



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Onddo harizpitsuen garapenaren
erregulazioan parte hartzen duten
transkripzio faktoreen
dinamika zelularra**

*Ainara Otamendi, Elixabet Perez-de-
Nanclares-Arregi,
Elixabet Oiartzabal, Marc S. Cortese,
Eduardo A. Espeso eta
Oier Etxebeste*

145-152 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.05.20>



Onddo harizpitsuen garapenaren erregulazioan parte hartzen duten transkripzio faktoreen dinamika zelularra

Otamendi, Aina¹; Perez-de-Nanclares-Arregi, Elixabet¹; Oiartzabal, Elixabet¹; Cortese, Marc S.¹; Espeso, Eduardo A.²; Etxebeste, Oier^{1*}

¹*Biochemistry II laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, 20018 San Sebastian.*

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

E-mail: otamendiainara@gmail.com

Laburpena

Hainbat zelula mota hazkuntza polarizatuaren bidez hazten dira, besteak beste neurona, polen-hodi eta harizpi itxurako onddoen hifak. Zelula horiek noranzko bakar batean asimetriki hazten dira, luzatzen ari diren hodien itxuraz. Zelulen hazkuntza gunea kanpo inguruarekin kontaktu zuzenean dago, eta estimulu bat jasotzean informazio hori nukleora iritsi eta beharrezko erantzuna emateko transdukzio mekanismo konplexuak garatu behar izan dituzte zelula mota horiek. Izan ere, polarizazioaren ondorioz, zelula hazi ahala hazkuntza gunea eta nukleoen arteko distantziak areagotzen doaz. Ondorengo lerroetan, harizpi itxurako *Aspergillus nidulans* onddoan era honetako transdukzio lanetan diharduen FlbB transkripzio faktorearen dinamika aztertuko da, espora asexualen ekoizpena erregulatzen duena.

Hitz gakoak: Harizpi itxurako onddoa, hazkuntza polarizatua, garapen asexuala, transkripzio erregulatuak, transdukzio mekanismoak.

Abstract

*Multiple cell types, such as neurons, pollen tubes and hyphae of filamentous fungi grow by polarized extension as elongated tubes. The cell growth region, or polarity site, receives external information in the form of different stimuli. However, nuclei are the cellular compartment where the response to those stimuli must be triggered. Permanent polarization causes an increase in the distance between polarity sites and nuclei, making the transduction of signals difficult. Therefore, polarized cells have developed sophisticated transduction mechanisms to overcome it. In this work, we will analyze the polarity site-to-nucleus dynamics of the transcription factor FlbB in fungus *Aspergillus nidulans*. This regulator controls developmental transitions and the production of asexual spores.*

Key words: filamentous fungus, polarized growth, asexual development, transcription regulators, transduction mechanisms.

1. Sarrera eta motibazioa

Espezie ororen bizirautea bermatuko bada, bizi den ingurunera egokitu beharra du. Ingurugiroko aldaketetara hobekien moldatzeko gaitasuna duten espezieek aurrera begira ebolutiboki jarraipen aukera gehiago izango dute. Moldagarritasun eta egokitzapen hau bermatzeko hainbat mekanismo desberdin garatu dira.

Izaki bizidunen historian zelulaniztasunaren agerpena mugarri izan da. Zelulaniztasun sistema konplexuak antolaketa biologiko maila gorenaren eredu direla esan ohi da, zelulen arteko komunikazio eredu berriak garatu behar izan direlarik. Hain zuzen, eboluzioan 5 momentutan soilik agertu da zelulaniztasun konplexua, eta horietako bat onddoetan (Nagy et al, 2018). Antolaketa konplexuen agerpenak zelulen arteko elkarkidetzaren erroka berriak ekarri baditu ere, ingurura egokitzeko eta hedatzeko abantailak ere eskaini dizkie organismo horiei.

Harizpi itxurako onddoen espezie batzuk gai dira inguruko estimulu jakinen aurrean beren patroia genetikoa aldatu eta konidioforo deritzen egitura asexual zelulanitzak garatzeko. Onddoak, ingurura nahiz habitat berrietara zabaltzeko baldintza egokiak direla antzematean, ordura arte polarizazioz luzeka hazten joan diren zelulek, hifa izenez ezagunak, hazkuntza eten eta ugalketa asexualari leku emango diote (Adams et al., 1998). Bertan, eratuko diren konidioforo egitura tridimentsional konplexutatik, milioika espora asexual (konidia izenekoak) ekoitziko dira. Espora horiek dira, hain zuzen, onddoaren infekzio eta nitxo berrietara hedatzeko mekanismo nagusia (Ugalde et al., 2014). Esporen erretzeak norbanako berrien hazkuntzari emango dio hasiera, onddoaren bizi zikloa berrabiaraziz.

Inguruko baldintzen aurrean harizpi itxurako onddoek erakusten duten egokitzapen eta patroia genetikoaren birmoldaketa gaitasuna onddoaren hedatze eta infekzio azkartasunaren gako dira. Onddo horien artean hainbat espezie patogeno aurki ditzakegu. Landare ugariaren patogeno izaki, munduko labore uzta ugariaren hondatzea eragiten dute. Urtero, onddoen eraginez, 500 milioi pertsona baino gehiagoren elikagai beharrak asetzeko adina jaki galtzen dela kalkulatu da (Fisher et al., 2012). Bestalde, pertsonen osasuna ere arriskuan jartzeko gai dira, heriotza bera ere ekar dezaketelarik. Txanponaren beste aldean baina, beste zenbait espezie industrialki baliatzen dira intereseko hainbat produkturen ekoizpenerako (azido organikoak, antibiotikoak, etabar). Osasun eta ekonomia interesek onddo harizpitsuen biologiarren ikerketa bultzatu dute.

