



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Transkripzio faktoreen bidezko
punta-nukleo komunikazioa zelula
polarretan: garapenaren kontrola
harizpi-formako onddoetan**

*E. Perez de Nanclares Arregi,
E. Herrero-García, M. S. Cortese,
A. Marquina-Iñarrairegui,
E. A. Espeso, U. O. Ugalde
eta O. Etxebeste*

342-349 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.46>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



BFA
DFB
Bizkaiko Foru Aldundia
Diputación Foral de Bizkaia

eman ta zabal zazu



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Deusto
Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Transkripzio faktoreen bidezko punta-nukleo komunikazioa zelula polarretan: garapenaren kontrola harizpi-formako onddoetan.

Perez de Nanclares Arregi E.¹, Herrero-García E.², Cortese MS.¹, Marquina-Iñarrairaegui A.¹, Espeso EA.², Ugalde UO.¹, Etxebeste O.¹.

¹*Biokimika II laborategia, Kimika Aplikatua departamentua, Kimikako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Manuel de Lardizabal pasealekua 3, 20018 Donostia, Euskal Herria,*

²*Dept. Of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), Ramiro de Maeztu 9, 28010 Madril, Espainia.*

Kontakturako e-posta: elixabet.perezdenanclares@ehu.es

Laburpena

Zelula polarizatueta hazkundera zelularen puntu batetik ematen da. Era honetako hazkundera dute, esaterako, neuronek, polen hodiekin edo hainbat onddo patogenok. Polarizazioak hazkuntza leku eta nukleoaren arteko distantzia handitzen duenez, zelula hauek mekanismo ugari garatu behar izan dituzte ingurugiroko seinaleak polarizazio gunetik nukleora garraiatzeko. Mekanismo horietako batzuetan, transkripzio faktoreek (TF) hartzen dute parte, ADN-aren transkripzioa erregulatzen duten proteinak, alegia. Lan hau harizpi itxurako onddoen zelula polarretan ematen den TF bidezko punta-nukleo komunikazioaren azterketan oinarritu da, zeinak garapenaren kontrolean ezinbesteko funtzioa betetzen duen.

Hitz gakoak: harizpi-formako onddoak, hazkundera polarizatua, ugalketa asexuala, FlbB, Dendra2, mutagenesia.

Abstract

Growth in polarized cells occurs in a specific part of the cell. Neurons, pollen tubes or several fungal pathogens show this growth mechanism. Since polarization increases the distance between the growth site and the nucleus, polarized cells have developed mechanisms to convey environmental signals to nuclei. Transcription factors (TF), which regulate the transcription of DNA, play a crucial role in such processes. This work has analyzed the role of TF-s in the tip-to-nucleus communication of polarized fungal cells. This mechanism plays a key role in the control of fungal development.

Keywords: Filamentous fungi, polar growth, asexual reproduction, FlbB, Dendra2 tagging, mutagenesis.

1. Sarrera eta motibazioa

Onddoak eta zehazki *Aspergillus* generoko harizpi-formako onddoak oso garrantzitsuak dira elikadura arloan, industrian eta baita hainbat antibiotikoen identifikazio eta isolatze prozesuetan ere. *Aspergillus nidulans* eredu gisa erabili ohi da ekonomikoki garrantzi handikoak diren beste organismoentzat, hala nola, *A. oryzae* edota *A. niger* industrian eta *A. fumigatus* medikuntzan. Gaur egun, biologia molekularreko teknika berritzaileak prozedura estandarren bidez aplikatu daitezke onddo honetan: gene ezberdinen etiketatzeak edota ordezkatzak, proteinen lokalizazio analisiak edota genomika, transkriptomika edo proteomika analisiak.

Polarizazioa (zelula puntu batetik bakarrik hazten denean) zelula mota askotan eman ohi da. Zelula mota batzuk beraien bizi zikloko une batzuetan soilik polarizatzen diren bitartean (adibidez, legamien zelulak), beste batzuk, etengabe daude polarizatuak, hala nola, neuronak, polen hodiak edota harizpi-formako onddoen hifa begetatiboak. *A. nidulans*-en zelula ez-espezializatu eta multinukleatu hauen kasuan, pareta-zelularra eta mintz plasmatikoa sortzeko beharrezkoak diren materialak puntara garraiatzen dira (Riquelme, 2013). Hazkundera polarizatu hau mantendu egiten da, zelulak estimulu zehatz batzuk jaso eta esporen produkzioa induzitu arte. Zelula ez-espezializatutik zelula espezializatuak sortzen direneko trantsizioa prozesu konplexua da eta bere baitan hartzen ditu hainbat zelula-mota espezializatuen eraketa.

Garapen asexualean, konidia izeneko espora mitotikoak sortzen dira. Konidiak dira onddoen dispersio mekanismo nagusia. Bi bide genetikok kontrolatzen dute garapen prozesu hau. **Bide genetiko zentralak** (*Central Developmental Pathway, (CDP)*) esporen sintesirako beharrezkoak diren zelula moten produkzioa erregulatzen du. **UDA deritzen faktoreek** (*Upstream Developmental Activators*), ordea, ingurugiroko baldintzak seinalizatu eta CDP bide genetikoaren erregulatuile nagusiaren, *brlA*-ren, aktibazioa erabakitzen dute (Yu *et al.*, 2006).

