

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida con orientación en  
Microbiología Celular y Molecular**

---

**El papel de la proteína RHO-3 durante el desarrollo celular de  
*Neurospora crassa***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Martha María Ornelas Llamas**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Martha María Ornelas Llamas**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Ernestina Castro Longoria**  
Directora de tesis

Miembros del comité

**Dra. Olga Alicia Callejas Negrete**

**Dra. María del Carmen Maya Sánchez**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Martha María Ornelas Llamas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular

### **El papel de la proteína RHO-3 durante el desarrollo celular de *Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ernestina Castro Longoria  
**Director de tesis**

Las GTPasas monoméricas de la familia Rho actúan como proteínas de señalización clave para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y otros procesos esenciales para la célula. Estas funcionan como interruptores moleculares al ciclar entre un estado inactivo unido a guanósín difosfato (GDP) y un estado activo unido a guanósín trifosfato (GTP), lo cual está altamente regulado. En su conformación activa, las Rho GTPasas interactúan con proteínas efectoras para provocar una variedad de respuestas intracelulares y mediar una diversidad de procesos como la morfogénesis, división celular, remodelación del citoesqueleto de actina, tráfico vesicular y la dinámica de los microtúbulos. Rho3 es una GTPasa de la familia Rho exclusiva de hongos, la cual participa en la polaridad celular de levaduras al regular la organización del citoesqueleto de actina y la exocitosis. Sin embargo, la información acerca de su función en hongos filamentosos es escasa. En este trabajo se estudió el papel de RHO-3 en el desarrollo del hongo filamentoso modelo *Neurospora crassa*. Particularmente, se analizó el efecto de la eliminación de *rho-3* en la morfogénesis celular, donde los resultados demostraron que la cepa que carece de este gen tiene graves defectos en la tasa de crecimiento, longitud de hifas aéreas, conidiación y en el desarrollo sexual; además de alteraciones en la distancia entre septos. El mantenimiento de la organización del Spitzenkörper también se ve afectado en la cepa que carece de *rho-3*. Adicionalmente, se determinó la localización subcelular de RHO-3 mediante la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo amino-terminal de RHO-3. El análisis por microscopía confocal reveló que esta proteína se localiza en la región externa del Spitzenkörper, en la membrana plasmática desde la región II hasta principios de la región III y en septos de hifas maduras, por lo que se sugiere que RHO-3 participa en la formación de estos. Además, análisis por microscopía confocal de la co-expresión de GFP-RHO-3 con la glucano sintasa 1 y la quitina sintasa 1 marcadas con la proteína fluorescente roja, demostraron que RHO-3 se asocia con las macrovesículas de la región externa del Spitzenkörper. Esta información sugiere que la GTPasa RHO-3 aunque no es esencial para el crecimiento polarizado de las hifas, juega un papel importante en el desarrollo de *Neurospora crassa*.

**Palabras clave:** GTPasas, Polaridad, *Neurospora crassa*, RHO-3

Abstract of the thesis presented by **Martha María Ornelas Llamas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Molecular and Cellular Microbiology

### **The role of the RHO-3 protein during the cell development of *Neurospora crassa***

Abstract approved by:

---

Ph. D. Ernestina Castro Longoria  
**Thesis Director**

The Rho family of monomeric GTPases act as signaling proteins for the establishment and maintenance of cell polarity and other essential cellular processes. They function as molecular switches by cycling between an inactive GDP-bound conformation and an active GTP-bound conformation, which is highly regulated. In the GTP-bound conformation, the Rho GTPases are able to interact with effector proteins to induce a variety of intracellular responses and mediate various processes including morphogenesis, cell division, actin cytoskeleton re-organization, vesicular trafficking and microtubule dynamics. Rho3 is a GTPase of the Rho family exclusive of fungi involved in regulating cell polarity in yeast, by controlling polarized exocytosis and the organization of the actin cytoskeleton. However, few studies have been performed about its function in filamentous fungi. In this study, we investigated the role of RHO-3 in the development of the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. In particular, we analyze the phenotypic effect of deletion of *rho-3*, and the results revealed that the *rho-3* null cells showed serious defects in growth rate, aerial hyphae length, conidia production and sexual development; besides alterations in the distance between septa. The maintenance of the organization of the Spitzenkörper is also affected in absence of the *rho-3*. In addition, the subcellular localization of RHO-3 was determined by the fusion of the green fluorescent protein (GFP) at the N-terminus of RHO-3. The confocal microscopy analysis revealed that this protein is localized in the outer region of the Spitzenkörper, in the plasma membrane from region II to the beginning of region III and in septa of mature hyphae, suggesting that RHO-3 participates in septum formation. Furthermore, confocal microscopy analysis of the co-expression of GFP-RHO-3 with glucan synthase 1 and chitin synthase 1 labeled with the red fluorescent protein, demonstrated that RHO-3 associates with macrovesicles of the external region of the Spitzenkörper. Taken together, our results suggest that the GTPase RHO-3, although is not essential for polarized growth of hyphae, plays an important role in the cell development of *Neurospora crassa*.

**Keywords:** GTPases, Polarity, *Neurospora crassa*, RHO-3

## Dedicatoria

A Dios, por guiar mis pasos y llenarme de fortaleza para llevar a cabo mis metas.

A mis padres Martha y Felipe, por ser mi inspiración, por estar presentes en todos los momentos importantes de mi vida, motivándome a cumplir mis sueños y dar lo mejor de mí. Me siento muy agradecida por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Felipe, quien ha estado conmigo toda mi vida, apoyándome y siendo mi cómplice de aventuras (aunque sea un poco distraído).

A mi compañero de vida, mi esposo José Luis, por su apoyo incondicional, por alegrar mis días y alentarme siempre. Quien estuvo presente en cada satisfacción y estrés que provocó este trabajo, compartiendo mis sentimientos y haciendo lo posible por verme sonreír.

De una manera muy especial, a mi mejor amigo Roberto, con quien empecé este sueño y con quien desearía compartir la alegría de culminarlo juntos. Con quien compartí tantos momentos dentro y fuera del laboratorio y una de las personas que mejor me conocía. Quien me escuchaba con paciencia y me apoyaba siempre. A quien nunca olvidaré y siempre tendré presente en mi corazón, acompañándome a donde quiera que vaya, como lo hacía cuando estaba aquí....

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada.

Al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (**CICESE**) y al **Departamento de Microbiología** por proporcionarme los conocimientos y equipos necesarios para la realización del presente trabajo.

A mi directora de tesis, la **Dra. Ernestina Castro Longoria**, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Por todo el tiempo dedicado, sus enseñanzas y el apoyo que me brindó no sólo para la realización de este trabajo, sino a nivel personal, siempre preocupada por el bienestar de sus estudiantes. Mi mayor admiración.

A mi comité de tesis: la **Dra. Olga Callejas Negrete** y la **Dra. María del Carmen Maya Sánchez**, por todo el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por todas sus aportaciones en el desarrollo de este proyecto, las cuales fueron de gran ayuda.

Extendiendo el agradecimiento a la **Dra. Olga Callejas** por su asesoría, por todo el conocimiento compartido, los reactivos proporcionados y por siempre estar dispuesta a ayudar. Es admirable el trabajo que realiza en el laboratorio para todos los estudiantes.

Al **Dr. Diego Delgado**, por su apoyo en la microscopía y sus consejos.

A todos los **miembros** del departamento de **Microbiología**, cuyas aportaciones siempre fueron valiosas para el desarrollo del presente trabajo.

A **Leo** (el Dr. Luis Leobardo Pérez Mozqueda), a quien le debo gran parte de la realización de este proyecto ya que fue inmenso el apoyo que me proporcionó explicándome las técnicas, la teoría y el uso de equipo requeridos para la realización del proyecto, siempre con buena disposición y paciencia. Lo considero como mi maestro en laboratorio y uno de mis mejores amigos, ya que tuve la suerte de compartir momentos alegres y difíciles con él. Un millón de gracias.

A todos mis **compañeros** de la generación 2018-2020 de **Ciencias de la Vida**, de quienes aprendí muchas cosas. Me siento agradecida de haber pertenecido a un grupo tan unido y empático, siempre apoyándonos unos a otros. Admiro a cada uno y los tendré siempre presentes en mi corazón.

A **Andrea** por todo su apoyo y por estar siempre al pendiente de mí.

A **Tonancy** por la complicidad, por ser un gran apoyo y por las pláticas tan interesantes, en quien encontré a una amiga dentro y fuera del laboratorio.

A los de la casita móvil: **Lluvia, Alex, Lucía, Scarlett, José Luis, Fausto** y **Leo** por las pláticas, el apoyo, los consejos y los buenos ratos de comida, café y pan.

A mis mejores amigas las JEMM: **Jetza, Edna, Mizuki** y ahora **Juliana**, y al “**Team Depa**”, por animarme siempre a cumplir mis metas y ser parte de mi inspiración.

A mi mejor amigo **Roberto Alcalá**. Por haber sido mi compañero de laboratorio, estudio, risas, estrés y quien estaba presente en todos los momentos de mi vida. Gracias por inspirarme aun en la ausencia; cuando las cosas se ponían complicadas, bastaba con voltear a ver su foto y pensar en lo que me diría para animarme.

A mi **familia**, incluyendo a mi **Jos**, por ser mi mayor fuente de inspiración, por su amor y apoyo incondicional.

A todos con los que tuve la oportunidad de coincidir en estos dos años, me llevo lo mejor de cada uno. Muchas gracias.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Las GTPasas de la familia de la familia Rho.....	2
1.1.2 Regulación de las Rho GTPasas.....	3
1.1.3 Características estructurales principales de las Rho GTPasas.....	3
1.1.4 Rho GTPasas en hongos.....	5
1.1.5 <i>Neurospora crassa</i> .....	10
1.1.6 Función y localización de Rho GTPasas en <i>Neurospora crassa</i> .....	11
1.2 Justificación .....	13
1.3 Hipótesis .....	13
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general .....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Organismos y medios de cultivo.....	15
2.2 Análisis bioinformático.....	16
2.3 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i> .....	16
2.4 Construcción de cepas de <i>N. crassa</i> .....	17
2.4.1 Cepa <i>gfp::rho-3</i> .....	17
2.4.2 Cepa $\Delta\rho-3$ .....	19
2.4.2.1 Construcción de fragmentos recombinantes.....	19
2.4.2.2 Transformación de <i>N. crassa</i> .....	20
2.4.2.3 Obtención de mutante homocarión.....	21
2.5 Caracterización fenotípica de $\Delta\rho-3$ .....	21



2.5.1	Morfología colonial.....	21
2.5.2	Morfología microscópica.....	22
2.5.3	Tasa de crecimiento.....	22
2.5.4	Índice de ramificación.....	23
2.5.5	Conidiación.....	23
2.5.6	Producción de biomasa.....	23
2.5.7	Distancia entre septos.....	23
2.6	Fusiones vegetativas.....	24
2.7	Microscopía.....	24
2.7.1	Microscopía estereoscópica.....	24
2.7.2	Microscopía confocal.....	25
2.7.3	Microscopía de epifluorescencia.....	26
<b>Capítulo 3. Resultados</b>		
3.1	Análisis bioinformático.....	27
3.2	Localización intracelular de GFP-RHO-3 en <i>Neurospora crassa</i> .....	28
3.2.1	Localización de GFP-RHO-3 en hifas maduras.....	28
3.2.2	Localización de GFP-RHO-3 en germínulas.....	33
3.3	Asociación de GFP-RHO-3 con las vesículas del Spitzenkörper.....	35
3.4	Construcción y obtención de la cepa $\Delta rho-3$ .....	38
3.5	Caracterización fenotípica de $\Delta rho-3$ .....	39
3.5.1	Morfología colonial.....	39
3.5.2	Morfología microscópica.....	40
3.5.3	Tasa de crecimiento.....	43
3.5.4	Conidiación.....	43
3.5.5	Ramificación.....	45
3.5.6	Producción de biomasa.....	45
3.5.7	Distancia entre septos.....	46
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....		48
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b> .....		52
<b>Literatura citada</b> .....		53
<b>Anexos</b> .....		59

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo de las Rho GTPasas.....	3
2	Estructura del dominio G de las GTPasas.....	4
3	Diagrama esquemático del mecanismo <i>switch</i> de las GTPasas.....	5
4	Modelo del papel de Rho3 en <i>S. cerevisiae</i> .....	8
5	Localización de Rho3 en <i>S. pombe</i> .....	8
6	Morfología colonial de <i>A. gossypii</i> en ausencia de Agrho3.....	9
7	Distancia entre septos en $\Delta$ rho3 de <i>B. cinerea</i> .....	9
8	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i> .....	11
9	Localización de las Rho GTPasas en <i>N. crassa</i> .....	12
10	Mapa del vector pCCG-N-gfp.....	17
11	Construcción del plásmido pCCG-N-gfp+rho3.....	18
12	PCRs de fusión.....	20
13	Técnica utilizada para la medición del crecimiento radial.....	22
14	Estrategia utilizada para realizar las fusiones vegetativas.....	24
15	Técnica de bloque de agar invertido.....	25
16	Alineamiento de las secuencias peptídicas de RHO-3 de diferentes hongos.....	27
17	Comprobación del plásmido pCCG-N-gfp+rho3 mediante enzimas de restricción .....	28
18	Localización de GFP-RHO-3 en hifas de <i>N. crassa</i> .....	29
19	Localización de GFP-RHO-3 en la región externa del Spitzenkörper.....	30
20	Dinámica de GFP-RHO-3 durante la ramificación en hifas de <i>N. crassa</i> .....	31
21	Localización de GFP-RHO-3 en los septos de hifas de <i>N. crassa</i> .....	32
22	Localización de GFP-RHO-3 durante la formación del septo en hifas maduras.....	33
23	Localización de GFP-RHO-3 en germínulas de <i>N. crassa</i> .....	34

24	GFP-RHO-3 durante el desarrollo del septo en germínulas.....	35
25	Co-expresión de GFP-RHO-3 y GS-1-mChFP.....	36
26	Co-expresión de GFP-RHO-3 y CHS-1-mChFP.....	37
27	Fragmentos recombinantes obtenidos por PCR de fusión.....	38
28	Corroboración por PCR de la sustitución de <i>rho-3</i> .....	39
29	Morfología colonial de la cepa silvestre (WT) y la cepa $\Delta rho-3$ .....	40
30	Morfología de las hifas de la cepa WT y de $\Delta rho-3$ .....	41
31	Organización del Spitzenkörper en la cepa WT y en $\Delta rho-3$ .....	42
32	Trayectoria del Spitzenkörper en la cepa WT y en $\Delta rho-3$ .....	43
33	Tasa de crecimiento de la cepa WT y de $\Delta rho-3$ .....	44
34	Producción de conidios en la cepa WT y en $\Delta rho-3$ .....	44
35	Frecuencia de ramificaciones en la cepa WT y en $\Delta rho-3$ .....	45
36	Producción de biomasa en la cepa WT y la cepa $\Delta rho-3$ .....	46
37	Distancia entre septos en la cepa WT y en $\Delta rho-3$ .....	47
38	Peritecios falsos.....	59

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Organismos y cepas utilizados en este estudio.....	15
2	Descripción de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	19
3	Crecimiento de la cepa WT y de $\Delta rho-3$ .....	59

## Capítulo 1. Introducción

---

Se estima que el Reino de los hongos contiene aproximadamente 1.5 millones de especies (Hawksworth, 2001). Los hongos se caracterizan principalmente por ser organismos eucariotas, alimentarse por absorción y reproducirse por medio de esporas (Money, 2016). Este grupo de organismos tiene una gran importancia ecológica y en la sociedad. Son ampliamente utilizados en la industria, para la producción de alimentos y para la síntesis de compuestos, enzimas y metabolitos, incluyendo antibióticos (Wainwright, 1992). En la naturaleza, la descomposición de la materia orgánica ocurre principalmente por medio de enzimas secretadas por hongos, desempeñando un papel importante en los procesos ecológicos (John, 2016). Sin embargo, esta capacidad de biodegradación puede llevar a la descomposición de productos económicamente importantes, como los alimentos. Además, los hongos son el grupo más importante de patógenos de plantas y están asociados con numerosas enfermedades de humanos y animales (Arx, 1987; Howard, 2002).

Adicionalmente, estudios realizados en hongos han contribuido en gran medida al progreso de la biología celular y molecular, bioquímica y genética. Como organismos eucariotas relativamente simples, son un importante modelo de investigación. Particularmente, han sido de gran utilidad para comprender procesos celulares relacionados con el desarrollo y la morfogénesis, como la polaridad celular. El establecimiento y el mantenimiento de la asimetría celular son propiedades esenciales que rigen la morfogénesis y el desarrollo de la mayoría de células eucariotas y es característica de varios organismos tanto unicelulares como pluricelulares (Etienne-Manneville, 2004). En el caso de las levaduras unicelulares, se ha demostrado que poseen un crecimiento polarizado durante algunas etapas de su ciclo vital (Park y Bi, 2007). En contraste, el crecimiento de las hifas en hongos filamentosos es un proceso totalmente continuo que las ha llevado a ser consideradas como algunas de las células más polarizadas (Riquelme et al., 2003). El crecimiento de la punta de la hifa es un proceso complejo y regulado que implica la polarización del citoesqueleto de actina y un flujo continuo de vesículas que permiten la extensión de la membrana y la síntesis de pared celular, así como diversos movimientos citoplasmáticos (Fischer et al., 2008). Particularmente, el rápido crecimiento del hongo filamentoso *Neurospora crassa* ( $\sim 44 \text{ mm hr}^{-1}$ ), es el resultado de un mecanismo fuertemente polarizado que lo convierte, entre otras características, en un buen organismo modelo para estudiar este proceso (Riquelme et al., 2011).

La capacidad de los hongos para crecer continuamente de manera polarizada, refleja la existencia de un control temporal y espacial sobre el establecimiento de los ejes de polaridad durante la germinación de

las esporas y su mantenimiento durante la extensión de la punta de las hifas (Momany, 2002; Riquelme et al., 2011) . Varios estudios recientes señalan que un grupo de proteínas conocidas como GTPasas (trifosfatasa de guanosa), actúan como moléculas de señalización clave para el establecimiento de la polaridad celular y están notablemente conservadas tanto a nivel estructural como funcional en diversos organismos (Bourne et al., 1991; Kjølner y Hall, 1999). Las GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras son proteínas G monoméricas que se agrupan en cinco subfamilias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran (Takai et al., 2001). Dentro de estos grupos, las proteínas de las familias Ras y Rho, son las que más se han descrito en hongos (An et al., 2015).

## **1.1 Antecedentes**

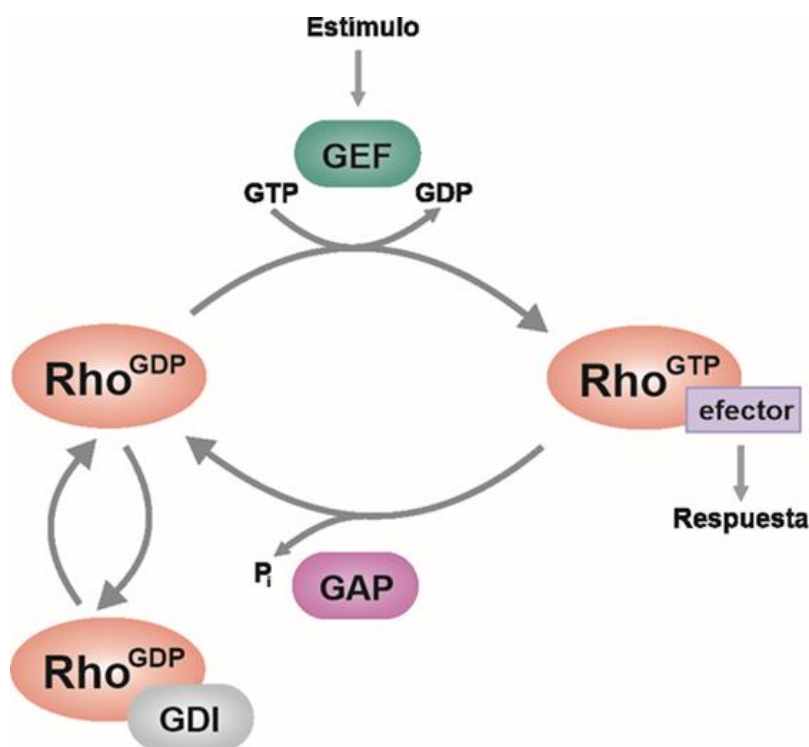
### **1.1.1 Las GTPasas de la familia Rho**

La familia de proteínas Rho pertenecen a la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras, e incluyen a las GTPasas: Rac, Cdc42 y Rho (1-4). Estas proteínas se caracterizan por actuar como interruptores moleculares para controlar una amplia gama de vías bioquímicas esenciales en todas las células eucarióticas (Mackay y Hall, 1998). Así como todos los miembros de la superfamilia Ras, ciclan entre una conformación inactiva unida a guanósín difosfato (GDP) y una forma activa unida a guanósín trifosfato (GTP) (Hakoshima et al., 2003). Es en el estado unido a GTP, que las Rho GTPasas realizan su función reguladora al interactuar con moléculas efectoras para provocar una variedad de respuestas intracelulares. Se han identificado más de 50 efectores para la familia Rho, los cuales incluyen serina/treonina cinasas, tirosina cinasas, lípido cinasas, lipasas, oxidasas y proteínas de andamiaje (Jaffe y Hall, 2005). Además, cada proteína de la familia Rho puede reconocer múltiples efectores y, un mismo efector, puede ser reconocido por más de una proteína perteneciente a esta familia, lo que refleja la complejidad y diversidad de las propiedades funcionales de estas proteínas (Wennerberg y Der, 2004).

Las proteínas Rho se reconocen principalmente por su papel fundamental en la regulación de muchos procesos celulares, incluida la morfogénesis, tráfico membranal, división celular, remodelación del citoesqueleto de actina, migración celular, dinámica de los microtúbulos, vías de transducción de señales que conducen a cambios en la expresión génica, actividades enzimáticas, interacciones célula-célula, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros (An et al., 2015; Jaffe y Hall, 2005; Moon y Zheng, 2003).

### 1.1.2 Regulación de las Rho GTPasas

El equilibrio entre el estado activo e inactivo de las Rho GTPasas está controlado por tres clases de proteínas reguladoras: (i) los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que inducen la liberación del GDP unido para que sea reemplazado por el GTP; (ii) las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) que actúan potenciando la hidrólisis de GTP; y (iii) los inhibidores de nucleótidos de guanina (GDI), que inhiben el intercambio de GDP por GTP al extraer de los compartimentos de membrana a las GTPasas unidas a GDP y mantenerlas en el citoplasma, participando en la regulación de su localización intracelular. (Bos et al., 2007; Olofsson, 1999) (Figura 1).



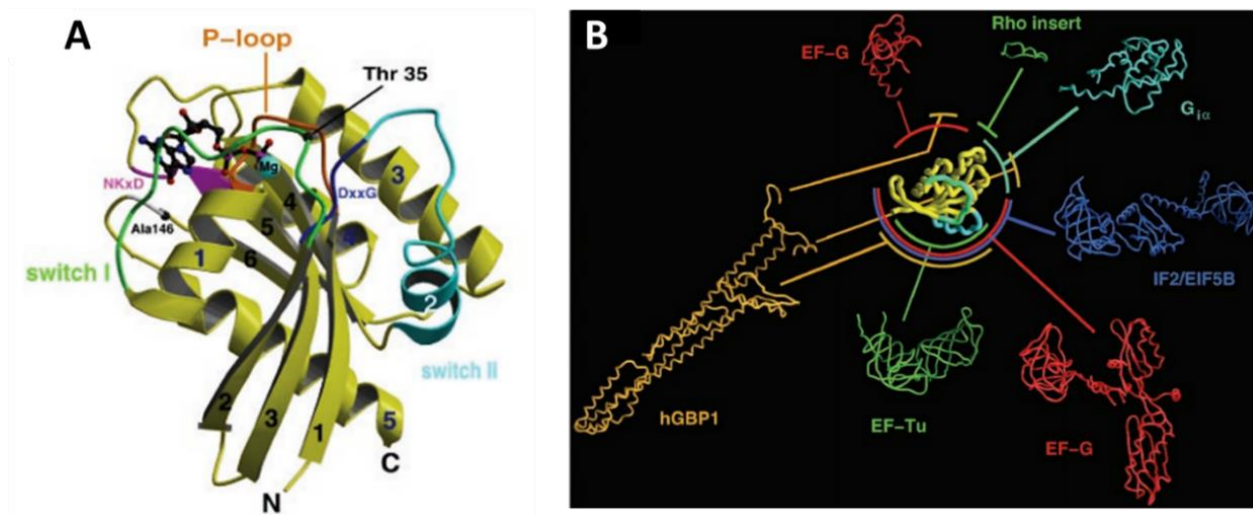
**Figura 1. Ciclo de las Rho GTPasas.** Las Rho GTPasas ciclan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. En su forma activa, las GTPasas interactúan con proteínas efectoras para mediar una variedad de respuestas celulares (modificado de Jaffe y Hall, 2005).

