB2 riboB2 veA1	27
BD14 (fbb100f)	biA1 fbb100 veA1	This study
BD12 (fbb101f)	biA1 fbb101 veA1	This study
BD11 (fbb102f)	biA1 fbb102 veA1	This study
BD109	pyrG89 pabaA1 yA2 argB2 fbb101 veA1	This study
BD143	pyrG89 ΔnkuA::argB argB2 ΔfbbB::pyrG pyroA4 veA1	This study
BD164	pyrG89 pabaA1 argB2 ΔfbbB::pyrG pyroA4	This study
BD167	pyrG89 ΔnkuA::argB argB2 fbbB::gfp/pyrG pyroA4 veA1	This study
BD183	pyrG89 ΔnkuA::argB argB2 gfp::fbbB pyroA4 veA1	This study
TN116.2	biA1 alc4(p)::fbbB::pyroA ⁺	This study
RNI24.5	biA1 alc4(p)::fbbB::pyroA ⁺	This study
TNI22.1	biA1 pJW53::pyroA ⁺	This study
TJW113	biA1 methG1 ΔfbbB::argB ⁺	18

MATERIALS AND METHODS

Strains, oligonucleotides, media, and culture conditions. The strains of *A. nidulans* employed in this study are listed in Table 1. Plasmids were amplified in *Escherichia coli* strain DH5α or DH1 grown in Luria-Bertani medium with ampicillin (75 μg ml⁻¹). Purification was carried out using GenElute plasmid miniprep or maxprep kits (Sigma). Oligonucleotides used in this study are listed in Table 2.

The strains were cultivated in minimal medium (MMA [17]) or complete medium (MMA plus 5 g liter⁻¹ yeast extract) that was adequately supplemented in case of auxotrophy. Nutrient depletion experiments in solid medium involved dilution of glucose or sodium nitrate to one-fifth of the original concentration. Salt stress experiments involved the addition of KCl (0.6 M) and MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, 0.05 M). Experiments in liquid medium with nutrient limitation were conducted as described by Skromne et al. (37). Briefly, strains were cultivated for 18 h, at 37°C and 250 rpm, and then transferred to minimal medium with KCl and MES, with or without glucose or sodium nitrate. The morphology of the mycelium was examined after 10 and 20 h of culture.

Extracellular complementation experiments were conducted by point inoculation of two strains onto the solid medium at a distance of 2 cm in the same petri dish. After 3, 4, and 5 days of cultivation, the contact zone was examined and photographed under a binocular microscope.

Time course experiments for the induction of development were conducted essentially as described previously (3, 20). After 18 h of culture in liquid MMA as described above, mycelium was filtered onto nitrocellulose membranes (0.45 μm; MicronSep; GE Water and Process Technologies), placed on solid medium, and cultured for 0, 6, 12, 24, and 48 h before being processed for Northern blot analysis.

The intracellular localization of FhbB was analyzed by inoculating 40 μl of a conidiospore suspension onto a coverslip submerged in a petri dish containing adequately supplemented liquid minimal medium. After incubation at room temperature for 16, 24, and 36 h, samples were fixed with 4% (w/vol) p-formaldehyde in phosphate-buffered saline for 16 h at 4°C, washed three times with phosphate-buffered saline, and stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (essentially as described in references 7, 30, and 38). The coverslip was inverted onto a slide, and FhbB and nucleus localizations were observed by fluorescence microscopy.

Fluorescein staining experiments for confirmation of autolysis in liquid starvation cultures were performed as described by Roaical et al. (33).

Cloning of *fbbB*. The gene library contained in the self-replicating plasmid pRG3-AMA-Nod (20) was amplified using competent *E. coli* DH5α library efficiency cells (Invitrogen). Preparation and transformation of protoplasts were carried out as previously reported (41) with the following adaptations: after 20 to 24 h of culture at 37°C, in order to avoid conidiation induced by osmotic stress, the protoplast regeneration cultures (MMA plus 1 M sucrose) were overlaid with 7 ml of complete medium. The cultures were then incubated for 24 h. Conidating colonies which emerged through the overlay were selected as positive transformants, and plasmids were isolated and amplified for sequencing. Inserts were amplified using oligonucleotides pRG3up and pRG3down. In order to localize and define the three mutations, genomic DNA was extracted from the three aconidial mutants and FGSC26. Each *fbbB* open reading frame (ORF) was amplified using oligonucleotides 7542-1, 7542-2, and 7542-3 and sequenced.

Genetic techniques and extraction and manipulation of DNA. Meiotic crosses were performed according to Pontecorvo et al. (32). DNA extractions were carried out from 24-h liquid-culture-grown mycelium that had been filtered, washed, and lyophilized. The extraction process involved a GenElute plant genomic DNA extraction kit (Sigma), with the addition of 50 units of RNase (Sigma). Southern blot analyses were carried out using a digoxigenin High Prime II DNA labeling and detection starter kit (Roche). The cDNA sequence of *fbbB* was PCR amplified using specific primers and a cloned *avian myeloblastosis virus* first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen). A 24-h wild-type total RNA sample was used as the template.

RNA isolation and analysis. A mycelium sample (100 mg [dry weight]) was frozen in liquid nitrogen, and 1 ml of TRIzol reagent (Fluka) was added. RNA extraction from these samples was performed according to the Invitrogen protocol for RNA extraction using the TRIzol reagent. RNA concentrations were calculated with a Qubit assay system (Invitrogen). Northern blot analysis of RNA was carried out with a digoxigenin Northern blot starter kit (Roche).

Fusion PCR. The DNA constructions for the generation of null mutants as well as green fluorescent protein (GFP) tagging were conducted as described by Yang et al. (50), using the Triplemaster PCR system (Eppendorf). Null mutants were generated using a modified version of the protocol of Yang et al. (50), by constructing a DNA fragment of 5.1 kb with 5' and 3' regions of *fbbB* flanking the auxotrophic marker *pyrG* of *Aspergillus fumigatus*. GFP tagging at the C-terminal region of FhbB was done as described by Yang et al. (50). In the case of N-terminal tagging, the GFP coding sequence was added behind the start codon using the overlapping PCR technique, and no marker was included. In this latter

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	Target or purpose
pRG3up	GAA TTC GAG CTC GGT ACC	Sequencing pRG3 insert flanking regions
pRG3 down	AAG CTT GCA TGC GCG GCC	Sequencing pRG3 insert flanking regions
AN7542-1	GGT GAG GGT AGA AAG GG	<i>fibB</i> sequencing
AN7542-2	GAC AGG GTG ATT CCA GC	<i>fibB</i> sequencing
AN7542-3	GGG TTT TTC TGA CGT CG	<i>fibB</i> sequencing
fibB-GSP1	CCT CTT GTG GAT GCA CTC TGG AAT GTG GGC	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i>
fibB-GSP1*	CGT TGA ACG ATT GTC GCA CAG TCG C	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i>
fibB-GSP2	TGA ATA CAT CGT CTC ATC AGC ATG CCG GGT	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i>
fibB-GSP3	TGA CCT GAC AGC TCG CTT TTT TTC TGA GCT TTC TAA TGC	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i> and $\Delta fibB$
fibB-GSP4	GAA AGG TGC GTG GGT TCG AAT CCC ACC	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i> , <i>gfp::fibB</i> and $\Delta fibB$
fibB-PP1	GTT TTC TGG TCC TCG GTC AAC CGG TGG	Obtaining <i>gfp::fibB</i> and $\Delta fibB$
fibB-PP2	CAT GGT GGT CGA GCT GTG AAT AGC GGA GAA	Obtaining <i>gfp::fibB</i> and $\Delta fibB$
fibB-GFP1	TCC CGG CAT GCT GAT GAG ACG ATG TAT TCA GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i>
fibB-GFP2	GCA TTA GAA AGC TCA GAA AAA AAG CGA GCT GTC AGG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Obtaining <i>fibB::gfp::pyrG</i> and $\Delta fibB$
fibB-SMP1	TTC TCC GCT ATT CAC AGC TCG ACC ACC ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Obtaining $\Delta fibB$
fibB-gfpSP	TTC TCC GCT ATT CAC AGC TCG ACC ACC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTCCT GGA GTT	Obtaining <i>gfp::fibB</i>
fibB-gfpFP	GTT CAG ATC CAA GGG TAT TGG CCT ACT ACT GAT CGA AGT CAT TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TGT	Obtaining <i>gfp::fibB</i>
fibB-geneSP	ATG ACT TCG ATC AGT AGT AGG CCA ATA CCC TTG GAT CTG AAC	Obtaining <i>gfp::fibB</i>
OJA141	CCG TTC TGC TTA GGG TA	5' end of <i>alc4(p)</i>
OJA106	TTT GAG GCG AGG TGA TAG GAT TGG A	3' end of <i>alc4(p)</i>
OJA108	CG GGA TCC AGT GGT TCG GTA ATC	<i>alc4(p)</i> 5' nested with BamHI tail
OMN233	TCC AAT CCT ATC ACC TCG CCT CAA A ATG ACT TCG ATC AGT AGG C	<i>fibB</i> overexpression 5' with complementary <i>alc4(p)</i> tail
OMN212	GTT AAC TAG TGG CAG TGC AAC C	<i>fibB</i> overexpression 3' amplification
OMN234	CG GGATCC GCT CGA TAA GGA GTG AG	<i>fibB</i> overexpression construct 3' nested with BamHI
OJA142	CTG GCA GGT GAA CAA GTC	Forward primer for <i>bfd4</i> probe
OJA143	AGA AGT TAA CAC CGT AGA	Reverse primer for <i>bfd4</i> probe
OMN213	TGA TCT GTC CAT AGA ACA TCG C	Forward primer for <i>fibB</i> probe
OMN227	CGA GCT GTC AGG TCA TGA ATA C	Reverse primer for <i>fibB</i> probe
ONK20	ATA TGA ATT CAT GAC TTC GAT CAG TAG TAGG	FibB forward for TF activity test
ONK21	ATA TGT CGA CTC ATG AAT ACA TCG TCT CAT C	FibB forward for TF activity test
ONK68	ATA TGA ATT CAT GGG ATC GGG ATT CCA CTC CAG	FibB-C forward for TF activity test
ONK69	ATA TGT CGA CTC CCA TCT GTC GCT CGG CTC TG	FibB-N forward for TF activity test

case, selection of transformants was conducted using 2 mg/ml fluorometric acid in an *fibB*-null strain, selecting for gene replacement by the *A. nidulans pyrG* gene, which replaced the *fibB* coding sequence.

Construction of *alc4(p)::fibB* strain. The *alc4(p)::fibB* construct was created as described previously (53) and cloned into the BamHI site of pJW53 (J. W. Bok and N. P. Keller, unpublished data) to generate pNI41. pNI41 was transformed into FGSC33 to yield strain TN116.2. TN116.2 was crossed with FGSC773 to produce strain RND45. pJW53 was introduced into FGSC33 to give rise to the control strain TN121.1.

Yeast strains and plasmids for the transactivation assay. The *Saccharomyces cerevisiae* reporter strain L40 [MAT α *his3-D200* *trp1-901* *lexA2-3,112* *ade2* *LYS::LexAop4-HIS3* *URA3::LexAop3-LacZ*] was obtained from Invitrogen. L40 was grown in synthetic dropout minimal medium (36) with various supplements. The medium composition (per liter) is as follows: 20 g glucose, 6.7 g of yeast nitrogen base (MP Biomedicals), 50 ml of 20 \times dropout solution (300 mg L-histidine, 1,500 mg L-valine, 500 mg L-phenylalanine, 300 mg L-arginine, 300 mg L-tyrosine, 300 mg L-threonine, 300 mg L-lysine, 200 mg L-methionine, and 500 mg L-adenine hemisulfate salt) with or without 10 ml of 100 \times nutrient solution (10 g leucine, 2 g tryptophan, and 2 g histidine per liter). The plasmid pLexA (11) (kindly provided by Suh-Kee Chae at Pochon University, Daejeon, Korea) carrying the LexA DNA binding domain (8) was generated by the modification of pEYbLex/Zeo (Invitrogen) by inserting the TRP1 marker (obtained from pGTY; Clontech).

Construction and transformation for testing FibB transactivation activity. The cDNA-derived full-length FibB (amino acids [aa] 1 to 426) and N-terminal (aa 1 to 177) and C-terminal (aa 166 to 426) regions of FibB were PCR amplified

using the primer pairs ONK20-ONK21, ONK20-ONK69, and ONK68-ONK21, respectively, from an *A. nidulans* cDNA library provided by Kwang-Yeop Jahng (Chonbuk University, Jeonju, Korea). Individual amplicons were digested with EcoRI and SalI and cloned into pLexA, resulting in pNJ01, pNJ02, and pNJ03, respectively. Individual plasmids were then introduced into L40. Lithium acetate-polyethylene glycol-mediated yeast transformation (16) was carried out, and transformants were selected on synthetic dropout medium without tryptophan and uracil. To test FibB transactivation activity, the transformants were inoculated on medium containing 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) or X-Gal (β -bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; 40 μ g/ml), and their growth and colony color were examined. To further confirm transactivation, more than five transformants of each plasmid were tested for β -galactosidase activity using a yeast β -galactosidase assay kit (Pierce). Results are expressed as means and standard deviations (see Fig. 7).

Light and fluorescence microscopy. Liquid cultures were examined with a Nikon Optiphot microscope in bright-field or fluorescence mode. Images were recorded with a Nikon FX-35DX camera attached to the microscope. Direct examination of solid cultures was performed with a Nikon SMZ800 binocular microscope, attached to the above-mentioned camera.

GFP-labeled FibB images were taken with an Eclipse E-600 Nikon microscope, equipped with a 60 \times Apo 1.4 numerical aperture oil immersion objective (Nikon), a 100-W mercury lamp, and B2-A (excitation, 495 nm; emission, 530 nm) and UV-2A (360 to 460 nm) filters (Nikon) for GFP and DAPI detection, respectively (7, 30, 38). Images were recorded with an ORCA-ER digital camera (Hamamatsu Photonics) coupled with WinAxi (Hamamatsu Photonics) and Metamorph (Universal Image) image analysis programs.

TABLE 3. Mutations characterized in this study

Allele	DNA change(s)	Mutant protein ^a	Change(s) in protein ^b
<i>fibB100</i>	G456A	aa 1-426	G70R
<i>fibB101</i>	G1143A	aa 1-267 + YVLR	L267 fs
<i>fibB102</i>	C1255T, Δ1257	aa 1-304 + L-35	P305L, P306 fs

^a YVLR and L-35 are residues added out of frame.

^b fs, frameshift followed by early termination.

Sequence accession numbers. Nucleotide and corresponding amino acid sequences for *fibB* were deposited in the EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/EMBL/Submission/web/in.html>) under accession number AM494477.

RESULTS

Three aconidial mutants define distinct *fibB* mutant alleles. Via chemical (nitrosoguanidine) or UV mutagenesis followed by visual screening of more than 64,000 survivors, we isolated three nonsporulating (fluffy) mutants. Conidiation of these mutant strains (BD11, BD12, and BD14) could be induced by growing them in contact with a conidiating strain. In turn, these mutant strains induced conidiation of fluffy nonconidial *fluG* mutant strains. The extracellular complementation of the *fluG*⁻ strains, in which the corresponding diffusible FluG factor is absent, suggested that the mutations were not within the *fluG* gene.

Meiotic crosses and diploid analyses revealed that these three mutations were recessive and allelic and mapped to chromosome IV (results not shown). The recessive nature of the mutations allowed us to use an autoreplicative plasmid (pRG3/AMA/NctI)-based genomic DNA library (29). We constructed strain BD109 (Table 1), carrying the *pyrG89* mutation from strain BD12, and used it for complementation-based gene cloning. All the plasmids isolated from conidiating (complemented) transformants contained inserts including the AN7542.3 gene (Broad Institute; <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus>).

