

TESIS DEFENDIDA POR
CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Ernestina Castro Longoria

Director del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Codirector del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García

Miembro del Comité

Dr. José Luis Stephano Hornedo

Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado en
Ciencias de la Vida*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

05 de Julio de 2012.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN, LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL MÓDULO CDC-42 –
RAC – CDC-24 Y DE LAS PROTEÍNAS BUD-2 Y BUD-5 EN EL HONGO
FILAMENTOSO *NEUROSPORA CRASSA***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES

Ensenada, Baja California, México, Julio de 2012.

RESUMEN de la tesis de **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California. Julio de 2012.

Caracterización, localización y función del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 y de las proteínas BUD-2 y BUD-5 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de tesis

Neurospora crassa es un hongo filamentoso que se caracteriza por la formación de hifas altamente polarizadas. La morfogénesis de las hifas requiere del establecimiento y del mantenimiento de la polaridad celular, ambos procesos son regulados por múltiples complejos proteicos. Las proteínas Rho GTPasas son consideradas importantes en la regulación de la polaridad celular en eucariotas, por lo que en este trabajo se analizó el módulo constituido por las Rho GTPasas CDC-42, RAC y su activador, el factor de intercambio de guanina (GEF) CDC-24 en el hongo *N. crassa*. Cdc-42p se ha denominado como el regulador maestro de la polaridad en levaduras, sin embargo en este trabajo se comprobó que para *N. crassa* este gen no es esencial. Se determinó que las mutantes $\Delta cdc-42$ y Δrac son viables, aunque con fenotipos que presentan colonias muy compactas e hifas con morfología irregular, mientras que las dobles mutantes con pérdida de alelos de *cdc-42* y *rac* son letales, sugiriendo que ambas proteínas comparten al menos una función esencial. Por otro lado, se observó que la mutante de $\Delta cdc-24$ es letal, lo cual sugiere que el GEF CDC-24 es fundamental para la activación de CDC-42 y RAC. Mediante el análisis *in vivo* por microscopía confocal se determinó que el módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 está asociado a la membrana celular y organizado en forma de capucha apical cuando es etiquetado con proteínas fluorescentes en el extremo N-terminal. Las tres proteínas se localizaron en el domo apical de las hifas con una distribución distinta y aparentemente complementaria. CDC-42 está confinada en forma de media luna a la membrana del ápice celular, RAC también está asociada a membrana pero en forma de anillo, excluyendo la región ocupada por CDC-42. CDC-24 ocupó una posición estratégica asociándose a membrana plasmática en forma creciente en el ápice celular, así como en el citosol apical excluyendo la zona del Spitzenkörper (Spk). Por otra parte, CDC-42 y RAC presentaron una localización temporal distinta durante el proceso de formación de ramificaciones y durante la germinación de esporas. Ambas proteínas se acumularon en la membrana

plasmática antes de la formación de una rama. Sin embargo CDC-42 apareció primero que RAC, aproximadamente un minuto antes de la emergencia de la rama, mientras que RAC apareció después, alrededor de 20 segundos antes de la emergencia de la rama. Durante la germinación, GFP-CDC-42 se acumula en una región específica en la membrana celular de esporas durante la fase de hidratación y en los ápices de los tubos germinativos, mientras que RAC aparece una vez que se ha formado el tubo germinativo. Esto sugiere que ambas GTPasas juegan un papel importante en la regulación de la polaridad celular. CDC-42 aparentemente participa en la iniciación de la polarización celular mientras que la función principal de RAC pudiera ser el mantenimiento de un crecimiento polarizado. La geranilgeranilación de CDC-42 es importante para su anclaje a membrana, ya que al etiquetar CDC-42 con la proteína fluorescente mCherry en el C-terminal, la geranilgeranilación se ve interrumpida y el patrón de localización difiere con respecto al etiquetamiento en el extremo N-terminal. Tanto en hifas maduras como en germínulas la localización de CDC-42-mCherryFP se observó en el ápice celular ocupando la parte central del Spk, sugiriendo que la localización en membrana plasmática depende de la geranilgeranilación. Sin embargo al parecer ésta no es importante para llevar a cabo su función ya que la polaridad celular es restablecida en la cepa homocarión obtenida mediante la cruce genética de la mutante $\Delta cdc-42$ con la cepa $cdc-42::mchfp$. Además la localización de CDC-42-mCherryFP durante la formación de septos y ramificaciones laterales no se ve afectada.

Otros componentes involucrados en el establecimiento de la polaridad celular y en mantener un crecimiento polarizado en levaduras son las proteínas BUD-2 y BUD-5 que en *N. crassa* muestran distintos patrones de localización tanto en hifas maduras como en germínulas. En hifas maduras BUD-2 es confinada al ápice celular ocupando la parte central del Spk, mientras que BUD-5 se observó tanto de forma citosólica, con un punto brillante en la parte central dando la apariencia de abanico, como asociada a la membrana apical, por lo que ambas proteínas colocalizan parcialmente. Durante la germinación de esporas y en la elongación de las germínulas, BUD-2 se observó en la membrana plasmática apical, mientras que BUD-5 se encontró tanto de forma citosólica en el ápice como asociada a la membrana apical. Así mismo ambas proteínas mostraron una localización distinta durante diversos eventos morfogénicos donde BUD-2 participó en la formación de septos y BUD-5 en marcar los sitios de ramificaciones laterales. Esto sugiere que aparte del papel que ambas proteínas aparentemente juegan en el establecimiento de la polaridad, también participan en diferentes procesos asociados a la morfogénesis celular de *N. crassa*.

Palabras Clave: Crecimiento polarizado, CDC-42, RAC, CDC-24, BUD-2, BUD-5, *Neurospora crassa*

ABSTRACT of the thesis presented by **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Microbiology. Ensenada, Baja California, México. July, 2012.

Characterization, localization and function of the module CDC-42 – RAC – CDC-24 and the proteins BUD-2 and BUD-5 in the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Neurospora crassa is a filamentous fungus that is characterized by the formation of highly polarized hyphae, which is a morphogenetic event that requires the coordinated assembling of multiple protein complexes to ensure the establishment and maintenance of cell polarity. Rho GTPases are key regulators that control eukaryotic cell polarity, therefore in this study, we analyzed the Rho GTPases CDC-42, RAC and their activator the guanine exchange factor (GEF) CDC-24 in *N. crassa*. In yeast, Cdc-42p has been considered as a master polarity regulator; however in this study we demonstrate that for *N. crassa* this gene is not essential. We determined that $\Delta cdc-42$ and Δrac mutants are viable, although the phenotypes present very compact colonies and irregular hyphal morphology, while double mutants carrying the loss of function alleles of *cdc-42* and *rac* are lethal, suggesting that both *cdc-42* and *rac* share at least one common essential function. On the other hand, it was observed that $\Delta cdc-24$ mutant is lethal, this suggest that the GEF CDC-24 is fundamental for CDC-42 and RAC activation. *In vivo* confocal microscopy shows that the CDC-42 – RAC – CDC-24 module is organized as a membrane-associated cap that covers the hyphal apex when are tagged with fluorescent proteins at the N-terminal. The three proteins were present at the apical dome with a distinct but apparently complementary localization. CDC-42 occurs as an apical membrane-associated crescent, RAC is also membrane-associated but distributed as a ring excluding the region labeled by CDC-42, and CDC-24 occupied a strategic position, localizing as a broad apical membrane-associated crescent and in the apical cytosol excluding the Spitzenkörper (Spk). On the other hand, CDC-42 and RAC also display distinct temporal localization patterns during branching and spore germination. Both proteins were observed as an accumulation of fluorescence at the plasma membrane before branch formation. However CDC-42 was observed before RAC, approximately one minute before branch emergence, while RAC appeared after CDC-42, about 20 seconds before branch emergence. During germination, GFP-CDC-42 accumulates in a specific region of the cell membrane of spores during the hydration phase and continues at the apices of germ tubes, while RAC appears only once the germ tube has been formed. These localizations suggest that both GTPases play an important role for cell polarity regulation, apparently CDC-42 participate during polarity establishment, while the primary function of RAC could be to maintain polar growth. CDC-42 geranylgeranylation is important for membrane attachment, because when CDC-42 was labeled by the mCherry fluorescent protein at the C-terminal, the geranylgeranylation is disrupted and the localization pattern of CDC-42 is different with respect at the tagged at the N-terminal. In both germlings and mature hyphae, CDC-42 was localized at the cell apex occupying the core of the Spk. This

suggests that membrane-association depends on the geranylgeranylation. However, apparently this is not necessary to carry out its function, because cell polarity was restored in a homokaryon strain obtained by sexual crosses between $\Delta cdc-42$ and $cdc-42::mchfp$ strains. Additionally, CDC-42-mCherryFP localization during septa and branching formation was not affected.

Other components that are involved in the establishment and maintenance of cell polarity are the BUD-2 and BUD-5 proteins. In *N. crassa* both BUD-2 and BUD-5 display distinct localization patterns in both germlings and mature hyphae. In mature hyphae, BUD-2 is confined to the apical cytosol occupying the core of the Spk, while BUD-5 was observed in the apical region of the cell as a bright spot with higher intensity at the base adopting a hand fan shape and associated to the apical plasma membrane. Both proteins partially colocalized in the apical region. However, during spore germination and elongation of germlings, BUD-2 was associated to the plasma membrane, while BUD-5 was found both in the cytosolic form and membrane-associated. BUD-2 and BUD-5 also display distinct localization patterns during some morphogenetics processes. BUD-2 is localized during septum formation, and BUD-5 was involved during initiation of lateral branches. This suggests that in addition to the role that both proteins apparently play in the establishment of cell polarity, they also participate in different processes associated to cell morphogenesis of *N. crassa*.

Keywords: Polarized growth, CDC-42, RAC, CDC-24, BUD-2, BUD-5, *Neurospora crassa*.

A mi familia.....

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias primeramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyar la investigación científica y a los estudiantes de posgrado a través de becas. Así como también a la institución receptora CICESE, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirnos realizar nuestros estudios de posgrado. También quiero agradecer a SEP-CONACyT de Ciencia Básica (CB-2006-1-61524) por el apoyo económico para la realización del artículo Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC-24 module in *Neurospora crassa* así como a la Dra. Ernestina Castro-Longoria, Dra. Corina Richthammer y al Dr. Stephan Seiler por darme la oportunidad. Así como a cada uno de los miembros de mi comité de tesis por todo su apoyo, aportaciones, sugerencias y comentarios brindados para la realización de este trabajo. Gracias también a Olga Callejas, que siempre apoya a todos los estudiantes sin excepción alguno. Y no podían faltar mis grandes amigos y familia por su apoyo incondicional.....Gracias!.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xv
1. Introducción.....	1
1.1 Morfogénesis celular: crecimiento polarizado en hongos.....	1
1.2 Papel de las GTPasas en el crecimiento polarizado de los hongos.....	4
1.3 Mecanismo general de regulación de las GTPasas.....	7
1.4 Estructura general de las Rho GTPasas.....	8
1.5 Modificaciones post-traduccionales de las proteínas Rho GTPasas.....	12
1.6 Las Rho GTPasas y su papel en el crecimiento de las células levaduriformes.....	18
1.6.1 Cdc42 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.6.2 Cdc42 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
1.7 Las Rho GTPasas y su papel en el crecimiento de hongos filamentosos.....	22
1.7.1 Papel del módulo CDC-42, RAC y CDC-24 en hongos filamentosos.....	22
1.8 Papel del módulo Bud1 – Bud2 – Bud5 en el establecimiento de la polaridad celular de hongos.....	27
1.9 Descripción general del módulo Bud1 – Bud2 – Bud5.....	31
1.10 Localización general del módulo Bud-1 – Bud2 – Bud5 en células fúngicas.....	34
2. Justificación.....	37
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivos.....	38
5. Materiales y Métodos.....	39
5.1 Cepas de <i>Neurospora crassa</i>	39
5.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	40
5.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	40
5.3.1 Medios de cultivo para hongos.....	40
5.3.2 Medios de cultivo para bacterias (LB).....	41
5.3.3 Condiciones de crecimiento.....	41
5.4 Ensayos de biología molecular.....	41
5.4.1 Diseño de oligonucleótidos.....	41
5.4.2 Vectores de clonación.....	43

CONTENIDO (continuación)

	Página
5.4.3 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	45
5.4.4 Cuantificación de DNA genómico.....	45
5.4.5 Separación de DNA mediante electroforesis.....	45
5.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
5.4.7 Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	46
5.4.8 Transformación genética de <i>E. coli</i>	47
5.4.8.1 Obtención de células químicamente competentes.....	47
5.4.8.2 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	47
5.4.9 Purificación de DNA.....	48
5.4.9.1 Purificación de DNA plasmídico.....	48
5.4.10 Tratamiento enzimático.....	48
5.4.10.1 Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	48
5.4.10.2 Defosforilación de extremos 5' de moléculas de DNA.....	49
5.4.10.3 Ligación de fragmentos de DNA a vectores de clonación.....	49
5.4.11 Selección y verificación de clones positivas.....	49
5.4.12 Deleción de dominio con motivo CAAX.....	50
5.4.13 Transformación genética de <i>N. crassa</i>	51
5.4.14 Recuperación de transformantes de <i>N. crassa</i>	52
5.4.15 Análisis bajo microscopía.....	52
5.4.15.1 Microscopía de bajo aumento.....	52
5.4.15.2 Microscopía de alto aumento.....	53
5.4.16 Fluorocromos e inhibidores.....	54
5.4.16.1 FM4-64.....	54
5.4.16.2 Inhibidores del cito esqueleto celular.....	55
6. Resultados.....	56
6.1 La actividad coordinada de CDC-42 y RAC es requerida para la polaridad celular, integridad del Spitzenkörper y el crecimiento de <i>N. crassa</i>	56
6.1.1 Caracterización de las mutantes condicionales de <i>cdc-42</i> y <i>rac</i> en <i>N. crassa</i>	56
6.1.2 Caracterización de las mutantes $\Delta cdc-42$ y Δrac en <i>N. crassa</i>	59
6.1.3 Caracterización de las dobles mutantes de <i>rac;cdc-42</i> en <i>N. crassa</i>	61
6.2 CDC-24 es una proteína esencial para el crecimiento, la polaridad celular y la morfogénesis fúngica en <i>N. crassa</i>	63
6.2.1 Caracterización de las mutantes por deleción y condicionales de <i>cdc-42</i> en <i>N. crassa</i>	63
6.3 El crecimiento de las mutantes del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 es afectada por la pérdida de la polaridad en <i>N. crassa</i>	66

CONTENIDO (continuación)

	Página
6.4 CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización intracelular durante la polarización celular y extensión apical.....	68
6.4.1 Obtención del vector recombinante pCAP24.3.....	68
6.4.2 Análisis intracelular de las proteínas CDC-42, RAC y CDC-24 etiquetadas con proteínas fluorescente en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	70
6.4.3 CDC-42 y RAC participan en la formación del septo en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	72
6.4.4 CDC-42 y RAC participan durante el proceso de formación de ramificaciones laterales en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	74
6.4.5 Localización del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 en germínulas de <i>N. crassa</i>	76
6.5 El módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 es independiente del cito esqueleto en <i>N. crassa</i>	78
6.6 Obtención de los vectores recombinantes pCAP42.1, pCAP42.2, pCAP24.1 y pCAP24.2.....	80
6.7 CDC-42 y CDC-24 se localizan en la región central del Spitzenkörper al ser etiquetadas en el extremo C-terminal.....	85
6.7.1 Análisis intracelular de la proteína CDC-42-mCherryFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	85
6.7.2 Análisis intracelular de la proteína CDC-24-mCherryFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	87
6.8 CDC-42 participa durante el proceso de formación de ramificaciones laterales.....	88
6.9 CDC-42 es una proteína funcional en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	90
6.10 Localización de CDC-42 y CDC-24 etiquetadas en el C-terminal en germínulas de <i>N. crassa</i>	92
6.11 Análisis molecular de las proteínas BUD-2 y BUD-5 en <i>N. crassa</i>	94
6.12 Obtención de los vectores recombinantes pCAP2.1 y pCAP5.1.....	94
6.13 BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	99
6.13.1 Análisis intracelular de las proteínas BUD-2 y BUD-5 en los ápices celulares de las hifas maduras de <i>N. crassa</i>	99
6.13.2 Colocalización de BUD-5 y BUD-2 en ápices en crecimiento de <i>N. crassa</i>	101

CONTENIDO (continuación)

	Página
6.14 BUD-5 participa durante el proceso de formación de ramificaciones laterales en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	103
6.15 BUD-2 participa en la formación del septo en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	105
6.16 BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en germínulas de <i>N. crassa</i>	107
7. Discusiones	111
8. Conclusiones	127
9. Perspectivas	129
Lista de referencias bibliográficas	130
Apéndice A	157
Apéndice B	158
Apéndice C	159
Apéndice D	160
Apéndice E	161

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de activación/inactivación de las GTPasas.....	6
2	Representación esquemática de los motivos estructurales que presentan en forma general las proteínas Rho GTPasa.....	11
3	Diagrama esquemático de los dominios estructurales del GEF Cdc24.....	12
4	Representación esquemática del proceso de prenilación de proteínas en células eucariotas.....	15
5	Representación esquemática del mecanismo potencial de señalización de las Rho GTPasas.....	16
6	Representación esquemática de la ruta de señalización que conduce al establecimiento de la polarización en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
7	Representación esquemática del modelo de interacción del módulo Rsr1/Bud1 con el módulo Cdc42.....	33
8	Representación esquemática de la técnica de bloque invertido. (Modificado de Hickey <i>et al.</i> , 2004).....	53
9	Mutantes condicionales de <i>cdc-42</i> y <i>rac</i> revelan defectos en la polaridad celular.....	58
10	Las cepas fúngicas de $\Delta cdc-42$ y Δrac son viables, pero su morfología es fuertemente afectada.....	60
11	La cepa doble mutante de <i>rac</i> y <i>cdc-42</i> es letal.....	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
12	La proteína CDC-24 es esencial para la viabilidad y las cepas condicionantes <i>rac</i> y <i>cdc-24</i> muestran defectos en sus morfologías.....	65
13	Tasa de elongación de las cepas mutantes del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24.....	67
14	Construcción del vector recombinante pCAP24.3.....	69
15	CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización en los ápices de hifas maduras.....	71
16	CDC-42 y RAC se localizan en los septos.....	73
17	CDC-42 y RAC participan en la iniciación de la emergencia de ramificaciones laterales.....	75
18	CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización durante la germinación de <i>N. crassa</i>	77
19	La localización de CDC-42, RAC y CDC-24 en la membrana plasmática no es afectada por la interrupción del citoesqueleto de actina o citoesqueleto microtubular.....	79
20	Obtención de los fragmentos de <i>cdc-42</i> y <i>cdc-24</i> por PCR de alta fidelidad.....	80
21	Análisis de restricción de los fragmentos <i>cdc-42</i> , <i>cdc-24</i> y del vector de clonación pMF272 y pJV15.2.....	81
22	Resultado obtenido de la PCR de colonia de <i>cdc-42</i> y <i>cdc-24</i> integrados a los vectores pMF272 y pJV15.2.....	83

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
23	Patrones de restricción de los vectores recombinantes pCAP42.1, pCAP42.1, pCAP24.1 y pCAP24.2.....	84
24	CDC-42 se localiza en los ápices de hifas maduras en crecimiento.....	86
25	CDC-24 se localiza en el ápice celular.....	87
26	CDC-42 participa en la iniciación de la emergencia de ramificaciones laterales.....	89
27	La cepa <i>cdc-42::mchfp</i> restablece la polaridad de la cepa Δ <i>cdc-42</i> .	90
28	CDC-42 y CDC-24 muestran distintos patrones de localización en germínulas de <i>N. crassa</i>	93
29	Obtención de los fragmentos de <i>bud-2</i> y <i>bud-5</i> por PCR de alta fidelidad.....	95
30	Análisis de restricción de los fragmentos <i>bud-2</i> , <i>bud-5</i> y de los vectores de clonación pJV15.2 y pM272.....	96
31	Resultado de la PCR de colonia para <i>bud-2</i> y <i>bud-5</i> integrados a los vectores de clonación pJV15.2 y pMF272.....	97
32	Patrones de restricción de los vectores recombinantes pCAP2.1, pCAP5.1.....	98
33	BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en los ápices celulares de hifas maduras.....	100
34	BUD-5 y BUD-2 colocalizan parcialmente en la región apical de hifas maduras de <i>N. crassa</i>	102

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
35	BUD-5 participa en la iniciación de la emergencia de ramificaciones laterales.....	104
36	BUD-2 participa en la formación del septo en <i>N. crassa</i>	106
37	Distribución intracelular de BUD-5 en germínulas de <i>N. crassa</i>	108
38	BUD-2 en germínulas de <i>N. crassa</i> se encuentra asociado a membrana plasmática.....	110
39	Modelo representativo de localización del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 en <i>N. crassa</i>	116

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Cepas de <i>N. crassa</i> usadas y generadas para este estudio.....	39
II	Oligonucleótidos usados en este estudio. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción se encuentran señaladas en negritas y el codón de inicio de la transcripción se encuentra subrayado.....	43
III	Vectores para expresión fúngica utilizados en el presente trabajo mostrando sus características principales.....	44

1. Introducción

Los hongos son organismos eucarióticos que tienen un gran impacto en nuestra sociedad por ser considerados como los principales devastadores de plantas económicamente importantes en la agricultura (Agrios, 1997), debido a que anualmente se pierden más de un billón de dólares de cultivo (Wainright, 1992). En el área médica se ha visto un aumento en el número de pacientes con enfermedades provocadas por estos organismos (Walsh *et al.*, 2004). Pero su importancia no solo radica en su naturaleza perjudicial, sino que también un gran número de estos organismos son benéficos para el humano, puesto que sirven como alimento y también para producir metabolitos secundarios que son utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica (Deacon, 1990).

Dentro de los hongos filamentosos, *Neurospora crassa* presenta características que lo hacen muy atractivo como organismo ideal para la experimentación (Deacon, 1990). *N. crassa* ha tenido gran auge dentro de las áreas de Genética, Bioquímica y Biología Celular y Molecular (Davis, 2000; Davis y Perkins, 2002), debido a que presenta propiedades que son ventajosas para su estudio. Dentro de las propiedades ventajosas se encuentra que el genoma de *N. crassa* está totalmente secuenciado (Galagan *et al.*, 2003), crece en un medio relativamente simple, se cultiva fácilmente en el laboratorio y completa su ciclo de vida en un corto período de tiempo (Deacon, 1990). En conjunto, todas estas características permiten nuevas oportunidades para comprender las bases de procesos celulares como el crecimiento de los hongos filamentosos.

1.1 Morfogénesis celular: crecimiento polarizado en hongos

El crecimiento polarizado es un proceso que se da en una región discreta de las células, el cual es fundamental en el desarrollo de los hongos (Virag y Harris, 2006). Tanto los organismos unicelulares como pluricelulares utilizan mecanismos conservados para generar la polaridad (Nelson, 2003), así que a través de los reinos, los organismos han evolucionado para formar células individuales que seleccionan un sitio de polarización que tiene como objetivo formar células alargadas y tubulares (Virag y Harris, 2006). Algunos ejemplos de

células con crecimiento polarizado son: neuronas en animales (Andersen y Bi, 2000), tubos de polen y raíces en plantas vasculares (Hepler *et al.*, 2001), rizoides en algas (Kropf, 1992) e hifas en hongos filamentosos (Heath, 1990; Gow, 1995).

En hongos, el crecimiento polarizado está dado por proteínas y por componentes selectos que mantienen la organización y el tráfico de organelos hacia los sitios de polarización en las células (Sheu y Snyder, 2001; Wiggin *et al.*, 2005), así que el crecimiento en estos organismos inicia por la germinación de esporas. El proceso de germinación implica una fase de hinchamiento o isotrópico (Ekundayo y Carlile, 1964; Fletcher, 1969; Gull y Trinci, 1971; Schmit y Brody, 1976; Seiler y Plamann, 2003), denominada por Bartnicki-García (1981) como fase de crecimiento esférico. Durante este período Van Etten *et al.*, (1977) señalaron que las esporas incrementan en biomasa así como en volumen y cuya duración es de aproximadamente 2 horas (Schmit y Brody, 1976; Seiler y Plamann, 2003). Transcurrido este tiempo el crecimiento comienza a polarizarse generando un ápice; a este proceso se le conoce como emergencia del tubo germinativo (Schmit y Brody, 1976) y ocurre a las 3 horas (Seiler y Palman, 2003). Posteriormente, el crecimiento polarizado resulta continuo en extensión unidireccional, por lo que Schmit y Brody (1976) lo denominaron como elongación del tubo germinativo y ocurre de acuerdo con Seiler y Plamann (2003) a las 5 horas. Este proceso de crecimiento se convierte en un crecimiento altamente polarizado (Grove, 1978; Prosser y Trinci, 1979; Howard, 1981; Trinci, 1984). Durante el proceso de polarización, el tubo germinativo se extiende apicalmente hasta convertirse en una hifa. Durante la etapa de extensión apical se van incorporando componentes al ápice de la célula para la formación de nueva membrana plasmática y para la formación de nueva pared celular en el ápice (Gooday, 1995). Cuando el flujo de vesículas secretadas dentro del segmento apical de la hifa excede la proporción máxima de vesículas que puede absorber el ápice de la hifa, empieza el proceso de ramificación para dar lugar a la formación del micelio (Katz *et al.*, 1972; Prosser y Trinci, 1979; Watters y Griffiths, 2001).

El desarrollo de un crecimiento altamente polarizado en las células fúngicas, requiere del suministro de material orgánico y la organización en tiempo y espacio de componentes

celulares necesarios para el crecimiento de la membrana plasmática y la pared celular (Gooday, 1995). El establecimiento de la polaridad celular, el crecimiento polarizado y el mantenimiento de la asimetría celular son eventos esenciales que gobiernan la morfogénesis y el desarrollo de organismos tanto unicelulares como pluricelulares (Wendland y Philippsen, 2001). Tales procesos, fundamentales en el desarrollo de los hongos (Virag y Harris, 2006), implican el establecimiento de mecanismos y funciones celulares de una forma unidireccional y localizada en una región discreta de las células (Palmieri y Haarer, 1998; Johnson, 1999; Chant, 1999; Pruyne y Bretscher, 2000). Es por ello que tanto los organismos unicelulares como pluricelulares utilizan mecanismos conservados para generar la polaridad (Nelson, 2003), así que a través de los reinos, los organismos han evolucionado para formar células individuales que seleccionan un sitio de polarización que tiene como objetivo formar células alargadas y tubulares (Virag y Harris, 2006). En hongos, el crecimiento polarizado está regulado por proteínas y por componentes selectos (Sheu y Snyder, 2001; Wiggin *et al.*, 2005) que mantienen la organización y el tráfico de organelos hacia los sitios de polarización en las células. Dentro de los componentes selectos que originan la polarización en levaduras se encuentran las proteínas de las subfamilias de Rho y Ras GTPasas. Dentro de las Rho-GTPasas involucradas en establecer la polarización celular en organismos eucariotas se encuentran las proteínas Cdc42, Rac y Cdc24, y dentro de las Ras-GTPasas implicadas en marcar sitios de polarización celular se encuentran las proteínas Rsr1/Bud1, Bud2 y Bud5. Ambas subfamilias de GTPasas son requeridas para la propia localización de los parches de polarización en los sitios especificados por los marcadores espaciales (Irazoqui y Lew, 2004).

En la levadura *S. cerevisiae*, los procesos polarizados de gemación y la formación de las prolongaciones típicas del apareamiento muestran algunos elementos en común en cuanto a la reestructuración de la polaridad celular. Estos procesos en la levadura se llevan a cabo bajo los siguientes requerimientos: debilitamiento de la pared celular por enzimas que permiten la expansión de la célula, formación de nueva membrana plasmática y síntesis de la nueva pared celular por enzimas biosintéticas (Rodríguez Pachón, 2001). En hongos

filamentosos el establecimiento del crecimiento polarizado se encuentra restringido a los ápices celulares de las hifas en los cuales se llevan a cabo una serie de eventos de forma coordinada que dan lugar a la expansión de la hifa en forma polarizada. Para sostener un crecimiento polarizado se requiere de procesos tales como la polarización de actina, la migración polarizada de vesículas secretoras que aportan enzimas y precursores hacia el ápice de la célula, así como la exocitosis, la cual es requerida para que la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática.

Para que se pueda establecer el crecimiento polarizado tanto en organismos levaduriformes como en organismos filamentosos, las rutas secretoras deben dirigir la maquinaria necesaria a sitios concretos de la corteza celular. En todos estos procesos el citoesqueleto de actina juega un papel fundamental (Finger y Novick, 1998) manteniendo las estructuras polarizadas en respuesta a marcas espaciales y temporales. Dentro de las marcas espaciales y temporales que seleccionan el inicio de un proceso de polarización en hongos se encuentran las proteínas Cdc42, Rac y Cdc24, así como Rsr1/Bud1, Bud2 y Bud5. No obstante, las hifas poseen un mecanismo de secreción que les permite crear un gradiente polarizado en sus ápices para formar pared celular. Esta habilidad le permite organizar de manera espacial todos los componentes necesarios para el crecimiento polarizado, mecanismo complejo donde interviene la biosíntesis y transporte de vesículas y organelos que van de las regiones dístales de la hifa hacia la punta de la hifa (Bartnicki-García, 2002).

1.2 Papel de las GTPasas en el crecimiento polarizado en los hongos

Las Rho GTPasas constituyen una familia dentro de la superfamilia de las Ras pertenecientes a las proteínas G monoméricas, cuyo peso molecular oscila de 20 a 40 kDa (Takai *et al.*, 2001). En mamíferos existen alrededor de 22 genes que codifican para Rho GTPasas, de las cuales, algunas presentan varias isoformas que incluyen: Rho (A, B y C), Rac (1, 2 y 3), Cdc42 (Cdc42Hs y G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, RhoH/TTF, TCL, TC10, Chp, Wrch-1, Rif, RhoBTB1, RhoBTB2, Miro-1, Miro-2 (Ridley 2000; Aspenstrom *et al.*, 2004; Bustelo *et al.*, 2007). Sin embargo, en total se han

identificado alrededor de 100 proteínas G monoméricas en organismo eucariotas, que van desde levaduras a humanos (Bourne *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1990; Takai *et al.*, 1992), por lo que los integrantes de esta superfamilia en mamíferos, se han agrupado a su vez en 5 subfamilias: la subfamilia de Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran. Los miembros de la subfamilia Ras, principalmente regulan la expresión génica; la subfamilia Rho, regulan la organización del citoesqueleto como la expresión de genes; los miembros de las subfamilias Rab y Sar1/Arf, regulan el transporte de vesículas intracelulares y finalmente, la subfamilia Ran regulan el transporte nucleocitoplasmático durante las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular, así como también regulan la organización microtubular durante la fase M del ciclo celular (Takai *et al.*, 2001). No obstante, los miembros mejor caracterizados son Rho, Rac y Cdc42 (Bishop y Hall, 2000). Cada una de estas GTPasas actúan como interruptores moleculares, ciclándose entre un estado activo, que es cuando se hallan unidas a GTP, a un estado inactivo, que es cuando se encuentran unidas a GDP (Takai *et al.*, 2001). Cuando estas GTPasas se encuentran en su forma unida a GTP son capaces de interactuar con efectores o blancos moleculares para iniciar una repuesta de señalización, mientras que una actividad GTPasa intrínseca regresa a las proteínas a un estado GDP, lo cual permite completar el ciclo y poner fin a las señales de transducción (Bishop y Hall, 2000). Para que todo este proceso de ciclado sea llevado a cabo, debe ser controlado por factores de intercambio de guanosinas (GEFs), los cuales son capaces de catalizar el intercambio de GDP a GTP para activar el interruptor (Bernards, 2003); así mismo intervienen proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que son encargadas de estimular la actividad GTPasa intrínseca para inactivar el interruptor (Bernards, 2003), y finalmente intervienen los inhibidores de disociación de nucleótidos de guaninas (GDIs), cuyo papel parece ser bloquear la activación espontánea de las Rho GTPasas (Olofsson, 1999) (Figura 1), previniendo su interacción con la membrana plasmática (Carpenter *et al.*, 1999; Hansen y Nelson, 2001).

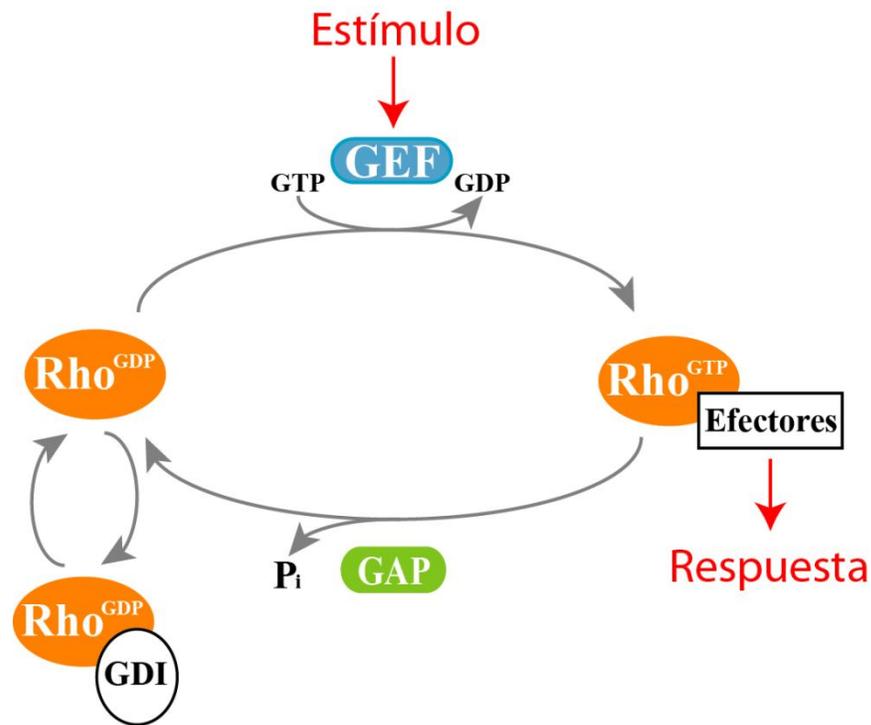


Figura 1. Ciclo de activación/inactivación de las GTPasas. Las proteínas GEFs catalizan el intercambio de GDP a GTP de las Rho GTPasas en presencia de un estímulo; activadas las Rho GTPasas interactúan con efectoras moleculares para iniciar una respuesta de señalización; posteriormente el ciclo es inactivado por las proteínas GAPs; finalmente las proteínas GDIs, se encargan de mantener bloqueadas a las Rho GTPasas. Tomado y modificado de Jaffe y Hall, 2005.

Este ciclo de regulación y su importancia en la señalización de procesos celulares, hace que las Rho GTPasas sean de gran interés ya que han sido relacionadas con el citoesqueleto de actina, participan en la regulación de la polaridad celular, transcripción de genes, progresión del ciclo celular, dinámica de los microtúbulos, en las rutas de transporte vesicular y en una gran variedad de actividades enzimáticas que van desde las NADPH oxidasas a la síntesis de glucanos en levaduras (Etienne-Manneville y Hall, 2002). La aparentemente interminable lista de actividades que presentan puede ser confusa, pero es consistente con el gran número de proteínas blanco que han sido identificadas. Una de las funciones de las Rho GTPasas es activar una amplia variedad de proteínas efectoras que regulan una gran variedad de funciones celulares (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Desde los primeros estudios sobre Rho GTPasas, la mayoría de trabajos se han enfocado en

entender su papel en el control del crecimiento polarizado y morfología celular desde levaduras hasta células de mamíferos (Adams *et al.*, 1990; Johnson y Pringle, 1990; Paterson *et al.*, 1990).

1.3 Mecanismo general de regulación de las GTPasas

El paso de un estado unido a GTP a uno unido a GDP es regulado por numerosas proteínas celulares (Boguski y McCormick, 1993) que incluyen GEFs, GAPs y GDIs. Se han identificado alrededor de 30 factores de intercambio de guanosinas (GEFs) (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997). Todas las proteínas Rho GEFs se caracterizan por contener un dominio Dbl-homólogo (DH) el cual codifica la actividad catalítica GEF (Hart *et al.*, 1994; Cherfils y Chardin, 1999) y por tener tres regiones conservadas llamadas CR1, CR2 y CR3, cada una de 10 a 30 aminoácidos de longitud (García *et al.*, 2006), y con CR1 y CR2 expuestas sobre la superficie del dominio DH formando el núcleo del dominio (García *et al.*, 2006). Adyacente al dominio DH, hacia el C-terminal, se localiza el dominio pleckstrin-homólogo (PH). Se cree que el dominio PH media la localización hacia la membrana por la unión de lípidos (Zheng *et al.*, 1996, Rameh *et al.*, 1997). Aparte del módulo DH – PH, la mayoría de las proteínas GEFs contienen adicionalmente dominios funcionales como: DEP (por sus siglas en inglés: *Dishevelled*, *Egl-10* and *Pleckstrin*), CNH (Citrón and NIK1-like kinase homology domain), PB1 (Phox and Bem1p domain) y CH (Calponin homology domain), los cuales han sido implicados en la unión a actina (Li y Chang, 2003; Wang *et al.*, 2004).

Por otra parte, el segundo grupo de proteínas involucradas en el ciclo de las GTPasas son las GAPs. Se han identificado alrededor de 20 proteínas de unión a GTPasas (GAPs), todas ellas caracterizadas por incrementar la tasa intrínseca de la hidrólisis de GTP de las Rho GTPasas (Lamarche y Hall 1994). Este tipo de proteínas en el N-terminal presentan un dominio hidrofóbico, seguido de dos dominios SH2 y SH3 (Pawson, 1988); también poseen un dominio PH y una región similar a la región CalB de la fosfolipasa A₂ (Clark *et al.*, 1991). En el C-terminal, presentan un dominio de aproximadamente 250 residuos, el cual es

responsable para la estimulación GTPasa y este dominio consiste de tres bloques altamente conservados (Gibbs y Marshall, 1989).

Las proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guaninas (GDIs), constituyen la tercera clase de reguladores directamente involucrados en el control del ciclo de las GTPasas. Las GDIs fueron identificadas como factores capaces de inhibir la disociación de GDP (Bollag y McCormick, 1991; Ohga *et al.*, 1989), así que su función biológica es su habilidad de remover proteínas Rho asociadas a membrana plasmática, o bien, facilitar el movimiento de las proteínas Rho de un compartimiento membranal a otro (Boguski y McCormick, 1993). En este proceso, la GDI se une al C-terminal prenilado de la GTPasa, recubriéndolo, y manteniendo la cola hidrofóbica de la GTPasa protegida dentro de un bolsillo hidrofóbico, lo que facilita la extracción de la GTPasa de la membrana y permitiendo su reubicación citosólica intracelular (Vetter y Wittinghofer, 2001). Se sugiere que sin tal factor, las proteínas Rho se quedarían firmemente unidas a la membrana (Ohga *et al.*, 1989).

1.4 Estructura general de las Rho GTPasas

Una gran proporción de proteínas que utilizan nucleótidos de guaninas, se han caracterizado como interruptores moleculares binarios (GTP a GDP) y son considerados como el grupo más conservado entre la evolución proteica, donde encontramos a las GTPasas de la superfamilia Ras y las cuales se encuentran en todos los organismos eucariotas. Las Rho GTPasas son proteínas monoméricas de unos 200 aminoácidos que oscilan entre 20 a 40 kDa de peso molecular y representan la mayor rama de la superfamilia de las Ras GTPasas (Takai *et al.*, 2001). El primer miembro fue descrito en 1985 y en la actualidad se conocen al menos en mamíferos más de diez Rho-GTPasas (Ridley, 2000). Dentro de las Rho GTPasas más estudiadas se encuentran: Rac (por sus siglas en inglés: Ras related C3 botulinum toxin substrate), Cdc42 (Por sus siglas en inglés: Cell división cycle 42) y Rho (Por sus siglas en inglés: Ras homologous member). Estas proteínas participan en diferentes procesos celulares, dentro de los cuales encontramos la

polarización celular, regulación del citoesqueleto celular, tráfico de membranas, proliferación celular, entre otros (Hall, 1998; Boettner y Van Aelst, 2002). Todos los miembros de esta familia tienen en común: 1) Una secuencia consenso de unión a GDP/GTP que se denomina “Switch I y II” respectivamente (Bernards, 2003); 2) Un dominio efector implicado con la interacción con otras proteínas; 3) y una secuencia CAAX (C, cisteína; A, aminoácido alifático; X, un aminoácido cualquiera) (Omer y Gibbs, 1994; Pereira-Leal *et al.*, 2001), la cual es una señal de modificación post-traducciona que aumenta la naturaleza hidrofóbica de la proteína, hecho que facilita su anclaje a la membrana plasmática (Casey, 1992; Clarke, 1992).

Considerando que las Rho GTPasas participan en una amplia variedad de procesos celulares, es sorprendente la gran cantidad de esfuerzos que se han realizado para la identificación de las secuencias blanco que componen los dominios importantes de estas proteínas para un mejor entendimiento. Es muy conocido que la forma activa de las Rho GTPasas es cuando se encuentran en su forma GTP, así que un análisis en la estructura de estas proteínas revelan que las diferencias conformacionales entre las formas GTP-GDP son restringidas a dos bucles de superficie llamados “switch I” y switch II” (Figura 2) que en Cdc42 y Rac se localizan entre los aminoácidos del 26-54 y 59-74 respectivamente (Ihara *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1997) localizándose cerca del N-terminal. Por otra parte, Se ha descrito que la región switch I es idéntica al loop G2 del dominio G, mientras que el switch II está constituida por un loop G3 seguida de 2 α -hélice (Sprang, 1997; Vetter y Wittinghofer, 2001), y que estos dominios contienen una secuencia consenso denominado motivo CRIB (dominio interactivo Cdc42/Rac) (Burbelo *et al.*, 1995) que son conocidos como dominio de unión a la cinasa PAK, o bien como dominio de unión GTPasa (GBD) (Park y Bi, 2007). El dominio CRIB es encontrado en muchos efectores río abajo de cdc42 (Sells y Chernoff, 1997). Se han realizado numerosas mutaciones puntuales dentro de los switch I y II en Rho, Rac y Cdc42, y se han observado algunos impedimentos en la unión de algunas proteínas blanco en esos sitios (Joneson *et al.*, 1996; Lamarche *et al.*, 1996; Sahai *et al.*, 1998) como por ejemplo, la interacción de PAK (cinasa p21-activada) con Cdc42 o Rac es bloqueada por una mutación de Tyr⁴⁰ a Cys, pero no se bloquea con la

mutación Phe³⁷ a Ala (Lamarche *et al.*, 1996). No obstante, en el C-terminal del switch II se han detectado dos aminoácidos que en las proteínas Rho son de propiedad ácidos, pero en Rac son hidrofóbicos y al parecer estas diferencias son importantes para la unión de dos efectores PRK2 y ROK (Zong *et al.*, 1999). Así mismo, esta misma región en Rac ha sido implicada en la unión de GAPs (Diekmann *et al.*, 1995). En general estos estudios mutacionales dentro de estas regiones son esenciales para mantener contacto con proteínas efectoras (Bishop y Hall, 2000). Por otra parte, las Rho GTPasas también poseen otro dominio de importancia llamado Rho, el cual se ha considerado como una estructura clave que distingue a la familia de las Rho GTPasas de otros miembros de la superfamilia de Ras, es una inserción helicoidal de 13 aminoácidos aproximadamente (Ihara *et al.*, 1998). Los aminoácidos que constituyen esta región son diferentes entre Rho, Rac y Cdc42, lo que implica que esta región es importante para la especificidad hacia Rho, Rac y Cdc42 respectivamente (Ihara *et al.*, 1998) y el cual es único para las Rho-GTPasas (Figura 2). Se ha descrito que estos dominios están implicados en la interacción con algunos efectores río abajo tales como: IQGAPs y GDIs en humanos (por sus siglas en inglés Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) (McCallum *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997), así como: Bni1, Ste20, Cla4, Gic1, Gic2, Msb3 y Msb4 (Court y Sudbery, 2007). Por otro lado, estudios realizados en Rac sin esta región de inserción Rho, muestran que el dominio conserva todas sus funciones GTPasa intrínsecas, realizando el intercambio de nucleótidos por su GEF e interactúa con las proteínas GDIs. Además, la estructura general no se vió afectada en ausencia de esta región (Thapar *et al.*, 2002). Varios estudios han demostrado que la región de inserción es importante al menos en Rac para la activación de Nox-NADPH oxidasas (Diebold y Bokoch, 2001; Freeman *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2002). No obstante, también se ha reportado que la eliminación de esta región de inserción conduce a un plegamiento de la proteína incorrecta, sin embargo, no afecta en el anclaje a membrana plasmática (Miyano *et al.*, 2009). Finalmente en el C-terminal, las Rho GTPasas contienen una caja CAAX (donde “C” es una cisteína; “A” es un aminoácido alifático y “X” es cualquier aminoácido) que consta generalmente de la siguiente secuencia de aminoácidos CTIL para la prenilación del grupo geranylgeranyl isopreno en el residuo Cys (Ziman *et al.*, 1993).

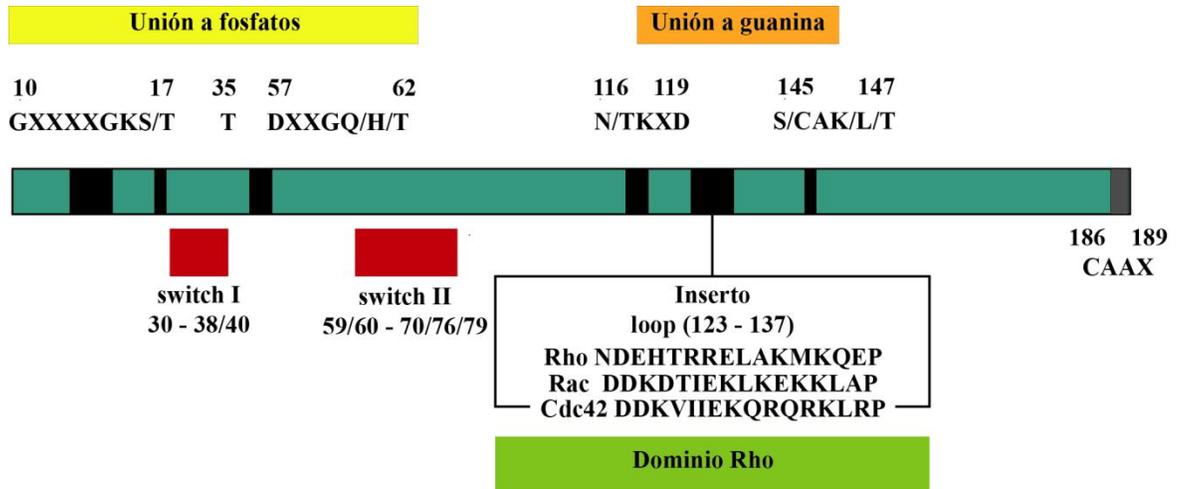


Figura 2. Representación esquemática de los motivos estructurales que presentan en forma general las proteínas Rho GTPasa. Motivos estructurales y sus patrones potenciales de unión basados en estudios que van desde levaduras a mamíferos. Switch I también conocido como región efectora Ras; switch II, sitio que sirve de unión con otras proteínas con motivo CRIB; dominio Rho, único para GTPasas tipo Rho; caja CAAX, sitio de reconocimiento para llevar a cabo la prenilación e importante para su unión a membrana plasmática y función. La imagen no presenta escala. Adaptado de Castaño-cardoso, 2005 y Park y Bi, 2007.