### 1.1.3 Características estructurales principales de las Rho GTPasas

Las GTPasas comparten un dominio G, el cual tiene la función básica de unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina y permite que estas proteínas conserven grandes similitudes estructurales y propiedades bioquímicas. Este dominio está formado por seis hojas- $\beta$  en cadena, rodeadas de cinco  $\alpha$ -hélices en ambos

lados (Vetter y Wittinghofer, 2001)(Figura 2A). Las proteínas pertenecientes a la familia Rho se distinguen de otras GTPasas pequeñas por tener una inserción de aproximadamente 13 aminoácidos, ubicado entre la quinta cadena  $\beta$  y la cuarta  $\alpha$ -hélice en el pequeño dominio G (Rojas et al., 2012) (Figura 2B). La mayoría de proteínas Rho son pequeñas y poseen de 190 a 250 aminoácidos, conteniendo solo el dominio de GTPasa (G) y extensiones N y C-terminales cortas. Sin embargo, algunos miembros de la familia tienen dominios adicionales definidos y pueden tener más de 700 aminoácidos de longitud (Wennerberg y Der, 2004).

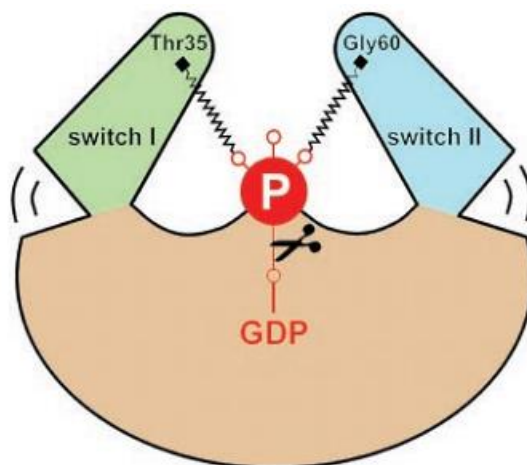
Las diferencias entre las formas estructurales unidas a GDP y GTP de las Rho GTPasas se deben principalmente a dos regiones conocidas como *switch* I y *switch* II (Milburn et al., 1990). En la forma unida a GTP, las regiones *switch* están unidas por puentes de hidrógeno al  $\gamma$ -fosfato, a través de la cadena principal de grupos NH de los invariantes residuos de glicina y treonina, donde este último está también involucrado en la unión a  $Mg^{2+}$  a través de la cadena lateral. La hidrólisis del GTP permite la liberación del fosfato provocando la relajación de las regiones *switch* en la conformación unida a GDP característica (Figura 3) (Vetter y Wittinghofer, 2001).



**Figura 2. Estructura del dominio G de las GTPasas.** (A) Diagrama de cintas del dominio G básico. Las estructuras hojas- $\beta$  y  $\alpha$ -hélices se encuentran enumeradas. Además, se muestran las regiones *switch* en diferentes colores. (B) Dominios e inserciones adicionales y su ubicación relativa en el dominio G. La inserción Rho característica de la familia de proteínas Rho se encuentra señalada en color verde (tomado de Vetter y Wittinghofer, 2001).



Adicionalmente, las Rho GTPasas poseen un motivo C-terminal conocido como CAAX (C: cisteína, A: alifático, X: cualquier aminoácido), el cual es sometido a modificaciones lipídicas postraduccionales funcionando como una señal para direccionamiento a la membrana; además de una región polibásica adyacente al motivo, que permite la asociación con membranas, localización subcelular e interacción con reguladores (Fort y Blangy, 2017).



**Figura 3. Diagrama esquemático del mecanismo *switch* de las GTPasas.** Existen dos enlaces hidrógeno entre los oxígenos del  $\gamma$ -fosfato con los grupos NH de la cadena principal en los residuos de Thr y Gly de las regiones *switch*. La liberación del fosfato después de la hidrólisis del GTP, permite que las regiones *switch* cambien de conformación en lo que podría llamarse un mecanismo de resorte (tomado de Vetter y Wittinghofer, 2001).

#### 1.1.4 Rho GTPasas en hongos

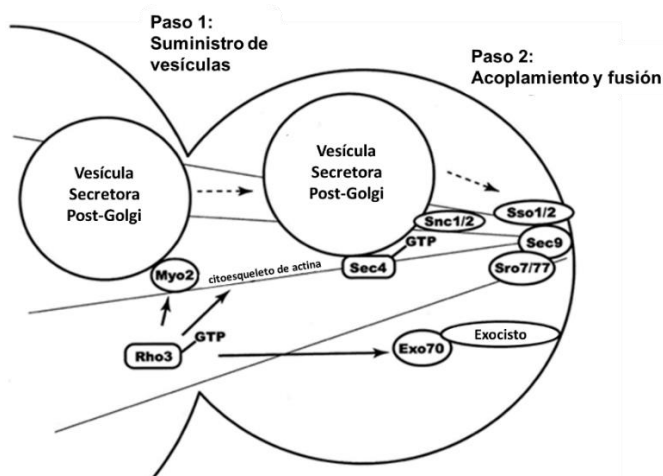
La caracterización de las GTPasas Cdc42/Rho dentro del reino de los hongos, se realizó primeramente en la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, donde se encontraron seis distintas: Cdc42, Rho1-Rho5, las cuales funcionan de manera general, en la regulación de la morfogénesis celular (Park y Bi, 2007). Dada la importancia de estas proteínas en el crecimiento polarizado de las levaduras, se realizaron estudios posteriores para el análisis y caracterización de las Rho GTPasas homólogas en hongos filamentosos; donde análisis comparativos revelaron que se conservan en gran medida; sin embargo, existen diferencias significativas. Un ejemplo de ello, es la presencia de la proteína Rac1 en la mayoría de hongos filamentosos, pero no en las levaduras (Harris, 2011). Se ha descrito que esta GTPasa comparte una considerable similitud con Cdc42 y que ambas comparten al menos una función superpuesta que se requiere para el

establecimiento de la polaridad celular y la organización del citoesqueleto de actina (Araujo-Palomares et al., 2011; Ballou et al., 2013; Boyce et al., 2005; Mahlert et al., 2006). No obstante, parece haber funciones específicas para Cdc42 y Rac1 que varían entre diferentes especies de hongos filamentosos. Por ejemplo, en *Aspergillus nidulans* la delección de *cdc42* conduce a tasas de crecimiento más lentas y menor ramificación, mientras que la eliminación de *cdc42* en *Aspergillus niger*, no tiene un efecto significativo en la morfogénesis de las hifas. Las mutantes por delección de *rac1* en *A. niger* producen hiperpolarización de actina filamentosa e hiperramificación; sin embargo, en *A. nidulans* esta mutación resulta únicamente en un crecimiento reducido, pero no afecta significativamente la morfología (Kwon et al., 2011; Virag et al., 2007). En ambas especies la doble eliminación de *cdc42* y *rac1* conduce a letalidad, pero ninguna de las dos proteínas resulta ser esencial (Virag et al., 2007). En *Ustilago maydis*, Rac1 tiene un papel fundamental en la polaridad celular, mientras que Cdc42 se requiere principalmente para la virulencia y la separación celular durante la gemación, sin embargo, no parece ser necesaria para la polaridad (Mahlert et al., 2006). En el hongo dimórfico *Penicillium marneffeii*, CDC42 es esencial para la viabilidad, mientras que RAC1 no lo es; sin embargo, ambas controlan de forma coordinada la polarización de las células hifales (Boyce et al., 2003; Boyce et al., 2005). Además, el módulo CDC-42-RAC-1 es responsable del establecimiento y mantenimiento de la polaridad en *Neurospora crassa*. La eliminación de *rac-1* produce la división dicotómica de la punta y una hiperramificación apical masiva, mientras que la deficiencia de CDC-42 conduce principalmente a la aparición de numerosas ramas subapicales e hinchazón de las regiones apicales y subapicales de la hifa (Araujo-Palomares et al., 2011).

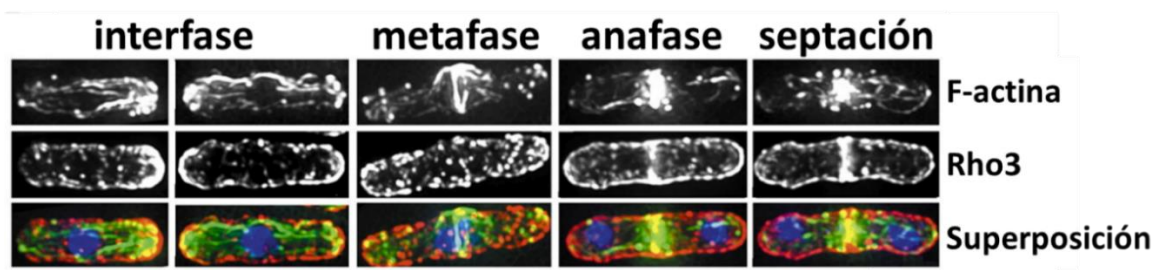
En las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, Rho1 posee un papel fundamental en la síntesis de la pared celular mediante la regulación de la síntesis de glucano a través de la  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) glucano sintasa y en la integridad de la pared celular (Arellano et al., 1996; Levin, 2005; Madaule et al., 1987). En *Candida albicans*, Rho1 se requiere para la viabilidad y el crecimiento filamentoso, además de tener un papel importante en la virulencia y la integridad de la pared celular (Corvest et al., 2013; Roemer et al., 2003). El gen *rho1* en *Aspergillus fumigatus* también es esencial y un mutante condicional para *rho1*, exhibió lisis celular en la punta de las hifas, además de una reducción significativa en el crecimiento radial y la conidiación (Dichtl et al., 2012). Adicionalmente, en *A. niger* el homólogo de Rho1 (RhoA) demostró tener función en la extensión adecuada de los tubos germinales (Kwon et al., 2011). Por lo tanto, Rho1 tiene un papel crítico en la integridad y remodelación de la pared celular en hongos dimórficos y filamentosos. Rho2 es no esencial y parece tener funciones redundantes con Rho1 en la repolarización del citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae* (Marcoux et al., 2000). En hongos filamentosos hay pocos estudios sobre la función de Rho2. En *A. niger*, RhoB (homólogo de Rho2) está implicado en la respuesta al estrés de la pared celular (Kwon et al., 2011). Los fenotipos asociados a la pérdida de Rho2 en *Ashbya gossypii* (AgRho2), sugirieron

que posee un papel importante en la ramificación de la punta de las hifas (Nordmann et al., 2014). Por otra parte, Rho4 está involucrada en el control de la morfología celular y la citocinesis en *S. pombe* (Nakano et al., 2003). Además, estudios en ascomicetos filamentosos como *A. nidulans* y *N.crassa*, sugieren que RHO-4 se requiere en la formación del septo, probablemente produciendo el ensamblaje correcto del anillo de actina contráctil (Rasmussen y Glass, 2005; Si et al., 2010).

El estudio de Rho3 en la levadura *S. cerevisiae*, demostró que tiene una función reguladora en diversos procesos relacionados con la polaridad celular como el transporte de las vesículas exocíticas, el acoplamiento y fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la polarización del citoesqueleto de actina (Imai et al., 1996; Robinson et al., 1999) . Adicionalmente, se ha sugerido que la regulación de la exocitosis por parte de Rho3 en *S. cerevisiae*, es independiente de su papel en la regulación de la polaridad de la actina. Esto incluye la regulación del transporte de vesículas desde la célula madre a la hija, dependiente de la miosina (Myo2) y el acoplamiento y fusión de las vesículas en sitios específicos, mediados por una proteína del exocisto llamada Exo70 (Figura 4) (Adamo et al., 1999; Robinson et al., 1999). Adicionalmente, en estudios sobre Rho3 realizados en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, se sugirió que esta GTPasa participa en la citocinesis y en el crecimiento celular polarizado a través la regulación de la exocitosis y de la organización del citoesqueleto por interacción con la formina For3 (Nakano et al., 2002; Wang et al., 2003). Adicionalmente, se reportó que Rho3 se localiza en la periferia celular y se concentra en los extremos en crecimiento de las células en interfase y en el sitio de división celular, mediante la utilización de anticuerpos producidos contra Rho3 y la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP-Rho3p) (Figura 5) (Nakano et al., 2002; Wang et al., 2003). En un estudio reciente, se describió que además de esta localización, Rho3 se localiza en las estructuras de Golgi/endosomas y se sugirió un papel adicional para esta proteína, donde participa en la regulación del tráfico Golgi/endosomas formando un complejo con Apm1 y otras subunidades del complejo de proteína adaptadora 1 asociada a clatrina (Kita et al., 2011).



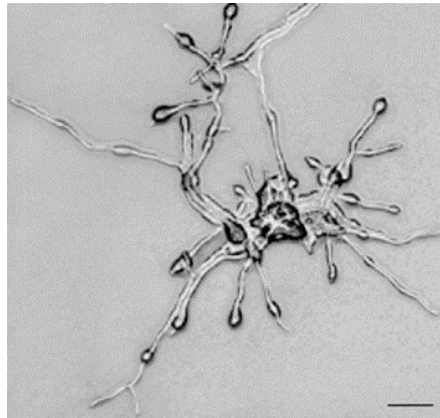
**Figura 4. Modelo del papel de Rho3 en *S. cerevisiae*.** Rho3 unido a GTP posee tres rutas efectoras en *S. cerevisiae*: (i) regulación de la distribución polarizada del citoesqueleto de actina; (ii) regulación de la administración de vesículas mediada por Myo2 y, (iii) regulación del acoplamiento y fusión de vesículas mediado por Exo70 (modificada de Adamo et al., 1999).



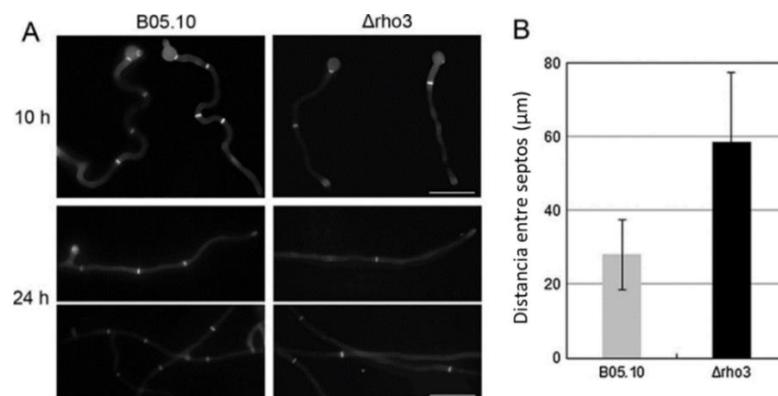
**Figura 5. Localización de Rho3 en *S. pombe*.** Rho3 se localiza en la periferia celular, concentrándose en los extremos en crecimiento de las células en interfase y en la región media de las células mitóticas. La acumulación de Rho3 en la región central de la célula, comienza en la metafase y persiste en el septo incluso durante la citocinesis. El patrón de tinción fue diferente para Rho3 y F-actina, aunque se superpusieron en las puntas y el septo. Barra de escala = 5  $\mu$ m (modificada de Nakano et al., 2002).

Por otra parte, en diversos hongos filamentosos, se han atribuido funciones diferentes a Rho3. En *Ashbya gossypii*, Wendland y Philippsen (2001) describieron que la eliminación de AgRho3 causa una tasa de extensión reducida y una fase de crecimiento isotrópico en las puntas de las hifas, el cual puede superarse con la aparición de nuevos tubos hifales que continúan extendiéndose en el eje de polaridad anterior (Figura 6). Además, mediante un ensayo de doble híbrido, se identificó que esta Rho GTPasa interactúa con AgBoi1/2p, activando la nucleación de los cables de actina y garantizando un crecimiento polarizado continuo en las puntas de las hifas, mediado por el polarisoma (Knechtle et al., 2006). En contraste, en *Magnaporthe grisea*, el homólogo de Rho3 (MgRho3) resulta prescindible para el crecimiento polarizado

de las hifas, pero esencial para el desarrollo del apresorio y la patogenicidad (Zheng et al., 2007b). Por otra parte, la delección de *rho3* en *Botrytis cinerea* suprime significativamente la tasa de crecimiento vegetativo y la conidiación, y reduce la formación del apresorio y la patogenicidad. Además, la distancia entre los septos aumenta en la mutante  $\Delta\rho3$ , lo que sugiere que *Rho3* puede estar involucrada en la formación de estos. Adicionalmente, la eliminación de *rho3* en *B. cinerea* provoca una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las puntas de las hifas, asociado a una pérdida de polaridad de las mitocondrias (An et al., 2015).



**Figura 6. Morfología colonial de *A. gossypii* en ausencia de *Agrho3*.** Las hifas mostraron hinchazones en la punta debido a un crecimiento isotrópico. La colonia fue incubada por 2 días a 30° C. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$  (tomada de Wendland y Philippsen, 2001).



**Figura 7. Distancia entre septos en  $\Delta\rho3$  de *B. cinerea*.** (A) Tinción de los septos con Calcofluor-white de esporas en germinación (10 h) e hifas (24h) de la cepa WT (B05.10) y  $\Delta\rho3$ . Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$  (B) Gráfico de barras que muestra la distancia promedio entre los septos de la cepa WT y la mutante (n= 50 hifas). Las barras de error representan las desviaciones estándar. P= 0.05. (tomada y modificada de An et al., 2015).

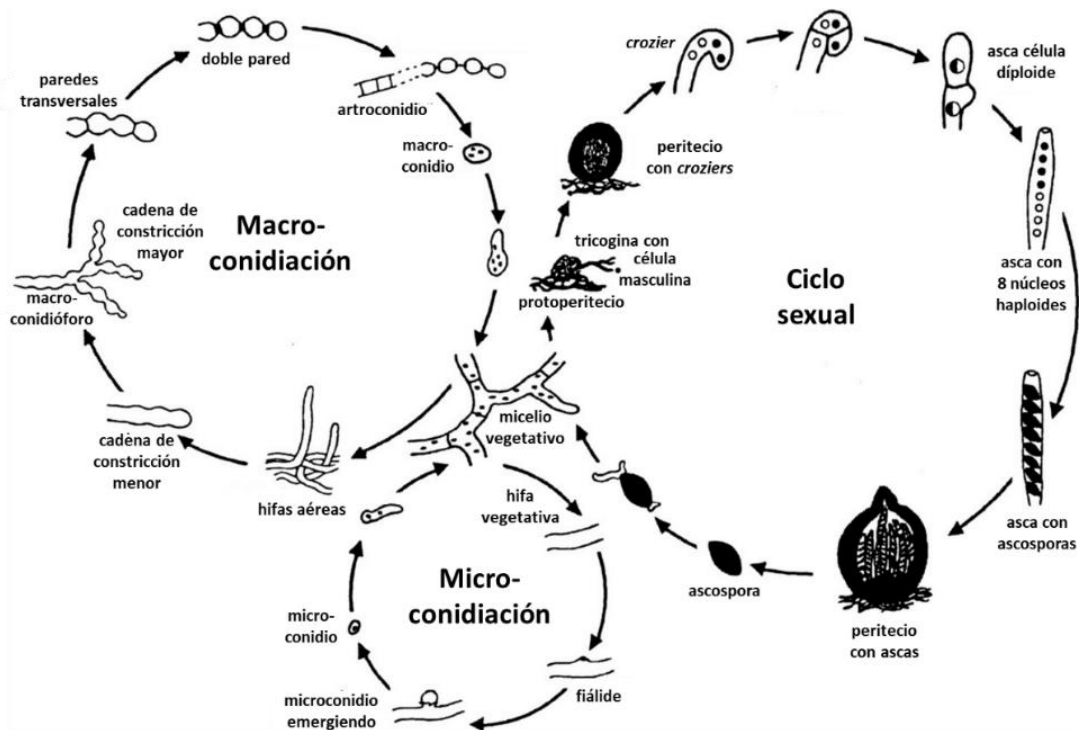
### 1.1.5 *Neurospora crassa*

*Neurospora crassa* es un hongo filamentoso perteneciente al phylum Ascomycota, que está ampliamente distribuido en la naturaleza (Davis, 2000). Este hongo ha sido adoptado como un organismo modelo experimental, siendo uno de los primeros estudios realizados en este, la hipótesis desarrollada por Beadle y Tatum "un gen-una enzima" (Beadle y Tatum, 1941). Gracias a que crece rápidamente, es fácil de propagar en medios de crecimiento definidos, las manipulaciones genéticas son relativamente simples y que su genoma está completamente secuenciado, *Neurospora crassa* tiene un gran valor en la investigación en estudios genéticos, bioquímicos, subcelulares y del desarrollo. Ha sido especialmente útil en estudios de fotobiología, ritmos circadianos, morfogénesis, reparación y recombinación de ADN y diversos procesos epigenéticos (Borkovich et al., 2004; Castro-Longoria et al., 2010; Davis y Perkins, 2002; Galagan et al., 2003).

El complejo ciclo de vida de *N. crassa* permite que se produzcan al menos 28 tipos de células morfológicamente distintas (Bistis et al., 2003) (Figura 8). La fase vegetativa inicia cuando una espora, ya sea sexual (ascospora) o asexual (conidio), germina dando lugar a células multinucleadas llamadas hifas, las cuales crecen por extensión de la punta y se ramifican regularmente para formar una red compleja llamada micelio. Una vez que el micelio se establece, las hifas vegetativas se pueden diferenciar en hifas aéreas (conidióforos), lo que lleva a la formación de cadenas de esporas asexuales, conocidos como macroconidios, los cuales son multinucleados y facilitan la dispersión (Aramayo y Selker, 2013). Una vía alterna permite formar otro tipo de espora asexual, conocida como microconidio. En esta vía, una hifa vegetativa forma una fiálide, de donde emerge un microconidio, generalmente uninucleado y el cual se ha propuesto que funciona principalmente como un elemento de fertilización masculino (Maheshwari, 1999; Springer, 1993).

En condiciones de limitación de nitrógeno, se induce un tipo de agregación hifal que conduce a la generación de órganos sexuales femeninos conocidos como protoperitecios. Cuando una hifa especializada (tricógina) que emerge desde el protoperitecio entra en contacto con una célula masculina (generalmente un conidio) en respuesta a feromonas, ocurre el apareamiento (Bistis, 1981). El proceso de fertilización transforma un protoperitecio en un peritecio. Después de la fertilización, los núcleos derivados de la célula femenina y masculina, permanecen en el mismo citoplasma, donde sufren mitosis y se organizan en un tejido dicariótico en el que cada célula tiene un núcleo de cada tipo de apareamiento. Posteriormente, los núcleos se someten a una serie de divisiones simultáneas en la punta de la hifa ascógena, formando una célula en forma de gancho conocida como *crozier*. La fusión de los núcleos

haploides es seguida rápidamente por meiosis y una división mitótica; dando lugar a un asca que contiene ocho ascosporas. Las ascosporas son expulsadas del peritecio y pueden germinar después de la exposición a altas temperaturas, completando el ciclo celular (Borkovich et al., 2004; Raju, 1992).

