

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko
Unibertsitatea**

Kimika Zientzien Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

**Mutagenesi zuzendua *Aspergillus nidulans*
onddoaren mutante akonidialak diseinatu eta
sartzeko**

Egilea: Ion Luis Abad Recio

**Zuzendariak: Oier Etxebeste Juárez eta Elixabet Perez de Nanclares
Arregi**

Donostia, 2017ko Otsaila

Aipamen berezi hau Elixabet Perez de Nanclares Arregi
doktoregaiarentzat; bai laborategian, bai bertatik kanpo niregan
aurkeztutako arreta, laguntzeko prestutasun eta adiskidetasunarengatik.

Mila esker

Aurkibidea

Aurkibidea	3
Laburpena/ <i>Summary</i>	5
1. Sarrera	7
1.1. <i>A. nidulans</i> -en bizi zikloa	8
1.2. Garapen asexualaren kontrol genetikoa	10
1.3. Helburuak	13
2. Materialak eta Metodoak	15
2.1. Materialak	15
2.1.1. Tresna bio-informatikoak	15
2.1.2. Erabilitako oligonukleotidoak	15
2.1.3. Erabilitako anduiak	16
2.1.4. Kultura medioak	17
2.2. Metodoak	18
2.2.1. Kasete mutagenikoaren prestaketa	18
2.2.2. Kasetearen transformazioa	20
2.2.3. DNA Erauzketa	21
2.2.4. Southern Blot teknika	21
2.2.5. DNA-ren sekuentziazioa	23
2.2.6. Western Blot teknika	23
2.2.7. Proteinen arteko elkarrekintza: <i>Pull-Down</i> froga	25
2.2.8. Mikroskopia	25
2.2.9. Azterketa Fenotipikoa	25
3. Emaitzak	27
3.1. Andui transformatearen sorrera	27
3.1.1. Errekonbinaketa egokiaren eta Mutazioaren insertzioaren baieztapena: Southern-Blot eta Sekuentziazioa	28
3.2. FlbE proteinan eragindako W11A mutazioak honen lokalizazio zelularra aldatzen du, baita FlbB-rena ere	30
3.3. W11A mutazioak FlbE-n, konidiazioa eragozten du	32
3.4. W11A mutazioak FlbE-n, FlbE eta FlbB-ren arteko elkarrekintza inhibitzen du	33
4. Eztabaida	35
5. Ondorioak/ <i>Conclusions</i>	37
Erreferentziak	39
Eranskinak:	41
1go eranskina: Transformazioa	41

2. Eranskina: DNA erauzketa	42
3. Eranskina: Southern-Blot	43
4. Eranskina: Western-Blot	44
5. Eranskina: Proteinen arteko elkarrekintza: <i>Pull-Down</i> froga	46

Laburpena/Summary

Gradu amaierako lan hau biologia molekularren zenbait teknika estandarren ikasketan oinarritu da. Horretarako, *Aspergillus nidulans* onddoa eta bere garapen asexuala kontrolatzen duen FlbE proteina hartu dira eredu bezala, proteinak hamaikagarren posizioan duen Triptofano aminoazidoa Alanina batez ordezkatur. Proteinan sartutako aldaketa horrek onddoaren hazkuntza eta garapenean duen eragina aztertu da, baita, maila molekularrean, zelula barneko lokalizazioan eta beste proteinekin FlbE-k ezartzen dituen elkarrekintzetan duen eragina ere. Analisi hauek burutzeko biologia molekularreko hainbat teknika landu dira, hala nola PCR-a (Polymerase Chain Reaction), transformazioa, DNA erauzketa eta detekzioa, proteinen immunodetekzioa, proteinen arteko elkarrekintza frogak eta fluoreszentzia mikroskopia. Orohar, 11. posizioan dagoen triptofanoa alaninaz ordezkatzean, FlbE proteinaren lokalizazio subzelularra, interakzioak eta garapena abiarazteko duen gaitasuna inhibitu egiten dira nabarmen.

*The main aim of this Final Degree project has been the development of basic skills in standard molecular biology techniques. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and FlbE, a protein required for asexual development, have been used as models. Tryptophan in position 11 of FlbE has been replaced by an Alanine, and the effects of this replacement on the fungi's development were studied, as well as the impact on subcellular localization and the interactions with other proteins. To proceed with the analysis, different molecular biology techniques were applied, such as PCR (Polymerase Chain Reaction), transformation, DNA extraction and detection, protein immunodetection, protein-protein interaction assays and fluorescent microscopy. Overall, W11A substitution within FlbE causes an inhibition of its subcellular localization, interactions and the ability to induce development.*

1. Sarrera

Aspergillus nidulans Ascomycota filumeko harizpi itxurako onddo espeziea da. Harizpi itxurako ondoek hifa begetatibo izena duten hodi formako zelulak osatzen dituzte (ikus 1B eta 1C irudiak; ikus ere 1.1 atala) (1). Hifak beraien puntatik hazten dira (hazkuntza polarra dute) eta adarkatu ere egiten dira, mizelio izeneko sare trinkoa osatzen dutelarik. Mizelioa kolore zurikoa da eta kotoi moduko itxura du. Garapenak aurrera egin ahala konidio izeneko esporak osatzen ditu eta hauen kolore arrunta berdea da, kolore hori duen metabolito baten sintesia dela eta. Mutazioen bidez kolore horia edo txuria duten konidioak ere sor daitezke (ikus 1A irudia) (2).

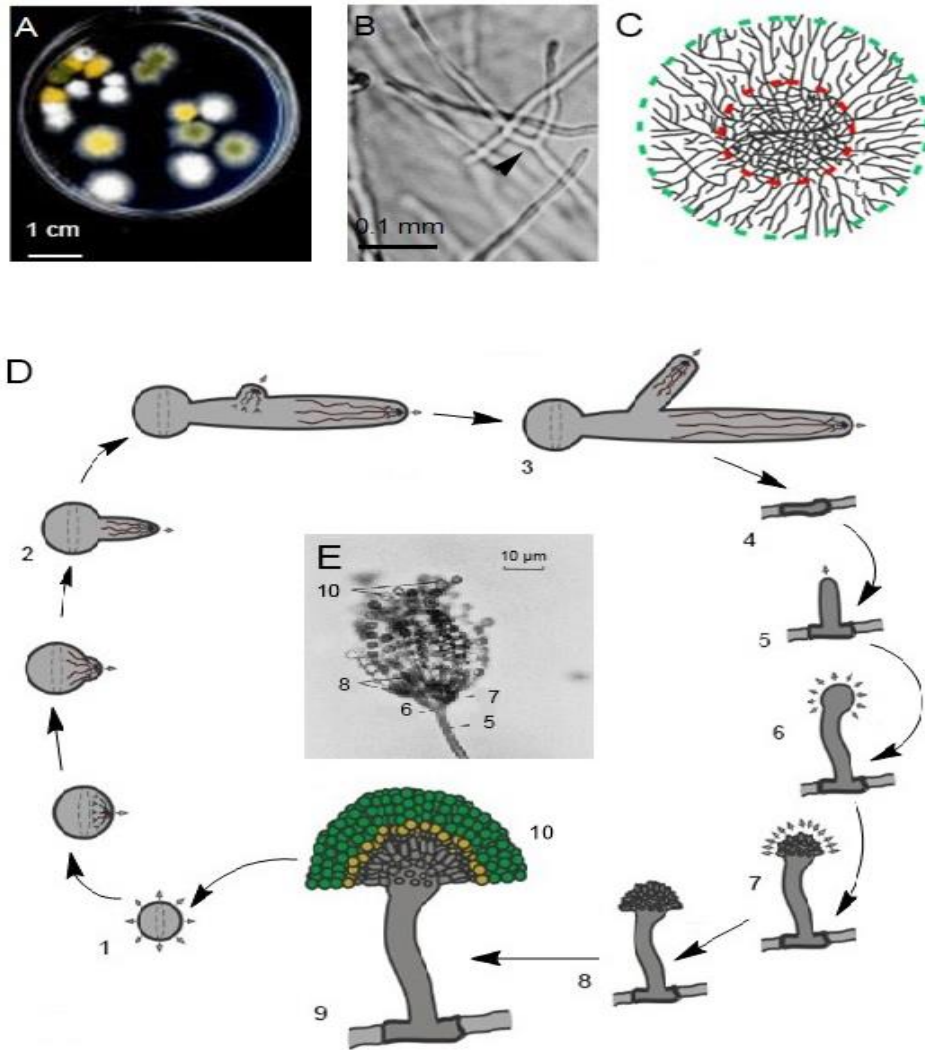
A. nidulans harizpi itxurako onddoen azterketarako eredu bezala erabilia izan da hogeigarren mendeko erdialdetik hona (1,3). Bere genomaren lehen sekuentzia zioa Monsanto eta Broad Institute-ren arteko kolaborazio baten ondorioz egin zen eta hau 2005. urtean argitaratu zen (4). Geroztik hainbat bertsio eguneratu argitaratu dira, AspGD (<http://www.aspgd.org/>) edo FungiDB (<http://fungidb.org/fungidb/>) datu-baseetatik lor daitezkeenak (bigarrenean bertsio eguneratuenak). Azken bertsioak, *A. nidulans*-en genomak 10.712 gene dituela aurreikusten du (5). Onddo hau eredu bezala erabiltzeko arrazoiak ugariak dira. Batetik, interes ekonomiko edo klinikodun *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* eta *Aspergillus oryzae* bezalako espezieekiko gertutasun ebolutiboa handia da. *A. niger*, esaterako, industrialki azido zitriko eta glutamikoak ekoizteko erabiltzen da. *A. flavus* zerealak eta hazi lehorrak infektatzen dituen onddoa da eta *A. fumigatus* patogenikoa da gizakiarentzat, biriketako aspergilosia sortzen duelarik (6,7). Azkenik, *A. oryzae* (Koji japonieraz) Asia ekialdeko kulturaren erabilia da soia, arroza eta bestelako hartzidura prozesua aurrera eramateko, soia saltsa, arroz ozpin edo sakea bezalako produktuen ekoizpenean (8). Bestetik, *A. nidulans*-en garapen zikloak, sexuala eta asexuala (ikus asexuala 1C irudian), errez induzitu daitezke laborategi mailan. Biologia zelular eta molekularreko teknikak ere modu estandarrean aplika dakizkioke, hala nola, geneen delezioa, gain-espresioa, fusio proteinak osatzea etiketa fluoreszenteekin, fenotipoaren azterketarako teknikak, eta abar. Teknika hauen erabilerak prozesu biologikoen inguruko informazio garrantzitsua ematen du, metabolismoaren kontrola edo hazkunde polarraren kontrola

bezalako prozesuak ikertzerako orduan estrapolagarri izan litezkeen modeloak ezarriz (9).

1.1. *A. nidulans*-en bizi zikloa.

Bi fase nagusitan bana daiteke bere bizi zikloa: hazkuntza begetatiboa eta ugalketa egituren garapena, bai sexualak bai asexualak (ikus 1D irudia) (1). Hazkuntza begetatiboa espora baten, sexual zein asexual, ernamuinketarekin (*germinación*) hasten da (ikus 1D irudiaren 1 azpiatala). Horretarako, lehenik espora puztu egiten da (hazkuntza isotropikoa, norabide guztietan berdina, alegia) eta baldintza egokien pean germinula hodia sortzen da esporaren puntu jakin batean. Germinula hodia hazkuntza polar bidez luzatzen da, mintz plasmaticoaren eta pareta zelularren sintesirako behar diren konposatu guztiak hazkuntza lekura, punta bezala ezagutzen dena, garraiatzen delako (10). Honela hifa begetatiboak osatzen dira, adarkatu ere egiten direnak, hazkunde polarreko puntu berriak sortuz eta substratuen kolonizazioa eraginkorrago eginez. Hazkuntza epe jakin baten ondoren eta kanpo zein barne estimulu egokien pean, garapen asexuala eragiten da (ikus 1D irudia, 4-10 azpiatalak), non konidioforo deituriko estrukturak osatzen dituen onddoak (11). Konidioforo bakoitzak milaka espora asexual edo konidio ditu eta hauen bidez onddoaren dispertsioa ahalbidetzen da, konidio hauek aireratu, substratu berri batean ezarri eta bertan ernamuindu egin daitezkeelako, kolonizazio ziklo berri bat hasiz.

Denborak aurrera egin ahala, egitura sexualak ere garatuko dira koloniaren eremu zaharrenetan, kleistotezio izenekoak. Kleistotezio bakoitzak, zortzina espora sexual edo askospora dituzten aska izeneko poltsak ditu barruan. Ugalketa sexualak bi anduien arteko material genetikoaren konbinazioa ahalbidetzen du (2).



