



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

**Sekuentziazio masiboaren
erabilera izaki eukarioten
garapena erregulatzen duten
geneak identifikatu eta
karakterizatzeko**

*E. Oiartzabal-Arano, A. Garzia, A.
Gorostidi, U. Ugalde, EA. Espeso
eta O. Etxebeste*

417-424 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.57>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



Sekuentziazio masiboaren erabilera izaki eukarioten garapena erregulatzen duten geneak identifikatu eta karakterizatzeke.

Oiartzabal-Arano E¹, Garzia A³, Gorostidi A⁴, Ugalde U¹, Espeso EA², eta Etxebeste O¹.

¹*Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Manuel de Lardizabal Pasealekua, 3, 20018, Donostia.*

²*Biologia Zelular eta Molekular Saila, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madril, Espainia.*

³*RNA Biologia Molekular Laborategia, Howard Hughes Institutu Medikoa, Rockefeller Unibertsitatea, 1230 York Avenue, Box 186 New York, NY 10065.*

⁴*Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, Genomika Plataforma, Begiristain Doktorea Pasealekua, 20014, Donostia.*

elixabet.oartzabal@ehu.es

Laburpena

Garapen zelularra harizpi itxurako onddoetan zelula ez-espezializatueta abiatzen da erregulatuzaile goiztiarren bitartez, FlbB transkripzio faktorea (TF) barne. Bere eraginpean dauden beste geneen funtzioak identifikatzeko, $\Delta flbB$ mutante eta andui basatiaren (WT) transkriptomak konparatu dira RNA-seq teknikaren bitartez. TF honen funtzio erregulatuzaile berriak aurkitu dira. Batetik, FlbBren ausentziak metabolito antibakteriano baten ekoizpenerako beharrezkoak diren geneen espresioa handitzen du. Bestalde, FlbBren bitartez erregulatu den ustezko TF bat ere identifikatu da, UrdA, garapen mota ezberdinen erregulatuzailea dena. Emaitez FlbBren gabeziak garapen mekanismoak eta prozesu metabolikoak desorekatzen dituela erakusten dute.

Hitz gakoak: Gene Espresioa; Garapena; Metabolismo Sekundarioko klusterrak

Abstract

Development in filamentous fungi is induced in non-specialized cells by a set of early regulators including the transcription factor FlbB. To identify genes under the transcriptional control of FlbB and determine their role, we compared $\Delta flbB$ and wild-type transcriptomes through the RNA-seq technique. We found additional regulatory roles for this TF. On one hand, the absence of FlbB increases the expression of a metabolic cluster that synthesizes an antibacterial metabolite. On the other hand, FlbB mediates the transcriptional control of urdA, coding for a putative TF which regulates the balance between the two developmental cycles of filamentous fungi. Taken together, our results open a new holistic outlook to the study of regulatory networks during development.

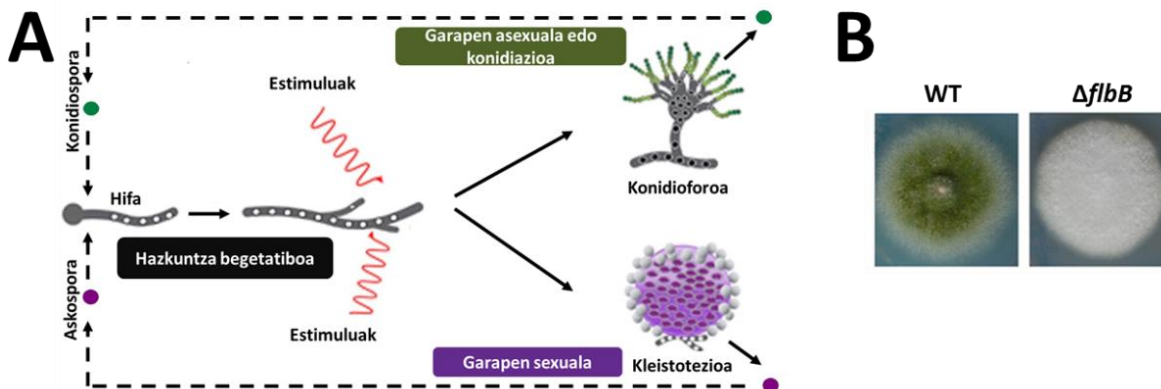
Keywords: Gene Expression; Development; Secondary Metabolism clusters

1. Sarrera eta motibazioa

A. nidulans harizpi itxurako onddoa aztertu da ikerketa honetan, organismo eukarioto konplexuago eta gizartean eragin ekonomiko garrantzitsua duten onddoen garapena ulertzeko organismo eredu. *A. nidulans*-en bizi zikloa fase ezberdinetan banatzen da. Nukleo bakardun zeluletatik (konidiospora edo askospora) hazkuntza begetatiboa abiatzen da. Hau da, zelula polarizatu eta harizpi itxura hartzen du, hifa deituriko egitura osatuz. Hazkuntza material berria hifaren puntan gehitzen gauzatzen da, neurona edo polen hodietako hazkuntza mekanismo bera erabiliz. Ondorioz, nukleo ugari dituzten egitura multizelular ez-espezializatuak sortzen dira: hifa begetatiboak.