Subsequent genomic DNA sequence comparisons of the AN7542.3 region from the three mutants and a wild-type strain confirmed that the aconidial phenotype was caused by mutations in this gene (Table 3). The prediction for the coding region of AN7542.3 showed coincidence with preliminary cDNA data corresponding to *fibB* (*-veg4*), a gene implicated in the control of asexual conidiation, which had been partially characterized (4, 47). We amplified the cDNA of *fibB*, using specific primers, and confirmed previous data on gene structure (Fig. 1A). Accordingly, these mutant alleles are designated *fibB100*, *fibB101*, and *fibB102*. *FibB100* carries a single substitution, yielding G70R; *fibB101* is predicted to have a mRNA splicing defect resulting in an *FibB101* protein truncated at amino acid 267 with a short (four-residue) out-of-frame tail. *FibB102* has the change P305L, prior to a frameshift adding 36 residues out of phase before a stop codon (Table 3 and Fig. 1B).

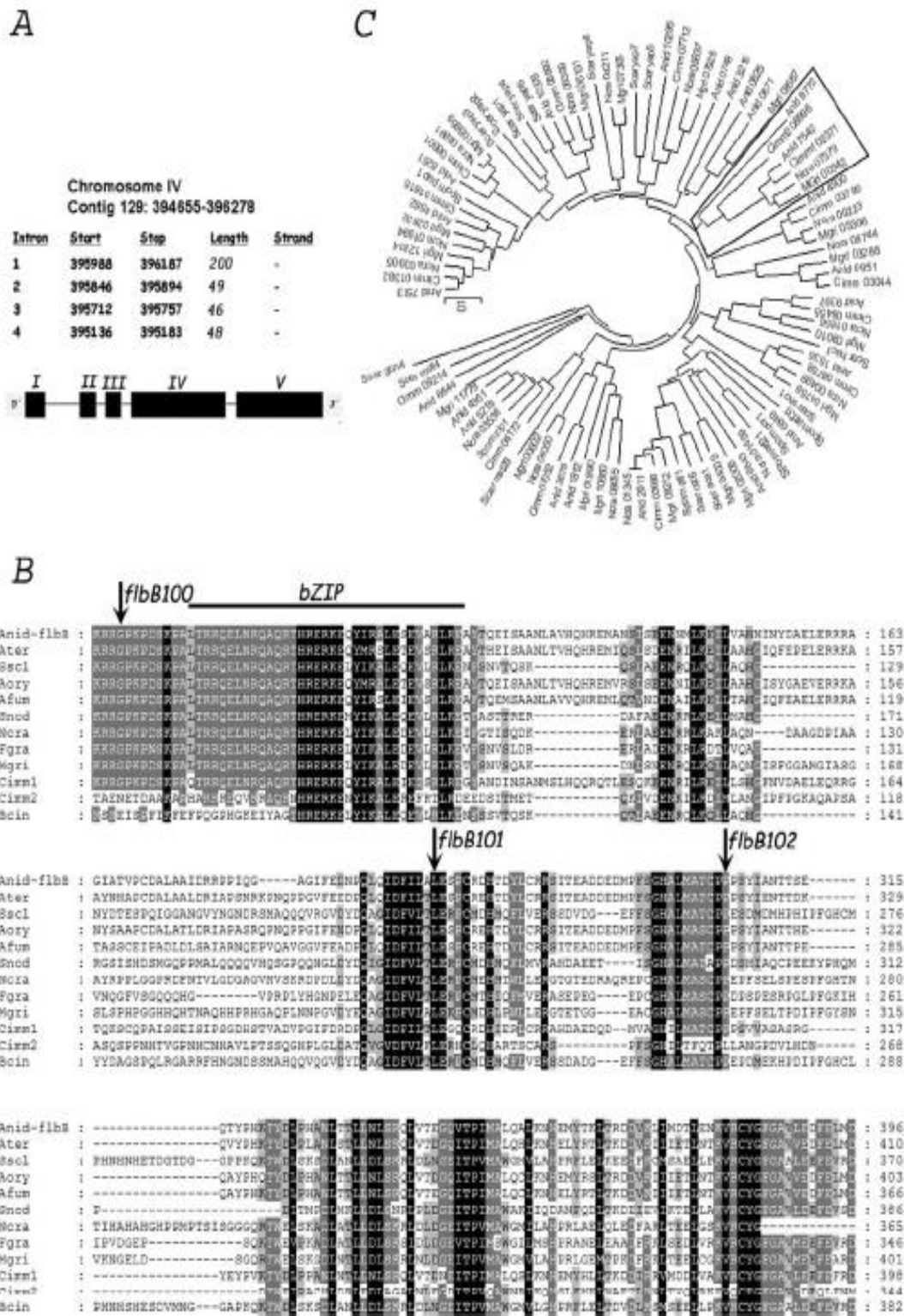
fibB encodes a bZIP-type transcription factor. The ORF of AN7542.3 consists of 1,624 bp (1,281 bp in the coding sequence), comprising five exons and four introns. Introns 2, 3, and 4 are of the usual sizes, 49 bp, 46 bp, and 48 bp, respectively, while intron 1 is much larger, 200 bp (Fig. 1A). The predicted *FibB* protein is 426 amino acids in length with a

predicted mass of 46.8 kDa and an isoelectric point of 5.98. Pfam database searches pointed to the presence of a bZIP-type DNA binding domain only between residues 79 and 113 (Pfam accession number PF00170) (Fig. 1B).

Protein database searches showed the existence of putative homologues in other *Aspergillus* species, such as *A. terreus*, *A. fumigatus*, and *A. oryzae*, as well as other filamentous fungi, such as *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum*, *Neurospora crassa*, *Botrytis cinerea*, *Coccidioides immitis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Stagonospora nodorum* (Fig. 1B). Bcin and Cimm2 homologues have less similarity with respect to *FibB* in the region before the bZIP than in the conserved regions of the C-terminal half (Fig. 1B). Thus, it is possible to differentiate a group of *FibB* homologues showing poor sequence conservation in this region. On the other hand, we could not detect similar genes in yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Schizosaccharomyces pombe*, or higher eukaryotes, such as *Homo sapiens* and *Arabidopsis thaliana*, indicating a restricted phylogenetic distribution of *FibB* homologues. To further explore this idea, we searched for all putative bZIP-containing proteins in the genomes of different filamentous fungi (*A. nidulans*, *C. immitis*, *M. grisea*, and *N. crassa*) and yeasts (*S. cerevisiae* and *S. pombe*). We found 23 proteins in *A. nidulans*, and functions have been described for the following ones: AN1812.3/*JibA* (40), AN2911.3/*AtfA* (5), AN3675.3/*CpcA* (15), AN4361.3/*MetR* (26), AN4900.3/*MeaB* (31), AN8251.3/*HapX* (41), and AN9397.3/*Hact* (34). The derived phylogenetic tree shows that the *FibB* bZIP belongs to a branch where yeasts are excluded (Fig. 1C). Our *in silico* analyses strongly suggest a highly specialized filamentous fungal function for at least *FibB* and probably for other bZIP-containing proteins, such as AN4900.3/*MeaB* and AN0951.3.

Phenotypic analysis of *fibB* mutants. To further analyze the phenotypes of the isolated mutations, we constructed an *fibB*-null strain by gene replacement using the *A. fumigatus pyrG* gene (see Fig. S1 in the supplemental material). Strains carrying mutant and null alleles of *fibB* were further analyzed in parallel. Surface cultures (Fig. 2) of the strains carrying the different *fibB* mutant alleles yielded the aconidial phenotype in solid MMA. We then investigated whether carbon or nitrogen starvation or salt stress might have a suppressing effect on the aconidial phenotype displayed by the *fibB* mutant alleles (Fig. 2), as it was previously shown to promote conidiation in the wild type (2, 37). A reduction in glucose content provoked low levels of conidiation accompanied by some autolysis at the oldest part (the center) of the $\Delta fibB$ colony. The *fibB100* mutant showed increased conidiation compared to the null mutant, and the response was much more pronounced in *fibB101* and *fibB102* mutants. Nitrogen starvation did not induce conidiation in the $\Delta fibB$ or *fibB100* mutant. In contrast, conidiation was sparse in the *fibB102* mutant and considerably stronger in the *fibB101* mutant, with visible conidiation rings in both mutants. Finally, under salt stress conditions (0.6 M KCl), the $\Delta fibB$ mutant showed sparse conidiation over a mainly fluffy colony pattern. However, the *fibB102* and *fibB101* mutants conidiated profusely, similar to the wild type, and the *fibB100* mutant responded to this stimulus but to a noticeably lesser degree.

The growth and conidiation patterns of the null mutant and the three original mutants were also assessed in liquid cultures



Downloaded from ec.asm.org by Univ. Ugaids on January 11, 2008

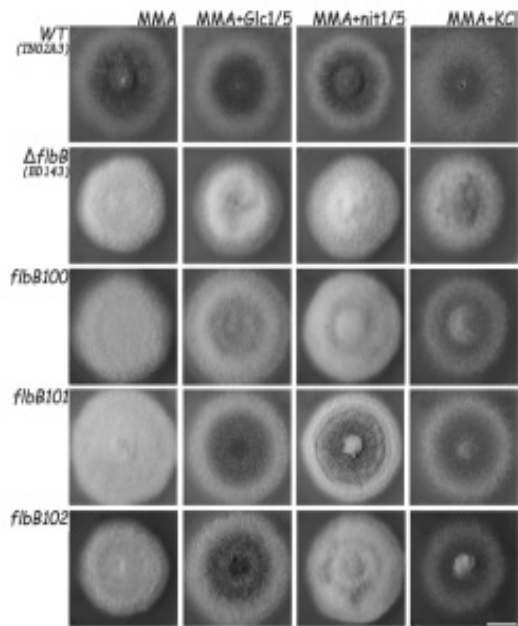


FIG. 2. Mutant characterization in solid medium. Phenotypes of wild-type (WT; TNO2A3), $\Delta fibB$ (BD143), *fibB100*, *fibB101*, and *fibB102* strains grown on solid MMA, MMA with reduced glucose, MMA with reduced nitrate, and MMA with KCl (see Materials and Methods) for 72 h are shown. Bar = 1 cm.

at 10 and 20 h after transfer to glucose- or nitrogen-free medium (Fig. 3). Cultures transferred to liquid MMA maintained a vegetative growth pattern. Under glucose limitation, however, the wild type produced reduced conidiophores, as previously reported (37) (Fig. 3). In contrast, the $\Delta fibB$ and *fibB100* mutants produced narrow hyphae, approximately 1.5 μm in diameter, from which single conidium-like structures rarely emerged (Fig. 3). The *fibB101* and *fibB102* mutants showed an intermediate response between those of the wild type and $\Delta fibB$ (or *fibB100*) mutants. Under nitrogen starvation conditions, the $\Delta fibB$ mutant and the three *fibB* mutants showed no conidiation response but rather exhibited an autolytic phenotype confirmed by the absence of staining with the vital stain fluorescein, while a wild-type strain generated conidiophores (37 and this work). In liquid medium with a high salt concentration, neither the $\Delta fibB$ mutant nor the three *fibB* mutants showed any conidiation response, while the wild-type strain generated conidiophores. Only in the case of the *fibB101* mutant were some vesicles seen after 20 h of incubation.

Taken together, the molecular and genetic results with the

obtained mutants and their comparisons with the null mutant lead us to conclude that the former bear partial loss-of-function mutations.

FibB is associated with the production of a diffusible compound needed for conidiation. Earlier studies had shown that wild-type strains extracellularly restored conidiation in all *fib* mutants (*fibA-E*) upon direct physical contact or through a dialysis membrane (21). *fib* mutants, in turn, unidirectionally restored conidiation in *fluG* loss-of-function mutants (47). We found that conidiation of *fibB* mutants was rescued by growing them in contact with a wild-type strain (Fig. 4) or through a dialysis membrane (data not shown). Moreover, all *fibB* mutants could extracellularly rescue conidiation in a $\Delta fluG$ strain. These results indicate that FibB may function in the synthesis of a diffusible signal compound that is necessary for normal conidiation and distinct from the FluG factor.

fibB expression precedes and determines *brlA* activation. The expression of *fibB* during the *A. nidulans* life cycle started with vegetative growth and continued into early phases of asexual development (Fig. 5A). The decline of *fibB* mRNA steady-state levels coincided with the start of *brlA* transcription. In addition, *fibB* expression resumed 12 h after asexual induction and was also observed in conidia and ascospores (sexual spores).

Since the above result did not clarify whether FibB activated or repressed *brlA* expression, the $\Delta fibB$ mutant was examined by Northern blotting (Fig. 5B). The absence of detectable *brlA* mRNA accumulation demonstrated that FibB is necessary for *brlA* expression and formally confirmed the designation of the gene as an *fib* (fluffy with low bristle expression) gene.

Finally, no significant differences could be detected in the *fibB* expression pattern between a *veA* wild-type (FGSC4) strain (Fig. 5A) and a *veA* mutant (*veA1*; FGSC26) strain (Fig. 5B), suggesting that *fibB* expression is not conditioned by the light-dependent conidiation regulator VeA.

Localization of FibB at the hyphal tip and in the nucleus. In order to determine the subcellular distribution of FibB, strains expressing either FibB::GFP or GFP::FibB proteins were constructed (see Materials and Methods and Fig. S2 in the supplemental material). Microscopic examination of the strains in liquid static cultures revealed that FibB is in the cytoplasm and accumulates at the hyphal tip at 16 h (Fig. 6A) and then (at 24 to 36 h) into the nuclei, as predicted by the putative transcriptional regulatory function of FibB, despite the absence of an identifiable nuclear localization signal (Fig. 6A). Interestingly, in most of the screened cells, the nucleus closest to the cell apex exhibited the highest level of fluorescence, indicating the high degree of regulation in localization or compartmentalization of FibB (see Discussion). The vast majority of the hyphae showed this localization for either C- or N-terminally tagged

FIG. 1. General description of *fibB*. (A) Genome localization and general description of *fibB*. Black segments represent exons, and black lines designate introns. (B) Sequence alignment of FibB homologues. Arrows indicate mutations which define changes in the amino acid sequence. Regions with low similarity are excluded. Genedoc software was used (version 2.6.003; www.psc.edu/biomed/genedoc). (C) Phylogenetic tree of bZIP domains identified in various fungal and yeast species. The bZIP branch including FibB bZIP is framed. Abbreviations: Ater, *A. terreus*; Bcin, *B. cinerea*; Socl, *S. sclerotiorum*; Aory, *A. oryzae*; Afum, *A. fumigatus*; Cimm, *C. immitis*; Snod, *S. nodorum*; Ncra, *N. crassa*; Fgra, *F. graminearum*; Mgr1, *M. grisea*; Spom, *S. pombe*; Scer, *S. cerevisiae*. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA software, version 3.1 (neighbor-joining method, with a bootstrap of 50,000 replicates and amino p-distance substitution model).

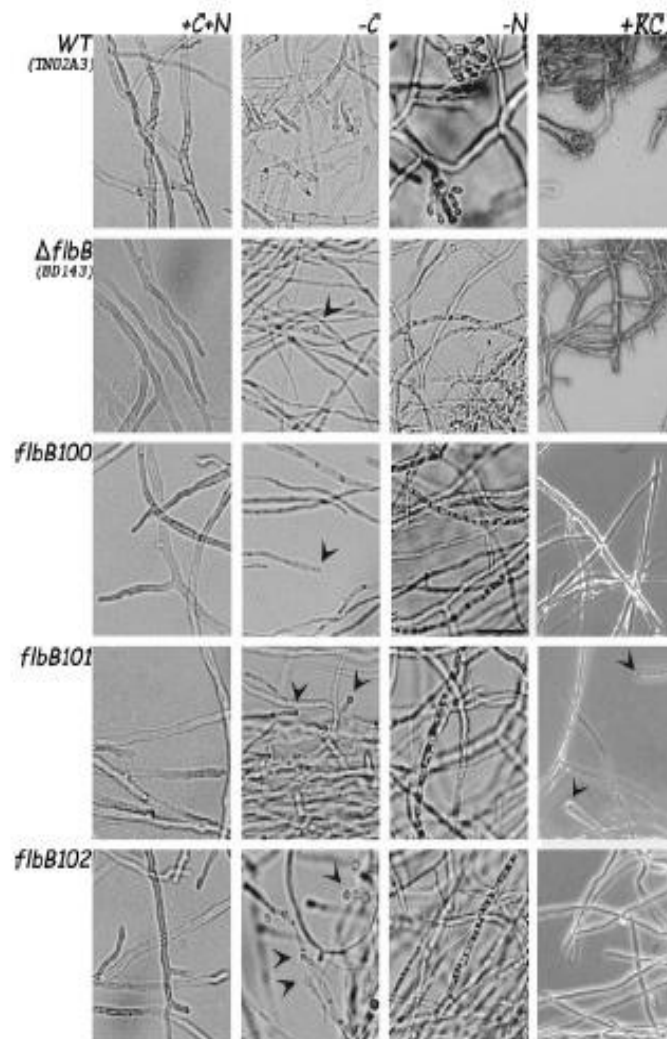


FIG. 3. Mutant characterization in liquid media. Phenotypes of wild-type (WT; TN02A3), $\Delta fibB$ (BD143), $fibB100$, $fibB101$, and $fibB102$ strains after 18 h of culture in MMA, followed by transfer to MMA-glucose, MMA-nitrate, or MMA plus KCl and MES for a further 20 h (see Materials and Methods), are shown. Arrowheads indicate condidium-like structures. Bar = 30 μ m.