1go Irudia: *A. nidulans*-en hazkuntza eta garapen asexuala. A: *A. nidulans*-en kolonia desberdinak erakusten dituen Petri plaka. Kolonien pigmentazio ezberdina erakusten da. Pigmentazio berdea andui silbestrearena da eta horia eta zuriak, kolore berdea lortzeko beharrezkoak diren bi entzimatako bat, *wA* (txuritik horira) eta *yA* (horitik berdera) geneek kodifikatzen dituztenak, mutatua duten anduinenak. Irudia (12)-tik lortua. B: Mikroskopia irudian *A. nidulans*-en hifak ageri dira, geziak adarkadura bat erakusten duelarik. Irudia (13)-tik eskuratua C: *A. nidulans*-en kolonia baten egitura irudikatzen duen irudia. Periferiako hifen (kolore berdez adieraziak) adarkadurek elkar alderatzen dute, barnealdeko hifek (kolore gorria) elkar erakartzen duten bitartean, batzuk elkarrekin fusionatuz. Barrualdeko hifek ere egitura asexualak, konidioforoak, garatzen dituzte, bakoitzak milaka konidio dituelarik. (14)-tik eskuratua. D: Konidioak sortzeko mekanismoa; mizelioan pixkanaka hainbat zelula mota desberdin sortzen dira, irudian azaltzen direnak 4-10 zenbakiekin. 4) oin zelula; 5) zurtoina, oin zelulatik hazkuntza polarraz luzatzen joaten dena; 6) besikula, zurtoinaren punta puztean sortua; 7) metulak, besikularen goiko aldetik sortzen direnak; 8) fialidak, metula bakoitza bitan banatzean sortuak; 9) Konidioforo helduak eta 10) konidioak, kate luze moduan sortzen direnak fialida bakoitzetik. Konidioak substratu berrietara zabaltzean, eta baldintza egokiak topatzean, ernamuindu egingo dute, 1) puztuz eta garapen polarreko mekanismoak eraikiz. Honela, germinula hodia sortzen da (2) zeina luzatu eta adarkatu ondoren (3) mizelio heldua osatuko duen. Irudia (14) -tik moldatua. E: Konidioforo heldu baten mikroskopia irudia. Irudia (13)-tik eskuratua.

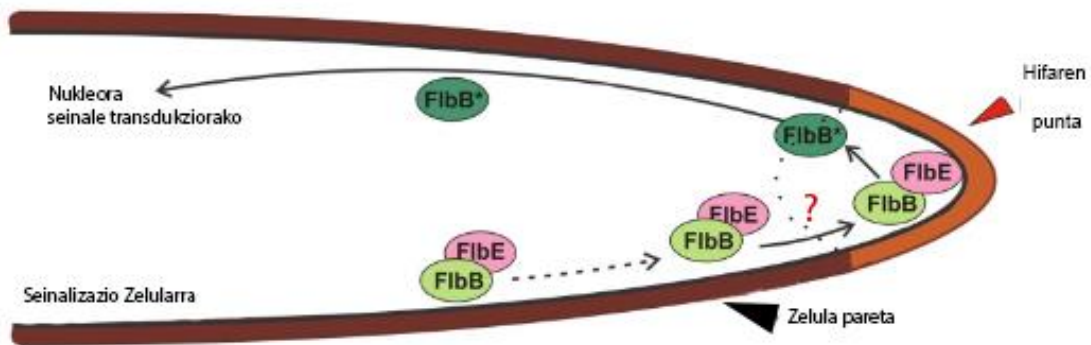
1.2. Garapen asexualaren kontrol genetikoa.

Inguruneko zein zelula barneko seinaleek garrantzi handia dute garapena eragiteko momentuan (11,14). Seinale horiek, ordea, detektatu egin behar dira, zelula barneko seinaleetan bihurtu eta dagokion erantzuna aktibatu behar da, kasu honetan garapen asexuala. Komunikazio prozesu hauei, orokorrean, seinaleen transdukzio-bideak deritze. Bide hauen azken eragileak transkripzio faktoreak dira, geneen espresioa kontrolatzen duten proteinak, alegia, seinaleei dagokien erantzun zelularra aktibatuz edo erreprimatuz (15). Seinaleak jasotzen direnean, transdukzio-bidea martxan jartzen da, seinalearen informazioa zelularen nukleora eramateko eta han erantzun egokia eman dadin. Erantzun zelularra geneen espresioa modulatuaz lortzen da, hauek aktibatuz edo inhibituz.

Garapen asexualaren kasuan, transdukzio-bide nagusia UDA (*Upstream Developmental Activator pathway*) akronimoaz ezagutzen da. Bide honetako proteinak kodifikatzen dituzten sei gene identifikatu dira gutxienez: *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* eta *flbE* (*flb*: *fluffy low brlA*; *fluffy*, kotoi itxurako kolonia akonidiala; fenotipo hori *brlA* genearen espresio mugatuak eragiten du; ikus *brlA* aurrerago) (16,17). UDA hauen funtzioaren karakterizazioari esker, beraiek jarraitzen dituzten mekanismo molekularren inguruko datu ugari bildu da, esaterako nola erabiltzen duten hazkunde polarreko makineria seinaleak transmititzeko (18). UDA geneen diana transkripzionala, alegia, erregulatu behar duten gene nagusia *brlA* da. *brlA*-k konidioforoa osatzen duten zelula gehienek sintesia kontrolatzen duten geneen artean lehena eta nagusienetako bat da. Gene hauek osatzen duten bide genetikoa CDP (*Central Developmental Pathway*) akronimoaz ezagutzen da. Beraz, *brlA* geneak UDA eta CDP bide genetikoaren arteko zubi lana egiten duela kontsidera daiteke, estimuluei erantzun egokia eman ahal izateko

flbE, 202 aminoazido eta 23.1 kDa-eko pisu molekularreko proteina kodetzen duen UDA genea da. UPV/EHU-ko zein Winsconsin-go Unibertsitateko lantaldeek karakterizatu dute gene honen funtzioa (16,17). FlbE-ren ezaugarri azpimarragarrienetako bat FlbB erregulatzaile transkripzionalarekin (UDA bideko beste proteina bat) duen harreman funtzionala da. FlbE eta FlbB-k hifaren puntan interakzionatzen dute. Puntan kokatzeko, batak bestearen beharra du eta puntan

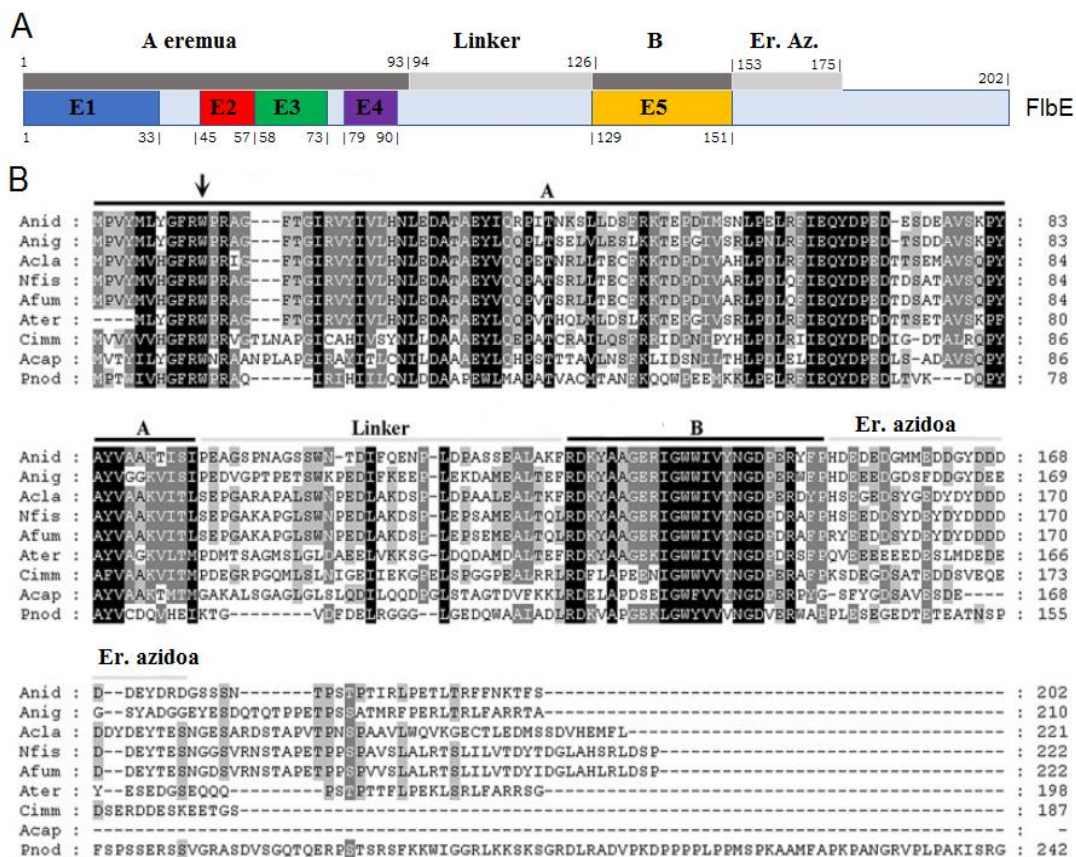
kokatzea beharrezkoa da FlbB-arentzat, hortik nukleora mugitu eta nukleoan *brlA*-ren espresioa aktibatzen (18) (ikus 2. irudia). *flbE*-ren delezioak, hau da, FlbE proteinaren gabeziak konidiazioa inhibitzen du, FlbB-ren delezioak bezala (16). Gainera bataren gain-espresioak ez du bestearen faltak sortutako garapenaren gabezia ezabatzen. Ikerketek erakutsi dute FlbE-ren gabezian FlbB ez dela hifaren puntan kokatzen, eta alderantziz, eremu honetan bete behar duten funtzioa eragotziz (18,19).



2. Irudia: FlbB eta FlbE-aren arteko interakzioarako proposatutako eredu molekularra. FlbB eta FlbE batera garraiatzen dira hifaren puntara, baina oraindik ezezaguna da nola ematen den garraio hau (marra ez jarraitua). Bertan jasotako seinaleak FlbB eta FlbE-aren arteko elkarrekintza inhibituko luke, FlbB aktibatuz (FlbB*) eta nukleorantz askatuz. Irudia (14)-tik lortua eta moldatua.

Genoma sekuentziaturik duten espezieen DNA sekuentzia, eta beraien geneetatik sortuko liratekeen proteinen sekuentziak ere, datu base desberdinetan daude eskuragarri. Honek, abiapuntutzat gene edo proteina baten sekuentzia hartuta, beste espezieetan sekuentzia antzekoenak bilatzeko aukera ematen du. Kontserbatuen dauden sekuentzia horiei ortologo deritze eta kontserbazioa handia bada, funtzioa ere kontserbatua egoten da askotan. FlbE-k ortologoak ditu harizpi itxurako hainbat ondo espezieetan. Ortologo horien guztien sekuentziak konparatuta, alineamenduz, FlbE-k bi eremu kontserbatu dituela aurkitu da, biak “*linker*” izenez adierazitako kontserbazio baxuko hirugarren eremu batez konektaturik daudelarik (ikus 3. Irudia) (16). Análisi bioinformatiko sakonagoen arabera (Marc S. Cortese doktoreak eginak), lehen eremu nagusia lau azpi-eremutan bana daiteke (ikus 3A irudia): E1, E2, E3 eta E4. Eremu hauen

funtzioa aztertzeke helburuarekin Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoregaiak egindako doktorego tesiaren barruan kokatzen da GrAL hau; zehazki E1 eremuaren funtzioaren azterketan. Horretarako, F1bE-ren E1 eremuaren barruan oso kontserbatua dagoen eta posizio zentrala duen amino azido bat, 11. posizioko triptofanoa, alegia, alanina baten ordezkari trukatuta da (gezi beltza 3B irudian), berari dagokion DNA sekuentziako kodoia (aminoazido bat kodifikatzen duen DNA-ren nukleotido hirukotea) ordezkaturik. DNA edo RNA mailan, amino azido bat kodetzen duen nukleotido hirukote bakoitzari kodoia deritzo. Alanina (A hizkia adierazten dena), amino azido hidrofobiko eta txiki bat, aukeratu da ordezkari egiteko triptofanoa (W hizkia) aromatikoa, bolumen handikoa eta polarragoa delako.