Zelula kanpoko edo barneko estimuluek eraginda, hifak (egitura ez-espezializatuak) bi motako garapen edo espezializazio prozesua izan dezake (1. irudia A). Batetik, garapen asexuala edo konidiazioa, non errekonbinazio genetikoak jasan ez duten konidiosporak sortzen diren konidioforo izeneko egituretan. Prozesu honek onddoaren dispersioa du helburu eta berau da onddo patogenoek erabiltzen duten zabaltze-bide nagusia. Bestetik, garapen sexuala dago, non errekonbinazio genetikoak jasan duten askosporak osatzen diren kleistotezioan. Ziklo honen helburua organismoaren biziraupena eta material genetikoaren elkartrukea dira.

1. irudia. A) *A.nidulans*-en bizi zikloa. B) WT eta $\Delta flbB$ anduien fenotipo konidial eta akonidiala, hurrenez hurren. Eskala = 1 cm.

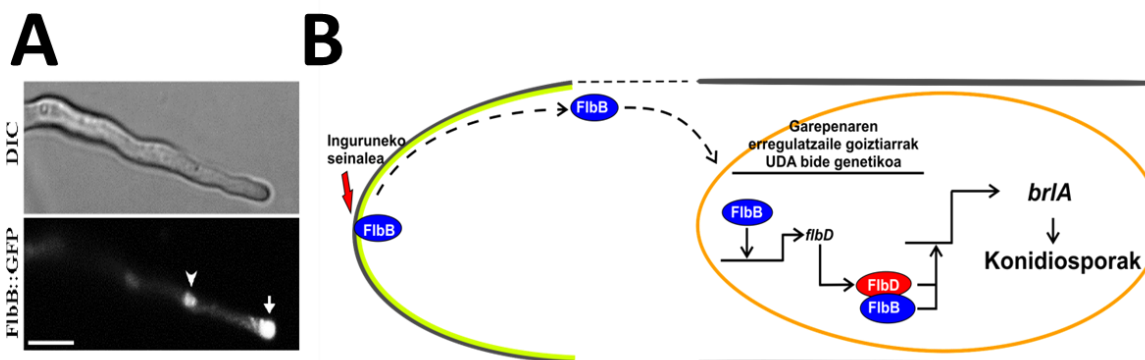


Hifa ez-espezializatutik konidiospora espezializaturako trantsizio genetikoa, edo beste hitzetan, garapen asexuala, sakonki aztertua izan da ondo honetan (Etxebeste et al., 2010; Park and Yu, 2012). Karakterizatutako geneen artean *brlA* transkripzio faktorea da prozesu horretan garrantzitsuenetakoa. BrlA konidiosporak sortzeko ezinbestekoa den proteina da eta bere gabeziak ondo akonidialak dakartza, konidiosporarik gabekoak (Park and Yu, 2012).

Konidiosporen sintesia estimulu jakin batzuk detektatu ondoren abiatzen dute hifa ez-espezializatuek (Fischer and Kües, 2006). Estimulu hauek modu egokian jaso eta transmititzeko mekanismo genetiko eta molekular efizienteak behar dira eta hori da garapenaren erregulatuzaile goiztiarren lana (UDA bide genetikoa; Upstream Developmental Activators) (Wieser et al., 1994; Etxebeste et al., 2010). Ikerketa honetan UDA bide genetikoko FlbB proteina izan da aztergai.

FlbB proteina transkripzio faktore bat da, hau da, DNAREN transkripzioaren erregulazioan parte hartzen du. Ezaugarri aipagarrienetako bat bere lokalizazio zelularra da. Hifaren puntatik gertuen dagoen nukleoan kokatzeaz gain, nukleotik kanpo ere aurkitzen da, hifaren puntan, puntatik nukleorako garraio dinamika bat jarraituz (Etxebeste et al., 2010) (2. irudia A). Puntan ingurune baldintzen detektore gisa jokatzeko duela proposatu da, inguruaren baldintzen arabera zelularen hazkuntza baldintzatuz. Horregatik, oso esanguratsua da FlbB puntan egotea, bertan inguruneko seinale bat jaso eta nukleora eramateko gaitasuna izan dezakeelako.

2. irudia. A) FlbB-ren lokalizazioa hifan. Eskala = 10 μ m. B) Garapen asexualaren indukzio modeloa FlbBren bitartez.



Behin nukleoan, FlbB nuklearrak beste UDA baten espresioa aktibatzen du lehenik, *flbD* TFa, eta ondoren bi faktoreak batera *brlA*-ren espresioa aktibatzen dute (2. irudia B). FlbB proteinaren funtzio galtzeak ere ondo akonidiala izatea dakar, FlbBren ausentzian *brlA*-ren espresioa inhibitua baitago (Wieser et al., 1994) (1. irudia B).