FibB proteins, up to 36 h of culture (Fig. 6A; data not shown for GFP::FibB). Blast searches using different programs available at www.expasy.org (HMMTOP, PredictProtein, SOSUI, TMAP, TMHMM, Tpred, TopPred, and PSORT) showed an absence of predictable transmembrane domains or cysteine residues susceptible to prenylation (PrePS), suggesting that FibB is probably not anchored to the membrane and that its apical localization responds to other, as-yet-unknown factors (Fig. 6B).

FibB is a potential transcriptional activator. To test whether FibB can function as a TF likely activating downstream genes necessary for conidiation, the ability of the FibB protein to activate two reporters was examined. The full-length protein (FibB-F), the N-terminal region including the bZIP domain (FibB-N), and the C-terminal region without the

bZIP domain (FibB-C) were fused with LexA_{DBD} (DNA binding domain), and individual fusion proteins were expressed in *S. cerevisiae*. As shown in Fig. 7, when the transformants were tested on the medium lacking two nutrients (uracil and histidine) in the presence of various concentrations of 3-AT for the HIS3 reporter, those expressing LexA_{DBD}::FibB-F and LexA_{DBD}::FibB-C grew on the medium with 5 mM and 10 mM 3-AT, respectively. However, the strains with pLexA alone or LexA_{DBD}::FibB-N were unable to form colonies. In the X-Gal test, those expressing LexA_{DBD}::FibB-C showed blue color within 4 h after inoculation, similar to the PJ69-4A strains expressing Gal4_{DBD}::AflR (28, 52). The strains expressing LexA_{DBD}::FibB-F began to exhibit blue color after 1 day. Moreover, when multiple transformants for each construct were tested for their β -galactosidase activity (Fig. 7, right), the

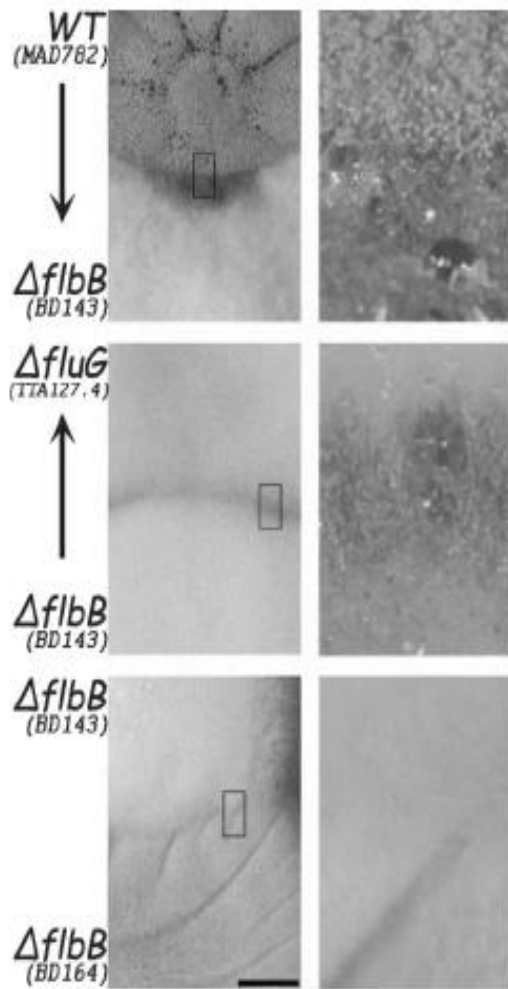


FIG. 4. Extracellular complementation. The $\Delta flbB$ (BD143) mutant acts as a donor of a signaling molecule to a $\Delta fluG$ (TTA127.4) strain at zones of contact between colonies. In turn, $\Delta flbB$ (BD143) conidiates when in contact with a sporulating strain (MAD782). The arrows indicate the complemented strains. There is no complementation between two $flbB$ deletion strains (BD143 and BD164). All other $flbB$ mutants described in this study display similar behavior. Right panels show close-up views ($\times 10$ magnification of left panel) of the framed zones. Bar = 0.6 cm.

strains expressing $LexA_{DND}::FibB-C$ and $LexA_{DND}::FibB-F$ showed high levels of β -galactosidase activity (489 ± 12 and 248 ± 7 units, respectively). These results indicate that the C-terminal region of FibB has a transactivation activity and that the N-terminal region may be involved in a modulating capacity, not excluding inhibitory effects on transactivation.

Overexpression of $flbB$ inhibits conidiation. To further examine the regulatory role of $flbB$ in conidiation, we generated an $flbB$ overexpression mutant by fusing the $flbB$ ORF with the inducible $alcA$ promoter (14). Since the above-mentioned data support the positive regulatory roles for FibB in conidiation, a hyperconidiating phenotype was expected. However, overexpression of $flbB$ resulted in severely reduced conidiation (Fig.

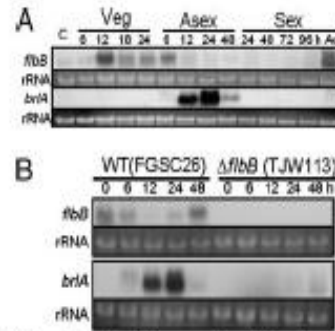


FIG. 5. $flbB$ and $brlA$ mRNA expression during the *A. nidulans* life cycle. (A) Steady-state mRNA levels of $flbB$ and $brlA$ during the life cycle of strain FGSC4. C and Ac represent conidia (asexual spores) and ascospores (sexual spores), respectively. Numbers indicate the time (hours) of incubation in liquid MMA with glucose (Veg) or solid MMA with glucose under conditions inducing asexual development (Asexual) or sexual development (Sexual). Note that $flbB$ is expressed during vegetative growth and early phase of asexual development as well as in ascospores, while $brlA$ is expressed as expected, during the early and medium stages of asexual development. (B) $flbB$ and $brlA$ mRNA expression levels, during asexual development, in the null mutant compared to the wild type (WT).

8A). Examination of $brlA$ and $flbB$ mRNA levels revealed that overexpression of $flbB$ abolished the proper accumulation of $brlA$ mRNA (Fig. 8B). This is consistent with the observation that the $alcA(p)::flbB$ mutant showed hyphal growth only after synchronized asexual developmental induction on threonine medium, whereas a control strain produced plenty of conidiophores (Fig. 8C). These findings suggest that FibB may be coupled with another factor(s) in a finely balanced stoichiometry, requiring a correct dosage in order to form an activating (heteromeric) complex (see Discussion).

DISCUSSION

In a mycelium, vegetative hyphae extend radially at the periphery, and some rise into the atmosphere. Recent evidence indicates that the recognition of this status is determined by an increase in extracellular levels of the FluG factor (33, 48). At this stage, some hyphae undertake conidiophore morphogenesis (1), but at least one additional signal seems to be required to confirm this particular fate, as previously shown (47) and confirmed in this study. The $flbB-D$ genes appear to intervene at this morphogenetic stage, as a mutation in any one of them blocks the synthesis of the second diffusible signal (47). Epistasis studies show that the sequence $FibE \rightarrow FibD \rightarrow FibB \rightarrow BrlA$ (FibC acting in parallel) is operational (55), FibB being the last reported element in the sequence before the activation of $brlA$. In addition, FibB is a transcription factor located at the hyphal apex near the growing point of the cell. Such a location suggests that distinct but as-yet-undetermined changes at the growing tip may be involved in its activation. Finally, FibB is required for the synthesis of the second signal downstream of FluG, which is necessary for conidiation induction.

Consistent with these observations, $flbB$ displays unique characteristics as a transcription factor, i.e., a highly conserved N-terminal bZIP domain and various conserved regions, which

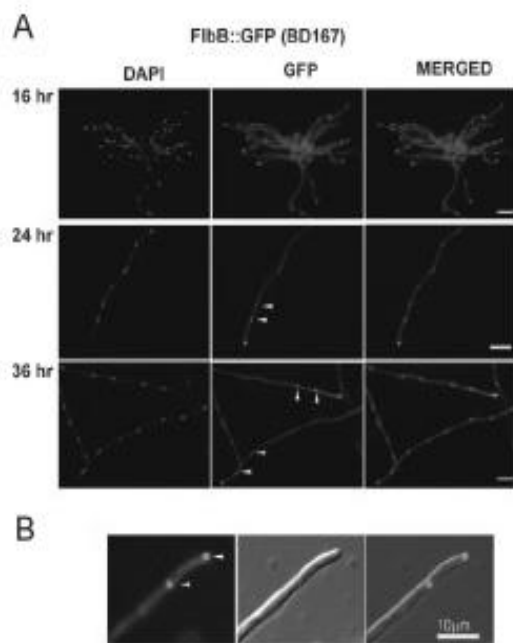


FIG. 6. Intracellular localization of FhbB. (A) The FhbB-GFP protein accumulates at the hyphal apex after 16 h of static culture in liquid MMA. Fluorescence at the cytoplasm is also visible, although in these images the contrast has been intentionally modified to show that no nuclei are fluorescent at 16 h. After 24 h and 36 h, fluorescence is also present in the proximal nuclei, as determined by DAPI staining. Arrowheads indicate fluorescent nuclei. (B) Proximity of FhbB to the tip of the cell. Arrowheads indicate the localization of FhbB at the apex and in the proximal nuclei. Bar = 10 μ m.

participate in the function of the protein and could participate in transcriptional activation, as found in this study.

The Gly residue, where the missense mutation FhbB100 (G70R) lies, is situated nine residues upstream from the starting Leu of the bZIP domain. Previous reports have shown the presence a similar sequence in HapX, where this Gly is universally conserved (41). This region is necessary for the recruitment of HapX to the Hap complex and consequent recognition

of CCAAT sequence-containing promoter regions (25). The apparent necessity of this flanking region for the functionality of FhbB suggests that the protein may form a (heterogenic) complex to activate conidiation, although an altered function of the bZIP DNA binding domain cannot be excluded.

The conserved FhbB_{K67-A73} and C-terminal regions were all required for normal conidiation in solid air-exposed cultures. However, in liquid culture, where stimuli can be studied separately, a differential response was revealed. Under carbon source-limiting conditions, which are known to induce conidiation in liquid cultures (37), a functional FhbB_{K67-A73} region is essential. In contrast, the C-terminal region does not appear to play a fundamental role. Under nitrogen starvation, however, all domains are required for conidiation in liquid culture, whereas in solid medium, truncating the protein from residue 267 onwards can result in notable conservation of activity. A more restricted truncation, affecting only residues 305 onwards, has a considerably greater effect, however, and this paradox raises the possibility of complex interactions between domains and indeed other interacting proteins. Under salt stress, mutants affected in the C-terminal region still showed a substantial conidiation response in solid medium, in sharp contrast to the mutant affected in Gly70, which resembled the practically fluffy phenotype of the null mutant. This indicates that the conserved region adjacent to the DNA binding domain, and possibly affecting bZIP function, appears to be essential for the response to salt stress. In contrast, in liquid medium all the regions characterized are necessary for conidiation to occur.

brlA expression starts just when *fbB* expression ends, and this could lead to the conclusion that FhbB could act as a *brlA* transcriptional repressor. However, no *brlA* expression was detected in the *fbB*-null mutant, showing that FhbB is required, directly or indirectly, for proper *brlA* transcription regulation. This suggests that the regulation of *fbB* expression must be precisely controlled for a normal asexual life cycle. The observation that *fbB* expression starts again at 48 h after asexual development induction suggests that FhbB could act in a cyclic way, having a sensory role, in order to confirm or remind that conidiation should continue. To confirm this, *fbB* and *brlA* expression should be analyzed for a longer period after asexual induction. Finally, *fbB* expression is not conditioned by VeA

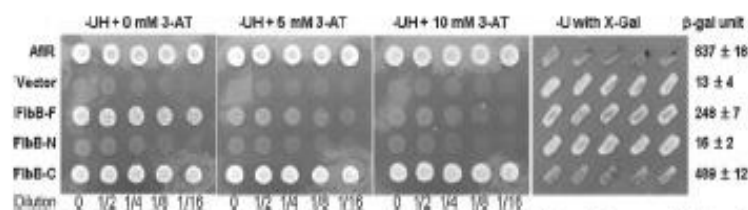


FIG. 7. FhbB is a potential transcription factor. Yeast strains expressing the Gal4_{DBD}::AffR (positive control) (28), pT_{LexA} alone (negative control), LexA_{DBD}::FhbB-F (full length; 1 to 427 aa), LexA_{DBD}::FhbB-N (N-terminal region including the bZIP domain; aa 1 to 172) and LexA_{DBD}::FhbB-C (C-terminal region without the bZIP domain; aa 166 to 427) fusion proteins were spotted on the medium without uracil and histidine (-UH) in the presence of various concentrations (0, 5, and 10 mM) of 3-AT in serial dilutions. Plates were incubated at 30°C for 3 days. Yeast strains expressing LexA_{DBD}::FhbB-F and LexA_{DBD}::FhbB-C grew in the presence of 5 mM and 10 mM 3-AT, respectively, whereas those expressing LexA_{DBD}::FhbB-N or vector alone did not grow on the same medium. Five individual transformants for each construct were then tested for their β -galactosidase activities; mean values \pm standard deviations are presented on the right. Rapid exhibition of blue color and high levels of β -galactosidase activity (489 \pm 12) by the strains expressing LexA_{DBD}::FhbB-C confirms that the C-terminal region of FhbB contains a potential transactivation domain.

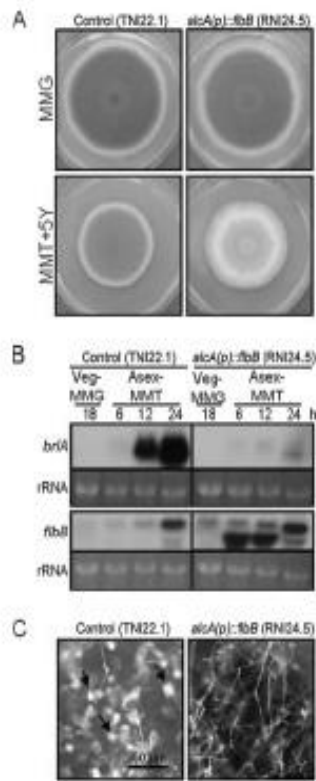


FIG. 8. Overexpression of *fibB* inhibits conidiation. (A) Photographs of the colonies of control (TNI22.1) and *alc4(p)::fibB* (RNI24.5) strains grown on MMA plus glucose (MMG; noninducing) and MMA plus yeast extract (MMT+5Y; threonine-inducing *alc4* promoter, with 5 g/liter yeast extract enhancing growth) for 5 days are shown. Overexpression of *fibB* resulted in a blockage in conidiation. (B) Control (TNI22.1) and *alc4(p)::fibB* (RNI24.5) strains were grown in liquid glucose medium at 37°C and 250 rpm for 18 h and then transferred onto solid medium with threonine (MMT; inducing) as the sole carbon source. Samples were collected at 18 h of vegetative growth (Veg) and 6, 12, and 24 h after asexual developmental induction (Asex) on MMT. Total RNA was isolated and subjected to Northern blot analyses for the levels of *bzl4* and *fibB* mRNAs. Equal loading of total RNA was evaluated by ethidium bromide staining of rRNA. (C) Close-up views of control (TNI22.1) and *alc4(p)::fibB* (RNI24.5) strains grown on MMT for 48 h after transfer onto solid MMT. The control strain produced conidiophores abundantly (arrows), whereas *alc4(p)::fibB* strain (RNI24.5) formed elongated aerial hyphae without conidiophores.

activity, and the reason for *fibB* mRNA presence in ascospores should be analyzed in more detail.

