

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**Regulación por la luz de la
localización y estabilidad de la proteína
VE-1 durante el desarrollo de
Neurospora crassa.**

María del Mar Gil Sánchez
Tesis Doctoral
Universidad de Sevilla
2017

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Regulación por la luz de la localización y estabilidad de la proteína VE-1 durante el desarrollo de *Neurospora crassa*.

Memoria presentada por la Licenciada
María del Mar Gil Sánchez
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, julio 2017

Director del trabajo:
Dr. Luis María Corrochano Peláez
Catedrático de Genética
Departamento de Genética, Facultad de Biología
Universidad de Sevilla

El director de la Tesis

El doctorando

Dr. Luis M. Corrochano Peláez

María del Mar Gil Sánchez

A mis padres,
a mi hermana y
a David

ÍNDICE

RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	17
1. <i>Neurospora crassa</i>	19
2. Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	19
3. Regulación por la luz azul en <i>Neurospora crassa</i>	22
4. Fotorreceptores de <i>Neurospora crassa</i>	22
4.1 El complejo White Collar.....	22
4.2 La proteína VVD.....	23
4.3 Otros fotorreceptores en <i>Neurospora crassa</i>	24
5. Activación de la transcripción y adaptación por la luz en <i>Neurospora crassa</i> ...	25
6. Fotorreceptores de otros hongos.....	28
6.1 Fotorreceptores de <i>Aspergillus</i>	28
6.2 Fotorreceptores de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	29
6.3 Fotorreceptores de <i>Mucor circinelloides</i>	30
6.4 Fotorreceptores de <i>Fusarium</i>	31
7. La importancia de la degradación de proteínas en la regulación del ritmo circadiano	32
8. Degradación de proteínas vía proteasoma/ubiquitina en <i>Neurospora crassa</i>	34
9. El sistema regulador Velvet.....	36
9.1 Velvet en <i>Aspergillus nidulans</i>	36
9.2 El complejo proteico VeA y su mecanismo de acción.....	38
9.3 Velvet en <i>Neurospora crassa</i>	41
9.4 Velvet en otros hongos.....	42
OBJETIVOS	49
RESULTADOS	51
1. Caracterización fenotípica del mutante de delección del gen <i>ve-1</i> , $\Delta ve-1$	53
1.1 Producción del carotenoide neurosporaxantina en conidios.....	53
1.2 Longitud de las hifas aéreas.....	54
1.3 Producción de conidios de la estirpe $\Delta ve-1$	55
1.4 Reproducción sexual en el mutante $\Delta ve-1$	56

2. Etiquetado de la proteína VE-1 para su detección mediante hibridación de Western.....	57
3. Regulación por la luz del gen <i>ve-1</i> y la proteína VE-1 de <i>Neurospora crassa</i> en micelio vegetativo.....	59
3.1 Acumulación de VE-1 en <i>Neurospora crassa</i>	59
3.2 Efecto de la ausencia de VE-1 sobre la transcripción de genes fotoinducibles.	61
3.3 Localización subcelular de VE-1 en diferentes condiciones de luz.	64
4. Regulación del gen y la proteína VE-1 de <i>Neurospora crassa</i> durante el desarrollo asexual.	65
4.1 Efecto de la ausencia de VE-1 sobre la transcripción otros genes durante el desarrollo asexual.	69
4.2 Localización subcelular de VE-1 durante el desarrollo asexual.....	70
5. Estabilidad y degradación de VE-1 en micelio vegetativo.	71
5.1 Estabilidad de VE-1 tras la adición de Cicloheximida al medio de cultivo bajo diferentes condiciones de luz.....	72
5.2 Acumulación y estabilidad de VE-1 en ausencia de proteínas claves de la ruta de degradación ubiquitina/proteasoma.	75
5.3 Estudio de la interacción entre VE-1 y FWD-1 mediante doble híbrido en levaduras	79
5.4 Respuesta en la estabilidad de VE-1 a Tiolutina, inhibidor del proteasoma.....	82
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	99
MATERIAL Y MÉTODOS	103
1. Estirpes utilizadas en esta tesis.....	103
2. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	103
3. Medios y condiciones de cultivo	105
3.1 Medios y condiciones de cultivo de <i>Neurospora crassa</i>	105
3.1.1 Cultivo líquido.....	105
3.1.1.1 Tratamiento con cicloheximida y/o tiolutina.....	105
3.1.2 Cultivo sólido	106

3.1.2.1 Propagación de cepas.....	106
3.1.2.2 Recolección de conidios	107
3.1.2.3 Crecimiento conidial.....	107
3.1.2.4 Medio de cruce	108
3.1.2.5 Inducción del desarrollo	108
3.2 Medio y condiciones de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
3.3 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	109
4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	110
4.1 Extracción de ADN	110
5. Reacción en cadena de la polimerasa	110
5.1 PCR convencional	110
5.2 RT-PCR cuantitativa	111
6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	111
7. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
8. Transformación de <i>Neurospora crassa</i>	112
8.1 Generación del casete para el etiquetado de genes.....	112
8.2 Transformación de conidios de <i>Neurospora crassa</i> por electroporación..	113
9. Análisis de proteínas	114
9.1 Extracción de proteínas totales.....	114
9.2 Hibridación de Western.....	114
9.3 Tinción de geles de poliacrilamida.....	116
10. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de núcleos	116
11. Extracción de carotenos de <i>Neurospora crassa</i>	117
12. Inmunoprecipitación de VE-1::3xFLAG en <i>Neurospora crassa</i>	117
13. Ensayos de doble híbrido	118
 BIBLIOGRAFÍA	 123
AGRADECIMIENTOS	142

RESUMEN

RESUMEN

Neurospora crassa es un hongo ascomiceto utilizado como modelo para el estudio de la fotobiología. La luz se percibe a través del complejo White Collar (WCC), un complejo dependiente de la luz que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes. El genoma de *N. crassa* también contiene genes para fotorreceptores secundarios: dos genes de fitocromos (*phy-1* y *phy-2*), uno de criptocromo (*cry-1*) y uno de opsina (*nop-1*). Además, el genoma de *Neurospora* contiene un homólogo del gen *veA* de *Aspergillus nidulans*, denominado *ve-1*. Las mutaciones de *veA* en *A. nidulans* producen una conidiación constitutiva que es independiente de la luz, y la proteína VeA forma un complejo con fotorreceptores de luz azul y roja. El mutante $\Delta ve-1$ de *N. crassa* tiene defectos en el crecimiento de las hifas aéreas, en la producción de conidios y en la producción de carotenos.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el papel de la proteína VE-1 durante las distintas etapas del desarrollo asexual. VE-1 es una proteína de 554 aminoácidos que presenta un dominio Velvet muy conservado en hongos, un dominio PEST de regulación de la estabilidad de proteínas y un dominio de señalización nuclear (NLS). Hemos caracterizado la expresión de *ve-1* y la acumulación de VE-1 tras la iluminación y durante el desarrollo asexual. Se observó un pequeño aumento en la acumulación de ARNm de *ve-1* después de la exposición a la luz en el micelio vegetativo, pero que no observamos cambios significativos en la acumulación de VE-1. La delección de *ve-1* da lugar a la disminución de la acumulación de ARNm de varios genes fotoinducibles como *wc-1*, *vvd*, *frq* y los genes de la carotenogénesis *al-1*, *al-2*, *al-3* y *cao-2*. También hemos investigado la localización celular de VE-1 bajo diferentes condiciones de luz y durante la conidiación, y hemos observado que VE-1 está preferentemente localizado en el núcleo en todas las condiciones, pero que también se detecta en el citoplasma.

Durante el desarrollo asexual únicamente hay acumulación de VE-1 en micelio aéreo cultivado en luz y no se detecta en oscuridad. Además, en el mutante $\Delta wc-1$ no se detecta VE-1 ni en luz ni en oscuridad lo que nos indica que la acumulación de VE-1 durante la conidiación depende de la luz. Al investigar la acumulación de ARNm de *ve-1* en las mismas condiciones de conidiación hemos observado que no se corresponde con la acumulación de proteínas, ya que se detecta ARNm de *ve-1* en micelio aéreo tanto en luz como en oscuridad. Esta diferencia podría deberse a modificaciones postranscripcionales, por lo que hemos estudiado la degradación de VE-1 a través de la

ruta ubiquitina/proteasoma. Nuestros resultados en los experimentos de adición de CHX, una droga que inhibe la síntesis de proteínas, indican que la estabilidad de VE-1 depende de la luz. Para identificar el mecanismo que participa en la degradación hemos estudiado la estabilidad de VE-1 en mutantes del signalosoma (complejo regulador de la ligasa de ubiquitina) y en el mutante en FWD-1 (adaptador del sustrato a la ligasa de ubiquitina). Hemos observado que en estos mutantes aumenta la estabilidad de VE-1 tras la adición de CHX, lo que sugiere que VE-1 interacciona con FWD-1 para su etiquetado con ubiquitina y su degradación en el proteasoma. La regulación por la luz de la degradación de VE-1 a través de la ruta del proteasoma y de las interacciones con FWD-1 podría ser clave en la regulación del desarrollo de los conidios en *N. crassa*.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral han permitido avanzar en el conocimiento del papel de la proteína VE-1 en *Neurospora crassa* durante el desarrollo vegetativo y la conidiación.

INTRODUCCIÓN

1. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un hongo filamentosamente heterotálico perteneciente a la clase Ascomycota. Este grupo se caracteriza porque las células provenientes de la división meiótica se almacenan en un saco membranosos llamado asca (Davis, 2000). Las especies del género *Neurospora* se ha encontrado en zonas húmedas tropicales y áreas subtropicales, y en zonas templadas de América y Europa (Jacobson et al., 2004, 2006; Luque et al., 2012; Turner et al., 2001). En la naturaleza, *Neurospora* es uno de los primeros organismos capaces de colonizar la vegetación quemada, ya que es capaz de utilizar celulosa en su metabolismo y por la necesidad de calor para la germinación de sus ascosporas que son el producto de su reproducción sexual (Figura 1).



Figura 1. *Neurospora* creciendo sobre la corteza de un árbol quemado (Olmedo et al., 2010).

Neurospora es un organismo modelo en investigaciones genéticas. Se conoce desde 1943 como un hongo con esporas naranjas que contaminaba las panaderías de París y aparecía en zonas de vegetación quemada. Primeramente se llamó *Monilia sitophila* hasta que los micólogos Shear y Dodge lo incluyeron en un nuevo género llamado *Neurospora* (Shear & Dodge, 1927). Gracias a la segregación mendeliana de sus dos tipos sexuales en sus ascas se reconoció su gran potencial como organismo para la investigación genética (Davis, 2000; Perkins & Davis, 2000).

2. Ciclo de vida de *Neurospora*

Neurospora crassa crece sobre el sustrato como hifas ramificadas que se fusionan formando un micelio. Estas hifas son multinucleadas y contienen tabiques perforados, que permiten el paso de citoplasma y núcleos de un compartimiento a otro. En el ciclo de vida de *Neurospora crassa* hay dos fases, una asexual y otra sexual (Figura 2).

Para la reproducción sexual se requiere la presencia de dos estirpes de distinto tipo sexual. Existen dos tipos sexuales *A* y *a* determinados por el locus sexual *mat* (Glass et

al., 1988). Ambos tipos reproductores pueden actuar como parental femenino. La formación de protoperitecios femeninos se induce en condiciones de bajo nitrógeno o carbono y está regulada por la luz azul (Degli-Innocenti & Russo, 1984; Harding & Melles, 1983). Finalmente, el ciclo sexual dará lugar a cuatro productos meióticos que al dividirse por mitosis producirán las ocho ascosporas que quedarán dentro del saco llamado asca. Las ascosporas son estructuras muy resistentes que pueden permanecer en estado latente mucho tiempo y que necesitan calor para germinar y producir un nuevo micelio (Springer, 1993).

La fase asexual consiste en la macroconidiación o conidiación y la microconidiación. La desecación o la falta de nutrientes inducen la macroconidiación, aunque también se ve afectada por la luz y los niveles de dióxido de carbono. Esta inducción genera un crecimiento de las hifas que comienzan a alejarse del sustrato formando un conjunto de hifas aéreas. Una vez alcanzada cierta longitud, el crecimiento apical cesa y comienza un proceso de gemación dando lugar a cadenas de proconidios con constricciones menores, que pasarán a constricciones mayores. Finalmente se liberarán conidios maduros que poseerán más de un núcleo (Springer, 1993). La otra ruta de reproducción asexual es la microconidiación que dará lugar a conidios más pequeños y uninucleados formados en el interior de las hifas vegetativas y que se liberarán una vez maduros, por rotura de la pared de éstas (Lowry et al., 1967).

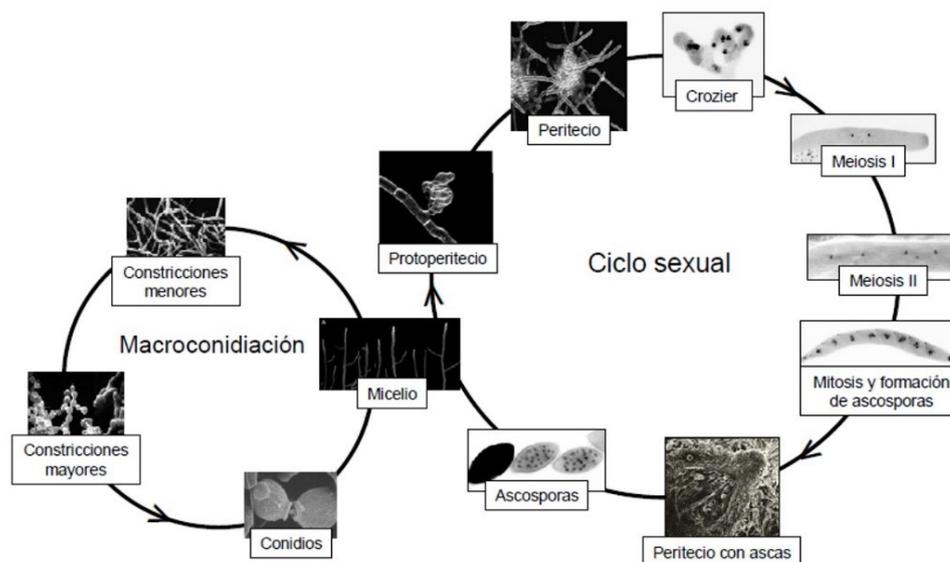


Figura 2. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Imágenes de N.B. Raju, M. Springer y N. Read. (Imagen tomada de la Tesis Doctoral de Maria Olmedo)

Existen estirpes mutantes bloqueadas en distintos estadios de la conidiación y sus genes responsables han sido identificados (Figura 3). Los mutantes en los genes *acon-2* y *fld* están alterados en la formación de las constricciones menores, pero sí son capaces de producirlos bajo ciertas condiciones (Springer & Yanofsky, 1989). ACON-2 es una fosfodiesterasa de AMPc (Greenwald et al., 2010). La proteína FLD contiene un dominio dedo de zinc y se localiza en el núcleo. Tanto la transcripción del gen *fld* como la acumulación de FLD en hifas aéreas en desarrollo asexual son dependientes de FL (Ruger-Herreros 2014). Los mutantes *acon-3* y *fl* están bloqueados en la formación de las constricciones mayores (Springer & Yanofsky, 1989). FL es un factor de transcripción necesario para inducir la formación de conidios y su sobreexpresión en la estirpe silvestre induce la conidiación en cultivos sumergidos (Bailey & Ebbole, 1998). Los mutantes *csp-1* y *csp-2* forman las constricciones mayores pero son incapaces de liberar los conidios maduros (Springer, 1993). CSP-1 es un represor de la transcripción que contiene un dominio dedo de zinc y su transcripción es inducida por la luz (Lambrechts et al., 2009; Smith et al., 2010). CSP-1 regula predominantemente genes implicados en el metabolismo, controla la síntesis de ergosterol y las modificaciones de ácidos grasos y por lo tanto modula la composición lipídica de las membranas (Sancar et al., 2011). CSP-2 está implicado en el desarrollo de la pared celular y además está relacionado con mecanismos de defensa y virulencia (Paré et al., 2012).

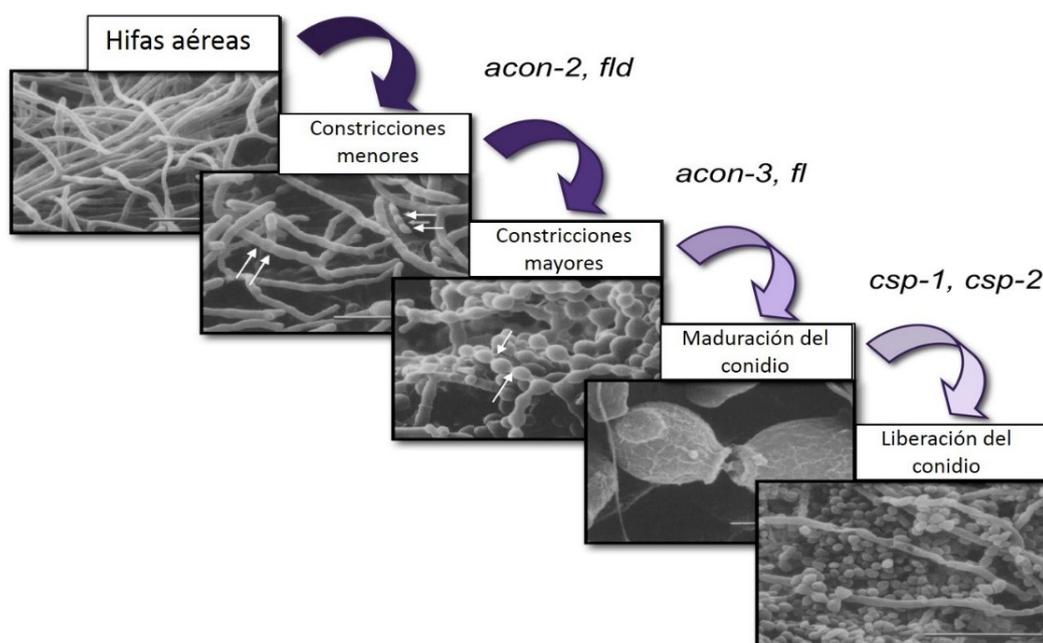


Figura 3. Distintas etapas de la formación de los conidios en *Neurospora crassa*. Se indica la etapa donde están bloqueados distintos mutantes de la conidiación (Ruger-Herreros, 2014).

3. Regulación por la luz azul en *Neurospora crassa*

La mayoría de los organismos necesitan recibir y procesar señales ambientales que regulan diferentes aspectos de su biología. La luz es una fuente de energía imprescindible para organismos fotosintéticos y para la visión en animales. En muchos hongos es esencial para la regulación de su metabolismo y de su desarrollo, como la producción y dispersión de esporas (Corrochano, 2007; Rodríguez-Romero et al., 2010; Tisch & Schmoll, 2010). En hongos se han descrito respuestas a distintas longitudes de onda, como a la luz azul en *Neurospora crassa* (Linden et al., 1997; Liu et al., 2003) y *Phycomyces blakeesleanus* (Cerdá-Olmedo, 2001). También se conocen respuestas a otras longitudes de onda como la conidiación en *Aspergillus nidulans*, regulada por luz roja (Fuller et al., 2013; Mooney & Yager, 1990; Röhrig, Kastner et al., 2013); o en *Alternaria tomato* en respuesta a luz del ultravioleta cercano (Kumagai, 1989).

Neurospora crassa ha servido como organismo modelo en la investigación de la percepción de luz azul y la transducción de la señal lumínica (Chen & Loros, 2009; He & Liu, 2005; Linden et al., 1997). En este hongo la luz azul regula distintos procesos como la carotenogénesis (Schmidhauser et al., 1990), la esporulación (Lauter & Russo, 1991) y la sincronización del reloj circadiano (Hurley et al., 2015; Montenegro-Montero et al., 2015; Russo, 1988).

4. Fotorreceptores de *Neurospora crassa*

4.1 El complejo White Collar

El Complejo White Collar (WCC) está formado por los productos de los genes *white collar-1* (*wc-1*) y *white collar-2* (*wc-2*) y es el responsable de las repuestas a la luz azul en *Neurospora crassa* (Collett et al., 2002; Lee et al., 2003; Linden & Macino, 1997). Estos genes se descubrieron por el estudio de mutantes que estaban afectados en la fotoinducción de la síntesis de carotenos. Los mutantes *wc* han perdido todas sus fotorrespuestas, pero no parecen estar afectados en el crecimiento, morfología o en las expresión de genes no regulados por la luz (Degli-Innocenti & Russo, 1984).

WC-1 es una proteína de 1167 aminoácidos (125 kDa) que tiene un dominio LOV (Luz, Oxígeno, Voltaje), dos dominios PAS (“Per-Art-Sim”) de interacción proteína-proteína, un dominio de unión al ADN tipo “dedo de Zinc”, y una señal de localización

nuclear (NLS) (Ballario et al., 1996; Schwerdtfeger & Linden, 2000). El primer dominio PAS es necesario para la función de WC-1 (Cheng et al., 2003) y el segundo es imprescindible para la interacción entre WC-1 y WC-2 para formar el complejo (Cheng et al., 2002). El dominio LOV se une a un nucleótido de flavina (FAD) permitiendo que la proteína sea capaz de captar la luz y actuar como un fotorreceptor (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). Este dominio LOV de unión a flavina se describió inicialmente en proteínas receptoras de plantas, principalmente en fototropinas (Christie et al., 2007) y también en otros hongos (Krauss et al., 2009).

La proteína WC-2 contiene un dominio “dedo de Zinc”, un dominio PAS de interacción proteína – proteína y una señal de localización nuclear (NLS) (Linden & Macino, 1997). WC-1 y WC-2 interactúan mediante el dominio PAS formando el Complejo White Collar (WCC).

Tanto WC-1 como WC-2 están presentes en el micelio en oscuridad (Cheng et al., 2001; Schwerdtfeger & Linden, 2000; Talora et al., 1999) y están localizadas preferentemente en el núcleo, aunque también se detecta WC-2 en el citoplasma (Cheng et al., 2001; Denault et al., 2001; Heintzen et al., 2001; Schafmeier et al., 2005). La localización de WC-1 y WC-2 no se ve afectada por la luz y no está alterada en los mutantes *wc-2* y *wc-1* respectivamente, lo que indica que su localización no necesita el WCC completo (Schwerdtfeger & Linden, 2000). WC-1 es el factor limitante en el complejo, mientras que WC-2 se encuentra en exceso (Cheng et al., 2001; Denault et al., 2001). Sin embargo, la sobreexpresión de *wc-1* no es suficiente para activar la mayoría de los genes fotoinducibles (Lewis et al., 2002).

4.2 La proteína VVD.

En *Neurospora crassa* existe otro pequeño fotorreceptor de luz azul producto del gen *vvd*. VVD es una pequeña proteína de 186 aminoácidos que contiene un dominio LOV como el existente en WC-1 (Heintzen et al., 2001; Schwerdtfeger & Linden, 2001). Esta pequeña proteína está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma (Chen et al., 2010; Hunt et al., 2010; Malzahn et al., 2010). La transcripción de *vvd* se activa por la luz mediante el WCC y está controlada por el reloj circadiano (Heintzen et al., 2001). Su dominio LOV también une un cromóforo del tipo flavina (FAD o FMN) y presenta un fotociclo lento de aproximadamente 5 horas (Schwerdtfeger & Linden, 2003). Para su

correcto funcionamiento *in vivo* es esencial la captación de la luz y la formación de un enlace entre la flavina y una cisteína del dominio LOV (Zoltowski et al., 2007). Una de las funciones de VVD es la represión de las fotorrespuestas después de la activación por luz (Heintzen et al., 2001).

4.3 Otros fotorreceptores en *Neurospora crassa*.

En el genoma de *Neurospora crassa* se han identificado varios genes que codifican para otros fotorreceptores capaces de recibir diferentes tipos de luz: una opsina (*nop-1*), un criptocromo (*cry-1*) y dos fitocromos (*phy-1* y *phy-2*) (Figura 4).

El gen *nop-1* de *N. crassa* codifica una proteína con siete hélices transmembrana similar a las rodopsinas estudiadas en arqueas, aunque NOP-1 ha sido la primera identificada en microorganismos eucariotas (Bieszke et al., 1999). NOP-1 se une al retinal *in vitro*, formando una rodopsina que absorbe la luz verde (Bieszke et al., 1999b; Brown & Jung, 2006).

Los criptocromos son proteínas capaces de percibir la luz azul. La proteína CRY-1 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma y está regulada por la luz y el ritmo circadiano. CRY-1 une el cromóforo FAD *in vitro* (Froehlich et al., 2010) y su secuencia sugiere que es un miembro de la subfamilia de criptocromos DASH (Daiyasu et al., 2004), que presentan actividad fotoliasa específica de ADN de cadena sencilla (Selby & Sancar, 2006) y actúan además como factores transcripcionales (Brudler et al., 2003).

Los fitocromos son fotorreceptores que detectan luz roja utilizando como cromóforo una molécula de tetrapirrol (Rockwell et al., 2006). En la secuencia genómica de *Neurospora* se han identificado dos genes de fitocromos, *phy-1* y *phy-2* (Borkovich et al., 2004; Galagan et al., 2003). Las proteínas PHY-1 y PHY-2 tienen un dominio sensorial responsable de la unión al cromóforo. Los genes *phy* no están regulados por la luz pero *phy-1* está regulado por el reloj circadiano (Froehlich et al., 2005).

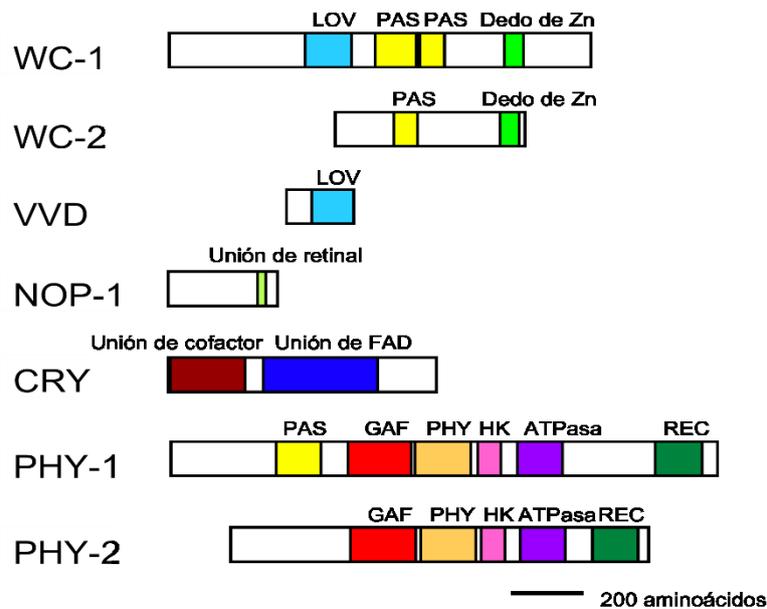


Figura 4 Fotorreceptores de *Neurospora crassa*. WC-1 y VVD, fotorreceptores con dominios LOV. WC-2 proteína que junto a WC-1 forma el complejo fotorreceptor WC. Otros fotorreceptores de *Neurospora* son la opsina (NOP-1), el criptocromo (CRY) y dos fitocromos (PHY-1 Y PHY-2). La figura muestra los diferentes dominios de las proteínas. (Imagen tomada de la Tesis Doctoral de Julio Rodríguez).

5. Activación de la transcripción y adaptación por luz en *Neurospora crassa*.

Se ha propuesto que el primer suceso fotoquímico para la activación de WC-1 consiste en la formación de un enlace covalente transitorio entre la flavina y una cisteína del dominio LOV, como en las fototropinas de plantas (Salomon et al., 2000). Este enlace produce un cambio conformacional que favorece la interacción proteína-proteína (Crosson et al., 2003) (Figura 5). El reemplazamiento de la cisteína conservada del dominio LOV de WC-1 por una serina impide la fotoactivación génica (Cheng et al., 2003).

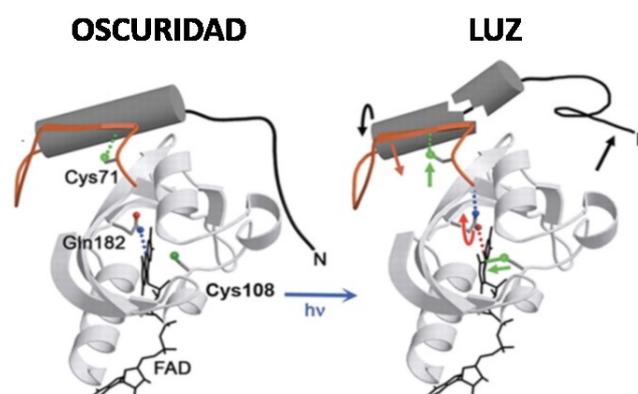


Figura 5: Cambios conformacionales en el dominio LOV tras una exposición a la luz. Las flechas indican los cambios principales en la estructura después de la formación del enlace flavina- cisteína. Modificado de (Zoltowski et al., 2007).

En oscuridad el WCC, formado por un heterodímero WC-1-WC-2, se une a secuencias conservadas LRE (“Light Response Elements”) de los promotores de genes regulados por luz (Froehlich et al., 2002, 2003; He & Liu, 2005; Smith et al., 2010) e interacciona con la acetilasa de histona NGF-1 (Brenna et al., 2012). Cuando WC-1 recibe la luz se produce el cambio conformacional que permite la formación de un homodímero entre dos WC-1 unidos mediante el dominio LOV de los dos WC-1 (Malzahn et al., 2010). El resultado de esta activación consiste en que NGF-1 lleva a cabo una acetilación transitoria dependiente de la luz de la lisina 14 de las histonas asociadas a los promotores de genes fotoinducibles a los que está unido el WCC, como se ha demostrado en el gen *al-3* (Brenna et al., 2012; Grimaldi et al., 2006). Esto provoca una modificación en la cromatina que permite la mejor accesibilidad de la polimerasa de ARN a los promotores, activando su transcripción. (Grimaldi et al., 2006) (Figura 6).

Entre los genes fotoinducibles se encuentra el propio *wc-1* (Ballario et al., 1996; Káldi et al., 2006). Además de esta regulación transcripcional, la luz promueve la fosforilación de la proteína WC-1, lo que permite su degradación y reemplazamiento en el WCC por un nuevo WC-1 que es inactivo (He & Liu, 2005; Schwerdtfeger & Linden, 2000, 2001; Talora et al., 1999). La proteína quinasa C, PKC, es capaz de interactuar y fosforilar a WC-1. Además mutaciones en PKC hacen variar la cantidad de WC-1 en el hongo (Franchi et al., 2005).

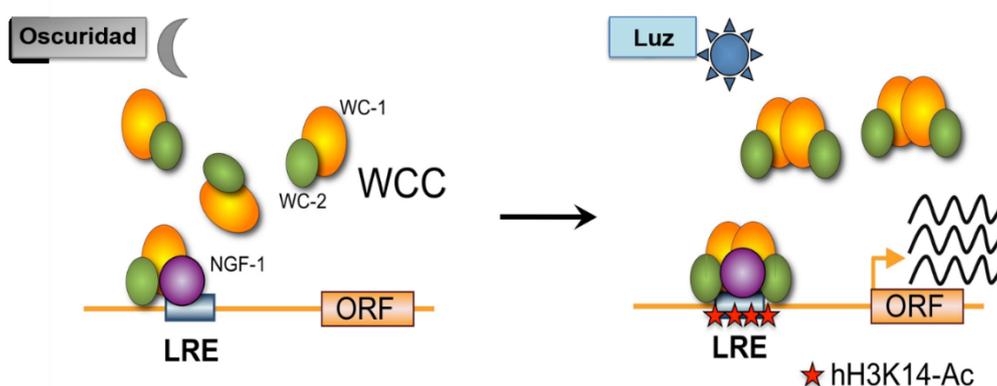


Figura 6: Modelo simplificado para la activación de la transcripción por luz. La recepción de la luz mediante el cromóforo FAD de WC-1 debe dar lugar a la formación del enlace entre la flavina y la cisteína, provocando un cambio conformacional que conduce a la dimerización del WCC, la remodelación de la cromatina a través de la acetilasa de histona NGF-1, y la activación de la transcripción de genes. Las histonas modificadas son mostradas mediante estrellas en el sitio de unión al promotor. La exposición a la luz estimula la transcripción de los genes *vvd*, *frq*, y otros genes fotoinducibles. Figura modificada de (Olmedo et al., 2013).

El WCC activa los genes fotoinducibles de manera transitoria en un fenómeno que se conoce como fotoadaptación (He & Liu, 2005). Cuando un micelio crecido en oscuridad se expone a la luz, el ARNm de los genes dependientes de WCC se acumulan rápidamente y esta acumulación disminuye pasado un tiempo de iluminación (Arpaia et al., 1999; Lauter & Yanofsky, 1993; Navarro-Sampedro et al., 2008; Olmedo et al., 2010; Schwerdtfeger & Linden, 2001; 2003). Uno de estos genes fotoinducibles es *vvd* cuyo producto, la proteína VVD, es necesaria para la fotoadaptación (Heintzen et al., 2001). En los mutantes *vvd* la hiperfosforilación de WC-1 por la luz se mantiene en el tiempo y la cantidad de WC-1 disminuye (Schwerdtfeger & Linden, 2001; Shrode et al., 2001). La luz activa VVD que dimeriza mediante su dominio LOV (Peter et al., 2012; Zoltowski & Crane, 2008). La similitud con el dominio LOV de WC-1 sugiere una posible interacción de los dos receptores mediante esta zona de la proteína, ya que sus dominios LOV *in vitro* son capaces de interactuar (Malzahn et al., 2010). Diferentes experimentos muestran que la unión de la proteína VVD recién sintetizada a WC-1 altera los dímeros transcripcionalmente activos, disminuyendo su capacidad de activar la transcripción (Chen et al., 2010a; 2010b; Hunt et al., 2010) (Figura 7).

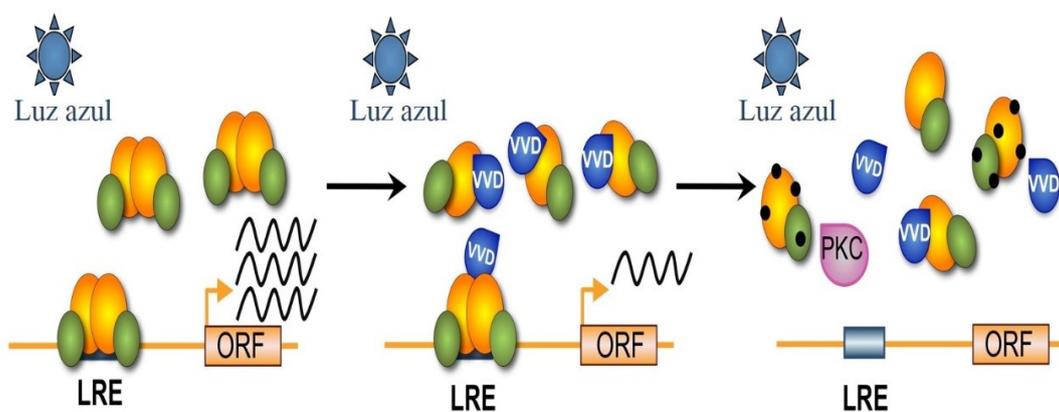


Figura 7: Modelo simplificado para la activación de la transcripción por luz y la fotoadaptación. La fotoactivación génica es transitoria. La proteína VVD sintetizada compite con la proteína WC-1 activada e interrumpe la formación de dímeros de WCC unidos al promotor. El WCC unido a VVD no está transcripcionalmente activo y resulta en una atenuación de la respuesta a la luz. Diferentes fracciones de WCC activado por luz son estabilizados por FRQ (no mostrado), fosforilados transitoriamente (círculos negros) y degradados parcialmente, probablemente a través de una interacción con la proteína quinasa C (PKC) y otras quinanas y fosfatasas. Modificado de (Olmedo et al., 2013).