Por otra parte la Rho GEF de Cdc42p, Cdc24p se caracteriza por contener un dominio Dbl homólogo (DH) en los residuos 283-452 (Stradal *et al.*, 1998) y adyacentemente se localiza el dominio pleckstrin homólogo (PH) (Rossman *et al.*, 2005) entre el residuo 472-681 aproximadamente (Stradal *et al.*, 1998) y es responsable de la actividad catalítica GEF (Hart *et al.*, 1994; Cherfils y Chardin, 1999) (Figura 3). No obstante, el dominio DH también se caracteriza por tener tres regiones conservadas CR1, CR2 y CR3, cada una de 10 a 30 aminoácidos de longitud (García *et al.*, 2006), y el dominio PH ayuda a orientar a la GEF hacia la membrana plasmática por la unión de lípidos (Zheng *et al.*, 1996; Rameh *et al.*, 1997; Bottomley *et al.*, 1998). Cdc24 también presenta otros dos dominios funcionales conservados, en el N-terminal se localiza el dominio calponina homólogo (CH, residuos

154-226) (Stradal *et al.*, 1998) (Figura 3), cuya función no es muy clara, pero se sugiere estar implicado en la unión a actina (Li y Chang, 2003; Wang *et al.*, 2004), y en el C-terminal se encuentra el dominio PBI (Figura 3), el cual se cree que media la unión de Cdc24 con la proteína adaptadora Bem1 (Wai *et al.*, 2009), sin embargo las funciones en la regulación de Cdc24p no son claras (Shimada *et al.*, 2004). También se describe que entre los residuos 649-658 y 820-831 Cdc24p tiene dos dominios de unión a calcio (Gulli y Peter, 2001).

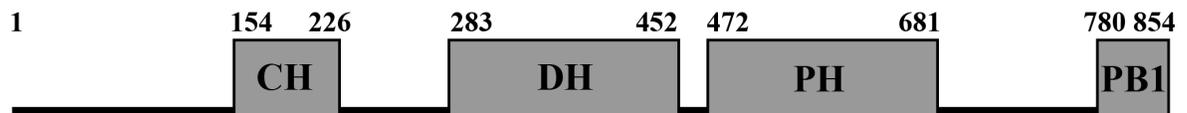


Figura 3. Diagrama esquemático de los dominios estructurales del GEF Cdc24. CH, calponina homólogo; DH, Dbl homólogo; PH, pelckstrin homólogo; PBI, p67^{phox}-Bem1 homólogo. Adaptado de Wai *et al.*, 2009.

1.5 Modificaciones post-traduccionales de las proteínas Rho GTPasas

La modificación post-traducciona de algunas proteínas por la incorporación de isoprenoides a su molécula o prenilación, se demostró por primera vez en células fúngicas al realizar un análisis estructural de los péptidos involucrados en los factores de apareamiento de *Rhodospordium toruloides* (rodotorucina A), *Tremella* sp. (tremerógenos) y en *S. cerevisaie* (factor *a*), demostrando que cada unos de estos péptidos contienen en su C-terminal una cisteína modificada por un enlace tioeter al isoprenoide farnesil o hidroxifarnesil (Kamiya *et al.*, 1978; Sakagami *et al.*, 1981; Ishibashi *et al.*, 1984; Anderegg *et al.*, 1988), sugiriendo que esta modificación es necesaria para su función (Fujino *et al.*, 1980). No obstante, experimentos realizados con ácido mevalónico e inhibidores de la síntesis del mevalonato como son las lovastantinas en células de mamíferos, indican que un número de proteínas celulares son modificadas por metabolitos

del mevalonato o por sus isoprenoides (Schmidt *et al.*, 1984; Maltese y Sheridan, 1987; Maltese, 1990). Adicionalmente, mutaciones en genes implicados en la ruta de la biosíntesis del mevalonato en *S. cerevisiae* (*hmg1*, *hmg2* y *erg13*), los cuales conducen a la biosíntesis del farnesil difosfato y geranilgeranil difosfato, interfieren con la función del factor-a y en la localización de las proteínas Ras en la membrana, previniendo así su prenilación (Schafer *et al.*, 1989). Por otro lado, un número de proteínas involucradas en las señales de transducción han mostrado ser preniladas post-traduccionalmente en la cisteína del C-terminal por un farnesil isoprenoide de 15 carbonos o por un geranilgeranil isoprenoide de 20 carbonos (Wolda y Glomset, 1988; Casey *et al.*, 1989; Farnsworth *et al.*, 1989; Schafer *et al.*, 1989; Finegold *et al.*, 1990; Fukada *et al.*, 1990; Yamane *et al.*, 1991). Es por ello, que la prenilación de estas proteínas es esencial para su asociación a membrana y su función (Maltese, 1990; Gibbs, 1991; Schafer y Rine, 1992; Clarke, 1992). Es evidente que una variedad de proteínas en células eucariotas son modificadas post-traduccionalmente, para poder dirigirse desde el citosol hacia estructuras membranosas donde van a desempeñar sus funciones celulares (Wennerberg *et al.*, 2005). El sitio de prenilación de este tipo de proteínas consiste en una secuencia formada por cuatro aminoácidos situados en el extremo carboxilo terminal, CAAX, donde “C” representa a la cisteína, “A” representa a los residuos alifáticos de leucina, isoleucina o valina y “X” representa los aminoácidos de metionina, alanina, glutamina, cisteína o serina (Waddick y Uckun, 1998; Andrews *et al.*, 2010). Sin embargo, estos cambios estructurales varían dependiendo de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de cada proteína (Wennerberg *et al.*, 2005), y es por ello que pueden ser agrupados en distintas clases:

1) Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-X, son modificadas post-traduccionalmente por la unión covalente de un grupo farnesil de 15 carbonos (Clarke, 1992; Zhang y Casey, 1996; Crowell, 2000; Crowell y Huizinga, 2009). Esta modificación da como resultado la formación de un enlace tioeter estable entre la cisteína del motivo CAAX y el farnesilo, sirviendo como donador el farnesilo difosfato. Esta reacción lipídica es catalizada por la proteína farnesiltransferasa (PFT), la cual es una enzima citosólica que consiste de una subunidad α y una subunidad β (Clarke, 1992; Zhang y Casey, 1996; Crowell, 2000; Crowell y Huizinga, 2009), produciéndose posteriormente la proteólisis del grupo A-A-X y

la carboximetilación de la cisteína (Clarke, 1992; Cox y Der, 1992; Glomset y Farnsworth, 1994; Wennerberg *et al.*, 2005) (Figura 4A).

2) Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-Leu, en este caso, la modificación lipídica se lleva a cabo por la unión covalente de un grupo geranilgeranilo de 20 carbonos en la cisteína del motivo CAAX. Esta modificación es catalizada por una proteína geranilgeraniltransferasa tipo I (PGGT1), la cual es una enzima citosólica que consta al igual que la farnesiltransferasa de una subunidad α y una subunidad β (Clarke, 1992; Zhang y Casey, 1996; Crowell, 2000; Hartman *et al.*, 2005; Crowell y Huizinga, 2009), y posteriormente es carboximetilada tras la proteólisis de los tres últimos aminoácidos (Clarke, 1992; Cox y Der, 1992; Glomset y Farnsworth, 1994; Wennerberg *et al.*, 2005) (Figura 4B).

3) Y finalmente, si el extremo C-terminal es Cys-X-Cys o Cys-Cys, las dos cisteínas son geranilgeraniladas por la geranilgeraniltransferasa tipo II (PGGT II), también llamada RAB geranilgeraniltransferasa (RAB GGT). Las modificaciones de esta última clase sólo sucede en la subfamilia de las proteínas Rab e ahí el nombre de RAB GGT (Novick y Bernnwald, 1993; Wennerberg *et al.*, 2005) (Figura 4C).

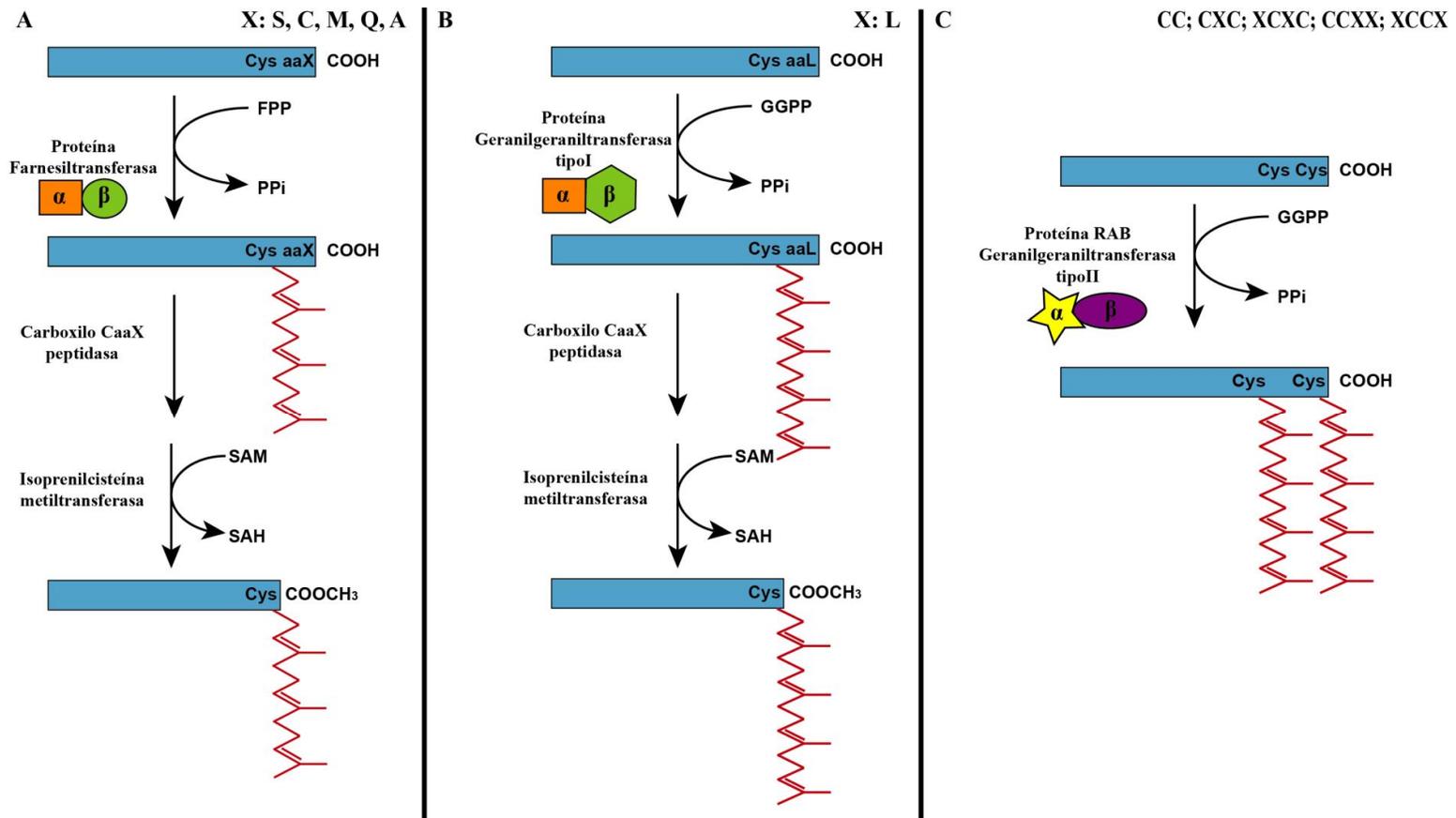


Figura 4. Representación esquemática del proceso de prenilación de proteínas en células eucariotas. (A) Proceso de prenilación de una proteína con motivo CAAX farnesilada. (B) Proceso de prenilación de una proteína con motivo CAAX geranylgeranilada. (C) Proceso de prenilación de una proteína RAB GTPasa. Imagen tomada y modificada de Andrews *et al.*, 2010.

En general, estas modificaciones post-traduccionales generan que la fracción de lípidos haga al C-terminal hidrofóbico ayudando a que las proteínas se anclen a la membrana (Samuel y Hynds, 2010) (Figura 5). Así mismo, esta modificación lipídica se cree es importante para su interacción con su factor de intercambio de nucleótidos de guaninas (Figura 5) y con sus efectores blancos río abajo (Takai *et al.*, 2005).

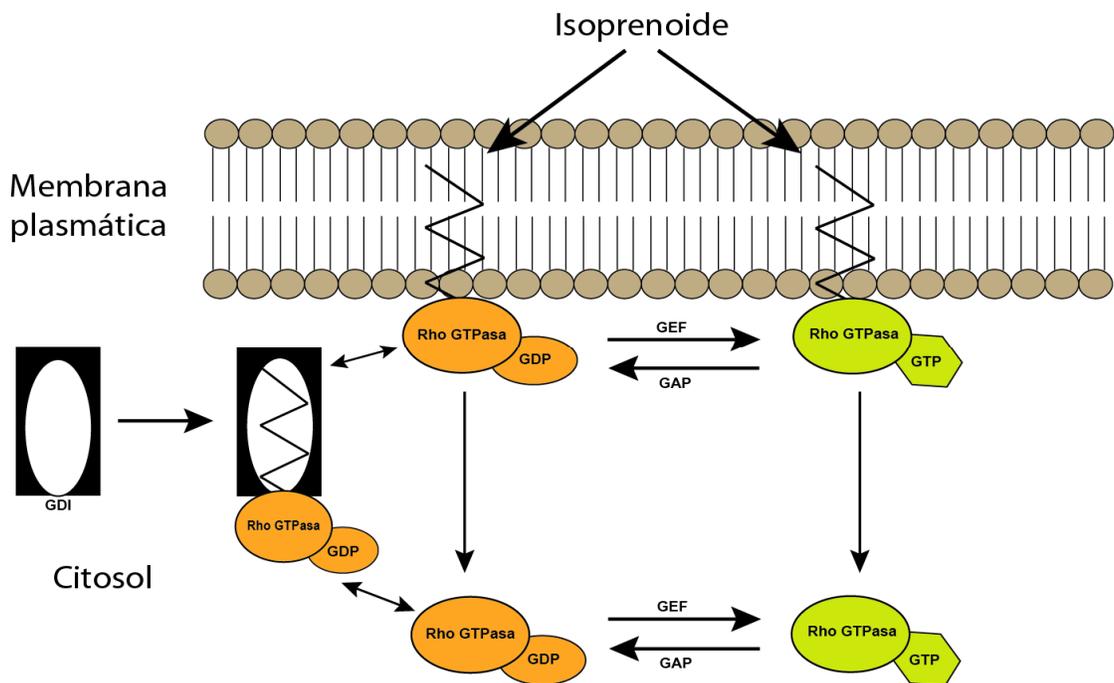


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo potencial de señalización de las Rho GTPasas. La prenilación de las Rho GTPasas promueve su localización en la membrana plasmática y su cambio de GDP a GTP, sin embargo, el estado GTP también puede suceder en el citosol. Por otra parte, la unión de GDI enmascara la modificación isoprenoide de las Rho GTPasas, previniendo su localización y secuestrando a las Rho GTPasas en el citosol para controlar su actividad. Tomado y modificado de Samuel y Hynds, 2010.

Por otra parte, Kranenburg *et al.*, 1997 reportan que algunas de las funciones asociadas con la activación de las Rho GTPasas podrían ser separadas de su asociación a membrana, ya que estudios preliminares de Samuel y colaboradores (Sin publicar), sugieren un apreciable

pool de Rho GTPasas en forma GTP en el citosol. Por otro lado, en la levadura *S. cerevisiae* experimentos de fraccionamiento celular indican que Cdc42 es encontrado en dos “pools”, uno de ellos en forma soluble y otro en forma particulado (Ziman *et al.*, 1993). La forma particulada de Cdc42 en *S. cerevisiae* es localizada en membrana plasmática, vesículas secretoras y en material denso (Ziman *et al.*, 1993). No obstante, cuando se realiza una mutágenesis de la Cys188 en el C-terminal de Cdc42 en la levadura, la fracción particulada es eliminada (Ziman *et al.*, 1993), sugiriendo que esta modificación lipídica de Cdc42 es requerida para su localización en la fracción particulada ya que al analizar una mutante de Cdc42 (Cdc42^{C188S}) fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) no se localizó en membranas internas, ni en membrana plasmática (Richman *et al.*, 2002). Estudios realizados en la fusión del motivo CAAX solo, con la proteína reportera GFP (GFP-¹⁸⁸CTIL) en *S. cerevisiae* resultó que la localización fue sólo en membranas internas, pero no en membrana plasmática, mientras que el fragmento GFP-KKSKKCTIL (que es un motivo polibásico además de la caja CAAX), es suficiente para dirigirse a ambas membranas. Sin embargo, la fusión GFP-KKSKKCTIL falló con su localización en forma de agregados en los sitios de crecimiento polarizado (Richman *et al.*, 2002), sustentando la idea de que los agregados de Cdc42 podrían requerir la unión de nucleótidos de guaninas (Richman *et al.*, 2004). No obstante, estos análisis sugieren que la caja CAAX y su dominio polibásico río arriba del motivo CAAX son suficientes para su localización en membrana plasmática, mientras que otras regiones de Cdc42 son propensos a estar involucrados en agrupar a Cdc42 en los sitios de crecimiento polarizado (Park y Bi, 2007). Por otro lado, en células de mamíferos, se ha visto que al inhibir la ruta del mevalonato con mevastantina, lovastatina, pravastatina, simvastatina o atorvastatina, dan como resultado la activación de Rac1, Cdc42 y RhoA, indicando que la localización en membrana no es necesaria para realizar una función (Dunford *et al.*, 2006). Por tal razón, se ha descrito que la importancia de la carboximetilación de las pequeñas GTPasas aún no ha sido extensamente evaluada (Lu *et al.*, 2004).

Por otra parte, Cdc-42 es una proteína involucrada en múltiples procesos celulares y su función depende de la localización en membrana plasmática, así que basado en la

controversia de su localización en agregados citosólicos, en este apartado se realizó el etiquetamiento de Cdc-42 y de su GEF Cdc-24 en el extremo C-terminal con la proteína mCherry fluorescente, encontrando que ambas proteínas son localizadas en las zonas de crecimiento, coincidiendo con la posición central del Spitzenkörper así como en sitios de septación, siendo estas localizaciones funcionales, de tal forma que este análisis es realizado y reportado por primera vez en hongos filamentosos.

1.6 Las Rho GTPasas y su papel en el crecimiento de células levaduriformes

Para entender como los componentes celulares pueden generar asimetría y establecer un crecimiento polarizado, es esencial entender la morfogénesis de los hongos. Es establecido que determinados marcadores espaciales tanto internos como externos determinan la selección de un sitio específico donde la maquinaria de crecimiento es activada (Pérez y Rincón, 2010). Durante el crecimiento vegetativo las células fúngicas utilizan marcadores internos para activar el crecimiento en coordinación con el ciclo celular (Chang y Peter, 2003). En organismos levaduriformes, existen dos modelos mayormente estudiados: *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Estos organismos se caracterizan por presentar diferentes patrones de crecimiento y diferentes rutas moleculares que en conjunto seleccionan el sitio de crecimiento y activación del mismo. En organismos levaduriformes, el crecimiento polarizado puede dividirse en tres pasos: (1) marcar los sitios de polarización celular en respuesta a señales internas o externas; (2) establecimiento de polaridad por el reconocimiento de sitios de polarización y señalización por el citoesqueleto que conduce a una reorganización asimétrica; y (3) distribución asimétrica de los componentes celulares y secreción polarizada, dando lugar a un crecimiento celular polarizado (Pérez y Rincón, 2010). Dentro de los factores involucrados en los procesos de polaridad celular se encuentran las Rho GTPasas, las cuales son activadas específicamente por proteínas blanco que marcan el sitio de polarización y son requeridas en el establecimiento de la polaridad y en el crecimiento polarizado (Pérez y Rincón, 2010).

1.6.1 Cdc42 en *Saccharomyces cerevisiae*

La proteína Cdc42p fue identificada por primera vez a partir de una cepa termosensible (*cdc42-1^{ts}*) de *S. cerevisiae*. Se ha descrito que en esta mutante, la formación de la yema se ve imposibilitada a 37°C por lo que la división celular se detiene a esta temperatura; sin embargo, la masa y el volumen celular continúan incrementándose, lo que produce un fenotipo de células grandes, redondeadas, sin yemas y con múltiples núcleos (Adams *et al.*, 1990). Todo ello llevó a concluir que Cdc42p regula eventos clave para el establecimiento del crecimiento polarizado en *S. cerevisiae*.

La activación de la GTPasa Cdc42p es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad (Drees *et al.*, 2001), por lo tanto Cdc42p es un factor crucial para pasar del crecimiento isotrópico a un crecimiento polarizado en *S. cerevisiae*. Esta Rho GTPasa es controlada por su factor de intercambio de guanosina (GEF), Cdc24p (Ruggieri *et al.*, 1992; Bender, 1993; Zheng *et al.*, 1994, 1995; Park *et al.*, 1999). Cuando esto sucede, Cdc42p sufre una prenilación con un grupo geranyl-geranyl-isopreno en la cisteína 188 que se encuentra en su extremo C-terminal, tras lo que se eliminan los tres aminoácidos restantes de la proteína (Finegold *et al.*, 1991). Gracias a esta prenilación, Cdc42 se ancla a la membrana plasmática y aparece en lugares de crecimiento polarizado como son: invaginaciones de la membrana plasmática en el lugar de emergencia de las yemas y en el extremo apical de las proyecciones de apareamiento características durante el tratamiento con feromonas (Adams *et al.*, 1984; Kilmartim y Adams, 1984; Ziman *et al.*, 1991; 1993); así mismo, también ha sido localizada en la región del cuello entre las células madres y las células hijas (Johnson, 1999). Cdc42p además de ser activada por su GEF Cdc24p, también necesita de proteínas activadoras de GTPasas GAPs. En el caso de *S. cerevisiae* se conocen 6 GAPs: Rga1p, Rga2p, Bem2p, Bem3p, Rgd2p, y Lrg1p (Stevenson *et al.*, 1995; Roumanie *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). En cuanto a GDIs, Rdi1 es la única conocida en *S. cerevisiae* (Pérez y Rincón, 2010). Sin embargo, Cdc24p, es la que presenta un papel importante en la activación de Cdc42p, el cual inicia en el proceso de gemación (Park y Bi, 2007; Pérez y Rincón, 2010). Se ha reportado que las mutantes de *S. cerevisiae* con una sobreexpresión de la proteína Cdc24p presentan fenotipos similares a mutantes de Cdc42p

(Ziman y Johnson, 1994). Sloat *et al.*, en 1981 señalaron que dichas mutantes manifiestan un ligero defecto en la selección del lugar de gemación. Durante el ciclo celular, específicamente en la fase tardía G_1 del ciclo celular, Cdc24p es secuestrada en el núcleo por interacción con la proteína adaptadora Far1p (Shimada *et al.*, 2000). Far1p es fosforilada por el complejo ciclina G_1 /cinasa Cdc28p, el cual dispara rápidamente la degradación de Far1p, lo que permite que Cdc24p sea liberada del núcleo y exportada al citoplasma (Henchoz *et al.*, 1997; Toenjes *et al.*, 1999; Nern y Arkowitz, 1999; Shimada *et al.*, 2000). No obstante, cuando Cdc24p es liberado del núcleo, es reclutado por la GTPasa Rsr1p, también conocida como Bud1p (Zheng *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 2000), el cual reside en conjunto con su GEF Bud5p y su GAP Bud2p en el sitio de gemación. Se ha demostrado que Rsr1p además de interactuar con Cdc24p, también interactúa con Cdc42p (Kozminski *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2010). Se asume que al mismo tiempo, Bem2p, Bem3p y posiblemente otras GAPs específicas para Cdc42p, restringen la actividad de Cdc42 durante la fase G_1 hasta su inactivación por el complejo ciclina G_1 /cinasa Cdc28p (Knaus *et al.*, 2007). No obstante, Cdc24p no solo localiza en el núcleo, sino que una vez que es liberada al citoplasma y reclutada por Rsr1p, Cdc24p puede localizarse en los sitios de crecimiento polarizado. En el caso de las células sin gemar, Cdc24p es localizada en forma de parche en la membrana celular, así mismo, esa localización permanece en células con pequeños brotes de gemación, orientándose al ápice de la gema en forma creciente (Nern y Arkowitz, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2000) y cuando las células en gemación son simétricas a las células madres, la localización sigue permaneciendo en forma creciente pero de manera más amplia; finalmente durante la citocinesis, Cdc24p desaparece de la membrana, localizándose en el septo entre la célula madre y la célula hija (Nern y Arkowitz, 1999).

Una vez que Cdc42p es localizada en los sitios presuntivos de gemación, se organiza el citoesqueleto de actina, las septinas y la secreción polarizada para llevar a cabo el crecimiento polarizado de las células (Pérez y Rincón, 2010). Así que para controlar todos estos procesos, Cdc42p interactúa con una variedad de proteínas efectoras tales como: las

MAP cinasas Ste20, Cla4, Skm1, la formina Bni1, las proteínas Gic (Gic1 y Gic2) y la subunidad del exocisto Sec3 (Pérez y Rincón, 2010).

1.6.2 Cdc42 en *Schizosaccharomyces pombe*

El crecimiento en *S. pombe* es muy peculiar. Sus unidades celulares tienen forma cilíndrica, la cual es mantenida por un crecimiento apical y se dividen por la formación de un septo en la zona media de la célula (Pérez y Rincón, 2010). Este evento morfogenético es altamente acoplado al ciclo celular, así que durante la fase G₁, las células crecen de manera monopolar, es decir, que crecen a partir de uno de los extremos o polo heredado de la célula madre (polo antiguo) (Chang, 2001; Hayles y Nurse, 2001). Al inicio de la fase G₂ cuando las células alcanzan un tamaño crítico, el crecimiento del polo originado como consecuencia de la división anterior es activado nuevamente (polo nuevo), y a este proceso se le conoce como NETO (por sus siglas en inglés: new end take off) lo cual produce un crecimiento bipolar (Hayles y Nurse, 2001). Posteriormente las células entran en mitosis y el crecimiento termina para dar lugar a la división nuclear y empezar a dividirse mediante fisión en la zona media de la célula generando un anillo contráctil, para producir dos células hijas de tamaños iguales (Pérez y Rincón, 2010). Es por ello que en *S. pombe* a diferencia de *S. cerevisiae*, los microtúbulos del citoesqueleto juegan un papel importante en definir el sitio de crecimiento polarizado (Castagnetti *et al.*, 2007; Martin, 2009), donde Cdc42 juega un papel importante durante este proceso.

En *S. pombe*, el módulo Cdc42 se compone de la misma GTPasa Cdc42, que es controlada por dos proteínas GEFs que corresponden a Scd1 o Ral1 (Chang *et al.*, 1994; Fukui y Yamamoto, 1998) y Gef1 (Coll *et al.*, 2003); así mismo, es regulada por una sola proteína GAP, Rga4 (Tatebe *et al.*, 2008). En el caso del GEF, Scd1, contraparte de Cdc24p en *S. cerevisiae* es el principal GEF que controla la actividad de Cdc42 en la polaridad celular, mientras que el GEF Gef1, juega un papel importante en el proceso NETO y en la citocinesis (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003). Por otra parte, el establecimiento de la polaridad celular en *S. pombe* difiere considerablemente del que presenta *S. cerevisiae*, en

el cual Bud1p/Rsr1p conecta la señal para Cdc42p. *S. pombe*, contiene un ortólogo de Bud1p/Rsr1p, llamado Ras1, que tiene un papel importante durante el apareamiento y durante el crecimiento vegetativo (Fukui *et al.*, 1986; Papadaki *et al.*, 2002). Se cree que Ras1 en conjunto con la proteína de andamiaje Scd2 mejora la interacción de la RhoGEF Scd1 y Cdc42 en los sitios de crecimiento activo (Chang *et al.*, 1994). No obstante, Scd2 que corresponde al homólogo de Bem1p en *S. cerevisiae*, estimula la interacción de Scd1 con Ras1 y Cdc42 (Chang *et al.*, 1994). Scd2 se une a Cdc42 cuando se encuentra en estado GTP por lo que facilita su interacción con un efector denominado Shk1 (Endo *et al.*, 2003).

1.7 Las Rho GTPasas y su papel en el crecimiento de hongos filamentosos

1.7.1 Papel del módulo CDC-42, RAC, CDC-24 en hongos filamentosos

En hongos filamentosos como es el caso del ascomiceto *Aspergillus nidulans*, se ha reportado que Cdc42 (ModA) se localiza en los ápices celulares de las hifas en forma de media-luna, sugiriéndose que Cdc42 es la que desempeña un papel más importante durante la morfogénesis hifal de *A. nidulans* (Virag *et al.*, 2007). Otra de las funciones de Cdc42 en este organismo, es que además de ser la responsable de mantener la elongación de las hifas, también regula la polarización del proceso de formación de ramificaciones laterales (Virag *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha propuesto que Cdc42 y Rac (RacA) tienen una función compartida durante el establecimiento del eje de polaridad, ya que en *A. nidulans* la cepa doble mutante es sintéticamente letal. Mutantes simples de *Acdc42* pueden establecer hifas con polaridad, sin embargo, las hifas se observan defectuosas y exhiben un pronunciado retraso en la formación de ramificaciones, así como defectos en la formación de conidióforos. En la mutante *Arac*, también se observan defectos severos en el establecimiento de la polaridad y en la formación de conidióforos (Virag *et al.*, 2007). En el caso de *A. niger* RacA muestra mayor importancia que Cdc42 (CftA). RacA, en este organismo, se localiza en la membrana plasmática de los ápices celulares de hifas en crecimiento en forma de creciente. RacA en *A. niger*, también regula la polimerización de actina y el crecimiento hifal, específicamente mantiene el establecimiento de la polaridad, mientras que Cdc42 (CftA) es una proteína indispensable pero no muestra la misma función

que RacA (Kwon *et al.*, 2011). La mutante sencilla de RacA, presentó colonias compactas, defectos en la distribución de actina, ramificaciones dicotómicas y formación de conidióforos afectada (Kwon *et al.*, 2011). Por otra parte, la mutante sencilla de $\Delta cftA$ mostró un crecimiento medianamente perturbado con formación del tubo germinativo reducida y morfología hifal no afectada, lo cual llevó a sugerir que CftA aparentemente no tiene un papel importante en la morfogénesis hifal de *A. niger*. Finalmente la cepa doble mutante de RacA y CftA en *A. niger* es letal (Kwon *et al.*, 2011). En *A. fumigatus* $\Delta racA$ hubo pérdida de la polaridad y presentó defectos morfológicos significativos, incluyendo una tasa de crecimiento reducida así como una conidiogénesis anormal (Li *et al.*, 2011).

En el hongo dimórfico *Candida albicans*, Cdc42 se localizó en la membrana plasmática de los ápices de las yemas en crecimiento y en los ápices de las pseudohifas en crecimiento, y también en los septos en ambas formas de crecimiento (Hazan y Liu, 2002), y se determinó que es requerido para la proliferación y morfogénesis celular (Ushinsky *et al.*, 2002). Similarmente, Rac1 es localizada en la membrana plasmática durante la forma levaduriforme y en la forma filamentosa (Bassilana y Arkowitz, 2006). Análisis realizados mediante la técnica de recuperación de fluorescencia posterior al fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés) en Rac1 y Cdc42 muestran que Rac1 tiene una dinámica diferente en la membrana plasmática que Cdc42 (Bassilana y Arkowitz, 2006). No obstante, recientemente se ha identificado que Rac1 en *C. albicans* además de estar presente en la membrana plasmática, también se acumula en el núcleo (Vauchelles *et al.*, 2010). Se ha determinado en *C. albicans* que Rdi1 (CaRdi1) actúa como un RhoGDI para Cdc42, donde posiblemente CaRdi1 remueve Cdc42 de la membrana para asegurar que en la punta solo quede Cdc42 activo (Court y Sudbery, 2007).

En *Penicillium marneffei* Cdc42 es denominada CflA y es considerada como una proteína esencial. En cepas que expresan alelos dominantes negativos de *cflA* se sugiere que CflA está involucrada, en su fase filamentosa, en iniciar un crecimiento polarizado, mantener la extensión del tubo germinativo y subsecuentemente en mantener el crecimiento del micelio vegetativo (Boyce *et al.*, 2001). En su fase de levadura CflA, además de ser requerida para la polarización, se requiere para la separación celular y determinación de la forma correcta

de las células (Boyce *et al.*, 2001). Por otra parte, Rac denominada en *P. marneffei* como CflB, se localiza en la membrana plasmática de los ápices de las hifas vegetativas, así como en septos, colocalizando con la actina en los sitios de inicio a la formación del septo, por lo que se sugiere que CflB es requerido para la correcta localización de actina en hifas vegetativas crecidas a 25°C (Boyce *et al.*, 2003); sin embargo, cuando *P. marneffei* crece en forma levaduriforme (37°) la proteína CflB se localiza en la periferia celular y en septos. Otra de las funciones encontradas en CflB en *P. marneffei*, es que es requerida para la morfogénesis de los conidióforos durante la reproducción asexual (Boyce *et al.*, 2003). La cepa mutante de *cflB* en este organismo es viable, sin embargo exhibe pérdida de un crecimiento polarizado, de un inapropiado proceso de septación, anomalías en la localización de actina y ausencia de conidióforos definidos (sin métula, fiálides o conidios definidos) (Boyce *et al.*, 2003).

En *Paracoccidioides brasiliensis*, el agente etiológico de la paracoccidioidomicosis, la proteína Cdc42 (PbCdc42p) juega un papel importante durante la morfogénesis y virulencia (Almeida *et al.*, 2009). *Cryptococcus neoformans* presenta dos parálogos funcionales de Cdc42: Cdc42 y Cdc420 (Ballou *et al.*, 2010). Las mutantes simples $\Delta cdc42$ y $\Delta cdc420$ presentaron distintos fenotipos sin ser defectuosas en la polimerización de actina. La doble mutante $\Delta cdc42 \Delta cdc420$ mostró defectos morfológicos, como incremento en el tamaño celular, yemas anormales y fallas en completar la citocinesis, y también presentó defectos en la polimerización de actina (Ballou *et al.*, 2010). La eliminación de Rac1 en *C. neoformans* resultó en hifas alteradas y afectó el apareamiento (Vallim *et al.*, 2005). Por otra parte, el análisis de CDC42 en el hongo *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* mostró no ser una proteína esencial para la viabilidad celular (Ye y Szaniszló, 2000).

En hongos fitopatógenos como es el caso de *Colletotrichum trifolii* la expresión dominante negativa de Cdc42 (CtCdc42) afectó la germinación de esporas, ramificaciones y la morfología de las hifas; por otra parte, la expresión dominante activa de CtCdc42 condujo al crecimiento de hifas con morfologías aberrantes (Chen *et al.*, 2006). En *Claviceps purpurea* CpCDC42 ejerció un control accesorio en la formación de ramificaciones,

mientras que las mutantes *ΔCpcdc42* mostraron fenotipos drásticos formando hifas con ramificaciones abultadas, además fueron cepas no patógenas ya que no indujeron síntomas de enfermedad (Sheffer *et al.*, 2005). Sin embargo las mutantes de *C. purpurea* carentes de Rac1 mostraron colonias en forma de coral con hiper-ramificaciones, pérdida de la polaridad y de esporulación, y sin habilidad para penetrar en las plantas (Rolke y Tudzynski, 2008). En *Magnaporthe grisea* Rac es denominado como MgRac1, esta proteína resultó ser esencial en el proceso de la conidiogénesis, desarrollo del apresorio e indispensable en la formación de septos. Por otra parte, las mutante de *Mgrac1* fueron cepas no patógenas ya que fueron defectuosas en la producción de conidios así como de apresorios (Chen *et al.*, 2008). En *M. grisea*, se ha detectado un efector importante para MgRac1, el cual corresponde a la proteína Chm1, donde se ha visto que Chm1 corrige los defectos de la mutante *Mgrac1* durante la conidiogénesis en términos de morfología y cantidad de conidios, se ha descrito también que Chm1 actúa como un efector para MgCdc42 en *M. grisea* (Chen *et al.*, 2008). Subsecuentemente, Zheng y colaboradores en el 2009, analizaron a MgCdc42, un ortólogo de Cdc42 en *M. grisea*, observaron que esta proteína es requerida para la penetración, infección y virulencia de las plantas de arroz, ya que cepas mutantes de *Mgcdc42* fueron viables e incapaces de penetrar el hospedero y por ende de provocar una infección, así mismo, Cdc42 en *M. grisea* es importante para regular el establecimiento del turgor cuando se desarrolla el apresorio (Zheng *et al.*, 2009). En el hongo endofítico *Epichloë festucae* tanto Cdc24 como RacA son localizados en la membrana de los ápices celulares así como en septos, así mismo se ha sugerido que Cdc24 actúa como GEF para RacA y BemA (Takemoto *et al.*, 2011). Por otra parte, en el hongo micorrízico *Tuber borchii* CDC42 (TbCDC42) juega un papel fundamental en la morfogénesis del hongo ya que TbCDC42 fue detectado principalmente en la región apical de las hifas vegetativas, en las ramificaciones y en los sitios de formación de septos sugiriendo una probable función en la formación del anillo de actina (Menotta *et al.*, 2007). En contraste a la mayoría de los hongos filamentosos, *Ashbya gossypii* pertenece a la familia de los Saccharomycetaceae. Este organismo se caracteriza, al igual que las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, por no contar con un homólogo para RAC (Boyce *et al.*, 2003). En *A. gossypii* la proteína Cdc42 (AgCdc42) y su GEF Cdc24 (AgCdc24) son

consideradas como proteínas esenciales para llevar a cabo tanto un crecimiento polarizado como la polimerización de actina, ya que mutantes carentes de AgCdc42 y AgCdc24 mostraron fenotipos similares a los mostrados por las mutantes de *S. cerevisiae*. Las células mutantes sólo presentaron crecimiento isotrópico, sin capacidad notable de conducir un cambio de crecimiento isotrópico a un crecimiento polarizado, y una deslocalización de actina (Wendland y Philippsen, 2001). Además ambas proteínas, AgCdc42 y AgCdc24, en *A. gossypii* se encontraron en forma de capucha en el ápice celular (Köhli *et al.*, 2008).

En el hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica* YIRac1p marcada con epítopes se ha detectado en las puntas de células filamentosas (Hurtado *et al.*, 2000). Aunque la eliminación de *YIRAC1* no es letal, si se afecta la morfología celular de la levadura y suprime totalmente el crecimiento de las hifas, a pesar de que la polimerización de actina se observa inalterada (Hurtado *et al.*, 2000). Un caso similar, aunque con un fenotipo más severo es el que presenta la mutante PAK cinasa YICla4 y el cual podría ser un efector de YIRac1p en *Y. lipolytica* (Szabo, 2001), sin embargo está hipótesis aun no se ha probado, así como tampoco el papel que podría desempeñar Cdc42 en *Y. lipolytica* (Hurtado *et al.*, 2000).

Finalmente, en el basidiomiceto *Ustilago maydis*, el papel que desempeña Cdc42 y Rac no afecta la viabilidad del hongo, pero muestran fenotipos distintos. Mutantes sencillas de *cdc42* no presentan una morfología celular afectada, pero si muestran defectos durante la citocinesis, formando células agrupadas en forma de árbol, conectadas por un solo septo lo que evita la separación celular, mientras que la mutante sencilla de *rac1* si puede dividirse pero las células son incapaces de formar filamentos (Mahlert *et al.*, 2006). En *U. maydis* Don1 actúa como un activador GEF para Cdc42, las cuales, son esenciales para la formación del septo secundario así como la cinasa Don3, cuya proteína también es requerido para llevar a cabo la citocinesis (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006; Böhmer *et al.*, 2008) ya que mutantes carentes de *don1*, *cdc42* y *don3* interfieren con la separación celular dando como resultado la formación de células agrupadas que son conectadas solamente por el septo primario (Weinzierl *et al.*, 2002; Sandrock *et al.*, 2006). Por otra parte, en *U. maydis* Cdc24 se localiza en las puntas de las células en crecimiento e induce a la filamentación (Hlubek *et al.*, 2008), no obstante Cdc42 es quien marca el sitio

de gemación en *U. maydis* y organiza el ensamblaje del anillo de septinas en cual define el septo entre la célula madre y la célula hija (Longtine y Bi, 2003).

En el caso del hongo *Neurospora crassa*, Richthammer, (2011) ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que la proteína CDC-24 actúa como un GEF para CDC-42 y RAC. Así mismo, se encontró un posible segundo GEF (NCU10282) homólogo a Gef1 para CDC-42 y RAC, sin embargo no muestra una actividad tan eficiente como CDC-24 (Richthammer, 2011). Sin embargo, la función y la localización de las proteínas que constituyen el módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 en *N. crassa* antes de este trabajo eran desconocidas. Para ello se analizaron mutantes sencillas, dobles mutantes y mutantes condicionales, así como también se llevó a cabo la localización de cada uno de los componentes del módulo CDC-42. Se encontró que cada uno de los componentes se encuentran asociados a membrana plasmática, pero presentan diferentes patrones de localización tanto en hifas maduras como en germínulas. También se observó que cada componente del módulo participa en otros procesos de la morfogénesis celular.

1.8 Papel del módulo Bud1 - Bud2 - Bud5 en el establecimiento de la polaridad celular de hongos

El mantenimiento y la determinación de la forma de una célula es un prerrequisito fundamental para el desarrollo en cualquier organismo desde bacterias hasta vertebrados (Nelson, 2003). Los hongos filamentosos en particular, se caracterizan por un crecimiento altamente polarizado (Momany 2002; Wendland y Walther 2005) lo que les ha permitido explorar y colonizar nuevos sustratos (Pringle y Taylor, 2002; Magan 2007; Morris et al., 2007; Harris y Momany, 2004). En estos organismos, el establecimiento de la polaridad celular ocurre en dos puntos distintos: primero, con el surgimiento de un tubo germinativo primario a partir de una espóra y segundo, por la emergencia de una ramificación a partir de una hifa establecida (Harris y Momany, 2004). El establecimiento de la polaridad celular, requiere de sitios específicos definidos y del reclutamiento de la maquinaria morfogénica. Una vez establecidos los puntos de polarización, éstos deben mantenerse durante la

extensión de las hifas, las cuales dependen principalmente de la localización de la maquinaria morfogenética en las puntas de los ápices en crecimiento (Harris y Momany, 2004). Por mucho tiempo se ha tratado de comprender esta forma peculiar de crecimiento, donde características únicas como son la organización del crecimiento polarizado así como la capacidad de mantener múltiples ejes de polarización, implican la existencia de formas de regulación extraordinarias (Harris y Momany, 2004). Dentro de estas formas de regulación se ven involucrados factores moleculares y bioquímicos que determinan y modulan la polaridad celular (Figura 4.1), los cuales han sido sujeto a extensas investigaciones en una variedad de sistemas fúngicos modelos (Drubin y Nelson, 1996; Wendland y Philippsen, 2001; Nelson, 2003; Borkovich et al., 2004; Harris, 2006). A pesar del considerable interés que se ha manifestado en los mecanismos que subyacen en el establecimiento de la polaridad celular, este proceso especializado sigue siendo poco comprendido en hongos filamentosos. En el organismo modelo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6), se han llevado a cabo análisis genéticos, moleculares y bioquímicos para entender la especificación de un sitio de polarización en hongos. Estos estudios han proporcionado evidencia suficiente para elucidar como se lleva a cabo la selección específica de nuevos ejes de polarización. En estos organismos, se han descrito un gran número de marcadores corticales específicos los cuales se asocian con la membrana plasmática, así como un amplio número de complejos proteicos requeridos para producir patrones específicos de crecimiento (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Fujita et al., 1994; Halme et al., 1996; Roemer et al., 1996; Zahner et al., 1996). Dentro de estos marcadores específicos se encuentra el módulo constituido por RSR1/BUD1, BUD2 y BUD5, el cual es considerado como el complejo proteico encargado de iniciar la señalización del sitio de selección de polarización (Chant y Pringle, 1995) y cuyo análisis no se ha llevado a cabo en hongos filamentosos.

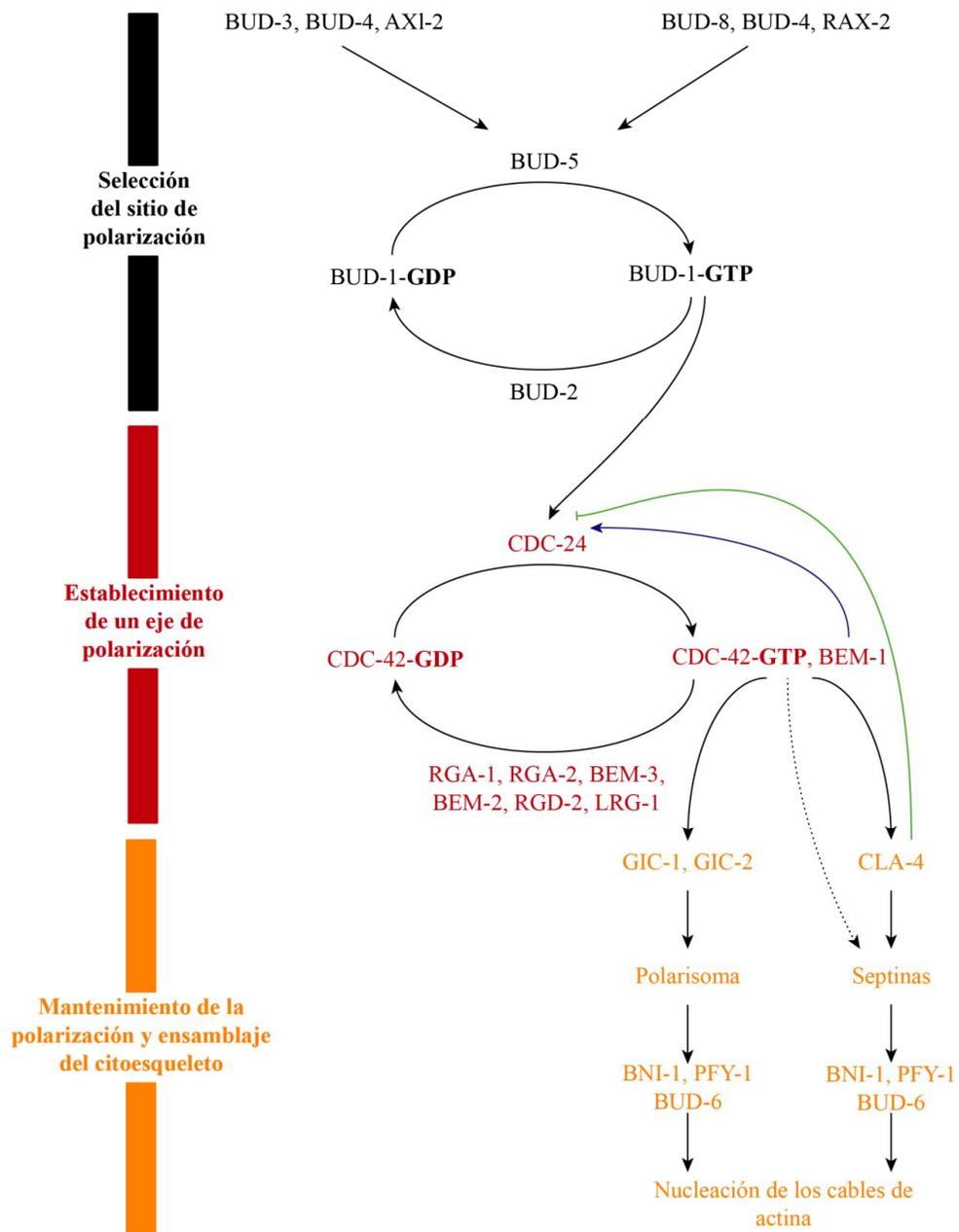


Figura 6. Representación esquemática de la ruta de señalización que conduce al establecimiento de la polarización en *Saccharomyces cerevisiae*. Modo de activación del proceso de polarización en levaduras donde reguladores río arriba desencadenan una cascada de señalización para activar la maquinaria morfogénica. Líneas continuas, indican la interacción física de las proteínas; líneas discontinuas, marca una interacción no directa; Línea azul, muestra la existencia de una retroalimentación positiva estabilizando a CDC-24; Línea verde, señala la inactivación de CDC-24 por fosforilación inducida por CLA-4. Tomado y modificado de Pruyne *et al.*, 2004.