3. Irudia: F1bE-ren sekuentziaren azterketa. A: F1bE-ren eremu kontserbatuak eta euren kokapena erakusten duen eskema. Kolore ezberdinetan Marc S. Cortese doktoreak proposatutako eremuak, haien hasiera eta amaierako puntuak markaturik daudelarik. B: *A. nidulans*-en F1bE-ren ortologo diren zenbait sekuentziaren egindako alineamenduak. Nomenklatura: Anid, *A. nidulans*; Anig, *A. niger*; Acla, *A. clavatus*; Nfis, *Neosarthoria fischeri*; Afum, *A. fumigatus*; Ater, *A. terreus*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Acap, *Ajellomyces capsulatum*; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum*. Beltzez kontserbatutako aminoazidoak ageri dira (berdinak edo izaera antzekoak) eta zenbat eta argiago orduan eta kontserbazio maila txikiagoa. Geziak W11 aminoazidoa erakusten du. Irudia (16)-tik eskuratu da.

1.3. Helburuak.

GrAL honen helburu esperimentalak honako hauek izan dira:

-W11A ordezkapena duen FlbE proteina mutatua espresatzen duen anduia sortu. Horretarako, 1) andui hori sortzeko eragin den DNA errekonbinaketa prozesua ondo eman dela baieztatu da Southern-Blot teknikaren bitartez, eta 2) eragin nahi zen mutazioari dagokion kodoiaren ordezkapena eman dela eta beste mutaziorik ez dagoela baieztatu da ere sekuentziazio bidez.

-Sortutako andui mutantearen karakterizazio fenotipikoa burutu.

-W11A mutazioa duen FlbE proteina mutantea sintetizatzen dela baieztatu Western-Blot teknikaren bidez eta honen lokalizazio subzelularra aztertu fluoreszentsia mikroskopia bidez, beti ere forma silbestrearen kantitate eta lokalizazioarekin alderatuz.

-FlbB eta FlbE proteinen arteko elkarrekintzan mutazioak eraginik duen aztertu.

2. Materialak eta Metodoak

2.1. Materialak

2.1.1. Tresna bio-informatikoak

A. nidulans-en *flbE* locus-aren sekuentzia Aspergillus Genome Database (<http://www.aspgd.org/>) web orrialdetik eskuratu da. Sekuentzia hori Invitrogen CorporationTM-ek garatutako Vector NTI 10.1.1 (2005) programa erabiliz aztertu da, PCR bidez eraiki beharreko konstrukzio genomikoa lortzeko eta sekuentziaziorako beharrezkoak diren oligonukleotidoak (1go Taula) diseinatzeko. Bestetik, konstrukzio genomikoa *A. nidulans*-en genomari ondo integratu dela baieztatuzko burutu beharreko Southern-Blot probaren diseinua ere egin da programa honen laguntzaz, errestrikzio entzima eta zunda egokiak aukeratuz (ikus 2.2.4 atala).

Sekuentziazio datuak aztertzeko Chromas 2.6.2 (Technelysium[®]) software-a eta Lalign (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>) web aplikazioa erabili dira.

2.1.2. Erabilitako oligonukleotidoak

Lan honetan erabilitako oligonukleotidoak, 1go Taulan jasotzen dira:

IZENA	SEKUENTZIA (5'→3')	L (BP)	PM (g/mol)	FT (°C)	ERABILERA
FLBE (W11A)-UP	CTCTACGGCTCCGATGGCCCCGAGCTGG	29	8847	84.0	Mutagenesia/ sekuentziazioa
FLBE (W11A)-DW	CCAGCTCGGGGCCATCGGAAGCCGTAGA G	29	8954	84.0	Mutagenesia/ sekuentziazioa
AN0721-PP1	GCAACAAATTCGGCTGTTGGGCTCAGG	27	8340	78.6	Kasete mutagenikoaren sorrera
AN0721-GSP4	GCTTACCTGCTGGATCTCCTGCCGGTACT TAGG	33	10088	78.0	Kasete mutagenikoaren sorrera
AN0721-GSP2	GCTTACCTGCTGGATCTCCTGCCGGTACT TAGG	33	10088	78.0	Sekuentziazioa
FLBE (D70A/D73A)-UP	CGCTTCATTGAACAGTATGACCCCGAGG ACGAAAGC	36	11063	82.1	Sekuentziazioa

FLBE (P182)-UP	GGGTCGTCTAGTAACACACCGTCGACGC CG	30	9193	80.7	Sekuentziazioa
FLBE (Y85A;Y86A)-DW	GCCTTATGCTTATGTTGCTGCGAAAACG	28	8594	73.9	Sekuentziazioa

1go Taula: Erabilitako oligonukleotidoak. Diseinua Oligoevaluator™ (Sigma-Aldrich) algoritmoa erabiliz egin zen. Pisu molekularra (PM) ezagutzea beharrezkoa da PCR-erreakziorako diluzio egokiak egin ahal izateko eta fusio tenperaturek (FT) PCR-aren anilamendu tenperatura zehazten dute (ikus 2.2.1 atala). L: luzera, hastarazlearen (oligonukleotidoaren) nukleotido kopurua.

2.1.3. Erabilitako anduiak

Lan honetan erabilitako anduiak 2. Taulan jasotzen dira:

ANDUIA	GENOTIPOA	AUXOTROFIAK	ITURRIA
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Piridoxina, uraziloa eta uridina	(20)
BD178	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB^{Afum}, riboB2</i>	Az. <i>p</i> -aminobentzoikoa, piridoxina, uridina eta uraziloa	(16)
BD721	<i>pyrG89, pabaA1; ΔnkuA::argB, ΔflbB::ribo^{Afum}, pyroA+::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*[*]; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Afum}, veA1, riboB2</i>	Az. <i>p</i> -aminobentzoikoa eta piridoxina	(18)
BD773	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::gfp::pyrG^{Afum}, veA1</i>	Piridoxina	(18)
BD946	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB, ΔflbB::ribo^{Afum}, pyroA+::[gpdA^{mini}::gfp::flbB::]_{1x}::pyroA4*[*]; veA1, riboB2</i>	Az. <i>p</i> -aminobentzoikoa, uridina eta uraziloa	Lan hau (Elixabet Perez de Nanclares)
BD995	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::gfp::pyrG^{Afum}, veA1</i>	Piridoxina	Lan hau
BD1001	<i>pyrG89, pabaA1; ΔnkuA::argB, ΔflbB::ribo^{Afum}, pyroA+::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*[*]; gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::mrfp::pyrG^{Afum}, veA1, riboB2</i>	Az. <i>p</i> -aminobentzoikoa	Lan hau

2. Taula: Lan honetan erabilitako *A. nidulans*-en anduiak. Genotipoak ezabatutako, mutaturako edo eraldatutako geneak adierazten ditu. Auxotrofiak genotipoak sortutako behar nutrizionalak dira. Alegia,

andui batek *pyroA*-n auxotrofia badu (*pyroA4*), piridoxina beharko du hazi ahal izateko. Auxotrofia hauek andui transformanteen selekzioa egiteko erabiltzen dira.

2.1.4. Kultura medioak

Lan hau burutzeko erabili diren kultura medioak 3. Taulan jasotzen dira:

MEDIOA	KONPOSIZIOA
Aspergillus Medio Minimoa (MMA), 400 mL Aspergillus Medio Osatua (MCA), 400 mL	-Traza elementu eta gatz disoluzioa: 8 mL -Agarra: 6g (medioa solidoa bada, likidoa izanik ez) -Ur distilatua: 360 mL -pH: 6.8-ra doitu NaOH 1 M-arekin -Autoklabean esterilizatu -Karbono (Glk) eta nitrogeno (NH ₄ T) iturriak gehitu MMA-ren berdina + 2 g Legamia estraktua
Protoplastoen birsorkuntza Medio Minimoa (MMR), 400 mL	-Traza elementu eta gatz disoluzioa: 8 mL -Sakarosa 136.8 g -Agarra: 6 g -Ur distilatua 400 mL-arte -pH: 6.8-ra doitu doitu NaOH 1 M-arekin -Autoklabean esterilizatu -Karbono eta nitrogeno iturriak gehitu
Transformazio ondorengo Medio Minimoa – TOP (MMR-TOP), 400 mL	-MMR-ren berdina baino agar 2.4 g-rekin
Glukosa (Glk) %20 (10x), 1 L	-Glukosa: 200 g -Ur distilatua 1 L arte -Autoklabean esterilizatu
Amonio Tartrato (NH₄T) dibasiko disoluzioa (100x), 200 mL	-(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆ : 18.4 g -Ur distilatua 200 mL arte -Irabiatu arrai magnetiko baten laguntzaz -Autoklabean esterilizatu
Traza elementu eta gatz disoluzioa, 1 L	-KCl: 26 g -Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O: 26 g -KH ₂ PO ₄ : 76 g -Traza elementu disoluzioa: 50 mL -Ur distilatua 1 L arte -Autoklabean esterilizatu
Traza elementu disoluzioa, 1 L	-Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O: 40 mg -CuSO ₄ · 5H ₂ O: 400 mg -FePO ₄ · 2H ₂ O: 800 mg -Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O: 800 mg -ZnSO ₄ · 7H ₂ O: 8 g -MnSO ₄ · 4H ₂ O 800: mg -Ur distilatua 1 L arte

3. Taula: *A. nidulans*-en kulturak hazteko erabili diren medio eta disoluzio nagusiak.

Anduien auxotrofiak osatzeko erabili diren konposatuak 4. Taulan jasotzen dira:

AUXOTROFIAK	PRESTAKUNTZA
Piridoxina (pyro) (10^3x), 100 mL	Piridoxina: 5 mg Ur distilatua 100 mL arte Autoklabean esterilizatu
Azido <i>para</i>-aminobentzoikoa (paba) (10^3x), 100 mL	Az. <i>p</i> -aminobentzoikoa: 20 mg Ur distilatua 100 mL arte Filtrazior esterilizatu
Biotina (10^4x), 100 mL	Biotina: 1 mg Ur distilatua 100 mL arte Distilatu filtrazior
Uridina 1x	1.22 g/L medio
Uraziloa 1x	0.56 g/L medio

4. Taula: *A. nidulans*-en andui ezberdinen auxotrofiak asetzeko erabilitako osagarriak.

2.2. Metodoak

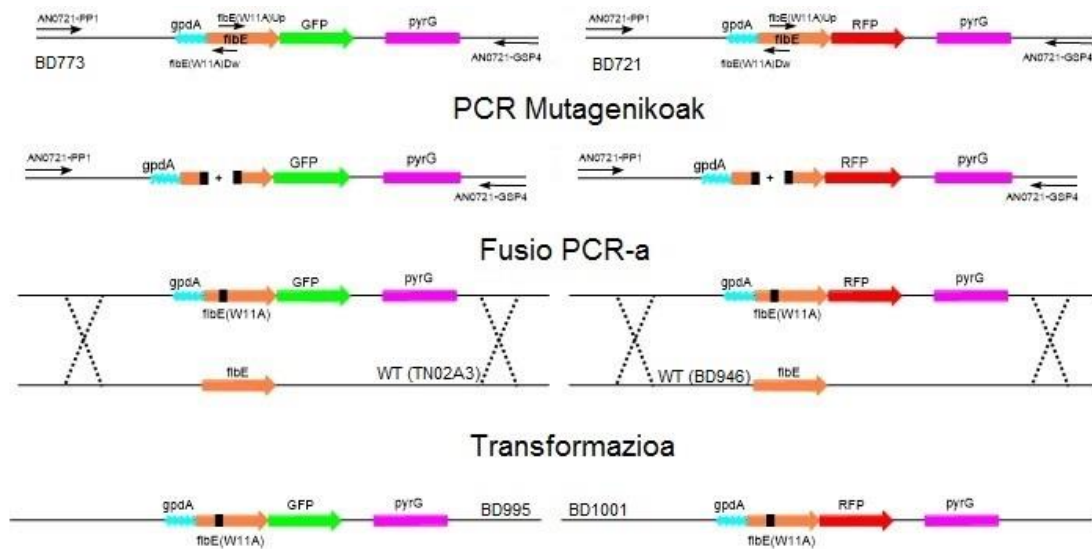
2.2.1. Kasete mutagenikoaren prestaketa

FlbE-n mutazioa duen anduia, pareta zelularrik gabeko protoplasto deituriko zelulak DNA “kasete” edo molekula sintetiko batekin transformatuz lortuko da. Beraz, lehen pausoa kasete sintetiko hori lortzea izango da. Horretarako, PCR teknika erabiliko da, zeina, teknika estandarra kontsidera daitekeen biologiaren hainbat alorretan. Polimerasaren kate erreakzioak, erreferentzia bezala erabiltzen den DNA molde batetik gure intereseko zati bat anplifikatzeko (kopia ugari egiteko) aukera ematen du. Horretarako, oligonukleotido espezifikoak erabiltzen dira (20-30 nukleotidotako DNA sekuentzia laburrak), DNA polimerasari abiapuntua ezarriko diotenak eta anplifikatuko den produktuaren hasiera eta bukaera ezarriko dituztenak. Gure kasuan, FlbE-ren forma mutantea anplifikatuko da, baina, gainera zenbait sekuentzia gehituz alboetan. Alde batetik, kontutan hartuz FlbE proteinaren kontzentrazioa zelulan baxua dela, maila hori igotzeko aukera emango duen promotore sekuentzia bat gehituko dugu, *gpdA^{mini}* deiturikoa. Bestetik, FlbE-ren forma mutantearen zelula-barneko lokalizazioa ere aztertu nahi dugunez, etiketa fluoreszente bat itsatsiko diogu, lehenik GFP (proteina fluoreszente berdea) eta beste kasu batean mRFP (proteina monomeriko fluoreszente gorria). Azkenik, andui transformanteen selekzioa egiteko *Aspergillus fumigatus*

onddoaren *pyrG* genea erabiliko dugu markadore bezala. Zati horiek guztiak kontutan hartuta, sortuko diren kaseteei *gpdA^{mini}::flbE(W11A)::GFP::pyrG^{Afum}* edo *gpdA^{mini}::flbE(W11A)::mRFP::pyrG^{Afum}* deituko diegu.