Garapen asexualean duen eginkizunaz gain, oso gutxi ezagutzen da hifaren puntatik nukleorako bidea egiten duen transkripzio faktore honen inguruan. Horregatik, FlbBren aktibitatearen ulermen zabalago bat izan eta FlbBren transkripzio diana berriak ezagutu ahal izateko egin da ikerketa lan hau.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa honetan ikasgai izan den organismoa *Aspergillus nidulans* onddo haritsua da. Organismo modeloa izanik, onddo honetan lortutako jakintzak interes ekonomiko edo interes klinikoa duten harizpi itxurako beste onddoetan ere aplika daitezke. *Aspergillus* generoaren baitan patogeno garrantzitsuak daude, hala nola, immunoeskasia duten gaixo eta animaliak infektatu ditzaketen espezieak, *A.fumigatus* esaterako (Bennett, 2010). Beste espezie batzuk, *A.parasiticus* adibidez, uztan aurkitu ohi dira eta elikagai industriarentzat arazoak dakartzaten mikotoxina deritzen sustantzia toxiko eta kantzerigenoak ekoizten dituzte (Weidenborner, 2001). Azkenik, *Aspergillus* generoan industrialki interes handia duten espezieak ere aurki daitezke, entzima edo elikagai hartzidura (*A.oryzae*, Abe and Gomi, 2008) eta farmakoen (*A.terreus*; Bizukojc and Ledakowicz, 2009) ekoizpenerako erabiltzen direnak adibidez.

Bestalde, harizpi itxurako onddoen garapenaren ikerketan erreferente nagusia da *A.nidulans* (Etxebeste et al., 2010; Park and Yu, 2012). Meiosi bidez espora sexualak sortzeko gaitasunak (Dyer et al., 2003) eta genetika eta biologia zelularreko lanetan duen maneiu estandarizatuak besteak beste, hainbat prozesu biologiko ulertzeko modelo esperimentera gisa erabiltzera eraman dute. Adibidez, organismo modelo bezala erabili da DNAREN errekonbinazio eta konpontzea, ziklo zelularren kontrola edo metabolismoaren erregulazioa ikertzeko (Nierman et al., 2005).

Azken urteotan bada ere antibiotiko berrien iturri izan daitekeelako oso ikertua izaten ari den beste arlo bat, onddo haritsuen metabolismo sekundarioa. Metabolito sekundarioak ingurunera moldatzeko garaian eginkizun garrantzitsua izan ohi duten konposatu organikoak dira eta aktibitate antibiotikoa izan dezakete. Konposatu hauen sintesiaz onddoen metabolismo sekundarioko (MS) gene klusterrak arduratzen dira (Yaegashi J, 2014), hau da, genomak elkarren aldamenen dauden gene multzoak (Yu and Keller, 2005).

FlbBren aktibitatearen ulermen zabalago bat izan eta FlbBren transkripzio diana berriak ezagutu ahal izateko helburuarekin, $\Delta flbB$ mutantearen eta bere andui basati (WT) isogenikoaren transkriptomak sekuentziatu dira RNA-seq teknikaren bidez. Emaitzek adierazten dute FlbB garrantzitsua dela ez soilik garapen asexualaren indukzioan, baizik eta garapen sexualaren aktibazio goiztiararen errepresioan ere. Bestalde, FlbBren gabeziak sortzen duen garapen asexualaren ezintasunak aktibitate antibakterianoa duen metabolito baten sintesian ere eragiten du.

3. Ikerketaren muina

*flbB*ren espresioa hifa begetatibo eta konidiofoaren garapenerako hasierako fasean ematen dela kontsideratuta (0 eta 6 ordu 3. irudia A), bi fase horietan erauzi ziren mRNA totalaren laginak andui basati (WT) eta $\Delta flbB$ mutantetik. RNA totalaren kontzentrazio eta osotasuna Nanodrop (Thermo Scientific) eta Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) aparatuen bitartez egiaztatu zen eta sekuentziak EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania) ikerketa zentruan egin zen. GAIIX Sekeuentziagailua (Illumina) izan zen erabilia, lerro bakoitzeko lau lagin korriaraziz (multiplexing). Datuen analisi bioinformatikoa Aitor Garzia doktorearekin (Rockefeller University, NY, AEB) kolaborazioan egin zen.

Emaitzetan, *flbB* genearen delezioak gene guztien %10-aren espresio jaitsiera dakarrela ikusi da eta soilik gene gutxi batzuen espresioaren igoera (%0,5). Beraz, FlbBk transkripzio aktibatzaile izaera erakutsi du inhibitzailearena baino gehiago.