En *S. cerevisiae* se han identificado un gran número de genes que son necesarios para un proceso de gemación correcto. Estos genes son denominados sitios de selección de gemación, los cuales han sido divididos dentro de tres módulos distintos basados en sus requerimientos durante la diferenciación celular en levaduras. El primer módulo, incluye a *BUD3*, *BUD4*, *AXL1* y *AXL2/BUD10*, los cuales son requeridos en las células haploides (**a** y **α**) y no en células diploides (**a/a**). Sin embargo, análisis genéticos sugieren que los productos de estos genes deben proveer los marcadores corticales para la emergencia axial, debido a que mutaciones en estos genes específicamente, afectan al tipo axial (Chant y Herskowitz, 1991; Fujita *et al.*, 1994; Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996). El segundo módulo, incluye a *BUD7*, *BUD8* y *BUD9*, estos genes son requeridos específicamente en células diploides. Se ha visto que mutaciones en cualquiera de estos genes causan una forma aleatoria del tipo de gemación en las células diploides, pero no afectan el tipo de gemación axial en las células haploides (Snyder, 1989; Valtz y Herskowitz, 1996; Zahner *et al.*, 1996). Finalmente, el tercer módulo incluye a los genes *BUD1* (también conocido como *RSR1*), *BUD2* y *BUD5*, los cuales son requeridos para la selección del sitio de gemación, el cual es considerado como el sitio general de la maquinaria de selección de polarización (Chant y Pringle, 1995) y cuyo análisis no se ha llevado a cabo en hongos filamentosos.

Se ha observado que una mutación en cualquiera de estos genes hace que las células exhiban un tipo de gemación aleatoria tanto en células diploides como en células haploides (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Chant *et al.*, 1991). Se ha propuesto que Bud1p, Bud2p y Bud5p funcionan como una maquinaria general para la selección del sitio de gemación, brindando proteínas requeridas para la formación de la yema (Park *et al.*, 1997). También se ha sugerido, que las proteínas Bud1p, Bud2p y Bud5p constituyen un módulo de GTPasas funcionales -una GTPasa y sus proteínas reguladoras- que es necesario para la selección de la gemación y que un componente de este módulo tal vez interactúa con componentes axiales o bipolares específicos para el establecimiento de la gemación (Park *et al.*, 1999).

1.9 Descripción general del módulo Bud1 – Bud2 – Bud5

Cada uno de los componentes que constituye al módulo Bud1p, Bud2p, Bud5p, pertenecen a una familia de proteínas altamente conservada (Bender y Pringle, 1989; Chant *et al.*, 1991; Chant y Herskowitz, 1991; Park *et al.*, 1993). Bud1p también conocido como Rsr1p pertenece a la familia de las GTPasas (Bender y Pringle, 1989). Se ha descrito que la región presumiblemente efectora de Rsr1p es idéntica a las proteínas Ras (Bender y Pringle, 1989), el cual es necesario para realizar su interacción con proteínas blanco río abajo, como es el caso de Cdc24p (Park *et al.*, 1997) (Figura 6-7). Otro componente importante de este módulo de GTPasas es la proteína Bud2p, la cual codifica para una proteína de activación GTPasa (GAP) para Bud1p, el polipéptido de Bud2p es de 1,104 aminoácidos en levaduras, contiene un dominio similar al dominio que presentan las proteínas Ras GAP (Park *et al.*, 1993). Bud2p desactiva a Rsr1p por hidrólisis de GTP y de esta manera Bud2p actúa como una GAP para Bud1p (Park *et al.*, 1993; Bender, 1993; Park *et al.*, 1996). En cambio, Bud5p es una proteína de 608 aminoácidos en levaduras (Kang *et al.*, 2004), contiene dos dominios Ras, un dominio RasGEF-N que se considera similar al dominio GEF (factor de intercambio GDP-GTP) de las familias de las Ras GTPasas (Chant *et al.*, 1991; Powers *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 2004) por lo que le permite a Bud5p actuar como un factor de intercambio de guanosinas (GEF) para Bud1p (Bender, 1993; Zheng *et al.*, 1995), y el segundo un dominio RasGEF se localiza cerca del C-terminal. En general, la GTPasa Rsr1p, la GAP Bud2p y la GEF Bud5p constituyen un módulo GTPasa funcional que en conjunto organizan la maquinaria morfológica hacia los sitios de crecimiento (Park *et al.*, 1993; Seiler y Justa-Schuch, 2010). Al parecer este módulo Bud1p, Bud2p, Bud5p es importante para determinar los sitios de polarización por lo que se ha propuesto un modelo de interacción entre el módulo Rsr1p con el módulo Cdc42p (Kozminski *et al.*, 2003). Bud5p, el cual se localiza en los sitios donde se generará un sitio de polarización por interacción con marcadores corticales (Kang *et al.*, 2001), también es la proteína encargada de realizar la conversión de GTP-GDP para Rsr1p (Figura 7 paso 1). Se ha sugerido que una vez activo, Rsr1p-GTP se asocia a Cdc24p y Cdc42p respectivamente, para guiar a estas proteínas hacia los sitios de polarización donde Bud2p se localiza (Figura 7 paso 2) (Park *et al.*, 1999). Se ha propuesto que la asociación de Rsr1p-GTP con Cdc24p mejora la

interacción entre Rsr1p-GTP y Cdc42p-GDP (Kozminski *et al.*, 2003). Bud1p-GTP es convertido a Bud1p-GDP a través de la acción hidrolítica que su GAP, Bud2p genera (Park *et al.*, 1993). Esto a su vez provoca que Rsr1p se disocie de Cdc24p (Figura 7 paso 3) (Park y Bi, 2007). Posteriormente Cdc24p al ser disociada de Rsr1p, cataliza la conversión de Cdc42p-GDP a Cdc42p-GTP (Figura 7 paso 4) (Kozminski *et al.*, 2003). Se ha sugerido que Bem1p, puede unirse y mantener al complejo ensamblado en los sitios presuntivos de polarización a través de la interacción con Cdc42p-GTP (Butty *et al.*, 2002) o con Bud1p-GDP (Park *et al.*, 1997). Alternativamente, la activación de Cdc24p sin una estimulación de su actividad GEF, puede interaccionar con Rsr1p (Zheng *et al.*, 1995). Por otra parte, la conversión de Rsr1p-GDP a Rsr1p-GTP por Bud5p, permite el reciclado de Rsr1p y además el reciclado de Cdc24p, Cdc42p y Bem1p en los sitios de polarización (Kozminski *et al.*, 2003).

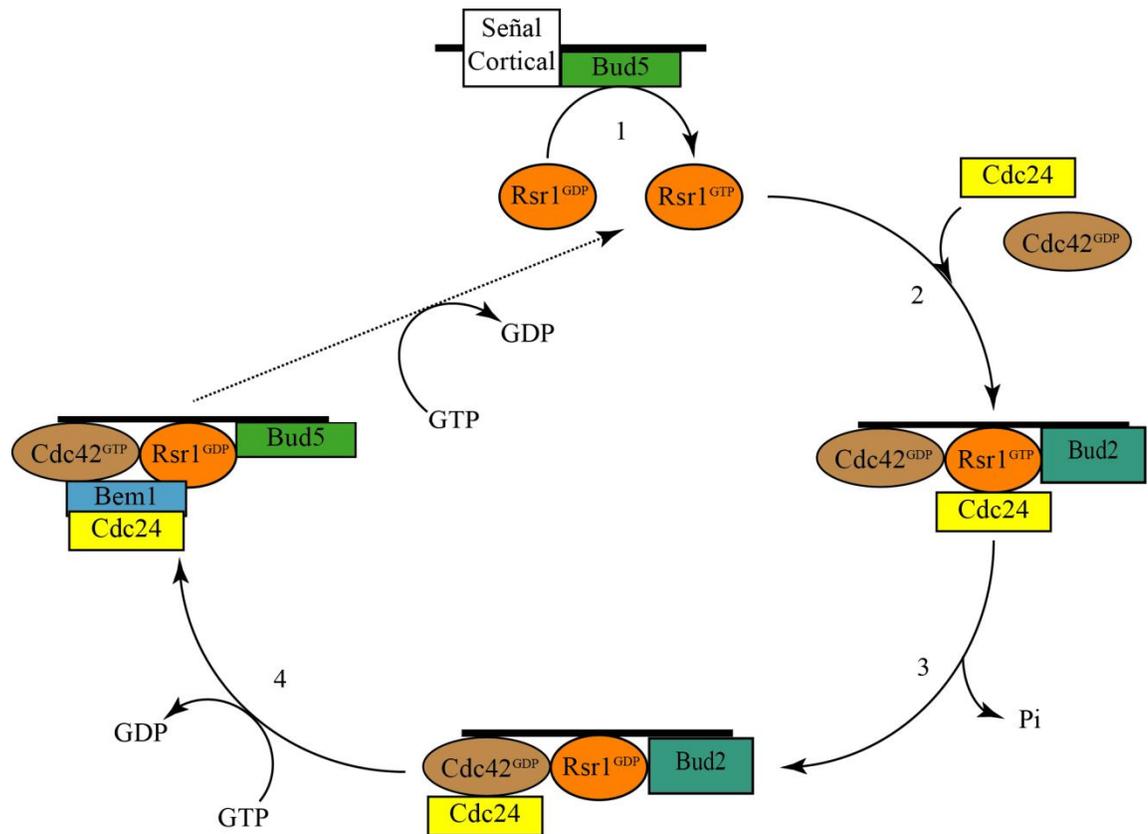


Figura 7. Representación esquemática del modelo de interacción del módulo Rsr1/Bud1 con el módulo Cdc42. La GTPasa Rsr1/Bud1 dirige el establecimiento de la polaridad en un sitio específico. Paso 1, Bud5 cataliza el cambio de GDP-GTP en Rsr1. Paso 2, Rsr1-GTP se asocia a Cdc24 y Cdc42 guiándolas a los sitios presuntivos de polarización. Paso 3, Bud2 inactiva a Rsr1 llevándola a un estado GDP. Paso 4, disociación de Rsr1 de Cdc24, la cual cataliza el cambio de GDP a GTP en Cdc42 por lo que dispara un crecimiento polarizado. Línea punteada, indica otro ciclo de la señal de transducción que Bud5 genera al activar a Rsr1/bud1-GTP. Tomado y modificado de Kozminski *et al.*, 2003.

1.10 Localización general del módulo Bud1 – Bud2 – Bud5 en células fúngicas

La secuenciación de múltiples genomas de hongos filamentosos, ha permitido analizar la participación de homólogos de genes en levaduras en muchos aspectos en la morfogénesis fúngica. Se ha revelado que diversos genes involucrados en la maquinaria de la selección de los sitios de gemación en *S. cerevisiae* pueden estar presentes en *Aspergillus* sp. y *N. crassa* (Galagan *et al.*, 2003; 2005; Borkovich *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2009). Aunque, la presencia de un módulo de señalización homóloga de Rsr1p-Bud2p-Bud5p en hongos filamentosos aún es cuestionable (Seiler y Justa-Schuch, 2010), en la levadura *S. cerevisiae* este módulo de gran relevancia para la selección de los sitios de gemación ha sido ampliamente analizado. En *S. cerevisiae* el análisis de fenotipos mutantes de Rsr1p no es letal, pero los fenotipos *rsr1*^{G12V} o *rsr1*^{K16N} conducen a un patrón de gemación aleatorio (Ruggieri *et al.*, 1992). Así mismo las mutantes *BUD2* y *BUD5* generan un patrón aleatorio de gemación (Chant *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1993). La localización del módulo Rsr1p, Bud2p y Bud5p, ha sugerido ser el protagonista de establecer los sitios putativos de gemación. Rsr1p al ser una GTPasa, se fusionó con la proteína verde fluorescente en el extremo N- terminal, por lo que su localización resultó en la membrana plasmática que posteriormente se concentró en los sitios de crecimiento polarizado, primero en los sitios de gemación, en el ápice de la yema y después en el cuello entre la célula madre y de la célula hija (Park *et al.*, 2002). Rsr1p además de localizarse en los sitios de polarización y en membrana plasmática, también se visualizó en las membranas de organelos internos, particularmente en la membrana de las vacuolas (Park *et al.*, 2002). No obstante, experimentos de fraccionamiento celular, indican que Rsr1p resulta consistente con su patrón de localización (Park *et al.*, 1997) ya que su localización en membrana y en los sitios de crecimiento polarizado requiere del motivo CAAX y de residuos de polilisina cerca del extremo C-terminal (Park *et al.*, 2002). Se ha analizado que el reemplazamiento de la cisteína Cys269 por serina (Ser) en el motivo CAAX evita toda asociación con membrana plasmática, mientras que el reemplazamiento de todos los residuos de lisina (Lys) dentro de las posiciones 260 a la 264 con serina, interrumpe la localización de Rsr1p en la membrana plasmática y en los sitios de crecimiento polarizado (Park *et al.*, 2002). Dado que la mutación de Rsr1p/Bud1p causa sitios de gemación azarosa (Park *et al.*, 2002) y la

localización de Rsr1p en la membrana plasmática así como en los sitios de crecimiento polarizado son necesarios para llevar a cabo su función de seleccionar los sitios de gemación, la localización de Rsr1p en membranas de organelos no es suficiente para llevar a cabo dicha función, por lo que se ha sugerido una función desconocida de Rsr1p/Bud1p en membranas de organelos (Park y Bi, 2007). Del mismo modo se ha propuesto que la localización en membranas de organelos es el reflejo de una localización intermedia durante su liberación hacia la membrana plasmática (Park y Bi, 2007). Por otra parte, se ha establecido que la localización de Bud2p en levaduras es en forma de parches en el sitio incipiente del sitio de gemación durante la fase tardía de la etapa G₁ del ciclo celular: un sitio de gemación axial en células haploides o en el polo proximal o distal de células diploides (Park *et al.*, 1999). Bud2p también se ha visto localizada en el septo del cuello entre la célula madre y la célula hija después de la emergencia de la yema, posteriormente es localizada alrededor de toda las células en la fase G₂/M del ciclo celular (Marston *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1999). En células haploides, Bud5p se localiza en los sitios putativos de gemación en la fase G₁ del ciclo celular, en los ápices de aquellas células que se encuentran en gemación y en el septo que se genera entre la célula madre y la célula hija en la fase G₂/M. Durante la fase M, Bud5p-GFP aparece como un anillo doble en el septo, lo que se divide en dos anillos individuales sobre la separación entre la célula madre y la célula hija, conduciendo a que cada célula madre e hija hereden un solo anillo, así la mayoría de las células de fase G₁ recién nacidas tienen el anillo Bud5p en el lugar donde ocurrió la división (Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001). Se ha sugerido que el patrón de localización que presenta Bud5p en levaduras es muy similar al patrón de localización que presenta Axl2p, el cual es requerido para el patrón de gemación axial (Fujita *et al.*, 1994; Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996). En células diploides, Bud5p-GFP muestra distintos patrones de localización, especialmente durante las fases G₁ y M. No obstante, antes de la emergencia de la yema, Bud5p-GFP se localiza en ambos polos de la célula como un anillo en uno de los polos, que acentúa la marca de la división celular anterior y en forma de un parche en el polo opuesto, que posteriormente se convierte un nuevo sitio de gemación (Marston *et al.*, 2001). Después de la emergencia de la yema, Bud5p-GFP se localiza a lo largo de la periferia de la yema, como se observa en células haploides. En una

etapa posterior del ciclo celular, Bud5p-GFP se localiza en el septo del cuello de la célula madre y en el ápice del extremo opuesto de uno de los polos, mientras que un pequeño porcentaje de las células muestran una señal de Bud5p-GFP en el septo del cuello solamente (Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001). En general, estos patrones específicos de localización tanto de Bud2p y Bud5p son importantes para la selección del propio sitio de gemación, puesto que una sobreexpresión de Bud2p o Bud5p da como resultado una deslocalización de cada una de las proteínas causando gemaciones aleatorias (Kang *et al.*, 2001). Algunos alelos de *BUD5* interfieren en la propia localización de Bud5p, sólo que en células diploides se muestran defectuosas en el patrón de gemación bipolar (Kang *et al.*, 2001). Por otra parte, la deslocalización de Bud5p en mutantes carentes de otros genes *BUD*, sugiere que Bud5p localiza en sitios específicos en cada célula de acuerdo al ciclo celular por lo que se sugiere una interacción con proteínas blanco que mandan una señal tipo-específica (Kang *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2004).

En el caso de hongos filamentosos como el ascomiceto *N. crassa*, la función y la localización del módulo RSR-1/BUD-1 – BUD-2 – BUD-5 no se conoce, es por ello que el análisis de componentes moleculares involucrados en el crecimiento polarizado nos permitirá obtener información clave que contribuirá en el entendimiento de la biología que presentan estos organismos. Específicamente, en el presente capítulo se analizaron los homólogos de las proteínas Bud2p y Bud5p de *S. cerevisiae*, las cuales en este organismo son componentes integrales del módulo Rsr1p cuyo papel está involucrado en llevar a cabo la selección de los sitios de gemación. No obstante, en *N. crassa* BUD-5 y BUD-2 presentan distintos patrones de localización tanto en hifas maduras como en germínulas, así mismo participan en diferentes procesos morfológicos esenciales para el desarrollo exitoso del hongo.

2. Justificación

La importancia de este trabajo es incrementar el conocimiento acerca del proceso de la polarización celular con el fin de entender el crecimiento apical y morfogénesis de los hongos filamentosos, ya que dentro de este grupo de organismos se encuentran representados los patógenos más devastadores de cultivos agrícolas y algunas especies representan una amenaza para la vida en pacientes inmunodeprimidos. En este trabajo se utilizó como organismo modelo al hongo filamentoso *N. crassa* para elucidar cuales son las proteínas requeridas para iniciar el proceso de polarización celular. Dentro de las proteínas descritas para desencadenar este proceso están las Rho GTPasas CDC-42 y RAC y el GEF CDC-24. Por lo tanto se evalúa el papel que juegan estas proteínas en el establecimiento de la polaridad en las células de *N. crassa*. También se determina si la función de la Rho GTPasa CDC-42 es dependiente de su asociación a membrana plasmática, y si la localización de la GEF CDC-24 en los sitios de crecimiento polarizado depende de que su extremo carboxilo esté intacto. Por otra parte, en levaduras se ha descrito que el módulo constituido por Rsr1p/Bud1p, Bud2p y Bud5p participa en el inicio del crecimiento polarizado. Sin embargo en hongos filamentosos el papel de estas proteínas no ha sido determinado, de tal manera que en *N. crassa* se describe la expresión espacio-temporal de las proteínas BUD-2 y BUD-5 para tratar de elucidar el papel que desempeñan en el crecimiento y en la morfogénesis fúngica. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento general de la biología celular de los hongos.

3. Hipótesis

Mediante técnicas de marcaje molecular y análisis de cepas mutantes se determinará que las proteínas que constituyen el módulo CDC-42, RAC y CDC-24 son requeridas para el establecimiento de la polaridad celular del hongo filamentoso *N. crassa* y que una obstrucción en el motivo CAAX de la GTPasa CDC-42, afectará la localización intracelular y la función de esta proteína. Así mismo, se comprobará que su activador el GEF CDC-24 mostrará alterada su función y localización al ser etiquetado en el extremo C-terminal ya que se afectará el dominio PH el cual media la localización hacia la membrana por la unión de lípidos. Por otro lado, se establecerá que las proteínas BUD-2 y BUD-5 son necesarias para marcar los sitios donde iniciará el proceso de polaridad del hongo.

4. Objetivos

1. Determinar la dinámica celular y localización *in vivo* de las proteínas del módulo CDC-42, RAC y CDC-24 durante la germinación de macroconidios y el crecimiento polarizado de hifas maduras y germínulas del hongo filamentoso *N. crassa*.
2. Determinar la localización y dinámica intracelular de la Rho GTPasa CDC-42 y el GEF CDC-24 y su papel en la morfogénesis en *N. crassa* durante el crecimiento vegetativo de hifas maduras y de germínulas cuando ambas proteínas son etiquetadas en el extremo C-terminal.
3. Determinar la dinámica celular y la localización *in vivo* de las proteínas BUD-5 y BUD-2 durante la germinación de macroconidios y el crecimiento polarizado de hifas maduras y germínulas del hongo filamentoso *N. crassa*.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas de *Neurospora crassa*

Las cepas de *N. crassa* utilizadas en este trabajo se encuentran enlistadas en la tabla I.

Tabla I. Cepas de *N. crassa* utilizadas para este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>wild type</i> mat a	<i>74-OR8-1a</i>	¹ §FGSC #988
<i>mus-51</i> mat A	Δ <i>mus-51::bar⁺; his-3⁻ A</i>	¹ §FGSC #9717
<i>fluffy</i> mat a	<i>fl a</i>	¹ §FGSC #4347
<i>fluffy</i> mat A	<i>fl A</i>	¹ §FGSC #4317
[†] <i>cdc-24(10-19)</i> mat A	<i>cdc-24(F254S) A</i>	[§] Seiler y Plamann, 2003
[†] <i>cdc-24(19-3)</i> mat A	<i>cdc-24(L444S) A</i>	[§] Seiler y Plamann, 2003
[†] <i>cdc-24(24-21)</i> mat A	<i>cdc-24(Q264R) A</i>	[§] Seiler y Plamann, 2003
[‡] <i>rac(7-1)</i> mat A	<i>rac(G16S) A</i>	² §Richthammer, 2011
[‡] <i>cdc-42(18-4)</i> mat a	<i>cdc-42(D16N, L22P, A161T, D172N) a</i>	² §Richthammer, 2011
<i>rac(7-1);cdc-42(18-4)</i>	<i>rac(G16S);cdc-42(D16N, L22P, A161T, D172N)</i>	² §Richthammer, 2011
Δ <i>rac</i> mat a	Δ <i>rac::hph^R a</i>	¹ §FGSC #11525
Δ <i>cdc-42</i> mat a	Δ <i>cdc42::hph^R a</i>	¹ §FGSC #15833
Δ <i>cdc-24</i> mat a	Δ <i>cdc-24::hph^R + cdc-24⁺ a</i>	^{1*} FGSC #11721
<i>yfp-cdc-42</i> mat A	<i>pgpd-yfp-cdc-42::his-3; Δcdc-42::hph^R A</i>	² §Richthammer, 2011
<i>yfp-rac</i> mat A	<i>pgpd-yfp-rac::his-3; Δrac::hph^R A</i>	² §Richthamer, 2011
<i>gfp-cdc-24</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::gfp⁺::cdc-24⁺ A</i>	[§] Este estudio
<i>cdc-42-mCherryfp</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::cdc-42⁺::mchfp⁺ A</i>	[§] Este estudio
<i>cdc-42-gfp</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::cdc-42⁺::gfp⁺ A</i>	[§] Este estudio
<i>cdc-24-mCherryfp</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::cdc-24⁺::mchfp⁺ A</i>	[§] Este estudio
<i>cdc-42-mCherryfp</i> mat a	<i>his-3⁺::Pccg-1::cdc-42⁺::mchfp⁺; Δcdc-42::hph^R a</i>	[§] Este estudio
<i>bud-5-gfp</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::bud-5⁺::gfp⁺ A</i>	[§] Este estudio
<i>bud-2-mcherryfp</i> mat A	<i>his-3⁺::Pccg-1::bud-2⁺::mcherryfp⁺ A</i>	[§] Este estudio

¹Fungal genetics stock center. ²Generada en el laboratorio del Dr. Seiler del Instituto de Microbiología y Genética de la Universidad de Göttingen, Alemania. [§]Homocariones. ^{*}Heterocariones. [†]Apéndice A. [‡]Apéndice B.

5.2 Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada en el presente trabajo fue DH5 α cuyo genotipo es F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r $^-$ _k, m $^+$ _k) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ^- (Invitrogen[®]).

5.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

5.3.1 Medio de cultivo para hongos

Todas las cepas de *N. crassa* fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (MMV), el cual contiene, sales de Vogel 1X (Apéndice C), sacarosa 2% (w/v) y agua destilada (Vogel, 1956). En el caso de medio sólido se utilizó como agente solidificante agar (DIFCO) al 1.5%. En algunos ensayos se utilizó el aminoácido L-histidina (Calbiochem), el cual es un aminoácido básico que permite crecer a la cepa FGSC #9717. Antes de añadir el aminoácido al medio de cultivo se esterilizó por filtración utilizando filtros con membrana de Polietersulfona con poros de 0.2 μ m (Whatman[®]) y se utilizó a una concentración final de 25mg ml $^{-1}$.

Para inducir a la reproducción sexual y así determinar el tipo de apareamiento (mat) de las cepas transformadas se utilizó medio sintético para cruza (MSC) (Westergaard y Mitchell, 1947) que contiene sales para cruza 2X (Apéndice D), sacarosa al 2% (w/v), agar al 2% y agua destilada. Así mismo el MSC se utilizó para obtener homocariontes de las cepas transformadas de *N. crassa*.

Para cultivar las cepas transformadas de *N. crassa* se utilizó medio FGS (Fructosa, Glucosa y Sorbosa) que contiene sales de Vogel 2X, agar al 1% y aditivo FGS 10X (Apéndice E). El aditivo FGS se preparó con sorbosa al 20%, fructosa al 0.5% y glucosa al 0.5%. Todos los componentes del aditivo FGS fueron esterilizados por filtración utilizando filtros de membrana de celulosa-acetato con poro de 0.45 μ m (PRO-XTM). Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave (VWR[®] Accu Sterilizar AS12) a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión.

5.3.2 Medios de cultivo para bacteria Luria-Bertani (LB)

Para el crecimiento de bacterias se utilizó medio Luria-Bertani (LB) en forma líquida y sólida. El medio LB contiene 1% de Bacto-Triptona, 0.5% de Extracto de Levadura, 1% de Cloruro de Sodio (NaCl). Cuando se requirió el medio en forma sólida se agregaron 20g de agar bacteriológico (Agarmex S.A. de C.V.). Finalmente la preparación se esterilizó por autoclave. Si el medio LB tanto en forma sólida como líquida requería de ampicilina, esta se utilizó a una concentración de $100\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para seleccionar las cepas bacterianas transformadas. La ampicilina se esterilizó por medio de filtrado utilizando filtros de membrana de polietersulfona de poros de $0.2\mu\text{m}$ (Whatman[®]), posteriormente se añadió a sus respectivos medios ya esterilizados.

5.3.3 Condiciones de crecimiento

Los inóculos se sembraron utilizando palillos estériles; las cajas se incubaron a 37°C durante 14h. Los cultivos de bacterias para la obtención de plásmidos se realizaron en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C toda la noche en un agitador orbital (LAB-LINE) a 200-250 rpm.

5.4 Ensayos en biología molecular

5.4.1 Diseño de oligonucleótidos

Inicialmente se realizó la búsqueda de las secuencias de los gen que codifican para *cdc-42* (NCU06454.4), *cdc-24* (NCU06067.4), *bud-2* (NCU03852.4) y *bud-5* (NCU06500.4) en *N. crassa*, tomando en cuenta su secuencia promotora y la región río abajo del gen. Cada secuencia fue obtenida en el sitio <http://www.broadinstitute.org>. Para llevar a cabo el etiquetamiento de *cdc-24* en el N-terminal, primeramente, cada oligonucleótido (Tabla II) fue diseñado añadiendo una secuencia para la enzima de restricción *SpeI* (ACTAGT) en el caso del oligonucleótido sentido (incluyendo el codón de inicio ATG del gen), mientras que la secuencia del oligonucleótido antisentido contenía el sitio de restricción para la enzima *PacI* (TTAATTAA) tomando en cuenta el codón de paro (TAA, TAG o TGA). Para el

etiquetamiento en el C-terminal de *cdc-42* (Tabla II), en la secuencia sentido se agregó la secuencia de la enzima de restricción *XbaI* (TCTAGA) (incluyendo el codón de inicio ATG del gen), mientras que la secuencia antisentido contenía el sitio de restricción para la enzima *PacI* (TTAATTAA); en esta última no se tomó en cuenta el codón de paro (TAA, TAG o TGA) del gen. Para el caso de los oligonucleótidos de *cdc-24* (Tabla II), la secuencia sentido fue diseñada con la enzima de restricción *SpeI* (ACTAGT) incluyendo en codón de inicio ATG del gen, mientras que la secuencia antisentido contenía el sitio de restricción para *PacI* (TTAATTAA) sin tomar en cuenta el codón de paro de la transcripción. Finalmente para los oligonucleótidos de *bud-2* y *bud-5* (Tabla II), la enzima de restricción que se consideró fue *XbaI* (TCTAGA) para el oligonucleótido sentido, incluyendo el codón de inicio de la transcripción ATG de cada gen, mientras que la secuencia del oligonucleótido antisentido de cada gen de *bud* contenían el sitio de restricción para la enzima *PacI* (TTAATTAA), para estas secuencias de oligonucleótidos para *bud* no se tomó en cuenta el codón de paro (TAA, TAG o TGA) para poder llevar a cabo el etiquetamiento en el extremo C-terminal. El uso de las enzimas de restricción nos permitió generar extremos cohesivos para poder introducir cada una de las secuencias al vector de clonación correspondiente (Tabla III). Antes de enviar a sintetizar cada uno de los oligonucleótidos se analizaron con el software FastPCR Professional[®] versión 6.0.196 beta 2 para identificar la posible formación de dímeros y horquillamientos no deseados, así como los parámetros físicos y químicos de los oligonucleótidos (T_m, % G-C, % A-T) y su estabilidad interna. Esto último es importante para establecer las condiciones de reacción óptimas y para incrementar las probabilidades de obtener un resultado positivo en la amplificación.

Tabla II. Oligonucleótidos usados en este estudio. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción se encuentran señaladas en negritas y el codón de inicio de la transcripción se encuentra subrayado.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Referencia
[§] CDC24-F	GGACTAGT <u>ATG</u> AGCCTGTCCAACGG	Este estudio
[§] CDC24-R	CCTTAATTA ACT CCAACAGTTCCCCTTC	Este estudio
[‡] CDC42-F	TGCTCTAG <u>AATG</u> GTGACGGGA ACT ATC	Este estudio
[‡] CDC42-R	CCTTAATTA AC GAAATCAAGCACTTCTT	Este estudio
[‡] CDC24-F	GGACTAGT <u>ATG</u> AGCCTGTCCAACGG	Este estudio
[‡] CDC24-R	CCTTAATTA ACT CCAACAGTTCCCCTTC	Este estudio
CDC42-F CAAX	5Phos-TTAATTA AC <u>ATG</u> GTGAGCAAGGGCG	Este estudio
CDC42-R CAAX	5Phos-CTTCTTGTCCCTTTTACTTGTCTTTTTCTG	Este estudio
[‡] BUD2-F	GCTCTAG <u>AATG</u> GGAAGGGAGGCACCCGGTT	Este estudio
[‡] BUD2-R	CCTTAATTA AAA ATTCCTTCTCGTGCCAGT	Este estudio
[‡] BUD5-F	GCTCTAG <u>AATG</u> CTAATGACACAGACGCCT	Este estudio
[‡] BUD5-R	CCTTAATTAAGGTCTTAAAGGGTGACCA	Este estudio

[§]Etiquetamiento en el extremo N-terminal.

[‡]Etiquetamiento en el extremo C-terminal.

5.4.2 Vectores de clonación

Los vectores empleados en este estudio se encuentran enlistados en la tabla III. Así mismo se realiza una descripción breve de sus características.

Tabla III. Vectores para expresión fúngica utilizados en el presente trabajo mostrando sus características principales.

Plásmido	Descripción	Referencia
PGEM [®] -T	Este vector de 3,015pb contiene dos timinas en el extremo 3' de cada cadena a las que se aparean la adenina terminal que añade la polimerasa termosensible a los productos de PCR permitiendo la clonación directa de productos de PCR en este vector de forma eficiente.	Promega
pRM-12	Vector de expresión fúngica de 8,505pb derivado de pMF334. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , así como el gen <i>sgfp</i> que se localiza río abajo del promotor flanqueado por el sitio de clonación múltiple. Como marcador de selección contiene la β -lactamasa. Este vector permite el etiquetamiento en el N-terminal de genes con la GFP y es dirigido al locus <i>his-3</i> para recombinación homóloga.	Mouriño-Pérez, sin publicar.
pCAP24.2	Vector de expresión fúngica de 11,30pb derivado de pRM-12. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>sgfp::cdc-24</i> y como marcador de selección β -lactamasa.	En este estudio
pMF272	El tamaño de este vector integrativo y de expresión para <i>N. crassa</i> presenta un tamaño de 8,479 pb. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , así como el gen <i>sgfp</i> que se localiza río abajo del promotor flanqueado por el sitio de clonación múltiple. Como marcador de selección contiene la β -lactamasa. Este vector permite el etiquetamiento en el C-terminal. Este plásmido se caracteriza por estar flanqueado por una región que permite la recombinación homóloga en el locus <i>his-3</i> y una vez ocurrida la recombinación homóloga restablece funcionalmente el alelo <i>his-3</i> .	Freitag <i>et al.</i> , 2004
pJV15.2	Vector integrativo y de expresión para <i>N. crassa</i> derivado de pMF272 y pMF24, presenta un tamaño de 9,779 pb. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , así como el gen <i>mcherryfp</i> , localizado río abajo del promotor y flanqueado por el sitio de clonación múltiple. Este vector permite el etiquetamiento en el C-terminal y es dirigido al locus <i>his-3</i> para recombinación homóloga.	Verdín <i>et al.</i> , 2009
pCAP42.1	Vector de expresión fúngica de 9,404 pb derivado del plásmido pMF272. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>cdc-42::sgfp</i> y como marcador de selección contiene la β -lactamasa.	Este estudio
pCAP42.2	Vector de expresión fúngica de 9,946 pb derivado del plásmido pJV15.2. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>cdc-42::mchfp</i> y como marcador de selección presenta la β -lactamasa.	Este estudio
pCAP24.1	Vector de expresión fúngica de 12,221 pb derivado del plásmido pJV15.2. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>cdc-24::mchfp</i> y como marcador de selección contiene la β -lactamasa.	Este estudio
pCAP5.1	Vector de expresión fúngica de 12,728 pb derivado del plásmido pMF272. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>bud-5::sgfp</i> y es dirigido al locus <i>his-3</i> para recombinación homóloga. Como marcador de selección en bacterias, contiene la β -lactamasa.	Este estudio
pCAP2.1	Vector de expresión fúngica de 12,890 pb derivado del plásmido pJV15.2. Contiene el promotor <i>Pccg-1</i> , <i>bud-2::mchfp</i> y es dirigido al locus <i>his-3</i> para recombinación homóloga. Como marcador de selección presenta la β -lactamasa.	Este estudio

5.4.3 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

Para la extracción de DNA genómico, se utilizó *N. crassa* cepa FGSC #988, la cual se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio MMV líquido, el cual se incubó de 3 a 5 días a 28°C en completa oscuridad y de esta manera evitar la formación de conidios. El cultivo posteriormente se filtró por medio de tela sintética tipo “MagiteI” estéril para eliminar la presencia de líquido. Subsecuentemente se realizaron lavados con 1 litro de agua destilada estéril para eliminar el exceso de MMV. El micelio se secó utilizando papel filtro de 125 mm de diámetro (Whatman®) estéril y se guardó en un ultracongelador (Nuair®) a una temperatura de -80°C hasta su uso. Antes de la extracción de DNA, el micelio congelado se trituró en un mortero preenfriado 30 min a -70°C en presencia de nitrógeno líquido moliendo hasta obtener un polvo fino. La extracción de DNA genómico de *N. crassa* se realizó utilizando el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (50) de QIAGEN.

5.4.4 Cuantificación de DNA genómico

La concentración de DNA genómico se estimó aproximadamente al comparar con concentraciones conocidas de DNA del fago lambda digerido con enzimas de restricción *EcoRI-HindIII*, ambas muestras se sometieron en geles de agarosa al 1% y visualizado mediante tinción con bromuro de etidio.

5.4.5 Separación de DNA mediante electroforesis

Se sometió el DNA genómico a electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell 2001). La agarosa se preparó al 1% en amortiguador TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM, pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80 V por un tiempo de 35-40 minutos en una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, BioRad®) con el mismo regulador (PowerPac Basic™ BioRad). El DNA se visualizó al irradiar el gel con luz ultravioleta bajo un transiluminador (Molecular imager GelDoc XR, BioRad®). El tamaño

de las bandas se determinó por comparación con marcadores de tamaño de DNA (DNA del fago λ digerido con enzimas de restricción *EcoRI* y *Hind III*).

5.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico que se obtuvo de la cepa FGSC #988 se utilizó como patrón para realizar la amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador iCyclerTM de BioRad[®]. En estos experimentos se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos que hibridaron en los extremos 5' y 3' del fragmento de DNA que se deseaba amplificar. Las muestras que se usaron como molde, junto con los oligonucleótidos correspondientes, se sometieron a una serie de ciclos de desnaturalización, unión y extensión del oligonucleótido bajo la acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando la amplificación del fragmento de DNA de interés, cuyos extremos quedaron definidos por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. Para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés se utilizó una mezcla de reacción que contenía: 1.5 μ l del oligonucleótido sentido, 1.5 μ l del oligonucleótido antisentido, 2 μ l de DNA genómico y 45 μ l de SuperMix (PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen[®]) con capacidad de amplificación de 1kb min⁻¹. Los parámetros de cada mezcla incluyeron: precalentamiento a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de una fase de 30 segundos a 94°C de desnaturalización, 30 segundos a 55°C de alineamiento y 5 minutos a 68°C de extensión, terminando con 10 minutos a 68°C de extensión final.

5.4.7 Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizó el Kit QIAquick[®] Gel Extraction (Qiagen) bajo las recomendaciones del fabricante.

5.4.8 Transformación genética de *E. coli*

5.4.8.1 Obtención de células químicamente competentes

La obtención de células químicamente competentes de *E. coli* se realizó de acuerdo a Sambrook y Russell (2001): 5 ml de medio LB contenidos en un matraz Erlenmeyer de 100 ml se inoculó con una colonia fresca (no más de 24h de edad) de la bacteria DH5 α y se dejó incubar a 37°C durante toda la noche en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Lab-Line). El cultivo obtenido se adicionó a 50ml de medio LB y se incubó a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0.5. Posteriormente, el cultivo bacteriano se mantuvo en hielo durante 30 minutos, se centrifugó a 2500g por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Las bacterias recolectadas se colocaron sobre un baño de hielo y se resuspendieron suavemente en 30ml de una solución fría y estéril de MgCl₂ 80 mM y CaCl₂ 20mM, se sometieron a centrifugación nuevamente bajo las mismas condiciones desechando el sobrenadante. La pastilla de las células obtenidas se resuspendió de manera muy suave en 2 ml de una solución fría y estéril de CaCl₂ 100 mM con glicerol al 15%. Las células se dividieron en alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron inmediatamente a -70°C.

5.4.8.2 Transformación de *E. coli* por choque térmico

La transformación de células quimiocompetentes de la cepa DH5 α (Invitrogen[®]) de *E. coli* se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: la transformación de las células quimiocompetentes se realizó utilizando 50 μ l de células, y 5 μ l de la ligación. La mezcla conteniendo las células se incubó por 30 minutos sobre una cama de hielo, inmediatamente para provocar un choque térmico la mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C, e inmediatamente se incubó sobre hielo por 2 minutos. A la mezcla se le adicionó 900 μ l de medio LB y se incubaron 1h a 37°C con agitación constante a 200-250 rpm en un agitador orbital (LAB-LINE). Inmediatamente después se extendieron sobre una placa Petri conteniendo medio sólido LB-ampicilina previamente espatulado con 20 μ l de X-gal (20mg ml⁻¹) y 4 μ l de IPTG (10mM), incubándose durante 12h a 37°C para seleccionar las colonias blancas (recombinantes) resistentes a ampicilina.

5.4.9 Purificación de DNA

5.4.9.1 Purificación de DNA plasmídico

Para la purificación de DNA plasmídico se utilizó el método de lisis-alcalina (Sambrook y Russell, 2001), con la finalidad de analizar colonias que tuvieran la recombinante requerida, el cual consiste en lo siguiente: En 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido, se inoculó con una colonia y se incubó a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Se recolectó la pastilla bacteriana por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente la pastilla se resuspendió en vortex con 100 µl de amortiguador TER (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; RNAsa 0.1 mg ml⁻¹), resuspendida la mezcla, se adicionaron 150 µl de SDS alcalino (SDS 1%, NaOH 0.2 M), se mezcló por inversión suave y se incubó 5 minutos en hielo. Pasada la incubación se adicionaron 200 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.5, se mezcló por inversión suave y se incubó en hielo durante 10 minutos. Finalizada la incubación se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos, recuperándose después el sobrenadante. Al sobrenadante obtenido se le trató con 1 µl de RNAsa 10 mM y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Después del tratamiento con RNAsa, se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 por 30 minutos. Posterior a la incubación se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm para recuperar la pastilla. Posteriormente, la pastilla se lavó con 200 µl con etanol al 70%, centrifugándose 5 minutos a 13,000 rpm. Se dejó secar la pastilla durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 µl de TE 1/10 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM, pH 8.0).

5.4.10 Tratamiento enzimático

5.4.10.1 Tratamiento con endonucleasas de restricción

Para realizar el análisis de restricción se siguieron las condiciones recomendadas por la casa comercial (Invitrogen, New England Biolabs o Promega). Cada mezcla de reacción contenía 1 unidad de enzima por cada µg de DNA con el amortiguador de digestión 10% v/v. La mezcla se incubó al menos 4 horas a la temperatura adecuada.

5.4.10.2 Defosforilación de extremos 5' de moléculas de DNA

Para disminuir la frecuencia de reacciones intramoleculares de ligación en vectores al ser ligados con insertos, el vector linearizado se trató con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (Promega). La mezcla de reacción contenía 1 unidad de SAP por cada 50 ng de plásmido linearizado. Para que se llevara a cabo la reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se inactivó la SAP incubando a 65°C por 15 minutos.

5.4.10.3 Ligación de fragmentos de DNA a vectores de clonación

La ligación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen o Promega). El vector previamente tratado con fosfatasa alcalina y el inserto a ligar se mezclaron en una relación 1:3, utilizando un volumen final de 15 µl, en amortiguador de ligación a una concentración final del 10% v/v y 1 unidad de enzima, la mezcla se incubó toda la noche a 25°C.

5.4.11 Selección y verificación de clonas positivas

Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina fueron sometidas a un ensayo de PCR de colonia. Para ello con un palillo de madera estéril se tomó una parte de la colonia bacteriana, se inoculó en una placa conteniendo medio LB-sólido con ampicilina y el resto se introdujo en un tubo para PCR conteniendo: 2µl de amortiguador Green GoTaq flexi, 1µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de dNTP's (2.5 mM), 1µl de oligonucleótido sentido 10µM y 1µl de oligonucleótido antisentido 10µM, 12.8µl de agua destilada y 0.25µl de polimerasa GoTaq (Promega®). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, posteriormente una fase de alineamiento a 58°C por 30 segundos y finalmente una fase de extensión a 72°C por 4 minutos. Cuando se completaron los 35 ciclos se programó una extensión final de 72°C por 8 minutos y para finalizar la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos de la PCR de colonia fueron sometidos a una electroforesis

como se describe en la sección V.4.5. Las clonas que dieron positivo en la PCR de colonia fueron inoculadas cada una en 5ml de medio LB-líquido con ampicilina, e incubadas por 12 a 14 horas a 37°C en agitación constante a 225rpm para posteriormente realizar la extracción de DNA plasmídico como se describe en la sección V.4.9.1. Obtenido el DNA plasmídico se realizó una prueba de restricción como se señala en la sección V.4.10.1, para corroborar que el inserto se encontraba dentro del plásmido con los sitios de clonación intactos.

5.4.12 Delección de dominio con motivo CAAX

Para la eliminación de dominios CAAX, se utilizó la técnica de mutagénesis sitio dirigido. Esta técnica es fácil de realizar para eliminar dominios simples o bien eliminar partes grandes de genes de interés vía PCR. Para ello se utilizó el plásmido pCAP42.1 descrito en la tabla III, y el cual se usó como cadena patrón para realizar la modificación del dominio de interés. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador NYX Technik Modelo ATC401 de Instrumental Pasteur S.R.L. En este experimento se utilizó un par de oligonucleótidos con modificación especial en el extremo 5' de cada oligonucleótido (Tabla II). La muestra que se usó como molde, junto con los cebadores correspondientes, se sometieron a una serie de ciclos de desnaturalización, unión y extensión del oligonucleótido bajo la acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando la amplificación del vector pCAP42.1 pero sin el dominio CAAX. Para la amplificación de este vector, se utilizó una mezcla de reacción que contenía: 32.5 µl de agua HPLC estéril, 10 µl de amortiguador 5X Phusion HP (New England, BioLabs[®] Inc), 1 µl de desoxinucleótidos o dNTP's 10 mM (Promega), 2.5 µl de oligonucleótido sentido 10 µM, 2.5 µl de oligonucleótido antisentido 10 µM y 0.5 µl de DNA polimerasa Phusion[®] (Phusion[®] High-Fidelity, New England, BioLabs) con capacidad de amplificación de 15 – 30kb min⁻¹. Los parámetros utilizados para la mezcla de amplificación fue: precalentamiento a 98°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de una fase de 1 minuto a 98°C de desnaturalización, 1 minuto a 52°C de alineamiento y 5 minutos a 72°C de extensión, terminando con 10 minutos a 72°C de extensión final. Posteriormente, el resultado de PCR fue sometido a una reacción de

digestión directamente con 1 μ l de enzima *DpnI* (esta enzima corta templado de DNA metilado, New England, BioLabs) incubándose a 37°C por un periodo de 1h. Transcurrido el tiempo de incubación, la enzima es inactivada a 68°C por 20 minutos. Seguido de la reacción de digestión e inactivación, la mezcla se sujetó a una reacción de ligación que consistió en 8 μ l del producto de PCR con su respectivo tratamiento y 1 μ l de amortiguador *T₄* ligasa 10X (Promega), esta reacción se incubó durante 1 minuto a 68°C, se enfrió en hielo rápidamente y después se le añadió 1 μ l de DNA *T₄* ligasa, finalmente se incubó toda la noche a 16°C para posteriormente transformar el producto de ligación en *E. coli* de acuerdo a lo descrito en la sección V.4.8.2.

5.4.13 Transformación genética de *N. crassa*

Para realizar la transformación de macroconidios de *N. crassa* se utilizó la cepa del FGSC #9717. La cepa 9717 tiene una mutación en el gen *mus-51*, que impide que se lleve a cabo una recombinación ectópica, así que la cepa solo realizará recombinación homóloga. La cepa se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200ml de MMV sólido suplementado con 25 mg ml⁻¹ de histidina. La incubación se realizó por 14 a 15 días a una temperatura de 28°C. Una vez que en el cultivo se formaron los suficientes macroconidios, éstos fueron resuspendidos en agua destilada estéril. Los macroconidios fueron transferidos a tubos cónicos estériles y fríos de 50 ml (FALCON®). Se centrifugaron en frío en una centrífuga MultiFuge 15-R Heraeus, por 5 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, se realizaron lavados tanto en agua destilada/desionizada estéril como en sorbitol 1 M estéril y frío. Para optimizar la transformación de los macroconidios se utilizó una suspensión con una concentración de 2.5X10⁹ macroconidios ml⁻¹ o una suspensión de macroconidios con una densidad óptica (OD₆₀₀) entre 0.2 a 1.0 utilizando espectrofotómetro (Modelo 6505, JENWAY UV/Vis).