UDA geneak zelula ez-espezializatuen hazkundera kontrolatzen duen makinariarekin harreman funtzional estua dute. FlbB, bZIP motako TF-a esaterako, zelula ez-espezializatuen puntan pilatzen da. Bertan, konplexua sortzen du bigarren UDA proteina batekin, FlbE-rekin (Garzia *et al.*, 2009; Garzia *et al.*, 2010). FlbB nukleoetan ere pilatzen da; gehienbat puntatik gertuen dagoen nukleoan eta metaketa hau gutxitzen doa puntatik urrunago dauden nukleoetan (Etxebeste *et al.*, 2008). Beraz, FlbB puntatik abiatzen den kontzentrazio gradiente baten arabera lokalizatzen da zelula hauetan.

Lan honetan, FlbB-ren puntatik nukleorako garraioa aztertu da zelula eukarioto polarizatueta, hazkunde puntuaren eta nukleoaren arteko komunikazioaren adibide gisa. Zehazki, komunikazio horretan parte hartzen duten FlbB-ren eremu ezberdinak aztertu dira. *brlA*-ren espresioa nukleoan indultzeko FlbB puntatik pasatzea derrigorrezkoa dela ikusi da. FlbB-ren eremuen artean, NLS-ak (*Nuclear Localization Signal*) FlbB nukleora joatearen ardura duen bitartean, puntako lokalizazioa hainbat eremurik kontrolatzen dute. bZIP eremuak FlbB-ren bi interakzio mota kontrolatzen ditu, homodimerizazioa eta FlbE-rekiko interakzioa. Bestetik, ortologoetan erabat kontserbatzen den C-terminal ertzeko zisteina batek ere ezinbesteko funtzioa jokatzeko du FlbB puntan kokatzen, baina ez da beharrezkoa FlbB-k FlbE-rekin interakziona dezan. Oro har, aztertutako kasuak hifen puntaren seinalizazio lana agerian uzten du, hifaren puntatik nukleoranzko komunikazioak garapen prozesuen kontrolean jokatzeko duen ezinbesteko funtzioa azpimarratuz.

2. Arloko egoera eta helburuak

Aurreko atalean esan bezala, onddoek garrantzi handia dute bai industrian eta baita medikuntzan ere, entzimak, antibiotikoak edota immunosupresoreen iturri garrantzitsua baitira. Harizpi-formako onddoek, honetaz gain, patogeno talde garrantzitsua ere osatzen dute. Adibidez, *Aspergillus* espezieko onddo batzuk (*Aspergillus fumigatus*, esate baterako) immunoeskasia duten pertsonen biriketean infekzio larriak sor ditzakete. *Aspergillus* generoko espezieak historian zehar heriotza kausa nagusienetakoak izan dira (Hohl eta Feldmesser, 2007). Harizpi-formako onddoek mundu guztiko uztan ere eragin izugarria dute. Esate baterako, *Magnaporthe oryzae* onddoak arrozaren uztaren % 10-35 bitarteko galera sortzen du urtero (Fischer *et al.*, 2012). *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* eta *Ustilago maydis* beste hiru adibide dira, garia, garagarra eta artoa infektatzen dituztenak, hurrenez hurren.

Harizpi-formako onddoen bitarteko nagusiak infekzio prozesu hauetan, hazkunde azkarra eta era askotariko substratuak kolonizatze gaitasuna dira. Honetaz gain, ingurugiroko estimuluari erantzuteko mekanismo eraginkorrak dituzte. Hauen artean, esporen produkzioak txoko ekologiko berrietara zabaltzeko aukera ematen die. Esporak ur kopuru txikia, mikotoxinak eta metabolismo moteldua duten ugaltzaileak dira. Espora bat erortzen denean landarearen gainazalean, ernamuindu egiten da zelularen puntu batetik, hazkuntza polarizatuari eta hifa begetatibo izeneko zelula ez-espezializatu eta multinukleatuari bide emanez. Polarizazio hau hazkuntzarako materialak puntu horretara garraiatzearen ondorioa da. Ernetze hau da landarearen infekzioaren lehen pausua. Zelula ez-espezializatuak hazten, adarkatzen eta fusionatzen doaz, komunikatuta dagoen sare moduko bat osatu arte. Sare honi, mizelioa deritza.

Ingurugiroko hainbat seinalek (adibidez, airea, argia, elikadura gabeziak edota beste estres egoera batzuk) hazkunderaren inhibizioa eragiten du eta zelula espezializatu asexualen sorrera. Prozesu honetan zehar hainbat zelula mota sortzen dira eta egitura horien multzoari konidiofora deritza. Konidioforoak ditu aipaturiko konidia edo espora asexualak ere. Esporek ahalbidetzen dute onddoen hedapena, baita ingurugiroko egoera kaxkarretan biziraupena ere, ezinbesteko mekanismoa bihurtuz onddo hauek eragindako infekzio prozesuetan.