RNAseq emaitzek aurretik garapen asexualarentzat proposatutako eredu genetiko berresten dute. Eredu honek FlbB eta FlbD TF-ek *brlA*-ren espresioa aktibatzen dutela babeste du (Garzia et al., 2010). RNAseq esperimentera emandako emaitza berriei dagokienez, FlbBren eraginpean dauden geneei buruz ondorengo ezagutu da:

3.1 FlbB metabolismo sekundarioko lau klusterren erregulazioarekin erlazionatuta dago.

Garapen asexualaren indukzioak metabolito sekundario espezifikoen aktibitatea behar du (Ugalde eta Rodriguez-Urra, 2014). Hauen biosintesarako beharrezkoak diren geneak klusterretan multzokatuta egon ohi direnez (Inglis et al., 2013), RNAseq datuetatik $\Delta flbB$ fondo genetikoan espresioa adierazgarriki aldatzen duten klusterrak identifikatu ziren: 1) emerizelamidaren (EAS) klusterra, ziklo sexuala duten *Aspergillus* espezieetan ekoizten den depsi-peptido ziklikoa sortzen duena (Chiang et al. 2008); 2) aspernidine A klusterra, morfogenesi prozesuarekin erlazioa duena (Ahuja et al., 2012); 3) *An2030* gentik *An2038* genera doan klusterra, funtzio ezezaguneko eta 4) orain dela gutxi karakterizatua izan den *dba* klusterra (Gerke et al., 2012), DHMBA metabolito antibakterianoaren sintesiaz arduratzen dena. Gainerako gene klusterrekin konparatuz *dba*-k gene espresio aldaketa handiena erakusten zuenez, sakonki aztertzeke hautatua izan zen.

RNAseq esperimenduaren arabera *An7893*tik *An7903*rako *dba* klusterreko geneak adierazgarriki gehiago espresatzen dira *flbB* genearen gabezia WT anduiarekin konparatuz. Espresio patroia hau qPCR bidez konfirmatu da klusterreko hiru geneekin: *An7895/cipB*, espresio aldaketa handiena erakusten duen genea, eta *An7896/dbaA* eta *An7901/dbaG*, klusterreko gainerako geneen espresioa erregulatzen duten bi TFak kodifikatzen dituztenak geneak (Gerke et al., 2012). qPCR bidez, WT eta $\Delta flbB$ zepen arteko espresio aldaketa baieztatzeaz gain, $\Delta brlA$ mutantean espresio azterketa egin da (Adams et al., 1998; Wieser et al., 1994). Emaitzek, $\Delta flbB$ eta $\Delta brlA$ mutanteetan *dba* klusterreko hiru gene horien espresioa adierazgarriki igotzen dela erakusten dute (irudia ez dago artikuluan).

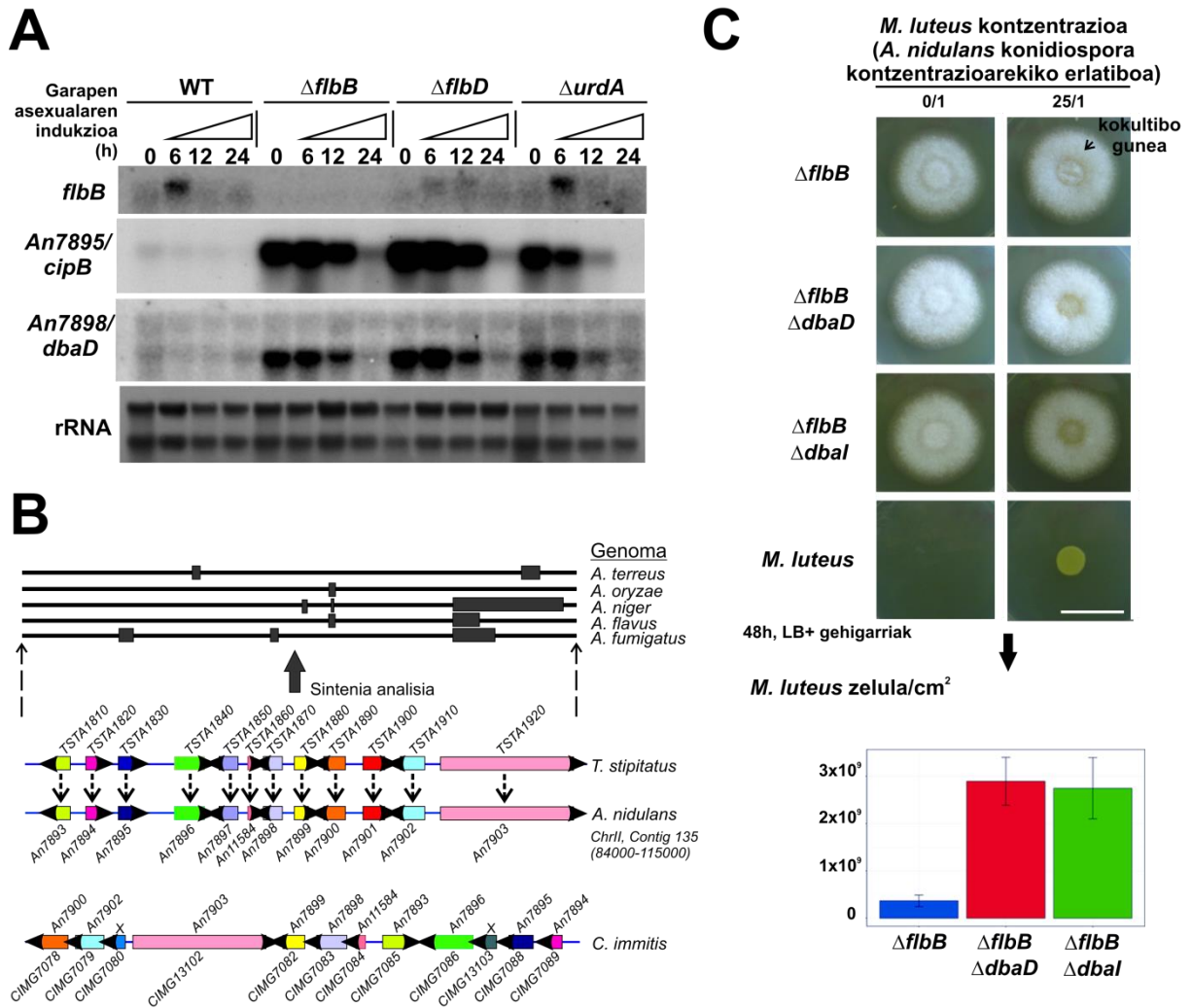
Northern-blot teknika ere erabili da $\Delta flbB$, $\Delta flbD$ eta $\Delta An4394/urda$ (ikus aurrerago) UDA mutanteetan klusterraren espresioa analizatzeko (3. irudia A). *An7895/cipB* eta *An7898/dbaD* geneen espresioa aztertu da garapeneko denbora ezberdinetan eta kasu honetan ere aztertutako UDA mutanteetan *dba* klusterreko geneen espresioa adierazgarriki igotzen dela ikusi da (3. irudia A).