The abovementioned evidence, combined with the apical localization of the transcription factor before its purported activation, points to a potential sensory function of FibB, effected through an as-yet-unidentified complex located at the hyphal apex. This evidence allows an interpretation of the aconidial phenotype observed in the overexpression strain. Like many bZIP proteins (45), FibB may form a heteromeric complex. When *fibB* is overexpressed, this results in the mis-scheduled and unbalanced presence of the FibB protein. This aberrant expression could block proper complex formation and

function, resulting in an aconidial phenotype. Since hypofunctional *fibB* mutants are not affected in growth pattern or kinetics, the role of this regulatory mechanism appears to be strictly limited to the control of conidiation.

The nature of the stimulus triggering FibB relocalization to the nucleus was not clarified in this study. Among the various possible cues is reactive oxygen species, which is associated with the cessation of growth and has been reported to have a role in fungal morphogenesis (19). Moreover, FibB shares a number of conserved cysteines in its C-terminal region with another bZIP transcription factor, Pap1 of *S. pombe*, which is capable of sensing moderate levels of oxidative stress through these residues (9). This and other likely possibilities are under examination.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our admiration and gratitude to T. H. Adams, J. Aguirre, and J. K. Wieser for their pioneering work in the field of conidiation induction, and especially with *fibB* mutants, which served as a basis for the findings of this investigation. We are also grateful to J. Clutterbuck for provision of strains and advice and T. Roncal and S. Corobés for their assistance with mutant screening.

The work carried out at UW-Madison was supported by Hatch (WIS04667) and National Science Foundation (MCB-0421863 and IOS-0640067) grants to J.H.Y. E.A.E thanks Ministerio de Educación y Ciencia for support through grant BFU2006-04185. U.U. thanks Ministerio de Educación y Ciencia for grant BFU2004-03499/BMC and UPV/EHU for grant GIU05/36. O.E received a doctoral grant from UPV/EHU, and A.G. was a contract researcher under the research program of Gipuzkoako Foru Aldundia/Diputación Foral de Gipuzkoa. The work was also supported by the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany.

REFERENCES

- Adams, T. H., M. T. Boylan, and W. E. Timberlake. 1988. *bzl4* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54:353-362.
- Adams, T. H., J. K. Wieser, and J. H. Yu. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:35-54.
- Aguirre, J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus bzl4* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* 8:211-218.
- Aguirre, J., R. Ortiz, J. Clutterbuck, R. Tapia, and M. Cardenas. 1993. *veg4* and *ctf4* define two new developmental genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Newsl.* 40A:68.
- Aguirre, J., M. Rios-Mombreg, D. Howitt, and W. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13:111-118.
- Axelrod, D. E., M. Gault, and M. Pastushok. 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 34:9-15.
- Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernandez-Martinez, H. Berger, L. Araujo-Bazan, E. A. Espeso, R. Pachlinger, A. Gallmeier, I. Andari, C. Scuzzocchio, and J. Strauss. 2007. Nuclear export of the transcription factor NitA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 27:791-802.
- Brent, R., and M. Ptashne. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43:729-736.
- Castillo, E. A., J. Aya, C. Chiva, A. Moldan, M. Carrascal, J. Ablan, N. Jones, and E. Hidalgo. 2002. Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol. Microbiol.* 45:243-254.
- Chang, Y. C., and W. E. Timberlake. 1993. Identification of *Aspergillus bzl4* response elements (BRES) by genetic selection in yeast. *Genetics* 133:29-38.
- Cho, J. H., S. S. Yun, Y. K. Jang, M. J. Cha, N. J. Kwon, and S. K. Chae. 2003. Identification and cloning of *isp4* encoding a polypeptide that interacts with a homolog of yeast Rad6, UVS1 in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 41:46-51.
- Fischer, R., and U. Kiles. 2006. Asexual sporulation in mycelial fungi, p. 263-292. In U. Kiles and R. Fischer (ed.), *The Mycota*, vol. 1: growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 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. Scuzzocchio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Drah, S. Busch, C. D'Enfert, C. Boucher, G. H. Goldman, D.

- Bell-Pedersen, S., Griffiths-Jones, J. H., Doonan, J. Yu, K., Vinken, A., Palm, M., Freitag, E. U., Selker, D. B., Archer, M. A., Penava, B. R., Oakley, M., Momany, T., Tanaka, T., Kumagai, K., Asai, M., Machida, W. C., Nierman, D. W., Denning, M., Caddick, M., Hyatt, M., Prokopi, R., Fischer, B., Miller, P., Dyer, M. S., Sachs, S. A., Osmani, and B. W. Birren. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105–1115.
14. Gwynne, D. I., F. P. Buxton, S. Sibley, R. W. Davies, R. A. Lockington, C. Scorzocchio, and H. M. South-Lewis. 1987. Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 51:205–216.
15. Hoffmann, R., O. Valerius, M. Adermann, and G. H. Braus. 2001. Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpo4* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 12:2846–2857.
16. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163–168.
17. Kafer, E. 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:217–232.
18. Köhler, E. M., and T. H. Adams. 2002. Mutations in *gfdA* and *gfdB* suppress multiple developmental mutations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 160:159–168.
19. Lalioupe, H., and P. Silar. 2003. NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol.* 11:9–12.
20. Law, D. J., and W. E. Timberlake. 1980. Developmental regulation of lacase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 144:509–517.
21. Lee, B. N., and T. H. Adams. 1994. The *Aspergillus nidulans* *flaG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev.* 8:641–651.
22. Lee, B. N., and T. H. Adams. 1994. Overexpression of *fla4*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brd4* and premature initiation of development. *Mol. Microbiol.* 14:323–334.
23. Mah, J.-H., and J.-H. Yu. 2006. Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 5:1585–1595.
24. Martinielli, S. D. 1994. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Prog. Ind. Microbiol.* 29:33–58.
25. McNabb, D. S., and I. Pinto. 2005. Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4:1829–1839.
26. Natorff, R., M. Stenka, J. Brzywczy, and A. Paszowski. 2003. The *Aspergillus nidulans* *merR* gene encodes a bZIP protein which activates transcription of sulphur metabolism genes. *Mol. Microbiol.* 49:1051–1094.
27. Nayak, T., E. Stowczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Uhl, S. L. Murray, M. J. Hyatt, S. A. Osmani, and B. R. Oakley. 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172:1557–1566.
28. Ni, M., and J.-H. Yu. 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2:e970.
29. Oskerov, N., J. Mathew, and G. S. May. 2000. Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 31:181–188.
30. Peñalva, M. A. 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42:963–975.
31. Polley, S. D., and M. X. Cadmick. 1996. Molecular characterisation of *nanB*, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* 388:200–205.
32. Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. McDonald, and A. W. Balfour. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141–238.
33. Roncal, T., U. O. Ugaldé, and A. Irastorza. 1993. Calcium-induced condensation in *Penicillium cyclopium*: calcium triggers cytosolic alkalization at the hyphal tip. *J. Bacteriol.* 175:879–886.
34. Saubidino, M., M. Valkonen, and M. Penttilä. 2003. Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol. Microbiol.* 47:1149–1161.
35. Seo, J.-A., Y. Guan, and J.-H. Yu. 2006. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* 172:1535–1544.
36. Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194:3–21.
37. Skromna, I., O. Sanchez, and J. Aguirre. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brd4* regulatory gene. *Microbiology* 141:21–28.
38. Slaughter, S. M., E. A. Espeso, I. Cobeno, I. Arriaga-Bazan, and A. M. Calvo. 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63:242–255.
39. Surlager, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake. 1991. Rodletens, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* 5:1161–1171.
40. Surtumator, A. W., S. Irniger, and G. H. Braus. 2001. Induction of *fla4* mRNA synthesis for a putative bZIP protein of *Aspergillus nidulans* by amino acid starvation. *Curr. Genet.* 39:327–334.
41. Tanaka, A., M. Kato, T. Nagase, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi. 2002. Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochim. Biophys. Acta* 1576:176–182.
42. Tibbitts, J., C. Scorzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington, and R. W. Davies. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26:205–221.
43. Ugaldé, U. O. 2006. Autoregulatory signals in mycelial fungi, p. 203–213. In U. Kiles and R. Fischer (ed.), *The Mycota*, vol. 1: growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
44. Viason, C. R., P. B. Sigler, and S. L. McKnight. 1989. Scissors-grp model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246:911–916.
45. Viason, C., A. Acharya, and E. J. Taparowsky. 2006. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1759:4–12.
46. Waring, R. B., G. S. May, and N. R. Morris. 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene* 79:119–130.
47. Wieser, J., B. N. Lee, J. Fondon III, and T. H. Adams. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27:62–69.
48. Wieser, J., and T. H. Adams. 1995. *flaD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.* 9:491–502.
49. Wieser, J. 1997. Genetic requirements for initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. Ph.D. thesis. Texas A&M University, College Station, TX.
50. Yang, L., L. Uhl, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies, C. P. C. De Souza, X. Dou, A. Perez-Balaguer, and S. A. Osmani. 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3:1359–1362.
51. Yu, J.-H., J. Wieser, and T. H. Adams. 1996a. The *Aspergillus* FlaA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* 15:5184–5190.
52. Yu, J.-H., R. A. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard, and T. H. Adams. 1996b. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *afR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.* 29:549–555.
53. Yu, J. H., Z. Hanari, K.-H. Han, J.-A. Seo, Y. Reyes-Dominguez, and C. Scorzocchio. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41:973–981.
54. Yu, J.-H. 2006. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 44:145–154.
55. Yu, J.-H., J.-H. Mah, and J.-A. Seo. 2006. Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot. Cell* 5:1577–1584.

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/yfgbi

NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin α

Lidia Araújo-Bazán^a, Javier Fernández-Martínez^{a,1}, Vivian Maythe de los Ríos^{b,c,1}, Oier Etxebeeste^{a,d}, Juan Pablo Albar^b, Miguel Ángel Peñalva^a, Eduardo Antonio Espeso^{a,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, Madrid 28040, Spain

^b Laboratorio de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid 28039, Spain

^c Laboratorio de Proteómica, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid 28040, Spain

^d Laboratorio de Química Microbiana, Facultad de Químicas, Universidad País Vasco, San Sebastián 20018, Spain

Received 9 May 2007; accepted 9 August 2007

Abstract

In eukaryotic cells, importin α is the major carrier for transport protein cargoes into the nucleus. We characterize here *kapA*, the single *Aspergillus nidulans* gene encoding an importin α . Using an affinity approach, we identify six potential interactors of KapA⁵⁰, a deleted version of KapA lacking the autoinhibitory importin-beta-binding domain. One such interactor is NapB, the *A. nidulans* orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps75p, a histone chaperone member of the Nap/SET family of proteins that additionally plays a cytosolic role in vacuolar protein sorting. NapB, but not its close relative NapA (the *A. nidulans* orthologue of yeast Nap1p) interacts directly with KapA⁵⁰ in pull down assays, despite the fact that NapB does not contain a classical nuclear localization sequence. NapB is a nuclear protein which exits nuclei at the onset of mitosis when two simultaneous mechanisms might be acting, the partial disassembly of the nuclear pore complexes and as yet unidentified posttranslational modification of NapB. The mitotic cytosolic localization of NapB might facilitate its putative role in the sorting of protein cargoes to the vacuole. In addition, we show that NapB and the mitotic B-type cyclin NimE compete for *in vitro* binding to KapA.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Aspergillus nidulans*; Fungi; Importin α ; Nucleosome assembly proteins; Nuclear transport

1. Introduction

The eukaryotic cell nucleus is delimited by a double membrane, the nuclear envelope which, by separating the nucleoplasm from the cytoplasm, uncouples DNA replication and transcription from protein synthesis and plays an important role in the regulation of gene expression. Bi-directional trafficking of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm occurs through the nuclear pore complex (NPC). Nuclear import and export are energy requiring processes mediated by a family of proteins called

karyopherins, whose paradigm is the $\beta 1$ importin. Karyopherins specifically recognize their substrates either by direct binding or by using other proteins as adaptors. The best characterized nuclear import pathway is mediated by the importin $\beta 1$ /importin α heterodimer (reviewed in Fried and Kutay, 2003; Gorlich and Kutay, 1999, and references therein), where importin α was initially described as a mere adapter for the importin $\beta 1$, the true protein carrier (Goldfarb et al., 2004). The energy required for nuclear import/export is given by the hydrolysis of GTP by the small GTPase Ran. In the cytosol, due to the low levels of RanGTP, importin $\beta 1$ binds with high affinity to the importin $\beta 1$ binding domain (IBB) in importin α . In the resulting heterodimeric complex, importin α is competent for binding its cargoes by specifically recognizing basic

* Corresponding author. Fax: +34 91 536 0432.

E-mail address: eespeso@cib.csic.es (E.A. Espeso).

¹ These two authors contributed equally to this work.

residue-rich, short amino acid sequence motifs acting as nuclear localization signals (NLSs). Those NLSs exclusively bound by an importin α are called “classical” NLSs (cNLS) and can be either monopartite or bipartite (see Fontes et al., 2000, and references therein). Cargoes bound to the importin α /importin β heterocomplex migrate through the NPC into the nucleus. In the nucleoplasm, the elevated levels of Ran in its GTP-bound state promote the disassembly of the importin β / α -cargo heterocomplex by direct interaction of Ran-GTP with importin β (reviewed in Gorlich and Kutay, 1999). The cargo is then released into the nucleus and the import factors are recycled to the cytoplasm. Importin β exits the nucleus bound to Ran-GTP (Gorlich and Kutay, 1999) and importin α is exported by the exportin CAS/Cse1p, in a Ran-GTP dependent manner (Hood and Silver, 1998).

Certain aspects of this general model of nuclear transport have been revisited. For example, in tobacco cells importin α can mediate the nuclear transport of proteins independently of importin β (Hubner et al., 1999) and binds to a variety of nuclear localization signals not completely conforming to the established consensus. In these cases, importin α is helped by cofactors that increase its affinity or nuclear import rate for the cargoes. Among these “helpers” are Hsp70 and Npap60. The Hsp70 heat shock chaperone can recognize amino acid sequence motifs close to the NLS consensus (Takenaka et al., 1995), and it has been suggested that Ssa1p (*Saccharomyces cerevisiae* Hsp70) promotes the formation and stability of the importin α (Srp1p)-NLS-cargo complex (Shulga et al., 1996). Human Npap60 was initially described as a nucleoporin (a component of the NPC), that associates with the importin β / α heterocomplex and stimulates nuclear import of cNLS-containing cargoes (revised in Moore, 2003). In view of these examples, it is generally accepted that importin α -mediated nuclear import may include additional and diverse cofactors, ensuring that a large number of divergent nuclear proteins can be imported into the nucleus in an appropriate and efficient mode in response to different stimuli.

Nuclear transport of macromolecules has been mainly studied in mono-nucleated cells. Many filamentous ascomycete fungi have a coenocytic organization, with several nuclei per cell compartment. To ensure a meaningful response to environmental factors, regulatory proteins must enter the all of nuclei of a cell in a coordinated manner, allowing an orchestrated nuclear response. We hypothesized that this would impose additional needs on the nuclear import machinery and set out to identify novel components of the importin α mediated pathway in the model filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans* using an affinity approach.