6. Fotorreceptores de otros hongos

6.1 Fotorreceptores de *Aspergillus*

En el genoma de *Aspergillus nidulans* existen dos genes que codifican proteínas homólogas a WC-1 y WC-2 de *N. crassa*: LreA y LreB (“Light Response”). LreA está formada por 836 aminoácidos y tiene los dominios característicos de las proteínas tipo WC-1: un dominio LOV, dos dominios PAS, un dominio de señal de localización nuclear (NLS), y un dominio dedo de zinc en el extremo C-terminal (Purschwitz et al., 2008). LreB contiene 417 aminoácidos y, al igual que WC-2 de *Neurospora crassa*, no tiene dominio LOV, y sí tiene un dominio PAS, un dominio de señal nuclear (NLS) y un dominio dedo de zinc. Mediante el análisis de mutantes ($\Delta lreA$ y $\Delta lreB$) se ha comprobado que la producción de conidios se reduce mucho con independencia de la presencia o no de luz, lo que sugiere una función represora de las proteínas LreA y LreB en la conidiación. Esta represión se lleva a cabo a través de la formación de un complejo entre LreA, LreB, y FphA con el sistema de regulación Velvet que está implicado en el control del desarrollo y el metabolismo secundario (Calvo, 2008; Purschwitz et al., 2008). El desarrollo sexual en *A. nidulans* ocurre preferiblemente en oscuridad. Bajo estas condiciones, la delección de *lreA* causa una reducción del 70% en la formación de cleistotecios; mientras que la delección de *lreB* sólo causa una reducción del 30% (Purschwitz et al., 2008). En luz blanca, la formación de cleistotecios se inhibe en la estirpe silvestre y prácticamente desaparece en los mutantes *lreA* o *lreB*, sugiriendo un efecto aditivo de la luz y la ausencia de las proteínas Lre. LreA y LreB actúan como activadores del ciclo sexual y su actividad se reprime por la luz a través de la acción del fitocromo FphA y el sistema de regulación Velvet (Calvo, 2008). Se ha comprobado que LreA únicamente interacciona con LreB y LreB interacciona además con el fitocromo FphA, demostrando que los sistemas de detección de luz azul y luz roja están conectados (Figura 8) (Bayram et al., 2010; Purschwitz et al., 2008).

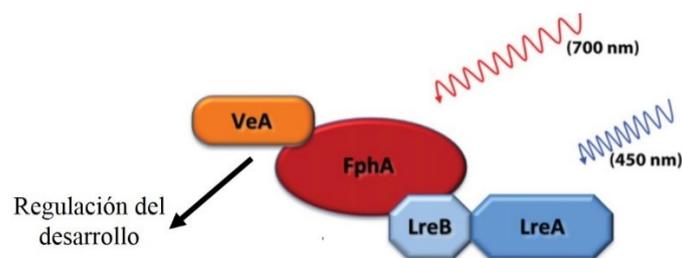


Figura 8. Esquema del complejo fotorreceptor de *Aspergillus nidulans*. Modificado de (Bayram et al., 2010).

6.2 Fotorreceptores de *Phycomyces blakesleeanus*

Phycomyces blakesleeanus es un hongo cigomiceto y su genoma también contiene genes del tipo *wc* de *Neurospora crassa*. Tres de estos genes son del tipo *wc-1* y cuatro genes del tipo *wc-2*. Los genes homólogos de *wc-1* se denominan *madA*, *wcoA* y *wcoB*; y los genes homólogos de *wc-2* se denominan *madB*, *wctB*, *wctC* y *wctD* (Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009). Estos genes se originaron mediante duplicaciones génicas que ocurrieron muy tempranas en la evolución de los cigomicetos y que no han sido observadas en otros grupos de hongos (Sanz et al., 2009). Como en *Neurospora*, las proteínas MadA y WcoA tienen un dominio de unión a flavina (LOV), dos dominios de interacción entre proteínas (PAS) y un dominio dedo de zinc. La proteína WcoB posee el dominio LOV, los dos dominios PAS pero carece del dominio dedo de zinc (Figura 9). Las proteínas del tipo WC-2 tienen un dominio PAS y un dominio dedo de zinc. En el genoma de *Phycomyces* también existe un gen que codifica para el criptocromo, *cryA*, que pertenece a los criptocromos de la familia cry-DASH (Figura 9).

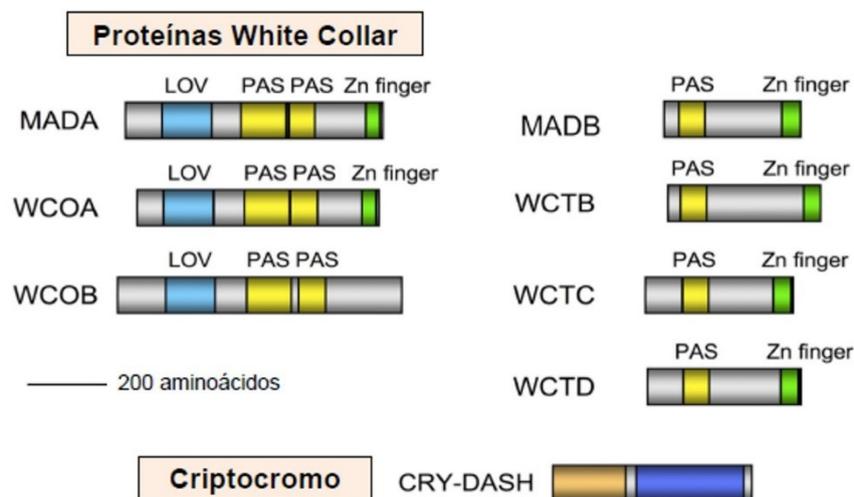


Figura 9: Fotorreceptores de *Phycomyces*. Figura de la Tesis Doctoral de Miralles-Durán.

De todos los genes *wc* de *Phycomyces*, los genes más importantes son *madA* y *madB* que se transcriben en oscuridad y cuyos mutantes tienen alteradas todas las respuestas a la luz (Bergman et al., 1973; Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009). Las proteínas MadA y MadB interactúan formando un complejo llamado Complejo Mad que es homólogo al WCC de *N. crassa* y es el complejo fotorreceptor principal en *Phycomyces* (Sanz et al., 2009). Las mutaciones en los genes *madA* o *madB* reducen la fotoactivación de los genes *wc* que son fotoinducibles, como *wcoA*, *wcoB*, *wctB* y *wctD*.

Los dominios presentes en MadA y MadB sugieren que el complejo Mad debe ser necesario para la activación de la transcripción por luz. El complejo Mad estaría disponible en oscuridad, para que cuando llegue la luz dicho complejo esté preparado para actuar. El sistema de fotorrecepción a la luz de *Phycomyces* es el más complejo descrito en un hongo, ya que se han descritos dos fotosistemas optimizados para la recepción de la luz de baja y alta intensidad (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1988; Galland & Lipson, 1987). Sin embargo, se desconoce el papel de las otras proteínas WC en la fotobiología de *Phycomyces*.

6.3 Fotorreceptores de *Mucor circinelloides*

En el cigomiceto *Mucor circinelloides* existen tres genes homólogos a *wc-1*: *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. El único gen cuya expresión está controlada por la luz es *mcwc-1c*, y los otros dos se expresan de forma constitutiva tanto en la luz como en oscuridad. Las tres proteínas Mcwc-1 poseen un dominio LOV de unión a flavina (Silva et al., 2006). *Mucor* también contiene en su genoma cuatro genes homólogos de *wc-2* denominados: *mcwc-2a*, *mcwc-2b*, *mcwc-2c* y *mcwc-2d* (Corrochano & Garre, 2010).

El gen *mcwc-1c* es el elemento clave en la inducción de la carotenogénesis por la luz ya que los mutantes que carecen de este gen presentan una reducción en la acumulación de β -caroteno en respuesta a la luz (Silva et al., 2006). La proteína Mcwc-1c regula la expresión de los genes carotenogénicos activando su transcripción en presencia de luz (Silva et al., 2006). El gen *mcwc-1b* participa en la regulación de la síntesis de carotenos independiente de la luz. Mcwc-1b se ubiquitina por CrgA con dos moléculas de ubiquitina, inactivándolo y, por tanto, reprimiendo la síntesis de carotenos, ya que la forma no ubiquitinada de esta proteína es la que activa la expresión de los genes carotenogénicos en oscuridad (Silva et al., 2008). La proteína Mcwc-1b es capaz de interaccionar consigo misma (Silva et al., 2008), siendo probable que forme complejos WC constituidos por Mcwc-1b y alguna o varias de las proteínas Mcwc-2, de forma similar a lo que ocurre en *N. crassa* (Cheng et al., 2002) y *P. blakesleeanus* (Sanz et al., 2009).

6.4 Fotorreceptores en *Fusarium*

Los genomas de especies de *Fusarium* contienen un gen ortólogo a *wc-1* de *N. crassa*, así como un ortólogo de *wc-2* aunque no responden igual a la luz. Mientras que la expresión de *wc-1* de *Neurospora* es fotoinducible, la de *wcoA* de *F. fujikuroi* no parece mostrar cambios significativos por la luz (Estrada & Avalos, 2008). Los mutantes *wcoA* de *F. fujikuroi* además de estar afectados en la producción de metabolitos como giberelinas, bikaverina y fusarinas, también poseen alteraciones en el desarrollo, como la conidiación o la hidrofobicidad de las hifas (Estrada & Avalos, 2008). El mismo gen de *F. oxysporum*, llamado *wc1*, participa en el desarrollo de las hifas aéreas, la patogenicidad en mamíferos y la fotorreactivación dependiente de la luz ultravioleta (Ruiz-Roldan et al., 2008). La proteína WcoA es necesaria para la fotoinducción completa de los genes *car* implicados en la carotenogénesis, aunque en dicha regulación participan también, al menos, una proteína de la familia VIVID y un criptocromo (Castrillo & Avalos, 2015).

F. fujikuroi posee dos genes para criptocromos y uno de ellos, el gen *cryD*, codifica para un criptocromo DASH. CryD se activa por la luz a través de WcoA, y su mutación produce diferentes alteraciones fenotípicas en condiciones de iluminación pero no en oscuridad (Castrillo et al., 2013). Estas alteraciones afectan a la morfología, la conidiación y la producción de metabolitos secundarios, aunque de forma distinta a las mostradas por los mutantes *wcoA*, indicando un papel regulatorio complejo y, al menos, parcialmente independiente de WcoA (Castrillo & Avalos, 2015). En *F. fujikuroi* el gen ortólogo de *vvd* se llama *vvdA*. Mutantes en este gen tienen una menor acumulación de carotenoides que en la estirpe silvestre en luz, indicando la participación de VvdA en esta fotorrespuesta (Castrillo & Avalos, 2014).

La función del único fitocromo que se encuentra en los genomas de *Fusarium* (Avalos & Estrada, 2010) no ha sido aún investigada en profundidad. *F. fujikuroi* posee, además, un gen para una rodopsina, *carO*, identificado por su presencia en el agrupamiento de los genes *car* (Prado et al., 2004), y otro gen para una segunda rodopsina, *opsA* en otro lugar del genoma (Estrada & Avalos, 2009). La comparación de secuencias sugiere que OpsA es ortólogo de Nop-1 de *N. crassa*, careciendo este hongo de un ortólogo para CarO. CarO es una bomba de iones regulada por la luz verde que se acumula en los conidios de *Fusarium fujikuroi* y que participa en la represión de la germinación por la luz (García-Martínez et al., 2015).

7. La importancia de la degradación de proteínas en la regulación del ritmo circadiano.

El WCC es también el principal factor de transcripción que regula el reloj circadiano de *Neurospora* (Crosthwaite et al., 1997; Dunlap & Loros, 2004; Heintzen & Liu, 2007). El reloj circadiano es un mecanismo celular clave que controla una amplia variedad de actividades fisiológicas y moleculares en organismos eucariotas. En *N. crassa* consiste en un bucle autorregulatorio negativo formado por tres componentes principales: FREQUENCY (FRQ), WC-1 y WC-2 (Loros & Dunlap, 2001; Young & Kay, 2001). En oscuridad el WCC se une al promotor del gen *frq* y activa su transcripción (Cheng et al., 2001, 2002, 2003; Crosthwaite et al., 1997; Froehlich et al., 2002, 2003; Talora et al., 1999). Una vez que FRQ se sintetiza se une a la proteína FRH y mediante interacción física con el WCC es capaz de reprimir su propia transcripción (Aronson et al., 1994; Cheng et al., 2001; Denault et al., 2001; Froehlich et al., 2003; Merrow et al., 2001). La oscilación en la acumulación de FRQ provoca cambios en la fosforilación y activación del WCC durante el ciclo circadiano en oscuridad (Dunlap & Loros, 2004). Debido a esto, los niveles de FRQ son claves para el funcionamiento del reloj, por lo que esta proteína está regulada por importantes mecanismos de degradación que se describen a continuación.

El primer paso hacia la degradación de FRQ es la fosforilación (Edery et al., 1994; Garceau et al., 1997; Liu et al., 2000). Se han identificado varias quinasas capaces de fosforilar FRQ: quinasa de caseína I (CKI), quinasa de caseína II (CKII) y PKA; y otras fosfatasas como PP1 y PP4 que contrarrestan la acción de las quinasas (Diernfellner & Schafmeier, 2011). FRQ, además de un dominio de señalización nuclear NLS, contiene dos dominios PEST y puede ser fosforilado en más de 100 sitios (Figura 10). Las mutaciones en estos sitios de fosforilación desencadenan alteraciones en la longitud del ciclo circadiano (Görl et al., 2001; Merrow & Dunlap, 1994).

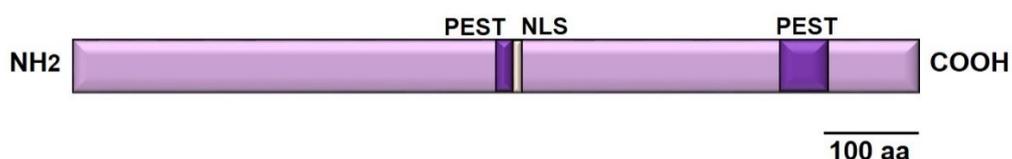


Figura 10. Estructura y dominios de la proteína FRQ de *Neurospora crassa*. Tiene dos dominios PEST y un dominio de localización nuclear (NLS)

Una vez que la proteína FRQ es sintetizada en el citosol, se fosforila secuencialmente. Primero se fosforilan regiones del extremo C-terminal, aumentando su estabilidad; luego las zonas centrales (donde se encuentra PEST-1) y por último la región del N-terminal (Querfurth et al., 2011). Es esta hiperfosforilación la que promueve la degradación de FRQ (Baker et al., 2009; Tang et al., 2009). La proteína FRQ hipofosforilada y unida a FRH y CKI entra en el núcleo para fosforilar e inactivar el WCC (Diernfellner et al., 2009; Luo et al., 1998). Al contrario que FRQ, WCC se fosforila en pocos sitios (He et al., 2005; Sancar et al., 2009). Cuando WCC está hipofosforilado es inestable y activo pero a medida que aumenta su fosforilación se hace estable e inactivo, por lo que estos sitios de fosforilación actúan como un interruptor de su activación. Sobre WCC también actúan sus propias quinasas PKA y PKC para desestabilizarlo y las fosfatasas PP2A y PP4 que lo reactivan para volver al núcleo (Cha et al. 2008; Hong et al., 2008) (Figura 11).

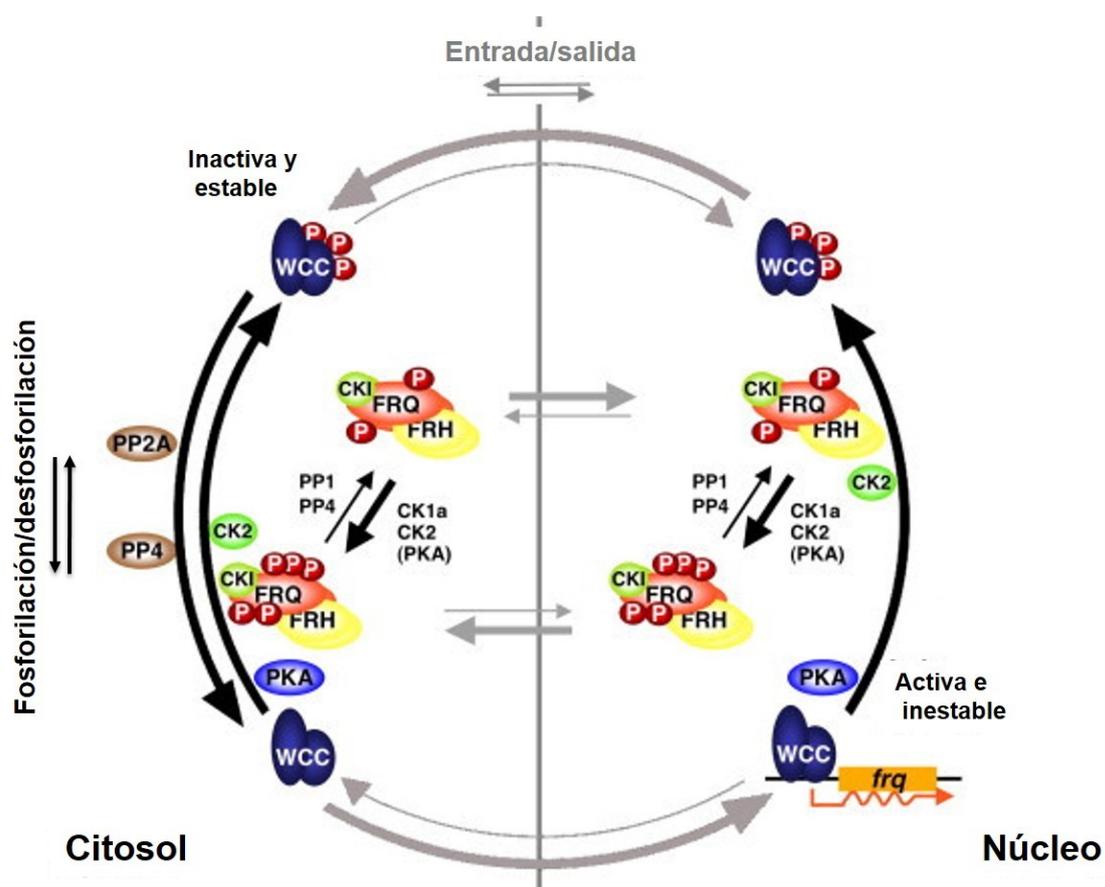


Figura 11. Ciclos interdependientes de entrada y salida al núcleo de FRQ y el WCC. El WCC hiperfosforilado en el citoplasma es inactivo, la acción de fosfatasas lo activan y vuelve a entrar en el núcleo donde promueve la transcripción del gen *frq*. FRQ dentro del núcleo se une a FRH y es hipofosforilado, activándose y actuando sobre el WCC. La hiperfosforilación de FRQ/FRH promueve su salida al citosol. Modificado de (Diernfellner & Schafmeier, 2011)

8. Degradación de proteínas vía proteasoma/ubiquitina en *Neurospora crassa*.

En organismos eucarióticos la principal vía de degradación intracelular de proteínas es el sistema Proteasoma/Ubiquitina. En esta ruta de señalización, las proteínas marcadas para su degradación se unen a ubiquitina, una pequeña proteína de 76 aminoácidos (Hershko & Ciechanover, 1998). Esta unión está mediada por una serie de enzimas que actúan en cascada: enzimas de activación de ubiquitina (E1), enzimas de conjugación de ubiquitina (E2) y la ligasa de ubiquitina (E3). Una vez que la proteína está poliubiquitinada se degrada en el proteasoma (Pickart, 2001).

El principal grupo de enzimas E3 son las llamadas ligasas de ubiquitina “Culling-Ring” (CRL), de las cuales podemos encontrar dos grupos: SCF (“Skp-1, Cullin, F-box complex”) y el complejo E3 del tipo Cul3. Las CRL están formadas por varias subunidades: una subunidad Cullin (Cul1, Cul3 o Cul4), una proteína RING (Hrt1/Roc1/Rbx1), un adaptador de proteínas marcadas (Skp1 en el complejo SCF y DDB1 en el complejo tipo Cul3) y una subunidad de reconocimiento de sustrato, como las proteínas F-Box FBP, BTB o DCAF (Cardozo & Pagano, 2004; J. Lee & Zhou, 2007; Pintard et al., 2004).

Las CRLs se activan por un proceso de neddilación, la unión de la proteína Nedd8 a un sitio conservado de la proteína Cullin. Esta regulación se lleva a cabo por otro complejo multiproteico llamado el Signalosoma COP9 (CSN), que es el encargado de separar la proteína Nedd8 facilitando el desensamblaje de CRL (Cope & Deshaies, 2003; Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001). El complejo CSN está muy conservado en eucariotas (Wei & Deng, 2003; Wei et al., 2008; Wolf et al., 2003). Inicialmente fue descubierto en *Arabidopsis thaliana* como un importante regulador de la fotomorfogénesis (Wei et al., 1994), y más tarde se descubrió que, además, participaba en muchos procesos en eucariotas, como en *Drosophila melanogaster* que está implicado en la oogénesis (Oron et al., 2002). En *Dictyostelium discoideum* y *Aspergillus nidulans* el CSN tiene ocho subunidades, pero en *Neurospora crassa* el CSN sólo tiene siete (He et al., 2005). En el genoma de *N. crassa* no se encuentra el gen *csn-8*, pero sí hay genes que codifican para las otras siete subunidades que se dividen en dos grupos, las que tienen dominio PCI (“Proteasome, COP9 signalosome, Initiation factor”) necesario para el ensamblaje del complejo: CSN-1, CSN-2, CSN-3, CSN-4, CSN-7; y las que contienen dominio MPN (“Mpr1p, PAD1p N-terminal”) necesario para la eliminación de Nedd8: CSN-5 y CSN-6 (Wang et al., 2010). Las distintas subunidades podrían llevar a cabo

distintas funciones, ya que los mutantes en estos genes no tienen los mismos fenotipos. Todos los mutantes excepto el mutante *Δcsn-3* tienen alterado el número de conidios, la longitud de las hifas aéreas, la tasa de crecimiento, el ritmo circadiano y la estabilidad de componentes del CRL (Wang et al., 2010).

En *Neurospora crassa* se ha investigado la degradación de FRQ mediante esta vía crítica en el control del ritmo circadiano en *Neurospora crassa* (Dunlap, 1999; Liu, 2005). FRQ actúa como elemento negativo en la regulación por retroalimentación del ritmo circadiano, proceso en el cual es necesaria su fosforilación (Diernfellner & Schafmeier, 2011; Liu et al., 2000). La proteína FRQ fosforilada es reconocida por FWD-1, una proteína del tipo FBP, que la une al complejo CRL llamado ligasa de ubiquitina SCF (He et al., 2003) que lo ubiquitina para que sea degradado en el proteosoma. FWD-1 está unido físicamente a la proteína SKP-1 del complejo SCF, que a su vez está unida a CUL-1 neddilado (He et al., 2005). Una vez que FRQ es degradado, CSN actúa sobre el complejo SCF separando Nedd8 y haciendo que el complejo se desensamble. FWD-1/SKP-1 se libera quedando disponibles para volver a formar parte del complejo cuando sea necesario y CUL-1/RING son estabilizadas por la proteína CAND-1 (Liu et al. 2002; Zheng et al., 2002). Si esta separación no se lleva a cabo, el complejo SCF se autoubiquitina y se degrada, como ocurre en mutantes *csn-2*, acumulándose FRQ fosforilado dando lugar a una alteración del ritmo circadiano, el desarrollo y crecimiento en *N. crassa* (He et al., 2005).

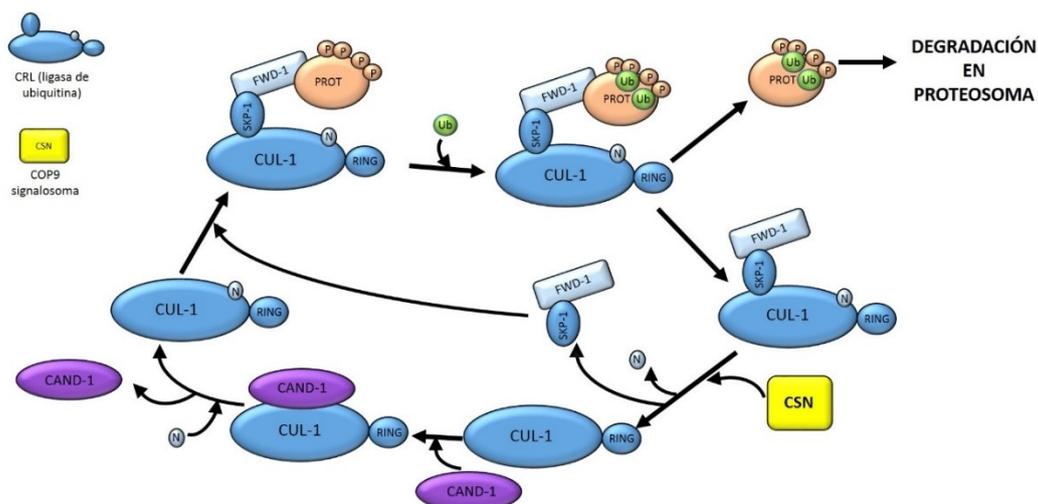


Figura 12. Ruta de degradación de proteínas en *Neurospora crassa* mediante la vía Ubiquitina/proteosoma. Las proteínas marcadas por fosforilación serán reconocidas por la ligasa de ubiquitina que añadirá moléculas de Ubiquitina para posteriormente ser degradadas en el proteosoma. El complejo CSN impide la degradación por autoubiquitinación de la ligasa de ubiquitina. Modificado de He et al. (2005).

9. El sistema regulador Velvet

Las proteínas Velvet se han identificado y caracterizado como proteínas clave en la regulación del crecimiento de hongos, la diferenciación y el metabolismo secundario en ascomicetos y basidiomicetos (Bayram & Braus, 2012). Todos los reguladores Velvet tienen un dominio de unión a ADN denominado dominio Velvet, por lo que podrían definirse como una nueva clase de factor de transcripción específico de hongos (Ahmed et al., 2013; Bayram & Braus, 2012; Ni & Yu, 2007). Además estas proteínas pueden interactuar con otras proteínas formando complejos capaces de regular diferentes aspectos de la biología del hongo como el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios (Bayram et al., 2008; Park et al. 2012; Sarikaya Bayram et al., 2010).

9.1 Velvet en *Aspergillus nidulans*

En *Aspergillus nidulans*, como en otros hongos, el desarrollo sexual y asexual está controlado por una regulación espacial y temporal de distintos genes (Adams et al., 1998; Calvo et al., 2002; Kues & Fisher, 2006). La proteína VelvetA (VeA) es uno de los principales componentes de dicha regulación (Kim et al., 2002). La activación de VeA por la luz inhibe el desarrollo sexual y activa el desarrollo asexual o conidiación. Por el contrario en oscuridad su activación provoca el desarrollo sexual del hongo (Mooney & Yager, 1990; Yager, 1992). VeA también tiene un papel principal en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios como micotoxinas, antibióticos y metabolitos que actúan de protección frente a la radiación ultravioleta (Calvo et al., 2004; Cary et al., 2007; Dadachova et al., 2007; Duran et al., 2007; Kato et al., 2003; Leonard, 1972; Whyte et al., 1996)

La proteína VeA posee 573 aminoácidos (Kim et al., 2002). En su extremo amino tiene un dominio Velvet (Bayram et al., 2008), un dominio de señalización nuclear (NLS), un dominio de exportación nuclear (NES) (Kim et al., 2002; Stinnett et al., 2007), y un dominio PEST (secuencia peptídica rica en Prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)) asociado a proteínas de vida media corta y de rápido recambio (Bayram et al., 2008; Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al., 1986; Roth & Davis, 2000) (Figura 13).



Figura 13. Estructura y dominios de la proteína VeA de *Aspergillus nidulans*. Presenta un dominio Velvet muy conservado en hongos, dentro del cual aparecen un dominio NLS y un dominio NES para su localización en el núcleo, y un dominio PEST para la rápida degradación de la proteína.

Un mutante muy útil en las investigaciones con *Aspergillus nidulans* es el mutante con el alelo *veA1*. Este alelo mutante difiere del silvestre en el cambio de un nucleótido en el codón de iniciación (G por T en la posición +3), lo que resulta en una proteína truncada a la que le faltan los 36 primeros aminoácidos ya que se usa el codón 37 como nuevo codón de iniciación (Han et al., 2010; Kim et al., 2002). Fenotípicamente el mutante *veA1* ha perdido casi toda su función sexual produciendo menos cleistotecios; y en oscuridad produce muchas más esporas asexuales que el silvestre (Han et al., 1990; Mooney & Yager, 1990; Yager, 1992). El mutante que carece del gen, ΔveA , sí ha perdido la capacidad de desarrollo sexual; y la sobreexpresión de la proteína VeA conlleva al aumento del desarrollo sexual y disminución del desarrollo asexual. El análisis fenotípico de estos mutantes confirma que VeA es un regulador positivo del desarrollo sexual y a la vez un regulador negativo del desarrollo asexual (Kim et al., 2002).

La expresión del gen *veA* no es constitutiva sino que se inicia a las 14 horas de cultivo (Kim et al., 2002). VeA actúa sobre importantes factores de transcripción reguladores del desarrollo. El aumento de la producción de conidios en el mutante *veA* coincide con una desregulación del gen *brlA* esencial para la conidiación en *Aspergillus nidulans* (Kato et al., 2003). El gen *brlA* produce dos transcritos, uno más pequeño denominado α y otro de mayor longitud llamado β (Han et al., 2001; Han et al., 1993). *brlA β* es necesario para que se transcriba *brlA α* . En la delección de *veA* el transcrito mayoritario es *brlA α* , lo que podría desencadenar un aumento de la conidiación (Kato et al., 2003). Además de los efectos sobre *brlA*, también se conoce que VeA actúa positivamente sobre factores de transcripción reguladores del desarrollo sexual como NsdD y SteA (Kato et al., 2003), IsdA (Lee et al., 2001) y EsdC (Han et al., 2008; Jeong et al., 2000) entre otros.

Dentro del género *Aspergillus*, los homólogos de VeA pueden tener diferentes funciones. En *A. nidulans* y *A. flavus* la mutación en *veA* incrementa la reproducción

asexual (Duran et al., 2007). Por el contrario, en *Aspergillus parasiticus*, el mutante *veA* tiene reducida la conidiación (Calvo et al., 2004), y en *Aspergillus fumigatus* el mutante *veA* no tiene fenotipo, únicamente disminuye su conidiación en medio con nitrato, indicando que podría participar en el metabolismo del nitrógeno (Krappmann et al., 2005).

Además de estar implicado en el desarrollo de *Aspergillus*, VeA es necesario para la expresión de genes que regulan el metabolismo secundario (Calvo et al., 2004; Duran et al., 2007; Kato et al., 2003), como el gen del factor de transcripción AflR que activa el agrupamiento de genes ST (mycotoxina sterigmatocistina) (Lee et al., 2006; Payne et al., 1993). VeA también es necesaria para la producción de la penicilina en *Aspergillus nidulans* ya que se necesita para la expresión del gen *acvA*, gen clave para el primer paso de la síntesis de penicilina (Kato et al., 2003).

9.2 El complejo proteico VeA y su mecanismo de acción.

En *Aspergillus nidulans* existen varias proteínas de la familia velvet: VeA, VelB, VosA y VelC, y todas poseen un dominio Velvet (Bayram & Braus, 2012) (Figura 14).

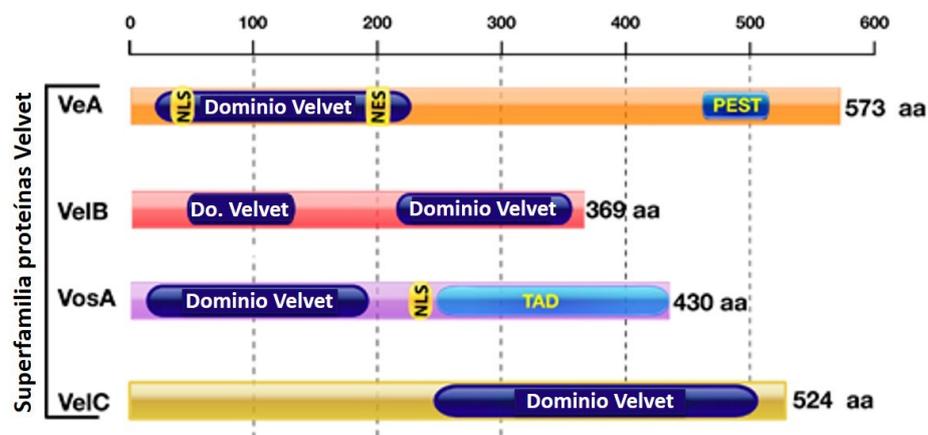


Figura 14. Esquema de los dominios de las proteínas pertenecientes a la familia Velvet, VeA, VelB, VosA, VelC existentes en *Aspergillus nidulans*. Modificado de Bayram & Braus (2012).

El mecanismo de acción de estos reguladores Velvet está muy estudiado en *Aspergillus nidulans*. VeA tiene una movilidad subcelular que depende de la luz. Gracias a la señal de localización nuclear (NLS) que tiene desde el aminoácido 28 al 44 y al transportador KapA, VeA es capaz de entrar en el núcleo en determinadas condiciones de luz y desarrollo. En oscuridad, VeA está principalmente localizado dentro del núcleo

formando heterodímeros con VelB que son necesarios para llevar a cabo la reproducción sexual. Por el contrario, bajo condiciones de luz está presente mayoritariamente en el citoplasma, asociado a cuerpos filamentosos (Stinnett et al., 2007). La formación de heterodímeros VeA-VelB se promueve mediante la fosforilación de la MAP Kinasa AnFus3. Al recibir las señales ambientales, el módulo MAPK de *A. nidulans* se separa de la membrana plasmática, viaja a la envoltura nuclear y libera AnFus3 en el núcleo. La fosforilación de VeA es vital para la regulación del desarrollo en hongos y del metabolismo secundario (Bayram et al., 2012). Además, VeA en el interior del núcleo funciona como un puente entre VelB y LaeA (Bayram et al., 2008). LaeA es una metiltransferasa implicada en la regulación del metabolismo secundario y en la formación de células Hülle que forman un tejido para nutrir los cuerpos fructíferos en crecimiento (Bok & Keller, 2004; Patananan et al., 2013; Sarikaya Bayram et al., 2010). La reducción del desarrollo sexual en luz se correlaciona con la disminución de los niveles del complejo nuclear VelB-VeA-LaeA, que se requiere para activar el desarrollo sexual y coordinar el metabolismo secundario (Bayram et al., 2008a) (Figura 15).

En el mutante *veA1* donde el NLS está truncado, VeA es incapaz de entrar en el núcleo ni en luz ni en oscuridad. En este mutante se ha observado también una menor producción de la mycotoxina ST en oscuridad que en el silvestre, lo que también coincide con la entrada de VeA en el núcleo (Stinnett et al., 2007). La degradación de VeA puede estar promovida por la luz mediante el motivo PEST. Por eso, bajo condiciones prolongadas de luz, podría salir al citoplasma para ser degradada (Calvo, 2008).

Otra proteína de la familia Velvet es VosA. Esta proteína también posee un dominio NLS y un dominio de activación transcripcional (TAD), por lo que también se encuentra en el núcleo presumiblemente para regular la transcripción (Ahmed et al., 2013; Ni & Yu, 2007). En los conidios, VosA forma un heterodímero con VelB que inhibe la germinación, activa la síntesis de trehalosa y la formación de la pared para la correcta maduración de la espora (Bayram et al., 2008; Park et al., 2012; Sarikaya Bayram et al., 2010). VelC interacciona con VosA y actúa como un regulador positivo de la reproducción sexual (Figura 15). El ARN mensajero de *velC* se acumula en la fase temprana de la reproducción sexual (Park et al., 2014). En el mutante *velC* se observa un aumento de la producción de conidios y una reducción de cleistotecios, y la sobreexpresión de *velC* los incrementa (Park et al., 2014)

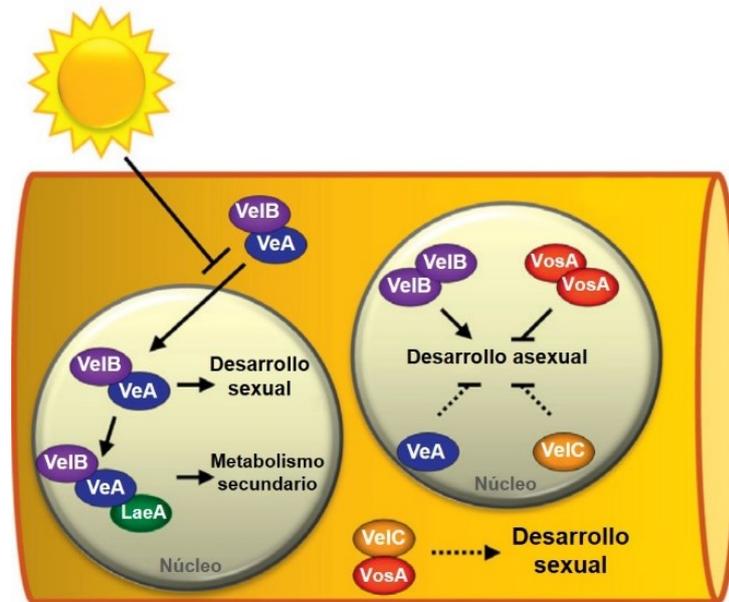


Figura 15. Mecanismo de acción de la proteína VeA de *Aspergillus nidulans* regulado por luz, localización celular e interacción con otras proteínas. En oscuridad el heterodímero VeB-VeA actúa en el núcleo activando la conidiación o desarrollo asexual, y uniéndose a LaeA para activar el metabolismo secundario. Modificado de (Park & Yu, 2012).