Azterketa bioinformatikoen bitartez, *dba* klusterra *Aspergillus* generoko beste espezieetan kontserbatzen ez dela baina txoko ekologikoa elkarbanatu dezaketen espezieetan kontserbatu daitekeela erakutsi da. Batetik, sententia edo espezie ezberdinen arteko gune genomiko baliokideen alineamenduak egin dira kontserbazio ezaren adierazgarri (3. irudia B, goian). Karratu gris ilunek *Aspergillus* generoko beste espezieetan *A.nidulans*-en genoma nola kontserbatzen den erakusten dute eta bertan *dba* klusterraren ausentzia garbi ikusten da. Bestetik, blast edo proteinen alineamenduak egin dira. Kasu honetan, *An7893*tik *An7903*-rako gene guztien homologoak aurkitu dira *Talaromyces stipitatus* lurreko onddoko kluster batean, gene guztiek *dba* klusterrarekiko posizio eta orientazioa mantentzen dutelarik. *dba*-ren gene gehienek homologoak dituen kluster bat ere aurkitu da *Coccidioides immitis* eta *C. Posadasii* giza patogenoetan. Hala ere, gene hauek posizio eta orientazio erlatibo ezberdinak dituzte *dba* klusterrarekin konparatuz (3. irudia B, behean).

dba klusterrak ekoizten duen DHMBA metabolitoak aktibitate biologikoa du *M.luteus* bakterioaren aurka (Gerke et al., 2012), lur, hauts, ur, aire eta gorputzeko hainbat ehunetan aurki daitekeen bakterioa. *dba* klusterraren espresioa aktibatzeak *M.luteus*-en kontrako tolerantzia handitzen duen aztertzeke, $\Delta flbB$ anduia (non *dba* klusterraren espresioa modu esanguratsuan handitua dagoen) eta *M.luteus* bakterioa elkarrekin kultibatu dira. Inkubazioaren ondoren, ezberdintasun handiak ikusten dira $\Delta flbB$ eta $\Delta flbB;\Delta dba$ anduien artean kokultiboaren gunean. $\Delta flbB$ hifek agarraren gainazala kolonizatzen dute, eta hifa aereoak sortzen dituzte bakterioaren presentzian (gezi beltza 3. irudia C). Patroi horrekin kontraesanean, onddoaren hifa dentsitatea jaitsi egiten da $\Delta flbB;\Delta dbaD$ eta $\Delta flbB;\Delta dbaI$ mutante bikoiztetan eta bakterio lehiakideak zelula kopuru esanguratsuki handiagoak sortzen ditu (3. irudia C). Hau da, $\Delta flbB$ fondo genetiko batean *dba*-ren espresioa aktibatua dagoenez, *M.luteus*-en aurrean tolerantzia handiagoa erakusten du onddoak. $\Delta flbB$ fondo genetikoan *dba* klusterreko gene bat ezabatzean (adibidez, $\Delta flbB;\Delta dbaI$) metabolitoa egiteko gaitasunarekin batera erresistentzia gaitasuna ere gutxitzen da.

Oro har, FlbB-ren ausentziak metabolismo sekundarioko kluster espezifikoen aktibitatea aldatzen duela ikusten da eta *dba* klusterraren espresioa handitzeak aktibitate antibiotikoa handitzen duela.