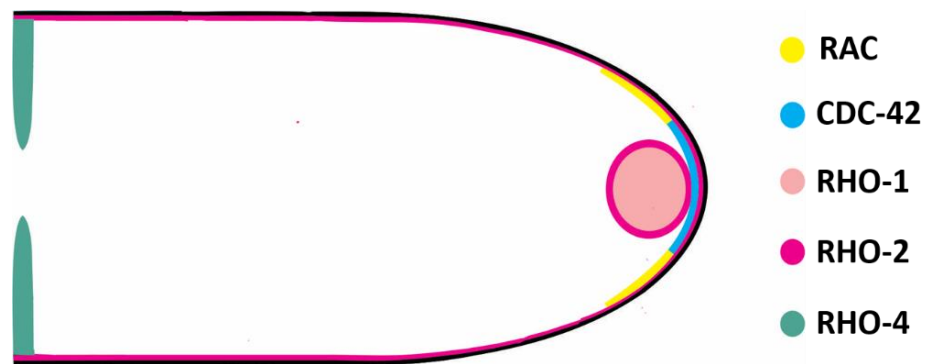


**Figura 8. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*.** Dependiendo de las condiciones del entorno y la disponibilidad de nutrientes, *N. crassa* puede entrar en fases distintas. El micelio vegetativo puede sufrir los procesos de esporulación asexual por medio de macroconidiación o microconidiación. La macroconidiación se desarrolla por medio de la formación de hifas aéreas que producen macroconidios multinucleados. La microconidiación ocurre a partir de la formación de una fiálide de donde emergen microconidios uninucleados. Además, en respuesta a la limitación de nitrógeno, *N. crassa* puede ingresar a la fase sexual, formando protoperitecios, que después de la fertilización, conducen a la formación de los peritecios, dentro de los cuales se forman ascas, cada una con ocho esporas sexuales (ascosporas) (modificada de Borkovich et al., 2004).

### 1.1.6 Función y localización de Rho GTPasas en *Neurospora crassa*

El genoma de *N. crassa* codifica seis miembros pertenecientes a la subfamilia de Rho GTPasas: RAC, CDC-42, RHO1-4. Dentro de estas, RHO-3 es la única que no se ha descrito. De acuerdo a Araujo-Palomares et al. (2011), el módulo RAC-CDC-42 es necesario para el crecimiento polarizado y la morfogénesis de las hifas. La eliminación de cualquiera de las dos GTPasas produce colonias viables, pero muestran claros defectos en el crecimiento y polaridad. Además, los mutantes dobles de *rac* y *cdc-42* son letales, lo que

sugiere que ambas GTPasas comparten al menos una función en común. Sin embargo, el análisis microscópico de los patrones de localización de las dos proteínas, indican que tienen funciones principales no redundantes. CDC-42 se localiza en forma de media luna asociada a la membrana apical, mientras que RAC marca un anillo asociado a la membrana apical, excluyendo la región que ocupa CDC-42 (Figura 9). De la misma forma, muestran patrones de localización distintos durante la formación del tubo germinal y las ramas, donde CDC-42 se acumula en la membrana plasmática antes que RAC. Estos estudios, sugieren que CDC-42 tiene una función más importante en el establecimiento de la polaridad, mientras que la función principal de RAC podría ser mantener la polaridad.



**Figura 9. Localización de las Rho GTPasas en *N. crassa*.** RAC y CDC-42 se localizan en la membrana apical. RHO-1 se localiza principalmente en la región central del Spitzkörper, así como en un sistema endomembranoso en regiones subapicales (no mostrado). RHO-2 se asocia con la membrana plasmática y con la región externa del Spitzkörper. RHO-4 se localiza principalmente en los septos, en todas las etapas de su formación.

Por otra parte, estudios de inmunodetección, mostraron un patrón de localización de RHO-1 que coincide con la región central del Spitzkörper (Spk) en la punta de las hifas en crecimiento, además de localizarse en un sistema endomembranoso dinámico en regiones subapicales. En contraste, la localización de RHO-2 se asocia con la membrana plasmática a lo largo de toda la hifa y se acumula débilmente en la región externa del Spitzkörper (Figura 9). La función principal asociada a RHO-1 en *N. crassa*, es el mantenimiento de la integridad de la pared celular, además de funcionar como una subunidad reguladora de la glucano sintasa y estar involucrada en la polarización celular y la organización del citoesqueleto de actina a través de la interacción con la formina BNI-1. RHO-2 es altamente homóloga a RHO-1; sin embargo, no tiene una función reguladora en la actividad de la glucano sintasa y el citoesqueleto de actina, sino que participa en la regulación de la integridad de la pared celular al interactuar con PKC-1, teniendo una función redundante con RHO-1 (Richthammer et al., 2012).



Por otro lado, Rasmussen y Glass (2005), describieron que los mutantes de *rho-4* carecen de anillos de actina, lo que indica que RHO-4 actúa temprano en el proceso de septación y es esencial para la formación del anillo de actina. Además, la caracterización de cepas que contienen alelos activados de *rho-4*, sugieren que RHO-4 unido a GTP está involucrado en el inicio de la septación, mientras que para el término puede requerirse su forma unida a GDP. De acuerdo con su función, RHO-4 se localiza en los anillos corticales antes y durante el desarrollo del septo y alrededor del poro septal después de su formación (Figura 9) (Rasmussen y Glass, 2007).

## 1.2 Justificación

Las GTPasas de la familia Rho son moléculas clave involucradas en las vías de transducción de señales que regulan múltiples procesos celulares fundamentales. En levaduras, la GTPasa Rho3 se ha identificado como una proteína clave en la regulación del proceso de exocitosis y la organización del citoesqueleto de actina. No obstante, la función de Rho3 durante el desarrollo de hongos filamentosos aún no está clara debido a la falta de información reportada. El análisis de la localización de la proteína RHO-3 del hongo filamentosos modelo *Neurospora crassa*, así como una evaluación de los procesos celulares en los que participa durante su desarrollo, ayudará a establecer una mejor comprensión del papel que tiene esta Rho GTPasa durante el crecimiento de hongos filamentosos.

## 1.3 Hipótesis

- GFP-RHO-3 se localizará en la región apical de las hifas de *N. crassa*, así como en sitios de septación.
- La eliminación de *rho-3* causará defectos en el desarrollo celular de *N. crassa*.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar el papel de la GTPasa RHO-3 en el desarrollo del hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Determinar la dinámica y localización de GFP-RHO-3 en germinulas e hifas maduras de *N. crassa*.
2. Determinar el efecto de la delección de *rho-3* en la morfogénesis celular de *N. crassa*.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Organismos y medios de cultivo

Los organismos y cepas utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1. Las células de *Escherichia coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB), el cual contiene bacto-triptona (1%), extracto de levadura (0.05%), NaCl (1%) y agar (1.5%). Adicionalmente, para la selección de células de *E. coli* transformantes se utilizó medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ mL). Las cepas de *N. crassa* fueron cultivadas en Medio Mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1956), el cual consiste en sales de Vogel (1X), sacarosa (1.5%) y agar (1.8 %), a una temperatura de 30° C. Las cepas de *N. crassa* con genotipo *his*<sup>-3</sup> *hph*<sup>R</sup> fueron cultivadas en medio MMV suplementado con L- histidina (0.5 mg/mL) e higromicina B (300 µg/mL) a 30° C. Para la obtención de microconidios, se utilizó el medio Westergaard preparado con sacarosa (5 mg/ml), biotina (5 ng/ml), agar (2 %) y sales de Westergaard 5X al 2% (KNO<sub>3</sub> 5 mg/ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mg/ml, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2.5 mg/ml, NaCl 0.5 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mg/ml y elementos traza 0.05%). Además, para el aislamiento de colonias transformantes de *N. crassa* se utilizó el medio FGS (sales de Vogel 1X, fructosa 0.05 %, glucosa 0.05%, L-sorbosa 2% y agar 1.5%).

**Tabla 1.** Organismos y cepas utilizados en este estudio.

ORGANISMO/CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>DH5-α</b>	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-	Invitrogen
<b><i>Neurospora crassa</i></b>		
<b>4200</b>	Wt: tipo silvestre mat a	FGSC
<b>9717</b>	Δ <i>mus-51::bar</i> <sup>+</sup> ; <i>his-3</i> <sup>-</sup> mat A	FGSC
<b>Δ<i>rho-3</i></b>	Δ <i>mus-51::bar</i> <sup>+</sup> ; <i>his-3</i> <sup>-</sup> ; Δ <i>rho-3::hph</i> <sup>R</sup> mat A	Presente estudio
<b><i>gfp::rho-3</i></b>	Δ <i>mus-51::bar</i> <sup>+</sup> ; <i>his-3</i> <sup>+</sup> ; <i>Pccg-1-gfp::::7xGly::rho-3</i> mat A	Presente estudio
<b>NJV12.1.1</b>	<i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1</i> :: <i>ch -1</i> <sup>+</sup> :: <i>mcherryfp</i> <sup>+</sup> mat A	Verdín et al., (2009)
<b>NJV14.4.2</b>	<i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1</i> :: <i>gs-1</i> <sup>+</sup> :: <i>mcherryfp</i> <sup>+</sup> mat A	Verdín et al., (2009)

FGSC: Fungal Genetic Stock Center

## 2.2 Análisis bioinformático

La identificación de la proteína putativa RHO-3 en el genoma de *N. crassa* (EAA36504.1), se realizó a partir de un alineamiento de secuencias peptídicas con la proteína Rho3p de *S. cerevisiae* (KZV10495.1), así como con las secuencias peptídicas EgRho3 de *Eremothecium gossypii* (AAG41252.1), MgRho3 de *Magnaporthe grisea* (ABK60346.1) y BcRho3 de *Botrytis cinerea* (EMR86432.1), las cuales corresponden a homólogos de Rho3p en hongos filamentosos. El alineamiento se realizó utilizando el software CLC Genomics Workbench y los porcentajes de identidad se obtuvieron con la herramienta blastp de la base de datos NCBI. Además, se analizaron los dominios conservados de Rho GTPasa con ayuda de la base de datos Interpro.

## 2.3 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

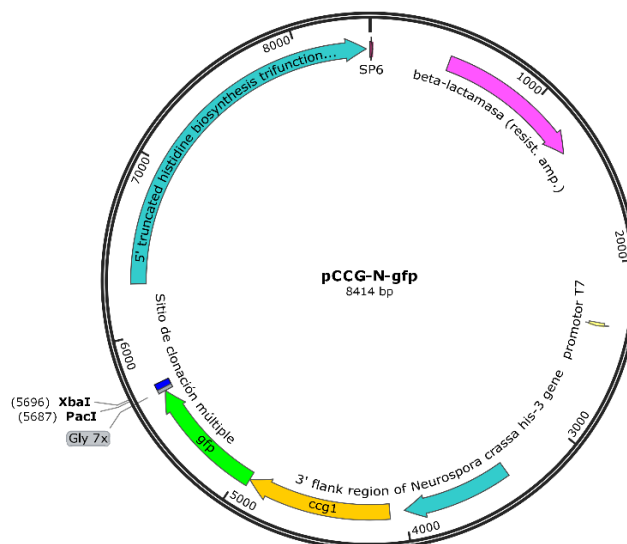
El DNA genómico de las cepas de *N. crassa* utilizadas se extrajo a partir de micelio cultivado en MMV líquido durante 72 horas a 28°C en oscuridad. El micelio se filtró al vacío y se congeló con nitrógeno líquido para ser triturado en mortero hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Luego de ello, se añadieron 600 µl de buffer de extracción (EDTA 0.05M, SDS 0.2 %, DEPC 1 µl/ml) y se incubó a 65°C por 45 minutos, seguido de una centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 100 µl de acetato de potasio (3M pH 5.2), incubando por 8 minutos en hielo. Una vez concluido el tiempo de incubación, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se añadieron 600 µl de isopropanol frío. Luego de ser centrifugado nuevamente a 12,000 rpm por 10 minutos, la pastilla resultante se resuspendió en 300 µl de TE1X, incubando por una hora a 65°C. Posteriormente, se añadieron 800 µl de etanol absoluto y 15 µl de cloruro de litio (10M) para precipitar el DNA, centrifugando a 12,000 rpm por 5 minutos. El DNA precipitado se lavó con 600 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente. Una vez seca la pastilla de DNA genómico, se disolvió en agua.

## 2.4 Construcción de cepas de *N. crassa*

### 2.4.1 Cepa *gfp::rho-3*

Para la construcción de la cepa que expresa la proteína RHO-3 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el amino terminal (N-terminal), se utilizó como vector de clonación el plásmido pCCG-N-gfp, el cual contiene (i) el gen de la proteína GFP bajo el promotor constitutivo *ccg-1*; (ii) un sitio de clonación múltiple que permite integrar el marco abierto de lectura de *rho-3*, las regiones 5' y 3' truncadas del locus *his-3* de *N. crassa*, necesarias para que se lleve a cabo la recombinación en el genoma; y (iii) el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa como marcador de selección para la transformación en *E. coli* (Figura 10).

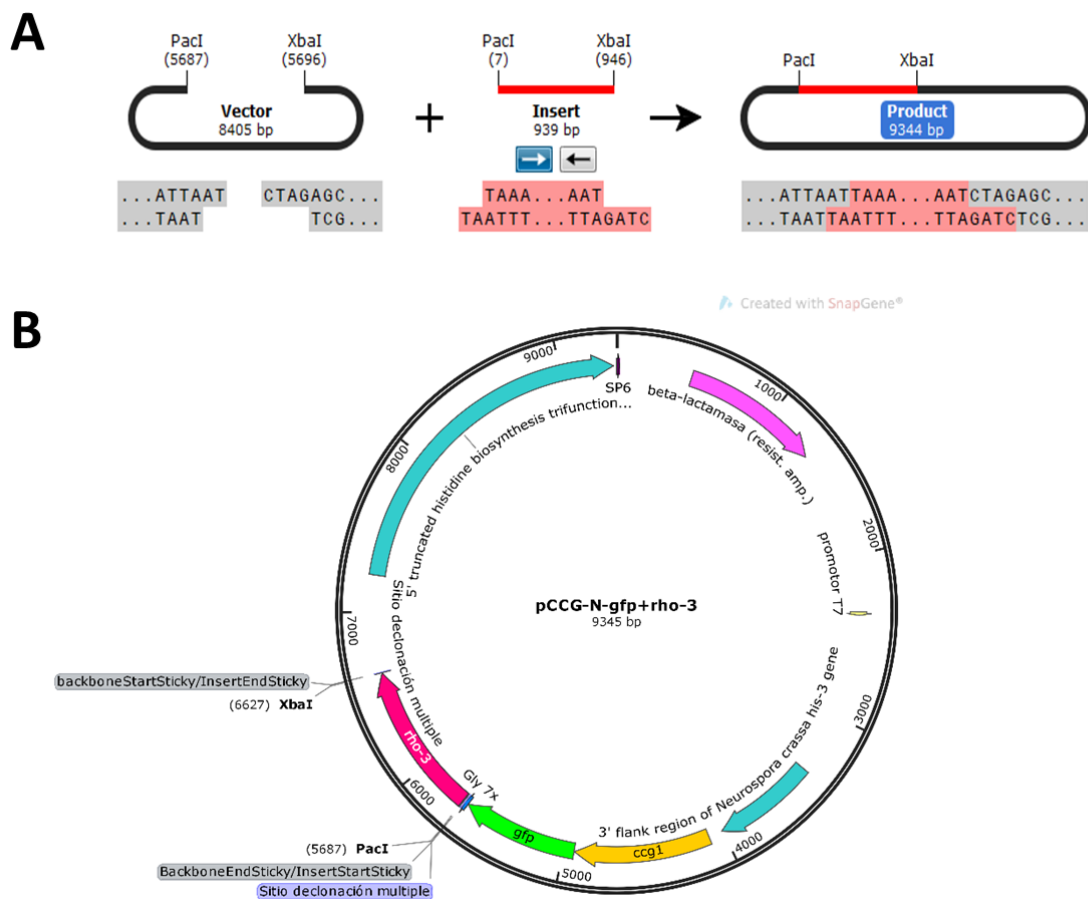
El marco abierto de lectura de *rho-3* se obtuvo mediante PCR, a partir del DNA genómico de la cepa silvestre 4200 de *N. crassa*. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos 11 y 12 descritos en la Tabla 2, los cuales incluyen secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción PacI y XbaI, en la región 5' y 3' respectivamente. El sitio de clonación múltiple del vector pCCG-N-gfp también posee estas secuencias de reconocimiento, por lo que el producto de la amplificación por PCR de *rho-3*, se integró al plásmido mediante restricción y ligación (Figura 11). La reacción de ligación se transformó por choque térmico en células quimiocompetentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*.



**Figura 10. Mapa del vector pCCG-N-gfp.** El gen que codifica para la proteína GFP se encuentra en verde, bajo el promotor fuerte constitutivo *ccg1* en amarillo. Además, contiene un sitio de clonación múltiple al terminar una secuencia de siete glicinas (Gly 7X) que se encuentra en el C-terminal de la proteína GFP. Los fragmentos marcados en azul cielo corresponden a regiones truncadas de *his-3*, necesarios para llevar a cabo la recombinación homóloga.

Una vez extraído y purificado el vector de las bacterias, se transformó por electroporación en conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.2.2. Esta cepa es auxótrofa a histidina, por lo que los conidios transformantes se seleccionaron en medio FGS sin histidina a 30°C durante cinco días. Una vez concluido el tiempo de incubación, se realizó una transferencia de los cultivos que presentaron crecimiento a tubos con medio MMV 1.8% nuevo y, después de dos días en incubación a 30°C, se observaron por microscopía confocal.

Las cepas que presentaron fluorescencia se cultivaron en medio Westergaard agar para obtener la cepa *gfp::rho-3* homocarión por medio de la producción de microconidios, como se describe en el apartado 2.4.2.3.



**Figura 11. Construcción del plásmido pCCG-N-gfp+rho3.** (A) Se utilizó restricción y ligación como estrategia de clonación de *rho-3* en el vector pCCG-N-*gfp*. Las enzimas utilizadas para la doble digestión tanto del vector como del gen corresponden a PacI y XbaI. (B) El gen de la proteína verde fluorescente se encuentra fusionado en el N-terminal del marco abierto de lectura de *rho-3* en el vector construido.

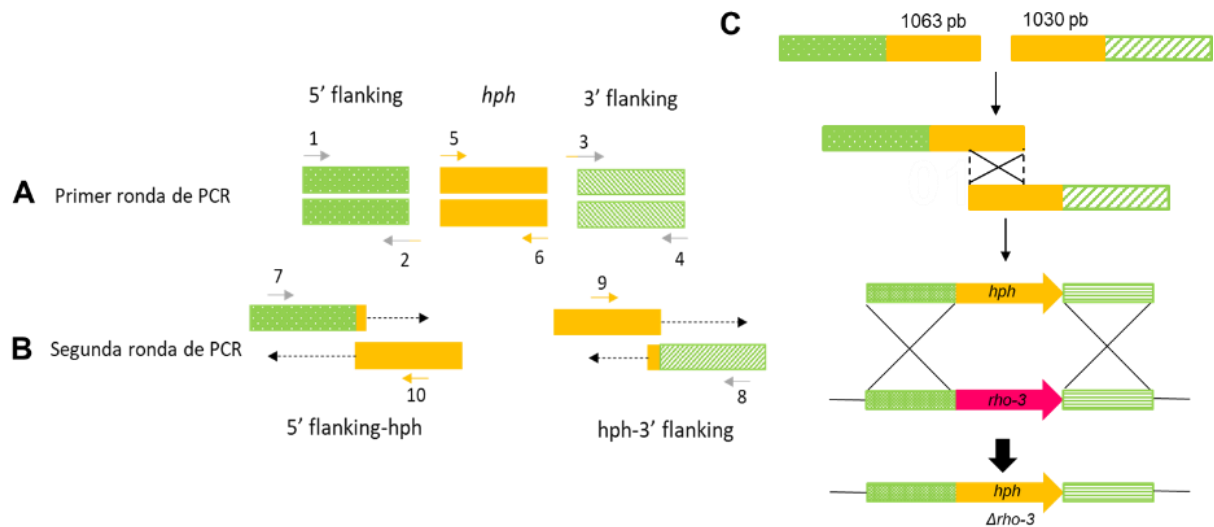
## 2.4.2 Cepa $\Delta\rho\text{-3}$

### 2.4.2.1 Construcción de fragmentos recombinantes

Para la obtención de la cepa *knockout*  $\Delta\rho\text{-3}$  se construyeron dos fragmentos recombinantes utilizando la técnica de PCR de fusión (Yu et al., 2004) (Figura 12). Para ello, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1000 pb de las regiones flanqueantes del gen interés mediante PCR, siguiendo el protocolo especificado para la enzima Phusion High-Fidelity (ThermoFisher No.Cat. F530S). Utilizando los oligonucleótidos 1 y 2 descritos en la Tabla 2, se obtuvieron copias del fragmento río arriba del gen *rho-3* (región 5'), mientras que con los oligonucleótidos 3 y 4 se amplificó el fragmento río abajo (región 3'). Adicionalmente, utilizando como templete el plásmido pCSN44, se amplificó el fragmento correspondiente al cassette del gen *hph*, el cual confiere resistencia a higromicina B, a través de la expresión de la enzima fosfotransferasa y el cual se encuentra flanqueado por el promotor y terminador de *Aspergillus nidulans* (Staben et al.,1989) (Figura 12A). Posteriormente, se realizó la fusión del fragmento amplificado de la región flanqueante 5' con 1063 pares de bases a partir de la región 5' del cassette del gen *hph* y la fusión de 1030 pares de bases a partir de la región 3' del cassette del gen *hph* con el fragmento flanqueante de la región 3'. Para lo anterior, se emplearon los oligonucleótidos anidados 7 y 8, y los oligonucleótidos 9 y 10 que amplifican parcialmente el cassette de higromicina (Figura 12B), siguiendo el protocolo de la enzima Phusion High-Fidelity (ThermoFisher No.Cat. F530S), adicionando DMSO y utilizando una temperatura de alineamiento de 50°C.

**Tabla 2.** Descripción de los oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia
1	F5 rho-3	5' GCAACAGCATAGTCATAGTACGAAG 3'
2	R5 rho-3	5' CCACTTAACGTTACTGAAATCCGTCTGGAGCTCGATAATGAATG 3'
3	F3 rho-3	5' CTTCAATATCATCTTCTGTGCGAAACACGGGCAACCACATTTATC 3'
4	R3 rho-3	5' GTATAGGACAGGCATGTAATTCAACCG 3'
5	HphF-pCN44	5' GATTCAGTAACGTTAAGTGG 3'
6	HphR-pCN44	5' GACAGAAGATGATATTGAAGG 3'
7	NestedF rho-3	5' CTGGAGTATATACGTAGTCTCTGTG 3'
8	NestedR rho-3	5' CAAAGATACAGTGCATGTTTATCCTTC 3'
9	hph-SM-F	5' TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC 3'
10	hph-SM-R	5' AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG 3'
11	rho3-Pacl F	5' CCTTAATTAATGCCTTGCGGACTCGGAG 3'
12	rho3-XbaI R	5' CGTCTAGATTACATGACCACGCACTTCG 3'



**Figura 12. PCRs de fusión.** (A) En una primera ronda de PCR se amplificaron los fragmentos flanqueantes de aproximadamente 1000 pb de *rho-3* en el genoma de *N. crassa*, así como el cassette hph. (B) En la segunda ronda se llevó a cabo la fusión del fragmento flanqueante 5' con 1063 del cassette de hph con los oligonucleótidos 7 y 10, así como la fusión de 1030 pb del cassette de hph con el fragmento flanqueante 3' mediante los oligonucleótidos 9 y 8. (C) La sustitución del ORF de *rho-3* en el genoma de *N. crassa* se obtiene mediante recombinación homóloga, tanto de los fragmentos fusionados para completar el cassette de hph, como en el locus del gen de *rho-3*.

#### 2.4.2.2 Transformación de *N. crassa*

Conidios de la cepa FGSC #9717 fueron transformados con los fragmentos recombinantes, mediante la técnica de electroporación. Para ello,  $1.25 \times 10^8$  conidios se lavaron tres veces con 500  $\mu$ l de sorbitol 1M, centrifugándolos a 6,000 rpm durante un minuto y desechando el sobrenadante. El precipitado de conidios se resuspendió en 40  $\mu$ l de sorbitol 1M y se mezcló con 1 $\mu$ g de cada fragmento fusionado. Esta solución fue transferida a una celda de electroporación estéril, y se aplicó un pulso eléctrico (1500 V, 600  $\Omega$ , 25  $\mu$ F) en el electroporador GenePulser Xcell™ (BIO-RAD®). Inmediatamente después del pulso, los conidios se mezclaron con 1 mL de sorbitol 1M y se resuspendieron en 15 ml de solución de recuperación (2 % Sales de Vogel). Posteriormente, se incubaron por tres horas a 30°C en agitación constante (5 rpm) y oscuridad. Los conidios transformantes se seleccionaron en medio FGS con higromicina B (300  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 30° C durante cinco días. Las colonias resultantes se aislaron en tubos de vidrio con medio MMV suplementado con histidina (500  $\mu$ g/ml) e higromicina B (300  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 30°C durante cinco días. Este procedimiento se repitió dos veces y posteriormente se extrajo DNA genómico. La comprobación de la sustitución del gen *rho-3* por el cassette de *hph* en la cepa heterocarión se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos anidados 7 y 8 (Tabla 2).



