

Tesis defendida por
Marisol González Amarillas
Y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director del Comité

M.C Olga Alicia Callejas Negrete
Miembro del Comité

Dra. Nallely Cano Domínguez
Miembro del Comité

Dr. Santiago Camacho López
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de la Dirección de Estudios
de Posgrado

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de posgrado en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología

El papel de la proteína RGD-1 en el crecimiento polarizado
del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

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

Presenta:
Marisol González Amarillas
Ensenada, Baja California, México

2014

Resumen de la tesis de Marisol González Amarillas, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

El papel de la proteína RGD-1 en el crecimiento polarizado en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Las proteínas Rho son esenciales como reguladores del crecimiento polarizado en las células eucariotas. Estas proteínas son reguladas por las proteínas activadoras de GTPasas (RhoGAPs). En *N. crassa* se ha descrito a LRG-1 como una reguladora de la RHO-1, sin embargo no existen estudios que identifiquen el resto de las RhoGAPs de este hongo filamentoso. En este trabajo se identificó a gen *rgd-1* en *N. crassa* (NCU00553.5) el cual codifica para la proteína RGD-1, de 743 aminoácidos, que contiene el dominio F-BAR en el N-terminal y un dominio RhoGAP en el C-terminal característico de las proteínas RhoGAPs. Se llevó a cabo el estudio del papel de la proteína RGD-1 a través de la caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta rgd-1$. Se encontró que la ausencia de esta proteína genera hifas con mayor número de ramificaciones y una disminución en la producción de conidios. También se caracterizó el fenotipo de una cepa doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$, la cual mostró un patrón de ramificación similar al de la cepa $\Delta rgd-1$. Respecto a la tasa de crecimiento todas las cepas mutantes analizadas se observaron muy semejantes a la cepa silvestre. El sitio específico de activación de la Rho GTPasa CDC-42 es crítico para el establecimiento de la polaridad celular, por ello se analizó la localización de la Rho GTPasa CDC-42 etiquetada con YFP en la cepa mutante $\Delta rgd-1$, revelando una localización el ápice de las hifas, similar que una cepa silvestre. Sin embargo el área apical que ocupa CDC-42 en la cepa mutante de $\Delta rgd-1$ se ve ligeramente disminuída. Por lo cual, se analizó la localización de la actina a través del reportero lifeact-GFP en la cepa mutante de $\Delta rgd-1$. La localización de la actina no se vio afectada, observándose igual que una cepa silvestre en los sitios del collar endocítico y en el spitzenkörper. Por los resultados obtenidos se puede concluir que RGD-1 participa en la regularización de la Rho GTPasa CDC-42, sin embargo no es esencial y en su ausencia CDC-42 es regulada por otras GAPs.

Palabras clave: **Crecimiento polarizado, Rho GTPasa, GAP, RGD-1**

Abstract of the thesis presented by Marisol González Amarillas as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

The role of the RGD-1 protein in the polarized growth of the filamentous fungus
Neurospora crassa.

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis advisor

Rho proteins are essential regulators of polarized growth in eukaryotic cells. These proteins are regulated in vivo by Rho GTPase activating proteins (RhoGAPs). In *N. crassa* LRG-1 has been described as a regulator of the RHO-1, however there are no studies that identify the remaining RhoGAPs in this filamentous fungus. In this work the gene *rgd-1* was identified in the *N. crassa* (NCU00553.5) which encodes the RGD-1 protein of 743 amino acids containing the F-BAR domain at the N-terminus and a characteristic RhoGAP domain of the GAP proteins at the C-terminus. The study of the role of RGD-1 protein was done by phenotypic characterization of the mutant strain $\Delta rgd-1$. It was found that the absence of this protein generates hyphae with more branches and a decrease in the conidia production. Also, a double mutant for two GAPs was phenotypically characterized, the double mutant strain $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$, which showed similar branching pattern as the *rgd-1* strain the branching pattern of the strain $\Delta rgd-1$. Regarding the growth rate of all strains it was observed a very similar pattern to the wild type strain. Site specific activation of the Rho-type GTPase CDC-42 tagged with YFP in a $\Delta rgd-1$ mutant strain was analyzed, revealing a location at the apex of the cell, as in the wild type strain. However, the area occupied by CDC-42 was slightly less in the mutant *rgd-1*. Therefore, actin localization through lifeact-GFP reporter in $\Delta rgd-1$ mutant strain was analyzed. The localization of actin was not affected, it was observed in endocytic sites and in the spitzkörper. From the results obtained it can be concluded that RGD-1 participate in the RhoGTPase CDC-42 regulation, however is not essential and its absence on other GAPs regulate CDC-42.