La transformación de los macroconidios de *N. crassa* se realizó mediante la técnica de electroporación. En una celda para electroporación se colocaron 90 μ l de macroconidios y 10 μ l de plásmido respectivo sin linealizar. Se aplicó un pulso eléctrico con un

electroporador Gen Pulser Xcell System (Modelo 165-2660 BIO-RAD) a un voltaje de 1,500 volts (V), una capacitancia de 25 microfaradios (μF) y una resistencia de 600 Ohms (Ω) durante 14 milisegundos (ms). Inmediatamente después del pulso eléctrico, los macroconidios fueron resuspendidos en 1 ml de sorbitol 1 M, y posteriormente, la mezcla de macroconidios-sorbitol, se resuspendió en 5 ml de solución de recuperación incubándose a 30°C con agitación suave por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación los macroconidios se sembraron en 4 placas de Petri conteniendo medio agar FGS incubándose a 30°C por 4 a 5 días.

5.4.14 Recuperación de transformantes de *N. crassa*

Las transformantes se recuperaron resemebrándolas en tubos de borosilicato de 12X75mm (PYREX[®]) conteniendo MMV con o sin marcador de selección, en forma oblicua para obtener mayor superficie de cultivo. Se incubaron a una temperatura de 28°C hasta que el micelio se encontraba maduro y con abundante producción de esporas asexuales. Los macroconidios se revisaron bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 200) equipado con una lámpara de fluorescencia que permitió seleccionar aquellas transformantes que expresaron fluorescencia.

5.4.15 Análisis bajo microscopía

5.4.15.1 Microscopía de bajo aumento

Para el análisis de la morfología colonial e hifal de las células de *N. crassa* se usó un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 equipado con un lente adaptador de 0.097X. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Olympus DP70 que operaba con el Software DP Controller Olympus compatible para Windows.

5.4.15.2 Microscopía de alto aumento

Para analizar las células de *N. crassa* se utilizó la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2004). Para el caso de germínulas se sembraron diluciones de macroconidios en MMV líquido en una cámara de cultivo para microscopía cubierta con poli-L-lisina (Ibidi, Integrated BioDiagnostics), así como también se realizaron siembras en placas de Petri conteniendo MMV sólido, ambos cultivos se incubaron a 28°C. Una vez que las células contenidas en la cámara de cultivo germinaron, la muestra se analizó bajo microscopía confocal. En el caso de los cultivos en placas de Petri conteniendo las germínulas, se realizó un corte de un bloque de agar en forma rectangular y se procedió al análisis bajo el microscopio confocal (Figura 8). En el caso de hifas maduras, las células se cultivaron en MMV sólido incubándose a 20°C, cuando las células formaron una colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro, se realizó el corte de un bloque de MMV en la periferia de la colonia en forma rectangular, y después de un periodo de recuperación de 5 a 10 minutos, se procedió al análisis bajo el microscopio (Figura 8).

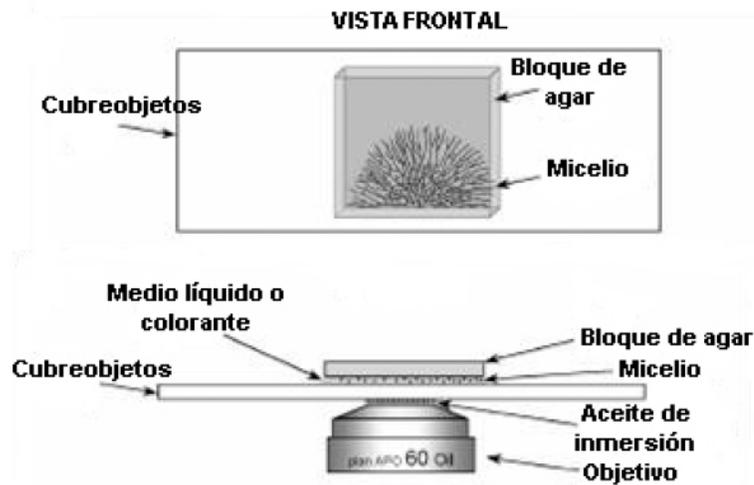


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de bloque invertido (Modificado de Hickey *et al.*, 2004).

Se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser LSM-510 META (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión 100X de contraste de fases (N.A. 13: Plan Neofluar, Carl Zeiss). Para examinar la expresión de la YFP y GFP se utilizó un láser de Argon/2 con una Exc/Em 514/527nm para la YFP y una Exc/Em 488/505-530 nm para la GFP. Para la expresión de la mCherryFP se usó un láser de He1/Ne1 Exc/Em 543/600-630nm. Este microscopio, es equipado con un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases. Para la obtención de imágenes y series de tiempo se utilizó el software LSM-510 versión 3.2 (Carl Zeiss) y se evaluaron con el LSM-510 Image Examiner versión 3.2. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a formato TIFF (Tagged Image File Format). Las secuencias de imágenes obtenidas se transformaron a formato AVI (Audio/Video Interleave) utilizando el software LSM Examiner versión 3.2. El procesamiento de imágenes individuales y reconstrucciones, se realizaron utilizando el programa de cómputo Adobe Photoshop® CS3 y Adobe Illustrator® CS5.

5.4.16 Fluorocromos e inhibidores

5.4.16.1 FM4-64

El uso del colorante FM4-64 (Molecular probes, Invitrogen®) o N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dietilamino)fenil)hexatrienil)piridio dibromuro, ha sido una herramienta clave en estudios con células *in vivo* que ha permitido en el campo de la biología celular analizar en detalle procesos tales como la endocitosis y el tráfico de vesículas secretoras. El FM4-64, es un colorante vital que se ha utilizado para teñir a un grupo de vesículas que se encuentran en el ápice celular donde se localiza el Spk. La solución stock de este colorante se preparó a una concentración de 0.25 mM en dimetilsulfóxido 100% (DMSO) y se usó a una concentración de trabajo de 25 μ M. Como agente diluyente se utilizó MMV líquido. Para detectar la fluorescencia del FM4-64 se utilizó un láser de Argón/2 Exc/Em 514/670 nm.

5.4.16.2 Inhibidores del citoesqueleto celular

Como inhibidores del citoesqueleto celular fúngico, se utilizó Carbamato de metilo 1-[butilaminocarbonil] 2-benzimidazol o benomilo (Sigma-Aldrich). Esta droga despolimeriza a los microtúbulos del cito esqueleto. Se preparó a una concentración de trabajo de 10 mg ml^{-1} de acuerdo a lo descrito por Delgado-Álvarez *et al.* (2010). Por otra parte, el segundo inhibidor utilizado fue la citocalasina-A. Esta droga es un despolimerizador de los filamentos de actina, y se usó a una concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ según lo descrito por Delgado-Álvarez *et al.* (2010).

6. Resultados

6.1 La actividad coordinada de CDC-42 y RAC es requerida para la polaridad celular, la integridad del Spitzenkörper y el crecimiento de *N. crassa*

6.1.1 Caracterización de las mutantes condicionales de *cdc-42* y *rac* en *N. crassa*

Con la finalidad de analizar las funciones de CDC-42 y RAC durante el crecimiento polarizado en el hongo filamentoso *N. crassa*, se analizaron las mutantes condicionales *cdc-42(18-4)* y *rac(7-1)* generadas por Richthammer (2011) mediante el uso de una técnica de mutagénesis *in vivo* denominada repeticiones inducidas por mutaciones puntuales o RIP (por sus siglas en inglés: Repet induced point mutation). RIP permite la introducción de mutaciones puntuales en genes de *N. crassa* como parte del mecanismo de defensa del hongo, mediante la inactivación de secuencias duplicadas cuando las cepas con las secuencias repetidas son intercambiadas a través de una cruce sexual (Selker, 1990). En este trabajo, se realizó el análisis de dichas mutantes sensibles a temperatura, tanto en condiciones permisivas ($\leq 32^{\circ}\text{C}$), como en condiciones restrictivas (37°C) con microscopía de bajo y alto aumento. En general, bajo condiciones permisivas, estas cepas exhibieron una morfología muy similar a la cepa silvestre (Figura 9A). Sin embargo, cuando los cultivos se sometieron a una temperatura restrictiva, las cepas mostraron fenotipos aberrantes (Figura 9A). Análisis de hifas de estas cepas teñidas con el colorante vital FM4-64 bajo microscopía de alta solución, revelaron una acumulación del colorante en los ápices celulares, pero sin mostrar un Spitzenkörper (Spk) de forma típica como lo muestra la cepa control (Figura 9B). Los septos en las cepas termosensibles fueron localizados muy cerca de la zona apical. La cepa *cdc-42(18-4)* crecida a temperatura restrictiva de 37°C , mostró tanto por microscopía de bajo y alto aumento, algunas ramificaciones apicales, pero los defectos más pronunciados fueron, la pérdida de la polaridad apical, la generación de ramificaciones subapicales y la presencia de ápices hinchados (Figura 9). Por otra parte, las hifas de la mutante *rac(7-1)* después de 1h de incubación a 37°C , mostraron en sus ápices un crecimiento hinchado o crecimiento apolar; posteriormente, el crecimiento polar se reanudó después de varias horas de incubación (aprox. 3h, 37°C), mostrando una hiper-

ramificación pronunciada y dando como resultado final en la periferia de la colonia fúngica, una forma de árbol y una colonia compacta (Figura 9A).

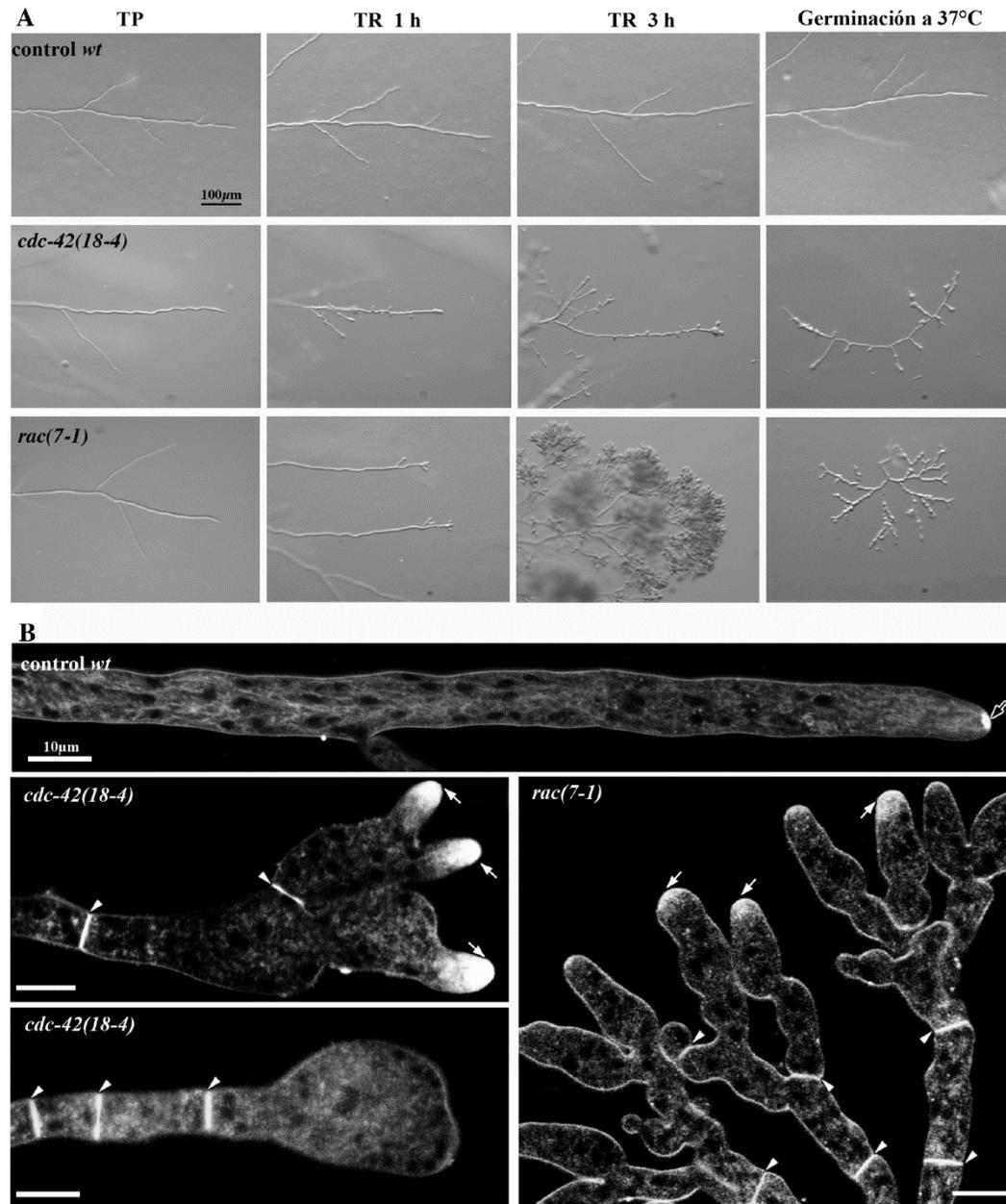


Figura 9. Mutantes condicionales de *cdc-42* y *rac* revelan defectos en la polaridad celular. (A) Análisis bajo microscopio estereoscópico de *wt*, *cdc-42(18-4)* y *rac(7-1)* crecidas a temperatura permisiva (TP: $\leq 32^{\circ}\text{C}$) y a temperatura restrictiva (TR: 37°C) por 1 hora, 3 horas de incubación y germinadas a temperatura restrictiva. **(B)** Análisis a alto aumento mediante microscopía confocal de las cepas *wt*, *cdc-42(18-4)* y *rac(7-1)* incubadas a 37°C y teñidas con FM4-64. Observar que ambas cepas mutantes, revelan defectos morfológicos severos comparados con la cepa control. Flecha negra, señala el Spk en el ápice de la cepa control; flechas blancas, indican el acúmulo del colorante FM4-64 dentro de la región apical de las hifas sin formar un Spk típico; cabezas de flechas, señalan la posición de los septos en ambas cepas.

6.1.2 Caracterización de las mutantes $\Delta cdc-42$ y Δrac en *N. crassa*

Las mutantes por delección de $\Delta cdc-42$ y Δrac mostraron morfologías severas a nivel de colonia, dando como resultados colonias compactas (Figura 10A). Así mismo, el análisis bajo el microscopio estereoscópico permitió observar irregularidades en el crecimiento de las hifas, con ápices hinchados que van dando lugar a hifas distorsionadas, esta distorsión es una consecuencia de la pérdida temporal de la polaridad y el periodo de re-iniciación del crecimiento polarizado en los sitios apicales (Figura 10B).

Cuando se tiñeron con el colorante FM4-64, las hifas de $\Delta cdc-42$ mostraron una acumulación de dicho colorante en las áreas apicales y subapicales, y no pudo observarse un Spk definido. Por otro lado, también se pudo observar que los septos se formaron cerca de la zona apical y cercana uno del otro, dando como resultado compartimientos celulares reducidos (Figura 10C). Por otra parte, la mutante de la cepa Δrac al ser analizada por microscopía de alto aumento, se caracterizó por su producción abundante de ramificaciones apicales (Figura 10C), así mismo, la acumulación del colorante FM4-64 en la región apical fue mucho menor en comparación con la presencia del colorante en los ápices de las hifas de $\Delta cdc-42$. Estas observaciones corroboran que RAC y CDC-42 son componentes críticos para mantener la polaridad y son requeridas para el ensamblaje del Spk.

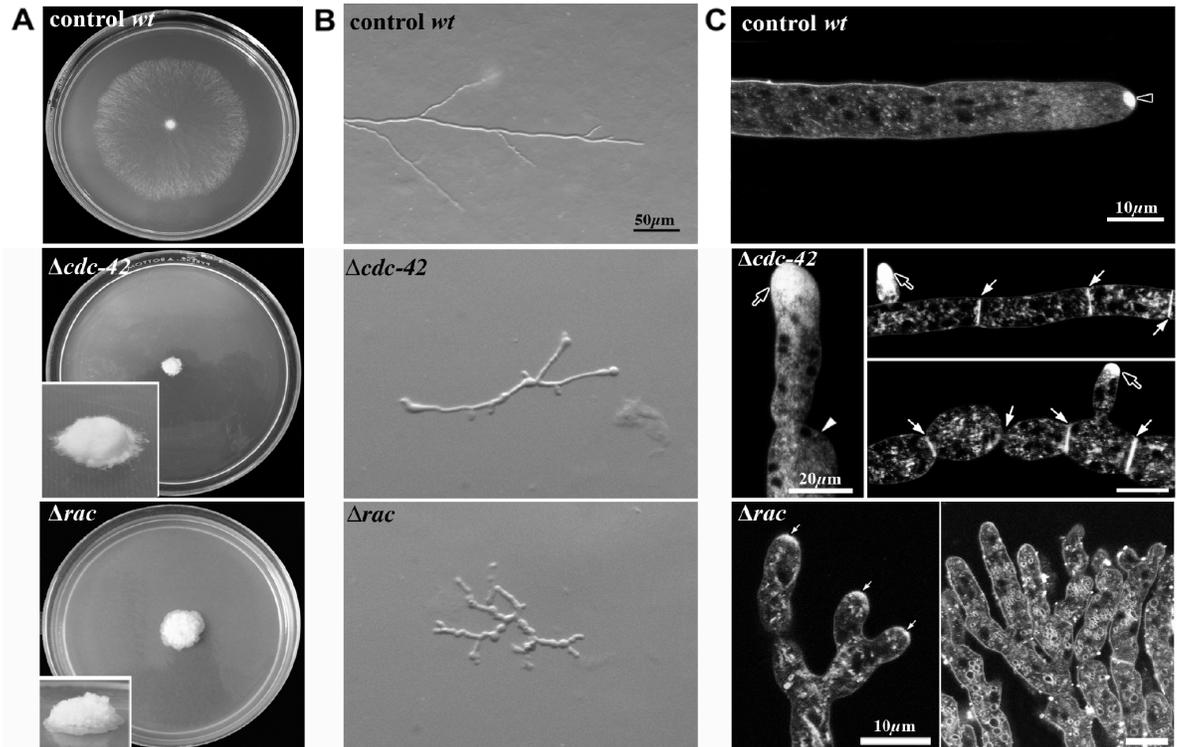


Figura 10. Las cepas fúngicas de $\Delta cdc-42$ y Δrac son viables, pero su morfología es fuertemente afectada. (A) Colonias fúngicas de las cepas silvestre (*wt*), $\Delta cdc-42$ y Δrac . $\Delta cdc-42$ y Δrac muestran colonias compactas y pequeñas en comparación con la cepa control. **(B)** Análisis a baja resolución de microcolonias de *wt*, $\Delta cdc-42$ y Δrac ; las dos últimas cepas muestran una morfología afectada. **(C)** Análisis de alta resolución de hifas maduras de *wt*, $\Delta cdc-42$ y Δrac , teñidas con el colorante FM4-64. Las cepas $\Delta cdc-42$ y Δrac muestran defectos severos en la polaridad celular. Cabeza de flecha negra, señala la acumulación de FM4-64 en la región apical de la cepa control mostrando un Spk de forma típica; flechas negras, señalan la acumulación del FM4-64 en regiones apicales de las hifas de $\Delta cdc-42$ sin formar un Spk típico; flechas blancas (panel superior), indican la presencia de septos; cabeza de flecha blanca, muestra una región de hinchamiento; flechas blancas (panel inferior), muestran la acumulación del colorante FM4-64 en las áreas apicales de las hifas de Δrac sin formar un Spk típico.

6.1.3 Caracterización de las dobles mutantes de *rac*;*cdc-42* en *N. crassa*

Las ascosporas resultantes de una cruce entre *N. crassa* Δrac y *N. crassa* $\Delta cdc-42$, pudieron germinar por un periodo limitado y con defectos severos de polaridad; tras ese periodo inicial, no pudieron mantener un crecimiento polarizado, lo que sugiere que la doble mutante Δrac ; $\Delta cdc-42$ es letal (Figura 11A). Para solventar esto, se analizó la cepa condicional doble mutante de *rac(7-1);cdc42(18-4)*. Esta cepa condicional doble mutante, mostró defectos en la polaridad celular al ser transferida a una temperatura restrictiva de 37°C (Figura 11B). A 37°C se observó una pronunciada hiper-ramificación apical, un hinchamiento del ápice, así como de los compartimientos subapicales de las hifas, y también se visualizó un incremento en el número de septos (Figura 11B). Después de 3 horas de incubación a temperatura restrictiva, la polaridad de las células se perdió y los compartimientos celulares se lisaron y las células murieron (Figura 11B). El fenotipo de la cepa *rac(7-1);cdc42(18-4)* a bajo aumento se corroboró posteriormente a alto aumento, utilizando el colorante FM4-64, donde se observó que la organización típica de las hifas se perdió (Figura 11C). La incubación de los conidios de *rac(7-1);cdc-42(18-4)* a temperatura restrictiva no permitió la formación de germínulas viables, sólo crecieron en forma isotrópica y posteriormente se lisaron, pero el cambio de una temperatura restrictiva a una temperatura permisiva permitió observar la generación de múltiples tubos germinativos (Figura 11B), los cuales emergieron principalmente en uno de los lados del macroconidio, sugiriendo que las señales requeridas para el establecimiento de la polaridad no estaban confinadas en un solo punto, sino en una amplia región de la célula. Estos resultados sugieren que ambas GTPasas tienen una función esencial y común durante el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular.

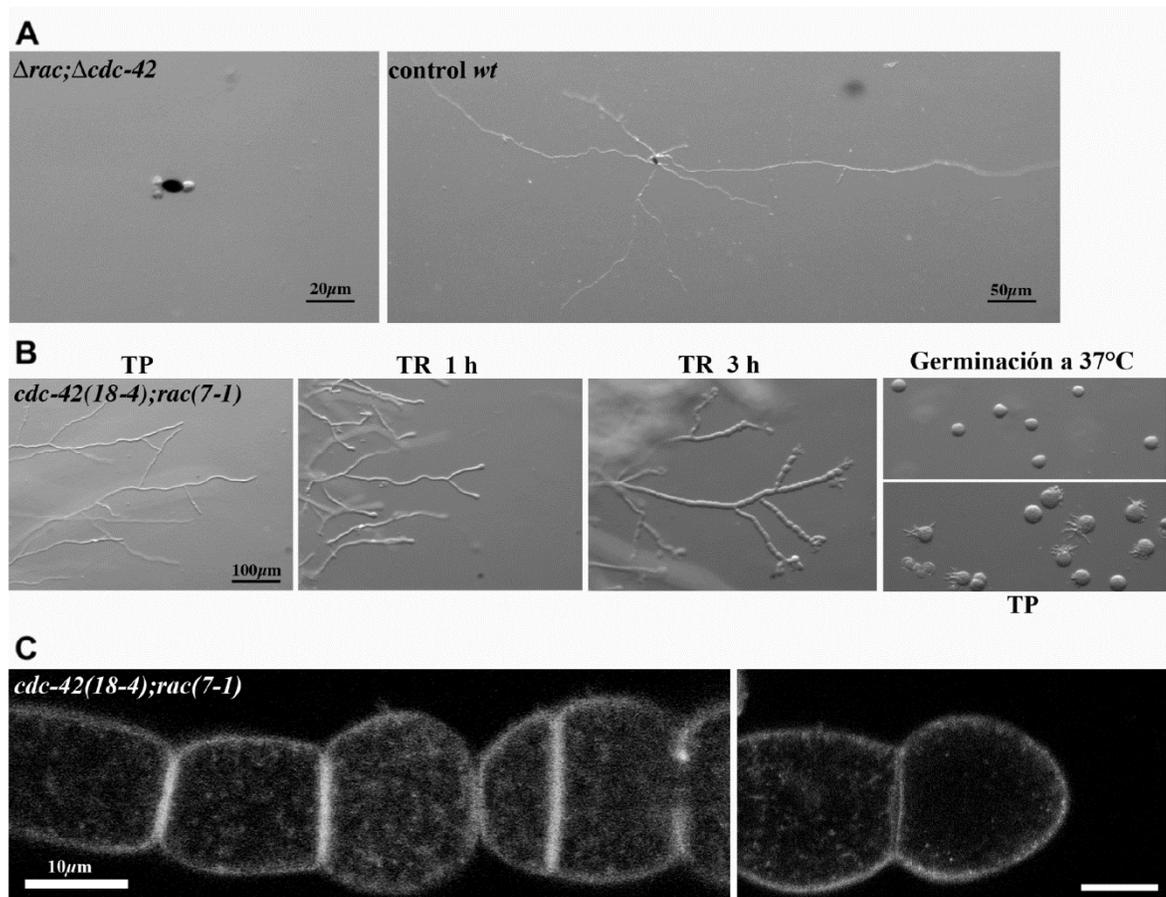


Figura 11. La cepa doble mutante de *rac* y *cdc-42* es letal. (A) Una ascospora de la cepa doble mutante *Δrac;Δcdc-42* y de la cepa control *wt* fueron activadas y crecidas en medio selectivo. *Δrac;Δcdc-42* muestra una germinación apolar, sin embargo no es viable. (B) Análisis a bajo aumento de la cepa mutante condicional *cdc-42(18-4);rac(7-1)* crecida a temperatura permisiva y posteriormente cambiada a temperatura restrictiva de 37°C a 1h, 3h de incubación y germinadas a 37°C. Observar que durante la germinación a 37°C, los macroconidios se desarrollan de forma hinchada sin mostrar algún tipo de polaridad celular, pero cuando se hace el cambio a temperatura permisiva los macroconidios germinan formando múltiples tubos germinativos a un lado de los macroconidios. (C) Análisis a alto aumento de hifas maduras crecidas a temperatura restrictiva y teñidas con el colorante FM4-64, muestran hifas hinchadas con múltiples septos.

6.2 CDC-24 es una proteína esencial para el crecimiento, la polaridad celular y la morfogénesis fúngica en *N. crassa*

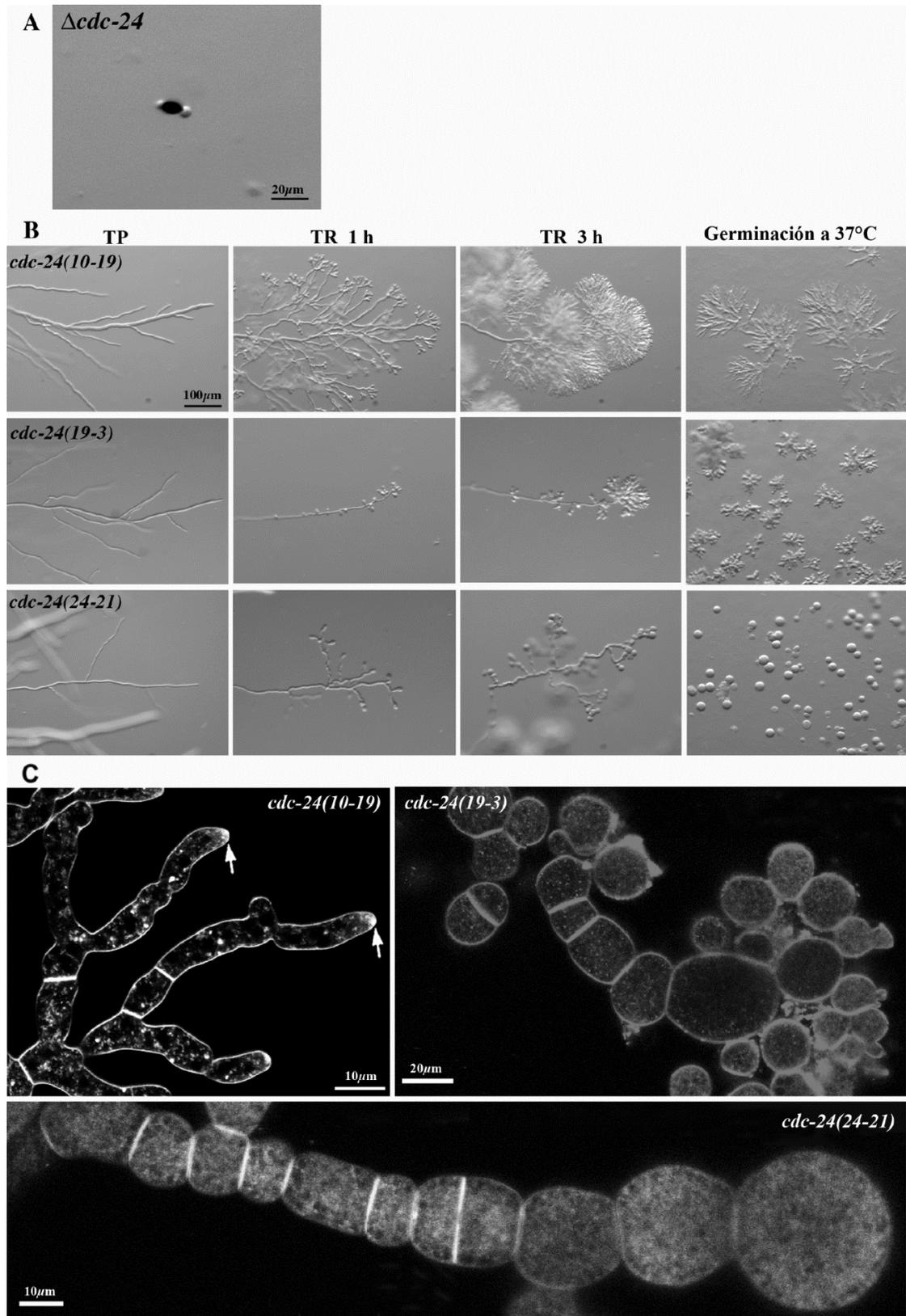
6.2.1 Caracterización de las mutantes por delección y condicionales de *cdc-24* en *N. crassa*

El proyecto genoma de *Neurospora* ha generado cepas heterocarióticas que contienen la delección del GEF *cdc-24*. La mayoría de ascosporas homocariones de las cepas knockout de *cdc-24*, no germinaron. Sin embargo aquellas ascosporas que germinaron, lo hicieron de manera apolar y posteriormente las células se lisaban, lo cual sugiere que *cdc-24* es esencial para la viabilidad en *N. crassa* (Figura 12A). Para corroborar este hecho, se analizó el fenotipo de tres mutantes condicionales de *cdc-24* que corresponden a *cdc-24(10-19)*, *cdc-24(19-3)* y *cdc-24(24-21)* (Apéndice B), las cuales fueron generadas por Seiler y Plamann (2003).

Estas mutantes condicionales mostraron múltiples formas con hiper-ramificaciones y pérdida de la polaridad celular (Figura 12B, C). Cuando la cepa *cdc-24(10-19)* fue crecida a una temperatura restrictiva de 37°C, la cepa mostró una pronunciada hiper-ramificación, dando como resultado la formación de hifas con apariencia de árbol, luciendo muy similar a las características observadas en la cepa *rac(7-1)*. La observación al microscopio confocal, permitió la visualización de hifas distorsionadas, sin embargo, las hifas continuaron manteniendo un crecimiento polar, sin una organización interna característica ya que el Spk se observaba en forma atípica, los núcleos se encontraban muy cerca del ápice y no se observaron mitocondrias alargadas (Figura 12C). No obstante, los defectos morfológicos más severos fueron observados en las cepas *cdc-24(19-3)* y *cdc-24(24-21)*, donde las hifas ramificaron excesivamente en la región apical y área subapical. Esto fue acompañado también por el hinchamiento de los ápices celulares y la formación de múltiples septos, dando lugar a células esféricas en forma de cadena y sin mostrar una organización intracelular típica (Figura 12C). Los ápices celulares de estas dos cepas, perdieron por completo la polaridad celular dando lugar a un crecimiento isotrópico y en algunos casos se presentó la lisis celular. Los defectos mostrados por las cepas *cdc-24(19-3)* y *cdc-24(24-21)*

fueron muy similares a los observados en la cepa condicional doble mutante *rac(7-1);cdc-24(18-4)* (Figura 12C).

Cuando los conidios de las tres mutantes condicionales de *cdc-24* fueron germinados a 37°C las características de polaridad fueron muy similares a las mostradas en hifas maduras y a nivel de colonia. *cdc-24(10-19)* formó pequeñas colonias (microcolonias) hiper-ramificadas; similarmente, la cepa *cdc-24(19-3)* también mostró una notable hiper-ramificación de la microcolonia, acompañada por un hinchamiento en los ápices celulares, así como hinchamiento celular en las regiones subapicales. Sin embargo, los conidios de la cepa *cdc-24(24-21)* fueron incapaces de polarizarse y por ende, el crecimiento se vio limitado sólo a un crecimiento isotrópico.



Descripción en la siguiente página

Figura 12. La proteína CDC-24 es esencial para la viabilidad y las cepas condicionantes *rac* y *cdc-24* muestran defectos en sus morfologías. (A) Crecimiento de una ascospora de la cepa mutante $\Delta cdc-24$, crecida en medio selectivo muestra una germinación apolar y posteriormente muere. (B) Análisis a bajo aumento de las cepas condicionales de *N. crassa* *cdc-24(10-19)*, *cdc-24(19-3)* y *cdc-24(24-21)* cultivadas a temperatura permisiva y posteriormente incubadas a 37°C por 1h, 3h y geminadas a 37°C. Observar que en la cepa *cdc-24(10-19)* muestra hiper-ramificación en las puntas al igual que en la cepa *cdc-24(19-3)*, no obstante, en la cepa *cdc-24(24-21)* se observan los ápices celulares de forma abultada. (C) Hifas maduras de las cepas *cdc-24(10-19)*, *cdc-24(19-3)* y *cdc-24(24-21)* teñidas con FM4-64 muestran defectos en la polaridad celular, así como la formación excesiva de septos. Flecha blancas, indican la acumulación del colorante FM4-64 en los ápices celulares mostrando un Spk desorganizado sin una forma típica.

6.3 El crecimiento de las mutantes del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 es afectado por la pérdida de polaridad en *N. crassa*

Se calculó la tasa de elongación de la cepa silvestre, de las mutantes por delección de $\Delta cdc-42$ y Δrac , mutantes condicionales *cdc-42(18-4)*, *rac(7-1)*, *cdc-24(10-19)*, *cdc-24(19-3)*, *cdc-24(24-21)*, así como de la doble mutante condicional *cdc-42(18-4);rac(7-1)* para observar las diferencias entre ellas. Las condiciones en las que fueron incubadas para tomar la lectura de crecimiento fue de 37°C. Cabe señalar que la mutante sencilla por delección $\Delta cdc-24$ y la doble mutante $\Delta cdc-42;\Delta rac$ son letales, así que las tasas de crecimiento en ambas cepas es considerada como cero. En la figura 13, podemos observar claramente que las mutantes por delección y las mutantes condicionales muestran una tasa de elongación menor comparada con la cepa silvestre. La cepa silvestre mostró una elongación de $4.38 \pm 0.28 \mu\text{m min}^{-1}$, no obstante, en las cepas mutantes tanto por delección como sensibles a temperatura, la tasa de crecimiento no alcanzó ni $1 \mu\text{m min}^{-1}$. Estos resultados corroboran que cada una de las proteínas GTPasas y de la proteína GEF para *N. crassa*, son proteínas esenciales para llevar a cabo un crecimiento polar.

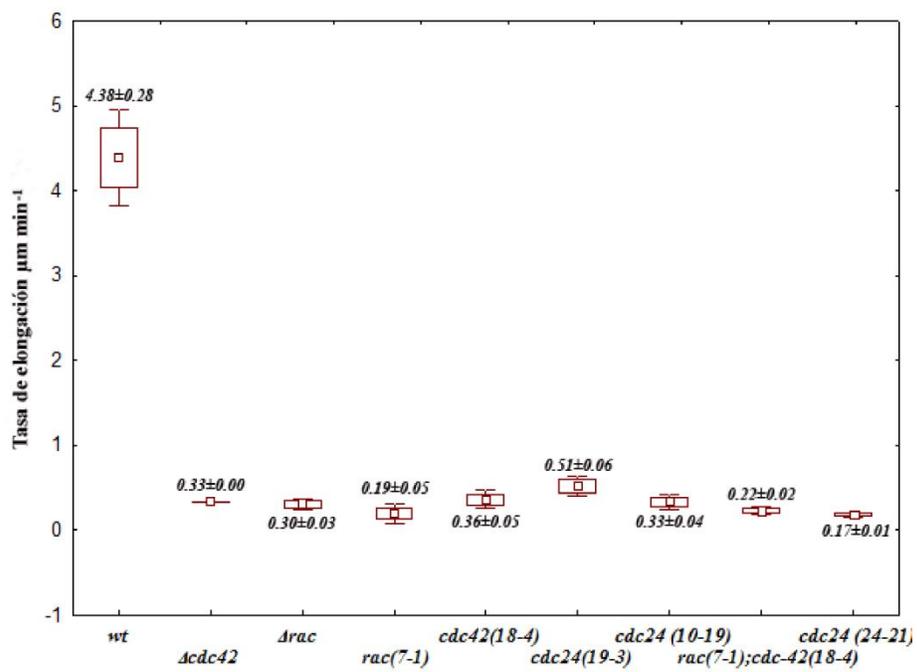


Figure 13. Tasa de elongación de las mutantes del módulo CDC-42 - RAC - CDC-24. Tasa de elongación de la cepa silvestre, mutantes por delección y mutantes sensibles a temperatura de *N. crassa* incubadas a 37°C. (■) media, (□) error estándar, (I) intervalo de confianza al 95%.

6.4 CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización intracelular durante la polarización celular y extensión apical.

6.4.1 Obtención del vector recombinante pCAP24.3

Se logró amplificar un fragmento de 2,912pb correspondiente a *cdc-24* (Figura 14A), por lo que la construcción del vector recombinante pCAP24.3 se llevó a cabo mediante la inserción del amplicón de *cdc-24* digerido con las enzimas de restricción *SpeI* y *PacI* en el sitio de clonación múltiple del vector de clonación pRM-12, digerido igualmente con las mismas enzimas (Figura 14B). Ambos fragmentos obtenidos fueron ligados mediante una reacción de ligación y el vector recombinante se usó para transformar *E. coli* DH5 α , obteniendo alrededor de 50 colonias. Para verificar que las colonias bacterianas obtenidas tuvieran el vector recombinante pCAP24.3, se llevó a cabo una PCR de colonia de 12 de las colonias obtenidas (Figura 14C). De las 12 clonas obtenidas 7 fueron positivas. Se seleccionaron 4 de estas clonas, se obtuvo ADN plasmídico y se digirió con las enzimas *SpeI-PacI* respectivamente, mostrando la liberación de *cdc-24* e indicando que el gen se integró correctamente dentro del vector pMR-12 (Figura 14D).

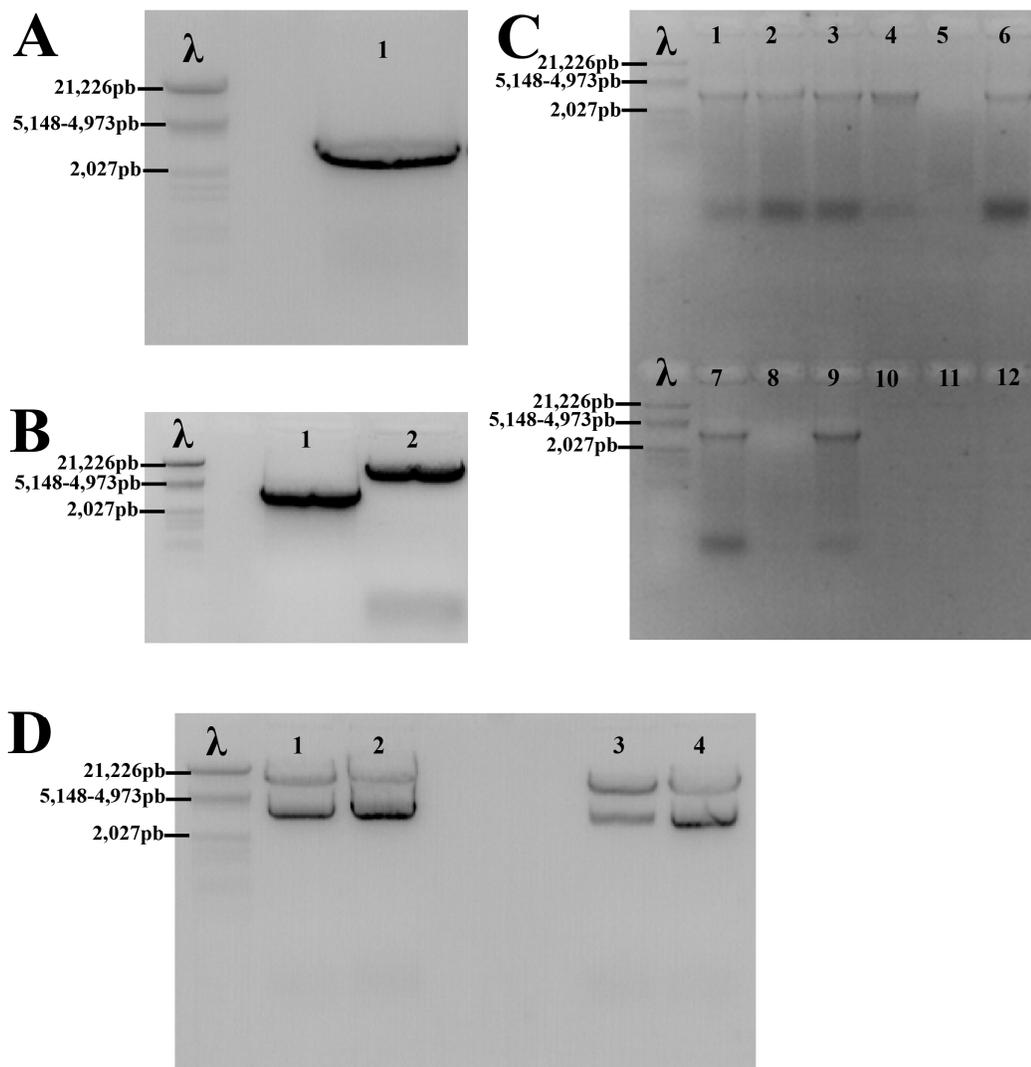


Figura 14. Construcción del vector recombinante pCAP24.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$. **(A)** muestra el resultado de PCR de alta fidelidad para *cdc-24* mostrando un amplicón de un tamaño aproximado de 2,912 pb; **(B)** *cdc-24* (carril 1) y el vector de clonación pRM-12 (carril 2) digeridos con *SpeI* y *PacI*; **(C)** PCR de colonia mostrando en los carriles 1,2,3,4,6,7 y 9 las clonas positivas; **(D)** resultado de la digestión del vector recombinante pCAP24.3 con las enzimas *SpeI* y *PacI* mostrando la liberación de *cdc-24*.

6.4.2 Análisis intracelular de las proteínas CDC-42, RAC y CDC-24 etiquetadas con proteínas fluorescentes en hifas maduras de *N. crassa*

Las cepas de *N. crassa* mutantes simple, en las cuales se expresó una copia de las GTPasas CDC-42 y RAC etiquetadas en el extremo amino terminal con la proteína amarillo fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés), muestran que los defectos de crecimiento son complementados, indicando una correcta funcionalidad de los constructos (Richthammer, 2011). En este trabajo, se observó bajo microscopía confocal de escaneo por láser, que en las hifas en crecimiento, YFP-CDC-42 se encuentra en los ápices celulares en forma de media luna y esta localización fue asociada a membrana plasmática (Figura 15A). En contraste, YFP-RAC se encontró asociada a membrana pero mostrando una localización diferente, en forma de anillo excluyendo mayormente la zona apical, la cual es ocupada por YFP-CDC-42 (Figura 15B). No obstante, como era de esperarse por la doble función que presenta la GEF CDC-24 hacia CDC-42 y RAC, la localización de GFP-CDC-24 en el N-terminal se sobrelapa con la localización de las dos GTPasas CDC-42 y RAC, ya que la distribución de CDC-24 fue en el ápice de las hifas en forma de capucha (Figura 15C). Interesantemente, GFP-CDC-24 no fue exclusivamente asociada con la membrana apical como las otras GTPasas, sino que también se localizó en una región citosólica dentro del domo apical rodeando al Spk de manera muy dinámica (Figura 15D). Esto pudo ser observado claramente al teñir las hifas del hongo con el colorante FM4-64, lo cual permitió observar que CDC-24 fue excluído de la región central del Spk (Figura 15D). En resumen, el módulo constituido por las GTPasas y el GEF CDC-42 – RAC – CDC-24, muestran distintos patrones de localización en los ápices de las hifas maduras del hongo filamentoso *N. crassa*.

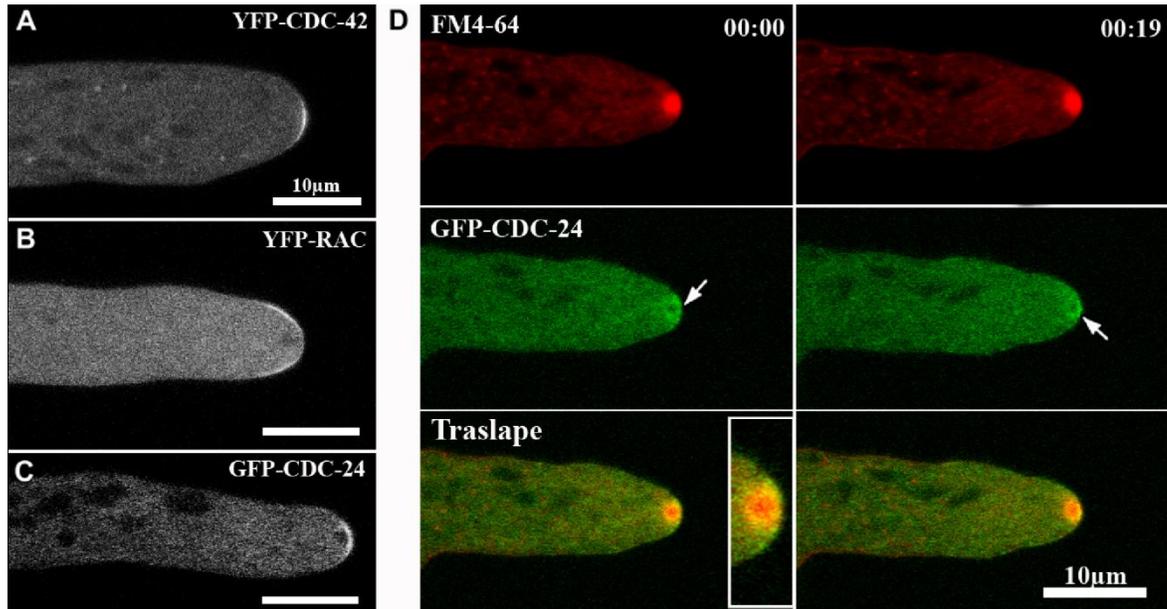


Figura 15. CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización en los ápices de hifas maduras. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de escaneo por láser de las cepas marcadas con proteínas fluorescentes en hifas maduras de *N. crassa*. (A) YFP-CDC-42, se localiza asociada a la membrana plasmática formando una capucha cortical; (B) YFP-RAC, se localiza asociada a membrana plasmática formando un anillo cortical; (C) GFP-CDC-24, se localizó ocupando una posición estratégica dentro del domo apical, confinándose como una amplia media luna en el ápice, cubriendo el patrón de localización de ambas GTPasas CDC-42 y RAC, así mismo se ubicó CDC-24 rodeando al Spk. (D) Serie de tiempo mostrando la colocalización de la proteína CDC-24 con el colorante FM4-64. Las flechas, indican la acumulación de CDC-24 en el citosol, observándose la exclusión del núcleo del Spk. Tiempo en min:seg.