La sincronización del desarrollo sexual y el metabolismo secundario se lleva a cabo mediante la interpretación de señales lumínicas transmitidas a través de los fotorreceptores al complejo Velvet. Dentro del núcleo VeA interacciona con otras proteínas además de VeB y LaeA. De las primeras interacciones que se identificaron fue con el fitocromo FphA (Purschwitz et al., 2008), un receptor de luz roja implicado en la represión de la formación de estructuras sexuales e inductor de la conidiación (Blumenstein et al., 2005). También se conoce que LreA y LreB, receptores de luz azul y ortólogos de WC-1 y WC-2 en *Neurospora crassa*, forman parte del complejo Velvet (Purschwitz et al., 2008; Purschwitz et al., 2009). La mutación de la cisteína que permite la unión al cromóforo en FphA hace que el complejo pierda su integridad. Además, los niveles del complejo Velvet en el núcleo dependen de VeA, y de su unión al fitocromo (Purschwitz et al., 2009). La unión de LreA y LreB al complejo no ocurre directamente a través de VeA sino que estas proteínas se unen a través de FphA (Purschwitz et al., 2008) (Figura 16). En resumen, el complejo Velvet coordina la percepción de la luz con el desarrollo y el metabolismo secundario del hongo a través de la interacción de VeA con el fitocromo FphA el cual a su vez se une a las proteínas del complejo WC (LreA/LreB) a través de LreB. De esta manera, la luz se transmite a los fotorreceptores de luz azul y

roja controlando la actividad del complejo Velvet a través de la interacción (Purschwitz et al., 2008).

VeA también interacciona físicamente con el complejo VipC-VapB (metiltransferasas nucleares). El complejo VapA-VipC-VapB está ligado a la membrana mediante VapA manteniendo a las metiltransferasas VipC -VapB fuera del núcleo. Una vez que el heterodímero se libera entra en el núcleo y puede interaccionar con VeA inhibiendo su acumulación nuclear, lo que resulta en un menor desarrollo sexual y metabolismo secundario. El dímero VipC-VapB libre activa el programa de diferenciación asexual como parte de una vía de transducción de la señal de metiltransferasas (Sarıkaya-Bayram et al., 2014).

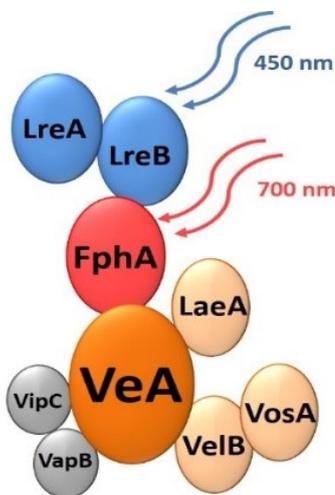


Figura 16. Complejo proteico Velvet en *Aspergillus nidulans*. VeA forma un complejo multiproteico donde se incluyen fotorreceptores, otras proteínas de la familia Velvet y metiltransferasas.

9.3 Velvet en *Neurospora crassa*

El gen *velvet* está muy conservado en algunas especies de hongos incluyendo *N. crassa* donde se denomina *ve-1*. Este gen codifica una proteína con alta similaridad a VeA de *A. nidulans* (49.5%) y es capaz de complementar su función en el mutante de delección de *veA*. Además en *N. crassa* existen también genes ortólogos a VelB, VosA y VelC (Bayram et al., 2008b). El gen *ve-1* contiene dos exones interrumpidos por un único intrón en la primera mitad del gen, y codifica una proteína de 554 aminoácidos (Bayram et al., 2008b).

En cuanto a la estructura de la proteína, VE-1 tiene un dominio PEST como VeA, pero no contiene el dominio NES ni el NLS que sí aparecen en VeA (Bayram et al., 2008b) (Figura 17).



Figura 17. Estructura y dominios conservados de la proteína VE-1 de *Neurospora crassa*. VE-1 tiene un dominio Velvet en la primera mitad de la proteína (azul oscuro), desde el aminoácido 34 al 225 y que incluye un dominio PEST (rectángulo violeta) desde el aminoácido 172 al 190.

El mutante de delección de *ve-1* muestra alteraciones en el desarrollo asexual con hifas aéreas más cortas y un mayor número de conidios. En el mutante *ve-1* el metabolismo secundario también está alterado ya que produce una menor cantidad de carotenos y necesita más intensidad de luz para iniciar la producción (Olmedo et al., 2010; comunicación personal Eva M. Luque).

La transcripción de *ve-1* en *N. crassa* es constitutiva en las diferentes etapas del desarrollo, al igual que *veA* de *A. nidulans* que también se expresa tanto en micelio vegetativo, asexual y sexual, lo que sugiere que puede actuar en una fase del desarrollo relativamente temprana (Bayram et al., 2008b; Kim et al., 2002). También se sabe que la transcripción de *ve-1* está activa durante el crecimiento bajo iluminaciones de diferentes longitudes de onda, aunque se observa un aumento bajo luz roja con respecto a la oscuridad (Bayram et al., 2008b). Estos resultados indican que *ve-1* no responde a la luz y que podría ser un represor de la conidiación, mientras que VeA depende de la luz y el desarrollo y es un represor de la conidiación y activador sexual en *Aspergillus nidulans* (Bayram et al., 2008b).

9.4 Velvet en otros hongos

Se han descrito y caracterizado genes homólogos a *veA* en otros hongos de diferentes géneros.

Fusarium verticillioides es un hongo filamentoso que causa daños en el tallo y la mazorca del maíz. Su genoma también posee un gen ortólogo a *veA*, llamado *Fvve1*. Estudios con mutantes de delección de este gen indican que FvVE1 podría estar implicada en el crecimiento de las hifas, su polaridad e hidrofobicidad, la conidiación y la integridad de la pared celular. Este gen, además, es incapaz de complementar a la estirpe de *A. nidulans* que carece del gen *veA*, lo que indica que deben tener funciones distintas (Li et

al., 2006). El metabolismo secundario está alterado en los mutantes *Fvvel1*, por lo que indica que en *Fusarium verticillioides* FvVE1 está implicado en la producción de fumonisinas (Desai et al., 2002; Gelderblom et al., 1988). Otra especie de *Fusarium* donde también se han estudiado las proteínas Velvet es *Fusarium fujikuroi*. Este hongo es capaz de producir metabolitos secundarios como giberelina, bikaverina y neurosporaxantina (Avalos et al., 2012; Kjaer et al., 1971; Lale & Gadre, 2016; Limón et al., 2010) y micotoxinas como fumonisina y fusarina C (Barrero et al., 1991; Proctor et al., 1995). En *F. fujikuroi* existen los genes *Ffvel1*, *Ffvel2* y *Fflae1* que son los correspondientes a *veA*, *velB* y *laeA* de *Aspergillus nidulans* (Wiemann et al., 2010b). FfVel1 y FfLae1 están localizadas en el núcleo e interaccionan físicamente. El mutante $\Delta Ffvel1$ presenta defectos en el desarrollo como hifas aéreas más cortas y un incremento de la pigmentación en oscuridad. El estudio de mutantes de delección de los genes *Ffvel1* y *Fflae1* indica que el complejo Velvet puede actuar simultáneamente como regulador positivo del metabolismo secundario activando la síntesis de giberelinas, fumonisinas y fusarinas; y como regulador negativo reprimiendo la síntesis de bikaverinas, y que ambos componentes afectan a la conidiación y a la virulencia de *F. fujikuroi* (Wiemann et al., 2010b). Además, la proteína Velvet FfVel2 tiene funciones similares a FfVel1 en la conidiación, el metabolismo secundario y la virulencia. Los estudios de complementación de mutantes de componentes del complejo Velvet entre *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* sostienen un origen ancestral para este complejo, que ha sufrido una divergencia en funciones específicas que intervienen en el desarrollo y en el metabolismo secundario (Wiemann et al., 2010b).

Otro hongo en el que las proteínas Velvet son importantes reguladores es *Trichoderma reesei*, que es el productor industrial de celulasas y hemicelulasas para procesos de biorrefinería (Kubicek, 2012; 2013). Su producción es dependiente de la función de la proteína metiltransferasa LAE1, ortólogo de *LaeA* de *Aspergillus nidulans* donde forma parte del complejo de proteínas VELVET (Seiboth et al., 2012). *T. reesei* posee una proteína ortóloga a *VeA* llamada VEL1 (Aghchegh et al., 2014). La delección del locus *vell* de *T. reesei* provoca una pérdida de la conidiación independiente de la luz y defectos en la formación de peritecios. La delección de *vell* también altera la morfología de las hifas, lo que conlleva a una disminución de la tasa de crecimiento. Estas alteraciones en el crecimiento del hongo afectan negativamente a la producción de celulasas y xilanasas (Aghchegh et al., 2014). Estos datos confirman que VEL1 controla el desarrollo sexual y asexual independientemente de la luz y es también esencial para la

expresión del gen de la celulasa. Los resultados sugieren que LAE1 forma parte del complejo Velvet, ya que ambas proteínas son necesarias para la producción de celulasas (Aghcheh et al., 2014).

En el genoma de *Botrytis cinerea* también existen genes ortólogos a los genes *velvet*. Este hongo comúnmente conocido como el hongo del moho gris, es un patógeno vegetal importante (van Kan, 2006; Williamson et al., 2007). Las poblaciones silvestres se caracterizan por su variabilidad respecto a la morfología, el modo de reproducción (formación de conidios o esclerocios), producción de metabolitos secundarios y la virulencia. El gen *bcvell*, que codifica el ortólogo de *veA* de *Aspergillus nidulans*, está implicado en la regulación de la diferenciación dependiente de la luz, la formación de ácido oxálico y la virulencia (Schumacher et al., 2015). Además de *bcvell*, *B. cinerea* también tiene genes que codifican para la metiltransferasa BcLAE1 y la proteína BcVEL2, ortólogos de *LaeA* y *VelB* de *A. nidulans*. El estudio de los mutantes en los genes *bcvell* y *bclae1* muestran la pérdida de la capacidad de producir ácido oxálico, de colonizar el tejido huésped y de formar esclerocios; además de alteraciones en la hifas y la formación de conidios. Análisis genómicos de estos mutantes indican que algunos genes están menos expresados en ambos mutantes como por ejemplo los que codifican enzimas relacionadas con síntesis y regulación de metabolitos secundarios, proteasas y otras enzimas reguladoras del desarrollo, lo que podría explicar reducción de virulencia (Schumacher et al., 2015).

Penicillium chrysogenum es el productor industrial del antibiótico penicilina, además de ser un excelente modelo de hongo para estudiar los mecanismos moleculares de regulación de expresión de genes del metabolismo secundario (García-Rico et al., 2008; Liras & Martín, 2009). En *P. chrysogenum* existen también genes ortólogos de *laeA* y *veA* de *Aspergillus nidulans*, llamados *PclaeA* y *PcvelA* respectivamente. Estos genes actúan como reguladores positivos de la producción de penicilina (Hoff et al., 2010; Kosalková et al., 2009). La silenciación o delección del gen *PclaeA* tiene un fuerte efecto negativo sobre la biosíntesis de penicilina y su sobreexpresión aumenta dicha producción. Además, estos mutantes también presentan menor síntesis de pigmentos y menor producción de conidios indicando el papel de *PcLaeA* en el desarrollo del hongo además del metabolismo secundario (Kosalková et al., 2009). Los mutantes en el gen *PcvelA* han perdido la dependencia de la luz en la regulación de la conidiación, presentado el mismo número de conidios en luz y en oscuridad (Hoff et al., 2010). Además, se han descrito otros tres componentes del complejo Velvet en *P. chrysogenum*: *PcVelB*, *PcVelC* y

PcVosA (Kopke et al., 2013). Todos estos componentes interactúan entre sí y tienen también un papel en la regulación de la síntesis de penicilina y el desarrollo del hongo. PcVelB al contrario que PcVelA y PcLaeA, reprime la síntesis de penicilina. Además, PcVelB y PcVosA promueven la conidiación, mientras que PcVelC tiene un efecto inhibitorio. Otros análisis genéticos mostraron que la formación de esporas dependiente de la luz depende no sólo de PcVelA sino también de PcVelB y PcVosA (Kopke et al., 2013). La regulación mediada por el complejo PcLaeA-Velvet tiene gran importancia para la mejora de la producción de metabolitos secundarios en *P. chrysogenum* (Martín, 2016).

El gen *velvet* de *Acremonium chrysogenum* se llama *AcveA* (Dreyer et al., 2007) y está implicado en la morfología de las hifas, más concretamente en la fragmentación de las hifas, en la formación temprana de las artrosporas y en la hiperramificación de las puntas de las hifas (Dreyer et al., 2007). Estas alteraciones en el mutante pueden remediarse con la adición de estabilizadores osmóticos, lo que indica una alteración de la pared. Este hongo es el mayor productor del antibiótico cefalosporina C, relacionado estructuralmente con las penicilinas (Abraham & Newton, 1961; Adinarayana et al., 2003; Bayer et al., 1989; Lee et al., 2017; Luo et al., 2013). La mutación en el gen *AcveA* conlleva a una reducción de la expresión de los genes de biosíntesis de cefalosporina y por tanto una reducción de sus niveles (Dreyer et al., 2007) por lo que, como en el caso de *Aspergillus nidulans* y la penicilina, el gen *velvet* es necesario para la normal producción del antibiótico en *Acremonium chrysogenum* (Kato et al., 2003).

OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis doctoral ha sido investigar el papel del complejo Velvet en *Neurospora crassa*.

Por ello, se propusieron los objetivos que se enumeran a continuación:

1. Caracterizar el fenotipo de *Neurospora crassa* en ausencia de la proteína VE-1 y su respuesta a la luz.
2. Investigar la regulación por luz del gen *ve-1* y la proteína VE-1 en micelio vegetativo, sus posibles efectos sobre la regulación de otros genes conocidos, y su localización.
3. Investigar la regulación del gen *ve-1* y la proteína VE-1 en distintas etapas del desarrollo asexual del hongo.
4. Descubrir e investigar las proteínas claves en la ruta de degradación de VE-1 y las condiciones en las que se lleva a cabo dicha degradación.

RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica del mutante de delección del gen *ve-1*, $\Delta ve-1$.

1.1 Producción del carotenoide neurosporaxantina en conidios.

Una de las características principales del hongo *Neurospora crassa* es la producción de carotenoides, un pigmento anaranjado llamado neurosporaxantina (Avalos et al., 2012). Este pigmento puede ser producido en micelio sumergido, en hifas aéreas y en los conidios. En micelio vegetativo es necesaria una cierta intensidad de luz para que comience la carotenogénesis, como puede observarse en la figura 1.1 (B). Por el contrario la síntesis de carotenos en los conidios es independiente de la luz y del WCC, ya que tanto los conidios producidos en oscuridad total como los de los mutantes en los genes *wc-1* o *wc-2* son anaranjados. El mutante $\Delta ve-1$ produce menor cantidad de carotenos y necesita más intensidad de luz para activar la producción en micelio vegetativo. (Olmedo et al., 2010; comunicación personal Eva M. Luque).

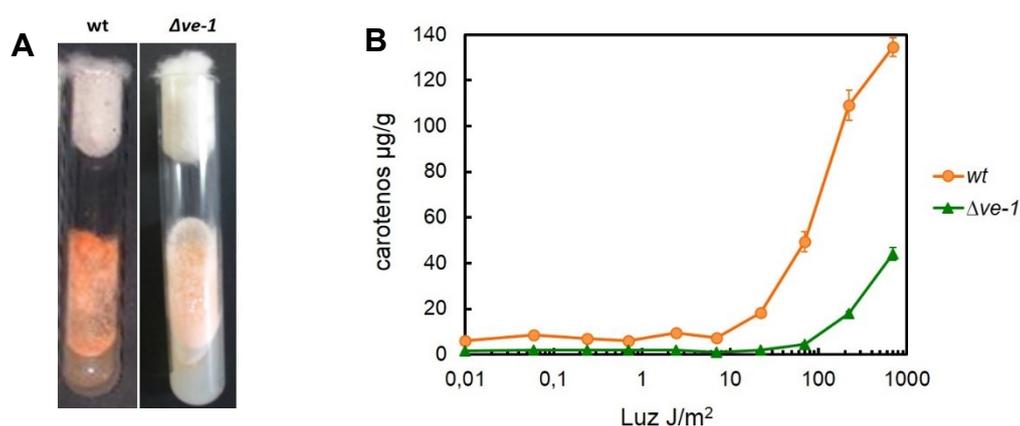


Figura 1.1: Producción de carotenos en el mutante $\Delta ve-1$ y en la estirpe silvestre (wt). **A:** Fenotipo de la estirpe mutante $\Delta ve-1$ creciendo en un tubo de agar inclinado. **B:** Cuantificación de los carotenos producidos bajo distintas intensidades de luz realizada por Eva M. Luque Fobelo. Los carotenos fueron extraídos de micelios crecidos en oscuridad continua durante 48 horas o expuestos 2 minutos a distintas intensidades de luz y posteriormente crecidos de nuevo en oscuridad a 8°C. Los datos muestran la media y el error estándar de cinco experimentos independientes.

Para investigar si este déficit en la producción de neurosporaxantina se mantenía en otras etapas del ciclo de vida de *Neurospora crassa* se cuantificó la producción de carotenos en conidios tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe $\Delta ve-1$. Como se observa en la figura 1.2, la cantidad de carotenos en los conidios de la estirpe silvestre casi alcanza los 2500 μg/g de masa seca, mucho mayor que en micelio vegetativo donde no se superan los 140 μg/g de masa seca. Los resultados también muestran que en el mutante $\Delta ve-1$ la producción de carotenos en los conidios al igual que en micelio es menor que en la estirpe silvestre, tanto en condiciones de luz como en oscuridad. Estos resultados

indican que la proteína VE-1 también es necesaria para alcanzar los niveles máximos de síntesis de neurosporaxantina en los conidios de *Neurospora crassa*.

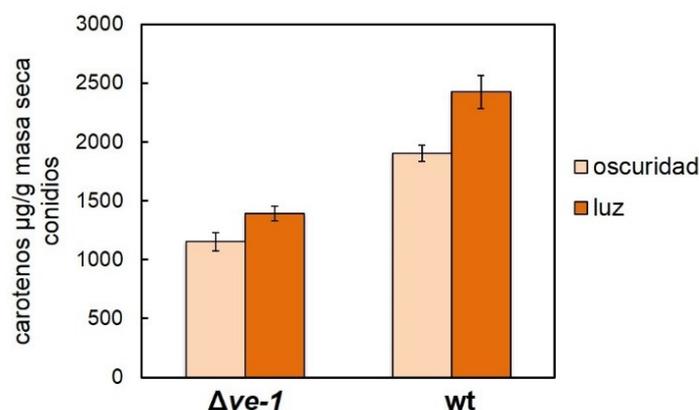


Figura 1.2: Cuantificación de carotenos ($\mu\text{g/g}$ masa seca) en conidios en el mutante $\Delta ve-1$ y en la estirpe silvestre (wt). Las estirpes fueron cultivadas bajo luz blanca continua o mantenidas en oscuridad durante tres días a 30°C en Vogel sólido. Los datos de la cantidad media de carotenos fueron obtenidos de tres experimentos independientes; indicando el error estándar de los tres experimentos.

1.2 Longitud de las hifas aéreas.

Cuando distintos estímulos ambientales como la desecación o la falta de nutrientes inducen la macroconidiación, el micelio de *Neurospora* es capaz de crecer formando hifas aéreas que se separan del sustrato (Springer, 1993). La ausencia de la proteína VE-1 da lugar a un crecimiento menor de estas hifas (Bayram et al., 2008b). Con el fin de conocer si esta disminución en la longitud de las hifas en el mutante es dependiente de la luz y del WCC, se estudió dicho crecimiento bajo condiciones de luz continua y oscuridad y en ausencia de la proteína WC-1.

Los resultados de estos experimentos muestran que tanto en la estirpe silvestre como en el mutante $\Delta wc-1$ no existen diferencias en el crecimiento de las hifas aéreas entre luz y oscuridad. Por el contrario el mutante $\Delta ve-1$ presenta un acortamiento de las hifas aéreas únicamente bajo condiciones de luz, ya que en oscuridad alcanzan una longitud similar a la de la estirpe silvestre. Para investigar el papel del WCC sobre la regulación por luz del crecimiento de las hifas aéreas creamos un doble mutante $\Delta wc-1 \Delta ve-1$ mediante cruzamiento sexual entre las estirpes $\Delta ve-1 (matA)$ y $\Delta wc-1 (mata)$. En ausencia de estos dos genes el defecto de crecimiento en luz se recupera casi totalmente, lo que sugiere que el fenotipo observado en luz en $\Delta ve-1$ podría deberse directa o indirectamente a la proteína

WC-1 (Figura 1.3). Nuestros resultados sugieren que la luz reprime el crecimiento de las hifas aéreas, aunque este efecto represor sólo se observa en ausencia de VE-1.

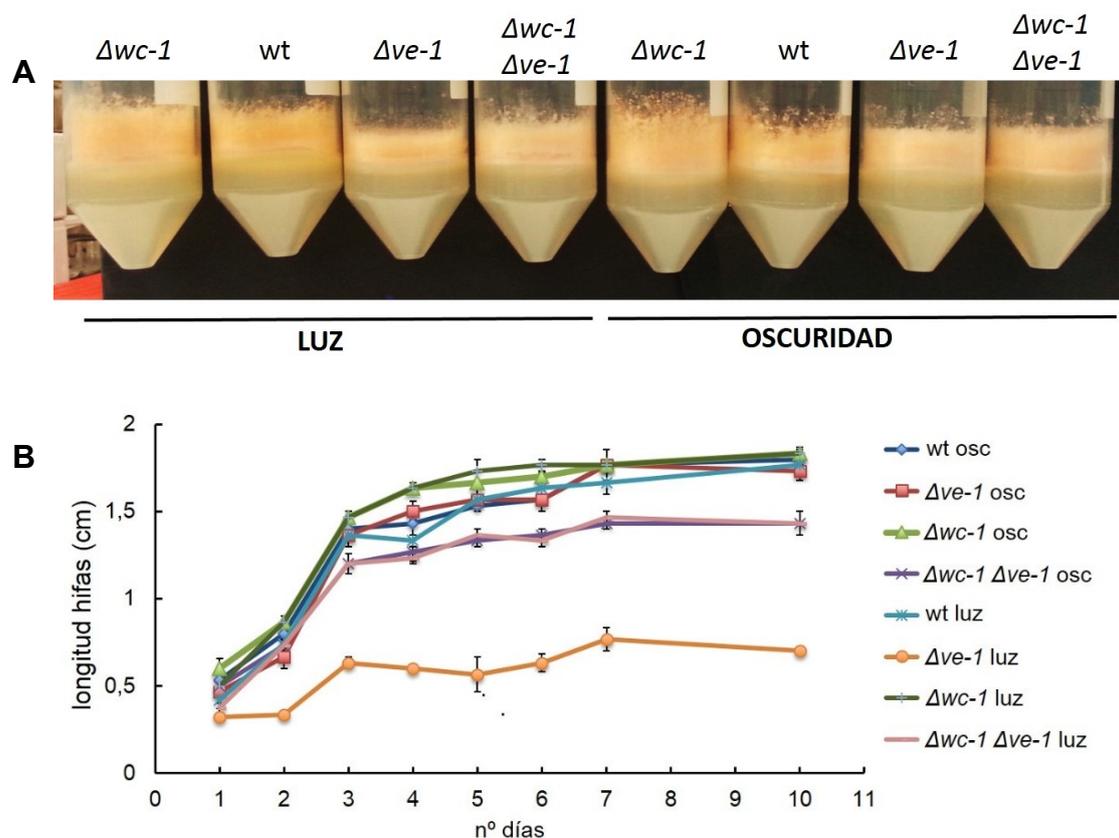


Figura 1.3: **A:** Longitud de la hifas aéreas después de tres días de crecimiento en el mutante $\Delta ve-1$, el doble mutante $\Delta wc-1 \Delta ve-1$ y la estirpe silvestre (wt). **B:** Cuantificación del crecimiento de las hifas aéreas. Las estirpes fueron cultivadas bajo luz blanca o mantenidas en oscuridad de 1 a 10 días a 30°C en Vogel sólido. Se muestra la media y el error estándar de cuatro experimentos independientes.

1.3 Producción de conidios de la estirpe $\Delta ve-1$.

En otros hongos como *Aspergillus nidulans* la conidiación está regulada por la luz que es necesaria para la producción de esporas. La mutación en el gen *veA* de *Aspergillus nidulans* permite la producción de conidios en oscuridad (Mooney & Yager, 1990). Para aclarar si este fenómeno ocurre también en *Neurospora crassa*, se cuantificó la producción de conidios tanto en luz como en oscuridad. Como se muestra en la figura 1.4A *Neurospora* no necesita luz para la producción de conidios ni en la estirpe silvestre ni en el mutante $\Delta ve-1$ y la ausencia de la proteína VE-1 no aumenta el número de conidios sino que por el contrario la disminuye (Figura 1.4A). Únicamente tras 24 horas de crecimiento se observa un pequeño aumento en el número de conidios del mutante $\Delta ve-1$ en oscuridad (Figura 1.4B), lo que indica que VE-1 no es esencial para la conidiación en

Neurospora crassa pero actúa como un represor de la conidiación en la primeras 24 horas de cultivo.

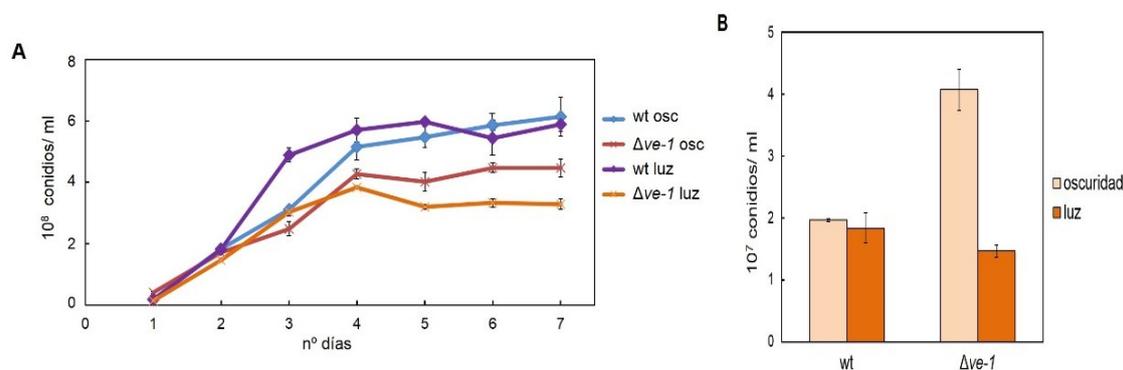


Figura 1.4: Cuantificación del número de conidios en la estirpe silvestre (wt) y el mutante $\Delta ve-1$ bajo condiciones de luz continua y oscuridad. Las estirpes fueron cultivadas a 30°C, los conidios se recogieron y contaron al microscopio. Los datos muestran la media de cuatro réplicas independientes; indicando el error estándar de los cuatro experimentos. **A.** Número de conidios / ml de uno a siete días de crecimiento. **B.** Número conidios /ml a las 24 horas de crecimiento.

1.4 Reproducción sexual en el mutante $\Delta ve-1$

En otras especies de hongos los mutantes que carecen de la proteína Velvet tienen afectada su reproducción sexual (Aghcheh et al., 2014; Mooney & Yager, 1990). La luz no es un elemento imprescindible en la reproducción sexual de *N. crassa*, ya que es capaz de llevarse a cabo tanto en luz como en oscuridad aunque la luz azul promueve el desarrollo de los protoperitecios (Degli-Innocenti & Russo, 1984). Para comprobar si VE-1 es necesario para formar las estructuras sexuales cruzamos las estirpes $\Delta ve-1$ (*matA*) y $\Delta ve-1$ (*matA*) en luz continua y en oscuridad. Transcurridos diez días, que es el tiempo necesario para formar estructuras sexuales, observamos que al igual que la estirpe silvestre, $\Delta ve-1$ es capaz de formar peritecios (Figura 1.5). En cuanto a liberación de las ascosporas a través del ostiolo, a los 14 días de iniciar el cruzamiento la estirpe silvestre fue capaz de liberarlas mientras que el mutante sólo liberó las ascosporas tras unos 25 días, pero en mucha menor cantidad que el silvestre. También se observa que los peritecios en el mutante $\Delta ve-1$ están recubiertos de muchas más hifas que la estirpe silvestre lo que puede dificultar la liberación de las ascosporas (Figura 1.5).

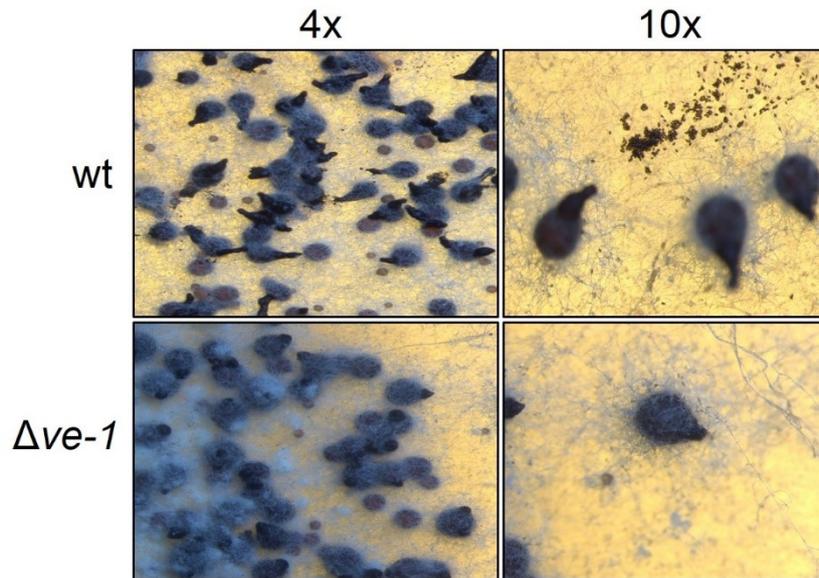


Figura 1.5. Estructuras sexuales en la estirpe silvestre (wt) y en el mutante $\Delta ve-1$. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio estereoscópico Leica M125.

2. Etiquetado de la proteína VE-1 para su detección mediante hibridación de Western.

La proteína VE-1 tiene 554 aminoácidos y 62 kDa (Bayram et al., 2008). El estudio de la acumulación de VE-1 en diferentes mutantes y bajo diferentes condiciones de crecimiento podría ayudar a aclarar la función de esta proteína en el hongo *Neurospora crassa*. Para ello hemos generado una versión de la proteína VE-1 fusionada a la etiqueta 3xFLAG siguiendo el método descrito por (Honda & Selker, 2009) y que se describe con más detalle en el apartado de materiales y métodos de esta Tesis. Este método se basa en la generación de un casete “knock-in” que permite la unión de la etiqueta al extremo C-terminal de la proteína y que incluye el gen de resistencia a higromicina (*hph*). Una vez obtenido el casete, transformamos por electroporación conidios de una estirpe mutante del gen *mus-52* creada mediante integración del gen de resistencia a glufosinato (*bar*), y que está afectada en la recombinación no homóloga. Los transformantes resistentes a higromicina deben tener la fusión *ve-1::3xFLAG* que reemplaza el gen original en heterocariosis ya que los conidios son multinucleados y sólo algunos núcleos habrán incluido el casete. Para obtener las estirpes en homocariosis se cruzan sexualmente los transformantes donde se ha detectado VE-1::3xFLAG por hibridación de Western con la estirpe silvestre. El producto de esta reproducción sexual, las ascosporas, sí son uninucleadas y por tanto las estirpes resultantes tendrán todo su material genético con la versión del gen *ve-1::3xFLAG*. Seis descendientes se analizaron mediante PCR usando

un oligonucleótido del gen *ve-1* y de una zona 1,3 kb tras el codón STOP para poder amplificar tanto el gen como el casete de etiquetado y la resistencia (Figura 2.1A). Como se observa en la figura 2.1B el descendiente 4 y el descendiente 6 dieron el resultado esperado para la fusión *ve-1::3xFLAG*. Una vez seleccionados estos dos descendientes se comprobó mediante hibridación de Western que la proteína se expresaba y que podía ser detectada mediante un anticuerpo anti-FLAG. La etiqueta FLAG tiene 8 aminoácidos: DYKDDDDK (aproximadamente 1 kDa), por lo que la versión de VE-1 etiquetada, VE-1::3xFLAG, debe tener aproximadamente 68 kDa (Figura 2.1C).

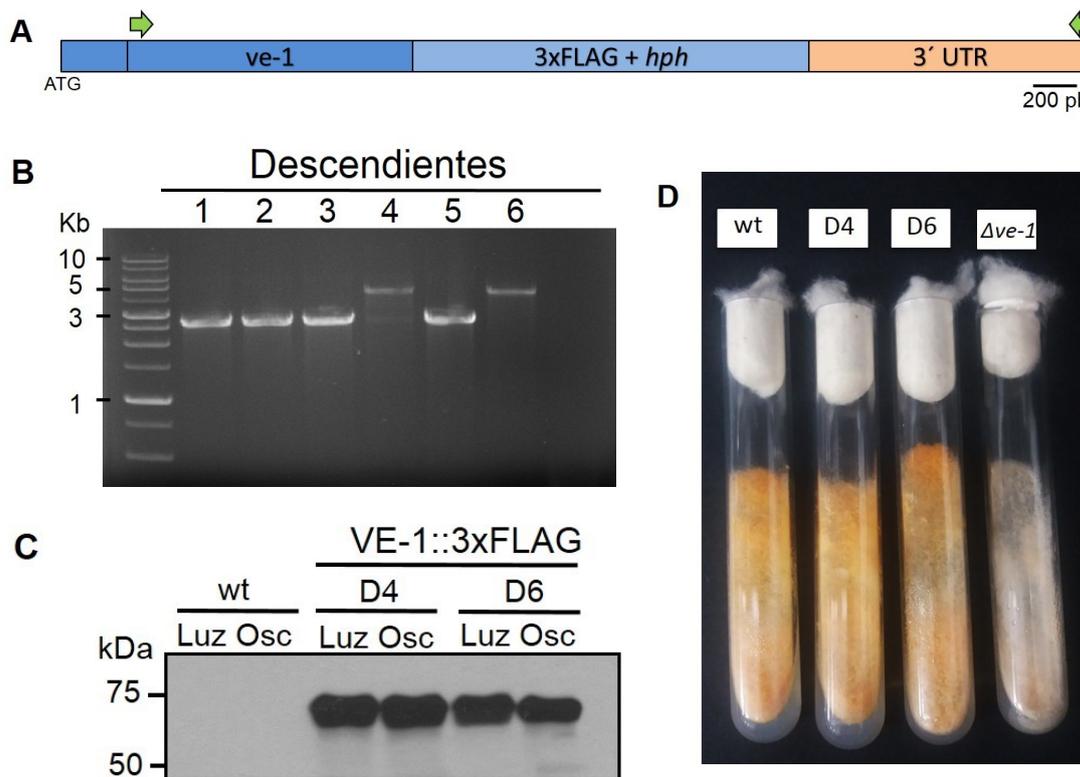


Figura 2.1. Selección de las estirpes VE-1::3xFLAG homocarióticas. **A.** Esquema de la zona amplificada (aproximadamente 4,5 kb) para la comprobación de los descendientes del cruce entre la estirpe silvestre y transformantes *ve-1::3xFLAG*. **B.** Amplificación mediante PCR del casete de transformación usando los oligonucleótidos indicados como flechas verdes en la Fig.A. **C.** Detección de la proteína VE-1::FLAG mediante hibridación con un anticuerpo anti-FLAG. Las estirpes se cultivaron en Vogel líquido 24 horas a 34°C en oscuridad (Osc) y se iluminaron durante 30 minutos (Luz). **D.** Comparación fenotípica entre la estirpe silvestre, estirpes VE-1::3xFLAG (D4 y D6) y el mutante $\Delta ve-1$. Las estirpes fueron cultivadas en Vogel Sólido a 30°C durante cuatro días en luz.