### 2.4.2.3 Obtención de mutante homocarión

Debido a que la cepa mutante heterocarión de *rho-3* fue incapaz de producir ascosporas al cruzarse con una cepa del tipo de apareamiento opuesto, se utilizó la estrategia de inducción de microconidios para la obtención de la cepa mutante homocarión, ya que estos conidios son predominantemente uninucleados (Horowitz y Macleod 1960; Baylis y DeBusk 1967). Para ello, se cultivó la cepa  $\Delta\rho-3$  heterocarión en tubos de borosilicato con 7 ml de medio Westergaard agar suplementado con yodoacetato de sodio 0.1 M, de forma inclinada, durante 12 días a 25°C. Una vez concluido el tiempo de incubación, los conidios de cada tubo se suspendieron en 3 ml de agua estéril y se filtraron a través de un filtro de 5 micrómetros. El filtrado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y los conidios se suspendieron en 200  $\mu$ l de agua estéril, para aumentar la concentración de los mismos. Posteriormente, se tomaron 50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l de la solución de conidios, para sembrarlos en cajas de Petri con medio FGS suplementado con higromicina B (300  $\mu$ g/mL). Las cajas se incubaron durante dos días a 30 °C y se seleccionaron las colonias más pequeñas, correspondientes a las originadas por microconidios, con ayuda del microscopio estereoscópico Olympus SZX12. Las colonias seleccionadas se sembraron en tubos de borosilicato con 3ml de MMV suplementado con higromicina B (300  $\mu$ g/mL) y se realizaron dos pases, cultivándolas a 30°C durante dos días. La comprobación de la mutante homocarión se realizó a partir de extracción de DNA genómico y PCR utilizando los oligonucleótidos anidados 7 y 8, de la misma forma que con la mutante heterocarión.

## 2.5 Caracterización fenotípica de $\Delta\rho-3$

Todos los análisis para la caracterización fenotípica se realizaron por triplicado, utilizando la cepa mutante de *rho3* de *N. crassa* ( $\Delta\rho-3$ ) y la cepa WT 4200 como control.

### 2.5.1 Morfología colonial

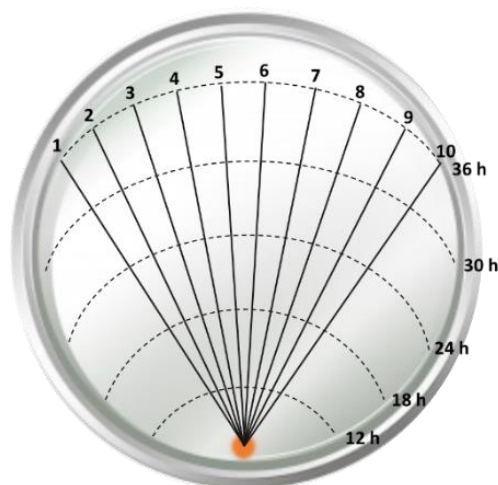
Para determinar la morfología colonial de  $\Delta\rho-3$ , se inocularon  $1.987 \times 10^6$  conidios en el centro de placas de Petri de 10 cm con MMV y se incubaron a 30°C durante 18 horas. Las imágenes macroscópicas fueron tomadas con una cámara Nikon D3300. Adicionalmente, se tomaron imágenes del margen de la colonia mediante microscopía estereoscópica (ver apartado 2.6.1).

### 2.5.2 Morfología microscópica

Para la visualización microscópica de las hifas maduras, se inocularon conidios en el centro de placas de Petri con MMV 3% agar y se incubaron a 30°C por 24 h. Las imágenes de la morfología fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial; además de observar la organización del Spitzenkörper por microscopía confocal de barrido láser utilizando el microscopio invertido OlympusFluoview FV-1000 y el colorante FM4-64 (10  $\mu$ l, a una concentración de 2.5  $\mu$ M) (ver apartado 2.6.2). El diámetro de las hifas se determinó realizando diez mediciones a lo largo de toda la hifa, de 30 hifas principales, utilizando el software ImageJ®.

### 2.5.3 Tasa de crecimiento

Para medir la tasa de extensión de las hifas, se inocularon  $1.987 \times 10^6$  conidios en el extremo de placas de Petri de 150x15 mm con medio MMV. Luego de un periodo inicial de 12 horas de incubación a 30°C, se marcó el perímetro de la colonia cada 6 horas, hasta cumplir 36 horas. Para cada marca, se midieron 10 transectos perpendiculares a lo largo de la superficie colonial y se determinó la media y la desviación estándar (Figura 13).



**Figura 13. Técnica utilizada para la medición del crecimiento radial.** Cada 6 horas de crecimiento a 30°C, se marcó el margen de la colonia hasta llenar la caja (líneas punteada) y se midieron 10 transectos perpendiculares en cada marca (líneas sólidas) para determinar la tasa de elongación.

#### **2.5.4 Índice de ramificación**

Para obtener la tasa de ramificación, se inocularon  $1.987 \times 10^6$  conidios en el extremo de cajas de Petri con MMV y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, con ayuda del microscopio estereoscópico Olympus SXZ12, se cuantificaron las ramas laterales producidas dentro de los primeros 500  $\mu\text{m}$  (apicales) de 10 hifas parentales, para obtener un total de 30 mediciones.

#### **2.5.5 Conidiación**

La producción de conidios se evaluó inoculando  $1.987 \times 10^6$  conidios en tubos de borosilicato con 5 mL de MMV sólido, incubándolos tres días en oscuridad a 30°C y, posteriormente, exponiéndolos a la luz durante cinco días. Los conidios se colectaron en 1 mL de agua estéril y se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer.

#### **2.5.6 Producción de biomasa**

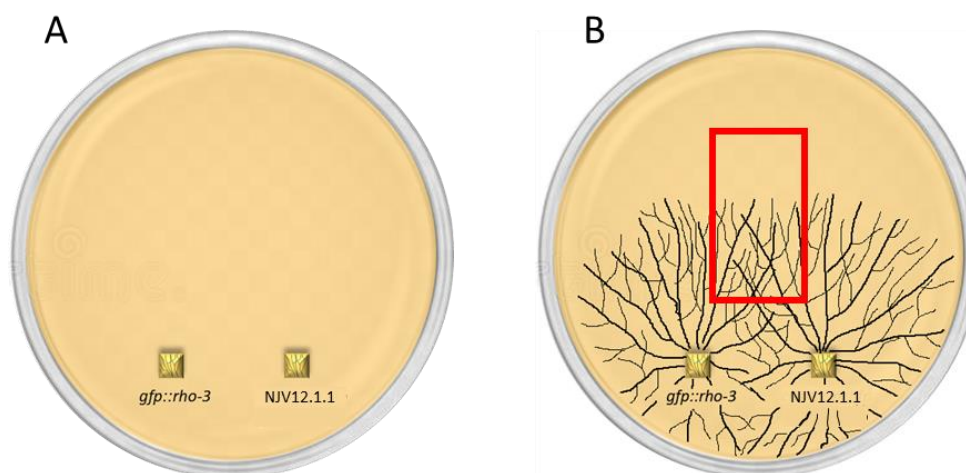
Se inocularon  $1.987 \times 10^6$  conidios en matraces Erlenmeyer con 50 mL de MMV líquido y se incubaron a 30°C durante tres días en oscuridad. Una vez concluido el tiempo de incubación, el micelio se filtró en una bomba de vacío y se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se pesó en una balanza analítica y se registró el peso seco.

#### **2.5.7 Distancia entre septos**

Para visualizar los septos se inocularon conidios en una placa de Petri con MMV al 3% y se incubaron a 30°C por 18 h. Posteriormente, las hifas se tiñeron con 10  $\mu\text{l}$  del colorante Calcofluor-white (1 mM) y se observaron en el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E (ver apartado 2.6.3). Para medir la distancia entre septos se utilizó el software del microscopio NIS-Elements Viewer, realizando 200 mediciones para cada cepa.

## 2.6 Fusiones vegetativas

Con la finalidad de analizar la dinámica de RHO-3 en relación con la localización de la quitina sintasa 1 (CHS-1) y la glucano sintasa 1 (GS-1) de *N. crassa*, se realizaron fusiones vegetativas entre la cepa *gfp::rho-3* y las cepas que contienen la CHS-1 y GS-1 etiquetadas con la proteína fluorescente mCherry (NJV12.1.1 y NJV14.4.2; cortesía Dra. Riquelme), todas con tipo de apareamiento mat A. Para ello, se tomaron cuadros de micelio de aproximadamente 5x5mm y se colocaron a una distancia de 2 cm en placas de Petri con MMV 3 % agar (Figura 14). Estas placas se incubaron a 30 °C durante 16 horas en oscuridad y posteriormente se observaron en microscopía confocal de disco giratorio para realizar el análisis de co-localización (ver apartado 2.7.2).



**Figura 14. Estrategia utilizada para realizar las fusiones vegetativas.** (A) Se colocaron cuadros de micelio de las cepas a fusionar (*gfp::rho3* con NJV12.1.1 o NJV14.4.2) separados por 2 cm de distancia en placas de Petri con MMV 3% agar. (B) Después de 16 horas de incubación a 30 °C, se observó el área delimitada por el rectángulo rojo en microscopía confocal de disco giratorio.

## 2.7 Microscopía

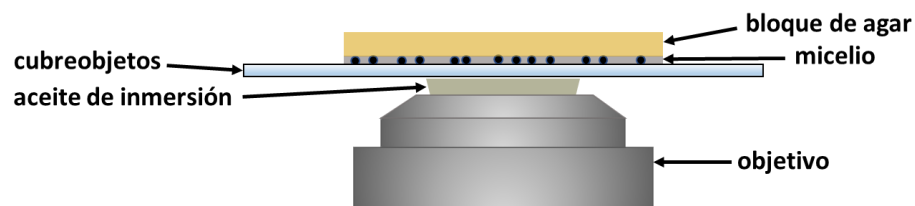
### 2.7.1 Microscopía estereoscópica

Las imágenes del margen de las colonias fueron obtenidas utilizando el microscopio Olympus SXZ12 con un lente DF PLAPO 1X PF y la cámara AxioCam ERc 5s de Zeiss, con un aumento de 7X.

## 2.7.2 Microscopía confocal

Las imágenes de las hifas y germínulas de la cepa *gfp::rho-3* de *N. crassa* fueron obtenidas por microscopía confocal de escaneo por láser y de disco giratorio, utilizando la técnica de bloque de agar invertido para la manipulación y visualización de las muestras (Figura 15) (Hickey et al., 2004).

Para la observación de las células por microscopía confocal de escaneo por láser se utilizó el equipo Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan). Las muestras se observaron utilizando el objetivo plan apocromático 60X (1.4 N.A) con aceite de inmersión. Como fuente de iluminación se utilizó un láser de argón con filtros EGFP (excitación a 488 nm, emisión a 510 nm) y Texas Red (excitación a 543 nm, emisión a 612 nm), además de una fuente de luz transmitida convencional (halógena 100W) con el objetivo de obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC Nomarski). Las imágenes fueron capturadas usando el *software* FV-10 ASW y analizadas con el programa FV-10 ASW viewer (versión 4.1).



**Figura 15. Técnica de bloque de agar invertido.** La técnica de preparación de muestras de hifas de hongos filamentosos para ser observadas por microscopía confocal, con la finalidad reducir la aberración esférica al mínimo, consiste en tomar un bloque de agar de la región de la colonia deseada y colocarlo sobre un cubreobjetos de forma que el micelio quede en contacto con éste (modificado de Hickey et al., 2004).

Para obtener las imágenes por microscopía confocal de disco giratorio, se utilizó el microscopio Nikon Eclipse Ti-E acoplado a una cámara iXon Ultra (Andor) y la unidad de disco giratorio CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Japón). Para la observación de las células etiquetadas con GFP y teñidas con FM4-64, se utilizó el objetivo plan apocromático 60X (1.49 N.A.) con aceite de inmersión y filtros de emisión GFP (515-555 nm) y FM4-64 (620 nm). El análisis de las co-localizaciones de GFP-RHO-3 con CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP se llevó a cabo con el mismo objetivo y utilizando los filtros para EGFP (excitación 488, emisión 515-555 nm) y mCherry (excitación 585, emisión 590-650 nm). Además, se empleó el software NIS-Elements integrado al microscopio para la recuperación y análisis de las imágenes.

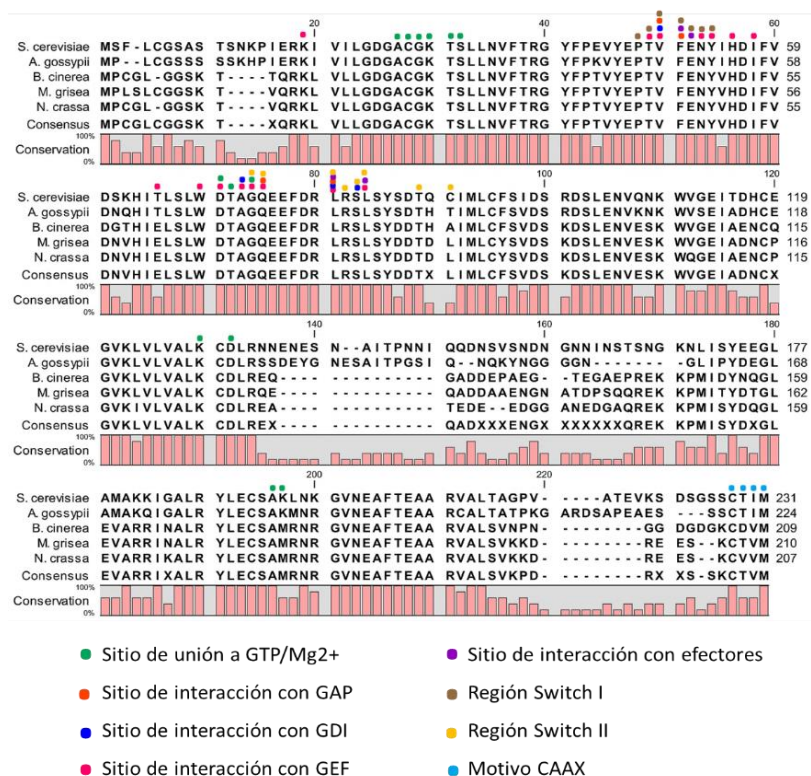
### **2.7.3 Microscopía de epifluorescencia**

Para la observación de hifas teñidas con Calcofluor-white, se utilizó el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E descrito en el apartado 2.7.2 con la cámara CCD Hamamatsu ORCA. Se empleó el objetivo 10 X con una apertura numérica de 0.30. Como fuente de iluminación se utilizó una lámpara ultravioleta con un tiempo de exposición de 10 ms y un filtro DAPI (excitación 380 nm, emisión 475 nm).

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Análisis bioinformático

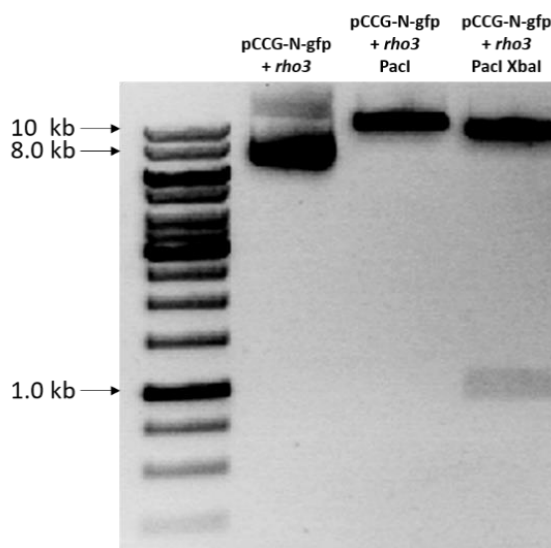
El alineamiento de la secuencia peptídica de RHO-3 de *N. crassa* (Figura 16) reveló una identidad del 61.40 % con la secuencia peptídica de Rho3 de *S. cerevisiae*, mientras que, con la secuencia peptídica de las proteínas homólogas en hongos filamentosos, mostró una identidad de 62.95% con respecto a *A. gossypii*, 83.25 % con *B. cinerea* y un 88.57 % con *M. grisea*. Además, la identificación de los dominios de RHO-3 de *N. crassa*, mostró varios dominios conservados de Rho GTPasa que corresponden a un sitio de unión a GTP/Mg<sup>2+</sup>, un sitio putativo de unión a proteínas GAP, sitio putativo de unión a proteínas GEF, sitio putativo de interacción con las proteínas reguladoras GDI y un sitio de interacción con efectores. Además, se identificaron dos regiones *Switch*, que corresponden a los bucles que experimentan cambios conformacionales al unirse a GTP y GDP, y un motivo de orientación a membrana CAAX en el carboxilo terminal.



**Figura 16. Alineamiento de las secuencias peptídicas de RHO-3 de diferentes hongos.** Los círculos de colores señalan los aminoácidos involucrados en los diferentes dominios identificados de la GTPasa, los cuales están altamente conservados.

### 3.2 Localización intracelular de GFP-RHO-3 en *Neurospora crassa*

La construcción del plásmido pCCG-N-gfp+rho3 se confirmó mediante una reacción de digestión con *PacI* y *XbaI* (Figura 17). La transformación con el plásmido resultó en colonias viables, las cuales se analizaron mediante microscopía confocal para determinar la localización de GFP-RHO-3 en hifas maduras y germínulas, mediante fluorescencia.



**Figura 17. Comprobación del plásmido pCCG-N-gfp+rho3 mediante enzimas de restricción.** En el primer carril se muestra el plásmido purificado directamente de las bacterias transformantes. La digestión con *PacI* linealizó el plásmido mostrando su tamaño equivalente a 9345 pb (segundo carril). La doble digestión con las enzimas *PacI* y *XbaI* mostró la liberación del ORF de rho-3 (939 pb) en el tercer carril; comprobando la correcta integración del mismo en el vector pCCG-N-gfp.

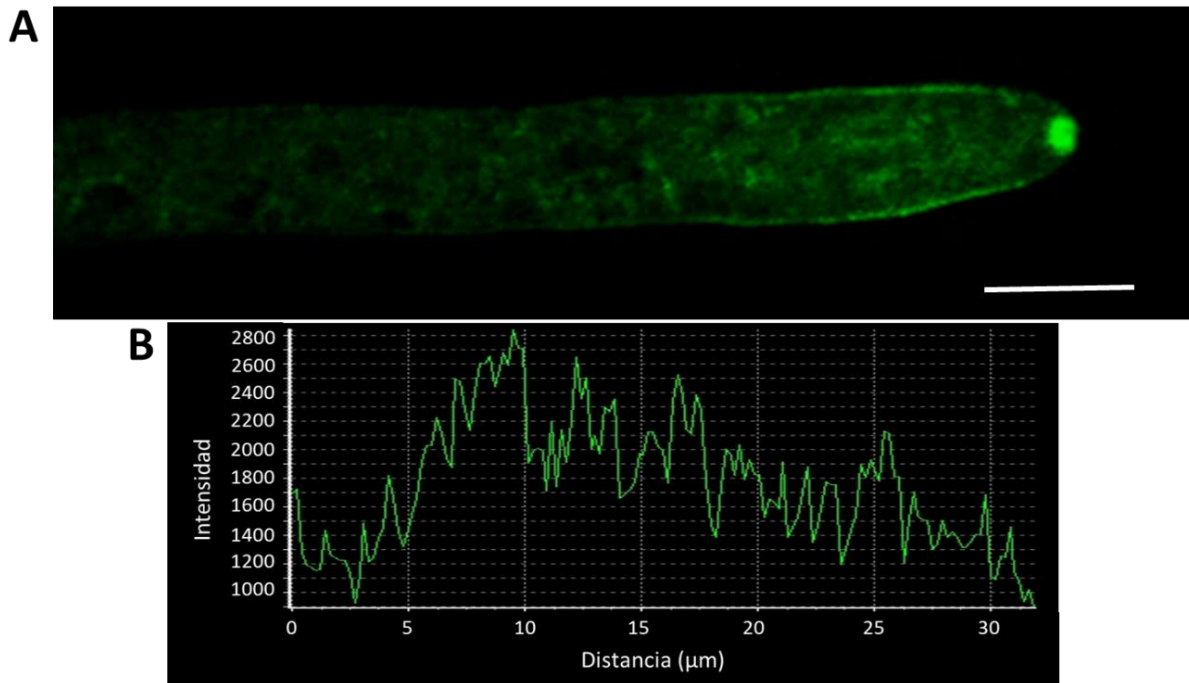
#### 3.2.1 Localización de GFP-RHO-3 en hifas maduras

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostraron que GFP-RHO-3 se localiza en la región del Spitzenkörper y en la membrana de las hifas de *N. crassa* principalmente desde la región II hasta el principio de la región III, incluyendo la región del collar endocítico. Además, análisis del perfil de intensidad de fluorescencia sugieren que GFP-RHO-3 no se localiza de forma continua en la membrana, ya que se presentan incrementos y disminuciones en la intensidad de fluorescencia (Figura 18).

Análisis más detallados mostraron un patrón de localización de RHO-3 que coincide con la región externa del Spitzenkörper, ya que se observa fluorescencia en forma de anillo en la punta de las hifas en



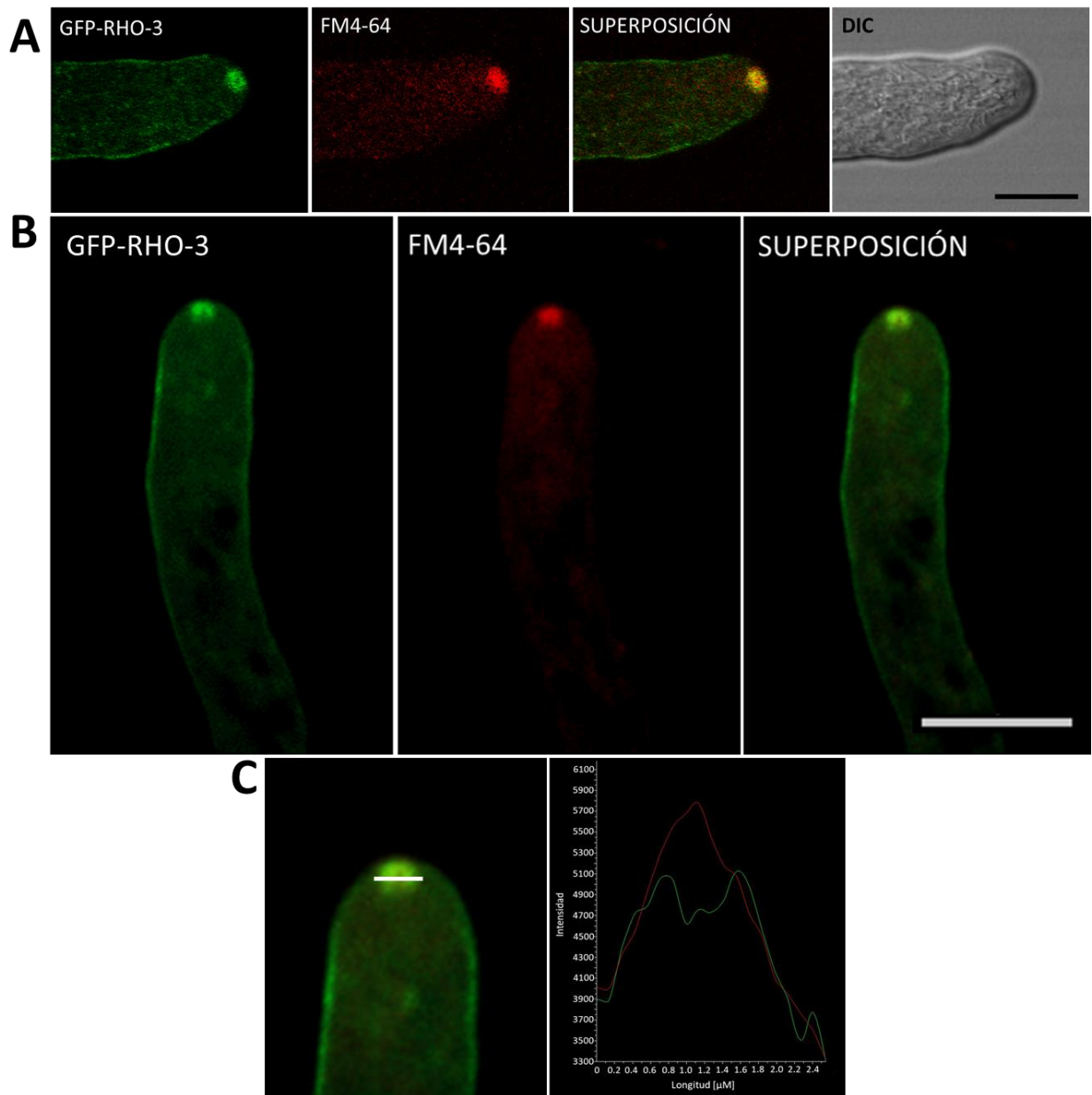
crecimiento y una disminución en los valores de intensidad de fluorescencia en el área central del Spitzenkörper (Figura 19).