Laugarren irudian erakusten den bezala, lehen pauso batean, bi PCR erreakzio independente egin dira. Batean, aurretik sortua dagoen BD773 izeneko anduiaren (*gpdA^{mini}::FlbE::GFP::pyrG^{Afum}* egituraketa duena genomaren *flbE* locus-ean) DNA erabiltzen da molde bezala eta bestean BD721-rena (*gpdA^{mini}::FlbE::mRFP::pyrG^{Afum}* egiturarekin) baina, PCR erreakzio batean, FlbE-PP1 eta FlbE(W11A)-Dw, eta beste erreakzioan, FlbE(W11A)-Up eta FlbE-GSP4 oligonukleotido pareak erabiltzen dira (ikus 1go taula). FlbE(W11A)-Dw eta –Up oligonukleotidoek, eragin nahi dugun mutazioari dagokion kodoian (W11 amino azidoa kodifikatuko duen nukleotido hirukotea) alanina kodifikatzeko beharrezkoa duen mutazioa dute. Era honetan, PCR erreakzioan zehar, W11A ordezkapenari dagokion aldaketa sartuko da anplifikatuko diren DNA zatietan. Lehen PCR produktuak *gpdA^{mini}* eta W11-ri dagokion mutazioa duen *flbE*-ren zatia izango ditu. Bigarren zatia, aldiz, *flbE*-ren gainontzeko sekuentzia (mutazio berdinarekin), *gfp* edo *mrfp* eta *pyrG^{Afum}* izango ditu.

Azken pausoan, hirugarren PCR erreakzio batean, alegia, aurretik anplifikatutako bi zatia fusionatu egiten dira. Sortutako kasetearen tamaina egokia baieztatu egiten da agarosa elektroforesi bidez, purifikatu egiten da soberako erreaktiboak garbitzeko komertziala den “*kit*” bat erabiliz (NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit; Macherey Nagel) eta transformaziorako gordetzen da.



4. Irudia: Jarraitutako mutagenesi eta transformazio prozeduren eskema. 3 PCR erreakzio ezberdin egin behar dira, bi zati desberdinetan bana daitezkeenak. Lehenik, fusionatuko diren fragmentoak sortu, mutazioa izango dutenak. Bestetik, bi zatien fusioa. Irudian fusio horiek GFP (ezkerrean) edo mRFP-rekin (eskuian) sortzeko jarraitutako bi prozedurak erakusten dira. Mutazioa eragiteko, mutazioa beraien sekuentziaren barnean duten oligonukleotidoak erabili dira, *flbE(W11A)*-up eta *flbE(W11A)*-Dw (zati beltza *flbE*-ren barnean). Fusio PCRan sortutako kasete mutanteak andui silbestrearen protoplastoak transformatzeko erabiltzen dira, independenteki, behealdean adierazten diren antolaketa genomikoak dituzten transformanteak lortzen direlarik (ezkerrean *gfp*-rekin eta eskuian *mrfp*-rekin). Marra ez-jarraiek errekonbinaketa prozesua adierazten dute, genomaren *flbE* sekuentzia sortutako kasete sintetikoaz ordezkatzeko delarik. Transformanteen selekzioa *A. fumigatus*-en *pyrG* genea erabiliz egiten da, uridina eta urazilo gabeko medio batean hazteko aukera emango duena.

2.2.2. Kasetearen transformazioa

Sortutako *gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::GFP::pyrG^{Afum}* kasetea TN02A3 andui silbestrearen (WT bezala adierazia 4. Irudian) protoplastoak transformatzeko erabili da eta *gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::RFP::pyrG^{Afum}* kasetea BD946 anduiaren (ikus 4. Irudia) protoplastoak transformatzeko (ikus 2. Taula).

Transformatu behar diren anduien kultura likidoa estres baldintzapean egiten da konidioak osa ditzaten. Hauek jaso eta protoplastoak lortzeko disoluzio batean inkubatzen dira. Protoplastoak paretatik zelulatik gabe zelulak dira, eta ondorioz DNA exogenoa (gure kasetea) barneratzeko gai dira. Protoplastoak zelula paretaren hondakinetatik banatu eta DNA exogenoarekin kontaktuan jartzen dira. DNA exogenoa barneratzeko *shock* termiko bat eragiten zaie; tenperatura aldaketa bortitzak mintz plasmatikoa zuloak ireki eta DNA zulo hauek zehar barreiatu dadin. Azkenik,

protoplastoak kultura medio selektiboetan hazten dira, bakarrik andui errekonbinanteak hazteko.

Jarraitu beharreko prozedura eta erabili beharreko disoluzioak [lehen eranskinean](#) azter daitezke.

2.2.3. DNA Erauzketa

DNA erauzketarako pauso nagusietako bat berau zelularen beste osagaietatik banatzea da. Honetarako, hasieran gure anduien konidioak bildu eta medio likidoan hazi ondoren mizelioa jaso eta liofilizatu (hezetasuna kendu) egiten da. Mizelio lehorra txikitu ondoren lisi disoluzio batean inkubatzen da, zelulak apurtzeko. Ondoren DNA bestelako osagaietatik banandu behar da; honetarako laginak fenolizatu egiten dira Fenol-Kloroformo nahaste batekin eta, zentrifugatu ondoren, DNA jasotzen da faseetako batean. Fenolizatzean, Azido nukleikoz osatua dagoen RNA ere jasotzen da, eta hau baztertzeko RNAsa entzima batekin inkubatzen da, laginan jasotako RNA-k degradatzeko. Azkenik, zenbait garbiketa pauso burutzen dira azetato sodiko eta isopropanol nahaste bat erabiliz (DNA genomikoa ez baita disoluzio honetan disolbagarria baina ezpurutasunak bai). Amaieran, laginak ur distilatutan disolbatzen dira eta -20 °C-tan gordetzen dira.

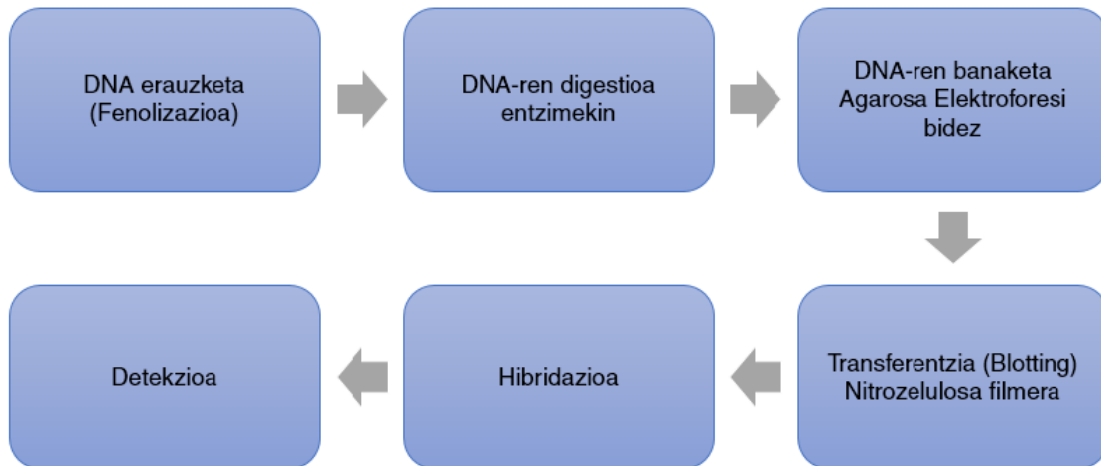
Prozedura zehatza [2. eranskinean](#) jarrai daiteke.

2.2.4. Southern Blot teknika

Southern Blot teknikari esker, DNA zati espezifiko bat identifikatu daiteke bisualki. Horretarako, identifikatu nahi den DNA zati horrekiko espezifikoa den zunda luminiszente bat erabiltzen da. Gure kasuan, fusio-PCR bidez eraiki dugun eta transformatu den anduiaren genomatik integratu den kasete mutagenikoa detektatu nahi dugu, eta genomatik dagokion eremuan (*flbE locus*-a) errekonbinatu dela baieztatuz. Beraz, kasete mutagenikoaren zati batekiko espezifikoa den zunda bat eraiki behar dugu, eta gure transformante eta transformatutako anduiaren genomatik hibridatu. Transformatutako anduiak ez duenez kasete mutagenikoa bere genomatik integratua baina transformanteek ustez bai, zundak genomatik lotuko duen zati espezifikoaren

tamaina aldatu egingo da. Diferentzia hori da neurtzen saiatzen dena teknika honen bidez. Jarraitutako prozedura 5. irudian azaltzen da.

Southern Blot



5. Irudia: Southern Blot teknikaren pauso nagusiak. Teknika hau Edwin Southern-ek asmatu zuen eta bere izena jarri zion.

Lehenik, transformatutako anduietatik DNA erauzten da. Ondoren DNA horiek independenteki liseritzen dira, horretarako errestrikzio entzima espezifiko bat erabiliz. Entzima horrek genomatan zehar leku edo sekuentzia motz espezifiko batzuk ezagutu eta bertatik mozten du. Errestrikzio entzima egokia aukeratzeko, aurretik *flbE locus*-aren sekuentzia ikertzen da VectorNTI programarekin, errestrikzio entzimen errestrikzio lekuak kokatuz eta liseriketa hartatik sortuko lirakekeen zatien tamaina aurrenez. Tamaina horretan detekta daitekeen diferentzia nabarmen bat egon beharko luke transformatutako andui eta transformanteen genomen artean. Erabiliko den zunda tamaina diferentzia nabaria emango duen zati horrekiko espezifikoa izango da, eta luminiszentzia ematen zaio aurre-tratamendu baten bidez.

Digeritutako DNA laginak agarosa elektroforesi bidez banatu egiten dira hauen tamainaren arabera, gero DNA zatien arteko tamaina diferentzia hori ikusi ahal izateko. Agarosa gelesko kate bikoitzeko DNA desnaturalizatu egiten da kate bakarreko hariak lortuz eta Agarosa gelesko DNA hau transferitu egiten da (*blotting*) nitrozululosazko film batera difusioaren eraginez. DNA nitrozululosazko mintzan finkatu ondoren, hau zundarekin inkubatu egiten da, zunda dagokion DNA zatiarekin hibrida dadin (dagokion

zattia aztertzen den lagin bakoitzean). Hibridazio ez-espezifikoak saihesteko mintza garbitu egiten da eta azken pausoan zundaren erreakzio kimioluminiszentea eragiten da, argazkia ateratzeko.

Prozedura zehatza [3. eranskinean](#) jarrai daiteke.