Key words: **Polarized growth, RhoGTPase, CDC-42, GAP**

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante estos dos años de estudios, apoyando la investigación científica.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Microbiología por permitirme realizar este posgrado.

Al proyecto de ciencia básica SEP-CONACyT CB2011/169154 por haber financiado este trabajo de tesis.

A mi comité de tesis por su apoyo, sugerencias y comentarios mucha paciencia y durante este trabajo, la Dra. Ernestina Castro por darme la oportunidad de aceptarme en su equipo de trabajo, por sus observaciones y por toda su paciencia durante mi estancia. A la Dra. Nallely Cano, joven y entusiasta investigadora que compartió sus conocimientos y me impulsó durante este trabajo. A la M.C Olga Callejas por su gran disposición y apoyo otorgado. Y claro que al Dr. Santiago Camacho que sin conocerme aceptó ser parte del comité, gracias por sus preguntas durante los avances y por su paciencia.

A todo el equipo del Laboratorio de Microbiología, miembros de mi generación y a los investigadores que me dieron clase y aprendí mucho de ellos. Compañeros del equipo de la Dra. Ernestina en especial a Marión por todo su aguante y a Katrin por su sencillez y apoyo, son unas bellas!

A mi amiga Ana Paola, que ha sido mi bestfriend y que juntas hemos vivido de todo un poco en esta corta estancia de conocernos.

A cada una de mis amigas, las de aquí, las de allá....gracias por todo su apoyo. A la Escuela de Enología y Gastronomía de la UABC y al petite comité.

A mi familia que siempre ha creído en mí y me han impulsado en todas las etapas de mi vida. A la Fam. Carpinteyro por engendrarme como una "hija" y a toda mi familia en el espíritu que saben que les amo.

A mi amado, por todo su amor y paciencia que me han inspirado a continuar y esperar en los tiempos perfectos que el Señor tiene para los dos, te amo Cris!!

Mencionando a lo último, como el mejor vino hasta el final...a mi razón de vivir, a mi Señor, mi Rey, mi Padre, mi amigo a quien le doy todo el honor y la gloria por tomarme de su mano justo cuando empecé este proyecto. Tu superas todo!!!!

Contenido

Resumen Español.....	ii
Resumen Inglés.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Crecimiento Polarizado.....	2
1.2 Las GTPasas de la familia Rho.....	4
1.3 Regulación de las proteínas Rho.....	7
1.4 Mecanismo de acción y función de las Rho GAPs.....	8
1.5 La GTPasa Cdc42 y sus reguladores en hongos.....	10
1.6 La GTPasa Cdc42 y sus reguladores en los hongos filamentosos.....	13
1.7 <i>Neurospora crassa</i>	14
Capítulo 2. Justificación.....	18
Capítulo 3. Objetivos.....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
Capítulo 4. Hipótesis.....	20
Capítulo 5. Materiales y métodos.....	21
5.1 Cepas utilizadas.....	21
5.2 Medios de cultivo.....	22
5.3 Análisis Bioinformático.....	22
5.4 Diseño de Oligonucleótidos.....	22
5.5 Cruzas genéticas y obtención de ascosporas.....	23
5.6 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	24
5.7 Separación de DNA mediante electroforesis.....	24
5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
5.9 Transformaciones en <i>N. crassa</i>	25
5.10 Recuperación de transformantes de <i>N. crassa</i>	26
5.11 Recuperación y conteo de conidios.....	27
5.12 Morfología colonial.....	27
5.13 Determinación de la tasa de crecimiento.....	28
5.14 Índice de ramificación.....	28
5.15 Conidiación.....	28
5.16 Medición de biomasa.....	28
5.17 Métodos de microscopía.....	29
5.17.1 Microscopía de bajo aumento.....	29
5.17.2 Microscopía de alto aumento.....	29
Capítulo 6. Resultados.....	30