6.4.3 CDC-42 y RAC participan en la formación del septo en hifas maduras de *N. crassa*

Se realizó la captura de series de tiempo por el canal de fluorescencia para determinar si estas proteínas estaban involucradas con la formación de septos. Las GTPasas CDC-42 y RAC son observadas durante la formación del septo (Figura 16), no obstante para el caso del GEF CDC-24 no se pudo detectar fluorescencia durante este proceso de la morfogénesis del hongo *N. crassa*, lo cual indica que CDC-24 no participa en la formación de septos.

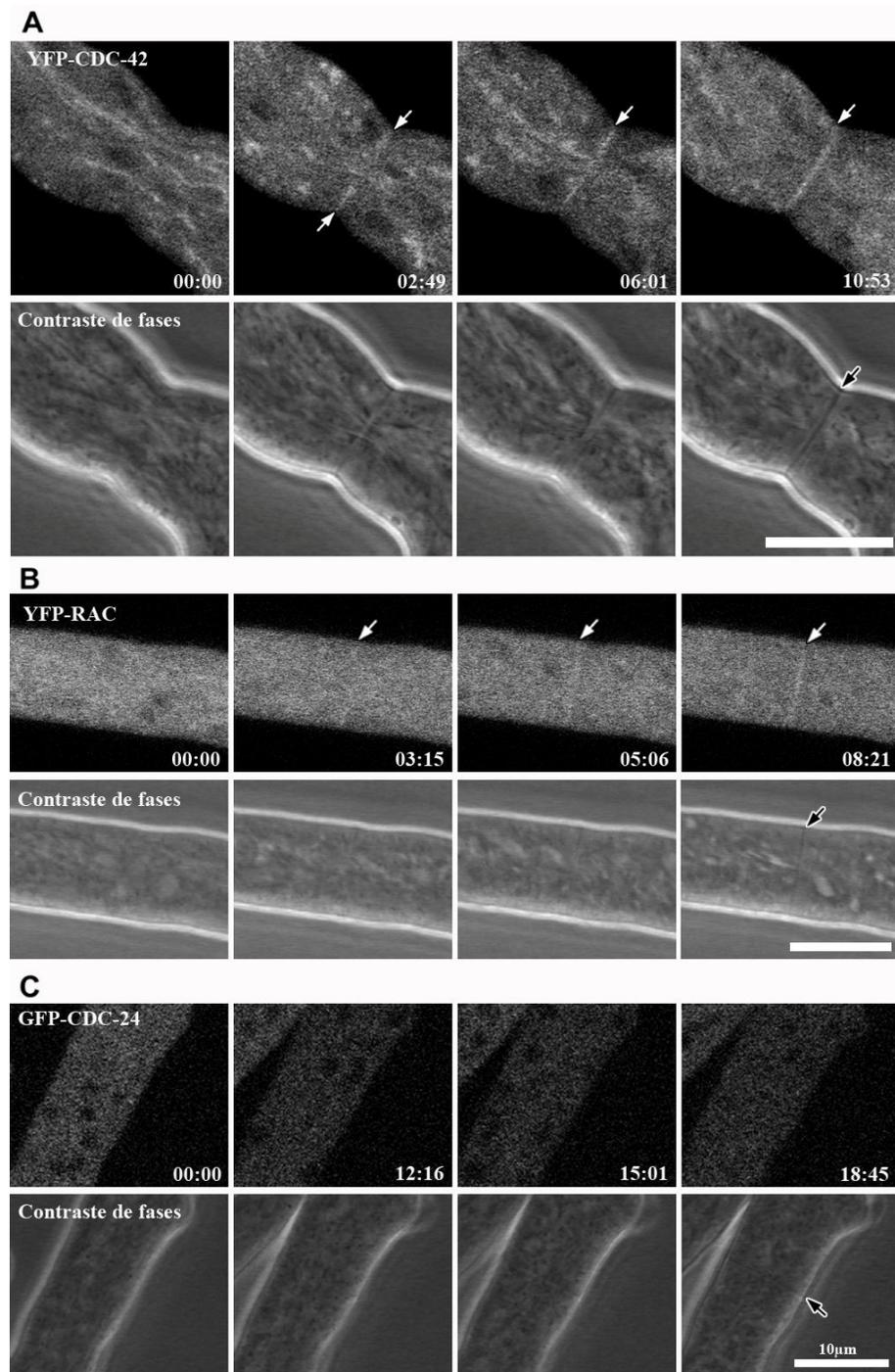


Figura 16. CDC-42 y RAC se localizan en los septos. Series de tiempo mediante microscopía confocal durante la formación de septos en hifas maduras de *N. crassa* en las cepas (A) YFP-CDC-42, (B) YFP-RAC, (C) GFP-CDC-24. Flecha blanca, indica la formación de un septo detectado por el canal de fluorescencia; flecha negra, señala al mismo septo por contraste de fases. Tiempo en min:seg.

6.4.4 CDC-42 y RAC participan durante el proceso de formación de ramificaciones laterales en hifas maduras de *N. crassa*

Para este proceso de morfogénesis se analizaron alrededor de 10 diez series de tiempo para CDC-42, RAC y CDC-24. Se observó que CDC-42 y RAC son las que participan en la formación de ramas laterales. En una serie de tiempo (Figura 17) se visualiza claramente una ligera fluorescencia de ambas GTPasas en la membrana lateral de la región subapical de las hifas (Figura 17A, B), aproximadamente de 20 a 70 seg antes de la aparición de la nueva ramificación. Este hecho sugiere la participación de CDC-42 y RAC en el establecimiento de un nuevo sitio de polaridad.

Interesantemente, la acumulación de CDC-42 en los futuros sitios de ramificación fue aproximadamente ≥ 1 minuto antes de la emergencia de la ramificación lateral, mientras que RAC se localizó sólo ≤ 20 segundos antes. Ambas GTPasas mantienen su localización dentro del ápice celular de las ramificaciones recién formadas con un comportamiento altamente dinámico. Por otra parte, curiosamente RAC fue observada en forma creciente a lo largo del domo apical de la rama recién formada (Figura 17B), mostrando un patrón de localización diferente a lo observado en hifas maduras. Sin embargo, una vez que la ramificación alcanzó una longitud aproximada entre 20 a 30 μm , RAC adoptó la distribución de anillo subapical como se observa en hifas maduras. CDC-42 también mostró en las nuevas ramificaciones una distribución más amplia, en comparación a la hifa madura.

En contraste a CDC-42 y RAC, el GEF CDC-24 no se detectó como una acumulación cercana a la membrana plasmática, sino que la fluorescencia fue observada de manera difusa ocupando el domo apical de la nueva rama (Figura 17C; tiempo 1:39). Esta acumulación en la punta, fue detectada una vez que la nueva ramificación alcanzó aproximadamente 10 μm de longitud (Figura 17C).

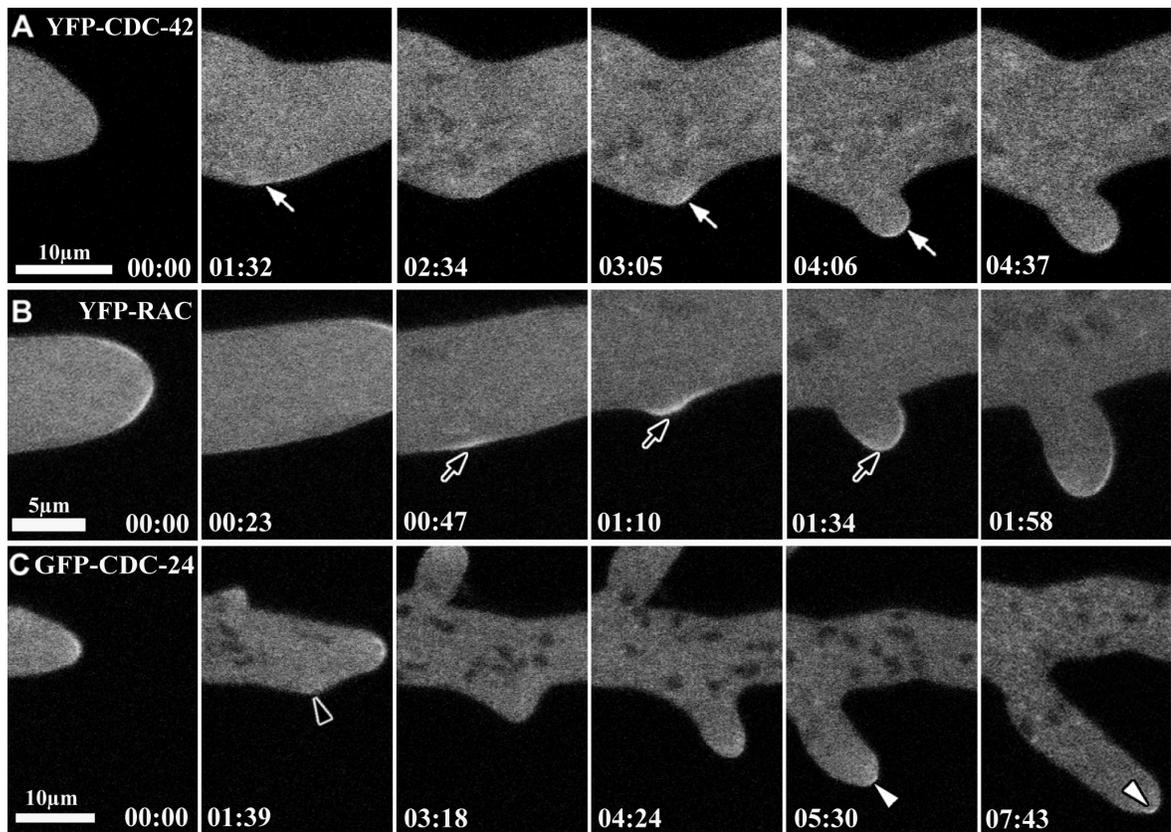


Figura 17. CDC-42 y RAC participan en la emergencia de ramificaciones laterales. Series de tiempo tomadas por microscopía confocal de escaneo con láser de las cepas YFP-CDC-42, YFP-RAC, GFP-CDC-24 de *N. crassa* durante la emergencia de ramificaciones laterales. (A-B) CDC-42 y RAC se acumulan en la región subapical de la membrana plasmática, antes de la presencia de una nueva ramificación y después del establecimiento de un nuevo eje de polaridad celular, ambos eventos se indican con las flechas blancas y negras respectivamente. (C) Cabeza de flecha negra, señala que CDC-24 no se detectó cerca de la membrana plasmática; cabeza de flecha blanca, indica una acumulación citoplasmática de CDC-24 que ocupa el domo apical en un nuevo sitio de polaridad celular. Tiempo en min:seg.

6.4.5 Localización del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 en germínulas de *N. crassa*

Durante la fase de hidratación, YFP-CDC-42 se acumuló en una región discreta del conidio, donde marca el futuro sitio de emergencia del tubo germinativo, mientras que YFP-RAC, se observó en el conidio como puntos brillantes citosólicos. No obstante, la acumulación de RAC en la membrana plasmática se localizó hasta después que ocurrió la polarización celular y por ende la formación de un tubo germinativo (Figura 18A). GFP-CDC-24, en primera instancia fue observada como pequeñas acumulaciones citosólicas y en algunas ocasiones acumulada en la corteza celular del conidio. Sin embargo, la localización bien definida de GFP-CDC-24 en el ápice de tubos germinativos fue visible cuando el tubo germinal alcanzó alrededor de 2 a 3 micras de longitud.

Durante la extensión apical de las germínulas, ambas GTPasas YFP-CDC-42 y YFP-RAC fueron acumuladas en general en la membrana plasmática, cubriendo un área apical de 5 a 10 μm (Figura 18B). A diferencia de CDC-42 y RAC, CDC-24 se observó acumulada en la región apical del tubo germinativo como una nube (Figura 18A), que posteriormente se asoció a la membrana plasmática del ápice celular (Figura 18B). Al igual que en hifas maduras, en germínulas, sólo las proteínas CDC-42 y RAC se detectaron en septos. La falta de acumulación de CDC-24 en septos sugiere que CDC-24 no participa en el proceso de formación de septos en diferentes etapas del crecimiento vegetativo de *N. crassa*, germinación y crecimiento.

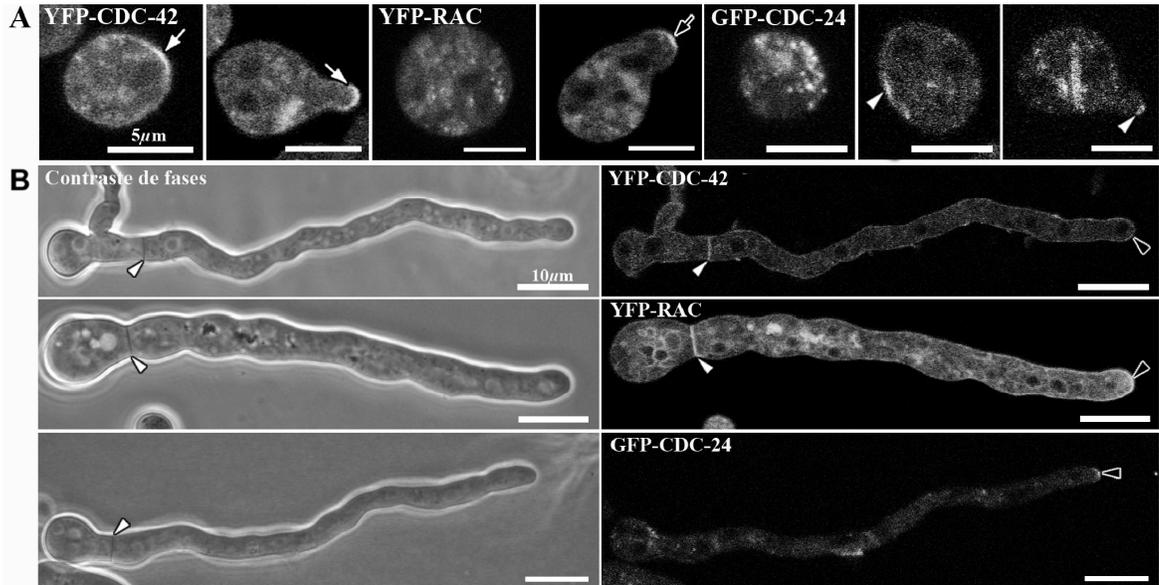


Figura 18. CDC-42, RAC y CDC-24 muestran distintos patrones de localización durante la germinación de *N. crassa*. (A) Imágenes tomadas en el canal de fluorescencia muestran la localización de YFP-CDC-42, YFP-RAC y GFP-CDC-24 durante la germinación de esporas y emergencia del tubo germinativo. Flechas blancas, indican la presencia de YFP-CDC-42 en una región discreta de la espora indicando un nuevo sitio de polarización celular, así mismo, se muestra que CDC-42 continúa presente en el domo apical durante la emergencia del tubo germinativo; flecha negra, señala la localización de YFP-RAC durante la elongación del tubo germinativo; cabezas de flechas blancas, indican la localización de GFP-CDC-24 en una región discreta de la espora y durante la elongación del tubo germinativo. (B) Imágenes por contraste de fases y por fluorescencia, muestran la localización de YFP-CDC-42, YFP-RAC y GFP-CDC-24 en germínulas de *N. crassa*. Observar que CDC-42 y RAC están presentes en los sitios de septación en germínulas, sin embargo CDC-24 no fue detectado durante este proceso. Cabezas de flechas blancas, muestran la formación del septo por contraste de fases y por el canal de fluorescencia; cabezas de flechas negras, señalan la localización de YFP-CDC-42, YFP-RAC y GFP-CDC-24 en el ápice de las germínulas.

6.5 El módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 es independiente del citoesqueleto en *N. crassa*

El papel que desempeña el citoesqueleto en la morfogénesis fúngica ha sido estudiado en diversos hongos (Kaminskyj y Heath, 1996; Xiang y Plamann, 2003). El citoesqueleto regula la morfogénesis celular a través del control de la polaridad celular, endocitosis, exocitosis, septación y la organización del transporte intracelular por su asociación con proteínas específicas (Harris y Momany, 2004; Harris, 2006; Steinberg, 2007a; 2007b; Banuett *et al.*, 2008; Bornens, 2008; Fischer *et al.*, 2008; Harris, 2008; Sudbery, 2008; Rittentour *et al.*, 2009; Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2010; Justa-Schuch *et al.*, 2010). La interrupción del citoesqueleto en células fúngicas por el uso de agentes químicos como la citocalasina, latrunculina y benomilo, han confirmado que el citoesqueleto es requerido para un crecimiento apical normal (McGoldrick *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997; Torralba *et al.*, 1998; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006; McDaniel y Roberson, 2000; Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

Para explorar si los tres componentes del módulo de GTPasas localizan en el ápice celular de manera dependiente del citoesqueleto, las hifas maduras de *N. crassa* fueron expuestas a benomilo (Figura 19A), una droga que despolimeriza los microtúbulos, así como también, a citocalasina-A (Figura 19B), la cual despolimeriza los microfilamentos de actina. Cuando las hifas fueron expuestas a estos fármacos, las tres proteínas CDC-42, RAC y CDC-24 se mantuvieron asociadas al ápice celular de las hifas, a pesar del daño severo que provocaron las drogas. Los efectos que produjeron estas drogas fue la presencia de un crecimiento irregular de las hifas, así como la pérdida de la polaridad respectivamente (Figura 19). Estos resultados demuestran que la preservación de las tres proteínas en los ápices celulares es independiente a la funcionalidad del citoesqueleto de actina y del citoesqueleto microtubular en *N. crassa*.

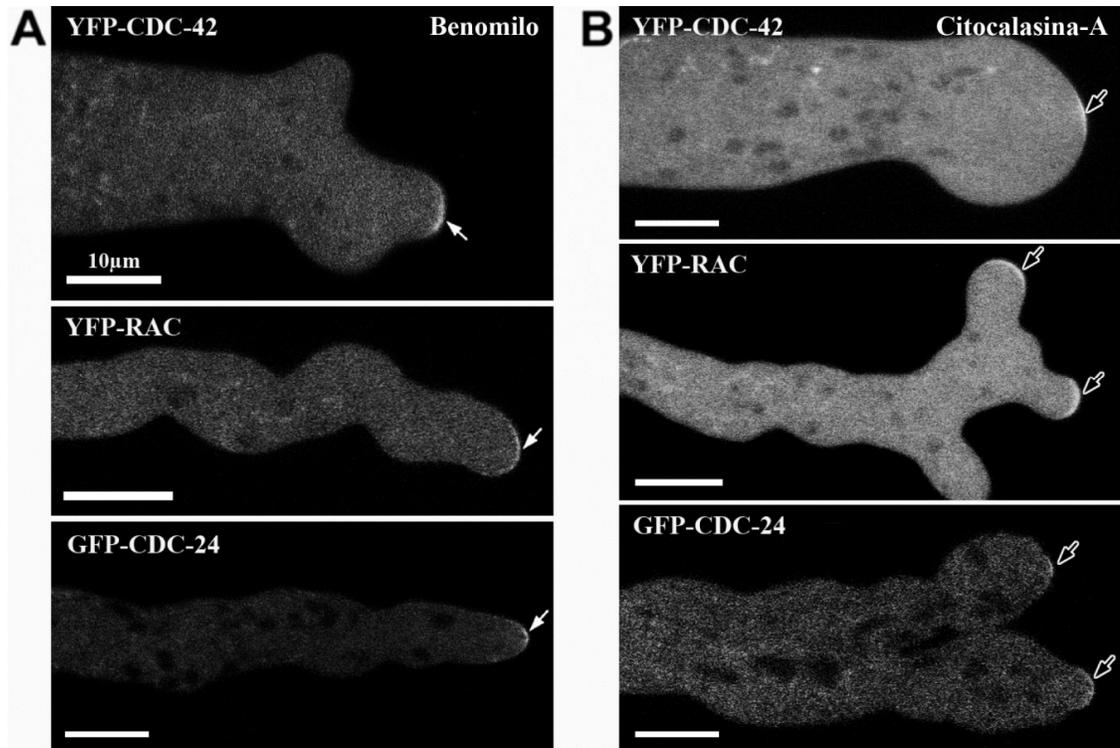


Figura 19. La localización de CDC-42, RAC y CDC-24 en la membrana plasmática no es afectada por la interrupción del citoesqueleto de actina o citoesqueleto microtubular. (A) Imágenes confocales de hifas vegetativas de *N. crassa* tratadas con $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de benomilo. **(B)** Hifas vegetativas de *N. crassa* tratadas con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de citocalasina-A. Observar que las hifas muestran una morfología distorsionada a causa de la presencia de ambos inhibidores. Las flechas señalan la presencia de YFP-CDC42, YFP-RAC y GFP-CDC-24 en los ápices celulares.

6.6 Obtención de los vectores recombinantes pCAP42.1, pCAP42.2, pCAP24.1 y pCAP24.2

Utilizando los oligonucleótidos Cdc42-F/Cdc42-R y Cdc24-F/Cdc24-R, así como DNA genómico de *N. crassa* cepa #988 como cadena patrón, se logró amplificar mediante PCR un fragmento de 1,009pb para *cdc-42* y otro fragmento de 3,214pb para *cdc-24* respectivamente (Figura 20); así mismo en cada una de las reacciones de PCR no se observaron amplificaciones inespecíficas, por lo que ambos amplicones fueron purificados para realizar la construcción de los vectores recombinantes.

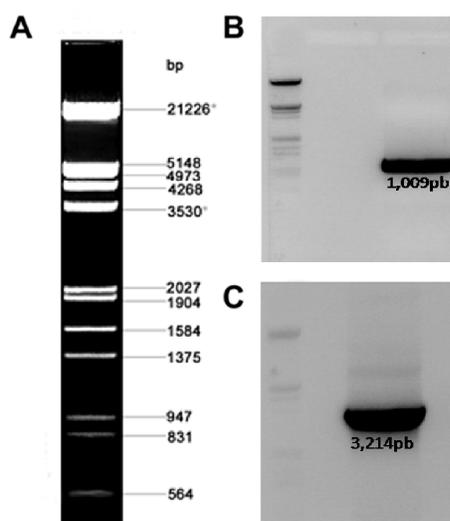


Figura 20. Obtención de los fragmentos de *cdc-42* y *cdc-24* por PCR de alta fidelidad. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. (A) Imagen de DNA del fago λ digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular indicando el tamaño en pares de bases. (B) Banda obtenida para *cdc-42*. (C) Fragmento obtenido para *cdc-24*.

La construcción de los vectores recombinantes pCAP42.1, pCAP42.2, pCAP24.1 y pCAP24.2, se llevó a cabo tras digerir cada uno de los amplicones de *cdc-42* y *cdc-24* respectivamente, así como de los vectores de clonación pMF272 ó pJV15.2 con las enzimas de restricción específicas (Figura 21). Los productos obtenidos de la digestión fueron

purificados y unidos mediante una reacción de ligación para después ser transformados por choque térmico en células bacterianas de *E. coli* DH5 α químicamente competentes.

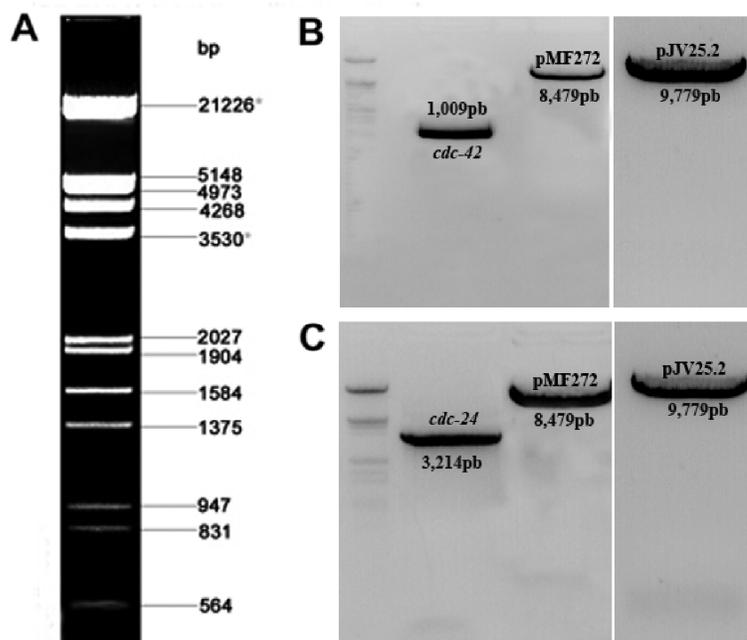


Figura 21. Análisis de restricción de los fragmentos *cdc-42*, *cdc-24* y del vector de clonación pMF272 y pJV15.2. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. (A) DNA del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular; (B) gel de agarosa mostrando los fragmentos de 1,009pb para *cdc-42*, 8,479pb correspondiente a pMF272 y 9,779pb para pJV15.2; (C) gel de agarosa revelando la presencia de tres bandas, una de 3,214pb que fue de *cdc-24*, otra de un tamaño de 8,479pb que fue del vector de clonación pMF272 y una de 9,779pb del vector pJV15.2.

Posterior a la transformación genética, las transformantes presuntivamente positivas al crecer en medio LB sólido con ampicilina, fueron sometidas a un ensayo de PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para cada una de las secuencias de interés (Tabla II) para amplificar los fragmentos correspondientes de *cdc-42* y *cdc-24* (Figura 22) contenidos tanto en pMF272 como en pJV15.2. La figura 22B nos muestra el resultado de la PCR de colonia de *cdc-42* contenida tanto en el vector pMF272, mostrando que 7 de las clonas

sometidas a este ensayo, sólo 6 amplificaron el fragmento de 1,009pb que corresponde para *cdc-42*. En la figura 22C, podemos observar que entre 10 de las clonas seleccionadas, 9 de ellas mostraron el tamaño esperado de *cdc-42* contenido en pJV15.2. Por otra parte, la figura 22D y E muestran el resultado que se obtuvo para *cdc-24* contenida en los vectores de clonación pMF272 y pJV15.2 respectivamente, mostrando un fragmento para ambos casos de 3,214pb. La imagen 22D muestra que sólo las clonas 2, 6 y 10 amplificaron para *cdc-42* en pMF272 y en la figura 22E los carriles 1, 6 y 10 fueron los positivos para *cdc-42* en pJV15.2.

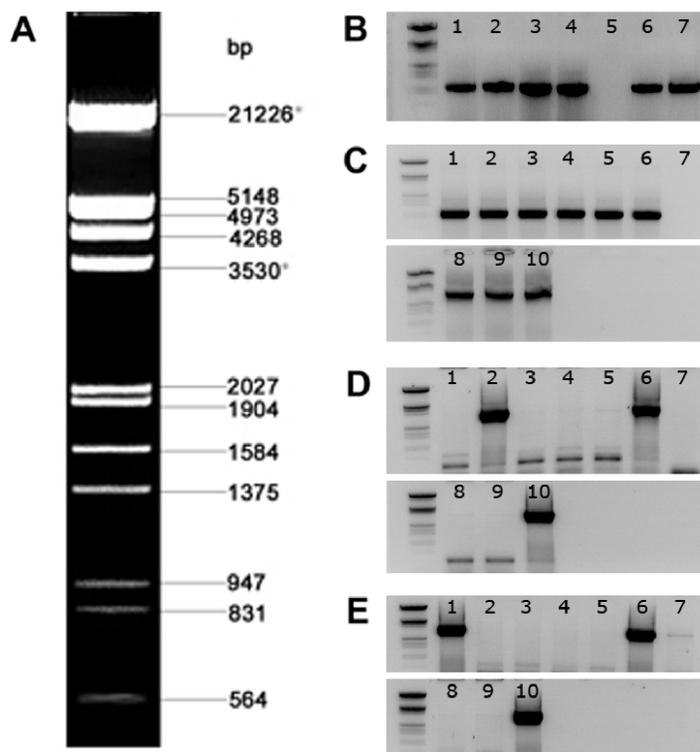


Figura 22. Resultado obtenido de la PCR de colonia de *cdc-42* y *cdc-24* integrados a los vectores pMF272 y pJV15.2. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. (A) DNA del fago λ digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular mostrando el tamaño de cada banda en pares de bases; (B) PCR de colonia para *cdc-42* (1,009pb) en pMF272; (C) PCR de colonia de *cdc-42* (1,009pb) en pJV15.2; (D) PCR de colonia para *cdc-24* (3,214pb) contenido en pMF272; (E) PCR de colonia de *cdc-24* (3,214pb) en pJV15.2.

Las clonas que dieron positivo en esta prueba, se procesaron para extraer DNA plasmídico y los plásmidos fueron sometidos a un perfil de restricción con enzimas específicas con la finalidad de corroborar la integración de los insertos respectivos en los vectores recombinantes correspondientes. Los resultados obtenidos de este análisis un patrón de restricción conservado indicativo de que cada uno de los fragmentos de *cdc-42* y *cdc-24* se

integraron correctamente dentro de los vectores pMF272 y pJV15.2, originando así pCAP42.1, pCAP42.2, pCAP24.1 y pCAP24.2 (Figura 23).

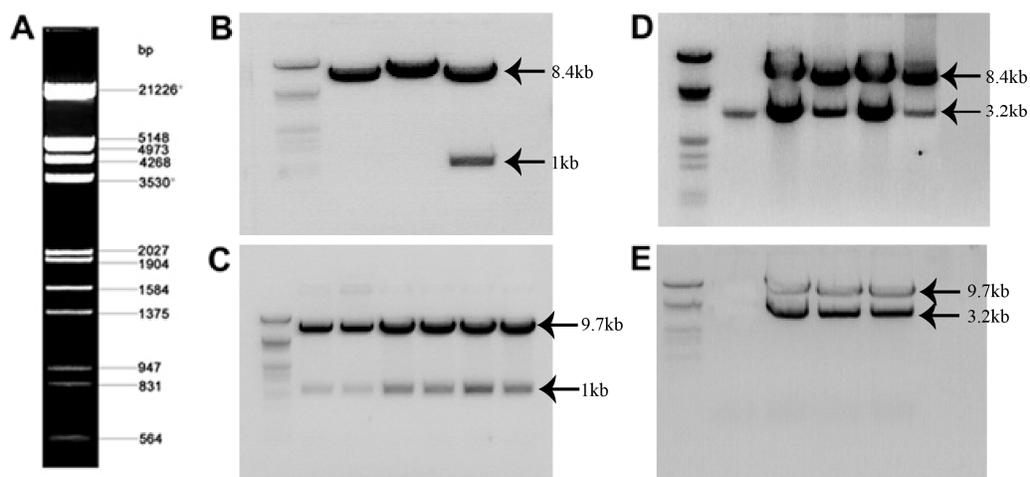


Figura 23. Patrones de restricción de los vectores recombinantes pCAP42.1, pCAP42.1, pCAP24.1 y pCAP24.2. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. **(A)** DNA del fago lambda (λ) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular donde se muestra el tamaño de cada banda en pares de bases. **(B)** Muestra la comprobación de la presencia del inserto *cdc-42* en pMF272. **(C)** Comprobación de la integración de *cdc-42* en pJV15.2. **(D)** Demostración de la integración de *cdc-24* en el vector recombinante pMF272. **(E)** Comprobación de la integración de *cdc-24* en el cassette pJV15.2.

6.7 CDC-42 y CDC-24 se localizan en la región central del Spitzenkörper al ser etiquetadas en el extremo C-terminal.

6.7.1 Análisis intracelular de la proteína CDC-42-mCherryFP en hifas maduras de *N. crassa*.

La proteína Rho, CDC-42 fue etiquetada en su extremo C-terminal después del motivo CAAX con la proteína GFP y con la proteína mChFP, así que su análisis mediante microscopía confocal de escaneo con láser, permitió determinar la localización de la proteína CDC-42 en hifas maduras en crecimiento de *N. crassa*. La fluorescencia que presentó dicha proteína con su etiquetamiento en el C-terminal en las hifas maduras, fue localizada en la zona central del Spk (Figura 24A).

Una vez visualizada la localización de la Rho CDC-42 en el ápice celular de las hifas maduras de *N. crassa*, se realizó la captura de series de tiempo para determinar si CDC-42 con la etiqueta en el C-terminal participa en la formación del septo. CDC-42 participa durante la formación del septo; ésto puede ser evidenciado en la figura 24B (a-e) donde se muestra que al tiempo de 2 minutos aproximadamente, el acúmulo de CDC-42-mChFP participa durante las primeras etapas de la formación del septo; no obstante, alrededor de 12 minutos CDC-42-mChFP ya se localizaba en todo el septo, indicando la formación completa del tabique. Sin embargo la localización de CDC-42 en esta estructura no es permanente, ya que al tiempo de 30 minutos la fluorescencia iniciaba a desvanecerse del septo (Figura 24B (k-o)). Cabe mencionar que el etiquetamiento de CDC-42 se realizó tanto con la GFP como con la mChFP y ambos etiquetamientos mostraron el mismo patrón de localización, sin embargo en esta sección sólo se muestran los resultados obtenidos con el marcaje de la mChFP.

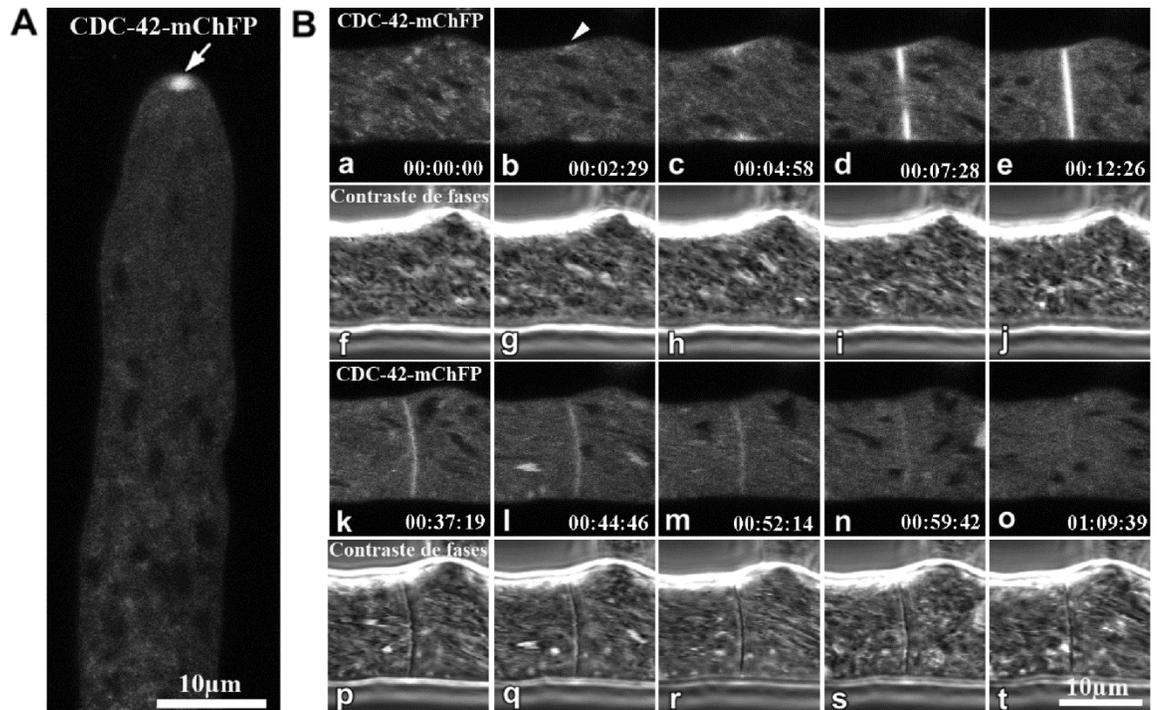


Figura 24. CDC-42 se localiza en los ápices de hifas maduras en crecimiento. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de escaneo con láser de la cepa marcada con la proteína mCherry fluorescente en hifas maduras de *N. crassa*. (A) CDC-42-mChFP se localiza formando un agregado que coincide con la región central del Spk. Flecha blanca, señala la ubicación de CDC-42-mChFP en el ápice de la hifa. (B) Serie de tiempo mostrando la formación del septo en hifas maduras de *N. crassa*. (a-e; k-o) Imágenes obtenidas por el canal de fluorescencia mostrando el inicio la formación del septo; (f-j; p-t) imágenes por contraste de fases mostrando la formación del septo. Cabeza de flecha, indican la formación del septo por el canal de fluorescencia. Tiempo en h:min:seg.

6.7.2 Análisis intracelular de la proteína CDC-24-mCherryFP en hifas maduras de *N. crassa*.

El GEF CDC-24 al igual que la Rho-GTPasa CDC-42, fue etiquetado en el extremo C-terminal cercano al dominio PB1 donde ocurre la interacción proteína-proteína. Este dominio en *N. crassa* se localiza a 6 aminoácidos del C-terminal. El etiquetamiento se realizó tanto con la GFP como con la mChFP. En hifas maduras de *N. crassa* CDC-24 se localizó en la región central del Spk (Figura 25A). Así mismo, también fue posible observar CDC-24-mCherryFP en las regiones donde ocurre la formación del septo (Figura 25B), sin embargo, no ocurre así con GEF-CDC-24. Cabe señalar que este patrón de localización es muy similar al que mostró CDC-42 etiquetada en el C-terminal.

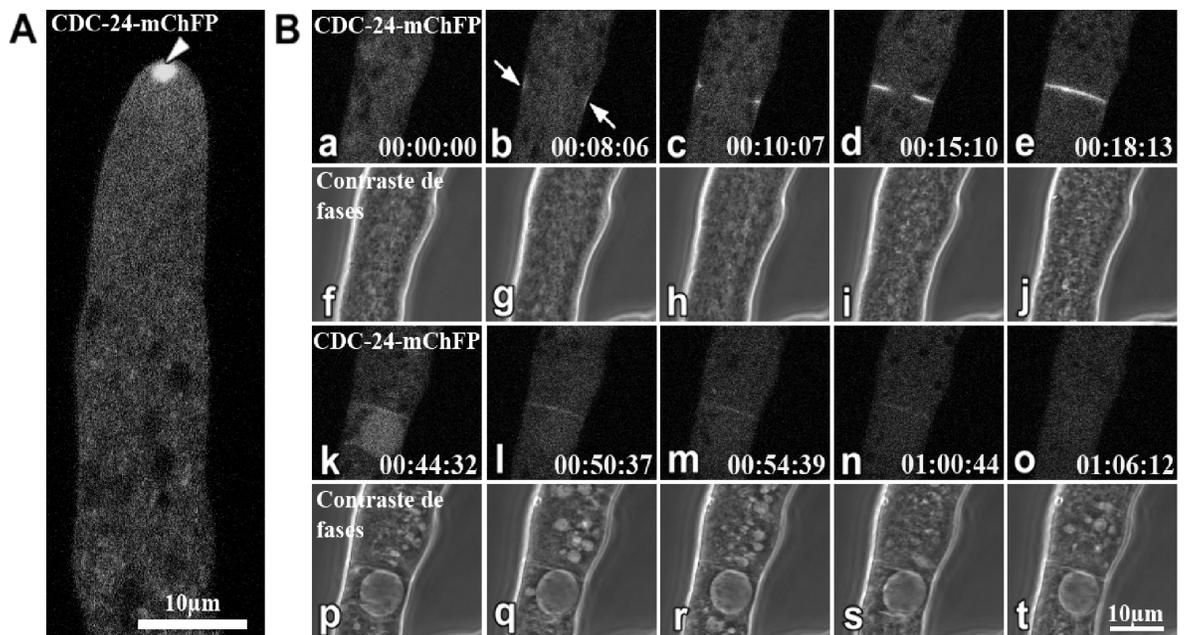


Figura 25. CDC-24 se localiza en el ápice celular. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de escaneo con láser de la cepa marcada con la proteína mCherry fluorescente en hifas maduras de *N. crassa*. (A) CDC-24-mChFP se localiza en la región central del Spk. Cabeza de flecha, señala la ubicación de CDC-24-mChFP en el ápice de la hifa. (B) Imágenes obtenidas de una serie de tiempo por el canal de fluorescencia mostrando el inicio de la formación del septo en hifas maduras de *N. crassa*. (a-e; k-o) e imágenes por contraste de fases mostrando la formación del septo (f-j; p-t). Flechas, indican el inicio de la formación del septo. Tiempo en h:min:seg.

6.8 CDC-42 participa durante el proceso de formación de ramificaciones laterales.

Para analizar esta etapa de la morfogénesis del hongo filamentoso *N. crassa*, se realizó la captura de series de tiempo mediante microscopía confocal de escaneo con láser, observándose que CDC-42 participa en la formación de ramificaciones laterales. En las series de tiempo presentadas en esta sección, se visualiza claramente una ligera fluorescencia de CDC-42 cerca de la membrana plasmática de la región subapical de las hifas (Figura 26A-B), aproximadamente de 20 a 30 seg antes de la aparición de los nuevos ejes en crecimiento. Este hecho, si lo comparamos con el etiquetamiento de CDC-42 en el N-terminal, sugiere que el etiquetamiento de CDC-42 en el extremo C-terminal es viable, ya que no es afectada su participación en este proceso de la morfogénesis del hongo *N. crassa*.

Interesantemente, la acumulación de CDC-42 en los nuevos ejes de polarización está asociada a membrana plasmática; sin embargo, posteriormente CDC-42 se localiza como pequeños parches dentro de los ápices de las nuevas ramificaciones, conservando su localización en la parte central del Spk. En contraste a CDC-42, el factor de intercambio de guanosinas CDC-24 no se detectó como una acumulación cercana a la membrana plasmática, sino que la fluorescencia fue observada cuando la nueva rama alcanzó una longitud aproximada entre 29 a 30 μ m (Figura 26C), ocupando el domo apical de este nuevo eje de crecimiento subapical.

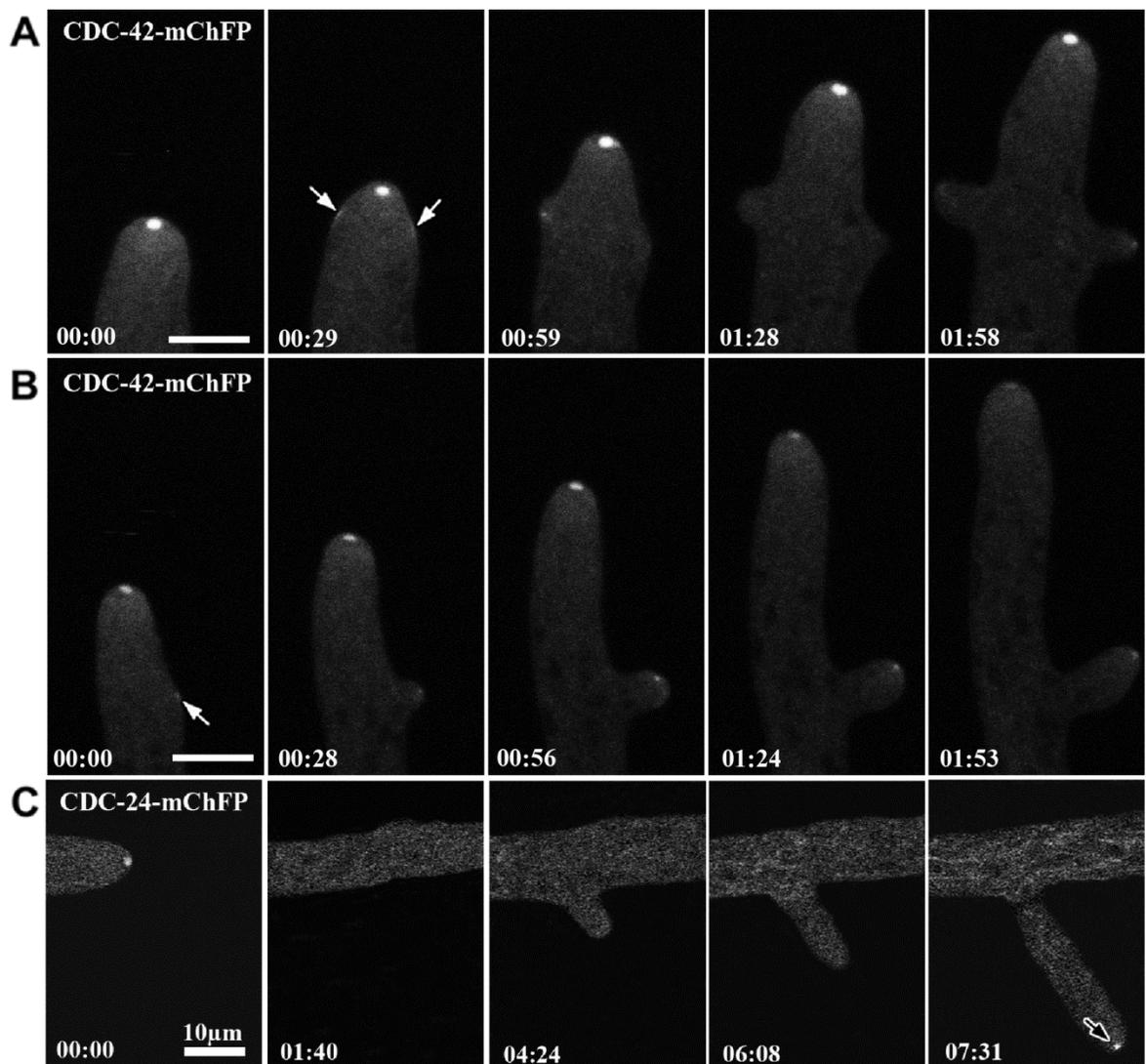


Figura 26. CDC-42 participa en la iniciación de la emergencia de ramificaciones laterales. Serie de tiempo obtenida mediante microscopía confocal de escaneo con láser de las cepas CDC-42-mChFP y CDC-24-mChFP de *N. crassa* durante la emergencia de ramificaciones laterales. (A-B) CDC-42 se acumula en la región subapical de la membrana plasmática, antes de la presencia de una nueva ramificación y después del establecimiento del nuevo eje de polarización se acumula dentro del ápice celular. (C) CDC-24 sólo se observa acumulada en la ramificación lateral después de haber alcanzado entre 29 a 30 micras de longitud. Flechas blancas, señalan la localización de CDC-42 en la membrana de la hifa; flecha negra, indica la acumulación de CDC-24 que ocupa dentro del ápice en la rama lateral. Tiempo en min:seg.

6.9 CDC-42 es una proteína funcional en hifas maduras de *N. crassa*

Para determinar si el marcaje de la proteína Rho CDC-42 en el C-terminal es funcional en el hongo filamentoso *N. crassa*, se realizó una cruce entre la cepa $\Delta cdc-42$ y la cepa *cdc-42-mCherryfp*. El resultado de dicha cruce dió como progenie una cepa con genotipo *his-3⁺::pccg-1::cdc-42⁺::mchfp⁺; $\Delta cdc-42::hph^R$* a. Como se reportó anteriormente, la cepa $\Delta cdc-42$ presenta una morfología compacta a nivel de colonia (Figura 27A), misma que al ser analizada a bajo aumento, mostró irregularidades severas en las hifas (Figura 27B). De la misma forma al analizar a alto aumento las hifas de la cepa $\Delta cdc-42$ teñidas con el fluorocromo FM4-64 (Figura 27C) se mostraron hifas hinchadas con los septos cercanos uno del otro y con ramificaciones abultadas que crecieron en forma isotrópica. Una vez obtenida la progenie de la cruce genética, estas anormalidades desaparecieron, ya que las hifas de la cepa complementada mostraron una morfología muy similar a la cepa silvestre y a la cepa *cdc-42-mCherryfp*. Con respecto a la localización de CDC-42, ésta se observó en la parte central del Spk (Figura 27D), en septos y en los sitios de ramificación como se mostró en la cepa *cdc-42-mCherryfp*. Así mismo, se evaluaron las tasas de crecimiento de las tres cepas (silvestre, *cdc-42-mCherryfp* y complementada) obteniendo resultados muy parecidos. La cepa silvestre mostró una tasa de $0.91 \pm 0.1 \mu\text{m seg}^{-1}$, la cepa *cdc-42-mCherryfp*, presentó una tasa de $0.96 \pm 0.03 \mu\text{m seg}^{-1}$ y finalmente la cepa complementada, mostró una tasa de crecimiento de $0.97 \pm 0.08 \mu\text{m seg}^{-1}$. Estos resultados tanto de localización como el análisis de las tasas de crecimiento, sugieren que el etiquetamiento de CDC-42 con mCherryFP en el C-terminal es funcional, a pesar que su localización sea en vesículas y no en membrana plasmática como se ha reportado en hongos filamentosos.