Jakintza biologikoaren mugak hedatzeko nahiak berak ere harizpi itxurako onddoak jomugan jarri ditu oinarritzko ikerketaren mailan. Izan ere, organismo hauen zelula karakteristikoak diren hifak, neurona eta polen-hodien antzera, polarizazioz hazten dira; hau da zelulak noranzko bakarrean hazten dira. Historikoki, *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoa hazkuntza polarizatua eta garapen prozesuak aztertzeko tresna baliagarria bilakatu da, besteak beste laborategi eskalan manipulatzeko erraza baita, eta gertuko beste espezie batzuk ez bezala ez da patogenoa.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Harizpi itxurako onddoen bereizgarri nagusietako bat zelulen hazkuntza polarra da. Zelula, polarizazio puntu batetik abiatuz hodi bat balitz bezala hazten da, polarizazio edo hazkuntza gune hori hodiaren muturrean mantentzen delarik. Onddoen kasuan egitura luzexka hauei hifa deritze eta elikagaien bila hazten dihardute ingurugiroko baldintzek aurkakorik eragin ezean.

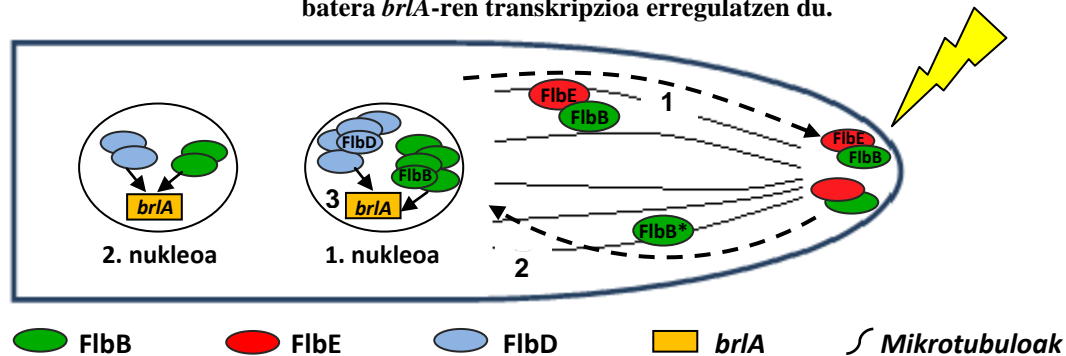
Hifen hazkuntza lekua (punta izenez ezagutzen dena) da substratu berria kolonizatzen lehena, eta ondorioz, kolonizatzaera doan sustratoari buruzko informazioa jasotzen duen lehena. Aldiz, jasotako estimuluen aurrean onddoak beharrezko transkripzio erantzuna emateko informazioak nukleora iritsi behar du. Beraz, puntaren eta nukleoen (*A. nidulans*en kasuan, hifak egitura nukleoanitzak dira) arteko komunikazioa ezinbestekoa eta etengabekoa izango dela pentsa daiteke. Baina polarizazioak berak, hifaren punta, prozesu biologikoen kontrola eta garapen aginduak ematen diren gunetik, nukleotik alegia, urrunago egotea eragiten du. Orokorrean, hazkuntza polarizatua duten zelulek bi gune horien aldentzeak eragiten dituen mugei aurre egiteko seinaleen transdukzio mekanismo konplexuak garatu dituzte, distantzia erlatiboki luzeak abiadura azkarrean gainditzeko gai direnak. Neuronetan, transkripzio faktore (TF: geneen adierazpena erregulatzen duten proteinak) ugari dihardu era honetako distantzia luzeak komunikazio lanetan. Neuronen adibideari jarraiki, hazkuntza eremutik informazioa nukleora zuzenean garraiatzen duten TF-ak ere badaude onddo harizpitsuetan, nukleoa kanpo seinaleei erantzun egokia eman ahal izateko dagokien geneen adierazpena erregulatuko dutelarik.

Onddoetan seinale jakinek (airearekiko hifen kontaktuak, zenbait estres motek, etabar) ugalketa asexuala, eta ondorioz, esporen sintesia eragiten dute. *A. nidulans*-en kasuan, konidioforo izena dute ekoizten diren egitura asexualek eta bakoitza 10000 espora asexual izatera iritsi daiteke. Horretarako, aipatutako estimulu horiei dagokien “aginduek” nukleora iritsi behar dute eta *A. nidulans* bezalako onddoetan, nukleoa *brlA* genearen transkripzioa aktibatu behar da (Adams et al., 1998). Ugalketa asexuala kontrolatzen duten geneak bi bide

genetikotan taldeka daitezke. Bigarrena konidioforoa osatuko duten zelula mota gehien sintesia kontrolatzen duen gene taldea da, CDP (*central developmental pathway*) akronimoarekin ezagutzen dena. Bidezidor honen lehen genea da, hain zuzen, *brlA*, eta konidiaziolari hasiera emango bazaio gene honen aktibazioa ezinbestekoa da; fase asexualaren mugarria dela esan liteke, beraz.