Hau guztia kontuan hartuta, gure laborategian *A. nidulans*-en zelula ez-espezializatuetatik, espezializatuetakako trantsizioa ikertzen da, berau indultzatzen duten UDA geneetan zentratuz, nagusiki

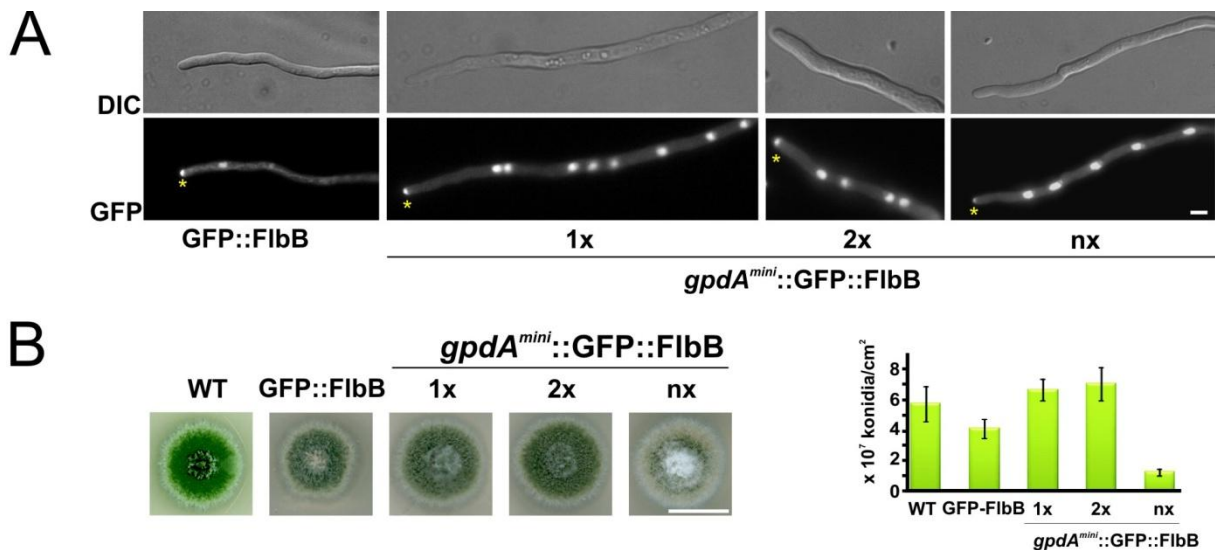
flbB-n. FlbB harizpi-itxurako onddoen zelula ez-espezializatuen puntan aurkitu den lehen TF-a da eta bere nukleorako garraioaren azterketak ezagutza garrantzitsuak utziko ditu ondoek sortutako infekzioen hedapenaren ezagutza eta kontrol mekanismoen garapenean.

3. Ikerketaren muina

3.1 Puntatik nukleoetarako FlbB-ren kontzentrazio gradientea, puntatik datorren proteina kantitateak definitzen du.

FlbB-ren kontzentrazio gradientea zergatik sortzen den jakiteko, genearen espresioa handitu zen. Horretarako, *gpdA^{mini}* (Pantazopoulou eta Peñalva, 2009) promotorea erabili zen jatorrizkoaren ordez, GFP::FlbB (*Green Fluorescent Protein*) kimera espresatzeko. Fluoreszentzia mikroskopia bidez frogatu zen gain espresio horrek gradientea hautsi eta FlbB nukleo guztietan intentsitate antzekoarekin ikustea eragiten duela. 1.A irudian ikus daitekeen bezala, jatorrizko promotorearekin GFP::FlbB puntan eta batez ere lehen nukleoan ikus daiteke (1.A irudia, 1. zutabea) (Etxebeste *et al.*, 2008). Aldiz, gain-espresioa sortzen duen promotorea erabiltzean, nukleo guztiek FlbB kopuru bera dute (1.A irudia, 2, 3 eta 4. zutabeak). Konkrétuki, lehen eta bigarren nukleoaren arteko fluoreszentzia ratioa 1:1 den bitartean, lehen nukleoeko fluoreszentzia puntan aurki daitekeena baino handiagoa da.

1. irudia. FlbB gradiente bidez banatzen da nukleoetan berezko promotorepean. A) GFP::FlbB eta *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB-ren lokalizazioa zelulan plasmido bat, bi edota n sartuta. Eskala = 5µm. B) Ezkerrean, *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB kimera espresatzen duten anduien fenotipoa 72 orduz 37°C-tan hazten egon ondoren. Eskala = 2cm. Eskuinean, kimera bakoitzak sortzen duen espora kantitatea irudikatu da.