We describe here the identification of *in vitro* interactors of *A. nidulans* importin α . One of these is NapB, a member of the nucleosome assembly protein family including Nap and SET protein subfamilies. A second member of this family of proteins has been characterized, NapA the puta-

tive orthologue of yeast Nap1p. Nap/SET proteins play nuclear roles in chromatin remodeling, histone metabolism and cell cycle progression (Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995; Miyaji-Yamaguchi et al., 2003; Mosammamparast et al., 2002; Park et al., 2005). Interestingly, in contrast to the described interaction between B-type cyclins and the Nap/SET proteins (Archambault et al., 2004; Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995) we have been unable to detect *in vitro* interaction of NapA or NapB with the mitotic B-type cyclin NimE (O’Connell et al., 1992). NapB shows nuclear localization in interphase and exits the nuclei at the onset of mitosis, when the nuclear pore complex is disassembled (De Souza et al., 2004) and in response to an unknown posttranslational modifying mechanism. NapB interacts directly with importin α , strongly suggesting that it is a cargo of this nuclear importer.

2. Materials and methods

2.1. Strains and materials

The *A. nidulans* yA2 pabaA1 strain (MAD1116) was used for making protein extracts. TNO2A3 (MAD1425), with genotype: *pyroA4, pyrG89, Δ nkuA::argB* strain (a gift from B. Oakley) was used as recipient of construct *napB::gfp*. Strains expressing *pacC700* allele, GFP::PacC(5–250), and mutant forms carrying S131A or P138F substitutions have been described in Fernandez-Martinez et al. (2003). A strain carrying GFP tagged An-Nic96 has been described in Osmani et al. (2006). Minimal and complete media for *A. nidulans* have been described (Cove, 1966). *Escherichia coli* DH1 strain was used for standard cloning techniques and recombinant protein expression. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in yeast-two hybrid screenings were Y187 and AH109 from Matchmaker III system (Clontech), wild type strain W303-1a was used in microscopy. IgG-sepharose was from GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

2.2. Gene identification, cloning, and GFP tagging

We used in TBLASTN searches of the *A. nidulans* database (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/annotation/aspergillus/blast_page.cgi) the human importin- α 1 (AAH02374), α 2 (AAH05978), α 3 (AAH24202), α 4 (AAH28691), α 5 (AAH47409), and α 6 (AAH20520) family members and *S. cerevisiae* Srp1p (AAA35090).

Aspergillus nidulans *kapA* was amplified from genomic and cDNA using oligonucleotides α 1 and α 4 (Supplementary Table 1) and sequenced. The *kapA* cDNA sequence has been deposited at the GenBank (Accession Number AF465210). Nucleosome assembly proteins coding genes *napA* and *napB* were amplified from genomic and cDNA using oligonucleotides for *napA*: *napUP* and *napDW* and for *napB*: *nap1* and *nap2* (see Supplementary Table 1). The *napA* and *napB* cDNA sequences have been deposited at GenBank with the Accession Numbers EF592166 and DQ004246, respectively.

ARTICLE IN PRESS

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

3

cDNA from genes encoding NnukA, Hsp70/AN5129.3, Hsp90/AN8269.3, NudK, NapB, KapB, and NimE were amplified using specific primers (see Supplementary Table 1), Pfu polymerase (Promega), and as template single stranded cDNA synthesized from a Cloned AMV First-strand Synthesis kit (Invitrogen) and a 24 h total RNA sample following manufacturer instructions. PCR amplified fragments were digested with EcoRI and BamHI restriction enzymes and introduced at the same sites in pGBKT7 (Clontech) polylinker. pGBKT7 derivatives were used in yeast-two hybrid assays and/or for TNT (Promega) based *in vitro* translation. Amplified *nimE* cDNA was digested with BamHI and cloned into pC20, a modified version of pET-19b (Novagen) lacking the 10×His tag and used in TNT (Promega). *kapB* cDNA was introduced into a modified version of pGADT7-rec (Clontech) lacking the ADHI promoter using the gap repair technique (Clontech) and primers SM-KapB and CDS-KapB.

Aspergillus nidulans Kap114p homologue, KapG/AN2163.3, was identified using the Blastp program and the Kap114p amino acid sequence. *kapG* cDNA was amplified using primers KapG1 and KapG2 (see Supplementary Table 1) and cloned into pCR2.1-TOPO. pTOPO-KapG was used in TNT to express KapG protein for pull down assays.

Tagging of NapB with GFP was done as described in Yang et al. (2004) and taking advantage of the new strains deficient in heterologous recombination (Nayak et al., 2006). The 3' end of the gene, 1.5 kb, and the 3' UTR region were amplified with primers NapB1 and NapB2, NapB3 and NapB4, respectively (see Supplementary Table 1) and fused in a 3 way PCR with a fragment, amplified with primers NapB-GFP1 and NapB-GFP2, containing the *gfp* gene together with the selectable marker *A. fumigatus pyrG* gene (Yang et al., 2004). The fusion cassette was transformed into MAD1425 strain following the protocol previously described (Tilburn et al., 1983). Uracil prototrophs were selected and homokaryons were analyzed by Southern for a single copy integration of the cassette.

To express the GFP::NapB fusion in *S. cerevisiae* we followed the procedure described in Fernandez-Martinez et al. (2003).

2.3. Expression and purification of recombinant and *in vitro* expressed proteins

Plasmids pQE80zz (a gift from Dr. D. Görlich) (Mingot et al., 2001b) and pGEX-2T were used to express ZZ::KapA⁵⁰ and GST::NapB, respectively. The KapA⁵⁰-coding fragment was PCR-amplified from cDNA using oligonucleotides $\alpha 5$ and $\alpha 6$, each containing a newly BamHI restriction site (Supplementary Table 1, shown in italics), and cloned into the BamHI site of pQE80zz. *napA* and *napB* cDNAs were amplified using oligonucleotides napUP and napDW for *napA* (see preceding section) and nap3 and nap4 for *napB*. Amplified fragments were double digested with BamHI and EcoRI (Supplementary Table 1, novel

sites are indicated in italics) and cloned into the pGEX-2T polylinker digested with the same restriction enzymes. Pfu polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used to prevent undesired mutations resulting from PCR.

Plasmids expressing either ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ alone, and GST::NapB were introduced into *E. coli* DH1. Transformants were grown for 16 h at 30 °C in LB broth plus 100 µg/ml of ampicillin. Cultures were diluted 1/50 with fresh medium and further incubated at 30 °C until cell density reached 0.6 U O.D. at 600 nm. Expression of ZZ, ZZ::KapA⁵⁰ and GST::NapB was induced by addition of 0.1 mM IPTG followed by a 3 h incubation at 30 °C. Cells were collected by centrifugation and resuspended in binding buffer (buffer B, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) containing complete protease inhibitor cocktail (Roche). The cell suspension was lysed with a French Press. Samples were clarified by centrifugation for 15 min at 14,000 rpm, 4 °C. Supernatants were stored at -80 °C. We used TNT coupled transcription translation kit (Invitrogen) to express radioactive, [³⁵S]-methionine, labeled proteins following the protocol from the manufacturer.

2.4. Affinity chromatography

Aspergillus nidulans total protein crude extract was obtained as described in Diez et al. (2002). MFA broth (Orejas et al., 1995), buffered at acidic pH with Na₂HPO₄ to a final concentration of 100 mM, was inoculated with 3 × 10⁶ conidiospores of the MAD1116 strain. Mycelium was collected after 16 h of growth at 37 °C and lyophilized. 200 mg of dry mycelia was grounded using a Fast-Prep 120 cell disruptor (Savant Bio101 Inc) and proteins were extracted as in Diez et al. (2002), using 1 ml of A50 buffer plus protease inhibitors (Roche), followed by gentle shaking for 30 min at 4 °C in a rotary wheel. Extracts were clarified by centrifugation at 14,000 rpm and 4 °C for 30 min and stored at -80 °C.

IgG-sepharose was loaded either with ZZ-tagged KapA⁵⁰ or ZZ as follows: 20 µl of the matrix were incubated with 300 µg of an *E. coli* extract expressing ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ in HNA buffer (50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM magnesium acetate and complete protease inhibitor cocktail), in a final volume of 1.5 ml. The matrix was washed three times with HNA buffer before utilization. Non-specific IgG-sepharose binding proteins were removed incubating 4 mg of *Aspergillus* total protein crude extract with 250 µl of matrix in a rotary wheel for 4 h at 4 °C. The sample was loaded onto a Micro Bio-spin chromatography column (Bio-Rad), the flow-through was collected and incubated with 25 µl of IgG-sepharose loaded with ZZ-KapA⁵⁰ or ZZ for 4 h in a rotary wheel at 4 °C. Samples were loaded onto a new Micro Bio-spin column, the flow-throw was discarded and the matrix was washed six times with 1 ml each of HNA buffer. After a final 1 h wash with 1 ml of HNA buffer on a rotary wheel, KapA⁵⁰ bound proteins were eluted with 1.5 M MgCl₂ and

ARTICLE IN PRESS

4

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

precipitated using an equal volume of 10% w/v TCA diluted in acetone plus 20 mM DTT for 40 min at -20°C . Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C , followed by three wash steps with an ice cold solution of acetone plus 20 mM DTT. The protein pellet was vacuum dried and stored at -80°C until used.

2.5. SDS-PAGE and MS analysis

Protein samples were dissolved in SDS-PAGE-loading buffer with 1% v/v β -mercaptoethanol, boiled for 5 min and resolved on a 10% SDS-PAGE. Gels were stained using the silver-staining kit Plus-OneTM (Amersham) and the indications of the manufacturer for further MS analysis. Silver-stained bands were excised manually and processed automatically using an Investigator ProGest automatic digester (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK). The digestion protocol was essentially as described by Shevchenko et al. (1996), with minor modifications. Gel bands were soaked 20 min in 50 mM NH_4HCO_3 , followed by 10 min incubation with ACN to dehydrate the gel piece. Digester temperature was raised to 56°C and proteins were reduced in 10 mM DTT plus 25 mM NH_4HCO_3 . After 10 min, heaters were switched off and samples were incubated in reducing solution for 20 additional minutes. Then, samples were alkylated for 15 min at room temperature in 100 mM iodoacetamide, 50 mM NH_4HCO_3 and washed 10 min in 50 mM NH_4HCO_3 . After the washing step, gel pieces were dehydrated for 15 min with ACN. Finally, sequencing grade modified porcine trypsin (Promega) was added to the samples at a final concentration of 16 ng/ μl in 25 mM NH_4HCO_3 and further incubated at 37°C for 6 h. Gel pieces were washed with 50 mM NH_4HCO_3 and peptides were sequentially extracted with 25 mM NH_4HCO_3 for 15 min, 0.1% TFA in water for 15 min and ACN for 15 min, to a final volume of 100 μl .

2.6. MALDI peptide mass fingerprinting and database searching

Trypsin peptides were dried in a SpeedVac and resuspended in 10 μl of TA solution (33% ACN in water, 0.1% TFA). A 0.3 μl aliquot of each sample was manually deposited onto a 400 μm diameter AnchorChip MALDI probe (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Then, 0.3 μl of matrix solution (a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ saturated solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid in TA solution) was added and dried at room temperature. Samples were automatically analyzed in a MALDI-TOF Bruker ReflexTM IV MALDI time of flight mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Germany) equipped with the SCOUTTM source in positive ion reflector mode using delayed extraction. The ion acceleration voltage was 20 kV. The equipment was externally calibrated with protonated mass signals from a peptide mix-

ture covering the 1000–3200 m/z range and every spectrum was internally calibrated by using selected signals arising from trypsin autoproteolysis to reach a typical mass measurement accuracy of ± 30 ppm. Measured tryptic peptide mass values were transferred using the MS Bio ToolsTM (Bruker) program as inputs to search the National Center for Biotechnology Information non-redundant database by using MascotTM software (Matrix Science, London, UK). Searches were done using *A. nidulans* database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) and allowing a protein molecular mass range of 1–200 kDa. Up to one missed tryptic cleavage was considered, and a mass accuracy of 50 ppm was used for all tryptic mass searches. Only protein identifications with score values higher than that signaling identity or extensive similarities were accepted and further manual analysis was carried out to avoid misidentifications.

2.7. Microscopy

Observations of *Aspergillus* fluorescent strains were done in “watch minimal medium” WMM as previously described in Penalva (2005). *Aspergillus* strains were grown onto coverslips immersed into supplemented WMM at 25°C during 16 h. In energy depleting conditions 15 mM azide and 15 mM sodium fluoride were added to the medium and samples were observed after 10 min incubation at 25°C . When required samples were fixed with 4% p-formaldehyde in PBS (Phosphate Buffer Saline) at 4°C for 16 h, washed three times with PBS and stained with a solution of DAPI 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50% glycerol for 5 min at room temperature, washed once with 50% glycerol and then mounted and imaged. Green fluorescence was analyzed using a Nikon-E600 microscope equipped with a B-2A filter, and DAPI using a UV-2A filter. NapB::GFP movie was obtained using a Leica DMI6000B microscope and an incubator at 37°C . Each frame of movie 1 is the maximum projection 3D-deconvoluted of 4 planes imaged every 5 min during 1 h for 100 ms. Images and movie 1 were recorded using a Hamamatsu Orca-ER digital camera and Metamorph software (Universal Image). GFP::PacC movies were obtained using an inverted NikonTE300 microscope associated with a confocal Ultraview Spinning-disc (Perkin-Elmer), controlled with Ultraview Software (Perkin-Elmer). Each frame from movies 2, 3, and 4 is the maximum projection of 10 planes imaged every 90 s with an exposure time of 0.5 s per plane.

Microscopy of *S. cerevisiae* GFP::NapB expressing cells was done as described in Fernandez-Martinez et al. (2003).

3. Results

3.1. Characterization of *kapA*, the single importin α gene in *A. nidulans*

By using the amino acid sequences of Srp1p (the single importin α in *S. cerevisiae*) and its six human homologues

in tBLASTn searches, we detected in the genome of *A. nidulans* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) a single importin α gene, that we named *kapA*. Additional *A. nidulans* database searches for proteins containing the two PFAM domains characterizing importin α family members, the importin β binding (IBB, PF01749) and the armadillo/ β -catenin like domain (PF00514), did not reveal any other gene encoding an additional importin α . The armadillo/ β -catenin domain search, however, detected an orthologue of *S. cerevisiae* Vac8p, a vacuolar protein that has been previously shown to contain armadillo repeats.

We PCR-amplified and characterized genomic and cDNA versions of *kapA*, whose nt sequence comparison revealed that the KapA ORF is split by two introns, 224 and 56 bp long (GenBank Accession No. AF465210; Supplementary Fig. 1A). The *kapA* ORF encodes a 553 residue protein with a predicted M_r of 60,626 Da showing 57% amino acid sequence identity to *S. cerevisiae* Srp1p, 85% and 95% identity to the single predicted importin α proteins from *A. fumigatus* and *Neurospora crassa*, respectively, 61% and 68% identity to the two importin α proteins from *Schizosaccharomyces pombe* and 46–58% identity to the six human importin α family members.

KapA contains N-terminal importin β binding (IBB) and auto-inhibitory (AID) domains and the putative binding sites for the specific importin α nuclear exporter, CAS/Cse1p (Supplementary Fig. 1B–D). The IBB domain includes conserved basic residues which have been shown to mediate interactions of importin α with the Heat repeats of importin β (Gorlich et al., 1996; Weis et al., 1996), strongly suggesting that the KapA IBB domain mediates similar intermolecular interactions with the *A. nidulans* importin β orthologue (KapB, Osmani et al., 2006). When importin β is not bound to the IBB, a sequence motif present in the AID occludes the cNLS binding site (Harreman et al., 2003; Kobe, 1999) to prevent cargo binding. The importin α specific exporter, CAS/Cse1p, recognizes different motifs in the IBB domain and Armadillo repeat 10 (Matsuura and Stewart, 2004). Both groups of amino acids at the IBB involved in CAS/Cse1p interaction are highly conserved in KapA (Supplementary Fig. 1C). Alanine scanning mutagenesis of the armadillo repeat 10 in human importin α 2 identified an acidic residue crucially involved in interaction with human CAS (Herold et al., 1998). Although this acidic residue is conserved in Srp1p, the single *S. cerevisiae* importin α , it is absent from KapA (Supplementary Fig. 1D), suggesting that the interaction between KapA and the *A. nidulans* CAS/Cse1p homologue (KapE/AN6591.3) occurs through a different mechanism.