Lehen bide genetikoan, aipatutako seinaleei erantzunaz, *brlA*-ren transkripzioa aktibatu ala ez erabakitzen duten geneak taldekatzen dira. UDA (upstream developmental activation) akronimoa erabiltzen da bide genetiko hau izendatzeko. Bertan kokatzen da FlbB TF-a, *A. nidulans*-en hifen puntan aurkitzen dela ezagutzen den lehen TF-a (Etxebeste et al., 2008).

1. irudia. Hifa zelula polarizatu baten eta FlbB TF-aren dinamikaren irudikapena. 1) FlbB/FlbE konplexuaren garraio akropetala hazkuntza lekurantz. 2) Kanpo seinalaren bati erantzunez, FlbB-ren garraio basipetala nukleoetara. 3) FlbBk, nukleora iristean, FlbD izeneko bigarren TF batekin batera *brlA*-ren transkripzioa erregulatzen du.



Edozein proteinak, lan honetan aztertutakoak barne, zelula barnean duen lokalizazioa eta dinamika aztertzeko proteina horiek epitopo jakin batez etiketatzen dira. Epitopo edo etiketa horren ezaugarri nagusia fluoreszentzia emititzea da, honela, fluoreszentzia mikroskopio baten laguntzaz, etiketatutako proteina zelula barruan non kokatzen den ikus daiteke. FlbB-ren kasuan, mikroskopioaz behatzean bi lokalizazio nagusi ikus daitezke. Batetik, eta kontutan hartuta TF bat izanda geneen adierazpena kontrolatu behar duela, hifen nukleoetan pilatzen da. Baina, hazkuntza lekutik gertuen dauden nukleoetan detekta daiteke bakarrik, puntatik urrundu ahala fluoreszentzia nuklearraren intentsitatea ahultzen doalarik (Etxebeste et al., 2008). Bestetik, hifen hazkuntza lekuan, puntan, ere pilatzen dela ikusi da. Lokalizazio bikoitz honek FlbBk seinaleen transdukzioan izan zezakeen rola sakonago aztertzea eraman zuen gure ikerketa taldea. Besteak beste, *flbB* genea genomatik ezabatzean ($\Delta flbB$ anduaia), proteina hori ekoizteko ezintasunak onddoaren konidiazioa, esporen produkzioa, inhibitzen du. Onddoak kotoi itxura hartzen du, *fluffy* fenotipo bezala ezagutzen dena.

Hifen hazkuntzan zehar FlbB puntan aurkituko bada ezinbestekoa du FlbE deritzon UDA bide genetikoko proteina baten esku-hartzea (ikus 1go irudia). Proteina honen gabeziak FlbB-ren deslokalizazioa dakar puntatik eta, aldi berean, onddoaren konidiatzeko ezintasuna. Are gehiago, aurreko lanetan frogatu da FlbE bidezko FlbB-ren kontzentrazioa puntan ezinbestekoa dela gerora nukleoan *brlA* aktibatzeke eta esporen sintesia eragiteke (Herrero-García et al., 2015).

FlbB puntan dela, ezezaguna den arrazoi edo estimuluren baten eraginez, puntatik askatu eta nukleorako bidea egiten du seinalearen berri ematera. Bertan TF gisa *brlA*-ren adierazpena erregulatzen du. Alabaina, nukleoan pilatzeko FlbD deritzon (Garzia et al., 2010) bigarren TF baten bitartekaritza beharrezkoa da (ikus 1. irudia).

Beraz, FlbB-ren erregulatuzaile aktibitatea zelula barneko bere lokalizazio eta dinamikaren menpe dago. Eta aldi berean, FlbB-ren dinamika, FlbE eta FlbD-k, eta ziurrenik beste proteina batzuek kontrolatzen dute. Lan honen helburua FlbB-ren dinamikak seinaleen transdukzio mekanismoan eta garapenaren kontrolean jokatzen duen rola argitzen laguntzea da. Horretarako, *A. nidulans* onddoan modu estandarrean erabiltzen diren biologia molekularreko hainbat teknika