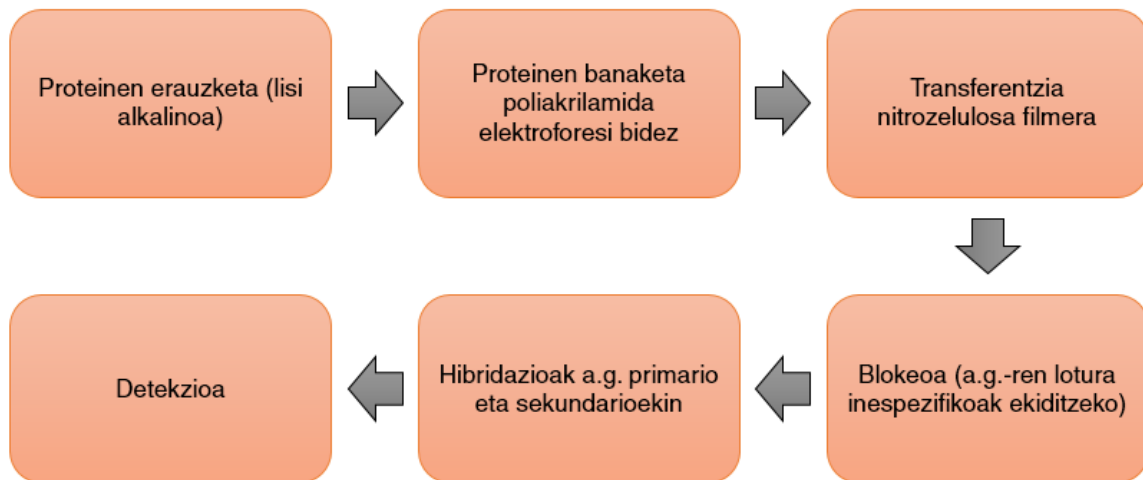
2.2.5. DNA-ren sekuentziazioa

Sortutako mutanteetan, eragin nahi den mutazioa bertan dela baieztatzeko, beraien DNA genomikoa erauzi zen eta *flbE*-ren sekuentzia anplifikatu zen PCR bidez. Ondoren, hainbat oligonukleotido erabiliz, *flbE* genearen sekuentzia ahalik eta zabalena sekuentziatu zen. Anplifikatutako PCR laginak, sekuentziaziorako erabilitako oligonukleotidoekin batera (lagin bat oligonukleotido bakoitzeko) Secugen laborategian (CIB-CSIC, Madrid) sekuentziatu ziren. Jasotako datuak Chromas programa eta Lalign web orria erabilia kontrastatu egin ziren Aspergillus Genome Datubaseak *flbE* sekuentziarentzat eskainitakoekin. Bilatutako mutazioaren presentzia eta beste edozein mutaziorik ez dagoela aztertu zen.

2.2.6. Western-Blot teknika

Western-Blot teknikan proteina espezifikoko baten detekzioa egiten da immunodetekzio bidez, hau da, antigorputz jakin bat erabilia. Horretarako, lehenik, kolonien proteina erauzketa bat burutzen da. Lan honetan, detekziorako, GFP-rekin lotzen den antigorputz espezifikoko bat erabiltzen da, anti-GFP antigorputz primarioa. Bigarren antigorputz batek, lehenengoa lotzen du kantitate handitan, seinalea anplifikatuz, batetik, eta aktibitate entzimatikoa emanez, bestetik, argia emititzen duen produktu bat sortzen duelarik. Honek, gure proteina, edo hobe esanda, gure proteinarekin fusionatutako GFP sekuentzia, detektatzeko aukera ematen du.

Western-Blot



6. Irudia: Western-Blot teknikaren pauso nagusiak. Teknika hau Stanfordeko Unibertsitateak garatu zuen eta analogoa den Southern-Blot DNA detekzio teknikarekin hitz jokoia egiteko izena eman zioten. Northern-Blot teknika ere existitzen da RNA-ren detekziorako, zeinak aurrekoen eskema antzekoa jarraitzen duen.

DNA erauzketan bezala (ikus 2.2.3. atala) hemen ere zeluletako osagai batzuk erauzi behar dira, oraingoan proteinak direlarik. Mizelio liofilizatua erabiliz, hau txikitu eta lisi alkalino bidez proteinak erauzi egiten dira. Proteina hauek ere elektroforesi bidez haien tamainaren arabera banatzen dira, orain poliakrilamidazko gel bat erabiliz agarosazko gel bat erabili beharrean.

Proteina hauek, ondoren, nitrozelulosazko filmara transferitzen dira, kasu honetan elektrotransferentziaz, non proteinak korronteak sortutako polarizazioaren eraginez desplazatzen diren filmara. Filma blokeatu egiten da hibridazio inespezifikoak eta positibo faltsuen agerpena ekiditeko. Blokeoa esne hautsean aurkitzen den kaseina erabiliz egiten da, zeinak lotura leku inespezifikoak “estaltzen” dituen. Ondoren, GFP antigorputzarekin egiten da lehen hibridazioa eta antigorputz sekundarioarekin bigarrena. Antigorputz sekundarioak aktibitate entzimatikoa da, eta sustrato egokia gehituz, hau degradatu egiten da argia emitituz.

Prozedura zehatza [4. eranskinean](#) jarrai daiteke.

2.2.7. Proteinen arteko elkarrekintza: *Pull-Down* froga

Lan honetan burututako *pull-down* frogak *in vitro* bi proteinen arteko interakzioa dagoen ala ez aztertzeko balio du. Froga honetan, interakzioa emango lukeen bi proteinetako bat fase geldikor batean itsasten da. Lehen proteina hori “amua” bezala ezagutzen da. Ondoren, lan honen kasuan, bigarren hautagaia GFP-rekin etiketatua duen proteina estraktu bat pasarazten da amua lotua duen fase geldikorretik. Interakziorik badago amuarekin, erretenturik geratuko da zutabeen bigarren hautagaia. Zutabeen atxikirik gelditu ez den eta gelditu den frakzioei Western-Blot froga burutzen zaie, GFP antigorputzarekin. Interakziorik balego, atxikitutako frakzioan GFP-ri dagokion seinalea detektatu beharko litzateke.

Prozedura zehatza [5. eranskinean](#) jarrai daiteke.

2.2.8. Mikroskopia

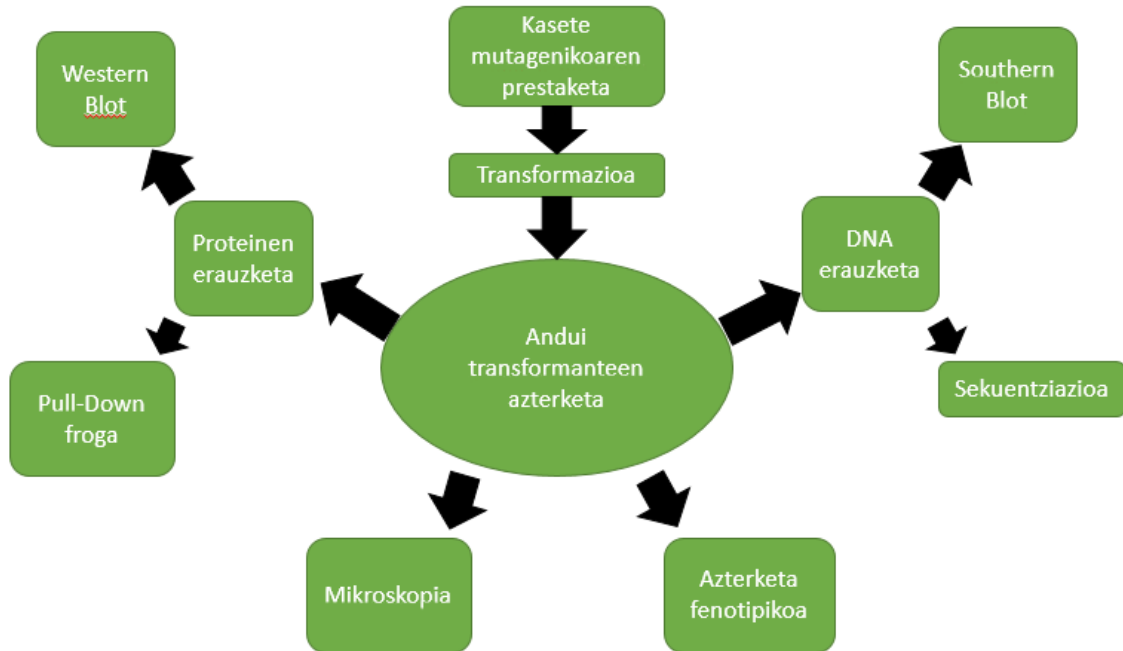
Mikroskopia lanak Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoregaiak burutu zituen Leioako Campusean. Anduiak WMM (*Watch Minimal Medium*) medioan (21) hazi ziren eta Zeiss Axio Observer Z1 inbertsio mikroskopia erabiliz aztertu ziren. Fluoreszentzia berdea detektatzeko 800 ms-ko esposizioa eta gorrirako 2000 ms-koa erabili ziren. GFP-ren eszitazio eta emisioko uhin-luzerak 470 nm eta 525 nm dira, hurrenez hurren, mRFP-rako eszitazio eta emisioko uhin-luzerak 545 nm eta 605 nm direlarik (19). Lortutako irudiak Fiji Softwarea (<https://fiji.sc/>) erabiliz moldatuak izan dira lan honetarako.

2.2.9. Azterketa Fenotipikoa

5 cm-ko diametroa duten plaketan inokulatzen dira koloniak. Fenotipoak 72 ordotara aztertu ziren, argazkiak ateraz, kolonien diametroa neurtuz eta konidio kantitatea neurtuz. Konidio kantitatea neurtzeko, kolonia bakoitzeko konidioak bildu eta Tween 20 detergentean %0.02 den disoluzio baten 1ml-tan gehitu ziren, 15 mL-ko polipropileno hodi esteriletan. Diluzio egokia egin eta alikuoten espora kopurua kuantifikatzen da mikroskopioan, Thoma kamera izena hartzen duen laukidun porta baten laguntzaz.

3. Emaitzak

Helburu esperimentalak lortzeko hainbat teknika erabili dira. Zazpigarren irudiak teknika horiek zein ordenetan burutu diren laburtzen du:



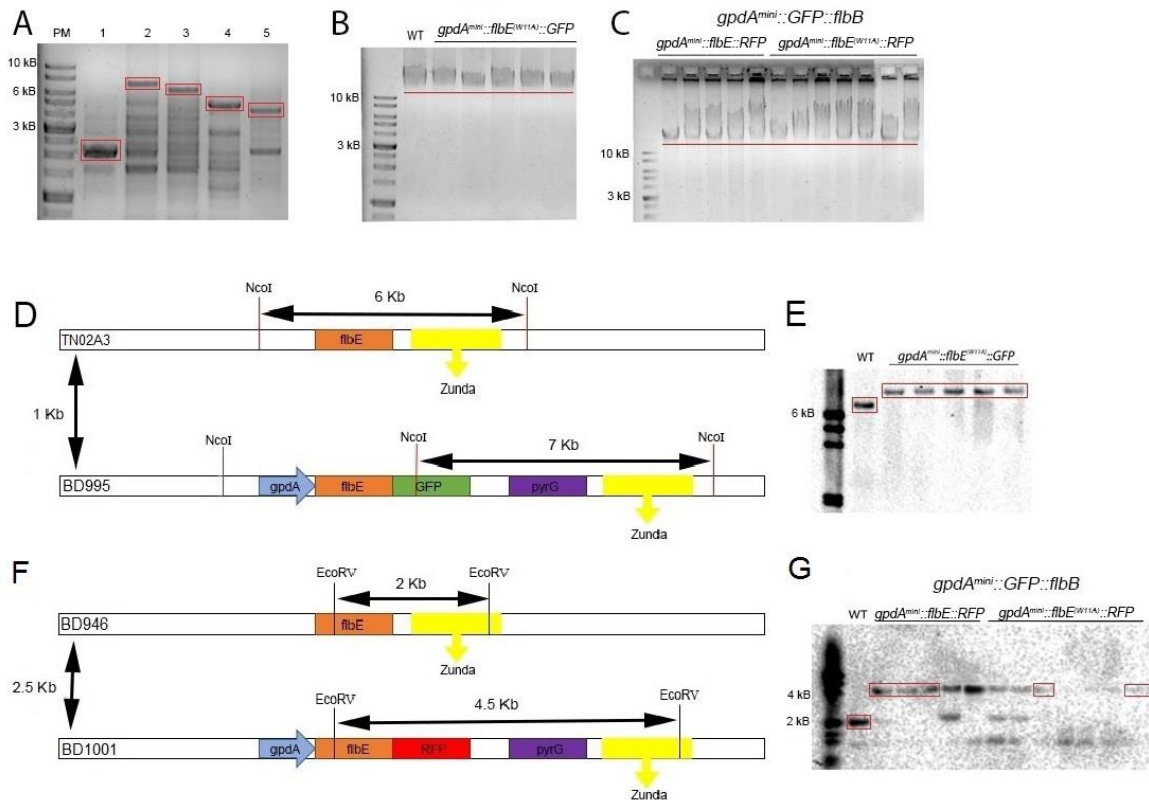
7. Irudia: Lanean zehar egindako esperimentuak. PCR bidez prestatutako kasete mutagenikoarekin *A. nidulans*-en protoplastoak transformatu ondoren, andui transformanteen azterketa burutu da. Proteinen erauzketa bidez, Western-Blot frogarekin, FlbE(W11A)::GFP fusio proteinaren sintesia baieztatu daiteke, eta *Pull-Down* frogaren bidez FlbE mutatuaren eta FlbB-ren arteko *in vitro* interakziorik dagoen ikertu daiteke; DNA erauzketa burutuz, Southern Blot frogaren bidez, *flbE*-ren *locus*-ean sortutako aldaketa baieztatu daiteke eta sekuentziazioari esker mutazioaren presentzia ziurtatzen da; andui transformanteen mutazioak ondoaren hazkundera edo konidiazioan eraginik duen ikertzeko azterketa fenotipikoa egiten da eta fluoreszentsia mikroskopiari esker, mutazioak FlbE eta FlbB proteinen zelula barneko lokalizazioan eragindako aldaketak ikertu dira.