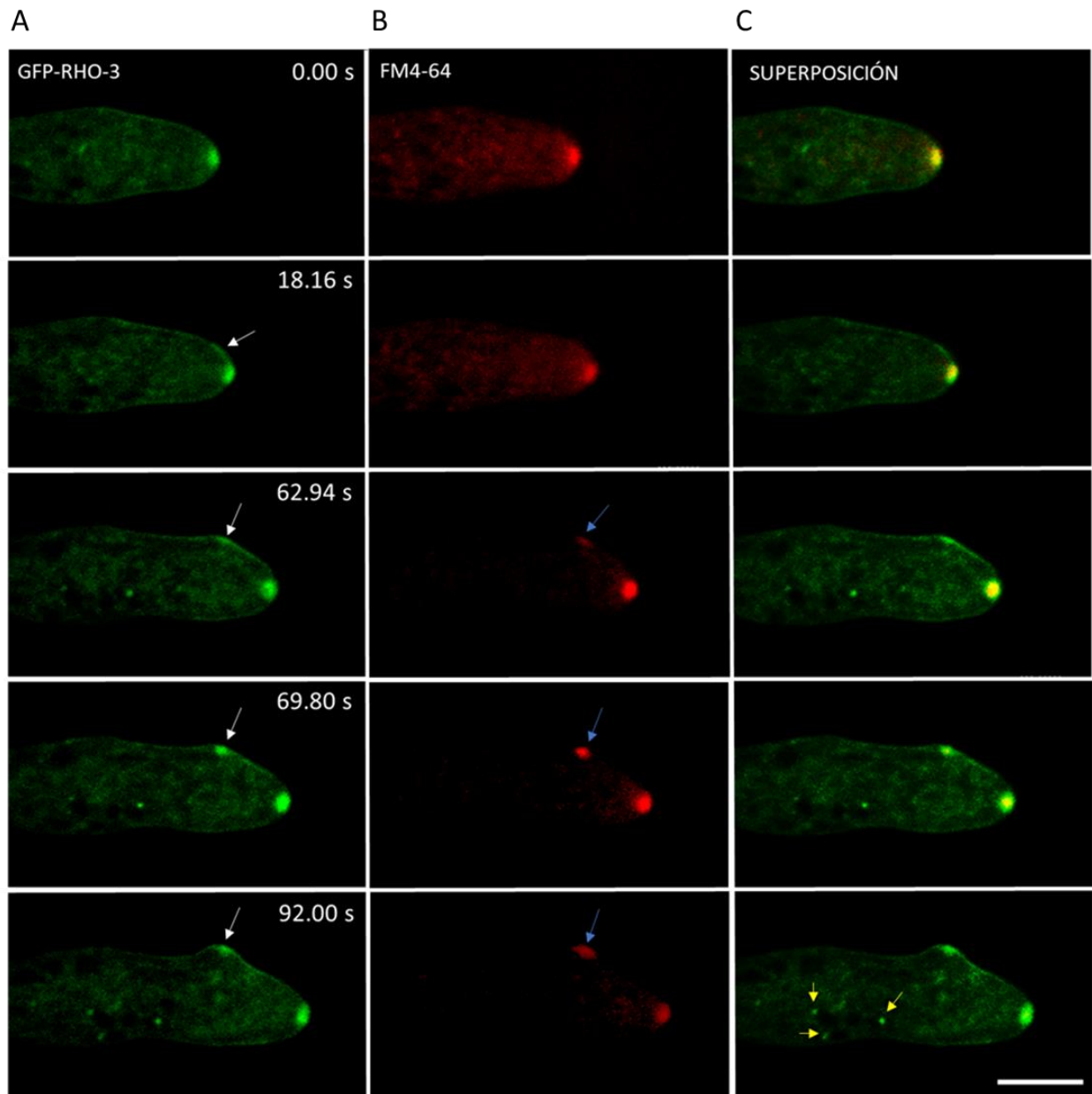
**Figura 18. Localización de GFP-RHO-3 en hifas de *N. crassa*.** (A) La fluorescencia se observó principalmente en el área del Spitzenkörper y en la membrana de las hifas, abarcando desde la región II hasta el principio de la región III. Barra de escala = 10 μm. Microscopía confocal de escaneo láser. (B) Perfil de fluorescencia de GFP-RHO-3 en la membrana plasmática. Valores medidos desde que finaliza la fluorescencia en la región del Spk (0 μm) hasta que termina la fluorescencia en la membrana (30 μm).

Adicionalmente, el estudio de la dinámica de GFP-RHO-3 a través del tiempo mediante microscopía confocal de disco giratorio, permitió seguir la localización de RHO-3 durante la producción de ramificaciones, donde se observó que la proteína se acumula en el sitio donde se formará la nueva rama, coincidiendo con la aparición de las vesículas del Spitzenkörper en el nuevo sitio de polaridad (Figura 20).

Otro fenómeno que se observó con frecuencia, es la presencia de puntos de fluorescencia moviéndose en sentido anterógrado junto a los núcleos, desde partes distales de la hifa hasta la región subapical (Figura 20).



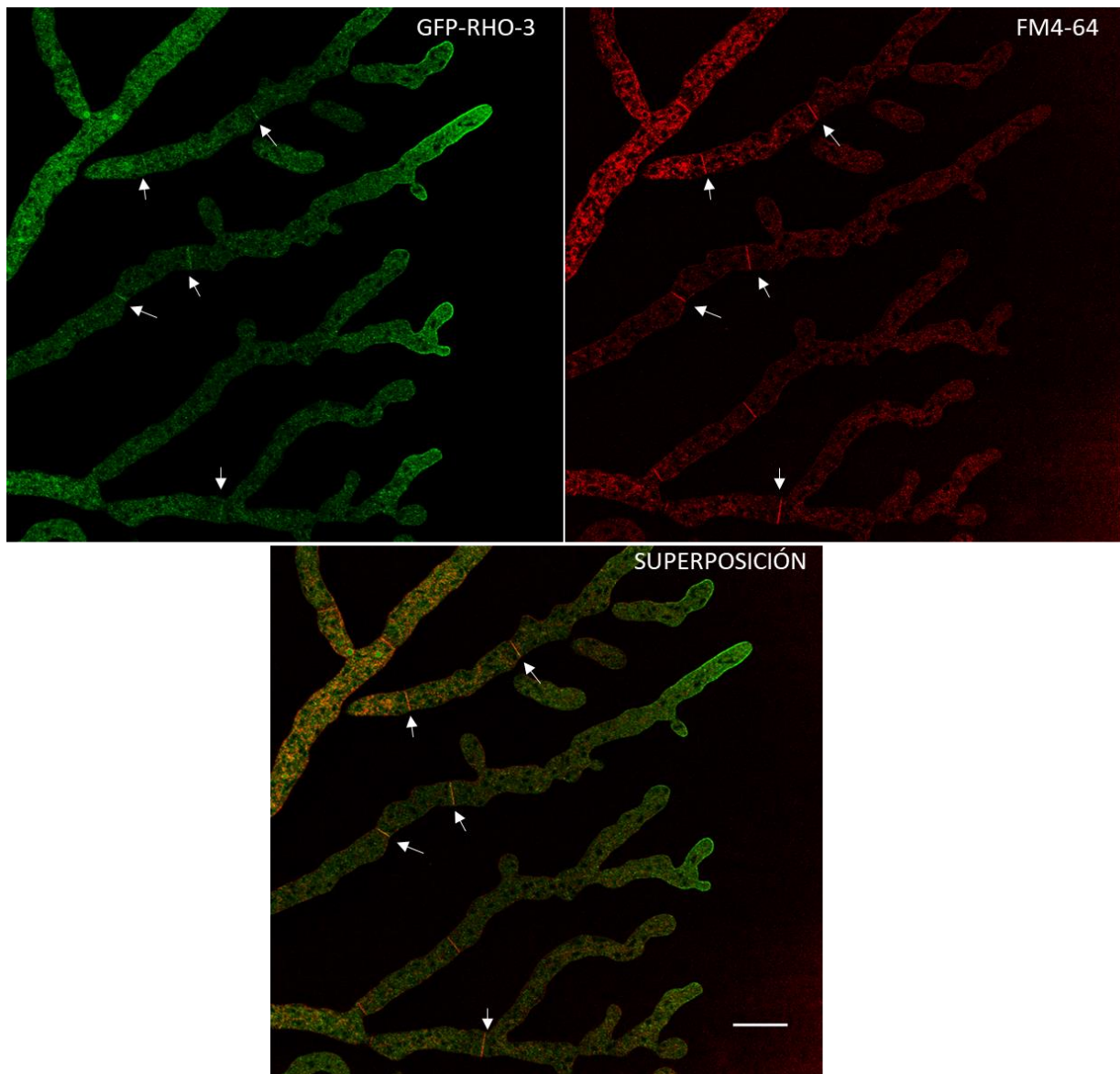
**Figura 19. Localización de GFP-RHO-3 en la región externa del Spitzenkörper.** (A) Localización de la GFP-RHO-3 en el ápice de hifas maduras de *N. crassa* mediante microscopía confocal de escaneo laser. Primera columna, fluorescencia de GFP; segunda columna, hifa teñida con FM4-64 para la observación del Spitzenkörper; tercera columna, superposición; cuarta columna, imagen de la hifa en contraste de interferencia diferencial. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Localización de GFP-RHO-3 mediante microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ . (C) Perfil de intensidad de fluorescencia de GFP y FM4-64 del área seleccionada por la línea blanca, donde se muestra una disminución de la fluorescencia verde en la región central del Spitzenkörper.



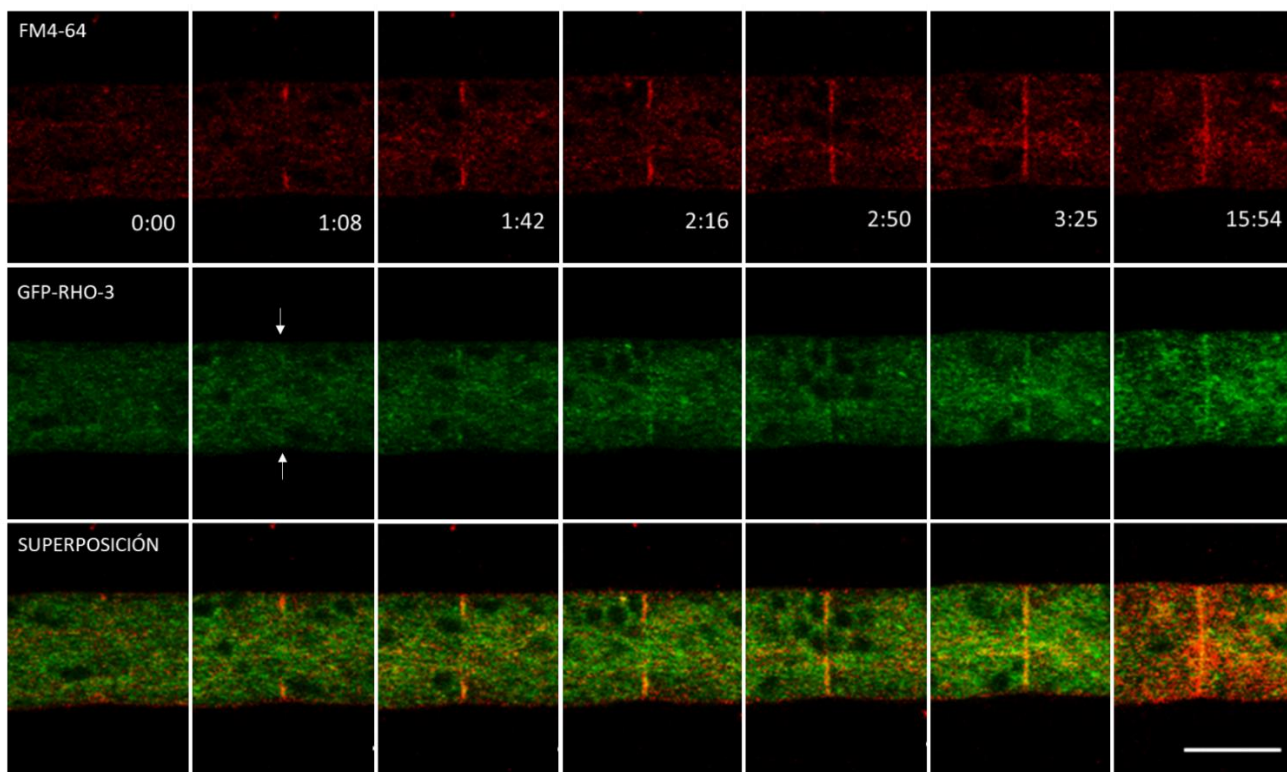
**Figura 20. Dinámica de GFP-RHO-3 durante la ramificación en hifas de *N. crassa*.** En el panel A se muestra la fluorescencia de GFP-RHO-3 a través del tiempo, las flechas blancas señalan la acumulación en el sitio de la ramificación. Las flechas azules en el panel B señalan la acumulación de las vesículas del Spitzenkörper. Panel C, superposición. Las flechas amarillas señalan los puntos de fluorescencia observados asociados a los núcleos. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

GFP-RHO-3 también se vio localizada en los septos de hifas maduras (Figura 21), por lo que se analizó la aparición de fluorescencia verde con respecto a la formación del septo teñido con FM4-64. La secuencia de imágenes a través del tiempo, mostró que la fluorescencia de GFP-RHO-3 en el sitio de septación se

hace visible aproximadamente 1 min 8 s después de la primera evidencia del crecimiento de la membrana plasmática, extendiéndose hacia el centro de la hifa de la misma forma que la membrana y continúa observándose una vez que el septo está formado (Figura 22). Sin embargo, ya que la intensidad de la señal de fluorescencia observada por parte de GFP-RHO-3 es baja, no es posible determinar con certeza el tiempo en que RHO-3 se localiza en el sitio de septación después del comienzo del crecimiento de la membrana plasmática.



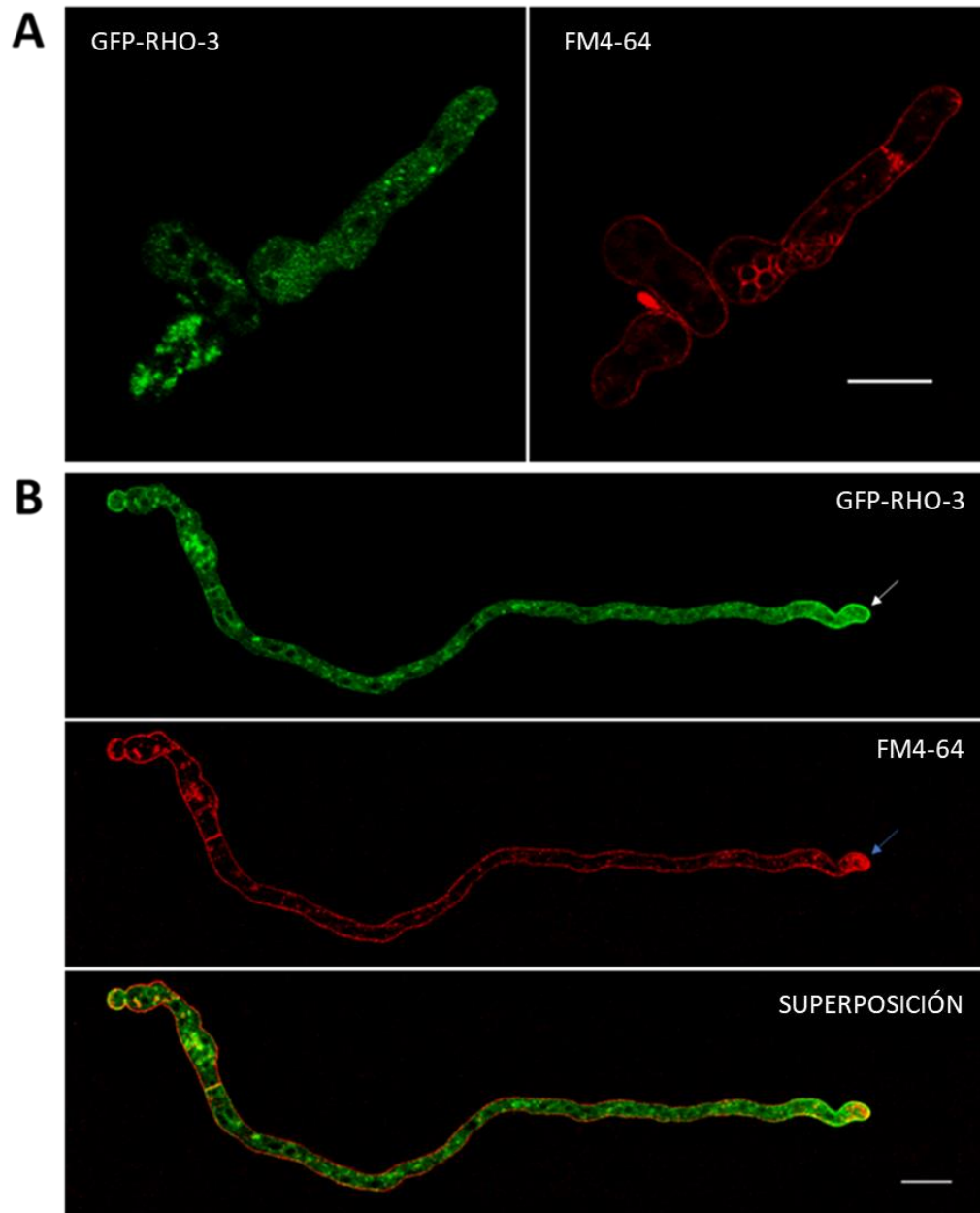
**Figura 21. Localización de GFP-RHO-3 en los septos de hifas de *N. crassa*.** GFP-RHO-3 co-localiza con los septos teñidos con FM4-64 en hifas maduras. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Microscopía confocal de escaneo láser.



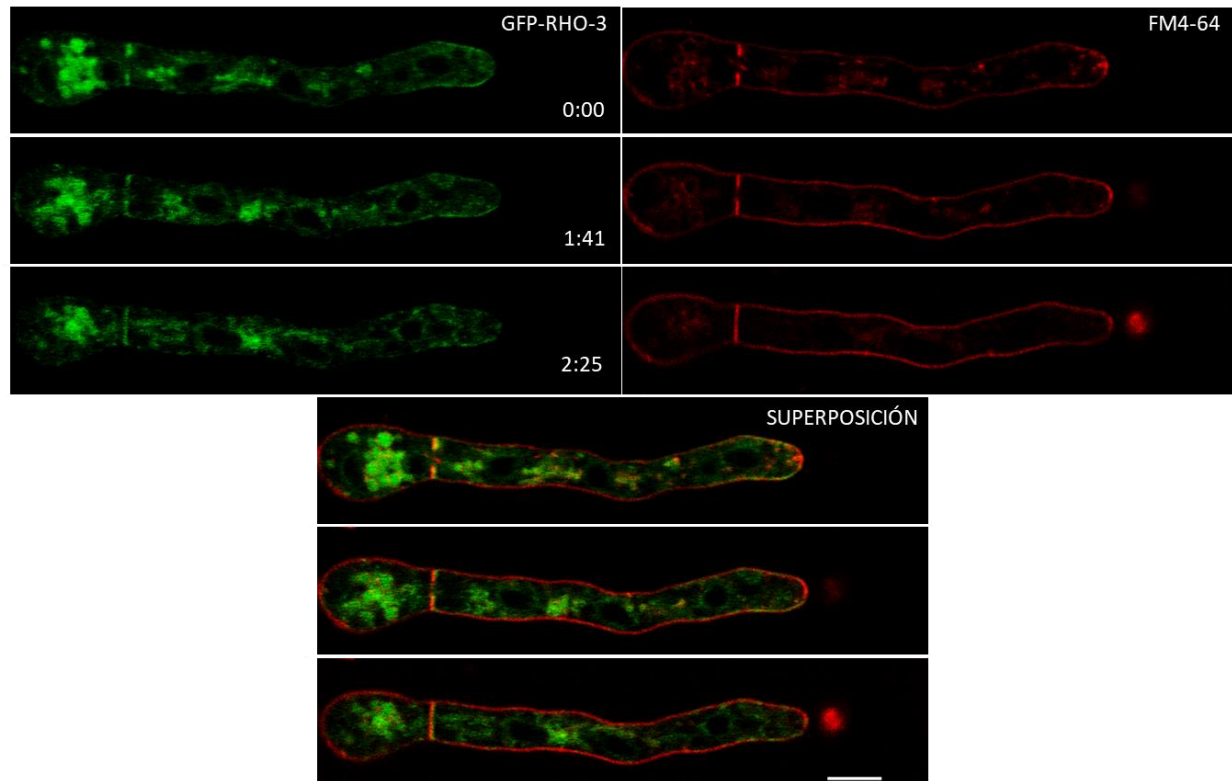
**Figura 22. Localización de GFP-RHO-3 durante la formación del septo en hifas maduras.** La secuencia de imágenes muestra que la fluorescencia de GFP-RHO-3 se acumula 1 min 8 s después de que se observa el crecimiento de la membrana en el sitio de la formación del septo (flechas blancas). Además, GFP-RHO-3 sigue presente en el septo varios minutos después de haberse completado su formación. La fila superior muestra la tinción de la membrana con FM4-64. En la fila central se muestra la localización de GFP-RHO-3. Superposición de las señales de fluorescencia en la fila inferior. Tiempo en min:seg. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . Microscopía confocal de escaneo láser.

### 3.2.2 Localización de GFP-RHO-3 en germínulas

Durante la etapa de germinación de conidios de *N. crassa* no se observó una localización definida de GFP-RHO-3 ya que los conidios, antes y durante la germinación, presentaron fluorescencia en forma de puntos dispersos por el citoplasma (Figura 23A). Sin embargo, una vez que el tubo germinal alcanza una longitud de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , se observa claramente fluorescencia en la punta de las germínulas debido a la acumulación de GFP-RHO-3; lo que coincide con la acumulación de fluorescencia proveniente del colorante FM4-64 que tiñe las vesículas del Spitzenkörper (Figura 23B). Además, GFP-RHO-3 se observó en el septo de las germínulas, como fue descrito para las hifas maduras (Figura 24).



**Figura 23. Localización de GFP-RHO-3 en germínulas de *N. crassa*.** (A) Durante la germinación de los conidios se observan puntos de fluorescencia sin un patrón definido. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Germínula de más de 100  $\mu\text{m}$  de longitud, donde se observa la acumulación de fluorescencia de GFP-RHO-3 y de FM4-64 en las vesículas del Spitzenkörper, localizadas en la punta del tubo germinativo. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . Microscopía confocal de escaneo láser.