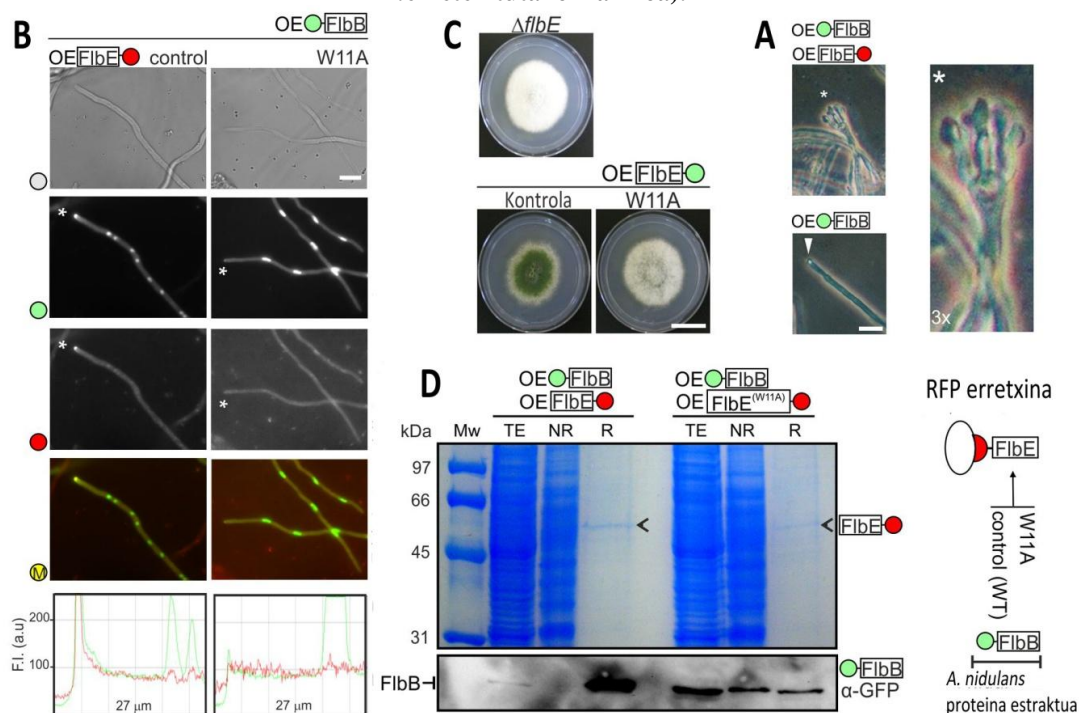
(proteinen etiketatzea, gene jakinen ezabatze edo delezioa, edo mutazio puntualak txertatzea, esaterako) erabili da.

3. Ikerketaren muina

3.1 FlbB-ren garraio akropetala (puntaranzko garraioa eta lokalizazioa)

Aurrez iada egindako ikerketek FlbB eta FlbE arteko harreman funtzional estua iragartzen zuten (Garzia et al. 2009). Adibidez, *flbE* genea genomatik ezabatzean (FlbE proteina ez da sintetizatzen), FlbB ez zen puntara ailegatzen eta, ondorioz, esporen sintesia inhibitu egiten zen (Garzia et al., 2009). Kontrako aldean, FlbE proteinaren kontzentrazioa areagotzearen (gainadierazpena) FlbB-ren puntako kontzentrazioa ere handitzen zen, kultibo baldintza espezifikotan espora asexualen sintesia eraginez (ikus 2A irudia; Otamendi et al., ebaluzioan). Beraz, FlbB-k hifen puntan duen kokapena FlbE-ren kontzentrazioarekin zuzenki lotuta dago.

2. irudia. A) *gpdA*(gainadierazpena)::FlbE::RFP; *gpdA*::GFP::FlbB anduiaren fluoreszentzia mikroskopio irudiak, FlbE/B-ren lokalizazio subzelularra ikus daiteke kontrol eta FlbE(W11A) fondo mutatuan. Fondo mutatuan FlbB (GFP epitopo berdeaz) eta FlbE-ren (RFP epitopo gorriaz) fluoreszentzia apikalak galdu egiten dira. Eskala barra= 10µm B) $\Delta flbE$, WT (andui basatia) eta *gpdA*::FlbE(W11A) anduien fenotipoa medio solidoan. Eskala barra= 5µm C) *gpdA*::FlbE::RFP; *gpdA*::GFP::FlbB anduiaren fenotipoa 26 orduz medio likidoan hazten egonda. Konidioforoen goiztiarren eraketa ikus daiteke eskubiko irudian. Eskala barra= 2cm. D) Pull-down esperimentuak *gpdA*::FlbE::mRFP edo *gpdA*::FlbE(W11A)::mRFP proteinak amu gisa erabilia. Forma mutantearen kasuan, GFP::FlbBren immunodetekzioa nabarmenki txikitzen da R frakzioan (TE:erauzkin totala; NR: eluitutako frakzioa; R:erretentitutako frakzioa).



Bi proteinen arteko hartu-emana hobeto ulertu nahian FlbE-ren parte hartzea ikertu nahi izan da. Azterketa bioinformatiko desberdinak erabiliz, FlbE proteinaren sekuentziaren barruan eremu desberdinak daudela ikusi da. Eremu horietako bakoitzak FlbB eta FlbE-ren puntako lokalizaziorako duen garrantzia aztertzeke, banan banan mutatu egin ziren. Eta sortutako andui mutante bakoitzaren fenotipoa eta bi proteinen lokalizazio subzelularra aztertu ziren (ikus 2. irudia, B eta C atalak). Lokalizazioa aztertzeke fluoreszentzia mikroskopioa erabili zen beste behin, horretarako bi proteinak epitopo banaz etiketatu ziren; FlbB GFP-rekin (irudian berdez adierazia) etiketatu zen eta FlbE, berriz RFP-z (gorri koloreaz irudian). Eremu zehatzetako

aminoazidoak mutatzek onddoaren konidiazioa kaltetzen du, ia kasu guztietan, FlbB/E puntatik desagertu izanaren ondorioz. Honek guztiak FlbE-ren zenbait eremuko prozesu hauetan duten garrantzia uzten du agerian.