3.1. Andui transformanteen sorrera

Bi PCR mutageniko bidez, gerora fusionatu beharreko zati mutanteak sortu ziren (ikus metodologia 4. irudian eta zati bakoitzaren tamaina 8A irudian). Gogoratu behar da 4. irudian mutagenesi PCR zatien arteko diferentzia nagusia GFP eta mRFP-ren sekuentziak dituztela zela. Fusioetan *gpdA^(mini)::flbE^(W11A)::GFP::pyrG* eta *gpdA^(mini)::flbE^(W11A)::mRFP::pyrG* kaseteak lortu ziren (ikus 8A irudia). Behin fusioak lortuta, GFP-duna TN02A3 anduiaren eta mRFP-duna BD946 anduiaren protoplastoak transformatzeko erabili dira.

3.1.1. Errekonbinaketa egokiaren eta Mutazioaren insertzioaren baieztapena: Southern-Blot eta Sekuentziazioa

Lan honetan, transformatutako anduia eta andui transformanteen genomak *flbE* locus-aren konfigurazioa konparatu da, transformanteetan guk sortu dugun kasete mutagenikoa integratu dela baieztatzeko (ikus prozedura 2.2.4. atalean). Horretarako, Southern-Blot teknika erabili da, NcoI edo EcoRV errestrikzio entzimak eta 8D eta 8F irudietan horiz adierazten diren zatiekiko espezifikoak den zunda luminisizentea. GFP duen kasete mutagenikoaren integrazioaren kasuan (8D irudia), zundak modu espezifikoan lotutako DNA zatiek 6 Kb izango dute transformatutako anduiaren kasuan eta 7Kb andui transformanteen kasuan. mRFP duen kasetearen integrazioaren kasuan (8F irudia), 2Kb-tik 4.5Kb-tarako aldaketa dugu. Southern-Blot prozedura burutzeko, lagin bakoitzaren DNA genomikoa erauzi zen (8B eta 8C irudiak). Kasu guztietan 23Kb-tako banda ikusi zen, erauzketak ontzat emanez. Southern-Blot prozedura aplikatu ondoren, emaitzak 8E eta 8G irudietan ikus daitezke. Egindako bi probatan, tamainaren jauzi egokia ematen duten laginak daudela ikus daiteke, karratu gorri baten bidez adierazten direlarik. Horietako bakoitzaren lagin bana Biokimika II laborategiaren anduien datu basean gorde zen. Horiekin ere, ondoren azaltzen diren esperimentoak burutu ziren.



8. Irudia: A: PCR bidez lortutako DNA zatiak. 1) *flbE*-PP1-tik *flbE*(W11A)-Dw-erako zatia. 2) GFP-rekin fusioz osatutako kasete mutagenikoa. 3) RFP-rekin fusioz osatutako kasete mutagenikoa. 4) *flbE*(W11A)-Up-etik *flbE*-GSP4-rako zatia GFP-rekin. 5) *flbE*(W11A)-Up-etik *flbE*-GSP4-rako zatia RFP-rekin. B: TN02A3 anduia (WT), GFP duen kasete mutagenikoarekin transformatzean lortutako transformanteen DNA genomiko erauzketa. C: BD946 anduiaren transformanteen DNA erauzketa. D eta F: Southern Blot-a egiteko erabilitako *NcoI* (D panela) edo *EcoRV* (F panela) errestrikzio entzimen errestrikzio lekuak *flbE* genearen inguruan. Transformatutako bi anduien *flbE* locus-ak eta transformanteek eduki beharko luketena konparatzen dira, zundaren kokapena, entzimak digeritutako fragmentuen tamaina eta fragmentuen arteko aldea adieraziz. E eta G: Southern Blot frogaren emaitzak.

Southern-Blot teknikak gure kasete mutagenikoa modu egokian eta genomari dagokion lekuan integratu dela ziurtatzen du baina, ez du ezer esaten guk sortu nahi dugun mutazioaren presentziari buruz. Horretarako, 8. irudian ontzat jo diren zenbait transformanteen (BD995) DNA genomikoa erabiliz, *flbE* locus-a anplifikatu zen PCR bidez eta genea sekuentziatu zen. Sekuentziazio erreakzio desberdinak burutu ziren gene guztiaren sekuentzia lortzeko, horretarako oligonukleotido desberdinak erabiliz (ikus 1go Taula). Transformatu gabeko anduiaren *flbE* genea ere sekuentziatu zen, kontrol bezala erabiltzeko. Lortutako sekuentzia guztiak aintzat hartuta, ia FlbE guztiari dagokion DNA sekuentzia lortu zen (berdez 5. Taulan; bakarrik bi kodoien sekuentzia gelditu zen sekuentziatu gabe), guk bilatzen genuen mutazioa konfirmatuz eta besterik ez zegoela baieztatuz.

FlbE (W11A)

MPVYMLYGFR^APRAGFTGIRVYIVLHNLEDAEYIQRPITNKSLD^SFRKTEPDIMSNLPELR
 FIEQYDPEDES^DEAVSKPYAYVAAKTISIPEAGSPNAGSSWNTDIFQENPLDPASSEALAKFRD
 KYAAGERIGWWIVYNGDPERYFPHDEDEDGMMEDDGYDDDDDEYDRDGSSSNTPTPTIR
 LPETLTRFFNKTF^S

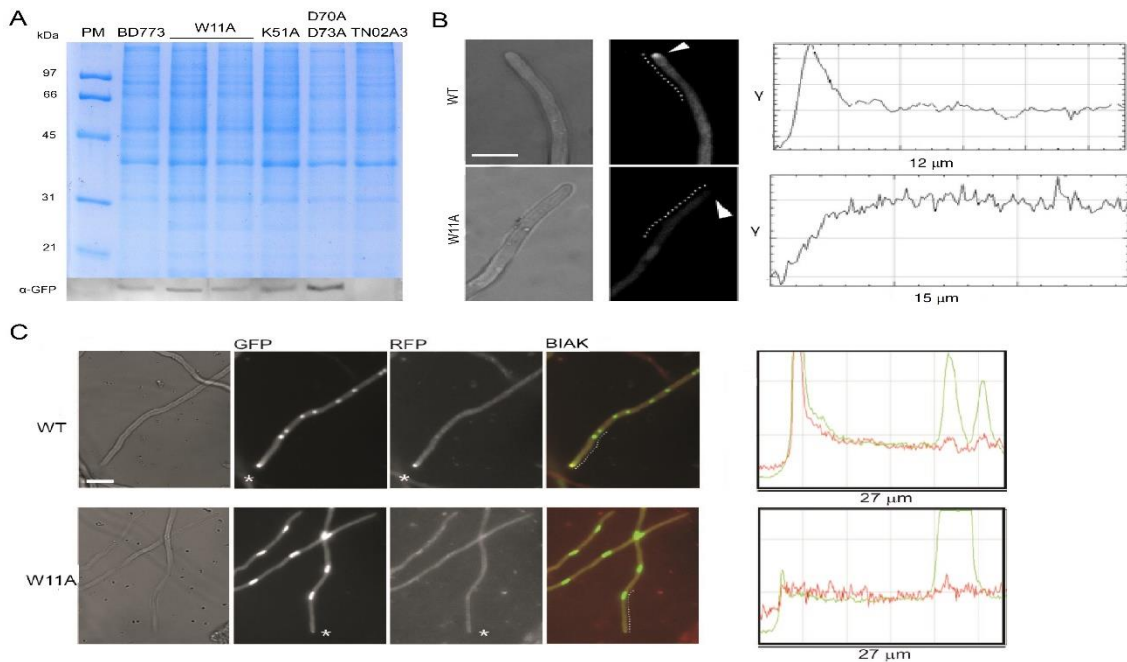
5. Taula: Transformante egokietan egindako DNA sekuentziazio bidez estalitako FlbE proteinaren zatiak, berdez adieraziak. Ikusten denez, sekuentzia guztia, bi amino azidori dagokien kodoiak ezik, lortu da. Azpimarraturik eta gorri hamaikagarren posizioko triptofanoaren ordeztutako Alanina aminoazidoa ageri da.

3.2. FlbE proteinan eragindako W11A mutazioak honen lokalizazio zelularra aldatzen du, baita FlbB-rena ere

Behin kasete mutagenikoaren integrazioa eta bilatzen zen mutazioaren presentzia baieztatuta, zepa egokiekin mutazio horrek FlbE-ren aktibitatean, interakzioetan eta konidiazioa induzitzeko gaitasunean dituen eraginak aztertzen hasi ahal izan zen. Hori baino lehen, integratutako kasetetik tamaina egokiko FlbE::GFP proteina sortzen zela eta, berau, detekta zitezkeen kantitateetan sortzen zela baieztatu zen Western-Blot teknikaren bitartez (ikus 9A irudia). FlbE::GFP silbestre eta beste mutante batzuekin konparatuta (mutanteak Elixabet Perez de Nanclares-ek sortuak dira), W11A mutanteak tamaina egokiko kimera sortzen du, aztertutako bi anduiek detekta daitezkeen kantitateetan gainera.

FlbE-k lokalizazio oso zehatza du hifa begetatiboan, haien puntan kokatzen delarik (Ikus 1.2. atala) (ikus 9B irudia, goiko lerroa). Aldiz, W11A forma mutanteak puntako lokalizazioa galdu egiten du. Beraz, amino azido hori eta FlbE-ren E1 eremua (ikus 3A irudia) beharrezkoak dira FlbE puntan kokatu ahal izateko. FlbE-ren puntako lokalizazioa inhibitzean, FlbB-rena ere inhibitzen da (9C irudia, Elixabet Perez de Nanclares-ek lortutako irudiak). Andui silbestrean FlbB hifaren puntan eta nukleoetan ageri da, FlbE puntan agertzen den bitartean. Mutazioak FlbE-ren puntako lokalizazioa

galduz gain, FlbB-rena ere kaltetzen du, biak batera puntara batera garraiatzen direnaren hipotesia babestuz (18).

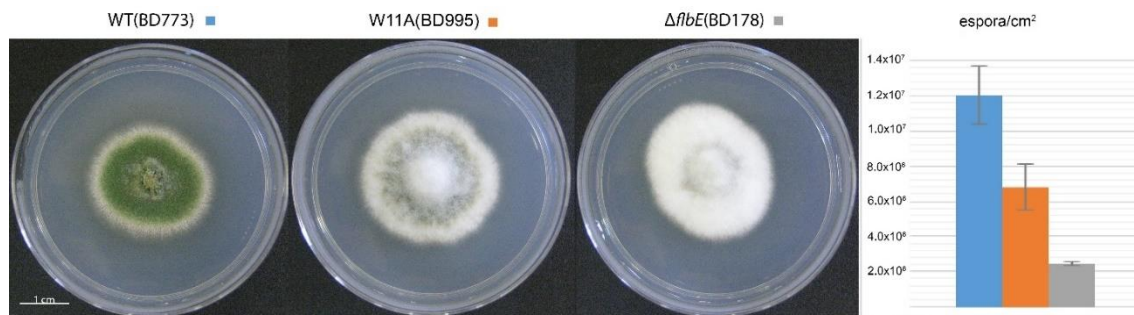


9. Irudia: A) FlbE::GFP silbestre eta W11A, K51A eta (D70A;D73A) mutanteak espresatzen dituzten anduien proteina estraktuekin egindako Western-Blot esperimendua, GFP-ren kontrako antigorputza erabiliz. Ezkerreko katean pisu molekularreko markatzaileen banden tamainak adierazten dira, erreferentzia bezala erabiltzen direnak. Goiko gelean (Coomassie (Bio-Rad) tindagaiak kolore urdina ematen dio) kale bakoitzean proteina totalaren kantitatea antzekoa dela ikus daiteke. B) FlbE::GFP eta FlbE(W11A)::GFP formen lokalizazioa hifa begetatiboetan. Hirukiek hifen puntak adierazten dituzte. Eskubiko grafikek marra ez-jarriak adierazten duen eremuan zehar dagoen fluoreszentsia berdearen intentsitatea (ausazko unitateak) erakusten dute, puntatik hasita. Eskala barra = 10 μ m. C) GFP::FlbB eta FlbE::mRFP-ren lokalizazioa hifatan. Lehenengo lerroan andui silbestrean proteinen lokalizazioa ageri da; bigarreanean aldiz FlbE(W11A) mutaziodun anduian duten lokalizazioa. Hifaren puntak asterisko bidez adierazirik daude, eta eskubiko grafikek marra ez-jarriaren luzeran zehar hifak duen fluoreszentsia berde eta gorriaren intentsitateak(ausazko unitateak) ageri dira. Eskala barra = 10 μ m. Fluoreszentsia mikroskopiazko irudi hauek Elixabet Perez de Nancrales doktoregaiak lortuak dira.