3. irudia. A) *dba* klusterreko geneen espresioa aztertzeko northern-blot esperimentua. B) Anlisi bioinformatikoak. Goian, sintenia analisia; behean, blast analisia. C) *Aspergillus nidulans* eta *Micrococcus luteus* espezieen kultiboa elkarrekin. Eskala= 2 cm.



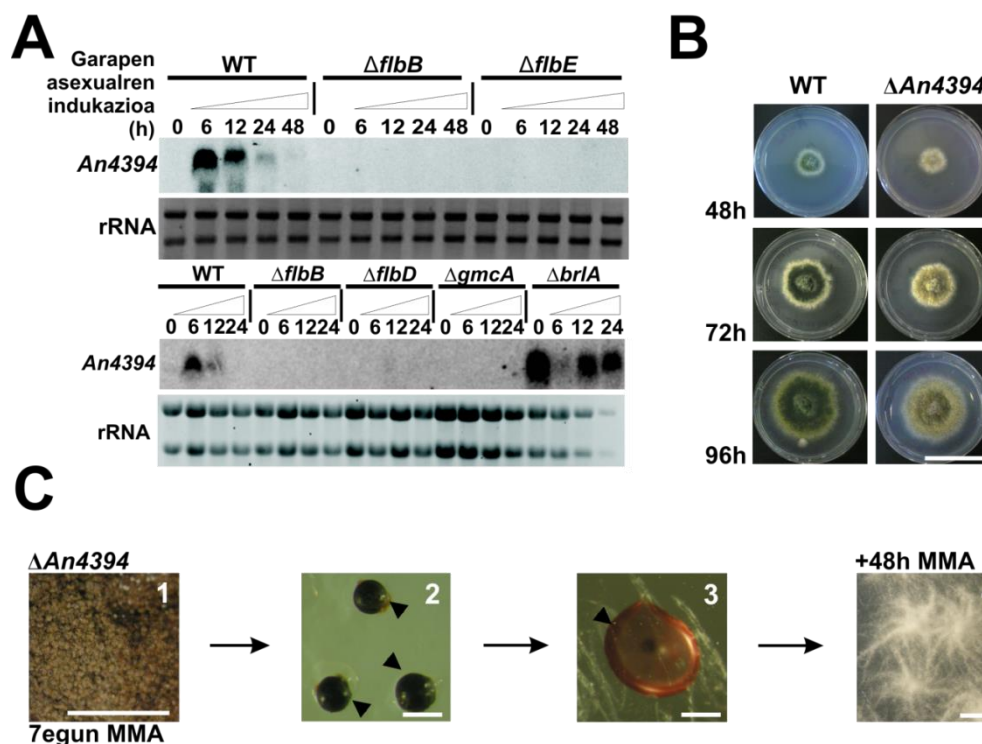
3.2 FlbBren aktibitatea beharrezkoa da *An4394*ren espresioa aktibatzeko, garapen sexuala inhibitzen duen TFa kodifikatzen duen genea.

RNAseq esperimentuak *An4394* genearen espresioa $\Delta flbB$ fondo genetikoan inhibitu egiten dela adierazten du. Gainera, analisi bioinformatikoek, *An4394*ren ortologoak garapen asexualaren erregulazio positiboan inplikaturik daudela iradokitzen dute. Beraz, *An4394* genearen espresioa garapen asexualerako denbora desberdinetan aztertzea erabaki zen Northern-blot teknikaren bidez.

Emaitzek *An4394*ren espresioaren inhibizioa konfirmatzen dute ez bakarrik $\Delta flbB$ fondo genetikoan, baita beste UDA mutanteetan ere (4. irudia A). Bestalde, *An4394* genea kentzeak ez du *flbB*ren espresio patroian eraginik sortzen, andui basatian bezala mantentzen da (3. irudia A). Beraz, FlbBk *An4394*ren espresioa kontrolatzen du, baina ez alderantziz.

A.nidulans-en garapenean *An4394*ren papera hobeto ulertu ahal izateko, genea delezionatu eta bere fenotipoa karakterizatu da. Horrela, $\Delta An4394$ anduiak garapen asexualaren inhibizio handia erakusten duela aztertu da. Konidiospora produkzioa 27 aldiz txikiagoa da WT-arekin konparatuz (72h, 4. irudia B). Garapen sexualari dagokionez, $\Delta An4394$ anduiak kleistotezio deritzen egitura sexual ugari sortzen du, WT anduiak baina bost aldiz gehiago (96h, 4. irudia B). Kleistotezioak isolatu, puskatu eta askosporen hazkuntza aztertuz hauen bideragarritasuna egiaztatu da (4. irudia C).

4. irudia. A) Northern-blot esperimentuan *An4394*ren espresioa. B) $\Delta An4394$ anduiaren fenotipoa. Eskala= 3cm. C) Kleistotezioen isolatzea eta askosporen hazkuntza $\Delta An4394$ zepan. Eskala 1) 0.2 cm; 2) 100 μ m; 3) 0.3 mm; 4) 3 mm.