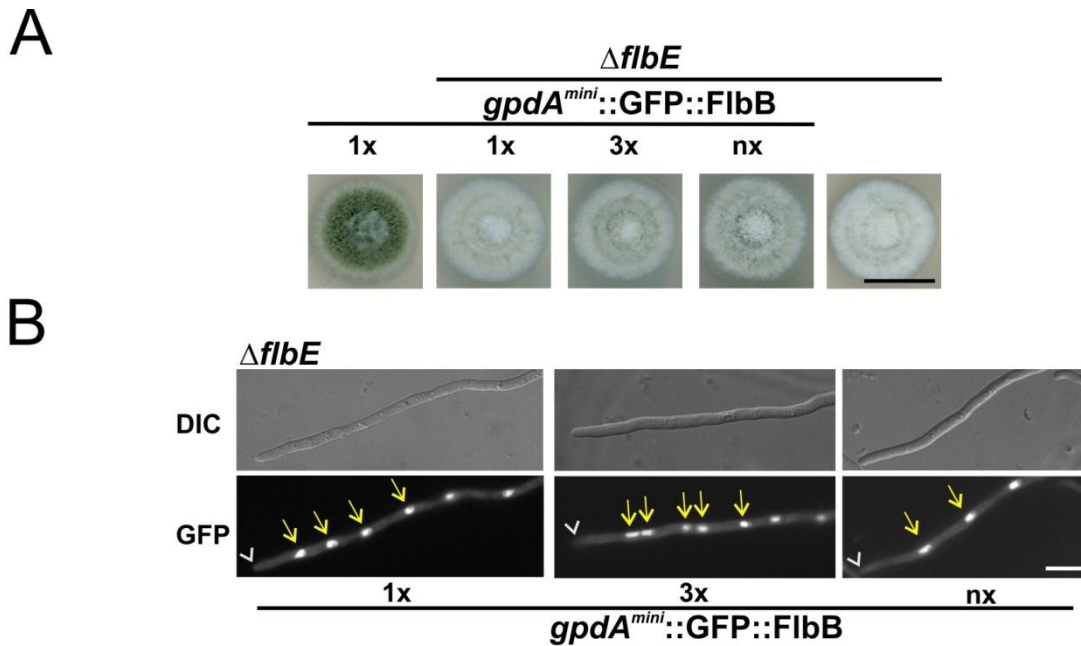


Sortutako andui hauen fenotipoa aztertu zen (1.B irudia, ezkerrean). 1.B irudian ezkerrean ikus daitekeen bezala andui guztiek fenotipo konidiantea erakutsi zuten. Gainera, cm²-ko espora kopuruan (1.B irudia, eskuina) aldaketa signifikatiborik ez dagoela baieztatu zen. Beraz, FlbB-ren populazio nuklearraren igoerak ez du konidia gehiago sortzea eragiten.

3.2 Zelula espezializatuak sortzeko, FlbB-k zelula ez-espezializatuen puntatik pasa behar du.

Ondoren, FlbB-ren puntako lokalizazioaren garrantzia aztertu zen. Horretarako, GFP::FlbB-ren kopia kopuru ezberdina gain espresatzen duten anduiak sortu ziren FlbE-rik gabeko ($\Delta flbE$) egoera batean. FlbE-k FlbB-rekin puntan interakzionatzen du (Garzia *et al.*, 2009). Sortutako andui guztiek fenotipo akonidiala dute (2.A irudia), *brlA*-ren espresioa indultzeko ezintasunak eragiten duena. Bestetik, nukleoetan detektatu arren, FlbB-k ezin du puntan metatu FlbE ez badago. Emaitza hauek erakusten dute FlbB nukleoetan egotea ez dela nahikoa konidia produkzioa aktibatzen. Aurretik, FlbE-ren laguntzaz, puntatik pasatu behar du (2.B irudia).

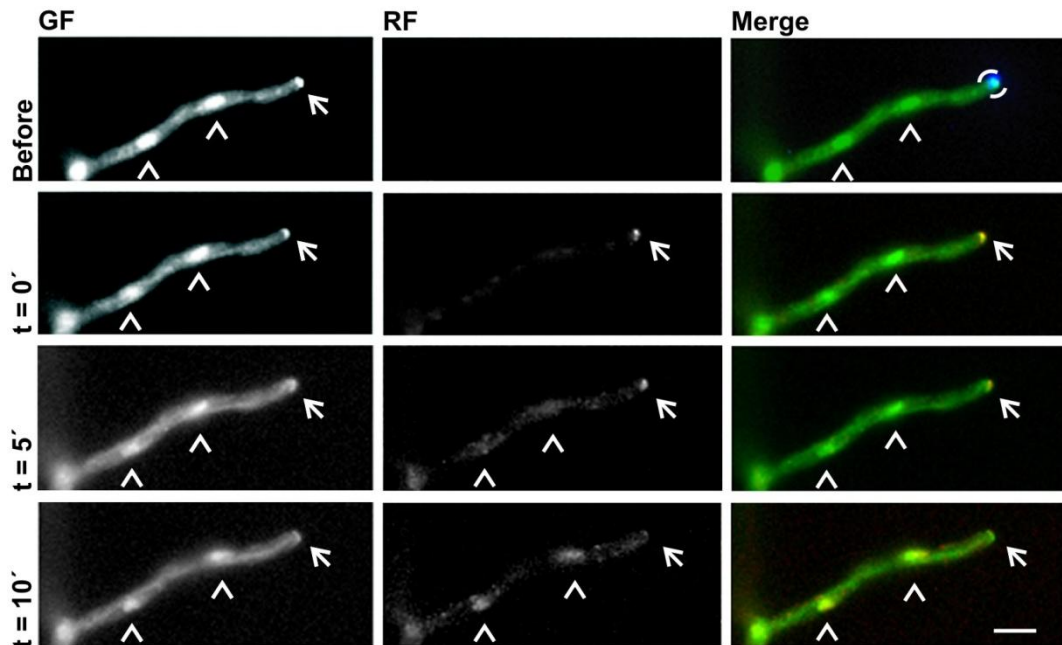
2. irudia. FlbB-ren fenotipoa eta lokalizazioa zelulan *flbE* ez dagoenean. A) FlbB-ren fenotipoa *fluffy*-a da *flbE*-ren delezioa egiten denean. Eskala = 2cm. B) FlbB ez da gai zelula ez-espezializatuaren puntan pilatzeko, nahiz eta nukleoetan metatu. Eskala = 5 μ m.