Una vez obtenidas las estirpes VE-1::3xFLAG en homocariosis se analizó fenotípicamente para comprobar que su fenotipo era igual al de la estirpe silvestre y que la etiqueta no había generado una proteína no funcional (Figura 2.1D). Todos los descendientes cultivados en tubos de agar con Vogel sólido tenían un fenotipo silvestre. Además caracterizamos el tipo sexual (*mata* o *mataA*) de las estirpes etiquetadas

cruzándolas sexualmente, y el fondo genético (wt o *mus52*) mediante la resistencia a glufosinato (Figura 2.2). Esta caracterización fenotípica nos será útil posteriormente para poder usarlas en la obtención mediante cruzamiento sexual o transformación de nuevas estirpes que incluyan la proteína VE-1::3xFLAG. El descendiente 4 (D4) es del tipo sexual *mata* y tenía la mutación *mus52* ya que era capaz de crecer en presencia de glufosinato; y el descendiente 6 (D6) es del tipo sexual *matA* y carece de la mutación *mus52*.

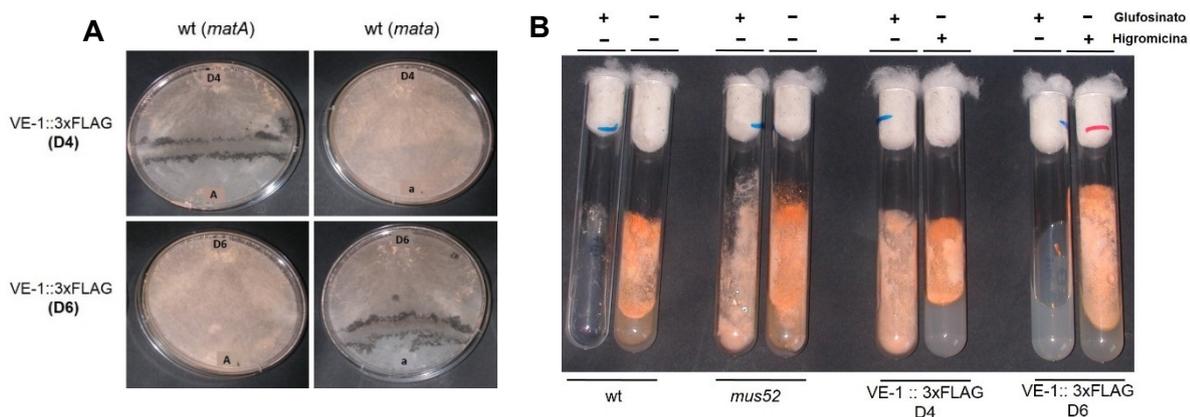


Figura 2.2. Caracterización de las estirpes etiquetadas VE-1::3xFLAG. **A.** Cruzamiento sexual entre estirpes VE-1::FLAG (D4 y D6) y la estirpe silvestre wt (*mata* y *mata*) en medio de cruce durante 10 días. **B.** Determinación del fondo genético mediante la resistencia a glufosinato. Las estirpes con fondo genético *mus-52::bar* son resistentes a glufosinato. Las estirpes etiquetadas VE-1::3xFLAG son resistentes a higromicina.

3. Regulación por la luz del gen *ve-1* y la proteína VE-1 de *Neurospora crassa* en micelio vegetativo.

3.1 Acumulación de VE-1 en *Neurospora crassa* tras exposiciones a la luz.

En *Neurospora crassa* la iluminación del micelio activa el mecanismo de acción del WCC y, por tanto, la transcripción de genes fotoinducibles. Para poder conocer si la luz afecta a la regulación del gen *ve-1* y la proteína codificada por dicho gen, se estudió la transcripción del gen *ve-1* y la acumulación de la proteína tras diferentes tiempos de iluminación. Para el estudio de la proteína se construyó la estirpe con VE-1 unida a una etiqueta 3xFLAG, VE-1::3xFLAG descrito en el apartado 2 de los resultados de esta tesis.

Como se observa en la figura 3.1, existe transcripción de *ve-1* en oscuridad. A los 30 minutos de iluminación se observa un pequeño aumento en la acumulación de ARNm de *ve-1* que desaparece tras largas exposiciones a la luz (300 min). La detección de ARNm en oscuridad podría indicar que la activación del gen *ve-1* no depende del WCC. Para confirmar ésta hipótesis y estudiar aún más si el mecanismo de fotoinducción/foto-

adaptación del WCC influía en la regulación de *ve-1*, analizamos su transcripción en un mutante $\Delta wc-1$ y en un mutante puntual del gen *vvd*^{SS-692} alterado en la fotoadaptación. Como control de gen fotoinducible estudiamos la fotoactivación de la transcripción del gen *con-10* que además es dependiente de WCC (Olmedo et al., 2010). En oscuridad no se detecta ARNm de *con-10*, pero su acumulación aumenta tras 30 minutos de luz y disminuye tras tiempos largos de iluminación por la fotoadaptación (Figura 3.1). La fotoactivación y la fotoadaptación de *con-10* se alteraron en ausencia de proteínas funcionales WC-1 y VVD respectivamente. Por el contrario, observamos un aumento en la acumulación del ARNm de *ve-1* en ausencia de WC-1, lo que nos permite concluir que *ve-1* no es un gen fotoinducible pero que sí está reprimido por WC-1.

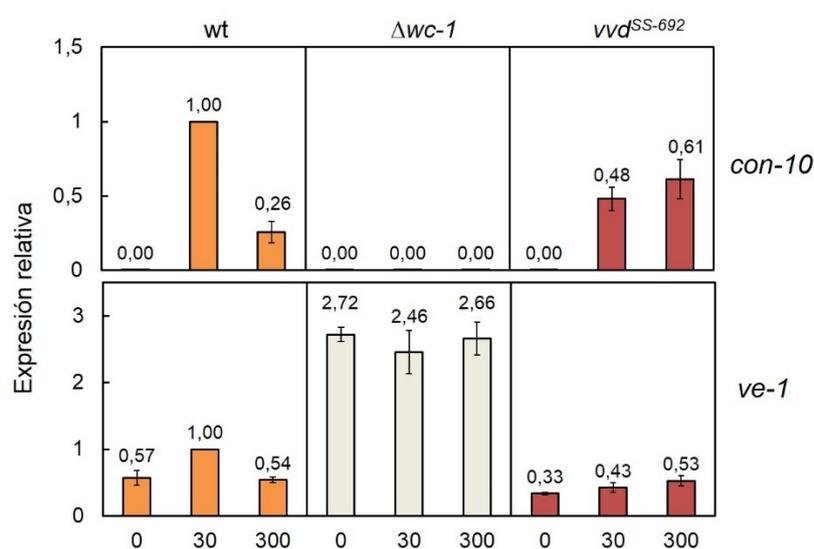


Figura 3.1: Expresión relativa del gen *ve-1* y del gen *con-10* a distintos tiempos de luz y en distintas estirpes. Las estirpes fueron cultivadas en Vogel líquido 48 horas a 22 ° C en oscuridad y posteriormente expuestas a diferentes tiempos de luz. Se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa para medir la expresión relativa en tres experimentos independientes. Los niveles de ARN para cada gen se normalizaron con el ARN de la tubulina (*tub-2*) para corregir errores de muestreo y éstos fueron después normalizados con el resultado del ARN de las muestras expuestas a 30 minutos de luz. Los datos muestran la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

Para investigar la acumulación de la proteína VE-1 se extrajeron proteínas totales de micelio vegetativo cultivado en oscuridad y/o iluminados durante distintos tiempos. Posteriormente fueron separadas por electroforesis, transferidas a una membrana e incubadas con un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta FLAG. Como muestra la figura 3.2 se detecta VE-1 en oscuridad, hay un leve aumento tras 15 y 30 min de luz y vuelve a disminuir la acumulación tras tiempos más largos de iluminación. Para comprobar si había una alteración en la acumulación de la proteína en los mutantes

$\Delta wc-1$ y vvd^{SS-692} se hicieron cruzamientos sexuales entre la estirpe etiquetada VE-1::3xFLAG (*matA*) con $\Delta wc-1$ (*matA*); y VE-1::3xFLAG (*matA*) con vvd^{SS-692} (*matA*). Tanto en el mutante $\Delta wc-1$ como en el vvd^{SS-692} la acumulación de la proteína VE-1 no difiere con la del silvestre, lo que confirma que en micelio vegetativo *ve-1* no tiene una regulación por la luz. El incremento de unas dos veces en la acumulación de ARNm de *ve-1* que observamos en el mutante $\Delta wc-1$ (Figura 3.1) no da lugar a un incremento en la acumulación de la proteína VE-1 (Figura 3.2).

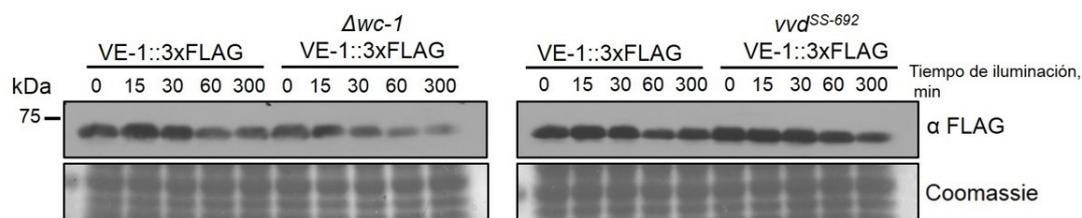


Figura 3.2. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo anti-FLAG en extractos celulares de proteínas de las distintas estirpes. Las estirpes fueron cultivadas en medio Vogel mínimo 48 horas a 22 ° C en oscuridad y posteriormente expuestas a diferentes tiempos de luz. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

3.2 Efecto de la ausencia de VE-1 sobre la transcripción de genes fotoinducibles.

En *Neurospora crassa* existen una serie de genes cuya transcripción se activa por la luz, por lo que se denominan genes fotoinducibles (Chen et al., 2009; Wu et al., 2014). Entre ellos están los genes implicados en la ruta de carotenogénesis: genes albinos (*al-1*, *al-2*, *al-3*) y el gen *cao-2*, el propio gen *wc-1* cuyo producto formará parte el WCC, el gen *vvd* encargado de la fotoadaptación de la transcripción, el gen *frq* principal componente del reloj circadiano, y el gen *con-10* que además se induce por desarrollo asexual.

Como hemos observado en resultados anteriores, el gen *ve-1* no tiene el patrón de acumulación de ARNm propio de un gen fotoinducible por el WCC pero en ausencia de WC-1 su transcripción está desregulada, por lo que es interesante el estudio de la transcripción de genes fotoinducibles en ausencia de la proteína VE-1 en micelio vegetativo. Para ello cultivamos la estirpe silvestre y el mutante $\Delta ve-1$ en oscuridad e iluminamos distintos tiempos. Los resultados muestran un descenso de la transcripción

de un grupo de genes fotoinducibles, pero conservando su cinética de fotoinducción/fotoadaptación (Figura 3.3).

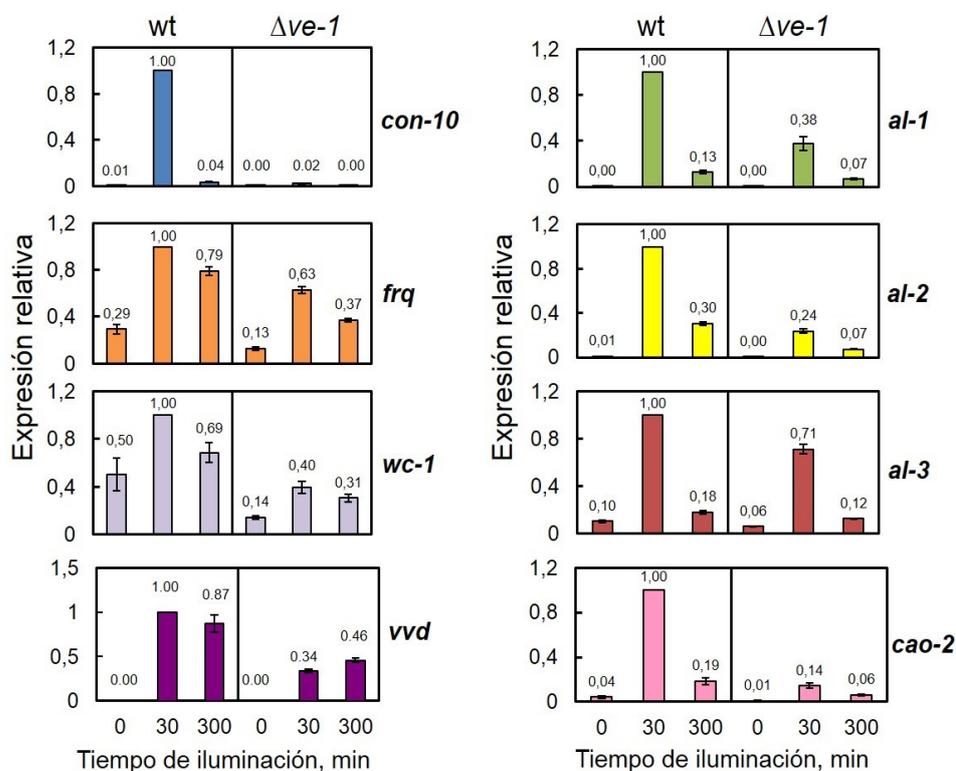


Figura 3.3. Expresión relativa de distintos genes fotoinducibles en la estirpe silvestre y mutante $\Delta ve-1$. Las estirpes fueron cultivadas en medio Vogel mínimo 48 horas a 22 °C en oscuridad y posteriormente expuestas diferentes tiempos de luz. Se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa para medir la expresión relativa en tres experimentos independientes. Los niveles de ARN para cada gen se normalizaron con el ARN de la tubulina (*tub-2*) para corregir errores de muestreo y éstos fueron después normalizados con el resultado del ARN de las muestras expuestas a 30 minutos de luz. En el gráfico se muestran la media y el error estándar de los tres experimentos.

La fotoinducción de *wc-1* es menor en el mutante $\Delta ve-1$ que en la estirpe silvestre. Es posible que esta menor acumulación de ARNm de *wc-1* de lugar a una disminución de la proteína WC-1 y que sea la responsable de la disminución de la fotoactivación de los genes estudiados en la estirpe $\Delta ve-1$. Para determinar si esa bajada se debe directamente a un descenso de la proteína WC-1 en el mutante $\Delta ve-1$ realizamos experimentos de hibridación de Western para detectar la acumulación de WC-1. En la figura 3.4 se observa que no existen cambios entre la acumulación de WC-1 en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta ve-1$. Tampoco se observan alteraciones en el patrón de fosforilación, por lo que la disminución de la activación de los genes fotoinducibles no es debida a una correlación entre la bajada de la transcripción del gen *wc-1* y la acumulación de WC-1 en el mutante $\Delta ve-1$, sino a un efecto directo de la falta de VE-1 sobre la activación génica por luz.

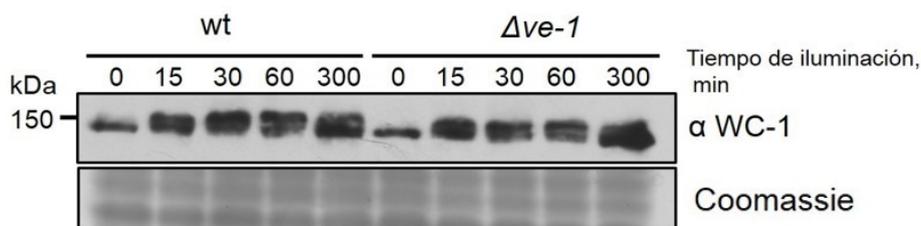


Figura 3.4 Detección de la proteína WC-1 con anticuerpo anti- WC-1 en lisados celulares de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta ve-1$. Las estirpes fueron cultivadas en medio Vogel mínimo 48 horas a 22 °C en oscuridad y posteriormente expuestas diferentes tiempos de luz. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

Otra posible causa de la alteración de la fotoactivación génica en estos genes podría ser que VE-1 y WCC interaccionaran bajo determinadas condiciones de luz. Para ello realizamos una inmunoprecipitación de VE-1 e hibridamos además de con el anticuerpo anti-FLAG con un anticuerpo anti-WC-1 para ver si se detectaban ambas proteínas en la fracción inmunoprecipitada. La estirpe silvestre y la estirpe VE-1::3xFLAG se cultivaron en agitación a 30°C durante 48 horas en medio líquido. Como muestran los resultados (figura 3.5) bajo estas condiciones WC-1 y VE-1 no interaccionan, ya que en la fracción inmunoprecipitada (IP) únicamente se detecta acumulación de VE-1 y no de WC-1.

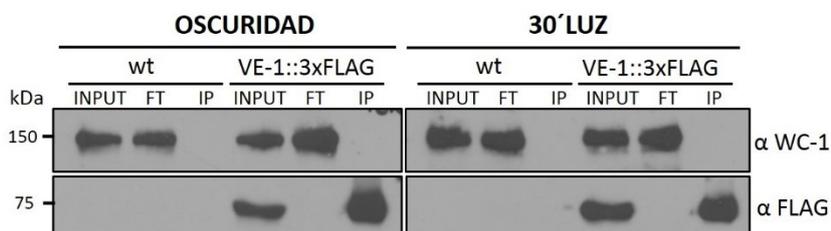


Figura 3.5 Inmunoprecipitación de la proteína VE-1 en la estirpe etiquetada. Detección de la proteína VE-1 con un anticuerpo anti-FLAG y de la proteína WC-1 con anticuerpo anti- WC-1 en distintas fracciones de la inmunoprecipitación: extracto total (INPUT), extractos de proteínas que no se unen al anticuerpo (FT) y fracción inmunoprecipitada o extracto de proteínas que se unen al anticuerpo (IP). Las estirpes fueron cultivadas en medio Vogel mínimo 48 horas a 30 °C en oscuridad y posteriormente expuestas a diferentes tiempos de luz.

Estos resultados sugieren que VE-1 es necesaria para la regulación de la activación de la transcripción por luz de manera independiente del WCC.

3.3 Localización subcelular de VE-1.

Una proteína puede entrar en el núcleo gracias a un dominio de señalización nuclear (NLS) o mediante el transporte asociada a otra proteína que lo tenga. Para investigar una posible regulación de VE-1 por su localización subcelular realizamos un estudio mediante análisis bioinformáticos. Para determinar la probabilidad de que VE-1 estuviera localizado en el núcleo usamos el servidor PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>), donde se indica que VE-1 tiene un 47,8 % de probabilidad de localización nuclear. Posteriormente usamos el programa NLSMapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi), capaz de determinar dominios NLS a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína. NLSMapper indicó que VE-1 posee un NLS (GSKRAHDQTF) en el extremo carboxilo de la proteína desde el aminoácido 497 al 506 (Figura 3.6).

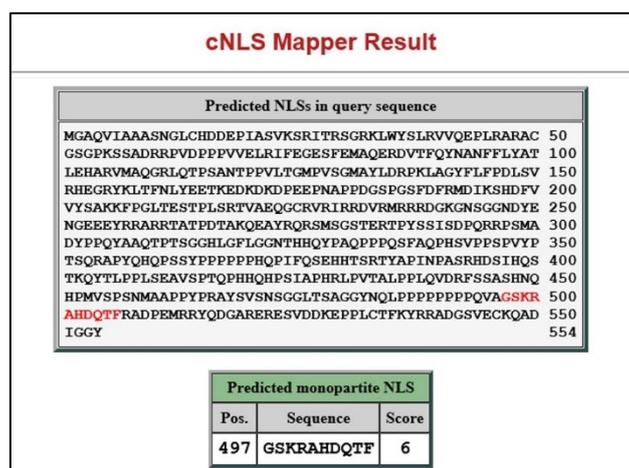


Figura 3.6 Resultado de la predicción del dominio NLS en VE-1 mediante NLSMapper (Score 6). En rojo se indica el NLS.

Para comprobar si estas predicciones son correctas y VE-1 se localiza en el núcleo realizamos un fraccionamiento subcelular a partir de extractos de proteínas totales. Como se observa en la figura 3.7, VE-1 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma independientemente de las condiciones de luz ya que se detecta acumulación de la proteína en micelios crecidos en oscuridad total, en luz continua y en micelios iluminados con luz blanca durante 30 minutos. Estos resultados nos permiten afirmar que VE-1 se acumula en el núcleo como habíamos predicho mediante técnicas bioinformáticas.

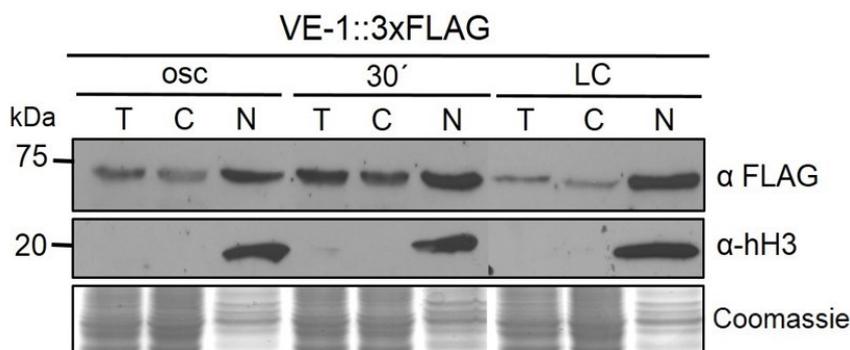


Figura 3.7 Fraccionamiento subcelular. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG en lisados celulares totales (T), fracciones citoplasmáticas (C) y núcleos (N) de micelios cultivados en agitación durante 48 horas a 30°C en oscuridad (osc), luz continua (LC) o posteriormente iluminados 30 minutos (30'). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

Además caracterizamos la localización de VE-1 en ausencia de las proteínas WC-1 y VVD muy importantes en la regulación génica por luz (Figura 3.8). Los resultados muestran que estas proteínas no afectan a la localización de VE-1. Por lo que podemos concluir que la acumulación de la proteína VE-1 en citoplasma y núcleo es independiente de la luz.

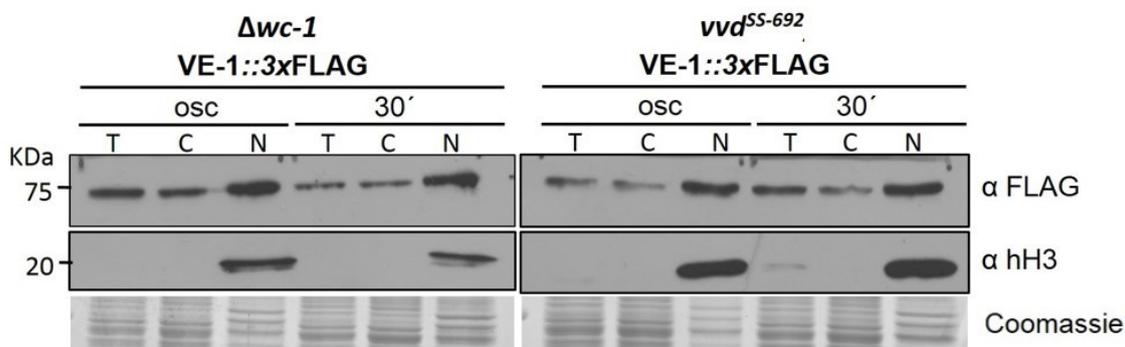


Figura 3.8 Fraccionamiento subcelular. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG en lisados celulares totales (T), fracciones citoplasmáticas (C) y núcleos (N) de micelios cultivados en agitación 48 horas a 30°C en oscuridad (osc), luz continua (LC) o posteriormente iluminados 30 minutos (30') en las estirpes $\Delta wc-1$; VE-1::FLAG y Δvvd ; VE-1::FLAG. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

4. Regulación del gen *ve-1* y la proteína VE-1 de *Neurospora crassa* durante el desarrollo asexual.

En *Aspergillus nidulans* VeA regula la conidiación, y su ausencia provoca la producción de esporas en oscuridad (Mooney & Yager, 1990). Por el contrario en *Neurospora* la ausencia de esta proteína no es esencial para su conidiación ni en oscuridad ni en luz (Bayram et al., 2008b), pero podría tener otra función importante durante esta etapa ya que como hemos descubierto en el apartado 1.2 de los resultados de esta Tesis,

el mutante *Δve-1* tiene un defecto importante en la elongación de las hifas aéreas únicamente en luz. Para estudiar el papel de VE-1 durante la conidiación se usó un método de cultivo que nos permite separar el micelio aéreo del vegetativo (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). Las diferentes estirpes se cultivaron durante 24 horas en medio líquido a 30°C tanto en luz como en oscuridad. Posteriormente, los micelios fueron filtrados y colocados entre dos papeles de filtro sobre placas de medio sólido. Estas placas fueron incubadas a 30°C en luz o en oscuridad durante 15 ó 24 horas. El micelio capaz de atravesar el papel de filtro es micelio aéreo y el que queda húmedo entre los dos papeles de filtro es micelio vegetativo (Figura 4.1).

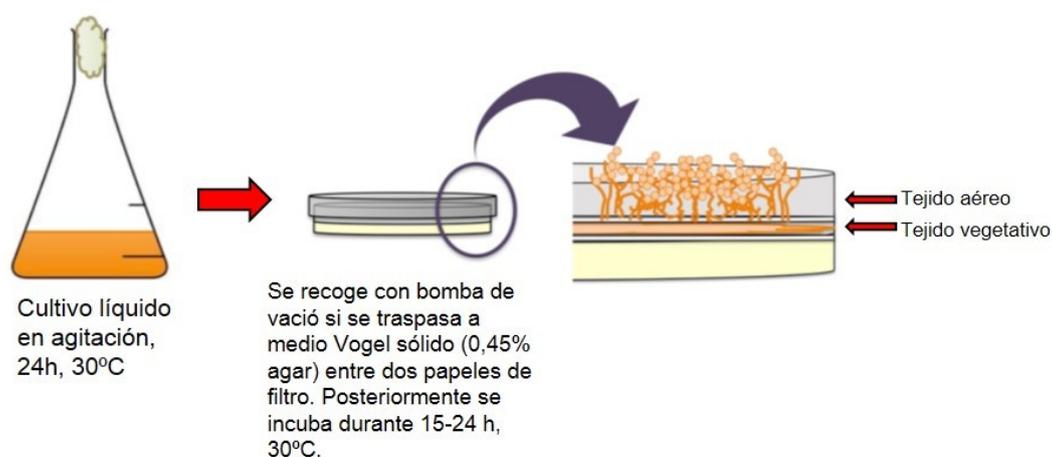


Figura 4.1 Método de inducción del desarrollo en *Neurospora crassa* basado en (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). Figura modificada de Ruger-Herreros (2014).

Los cultivos se recogieron tras 15 y 24 horas después de la transferencia a medio sólido para obtener tejido en diferentes etapas de la reproducción asexual. Como puede observarse en la figura 4.2, a las 15 horas tras la inducción de la conidiación ya se han formado constricciones en las hifas y sería el momento en que se activarían los genes implicados en ese proceso como *acon-2*, *acon-3*, *fl* y *fld* (Bailey & Ebbole, 1998; Springer & Yanofsky, 1989; Ruger-Herreros, 2014). A las 24 horas ya hay liberación de conidios como se muestra en la fotografía 24a de la figura 4.2 y es en esta etapa donde actuarían los productos de los genes *csp-1* y *csp-2* (Springer, 1993).

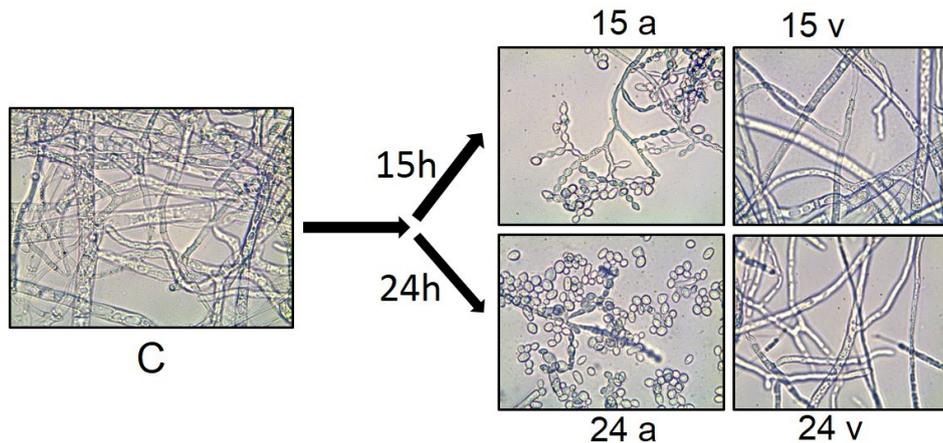


Figura 4.2. Etapas del desarrollo en *Neurospora crassa*. Imágenes tomadas al microscopio óptico con aumento 20x. **C:** cultivo líquido en agitación, 24 horas a 30°C; **15a:** micelio aéreo con constricciones tras 15 horas del traspaso a medio sólido; **15v:** micelio vegetativo tras 15 horas del traspaso a medio sólido; **24a:** micelio aéreo y conidios sueltos tras 24 horas del traspaso a medio sólido; **24v:** micelio vegetativo tras 24 horas del traspaso a medio sólido.

Una vez comprobado que el método de cultivo y las horas seleccionadas eran las correctas, se extrajeron proteínas totales de las muestras recogidas de la estirpe VE-1::3xFLAG en las distintas etapas del desarrollo y se realizó una hibridación de Western con un anticuerpo anti-FLAG. Como podemos ver en la figura 4.3, VE-1 está presente cuando se iluminan los cultivos en micelio aéreo y vegetativo tras 15 y 24 horas tras la inducción de la conidiación; por el contrario cuando el experimento se realiza en oscuridad únicamente detectamos VE-1 en micelio vegetativo tras 15 y 24 horas. Estos resultados indican que existe una regulación por la luz y el desarrollo en la localización de VE-1 durante la conidiación.

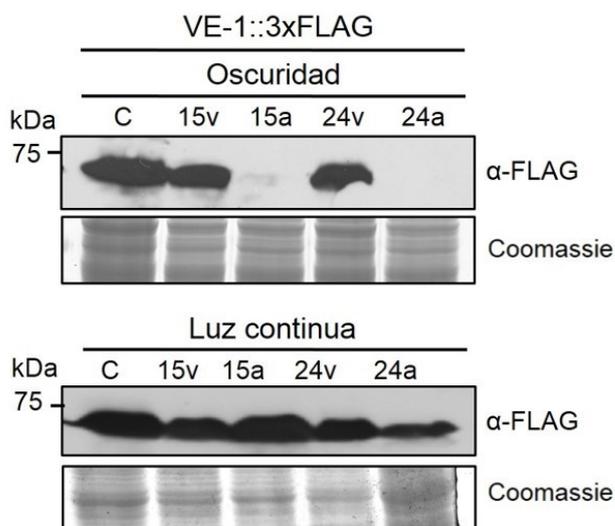


Figura 4.3 Localización de VE-1 en distintos tejidos. La muestra control **C** se obtiene de micelio cultivado en medio líquido. La muestra **v** (**15v** o **24v**) corresponde con los tejidos cultivados en medio líquido durante 24 horas y posteriormente transferidos a medio sólido entre dos papeles de filtro y cultivados 15 ó 24 horas. Las muestras **a** (**15a** y **24a**) corresponden a las hifas aéreas y conidios que son capaces de atravesar el papel de filtro y crecer por encima de él. En cada carril fueron cargados 100 µg de proteínas. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

¿Qué mecanismo permite la acumulación de VE-1 en micelio aéreo en luz? Con el fin de aclarar si la diferencia de la localización de VE-1 en luz y oscuridad era debida al WCC se repitió el experimento usando la estirpe $\Delta wc-1$ VE-1::3xFLAG. Observamos que en ausencia de WC-1 la acumulación de VE-1 es prácticamente inexistente en tejido vegetativo tanto en oscuridad como en luz (Figura 4.4). Esto indica que WC-1 es la responsable de la presencia de la proteína VE-1 en micelios aéreos en luz, tanto a las 15 horas cuando se están formando las constricciones como a las 24 horas donde la mayoría del tejido son conidios libres.

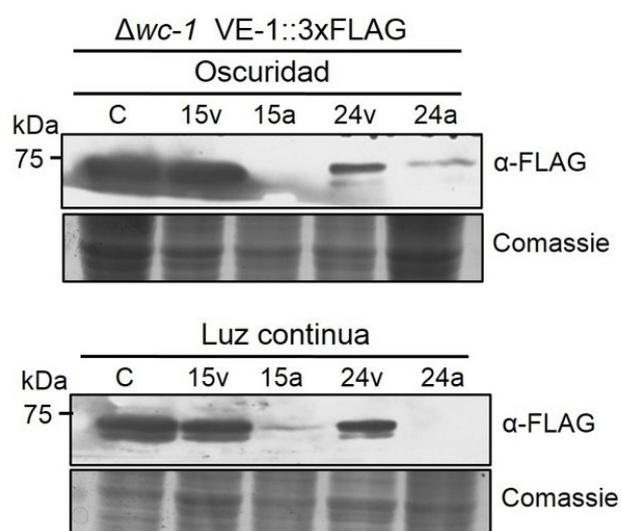


Figura 4.4 Localización de VE-1 en distintos tejidos en la estirpe $\Delta wc-1$ VE-1::3xFLAG. La muestra control **C** se obtiene de micelio cultivado en medio líquido. La muestra **v** (**15v** o **24v**) corresponde con los tejidos cultivados en medio líquido durante 24 horas y posteriormente trasferidos a medio sólido entre dos papeles de filtro y cultivados 15 ó 24 horas. Las muestras **a** (**15a** y **24a**) corresponden a las hifas aéreas y conidios que son capaces de atravesar el papel de filtro y crecer por encima de él. En cada carril fueron cargados 100 μ g de proteínas. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie

Para investigar más esta regulación por luz y desarrollo y comprobar si esta diferencia en la acumulación de la proteína VE-1 se debía a una regulación de transcripción del gen *ve-1*, se extrajo ARN total de los tejidos cultivados bajo inducción del desarrollo asexual y se midió la acumulación de ARNm de *ve-1* mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos mostraron que no existía una correlación entre los niveles de ARNm de *ve-1* y los de la proteína VE-1, ya que tanto en micelio aéreo como en micelio vegetativo en oscuridad existe ARNm de *ve-1* (Figura 4.5). Estos resultados podrían indicar que la ausencia de VE-1 en micelio aéreo (15a y 24a) cultivado en oscuridad podría deberse a modificaciones postranscripcionales.

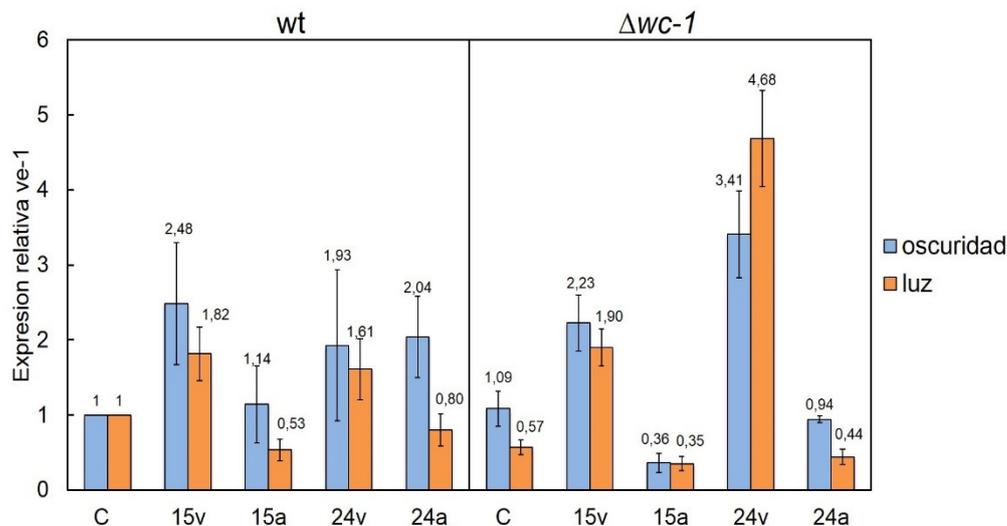


Figura 4.5 Expresión relativa del gen *ve-1* en las estirpes silvestre (wt) y $\Delta wc-1$ en oscuridad y luz. La muestra control C se obtiene de micelio cultivado en medio líquido. La muestra v (15v o 24v) corresponde con los tejidos cultivados en medio líquido durante 24 horas y posteriormente trasferidos a medio sólido entre dos papeles de filtro y cultivados 15 ó 24 horas. Las muestras a (15a y 24a) corresponden a las hifas aéreas y conidios que son capaces de atravesar el papel de filtro y crecer por encima de él. Se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa para medir la expresión relativa. Se muestran las medias de los datos obtenidos de tres experimentos independientes y su error estándar. Los niveles de ARN para cada gen se normalizaron con el ARN de *tub-2* para corregir errores de muestreo y éstos fueron después normalizados con el resultado del ARN del control C.