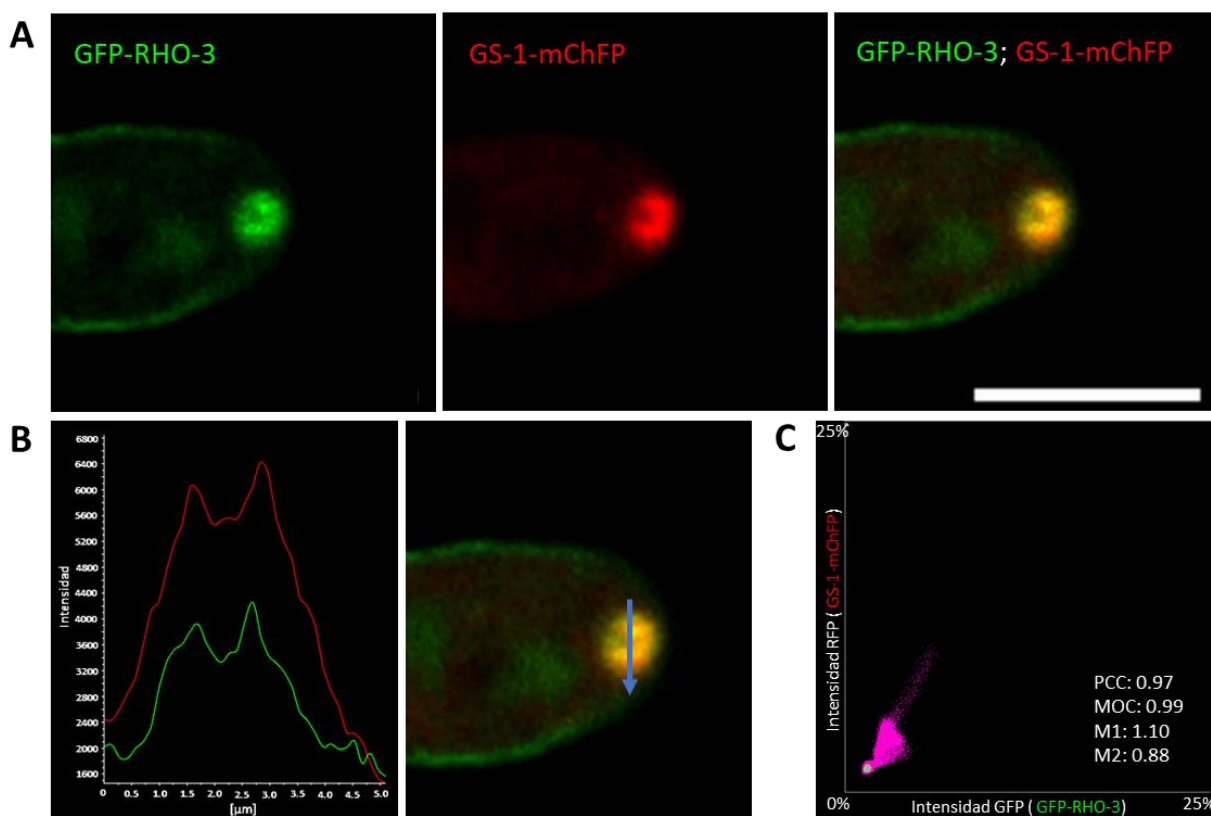
**Figura 24. GFP-RHO-3 durante el desarrollo del septo en germínulas.** GFP-RHO-3 también se localiza durante la formación de los septos en germínulas. Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ . Microscopía confocal de escaneo láser.

### 3.3 Asociación de GFP-RHO-3 con las vesículas del Spitzenkörper

Debido al patrón de fluorescencia que se observó para GFP-RHO-3 en la punta de las hifas, se realizaron fusiones vegetativas entre la cepa *gfp::rho-3* y las cepas NJV12.1.1 (*chs-1::mcherryfp*) y NJV14.4.2 (*gs-1::mcherryfp*), para determinar la posible asociación entre RHO-3 con las macrovesículas del Spitzenkörper. La quitina sintasa CHS-1 de *N. crassa* es suministrada a la punta de la hifa por medio de microvesículas que se acumulan en el núcleo del Spitzenkörper; mientras que la proteína glucano sintasa GS-1 está contenida en las macrovesículas, que forman una estructura dinámica en forma de anillo, rodeando el núcleo interno del Spk (Verdín et al., 2009).

Los análisis de co-expresión de GFP-RHO-3 y GS-1-mChFP mediante microscopía confocal de disco giratorio, sugieren que RHO-3 está asociada con las vesículas de la región externa del Spitzenkörper. El grado de co-localización entre RHO-3 y GS-1 en la punta de la hifa, corresponde a un coeficiente de correlación de Pearson (PCC) de 0.97 y un coeficiente general de superposición de Manders (MOC) de 0.99, donde ambos parámetros indican un alta co-localización. Además, las imágenes obtenidas y el

análisis del perfil de intensidad de fluorescencia, demuestran que tanto GFP-RHO-3 como GS-mChFP, forman una estructura en forma de anillo en la punta de la hifa, presentando una concentración máxima de fluorescencia en los extremos del Spk y un decremento de ésta en el núcleo (Figura 25), tal como se describió en los análisis de localización de GFP-RHO-3 (apartado 3.2.1)

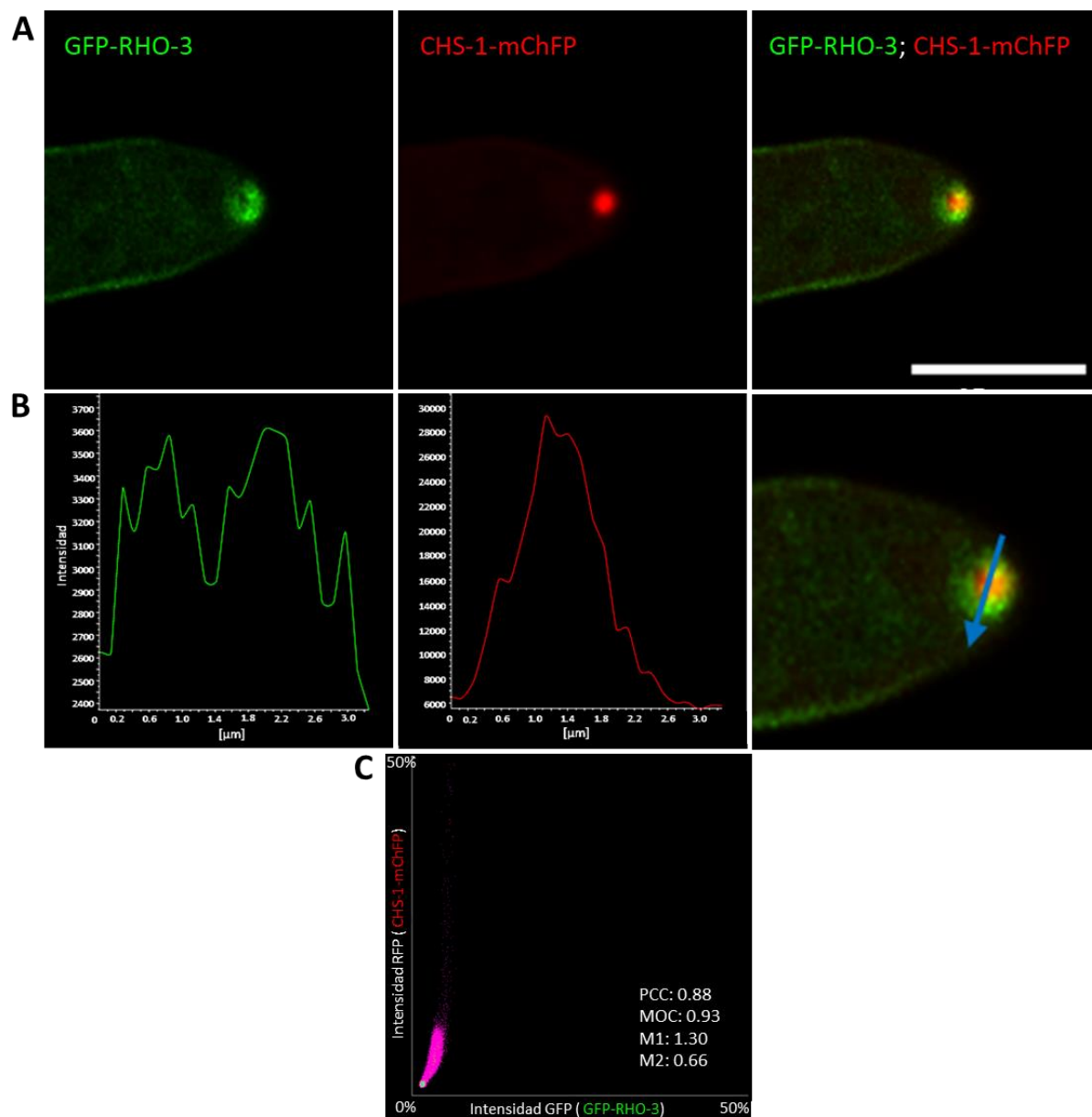


**Figura 25. Co-expresión de GFP-RHO-3 y GS-1-mChFP.** (A) Microfotografías que muestran la co-localización entre GFP-RHO-3 y GS-1-mChFP. Microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala = 10 µm. (B) Perfil de intensidad de fluorescencia de GFP-RHO-3 (verde) y GS-1-mChFP (rojo) de la región seleccionada por la flecha azul. (C) Citofluorograma de la distribución de píxeles del canal verde (GFP-RHO-3) y rojo (GS-1-mChFP). PCC: Coeficiente de correlación de Pearson; MOC: Coeficiente general de superposición de Manders; M1 y M2: Coeficientes de superposición de Manders.

Por otra parte, el análisis de cuantitativo de co-localización de GFP-RHO-3 y CHS-1-mChFP en el ápice de las hifas arrojó un valor de PCC igual a 0.88 y un valor para el coeficiente general de superposición de Manders de 0.93. No obstante, se observa que esta co-localización es parcial, ya que los análisis del perfil de intensidad de fluorescencia muestran que CHS-1-mChFP alcanzó la máxima intensidad de fluorescencia



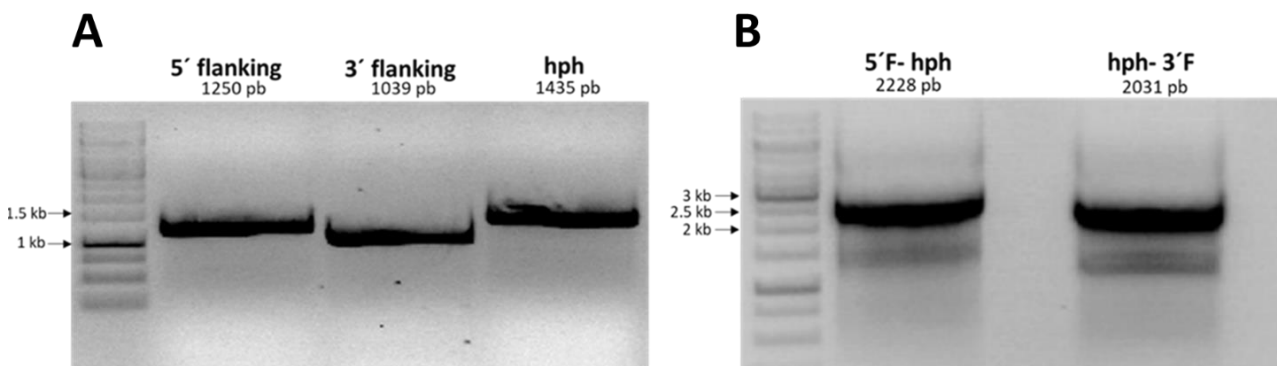
en la región central del Spk, a diferencia de GFP-RHO-3, que muestra el perfil anteriormente descrito, donde se presenta una disminución de fluorescencia en el núcleo. Esto mismo puede observarse en las imágenes de co-localización obtenidas, donde el anillo de fluorescencia verde aparece rodeando al punto de fluorescencia roja formado por CHS-1-mChFP (Figura 26).



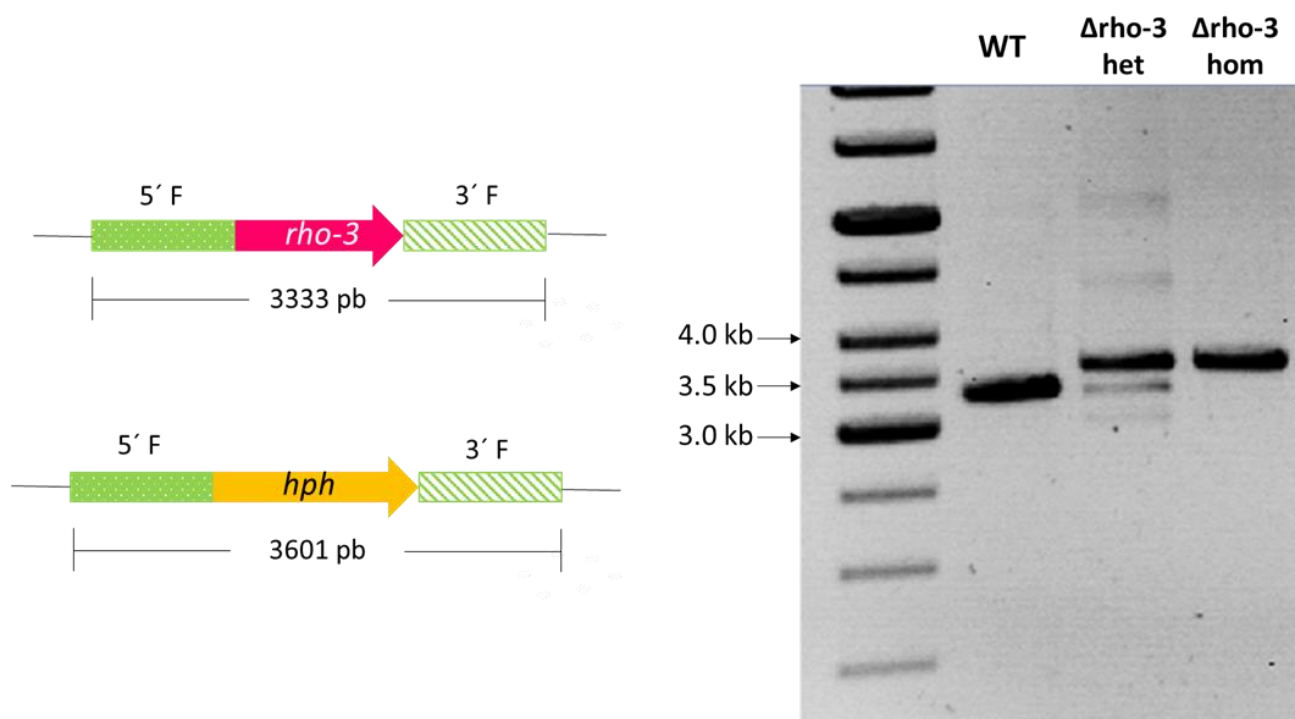
**Figura 26. Co-expresión de GFP-RHO-3 y CHS-1-mChFP.** (A) Microfotografías que muestran la co-localización entre GFP-RHO-3 y CHS-1-mChFP. Microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala = 10 μm. (B) Perfiles de intensidad de fluorescencia de GFP-RHO-3 (verde) y CHS-1-mChFP (rojo). La flecha azul señala la zona seleccionada (C) Citofluorograma de la distribución de pixeles del canal verde (GFP-RHO-3) y rojo (CHS-1-mChFP). PCC: Coeficiente de correlación de Pearson; MOC: Coeficiente general de superposición de Manders; M1 y M2: Coeficientes de superposición de Manders.

### 3.4 Construcción y obtención de la cepa $\Delta\rho\text{-}3$

Por medio de los PCRs de fusión se obtuvieron dos fragmentos recombinantes denominados como 5'F-hph y hph-3'F (Figura 27), los cuales se transformaron en conidios de la cepa FGSC #9717 de *N. crassa* para obtener una cepa mutante resistente a higromicina B (*hph*) por recombinación homóloga tanto del cassette de *hph*, como en *locus* de *rho-3* en el genoma de *N. crassa*. El PCR realizado con los oligonucleótidos anidados 7 y 8, resultó en un solo fragmento amplificado que corresponde a los 3333 pb procedentes de las dos regiones flanqueantes más el gen *rho-3*, para la cepa WT; mientras que para la cepa mutante heterocarión obtenida, además de este fragmento, se amplificó uno de mayor tamaño, que corresponde a los 3601 pares de bases resultantes de la amplificación de las regiones flanqueantes con el cassette de *hph*. De la misma forma, se comprobó la correcta sustitución de *rho-3* en la cepa mutante homocarión obtenida mediante la producción de microconidios, ya que sólo se amplificó un fragmento de 3601 pares de bases (Figura 28).



**Figura 27. Fragmentos recombinantes obtenidos por PCR de fusión.** (A) Fragmentos amplificados de las regiones flanqueantes 5' (1250 pb) y 3' (1039) de *rho-3*, y el cassette de *hph* (1435). (B) En el carril izquierdo se muestra la fusión de el fragmento flanqueante 5' con 1063 pb del cassette de *hph* (5'F-hph), mientras que en el carril derecho se encuentra la fusión de 1030 pb del cassette de *hph* con el fragmento flanqueante 3' (hph-3'F).

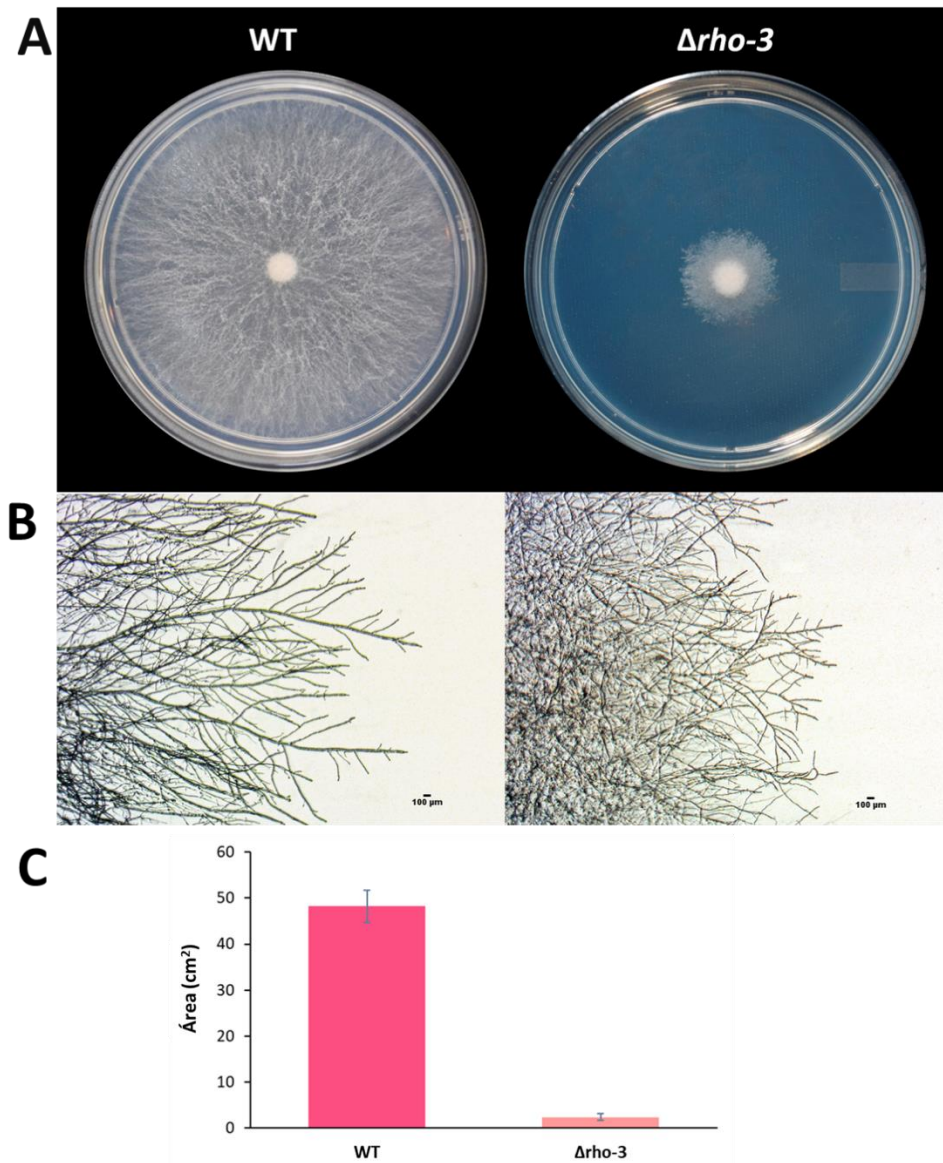


**Figura 28. Corroboración por PCR de la sustitución de *rho-3*.** En el carril correspondiente a la cepa mutante homocarión ( $\Delta\rho\text{-3}$  hom) se observa una banda mayor a 3.5 kb respectiva al fragmento que confiere resistencia a higromicina B (3601 pb); mientras que en el carril de la cepa silvestre (WT) se observa una banda por debajo de los 3.5 kb, correspondiente a la amplificación del fragmento que contiene el gen *rho-3*. Para la cepa mutante heterocarión ( $\Delta\rho\text{-3}$  het) se observan los dos fragmentos.

### 3.5 Caracterización fenotípica de $\Delta\rho\text{-3}$

#### 3.5.1 Morfología colonial

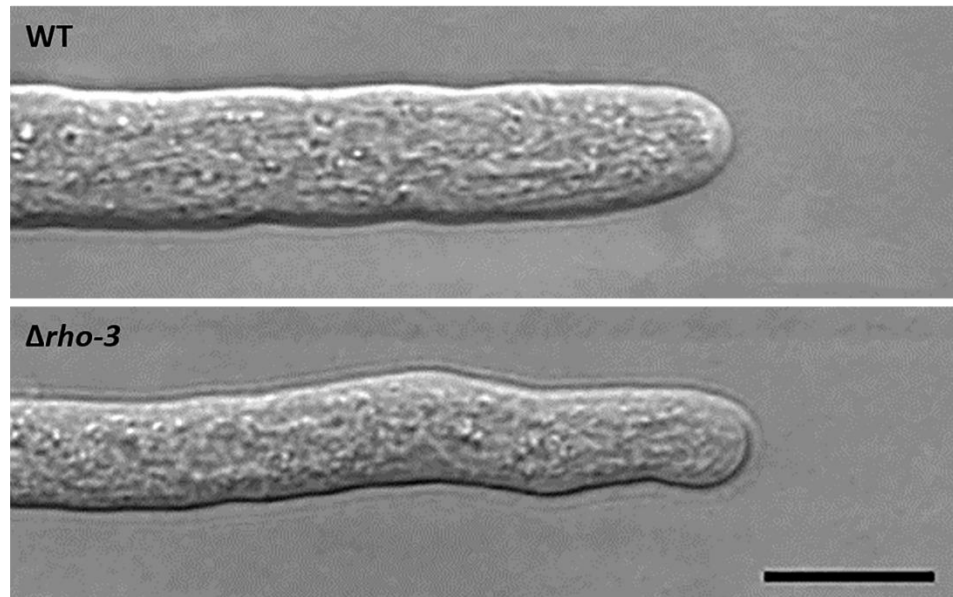
Las colonias formadas por  $\Delta\rho\text{-3}$  ocuparon un área equivalente al 4.98% ( $2.4 \pm 0.74 \text{ cm}^2$ ) del área ocupada por las colonias de la cepa WT ( $48.23 \pm 3.5 \text{ cm}^2$ ) después de 18 horas de crecimiento a  $30^\circ\text{C}$  (Figura 29A). Además, el margen de colonia mostró que las hifas de la mutante  $\Delta\rho\text{-3}$  crecen de forma más compacta y más densa que las hifas de la cepa WT (Figura 29B).