3.3. W11A mutazioak FlbE-n, konidiazioa eragozten du

W11A mutazioak FlbE-ren puntako lokalizazioan eragiten duen inhibizioa konidiazioaren indukzioarekin lotzeko asmoarekin, mutanteak sortutako konidio kantitatea kuantifikatu zen, beti ere FlbE::GFP fusio proteina silbestrea sortzen duen andui batekin alderatuz, baita *flbE* genea delezionatua (genomatik kenduta; mutante nulua *flbE*-n) duen andui batekin alderatuta ere.

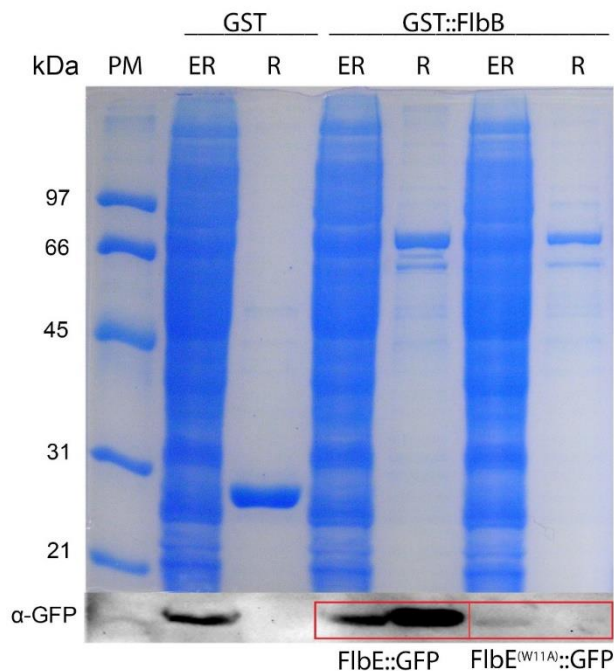
Mutazioak *fluffy* fenotipo-a eragiten du, konidio gutxiago dituzten koloniak sortuz (ikus 10. irudia). Kuantifikazioen arabera andui silbestreak (BD773) $1.2 \times 10^7 \pm 3.2 \times 10^6$ konidio/cm²-ko eta W11A andui mutanteak (BD995) $6.7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$ konidio/cm²-ko ekoizten dituzte. %95-eko konfidantza tartearrekin T froga burutu ondoren, p-ren balioa 0.048-koa da eta Balio Kritikoaren azpitik dagoenez konidiazioaren jaitsiera adierazgarritzat har daiteke (hiru neurketa andui bakoitzarentzat).



10. Irudia: W11A mutazioaren eragina konidio produkzioan. W11A anduiak (erdian) konidioek emaniko pigmentazio berdearen parte bat galtzen du, eta hifak ageriago daude. Kolonien tamainaren handitzea etengabeko hazkunde begetatibo bati dagokio, ziurrenik. Grafikan, aztertutako hiru anduien konidia produkzioaren kuantifikazioa azaltzen da. Emaitzak andui bakoitzarentzat egindako hiru neurketen batzabesteak dira, desbideratze estandarrekin batera.

3.4. W11A mutazioak FlbE-n, FlbE eta FlbB-ren arteko elkarrekintza inhibitzen du

W11A mutazioak FlbE-n, beronen eta FlbB puntako lokalizazioa kaltetzen du. Bi proteinek hifaren puntan interakzionatzen dutenez (16), mutazio horrek bi proteinen arteko interakzioa kaltetzen duen aztertu zen *pull-down* frogaren bitartez. 11. irudiak argi erakusten du FlbE::GFP forma silbestreak GST-ri lotutako FlbB formarekin (amuarekin, alegia) interakzionatzen duen bitartean, W11A forma mutanteak ez duela interakzionatzen (ikus karratu gorria irudian, interakzioa ezkerrean eta bere inhibizioa eskubian).



11. Irudia: W11A mutazioaren eragina FlbE eta FlbB-ren arteko interakzioan. Goian Coomassie tindagaiaz tindatutako poliakrilamida gela. Behean Western-Blot-ari dagokion emaitza, alegia, FlbE::GFP eta FlbE(W11A)::GFP-ren detekzioa. Amu bezala erabilitako GST::FlbBk FlbE::GFP silbestrea atxikitzen duen bitartean, W11A forma mutantea ez da atxikitzen (karratu gorria). ER: Ez-erretenitua, zutabean atxiki ez den frakzioa. R: Erretenitua, zutabean atxikita gelditu den frakzioa.

4. Eztabaida

FlbE-ren E1 eremuko hamaikagarren posizioan dagoen triptofano amino azidoa funtsezkoa da UDA proteina honen funtzionamedu egokirako. Mutatutako W11 aminoazidoa kontserbazio maila altuko eramu batean dago kokatua (ikus 3B irudia) eta Alanina hondakin batez aldatzeak segida honek aurkeztutako egitura sekundarioa alda lezake. Tresna bioinformatikoen bidez mutazioak sortutako aldaketa konformazionalak aurrean litezke.

Sekuentziazioan E3 eta E4 eremu kontserbatuen artean dauden 76. eta 77. hondakinen kodoiak baiezatu ez diren arren (ikus 5. taula eta 3A irudia), ez dute proteina eten. Sekuentziazioa osatu beharko litzateke sekuentziatu gabeko bi kodoi horietan ausazko mutazioak daudela baztertzeko baina, emaitza guztien arabera, horretarako aukera ia nulua da.

Andui silbestrearen eta mutatuaren arteko proteina mailak ez dira aldatu (ikus 9A irudia); betiere kontutan hartuta *gpdA^{mini}* promotoreak hauen kontzentrazioa handitu duela. Proteinaren tamaina ere egokia da, fusio proteinaren tamaina 50 kDa-koa izanik (23.1 kDa FlbE eta 26.9 kDa GFP-rentzat). Beraz, erabilitako gerturaketa esperimentalak mutazioak FlbE-ren lokalizazioan duen eragina aztertzeko aukera eman du, honek FlbE, eta FlbB ere, puntatik deslokalizatzen dituelarik.

Azkenik, W11A mutazioak eragindako konidiazio galera signifikatibotzat har daiteke, baino ikerketak garatu beharko lirateke gainespresioa eragiten duen *gpdA^{mini}* promotorerik gabe, konidiazioarengan *flbE*-ren W11A mutazioak duen eragin erreala ikusteko.

5. Ondorioak/*Conclusion*

- 5.1 W11A mutazio puntuala eragin da FlbE proteinan. Mutazioaren presentzia eta besteren baten gabezia DNA sekuentziazio bidez baieztatu dira.

Residue W11 within FlbE was replaced by an alanine. The presence of this mutation as well as the absence of any other were confirmed by DNA sequencing.

- 5.2 Mutazioak *fluffy* fenotipoa eragiten du, ziurrenik *brlA-ren* espresio murriztua dela eta.

This mutation causes a fluffy phenotype, probably due to low brlA expression.

- 5.3 W11A mutazioak FlbE proteinari puntako lokalizazioaren galera eragiten dio.

W11A point mutation inhibits the tip localization of FlbE.

- 5.4 FlbE eta FlbB-ren arteko interakzioa kaltetzen da W11A mutazioaren eraginez, UDA transdukzio-bidea etenez.

The mutation inhibits the interaction between FlbE and FlbB, cutting off the UDA transduction pathway.

Erreferentziak

1. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 1953;5:141–238.
2. Kurtz MB, Champe SP. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. *J Bacteriol.* 1981;148(2):629–38.
3. Cove DJ. The Induction And Repression Of Nitrate Reductase In The Fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta.* 1965;3(1966):51–6.
4. Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L, Wortman JR, Batzoglou S, et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.* 2005;438(Abendua):1105–15.
5. Stajich JE, Harris T, Brunk BP, Brestelli J, Fischer S, Harb OS, et al. FungiDB: An integrated functional genomics database for fungi. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):675–81.
6. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology.* 2007;153(6):1677–92.
7. Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol.* 2011;49:107–33.
8. Machida M, Yamada O, Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.* 2008;15(4):173–83.
9. Etxebeste O, Espeso EA. Neurons show the path: Tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(5):610–24.
10. Momany M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol.* 2002;12:580–5.
11. Oshero N, May GS. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;199(2):153–60.
12. Kaminskyj SGW. Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Newsletter.* 2001;25–31.
13. Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev [Internet].* 1998;62(1):35–54. Eskuragarri: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529886> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98905>
14. Oiartzabal-Arano E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Espeso EA, Etxebeste O. Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 2016;62(2):371–7.
15. Garzia A, Etxebeste O, Rodríguez-Romero J, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U. Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2013;12(2):311–21.
16. Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol.* 2009;71(1):172–84.
17. Kwon NJ, Shin KS, Yu JH. Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol [Internet].* 2010;47(12):981–93. Eskuragarri: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.009>

18. Herrero-Garcia E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Cortese MS, Markina-I?arrairaegui A, Oiartzabal-Arano E, Etxebeste O, et al. Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol Microbiol.* 2015;98(4):607–24.
19. Perez-de-Nanclares-Arregi E, Etxebeste O. Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 2014;70:33–41.
20. Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, et al. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2006;172(3):1557–66.
21. Peñalva MA. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol.* 2005;42(12):963–75.

Eranskinak:

1go eranskina: Transformazioa

Lehenik, transformatu behar diren anduiak kultibatu egiten dira estres baldintzapean, konidioak osa ditzaten. Konidio horiek bildu eta MMA likidoan inokulatu dira, 14 orduz, 30 °C eta 150 RPM-tan haziz. Sortutako mizelioa filtratu eta garbitu ondoren, 1.5 g mizelio biltzen dira. Hauek 100mL-ko erlenmeyer batetan kokatzen dira 16mL Protoplasting izeneko soluzioan (2.048g Vinotaste entzima litikoa (Novozymes) + KCl 1.1 M / Az. Zitriko 0.1 M disoluzioaren 16 mL) eta 16mL MCA-likidorekin (ikus 3. taula). Nahastea 30 °C-tan inkubatzen da 100 minutuz eta 100 RPM-tan, 15 minuturo irabiatuz (vortex) abiadura ertainean.

Protoplastoak sortu direla baieztatu ondoren, disoluzioa bitan banatu eta lagin bakoitzari sakarosatan 1.2 M den disoluzio baten bolumen berdina gehitzen zaio, oso mantso, bigarren fase bat osa dadin. Nahastea 10 minutuz zentrifugatzen da 4 °C-tan eta 1800 G-ko indar pean. Interfasean, transformaziorako erabiliko ditugun protoplastoak dituen banda bat azaltzen da. Banda hori bildu egiten da *pasteur* pipeta batekin eta KCl-tan 0.6 M den disoluzio baten bolumen berdina gehitzen da beste hodi batean. Berrito zentrifugatu, aurreko baldintzen pean, ondoren gainjalkina kendu eta prezipitatutako fasea berreseki egiten da KCl-tan 0.6 M den disoluzio baten 2 mL-tan. Zentrifugatu egiten da berriz 3 minutuz, 4 °C-tan eta 2400 G-ko indar pean. Prezipitatutako fasea garbitu egiten da disoluzio berarekin bitan eta giro tenperaturan. Azkenik, prezipitatutako protoplastoak KCl-tan 0.6 M eta CaCl₂-tan 50 mM den disoluzio baten 0.5 mL-tan berreseki egiten dira, beste behin garbituz baldintza berdinetan.

Protoplasto nahastearen 100 µL, transformaziorako sortu dugun DNA kasetearen 10 µL-rekin nahasten dira, giro tenperaturan dagoen 8. disoluzioaren (PEG 0.1 M, TrisHCl 0.01M eta CaCl₂ 0.01M) 50 µL ere gehituz. Kontrol negatibo bezala, DNA kasetarik ez duen beste nahaste bat prestatzen da beste hodi batean. Hodiak irabiatu egiten dira (vortex) segundo bateko 4-5 ziklo burutuz eta 25 minutuz inkubatzen dira izotzetan. Ondoren, 8. disoluzioaren 1 mL gehitu eta 5 minutuz uzten da nahastea giro

temperaturan. Azkenik, 7. disoluzioaren (Sorbitol 1 M, TrisHCl 0.01 M eta CaCl₂ 0.01M) 5 mL eta MMR-TOP medioaren (ikus 3. taula) 15 ml inguru gehitzen dira, nahaste osoaren laginak MMR mediodun plakatan inokulatuz. MMR plaka horiek, sortutako kasete mutanteek duten *pyrG* geneari dagozkion elikagaiak, uridina eta uraziloa alegia, faltan dituzte (ikus 4. taula). Era honetan, transformaziorako kasetea genomatik integraturik duten koloniak, transformanteak, bakarrik haziko dira, *pyrG* genea integratzean, uridina eta uraziloa euren kabuz sortzeko gaitasuna berreskuratzen baitute. Kontrol negatibo bezala erabili dugun nahasteari dagokion kasuan, plakatan ezin da transformanterik hazi, ez baitugu fusio-PCR produkturik (kasetarik) gehitu.