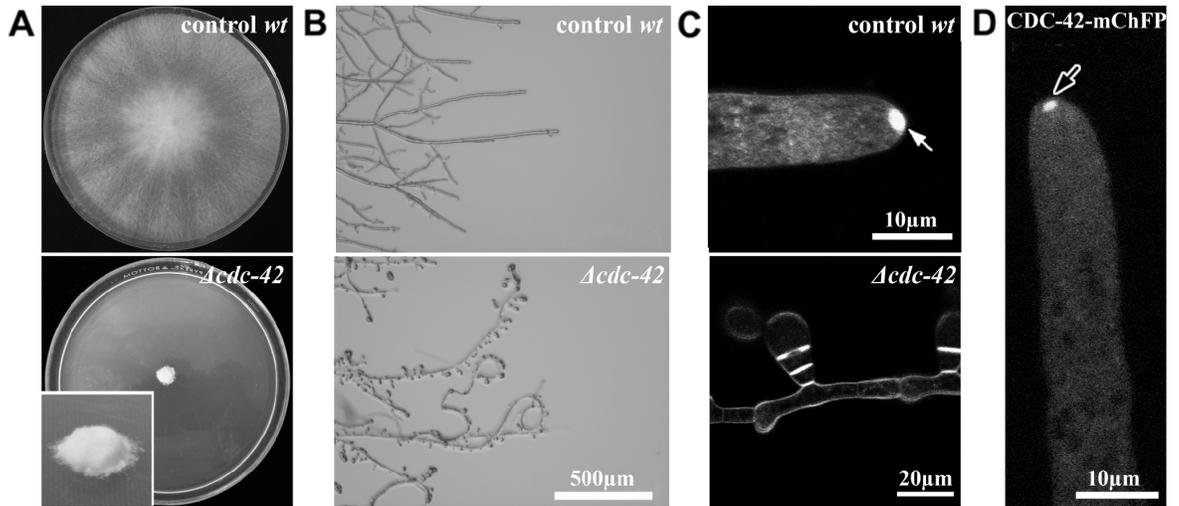


Figura 27. La cepa *cdc-42::mchfp* restablece la polaridad de la cepa *Δcdc-42*. (A) Colonias fúngicas de la cepa silvestre (*wt*) y *Δcdc-42*. *Δcdc-42* muestra una colonia compacta comparada con la cepa control. (B) Análisis a baja resolución de las hifas de las cepas *wt* y *Δcdc-42*, la última cepa muestra una morfología afectada con ramificaciones laterales hinchadas. (C) Análisis a alto aumento de hifas maduras de las cepas *wt* y *Δcdc-42* teñidas con el colorante FM4-64. La cepa *Δcdc-42* muestra defectos en la morfología de la hifa, ramificaciones y septos muy cercanos unos con otros. (D) Cepa derivada de la cruce genética *Δcdc-42* y *cdc-42::mcherryfp*, mostrando la complementación de la mutación. Flecha blanca, indica la presencia del Spk teñido con FM4-64; flecha negra, señala la acumulación de CDC-42 etiquetada en el C-terminal con la mChFP.

6.10 Localización de CDC-42 y CDC-24 etiquetadas en el C-terminal en germínulas de *N. crassa*

En la figura 28, se muestran las distintas etapas que el hongo *N. crassa* presenta. Durante la fase de hidratación y crecimiento isotrópico, proceso que duró entre 3 y 4 horas de incubación, CDC-42-mChFP y CDC-24-mChFP se acumularon en el citoplasma en forma de agregados, sin mostrar una localización específica que indicara el marcaje de un nuevo sitio de polarización. Durante la fase de emergencia del tubo germinativo, entre 4 y 5 horas de incubación, CDC-42-mChFP pudo observarse muy cercano al ápice en forma de punto brillante citosólico, mientras que CDC-24-mChFP continuó localizándose a lo largo del citoplasma de la célula. En la fase de elongación del tubo germinativo, tanto CDC-42-mChFP como CDC-24-mChFP continuaron observándose en todo el citoplasma de la germínula. Sin embargo, muy cerca de la membrana plasmática de la región apical, se observaban pequeños parches. Una vez que las germínulas presentaron una longitud aproximadamente de $160 \pm 2\mu\text{m}$, CDC-42-mChFP fue observada a lo largo del citoplasma de la germínula en forma de parches. También se observó en sitios específicos como en septos y en forma de conglomerado citosólico dentro del ápice celular justo en el lugar que ocupa el Spk inmaduro en germínulas. Del mismo modo, en las germínulas que expresaban CDC-24-mChFP y que alcanzaron una longitud de $160\mu\text{m}$, CDC-24-mChFP sólo se observó dentro del domo apical como una nube citosólica altamente dinámica.

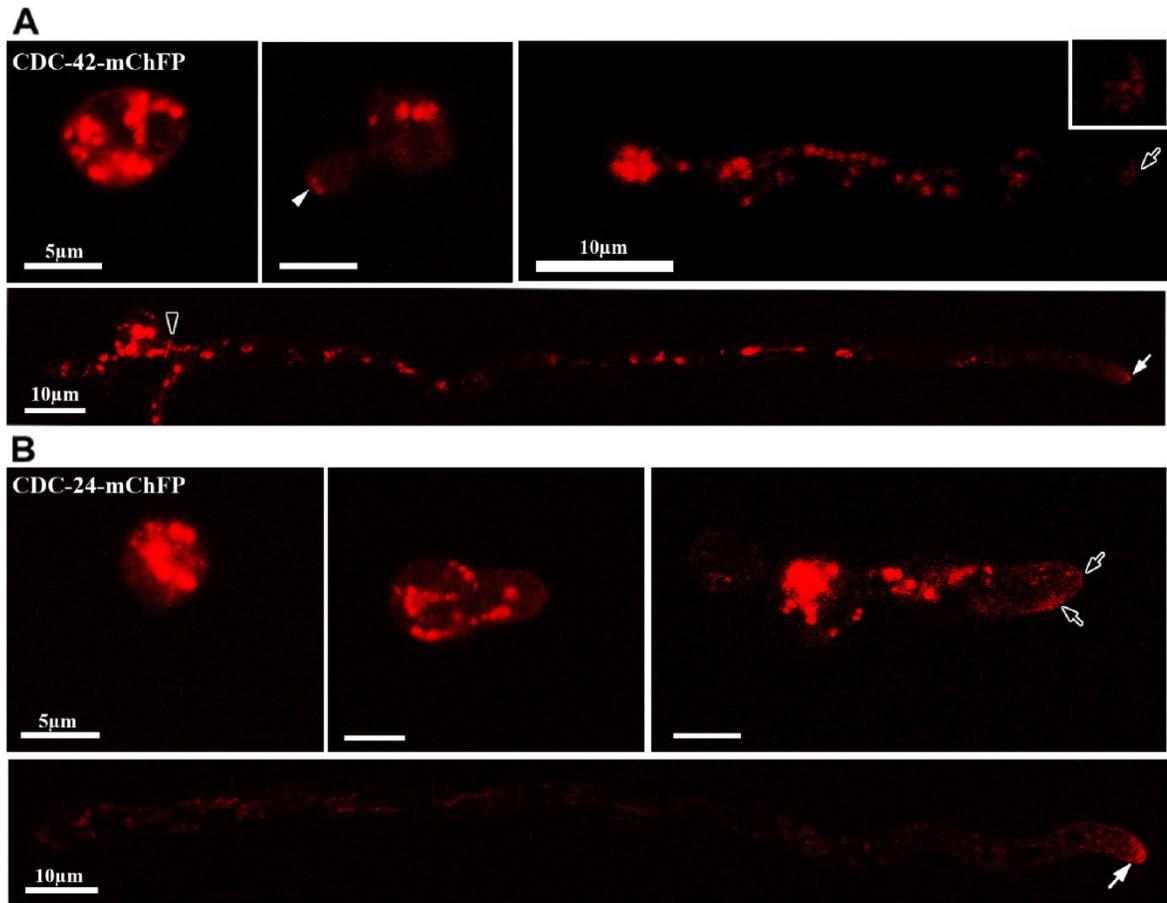


Figura 28. CDC-42 y CDC-24 muestran distintos patrones de localización en germinulas de *N. crassa*. Imágenes obtenidas por el canal de fluorescencia mediante microscopía confocal de escaneo con láser. **(A)** Distribución intracelular de CDC-42-mChFP durante la germinación de esporas, emergencia y elongación del tubo germinativo de *N. crassa*. Cabeza de flecha blanca, marca un agregado de CDC-42 durante la emergencia del tubo germinativo cerca del ápice de la germinula; flecha negra, muestra parches de CDC-42 durante la fase de elongación del tubo germinativo dentro del domo apical; cabeza de flecha negra, señala la presencia de CDC-42 en el septo; flecha blanca, indica a CDC-42 en el ápice de la germinula. **(B)** Localización intracelular de CDC-24-mChFP durante la germinación de *N. crassa*. Flechas negras, señalan la localización CDC-24 en forma de parches cerca de la membrana plasmática durante la elongación del tubo germinativo; flecha blanca, indica a CDC-24 en forma de nube citosólica dentro del domo apical.

6.11 Análisis molecular de las proteínas BUD-2 y BUD-5 en *N. crassa*

Para el ascomiceto *N. crassa* se encontraron los homólogos de *BUD2* y *BUD5* de *S. cerevisiae* después de haber realizado un análisis de cada una de las secuencias en la base de datos del instituto BROAD (www.broadinstitute.org). De acuerdo a la base de datos *bud-5* codifica para una proteína putativa denominada CDC-25 (control de la división celular) de 1,211 aminoácidos. El GEF BUD-5 posee en su extremo N-terminal dos variantes del dominio SH3 en la posición 73aa a la 128aa en la secuencia de aminoácidos, mientras que en dirección hacia el extremo C-terminal posee dos dominios GEF, uno de los cuales al igual que en *S. cerevisiae*, se denomina RasGEF N-terminal cuya posición es del aminoácido 795aa al 903aa y el dominio más cercano al extremo C-terminal simplemente se denomina RasGEF y se localiza en la posición 952aa al 1,189aa de la secuencia aminoacídica, mientras que BUD-2 codifica putativamente para una GAP (GTPasa activadora) de 1,477 aminoácidos. BUD-2 en *N. crassa*, posee en la la parte central de la secuencia un dominio C2 en la posición 667aa al 802aa, y un dominio RasGTPasa entre 780aa al 1,191aa de la secuencia de aminoácidos. Al realizar este análisis estructural en ambas proteínas, se llevó a cabo el etiquetamiento en el extremo C-terminal, que siguiendo el criterio en lo encontrado en la base de datos, no afectaría la localización intracelular de ambas proteínas en el hongo *N. crassa*.

6.12 Obtención de los vectores recombinantes pCAP2.1 y pCAP5.1

Utilizando los oligonucleótidos Bud2-F/Bud2-R y Bud5-F/Bud5-R, así como DNA genómico de *N. crassa* cepa #988 como templado, se logró amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de 4,446pb para *bud-2* y otro fragmento de 4,268pb para *bud-5* respectivamente (Figura 29). Cada uno de los amplificados fueron purificados mediante kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante para realizar la construcción de los vectores recombinantes.

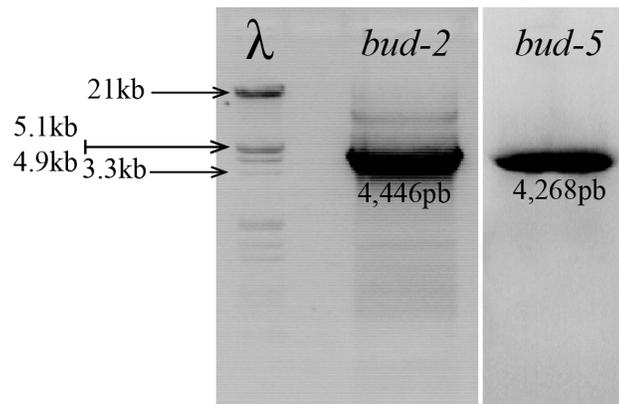


Figura 29. Obtención de los fragmentos de *bud-2* y *bud-5* por PCR de alta fidelidad. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$ mostrando los fragmentos obtenidos de *bud-2* y *bud-5*. λ , DNA del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular indicando el tamaño en pares de bases.

Obtenidos los amplicones correspondientes de *bud-2* y *bud-5*, se realizó un análisis de restricción, el cual se llevó a cabo tras digerir cada uno de los fragmentos de *bud-2* y *bud-5* respectivamente, así como de los vectores de clonación pJV15.2 y pMF272 con las enzimas de restricción *XbaI*- *PacI* (Figura 30). Los productos obtenidos de la digestión fueron purificados y unidos mediante una reacción de ligación para dar origen a los vectores recombinantes pCAP2.1 y pCAP5.1. Posteriormente, estos vectores fueron transformados por choque térmico en células bacterianas de *E. coli* DH5 α químicamente competentes.

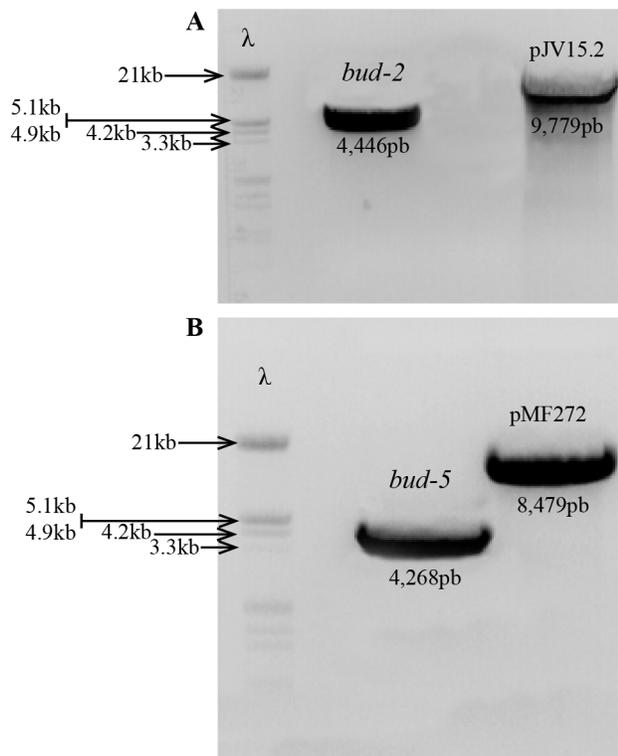


Figura 30. Análisis de restricción de los fragmentos *bud-2*, *bud-5* y de los vectores de clonación pJV15.2 y pM272. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. **(A)** Muestra los fragmentos de *bud-2* (4,446pb) y pJV15.2 (9,779pb). **(B)** Exhibe la presencia del amplicon de *bud-5* (4,268pb) y de una banda que corresponde al vector de clonación pMF272 (8,479pb). λ , corresponde a DNA del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular.

Después de la transformación genética de las células de *E. coli* con los vectores pCAP2.1 y pCAP5.1, las transformantes supuestamente positivas al crecer en medio LB sólido con antibiótico de selección, fueron sometidas a un ensayo de PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para cada una de las secuencias de interés (Tabla II), para amplificar los fragmentos correspondientes de *bud-2* y *bud-5* (Figura 31) contenidos tanto en pJV15.2 como en pMF272. La figura 31A, nos muestra los productos obtenidos mediante PCR de colonia de BUD-2 contenida en el vector pJV15.2, mostrando que 6 de las clonas sometidas a este ensayo, sólo 2 clonas amplificaron el fragmento de 4,446pb que

corresponde para BUD-2. Por otra parte, en la figura 31B se observa que todas las 6 clonas seleccionadas, mostraron el tamaño esperado de BUD-5 contenido en el plásmido pMF272.

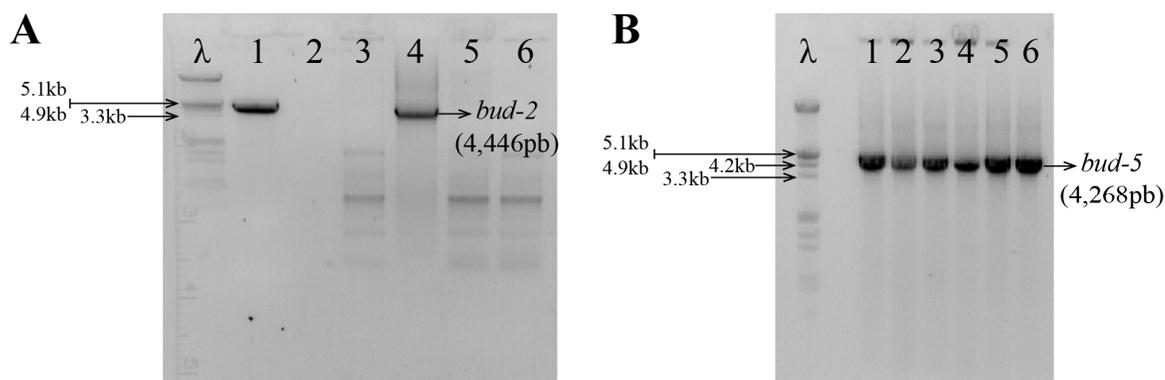


Figura 31. Resultado de la PCR de colonia para *bud-2* y *bud-5* integrados a los vectores de clonación pJV15.2 y pMF272. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. (A) PCR de colonia de *bud-2* (4,446pb) en pJV15.2; (B) PCR de colonia de *bud-5* (4,268pb) en pMF272. λ , indica DNA del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular.

Subsecuentemente, a las clonas que dieron positivo al ensayo de PCR de colonia, se les extrajo DNA plasmídico y fueron sometidos a un perfil de restricción con las enzimas *XbaI* - *PacI*, con la finalidad de corroborar la integración de los insertos respectivos en los vectores recombinantes correspondientes. Los resultados obtenidos en este análisis para *bud-2*, mostraron un patrón de restricción conservado indicativo de que el inserto *bud-2* se integró correctamente dentro del vector pJV15.2 (Figura 32A), por otra parte, las clonas que dieron positivo en el análisis de PCR para *bud-5*, sólo cuatro de ellas fueron sometidos

al análisis de restricción. El análisis de restricción reveló que las cuatro clonas seleccionadas liberaron el fragmento correspondiente para BUD-5 que corresponde a 4,268pb, de las cuales, la clona indicada con el número dos (Figura 32B) mostró un patrón de restricción adecuado.

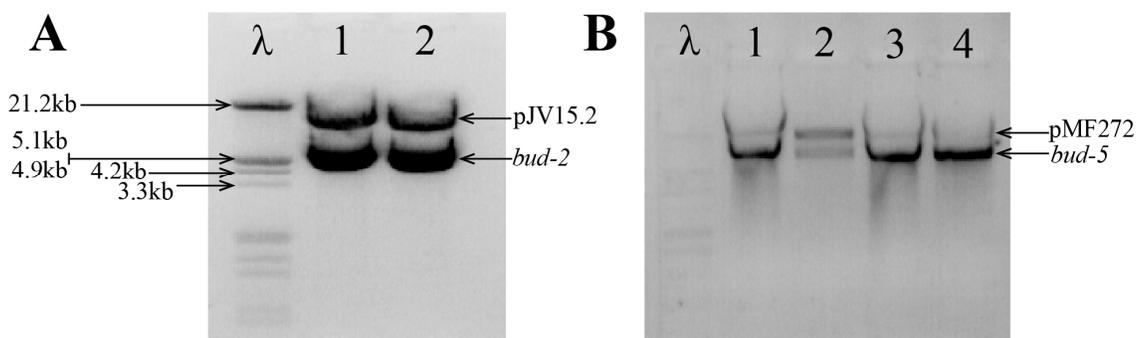


Figura 32. Patrones de restricción de los vectores recombinantes pCAP2.1 y pCAP5.1. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0.1\mu\text{g ml}^{-1}$. **(A)** Muestra el patrón de restricción de *bud-2* liberado del vector pJV15.2. **(B)** Comprobación de la integración de *bud-5* integrado en plásmido pMF272. λ , indica el DNA del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* – *HindIII* usado como marcador de peso molecular.

6.13 BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en hifas maduras de *N. crassa*

6.13.1 Análisis intracelular de las proteínas BUD-2 y BUD-5 en los ápices celulares de las hifas maduras de *N. crassa*.

La proteína GEF BUD-5 y la GAP BUD-2 fueron etiquetadas en su extremo C-terminal con la proteína GFP y con la proteína mChFP respectivamente, así que su análisis mediante microscopía confocal de escaneo con láser, permitió determinar la localización intracelular de las proteínas en hifas maduras en crecimiento de *N. crassa*.

La fluorescencia que presentó el GEF BUD-5 dentro de las hifas del hongo, fue localizada en el área apical en forma de conglomerado citosólico (Figura 33A), que al ser teñido con el colorante FM4-64 colocaliza parcialmente con la ubicación que ocupa el Spk dentro del domo apical. En la mayoría de las células analizadas, BUD-5-GFP adoptó una distribución más amplia dentro del domo apical, mientras que el colorante FM4-64, tiñó al agregado de vesículas que constituye al Spk como un amorfo cuerpo que parcialmente co-localiza con BUD-5-GFP (Figura 33A).

Por otra parte, la GAP BUD-2 al igual que la GEF BUD-5, fue etiquetada en el extremo C-terminal con la proteína mChFP, así que la ubicación intracelular de BUD-2 en hifas maduras de *N. crassa* fue localizado dentro del ápice celular, de una forma redondeada y de menor tamaño que la proteína BUD-5 presenta dentro de los ápices celulares de las hifas maduras del hongo *N. crassa*, por lo que la posición que presenta BUD-2 en la zona apical, coincide con la región central del Spk (Figura 33B). En general, estos resultados sugieren que la GEF BUD-5 y la GAP BUD-2 poseen distintos patrones de localización en los ápices de las hifas maduras del hongo filamentoso *N. crassa*.

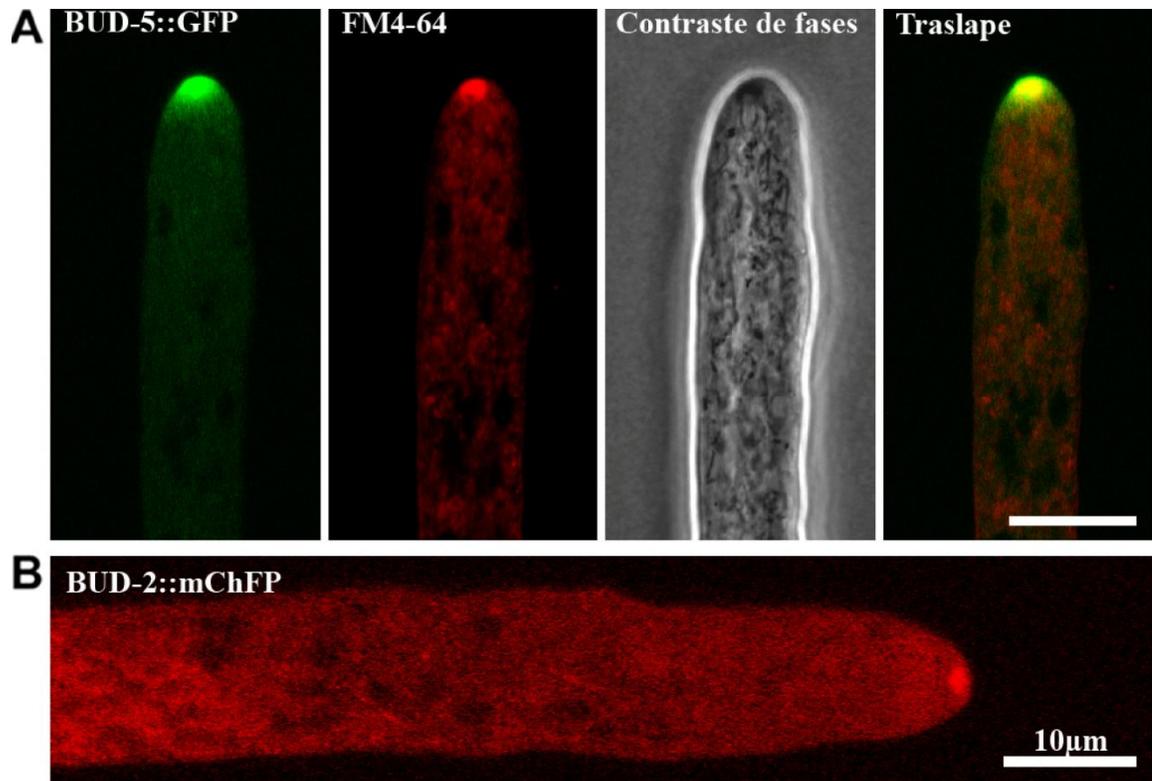


Figura 33. BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en los ápices celulares de hifas maduras. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de escaneo con láser de las cepas marcadas con proteínas fluorescentes en hifas maduras de *N. crassa*. **(A)** BUD-5-GFP, se localizó en el ápice de la célula co-localizando parcialmente con el Spk al ser teñido con FM4-64. **(B)** BUD-2-mChFP, se localizó ocupando la parte central del Spk.

6.13.2 Colocalización de BUD-5 y BUD-2 en ápices en crecimiento de *N. crassa*

Se analizaron hifas maduras en crecimiento de *N. crassa* para determinar la co-localización de las proteínas BUD-5 y BUD-2 respectivamente en los ápices celulares del hongo. La figura 34, muestra que BUD-5-GFP y BUD-2-mChFP poseen un patrón de localización diferente. En la mayoría de las células analizadas, BUD-5-GFP adoptó una forma de abánico con un punto brillante en la parte inferior central, desde ese punto, la distribución de BUD-5 se extiende de manera citosólica hacia afuera en forma radial dentro del ápice, hasta llegar a la membrana plasmática apical (Figura 34A), mientras que BUD-2-mChFP se observó también como un agregado citosólico pero de forma ovoide (Figura 34B) que al igual que BUD-5, presentó un punto brillante en la parte central inferior, no obstante, la ubicación que presentaron ambas proteínas, muestran una colocalización parcial (Figura 34C-D).

Estos resultados en conjunto, demuestran que BUD-5 y BUD-2 colocalizan parcialmente entre ellas y con la posición que presenta el Spk. Así mismo, se estipula que BUD-2 se localiza en la parte central del Spk.

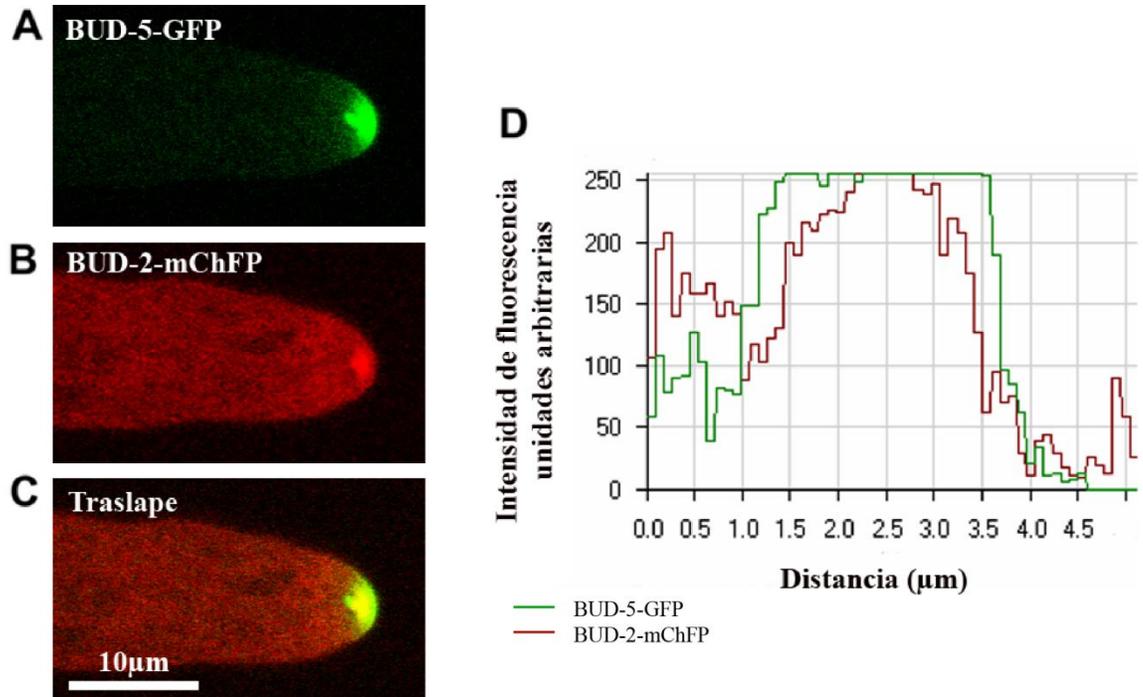
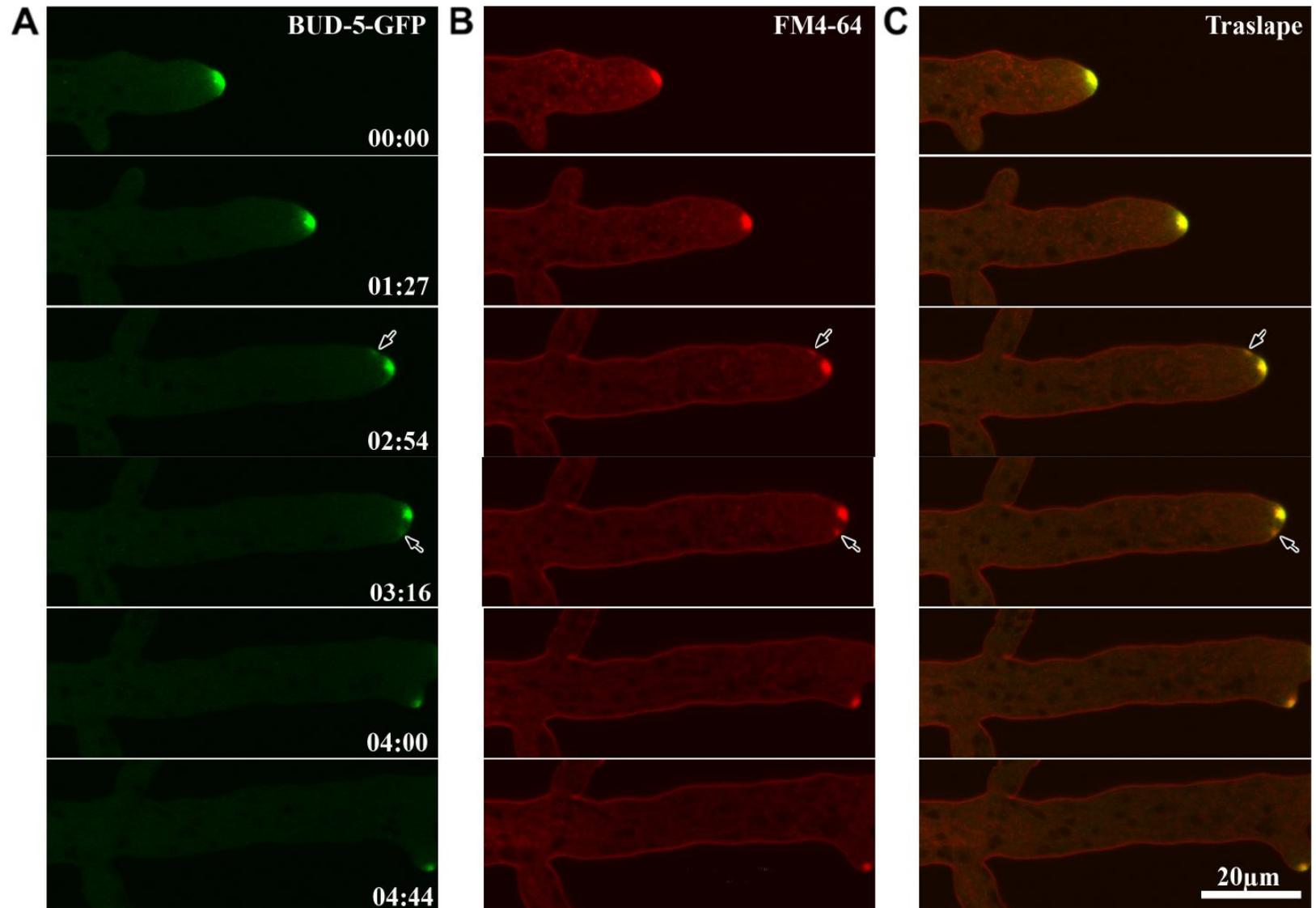


Figura 34. BUD-5 y BUD-2 colocalizan parcialmente en la región apical de hifas maduras de *N. crassa*. Imágenes obtenidas por canales de fluorescencia mediante microscopía confocal de escaneo con láser de (A) BUD-5-GFP y (B) BUD-2-mChFP. (C) Imágen sobrelapada de BUD-5-GFP y BUD-2-mChFP. (D) Muestra el patrón de distribución de fluorescencia que presentan las proteínas fluorescente GFP y mChFP durante el sobrelapamiento de BUD-5 y BUD-2.

6.14 BUD-5 participa durante el proceso de formación de ramificaciones laterales en hifas maduras de *N. crassa*

Para determinar si la proteína GEF BUD-5 participa en la formación de ramificaciones laterales en el hongo *N. crassa*, se tomaron imágenes secuenciales de una hifa madura en diferentes canales de fluorescencia, mediante microscopía confocal de escaneo con láser.

Durante esta etapa de la morfogénesis del hongo, se observó que BUD-5 participa en la formación de ramificaciones laterales (Figura 35). Al tiempo de 2:54 min de la serie de tiempo, se observó una ligera fluorescencia del GEF cerca de la membrana plasmática de la región lateral superior del domo apical, lo que parece una señal indicativa del futuro sitio de ramificación. Subsecuentemente, continuando con la serie de tiempo, al minuto 3:16 otro agregado de fluorescencia de BUD-5 se formó, pero en la parte inferior lateral del domo apical (Figura 35A). Interesantemente, al observar la hifa teñida con el fluorocromo FM4-64 (Figura 35B), se observó en el ápice celular un Spk definido con dos satélites de Spk, que curiosamente coincidieron con la posición de los agregados laterales de BUD-5-GFP en el domo apical. Este hecho puede observarse más evidentemente en la Figura 35C, donde se muestra el traslape de ambos canales de fluorescencia y donde se aprecia considerablemente la colocalización de BUD-5-GFP con FM4-64 en el ápice celular y en la formación de los nuevos sitios de polarización que darán origen a ramificaciones laterales. No obstante, la acumulación de BUD-5-GFP del tiempo 2:54 desapareció, por lo que no se definió la formación de una ramificación lateral, sin embargo, el eje establecido en la parte lateral inferior del domo apical se concretó, concluyendo con la formación del nuevo eje de crecimiento, observándose en el ápice de la ramificación lateral la acumulación de BUD-5-GFP. Estos resultados muestran que BUD-5 participa en la selección de nuevos ejes de polarización, participando en el establecimiento de ramificaciones laterales.



Descripción en la siguiente página

Figura 35. BUD-5 participa en la iniciación de la emergencia de ramificaciones laterales. Serie de tiempo obtenida mediante microscopía confocal de escaneo con láser durante la formación de una ramificación lateral en una hifa madura de *N. crassa*. **(A)** Canal de fluorescencia mostrando a BUD-5-GFP acumulado en el ápice celular de la hifa y en las regiones laterales del domo apical. **(B)** Canal de fluorescencia mostrando a la hifa de *N. crassa* teñida con el colorante FM4-64, mostrando en el ápice celular al Spk y los satélites del Spk. **(C)** Canal simultáneo, donde muestra la colocalización de BUD-5-GFP y al Spk. Flechas negras, señalan la acumulación de BUD-5 en A; Spk satélites en B y el traslape de BUD-5-Spk en C. Tiempo en: min:seg.

6.15 BUD-2 participa en la formación del septo en hifas maduras de *N. crassa*

Una vez visualizada la localización del GEF BUD-5 y la GAP BUD-2 en los ápices celulares de las hifas maduras del hongo *N. crassa*, se realizó la captura de series de tiempo por el canal de fluorescencia para determinar si las proteínas BUD-5 y BUD-2 estaban involucradas en la formación de los septos.

Durante esta etapa de la morfogénesis fúngica, interesantemente la GAP BUD-2 se observó involucrada durante la formación del septo (Figura 36). La presencia de BUD-2 durante este evento morfogénético, se hizo presente en la región subapical de las hifas como un agregado fluorescente asociado a membrana plasmática (tiempo de 3:00) y conforme el septo se desarrollaba, gradualmente la fluorescencia de BUD-2 se invaginaba. Por otra parte, con respecto al GEF BUD-5 no se observó participar en la formación del septo. Estos resultados sugieren que la proteína GAP BUD-2 en el hongo *N. crassa* participa en marcar los futuros sitios de septación.

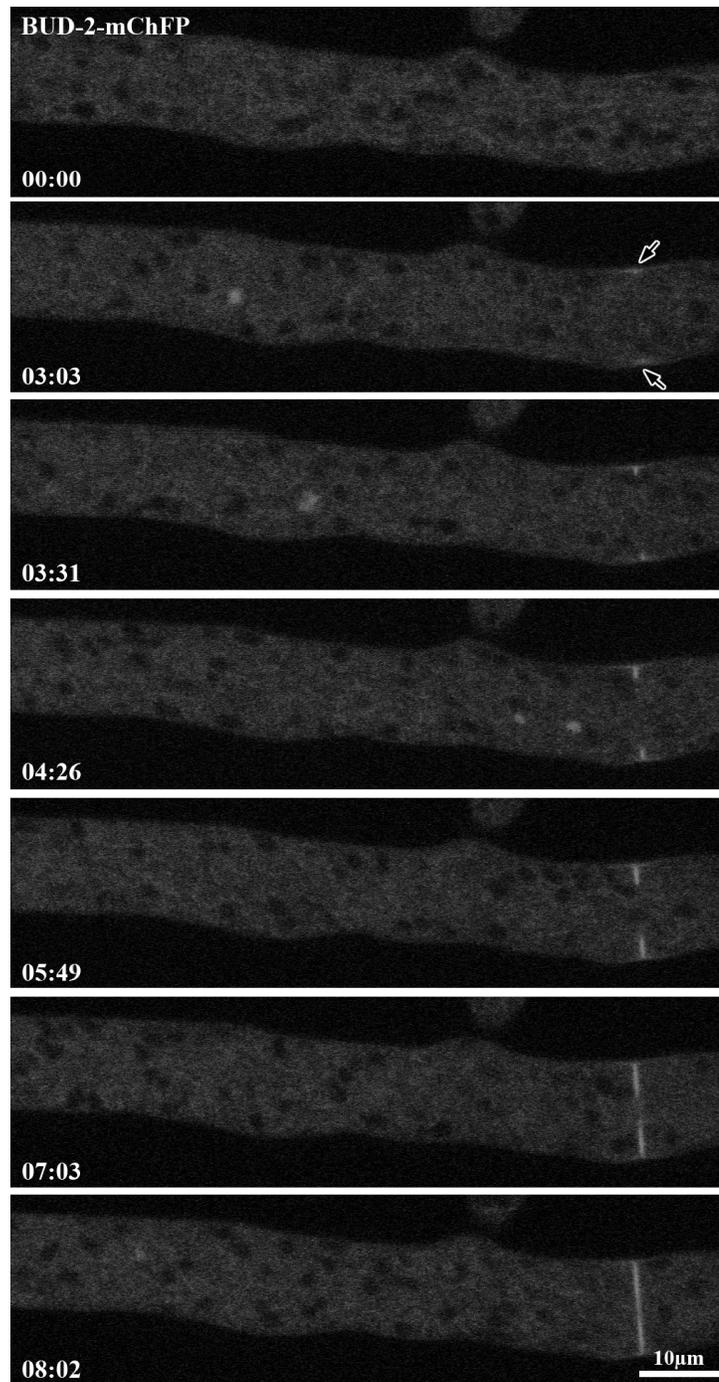


Figura 36. BUD-2 participa en la formación del septo en *N. crassa*. Series de tiempo mediante microscopía confocal durante la formación de septos en hifas maduras de *N. crassa* en la cepa BUD-2-mChFP. Flechas negras, indican el marcaje donde ocurrirá la formación de un septo. Tiempo en: min:seg.

6.16 BUD-5 y BUD-2 muestran distintos patrones de localización en germínulas de *N. crassa*

Utilizando microscopía confocal de barrido con láser, se analizaron germínulas de *N. crassa* que expresaban tanto BUD-5 como BUD-2 marcadas con las proteínas fluorescentes GEF y mCherryFP respectivamente, para analizar la distribución intracelular de ambas proteínas durante las diferentes etapas del desarrollo. Para ello, los macroconidios (esporas asexuales) fueron transferidos a un medio apropiado, que permitió iniciar con la fase de hidratación que comienza con un crecimiento isotrópico.

Para el caso de BUD-5, durante la fase de hidratación la proteína se observó acumulada en el citoplasma de la célula en forma de pequeños parches brillantes (Figura 37A), sin marcar algún sitio específico que indicara la expresión de un nuevo eje de crecimiento. Una vez que las células cesaron con la fase de hidratación e iniciaron con la siguiente etapa de crecimiento que es la fase de emergencia de un tubo germinativo, BUD-5-GFP pudo observarse en los ápices de los tubos germinativos como un agregado citosólico amorfo (Figura 37A). Continuando con las distintas etapas de crecimiento que el hongo *N. crassa* presenta, durante la fase de elongación del tubo germinativo, interesantemente BUD-5-GFP de estar presente en forma de agregado citosólico amorfo, dentro del ápice del tubo germinativo, cambió a un agregado de igual manera citosólico, pero de apariencia de media luna ocupando el domo apical (Figura 37A). Subsecuentemente, durante esta fase de crecimiento, BUD-5-GFP continuó en forma de media luna en el domo apical. Sin embargo, se observó que BUD-5 además de estar presente en forma citosólica en los ápice celulares de las germínulas, también se observó asociado a membrana plasmática (Figura 37A). Por otra parte, tanto en germínulas como en hifas maduras, se observó que BUD-5-GFP no participa en la formación del septo (Figura 37B).

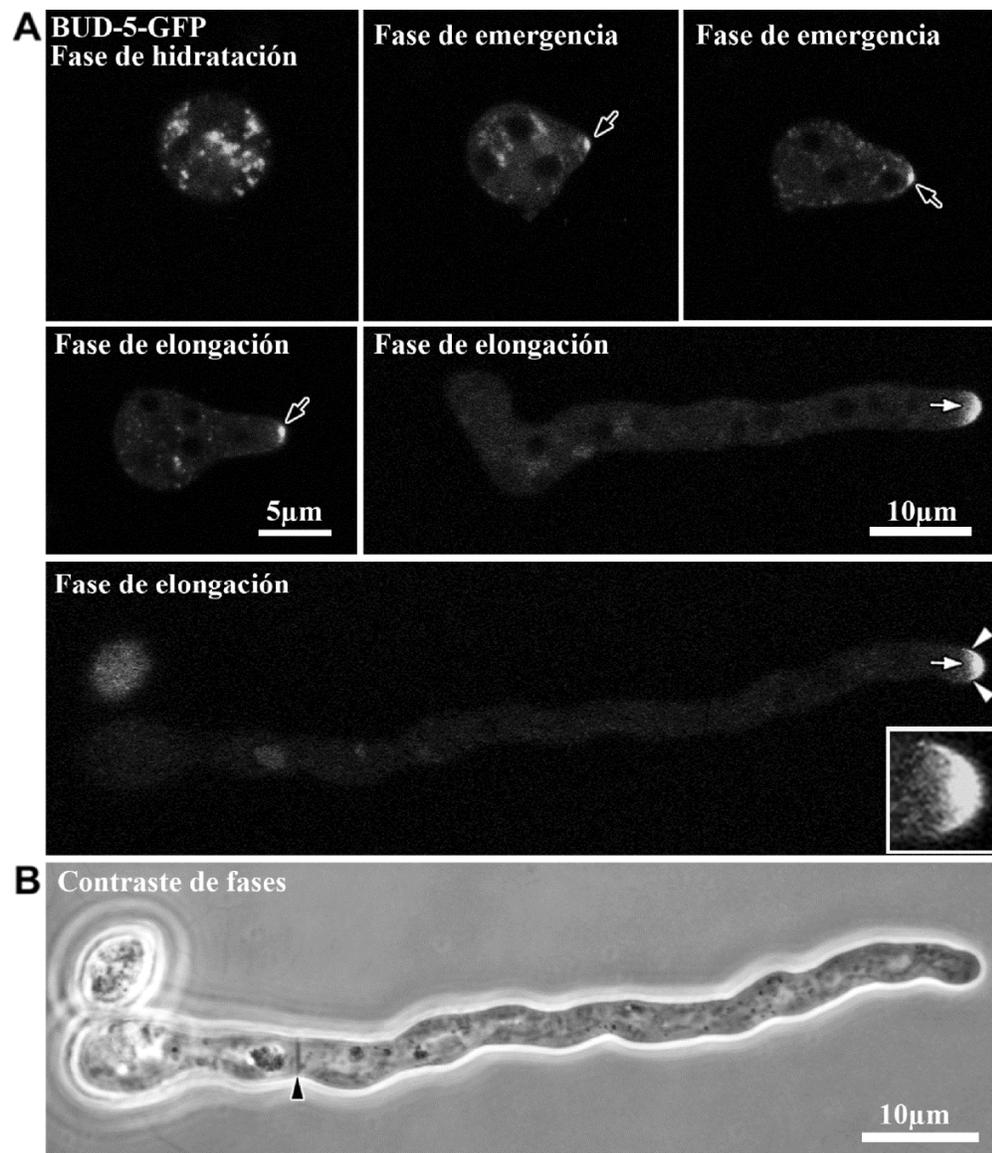


Figura 37. Distribución intracelular de BUD-5 en germínulas de *N. crassa*. (A) Imágenes tomadas por el canal de fluorescencia mediante microscopía confocal mostrando la localización de BUD-5-GFP en las distintas etapas del desarrollo del hongo. Flechas negras, señalan la presencia de BUD-5-GFP dentro de los ápices celulares durante la emergencia y elongación del tubo germinativo en forma de agregado citosólico como punto brillante; Flechas blancas, indican la presencia de BUD-5-GFP en el ápice de las germínulas durante la fase de elongación del tubo germinativo mostrando una apariencia de media luna; Cabezas de flechas blancas, muestran que BUD-5-GFP además de presentarse en forma citosólica, media luna, también se encuentra asociada a membrana plasmática. (B) Imagen tomada por luz transmitida por contraste de fases de una germínula en fase de elongación del tubo germinativo. Cabeza de flecha negra, muestra la localización de un septo en la germínulas.

Por otra parte, la figura 38A, nos muestra que durante la fase de hidratación, BUD-2-mChFP se localizó en primera instancia como agregados citoplasmáticos dentro del macroconidio, sin embargo, en algunas ocasiones fue acumulada en la corteza celular del macroconidio. Durante la fase de emergencia y fase de elongación de los tubos germinativos, BUD-2-mChFP siempre se mantuvo asociada a membrana plasmática. No obstante, cuando la germínula en elongación alcanzó una longitud aproximadamente de 73 μ m, BUD-2 se localizó también asociado al septo (Figura 38B) como se ha descrito anteriormente en hifas maduras.