**Figura 29. Morfología colonial de la cepa silvestre (WT) y la cepa  $\Delta\rho\text{-}3$ .** (A) Morfología colonial de las cepas cultivadas en medio MMV agar a 30°C después de 18 h de incubación. (B) Margen de la colonia 7X. Barras de escala = 100 μm (C) Área ocupada por las colonias en las cajas de Petri después de 18 h de incubación. La colonia formada por la cepa mutante es más compacta que la de la cepa WT. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.5.2 Morfología microscópica

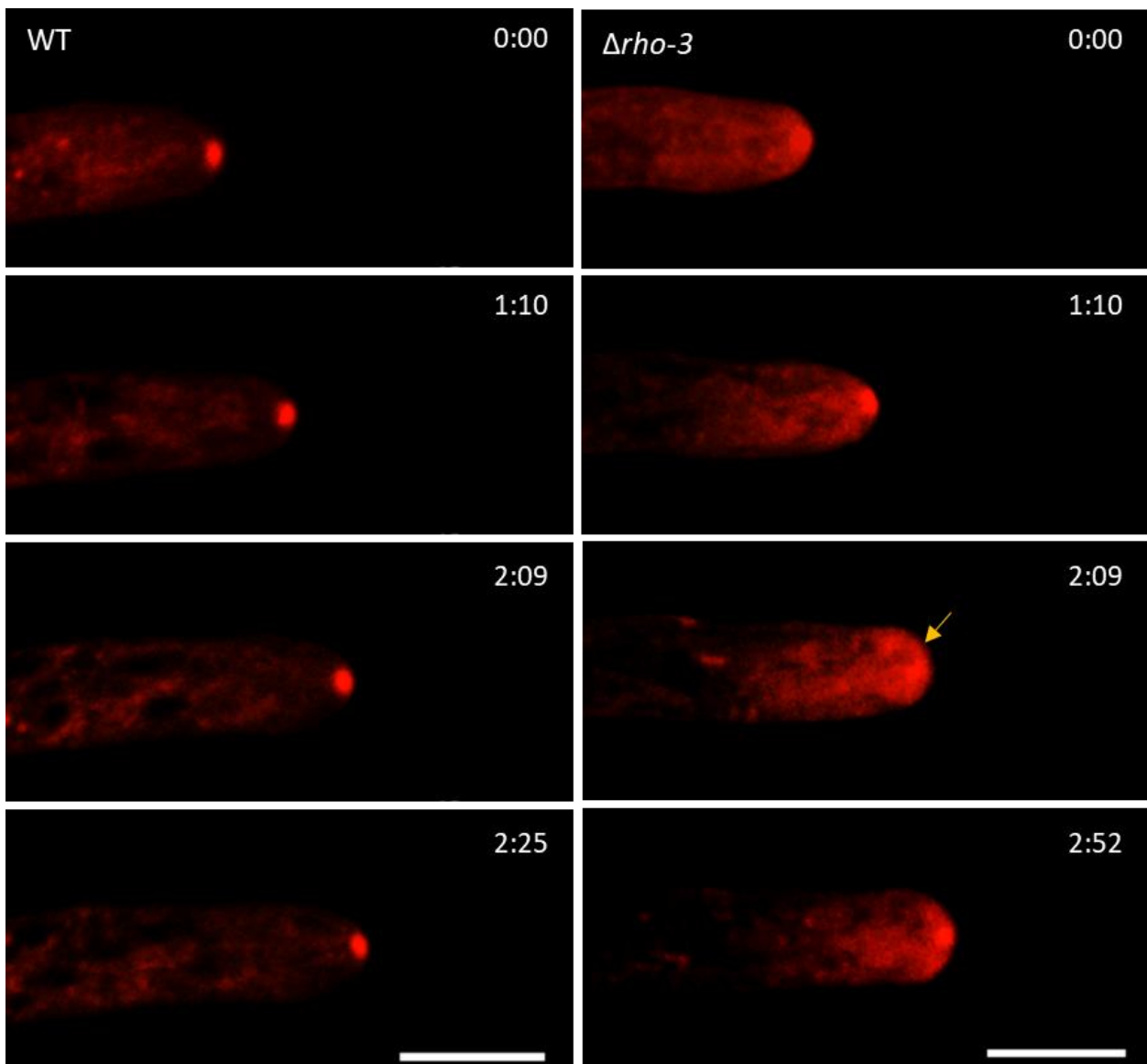
El análisis microscópico permitió determinar que las hifas producidas por la mutante ( $6.69 \pm 0.68 \mu\text{m}$ ) presentan un diámetro aproximadamente 34.73% menor que las hifas de la cepa WT ( $10.25 \pm 1.30 \mu\text{m}$ ) (n=30) (Figura 30).



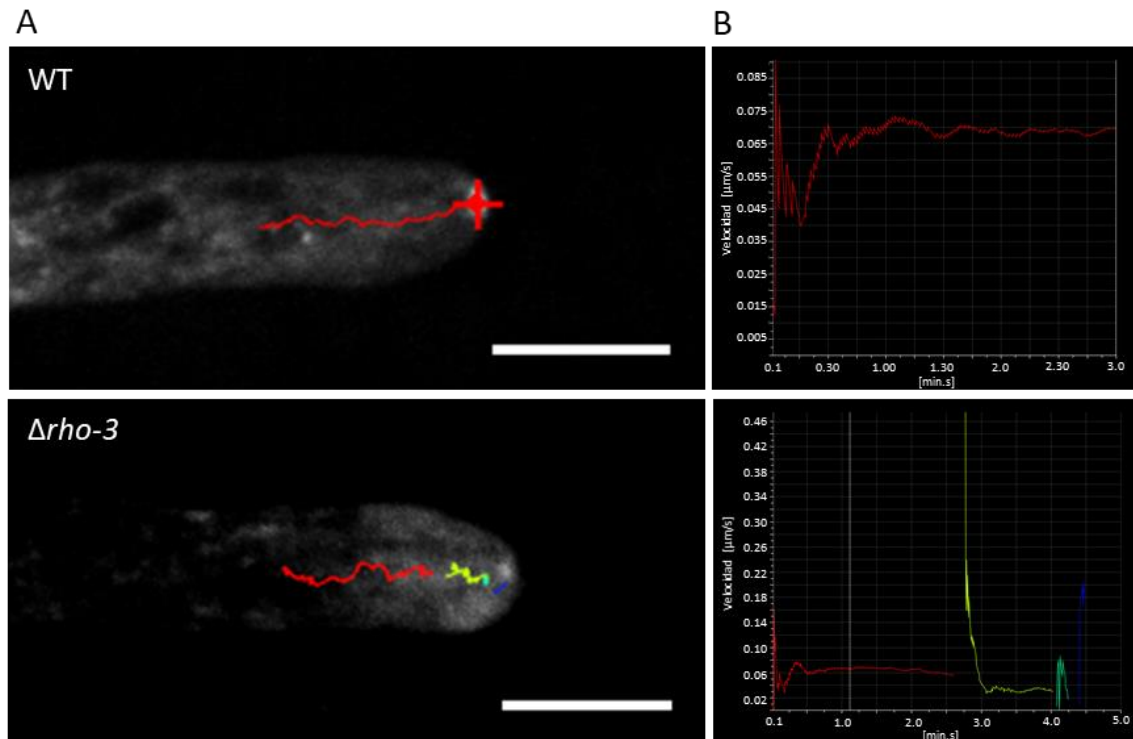
**Figura 30. Morfología de las hifas de la cepa WT y de  $\Delta\rho\text{-3}$ .** Las hifas de la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$  son más delgadas que las de la cepa silvestre. Microscopía de contraste de interferencia diferencial. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, el análisis de la morfología de las hifas mediante microscopía confocal con el colorante FM4-64, mostró que la organización del Spitzenkörper se vio afectada en la mutante  $\Delta\rho\text{-3}$  ya que, aun cuando está presente, la fluorescencia se observa de una forma más difusa en la punta de la hifa, en comparación con la cepa WT, donde la fluorescencia se ve delimitada en forma circular en la punta de la hifa. Además, con frecuencia se observa que la organización del Spk no logra mantenerse continua y parece desensamblarse produciendo un ligero ensanchamiento en la punta de las hifas, seguido del reensamble del mismo para que las hifas puedan seguir creciendo polarmente (Figura 31).

Lo anteriormente descrito se muestra en los diagramas de la trayectoria del Spk, donde se observa que el Spk de la cepa silvestre se desplaza hacia adelante de manera continua acompañado de pequeñas oscilaciones transversales, mientras que en la cepa mutante estas oscilaciones son más pronunciadas y frecuentemente se pierde la estructura puntiforme del Spk (Figura 32).



**Figura 31. Organización del Spitzenkörper en la cepa WT y en  $\Delta\rho\text{-}3$ .** La serie de tiempo de la hifa de la cepa WT teñida con FM4-64, muestra la distribución de vesículas del Spitzenkörper como un punto definido en la punta de la hifa. En contraste, en la hifa de la cepa mutante la fluorescencia se observa más difusa en la punta de la hifa. La flecha amarilla señala un evento de desensamble del Spk, seguido de un ensanchamiento en la punta de la hifa. Barras de escala = 10  $\mu\text{m}$ . Tiempo en min:seg.



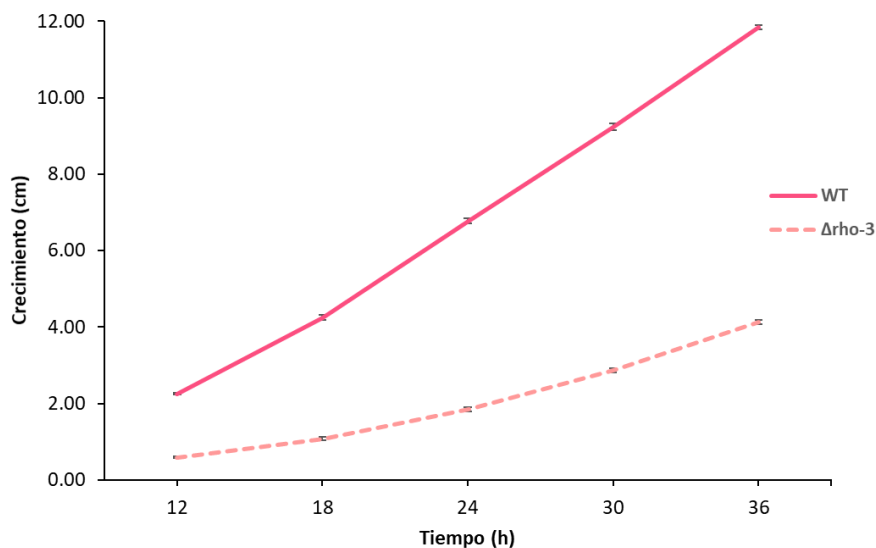
**Figura 32. Trayectoria del Spizzenkörper en la cepa WT y en  $\Delta\rho\text{-3}$ .** (A) Las líneas indican el movimiento del Spk a través del tiempo durante el crecimiento de las hifas. El cambio de color en las líneas que se observa en la hifa de la cepa mutante indica eventos de reaparición del Spk. Barras de escala = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Gráficas que muestran la velocidad de desplazamiento del Spk.

### 3.5.3 Tasa de crecimiento

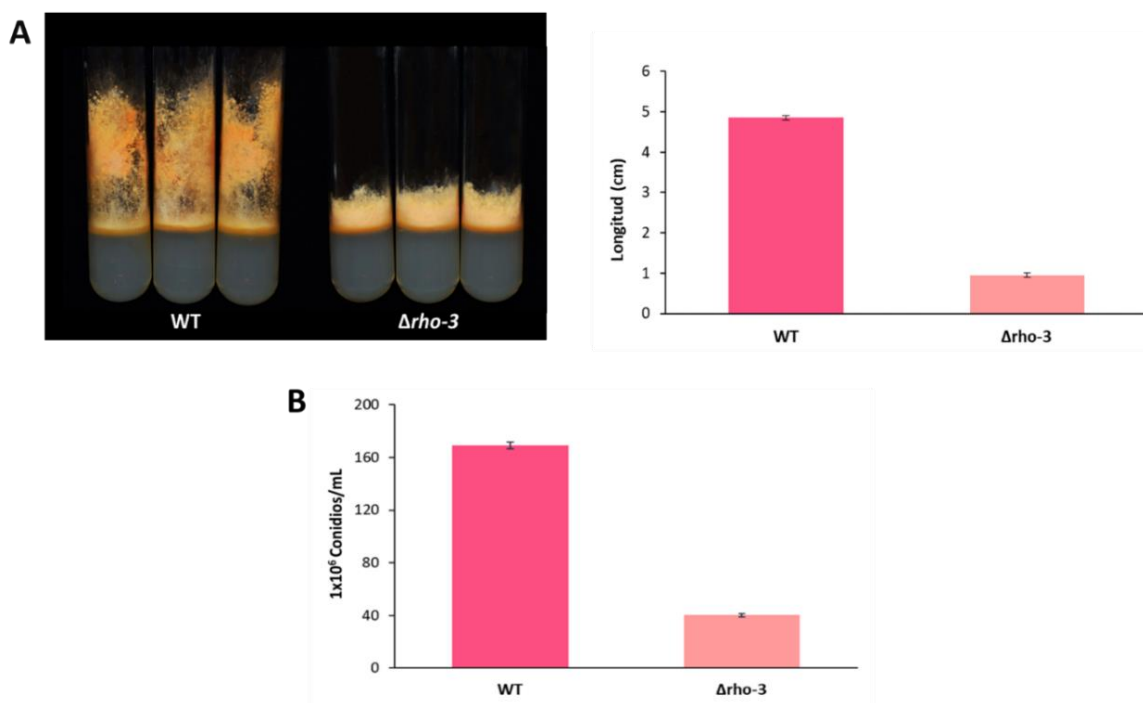
La velocidad de crecimiento promedio de las hifas de la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$  fue de  $1.28 \pm 0.65 \text{ mm h}^{-1}$ , mientras que la cepa WT tuvo una velocidad de crecimiento de  $3.57 \pm 1.03 \text{ mm h}^{-1}$ ; por lo tanto, el crecimiento de la cepa mutante  $\Delta\rho\text{-3}$  se redujo aproximadamente un 64.15 % (Figura 33) (Tabla A1).

### 3.5.4 Conidiación

La producción de hifas aéreas se vio considerablemente afectada en la cepa mutante ( $0.95 \pm 0.05 \text{ cm}$ ) en comparación con la cepa WT ( $4.85 \pm 0.05 \text{ cm}$ ) (Figura 34A). Además, la producción de conidios en la cepa WT resultó en  $169.17 \times 10^6 \pm 2.43 \times 10^6 \text{ células/mL}$ , mientras que la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$  produjo  $40.25 \times 10^6 \pm 1.30 \times 10^6 \text{ células/mL}$ , después de 8 días en incubación a  $30^\circ\text{C}$  (3 días oscuridad/5 días luz) (Figura 34B).



**Figura 33. Tasa de crecimiento de la cepa WT y de  $\Delta\rho\text{-3}$ .** La velocidad de crecimiento de la cepa mutante se redujo en un 64.15 % con respecto a la cepa silvestre. Las mediciones se realizaron durante 36 horas de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar.

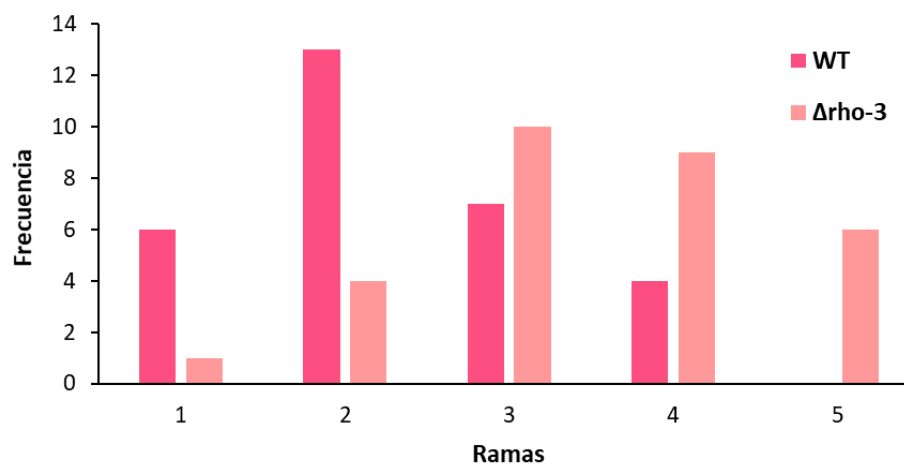


**Figura 34. Producción de conidios en la cepa WT y en  $\Delta\rho\text{-3}$ .** (A) La elongación de las hifas aéreas se redujo aproximadamente cinco veces en la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$  en comparación con la cepa WT. (B). Grafica que muestra el total de conidios recuperados de las cepas WT ( $169.17 \times 10^6 \pm 2.43 \times 10^6$  células/mL) y  $\Delta\rho\text{-3}$  ( $40.25 \times 10^6 \pm 1.30 \times 10^6$  células/mL) cultivadas en MMV 1.8 % agar durante 8 días. La producción de conidios en  $\Delta\rho\text{-3}$  se redujo ~ 76.20 % Las barras de error representan la desviación estándar.



### 3.5.5 Ramificación

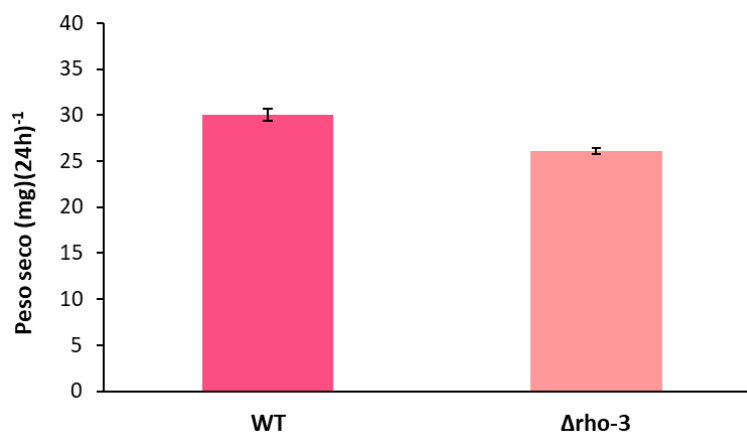
La mayor frecuencia del número de ramificaciones que produce la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$ , en una distancia de 500  $\mu\text{m}$  a partir de la punta, es de 3 y 4 ramas; mientras que en la cepa silvestre es de 2 ramas (Figura 35); lo que corresponde a una media de  $2.3 \pm 0.95$  ramas para la cepa WT y  $3.5 \pm 1.07$  ramas para la cepa mutante.



**Figura 35. Frecuencia de ramificaciones en la cepa WT y en  $\Delta\rho\text{-3}$ .** Dentro de los primeros 500  $\mu\text{m}$ , las hifas de la cepa silvestre producen dos ramificaciones con mayor frecuencia; mientras que las de la cepa mutante, en su mayoría producen de 3 a 4 ramas.

### 3.5.6 Producción de biomasa

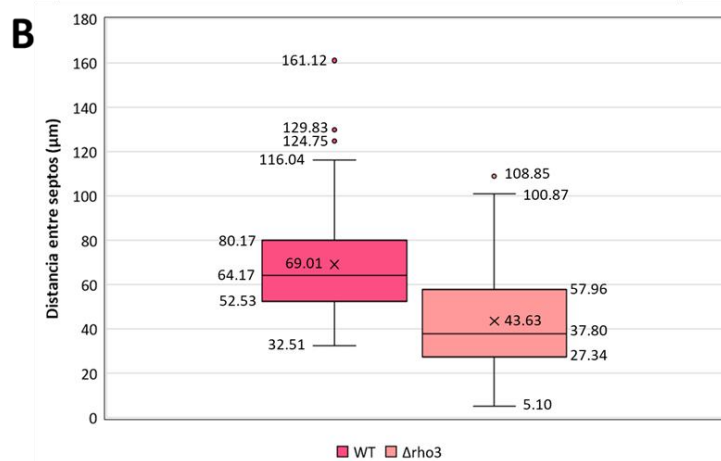
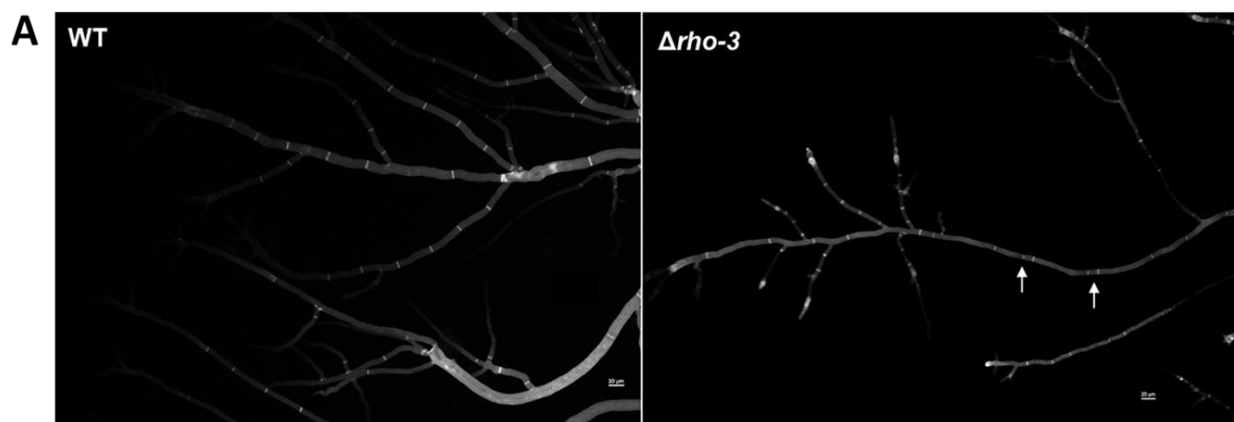
La biomasa producida por la cepa  $\Delta\rho\text{-3}$  ( $26.06 \pm 0.34$  mg/24h), después de tres días de incubación a 30°C, tuvo una reducción de aproximadamente el 13% en relación con la biomasa producida por la cepa WT ( $29.99 \pm 0.66$  mg/24h) (Figura 36). Además, por medio de la prueba estadística de "t" de Student, se determinó que la diferencia entre la cantidad de biomasa producida por ambas cepas es significativa.



**Figura 36. Producción de biomasa en la cepa WT y la cepa  $\Delta\rho\text{-}3$ .** La eliminación de *rho-3* produjo una disminución en la producción de biomasa de aproximadamente el 13%. Las barras de error representan la desviación estándar. P-valor < 0.05.

### 3.5.7 Distancia entre septos

Debido a que RHO-3 se encuentra localizada en los septos en *N. crassa*, se realizaron observaciones de las hifas maduras para determinar si la ausencia de *rho-3* afectaba la formación de estos. Las hifas teñidas con Calcofluor-white mostraron que la eliminación de *rho-3* da como resultado una septación irregular, que tiende a la disminución de la distancia de los compartimentos, ya que las hifas a menudo producen dos septos muy cercanos entre sí (alrededor de 10  $\mu\text{m}$ ), lo que no sucede en la cepa WT (Figura 37).



**Figura 37. Distancia entre septos en la cepa WT y en  $\Delta\rho\text{-3}$ .** (A) Hifas teñidas con Calcofluor-white. Las flechas blancas señalan el patrón de septación que produce a menudo la cepa mutante, en donde se forman septos muy cercanos entre sí. Barras de escala = 20  $\mu\text{m}$ . (B) Diagrama de Caja que muestra de manera general la distribución de los datos obtenidos de la distancia entre dos septos en la cepa WT y  $\Delta\rho\text{-3}$ ,  $n=200$ . El valor mínimo para la distancia entre septos para la cepa WT corresponde a 32.51  $\mu\text{m}$ , mientras que para la cepa mutante corresponde a 5.10  $\mu\text{m}$ . Los puntos superiores representan los valores atípicos. Existe diferencia significativa según la prueba  $U$  de *Mann-Whitney* (datos con distribución diferente a la normal).  $P<0.05$ .

## Capítulo 4. Discusión

---

Las GTPasas monoméricas de la superfamilia Ras son reguladores clave de numerosos procesos fisiológicos en células eucariotas. Particularmente, a los miembros de la familia Rho, se les han atribuido funciones en la regulación de varios procesos celulares importantes, como la morfogénesis y la polaridad celular. Debido a que los hongos filamentosos presentan células altamente polarizadas, es de gran importancia estudiar la función de estas proteínas en su desarrollo. La proteína Rho3 actúa como un regulador clave de la polaridad y exocitosis en levaduras; sin embargo, la falta de estudios en hongos filamentosos, no ha permitido establecer claramente la función que tiene en su desarrollo celular. En el presente estudio se detalló la localización subcelular de RHO-3 de *Neurospora crassa* y se caracterizó fenotípicamente la mutante de eliminación, para identificar cuál es su posible función en el crecimiento. El estudio del crecimiento polarizado en *N. crassa* es importante debido a que este hongo filamentosos ha proporcionado un sistema modelo para comprender la regulación de muchos procesos en otros organismos.

Este estudio reveló que la secuencia NCU0600 que codifica para la proteína RHO-3 en *N. crassa*, no es esencial para su viabilidad, pero su eliminación causa defectos en la conidiación, frecuencia de ramificación, producción de biomasa y una clara disminución en la tasa de crecimiento. Este resultado concuerda con lo observado en otros hongos filamentosos como *A. gossypii*, donde Wendland y Philippsen (2000), describieron que la eliminación de *Agrho3* conduce a una tasa de extensión reducida y fases de crecimiento isotrópico en la punta de las hifas. Asimismo, la mutante nula de *rho3* del hongo patógeno *B. cinerea*, suprime significativamente el crecimiento vegetativo y la conidiación; además de reducir la formación de apresorios y la virulencia (An et al., 2015). Por el contrario, en *M. grisea*, *MgRho3* es prescindible para el crecimiento polarizado de las hifas y la velocidad de crecimiento, pero si es necesario para la patogénesis, de la misma forma que para *B. cinerea* (Zheng et al., 2007). Esto demuestra que a pesar de que los homólogos de Rho3 están bien conservados en hongos filamentosos, su eliminación no causa el mismo efecto en el desarrollo vegetativo.