4.1 Efecto de la ausencia de VE-1 sobre la transcripción de otros genes durante el desarrollo asexual.

El defecto en el crecimiento de las hifas aéreas sugiere que VE-1 puede regular la transcripción o la actividad de las proteínas que participan en la regulación de la conidiación. Para investigar el posible efecto de VE-1 sobre la transcripción de genes del desarrollo como *fl* y *fld* (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004; Ruger-Herreros 2014) y *con-10* que es un gen inducible por el desarrollo y por luz (Olmedo et al., 2010) se extrajo ARN total de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta ve-1$ de micelio vegetativo y aéreo y se realizaron experimentos de RT-PCR para cuantificar la acumulación del ARNm de *fl*, *fld* y *con-10*.

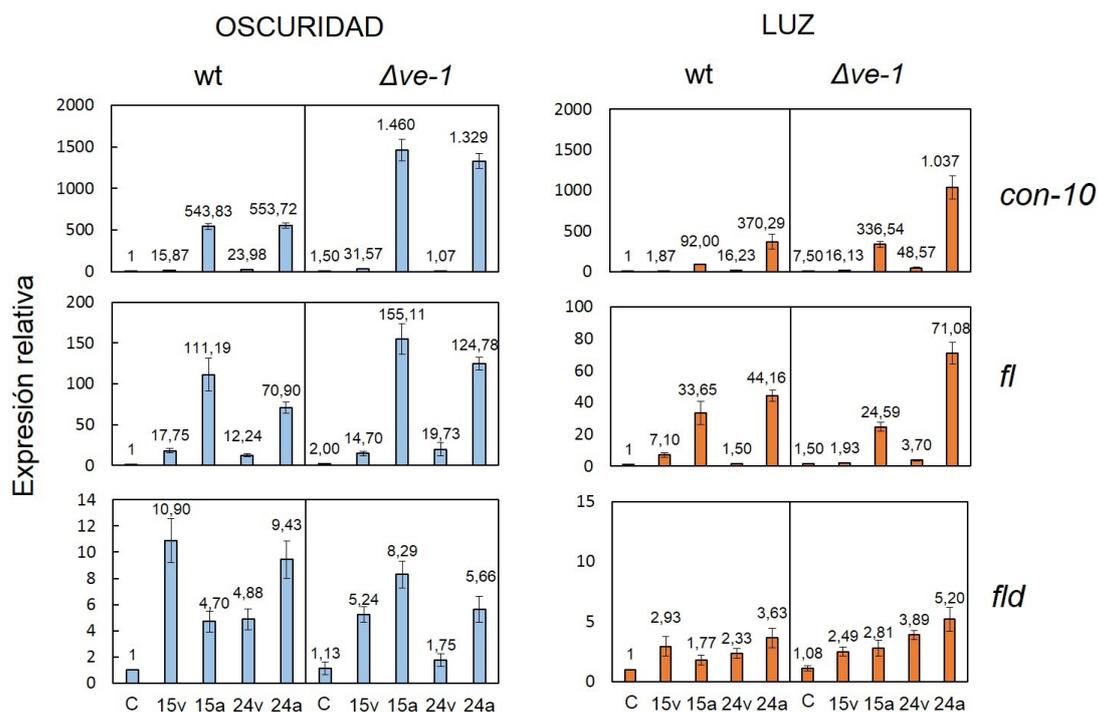


Figura 4.6 Expresión relativa de los genes *con-10*, *fl* y *fld* en las estirpes silvestre (wt) y $\Delta ve-1$ en oscuridad y luz continua. La muestra control C se obtiene de micelio cultivado en medio líquido. La muestra v (15v o 24v) corresponde con los tejidos cultivados en medio líquido durante 24 horas y posteriormente transferidos a medio sólido entre dos papeles de filtro y cultivados 15 ó 24 horas. Las muestras a (15a y 24a) corresponden a las hifas aéreas y conidios que son capaces de atravesar el papel de filtro y crecer por encima de él. Se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa para medir la expresión relativa. Se muestran las medias de los datos obtenidos de tres experimentos independientes y su error estándar. Los niveles de ARN para cada gen se normalizaron con el ARN de *tub-2* para corregir errores de muestreo y éstos fueron después normalizados con el resultado del ARN del control C.

Los resultados de la figura 4.6 indican que la ausencia de VE-1 durante la conidiación no afecta drásticamente a la transcripción de los genes *con-10*, *fl* y *fld* aunque observamos un pequeño aumento en la acumulación de ARN de *con-10* y *fl* tanto en luz como en oscuridad. Este efecto de la falta de VE-1 sobre la acumulación de ARNm de *con-10* indica que el papel de VE-1 sobre la transcripción es diferente en el micelio vegetativo, donde la transcripción de *con-10* disminuye (figura 3.3), y durante el desarrollo asexual donde aumenta. Estos datos sugieren que VE-1 puede actuar como un activador o represor de la transcripción según el estado de desarrollo del hongo.

4.2 Localización subcelular de VE-1 durante el desarrollo asexual.

En tejido vegetativo hemos detectado acumulación de VE-1 en el citoplasma y en el núcleo tanto en luz como en oscuridad (Figura 3.7). Como en el micelio aéreo únicamente detectamos proteína VE-1 en luz, realizamos un fraccionamiento subcelular

en estas condiciones para comprobar si la localización de VE-1 se mantiene también en el citoplasma y en el núcleo. Nuestros resultados indican que en micelio vegetativo bajo las diferentes condiciones de cultivo (C, 15v y 24v) VE-1 se localiza en el citoplasma y el núcleo, siendo la acumulación de VE-1 levemente mayor en el núcleo. Sin embargo, en micelio aéreo (15a y 24a) la acumulación de VE-1 en el núcleo es mucho mayor que en el citoplasma, lo que indica que VE-1 podría realizar su función durante la conidiación en el interior del núcleo, presumiblemente regulando la transcripción (figura 4.7).

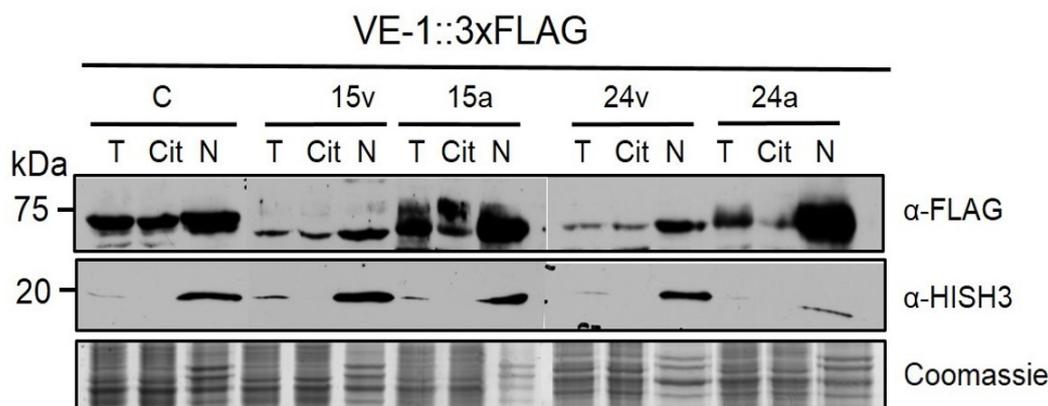


Figura 4.7 Fraccionamiento subcelular durante la conidiación en luz. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG en lisados celulares totales (T), fracciones citoplasmáticas (Cit) y núcleos (N). La muestra control C se obtiene de micelio cultivado en medio líquido. La muestra v (15v o 24v) corresponde con los tejidos cultivados en medio líquido durante 24 horas y posteriormente transferidos a medio sólido entre dos papeles de filtro y cultivados 15 ó 24 horas. Las muestras a (15a y 24a) corresponden a las hifas aéreas y conidios que son capaces de atravesar el papel de filtro y crecer por encima de él.

5. Estabilidad y degradación de VE-1 en micelio vegetativo.

La ausencia de VE-1 en las hifas aéreas aunque sí detectáramos su ARNm nos hizo considerar la hipótesis de que VE-1 podría ser inestable y que las condiciones de iluminación podrían regular su estabilidad.

Uno de los medios que emplean las células para controlar la función de las proteínas es regular su concentración controlando el balance entre síntesis y degradación. El proteasoma es el sistema más importante de degradación de proteínas presente en la mayoría de los seres vivos. Para que una proteína sea reconocida y degradada por el proteasoma es necesario un marcaje previo con ubiquitina, una pequeña proteína de 76 aminoácidos (Hershko & Ciechanover, 1998). Algunas proteínas tienen dominios conservados que sirven para este recambio de degradación y síntesis. Uno de los más comunes es el dominio PEST (secuencia peptídica rica en Prolina (P), ácido glutámico

(E), serina (S) y treonina (T)) asociado a proteínas de vida media corta (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al., 1986). La proteína VE-1 tiene un dominio PEST (Bayram et al., 2008b), lo que indica que su función podría ser regulada por marcaje con ubiquitina antes de su degradación. Para aclarar esta hipótesis estudiamos la estabilidad y degradación de VE-1 en diferentes condiciones de cultivo y con el uso de drogas como la cicloheximida y la tiolutina. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Actúa interfiriendo la actividad del ribosoma, bloqueando la elongación traduccional (Obrig et al., 1971; Schneider-Poetsch et al., 2010). La tiolutina es un antibiótico producido por *Streptomyces* y que inhibe la proteasa Rpn11, componente del proteasoma. La adición de tiolutina al medio de cultivo bloquea la acción del proteasoma y por lo tanto la degradación (Lauinger et al., 2017).

5.1 Estabilidad de VE-1 tras la adición de cicloheximida al medio de cultivo bajo diferentes condiciones de luz.

Para investigar si VE-1 es una proteína muy estable o, por el contrario, tiene una degradación rápida, cultivamos la estirpe con la fusión VE-1::3xFLAG en medio líquido y añadimos cicloheximida (CHX) durante diferentes tiempos. Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: los conidios se cultivaron durante 24 horas a 34°C en placas de medio líquido sin agitación. Posteriormente se recortaron discos de micelio de aproximadamente dos centímetros de diámetro y se transfirieron a un matraz con 200 ml de medio líquido que se incubó durante otras 24 horas a 30°C. Transcurrido ese tiempo iluminamos durante 30 minutos las muestras correspondientes a esas condiciones, y posteriormente añadimos la CHX. Tras la adición de CHX al medio fuimos recogiendo los discos de micelio a diferentes tiempos de incubación para extraer proteínas y detectar VE-1 mediante hibridaciones de Western. El tiempo 0 representa la muestra justo antes de añadir la CHX (Figura 5.1).

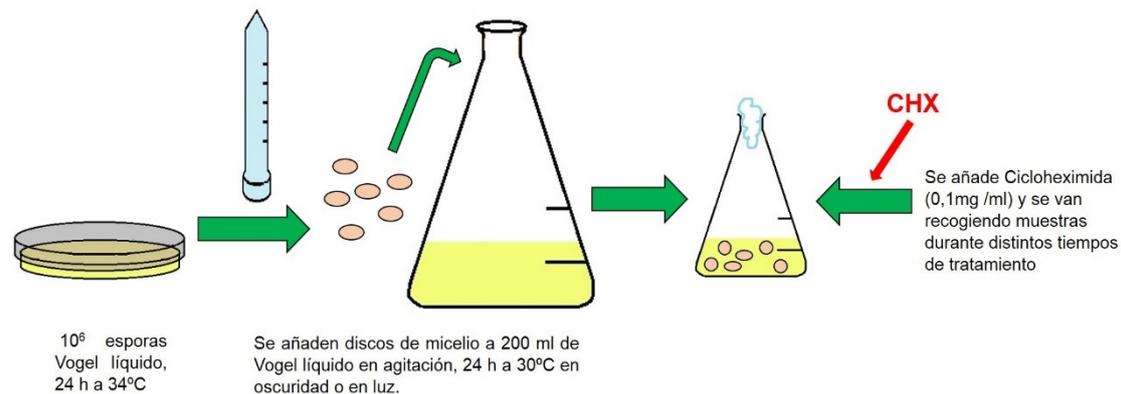


Figura 5.1 Método de cultivo para el estudio de la estabilidad de VE-1 mediante tratamiento con CHX. Las estirpes fueron cultivadas durante 24 h a 34°C en placas de Petri sin agitación. Una vez crecido el micelio se recortaron discos de micelio y se transfirieron a un matraz que se cultivó otras 24 horas a 30°C en agitación. Posteriormente se iluminaron y se añadió la CHX (0,1mg/ml).

Los resultados indican que VE-1 es una proteína inestable (Figura 5.2). Tras 120 minutos de incubación con CHX observamos que la acumulación de VE-1 disminuye y ya no se detecta. Como control de proteína muy estable hemos detectado NOP1P, una proteína nucleolar muy conservada en eucariotas (Jansen et al., 1991). Tras la adición de CHX al medio detectamos NOP1P incluso tras 480 minutos de incubación con CHX (Figura 5.2).

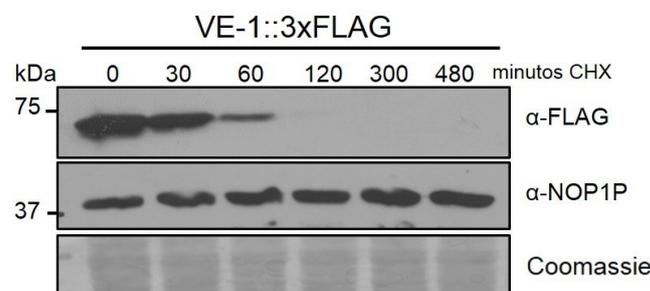


Figura 5.2 Estabilidad de VE-1 tras 30 minutos de iluminación. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG y de la proteína NOP1P con un anticuerpo monoclonal anti-NOP1P como control. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición de CHX (0,1mg/ml). Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

Como los resultados muestran que la proteína VE-1 es inestable, nos preguntamos si la estabilidad podría estar sometida a algún tipo de regulación por la luz. Para ello realizamos el experimento explicado anteriormente bajo tres condiciones de luz distintas: oscuridad, 30 minutos de luz y luz continua antes de la adición de CHX. Además, realizamos el mismo experimento con una estirpe carente de la proteína WC-1 para comprobar si el posible efecto de la luz sobre la estabilidad de VE-1 podría deberse al

WCC. Como se muestra en la figura 5.3, la estabilidad de VE-1 depende de las condiciones de iluminación. VE-1 es más estable cuando los micelios se mantienen iluminados de manera continua que en oscuridad. Esto se observa, sobre todo tras 120 minutos de incubación después de añadir CHX (Figura 5.3). Sin embargo, la transición de oscuridad a luz promueve una degradación más rápida de VE-1 como se observa por la ausencia de VE-1 tras 120 minutos de incubación con CHX en micelios que sólo se expusieron 30 minutos de luz (Figura 5.3). Las diferencias en la estabilidad de VE-1 entre las diferentes condiciones son más notables tras 120 minutos de incubación con CHX, pero estas diferencias desaparecen casi por completo en un mutante $\Delta wc-1$ (Figura 5.3), lo que indica que el efecto de la luz en la estabilidad de VE-1 depende del WCC.

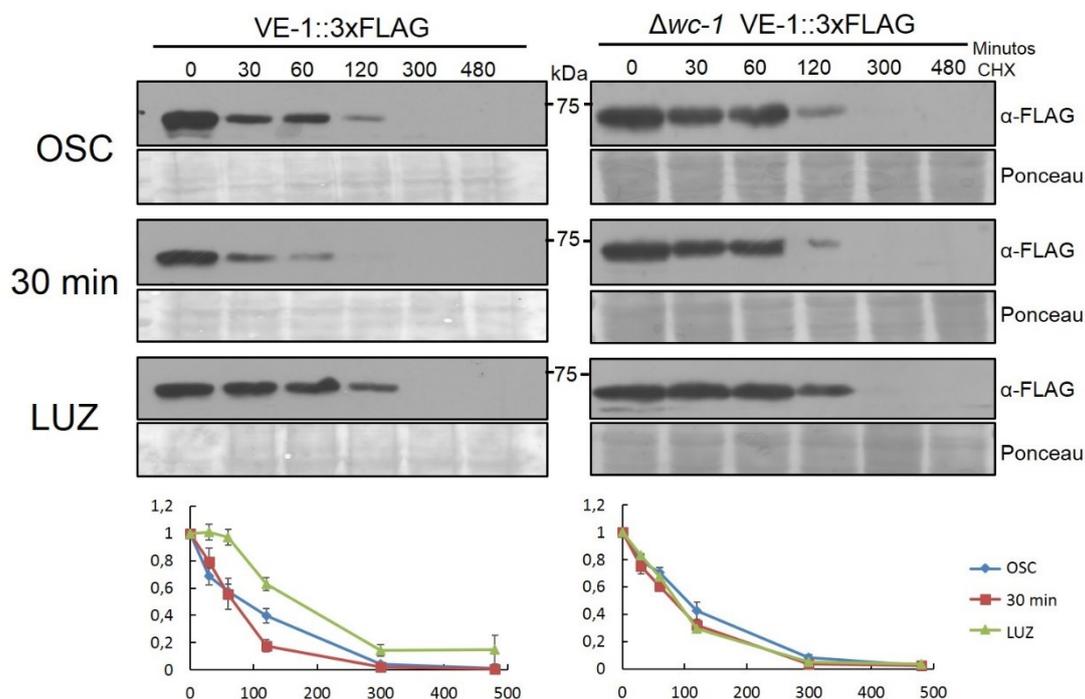


Figura 5.3 Estabilidad de VE-1 bajo diferentes condiciones de iluminación: oscuridad total (osc), 30 minutos de luz (30min) y luz continua (luz). Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición de CHX (0,1mg/ml). Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE, transferimos a una membrana y la teñimos con tinción Ponceau antes de la hibridación con el anticuerpo. En la cuantificación se muestran las medias de los datos obtenidos de tres experimentos independientes y su error estándar. Los niveles de acumulación de proteína VE-1 se normalizaron con la acumulación de VE-1 a tiempo cero (sin adición de CHX).

Para asegurarnos que WC-1 podría estar presente para influir en la estabilidad de VE-1, repetimos el experimento con CHX e incubamos con el anticuerpo anti-WC-1 para comprobar si podíamos detectar WC-1 tras largos tiempos de incubación con CHX. Como podemos ver en la figura 5.4 en todas las condiciones de luz WC-1 es muy estable, y se detecta incluso a 480 minutos tras la adición de CHX. Estos resultados indican que

WC-1 podría estar actuando y regulando la estabilidad de VE-1 durante todo el tiempo del experimento. Este resultado también demuestra que el efecto regulador de la luz sobre la estabilidad es específico y no ocurre en todas las proteínas de *Neurospora crassa*.

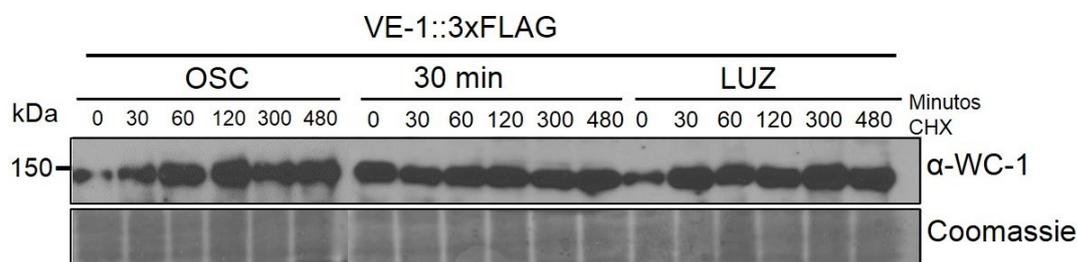


Figura 5.4 Estabilidad de WC-1 bajo diferentes condiciones de iluminación. Detección de la proteína WC-1 con anticuerpo contra WC-1. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición de CHX (0,1mg/ml). Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie

5.2 La acumulación y estabilidad de VE-1 depende de la ruta de degradación ubiquitina/proteasoma.

Dos complejos muy importantes en la ruta de degradación ubiquitina/proteasoma son el Signalosoma COP9 (CSN) y la ligasa de ubiquitina SCF junto con su adaptador FWD-1 (He & Liu, 2005; He et al., 2003). Como los resultados del apartado 5.2 de esta Tesis muestran la inestabilidad de VE-1, nos preguntamos si su degradación podría llevarse a cabo a través de esta ruta. Para ello seleccionamos mutantes de varias proteínas implicadas en la vía de degradación ubiquitina/proteasoma. De los dos tipos de subunidades del CSN seleccionamos una de cada grupo: CSN-5 que pertenece a las que contienen dominio MPN y que lleva a cabo la separación de NEDD8 del complejo SCF (Cope et al., 2002); y CSN-1, que tiene un dominio PCI y es importante para la estabilidad de los componentes del SCF (Wang et al., 2010). Además de mutantes del CSN también investigamos la estabilidad de VE-1 en un mutante de FWD-1 que es el adaptador que reconoce la proteína que se va a degradar en el proteasoma y la une a la ligasa de ubiquitina SCF (He et al., 2005). Estos mutantes tienen defectos en el crecimiento, en la conidiación y en el ritmo circadiano (Wang et al., 2010). Para completar la caracterización del fenotipo de estos mutantes cuantificamos su producción de conidios y su síntesis de carotenos con el fin de encontrar algún dato contrario a los encontrados en el mutante *Δve-1* (apartado 1 de los resultados de esta Tesis), ya que nuestra hipótesis de partida es el aumento de la estabilidad de VE-1 en estos mutantes. Como se muestra en la figura 5.5A, todos los mutantes producen menos conidios que el silvestre. Tanto a los dos como

a los siete días de crecimiento el mutante $\Delta fwd-1$ es el que tiene menor número de conidios. Los mutantes $\Delta csn-1$ y $\Delta csn-5$ tienen menor número de conidios que el silvestre pero más que el mutante $\Delta fwd-1$. No existen casi diferencias en la producción de conidios de las estirpes estudiadas entre luz y oscuridad (Figura 5.5A). Por el contrario, cuando cuantificamos los carotenos, el mutante $\Delta fwd-1$ es el mayor productor superando incluso a la estirpe silvestre (Figura 5.4B). Los mutantes del CSN, $\Delta csn-1$ y $\Delta csn-5$, producen un poco menos carotenos que la estirpe silvestre pero más que el mutante $\Delta ve-1$ (Figura 5.5B).

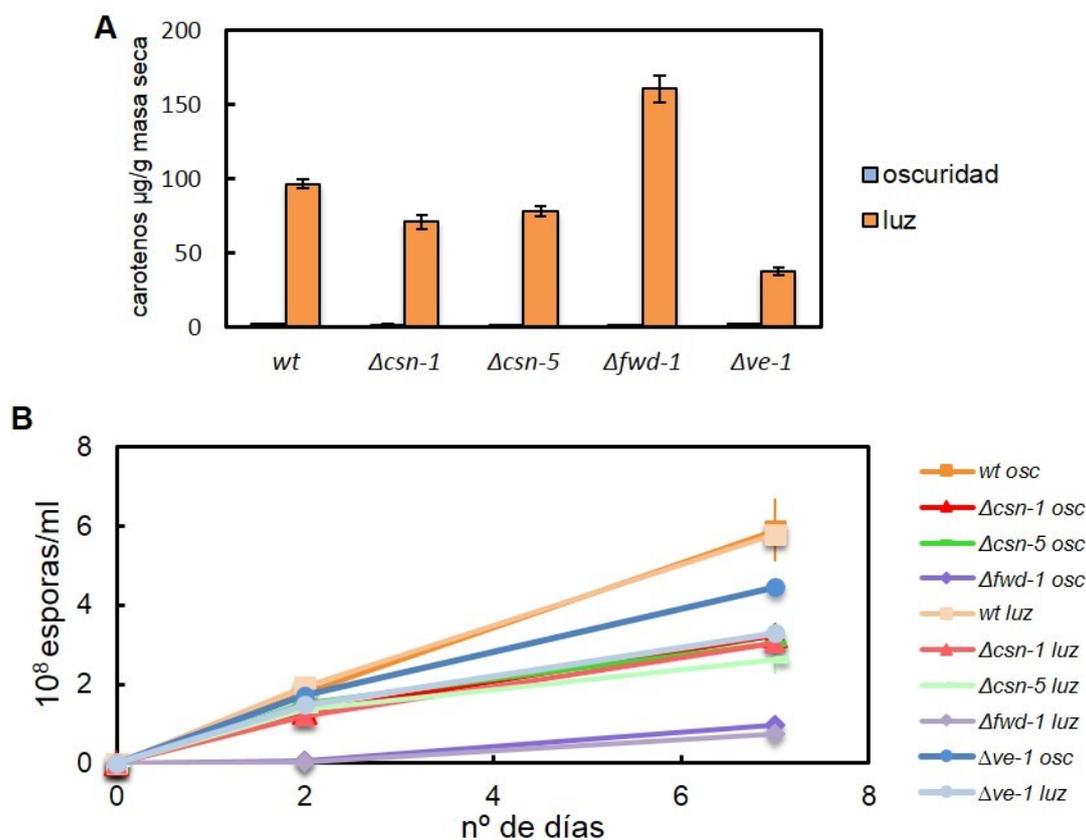


Figura 5.5 Cuantificación de la producción de carotenos (A) y conidios (B) de los mutantes de la ruta de degradación $\Delta csn-1$, $\Delta csn-5$, $\Delta fwd-1$. Para la extracción de carotenos las estirpes se cultivaron 48 horas a 22°C, posteriormente se iluminaron dos minutos con luz blanca o se mantuvo en oscuridad y se continuó su incubación 24 horas más a 8°C para una máxima producción de carotenos. Para la cuantificación del número de conidios las estirpes se sembraron en tubos de medio sólido durante dos o siete días a 30°C en oscuridad o luz.

Para poder estudiar la estabilidad de VE-1 en estos mutantes de la ruta de degradación creamos versiones de cada una de las estirpes mutantes con la fusión VE-1::3xFLAG mediante cruzamientos sexuales y obtuvimos las estirpes con los siguientes genotipos: $\Delta fwd-1 ve-1::3xFLAG$, $\Delta csn-1 ve-1::3xFLAG$ y $\Delta csn-5 ve-1::3xFLAG$. Estos mutantes fueron cultivados y tratados con CHX como se ha descrito al inicio de este

apartado. Los resultados indican que la ausencia de la subunidad CSN-1 no afecta drásticamente a la estabilidad de VE-1 ya que después de 300 o 480 minutos tras la adición de CHX al medio casi no se detecta acumulación de VE-1 al igual que en la estirpe silvestre. En cambio en los mutantes *Δfwd-1* VE-1::3xFLAG y *Δcsn-5* VE-1::3xFLAG la acumulación de la proteína VE-1 se mantiene incluso después de 480 minutos tras el tratamiento con CHX tanto en luz como en oscuridad (figura 5.6). Estos resultados nos permiten concluir que la ausencia de las proteínas FWD-1 y CSN-5 aumentan la estabilidad de VE-1 en micelio vegetativo independientemente de la luz. Como consecuencia de este resultado proponemos que el complejo SCF que contiene FWD-1 como proteína adaptadora participa en la ubiquitinación y degradación de VE-1.

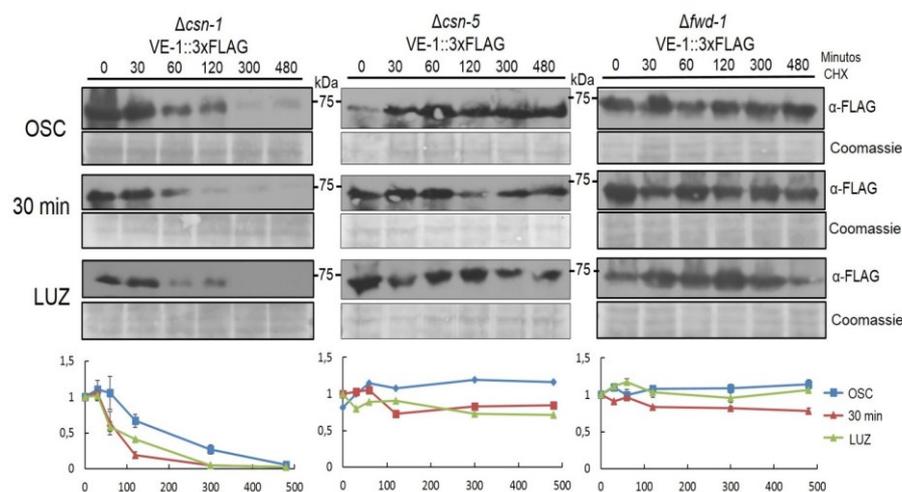


Figura 5.6 Estabilidad de VE-1 en mutantes de la ruta de degradación ubiquitina/proteasoma. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición de CHX (0,1mg/ml). Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie. En la cuantificación se muestran las medias de los datos obtenidos de tres experimentos independientes y su error estándar. Los niveles de acumulación de proteína VE-1 se normalizaron con la acumulación de VE-1 a tiempo cero (sin adición de CHX).

Para comprobar si este aumento de la estabilidad en los mutantes *Δfwd-1* VE-1::3xFLAG y *Δcsn-5* VE-1::3xFLAG afectaba a la cantidad total de VE-1 en micelio vegetativo realizamos una extracción de proteínas de micelios cultivados en diferentes condiciones de luz y oscuridad. En los resultados obtenidos no se observa una gran diferencia en la acumulación de VE-1 entre VE-1::3xFLAG (wt) y *Δcsn-1* VE-1::3xFLAG y *Δcsn-5* VE-1::3xFLAG, pero sí se observa una acumulación mayor de VE-1 en el mutante *Δfwd-1* VE-1::3xFLAG como consecuencia de la mayor estabilidad de VE-1 (figura 5.7). Como control de iluminación y para estudiar también si su acumulación se veía afectada por la ausencia de las proteínas CSN-1, CSN-2 y FWD-1,

incubamos también los extractos totales con el anticuerpo anti-WC-1. Como esperábamos por la alta estabilidad de WC-1 tras el tratamiento con CHX (figura 5.4), ni la cantidad ni el patrón de fosforilación por la luz de WC-1 están afectados en estos mutantes (figura 5.6).

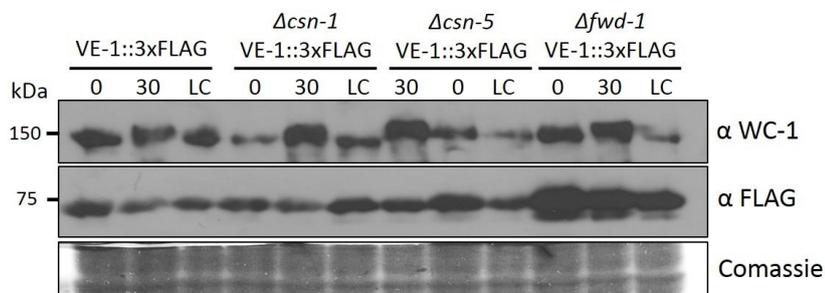


Figura 5.7. Acumulación de las proteínas VE-1::3xFLAG y WC-1 en la estirpe silvestre y en mutantes de proteínas de la ruta de degradación de proteínas. Las estirpes VE-1::3xFLAG (wt), $\Delta csn-1$ VE-1::3xFLAG, $\Delta csn-5$ VE-1::3xFLAG y $\Delta fwd-1$ VE-1::3xFLAG se cultivaron en oscuridad total (O) o luz continua (LC) durante 48h a 22°C y posteriormente se iluminaron durante 30 minutos (30). La detección de la proteína VE-1::3xFLAG se realizó con anticuerpo anti-FLAG y la de WC-1 con anticuerpo anti-WC-1 en extractos de proteínas de las distintas estirpes. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

La mayor acumulación de VE-1 en el mutante $\Delta fwd-1$ VE-1::3xFLAG se debe posiblemente a la acumulación de VE-1 en el citoplasma ya que su maquinaria de degradación no es funcional. Para comprobar esta hipótesis realizamos un fraccionamiento subcelular en las estirpes VE-1::3xFLAG, $\Delta fwd-1$ VE-1::3xFLAG y $\Delta csn-5$ VE-1::3xFLAG. Como se observa en la figura 5.8 en $\Delta fwd-1$ VE-1::3xFLAG la cantidad de VE-1 en el citoplasma es mayor que en la estirpe silvestre, por lo que podemos concluir que el bloqueo de la ubiquitinación de VE-1 y por tanto el bloqueo de la degradación provoca una mayor acumulación de VE-1 en el citoplasma sin afectar la acumulación de VE-1 en el núcleo.

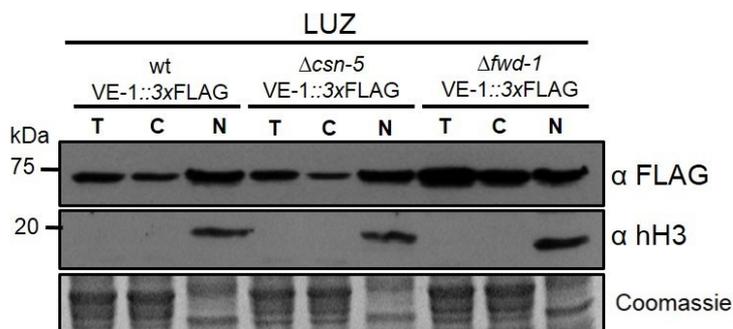


Figura 5.8 Fraccionamiento subcelular. Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG en lisados celulares totales (T), fracciones citoplasmáticas (C) y núcleos (N) de micelios cultivados en agitación 48 horas a 30°C en luz continua estirpes wt VE-1::FLAG, $\Delta fwd-1$;VE-1::FLAG y $\Delta csn-5$;VE-1::FLAG. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

5.3 Estudio de la interacción entre VE-1 y FWD-1 mediante doble híbrido en levaduras.

Nuestros resultados indican que VE-1 es marcada por el SCF para su degradación por el proteasoma y que este proceso está regulado por la luz. La estabilidad de VE-1 en el mutante $\Delta fwd-1$ indica que FWD-1 debe interactuar con VE-1 durante el proceso de etiquetado previo a su degradación.

El sistema de doble híbrido en levaduras es una técnica muy usada para comprobar interacción entre dos proteínas (Gietz et al., 1997; Young, 1998). En *Neurospora crassa* se ha usado para confirmar la interacción entre los dominios LOV de WC-1 y VVD (Malzahn et al., 2010). Esta técnica se basa en la fusión del dominio de unión a ADN (BD) y el dominio activador de la transcripción (AD) del activador GAL4 de *S. cerevisiae* a proteínas concretas para estudiar su interacción. La interacción entre las proteínas de estudio de estos dos dominios y activa al factor de transcripción, que se detecta gracias a la expresión de un gen reportero (figura 5.9). Hemos realizado experimentos de doble híbrido para investigar la interacción entre VE-1 y FWD-1. Para el análisis del doble híbrido hemos utilizado las estirpes YH2Gold y Y187 de *S. cerevisiae* que tienen deletado el gen *GAL4* y que además poseen mutaciones en los genes *TRP1* y *LEU2* respectivamente. Estas auxotrofías se complementan en presencia de los plásmidos pGBKT7, que llevan el marcador *TRP1* y la fusión con nuestro gen de interés; y pGADT7, que tienen el marcador *LEU2* y la fusión con el otro gen de interés. Las estirpes Y187 e Y2HGold son de sexo opuesto, por lo que conseguiremos un diploide con ambos plásmidos con las fusiones con los genes de nuestras proteínas de estudio, VE-1 y FWD-1 fusionadas al dominio activador y de unión del factor de transcripción GAL4. La estirpe YH2Gold posee marcadores (genes *HIS3* y *ADE2*) que responden al factor de transcripción GAL4. Estos marcadores solo se expresan cuando hay interacción de las proteínas de fusión dando lugar a que el activador GAL4 reuna sus dos dominios. Por tanto si existe interacción entre VE-1 y FWD-1 la levadura será capaz de crecer en medio carente de histidina y adenina.