3.3 FlbB-k puntatik nukleora migratzen du.

Nukleoetan transkripzioa aktibatu eta konidien sorrera eragiteko, FlbB-k puntatik pasatu behar badu lehenik, puntatik nukleorako garraio norantza batean pentsa daiteke. Horri garraio retrogradoa deritzo, puntaranzkoari anterogradioa deritzon bitartean. FlbB-ren garraio retrogradoaren existentzia baieztatzeko, Dendra2 (Chudakov *et al.*, 2007; Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014) proteina itsatsi zitzaion FlbB-ri. Dendra2 epitopoa fluoreszentsia berde izatetik gorri izatera pasatzen da uhin luzera espezifiko erradiazio baten ondorioz (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014). Hau guztia kontutan izanda, fluoreszentsia gorri eta berdearekin irudiak atera ziren bai hifa begetatiboen erradiazio aurretik eta baita erradiazio ondoren ere. Erradiazioa zelula ez-espezializatuaren puntan soilik eragin genuen, mikroskopioaren diafragma tamaina egokira itxiz (ikus 3. irudiko puntu urdina, EHU-ko Mikroskopia zerbitzuko Ricardo Andraderekin kolaborazioa). Erradiazio aurretik ikusten den fluoreszentsia bakarria berdea da (GF, *Green Fluorescence*), puntan eta nukleoan metatzen dena nagusiki. Erradiazioaren ondoren diafragma guztiz irekitzen da eta fluoreszentsia gorri (RF, *Red Fluorescence*) eta berdeak aztertzen dira. Fluoreszentsia gorria puntan bakarrik detektatzen da baina, denbora aurrera joan ahala, nukleoetako fluoreszentsia gorriaren intentsitatea handitzen doa, FlbB proteina puntatik nukleorantz garraiatzen denaren seinale.

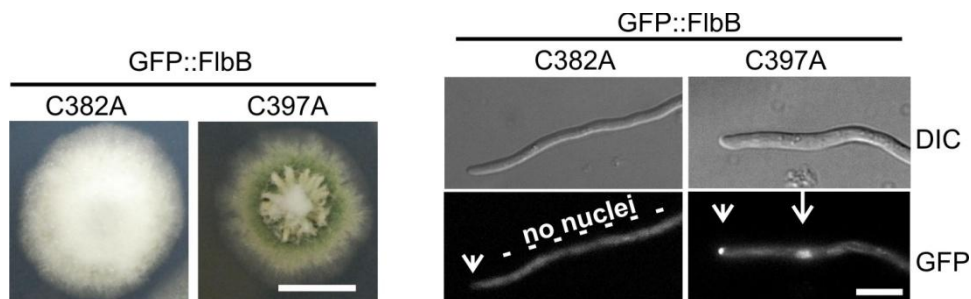
3. irudia. FlbB::Dendra2-ren garraio retrogadoa zelula ez-espezializatuaren puntatik nukleorantz. Foto-konbertsioa eragiteko UV argiaren intentsitatea %80koa izan zen eta 2500 ms-ko esposizioak egin ziren (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014). Eskala = 5µm.



3.5 FlbB-ren karboxilo terminala beharrezkoa da hifen puntan pilatu dadin.

FlbB-ri puntara iritsi eta bertan metatzeko gaitasuna proteinaren eremu espezifikoek ematen diotela pentsa liteke. Eremu hauek identifikatu eta euren funtzioa zehazteko, FlbB-ren karboxilo terminala aztertu zen, lehenik.

5. irudia. FlbB-ren karboxilo terminalaren karakterizazioa. Ezkerrean, FlbB-ren C-terminalean eragindako bi mutazioek sortutako fenotipoa, inokulatu eta 48 orduz. Eskala = 1cm. Eskuinean kimera horien lokalizazioa zelulan. Gezien puntetik zelula ez-espezializatuaren punta adierazten dute eta geziak nukleoa. Eskala = 5µm.