Además de afectar el desarrollo vegetativo, se demostró que la eliminación de *rho-3* produce defectos en la reproducción sexual de *N. crassa*, ya que la cepa mutante fue incapaz de producir ascosporas al cruzarla sexualmente con una cepa del tipo de apareamiento opuesto en el medio sintético de cruza, utilizándola ya sea como hembra o como macho. Aun cuando parecía haber producción de peritecios cuando se utilizó la cepa mutante como cepa fertilizante (macho), estos tenían una forma esférica y no contenían ascas ni ascosporas (Figura A1), por lo que se puede inferir que corresponden a protoperitecios que se agrandaron y pigmentaron, los cuales se denominan como "falsos peritecios" (Perkins y Raju, 1986).

Adicionalmente, los resultados de la tinción con Calcofluor White, mostraron que la distancia entre los septos se modificó en el mutante de *rho3* en comparación con la cepa WT, dado que la cepa mutante forma continuamente septos muy próximos. Esto, en conjunto con los resultados de los análisis de su localización, en donde se observó la fluorescencia de GFP-RHO-3 co-localizando con FM4-64 durante el desarrollo del septo, sugiere que RHO-3 puede estar involucrado en la formación de estos en *N. crassa*. Previamente, en tres estudios se describió que Rho3 se localiza en la membrana plasmática y en el sitio de división celular durante la mitosis y septación en *S. pombe*. Además, Nakano et al. (2002) describieron que las células carentes de *rho3* son multi-septadas por encima de los 34 ° C y algunas de estas no experimentan citocinesis a 37 ° C. Adicionalmente, se ha sugerido en estudios en *S. cerevisiae*, que Rho3p posiblemente comparte funciones con Rho4p, siendo necesarias para mantener la polaridad celular durante la maduración de células hijas (Matsui y Toh-E, 1992). En *N. crassa*, Rasmussen y Glass (2005) describieron que los mutantes de *rho-4* carecen de septos, ya que no son capaces de formar el anillo de actina requerido para la septación. Además, los mutantes que contienen alelos activados de *rho-4*, tenían dos o más septos dentro de los 10  $\mu\text{m}$  de longitud, de manera similar a lo que observamos en los mutantes que carecían de *rho-3*. Esta similitud entre los fenotipos, sugiere que ambas GTPasas están implicadas en la regulación de la posición de la formación del septo; sin embargo, mientras que RHO-4 parece estar implicada positivamente en la formación de estos, RHO-3 parece actuar como regulador negativo. Por otra parte, en *N. crassa* otro componente necesario para la formación del septo es MYO-2, el cual tiene una función esencial en la formación del anillo de actomiosina en los septos. El anillo de actomiosina es una estructura compleja formado de un esqueleto de actina anclado a otras proteínas como miosina formina y tropomiosina (Delgado-Álvarez et al., 2014). La evidencia de que Myo2 es un efector de Rho3 en *S. cerevisiae*, participando en la organización del citoesqueleto de actina y el transporte de vesículas (Robinson et al., 1999), puede proporcionar una guía futura para el estudio de efectores y reguladores para RHO-3 en relación con el proceso de septación en *N. crassa*.

Continuando con los análisis de la localización, se observó que GFP-RHO-3 se concentró en la punta de las hifas, co-localizando parcialmente con el Spitzenkörper, donde el patrón de fluorescencia sugirió que RHO-3 está relacionada con las macrovesículas de la región externa del mismo, las cuales están asociadas a la proteína GS-1 involucrada en la síntesis de  $\beta$  - 1,3 - glucano, componente importante de la pared celular. Con la finalidad de elucidar si realmente RHO-3 estaba asociado a las macrovesículas, se realizaron fusiones vegetativas y análisis de co-localización entre GFP-RHO-3 y la glucano y quitina sintetas 1 etiquetadas con la proteína fluorescente mCherry (GS-1-mChFP y CHS-1-mChFP). De acuerdo a Verdín et al. (2009), GS-1 se observa como una estructura anular en la punta de las hifas a la que se le denominó 'Spitzenring', el cual parece estar compuesto por un conjunto de partículas distribuidas de manera desigual

alrededor de un núcleo no fluorescente. Además, esta morfología en forma de anillo no es constante, sino que sufre reordenamientos dinámicos, presentando diversas estructuras. Por otra parte, CHS-1 una proteína que se encuentra contenida en las microvesículas de Spk y que participa en la biosíntesis de quitina, se acumula en la región nuclear del Spk. En este estudio, los análisis microscópicos permitieron determinar un alto grado de co-localización cuantitativo y cualitativo entre GFP-RHO-3 y GS-1-ChFP, ya que se obtuvo un PCC 0.97 de y un MOC de 0.99, además que el patrón de fluorescencia y el perfil de intensidad mostraron que tanto RHO-3 como GS-1 se acumulan en la punta de las hifas en forma de anillo como una de sus estructuras principales. En cambio, se observó que la fluorescencia de GFP-RHO-3 apareció rodeando el punto de fluorescencia formado por CHS-1-mChFP; de la misma forma que ocurre con la co-expresión de GS-1-GFP y CHS-1-mCherryFP, que se acumulan en dos estratos definidos presentándose una co-localización parcial en la periferia del Spk (Verdín et al., 2009).

Además, esta localización para GFP-RHO-3 coincide parcialmente con la localización de EXO-70-GFP, que también se observa en la capa externa del SPK, predominantemente concentrado cerca del ápice (Riquelme et al., 2014). EXO-70 es un componente del exocisto que en *N. crassa* se encarga de unir las vesículas a la membrana plasmática, en los pasos finales de la exocitosis. En levaduras, Exo70 se reportó como un efector de Rho3, relacionándolo con el papel de Rho3 en la secreción de vesículas. Por lo tanto, sería interesante investigar si EXO-70 de *N. crassa* tiene interacción con RHO-3 y con otros componentes del exocisto, para determinar si una de las funciones de RHO-3 está relacionada con la exocitosis en este hongo filamentoso.

El modelo bidimensional del centro de suministrador de vesículas plantea que el Spitzenkörper es el responsable del gradiente de exocitosis en la región apical, necesario para el crecimiento polarizado de las hifas (Bartnicki-Garcia et al., 2000). En este estudio se determinó que RHO-3 es necesaria para la organización correcta del Spitzenkörper, ya que, aunque este se encuentra presente en la mutante  $\Delta rho-3$ , no logra mantener su estructura de forma estable, tornándose en una nube de fluorescencia difusa en la punta de las hifas. Sin embargo, esta desorganización momentánea del suministro de vesículas, no causó que las hifas perdieran su capacidad de crecer de manera polarizada. Para analizar más a detalle el papel de RHO-3 en este proceso, sería relevante analizar a nivel ultraestructural la organización de las vesículas del Spitzenkörper mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Adicionalmente, se observó a GFP-RHO-3 en la membrana plasmática, en la mayoría de los casos excluyendo la región I y concentrándose desde la región II hasta principios de la región III de las hifas de *N. crassa*. Esta localización apoya hipótesis de la participación de RHO-3 en la distribución de las

macrovesículas para la formación de pared celular, lo cual también podría estar relacionado con la disminución del diámetro de las hifas que causa la eliminación de *rho-3*.

Además de determinar la localización de GFP-RHO-3 en hifas maduras, se observaron cúmulos de fluorescencia de GFP-RHO-3 en el citoplasma de los conidios y germínulas sin una localización específica; por lo que es probable que RHO-3 no participe en la etapa de germinación de conidios y únicamente se sintetice la proteína para realizar su función una vez que el tubo germinal alcance un cierto grado de madurez y tasa de crecimiento; como se observó en los tubos germinales que tenían ~ 100  $\mu\text{m}$  de longitud, donde también se acumularon las vesículas secretoras. Esto se podría relacionar con lo sugerido por Matsui y Toh-E (1992) en estudios en la levadura de gemación, donde atribuyen un papel para Rho3 para el mantenimiento de la polaridad celular en gema creciente y no en el establecimiento, lo cual se atribuye principalmente a la Rho GTPasa Cdc42. De la misma forma en *N. crassa*, la función principal de CDC-42 es el establecimiento de la polaridad (Araujo-Palomares et al., 2011), por lo que RHO-3 podría participar en la regulación del mantenimiento. Además, GFP-RHO-3 se observó en los septos de las germínulas, de manera consistente con lo observado en las hifas maduras.

Por otra parte, en estudios anteriores se ha identificado que las proteínas activadoras de las GTPasas Rgd1p y Rga1p interactúan *in vivo* con Rho3p, en la levadura de gemación (Doignon et al., 1999; He et al., 2015). En *N. crassa* GFP-RGA-1 se localiza de manera similar que GFP-RHO-3 en la punta de las hifas y en los septos; por lo que RGA-1 podría estar actuando como una proteína reguladora GAP para RHO-3 en este hongo filamentoso (Blanckett, 2017). No obstante, en ensayos *in vitro* se demostró que RGA-1-GFP interactúa con RHO-2 y RHO-4 de *N. crassa*; mientras que RGA-3 y RGA-4 fueron asignadas como proteínas reguladoras GAP para RHO-3 (Ludwig, 2015). Por ello sería importante complementar estos resultados con ensayos *in vivo* para confirmar si existe alguna interacción entre estas proteínas GAP y RHO-3; además de realizar una mutante activa para *rho-3* (RHO-3 siempre unida a GTP) y comparar los efectos en el desarrollo de *N. crassa* con los producidos por la eliminación de estas proteínas reguladoras.

Aún quedan varios interrogantes sobre la función que tiene RHO-3 en el desarrollo de *N. crassa*. Los estudios futuros estarán dirigidos a determinar las proteínas responsables de regular la actividad de RHO-3 y las proteínas efectoras. Lo anterior será necesario para descifrar si existe una relación funcional entre RHO-3 y los componentes que participan en los procesos de exocitosis y la organización de la actina en *N. crassa* y con ello poder comparar la función que tiene RHO-3 en este hongo filamentoso, con levaduras y hongos filamentosos patógenos.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- RHO-3 se localiza en la región externa del Spitzenkörper y en la membrana plasmática desde la región II hasta principios de la región III en hifas maduras.
- RHO-3 se localiza en los septos de hifas maduras y germínulas, sugiriendo que participa en el desarrollo de los mismos.
- La eliminación de *rho-3* causa defectos en el desarrollo de *N. crassa*, disminuyendo la tasa de crecimiento de las hifas, producción de conidios, producción de biomasa y modificando la distancia entre septos.
- RHO-3 es necesaria para el desarrollo sexual de *N. crassa*.
- RHO-3 participa en el mantenimiento de la integridad del Spitzenkörper.



## Literatura citada

---

- Adamo, J. E., Rossi, G., Brennwald, P. 1999. The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Molecular Biology of the Cell*, 10(12), 4121–4133. doi: 10.1091/mbc.10.12.4121
- An, B., Li, B., Qin, G., Tian, S. 2015. Function of small GTPase Rho3 in regulating growth, conidiation and virulence of *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 75, 46–55. doi: 10.1016/j.fgb.2015.01.007
- Aramayo, R., Selker, E. U. 2013. *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10):a017921. doi: 10.1101/cshperspect.a017921
- Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., Castro-Longoria, E. 2011. Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PloS One*, 6(11): e27148. doi: 10.1371/journal.pone.0027148
- Arellano, M., Durán, A., Pérez, P. 1996. Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *The EMBO Journal*, 15(17), 4584–4591. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00836.x
- Arx, J. A. 1987. *Plant pathogenic fungi*. J. J. Cramer, Berlin.
- Ballou, E. R., Selvig, K., Narloch, J. L., Nichols, C. B., Alspaugh, J. A. 2013. Two Rac paralogs regulate polarized growth in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 57, 58–75. doi: 10.1016/j.fgb.2013.05.006
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C. E., Gierz, G., López-Franco, R., Haisheng, L. 2000. Mapping the growth of fungal hyphae: Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophysical Journal*, 79(5), 2382–2390. doi:10.1016/S0006-3495(00)76483-6
- Baylis, J. R., and A.G. DeBusk. 1967. Estimation of the frequency of multinucleate conidia in microconidiating strains. *Neurospora Newslett*, 11. doi:10.4148/1941-4765.1975
- Beadle, G. W., Tatum, E. L. 1941. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 27(11), 499–506. doi: 10.1073/pnas.27.11.499
- Bistis, G. N. 1981. Chemotropic Interactions Between Trichogynes and Conidia of Opposite Mating-Type in *Neurospora crassa*. *Mycologia*, 73(5), 959–975. doi:10.2307/3759806
- Bistis, George N., Perkins, D. D., Read, N. D. 2003. Different cell types in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Reports*, 50(1), 17–19. doi: 10.4148/1941-4765.1154
- Blanket Melchum, H. 2017. El papel de la RhoGAP RGA-1 en la regulación del crecimiento de *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 44 pp.
- 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*, 68(1), 1–108. doi: 10.1128/mubr.68.1.1-108.2004
- Bos, J. L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. 2007. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 129(5), 865–877. doi: 10.1016/J.CELL.2007.05.018
- Bourne, H., Sanders D., McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117–127.

- Boyce, K. J., Hynes, M. J., Andrianopoulos, A. 2003. Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffe* RAC homolog. *Journal of Cell Science*, 116, 1249–1260. doi: 10.1242/jcs.00319
- Boyce, K. J., Hynes, M. J., Andrianopoulos, A. 2005. The Ras and Rho GTPases genetically interact to coordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffe*. *Molecular Microbiology*, 55(5), 1487–1501. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04485.x
- Castro-Longoria, E., Ferry, M., Bartnicki-Garcia, S., Hasty, J., Brody, S. 2010. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Dynamics of the clock component frequency visualized using a fluorescent reporter. *Fungal Genetics and Biology*, 47(4), 332–341. doi:10.1016/j.fgb.2009.12.013
- Corvest, V., Bogliolo, S., Follette, P., Arkowitz, R. A., Bassilana, M. 2013. Spatiotemporal regulation of Rho1 and Cdc42 activity during *Candida albicans* filamentous growth. *Molecular Microbiology*, 89(4), 626–648. doi: 10.1111/mmi.12302
- Davis, R. H. 2000. *Neurospora*. Contributions of a Model Organism . O. U. Press, New York.
- Davis, R. H., Perkins, D. D. 2002. *Neurospora*: A model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3, 397–403. doi: 10.1038/nrg797
- Delgado-Álvarez, D. L., Bartnicki-García, S., Seiler, S., Mouriño-Pérez, R. R. 2014. Septum development in *Neurospora crassa*: The septal actomyosin tangle. *PLoS ONE*, 9(5):e96744. doi:10.1371/journal.pone.0096744
- Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F., Wagener, J. 2012. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular Microbiology*, 83(3), 506–519. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07946.x
- Doignon, F., Weinachter, C., Roumanie, O., Crouzet, M. 1999. The yeast Rgd1p is a GTPase activating protein of the Rho3 and Rho4 proteins. *FEBS Letters*, 459(3), 458–462. doi:10.1016/S0014-5793(99)01293-4
- Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42 - The centre of polarity. *Journal of Cell Science*, 117, 1291–1300. doi: 10.1242/jcs.01115
- Fischer, R., Zekert, N., Takeshita, N. 2008. Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, 68(4), 813–826. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x
- Fort, P., Blangy, A. 2017. Rho Gtpases: Molecular Biology In Health And Disease. WSPC, France.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. O., Jaffe, D., ... Birren, B. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–868. doi: 10.1038/nature01554
- Hakoshima, T., Shimizu, T., Maesaki, R. 2003. Structural Basis of the Rho GTPase Signaling. *Journal of Biochemistry*, 134, 327–331. doi: 10.1093/jb/mvg149
- Harris, S. D. 2011. Cdc42/Rho GTPases in fungi: variations on a common theme. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1123–1127. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07525.x
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. doi: 10.1017/S0953756201004725
- He, F., Nie, W. C., Tong, Z., Yuan, S. M., Gong, T., Liao, Y., Bi, E., Gao, X. D. 2015. The GTPase-activating protein Rga1 interacts with Rho3 GTPase and may regulate its function in polarized growth in budding yeast. *PLoS ONE*, 10(4): e0123326. doi:10.1371/journal.pone.0123326

- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. 2004. Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63–87. doi: 10.1016/S0580-9517(04)34003-1
- Horowitz, N.H., and H. Macleod. 1960. The DNA content of *Neurospora* nuclei. *Microbial Genetics Bull.* 17, 6-7.
- Howard, D. 2002. *Pathogenic Fungi in Humans and Animals.* (2da ed.) CRC Press, New York.
- Imai, J., Toh-e, A., Matsui, Y. 1996. Genetic Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 Gene, Encoding a Rho-Type Small GTPase, Provides Evidence for a Role in Bud Formation. *Genetics*, 142(2), 359–369.
- Jaffe, A. B., Hall, A. 2005. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 247–269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- John, D. 2016. *Fungi in Ecosystem Processes.* (2da ed.) CRC Press, New York.
- Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y., Sugiura, R. 2011. Role of the small GTPase rho3 in Golgi/endosome trafficking through functional interaction with adaptin in fission yeast. *PLoS ONE*, 6(2): e16842. doi:10.1371/journal.pone.0016842
- Kjøller, L., Hall, A. 1999. Signaling to Rho GTPases. *Experimental Cell Research*, 253(1), 166–179. doi: 10.1006/EXCR.1999.4674
- Knechtle, P., Wendland, J., Philippsen, P. 2006. The SH3/PH domain protein AgBoi1/2 collaborates with the Rho-type GTPase AgRho3 to prevent nonpolar growth at hyphal tips of *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1635–1647. doi: 10.1128/EC.00210-06
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Roos, E. D., van den Hondel, C. A. M. J. J., Meyer, V., Ram, A. F. J. 2011. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1151–1167. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07524.x
- Levin, D. E. 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 262–291. doi: 10.1128/mubr.69.2.262-291.2005
- Mackay, D. J., Hall, A. 1998. Rho GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 20685–20688. doi: 10.1074/JBC.273.33.20685
- Madaule, P., Axel, R., Myers, A. M. 1987. Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(3), 779–783. doi: 10.1073/pnas.84.3.779
- Maheshwari, R. 1999. Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 1–18. doi: 10.1006/fgbi.1998.1103
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., Bölker, M. 2006. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 59(2), 567–578. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04952.x
- Marcoux, N., Cloutier, S., Zakrzewska, E., Charest, P. M., Bourbonnais, Y., Pallotta, D. 2000. Suppression of the profilin-deficient phenotype by the RHO2 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 156(2), 579.
- Matsui, Y., Toh-E, A. 1992. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5690–5699. doi:10.1128/mcb.12.12.5690

- Milburn, M. V., Tong, L., DeVos, A. M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Kim, S. H. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247(4945), 939–945. doi: 10.1126/science.2406906
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), 580–585. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00368-5
- Money, N. P. 2016. *Fungi: A Very Short Introduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Moon, S. Y., Zheng, Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology*, 13(1), 13–22. doi: 10.1016/S0962-8924(02)00004-1
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh-e, A., Matsui, Y., Mabuchi, I. 2002. The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 115, 4629–4639. doi: 10.1242/jcs.00150
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R., Mabuchi, I. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells*, 8(4), 357–370. doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00639.x
- Nordmann, D., Lickfeld, M., Warnsmann, V., Wiechert, J., Jendretzki, A., Schmitz, H. P. 2014. The small GTP-binding proteins AgRho2 and AgRho5 regulate tip-branching, maintenance of the growth axis and actin-ring-integrity in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *PLoS ONE*, 9(8): e106236. doi: 10.1371/journal.pone.0106236
- Olofsson, B. 1999. Rho Guanine Dissociation Inhibitors: Pivotal Molecules in Cellular Signalling. *Cellular Signalling*, 11(8), 545–554. doi: 10.1016/S0898-6568(98)00063-1
- Park, H.-O., Bi, E. 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 48–96. doi: 10.1128/MMBR.00028-06
- Perkins, D. D., Raju, N. B. 1986. *Neurospora discreta*, a new heterothallic species defined by its crossing behavior. *Experimental Mycology*, 10(4), 323–338. doi:10.1016/0147-5975(86)90019-8
- Raju, N. B. 1992. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycological Research*, 96(4), 241–262. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80934-9
- Rasmussen, C. G., Glass, N. L. 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1913–1925. doi: 10.1128/EC.4.11.1913-1925.2005
- Rasmussen, C. G., Glass, N. L. 2007. Localization of RHO-4 indicates differential regulation of conidial versus vegetative septation in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1097–1107. doi: 10.1128/EC.00050-07
- Richthammer, C., Enseleit, M., Sanchez-Leon, E., März, S., Heilig, Y., Riquelme, M., Seiler, S. 2012. RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 85(4), 716–733. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08133.x
- Riquelme, M., Fischer, R., Bartnicki-García, S. 2003. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma*, 222(3–4), 211–215. doi: 10.1007/s00709-003-0020-8
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-garcia, S., Bowman, B., Castro-longoria, E., Free, S. J., ... Douglas Shaw, B. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha e a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–74. doi: 10.1016/j.funbio.2011.02.008

- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., Freitag, M. 2014. The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1312–1326. doi:10.1091/mbc.E13-06-0299
- Robinson, N. G., Guo, L., Imai, J., Toh-E, A., Matsui, Y., Tamanoi, F. 1999. Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), 3580–3587. doi: 10.1128/mcb.19.5.3580
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., ... Bussey, H. 2003. Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology*, 50(1), 167–181. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03697.x
- Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., Valencia. 2012. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Journal of Cell Biology*, 196,189–201. doi: 10.1083/jcb.201103008.
- Si, H., Justa-Schuch, D., Seiler, S., Harris, S. D. 2010. Regulation of septum formation by the Bud3-Rho4 GTPase module in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 185(1), 165–176. doi: 10.1534/genetics.110.114165
- Springer, M. L. 1993. Genetic control of fungal differentiation: The three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssays*, 15(6), 365–374. doi: 10.1002/bies.950150602
- Staben, C., B. Jensen, M. Singer, J. Pollock, M. Schechtman, J. Kinsey, E. Selker. 1989. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Reports*, 36, 79-81. doi: 10.4148/1941-4765.1519
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. 2001. Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*, 81(1), 153–208. doi: 10.1152/physrev.2001.81.1.153
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044–1053. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x
- Vetter, I. R., Wittinghofer, A. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294, 1299–1304.
- Virag, A., Lee, M. P., Si, H., Harris, S. D. 2007. Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1579-1596. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06021.x
- Vogel, H.J. 1956. A Convenient Growth Medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42-47.
- Wainwright, M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. Wiley, Sheffield.
- Wang, H., Tang, X., Balasubramanian, M. K. 2003. Rho3p Regulates Cell Separation by Modulating Exocyst Function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 164(4), 1323-31.
- Wendland, J. y Philippsen, P. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*, 157(2), 601–610.
- Wennerberg, K., Der, C. J. 2004. Rho-family GTPases: It's not only Rac and Rho (and i like it). *Journal of Cell Science*, 117, 1301–1312. doi: 10.1242/jcs.01118
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001

Zheng, W., Chen, J., Liu, W., Zheng, S., Zhou, J., Lu, G., Wang, Z. 2007. A Rho3 Homolog Is Essential for Appressorium Development and Pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2240–2250. doi: 10.1128/EC.00104-07

## Anexos

Tabla 3. Crecimiento de la cepa WT y de  $\Delta rho-3$ .

Cepa	Tiempo de incubación (h)	Crecimiento radial promedio (cm)	Velocidad de crecimiento promedio (cm/h)
WT	12	$2.25 \pm 0.03$	$0.357 \pm 0.103$
	18	$4.25 \pm 0.07$	
	24	$6.78 \pm 0.07$	
	30	$9.23 \pm 0.09$	
	36	$11.85 \pm 0.05$	
$\Delta rho-3$	12	$0.59 \pm 0.03$	$0.128 \pm 0.065$
	18	$1.08 \pm 0.05$	
	24	$1.84 \pm 0.05$	
	30	$2.87 \pm 0.06$	
	36	$4.13 \pm 0.06$	



**Figura 38. Peritecios falsos.** Los protoperitecios derivados de la cruce sexual donde se utilizó a la cepa mutante  $\Delta rho-3$  como macho se pigmentaron asemejándose a peritecios, sin embargo, estos no contenían ascosporas.