6.1 La proteína NCU00553.5 es homóloga a la proteína Rgd1p de <i>S. cerevisiae</i>	31
6.2 Obtención de la cepa homocarión $\Delta rgd-1$	34
6.3 Comprobación de la cepa mutante $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ mediante PCR.....	36
6.4 Obtención de la cepa doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$	37
6.5 La mutante $\Delta rgd-1$ crece de igual manera que una cepa silvestre.....	38
6.6 Las cepas mutantes crecen con mayor número de ramificaciones.....	41
6.7 Las mutantes sencillas $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ muestran diferencias en la producción de biomasa	44
6.8 La mutante $\Delta rgd-1$ se encuentra afectada en la producción de las esporas pero no en la formación del micelio aéreo.....	45
6.9 El Spk de las mutantes $\Delta rgd-1$, $\Delta bem3$ y $\Delta rgd-1; \Delta bem3$ muestran una localización similar al de la cepa silvestre.....	46
6.10 La cepa $\Delta rgd-1$ no muestra alteraciones durante la formación de pared celular.....	49
6.11 La cepa mutante $\Delta rgd-1$ muestra una organización de actina en el collar endocítico y en el spk.....	51
6.12 La cepa mutante $\Delta rgd-1$ muestra una localización regular de la proteína YFP-CDC-42.....	53
Capítulo 7. Discusión.....	55
Conclusiones.....	63
Referencias Bibliográficas.....	64
Apéndice.....	74

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Morfogénesis de los hongos filamentosos.	4
2	Ciclo de las GTPasas.	8
3	Mecanismo de acción de las RhoGAPs.	9
4	Esquema que muestra la organización de los dominios de la proteína Rgd1p de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .	13
5	Ciclo de vida de <i>Neurospora</i> .	17
6	Esquema de los dominios encontrados en la secuencia de <i>N. crassa</i> correspondiente al NCU00553.5.	32
7	Alineamiento de la secuencia de los ortólogos de RGD-1 de otros hongos.	33
8	Productos obtenidos de la cruce sexual.	35
9	Identificación mediante PCR de la cepa mutante Δ <i>rgd-1</i> .	36
10	Identificación mediante PCR de la cepa mutante Δ <i>bem-3</i> .	37
11	Identificación mediante PCR de la cepa doble mutante Δ <i>rgd-1</i> ; Δ <i>bem-3</i> .	38
12	Morfología colonial de la cepa silvestre y de las mutantes a las 24 y 36 horas.	39
13	Gráfica que muestra la elongación micelial de las cepas mutantes simples y la doble mutante.	41
14	Gráfica que muestra el número de ramas en 200 μ m en las cepas mutantes simples y doble mutante.	43

15	Ramificación de las cepas silvestres y mutantes de <i>N. crassa</i>	43
16	Gráfica que muestra el promedio del peso en seco a las 24 h de crecimiento.	44
17	Gráfica de la concentración de conidios en las cepas silvestre, mutantes simples y en la doble mutante.	45
18	Hifas aéreas de las cepas silvestres, las mutantes simples $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y la mutante doble $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$.	46
19	Localización del Spk de las hifas de las cepas silvestre y mutantes.	48
20	Microscopía confocal de las cepas silvestre, mutantes y doble mutante.	50
21	Distribución de actina (Lifeact-GFP) en una cepa silvestre (A) y en la cepa mutante $\Delta rgd-1$.	52
22	Localización de la YFP-CDC-42 en la cepa mutante $\Delta rgd-1$.	54
23	Ensayo de actividad de las RhoGTPasas RHO-1 a RHO-4, CDC-42 y RAC con las distintas GAPs de <i>N. crassa</i> .	57

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Cepas de <i>Neurospora crassa</i> y plásmidos utilizados durante este estudio.	21
2	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	23

Capítulo 1

Introducción

El reino de los hongos comprende una gran diversidad de formas y tamaños, incluyendo las levaduriformes y las filamentosas (St. Germain y Summerbell, 1996). En el caso de los hongos filamentosos, estos se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y su importancia destaca por causar severa contaminación en alimentos, así como ser patógenos de plantas, animales y el hombre (Fischer *et.al*, 2008). Por otro lado, la capacidad metabólica de estos microorganismos les atribuye un impacto positivo al ser utilizados en los procesos de fermentación para la producción de moléculas de interés en la industria biotecnológica, como enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos u otros metabolitos (Ferreira *et al.*, 2011). Algunos de ellos son económicamente muy importantes en la industria de los alimentos y la producción de cerveza, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Kavanagh, 2005).