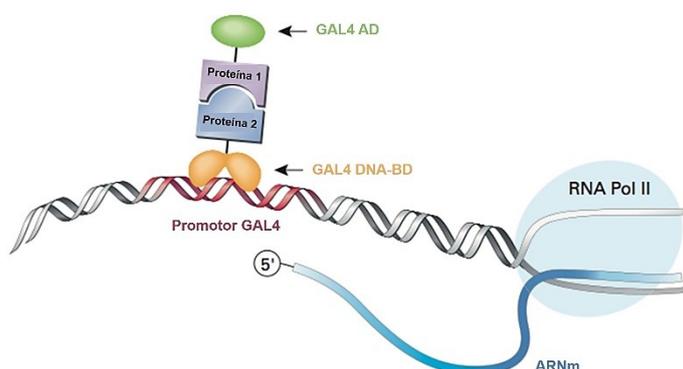


Figura 5.9 Mecanismo molecular del doble híbrido en levaduras. La interacción de las proteínas de estudio (proteína 1 y proteína 2) reconstituyen al activador de la transcripción GAL4 activando los genes reporteros. Imagen modificada de MatchmakerR Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Clontech

Para el estudio de la interacción de VE-1 y FWD-1 mediante doble híbrido realizamos diferentes construcciones en los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 para comprobar todas las posibles combinaciones. Para la proteína VE-1 introducimos la secuencia del gen *ve-1* sin intrones (1,6 kb) en ambos plásmidos. Para FWD-1, usamos únicamente la secuencia de su dominio de interacción proteína-proteína WD40 (0,7 kb) y una secuencia de *fwd-1* truncado (2,6 kb) para no incluir el dominio F-box completo: FWD-1^{Δbox} (figura 5.10), ya que este dominio da lugar a una rápida degradación de la proteína y sería difícil detectar la interacción como se ha demostrado en estudios de interacción de FWD-1 y FRQ (Qun He et al., 2003).



Figura 5.10 Esquemas de las modificaciones de la proteína FWD-1 utilizadas para estudiar la interacción con VE-1 mediante la técnica de doble híbrido. FWD-1^{Δbox} muestra una proteína truncada en el extremo amino y carente de los cinco primeros aminoácidos del dominio F-box. WD40 es únicamente la secuencia correspondiente al dominio WD40 de interacción de proteínas de FWD-1.

Una vez obtenidos los diploides de las levaduras con los plásmidos que incluyen VE-1 y las modificaciones de FWD-1 se comprobaron mediante PCR (Figura 5.11) y secuenciación. Se crearon diploides entre los plásmidos fusionados a nuestros genes de interés y los plásmidos vacíos para comprobar que cada proteína individualmente no era capaz de activar los genes reporteros activados por GAL4. Todos estos controles negativos no crecieron en el medio selectivo sin triptófano, leucina, histidina y adenina.

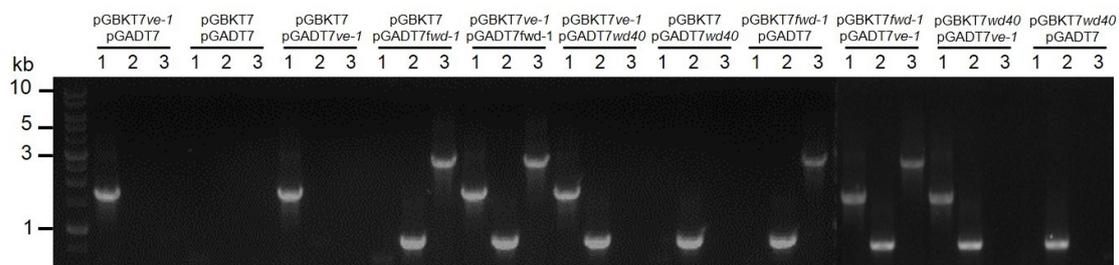


Figura 5.11 Comprobación por PCR de diploides de levaduras. 1. Amplificación del gen *ve-1* (1,6 kb). 2. Amplificación de la secuencia correspondiente al dominio WD40 (0,7 kb). 3. Amplificación de la secuencia correspondiente a FWD-1^{Δbox}, una proteína truncada en el extremo amino y carente de los cinco primeros aminoácidos del dominio F-box (2,6 kb). En la zona izquierda de la figura se muestra el marcador de tamaño.

Posteriormente, los diploides se sembraron en medio mínimo de levaduras carente de triptófano, leucina, histidina y adenina para visualizar las interacciones. Como controles positivos usamos unos diploides creados anteriormente en el laboratorio para un ensayo de doble híbrido entre dominios LOV de *Neurospora crassa* y *Phycomyces blakesleeanus*. Como control positivo dependiente de la luz usamos un diploide que contenía los plásmidos pGBKT7LOV vvd y pGADT7LOV $wc-1$, dominios LOV que únicamente interaccionan en luz (Malzahn et al., 2010); y como control positivo independiente de la luz un diploide que contenía los plásmidos PGBKT7LOV vvd y PGADT7LOV $madA$, dominios LOV de *Neurospora crassa* y *Phycomyces blakesleeanus* que interaccionan tanto en luz como en oscuridad. Como se observa en la figura 5.12 los resultados de los controles positivos han sido los esperados, observamos que la interacción entre los dominios LOV de WC-1 y VVD de *Neurospora* regulados por la luz por el crecimiento del diploide en medio mínimo en luz pero no en oscuridad. También observamos la interacción entre los dominios LOV de VVD de *Neurospora* y MadA de *Phycomyces* por el crecimiento del diploide en medio mínimo en luz y en oscuridad (Figura 5.12). Sin embargo la falta de crecimiento de las estirpes diploides con las fusiones de VE-1 y los fragmentos de FWD-1 sugiere que la interacción entre estas dos proteínas, si existe en levaduras, es demasiado breve para permitir la activación transcripcional en el sistema de doble híbrido (Figura 5.12).

Diploides Y2HGold Y187	pGBKT7 $ve-1$ pGADT7 $fwd-1^{\Delta box}$		pGBKT7 $ve-1$ pGADT7 $wd40$		pGBKT7 $fwd-1^{\Delta box}$ pGADT7 $ve-1$		pGBKT7 $wd40$ pGADT7 $ve-1$		pGBKT7LOV vvd pGADT7LOV $wc-1$		pGBKT7LOV vvd pGADT7LOV $madA$	
	OSC	LUZ	OSC	LUZ	OSC	LUZ	OSC	LUZ	OSC	LUZ	OSC	LUZ

Figura 5.12 Ensayo de interacción entre VE-1 y FWD-1. Se obtuvieron diploides con las distintas combinaciones de los dominios de unión y activación unidos a las secuencias de nucleótidos correspondientes a las tres versiones de las proteínas: VE-1, WD40 y FWD-1 $^{\Delta box}$ como se indica en la parte superior de la tabla. El crecimiento se visualizó en un medio mínimo de levadura ausente de triptófano, leucina, histidina y adenina. Como controles positivo de interacción dependiente e independiente de la luz se usaron diploides con los plásmidos pGBKT7LOV vvd y pGADT7LOV $wc-1$ y diploides con los plásmidos PGBKT7LOV vvd y PGADT7LOV $madA$ respectivamente.

Estos resultados podrían deberse a que la levadura no posee el complejo mecanismo de marcaje que es necesario para que una proteína sea unida a FWD-1, o que el dominio WD40 por sí sólo no sea capaz de interaccionar con la proteína VE-1.

5.4 Respuesta de la estabilidad de VE-1 a Tiolutina, un inhibidor del proteasoma.

Como hemos descrito anteriormente la tiolutina es un inhibidor del proteasoma (Lauinger et al., 2017). Para confirmar que la inestabilidad observada en VE-1 se debe a su degradación por el proteasoma cultivamos la estirpe VE-1::3xFLAG siguiendo el método descrito en la figura 5.1 pero añadiendo tiolutina además de CHX. Únicamente seleccionamos la condición de 30 minutos de iluminación porque es donde más efecto de la CHX hemos observado (figura 5.3). Como control de estabilidad hemos usado un anticuerpo anti-WC-1 ya que anteriormente vimos que WC-1 era estable tras la adición de CHX (figura 5.4). Como se observa en la figura 5.11 cuando no añadimos ninguna de las dos drogas al medio, VE-1 es estable en todos los tiempos tras la iluminación de 30 minutos. La adición de CHX muestra la inestabilidad de VE-1 a partir de los 120 minutos tras la adición que hemos descrito anteriormente. Cuando se añade tiolutina o tiolutina más CHX al medio, VE-1 se estabiliza y se detecta hasta 480 minutos tras la adición de las drogas (figura 5.13). Esto resultados indican que la inhibición del proteasoma es capaz de revertir los efectos de la adición de CHX, por lo que podemos concluir que aunque la síntesis de proteínas este bloqueada detectamos acumulación de VE-1 ya que ésta es incapaz de degradarse en el proteasoma inhibido con tiolutina.

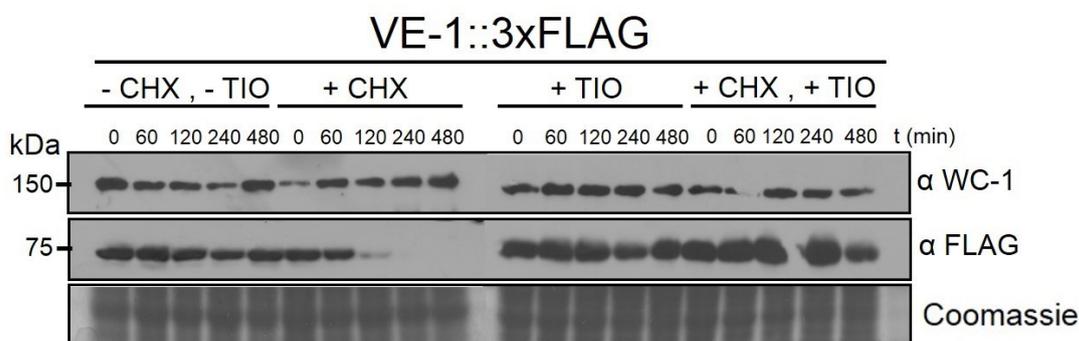


Figura 5.13 Estabilidad de VE-1 tras el tratamiento con CHX y tiolutina (TIO). Detección de la proteína VE-1::3xFLAG con anticuerpo contra FLAG. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición de CHX (0,1mg/ml) y/o tiolutina 50 μ M. Como control de proteína estable se usó un anticuerpo anti-WC-1 para detectar WC-1. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El fenotipo del mutante *Ave-1* de *N. crassa*.

Las proteínas de la familia Velvet son exclusivas de los hongos y participan en la regulación del desarrollo y del metabolismo secundario (Calvo, 2008). Estas proteínas contienen un dominio Velvet que permite la unión entre dímeros y al ADN, y su estructura recuerda al factor NF- κ B de mamíferos (Ahmed et al., 2013). En *Aspergillus nidulans* VeA participa en varios complejos proteicos, entre ellos forma uno con los receptores de luz azul y luz roja (Purschwitz et al., 2008) lo que permite suponer que en *Neurospora crassa* VE-1, su homólogo, debería tener un papel relevante en la regulación de la morfogénesis y la percepción de la luz.

La ausencia de VE-1 causa defectos en la producción de carotenos y en el desarrollo del hongo (Bayram et al., 2008b; Olmedo et al., 2010). Estos datos sugieren que VE-1 podría ser un regulador del desarrollo y del metabolismo secundario en *Neurospora crassa* como se ha demostrado en otros hongos (Calvo et al., 2004; Kim et al., 2002; Martín, 2016; Sarikaya Bayram et al., 2010; Wiemann et al., 2010). Nuestros resultados han indicado que en ausencia de VE-1 la disminución de la síntesis de carotenos no sólo se produce en micelio vegetativo (Olmedo et al., 2010) sino que también tiene un defecto en la producción de neurosporaxantina en los conidios independientemente de la luz. *Neurospora crassa* es capaz de producir carotenos en sus conidios en oscuridad y en mutantes *wc* (Ballario & Macino, 1997). Nuestros resultados muestran que la producción de carotenos en los conidios del mutante *Ave-1* es menor que en la estirpe silvestre, lo que indica que VE-1 es necesario para la máxima producción de neurosporaxantina en los conidios independientemente de la luz. Esta función en la síntesis de carotenos podría llevarse a cabo mediante una regulación de los genes y las proteínas encargadas de la ruta de síntesis de carotenos como *al-1*, *al-2* y *al-3* que se activan independientemente de la luz durante la conidiación (Li et al., 1997).

El mutante *Ave-1* produce más conidios que la estirpe silvestre (Bayram et al., 2008b) pero hemos observado que este efecto sólo se observa en los primeros días de la conidiación. Sin embargo, el principal defecto del desarrollo del mutante *Ave-1* es una reducción del crecimiento de las hifas aéreas durante el desarrollo de los conidios. Esta disminución en la longitud de las hifas aéreas sólo se observa en luz y depende del WCC. Nuestros resultados sugieren que la luz a través del WCC reprime el crecimiento de las hifas aéreas, y que esta represión desaparece cuando VE-1 está presente. Además nuestros

resultados también sugieren que VE-1 debe actuar, preferentemente, en las hifas aéreas iluminadas, pero no en oscuridad (Figura 6.1).

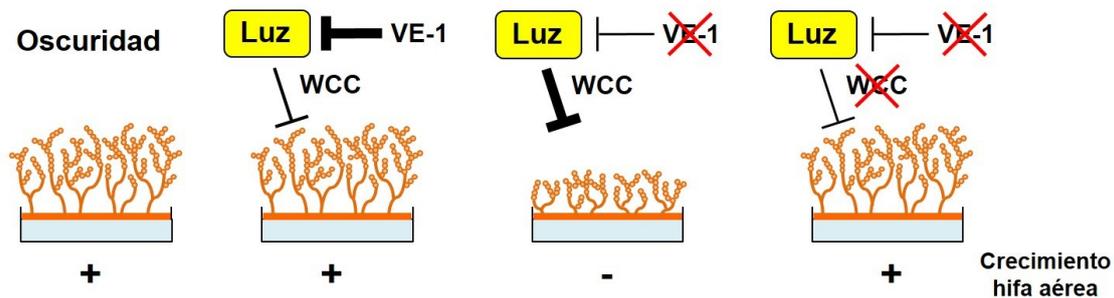


Figura 6.1 Modelo del papel de VE-1 y WCC en el crecimiento de las hifas aéreas durante la reproducción asexual. La luz a través del WCC inhibe el crecimiento de las hifas aéreas y VE-1 reprime el efecto de la luz. El mayor grosor de las líneas indican la predominancia de la inhibición. La cruz roja indica la ausencia de la proteína y los signos + y - crecimiento y no crecimiento de las hifas aéreas respectivamente.

Como la proteína VE-1 parece estar implicada en procesos regulados por la luz como la conidiación y la carotenogénesis, *ve-1* era un buen candidato a ser un gen fotoinducible. La caracterización de su transcripción nos mostró que no era así. Aunque la acumulación de ARNm de *ve-1* aumenta levemente tras la iluminación del micelio vegetativo, en ausencia de WC-1 y VVD, la transcripción del gen *ve-1* no sigue el patrón de fotoinducción y fotoadaptación por el WCC. Sin embargo, en el mutante $\Delta wc-1$ existe una desregulación de la transcripción de *ve-1*, aumentando en oscuridad y tras exposiciones a la luz, lo que nos lleva a afirmar que WC-1 puede disminuir la transcripción de *ve-1*. Este efecto no se observa a nivel traduccional ya que la ausencia de WC-1 no desencadena una mayor acumulación de VE-1 quizás porque VE-1 pueda sufrir regulaciones postranscripcionales para evitar que se acumule en exceso en el micelio.

¿Es VE-1 un regulador de la transcripción?

El dominio Velvet de unión a ADN permite proponer que VE-1 puede actuar regulando la transcripción. La localización nuclear de VE-1 apoya nuestra hipótesis de que VE-1 tiene un papel regulador de la transcripción. Los resultados sugieren que VE-1 regula la transcripción de manera diferente en el micelio vegetativo y durante la conidiación.

En ausencia de VE-1 la transcripción de un grupo de genes fotoinducibles disminuye en el micelio vegetativo. Esto podría deberse a que VE-1 es necesario junto

con WCC para la activación completa de estos genes por la luz. La disminución de la activación de los genes *al* y *cao-2* implicados en la carotenogénesis puede ser la causante de la menor producción de carotenos de los conidios del mutante $\Delta ve-1$, ya que estos genes tienen una regulación independiente de la luz durante la conidiación (Li et al., 1997). La disminución de la transcripción de estos genes fotoinducibles podría ser un efecto directo de VE-1, ya que ni la cantidad de WC-1 ni su fosforilación están alteradas en el mutante $\Delta ve-1$. Además tampoco se ha detectado una interacción entre VE-1 y WC-1 en esas condiciones de iluminación, lo que apoya aún más la hipótesis de que VE-1 participa directamente en la regulación por la luz de la transcripción.

El efecto de la falta de VE-1 sobre la regulación de la transcripción durante la conidiación es muy limitado y sugiere que el papel de VE-1 durante el crecimiento de las hifas aéreas no se debe a una modificación de la transcripción de los genes que regulan la conidiación, al menos de los que hemos caracterizado en esta Tesis Doctoral.

Localización de VE-1 durante el desarrollo.

Hemos detectado VE-1 en todas las etapas del desarrollo de micelios iluminados, desde los micelios en crecimiento vegetativo hasta las hifas aéreas con conidios. Además, VE-1 se acumula preferentemente en el núcleo de las hifas aéreas durante la conidiación. Estos resultados nos permiten proponer que VE-1 debe tener un papel relevante en la regulación de este proceso de desarrollo. Sin embargo, VE-1 no se detecta en las hifas aéreas de micelios que se han mantenido en oscuridad. La acumulación de VE-1 en hifas aéreas iluminadas depende del WCC y sugiere que VE-1 participa en la regulación del crecimiento de las hifas aéreas en la luz que hemos observado en esta Tesis Doctoral. Según nuestra hipótesis VE-1 no es necesario para el crecimiento de las hifas aéreas en oscuridad, por eso no detectamos VE-1 en esas condiciones y el mutante $\Delta ve-1$ tiene un crecimiento normal de las hifas aéreas en oscuridad. VE-1 es necesario para el crecimiento de las hifas aéreas en luz y por eso detectamos VE-1 en estas condiciones y se reduce su crecimiento en el mutante $\Delta ve-1$.

Nuestros resultados nos indican que WC-1 y la luz son necesarios para la presencia de VE-1 en las hifas aéreas una vez inducido el desarrollo asexual. Sin embargo, sí existe ARNm de *ve-1* en hifas aéreas en oscuridad donde no se detecta VE-1, por lo que la regulación por la luz de la localización de VE-1 durante el desarrollo asexual puede deberse a una regulación postranscripcional que aumente o disminuya la estabilidad de

VE-1 o a cambios en la regulación de la localización subcelular de la proteína. En la proteína VE-1 además del dominio Velvet y el dominio PEST (Bayram et al., 2008b), hemos identificado un dominio NLS en la parte final de la proteína desde el aminoácido 497 al 506. Esto indica que VE-1 puede tener un papel dentro del núcleo como se ha visto en *Aspergillus nidulans* donde se une a VelB y LaeA activando el desarrollo sexual y el metabolismo secundario (Bayram et al., 2008a). Nuestros resultados en los experimentos de localización subcelular muestran que VE-1 se acumula en el interior del núcleo independientemente de la luz y de WCC en micelio vegetativo, por lo que la señal para que entre en el núcleo una vez sintetizada en el citoplasma durante el desarrollo vegetativo no es lumínica. Tras la inducción del desarrollo asexual en luz la proteína VE-1 se acumula principalmente en el núcleo de las hifas aéreas, por lo que la conidiación y la luz sí podrían desencadenar esta entrada en el núcleo para llevar a cabo su función o formar complejos nucleares. Esta acumulación en el núcleo en micelio aéreo iluminado puede proteger a la proteína VE-1 de una degradación en el citoplasma ya que VE-1 posee un dominio PEST.

Estabilidad y degradación de VE-1.

Nuestros experimentos de adición de CHX revelan que VE-1 es una proteína inestable y que la luz regula su estabilidad. VE-1 es más estable en micelio en luz continua pero la transición de la oscuridad a la luz acelera su degradación como se observa en micelios que sólo se iluminan 30 minutos. Este papel regulador de la luz desaparece en ausencia del WCC, y estos resultados podrían explicar la ausencia de VE-1 en hifas aéreas en oscuridad. Durante la inducción del desarrollo asexual VE-1 está presente en micelio vegetativo tanto en luz como en oscuridad. Cuando comienza la formación de hifas aéreas la luz continua podría promover una mayor estabilidad de VE-1 y su entrada en el núcleo para llevar a cabo su función, lo que la protegería de la maquinaria de degradación citoplasmática.

En esta Tesis se ha determinado que la degradación de VE-1 se lleva a cabo mediante la ruta de degradación ubiquitina/proteasoma. La ausencia de CSN-5, la subunidad del signalosoma Cop9 (CSN) encargada de separar Nedd8 de la ligasa de ubiquitina (Cope et al., 2002), aumenta la estabilidad de VE-1, detectándose incluso tras ocho horas de haber inhibido su síntesis con CHX. Es conocido que las mutaciones en ciertas subunidades del CSN disminuyen la estabilidad de los componentes de la ligasa de ubiquitina, CUL-1, SKP-1, y esto da lugar a la ausencia del marcaje con ubiquitina y

por tanto al bloqueo de la degradación en el proteasoma (Wang et al., 2010). Otra proteína muy importante en esta ruta de degradación es FWD-1 como se ha demostrado en la degradación de FRQ (He et al., 2003). FWD-1 interacciona físicamente con FRQ, y es una proteína adaptadora entre FRQ fosforilado para ser degradado y la ligasa de ubiquitina SCF (He et al., 2003). En el mutante *Δfwd-1* la acumulación de VE-1 es mayor que en la estirpe silvestre. Además, en ausencia de FWD-1, al igual que en ausencia de CSN-5, la inestabilidad de VE-1 desaparece en cualquier condición de iluminación, por lo que asumimos que FWD-1 es vital para la degradación de VE-1 en el micelio vegetativo y que es la proteína que reconoce a VE-1 para su etiquetado con ubiquitina previo a su degradación.

No hemos podido demostrar la interacción física entre VE-1 y FWD-1 mediante ensayos de doble híbrido. Este resultado puede deberse a que para que la ligasa de ubiquitina se una mediante FWD-1 a la proteína a ubiquitinar, ésta debe estar marcada, posiblemente por fosforilación, para entrar en la ruta de degradación. Es posible que *Saccharomyces cerevisiae* no sea capaz de marcar VE-1 y, por tanto, no pueda unirse a FWD-1 para que detectemos la interacción en el ensayo de doble híbrido. Otra causa de los resultados negativos en el ensayo de doble híbrido puede ser que las versiones de FWD-1 utilizadas en el ensayo no sean suficientes para que se lleve a cabo la interacción. Hemos usado una versión a la que le faltaba el extremo amino de FWD-1 y los cinco primeros aminoácidos del dominio F-box necesario para llevar a cabo la ubiquitinación y una rápida degradación. En el caso de la interacción física entre FRQ y FWD-1 sólo se detectó “in vivo” con una versión de FWD-1 carente del dominio F-box (He et al., 2003). En nuestro caso sólo le faltan los 5 primeros aminoácidos de este dominio y pueden ser insuficientes para evitar la rápida degradación y detectar la interacción. La otra versión de FWD-1 que hemos ensayado y que tampoco ha mostrado interacción con VE-1 contiene únicamente el dominio WD40. En *N. crassa* se ha visto que los dominios de una proteína son capaces de interactuar por sí solos en ensayos de doble híbrido sin necesitar la proteína completa (Malzahn et al., 2010); e incluso en experimentos anteriores en el laboratorio donde se ha realizado esta Tesis hemos detectado interacción por doble híbrido entre dominios de proteínas de especies distintas: dominio LOV de MadA de *Phycomyces blakesleanus* y dominio LOV de VVD de *Neurospora crassa*. El resultado negativo en el ensayo de doble híbrido entre el dominio WD40 y VE-1 indicaría

la compleja regulación del marcaje de las proteínas que serán degradadas mediante la ruta ubiquitina/proteasoma en *Neurospora crassa*.

¿Cuál es el papel de VE-1 en *N. crassa*?

Nuestros resultados nos permiten proponer un papel para VE-1 en la regulación transcripcional y del desarrollo de *Neurospora crassa*.

En el micelio vegetativo VE-1 participa en la regulación por la luz de la transcripción y se detecta tanto en el citoplasma como en el núcleo. Los resultados de la localización subcelular mediante fusiones con GFP obtenido en el laboratorio de Stephan Seiler indican una localización únicamente nuclear. Además, los resultados obtenidos en el laboratorio de Ozgur Bayram indican que VE-1 interacciona con otras proteínas de la familia Velvet. Proponemos que VE-1 solo o interaccionando con otras proteínas Velvet participa en la regulación de la transcripción por la luz junto al WCC. No hemos detectado ninguna interacción entre VE-1 y el WCC en experimentos de inmunoprecipitación de VE-1 en micelio vegetativo. Tampoco se ha detectado VE-1 al inmunoprecipitar proteínas del WCC por lo que lo más probable es que WCC y VE-1 no interaccionen a diferencia de lo que se ha observado en *A. nidulans* (Purschwitz et al., 2008). Nuestra propuesta es que VE-1 modula la respuesta transcripcional a la luz independientemente del WCC.

VE-1 es necesario para el crecimiento de las hifas aéreas en la luz. En estas condiciones VE-1 se localiza preferentemente en el núcleo lo que, presumiblemente, la protege de la degradación por el proteasoma. En el núcleo VE-1 podría participar en la regulación génica necesaria durante el desarrollo de las hifas aéreas, pero no hemos detectado aún los genes regulados por VE-1 durante el desarrollo. Además de la localización nuclear, la exposición a la luz continua aumenta la estabilidad de VE-1 lo que facilita su función durante el desarrollo de las hifas aéreas. ¿Por qué no detectamos VE-1 en las hifas aéreas en oscuridad? Hemos detectado el ARNm de *ve-1* pero no la proteína, y proponemos que la rápida degradación de VE-1 en oscuridad es la responsable de su ausencia en estas condiciones. Sin embargo, no podemos descartar un papel de la luz en la regulación de la localización de VE-1 en las hifas aéreas. Esperamos que los experimentos con una estirpe que posee una fusión VE-1::GFP nos permitan aclarar el posible papel de la localización de VE-1 durante el desarrollo y su regulación por la luz.

La regulación por la luz de la estabilidad de VE-1 es un novedoso mecanismo en el que el WCC participa para regular de manera postraduccional la abundancia de una

proteína. Ninguno de los genes que participan en el proceso de ubiquitinación y degradación de VE-1 en el proteasoma está regulado por la luz, y no hemos detectado interacción de VE-1 con WC-1. Tampoco se han publicado interacciones entre el WCC y las proteínas que participan en el proceso de degradación por lo que desconocemos el mecanismo de regulación por la luz de la degradación de VE-1.

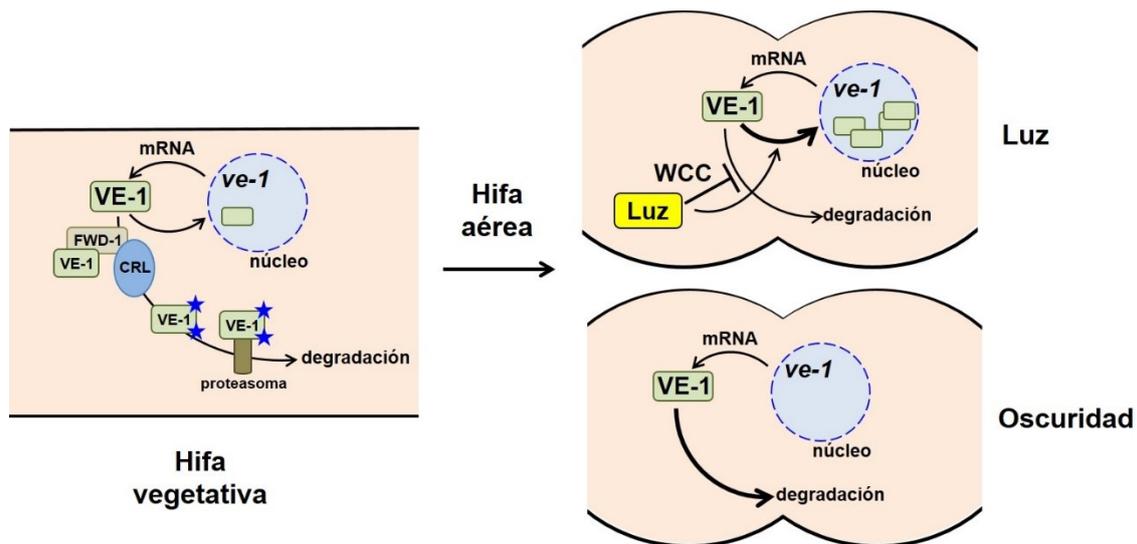


Figura 6.2 Modelo molecular del funcionamiento de VE-1 en micelio vegetativo y aéreo. Las líneas T indican efecto negativo y las flechas efecto positivo. El mayor grosor de las líneas indica la predominancia de la acción. Las estrellas azules indican el marcaje de la proteína para ser degradada por el proteasoma. Los rectángulos verdes indican la cantidad de VE-1 en los distintos compartimentos celulares.

A nivel molecular en el interior de las hifas, proponemos el modelo que aparece representado en la figura 6.2. En hifas vegetativas VE-1 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma tanto en luz como en oscuridad, por lo que proponemos una entrada al núcleo para actuar como regulador transcripcional y una salida al citoplasma para ser marcada y degradada posteriormente por el sistema proteasoma/ubiquitina compuesto por la ligasa de ubiquitina CRL y su adaptador FWD-1 y por el complejo CSN estabilizador de la ligasa de ubiquitina. Cuando el micelio empieza a separarse del sustrato y empiezan a formarse las hifas aéreas, las constricciones y finalmente la liberación de los conidios, la localización de VE-1 está más regulada por la luz, ya que no detectamos VE-1 en oscuridad. En luz, VE-1 entraría mayoritariamente al núcleo llevando a cabo su función transcripcional y estaría protegida de la degradación en el citoplasma. Por el contrario en oscuridad, la proteína se sintetizaría en el citoplasma y sería degradada rápidamente impidiendo que llevara a cabo su función nuclear (Figura 6.2).

La luz tiene un papel importante en la biología de *N. crassa* y regula la estabilidad de VE-1 y su localización durante el desarrollo. Esperamos que averiguar los detalles moleculares del mecanismo que posibilita a la luz regular la cantidad de VE-1 nos permitan entender mejor cómo ocurre el desarrollo en este hongo como un modelo sencillo de regulación de la diferenciación en eucariotas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. El regulador VE-1 es necesario para alcanzar los niveles máximos de síntesis de neurosporaxantina en los conidios de *Neurospora crassa*.
2. VE-1 no es esencial para la conidiación en *Neurospora crassa* pero actúa como un represor de la conidiación en las primeras 24 horas de cultivo y sólo en oscuridad.
3. VE-1 es necesaria para que la luz no reprima el crecimiento de las hifas aéreas una vez inducida la reproducción asexual.
4. VE-1 no es esencial para que *N. crassa* se desarrolle sexualmente.
5. Ni la proteína VE-1 ni el gen *ve-1* son fotoinducibles por WCC. Pero la ausencia de WC-1 altera la regulación de la transcripción.
6. La ausencia de VE-1 provoca una disminución en la fotoactivación de ciertos genes fotoinducibles como *wc-1*, *vvd*, *frq*, y los genes de la carotenogénesis *al-1*, *al-2*, *al-3* y *cao-2*.
7. VE-1 se localiza tanto en citoplasma como en núcleo durante el desarrollo vegetativo. En micelio aéreo durante el desarrollo asexual en luz VE-1 se acumula mayoritariamente en el núcleo.
8. Durante el desarrollo asexual la localización de VE-1 está regulada por la luz, detectándose en micelio aéreo únicamente en luz y no en oscuridad.
9. VE-1 es una proteína inestable. Su estabilidad está regulada por la luz, degradándose más rápido tras 30 minutos de iluminación y es más estable en luz continua.
10. En la degradación de VE-1 participan el SCF con la proteína adaptadora FWD-1, el signalosoma CSN y el proteasoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estirpes utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Genotipo	Fuente
FGSC#2489	74-OR23-1V <i>mat A</i>	FGSC
FGSC#2490	ORS-SL6a <i>mat a</i>	FGSC
FGSC#11401	<i>ve-1^{KO} mat A</i>	FGSC
FGSC#11701	<i>wc-1^{KO} mat a</i>	FGSC
FGSC#7853	<i>vvd^{SS-692}</i>	FGSC
FGSC#11044	<i>fl^{KO} mat a</i>	FGSC
FGSC#7023	<i>fld^{P628} mat a</i>	FGSC
FGSC#11284	<i>csn-5^{KO} mat a</i>	FGSC
FGSC#11281	<i>csn-1^{KO} mat a</i>	FGSC
FGSC#16115	<i>csn-2^{KO} mat a</i>	FGSC
FGSC#10373	<i>fwd-1^{KO} mat a</i>	FGSC
VE-1::3xFLAG	<i>ve-1::10xgly3xFLAG</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; $\Delta wc-1$	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG wc-1^{KO}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; Δvvd	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG vvd^{SS-692}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; Δfl	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG fl^{KO}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; <i>fld</i>	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG fld^{P628}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; $\Delta csn-1$	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG csn-1^{KO}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; $\Delta csn-5$	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG csn-5^{KO}</i>	Esta Tesis
VE-1::3xFLAG; $\Delta fwd-1$	<i>ve-1:: 10xgly3xFLAG fwd-1^{KO}</i>	Esta Tesis
$\Delta ve-1$; $\Delta wc-1$	<i>ve-1^{KO} wc-1^{KO}</i>	Esta Tesis

Tabla 1. Estirpes utilizadas en esta Tesis.

Para las clonaciones de plásmido se usó *Escherichia coli* DH5 α (*huA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) (Taylor et al., 1993). En el etiquetado de genes en *Neurospora* se utilizó para la construcción de casete la levadura FY834 (*MAT α his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*).

2. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Uso
con10-45F	CAGCCACAGCGGAGGC	RT-PCR
con10-104R	TTGGAGCAATTTTCGCGC	RT-PCR
ve1-939F	CGGAGGCCATCTGGGTTT	RT-PCR
ve1-998R	GGTGGTTGAGCGGGATACTG	RT-PCR
al1-266F	TCCAATGTTTCCCCAACTACAAC	RT-PCR

al1-328R	CGGTGGTGGGCGAGAA	RT-PCR
RT-al2-F	CGCTATCGCCTACCCATT	RT-PCR
RT-al2-R	CGACGAGGAAGCCTGTTTG	RT-PCR
al3-165F	CATCTCTTCCGCCGGTCTAG	RT-PCR
al3-227R	ACCGAGGCCTTGCGTTTAC	RT-PCR
cao2-F	TCAAGGGACTGAGAGAGCCG	RT-PCR
cao2-R	CGTTGACGTTGTTGTGCCAC	RT-PCR
frq-436F	AGCGCCGCCGATGAC	RT-PCR
frq-499R	CCTTAAGCCGCTTGTTTTCG	RT-PCR
fl-811F	GGCGATTCCCCTACTGTT	RT-PCR
fl-869R	TTGCAGGCCTTCCCAA	RT-PCR
fld-1275F	CGCCAACGCCAGAA	RT-PCR
fld-1350R	GCAGCGCATGACAACGAA	RT-PCR
wc1-2895F	AGCAGACTGGGCGCGTAT	RT-PCR
wc1-2960R	TCTTGCTCATCGAATCACCATT	RT-PCR
vvd-206F	CGTCATGAGCTCTGATTCTG	RT-PCR
vvd272R	GCTCCGAGGCGTACACAA	RT-PCR
tub-1073F	CCCGCGGTCTCAAGATGT	RT-PCR
tub-1139R	CGCTTGAAGAGCTCCTGGAT	RT-PCR
ve15'F	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG GGGTCGTCTGCAGACTCCTTCG	PCR
ve15'R	CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC ATACCCGCCAATATCTGCCTGC	PCR
ve13'F	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG ACGGTTATGTTCTTTGTGGGATTTCTT	PCR
ve13'R	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC CAGGCCACTTACTAACCGGTCC	PCR
fwd1-F- NdeI	GAACCATATGCCTAAAGATTCTGGGGTACC	PCR
fwd1-R- EcoRI	CAAGGAATTCTTACTGCACAGTGTCAAAG	PCR
ve1-F-NdeI	GAATTCATATGATGGGTGCTCAGGTTA	PCR
ve1-R-EcoRI	CAAATGAATTCTCAATACCCGCCAATA	PCR
WD40-F-NdeI	GAACCATATGCAGCTTCCCCACCCAACTAT	PCR
WD40-REcoRI	CAAGGAATTCTCACTCTACGCTGTACGGATGGTC	PCR
wc-1UTR-F	CCGCCGCAGACCAGTAGAGGCTCAG	PCR
ve-1UTR	GCGCTCATTTTCGCAGAGACCCC	PCR
csn1UTR	CGAAGGCATCAACGCAAAC	PCR
csn5UTR	GGAATAAGGTATGTACGG	PCR
fwd1UTR	CAGCAGCTGTCCTTCATTTT	PCR
vvd-F	ATGAGCCATACCGTGAACCTCG	PCR
vvd-R	TCATTCCGTTTTCGCACTGGAAAC	PCR
hygB-R	CGTGCACGCGGATTTTCGGCTCC	PCR

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis.