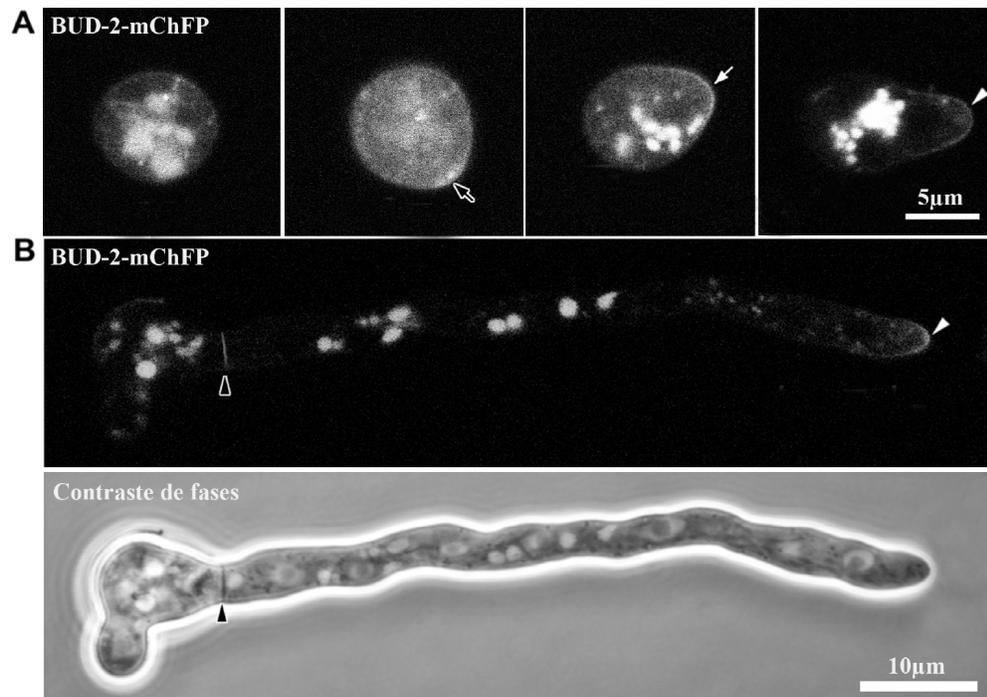


Figura 38. BUD-2 en germínulas de *N. crassa* se encuentra asociado a membrana plasmática. (A) Imágenes tomadas por el canal de fluorescencia mostrando la localización de BUD-2-mChFP durante la fase de hidratación, emergencia y elongación del tubo germinativo. Flecha negra, señala la presencia de BUD-2-mChFP en una región discreta de la espora indicando un sitio de polarización; flecha blanca, muestra que BUD-2 continúa presente en el domo apical durante la emergencia del tubo germinativo; cabeza de flecha blanca, marca a BUD-2 en el ápice celular durante la fase de elongación del tubo germinativo. **(B)** Imágenes por el canal de fluorescencia y por luz transmitida mediante contraste de fases, mostrando la localización de BUD-2-mChFP. Observar que BUD-2 además de estar presente en la membrana plasmática del ápice celular, también está presente en los sitios de septación. Cabezas de flechas negras, muestran la formación de un septo tanto por fluorescencia como por contraste de fases; Cabeza de flecha blanca, señala la localización de BUD-2-mChFP en el ápice de la germínula en la fase de elongación del tubo germinativo.

7. Discusiones

En las células fúngicas, el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en mantener un crecimiento polarizado, ha sido restringido principalmente a la levadura *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* se ha descrito que las Rho GTPasas intervienen en mantener un crecimiento polarizado. No obstante, *S. cerevisiae* a diferencia de los hongos filamentosos no presenta la proteína Rac Rho GTPasas (Bourex *et al.*, 2007). Es por ello que en el presente trabajo se analizó el papel de las Rho GTPasas CDC-42 – RAC – CDC-24 en el proceso de polarización durante la morfogénesis del hongo filamentosos *N. crassa*.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el módulo de las GTPasas CDC42 – RAC – CDC-24 es indispensable para la viabilidad de las células ya que son requeridas para el crecimiento polarizado y para mantener la morfogénesis de las hifas en el ascomiceto *N. crassa*. La caracterización fenotípica a través del análisis microscópico de baja y alta resolución de mutantes sencillas y dobles mutantes por delección y condicionales a temperatura, así como el análisis de los patrones de localización de las tres proteínas, indican que las dos GTPasas CDC-42 y RAC tienen funciones no redundantes, sin embargo, por lo menos comparten una función en común y esencial en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular como se reporta para *Aspergillus nidulans*, *A. niger* y *Ustilago maydis* (Mahlert *et al.*, 2006; Virag *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2011). Las células carentes de cualquiera de las dos GTPasas CDC-42 y RAC son capaces de germinar a pesar de mostrar claramente un crecimiento afectado, dando lugar a colonias fúngicas compactas con aberraciones morfológicas. Esto indica que el establecimiento de un eje de polarización en las hifas es posible, aunque retardado en ausencia de CDC-42 o RAC. Las cepas deficientes de RAC son caracterizadas por presentar puntas dicotómicas y por la presencia de una hiper-ramificación masiva; esto también es observado pero en menor medida en las mutantes de CDC-42. Sin embargo, la característica más destacada de las mutantes de CDC-42 es la aparición de numerosas ramificaciones subapicales y el hinchamiento de sus ápices y regiones subapicales de las hifas, sugiriendo que en ausencia de una GTPasa, la otra sustituye la función a pesar que la extensión apical sea altamente comprometida en

distintas formas. Esta noción de sustitución así como las funciones individuales de ambas GTPasas en la morfogénesis de *N. crassa* puede ser corroborado por lo observado en la doble mutante $\Delta rac;\Delta cdc-42$ que es letal y en la doble mutante condicional a temperatura restrictiva que presentó defectos drásticos, como por ejemplo una notable pérdida de polaridad. Estas características morfológicas en las mutantes de CDC-42 y RAC en *N. crassa* al parecer son muy similares a las características morfológicas que presentan las mutantes de CDC-42 y RAC en *P. marneffei*, donde ambas GTPasas CflA y CflB están igualmente involucradas en el crecimiento de las hifas (Boyce *et al.*, 2001, 2003). Sin embargo, las mutantes de CflB en *P. marneffei* presentan fenotipos similares de hiper-ramificación, sugiriendo que estos homólogos de Rac tanto en *N. crassa* como en *P. marneffei* podrían tener funciones análogas (Boyce *et al.*, 2001, 2003). Similarmente, la pérdida de CDC-42 en *N. crassa* da lugar a un fenotipo muy similar al que presenta la cepa mutante del hongo *C. purpurea* que expresa un alelo dominante negativo de *cdc42* (Scheffer *et al.*, 2005). Por otra parte, las mutantes condicionales de *N. crassa cdc-24* mostraron defectos en la polaridad como los observados en las mutantes deficientes de CDC-42 y RAC. Las mutantes termosensibles de *cdc-24(10-19)* y *cdc-24(19-3)* exhibieron claramente una hiper-ramificación como se determinó para *rac(7-1)*, no obstante en *cdc-42(18-4)* la ramificación masiva fue menos pronunciada, mientras que el fenotipo característico de la cepa *cdc-24(24-21)* fue idéntico a las características fenotípicas presentadas en la doble mutante condicional *rac(7-1);cdc-42(18-4)*. Específicamente, los conidios de las cepas *cdc-24(24-21)* y *rac(7-1);cdc-42(18-4)* fueron incapaces de realizar el cambio de un crecimiento isotrópico a un crecimiento polarizado, el cual es requerido para la germinación de las esporas y ascosporas homocarióticas de $\Delta cdc-24$ y $\Delta rac;\Delta cdc-42$ que fallaron en establecer la polaridad.

En *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la actividad de CDC-42 es regulada por la RhoGEF Cdc24p o por su homólogo cercano Scd1, respectivamente (Park y Bi, 2007; Pérez y Rincón, 2010). Cdc24, también está implicada en la regulación de Cdc42 en otros organismos fúngicos como *A. gossypii* (Wendland y Philippsen, 2001) y en *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2003), sin embargo la actividad reguladora de Cdc24 en estas especies no ha sido corroborada. En

contraste, en el basidiomiceto *U. maydis*, Cdc24 funciona como un activador específico para Rac1 (Mahlert *et al.*, 2006; Castillo-Lluva *et al.*, 2007; Frieser *et al.*, 2011). En el caso de *N. crassa* se ha demostrado que CDC-24 estimula *in vitro* la actividad de CDC-42 y RAC (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Consistente con los resultados presentados por estos autores y los defectos observados en la polaridad de las mutantes condicionales de *cdc-24* del presente trabajo, se complementa que CDC-24 es el principal GEF para CDC-42 y RAC en *N. crassa*.

La función traslapada propuesta en este trabajo para RAC y CDC-42 en *N. crassa* así como de CDC-24 como un activador para ambas GTPasas, también se ve reflejada en el patrón de localización que presentan estas tres proteínas en *N. crassa*. En los ápices de hifas maduras la localización de CDC-42, RAC y CDC-24 es asociada a la membrana plasmática y en forma de capucha de acuerdo a lo observado en los hongos tales como *A. nidulans*, *A. niger*, *C. albicans*, *E. festucae*, *P. marneffeii* y *U. maydis*, (Hazan y Liu, 2002; Boyce *et al.*, 2003; 2005; Bassilana y Arkowitz, 2006; Virag *et al.*, 2007; Álvarez-Tabarés y Pérez-Martín, 2008; Kwon *et al.*, 2011; Takemoto *et al.*, 2011). Interesantemente, en *N. crassa* el patrón de localización específicamente de las tres proteínas fue distinto, lo que apoya la sugerencia de que las GTPasas RAC y CDC-42 poseen funciones diferentes dentro de los ápices de hifas maduras y durante el establecimiento de la polaridad. Se localizó CDC-42 de forma creciente en el ápice de las hifas asociada a membrana plasmática, mientras que RAC, también fue asociada a membrana plasmática pero en forma de anillo subapical, excluyendo la zona ocupada por CDC-42 (Figura 39A). El GEF CDC-24 se localizó en una posición estratégica dentro del domo apical en forma de media luna cubriendo el patrón de localización de ambas GTPasas. Estos resultados son consistentes con los ensayos *in vitro* del cambio de GDP a GTP que corroboran la actividad GEF de CDC-24 hacia RAC y CDC-42 (Richthammer, 2011). Sin embargo, CDC-24 también mostró una acumulación citosólica que rodea al Spk, sugiriendo que la activación de RAC y CDC-42 ocurre en la membrana plasmática, mientras que la CDC-24 citosólica puede servir como un reservorio de activación competente o bien, puede tener otra función adicional independiente.

En etapas tempranas del crecimiento de germínulas y formación de ramificaciones durante el desarrollo de *N. crassa*, ambas GTPasas RAC y CDC-42 son concentradas en la membrana plasmática en forma creciente en los sitios de polarización y diferente a lo mostrado en hifas maduras. Esta diferencia en el patrón de localización podría deberse potencialmente a que la re-localización de ambas GTPasas ocurre de manera dependiente a la tasa de crecimiento que presentan las diferentes etapas de crecimiento; estas diferencias de localización ocurrieron de manera similar a lo descrito para la RHO-1 GAP LRG-1 en *N. crassa* (Vogt y Seiler, 2008). Así mismo, la localización de estas proteínas puede estar influenciada por su interacción específica con la membrana. Trabajos previos han demostrado dominios en la membrana ricos en esteroides, los cuales están implicados en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad en *A. nidulans* (Cheng *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2004). Sin embargo Seiler y Plamman (2003) han reportado mutantes de *N. crassa* defectuosos en la síntesis de ergosterol y en la síntesis de fosfoinositoides, mostrando defectos dramáticos en la polaridad. Este hecho podría explicar la hipótesis de que estas GTPasas están implicadas en la unión a dominios o microdominios lipídicos específicos a la membrana plasmática y estos estén expresándose en diferentes etapas del crecimiento del hongo y por ello vemos diferencias en la localización de estas proteínas. Específicamente, CDC-42 y RAC se localizaron en germínulas y durante la formación de nuevas ramificaciones en forma creciente asociadas a membrana plasmática dentro del domo apical y después cambiaron a una pequeña capucha apical y al anillo subapical respectivamente, una vez que la extensión apical ha alcanzado cierta tasa de extensión. Cdc42 también ha sido implicada en la formación de ramificaciones en *A. nidulans* (Virag *et al.*, 2007). En *N. crassa* CDC-42 y RAC se localizan en el futuro sitio donde se formará la emergencia de una ramificación subapical, lo que implica que ambas GTPasas regulan el inicio de ramificación subapical, sin embargo, ambas proteínas no son esenciales para la formación de ramificaciones ya que las mutantes carentes de estas proteínas fueron viables en generar ramificaciones subapicales. Interesantemente, las dos GTPasas tienen diferente cinética en la localización en la membrana antes de la emergencia de la rama, lo que indica funciones tempranas y tardías de CDC-42 y RAC, respectivamente, durante la iniciación de la rama. No obstante, la diferencia más pronunciada entre las dos GTPasas se observa

durante el establecimiento de la polaridad en conidios (Figura 39B): mientras que CDC-42 se localiza en la corteza celular antes de la emergencia del tubo germinativo, RAC se acumula sólo después de que la polaridad se establece. Estas diferencias, se correlacionan aún más con los defectos pronunciados de polaridad que presenta la cepa $\Delta cdc-42$ en comparación con la cepa Δrac , lo que puede sugerir un papel más importante de CDC-42 que RAC durante el establecimiento de la polaridad en *N. crassa*.

A Hifa madura



B Germínula

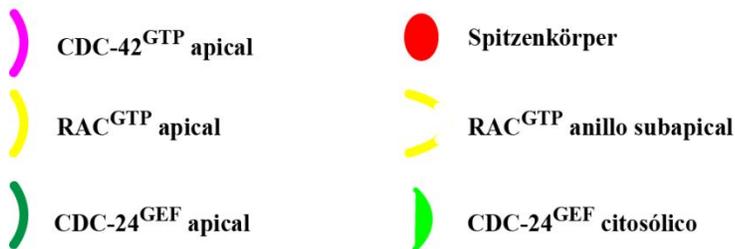
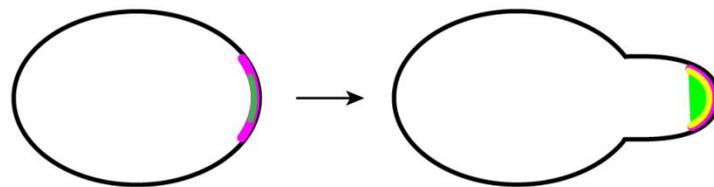


Figura 39. Modelo representativo de localización del módulo CDC-42 – RAC – CDC-24 en *N. crassa*. (A) Resumen esquemático del patrón de localización de CDC-42, RAC y CDC-24 en los ápices celulares de hifas maduras de *N. crassa* en crecimiento. (B) Patrón de localización de CDC-42, RAC y CDC-24 durante la germinación de macroconidios y elongación del tubo germinativo de *N. crassa*.

Cdc-42 y RAC además de participar en la formación de ramificaciones, también participa en la formación de septos, de acuerdo con la función descrita para Cdc42p en la levadura *S. cerevisiae* y la levadura de fisión *S. pombe* durante la división celular (Park y Bi, 2007; Pérez y Ricón, 2010). Del mismo modo, la localización de estas proteínas en el septo ha sido observada en *P. marneffeii*, donde la pérdida de una de ellas conduce a un proceso de septación inapropiado (Boyce *et al.*, 2003; 2005), para Cdc42 en *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2005) y raramente, para RacA en *A. niger* (Kwon *et al.*, 2011). Con excepción de

Cdc42 en *U. maydis*, la cual parece tener una alta especialización para controlar la separación celular en la levadura de este basidiomiceto (Böhmer *et al.*, 2008). Sin embargo, la contribución específica de CDC-42 y RAC durante la formación del septo en hongos filamentosos no ha sido elucidada. El incremento de abundancia de septos en las mutantes *rac*, *cdc-42* y *cdc-24* en *N. crassa* sugiere una participación como reguladores negativos que pueden funcionar en una relación antagónica con las GTPasas RHO1 y RHO4, los cuales son reguladores positivos en la formación del septo en *N. crassa*, *A. nidulans* y *C. albicans* (Rasmussen y Glass, 2005; Dünkler y Wendland, 2007; Vogt y Seiler, 2008; Justa-Schuch *et al.*, 2010; Si *et al.*, 2010; Seiler y Justa-Schuch, 2011).

En la levadura *S. cerevisiae* es bien conocido que Cdc42p juega un papel importante en la organización de los filamentos de actina (Adams *et al.*, 1990; Johnson, 1999) sin embargo existe controversia, ya que se señala que la localización de Cdc42p y Cdc24p no depende del citoesqueleto de actina (Ayscough *et al.*, 1997; Nern y Arkowitz, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; Irazoqui *et al.*, 2005). Del mismo modo se ha presentado esta misma situación en *A. nidulans* (Virag *et al.*, 2007), *C. albicans* (Hazan and Liu, 2002; Bassilana y Arkowitz, 2006), *Y. lipolytica* y *C. neoformans* (Hurtado *et al.*, 2000; Vallim *et al.*, 2005). En *N. crassa*, las cepas expresando CDC-42, RAC y CDC-24 marcadas con proteínas fluorescentes fueron tratadas con inhibidores del citoesqueleto microtubular (benomilo) y del citoesqueleto de actina (citocalasina-A) encontrando que las proteínas permanecían presente en los ápices celulares de hifas maduras, sugiriendo que la localización de ambas GTPasas y del GEF, son independientes al citoesqueleto tanto microtubular como de actina, sin embargo no se descarta la posibilidad que estas proteínas regulen otro tipo de proteínas que sean necesarias para la polimerización de actina, tal como la proteína Bni1, donde se ha demostrado ser necesaria para la propia orientación y organización de los cables de actina (Ozaki-Kuroda *et al.*, 2001; Sagot *et al.*, 2002; Evangelista *et al.*, 2002). No obstante, en hongos filamentosos como es el caso de *A. gossypii*, *A. niger*, *C. neoformans*, *P. marneffei* y *T. borchii*, al menos una de estas GTPasas juega un rol importante en la organización de actina (Wendland y Philippsen, 2001; Boyce *et al.*, 2003; 2005; Menotta *et al.*, 2007; Ballou *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2011).

En organismos eucariotas se ha descrito que las Rho GTPasas poseen en el extremo C-terminal una secuencia consenso CAAX (Ziman *et al.*, 1993; Omer y Gibbs, 1994; Waddick y Uckun, 1998; Pereira-Leal *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2010) necesaria para ser modificada post-traduccionalmente en la cisteína (Wolda y Glomset, 1988; Casey *et al.*, 1989; Farnsworth *et al.*, 1989; Schafer *et al.*, 1989; Finegold *et al.*, 1990; Fukada *et al.*, 1990; Yamane *et al.*, 1991) para asociarse a membrana plasmática y realizar su función (Maltese, 1990; Gibbs, 1991; Schafer y Rine, 1992; Clarke, 1992). Sin embargo, se ha sugerido que la función asociada con la activación de las Rho GTPasas podría ser separada de su asociación a membrana plasmática (Kranenburg *et al.*, 1997). Por otra parte, en organismos levaduriformes se ha descrito que la GEF Cdc24p presenta en el extremo C-terminal un motivo PB1, el cual es necesario para que se lleve la interacción específica entre la proteína Bem1p con Cdc24p (Ito *et al.*, 2001; Butty *et al.*, 2002), para mantener al GEF Cdc24p en los sitios de crecimecinto polarizado (Butty *et al.*, 2002). Sin embargo, la eliminación de este motivo es tóxico, por lo que se sugiere que un dominio PB1 intacto, es requerido para mantener a Cdc42p inactivo, posiblemente por un mecanismo de autoinhibición (Shimada *et al.*, 2004). Así que para comprender la funcionalidad y dinámica de estas proteínas, se llevó a cabo el etiquetamiento con proteínas reporteras en el extremo carboxilo-terminal encontrando que la localización de CDC-42 y CDC-24 en los ápices de hifas maduras se ha descrito que se encuentra asociada a la membrana plasmática en forma de capucha de acuerdo a lo observado en los hongos como *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Epichloë festucae*, *Penicillium marneffeii*, *Ustilago maydis* y recientemente en *N. crassa* cuando es etiquetado con proteínas fluorescentes en el extremo amino-terminal (Hazan y Liu, 2002; Boyce *et al.*, 2003; 2005; Bassilana y Arkowitz, 2006; Virag *et al.*, 2007; Álvarez-Tabarés y Pérez-Martín, 2008; Araujo-Palomares *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2011; Takemoto *et al.*, 2011). Como era de esperarse, el patrón de localización de CDC-42 y CDC-24 en *N. crassa* cambia completamente al ser etiquetadas en el extremo carboxilo-terminal, este hecho no se ha documentado en hongos filamentosos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas Rho GTPasas pueden localizarse tanto en

forma soluble (libre en el citosol) como en forma particulada (asociada a la membrana plasmática, vesículas secretoras o en material denso como Golgi) (Ziman *et al.*, 1993).

En hifas maduras del hongo filamentoso *N. crassa*, la Rho GTPasas CDC-42 y el Rho GEF CDC-24 se localizaron dentro de los ápices celulares como agregados citosólicos, coincidiendo con la región central del cuerpo apical o Spk. Este hecho sugiere que tanto CDC-42 como CDC-24 utilizando esta estrategia de marcaje molecular, permite su anclaje a las membranas que componen a las vesículas secretoras, como se reporta para *S. cerevisiae* (Ziman *et al.*, 1993; Shimada *et al.*, 2004). En este organismo se realizaron fusiones del motivo CAAX con la GFP y su localización fue sólo en membranas de vesículas, pero no en membrana plasmática de la periferia de la célula (Richman *et al.*, 2002). En levaduras se ha reportado que el exocisto es un complejo multiproteico que integra señales de muchas GTPasas durante el crecimiento polarizado, por lo que ciertos componentes que constituyen este módulo como es el caso de Sec3, interactúa con algunos miembros de las Rho GTPasas como Rho1 (Guo *et al.*, 2001) y Cdc42 (Zhang *et al.*, 2001) de una manera cooperativa, donde estas interacciones proporcionan temporalmente una regulación de la secreción polarizada. No obstante, la acumulación citosólica de la GEF CDC-24 previamente se ha reportado rodeando al Spk en *N. crassa* (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). En cambio, durante los diferentes eventos morfogénicos del desarrollo de *N. crassa* como es la fase de emergencia del tubo germinativo, CDC-42 se detectó dentro del ápice celular, conservando su localización durante la elongación del tubo germinativo, mientras que CDC-24, se observó una vez que se encontraba en la etapa de elongación del tubo germinativo como pequeños parches cerca de la membrana plasmática. En cambio en germínulas más desarrolladas de *N. crassa*, tanto CDC-42 como CDC-24 etiquetadas en el C-terminal mostraron una localización citosólica dentro de los ápices celulares cuando las germínulas alcanzaron una longitud aproximadamente de 160µm de longitud. Este hecho es la primera vez que se reporta en hongos filamentosos, no obstante, coincide con la presencia de un Spk inmaduro (Araujo-Palomares *et al.*, 2007). A pesar que su localización difiere en cada uno de los eventos morfogénicos, CDC-42 en esta etapa del desarrollo presentó una localización citosólica bien definida y delimitada dentro de los ápices, así

mismo, se localizó en septo; mientras que CDC-24 a pesar que su localización fue citosólica, esta fue en forma de nube.

Es evidente que la localización de CDC-42 como de CDC-24 con el etiquetamiento molecular en el N-terminal y en el C-terminal difieren notablemente, por lo que su localización es influenciada por la interrupción de las modificaciones post-traduccionales, interrumpiendo su interacción específica con la membrana plasmática. Sin embargo, se ha reportado que algunas de las funciones asociadas con la activación de las Rho GTPasas podrían ser separadas de su asociación a membrana (Kranenburg *et al.*, 1997), a pesar de que diferentes líneas de investigación indican que el C-terminal de las Rho GTPasas es requerida para su correcta localización. En *N. crassa* CDC-42 se localiza en los futuros sitios donde ocurrirá la emergencia de ramificaciones subapicales asociada a la membrana plasmática, conforme avanza el desarrollo del nuevo eje de crecimiento, la localización de CDC-42 cambia a un estado citosólico, lo que implica que esta GTPasa regula el establecimiento de ramificaciones laterales, sin embargo como se reporta en el capítulo anterior, esta proteína no es esencial para la formación de ramificaciones ya que la mutante carente de esta proteína y mutantes condicionales son capaces de formar ramificaciones. En otros organismos fúngicos como es el caso de *A. nidulans*, se ha reportado que Cdc42 también participa en la formación de ramificaciones (Virag *et al.*, 2007). Por tal motivo, si comparamos los resultados de esta sección, con el etiquetamiento en el N-terminal y lo reportado en *A. nidulans*, sugiere que la función de CDC-42 en el extremo C-terminal podría ser viable, ya que no es afectada su participación en este proceso de la morfogénesis del hongo *N. crassa*. En contraste a CDC-42, la proteína CDC-24 con el etiquetamiento tanto en el C-terminal como en el N-terminal, fue presente una vez que las ramificaciones alcanzaron una longitud determinada, por lo que sugiere que esta proteína no se encuentra implicada en este proceso morfogénico de *N. crassa*.

CDC-42 además de participar en la formación de ramificaciones bajo el marcaje en el C-terminal, también está implicada en la formación de septos, tal como se describe en las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* durante la citocinesis (Park y Bi, 2007; Pérez y Ricón,

2010). No obstante, la localización de esta proteína en particular en los sitios de septación también ha sido observado en otros organismos fúngicos como *P. marneffei* (Boyce *et al.*, 2003; 2005), *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2005), *A. niger* (Kwon *et al.*, 2011) y *N. crassa* (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Esto sugiere nuevamente que la función de CDC-42 con el etiquetamiento en el extremo C-terminal podría ser funcional. Sin embargo, la localización de CDC-24 en el septo previamente ha sido reportado en el hongo endofítico *E. festucae* (Takemoto *et al.*, 2011), en este organismo Cdc24-GFP se observó en la parte central del septo (Takemoto *et al.*, 2011). Aunado a esto, en la levadura *S. cerevisiae* se ha documentado que durante la citocinesis, Cdc24p desaparece de la membrana plasmática, localizándose en el septo entre la célula madre y la célula hija (Nern y Arkowitz, 1999). Con estos resultados y realizando un análisis comparativo, en *N. crassa* la localización de CDC-24-mChFP estuvo presente en la formación del septo, desde las primeras etapas de la formación del septo, hasta la madurez del mismo, sin embargo es importante señalar que la localización de CDC-24 en el septo es transitoria, ya que desaparece una vez que el septo llega a su madurez, hecho que anteriormente no se ha reportado en hongos filamentosos. Hasta la fecha no se sabe con certeza el papel que podría desempeñar CDC-24 en los septos. Por otra parte, al parecer el marcaje de CDC-24 en el C-terminal en *N. crassa* es funcional, ya que se ha reportado que el dominio CH y el cual se localiza hacia el N-terminal de la proteína es requerido para la función y localización celular de Cdc24 (Shimada *et al.*, 2004), así mismo el dominio PH ayuda a orientar a la GEF hacia la membrana plasmática por la unión de lípidos por lo que el etiquetamiento que se presenta en esta sección afecta la localización intracelular que presenta la proteína, a pesar que el dominio PB1 en *N. crassa* se localiza a 6 aminoácidos del C-terminal.

Se ha descrito que la prenilación es un proceso fundamental y esencial para la localización y función de las GTPasas (Maltese, 1990; Gibbs, 1991; Clarke, 1992; Schafer y Rine, 1992), sin embargo, en este trabajo al realizar la cruce genética de la cepa carente del gen de *cdc-42* con la cepa que posee *cdc-42-mCherryfp*, se demostró que CDC-42 etiquetada en el extremo carboxilo restablece el fenotipo silvestre y por lo tanto es funcional. En células de mamíferos, la localización de las Rho GTPasas en membrana no es necesaria

para llevar a cabo una función (Dunford *et al.*, 2006) por lo que apoya la hipótesis que el presente etiquetamiento es viable. Con fines comparativos se determinó la tasa de elongación tanto de la cepa *cdc-42-mCherryfp* y la cepa restablecida *cdc-42-mCherryfp*. Se determinó que la cepa marcada con la proteína reportera mChFP y la cepa restablecida exhibieron un comportamiento y una tasa de elongación similar a la cepa silvestre, por lo que no presentaron diferencias significativas, lo que sugiere nuevamente que CDC-42 es una proteína funcional. Estos hallazgos que se presentan en el presente trabajo llevan a pensar y coincidir con lo descrito por Lu *et al.*, (2004), quienes señalan que la carboximetilación aún no ha sido extensamente evaluada y las funciones asociadas con la activación de las Rho GTPasas podrían ser separadas de su asociación a membrana (Kranenburg *et al.*, 1997).

En organismos levaduriformes se ha descrito que el módulo Rsr1p constituido por Rsr1p/Bud1p, Bud2p y Bud5p, son requeridos para la selección de los sitios de gemación (Park *et al.*, 1999). Sin embargo, en hongos filamentosos el análisis de cada uno de los componentes que integran el módulo Rsr1p, así como el papel que desempeñan dentro de la morfogénesis fúngica no son conocidos. Es por ello que en el presente trabajo se analizó *in vivo*, algunos componentes homólogos integrales del módulo Rsr1p, involucrados en los mecanismos moleculares que intervienen durante el proceso de polarización en hongos.

Bud5p, originalmente identificado como un GEF para Bud1p, también se le ha atribuido que tiene un papel clave en la vinculación de señales para el establecimiento de la polaridad (Kang *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001). En *N. crassa* BUD-5 se localiza en los ápices celulares tanto de germínulas como en hifas maduras en crecimiento, mostrando diferentes patrones de localización como se reporta para levaduras (Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001), sin embargo, los patrones de localización encontrados en *N. crassa* difieren significativamente a los reportados en levaduras. En germínulas de *N. crassa*, BUD-5 se observó de tres distintas formas. Durante las etapas tempranas del desarrollo, como es la fase de emergencia de tubo germinativo, que ocurre después de las 3 horas de incubación (Araujo-Palomares *et al.*, 2007), BUD-5 se observó en forma de un pequeño agregado en la

parte central del ápice celular. Sin embargo, cuando las germínulas se encontraban a la fase de elongación del tubo germinativo, el cual se ha reportado que ocurre después de las 5 horas de incubación (Araujo-Palomares *et al.*, 2007), se observó un cambio en cuanto a la distribución de BUD-5. En esta etapa del crecimiento, BUD-5 pasó de tener una forma de pequeño agregado, a una forma de media luna en el domo apical, lo que condujo a ocupar una mayor área citosólica dentro del ápice celular, así mismo, también se observó asociada a membrana plasmática. Estos resultados sugieren, que las diferencias en el patrón de localización de BUD-5 en germínulas, es potencialmente sujeto al grado de maduración celular, o quizá la acumulación de la proteína no es la suficiente para observar el mismo patrón de localización. Este hecho puede ser apoyado por lo presentado en hifas maduras de *N. crassa*, ya que en los ápices de las hifas en crecimiento, la localización de BUD-5 se observó en forma citosólica con un punto brillante en la parte inferior central. Desde ese punto, la distribución de BUD-5 se extendió de manera citosólica hacia afuera en forma radial dentro del domo apical, dando la apariencia de un abanico. Así mismo, los ensayos de colocalización con el Spk sugieren que colocalizan parcialmente en el ápice celular. Del mismo modo, BUD-2 también mostró distintos patrones de localización, tanto en germínulas como en hifas maduras. En etapas tempranas del crecimiento de germínulas de *N. crassa*, BUD-2 es asociada a la membrana plasmática en forma creciente en los sitios de polarización y diferente a lo mostrado en hifas maduras, donde el patrón de localización de BUD-2 cambió drásticamente. En hifas maduras de *N. crassa*, BUD-2 se localizó en los ápices celulares, ocupando la parte central del Spk, lo que sugiere que en esta etapa de la morfogénesis fúngica es asociada a membranas de organelos. Esta diferencia que se muestra en el patrón de localización que presenta BUD-2, tanto en germínulas como en hifas maduras, tal vez sirve como una estrategia para servir como reservorio para la inactivación de Rsr1p/Bud1p del ápice.

Por otra parte, aunque en hongos filamentosos el estudio de los componentes que regulan la selección de los sitios de gemación es limitado, en *A. gossypii* y en *C. albicans*, el estudio de homólogos de Bud1/Rsr1 parecen tener una función en los ápices celulares, especificando la direccionalidad de extensión de las hifas (Bauer *et al.*, 2004; Hausauer *et*

al., 2005). En *N. crassa*, el análisis de los componentes del módulo RSR-1, BUD-5 y BUD-2 específicamente, sugiere que estos son requeridos para establecer sitios de polarización celular. Particularmente, BUD-5 se localizó en el futuro sitio donde ocurrirá la emergencia de una ramificación subapical, lo que implica que el GEF regula o establece el sitio donde ocurrirá una ramificación lateral. Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, se ha descrito que la localización de Bud2 es confinada a la corteza celular (Park *et al.*, 1999; Hausauer *et al.*, 2005). Interesantemente, la diferencia más pronunciada tanto de BUD-5 como BUD-2 fue en el establecimiento de la polaridad en los macroconidios, mientras que BUD-2 se localiza en la corteza celular antes de la emergencia del tubo germinal, BUD-5 se observa poco después que la polaridad celular se ha establecido, sin embargo no se descarta la posibilidad de que BUD-5 también se localice en la corteza celular de los macroconidios de *N. crassa*.

BUD-2 además de participar en el establecimiento de la polaridad celular, también participa en la formación de septos, de acuerdo a lo descrito en la levadura *S. cerevisiae* (Park *et al.*, 1999; Marston *et al.*, 2001) donde la proteína Bud2p se ha visto localizada en el septo que se genera entre la célula madre y la célula hija. En el hongo filamentoso *N. crassa*, BUD-2 también se observó presente en los septos, desde germínulas hasta en hifas maduras. No obstante, diversas líneas de investigación, han sugerido que la localización de Bud2p en los septos es debido a la interacción que tiene con algunas septinas como Cdc12p (Park *et al.*, 1999). Así mismo, se ha descrito que Bud2p tiene una asociación con el módulo Bud3p-Bud4p (Park *et al.*, 1999), donde en organismos como *A. gossypii*, *C. albicans*, *A. nidulans* y *N. crassa* el módulo BUD-3 y BUD-4 es requerido exclusivamente para el proceso de septación (Gale *et al.*, 2001; Wendland, 2003; Kaufmann y Philippsen, 2009; Justa-Schuch *et al.*, 2010; Si *et al.*, 2010). Por otra parte, reportes previos en *S. cerevisiae* señalan que Bud5p está involucrada en la formación de septos entre la célula madre y la célula hija (Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001). Sin embargo, para el caso de *N. crassa* no se encontró involucrada a la proteína BUD-5 en la formación de septos, lo que indica que la función primordial de BUD-5 es establecer sitios de crecimiento polarizado y mantener los ejes de polarización. En general, en levaduras la formación de septos es un evento

morfogenético que es altamente acoplado al ciclo celular, ya que una célula madre genera una célula hija que crece hasta alcanzar un tamaño similar a la célula madre, teniendo lugar en ese momento la citoquinesis, septación y separación de las células (Arkowitz, 2001; Marston *et al.*, 2001). Durante este evento del ciclo celular, Bud5p se localiza en forma de doble anillo en el septo, que una vez que ocurre la septación, Bud5p se divide en dos anillos individuales sobre la separación entre la célula madre y la célula hija, conduciendo a que cada célula heredere un solo anillo, sugiriendo que esta proteína está involucrada en llevar a cabo la disolución del septo entre ambas células durante proceso de celular (Arkowitz, 2001; Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001).

En levaduras, se ha establecido que el módulo general Rsr1p no juega un papel esencial en el establecimiento de los ejes de polarización, si no que el módulo Rsr1p/Bud1p-Bud5p-Bud2p es el encargado sólo de posicionar a la maquinaria morfogenética hacia los sitios donde se generará un sitio de polarización, siendo el módulo Cdc42p quien establece los sitios de polarización (Kozminski *et al.*, 2003). En *N. crassa*, el análisis parcial de los componentes que constituyen del módulo Rsr1p, sugieren que las proteínas BUD-2 y BUD-5 son requeridos para establecer y mantener los sitios de polarización similar como lo realiza el módulo CDC-42 (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Sin embargo, el módulo CDC-42 al parecer es el que posee una mayor importancia tanto en la levadura *S. cerevisiae* como en el hongo filamentoso *N. crassa*. Esto se refleja en el hecho de que las mutantes del módulo Cdc42p produce fenotipos de células grandes, redondeadas e imposibilitadas en la formación de células hijas (Adams *et al.*, 1990), mientras que las mutantes del módulo Rsr1p, sólo exhiben en las células gemaciones aleatorias tanto en células diploides como en células haploides (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Chant *et al.*, 1991). En cambio, en *N. crassa* las simples y dobles mutantes, así como las mutantes condicionales del módulo CDC-42 muestran defectos severos en el fenotipo e incluso algunas de las variantes fueron letales (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Sin embargo, es necesario realizar el análisis de las cepas simples mutantes de $\Delta bud-5$ y $\Delta bud-2$, múltiples mutantes y mutantes termosensibles que constituyen el módulo Rsr1p en *N. crassa*, para determinar si muestran un efecto considerable en el fenotipo para establecer una función

relevante del papel que desempeña el módulo Rsr1p/Bud1p-Bud5p-Bud2p en el hongo filamentoso *N. crassa*.

En *S. cerevisiae* además del módulo Rsr1p-Bud2p-Bud5p, también se han identificado otros módulos que son necesarios para la localización correcta de los sitios de gemación (Bender y Pringle, 1989; Snyder, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Chant *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1994; Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996; Valtz y Herskowitz, 1996; Zahner *et al.*, 1996), por lo que es posible que alguno de estos componentes modulares intervengan en los mecanismos de selección de polarización en hongos filamentosos. En las células fúngica como *A. gossypii*, *C. albicans*, *A. nidulans* y *N. crassa*, se ha establecido que parte del módulo Bud3p-Bud4p-Axl2p, específicamente Bud3p y Bud4p no son requeridos para establecer sitios de polarización y su función radica exclusivamente en el proceso de septación (Gale *et al.*, 2001; Wendland, 2003; Kaufmann y Philippsen, 2009; Justa-Schuch *et al.*, 2010; Si *et al.*, 2010). Así mismo, Seiler y Justa-Schuch (2010), señalan que no existen homólogos para BUD-8 y BUD-9 en *N. crassa*, los cuales forman parte del módulo Bud8p-Bud9p-Rax2p en *S. cerevisiae*. Sin embargo genes homólogos de RAX-1 y RAX-2 están presentes tanto en *A. nidulans* como en *N. crassa* por lo que no se descarta la posibilidad de que estos puedan también intervenir en la selección de sitios de polarización.

8. Conclusiones

1. Las proteínas del módulo CDC-42 - RAC - CDC-24 son requeridas para mantener la polaridad celular, integridad del Spk y crecimiento de *N. crassa*.
2. Las proteínas Rho GTPasas CDC-42, RAC y el GEF CDC-24, mostraron distintos patrones de localización en los ápices celulares de hifas maduras y germímulas en *N. crassa*.
3. En germímulas, CDC-42 presenta el papel más importante durante el establecimiento de un nuevo eje de polaridad celular en *N. crassa*.
4. CDC-42 y RAC participan en la formación de septos y en la formación de ramificaciones subapicales en *N. crassa*.
5. La localización del módulo CDC-42 - RAC - CDC-24 en el ápice celular de *N. crassa* es independiente del citoesqueleto, tanto del microtubular como del de actina.
6. Se establece que el etiquetamiento en el extremo C-terminal, obstruyendo el motivo CAAX, de la GTPasa CDC-42 no afecta su función, pero si su localización celular, lo que sugiere que la localización en membrana plasmática depende de la geranilgeranilación.
7. En hifas maduras CDC-42 se localizó en la parte central del Spitzenkörper, lo cual sugiere que al interrumpir la prenilación ésta es asociada a membrana intracelular.
8. El etiquetamiento en el extremo C-terminal de CDC-42 no bloquea su participación tanto en el proceso de septación como en la formación de ramificaciones laterales.
9. En hifas maduras CDC-24 mostró una localización citosólica ocupando la parte central del Spk, lo que sugiere que esta localización puede servir como un reservorio de activación o bien, puede tener otra función adicional independiente aún desconocida.

10. La proteína CDC-24 al ser etiquetada en el C-terminal fue observada durante el proceso de la formación de septos.
11. Las proteínas BUD-5 y BUD-2 mostraron distintos patrones de localización en los ápices celulares de hifas maduras y en germínulas del hongo filamentoso *N. crassa*.
12. BUD-5 y BUD-2 colocalizan parcialmente entre ellas y con la posición que presenta el Spk en los ápices celulares de hifas maduras de *N. crassa*, sugiriendo que ambas proteínas intervienen en el mantenimiento de polaridad celular.
13. BUD-5 participa en la formación de ramificaciones subapicales en hifas maduras de *N. crassa*, lo que sugiere que esta proteína participa en la selección de nuevos ejes de polarización secundarios.
14. BUD-2 participa en el establecimiento y en la formación de septos tanto en hifas maduras como en germínulas de *N. crassa*, lo que sugiere una participación en marcar los presuntivos sitios de septación.
15. En germínulas, BUD-2 presenta el papel más importante durante el establecimiento de un nuevo eje de polaridad celular en *N. crassa* lo que sugiere es requerida para establecer sitios de polarización celular, mientras que BUD-5 aparentemente solo mantiene la polaridad celular en germínulas.
16. Se encontró que la proteína BUD-5 no interviene en la formación de septos en *N. crassa*, lo que sugiere que son otras las proteínas las que intervienen en este eventos morfogénico.

9. Perspectivas

1. En levaduras, específicamente en *S. cerevisiae* se ha documentado que al realizar una mutagénesis en la Cys188 del carboxilo terminal de Cdc42, la localización de la GTPasa en membrana se elimina (Ziman *et al.*, 1993). Así que para corroborar este hecho y fundamentar la evidencia de que el etiquetamiento de la GTPasa CDC-42 en el C-terminal es funcional, en este trabajo se realizó una mutagénesis del extremo C-terminal, el cual consistió en la eliminación del motivo CAAX mediante la técnica de la ventana rodante (Seidel y Satur, sin publicar). Mediante esta técnica se obtuvieron alrededor de 40 cepas putativas sin presentar motivo CAAX, sin embargo queda pendiente el análisis de dichas cepas debido a la carencia de equipo que pueda permitir el análisis correspondiente.
2. En levaduras es establecido que el módulo Rsr1p-Bud2p-Bud5p es requerido para seleccionar los sitios donde ocurrirá la polarización, por lo que es importante realizar el análisis de localización intracelular de la proteína Rsr1p en *N. crassa* para poder determinar integralmente que la localización del módulo Rsr1p-Bud2p-Bud5p en el hongo *N. crassa* es también requerido para seleccionar los sitios donde se establecerá un sitio de polarización. Así mismo, hablar de una funcionalidad del módulo, es necesario realizar el análisis de simples mutantes, múltiples mutantes y mutantes condicionales de cada una de las proteínas que integran el módulo, para poder establecer si juegan un papel indispensable en la morfogénesis de *N. crassa*. Por otra parte, es fundamental determinar mediante ensayos *in vitro*, si BUD-5 es la GEF para RSR1 y si BUD-2 es la GAP para RSR1 en *N. crassa*.

Lista de referencias bibliográficas

- Adams, A.E. y J.R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 98:934-945.
- Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat y J.R. Pringle. 1990. CDC42 y CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111:131-142.
- Aghamohammadzadeh, S. y K.R. Ayscough. 2010. The yeast actin cytoskeleton and its function in endocytosis. *Fungal Biol. Rev.* 24:37-46.
- Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. 4th ed. Academia Press. London, United Kingdom. 635 p.
- Almeida, A.J., C. Cunha, J.A. Carmona, *et al.* 2009. *Cdc42p* control yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fung. Genet. Biol.* 46:919-926.
- Alvarez Tabarés, I. y J. Pérez-Martín. 2008. Cdk5 kinase regulates the asociación between adaptor protein Bem1 and GEF Cdc24 in the fungus *Ustilago maydis*. *J. Cell Sci.* 121:2824-2832.
- Anderegg, R.J., R. Betz, S.A. Carr, J.W. Crabb y W. Duntze. 1988. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone a-factor. *J. Biol. Chem.* 263:18236-18240.
- Andersen, S.S. y G.Q. Bi. 2000. Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays.* 22:172-179.
- Andrews, M., D.H. Huizinga y D.N. Crowell. 2010. The caax specificities of *Arabidopsis* protein prenyltransferases explain *eral* and *ggb*. *BMC Plant Biol.* 10:118.
- Araujo Palomares, C.L., E. Castro Longoria y M. Riquelme, 2007. Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 44:492-503.
- Araujo Palomares, C.L., C. Richthammer, S. Seiler y E. Castro Longoria. 2011. Functional characterization and celular dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC24 module in *Neurospora crassa*. *PLoS one.* 6:e27148. doi:10.1371/journal.pone.0027148.

- Arkowitz, R.A. 2001. Cell polarity: Connecting to the cortex. *Curr. Biol.* 11:R610-R612.
- Aspenstrom, P., A. Fransson y J. Saras. 2004. Rho GTPases have diverse effectors on the organization of the actin filament system. *Biochem. J.* 377:327-337.
- Ayscough, K.R., J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews y D.G. Drubin. 1997. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* 137:399-416.
- Ballou, E.R., C.B. Nichols, K.J. Miglia, L. Kozubowski y J.A. Alspaugh. 2010. Two *CDC42* paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermotolerance and morphogenesis under host physiological conditions. *Mol. Microbiol.* 75:763-780.
- Banuet, F., R.H.Jr. Quintanilla y C.G. Reynaga Peña. 2008. The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*-a survey of the genome sequence. *Fungal Genet. Biol.* 45:S3-S14.
- Bartnicki García, S. 1981. Cell wall construction during spore germination in Phycomycetes. En: Turian, G., and H.R. Hohl (eds.). *The Fungal Spore*. Academic Press. London. 533-556 p.
- Bartnicki García, S. 2002. Hyphal tip growth: Outstanding question. *Molecular Biology of Fungal Development*. En: Osiewacz, H.D. (ed.). *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. 1-25 p.
- Basilana M., J. Blyth y R.A. Arkowitz. 2003. Cdc24, the GDP-GTP exchange factor for Cdc42, is required for invasive hyphal growth of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 2:9-18.
- Basilana, M., J. Hopkins y R.A. Arkowitz. 2005. Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Euk. Cell.* 4:588-603.
- Basilana, M. y R.A. Arkowitz. 2006. Rac1 and Cdc42 have different roles in *Candida albicans* development. *Euk. Cell.* 5:321-329.
- Bauer, Y., P. Knechtle, J. Wendland, H. Helfer y P. Philippsen. 2004. A Ras-like GTPase is involved in hyphal growth guidance in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell.* 15:4622-4632.

Bender, A. y J.R. Pringle. 1989. Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the *ras*-related gene *RSR1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:9976-9980.

Bender, A. 1993. Genetic evidence for the roles of the bud-site-selection genes *BUD5* and *BUD2* in control of the Rsr1p (Bud1p) GTPase in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:9926-9929.

Bernards, A. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. Biochim. Biophys. Acta. 1603: 47-82.

Bishop, A.L. y A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem. J. 348: 241-255.

Boettner, B. y L. Ven Aelst. 2002. The role of the Rho GTPases in disease development. Gene. 286:155-174.

Boguski, M.S. y F. McCormick. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. Nature. 366: 643-654.