Erakutsitako emaitzetan oinarrituta, *An4394* geneari *urda* izena jarri zitzaion, bere UDA bide genetikoarekiko menpekotasuna adieraziz (UDA-dependent role in the Regulation of Development in *A. nidulans*). *urda*-k ustezko TF bat kodifikatzen du, *flb*-en ondoren kokatzen dena garapen asexualaren bide genetikoan eta ez da soilik garapen asexualerako beharrezkoa, garapen sexuala ere inhibitzen du, bi garapen zikloen orekaren erregulatzaile bihurtuz.

4. Ondorioak

FlbBri buruzko adostutako modeloak dio FlbBk lehenik *flbD*ren espresioa aktibatzen duela eta gero bi faktoreek batera *brlA* aktibatzen dutela (Garzia *et al.* 2010). Lortutako emaitzek modelo hori sostengatzen dute, baina FlbBren eginkizuna *brlA*ren indukzioa baino haratago doala frogatzen dute. Elkarrentzat baztertzaila diren garapen asexual eta sexualaren denborak modulatzeko funtzio garrantzitsua du. Funtzio hau UrdAren bitartez egiten du, proteina honen gabeziak garapen sexual goiztiarra induzitu eta konidia produkzioa inhibitzen duelarik. Horregatik, UrdA-k, UDA bide genetikoaren garapen sexualaren erregulazioarekin konektatzen duela proposatzen dugu.

Garapena metabolito sekundarioen produkzioarekin estuki erlazionatua dagoela ezaguna da (Ugalde eta Rodriguez-Urra, 2014). Horren harira, lan honetan, *flbB*, *flbD*, *urda* edo *brlA* geneen delezioak *dba* klusterreko geneen espresio igoera adierazgarria dakarrela erakutsi da. Beraz, UDA garapen eta metabolismo sekundarioko bideak elkarri konektatuta daude. Gainera, kontutan hartu behar da, aurretik *dba* klusterraren indukzioa deskribatu den bi artikuluetan, klusterra genomaren ondoan kokatzen den azido ortselinikoaren klusterrarekin batera aktibatzen dela deskribatu dela. Ondorioz, bi klusterren erregulazioa lotuta egon daitekeela proposatu da eta metabolito sekundarioen produkzioan bien arteko kooperazioa egon daitekeela. Gure kasuan ordea, *dba* klusterreko geneak aktibatzen dira baina ez azido ortselinikoaren klusterrarenak. Beraz, nahiz eta azterketa honen esanahi biologikoa oraindik ezezaguna den, klusterren espresio eta metabolito sekundarioen sintesiaren malgutasuna agerian dago, kluster bat metabolito ezberdinak sintetizatzeke gai izan daitekeela proposatu delarik (Zaehle *et al.*, 2014)

A. nidulans eta *T. stipitatus*-en dagoen *dba*-ren kontserbazioa gene transferentzia horizontal (horizontal gene transfer process (HGT)) baten ondorioa izan daitekeela erakusten dute azterketa bioinformatikoek, hau da, organismo batek bere ondorengo ez den zelula bati material genetiko

transferitu ahal izan diola (Fitzpatrick, 2012). HGT prozesu hipotetiko honen ondorioz ondoek bizirauteko abantailak izan ditzakete beste organismo batzuekin lehiari daudenean, adibidez, txoko ekologiko batean. Era honetan, *dba* klusterrak sortutako DHMBA metabolitoak *M.luteus* bakterioaren hazkuntza inhibitzen du (Gerke *et al.* 2012). Beraz, zentzuzkoa izan daiteke *dba* klusterraren indukzioa estres biotikoaren erantzuna izan daitekeela proposatzea. Testuinguru honetan, hainbat generen ausentziak beste mikroorganismo batzuekin lehiak sortutako efektuak simulatu ahalko lituzke eta horrela, defentsa metabolitoen ekoizpena aktibatu, adibidez DHMBA. Horrela, UDA aktibitatearen ausentziak sortutako garapen asexualaren blokeoa (Etxebeste *et al.* 2010) aktibitate biologikoa duten konposatuaren sintesia sortzeko seinale gisa interpretatu dezake ondoak.

Oro har, lan honek, UDA aktibitate ezak garapen eta prozesu metabolikoak desorekatu egiten dituenaren bi adibide esanguratsu ematen ditu. Hala ere, RNAseq esperimenterako emaitzetan espresioa adierazgarriki aldatzen duten gene kopuru eta aniztasunagatik, FlbBren aktibitateak prozesu zelular ezberdin gehiagotan eragin zuzena edo ez-zuzena izan dezakeela ematen du. Honek garapeneko erregulazio sareen azterketarako ikuspegi berri bat irekitzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

FlbB-k nukleoan duen aktibitate transkripzionalari buruzko informazio oso zabala lortu da ikerketa honi esker. Baina badago oraindik FlbB-ren inguruan ezezagunak diren hainbat elementu. Horien artean, FlbB-ren puntatik nukleorako garraioa nola ematen den eta transkripzioa zein mekanismoren arabera erregulatzen duen jakitea.