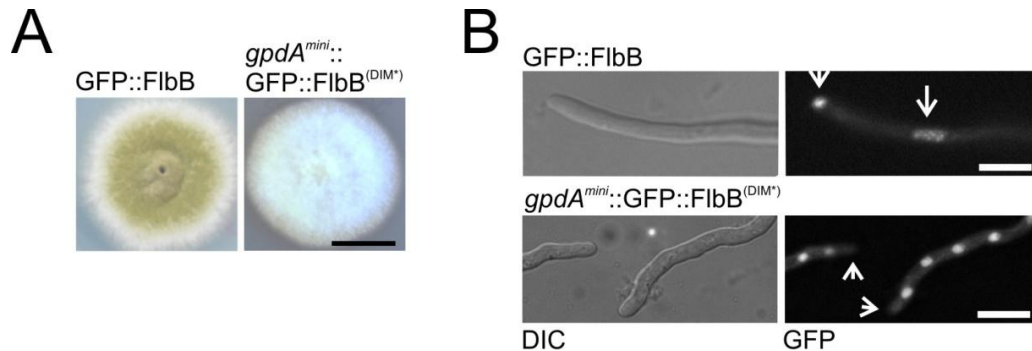
FlbB-ren karboxilo terminalak bere ortologoetan oso kontserbatuak dauden bi zisteina (C) ditu: C397 eta C382. Bi zisteina hauek FlbB-ren puntako lokalizazioan eragina duten aztertu zen, horietako bakoitza, edo biak batera, alaninarengatik ordezkatur. Fenotipoa eta FlbB-ren lokalizazioa aztertu ziren. C397A mutazioa zuen anduiak garapenean kalterik ez zuen bitartean, C382A edo C397A;C382A (azken hau ez da erakusten 5. irudia sinplifikatzearen) mutazioa zutenek ez zuten konidiarik sortu. Lokalizazioari dagokionean, GFP::FlbB^(C397A)-ren kasuan aldaketarik ez zegoen bitartean, GFP::FlbB^(C382A)-k puntan egoteari uzten zion. Emaitza hauek adierazten dute Cys382 aminoazidoak eragina duela FlbB-ren puntako pilaketan.

3.6 Dimerizazio eremua puntako lokalizatorako ezinbestekoa da, homodimerizazioa eta FlbE-rekin interakzioan parte hartzen duelako.

TF-ek, orokorrean, DNA-n sekuentzia espezifikoak ezagutu eta geneen transkripzioa kontrolatzen dute. FlbB-k bZIP eremua du eta era honetako domeinuen barnean dimerizazio (DIM) eremuak proteina-proteina interakzioak bideratzen ditu. Interakzio horiek proteina berdinekin (homodimerizazioa) edo desberdinekin (heterodimerizazioa) izan litezke (Vinson *et al.*, 2015). FlbB-ren DIM eremuaren azterketa bioinformatiko sakona egin ostean, bi aminoazido aukeratu ziren

mutagenesirako. Azterketa fenotipiko (6. irudia, ezkerra) eta mikroskopia analisisiek (6. irudia, eskuina) baieztatu zuten mutazio horiek konidien sintesia eta FlbB-ren puntako lokalizazioari kalte egiten ziotela (6. irudia, eskuina).

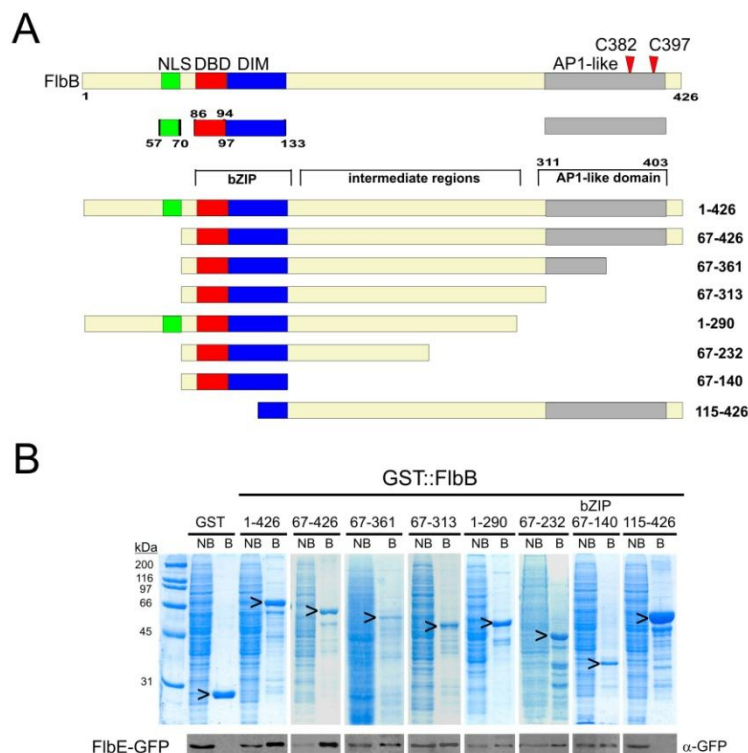
6. irudia. FlbB-ren dimerizazio domeinua beharrezkoa da puntan lokalizatzeko. A) DIM eremuaren barnean mutazioak egiten direnean konidiatzeko gaitasuna galdu eta koloniak *fluffy* itxura du. Eskala = 1cm. B) FlbB-ren dimerizazio eremuan mutazioak daudenean ez da puntan aurkitzen. Gezien puntak hifaren puntak adierazten dute eta geziak nukleoak, hain zuzen ere. Eskala = 5µm.