3.2. Identification of KapA interacting proteins using affinity chromatography

To identify putative importin α cargoes, we took advantage of an affinity approach previously used by others to reveal protein interactions amongst components of the

nuclear import/export machinery (Mingot et al., 2001b, and references therein; Fig. 1a). We expressed in *E. coli* a recombinant protein containing two IgG-binding, tandemly repeated Z domains of *Staphylococcus aureus* Protein A attached to the N-terminus of KapA⁵⁰. KapA⁵⁰ is a 50 kDa truncated version of KapA lacking the IBB domain. Deletion of the IBB domain increases the expression levels of the fusion protein and prevents auto-inhibitory intramolecular interactions (Harreman et al., 2003; Kobe, 1999) potentially masking binding surfaces for importin α interacting proteins. IgG-Sepharose bound

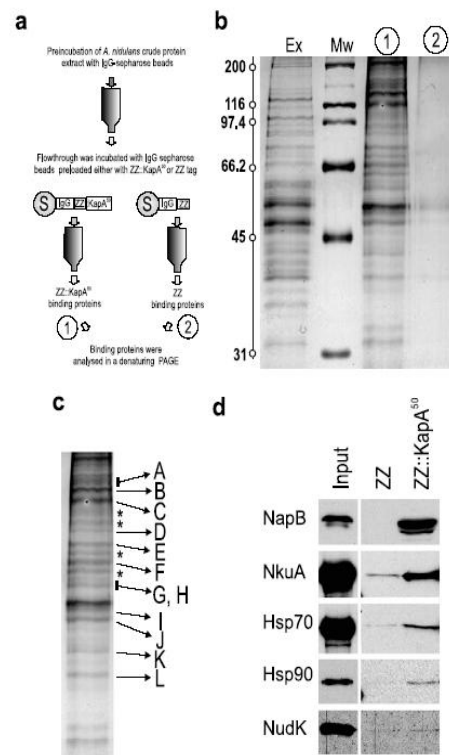


Fig. 1. Affinity column purification of KapA binding proteins. (a) Schematic representation of the protocol. (b) SDS-PAGE of the KapA binding proteins retained by the KapA⁵⁰ affinity column. Ex, 25 μ g of *Aspergillus nidulans* total protein extract. Lanes 1 and 2 are the eluates from the ZZ::KapA⁵⁰ and ZZ columns, respectively (see also panel a). Molecular weights of the standards are given in kDa. (c) The same lane 1 as in (b) showing the bands which have been identified by MS, indicated with capital letters (see also Table 1). (d) *In vitro* interaction analysis of bacterially expressed ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ loaded onto IgG-Sepharose with *in vitro* radioactive labeled proteins NapB (AN8170.3), NkuA (AN71298.3), Hsp70 (AN5129.3), Hsp90 (AN8269.3), and NudK (AN1953.3). Images correspond to different times of exposure for each pull down experiment. Coomassie gel staining was done to ensure equal amounts of ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ were bound to the resin (not shown). Input lane for each [³⁵S]-methionine labeled protein is as follows: 1/5 of NapB, NkuA and Hsp70 and 1/2 of Hsp90 and NudK of the amount of TNT reaction used in the pull down assay.

ARTICLE IN PRESS

6

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

ZZ-KapA⁵⁰ was used as bait in affinity purification experiments of *A. nidulans* protein extracts which had been pre-treated with IgG-Sepharose to minimize non-specific binding. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and silver staining (Fig. 1b). A similar control experiment using IgG-sepharose-ZZ was run as a control. Comparison of ZZ-KapA⁵⁰ and ZZ eluates showed a repetitive pattern of bands for the ZZ-KapA⁵⁰ affinity column (Fig. 1b). Protein bands selected from silver stained SDS-PAGE gel were digested with trypsin and the resulting peptide mixture were analyzed by MS. Proteins were identified after comparison of their MS pattern to the predicted trypsin digests of the *A. nidulans* protein database. Out of the 16 bands that we analyzed, we were able to identify the corresponding protein in 12 cases (Fig. 1c and Table 1 and see below) while we could not find a convincing candidate in four (indicated with asterisks in Fig. 1c).

Bands 'J' and 'L' in Fig. 1b, corresponding to EF-1A and an acidic 60S ribosome subunit, respectively, were found in both eluates and thus represent non-specific binding. Other bands corresponding to almost certain non-specific binders are 'D' (translation elongation factor EF-2), 'B' (UDP-glucose protein glucosyl transferase) and two bands corresponding to metabolic enzymes glutamate dehydrogenase and folic acid synthetase ('C' and 'K', respectively). Finally, bands 'E' and 'F' correspond to the *A. nidulans* Hsp90 and Hsp70 orthologues (AN8269.3 and AN5129.3, respectively, Table 1). Although these are known chaperones associating with *de novo* synthesized polypeptides which have been reported to bind non-specifically to affinity columns loaded with protein baits, they play an additional, important role in the nuclear import and cytoplasmic transport of proteins (Pratt et al., 2004) and thus cannot be ruled out as *bona fide* KapA interactors (see below).

The remaining four proteins are convincing candidates for physiological interactors of KapA. Band 'A' is the AN1413.3 product, which is annotated as a 3'-UTR mRNA cleavage and polyadenylation specific protein. Band 'G' is NudK (Xiang et al., 1999), the *A. nidulans* Arp1p (actin related protein 1) orthologue and thus a component of cytoplasmic dynein. Two other proteins, AN7753.3 and AN8170.3 (bands 'H' and 'I', respectively, Table 1) are likely to be associated with DNA. The

AN7753.3 product has been recently identified as the *A. nidulans* 70 kDa subunit from the heterodimeric helicase Ku70/Ku80, and denoted *nkuA*. The fourth of these proteins, the AN8170.3 product, has not been investigated previously. It shows convincing similarity to Vps75p, a nuclear protein (Huh et al., 2003) paradoxically required for normal sorting of carboxypeptidase Y to the yeast vacuole (Bonangelino et al., 2002) and that has been recently described to have nucleosome assembly function, binding specifically H3H4 heterodimers (Selth and Svejstrup, 2007).

To confirm the interactions previously described, we performed yeast two-hybrid analysis. cDNA from the different candidate genes (bands E, F, G, H, and I) was amplified and cloned into the pGBKT7 plasmid to be used as baits at the two-hybrid assay. As prey the Gal4 activation domain fused to KapA⁵⁰ was used (Stinnett et al., 2007). Having the reported VeA-KapA⁵⁰ interaction as control (Stinnett et al., 2007), we could not detect *ex vivo* interactions either using β -galactosidase or growth test (HIS3 and ADE2) reporters (results not shown). In view of these results we carried out *in vitro* protein-protein interaction assays using *in vitro* synthesized proteins expressed from the pGBKT7 derivative vectors and as a bait IgG bound ZZ or ZZ-KapA⁵⁰ resin. As shown in Fig. 1d we were able to detect interaction of ZZ::KapA with NkuA, Hsp90/AN8269.3, Hsp70/AN5129.3 and AN8170.3, but not with NudK. Our *in vitro* protein-protein interacting results contrast with the absence of detectable interaction using the yeast-two hybrid system. We know that Gal4pAD-KapA⁵⁰ is competent for interaction, i.e., with VeA (Stinnett et al., 2007), so it is formally possible that the bait proteins are either not properly folded or the presence of the Gal4p DNA binding domain prevents these interactions. These data validate the previous interaction selection using total protein extracts from *A. nidulans*, although with respect to NudK it is reasonable to suppose that additional proteins may be required for mediating the interaction with KapA.

Hsc82p, one of the two *S. cerevisiae* Hsp90s, has been shown to be a TAP interactor of Srp1p (importin α) (Zhao et al., 2005), in this work we show that *A. nidulans* Hsp90/AN8269 is also competent for binding to importin α . Yeast Ssa1p/Hsp70 interacts with Srp1p/importin α through a surface in the vicinity of the IBB domain, bridging the

Table 1
Putative physiological interactors of *A. nidulans* importin α

Band	<i>A. nidulans</i> protein number	M_r (Da)	Gene	Peptides (prot. coverage) ^a
A	AN1413.3	147,851	Putative cleavage and polyadenylation specific protein	10 (9)
E	AN8269.3	79,818	Heat Shock 90	13 (20)
F	AN5129.3	70,045	Heat Shock 70	12 (23)
G	AN1953.3	43,198 ^b	Actin related protein I, NudK	5 (17)
H	AN7753.3	71,298 ^b	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit (Ku70) superfamily, hypothetical protein	5 (11)
I	AN8170.3	40,849 ^b	NAP/SET family protein	5 (16)

^a Percentage of the KapA interacting protein covered by the identified peptides.

^b Proteins with abnormal electrophoretic mobility compared with the predicted molecular weight.

Please cite this article in press as: Araújo-Bazán, L. et al., NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members ..., Fungal Genet. Biol. (2007), doi:10.1016/j.fgb.2007.08.003

interaction of importin α with certain cargoes (Shulga et al., 1996); such interaction may also occur between KapA⁵⁰ and Hsp70/AN5129.3.

The Ku70/Ku80 heterocomplex is involved in the non-homologous end-joining repair pathway (Boulton and Jackson, 1998; Nayak et al., 2006; Ninomiya et al., 2004). The ability of human importin α to bind both subunits of the Ku70/Ku80 heterodimer has been described and agrees with the presence in each of a classic bipartite NLS (cNLS) (Song et al., 2003). However, the *A. nidulans* Ku70 orthologue, NkuA, does not contain an obvious cNLS, suggesting that it does not interact with KapA as a canonical cNLS-containing cargo.

In view of the facts that Nap/SET proteins are known interactors of mitotic B-type cyclins (Kellogg et al., 1995) and that in *S. cerevisiae* a genetic interaction has been described between *SRP1* and *CDC28*, encoding the catalytic subunit of the major cyclin-dependent kinase (Loeb et al., 1995), we have concentrated our efforts on the characterization of the AN8170.3 gene, that we denoted *napB*, and the second member of this family in *A. nidulans*, *napA*.

3.3. AN8863.3 and AN8170.3 are members of the Nap/SET family

The AN8170.3/NapB contains a PF00956 NAP domain characterizing the Nap, (nucleosome assembly proteins)/SET protein family (reviewed in Park and Luger, 2006a). As determined by database searching using the NAP domain (PF00956), the *A. nidulans* proteome has another Nap/SET protein, the product of AN8863.3, which is the orthologue of *S. cerevisiae* Nap1p (Supplementary Figs. 2A and 3) and that we denoted *napA*. Nap1p, a histone chaperone and chromatin remodeling factor and the best characterized member of this family (Kellogg and Murray, 1995; Park and Luger, 2006a; Park et al., 2005), shuttles histones from the cytoplasm to the nucleus (Miyaji-Yamaguchi et al., 2003; Mosammaparast et al., 2002, 2005).

We PCR-amplified and sequenced genomic and cDNA versions of AN8170.3/*napB* and AN8863.3/*napA*. Their comparison confirmed the intron/exon organization predicted by the automatic annotation tools for most of introns, with the sole exception of intron 3 in *napA* nucleotide sequence (see Genbank entry EF592166), and the presence of a PFAM PF00956 domain covering 64% of NapA and almost 85% of NapB amino acid sequences, respectively (Supplementary Fig. 3B and C). NapA shares 58% similarity with yeast Nap1p and shows amino acid sequence conservation in functional motifs/regions and secondary structure elements corresponding to those described in the Nap1p crystal structure (Park and Luger, 2006b), including the nuclear localization (NLS) and the nuclear export (NES) sequences (Supplementary Fig. 3). NapB shows lower overall conservation with the other Nap/SET protein family members, but it is actually more similar in amino acid sequence to human SET (26% simi-

larity) than to human or yeast Nap1p (23% and 21% similarity, respectively).

Nap1p shuttles between the nucleus and the cytoplasm by means of the above mentioned NLS and NES. The activity of the NES is modulated by the regulatory subdomain B, involving α -helix 3 in the crystal structure (Park and Luger, 2006b). Its NLS motif is recognized by the Kap114p importin (Mosammaparast et al., 2005), of which this protein is a demonstrated cargo. SET proteins, NapB and Vps75p lack these nuclear transport elements characteristic of Nap1p and its metazoan orthologues (Park and Luger, 2006a; Selth and Svejstrup, 2007) which, together with sequence similarity data, suggests that Vps75p and NapB are the fungal relatives of SET proteins from higher eukaryotes. The absence of the conserved Nap1p-NLS additionally suggest that NapB and Vps75p might use a Kap114p-independent nuclear import pathway, possibly depending on importin α KapA, as indicated by our affinity purification experiment.

3.4. NapB specifically interacts with Importin α

To study further the interaction detected between NapB and KapA in affinity columns, we used pull down assays with bacterially expressed proteins. Protein extracts from *E. coli* cells expressing either GST::NapB or ZZ::KapA⁵⁰ were incubated with IgG-sepharose. As expected, ZZ::KapA⁵⁰ but not GST::NapB, was retained by the resin (Fig. 2a, lanes 7 and 8). In contrast, when both extracts were mixed, GST::NapB was pulled down by IgG-sepharose loaded with ZZ::KapA⁵⁰, but not when loaded with the ZZ polypeptide (Fig. 2a, lanes 4 and 6). Similar results were obtained when GST-NapB was used as a bait under conditions in which GST alone did not show any interaction with either ZZ or ZZ-KapA⁵⁰ (data not shown). Thus, these pull down assays represent corroborating evidence of the interaction between *A. nidulans* importin α and NapB.

The specificity of these assays was confirmed. Additional pull down experiments were performed using purified *E. coli* expressed proteins GST::NapA, GST::NapB, and GST::PacC(305-678) (Fig. 2b lanes 4, 5, and 6, respectively). PacC(305-678) has no cNLS-like sequence and is not imported into the nucleus (Mingot et al., 2001a). In contrast to GST::NapB, neither GST::NapA nor GST::PacC(305-678) were pulled down by ZZ-KapA⁵⁰ (see Fig. 2b). Specific binding of NapB to importin α agrees with its nuclear localization (see below). As Nap1p, the *S. cerevisiae* NapA orthologue, is transported into the nucleus by Kap114p (Mosammaparast et al., 2001) and the NLS is not conserved between Nap and SET proteins, these data strongly suggest that nuclear import of different fungal Nap/SET family members might involve different carriers. To verify this hypothesis we characterized the *A. nidulans* Kap114p homologue. We did a Blastp search using the yeast Kap114p sequence and the *A. nidulans* protein database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>). We found one protein encoded by the gene

ARTICLE IN PRESS

AN2163.3 with 43% similarity to the yeast Kap114p (Supplementary Fig. 4). The gene AN2163.3 is an intron-less nt sequence, we denoted *kapG*. Then, we tested whether GST::NapB and GST::NapA are able to interact with *in vitro* expressed KapG using pull down assays with glutathione-sepharose preloaded with the fusion proteins. As control we included KapA⁵⁰ and the *A. nidulans* importin β 1, KapB (Osmani et al., 2006). Yeast importin β 1, Kap95p, does not interact with Nap1p (Mosammaparast et al., 2002). We detected the interaction between NapB and KapA, and confirmed the absence of interaction of KapA with NapA (Fig. 3, upper image). Unexpectedly no interaction could be detected by using either NapA or NapB with KapG, even when we used the assay conditions where the interaction between GST::Nap1p and Kap114p was analyzed (Mosammaparast et al., 2002) (Fig. 3, middle image). The absence of interaction between NapB and

KapB (Fig. 3 lower image) confirms the specific recognition of NapB by KapA. These results are in agreement with our previous hypothesis that the nuclear import machinery involved in the transport of the *A. nidulans* Nap/SET proteins might differ from that described in other organisms, at least in the yeast *S. cerevisiae* (see also below).

3.5. *NapB* is a nuclear protein in *A. nidulans*

In view of the specific interaction of NapB with the nuclear carrier importin α , we determined the subcellular localization of NapB. We tagged NapB with the green fluorescent protein using the method described by Yang et al. (2004) (Fig. 4a). Transformants carrying a gene replacement event of *napB* by *napB::GFP* were selected and analyzed by epi-fluorescent microscopy. In agreement with its interaction with importin α , NapB::GFP shows predominant, almost exclusive, nuclear localization in interphase (Fig. 4b).