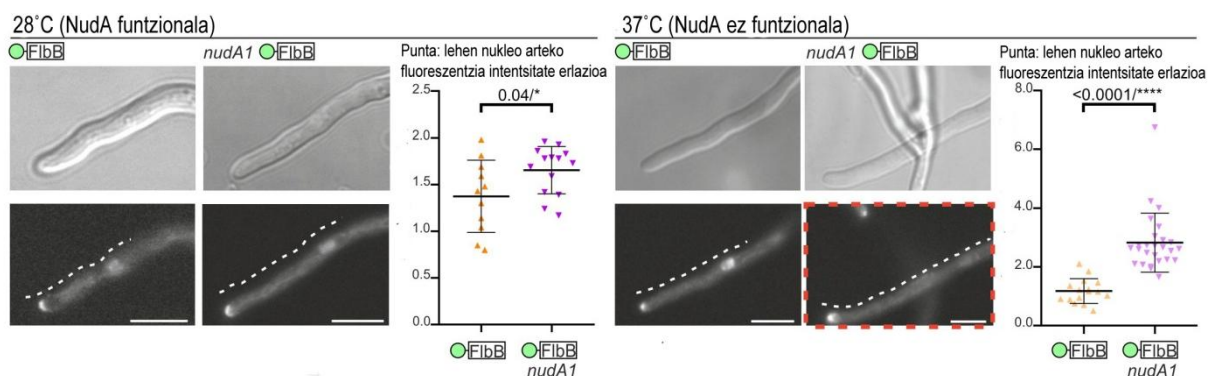
Aztertutako FlbE-ren eremuen artean azpimagarrietako bat E1 eremua dugu, FlbE-ren lehen 33 aminoazidoek osatzen dutena. Zenbait plataforma bioinformatikok proteina batek izan ditzakeen funtzioak proposatzen dituzte, aminoazido sekuentzien irakurketaz. FlbE-ren kasuan funtzio predikzioek E1 eremuan seinale peptido bat egon litekeela aurrezaten dute. Seinale peptidoa daramaten proteinak, orokorrean, erretikulu endoplasmatikora bideratu ohi dira (eta handik gehienetan Golgiren aparatura). FlbE-ren E1 eremuko mutantea (W11A) akonidiala zen, FlbE/Bren puntako lokalizazioaren galteraren ondorioz (ikus 2. irudian B eta C).

FlbE-ren zenbait aldaera mutanteak FlbB-ren puntako lokalizazioaren galera eragiten dutenez, TF-k puntarako bidea FlbE-rekin elkarturik egiten duela pentsa liteke. Horrek bi proteinen arteko interakzioa ekarriko luke, ziurrenik. Ustezko elkarrekintza hori frogatu nahian proteina-proteina immunoprezipitazio saiakuntza burutu ziren. *Pull-down* esperimentu hauek, aztertu nahi den proteina amu gisa erabilia, erretentituta geratu diren proteinen azterketa ahalbidetzen dute. Gure kasuan FlbE-ri tiraka, honek FlbB heltzeko gaitasuna duela frogatu zen, erretentitutako frakzioan FlbB detektatu ahal izan baita. Gainera, ikusi zen FlbE-ren E1 eremua ezinbestekoa dela interakzio horretan; izan ere, E1 eremuaren W11A mutazioaz elkarrekintza nabarmenki ahuldu egiten zen (ikus 2D irudia). Baina, sortutako beste andui mutante batzuen analisiak erakusten du, beharrezko izanagatik, E1 eremua ez dela nahikoa FlbB-ren puntako lokalizazioa bermatzeko, eta beste eremu batzuk ere ezinbesteko direla (Otamendi et al., ebaluazioan).

3.2. FlbB –ren garraio basipetala (punta-nukleo garraioa)

Behin FlbB puntan dela kanpo baldintzak egokiak direnean FlbB atzera bueltan nukleoranzko bidea abiatzen du zitoplasman zehar. Zelula barruan mikrotubuluek (MT), harizpi itxurako egitura proteikoek, hainbat elementu subzelularren garraioan dihardute. Hori horrela MT-en parte hartzearen aukera esku artean, MT-etan zehar garraio lanetan diharduen dineina proteina motoreak FlbB-ren garraioan izan zezakeen rola aztertzea erabaki zen. Izan ere, dineinak tren bagoi funtzioa du nolabait esateko, MT-ak trenbideko erraiak izaki, horiei segika “bidaiariak” garraiatzen ditu MT-en hasierarantz. Lan honetarako dineina proteinen osagai den NudA oinarri hartuta (Xiang X. et al, 1994), *nudA1* mutazio termo-sentikorra duen andui FlbB-ren lokalizazioa aztertu zen. Mutazio termo-sentikorra dela esaten da tenperaturaren baitan NudA funtzionala (28 °C) edo ez-funtzionala (37° C) izango baita andui mutante honetan.

3. irudia. GFP::FlbB-ren lokalizazio subzelularra *nudA1* mutazio termo-sentikorra duen andui mutantean. (Ezker aldean) 28°C-tan, tenperatura permisiboa izaki, NudA funtzionala da eta FlbB puntan nahiz nukleoan ikus daiteke. (Eskuin aldean) 37°C-tan, tenperatura errestriktiboan alegia, FlbB puntan kokatzen jarraitzen du baina, nukleoan jada ez da begiztatzen.