FlbB lokalizazio zelular karakteristikoa duen UDA transkripzio faktorea da, aurretik esan bezala. Hifa begetatiboko punta eta nukleorik apikalenean pilatzen da, beste UDA osagarrien jarduera behar duen mekanismo batean. FlbBren puntako akumulazioa FlbE egokitzailearen bitartez gertatzen da eta etorkizunean, puntatik nukleorako garraioa aztertu nahi da.

FlbBren nukleorako garraioa proteinaren N-terminalean kokatutako NLS (Nuclear Localization Signal) baten bitartez gauzatzen da, baina ez da garraioan eragina duen elementu bakarra, FlbDren aktibitatea FlbB nukleoan pilatu dadin funtsezkoa da. Bi proteina hauek interakzionatu egiten dute eta interakzio eremuak definitzea da orain gure helburua. Bestalde, *flbD* kentzean, FlbBren nukleoko pilaketa jaisteaz gain, puntako fluoreszentiaren intentsitatea adierazgarriki handitzen da. FlbB-ren bi noranzkoko mugimendu modu askoz errazagoan aztertu daiteke andui honekin eta hori aprobeztatuz garraio mekanismoari buruzko informazioa gehiago lortzea da helburua.

Azkenik, FlbBren transkripzio mekanismoa garapenaren fase ezberdinetan definitzeko, FlbB eta DNAREN arteko interakzio analisiak egingo dira (EMSA, ChIP). Honen bitartez, FlbB eta FlbD-k gene ezberdinak erregula ditzakeen konplexu transkripzional bat osatzen duten aztertu nahi da eta garapenaren fase ezberdinetan nola jokatzen duen aztertu.

6. Erreferentziak

- Abe, K. and Gomi, K. (2008). Food products fermented by *Aspergillus oryzae*. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. Goldman GH y Osmani SA, Eds., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 429-439.
- Adams, T. H., J. K. Wieser and J.H. Yu, (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 35-54.
- Ahuja, M., Y. M. Chiang, S. L. Chang, M. B. Praseuth, R. Entwistle et al. (2012) Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J.Am.Chem.Soc.*134: 8212-8221.
- Bennet, JW (2010) An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. Machida M eta Gomi K Eds. Caister Academic Press, Norfolk (UK), 1-17.
- Bizukojc, M and Ledakowicz S (2009) Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. J.* 4, 647-664.

- Chiang, Y. M., E. Szewczyk, T. Nayak, A. D. Davidson, J. F. Sanchez et al. (2008) Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chem.Biol.* 15: 527-532.
- Dyer,P.S., Paoletti,M., and Archer, D.B. (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* 149: 2301-2303.
- Etxebeste,O., Garzia,A., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* 18: 569-576.
- Fischer,R., and Kües,U. (2006) Asexual Sporulation in Mycelial Fungi Growth, Differentiation and Sexuality. Kües,U., and Fischer,R. (eds). *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 263-292.
- Fitzpatrick,D.A. (2012) Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 329: 1-8.
- Garzia,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Ugalde,U., and 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.
- Gerke, J., O. Bayram, K. Feussner, M. Landesfeind, E. Shelest et al. (2012) Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Appl.Environ.Microbiol.*
- Inglis, D. O., J. Binkley, M. S. Skrzypek, M. B. Arnaud, G. C. Cerqueira et al. (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC.Microbiol.*13: 91.
- Nierman,W.C., May,G., Kim,H.S., Anderson,M.J., Chen,D., and Denning,D.W. (2005) What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S3-S5.
- Park,H.S., and Yu,J.H. (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 15: 669-677.
- Rodriguez-Urra,A.B., Jimenez,C., Nieto,M.I., Rodriguez,J., Hayashi,H., and Ugalde,U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* 7: 599-606.
- Weiderborner, M. (2001) *Encyclopedia of Food Mycotoxins* (Berlin:Springer).
- Wieser,J., Lee,B.N., Fondon,J., III, and Adams,T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 27: 62-69.
- Yaegashi,J., Oakley,B.R., eta Wang,C.C. (2014) Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 433-442.
- Yu,J.H., and Keller,N. (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* 43: 437-458.
- Zaehle,C., Gressler,M., Shelest,E., Geib,E., Hertweck,C., and Brock,M. (2014) Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. *Chem Biol* 21: 719-731.

7. Eskerrak

Lan hau Eusko Jaurlaritza, Ministerio de Economía y Competitividad eta Euskal Herriko Unibertsitateak (UVP /EHU) babestu dute. Halaber, eskerrak eman nahi dizkiogu Julio Rodríguez-Romero doktoreari (UPM, Espainia) eta Reinhard Fischer-i katedradunari (Karlsruhe-ko Unibertsitatea, Alemania) RNA erauzketa eta datuen prozesamenduan emandako laguntzagatik.