2. Eranskina: DNA erauzketa

Konidioak bildu eta MMA likidoan inkubatzen dira 15 orduz, 37 °C-tan, irabiatuz. Mizelioa filtratu, lehortu eta alikuota bat 1,5 mL-ko hodietan kokatzen da. Laginak liofilizatu eta txikitu egiten dira zelulak puskatzeko bolatxo baten laguntzaz. Txikitutako lagin bakoitzari Tris 25 mM (pH=8), 0.25 M Sakarosa eta 20 mM EDTA duen disoluzio baten 1 mL eta SDS-tan %10 den disoluzioaren 100 µL gehitu egiten zaizkio, eta inkubatu egiten dira 15 minutuz 65 °C-tan. Disoluzioa beste 2 mL-tako hodi batera pasatzen da bolatxo berreskuratuz eta 1 mL Fenol/SEVAG (%50 fenol organiko, %48 kloroformo eta %2 Alkohol isoamiliko) gehitzen dira, 10 minutuz inkubatuz ondoren etengabe inbertsioz nahastuz. Ondoren 5 minutuz zentrifugatzen da abiadura maximoan (15000 RPM), goiko fasea berreskuratzen da, eta eppendorf berri batera pasatzen da. Prozesua errepikatzen da. Lortutako lagin bakoitzari AcONa-tan 3 M (pH= 6) den disoluzio batetik bere bolumenaren hamarrena gehitzen zaio, eta seiren bat isopropanol.

Inbertsioz nahasten da DNA hauspeatzeko. 15 minutuz giro temperaturan inkubatu ondoren abiadura maximoan 5 minutuz zentrifugatu eta gainjalkina kendu ondoren *pellet*-a Etanoletan %80 den disoluzio baten 1 mL-rekin garbitzen da. Berrito zentrifugatu egiten da eta *pellet*-a lehortu ondoren hau uretan berreseki egiten da, RNAsa-rekin ordu-erdiz inkubatzeko, egon daitezen RNA kutsadura deskonposatzeko. AcONa 3 M-ekin eta isopropanolarekin berrito hauspeatzen da DNA eta prezipitatutako

DNA mataza hori pipeta punta batekin jaso eta 2 mL-ko eppendorf batera transferitzen da, EtOH-ean %80 den disoluzio baten 0.5 mL-rekin garbitzeko. 5 minutuz zentrifugatzen da giro tenperaturan eta abiadura maximoan. Hutsunean lehortu ondoren, 200 μ L uretan berreseki egiten da. DNA lagin bakoitzaren 2 μ L agarosa-tan %0.8 den gel batean kargatzen dira, erauzketa egoki burutu dela ziurtatzeko. Gainontzeko laginak izozkailuan gordetzen dira.

3. Eranskina: Southern-Blot

DNA laginak (transformatutako anduia eta andui transformanteenak) digestio entzima eta buffer egokiarekin nahastu eta ON inkubatzen da 37 °C-etan. Hurrengo goizean errestrikzio nahaste guztiak agarosa gelezko elektroforesi bidez banatzen dira, bakoitzean sortutako DNA zatiak banatu ahal izateko.

Geleko DNA desnaturalizatu beharra dago sortua dagoen zunda dagokion zati espezifiko bakoitzari itsasteko lagin bakoitzean. Honetarako argi ultramore pean kokatzen da gela 10 minutuz eta ondoren desnaturalizazio disoluzioan (NaCl 1.5 M eta NaOH 0.5 M) uzten da 45 minutuz. Gero 30 minutuko bi garbiketa egiten dira neutralizazio disoluzioan (NaCl 3 M eta Tris Base 0.5 M) eta azkenik gela homogeneizatu egiten da SSC 2x (NaCl 0.3 M eta Trisodio Zitrato 30 mM) disoluzioa erabiliz. Transferentzia mintza ur distilatuarekin busti eta homogeneizatu egiten da SSC 2x-ekin eta Whatman (Sigma Aldrich) paper xurgatzailea prestatu eta transferentziarako muntaia prestatzen da. Honetarako, kubeta batetan SSC 20x jarri eta kubetan zehar kristalezko xafla batekin zubi bat eraikitzen da. Whatman papera gainean jartzen da zubitik behera erortzean SSC 20x-ean busti dadin; Whatman papera blai utzi ondoren gela kokatzen da gainean buruz behera eta bisturiarekin moztu egiten da orientazioa zehazteko. Azkenik, paperezko eskuoihalak kokatzen dira gainean eta hauen ondoren kristalezko xafla bat eta 500 g-ko masa. 2-3 ordu igaro ondoren eskuoihalak aldatu eta *overnight* uzten da.

Hurrengo goizean, mintza SSC 2x-etan garbitzen da bost aldiz eta filtro paperarekin lehortu ondoren, DNA-a finkatu egiten da mintzean 120 mJ-tako energia

duen argi ultramoreko bi pultsoekin. Hibridazio labea berotzen da 42 °C-tara eta mintza hibridazio hodian sartu ondoren 25 mL Church Buffer (%1 BSA, EDTA 1 mM, Na₃PO₄ 0.5 M eta %7 SDS) gehitzen dira. 2 Ordu eta erdi uzten da labean. Church Bufferarekin inkubazioa amaitu aurretik, ThermoBlock-a 95 °C-etan jarri eta zunda izotzetan ipintzen da. Zundaren 5 µL 95 °C-tan jartzen dira 5 minutuz eta azkenik minutu bat uzten da izotzetan. Church bufferrarekin mintza duen hodiari zunda gehitzen zaio; *overnight* uzten da 42 °C-tan. Hurrengo egunean hodia atera eta hibridazio labea 65 °C-etan jartzen da. Zunda falcon hodi batera pasa eta gorde egiten da izozkailuan berrerabili baitaiteke.

Bost minutuz, bi aldiz, mintza SSC 2x + %0.1 SDS-n -tan garbitzen da giro tenperaturan. Ondoren SSC-N 0.5x + %0.1 SDS-N tan berriro bi aldiz garbitzen da, 15 minutuz labean edukita 65 °C-tan. Amaitzean Washing Buffer (Az. maleiko 0.1 M, NaCl 0.15 M eta Tween 20 %0.3)-arekin garbitzen da 5 minutuz giro tenperaturan. Ordu erdiz Blocking disoluzioan (Roche-ren stock-a 10x, Az. maleiko 0.1 M, NaCl 0.15 M-etan diluitua) eduki behar da, eta beste hogeita minutu Antigorputz (Anti-dioxigenina 75 mU/mL) disoluzioan; hau zentrifugatutako Anti-Dioxigenin-AP disoluziotik 2 µL 20 mL Blocking disoluzioaren erdira batuz. Antidioxigeninak emango dio zundari kimioluminiszentzia sortzeko gaitasuna.

Gero bi aldiz garbitzen da Washing Buffer-etan ordu laurden eta azkenik 3 minutuz orekatzen da 20 mL Detekzio Buffer-a (Trizma base 0.1 M eta NaCl 0.1M pH=9.5 HCl-rekin doitu) erabiliz. Mintza bi plastikoen artean kokatzen da. 1 mL CSPD (*Chemiluminescent Substrate*, BioRad) gehitzen da DNA dagoen aurpegian eta 10 minutuz inkubatu egiten da 37 °C-tan luminiszentzia erreakzioa hobetzeko. Azkenik argazkia ateratzen zaio mintzari Chemidoc (Bio-Rad) kamera erabiliz.

4. Eranskina: Western-Blot

Konidioak MMA likidotan hazten dira gauez eta hurrengo egunean mizelioa filtratu egiten da Miracloth filtro papera erabiliz. Liofilizatu aurretik laginak N₂ likidotan sartzen dira, izoztean proteinen degradazioa ekiditeko. Mizelio liofilizatua txikitu egiten

da metalezko bolatxo baten laguntzaz. Ondoren, mizelioaren 6-7 mg koilaratxo batekin pasatzen dira beste hodi batera eta 1 mL lisirako disoluzio batekin (NaOH 4 mM eta 1/25000 parte β -merkaptotanol) berresakitzen da irabiatuz (*vortex*). Proteinak prezipitatu egiten dira TCA (Azido trikloroazetikoa) %7.5 den disoluzioa erabiliz. 10 minutuz izotzetan inkubatzen dira laginak eta ondoren 4 °C-tan eta 14000 RPM-tan zentrifugatzen dira bost minutuz bitan, gainjalkina kentzeko eta egoki lehortzeko. *Pellet*-ari 100 μ L Tris base 1M gehitu eta nahasten da, ondoren 200 μ L TR tanpoia (TrisHCl 0.08 M, %1 SDS, β -merkaptotanol 0.7 M, urea 4 M, tanta bat Bromofenol urdin) gehituz.

Western-Blot-erako erabilitako gela poliakrilamidatan %10 den SDS-PAGE gela da, goialdean Stacking bufferra duelarik. Laginak kargatu aurretik 5 minutu berotzen dira 95 °C-tan PM markadorearekin batera eta ondoren zentrifugatu egiten dira lagin horiek minutu batez 14000 RPM-tan. Laginak kargatu eta amaitzean transferentzia prestatzen da, transferitu beharreko gelarentzat eta Coomassie-ko gelari 3x5 minutuzko garbiketak egiten zaizkio ur distilatuarekin Coomassie disoluzioa gehitu aurretik eta tindatzen uzten da ordubetez balantzaxoan. Transferitu beharreko gela Transblot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) batekin transferitzen da Transblot aparatuan (Bio-Rad) elektrotransferentzia bidez.

Transferitutako mintza PBS 1x (PBS 10x 1L: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14.4 g, KH₂PO₄ 2.4 g, Ur distilatu 1 L arte, pH=7.4-ra doitu HCl-rekin, esterilizatu autoklabean)-tan garbitzen da 10 minutuz eta ondoren ordubete eta 40 minutu uzten da Blocking disoluzioan (Esne hautsa 0.75 g eta PBS 1x 15 mL). Gero tween detergentea duen PBS 1x-tan (PBS-T) garbitzen da. Lehen antigorputzean (α -GFP Roche 1:2000 diluzioan) inkubatzen da mintza gau osoa 4 °C-etan.

Hurrengo egunean mintza PBS-T 3x-etan (PBS 10x 100 mL, Tween 20, %0,02 500 μ L eta ur distilatu 1 L arte) garbitzen da hiru aldiz 10 minutuz. Ondoren mintza bigarren antigorputzarekin (α -mouse IgG Jackson ImmunoResearch Laboratories INC 1:2500 diluzioan) inkubatzen da ordubetez giro tenperaturan. Amaitzean berriro garbitzen da PBS-T 3x-ekin hiru aldiz eta beste behin PBS 1x-ekin 10 minutuz. Errebelatzeko falcon hodi batera 1 mL ECL (Enhanced Chemiluminiscent, Thermo Fisher) kit-eko pote bakoitzetik ipintzen dira eta ECL nahastea zabaltzen da mintzan zehar. Ondoren minutu

betez uzten da eta gero film artean ipintzen da mintza Chemidoc-ean errebelatuta egiten da.

5. Eranskina: Proteinen arteko elkarrekintza: Pull-Down froga

Proteina-proteina interakzioa aztertzeko *E. coli*-ren GST estraktua, GST::FlbB fusio proteina eta *A. nidulans*-en proteina erauziak erabili dira. GST etiketadun FlbB proteina estraktua Glutathione Sepharose (GE Healthcare) erretxina duen mediora batzen da eta hau 4°C-etan ordubetez inkubatzen da. Amua erretxinarekin lotuko da. PBS-rekin hiru garbiketa egin ondoren interakziorako bigarren hautagaia duen proteina estraktuaren 2 mg gehitzen dira hodira. Bigarren inkubazioa amaitu denean (ordubete, 4 °C-tan) beste 3-5 garbiketa burutu eta erretxina berreseki egiten da TR tanpoia erabiliz (ikus TR-aren konposaketa aurreko eranskinan), eta proteina elektroforesia prestatzen da SDS-poliakrilamida geletan, Coomassie (Bio-Rad) tindaketa egiteko gel bat eta Western-Blot bat egiteko bigarrena (ikusi 2.2.6 atala).