28°C-tan oraindik, tenperatura permisiboa izaki (NudA1 funtzionala da), bai erreferentzia anduian baita mutatuan ere ikus daiteke FlbB nukleoan. Aldiz, 37°C-tara igotzean tenperatura errestriktibora ailegatuko ginatke, non *nudA1* mutazioaren eraginpean aurkitzen da onddoa eta

FlbB ez da nukleoetan pilatzen (ikus 3. irudia). Beraz puntatik nukleorako FlbB-ren garraioa inhibitu du NudA proteinaren inaktibazioak. Honek pentsatzera garamatza dineina proteina motorea beharrezkoa dela FlbB-ren garraio basipetalean. Dineinaren parte hartzea eta aurre lanetan deskribatutako MT-en beharra bat datoz aurkeztutako nukleoranzko garraio ereduarekin.

3.3. FlbB-ren akumulazio nuklearra eta transkripzio funtzioa

Esan bezala, kanpo seinaleen aurrean onddoak eman beharreko erantzuna nukleoan gorpuzten da, beharrezko geneen adierazpena erregulatuz. Kasurako FlbB-k estimulu ezezagunek bultzatuta *brlA*-ren transkripzioa erregulatzen du konidiazioa ahalbidetzeko. Baina transkripzio funtzioa bete dezan FlbB-k nukleora sartu behar du. Horretarako baina, ezinbestekoa du cMyb motako bigarren TF baten, FlbD-ren (Garzia et al., 2010), aktibitatea. Bestalde, FlbD bera ere TFenez, *brlA*-ren transkripzioaren erregulazioan hartzen du parte (Wieser et al., 1995). FlbD proteina sintetizatzeke gai ez den andui batean, $\Delta flbD$ anduia, alegia, FlbB ez da nukleoan pilatzeko gai eta zitoplasman geratzen da aurrera eta atzera mugitzen, nora joanik ez balu bezala (Otamendi et al., ebaluazioan). FlbB nukleora iristen ezenez, onddoak ez du esporarik ekoizten.

FlbD proteinaren parte-hartzea hobeto ulertu nahian, zelula barruan duen lokalizazioa eta proteina beraren adierazpena aztertu nahi izan ziren. Horretarako, HA_{3x} nahiz GFP epitopoez FlbD etiketatzen saiatu izan gara. Baina HA_{3x}-az etiketatzean proteinaren ertz bat nahiz bestea, C- terminala edo N-terminala, onddoaren konidiazio gaitasuna partzialki kaltetzen da (ikus 4 irudia). Aldiz, eta bitxia dirudien arren, GFP etiketaz (HA_{3x} etiketa baino 9 aldiz luzeago dena) ez da horrelakorik gertatzen.

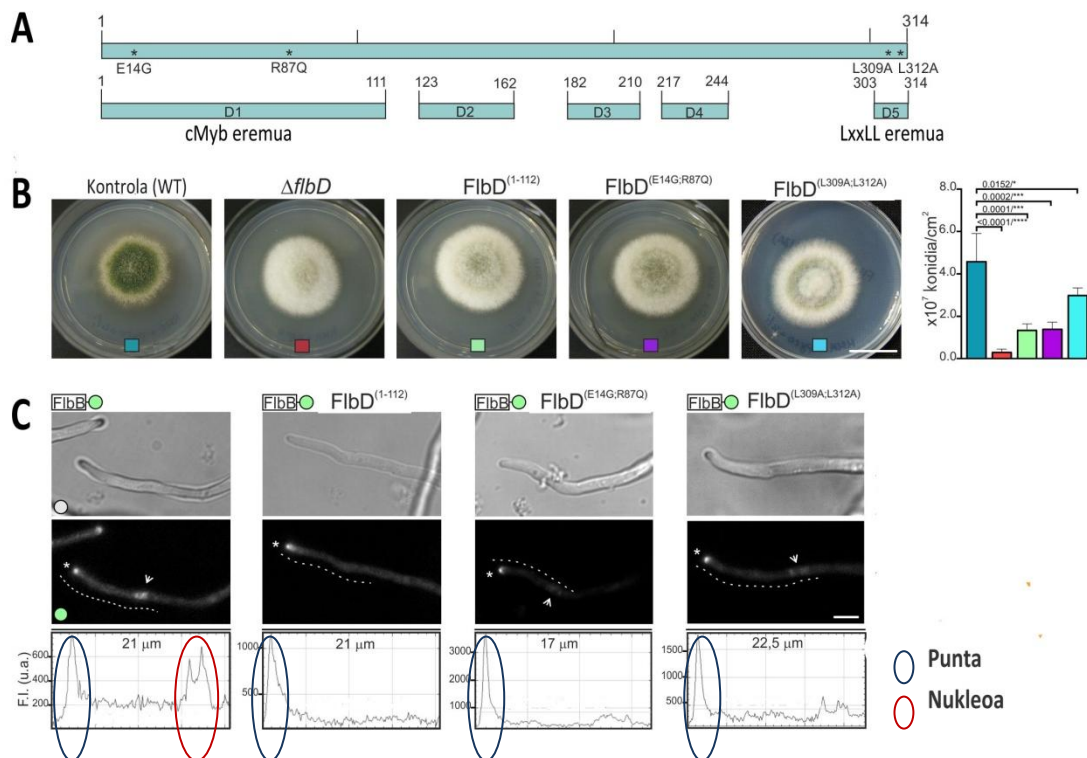
Proteinen etiketatzeak sarritan arazoak ekar ditzake, proteina beraren funtzioa oztopatu baitezake. Izan ere, proteinak bere ez duen “motxila” bat lotu zaio gainean eta gehiegizko “zama” ekar liezaioke. Gure kasua izan zitekeelakoan, FlbD proteinaren eremuen azterketa bioinformatikoari ekin zitzaion. Analisi informatiko hauek hurbileko espezieetan FlbD proteinaren baliokideak izan daitezkeenak, ortologoak, bilatzen dituzte eta *A nidulans* beraren FlbD-ren sekuentziarekin alderatzen dituzte. Aminoazido sekuentzien konparaketa honetan eremuren bat espezie desberdinetan asko errepikatzen bada eremu hori oso kontserbatuta dagoela esan ohi da. Domeinu kontserbatueneke sarritan funtzio jakin bati erantzuten diote, eta horregatik ebolutiboki kontserbatzen joan dira espezie batetik bestera. FlbD-ren azterketak hainbat eremu kontserbatu hauteman ditu, baina bereziki bi eremu nabarmentzen dira kontserbazio altuagatik (ikus 4. irudia A). Hain justu, proteinaren bi muturretan aurkitzen dira eremu horiek. N-terminalean cMyb (DNA-ri lotzeko domeinua) dago eta C-terminalean aminoazido sekuentzia labur (LxxLL) bat. Analisi bioinformatikoekin jarraituz, hauek C-terminaleko sekuentzia labur horrek errezeptore nuklearrekin lotzeko gaitasuna eman dezakeela proposatzen dute.