We have previously utilized *S. cerevisiae* to prove a physiological role of importin α in the nuclear transport of two *A. nidulans* proteins, PacC and VeA (Fernandez-Martinez et al., 2003; Stinnett et al., 2007). Using a centromeric plasmid we expressed a GFP::NapB fusion in the wild type strain W303-1a driven by the ADHI promoter (Fernandez-Martinez et al., 2003). In contrast to the nuclear localization described for GFP tagged Vps75p (Huh et al., 2003), GFP::NapB is not nuclear in *S. cerevisiae* (Fig. 4c). One possible explanation might be the absence of functionality of NapB NLS in the yeast; this has been previously reported for PacC, where the NLS located in the zinc finger region is not functional in *S. cerevisiae* (Fernandez-Martinez et al., 2003). The fact that the

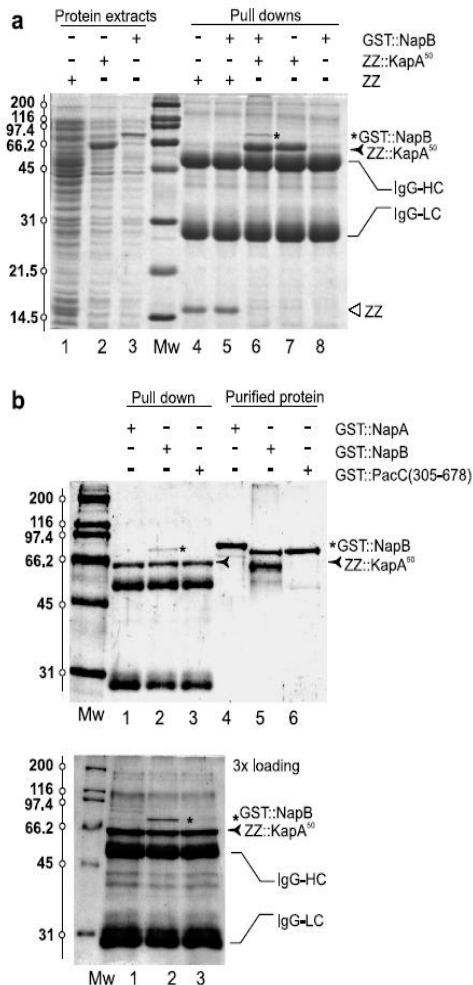


Fig. 2. KapA⁵⁰ specifically interacts with NapB in pull down assays. (a) The half-tone shows a Coomassie staining of a 12% SDS-PAGE of total *E. coli* extracts (lanes 1–3) or pull down assays in which protein extracts were incubated with IgG-sepharose, beads were recovered by centrifugation, washed and boiled in loading buffer (lanes 4–8). Lane 1, extract from cells expressing the ZZ domain alone; lane 2, extract from cells expressing ZZ::KapA⁵⁰; lane 3, extract from cells expressing GST::NapB (lane 3); lane 4, pull down assay using the ZZ extract alone; lane 5, pull down assay using the ZZ extract mixed with an equivalent amount of the GST::NapB extract; lane 6, pull down assay of the ZZ-KapA⁵⁰ extract mixed with an equal amount of the GST-NapB extract; lane 7, pull down assay using the ZZ-KapA⁵⁰ extract alone; lane 8, pull down assay using the GST-NapB extract alone. (b) Pull down assays showing the interaction between KapA⁵⁰ and NapB using KapA⁵⁰-loaded IgG resin and purified GST fusion protein baits. Lanes 4, 5, and 6 contain 1/10 of the input corresponding to GST::NapA, GST::NapB and GST::PacC(305–678), respectively. Lane 1, pull down assay using GST-NapA. Lane 2, pull down assay using GST-NapB. Lane 3, pull down assay using GST-PacC(305–678). The prominent bands in panels (a) and (b) correspond to the IgG heavy (IgG-HC) and light (IgG-LC) chains. NapB migrates as a 50 kDa protein (Fig. 1, band I) which contrasts with its predicted *M_r* of 40.8 kDa, and the 66.8 kDa GST::NapB fusion protein migrates as a ~72 kDa band. Similar discrepancies between predicted and observed mobility have been reported for yeast and vertebrate Nap/SET proteins (Ishimi and Kikuchi, 1991; Kellogg et al., 1995; Navadgi et al., 2006), almost certainly resulting from the abnormally high proportion of acidic residues (27% aspartate or glutamate in the case of NapB).

ARTICLE IN PRESS

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx-xxx

9

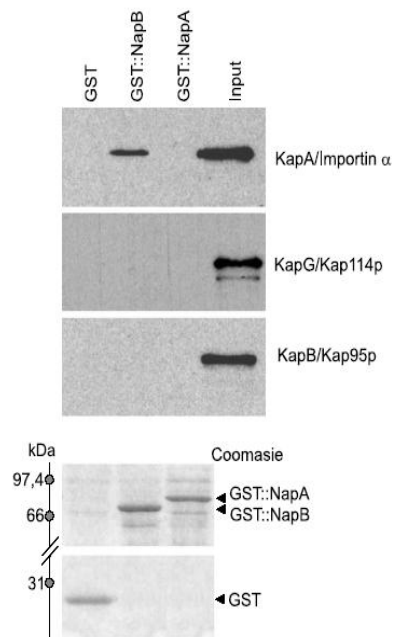


Fig. 3. KapG, the *A. nidulans* Kap114p homologue, does not interact with NapA or NapB. Immobilized GST, GST::NapA, and GST::NapB proteins were incubated with each of the three *in vitro* translated nuclear import carriers, KapA⁵⁰, KapB (GenBank AAP57941), and KapG, following the procedures described in Mosammaparast et al. (2002). Input labeled track contains 1/3 of the amount of TNT reaction used in each experiment. A representative Coomassie stained gel showing loading of each GST fusion proteins is displayed at the bottom.

Kap114 homologue KapG does not interact with either NapB or NapA suggests, at least for NapB, that major differences may exist in the mechanisms governing the import of these proteins in these two fungi.

3.6. NapB is cytoplasmic during mitosis

Nap/SET proteins typically show regulation at the level of nucleo-cytoplasmic trafficking, which accounts for the dual localization, in the cytosol and in the nucleus, reported for several of these proteins. For example, yeast Nap1p (Miyaji-Yamaguchi et al., 2003) and their plant homologues (Dong et al., 2005) shuttle between the nucleus and the cytoplasm due to the antagonizing roles of a NLS and a NES. Regulation of subcellular localization of Nap/SET proteins often occurs in a cell cycle-dependent manner (Ito et al., 1996; Marheineke and Krude, 1998; Rogner et al., 2000). For example, human NAP-2 and *Drosophila* NAP1 are nuclear during the S phase, in agreement with their role in nucleosome assembly, and cytosolic in G2 (Ito et al., 1996; Rogner et al., 2000). Thus, we followed the subcellular localization of *A. nidulans* NapB::GFP *in vivo*.

Aspergillus nidulans, like other fungi, undergoes a closed mitosis, where the nuclear membrane remains intact

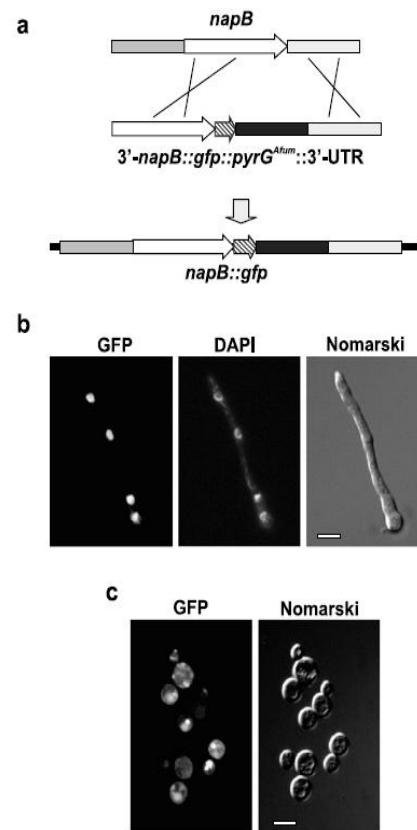


Fig. 4. GFP-tagging and subcellular localization of NapB. (a) Scheme showing the double cross-over strategy used to tag NapB with GFP. The cassette *3'-napB::gfp::pyrG^{Am}::3'-UTR* was amplified using the technique described in Yang et al. (2004). (b) Nuclear localization of NapB::GFP in interphase (GFP). Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) are shown. (c) GFP::NapB expression in yeast shows cytoplasmic and vacuolar distributions (GFP). Nomarski images of both germling and the yeast cells are depicted on the right side of each panel. The scale bar represents 5 μm.

throughout the cell cycle. However, nuclear pore complexes are partially disassembled during mitosis, which allows passage of proteins in a Ran gradient-independent, and thus karyopherin-independent, manner, suggesting that, during mitosis, the subcellular localization of proteins is dictated by their relative binding affinities to other subcellular components (De Souza et al., 2004). Fig. 5a shows frames taken from Supplementary movie 1, demonstrating that NapB::GFP, which exhibits preferential nuclear localization in non-mitotic nuclei (Fig. 4b), is released to the cytosol at the onset of mitosis and is re-imported into the nuclei after mitosis, when the Ran-GTP gradient is re-established (De Souza et al., 2004). In marked contrast, the zinc-finger transcription factor PacC²⁷ (Fernandez-Martinez et al., 2003; Penalva and Arst, 2004) is retained

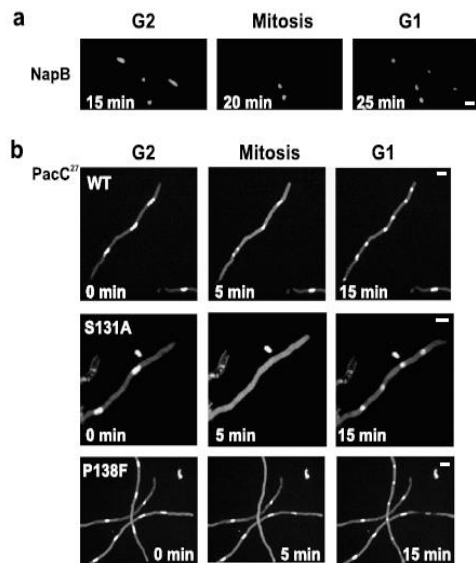


Fig. 5. Cytosolic localization of NapB during mitosis. (a) Frames from Supplementary movie 1 showing the nuclear localization of NapB-GFP in G2 is lost during mitosis and recovered after mitosis completion (G1). (b) Frames from Supplementary movies 2, 3, and 4 corresponding to strains expressing wild type GFP::PacC²⁷ (WT, encoded by *pacC700*) and its single residue substitution mutants S131A (*pacC²⁷-70004*) P138F (*pacC²⁷-70015*). Ser131Ala and Pro138Phe substitutions within the zinc-finger region of PacC²⁷ abolish DNA binding but do not impair nuclear import (Fernandez-Martinez et al., 2003). During mitosis these two GFP::PacC²⁷ mutant fusion proteins localize to the cytoplasm. They recover their nuclear localization after mitosis is completed, similarly to NapB. The scale bar represents 5 μ m.

in the mitotic nuclei through its ability to bind DNA, as demonstrated by the cytosolic localization of mutant PacC²⁷ forms carrying Ser131Ala or Pro138Phe substitutions, which impair DNA binding (Fig. 5b) (Fernandez-Martinez et al., 2003). These data additionally indicate that NapB does not bind chromatin during mitosis (see below). Exclusion of NapB from mitotic nuclei would facilitate a putative cytosolic role, such as that demonstrated for its yeast Vps75p *S. cerevisiae* orthologue (Bonangelino et al., 2002).

3.7. Nuclear localization of NapB during interphase is energy independent

The above data showed a dramatic change in the nuclear localization of NapB during mitosis, when active nuclear import is counteracted by partial NPC disassembly. To impair nuclear transport during interphase we used energy depleting conditions. Nuclear localization of wild type PacC²⁷ was unaffected after incubation in medium containing a mixture of azide and sodium fluoride (Fig. 6b). In contrast, mutant Pro138Phe PacC²⁷ was released to the cytoplasm (Fig. 6c), in agreement with the above results

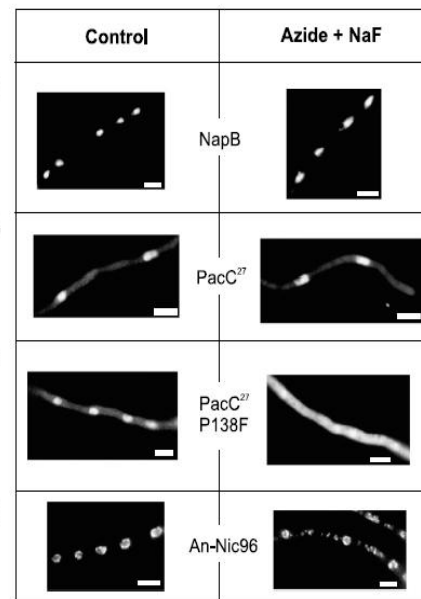


Fig. 6. Effect of energy depletion in the localization of NapB::GFP. Cells expressing the indicated fusion proteins were incubated in the presence of 15 mM azide and 15 mM NaF and the localization of the fluorescent protein fusions examined in nuclei that were not undergoing mitosis. (a) Nuclear localization of NapB::GFP in non-mitotic nuclei is not affected by the treatment. (b) Localization of wild type GFP::PacC²⁷. (c) Loss of nuclear localization of P138F GFP::PacC²⁷, impaired in DNA binding. This control convincingly demonstrates that the conditions used impair nuclear import. (d) Localization of the An-Nic96::GFP nucleoporin. The scale bar represents 5 μ m.

showing the strict requirement of DNA binding for nuclear retention of PacC²⁷ when the NPC is partially disassembled. Notably, the preferential nuclear localization of NapB::GFP (Fig. 6a) remained unchanged under these conditions, indicating that NapB might be also retained into the nuclei, possibly by binding to chromatin. We determined, as additional control, the localization of the An-Nic96::GFP chimera. An-Nic96 is a component of the NPC that gives name to a subcomplex of structural nucleoporins (the Nup93/Nic96 subcomplex) (see Tran and Went, 2006, and references therein) which has been shown to be released from the nuclear envelope during mitosis in *Aspergillus* (see Fig. 5, video 17 from reference Osmani et al., 2006). As it is shown in Fig. 6d, the perinuclear localization of An-Nic96 in interphase is essentially energy independent.

Overall these experiments strongly suggest that during interphase nuclear localization of NapB is mainly determined by its affinities or interactions within the nucleus and, interestingly, during mitosis posttranslational modifications might occur to prevent the nuclear retention of NapB in addition to the loss of an active nuclear import pathway.