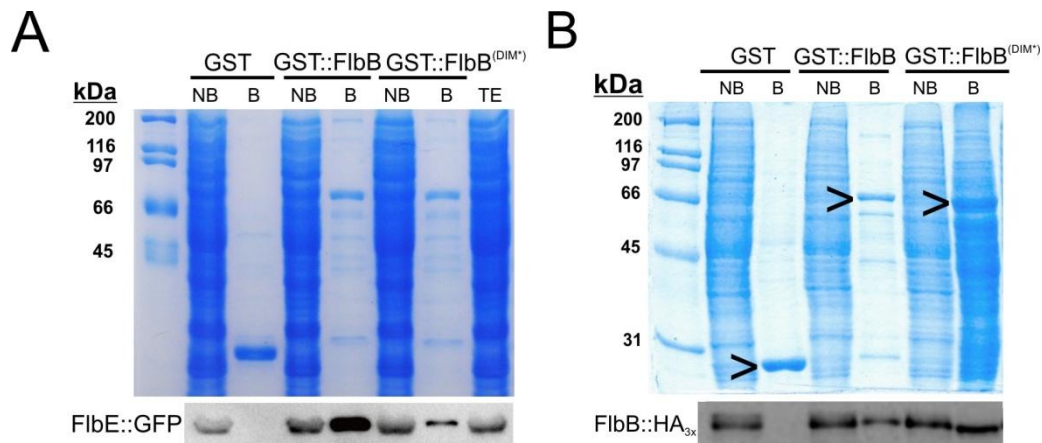
3.7 FlbB-ren dimerizazio eremua nahikoa eta beharrezkoa da FlbB/FlbE konplexua sortzeko.

Baina, FlbB-k ezartzen dituen interakzioetan ere ikusi zen eraginik DIM mutanteetan. Batetik, aurreko esperimentu batek demostratu zuen *pull-down* teknikan bidez, FlbE-rekin interakzioa ezartzeko FlbB-ren bZIP eremua bakarrik nahikoa zela (7. irudia). Bestetik, DIM eremuko bi aminoazidoetan ezarritako mutazio puntualek ere, FlbE-rekin interakzioa inhibititu zuten (7.B irudia). Efektu berdina ikusi zen homodimerizazioaren kasuan ere, alegia, FlbB-ren bi katek elkarrekin interakzioa osatzeko duten gaitasuna galdu egiten zen (8. irudia). Bi interakzio horiek kaltetzea izan liteke FlbB-ren DIM forma mutantea puntan ez metatzearren arrazoia.

7. irudia. FlbB-ren bZIP domeinua beharrezkoa eta nahikoa da FlbE-rekin interakzioa sortzeko. A) FlbB-ren eremuen eta egindako trunkamendu ezberdinen irudikapena. B) *Pull-down* esperimentua egin zen alde batetik amu bezala FlbB-ren trunkazio ezberdinak eta bestetik FlbE::GFP erabiliz. Gela *Coomassie blue*-rekin tindatu zen. NB: erretxinera lotu gabeko frakzioa. B: erretxinera lotutako frakzioa.



8. irudia. FlbB-ren dimerizazio eremuak konplexua sortzen du bai bere buruarekin eta baita FlbE-rekin ere. Pull-down esperimentua egin zen. Alde batetik, FlbB-ren mutante ezberdinak erabili ziren eta bestetik FlbE::GFP (A) edota FlbB::HA_{3x} (B).



4. Ondorioak

Harizpi-formako onddoek gaixotasun infekziosoak sortzen dituzte sarraskiak sortuz uztetan, toki askotan malnutrizioak sortuz eta biodibertsitatea eta gure osasuna baldintzatuz (Bebber *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2012). Arazo hau geroz eta larriagoa da patogenoek ingurugiro berrietara zabaldu eta egokitzeko duten gaitasun azkarrari esker. Ondorioz, azken urteotan onddoen infekzioen berri ematen diren txosten kopurua asko igo da (Fischer *et al.*, 2012; Bebber eta Gurr, 2015). Harizpi-itxurako onddoek hedatzeko duten gaitasunaz ohartzeko, beharrezkoa da hifa begetatiboen puntei arreta jartzea. Hifa polarizatuek funtzio garrantzitsua betetzen dute ingurugiroko estimuluak sentitu eta informazio hau nukleoari helarazten (Bayram *et al.*, 2012; Bielska *et al.*, 2014). Lehen aldiz, TF-ak (FlbB, esaterako) garraio honetan garrantzitsuak direla ikusi da.