FlbD-ren bi ertzetako domeinuak proteinaren funtzionalitatean izan dezaketen eginkizuna aztertze aldera, eremu horietan mutazioak eragin ziren. cMyb eremuari dagokionez, bi andui sortu ziren. Batek, FlbD(1-112) forma trunkatua, cMyb eremuari soilik dagokion proteina zatia, adierazten du. Besteak, FlbD(E14G,R87Q) cMyb eremuan mutante puntuala den forma adierazten du. Bestalde, C-terminaleko LxxLL sekuentzia ere mutatu zen, FlbD(L309A; L312A) forma sortuz. Mutante orotan, erreferentziatzeko andui basatiarekin alderatuz, konidia produkzioa nabarmen txikiagoa da (ikus 4. irudia B), eta FlbB-ren lokalizazio nuklearra ere kaltetu egin da, fluoreszentsia intentsitatea modu esanguratsuan jaisten delarik eremu horretan (ikus 4. irudia C). Ondorioz, esan genezake cMyb nahiz ustezko LxxLL eremuek eginkizun garrantzitsua betetzen dutela FlbB-ren kokapen nuklearrean.

Bi muturreko eremuen garrantziak azal lezake, beraz, FlbD HA_{3x}-az etiketatzean anduiaren konidiazio gaitasuna txikiagotzea, proteinaren funtzionalitatea kaltetzen ari baita. Honek, baina, ez luke argituko zergatik GFP etiketarekin ez dugun halako efekturik antzematen. Baliteke GFP etiketarekin, HA_{3x} bera baino handiagoa izaki, FlbD::GFP proteina ezegonkorra izatea eta proteinaren degradazioa gertatzea.

Hipotesi hori baieztatu edo ezeztatzeko HA_{3x}::FlbD::GFP etiketa bikoitzadun FlbD-ren forma adierazten duen anduia sortu zen. Proteina erauzkin totaletatik HA_{3x} etiketa daramaten proteinak detektatzen dira immunodetekzioz, hauen gutxi gorabeherako tamaina ere jakin daitekeelarik. Kasu honetan bi banda bereizten ziren. Alde batetik, konstrukzio osoari zegokiona (HA_{3x}::FlbD::GFP), eta bigarrena HA_{3x}::FlbD-k edukiko lukeen tamainari zegokiona. Beraz, badirudi neurri batean GFP-ren degradazioa gertatzen dela, GFP-z etiketatzeak anduiaren fenotipoan aldaketarik zergatik ematen ez den azalduz.

4. irudia. A) FlbD proteinaren eremu analisia. Bost eremu (D1,D2,D3,D4 eta D5) ortologoetan oso kontserbatuta daude, baina bereziki D1 eta D5. Azken bi eremu horien azterketarako egindako aminoazido aldaketak ere azaltzen dira. **B) Andui basatia (WT), $\Delta flbD$, FlbD(E14G,R87Q), FlbD(1-112) eta FlbD(L309A; L312A) formak adierazten dituzten anduiaren fenotipoa medio solidoan.** Andui mutanteek konidia ekoizpen txikiagoa aurkezten dute. Eskala barra = 2 cm. **C) FlbB::GFP-ren kokapen subzellularra WT, FlbD(E14G,R87Q), FlbD(1-112) eta FlbD(L309A; L312A) anduietan.** Erreferentziako anduiarekin alderatuta andui mutanteetan FlbB-ren fluoreszentzia nuklearra jaitsi egin da. Eskala barra = 5 μ m.