ARTICLE IN PRESS

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

11

3.8. NapB and the cyclin B NimE compete for *in vitro* binding to importin α

Nap/SET family members are known interactors of B-type cyclins (Kellogg et al., 1995; Kellogg and Murray, 1995), consequently we studied the possibility that one of the nuclear functions of NapB would be to help importin α to mediate nuclear import of NimE, the unique B-type cyclin characterized in *A. nidulans* (O'Connell et al., 1992). We expressed *in vitro* a radioactive NimE protein and we did pull down assays using ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ loaded IgG resins. As is shown in Fig. 7a, NimE interacts

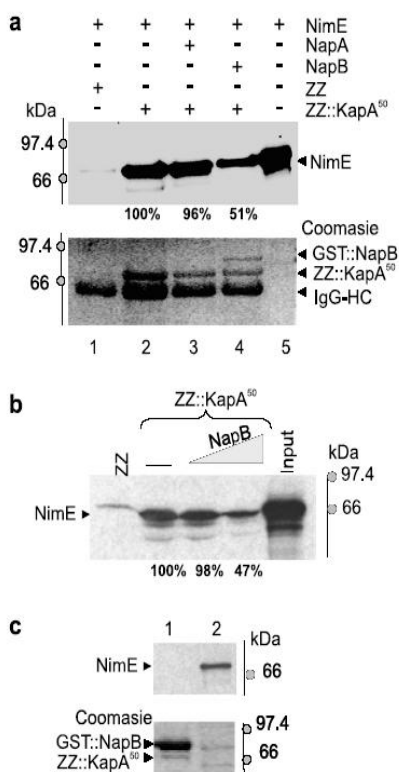


Fig. 7. *In vitro* interaction of KapA and NimE. (a) Immobilized ZZ, lane 1, or ZZ::KapA, lanes 2–4, were incubated with *in vitro* translated NimE, and the effect of adding either GST::NapA, lane 3, or GST::NapB, lane 4, to the pull down assay was analyzed. Percentages shown under NimE pull down measure the intensity of NimE bands at lanes 2, 3, and 4. Intensity of NimE band at lane 2 as was considered as 100% KapA–NimE interaction. The Coomassie staining of the SDS–PAGE gel is shown underneath. (b) NapB competes with NimE binding to KapA. Twenty and 100 μ l of *E. coli* protein extract expressing GST::NapB were added to the NimE–ZZ::KapA⁵⁰ binding reaction. Below the image is shown a quantification of each NimE band having as 100% that measured in the reaction without GST::NapB. (c) Pull down assay using as bait glutathione-sepharose immobilized GST::NapB and a mixture of *E. coli* protein extract expressing ZZ::KapA⁵⁰ and *in vitro* translated NimE, lane 1. Lane 2 contains 1/3 of the loading of NimE to the pull down assay. At the bottom is shown the Coomassie staining of the SDS–PAGE gel.

with the importin α , despite the absence of a classical NLS in its amino acid sequence (Fig. 7a, compare lanes 1 and 2). However, no interaction was detected between NimE and GST::NapA or GST::NapB (results not shown). In view of this unexpected result we did pull down assays using the ZZ::KapA⁵⁰ loaded IgG resin and a mixture of NimE and each of the GST::NapA or GST::NapB fusion proteins. As mentioned before, GST::NapA does not interact with ZZ::KapA⁵⁰ and in addition does not alter the recent interaction with NimE (Fig. 7, lane 3), in contrast the presence of GST::NapB in the pull down assay caused a reduction of NimE retention (approx. 50%) by the IgG–ZZ::KapA⁵⁰ loaded resin (Fig. 7, lane 4). Competition to NimE binding of ZZ::KapA⁵⁰ was further confirmed with pull down experiments adding different concentrations of GST::NapB (Fig. 7b), suggesting that importin α binds NimE and NapB through the same region. A pull down assay using glutathione-sepharose loaded with GST::NapB and a mixture of NimE and ZZ::KapA⁵⁰ confirmed the lack of formation of a KapA–NimE–NapB heterotrimer *in vitro*, although ZZ::KapA⁵⁰ was retained in the experiment by NapB as expected (Fig. 7c, lane 1). Taken together, these data indicate that the B-type cyclin NimE is another putative cargo of KapA and the Nap/SET family members in *A. nidulans* are not competent to bind to or help the importin α in recognizing and binding to NimE *in vitro*.

4. Discussion

KapA is the only gene encoding an importin α in the filamentous fungus *A. nidulans*. We used KapA⁵⁰, a deleted version of KapA lacking the IBB domain, as bait in affinity experiments, in an attempt to isolate interacting proteins potentially mediating the large number of roles attributed to this general nuclear import receptor. With the exception of the NAD⁺-specific glutamate dehydrogenase, none of the interacting proteins contains a classical NLS motif, suggesting that their interaction with KapA⁵⁰ is either indirect or, if direct, it is mediated through a KapA⁵⁰ surface/residues other than that/those involved in binding classical NLSs.

We demonstrate that NapB, the likely *A. nidulans* orthologue of yeast Vps75p, is an specific interactor of KapA⁵⁰. NapB and Vps75p are members of the Nap/SET family of histone chaperones, which includes yeast Nap1p and its orthologues, conserved from fungi to humans (Park and Luger, 2006a), as well as metazoan SET proteins, to which we propose that NapB and Vps75p are related.

A putative role has been proposed for metazoan SET proteins in chromatin organization. Human SET recruits the cyclin-B–CDK1 complex to promote histone H1 modification (Canela et al., 2003). The role of SET proteins as histone chaperones and chromatin remodeling factors has been reported for *Plasmodium* PfNapS, whose highly acidic carboxyl terminus has been shown to be specifically involved in the recognition of H1, with other regions binding to H3/H4 with high affinity (Navadgi et al., 2006).

While the association of *S. cerevisiae* Nap1p with histones and its role as chromatin remodeling factor is well established (Park et al., 2005), the nucleosome assembly activity and the ability of Vps75p to bind histone H3/H4 tetramers has only recently been demonstrated (Selth and Svejstrup, 2007). In addition to its role as histone chaperone, *S. cerevisiae* Nap1p helps nuclear import of histones H2A and H2B. The NLS in Nap1p is recognized by Kap114p and Nap1p bridges a heteromeric complex containing histones and the Kap114p importin which increases the affinity of Kap114p for the H2A and H2B NLSs (Mosammaparast et al., 2002, 2005). Our finding that NapB shows nuclear localization in non-mitotic nuclei, when the Ran-dependent machinery is strictly required for nuclear import in *A. nidulans* (De Souza et al., 2004), raises the possibility that NapB and other SET proteins play a hypothetical role as nuclear import helpers. Histones would be obvious candidates for potential cargoes. Vps75p specifically binds the H3/H4 histone tetramer (Selth and Svejstrup, 2007), although neither the nature of the interaction nor its role in H3/H4 nuclear import has been determined. Other potential candidates are regulators of the cell cycle. Human SET prevents cell cycle progression at the G2/M transition by inhibiting cyclin B-CDK1 activity through its direct interaction with cyclin B and the CDK inhibitor p21^{Cip1} (Canela et al., 2003).

The absence in NapB, Vps75 and other SET proteins of the nuclear localization sequence that recognizes Kap114p in Nap1p and the fact that NapB does not interact *in vitro* with KapG, the *A. nidulans* Kap114p putative orthologue, strongly suggests that a different carrier mediates the nuclear import of the SET-like proteins. We show here that importin α is a strong candidate to be such a carrier, although the participation of other nuclear importers cannot be ruled out. All three putative KapA binding cargoes that have been characterized in *A. nidulans*, PacC, VeA, and StuA, contain consensus classical bipartite NLSs (De Souza et al., 2004; Fernandez-Martinez et al., 2003; Fontes et al., 2000; Stinnett et al., 2007; Suelmann et al., 1997). NapB has no apparent bi- or mono-partite classical NLS suggesting that studies on the interaction between NapB and KapA may provide with new insights on the recognition by importin α of its cargoes.

Like the *A. nidulans* cyclin-dependent kinases PhoA and PhoB and the chimaeric fusion protein StuA-NLS-GFP, NapB exits the nucleus in mitosis, when the nuclear pore complexes are partially disassembled (De Souza et al., 2004; Suelmann et al., 1997). This is in stark contrast with PacC, which we show to be retained in mitotic nuclei through its DNA binding ability. Thus, the fact that NapB exits the nucleus during mitosis strongly suggests that, during this process, NapB is not retained in this compartment by interaction with any nuclear component. In contrast, NapB remains nuclear in interphase when nuclear import is compromised, indicating that NapB binds a nuclear component, possibly chromatin. Involvement of the histone chaperone Vps75p in vacuolar protein sorting (Bon-

angelino et al., 2002) shows that this protein plays non-nuclear functions. The transient cytoplasmic localization of its *A. nidulans* orthologue NapB would help to explain its roles in different subcellular compartments.

The conclusion that importin α but not NapA and NapB is interacting with the B-type cyclin NimE is very suggestive in view of the fact that Nap (Nap1p) and SET proteins are interactors of mitotic B-type cyclins (Archambault et al., 2004; Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995). NimE is the orthologue of Clb2p and the only cyclin-B characterized in *A. nidulans* (O'Connell et al., 1992), although our unpublished work has revealed the existence of an additional cyclin B in the *A. nidulans* genome. Future work will reveal if NapA and NapB are able to interact with this as yet uncharacterized B-type cyclin and have a role in cell cycle regulation. NimE nuclear import has been shown to be dependent on the activity of NimA, one of the serine/threonine protein kinases required for the onset of mitosis, and also on SonA, the Gle2p/Rae1p orthologue (Wu et al., 1998). However, the exact transport mechanism has not been already elucidated. Interestingly, both Clb2p and Gle2p/Rae1p are interactors of importin α /SRP1p (Archambault et al., 2004; Murphy et al., 1996). The competition of NimE and NapB for binding to KapA suggests a highly speculative hypothesis, where nuclear import of NimE could be regulated via binding competition to the importin α by SonA, thus, attributing to *A. nidulans* importin α a dual role in both nucleocytoplasmic transport and mitosis regulation. Future work involving isolation of conditional mutations affecting KapA and impairing nuclear transport will be required for physiological studies of its putative cargoes and determination its role in *A. nidulans* cell cycle regulation.

Acknowledgments

We thank Dr. Dirk Görlich for plasmid pQE80zz, Dr. Stephen Osmani for plasmid pGFP and help with confocal microscopy, J.C. Sánchez for help with the phylogenetic analysis, Prof. Herbert N. Arst Jr. for critical reading of the manuscript, Leire Paz for *kapG* cDNA cloning and E. Reoyo for technical assistance, and the Ministerio de Ciencia y Tecnología for support through Grants BFU2006-04185 to E.A.E. and BIO2006-0556 to M.A.P. J.F.-M. and L.A.-B. held a PFPI and a FPU fellowship, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2007.08.003.

References

- Archambault, V., Chang, E.J., Drapkin, B.J., Cross, F.R., Chait, B.T., Rout, M.P., 2004. Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol. Cell* 14, 699–711.

- Bonangelino, C.J., Chavez, E.M., Bonifacino, J.S., 2002. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13, 2486–2501.
- Boulton, S.J., Jackson, S.P., 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* 17, 1819–1828.
- Canela, N., Rodríguez-Villarrupia, A., Estanyol, J.M., Diaz, C., Pujol, M.J., Agell, N., Bachs, O., 2003. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* 278, 1158–1164.
- Cove, D.J., 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 51–56.
- De Souza, C.P.C., Osmani, A.H., Hashmi, S.B., Osmani, S.A., 2004. Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 14, 1973–1984.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst Jr., H.N., Penalva, M.A., 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21, 1350–1359.
- Dong, A., Liu, Z., Zhu, Y., Yu, F., Li, Z., Cao, K., Shen, W.H., 2005. Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants. *Plant Physiol.* 138, 1446–1456.
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, J., Penalva, M.A., Espeso, E.A., 2003. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* 334, 667–684.
- Fontes, M.R., Teh, T., Kobe, B., 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J. Mol. Biol.* 297, 1183–1194.
- Fried, H., Kutay, U., 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1659–1688.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., Adam, S.A., 2004. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14, 505–514.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A., Hartmann, E., 1996. A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* 15, 1810–1817.
- Gorlich, D., Kutay, U., 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607–660.
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E., Corbett, A.H., 2003. The auto-inhibitory function of importin α is essential in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 5854–5863.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., Cullen, B.R., 1998. Determination of the functional domain organization of the importin α : a nuclear import factor. *J. Cell Biol.* 143, 309–318.
- Hood, J.K., Silver, P.A., 1998. Cse1p is required for export of Srp1p/importin- α from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 35142–35146.
- Hubner, S., Smith, H.M.S., Hu, W., Chan, C.K., Rihs, H.P., Paschal, B.M., Raikhel, N.V., Jans, D.A., 1999. Plant importin α binds nuclear localization sequences with high affinity and can mediate nuclear import independent of importin β . *J. Biol. Chem.* 274, 22610–22617.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O’Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Ishimi, Y., Kikuchi, A., 1991. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 7025–7029.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., Kadonaga, J.T., 1996. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3112–3124.
- Kellogg, D.R., Kikuchi, A., Fujii-Nakata, T., Turck, C.W., Murray, A.W., 1995. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J. Cell Biol.* 130, 661–673.
- Kellogg, D.R., Murray, A.W., 1995. NAP1 acts with Clb2 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* 130, 675–685.
- Kobe, B., 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat. Struct. Biol.* 6, 388–397.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150–163.
- Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A., Fink, G.R., 1995. The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7647–7651.
- Marheineke, K., Krude, T., 1998. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 273, 15279–15286.
- Matsuura, Y., Stewart, M., 2004. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432, 872–877.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Diez, E., Penalva, M.A., 2001a. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1688–1699.
- Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., Gorlich, D., 2001b. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20, 3685–3694.
- Miyaji-Yamaguchi, M., Kato, K., Nakano, R., Akashi, T., Kikuchi, A., Nagata, K., 2003. Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6672–6684.
- Moore, M.S., 2003. Npap60: a new player in nuclear protein import. *Trends Cell Biol.* 13, 61–64.
- Mosammaparast, N., Del Rosario, B.C., Pemberton, L.F., 2005. Modulation of histone deposition by the karyopherin kap114. *Mol. Cell Biol.* 25, 1764–1778.
- Mosammaparast, N., Ewart, C.S., Pemberton, L.F., 2002. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* 21, 6527–6538.
- Mosammaparast, N., Jackson, K.R., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F., 2001. Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J. Cell Biol.* 153, 251–262.
- Murphy, R., Watkins, J.L., Wente, S.R., 1996. GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. *Mol. Biol. Cell* 7, 1921–1937.
- Navadgi, V.M., Chandra, B.R., Mishra, P.C., Sharma, A., 2006. The two *Plasmodium falciparum* nucleosome assembly proteins play distinct roles in histone transport and chromatin assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 16978–16984.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., Oakley, B.R., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H., 2004. From the cover: highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12248–12253.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217.
- O’Connell, M.J., O’Connell, M.J., Osmani, A.H., Osmani, A.H., Morris, N.R., Morris, N.R., Osmani, S.A., Osmani, S.A., 1992. An extra copy of nimE/cyclinB elevates pre-MPF levels and partially suppresses mutation of nimTcdc25 in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 11, 2139–2149.
- Orejias, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst Jr., H.N., Penalva, M.A., 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.
- Osmani, A.H., Davies, J., Liu, H.L., Nile, A., Osmani, S.A., 2006. Deletion and mitotic localization of the nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, E06–E07.

ARTICLE IN PRESS

14

L. Araújo-Bazán et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2007) xxx–xxx

- Park, Y.J., Luger, K., 2006a. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem. Cell Biol.* 84, 549–558.
- Park, Y.J., Luger, K., 2006b. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1248–1253.
- Park, Y.J., Chodaparambil, J.V., Bao, Y., McBryant, S.J., Luger, K., 2005. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.* 280, 1817–1825.
- Penalva, M.A., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975.
- Penalva, M.A., Arst, J., 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 425–451.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., DeFranco, D.B., 2004. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell. Signal.* 16, 857–872.
- Rogner, U.C., Spyropoulos, D.D., Le Novere, N., Changeux, J.P., Avner, P., 2000. Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. *Nat. Genet.* 25, 431–435.
- Selth, L., Svejstrup, J.Q., 2007. VPS75—a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *J. Biol. Chem.*
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M., Goldfarb, D.S., 1996. In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J. Cell Biol.* 135, 329–339.
- Song, J.Y., Lim, J.W., Kim, H., Morio, T., Kim, K.H., 2003. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J. Biol. Chem.* 278, 36676–36687.
- Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L., Calvo, A.M., 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63, 242–255.
- Suelmann, R., Sievers, N., Fischer, R., 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25, 757–769.
- Takenaka, I.M., Leung, S.M., McAndrew, S.J., Brown, J.P., Hightower, L.E., 1995. Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 19839–19844.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zisman, J.H., Lockington, R.A., Davies, R.W., 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221.
- Tran, E.J., Went, S.R., 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041–1053.
- Weis, K., Ryder, U., Lamond, A.I., 1996. The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* 15, 1818–1825.
- Wu, L., Osmani, S.A., Mirabito, P.M., 1998. A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 141, 1575–1587.
- Xiang, X., Zuo, W., Efimov, V.P., Morris, N.R., 1999. Isolation of a new set of *Aspergillus nidulans* mutants defective in nuclear migration. *Curr. Genet.* 35, 626–630.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C., Dou, X., Perez-Balaguer, A., Osmani, S.A., 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1359–1362.
- Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., Boone, C., Emili, A., Houry, W.A., 2005. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 120, 715–727.