Baliteke puntarako mugimendu horretan, FlbB eta FlbE-k mintza edo paretara zelularra sortzeko materialek erabiltzen duten garraio-bideren bat erabiltzea. Hori horrela balitz, FlbE FlbB-k bide hori egiteko behar duen egokigailua izan liteke. Ikerketa honetan aurkitu den FlbB/FlbE-ren arteko erlazioa dela eta, etorkizuneko azterketek FlbE-ren eremu ezberdinek FlbB-ren garraioan duten eragina ikertzea izango dute helburu. Bi UDA hauen arteko interakzioa bZIP domeinuaren bidez gertatzen da; hau, beharrezkoa eta nahikoa izanik interakzioa gertatzeko.

Dimerizazio eremua bai interakzioa gertatzeko eta baita FlbB-ren homodimerizaziorako garrantzitsua dela ikusi zen. Honek esan nahi du bZIP domeinuak hainbat funtzio bete ditzakeela, hala nola, homodimerizazioa, FlbE-rekin interakzioa, puntako metaketa eta nukleoetako transkripzioaren erregulazioa. Funtzio hauek sakonago aztertzeke daude.

5. Etorkizuna

Lehen aldiz, gure laborategietan eginiko lanei esker, transkripzio faktoreek onddoen zelula polarizatuen punta eta nukleoaren arteko komunikazioan parte hartzen dutela frogatu da. FlbB zelula ez-espezializatuetako puntetan kokatzen da eta hor mantentzen da hazkundera gertatzen den bitartean (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014). FlbB eta FlbE-ren arteko interakzioa derrigorrezkoa da, FlbB-k puntatik seinalea jaso eta zelula espezializatuen sorrera indultzeko.

Lan honetan azaldu diren FlbB/FlbE proteinen erlazio funtzionalak direla eta, etorkizunean garraio honetan parte hartzen duten beste interaktoreen identifikazioa egingo da. Bestalde, FlbB-k nukleora ingurugiroko zein seinaleri buruzko informazioa garraiatzen duen aztertuko da, honek FlbB-rengan eragiten duen aldaketa identifikatuko delarik.

6. Erreferentziak

Bayram,O., Bayram,O.S., Ahmed,Y.L., Maruyama,J., Valerius,O., Rizzoli,S.O. *et al.* (2012): The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet* **8**: e1002816.

Bebber,D.P., and Gurr,S.J. (2015): Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genet Biol* **74**: 62-64.

- Bebber, D.P., Ramotowski, M.A.T., and Gurr, S.J. (2013): Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Clim Change* **3**: 985-988.
- Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J., and Steinberg, G. (2014): Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**: 5097.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., eta Lukyanov, K.A. (2007): Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* **42**: 553, 555, 557.
- Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., eta Ugalde, U. (2011): Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* **6**: e17505.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., Espeso E.A. eta Ugalde U. (2008): Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**: 38-48.
- Fischer M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L. eta Gur S.J. (2012): Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186-194.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E.A., eta Ugalde, U. (2009): *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172-184.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U., eta Espeso, E.A. (2010): The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314-1324.
- Hohl T.M. eta Feldmesser M. (2007): *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot. Cell* **6**: 1953-63.
- Kwon, N.J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., eta Yu, J.H. (2010): FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203-1219.
- Pantazopoulou, A., eta Peñalva, M.A. (2009): Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**: 4335-4347.
- Perez-de-Nanclares-Arregi, E., eta Etxebeste, O. (2014): Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **70**: 33-41.
- Riquelme, M. (2013): Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**: 587-609.
- Yu, J.H., Mah, J.H., eta Seo, J.A. (2006): Growth and developmental control in the model and pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryotic Cell* **5**: 1577-1584.
- Vinson C.R., Hai T eta Boyd S.M. (2015): Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding prediction and rational design. *Genes & Development* **7**: 1047-1058.

7. Eskerrak

Lehenik eta behin, eskerrak eman nahi genizkioke Eusko Jaurlaritzari, Unai Ugalde ikertzaile nagusiak jasotako IT599-13 laguntzarekin egin baita lan hau. Honez gain, Espainiar estatuko Ekonomia eta Lehiakortasun ministerioaren bitartez (egun Zientzia eta Berrikuntza Ministerioa) Unai Ugaldek (BFU2010-17528) jasotako diru laguntza ezinbestekoa izan baita ikerketa honetan. Ikerketa hau burutu zenean Erika Herrero García Eusko Jaurlaritzaren beka predoktorala zuen eta Elixabet Perez de Nanclares Arregik Euskal Herriko Unibertsitatearena. Oier Etxebeste doktorea, aldiz, kontratudun ikertzailea zen (BFU2010-17528 beka) eta egun Euskal Herriko Unibertsitateko irakasle atxikia da. Ane Markina postdoktore ikertzailea da (IT599-13 beka). Azkenik, eskerrik asko Ricardo Andrade Euskal Herriko Unibertsitateko SGIker mikroskopio zerbitzuko doktoreari eta Carl Zeiss-eko Ivan González, Dendra2-ren erabilpenean emandako argibideengatik.