4. Ondorioak

FlbB-ren garraio akropetalari dagokionez, puntarako bidean, FlbE-ren zenbait eremu ezinbestekoak dira. Eremu horien artean E1 eremua dago, azterketa bioinformatikoez seinala peptido bezala identifikatzen dutena. E1 eremu hori ezinbestekoa da baina aldi berean ez da nahikoa FlbBren garraio akropetala eman dadin (beste eremu batzuk ere behar dira). Puntan kokatu ostean, seinaleen transdukzioa burutu ahal izateko, FlbB-k MT-gaineko dineina motore molekularren bidezko garraioa behar du nukleora iristeko. Azkenik, FlbB nukleoan mantentzeko beharrezko du FlbD-ren parte-hartzea. Honetarako, FlbD-ren bi ertzetako eremuak, cMyb (amino ertza) eta LxxLL (karboxilo ertza), beharrezkoak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

FlbB-ren dinamikarako beharrezko diren partaide guztiak oraindik ere ezagutzen ez ditugunez, horien identifikazio eta ezaugarritzea izango da etorkizuneko helburuetako bat. FlbB-k hifen puntaranzko bidean FlbE-ren presentzia ezinbestekoa du, FlbE-FlbB konplexua

osatur. Baina, FlbE-z gain, elementu ezezagun gehiagoren parte-hartzea beharrezko izan liteke. FlbE-ren E1 eremuko ustezko peptido seinaleak besikula bidezko garraio posible bat proposatzera garamatza ER-Golgi sistematik barrena. FlbB/E konplexuaren interaktore posibleen identifikazioak garraio horretan beharrezko lirategen proteinak ezagutu eta ezaugarritzeko aukera emango liguke.

Nukleora bueltako garraioa dineinaz eta MT-z ematen dela iradoki da. Baina, FlbB dineina-bidezko garraio mekanismora nola lotzen den edo zein bitartekarik hartzen duen parte oraindik erantzuteko dago. Garraio basipetalaren azken urrats gisa badakigu FlbD beharrezkoa dela FlbB nukleoratzeko eta *brlA*-ren transkripzioari ekiteko, baina oraindik ez dakigu FlbD-ren jarduna FlbB-kiko zehazki zein den. Bien arteko harreman funtzional zehatza argitzeke dago. Bi aukera mahairatu izan dira; batetik, lehen urrats batean FlbD-k FlbB nukleora sartzea bideratuko luke eta gerora lotuko lirategen bi proteinak *brlA*-ren sustatzailerara (*pbrlA*) gene honen adierazpena erregulatzen. Proposatzen den bigarren aukeran, lehenik FlbD lotuko litzateke esandako sustatzailerara, ondoren FlbBren lotura ahalbidetuz.

Dinamikaz haratago, interesgarria litzateke bestalde kanpo seinaleen aurrean FlbBk nola diharduen ulertzea. Izan ere, FlbB puntan dagoela kanpo estimulu bat da ziurrenik puntatik askarazi eta nukleoranzko bidean jartzen duena. Alabaina, oraindik ezezaguna zaigu zein den seinalea, eta nola gauzatzen den seinale hori maila molekularrean, zein aldaketa eragiten den FlbB-rengan (edo FlbE-rengan). Puntan jazotzen diren aldaketek ahalbidetzen dute FlbB-ren transkripzio faktore gisa jarduteko forma aktiboa. Seinale honen izaera eta mekanismoak ezagutzeak ugalketa asexulerako “jauzia” nola ematen den ulertzen lagunduko liguke. Eta etorkizun batean, harizpi itxurako onddoen dispersio mekanismo nagusi den konidia esporen produkzioa kontrolatzeko tresnak garatzen lagun liezaguke.

6. Erreferentziak

- Adams T. H., Wieser J. K., Yu J. H. (1998): “Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 35-54.
- Etxebeste O., Ni M., Garzia A., et al. (2008): “Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Eukaryotic Cell*, 7, 38–48.
- Etxebeste O., Herrero-García E., Araújo-Bazán L., et al. (2009): “The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*”, *Molecular Microbiology*, 73, 775–789.
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J. (2012): “Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health”, *Nature*, 484, 186–194.
- Garzia A., Etxebeste O., Herrero-García E., et al. (2009): “*Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB”, *Molecular Microbiology*, 71, 172–184.
- Garzia A., Etxebeste O., Herrero-García E., et al. (2010): “The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Molecular Microbiology*, 75, 1314–1324.
- Herrero-García E., Perez-de-Nanclares-Arregi E., Cortese M.S., et al (2015): “Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells” *Molecular Microbiology*, 98, 607–24.
- Nagy L., Kovács G. eta Krizsán K. (2018): “Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both?”, *Biological Reviews*, 93, 1778-1794.
- Otamendi A., Perez-de-Nanclares-Arregi E., Oiarzabal E., et al (2018): “Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB” *bioRxiv*(preprint), DOI: 10.1101/467563.
- Ugalde U., Rodriguez-Urra A. (2014): “The Mycelium Blueprint: insights into the cues that shape the filamentous fungal colony”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8809-8819
- Wieser J., Adams T.H. (1995): “*flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development” *Genes Development*, 9, 491–502.
- Xiang X., Beckwith S.M., Morris N.R. (1994): “Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*”, *Proc Natl Acad Sci*, 91, 2100–2104.