Böhmer, C., M. Böhmer, M. Bölker y B. Sandrock. 2008. Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. J. Cell Sci. 121:143-148.

Bollag, G. y F. McCormick. 1991. Regulators and effectors of ras proteins. Ann. Rev. Cell Biol. 7:601-632.

Borkovich, K.A., L.A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, *et al.* 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:1-108.

Bornens, M. 2008. Organelle positioning and cell polarity. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:874-886.

Bottomley, M.J., K. Salim y G. Panayotou. 1998. Phospholipid-binding protein domains. Biochim. Biophys. Acta. 1436:165-183.

Boureux, A., E. Vignal, S. Faure y P. Fort. 2007. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 24:203-216.

Bourne, H.R., D.A. Sanders y F. McCormick. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 348:125-132.

Boyce, K.J., M.J. Hynes y A. Andrianopoulos. 2001. The CDC42 homolog of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is required for correct cell polarization during growth but not development. *J. Bacteriol.* 183:3447-3457.

Boyce, K.J. y A. Andrianopoulos. 2003. Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* RAC homolog. *J. Cell Sci.* 116:1249-1260.

Boyce, K. J., M.J. Hynes y A. Andrianopoulos. 2005. The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffei*. *Mol. Microbiol* 55:1487-1501.

Burbelo, P.D., D. Drechsel y A. Hall. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270:29071-29074.

Bustelo, X.R., V. Sauzeau e I.M. Berenjeno. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 29:356-370.

Butty, A.C., N. Perrinjaquet, A. Petit, M. Jaquenoud, J.E. Segall, K. Hofmann, C. Zwahlen y M. Peter. 2002. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J.* 21:1565-1576.

Carpenter, C.L., K.F. Tolias, A. Van Vugt y J. Hartwig. 1999. Lipid kinase are novel effector of the GTPase Rac1. *Adv. Enzyme Regul.* 39:299-312.

Casey, P.J. 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J. Lipid Research.* 33:1731-1740.

Casey, P.J., P.A. Solski, C.J. Der y J.E. Buss. 1989. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8323-8327.

Castangnetti, S., B. Novak y P. Nurse. 2007. Microtubules offset growth site from the cell centre in fission yeast. *J. Cell Sci.* 120:2205-2213.

Castaño Cardoso, J. 2005. Regulación de la estructura-función de β -catenina y p120-catenina: dos proteínas asociadas a las uniones adherentes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. 208pp.

- Castillo Lluva, S., I. Alvarez Tabarés, I. Weber, G. Steinberg y J. Pérez Martín. 2007. Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J. Cell Sci.* 120:1584-1595.
- Chang, E.C., M. Barr, Y. Wang, V. Jung, H.P. Xu y M.H. Wigler. 1994. Cooperative interaction of *Schizosaccharomyces pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell.* 79:131-141.
- Chang, F. 2001. Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet.* 17:273-278.
- Chang, F. y M. Peter. 2003. Yeast make their mark. *Nat. Cell Biol.* 5:294-299.
- Chant, J. e I. Herskowitz. 1991. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell.* 65:1203-1212.
- Chant, J., K. Corrado, J.R. Pringle e I. Herskowitz. 1991. Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell.* 65:1213-1224.
- Chant, J. y J.R. Pringle. 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 129:751-765.
- Chant, J. 1999. Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:365-391.
- Chen, C., Y. Ha, J. Min, S.D. Memmott y M.B. Dickman. 2006. Cdc42 is required for proper growth and development in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Euk. Cell.* 5:155-166.
- Chen, J., W. Zheng, S. Zheng, D. Zhang, W. Sang, X. Chen, G. Li, G. Lu y Z. Wang. 2008. Rac1 is required for pathogenicity and Chm1-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *PLoS Pathog.* 4:e1000202. doi:10.1371/journal.ppat.1000202.
- Cheng, J., T.S. Park, A.S. Fischl y X.S. Ye. 2001. Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 21:6198-6209.
- Cherfils, J. y P. Chardin. 1999. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24:306-311.

Clark, J.D., L. L. Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, A.Y. Lin, N. Milona y J.L. Knopf. 1991. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain homology to PKC and GAP. *Cell*. 65:1043-1051.

Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* 61:355-386.

Coll, P.M., Y. Trillo, A. Ametzazurra y P. Pérez. 2003. Gef1p, a new guanine nucleotide Exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*. 14:313-323.

Court, H. y P. Sudbery. 2007. Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*. 18:265-281.

Cox, A.D. y C.J. Der. 1992. The ras/cholesterol connection: implications for ras oncogenicity. *Crit. Rev. Oncog.* 3:365-400.

Crowell, D.N. 2000. Functional implications of proteins isoprenylation in plants. *Prog. Lipid Res.* 39:393-408.

Crowell, D.N. y D.H. Huizinga. 2009. Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends. Plant Sci.* 14:163-170.

Davis, R.H. 2000. *Neurospora*. Contributions of a model organism. Oxford. Oxford University Press. 333 p.

Davis, R.H. y D.D. Perkins. 2002. *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat. Rev. Genet.* 3:7-13.

Deacon, J.W. 1990. Introducción a la micología moderna. LIMUSA. México. 350p.

Delgado Álvarez, D.L., O.A. Callejas Negrete, N. Gómez, M. Freitag, R.W. Roberson, L.G. Smith y R.R. Mouriño-Pérez. 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 47:573-586.

Diebold, B.A. y G.M. Bokoch. 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* 2:211-215.

Diekmann, D., C.D. Nobes, P.D. Burbelo, A. Abo y A. Hall. 1995. Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *EMBO J.* 14:5297-5205.

Drees, B.L., B. Sundin, E. Brazeau, J.P. Caviston, G.C. Chen, W. Guo, K.G. Kozminski, M.W. Lau, J.J. Moskow, A. Tong, L.R. Schenkman, A. McKenzie III, P. Brennwald, M. Longtine, E. Bi, C. Chan, P. Novick, C. Boone, J.R. Pringle, T.N. Davis, S. Fields y D.G. Drubin. 2001. A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* 154:549-571.

Drubin, D.G. y W.J. Nelson. 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* 84:335-344.

Dunford, J.E., M.J. Rogers, F.H. Ebetino, R.J. Phipps y F.P. Coxon. 2006. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J. Bone Miner. Res.* 21:684-694.

Dünkler, A. y J. Wendland. 2007. *Candida albicans* Rho-type GTPase-encoding genes required for polarized cell growth and cell separation. *Euk. Cell.* 6:844-854.

Ekundayo, J.A. y M.J. Carlile. 1964. The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*: spore swelling and germ-tube emergence. *J. Gen. Microbiol.* 35:261-269.

Endo, M., M. Shirouzu y S. Yokoyama. 2003. The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2. *J. Biol. Chem.* 278:843-852.

Etienne Manneville, S., y A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. 420: 629-635.

Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone y A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4:260-269.

Farnsworth, C.C., S.L. Wolda, M.H. Gelb y J.A. Glomset. 1989. Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 264:20422-20429.

Finegold, A.A., W.R. Schafer, J. rine, M. Whiteway y F. Tamanoi. 1990. Common modification of trimeric G proteins and ras protein: involvement of polyisoprenylation. *Science.* 249:165-169.

Finegold, A.A., D.I. Johnson, C.C. Farnsworth, M.H. Gelb, S.R. Judd, J.A. Glomset y F. Tamanoi. 1991. Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the *CDC43* gene product, but not the *DPR1* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:4448-4452.

Finger, F.P., y P. Novick. 1998. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. J. Cell Biol. 142:609-612.

Fischer, R., N. Zekert y N. Takeshita. 2008. Polarized growth in fungi –interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. Mol. Microbiol. 68:813-826.

Fletcher, J. 1969. Morphological and nuclear behaviour of germinating conidia of *Penicillium griseofulvum*. Transactions of the British Mycological Society. 53:425-432.
Freeman, J.L., A. Abo y J.D. Lambeth. 1996. Rac “insert región” is a novel effector región that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. J. Biol. Chem. 271:19794-19801.

Freitag, M., P.C. Hickey, N.B. Raju, E.U. Selker y N.D. Read. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fung. Genet. Biol. 41: 897-910.

Frieser, S.H., A. Hlubek, B. Sandrock y M. Bölker. 2011. Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*. Mol. Biol. Cell. 22:3253-3262.

Fujino, M., C. Kitada, Y. Sakagami, A. Isogai, S. Tamura y S. Suzuki. 1980. Biological activity of synthetic analogs of tremmerogen A-10. Naturwissenschaften. 67:406-408.

Fujita, A., C. Oka, Y. Arikawa, T. Katagai, A. Tonouchi, S. Kuhara y Y. Misumi. 1994. A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes. Nature. 372:567-570.

Fukada, Y., T. Takao., H. Ohguro, T. Yoshizawa, T. Akino y Y. Shimonishi. 1990. Farnesylated γ -subunit of photoreceptor G protein is indispensable for GTP-binding. Nature. 346:658-660.

Fukui, Y., T. Kozasa, Y. Kaziro, T. Yakeda y M. Yamamoto. 1986. Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. Cell. 44:329-336.

- Fukui, Y. y M. Yamamoto. 1988. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutant phenotypically similar to ras1. *Mol. Gen. Genet.* 125:26-31.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., Fitzhugh, W., Ma, L., Smirnov, S., Purcell, S., *et al.*, 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature.* 422:859-868.
- Galagan, J.E., S.E. Calvo, C. Cuomo, L.J. Ma, J.R. *et al.* 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.* 438:1105-1115.
- Gale, C., M. Gerami Nejad, M. McClellan, S. Vandoninck, M.S. Longtine y J. Berman. 2001. *Candida albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Mol. Biol. Cell.* 12:3538-3549.
- García, P., V. Tajadura, I. García y Y. Sánchez. 2006. Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast.* 23: 1031-1043.
- Gibbs, J.B. y M.S. Marshall. 1989. The *ras* oncogene-an important regulatory element in lower eukaryotic organisms. *Microbiol. Rev.* 53:171-185.
- Gibbs, J.B. 1991. Ras C-terminal processing enzymes-new drug target? *Cell.* 65:1-4.
- Glomset, J.A. y C.C. Farnsworth. 1994. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:181-205.
- Gooday, G.W. 1995. The dynamics of the growth. *Mycol. Resear.* 99:385-394.
- Gow, N.A.R. 1995. Tip growth and polarity. En: Gow N.A.R., G.M. Gadd (eds), *The growing fungus*. Chapman & Hall, London. 277-299 p.
- Grove, S.N. 1978. The cytology of hyphal tip growth. En: *The Filamentous Fungi* (Smith J.E., Berry D.R. Eds.). Arnold, London. 28-50 p.
- Gull, K. y A.P.J. Trinci. 1971. Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *J. General Microbiol.* 68:207-220.

- Gulli, M.P. y M. Peter. 2001. Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Develop.* 15:365-379.
- Guo, W., F. Tamanoi y P. Novick, 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3:353-360.
- Hall, A. 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science.* 249: 635-640.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-514.
- Hansen, M.D. y W.J. Nelson. 2001. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1: effector complex. *Curr. Biol.* 11:356-360.
- Halme, A., M. Michelitch, E.L. Mitchell y J. Chant. 1996. Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr. Biol.* 6:570-579.
- Harris, S.D., L. Hamer, K.E. Sharpless y J.E. Hamer. 1997. The *Aspergillus nidulans* sepA genes encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *EMBO J.* 16:3474-3483.
- Harris, S.D. y M. Momany. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet. Biol.* 41:391-400.
- Harris, S.D. 2006. Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *International Rev. Cytol.* 251:41-77.
- Harris, S.D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Micol.* 100:823-832.
- Harris, S.D., G. Turner, V. Meyer, E.A. Espeso, T. Specht, N. Takeshita y K. Helmstedt. 2009. Morphology and development in *Aspergillus nidulans*: a complex puzzle. *Fungal Genet. Biol.* 46:S82-S92.
- Hart, M.J., A. Eva, D. Zangrilli, S.A. Aaronson, T. Evans, R.A. Cerione y Y. Zheng. 1994. Cellular transformation and guanine nucleotide Exchange activity are catalyzed by a common domain and the dbl oncogene product. *J. Biol. Chem.* 269:62-65.

Hartman, H.L., K.A. Hicks y C.A. Fierke. 2005. Peptide specificity of protein prenyltransferases is determined mainly by reactivity rather than binding affinity. *Biochemistry*. 44:15314-15324.

Hausauer, D.L., M. Gerami-Nejad, C. Kistler Anderson y C.A. Gale. 2005. Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. *Eukariot. Cell*. 4:1273-1286.

Hayles, J. y P. Nurse. 2001. A journey into space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2:647-656.

Hazan, I. y H. Liu. 2002. Hyphal tip-associated localization of Cdc42 is F-actin dependent in *Candida albicans*. *Euk. Cell*. 1:856-864.

Heath, I.B. 1990. Tip growth in plant and fungal cells. Academic Press. San Diego. 211-232 p.

Henchoz, S., Y. Chi, B. Catarin, I. Herskowitz, R.J. Deshaies y M. Peter. 1997. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Develop*. 11:3046-3060.

Hepler, P.K., L. Vidali y A.Y. Cheung. 2001. Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17:159-187.

Herskowitz, I., H.O. Park, S. Sanders, N. Valtz y M. Peter. 1995. Programming of cell polarity in budding yeast by endogenous and exogenous signals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 60:717-727.

Hickey, P.C., S.R. Swift, M.G. Roca y N.D. Read. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods Microbiol*. 34:63-87.

Hirota, K., K. Tanaka, K. Ohta y M. Yamamoto. 2003. Gef1p and Scd1p, the two GDT-GTP Exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*. 14:3617-3627.

Hlubek, A., K.O. Schink, M. Mahlert, B. Sandrock y M. Bölker. 2008. Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signaling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol*. 68:615-623.

- Howard, R.J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Science*. 48:89-103.
- Hurtado, C.A.R., J.M. Beckerich, C. Gaillardin y R.A. Rachubinski. 2000. A Rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 182:2376-2386.
- Ihara, K. S. Muraguchi, M. Kato, T. Shimizu, M. Shirakawa, S. Kuroda, K. Kaibuchi y T. Hakoshima. 1998. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* 273:9656-9666.
- Irazoqui, J.E. y D.J. Lew. 2004. Polarity establishment in yeast. *J. Cell Science*. 117:2169-2171.
- Irazoqui, J.E., A.S. Howell, C.L. Theesfeld y D.J. Lew. 2005. Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol. Biol. Cell.* 16:1296-1304.
- Ishibashi, Y., Y. Sakagami, A. Isogai y A. Suzuki. 1984. Structures of tremmerogens A-9291-I and A-9291-VIII: peptidyl sex hormones of *Tremella tremmerogens*. *Biochemistry*. 23:1399-1404.
- Ito, T., Y. Matsui, T. Ago, K. Ota y H. Sumimoto. 2001. Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J.* 20:3938-3946.
- Jaffe, A.B. y A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:247-269.
- Johnson, D.I. y J.R. Pringle. 1990. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell Biol.* 111:143-152.
- Johnson, D.I. 1999. Cdc42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Rev.* 63:54-105.
- Joneson, T., M. McDonough, D. Bar-Sagi y L. Van Aelst. 1996. RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from jun kinase. *Science*. 274:1374-1376.

Justa Schuch, D., Y. Heilig, C. Richthammer y S. Seiler. 2010. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factor BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 76:220-235.

Kaminskyj, S.G.W. e I.B. Heath. 1996. Studies on *Saprolegnia ferax* suggest the general importance of the cytoplasm in determining hyphal morphology. *Mycologia.* 88:20-37.

Kamiya, Y., A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya, S. Fukui, C. Kitada y M. Fujino. 1978. Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:1077-1083.

Kang, P.J., A. Sanson, B. Lee y H.-O. Park. 2001. A GDP/GTP Exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity. *Science.* 292:1376-1378.

Kang, P.J., B. Lee y H.O. Park. 2004. Specific residues of the GDP/GTP exchange factor Bud5p are involved in establishment of the cell type-specific budding pattern in yeast. *J. Biol. Chem.* 279:27980-27985.

Kang, P.J., L. Beven, S. Hariharan y H. Park. 2010. The Rsr1/Bud1 GTPase interacts with itself and the Cdc42 GTPase during bud-site selection and polarity establishment in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 21:3007-3016.

Katz, D., D. Goldstein y R.F. Rosenberger. 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *J. Bacteriol.* 109:1097-1100.

Kaufmann, A. y P. Philippsen. 2009. Of bars and rings: Hof1-dependent cytokinesis in multiseptated hyphae of *Ashbya gossypii*. *Mol. Cell Biol.* 29:771-783.

Kilmartin, J.V. y A.E. Adams. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* 98:922-933.

Knaus, M., M. Pelli Gulli, F. van Drogen, S. Springer, M. Jaquenoud y M. Peter. 2007. Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. *EMBO J.* 26:4501-4513.

Köhli, M., V. Galati, K. Boudier, R.W. Roberson y P. Philippsen. 2008. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J. Cell Sci.* 121:3878-3889.

Kozminski, K.G., L. Beven, E. Angeman, A.H.Y. Tong, C. Boone y H. Park. 2003. Interaction between a Ras and a Rho GTPase couples selection of a growth site to the development of cell polarity in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14:4958-4970.

Kranenburg, O., M. Poland, M. Gebbink, L. Oomen y W.H. Moolenaar. 1997. Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J. Cell Sci.* 110:2417-2427.

Kropf, D.L. 1992. Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. *Microbiol. Rev.* 56:316-339.

Kwon, M.J., M. Arentshorst, E.D. Roos, C.A.M.J.J. van den Hondel, V. Meyer y A.F.J. Ram. 2011. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol. Microbiol.* 79:1151-1167.

Lamarche, N. y A. Hall. 1994. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* 10:436-440.

Lamarche, N., N. Tapon, L. Stowers, P.D. Burbelo, P. Aspenstrom, T. Bridges, J. Chant y A. Hall. 1996. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle pregression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell.* 87:519-529.

Li, H., B.M. Barker, N. Grahl, S. Puttikamonkul, J.D. Bell, K.D. Craven y R.A. Cramer Jr. 2011. The small GTPase RacA mediates intracellular reactive oxygen species production, polarized growth, and virulence in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Euk. Cell.* 10:174-186.

Li, Y. y E.C. Chang. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* Ras1 effector, Scd1, interacts with Klp5 and Klp6 kinesins to mediate cytokinesis, *Genetics.* 165:477-488.

Longtine, M.S. y E. Bi. 2003. Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol.* 13:403-409.

Lu, Q., E.O. Harrington, C.M. Hai, J. Newton, M. garber, T. Hirase y S. Rounds. 2004. Isoprenylcystein carboxyl methyltransferase modulates endothelial monolayer permeability: involved of RhoA carboxyl methylation. *Circ. Res.* 94:306-315.

Magan, N. 2007. Fungi in extreme environments. En: *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*, 85-104. K. Esser, C.P. Kubicek e I.S. Druzhinina (eds.), Berlin Springer.

- Mahlert, M., L. Leveleki, A. Hlubek, B. Sandrock y M. Bölker. 2006. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 59:567-578.
- Maltese, W.A. 1990. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J.* 4:3319-3329.
- Maltese, W.A. y K.M. Sheridan. 1987. Isoprenylated proteins in cultured cells: subcellular distribution and changes related to altered morphology and growth arrest induced by mevalonate deprivation. *J. Cell Physiol.* 133:471-481.
- Marston, A.L., T. Chen, M.C. Yang, P. Belhumeur y J. Chant. 2001. A localized GTPase exchange factor, Bud5, determines the orientation of division axes in yeast. *Curr. Biol.* 11:803-807.
- Martin, S.G. 2009. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell Biol.* 19:447-454.
- McCallum, S.J., W.J. Wu y R.A. Cerione. 1996. Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *J. Biol. Chem.* 271:21732-21737.
- McDaniel, D.P. y R.W. Roberson. 2000. Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genet. Biol.* 31:233-244.
- McGoldrick, C.A., C. Gruver y G.S. May. 1995. *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J. Cell Biol.* 128:577-587.
- Menotta, M., A. Amicucci, G. Basili, E. Rivero, E. Polidori, D. Sisti y V. Stocchi. 2007. Molecular characterization of the small GTPase CDC42 in the ectomycorrhizal fungus *tuber borchii* Vittad. *Protoplasma.* 231:227-237.
- Miyano, K., H. Koga, R. Minakami y H. Sumimoto. 2009. The insert región of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem.* 422:373-382.
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:580-585.

- Morris, S.J., C.F. Friese y M.F. Allen. 2007. Disturbance in natural ecosystems: scaling from fungal diversity to ecosystem functioning. En: *The Mycota IV: environmental and microbial relationships*, 31-46. K. Esser, C.P. Kubicek e I.S. Druzhinina (eds.), Berlin Springer.
- Mouriño Pérez, R.R., R.W. Roberson y S. Bartnicki García. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 43:389-400.
- Nelson, W.J. 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 422:766-774.
- Nern, A. y R.A. Arkowitz. 1999. A Cdc42p-Far1p-G β γ protein complex required for yeast orientation during mating. *J. Cell Biol.* 144:1187-1202.
- Novick, P. y P. Brennwald. 1993. Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell.* 75:579-601.
- Ohga, N., A. Kikuchi, T. Ueda, J. Yamamoto e Y. Takai. 1989. Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:1523-1533.
- Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signaling. *Cell Signal.* 11: 545-554.
- Omer, C.A. y J.B. Gibbs. 1994. Protein prenylation in eukaryotic microorganisms: genetics, biology and biochemistry. *Mol. Microbiol.* 11:219-225.
- Ozaki Kuroda, K., Y. Yamamoto, H. Nohara, M. Kinoshita, T. Fujiwara, K. Irie e Y. Takai. 2001. Dynamic localization and function of Bni1p at sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21:827-839.
- Palmieri, S.J., y B.K. Haarer. 1998. Polarity and division site specification in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:678-686.
- Papadaki, P., V. Pizon, B. Onken y E.C. Chang. 2002. Two ras pathways in fission yeast are differentially regulated by two ras guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Cell. Biol.* 22:4598-4606.

Park, H.O., J. Chant e I. Herskowitz. 1993. *BUD2* encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature*. 365:269-274.

Park, H.O. y J. Chant. 1996. Bud2 protein. En: M. Zerial and Huber (ed.), *The guidebook to the small GTPases*. New York. Oxford University Press. p. 200-203.

Park, H.O., E. Bi., J.R. Pringle e I. Herskowitz. 1997. Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:4463-4468.

Park, H.O., A. Sanson e I. Herkowitz. 1999. Localization of Bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev*. 13:1912-1917.

Park, H.O., P.J. Kang y A.W. Rachfal. 2002. Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *J. Biol. Chem*. 277:26721-26724.

Park, H.O. y E. Bi. 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*. 71:48-96.

Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., y Hall, A. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol*. 111: 1001-1007.

Pawson, T. 1988. Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncog*. 3:491-495.

Pearson, C.L., K. Xu, K.E. Sharpless y S.D. Harris. 2004. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*. 15:3658-3672.

Pereira Leal, J.B., A.N. Hume y M.C. Seabra. 2001. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS letters*. 498:197-200.

Pérez, P. y S.A. Rincón. 2010. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeast. *Biochem. J*. 426:243-253.

- Powers, S., E. Gonzales, T. Christensen, J. Cubert y D. Broek. 1991. Functional cloning of *BUD5*, a *CDC25*-related gene from *Saccharomyces cerevisiae* that can suppress a dominant-negative *RAS2* mutant. *Cell*. 113:1225-1231.
- Price, M.O., S.J. Atkinson, U.G., Knaus y M.C. Dinauer. 2002. Rec activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J. Biol. Chem.* 277:19220-19228.
- Pringle, J.R., E. Bi, H.A. Harkins, J.E. Zahner, C. De Virgilio, J. Chant, K. Corrado y H. Fares. 1995. Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 60:729-744.
- Pringle, A. y J. Taylor. 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends. Microbiol.* 10:474-481.
- Prosser, J.I. y P.J. Trinci. 1979. A model for hyphal growth and branching. *J. Gen. Microbiol.* 111:153-164.
- Pruyne, D. y A. Bretscher. 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J. Cell Sci.* 113:365-375.
- Pruyne, D., A. Legesse Miller, L. Gao, Y. Dong y A. Bretscher. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:559-591.
- Rameh, L. E., A.K. Arvidsson, K.L. Carraway III, A.D. Couvillon, G. Rathbun, A. Crompton, B. VanRenterghem, M.P. Czech, K.S. Ravichandran, S.J. Burakoff, D.S. Wang, C.S. Chen y L.C. Cantley. 1997. A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 272:22059-22066.
- Rasmussen, C.G. y N.L. Glass. 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Euk. Cell.* 4:1913-1925.
- Ridley, A. 2000. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J. Cell Biol.* 150: F107-109.
- Richman, T.J., M.M. Sawyer y D.I. Johnson. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot. Cell.* 1:458-468.

Richman, T.J., K.A. Toenjes, S.E. Morales, K.C. Cole, B.T. Wasserman, C.M. Taylor, J.A. Koster, M.F. Whelihan y D.I. Johnson. 2004. Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr. Genet.* 45:339-349.

Richthammer, C. 2011. Rho GTPases and their regulators in cell polarity of the filamentous ascomycete *Neurospora crassa*. Doctor rerum naturalium. Göttingen. der Georg August Universität. 137pp.

Rittentour, W.R., H. Si y S.D. Harris. 2009. Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol. Rev.* 23:20-29.

Rodríguez Pachón, J.M. 2001. Implicación de la proteína quinasa PAK Skm1 y de la GTPasa Cdc42 en procesos de crecimiento polarizado en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 151pp.

Roemer, T., K. Madden, J. Chang y M. Snyder. 1996. Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev.* 10:777-793.

Rolke, Y. y P. Tudzynski. 2008. The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 68:405-423.

Rossman, K.L., C.J. Der y J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:167-180.

Roumanie, O., C. Weinachter, I. Larrieu, M. Crouzet y F. Doignon. 2001. Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 506:149-156.

Ruggieri, R., A. Bender, Y. Matsui, S. Powers, Y. Takai, J.R. Pringle y K. Matsumoto. 1992. *RSR1*, a *ras*-like gene homologous to *Krev-1* (*smg21A/rap1A*): role in the development of cell polarity and interactions with the Ras pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 12:758-766.

Sagot, I., S.K. Klee y D. Pellman. 2002. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4:42-50.

Sahai, E., A.S. Alberts y R. Treisman. 1998. RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* 17:1350-1361.

Sakagami, Y., M. Yoshida, A. Isogai y A. Suzuki. 1981. Peptidal sex hormones inducing conjugation tube formation in compatible mating-type cells of *Tremella mesenterica*. *Science.* 212:1525-1527.

Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. , New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuel, F. y L. Hynds. 2010. Rho GTPases signaling for axón extension: is prenylation important? *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-010-8144-2.

Sandrock, B., C. Böhmer y M. Bölker. 2006. Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 62:655-666.

Schmit, J.C. y S. Brody. 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev.* 40:1-41.

Schafer, W.R. y J. Rine. 1992. Protein prenylation: genes, enzymes, targets and functions. *Annu. Rev. Genet.* 26:209-237.

Schafer, W.R., R. Kim, R. Sterne, J. Thorner, S.H. Kim y J. Rine. 1989. Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and human. *Science.* 245:379-385.

Scheffer, J., C. Chen, P. Heidrich, M.B. Dickman y P. Tudzynski. 2005. A CDC42 homologue in *Claviceps purpurea* is involved in vegetative differentiation and is essential for pathogenicity. *Euk. Cell.* 4:1228-1238.

Schmidt, R.A., C.J., Schneider y J.A. Glomset. 1984. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J. Biol. Chem.* 259:10175-10180.

Seiler, S. y D. Justa Schuch. 2010. Conserved components, but distinct mechanisms for the placement and assembly of the cell división machinery in unicelular and filamentous ascomycetes. *Mol. Microbiol.* 78:1058-1076.

- Seiler, S. y M. Plamann. 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 14:4352-4364.
- Selker, E.U. 1990. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.* 24:579-613.
- Sells, M.A. y J. Chernoff. 1997. Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol.* 7:162-167.
- Sheu, Y.J. y M. Snyder. 2001. Control of cell polarity and shape. En: Howard, R.J., N.A.R. Gow (eds.). *The mycota. Biol. Fungal Cell. Vol. VIII.* Berlin. Springer. 19-53 p.
- Shimada, Y., M.P. Gulli y M. Peter. 2000. Nuclear sequestration of the Exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat. Cell Biol.* 2:117-124.
- Shimada, Y., P. Wiget, M.P. Gulli, E. Bi y M. Peter. 2004. The nucleotide Exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *EMBO J.* 23:1051-1062.
- Si, H., D. Justa Schuch, S. Seiler y S.D. Harris. 2010. Regulation of Septum Formation by the Bud3-Rho4 GTPase Module in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 185:165-176.
- Sloat, B.F., A. Adams, y J.R. Pringle. 1981. Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 89:395-405.
- Smith, G.R., S.A. Givan, P. Cullen y G.F. Sprague. 2002. GTPase-activating proteins for Cdc42. *Euk. Cell.* 1:469-480.
- Snyder, M. 1989. The Spa2 protein localizes to sites of cell growth. *J. Cell Biol.* 108:1419-1429.
- Sprang, S.R. 1997. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66:639-678.
- Steinberg, G. 2007a. Hyphal growth: a tale of motors, lipids and the Spitzenkörper. *Euk. Cell.* 6:351-360.
- Steinberg, G. 2007b. On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:309-316.

- Stevenson, B.J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J.R. Pringle, G. Ammerer y G.F. Sprague Jr. 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 9:2949-2963.
- Stradal, T., W. Kranewitter, S.J. Winder y M. Gimona. 1998. CH domains revisited. *FEBS Lett.* 431:134-137.
- Sudbery, P.E. 2008. Regulation of polarized growth in fungi. *Fungal Biol. Rev.* 22:44-55.
- Symons, M. 1996. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biol. Sci.* 21:178-181.
- Szabo, R. 2001. Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Genet. Genomics.* 265:172-179.
- Taheri Talesh, N., T. Horio, L. Araujo Bazán, X. Dou, E.A. Espeso, M.A. Peñalva, S.A. Osmani y B.R. Oakley. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 19:1439-1449.
- Takai, Y., K. Kaibuchi, A. Kikuchi y M. Kawata. 1992. Small GTP-binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* 133:187-230.
- Takai, Y., T. Sasaki y T. Matozaki. 2001. Small GTP-Binding proteins. *Physiol. Rev.* 81:153-208.
- Takai, Y., T. Sasaki, K. Tanaka y H. Nakanishi. 2005. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 20:227-231.
- Takemoto, D., S. Kamakura, S. Saikia, Y. Becker, R. Wrenn, A. Tanaka, H. Sumimoto y B. Scott. 2011. Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *PNAS.* 108:2861-2866.
- Tatebe, H., K. Nakano, R. Maximo y K. Shiozaki. 2008. Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.* 18:322-330.
- Thapar, R., A.E. Karnoub y S.L. Campbell. 2002. Structural and biophysical insights into the roles of the insert region in Rac1 function. *Biochemistry.* 41:3875-3883.

- Toenjes, K.A., M.M. Sawyer y D.I. Johnson. 1999. The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr. Biol.* 9:1183-1186.
- Torralba, S., M Raudaskoski, A.M. Pedregosa y F. Laborda. 1998. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 144:45-53.
- Trinci, A.P.J. 1971. Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.* 67:325-344.
- Ushinsky, S.C., D. H Marcus, J. Ash, D. Dignard, A. Marcil, J. Morchhauser, D.Y. Thomas, M. Whiteway y E. Leberer. 2002. CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Euk. Cell.* 1:95-104.
- Vallim, M.A., C.B. Nichols, L. Fernandes, K.L. Cramer y J.A. Alspaugh. 2005. A Rac homolog function downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Euk. Cell.* 4:1066-1078.
- Valtz, N. e I. Herskowitz. 1996. Pea2 protein of yeast is localized to sites of polarized growth and is required for efficient mating and bipolar budding. *J. Cell Biol.* 135:725-739.
- Van Aelst, L. y C. D'Souza Schorey. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11: 2295-2322.
- Van Etten, J.L., L.D. Dunkle y S.N. Freer. 1977. Germination of *Rhizopus stolonifer* sporangiospores. En: *Eukaryotic microbes as model developmental systems.* (D.M.O. Day y P.A. Horgen Eds). New York. Marcel Dekker. 372-374 p.
- Vauchelles, R., D. Stalder, T. Botton, R.A. Arkowitz y M. Bassilana. 2010. Rac1 dynamic in the human opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS one.* 5:e15400. doi:10.1371/journal.pone.0015400.
- Verdín, J., S. Bartnicki García y M. Riquelme. 2009. Functional stratification of the spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 74:1044-1053.
- Vetter, I.R. y A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294:1299-1304.

Virag, A. y S. D. Harris. 2006. The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol. Res.* 110:4-13.

Virag, A., M.P. Lee, H. Si y S.D. Harris. 2007. Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 66:1579-1596.

Vogel, H.J. 1956. A convenient growth médium for *Neurospora* (Medium N.) *Microb. Genet. Bull.* 13:42-43.

Vogt, N. y S. Seiler. 2008. The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Mol. Biol. Cell.* 19:4554-4569.

Waddick, K.G. y F.M. Uckun. 1998. Innovative treatment programs against cancer. Ras oncoprotein as a molecular target. *Biochem. Pharmacol.* 56:1411-1426.

Wai, S.C., S.A. Gerber y R. Li. 2009. Multisite phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 during yeast cell polarization. *PLoS one.* 4:e6563. doi:10.1371/journal.pone.0006563.

Wainright, J. 1992. An introduction to fungal biotechnology. New York. Wiley. 202 p.

Walsh, T.J., A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides y E. Anaissee. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:48-66.

Wang, C.H., M.K. Balasubramanian y T. Dokland. 2004. Structure, cristal packing and molecular dynamics of the calponin-homology domain of *Schizosaccharomyces pombe* Rng2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:1396-1403.

Watters, M.K. y A.J.F. Griffiths. 2001. Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67:1788-1792.

Wei, Y., Y. Zhang, U. Derewenda, X. Liu, W. Minor, R.K. Nakamoto, A.V. Somlyo, A.P. Somlyo y Z.S. Derewenda. 1997. Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* 4:699-703.

- Weinzierl, G., L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner y M. Bölker. 2002. Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 45:219-231.
- Wendland, J., y P. Philippsen. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple Rho-protein modules in filamentous Ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics.* 157:601-610.
- Wendland, J. 2003. Analysis of the landmark protein Bud3 of *Ashbya gossypii* reveals a novel role in septum construction. *EMBO.* 4:200-204.
- Wendland J. y A. Walther. 2005. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. *Nature Rev. Microbiol.* 3:421-429.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman y C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118:843-846.
- Westergaard, M. y H.K. Mitchell. 1947. Neurospora V: a synthetic medium favoring sexual production. *Am J. Bot.* 34:573-574.
- Wiggin, G.R., J.P. Fawcett y T. Pawson. 2005. Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Develop. Cell.* 8:803-816.
- Wolda, S.L. y J.A. Glomset. 1988. Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid. *J. Biol. Chem.* 263:5997-6000.
- Wu, C., V. Lytvyn, D.Y. Thomas y E. Leberer. 1997. The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinase is essential for the function of myosin-I in yeast. *J. Biol. Chem.* 271:30623-30626.
- Xiang, X. y M. Plamann. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:628-633.
- Yamane, H.K., C.C. Farnsworth, H. Xie, T. Evans, W.N. Howald, M.H. Gelb, J.A. Glomset, S. Clarke y B.K.K. Fung. 1991. Membrane-binding domain of the small G protein G25K contains an S-(all-trans-geranylgeranyl)cysteine methyl ester at its carboxyl terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:286-290.

- Ye, X. y P.J. Szaniszló. 2000. Expression of a constitutively active Cdc42 homolog promotes development of sclerotic bodies but represses hyphal growth in the zoopathogenic fungus *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 182:4941-4950.
- Zahner, J.E., H.A. Harkins y J.R. Pringle. 1996. Genetics analysis of the bipolar pattern of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16:1857-1870.
- Zhang, F.L. y P.J. Casey. 1996. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65:241-269.
- Zhang, X., E. Bi, P. Novick, L. Du, K.G. Kozminski, J.H. Lipschutz y W. Guo. 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.* 276:46745-46750.
- Zheng, Y., R. Cerione y A. Bender. 1994. Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* 269:2369-2372.
- Zheng, Y., A. Bender y R.A. Cerione. 1995. Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270:626-630.
- Zheng, Y., D. Zangrilli, R.A. Cerione y A. Eva. 1996. The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic Dbl through specific intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 271:19017-19020.
- Zheng, W., Z. Zhao, J. Chen, W. Liu, H. Ke, J. Zhou, G. Lu, A.G. Darvill, P. Albersheim, S. Wu y Z. Wang. 2009. A Cdc42 ortholog is required for penetration and virulence of *Magnaporthe grisea*. *Fung. Genet. Biol.* 46:450-460.
- Ziman, M., J.M. O'Brien, L.A. Ouellette, W.R. Church y D.I. Johnson. 1991. Mutational analysis of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Cell. Biol.* 11:3537-3544.
- Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J. M. O'Brien, D. Botstein y D. I. Johnson. 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Biol. Cell.* 4:1307-1316.
- Ziman, M., y D.I. Johnson. 1994. Genetic evidence for a functional interaction between *Saccharomyces cerevisiae* CDC24 and CDC42. *Yeast.* 10:463-474.

Zong, H., N. Raman, L.A. Mickelson Young, S.J. Atkinson y L.A. Quilliam. 1999. Loop 6 of RhoA confers specificity for effector binding, stress fiber formation, and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 274:4551-4560.

Apéndice A



Figura complementaria 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de CDC-42 y RAC para la sustitución de aminoácidos en las mutantes condicionales *cdc-42* y *rac* en *N. crassa*. (A) Secuencia de aminoácidos en *N. crassa* (*Nc CDC42*), *A. nidulans* (*An MODA*), *S. cerevisiae* (*Sc Cdc42p*), *D. melanogaster* (*Dm CDC42*). La sustitución de cada aminoácido se indica en los recuadros de color rojo. (B) Secuencia de aminoácidos en *N. crassa* (*Nc RAC*), *A. nidulans* (*An RACA*), *D. melanogaster* (*RAC1*). La sustitución del aminoácido se señala en el recuadro de color rojo.

Apéndice B

cdc-24(10-19): F254S* *cdc-24(19-3): L444S* *cdc-24(24-21): Q264R

<i>N. crassa</i>	TTGFVKVTSVINYLVDLAEKRGLLQLTLPYPEDDIT-----QPQSKMTHRDYIVRELV 219
<i>A. nidulans</i>	TIGFTKVIKMVNRVLDILEIQGQLKKPS-DTAMAAP-----AAGRKLTKREHILKELL 187
<i>U. maydis</i>	TNGFVKVVRTINRLLDVFEERGLLIETN--RKSDND-----DLDHPSDDRKAVIRELL 282
<i>S. pombe</i>	TAPLVRALQTIPELLKKYEVSNNTKSSSTPSPSTDDNVPTG--TLNSLIASGRRVTAELY 237
<i>C. albicans</i>	AQDLIKIIDVINKLLAEYSDASDSGGGDEDVNMVDQ-----ITDERSKIVFREII 286
<i>S. cerevisiae</i>	TSQLVKVLEVVEITLNMSSPTIFPSKSKTQQIMNAENQHRHQPPQSSKKHNEYVKIIFEV 287
	: : : : : : : : : : : *
<i>N. crassa</i>	ETERKYVQDLENLHDLKRTLLEHRSVIPGEFIHDIPLNINAILDHQRKFLIRVETTSNMPQ 279
<i>A. nidulans</i>	ETERDYVHHLQNLQALKKELEDGTALTDASHQIFLNLNLLDFSRFLIRLEQHYARPE 247
<i>U. maydis</i>	TERKYVQDLEVMQNYARALAQYDILPPDTLHNLFFNLNKLVDVQRFLICVENVRRT 342
<i>S. pombe</i>	ETELKYIQDLEYLSNYVILQKQILSQDITLSIFNLNEILDQRFRFLVGLMNLSLPV 297
<i>C. albicans</i>	ETERKYVQDLELMCKYRQDLIEAENLSSEQIHLFFNLNEIIDQRFRFLNGLECNINVI 346
<i>S. cerevisiae</i>	ATERKYVHDLILDKYRQQLDLSNLTSEELYMLFENLGDADIDQRFRFLISLEINALVEP 347
	** . * : : * : : * . : : : * * : : * : : * * : *
	RhoGEF
<i>N. crassa</i>	ARQEWGSLFVTAEN-FGIYQPFIANQ-RKAAQVATQVFDKIQEAG-----HPVACDFNT 332
<i>A. nidulans</i>	EQQNWGELFIQHAEA-FRQYEPFIANQ-MRCDKTCQKEWDKIQAAPRSPDLQQMVAQPAT 305
<i>U. maydis</i>	DEQHFHGHVFMTEED-FSVYEPFCANYNLALDLINQEAHNLIRLKGMPAEGCYLDPAYE 401
<i>S. pombe</i>	EEQRLGALFIALEEG-FSVYQVFCNFPNAQQQLIIDNQQLLKVAN-----LLEPSYE 349
<i>C. albicans</i>	RYQRIGSVFIHASLGFNAYEPWTIGQLTAIDLINKEAANLKKSS-----LLDPGFE 399
<i>S. cerevisiae</i>	SKQRIGALFMHSHKF-FKLYEPWSIGQNAAEFLSSTLHKMRVDES-----QRFIINNKLE 402
	* . * : : . * * : : .
<i>N. crassa</i>	LDGFLLKPMQRLVKYPLLLKDLLKKS-EDeht-----KEDLAAGIAAAERVLKMA 381
<i>A. nidulans</i>	LNGFVVKPFQRLTKYPLMLSELRKQI-EDFDL-----QADISRADSIQSVLDAA 354
<i>U. maydis</i>	LPTFMIKPVQRICKYPLLEQLLKKTSDDAPR-----YQELQNGLEVMRRITDKV 451
<i>S. pombe</i>	LPALLIKPIQRICKYPLLNQLLKGTPSGYQY-----EELKQGMACVVRVANQV 399
<i>C. albicans</i>	LQSYILKPIQRLCKYPLLLKELIKTSPEYSKQDPHGSSSSTSFNELLVAKTAMKELANQV 459
<i>S. cerevisiae</i>	LQSFYKPVQRLCRYPLLVKELLAESSDDNNT-----KELEAALDISKNIARSI 451
	* : * * . * : : * * : : * * : : : : : *
<i>N. crassa</i>	NSAVDKNILEEALQDLIHRVDDWKS HKVDNFGSLLHGVYTVITGKSEQEKD-QYEIYLF 440
<i>A. nidulans</i>	NDAIDKEQLAAAFVELDERVDDWALKIETFGELLRFGFTVIKNDNNKDSEREYHIYLF 414
<i>U. maydis</i>	NETSRLQGNAQLVKELEFRVEDWKGHNKTFGLLLSDVFMVAKS-----DTEREYHVYLF 507
<i>S. pombe</i>	NETRRIHENRNAIIELEQRVIDWKGYSLQYFGQLLVVDVNVCKA----DIEREYHVYLF 455
<i>C. albicans</i>	NEAQRRAENIEHLEKLERVGNWRGFNLDAQGELLFHGQVGVKDA----ENEKEYVAYLF 515
<i>S. cerevisiae</i>	NENQRRTENHQVVVKLYGRVNVNWKYRISKFGELLYFDKVFISTNSSSEPEREFVYLF 511
	* . : . * * * * : : . : . * * * . : : : : * * *
	PH
<i>N. crassa</i>	ENILLCCKELTTTKAKD-----KKDKTRSVPKLRNKFALQLKGRIFMTNVTDVV 491
<i>A. nidulans</i>	ERILLCCKDINPNKQKS-----RLVGGSKDKPNTSKGKPRLVKGRIMANVTDIV 465
<i>U. maydis</i>	EKILLCCKELAPAAQKKSNNKNSLLKQKNGLGAATAGGKPKTTLQKGRIFINNVTGAF 567
<i>S. pombe</i>	EKILLCCKEMSTLKRQAR-----SISMNKKTKRLDSLQKGRILTSNITTVV 502
<i>C. albicans</i>	EKIVFFTEIDDNKKS-----KQEKSKFSTRKSTSSNLSST 555
<i>S. cerevisiae</i>	EKILILFSEVVTKKSAS-----SLILKKSSTSSASISASNITDNN 551
	* . * : : . : : * * : :

Figura complementaria 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de CDC-24 en diferentes especies fúngicas. Secuencia de aminoácidos en *N. crassa*, *A. nidulans*, *U. maydis*, *S. pombe*, *C. albicans* y *S. cerevisiae*. La sustitución de cada aminoácido para las mutantes condicionales de *cdc-24* en *N. crassa* e indicados en los recuadros de color azul, verde y rosa se realizaron dentro de los dominios RhoGEF y PH.

Apéndice C

1. Solución de sales de Vogel

Cuadro I. Solución madre para preparar medio de Vogel (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
1. Sales de Vogel (50X)		g/750ml de agua destilada
1.1 Citrato de sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150g
1.2 Fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{anhidro}$	250g
1.3 Nitrato de amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{anhidro}$	100g
1.4 Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
1.5 Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
Añadir con agitación:		
1.6 Solución de elementos traza		5ml
1.7 Solución de biotina		2.5ml

NOTA: El resultado total equivale a 1lt, añadir 2ml de cloroformo como agente preservador.

2. Solución de elementos traza

Cuadro II. Fórmula para preparar solución de elementos traza (Vogel, 1956).

Constituyente:	Formula:	Cantidad:
2. Solución de elementos traza		g/95ml de agua destilada
2.1 Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
2.2 Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
2.3 Sulfato de amonio ferroso	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
2.4 Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
2.5 Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
2.6 Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05g
2.7 Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g

NOTA: El volumen final es de 100ml, añadir 1ml de cloroformo como agente preservador.

3. Solución de biotina

Cuadro III. Fórmula para preparar solución de biotina (Vogel, 1956).

Constituyente:	Cantidad:
3. Solución de biotina	5mg/50ml de agua destilada

Apéndice D

1. Solución de sales para cruza 2X

Cuadro I. Solución base para preparar medio sintético de cruza
(Westergaard y Mitchell, 1947.)

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
1.1 Nitrato de potasio	KNO_3	2.0g
1.2 Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	1.4g
1.3 Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	1.0g
1.4 Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g
1.5 Cloruro de sodio	NaCl	0.2g
1.6 Cloruro de calcio	CaCl_2	0.2g
1.7 Biotina		10mg
1.8 Solución de elementos traza		0.2ml
1.9 Agua destilada	H_2O	1000ml
1.10 Cloroformo	CHCl_3	2ml

2. Solución de elementos traza

Cuadro II. Fórmula para preparar solución de elementos traza (Vogel, 1956).

Constituyente:	Formula:	Cantidad:
2.1 Solución de elementos traza		g/95ml de agua destilada
2.1 Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
2.2 Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
2.3 Sulfato de amonio ferroso	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
2.4 Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
2.5 Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
2.6 Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05g
2.7 Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g

NOTA: El volumen final es de 100ml, añadir 1ml de cloroformo como agente preservador.

3. Solución de biotina

Cuadro III. Fórmula para preparar solución de biotina (Vogel, 1956).

Constituyente:	Cantidad:
3 Solución de biotina	5mg/50ml de agua destilada

Ápndice E

1. Solución FGS 10X

Cuadro I. Solución base para preparar medio FGS.

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
1.1 Fructosa	$C_6H_{12}O_6$	5g
1.2 Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	5g
1.3 Sorbosa	$C_6H_{12}O_6$	200g
1.4 Agua destilada	H_2O	1000ml

NOTA: El volumen final, esterilizar por filtració