3. Medios y condiciones de cultivo.

3.1 Medio y condiciones de cultivo de *Neurospora crassa*.

El medio utilizado para el crecimiento de *Neurospora* fue medio mínimo Vogel (Vogel, 1956;1964) con diferentes fuentes de carbono dependiendo del experimento. Para realizar los diferentes medios de *Neurospora* se necesitan los siguientes stocks:

- Sales de Vogel 50X: 125 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 250 g de KH_2PO_4 anhidro, 10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g de NH_4NO_3 anhidro, 5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 ml de solución de biotina y 5 ml de solución de oligoelementos se disolvieron secuencialmente en 775 ml de agua destilada. Luego se llenó hasta 1 litro y se añadieron 5 ml de triclorometano como conservante. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvió previamente en 20 ml de agua destilada y se añadió lentamente a solución de sales para evitar su precipitación.
- Solución de Biotina: Se disolvieron 5 mg de biotina en 100 ml de etanol al 50%. Se almacenó a -20°C .
- Elementos traza: 5 g de ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de H_3BO_3 y 0,05 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron secuencialmente en 95 ml de agua destilada. Se almacenó a 4°C protegido de la luz.

3.1.1 Cultivo líquido.

Los cultivos líquidos se realizaron en placas de Petri o matraces y se usaron para extracciones de ADN, ARN y proteínas. El detergente Tween 80 se utilizó para evitar la formación de hifas aéreas y que el micelio se desarrollara únicamente en estado vegetativo. Los cultivos líquidos se inocularon con suspensiones de conidios y se incubaron a 30°C o 34°C durante 24 o 48 horas dependiendo del experimento. La composición del medio Vogel líquido es:

-Medio mínimo líquido con sacarosa: 1X sales Vogel, 2% [w/v] sacarosa, 0.2% [v/v] Tween 80.

3.1.1.1 Tratamiento con cicloheximida y/o tiolutina.

Para los experimentos de adición de cicloheximida (CHX) y/o tiolutina las diferentes estirpes se cultivaron en placa de Petri con 20 ml de Vogel líquido sin agitación durante 24 horas a 34°C . Una vez que el micelio había crecido, se recortaron discos de micelio con un falcon de 15 ml estéril y se traspasaron a un matraz con 200 ml de Vogel

líquido que se incubó en agitación a 30°C durante otras 24 horas para que el micelio estuviera en crecimiento activo cuando se añadieran las drogas. Transcurridas las segundas 24 horas, las muestras que correspondían a condiciones de iluminación se iluminaron 30 minutos y justo después se añadían las drogas a todos los matraces con las distintas condiciones de iluminación (oscuridad, 30 minutos de luz y luz continua). Posteriormente se recogieron discos de micelio del interior del matraz a distintos tiempos tras la adición de las drogas. La cicloheximida se usó a una concentración de 0,1 mg/ml y la tiolutina a 50µM (Figura M1).

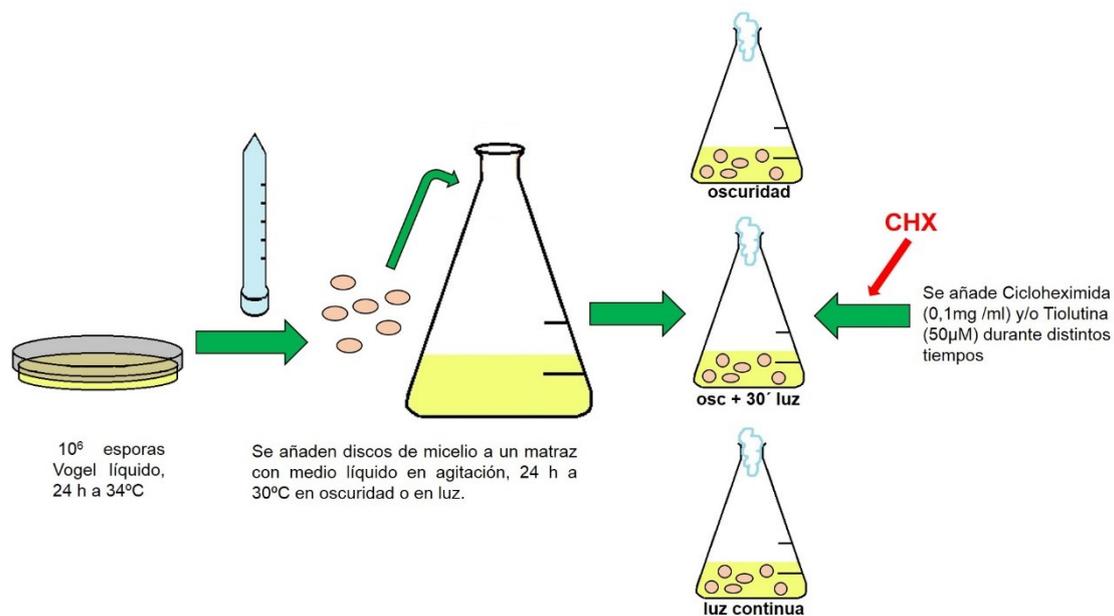


Figura M1. Método de cultivo para el estudio de la estabilidad de VE-1 mediante tratamiento con CHX y/o Tiolutina.

3.1.2 Cultivo sólido.

Se utilizaron cultivos sólidos para la propagación de las cepas, la producción de conidios, el crecimiento colonial, las transformaciones de conidios, los cruzamientos sexuales y la inducción de la fase asexual.

3.1.2.1 Propagación de las cepas.

Las distintas estirpes se mantuvieron en tubos de agar inclinado que contenían 5 ml de medio Vogel Sólido. El medio fundido se añadió a los tubos y se inclinaron antes de la solidificación para obtener mayor superficie de conidiación. Una vez inoculados los tubos con las estirpes de estudio se incubaron a 34°C durante dos días y luego se

expusieron a ciclos de luz y oscuridad ambientes para favorecer la conidiación. Se utilizó medio suplementado con higromicina para estirpes portadoras de una copia del gen *hph* que les da la resistencia a higromicina.

La composición de los medios utilizados es:

- Medio mínimo con sacarosa: 1X sales de Vogel, sacarosa al 2% [p/v], agar al 1,5%[p/v].
- Medio mínimo con sacarosa / Hygromicina B: 1X sales de Vogel, 2% [p/v] de sacarosa, 1,5%[p/v] de agar, 200 µg/ml de higromicina B (Roche®).

3.1.2.2 Recolección de conidios.

Se añadieron 50 ml de medio fundido a matraces de 250 ml estériles. Antes de la solidificación del agar, el medio fundido se extendió por las paredes del matraz para ampliar la superficie de conidiación. Una vez que el medio solidificó se inocularon los conidios y se cultivaron durante dos días a 34°C. Luego se mantuvieron a temperatura y ciclos de luz/oscuridad ambientes durante una semana para asegurarnos una máxima conidiación de las estirpes. Los conidios se recogieron añadiendo 50 ml de sorbitol 1M y dejando los matraces en agitación durante 5 minutos, luego se filtraron a través de una gasa estéril. La cuantificación se realizó en una cámara de Bürker y los conidios recogidos se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los medios utilizados para esta técnica son:

- Medio mínimo con sacarosa: 1X sales de Vogel, sacarosa al 2% [p/v], agar al 1,5%[p/v].
- Medio mínimo con sacarosa / Hygromicina B: 1X sales de Vogel, 2% [p/v] de sacarosa, 1,5%[p/v] de agar, 200 µg/ml de higromicina B (Roche®).

3.1.2.3 Crecimiento colonial.

El crecimiento conidial de *Neurospora* se obtiene utilizando sorbosa como principal fuente de carbono en el medio. *Neurospora* no puede usar la sorbosa para el crecimiento, así que el micelio tiene una extensión limitada y la producción conidial se reduce. Este medio fue utilizado para el crecimiento de los conidios transformados y para el crecimiento de las ascosporas productos de los cruzamientos sexuales. Se utilizó la suplementación con higromicina para la selección de estirpes con una copia del gen *hph*. Los medios para crecimiento colonial se conocen como FGS o FGS con higromicina.

- Medio mínimo con sorbosa (FGS): 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p/v], solución 1X

de solución FGS.

- Medio mínimo con sorbosa / higromicina B (FGS + higromicina): 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p / v], 1X de la solución FGS, 300 µg/ml de higromicina B (Roche®).

• Solución de FGS 10X: sorbosa al 10% [p/v], 0,5% [p/v] de glucosa, fructosa al 0,5% [p/v].

3.1.2.4 Medio de cruce.

Se usó medio de cruce para cruzar sexualmente dos estirpes de diferente tipo sexual. Placas de Petri con 25 ml de medio de cruce se inocularon con conidios o una pequeña cantidad de micelio de las dos cepas colocadas a ambos extremos de la placa. Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se sellaron con parafilm para limitar la cantidad de oxígeno disponible. Luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante unas semanas hasta que se liberaron las ascosporas. Las ascosporas se recogieron de la tapa de la placa de Petri con agua estéril y se activan a 60°C durante 45 minutos antes de sembrarlas en el FGS.

El medio de cruce está compuesto por: 10 g/l de sacarosa, 1 g/l KNO₃, 0,7 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g/l NaCl, 0,1 g/l de Cl₂Ca, 0,1 ml/l de elementos traza, 0,1 ml/l de biotina y 20 g de agar.

3.1.2.5 Inducción del desarrollo.

La inducción al desarrollo se llevó a cabo mediante el método descrito por (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004) con algunas pequeñas modificaciones. Las estirpes se cultivaron durante 24 horas en matraces con medio líquido en agitación y luego se filtraron sobre un papel de filtro con ayuda de una bomba de vacío. El micelio sobre el papel de filtro se invirtió sobre otro papel de filtro colocado en una placa de medio sólido con 0,45% [p/v] de agar. Estas placas se incubaron a 30°C durante 15 o 24 horas y en luz u oscuridad dependiendo de las condiciones necesarias para cada experimento. El micelio vegetativo que quedó entre los dos papeles de filtro creció a través del papel de filtro superior hasta ponerse en contacto con el aire para formar las hifas aéreas. El micelio vegetativo y las hifas aéreas pudieron ser recogidos por separado gracias a la separación física de los papeles de filtro (Figura M2).

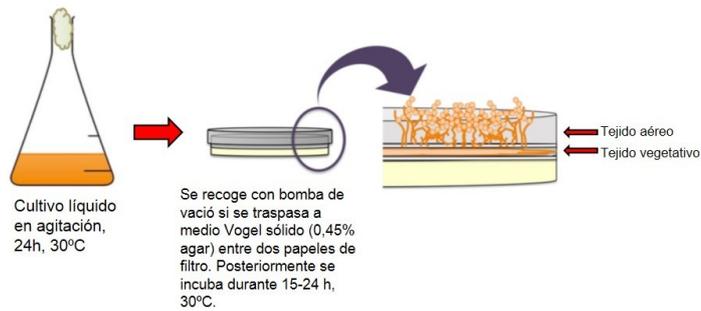


Figura M2. Método de inducción al desarrollo descrito en (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). Figura modificada de Ruger-Herreros (2014).

3.2 Medio y condiciones de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Distintas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se usaron para la construcción del casete de etiquetado y para los ensayos de doble híbrido. Las levaduras se cultivaron a 30°C durante diferentes tiempos dependiendo del experimento. Los medios utilizados fueron:

- YPD: 1% [p/v] de extracto de levadura, 2% [p/v] de bactopectona, 2% [p/v] de glucosa. Añadir 2% [p/v] de agar para medio sólido.
- Medio SC mínimo: 0,17% [p/v] YNB sin NH₄SO₄ ni aminoácidos, NH₄SO₄ al 0,5% [p/v], glucosa al 2% [p/v]. Añadir 2% [p/v] de agar para medio sólido. Suplemento con aminoácidos si es necesario.

3.3 Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

El medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *Escherichia coli* fue el medio LB (Luria & Burrous, 1957) suplementado con los antibióticos apropiados. Los cultivos se realizaron a partir una única colonia en cultivos líquidos o sólidos y se cultivaron a 37 °C durante 12 horas. La composición de los medios utilizados es:

- Medio Luria-Bertani (LB): 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl se disolvieron secuencialmente en 950 ml de agua destilada, se llenaron hasta 1 litro y se ajustó el pH a 7,5 antes del autoclavar. Los cultivos sólidos se suplementaron con agar al 2%[p/v].
- Stock ampicilina: 10% [p/v] de ampicilina sódica en agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C. Se usó en medio LB a 0,01% [p/v].
- Stock kanamicina: 5% [p/v] de ampicilina sódica en agua destilada. Se esterilizó por

filtración y se almacenó a -20°C. Se usó en medio LB a 0,005% [p/v].

4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

4.1 Extracción de ADN.

El ADN de los organismos utilizados en esta tesis se extrajo de micelio cultivados mediante el protocolo indicado en GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich).

El ADN plasmídico se asiló a partir de cultivos líquido de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* cultivados durante 12 horas a 37°C o 30°C usando el kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich). Los cultivos de levadura se centrifugaron, se resuspendieron en 640 µl de solución de zimolasa y se incubaron a 37°C durante 1 hora antes del aislamiento del plásmido. La solución de zimolasa contiene: 0.9 M sorbitol, 0.1M EDTA pH 8, 0.01% [v/v] β-mercaptoetanol, 150 µg de zimolasa 20T.

4.2 Extracción de ARN.

Aproximadamente 100 mg de micelio se mezclaron con *RLC Buffer* (RNeasy Plant Mini kit-QUIAGEN), con 1,5 g de perlas de zirconio (0,5 mm de diámetro) y se sometieron a dos pulsos de 0,5 min en un homogeneizador celular (FastPrep-24, MP Biomedicals). Posteriormente se siguió el procedimiento del RNeasy Plant Mini kit-QUIAGEN. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNase I (USB) antes de su uso en los experimentos de RT-PCR cuantitativa.

5. Reacción en cadena de la polimerasa.

5.1 PCR convencional.

La reacción de PCR convencional se hizo usando la polimerasa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA) mezclando: 1,5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 1µl de dNTPs (10 mM de cada nucleótido), 10 µl de 5X Green GoTaq Flexi Buffer, 5 µl de MgCl₂ 25mM, 1,25 U de polimerasa y 1 µl ADN (10-50 ng) y se añadió agua destilada hasta llegar a 50 µl . La reacción consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos para la amplificación del ADN donde se incluían 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura adecuada para los pareja de cebadores, y un tiempo variable a 72°C o 68°C dependiendo de la longitud del producto de PCR, generalmente 1 minuto por cada kb. Tras estos ciclos, se añadió un ciclo de 5 minutos a 72°C. La polimerasa GoTaq se ha utilizado para PCRs de comprobación de clonaciones. Los productos de PCR utilizados para las clonaciones de la Tesis se hicieron usando la polimerasa Expand High Fidelity

PCR System (Roche) mezclando: 1,5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 1µl of dNTPs (10 mM de cada nucleótido), 5 µl de Buffer III, 5 µl de MgCl₂ 25mM, 1,25 U de polimerasa y 1 µl ADN (10-50 ng) y añadiendo agua destilada hasta llegar a 50 µl. La reacción consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos para la amplificación del ADN incluyendo de 30 segundos a 94°C, 30s a la temperatura determinada para la pareja de cebadores, y tiempo variable a 72°C o 68°C dependiendo de la longitud del producto de PCR, generalmente 1 minuto por cada kb. Tras estos ciclos, se añadió un ciclo de 5 minutos a 72°C.

5.2 RT-PCR cuantitativa.

Para los experimentos de expresión génica se realizó RT-PCR cuantitativa en un LightCycler 480 II (Roche) utilizando el Kit de RT-PCR PrimeScript™ de One Step (Takara Bio Inc.), 0,2 µM de cada cebador y 50 ng de ARN en una reacción de 10 µl . La reacción consistió en 5 min a 42°C, seguido por 10s a 95°C, y luego 40 ciclos de amplificación de ADNc (5s a 95°C y 20s a 60°C). Después de cada RT-PCR se realizó análisis de la curva de fusión para mostrar la amplificación específica de segmentos de ADN único y la ausencia de ADN amplificado no específico. La señal fluorescente obtenida para cada gen se normalizó a la señal fluorescente correspondiente obtenida con el gen *tub-2* de *Neurospora crassa* para corregir los errores de muestreo.

6. Transformación de *Escherichia coli*.

6.1 Choque térmico.

El método de choque térmico se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5a. Se mezclaron células competentes (50 µl) con la cantidad apropiada de ADN y se mantuvieron durante 20 minutos en hielo. Luego se incubaron durante 45 segundos a 42°C y se pusieron inmediatamente en hielo durante 3 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de medio LB a las células y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación moderada (200 rpm). Después de este tiempo, se sembraron 100 µl de suspensión de células en una placa Petri con 25 ml de medio sólido LB con el antibiótico apropiado y el resto se centrifugó, se retiró casi todo el sobrenadante y el resto se sembró en otra placa de LB con antibiótico. Las placas se cultivaron durante 12 horas a 37°C. Este método se usó normalmente para amplificar vectores.

7. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó siguiendo un protocolo modificado de (Gietz & Woods, 2002). Se inoculó una única colonia de la cepa FY834 en matraces de 100 ml con 25 ml de medio YPD y se cultivó durante 12 horas a 30°C en agitación. A continuación, el cultivo se diluyó hasta una densidad óptica (600 nm) de 0,2 en 25 ml de YPD y se incubó a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 0,7. Las células se recogieron, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron. Las células se lavaron una vez con 500 µl de SOLUCIÓN-I (SLN-I) y finalmente se resuspendieron en 250 µl de SLN-I. Para cada transformación, se mezclaron 50 µl de suspensión celular, 120 ng de plásmido linealizado pRS426, 5 µl de cada PCR de interés, 1 µl de ADN de esperma de salmón (100 ng / µl) y 300 µl de SOLUCIÓN II (SLN-II). Se mezcló todo con ayuda de la pipeta y se incubó a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos seguido de 3 minutos de incubación en hielo. Las levaduras se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con agua destilada, y se resuspendieron sobre 1 ml de YPD para ser incubadas durante al menos 1 hora a 30°C en agitación. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron, se resuspendieron en 150 µl de agua destilada estéril y se sembraron sobre placas SC sin los aminoácidos necesarios para la selección de las levaduras que hayan integrado el plásmido. Las colonias individuales aparecieron en los siguientes 3-4 días y se verificaron por PCR. Este método se usó para la generación de los casetes para etiquetar genes en *Neurospora crassa* y en el ensayo de doble híbrido.

Las soluciones necesarias son:

- TE 10X: 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.01 M EDTA.
- SLN-I: TE 1X, 0.1 M acetato de litio.
- SLN-II: TE 1X, 0.1 M acetato de litio, 40 % [w/v] PEG 3500.

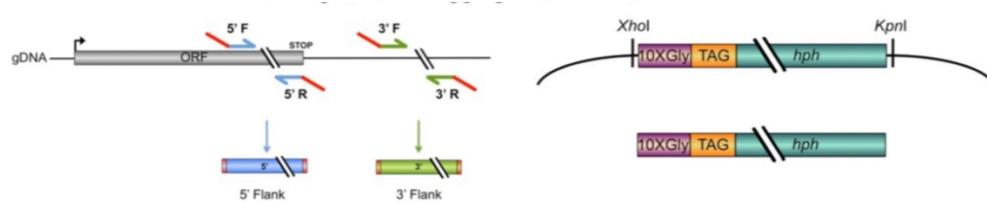
8. Transformación de *Neurospora crassa*.

8.1 Generación del casete para el etiquetado de genes.

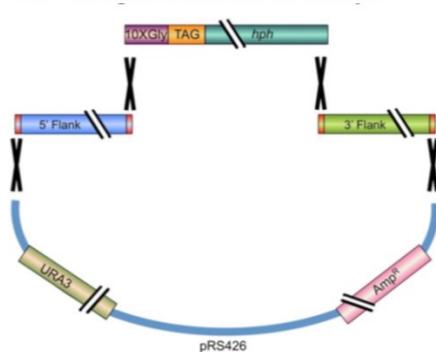
La generación de la proteína VE-1 fusionada a una etiqueta en *Neurospora crassa* se realizó siguiendo el método descrito por (Honda & Selker, 2009) con algunas modificaciones. Este método se basa en la generación de un casete de *knock-in* que permite la adición de una etiqueta en el C-terminal de la proteína. Para la generación del casete con la etiqueta se amplifican con zonas flanqueantes al lugar del genoma donde queremos la inserción del casete. Estas zonas flanqueantes son de aproximadamente 1,2

kb cada uno, uno justo antes del codón de parada (5') y el otro después del codón de parada (3') en la región intergénica. Los fragmentos 5' y 3' se obtienen por PCR usando cebadores con una cola complementaria al fragmento que contiene la etiqueta por digestión del plásmido p3xFLAG::hph::loxP (Genbank # FJ457009). El fragmento de la etiqueta contiene un adaptador de poliglicina (10xGly) antes de la etiqueta que va seguida del gen *hph* que confiere resistencia a higromicina. Esta resistencia será utilizada para seleccionar los transformantes. Los tres fragmentos (dos productos de PCR 3' y 5' y un fragmento lineal que incluye la etiqueta) y el plásmido pRS426 linealizado se usaron para fabricar los casetes knock-in por recombinación en una cepa auxotrófica de *S. cerevisiae* (Oldenburg et al., 1997).

1. Generación de zonas flanqueantes y digestión del vector para el etiquetado



2. Recombinación homóloga en levaduras



3. Generación del casete con el gen etiquetado

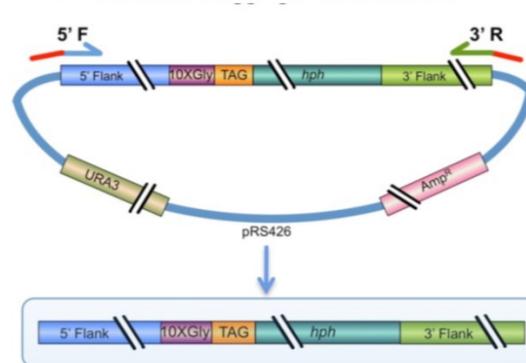


Figura M3. Generación del casete knock-in de etiquetado por recombinación homóloga en levaduras. Figura modificada de Ruger-Herreros (2014).

8.2 Transformación de conidios de *Neurospora crassa* por electroporación.

Una vez obtenido el casete de etiquetado la transformación de *Neurospora crassa* se realizó mediante electroporación (Colot et al., 2006). La estirpe mutante *Δmus-52::bar* se cultivó en tubos de agar inclinado a 34 °C para obtener conidios maduros que se recogieron con sorbitol 1M frío. El número de conidios se determinó contando en una cámara de Bürker. Aproximadamente 10⁸ conidios en un volumen de 40 μl de sorbitol 1M se echaron en una cubeta de electroporación con 5-10 μl de producto de PCR del casete de etiquetado (0,2 a 1 μg). La electroporación se realizó con un electroporador BTX Electro Cell Manipulator (Modelo ECM 630) a 1500V, 600Ω y 25μF. Después del

pulso eléctrico se añadió de inmediato 1 ml de frío sorbitol 1M a la cubeta. Posteriormente se mezcló 150 µl de la suspensión conidial electroporada con 850 µl de solución de regeneración y se incubó durante al menos 2 horas a 30°C con agitación (200 rpm). A continuación, la suspensión conidial se añadió a 6 ml de agar de regeneración y se extendió en placas de FGS suplementadas con extracto de levadura e higromicina y se cultivaron a 30°C durante 4 o 5 días hasta la aparición de colonias.

Los medios requeridos son:

- Solución de recuperación: Vogel 1X, extracto de levadura al 2% [p/v].
- Agar de regeneración: 1X sales de Vogel, extracto de levadura al 2% [p/v], Sorbitol 1M 1%[p/v], agar, solución de FGS 1X, 300 µg/ml de higromicina B (Roche).
- Medio mínimo para las transformaciones: 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p/v], solución 1X FGS, 300 µg/ml Higromicina B (Roche).

9. Análisis de proteínas.

9.1 Extracción de proteínas totales.

Los micelios (100mg) se mezclaron con 500 µl de tampón PEB que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa y se trituró con 1,5 g de perlas de zirconio (0,5 mm de diámetro), en un homogeneizador celular (FastPrep-24, MP Biomedicals) en dos pulsos de 30 segundos separados por una incubación de 5 minutos en hielo. Después de triturar los micelios, los extractos totales se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Las concentraciones de proteínas se midieron por espectrometría usando un Nanodrop (Abs 280 nm) o un ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Las soluciones utilizadas son:

- PEB: 50 mM HEPES pH 7.4, 10% [v/v] glicerol, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA.
- Inhibidores de proteasas: leupeptina (1 µM), pepstatina (1 µM), and PMSF (50 µM).

9.2 Hibridación de Western.

Las proteínas de lisados celulares totales, fracciones citoplasmáticas, nucleares o inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE en geles de acrilamida: bisacrilamida (29:1) al 7,5% o 10%. Las muestras se resuspendieron en tampón Laemmli 1X y se

hirvieron durante 5 minutos a 95°C antes de cargar en geles. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE usando el tampón 1X SDS-Running. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Como marcador de peso molecular se utilizaron las Precision PlusTM Standards All Blue de Bio-Rad. La equitatividad de la carga se confirmó mediante tinción de las membranas con solución de Ponceau S o mediante tinción del gel con Coomassie. Las membranas se lavaron durante 15 minutos antes de bloquear usando TBS 1X. El bloqueo se llevó a cabo utilizando leche en polvo al 5% disuelta en TBS 1X durante al menos 1 hora con agitación moderada a temperatura ambiente antes de la incubación con anticuerpos primarios. Los anticuerpos utilizados en esta tesis se detallan en la tabla TM.1. Los anticuerpos secundarios (α MOUSE y α RABBIT) se conjugaron con la peroxidasa de la planta *Armoracia rusticana* (rábano). La actividad de la peroxidasa se detectó usando quimioluminiscencia (ECL Prime Reagent GE Healthcare).

Las soluciones utilizadas son:

- Laemmli Buffer (4X): Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS al 8% [p/v], glicerol al 40% [v/v], β -mercaptoetanol al 4% [p/v] Bromofenol azul.
- Gel de acrilamida al 4% (*stacking*): 4% [p/v] bisacrilamida (29: 1), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS al 0,1% [p/v], APS al 10% [p/v], 0,2% [v/v] TEMED.
- Gel de acrilamida al 10% (*running*): 7,5%, acrilamida al 10% [p/v]:bisacrilamida (29: 1), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS al 0,1% [p/v], 0,5% APS 10% [p/v], 0,2% [v/v] TEMED.
- Tampón SDS-Running(10X): 0,4 M Tris base, 1,2 M Glicina, 1% [p/v] SDS.
- Tampón de transferencia semi-seca: base de Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol al 20%[v/v],0,05%[P/v]SDS.
- Solución Ponceau S: 0,1% [p/v] Ponceau S, 3% [p/v] TCA.
- TBS (10X): NaCl 1,5 M, base Tris 33 mM. Ajustar a pH 7.5.
- Solución de bloqueo: Leche desnatada al 5% [p/v] (Difco), TBS 1X.

Anticuerpo	Tipo	Concentración	Origen	Uso
FLAG	Monoclonal	1/10000	Mouse	Western blot, IP
WC-1	Policlonal	1/250	Rabbit	Western blot
hH3	Policlonal	1/10000	Rabbit	Western blot

<i>α</i>MOUSE	Monoclonal	1/10000	Goat	Western blot
<i>α</i>RABBIT	Monoclonal	1/10000	Goat	Western blot

Tabla 3. Anticuerpos usados en esta Tesis.

9.3 Tinción de geles de poliacrilamida.

9.3.1 Tinción Coomassie.

Los geles de acrilamida se tiñeron usando solución de Coomassie durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se sumergieron en la solución de destinción en agitación a temperatura ambiente hasta que se visualizaban con nitidez las bandas deseadas.

- Solución de tinción de Coomassie: metanol al 45% [v/v], ácido acético al 10% [v/v], Azul de Coomassie al 0,1% [p/v].

- Solución de destinción: metanol al 5% [v/v], ácido acético al 7,5% [v/v].

10. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de núcleos.

Los lisados celulares y los núcleos celulares totales se se obtuvieron basándonos en el método descrito por Baum y Giles con algunas modificaciones (Baum & Giles, 1985; Froehlich et al., 2002; Schwerdtfeger & Linden, 2000). Los micelios (4-5 g de peso húmedo) crecidos en medio líquido se recogieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron a un polvo fino en nitrógeno líquido usando un mortero. El micelio en polvo se mezcló con 8 ml de tampón A. El extracto bruto se filtró a través de una gasa y se añadió 2 volúmenes del tampón B al filtrado con agitación. Posteriormente el homogeneizado se añadió lentamente para no mezclar las capas sobre 10,4 ml de tampón C en un tubo Ultra-Clear (25x89 mm, Beckman) y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C en un rotor SW32Ti (Beckman) para eliminar los residuos celulares. Se tomó una alícuota de 1 ml del sobrenadante (lisado celular total), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. El sobrenadante restante se añadió también lentamente sobre un gradiente de sacarosa 1M de 5 ml y se centrifugó a 9400 g durante 30 minutos a 4°C con el rotor SW32Ti. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (fracción citoplásmica), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El sedimento nuclear resultante se resuspendió en 0,5 ml de tampón D, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Todos los tampones contenían inhibidores de proteasas. Se usaron fracciones totales, citosólicas y

nucleares para la transferencia de Western. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Las soluciones utilizadas están compuestas por:

- Tampón A: sorbitol 1 M, Ficoll al 7% [p/v], glicerol al 20% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, EGTA 5 mM, CaCl₂ 3 mM, DTT 3 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.
- Tampón B: glicerol al 10% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl 25mM, pH7,5.
- Tampón C: Compuesto de una mezcla 1: 1,7 de tampones A y B.
- Tampón D: glicerol al 25% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, DTT 3 mM, EDTA 0,1 mM, Tris - HCl 25 mM, pH 7,5.
- Gradiente de sacarosa: sacarosa 1 M, glicerol al 10% (v/v), acetato de magnesio 5 mM DTT 1 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5.
- Inhibidores de la proteasa: leupeptina 1 µM, pepstatina 1 µM y PMSF 50 µM.

11. Extracción de carotenos en *Neurospora crassa*.

Aproximadamente 10⁶ conidios se inocularon en 25 ml de medio Vogel líquido con 0,2 % de Tween 80. Las placas se cultivaron durante 48 horas a 22°C en oscuridad y luego fueron iluminadas con un protector a máxima intensidad de luz (2W/m²) durante 2 minutos, excepto los controles de oscuridad. Una vez iluminadas se volvieron a cultivar en oscuridad a 8°C durante otras 24 horas, incluyendo la placa de oscuridad. Transcurrido ese tiempo los micelios se recogieron, congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Los carotenos se extrajeron de 0,05 g de peso seco de las muestras como se describe en (Schmidhauser et al., 1990).

12. Inmunoprecipitación de VE-1::3xFLAG en *Neurospora crassa*.

Las estirpes se cultivaron a 30°C durante 48 horas. Luego se recogió el micelio mediante una bomba de vacío (8-10 g de peso húmedo), se congeló en nitrógeno líquido y se almaceno a -80°C hasta su utilización. El micelio se trituró a un polvo fino en nitrógeno líquido usando un mortero y se mezcló con 20 ml del tampón IPB con inhibidores de proteasas en un vortex hasta que se observó completamente disuelto. Los pulsos en el vortex se intercalaron con incubaciones de cinco minutos en hielo. Posteriormente, los extractos totales fueron centrifugados a 4°C, a 14300 g durante 20 minutos (rotor JA-20 Beckman). El sobrenadante se echó en tubos de ultracentrífuga y se centrifugaron a 169000 g y 4°C durante 45 minutos (rotor Beckman 70Ti). Del sobrenadante se cogió 1

ml como la muestra de proteína de extracto total (INPUT) y se congeló en nitrógeno líquido. Durante el tiempo que dura la centrifugación de 45 minutos equilibramos 300 μ l de perlas de agarosa unidas al anticuerpo M2-FLAG (Sigma) mediante tres lavados con el tampón IPB seguidos de centrifugaciones a 10000 g y 4°C. Una vez equilibradas las añadimos al resto del sobrenadante obtenido de la segunda centrifugación y lo incubamos durante 3 horas a 4°C en un balanceador para unir VE-1::3xFLAG al anticuerpo de las perlas. Posteriormente se recogen las perlas por centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 1500 g (rotor SX4250). Se recoge 1 ml del sobrenadante como muestra de la fracción de proteínas que no se une al anticuerpo (FT) y se congelan en nitrógeno líquido. Las perlas de agarosa con las proteínas unidas se lavan 3 veces con IPB mediante 3 minutos en agitación y posterior centrifugado a 1500 g. Finalmente se recogen las perlas de agarosa con 500 μ l de tampón IPB y se traspasan a un tubo de 2 ml. Se centrifuga una vez más, se retira totalmente el sobrenadante, se añade 120 μ l de tampón LDS NuPAGE (Invitrogen) y se incuba a 72°C durante 10 minutos para separar las proteínas que se hayan unido al anticuerpo. Las proteínas eluidas se recogen por centrifugación a 1000g a temperatura ambiente y se transfieren a nuevos tubos, esta es la fracción inmunoprecipitada (IP). A la fracción IP es necesario añadirme DTT (50mM) e incubar de nuevo 10 minutos a 72°C. Las concentraciones de proteínas del INPUT y del FT se midieron por espectrofotometría usando Nanodrop (Abs 280 nm). Las muestras INPUT, FT e IP se usaron para hibridación de Western y tinción Coomassie.

-Tampón IPB: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% [v/v] NP-40.

-Cócktel de Inhibidores de proteasas (Roche): 2 pastillas para 250ml de tampón TAP.

13. Ensayos de doble híbrido.

La metodología para los ensayos de doble híbrido fue la indicada en el protocolo del kit Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech).

El sistema del doble híbrido se basa en que muchos factores de transcripción son modulares, presentando al menos dos dominios claramente diferenciados: el dominio de unión a ADN ("binding domain" o BD) y el dominio de activación de la transcripción ("activation domain" o AD). Esta circunstancia ha sido explotada para el desarrollo de métodos que separan los dominios BD y AD en polipéptidos independientes fusionados a otras proteínas de interés, permitiendo detectar la existencia de interacción proteína-proteína *in vivo* mediante la recuperación de la función activadora del factor de

transcripción. En este caso, el método se basa en la fusión de los dominios BD y AD del activador GAL4 de *S. cerevisiae* a proteínas concretas. La interacción entre las proteínas objeto de estudio restaura la función activadora del factor de transcripción, detectable gracias a la expresión de un gen chivato adecuado.

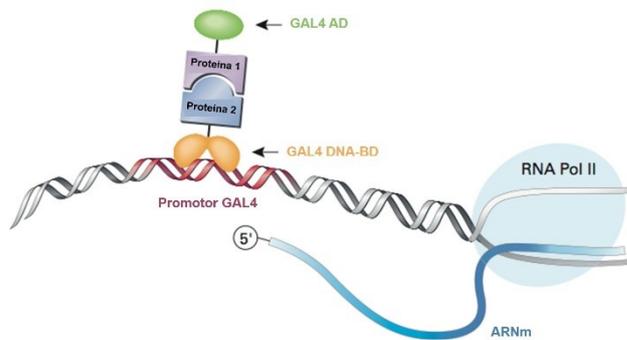


Figura M3. Mecanismo molecular del doble híbrido en levaduras. La interacción de las proteínas de estudio (proteína 1 y proteína 2) reconstituyen al activador de la transcripción GAL4 activando los genes reporteros. Imagen modificada de MatchmakerR Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Clontech

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR y se clonaron en los plásmidos pGDAT7 y pGBKT7 en los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y NdeI. Una vez obtenidas las construcciones se transformaron las levaduras YH2Gold (auxotrofa para Trp) y Y187 (auxótrofa para Leu) de *S. cerevisiae*. Los transformates se seleccionaron en medio mínimo de levaduras ausente de Trp y Leu respectivamente. Posteriormente se obtuvieron diploides de ambas levaduras mezclándolas en YPD sólido durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo los diploides se seleccionaron en medio mínimo de levaduras ausente de Trp y Leu, para comprobar que tenían los dos plásmidos. Finalmente para estudiar si existía interacción entre VE-1 y FWD-1, los diploides se sembraron en medio mínimo de levaduras sin Trp, sin Leu, sin Ade, sin His, ya que únicamente si existe interacción se activaran los genes de síntesis de adenina e histidina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E. P., & Newton, G. G. (1961). The structure of cephalosporin C. *The Biochemical Journal*, 79(2), 377–93.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 35–54.
- Adinarayana, K., Prabhakar, T., Srinivasulu, V., Anitha Rao, M., Jhansi Lakshmi, P., & Ellaiah, P. (2003). Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, 39(2), 171–177.
- Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H.-S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., ... Ficner, R. (2013). The Velvet Family of Fungal Regulators Contains a DNA-Binding Domain Structurally Similar to NF- κ B. *PLoS Biology*, 11(12), e1001750.
- Aronson, B. D., Johnson, K. A., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (1994). Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153), 1578–84.
- Arpaia, G., Cerri, F., Baima, S., & Macino, G. (1999). Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. *Molecular & General Genetics : MGG*, 262(2), 314–22.
- Avalos, J., & Estrada, A. F. (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 930–938.
- Avalos, J., Prado-Cabrero, A., & Estrada, A. F. (2012). Neurosporaxanthin Production by *Neurospora* and *Fusarium*. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 898, pp. 263–274).
- Bailey-Shrode, L., & Ebbole, D. J. (2004). The fluffy gene of *Neurospora crassa* is necessary and sufficient to induce conidiophore development. *Genetics*, 166(4), 1741–9.
- Bailey, L. A., & Ebbole, D. J. (1998). The fluffy gene of *Neurospora crassa* encodes a Gal4p-type C6 zinc cluster protein required for conidial development. *Genetics*, 148(4), 1813–1820.
- Baker, C. L., Kettenbach, A. N., Loros, J. J., Gerber, S. A., & Dunlap, J. C. (2009). Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Molecular Cell*, 34(3), 354–63.
- Ballario, P., & Macino, G. (1997). White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends in Microbiology*, 5(11), 458–462.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., & Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *The EMBO Journal*, 15(7), 1650–7.
- Barrero, A. F., Sánchez, J. F., Enrique Oltra, J., Tamayo, N., Cerdá-Olmedo, E., Candau, R., & Avalos, J. (1991). Fusarin C and 8Z-fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 30(7), 2259–2263.
- Baum, J. A., & Giles, N. H. (1985). Genetic control of chromatin structure 5' to the qa-x and qa-2 genes of *Neurospora*. *Journal of Molecular Biology*, 182(1), 79–89.
- Bayer, T., Zhou, W., Holzhauser, K., & Schügerl, K. (1989). Investigations of

- cephalosporin C production in an airlift tower loop reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 26–33.
- Bayram, Ö., Bayram, Ö. S., Ahmed, Y. L., Maruyama, J.-I., Valerius, O., Rizzoli, S. O., ... Braus, G. H. (2012). The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet*, 8(7), e1002816.
- Bayram, O., & Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*, 36(1), 1–24.
- Bayram, O., Braus, G. H., Fischer, R., & Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., ... Braus, G. H. (2008a). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504–1506.
- Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N., & Braus, G. H. (2008b). *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol*, 45(2), 127–138.
- Bergman, K., Eslava, A. P., & Cerdá-Olmedo, E. (1973). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Molecular & General Genetics: MGG*, 123(1), 1–16.
- Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O., & Borkovich, K. A. (1999). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 8034–9.
- Bieszke, J. A., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A., & Spudich, J. L. (1999). A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry*, 38(43), 14138–45.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., & Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology: CB*, 15(20), 1833–8.
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 527–35.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., ... Pratt, R. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(1), 1–108.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P., & Ballario, P. (2012). Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*, 23(19), 3863–72.

- Brown, L. S., & Jung, K.-H. (2006). Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5(6), 538.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., ... Getzoff, E. D. (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecular Cell*, 11(1), 59–67.
- Calvo, A. M. (2008). The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 45(7), 1053–61.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W., & Keller, N. P. (2004). veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4733–9.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(3), 447–59, table of contents.
- Cardozo, T., & Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(9), 739–51.
- Cary, J. W., OBrian, G. R., Nielsen, D. M., Nierman, W., Harris-Coward, P., Yu, J., ... Calvo, A. M. (2007). Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1107–18.
- Castrillo, M., & Avalos, J. (2014). Light-mediated participation of the VIVID-like protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in pigmentation and development. *Fungal Genetics and Biology*, 71, 9–20.
- Castrillo, M., & Avalos, J. (2015). The flavoproteins CryD and VvdA cooperate with the white collar protein WcoA in the control of photocarotenogenesis in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One*, 10(3), e0119785.
- Castrillo, M., Garcia-Martinez, J., & Avalos, J. (2013). Light-Dependent Functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH Cryptochrome in Development and Secondary Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2777–2788.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5), 503–512.
- Cha, J., Chang, S.-S., Huang, G., Cheng, P., & Liu, Y. (2008). Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *The EMBO Journal*, 27(24), 3246–55.
- Chen, C.-H., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2010). Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16715–16720.
- Chen, C.-H., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2010). *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 47(11), 922–9.
- Chen, C.-H., & Loros, J. J. (2009). *Neurospora* sees the light: light signaling

- components in a model system. *Communicative & Integrative Biology*, 2(5), 448–51.
- Chen, C.-H., Ringelberg, C. S., Gross, R. H., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2009). Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 28(8), 1029–42.
- Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., & Liu, Y. (2003). Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5938–43.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K. H., & Liu, Y. (2002). PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Molecular and Cellular Biology*, 22(2), 517–24.
- Cheng, P., Yang, Y., Heintzen, C., & Liu, Y. (2001). Coiled-coil domain-mediated FRQ-FRQ interaction is essential for its circadian clock function in *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 20(1–2), 101–8.
- Cheng, P., Yang, Y., & Liu, Y. (2001). Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7408–13.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., & Liu, Y. (2003). WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3801–8.
- Christie, J. M., Corchnoy, S. B., Swartz, T. E., Hokenson, M., Han, I.-S., Briggs, W. R., & Bogomolni, R. A. (2007). Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin 1. *Biochemistry*, 46(32), 9310–9.
- Collett, M. A., Garceau, N., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2002). Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. *Genetics*, 160(1), 149–158.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., ... Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10352–7.
- Cope, G. A., & Deshaies, R. J. (2003). COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*, 114(6), 663–71.
- Cope, G. A., Suh, G. S. B., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V., & Deshaies, R. J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5593), 608–11.
- Corrochano, L. M. (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(7), 725–736.
- Corrochano, L. M., & Cerdá-Olmedo, E. (1988). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: Dependence on environmental conditions. *Planta*, 174(3), 309–314.

- Corrochano, L. M., & Garre, V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 893–899.
- Crosson, S., Rajagopal, S., & Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42(1), 2–10.
- Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (1997). *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313), 763–9.
- Dadachova, E., Bryan, R. A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., ... Casadevall, A. (2007). Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PloS One*, 2(5), e457.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T., & Toh, H. (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to Cells*, 9(5), 479–495.
- Davis, R. H. (2000). *Neurospora : contributions of a model organism*. Oxford University Press.
- Degli-Innocenti, F., & Russo, V. E. (1984). Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *Journal of Bacteriology*, 159(2), 757–61.
- Denault, D. L., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2001). WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 20(1–2), 109–17.
- Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., ... Merrill, A. H. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585(2–3), 188–92.
- Diernfellner, A. C. R., Querfurth, C., Salazar, C., Höfer, T., & Brunner, M. (2009). Phosphorylation modulates rapid nucleocytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of *Neurospora* clock protein FRQ on a circadian time scale. *Genes & Development*, 23(18), 2192–200.
- Diernfellner, A. C. R., & Schafmeier, T. (2011). Phosphorylations: Making the *Neurospora crassa* circadian clock tick. *FEBS Letters*, 585(10), 1461–6.
- Dreyer, J., Eichhorn, H., Friedlin, E., Kürsteiner, H., & Kück, U. (2007). A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3412–22.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–90.
- Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2004). The *neurospora* circadian system. *Journal of Biological Rhythms*, 19(5), 414–24.
- Duran, R. M., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary

- for sclerotial formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), 1158–68. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0581-5>
- Ederly, I., Zwiebel, L. J., Dembinska, M. E., & Rosbash, M. (1994). Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2260–4.
- Estrada, A. F., & Avalos, J. (2008). The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genetics and Biology*, 45(5), 705–718.
- Estrada, A. F., & Avalos, J. (2009). Regulation and Targeted Mutation of opsA, Coding for the NOP-1 Opsin Orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *Journal of Molecular Biology*, 387(1), 59–73.
- Franchi, L., Fulci, V., & Macino, G. (2005). Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Molecular Microbiology*, 56(2), 334–45.
- Froehlich, A. C., Chen, C.-H., Belden, W. J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., ... Dunlap, J. C. (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 9(5), 738–750.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2002). White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 815–9.
- Froehlich, A. C., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2003). Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5914–9.
- Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J., & Dunlap, J. C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 2140–52.
- Fuller, K. K., Ringelberg, C. S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2013). The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. *mBio*, 4(2), e00142-13-e00142-13.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., ... Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–868.
- Galland, P., & Lipson, E. D. (1987). Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(1), 104–8.
- Garceau, N. Y., Liu, Y., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (1997). Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell*, 89(3), 469–76.
- García-Martínez, J., Brunk, M., Avalos, J., & Terpitz, U. (2015). The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore

- germination. *Scientific Reports*, 5(1), 7798.
- Garcia-Rico, R. O., Fierro, F., Mauriz, E., Gomez, A., Fernandez-Bodega, M. A., & Martin, J. F. (2008). The heterotrimeric G protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, 154(11), 3567–3578.
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggaar, R., & Kriek, N. P. (1988). Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1806–11.
- Gietz, R. D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K. C., & Woods, R. A. (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172(1/2), 67–79.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96.
- Glass, N. L., Vollmer, S. J., Staben, C., Grotelueschen, J., Metzberg, R. L., & Yanofsky, C. (1988). DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science*, 241(4865), 570.
- Görl, M., Merrow, M., Huttner, B., Johnson, J., Roenneberg, T., & Brunner, M. (2001). A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 20(24), 7074–84.
- Greenwald, C. J., Kasuga, T., Glass, N. L., Shaw, B. D., Ebbole, D. J., & Wilkinson, H. H. (2010). Temporal and spatial regulation of gene expression during asexual development of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 186(4), 1217–30.
- Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., ... Ballario, P. (2006). The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10), 4576–83.
- Han, D.-M., Han, Y.-J., Lee, Y.-H., Jahng, K.-Y., Jahng, S.-H., & Chae, K.-S. (1990). Inhibitory Conditions of Asexual Development and their Application for the Screening of Mutants Defective in Sexual Development. *The Korean Journal of Mycology*, 18(4), 225–232.
- Han, K.-H., Kim, J. H., Moon, H., Kim, S., Lee, S.-S., Han, D.-M., ... Chae, K.-S. (2008). The *Aspergillus nidulans* esdC (early sexual development) gene is necessary for sexual development and is controlled by veA and a heterotrimeric G protein. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(3), 310–8.
- Han, K.-H., Park, J.-S., Chae, K. S., & Han, D.-M. (2010). Simple identification of veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(6), 885–7.
- Han, S., & Adams, T. H. (2001). Complex control of the developmental regulatory locus brlA in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics*, 266(2), 260–270.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R. A., & Adams, T. H. (1993). Translational repression of brlA expression prevents premature development in *Aspergillus*. *The EMBO*

- Journal*, 12(6), 2449–57.
- Harding, R. W., & Melles, S. (1983). Genetic Analysis of Phototropism of *Neurospora crassa* Perithecial Beaks Using White Collar and Albino Mutants. *Plant Physiology*, 72(4), 996–1000.
- He, Q., Cheng, P., He, Q., & Liu, Y. (2005). The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex. *Genes & Development*, 19(13), 1518–31.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., He, Q., Yu, H., & Liu, Y. (2003). FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *The EMBO Journal*, 22(17), 4421–30.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H., & Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 840–3.
- He, Q., & Liu, Y. (2005). Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes & Development*, 19(23), 2888–2899.
- He, Q., Shu, H., Cheng, P., Chen, S., Wang, L., & Liu, Y. (2005). Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17526–32.
- Heintzen, C., & Liu, Y. (2007). The *Neurospora crassa* circadian clock. *Advances in Genetics*, 58, 25–66.
- Heintzen, C., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2001). The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 104(3), 453–64.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–79.
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H., & Kück, U. (2010). Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryotic Cell*, 9(8), 1236–50.
- Honda, S., & Selker, E. U. (2009). Tools for Fungal Proteomics: Multifunctional *Neurospora* Vectors for Gene Replacement, Protein Expression and Protein Purification. *Genetics*, 182(1), 11–23.
- Hong, C. I., Ruoff, P., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2008). Closing the circadian negative feedback loop: FRQ-dependent clearance of WC-1 from the nucleus. *Genes & Development*, 22(22), 3196–204.
- Hunt, S. M., Thompson, S., Elvin, M., & Heintzen, C. (2010). VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16709–14.
- Hurley, J., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Dissecting the mechanisms of the clock

- in *Neurospora*. *Methods in Enzymology*, 551, 29–52.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P., & Heitman, J. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4546–4551.
- Jacobson, D. J., Dettman, J. R., Adams, R. I., Boesl, C., Sultana, S., Roenneberg, T., ... Ushakova, A. (2006). New findings of *Neurospora* in Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. *Mycologia*, 98(4), 550–559.
- Jacobson, D. J., Powell, A. J., Dettman, J. R., Saenz, G. S., Barton, M. M., Hiltz, M. D., ... Natvig, D. O. (2004). *Neurospora* in temperate forests of western North America. *Mycologia*, 96(1), 66–74.
- Jansen, R. P., Hurt, E. C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., & Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 113(4), 715–29.
- Jeong, H. Y., Han, D. M., Jahng, K. Y., & Chae, K. S. (2000). The *rpl16a* gene for ribosomal protein L16A identified from expressed sequence tags is differentially expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 31(2), 69–78.
- Káldi, K., González, B. H., & Brunner, M. (2006). Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output. *EMBO Rep*, 7(2), 199–204.
- Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Atanasova, L., Fekete, E., Páholcsek, M., Sándor, E., ... Kubicek, C. P. (2014). The VELVET A Orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* Regulates Fungal Development and Is Essential for Cellulase Gene Expression. *PLoS ONE*, 9(11), e112799.
- Kato, N., Brooks, W., & Calvo, A. M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1178–86.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., & Chae, K. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 37(1), 72–80.
- Kjaer, D., Kjaer, A., Pedersen, C., Bu'lock, J. D., & Smith, J. R. (1971). Bikaverin and norbikaverin, benzoxanthetrione pigments of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1*, 16, 2792–7.
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, A., Kamerewerd, J., & Kück, U. (2013). Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryotic Cell*, 12(2), 299–310.
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R. V., Godio, R. P., Feltrer, R., Teixeira, F., ... Martín, J. F. (2009). The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 91(2), 214–225.

- Krappmann, S., Bayram, O., & Braus, G. H. (2005). Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryotic Cell*, 4(7), 1298–307.
- Krauss, U., Minh, B. Q., Losi, A., Gärtner, W., Eggert, T., von Haeseler, A., & Jaeger, K.-E. (2009). Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7234–42.
- Kubicek, C. P. (2012). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Kubicek, C. P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 133–42.
- Kües, U., & Fisher, R. (2006). *Growth, Differentiation and Sexuality*.
- Kumagai, T. (1989). TEMPERATURE AND MYCOCHROME SYSTEM IN NEAR-UV LIGHT INDUCIBLE AND BLUE LIGHT REVERSIBLE PHOTOINDUCTION OF CONIDIATION IN *Alternaria* tomato. *Photochemistry and Photobiology*, 50(6), 793–798.
- Lale, G. J., & Gadre, R. V. (2016). Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. *AMB Express*, 6(1), 34.
- Lambrechts, R., Shi, M., Belden, W. J., Decaprio, D., Park, D., Henn, M. R., ... Loros, J. J. (2009). A high-density single nucleotide polymorphism map for *Neurospora crassa*. *Genetics*, 181(2), 767–781.
- Lauinger, L., Li, J., Shostak, A., Cemel, I. A., Ha, N., Zhang, Y., ... Diernfellner, A. (2017). Thiolutin is a zinc chelator that inhibits the Rpn11 and other JAMM metalloproteases. *Nature Chemical Biology*.
- Lauter, F.-R., & Russo, V. E. A. (1991). Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6883–6886.
- Lauter, F. R., & Yanofsky, C. (1993). Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8249–53.
- Lee, C.-Z., Liou, G.-Y., & Yuan, G.-F. (2006). Comparison of the *aflR* gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*. *Microbiology*, 152(1), 161–170.
- Lee, D. W., Kim, S., Kim, S. J., Han, D. M., Jahng, K. Y., & Chae, K. S. (2001). The *IsdA* gene is necessary for sexual development inhibition by a salt in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 39(4), 237–43.
- Lee, J. H., Yoo, H. Y., Yang, X., Kim, D. S., Lee, J. H., Lee, S. K., ... Kim, S. W. (2017). Utilization of algal sugars and glycerol for enhanced cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum* M35. *Letters in Applied Microbiology*, 64(1), 66–72.
- Lee, J., & Zhou, P. (2007). DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Molecular Cell*, 26(6), 775–80.
- Lee, K., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2003). Roles for WHITE COLLAR-1 in circadian and general photoperception in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 163(1), 103–114.

- Leonard, K. J. (1972). Color mutants in *Cochliobolus carbonum*. *Canadian Journal of Botany*, 50(6), 1283–1285.
- Lewis, Z. A., Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K. L., Xie, X., Gomer, R. H., ... Bell-Pedersen, D. (2002). Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 45(4), 917–31.
- Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S., & Calvo, A. M. (2006). FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1418–32.
- Li, Sachs, & Schmidhauser. (1997). Developmental and Photoregulation of Three *Neurospora crassa* Carotenogenic Genes during Conidiation Induced by Desiccation. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 21(1), 101–8.
- Limón, M. C., Rodríguez-Ortiz, R., & Avalos, J. (2010). Bikaverin production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 21–29.
- Linden, H., Ballario, P., & Macino, G. (1997). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 22(3), 141–150.
- Linden, H., & Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 16(1), 98–109.
- Liras, P., & Martín, J. F. (2009). β -Lactam Antibiotics. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 274–289). Elsevier.
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., & Xiong, Y. (2002). NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Molecular Cell*, 10(6), 1511–8.
- Liu, Y. (2005). Analysis of posttranslational regulations in the *Neurospora* circadian clock. *Methods in Enzymology*, 393, 379–393.
- Liu, Y., He, Q., & Cheng, P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(10), 2131–2138.
- Liu, Y., Loros, J., & Dunlap, J. C. (2000). Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 234–9.
- Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2001). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annual Review of Physiology*, 63, 757–94.
- Lowry, R. J., Durkee, T. L., & Sussman, A. S. (1967). Ultrastructural studies of microconidium formation in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 94(5), 1757.
- Luo, C., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (1998). Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *The EMBO Journal*, 17(5), 1228–35.
- Luo, H., Zhang, J., Yuan, G., Zhao, Y., Liu, H., He, Z., & Shi, Z. (2013). Performance

- improvement of cephalosporin C fermentation by *Acremonium chrysogenum* with DO-Stat based strategy of co-feeding soybean oil and glucose. *Process Biochemistry*, 48(12), 1822–1830.
- Luque, E. M., Gutiérrez, G., Navarro-Sampedro, L., Olmedo, M., Rodríguez-Romero, J., Ruger-Herreros, C., ... Corrochano, L. M. (2012). A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain. *PloS One*, 7(3), e33658.
- LURIA, S. E., & BURROUS, J. W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*, 74(4), 461–76.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., ... Deshaies, R. J. (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5520), 1382–5.
- Malzahn, E., Ciprianidis, S., Káldi, K., Schafmeier, T., & Brunner, M. (2010). Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 142(5), 762–72.
- Martín, J. F. (2016). Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
- Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Görl, M., Johnson, J., Brunner, M., ... Roenneberg, T. (2001). Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 20(3), 307–15.
- Merrow, M. W., & Dunlap, J. C. (1994). Intergeneric complementation of a circadian rhythmicity defect: phylogenetic conservation of structure and function of the clock gene frequency. *The EMBO Journal*, 13(10), 2257–66.
- Montenegro-Montero, A., Canessa, P., & Larrondo, L. F. (2015). Around the Fungal Clock. In *Advances in genetics* (Vol. 92, pp. 107–184).
- Mooney, J. L., & Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development*, 4(9), 1473–1482.
- Mooney, J. L., & Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development*, 4(9), 1473–82.
- Navarro-Sampedro, L., Yanofsky, C., & Corrochano, L. M. (2008). A genetic selection for *Neurospora crassa* mutants altered in their light regulation of transcription. *Genetics*, 178(1), 171–83. 2
- Ni, M., & Yu, J.-H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PloS One*, 2(10), e970.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(1), 174–81.
- Oldenburg, K. R., Vo, K. T., Michaelis, S., & Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research*, 25(2), 451–2.

- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. M., & Corrochano, L. M. (2010). A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(4), 352–363.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. M., & Corrochano, L. M. (2013). Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology? *Fungal Biology Reviews*, *27*(1), 10–18.
- Oron, E., Mannervik, M., Rencus, S., Harari-Steinberg, O., Neuman-Silberberg, S., Segal, D., & Chamovitz, D. A. (2002). COP9 signalosome subunits 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)*, *129*(19), 4399–409.
- Paré, A., Kim, M., Juarez, M. T., Brody, S., & McGinnis, W. (2012). The Functions of Grainy Head-Like Proteins in Animals and Fungi and the Evolution of Apical Extracellular Barriers. *PLoS ONE*, *7*(5), e36254.
- Park, H.-S., Nam, T.-Y., Han, K.-H., Kim, S. C., & Yu, J.-H. (2014). VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PloS One*, *9*(2), e89883.
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K. C., Kim, Y. H., & Yu, J.-H. (2012). The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PloS One*, *7*(9), e45935.
- Park, H. S., & Yu, J. H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(6), 669–677.
- Patananan, A. N., Palmer, J. M., Garvey, G. S., Keller, N. P., & Clarke, S. G. (2013). A Novel Automethylation Reaction in the *Aspergillus nidulans* LaeA Protein Generates S-Methylmethionine. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(20), 14032–14045.
- Payne, G. A., Nystrom, G. J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., & Woloshuk, C. P. (1993). Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(1), 156–62.
- Perkins, D. D., & Davis, R. H. (2000). Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5107–9.
- Peter, E., Dick, B., & Baeurle, S. A. (2012). Illuminating the early signaling pathway of a fungal light-oxygen-voltage photoreceptor. *Proteins*, *80*(2), 471–81.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 503–33.
- Pintard, L., Willems, A., & Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The EMBO Journal*, *23*(8), 1681–7. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600186>
- Prado, M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R., & Avalos, J. (2004). A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Current Genetics*, *46*(1), 47–58.
- Proctor, R. H. E. mycology, Brown, D. W., Plattner, R. D., & Desjardins, A. E. (1995).

- Experimental mycology. Fungal genetics and biology FG & B.* Academic Press.
- Purschwitz, J., Müller, S., & Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 281(1), 35–42.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., ... Fischer, R. (2008). Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, 18(4), 255–259.
- Querfurth, C., Diernfellner, A. C. R., Gin, E., Malzahn, E., Höfer, T., & Brunner, M. (2011). Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Molecular Cell*, 43(5), 713–22.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), 267–71.
- Rockwell, N. C., Su, Y.-S., & Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 837–58.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., & Fischer, R. (2010). Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light Makes a Difference. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 585–610.
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4774), 364–8.
- Röhrig, J., Kastner, C., & Fischer, R. (2013). Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 59(1–2), 55–62.
- Roth, A. F., & Davis, N. G. (2000). Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 8143–53.
- Ruger-Herreros, C. (2014) Transcription factors that regulate development and light responses in *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral
- Ruiz-Roldan, M. C., Garre, V., Guarro, J., Marine, M., & Roncero, M. I. G. (2008). Role of the White Collar 1 Photoreceptor in Carotenogenesis, UV Resistance, Hydrophobicity, and Virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1227–1230.
- Russo, V. E. (1988). Blue light induces circadian rhythms in the bd mutant of *Neurospora*: double mutants bd,wc-1 and bd,wc-2 are blind. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 2(1), 59–65. 6
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U., & Briggs, W. R. (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry*, 39(31), 9401–10.
- Sancar, G., Sancar, C., Brügger, B., Ha, N., Sachsenheimer, T., Gin, E., Brunner, M. (2011). A global circadian repressor controls antiphase expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Molecular Cell*, 44(5), 687–97.

- Sancar, G., Sancar, C., Brunner, M., & Schafmeier, T. (2009). Activity of the circadian transcription factor White Collar Complex is modulated by phosphorylation of SP-motifs. *FEBS Letters*, *583*(12), 1833–40.
- Sanz, C., Rodríguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J. M., Heitman, J., Corrochano, L. M., & Eslava, A. P. (2009). Phycomyces MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 7095–100.
- Sarikaya-Bayram, Ö., Bayram, Ö., Feussner, K., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Kaefer, A., ... Braus, G. H. (2014). Membrane-Bound Methyltransferase Complex VapA-VipC-VapB Guides Epigenetic Control of Fungal Development. *Developmental Cell*, *29*(4), 406–420.
- Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S., Irrniger, S., Gerke, J., ... Braus, G. H. (2010). LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genetics*, *6*(12), e1001226.
- Schafmeier, T., Haase, A., Káldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., & Brunner, M. (2005). Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, *122*(2), 235–46.
- Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Russo, V. E., & Yanofsky, C. (1990). Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(10), 5064–5070.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., ... Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, *6*(3), 209–217.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., ... Tudzynski, B. (2015). The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(6), 659–674.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W. L., Lyapina, S., Deshaies, R. J., ... Deng, X. W. (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science (New York, N.Y.)*, *292*(5520), 1379–82.
- Schwerdtfeger, C., & Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *European Journal of Biochemistry*, *267*(2), 414–22.
- Schwerdtfeger, C., & Linden, H. (2001). Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, *39*(4), 1080–7.
- Schwerdtfeger, C., & Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal*, *22*(18), 4846–55.
- Seiboth, B., Karimi, R. A., Phatale, P. A., Linke, R., Hartl, L., Sauer, D. G., ...

- Kubicek, C. P. (2012). The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, *84*(6), 1150–1164.
- Selby, C. P., & Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 17696–17700.
- Shear, C. L., & Dodge, B. O. (1927). *Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the Monilia sitophila group*. US Government Printing Office.
- Shrode, L. B., Lewis, Z. A., White, L. D., Bell-Pedersen, D., & Ebbole, D. J. (2001). vvd is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *32*(3), 169–81.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2008). A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Molecular Microbiology*, *70*(4), 1026–36.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2006). Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, *61*(4), 1023–1037.
- Smith, K. M., Sancar, G., Dekhang, R., Sullivan, C. M., Li, S., Tag, A. G., ... Freitag, M. (2010). Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for neurospora white collar complex. *Eukaryotic Cell*, *9*(10), 1549–56.
- Springer, M. L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays*, *15*(6), 365–374.
- Springer, M. L., & Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, *3*(4), 559–571.
- Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., & Calvo, A. M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Molecular Microbiology*, *63*(1), 242–55.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P., & Macino, G. (1999). Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *The EMBO Journal*, *18*(18), 4961–8.
- Tang, C.-T., Li, S., Long, C., Cha, J., Huang, G., Li, L., ... Liu, Y. (2009). Setting the pace of the *Neurospora* circadian clock by multiple independent FRQ phosphorylation events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(26), 10722–7.
- Tisch, D., & Schmoll, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(5), 1259–77.
- Tudzynski, B. (n.d.). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(6), 597–611.

- Turner, B. C., Perkins, D. D., & Fairfield, A. (2001). Neurospora from natural populations: a global study. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 32(2), 67–92.
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–253.
- Vogel, H. J. (1964). Distribution of Lysine Pathways Among Fungi: Evolutionary Implications. *The American Naturalist*, 98(903), 435–446.
- VOGEL, & HJ. (1956). A convenient growth medium for Neurospora crassa (N medium). *Microb Genet Bull*, 13, 42–43. /
- Wang, J., Hu, Q., Chen, H., Zhou, Z., Li, W., Wang, Y., ... He, Q. (2010). Role of individual subunits of the Neurospora crassa CSN complex in regulation of deneddylation and stability of cullin proteins. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001232.
- Wei, N., Chamovitz, D. A., & Deng, X. W. (1994). Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, 78(1), 117–24.
- Wei, N., & Deng, X. W. (2003). The COP9 signalosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 261–86.
- Wei, N., Serino, G., & Deng, X.-W. (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(12), 592–600.
- Whyte, A. C., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., & Dowd, P. F. (1996). Sclerotiamide: a new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the sclerotia of Aspergillus sclerotiorum. *Journal of Natural Products*, 59(11), 1093–5.
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrewe, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H.-U., & Tudzynski, B. (2010a). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in Fusarium fujikuroi, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology*, 77(4)
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrewe, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H.-U., & Tudzynski, B. (2010b). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in Fusarium fujikuroi, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology*, 77(4), 972–94.
- WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., & VAN KAN, J. A. L. (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580.
- Wolf, D. A., Zhou, C., & Wee, S. (2003). The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nature Cell Biology*, 5(12), 1029–33.
- Wu, C., Yang, F., Smith, K. M., Peterson, M., Dekhang, R., Zhang, Y., ... Sachs, M. S. (2014). Genome-wide characterization of light-regulated genes in Neurospora crassa. *G3 (Bethesda, Md.)*, 4(9), 1731–45.
- Yager, L. N. (1992). Early developmental events during asexual and sexual sporulation in Aspergillus nidulans. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 23, 19–41.
- Young, K. H. (1998). Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time... *Biology of Reproduction*, 58(2), 302–11.

- Young, M. W., & Kay, S. A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Reviews. Genetics*, 2(9), 702–15.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E. H., Lykke-Andersen, K., ... Zhang, H. (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Molecular Cell*, 10(6), 1519–26.
- Zoltowski, B. D., & Crane, B. R. (2008). Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47(27), 7012–9.
- Zoltowski, B. D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J. J., Bilwes, A. M., Dunlap, J. C., & Crane, B. R. (2007). Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), 1054–7.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

¿Por qué no empezar los agradecimientos con un “Erase una vez...”? Así, como empiezan los mejores cuentos: un sueño cumplido y un cuento vivido. Un cuento con escenas felices, tristes, cómicas, intrigantes y con un final feliz. Un cuento que podía haberse llamado “María del Mar en el departamento de las maravillas” o mejor, “La “cuñá” en el departamento de las maravillas”. Un lugar maravilloso por su ciencia y más maravilloso aún por su gente.

Para hacer un recorrido por este “país maravilloso” empezaré por agradecer a quien me abrió sus puertas, a Luis Corrochano por enseñarme y darme la oportunidad de hacer ciencia con organismos peculiares que para mí hasta ese momento eran desconocidos y que ahora son como de la familia.

A mis chicos de levaduras por los experimentos extraoficiales de final del día, a Olga, Douglas, Lola, Juanjo, el Patri, Reyes, y a Xenia por regalarnos siempre una sonrisa permanente y por aguantar con nosotros hasta el final. A Isco por ser amigos, vivir momentos “de élite” juntos, risas, viajes y por haber sufrido el papeleo del final en el mismo momento. A Gonzalo por nunca admitir un no por respuesta, por pensar en los planes más locos y más acertados en cualquier momento, por el vámonos a la playa un día cualquiera, por las fiestas y los momentos todos juntos, por las conversaciones a cualquier hora y por ser amigo en todos los instantes. Y como no, a mi Lidia, una amiga que me llevo para siempre, gracias por escucharme, gracias por las confidencias, por las charlas al final del día, por los ratos de “cambiamos de tema”, por los momentos de compras, modelitos, por no haber aguantado la risa, por las miradas que lo dicen todo y desde aquel momento y hasta siempre, gracias por estar en mi vida.

A Violeta, Leandro, Jorge, Marta, Eugenio, Rafa, Almudena, María, Ana y Leyre por ser nuestros vecinos fúngicos y por haberme ayudado en los momentos de crisis experimentales. A Marta y Violeta por organizar de manera ejemplar los “eventos oficiales”.

A Macarena, que decir de Macarena con palabras que se puedan escribir en un papel. Gracias, gracias y gracias. Gracias por estar siempre ahí, en los buenos y malos momentos. Gracias por poder contar contigo, por compartir desde experimentos hasta momentos peculiares en distintas partes del mundo, por disfrutar conmigo días sevillanos y conileños, por mostrarme canciones que te encantan y que yo nunca había escuchado, gracias por sacarme una sonrisa con tan solo escucharte arrastrar los pies por el pasillo y que mi mente pensara: “*Ahí viene la alegría de la huerta*”. Gracias a ti y a Monchi por compartir vuestra casa conmigo. Pero sobre todo gracias por tus sabios consejos que hacen que los momentos menos buenos se conviertan en mejores.

A Nacho, Elenita, Sara, Bárbara, Elena, Mar y Fernando, “los bacterios”, y a Natalia, por haber compartido conversaciones, películas, barbacoas y risas departamentales. A Nacho por esas

conversaciones donde me ha hecho profundizar en temas que yo pasaría por alto. Y a Elenita por desprender su alegría por los pasillos y hacer las mejores y más divertidas escenas de las películas.

A Lola, mi Dolores Pérez de Camino, gracias por enseñarme cómo funciona este departamento, por intentar poner un poco de cordura a altas horas de la tarde y al final dejarte llevar por nuestras ideas y gracias por esas grandes tardes de fútbol. Un honor haber compartido todos estos años contigo.

A Jesús Fierro, al que yo siempre llamo Jesús y jamás Fierro y el que siempre me llama “cuñá” y jamás María del Mar. Gracias por ser mi amigo dentro y fuera del departamento. Por ayudarme siempre, por las sorpresas, por los detalles, por levantarme el ánimo cuando lo he necesitado y cuando no. Por tus consejos y esas conversaciones infinitas. Gracias por todo, nos veremos en Sevilla, en Huelva, en Conil o donde sea.

A mis compañeros de laboratorio, a los de antes y a los de ahora. A Carmen, por enseñarme el mundo *Neurospora*, por darme sus ideas en mis momentos de agobio y por resolver mis dudas aun estando en la distancia, ¡mil gracias! A Víctor por ser el mejor hermano mayor de laboratorio que se puede tener, por tener siempre tiempo para ayudarme con mis problemas y por el cariño todos los días. A Eva por alegrarnos todas las mañanas, por hacer que nunca exista un silencio incómodo, por enseñarme a hacer mis primeros cultivos, por resolver mis problemas administrativos y telefónicos, y por darnos de comer siempre tan bien. A Sara por haber compartido conmigo estos últimos momentos de estrés y por el entusiasmo por la ciencia con el que inunda el laboratorio.

Por supuesto, agradecer a Ale todo este tiempo, el de antes y el que vendrá después. Gracias por haber podido realizar esta tesis aquí. Gracias por mostrarme la oportunidad para poder hacer lo que realmente me gusta, la investigación. Gracias por los momentos de discusión de resultados locos pero siempre interesantes y por las sobremesas de risas con videos totalmente surrealistas. Pero sobre todo gracias por ser un gran compañero de laboratorio, de piso y de familia.

A Duli, amiga incondicional, la persona a la que no he necesitado decirle que me pasa para saberlo, en las alegrías y en otras muchas emociones. Gracias por ofrecerme todo lo que ha estado en tu mano y lo que no para ayudarme tanto dentro como fuera del laboratorio, por hacer de mí una persona con ganas de abrazarte, de sonreírte y de ayudarte también. Todos los agradecimientos son pocos para corresponder todo lo bueno que has dejado en mí. GRACIAS.

A Javi, a las Julias, a Juanlu, a Lucía, a Maritoñi, a Vero, a Ángela, a Ismael, a Stefen, a María Olmedo, Elena Puerta y a David por estos últimos meses en el departamento. Por las charlas en el comedor, las locuras, los intentos de paintball, y por aportarme la ilusión de la gente nueva.

A Carmen Limón y Paco Ramos por haber atendido mis dudas con la mejor de sus sonrisas. A las secretarias Ana y Conchi y a los técnicos Luis y Marina por haber hecho más fácil estos años en el departamento.

También agradecer a todos mis amigos de Conil y de otras ciudades por acompañarme en todos los momentos felices y de desconexión y por hacer de los fines de semana unas vacaciones constantes. A mis padres, a mi hermana y a mi David, por estar siempre ahí, ayudarme y quererme incondicionalmente.

Y a ti, por no dejar de pensarte en estos tres últimos meses.

Para finalizar, como dijo el Gato de Cheshire en “Alicia en el país de las maravillas”: *Siempre llegarás a alguna parte si caminas lo suficiente*. Así que, gracias por la compañía durante este camino.