Los hongos representan sistemas experimentales que han sido extensivamente explotados para investigar detalles moleculares de las funciones de células eucariotas (Kavanagh, 2005). Ellos han servido como “organismos modelo” para la investigación en los campos de la genética y la biología celular. Los hongos filamentosos tienen una morfología muy ramificada y ocupan un amplio espectro de hábitats, su velocidad de crecimiento es resultado de un mecanismo fuertemente polarizado, alcanzando la biogénesis de la pared celular tubular (Riquelme *et al.*, 2011). El crecimiento polarizado es un proceso complejo porque posee propiedades multifactoriales, que son coordinadas por numerosas señales. Esta red de señalización incluye a las GTPasas de la superfamilia de las Ras, las proteínas cinasas dependientes de cAMP (PKA) y las MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos (Vogt, 2008). En los hongos, el crecimiento polarizado requiere de diversos procesos celulares como la organización del citoesqueleto, la exocitosis y la endocitosis, los cuales son integrados por una ruta

y regulados por el ciclo celular (Pérez y Rincón, 2010). Estos patrones son altamente conservados y regulan numerosos aspectos de crecimiento y desarrollo como la proliferación celular, motilidad y sobrevivencia, en sistemas fúngicos son importantes para el mantenimiento de la polaridad de la hifa, desarrollo y patogenicidad (Vogt, 2008).

1.1 Crecimiento polarizado

La polaridad celular, es un proceso central para el desarrollo de la mayoría de los organismos eucariotas debido a que es crítica para el funcionamiento de diversos procesos tales como el transporte de nutrientes, señalización neuronal y la motilidad celular (Park and Bi, 2007). En particular se ha observado la importancia de la polaridad celular durante el desarrollo embrionario, la generación de axones y la íntima comunicación entre los linfocitos con el sistema inmune (Chant, 1999). En el caso de las levaduras, se ha mostrado que es básica para la división y el apareamiento. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha servido como organismo modelo en la investigación de los mecanismos moleculares que dirigen el crecimiento polarizado debido a que este proceso es común en varios estadios de su ciclo de vida y la mayoría de las proteínas que participan en la polarización de las levaduras son altamente conservadas entre los diversos reinos, por tanto los modelos emergentes están aplicándose de manera general (Pruyne *et al.*, 2004; Gulli, 2001; Sudbery y Curt, 2007). Durante la división celular, el establecimiento de la polaridad es un proceso que involucra varias etapas, que son reguladas por señales intra y extracelulares. Primeramente se requiere de la selección de un sitio específico en el cortex celular (Gulli, 2001). Después se establece un eje de polaridad hacia el sitio seleccionado por medio de moléculas señalizadoras. En el sitio previamente seleccionado se organiza el citoesqueleto y se dirige la secreción hacia el lugar donde se llevará a cabo la formación de la célula "hija". Posteriormente, el crecimiento celular se restringe

solamente hacia la célula hija y cuando ésta alcanza casi el mismo tamaño de la célula madre, se lleva a cabo la mitosis y citocinesis; y la secreción es dirigida hacia el cuello el cual forma un septo separando la célula madre de la hija (Pruyne *et al.*, 2004).

El crecimiento polarizado es un proceso que se da en una región discreta de la célula, lo cual es una característica fundamental de la fisiología de los hongos. Esto permite que asuman una forma típica entre cada especie y modifican esta forma durante el apareamiento y la búsqueda de nutrientes (Virag y Harris, 2006). En el proceso de germinación de los hongos filamentosos, las esporas rompen su estado de dormancia y se expanden isotrópicamente lo cual genera células de forma esférica. Durante su crecimiento isotrópico todo el material y la maquinaria requerida para generar la pared celular nueva y la membrana plasmática se distribuye en el córtex celular. En una segunda etapa, se selecciona un punto determinado para la salida del tubo germinativo “selección del sitio de germinación”. En el tercer paso, todo el material generado para la nueva pared y membrana es dirigido hacia el punto establecido y el tubo germinativo emerge “estableciéndose de esta manera la polaridad”. Como cuarto paso, toda la maquinaria continúa sintetizando material hacia el mismo punto y el tubo germinativo se extiende apicalmente hasta dar lugar a la hifa “mantenimiento de la polaridad” la cual se extiende continuamente y se va proliferando por ramificaciones para formar un conjunto de hifas el cual se denomina micelio (Figura 1)(Wendland y Philippsen, 2000; Wendland 2001; Momany, 2002).

Existen varios estudios en diversos organismos, en los que se le han atribuido a las GTPasas un papel de moléculas señalizadoras en el desarrollo de la polaridad. Estas proteínas se encuentran bastante conservadas desde levaduras hasta humanos. Los sitios de crecimiento polarizado son caracterizados por marcadores corticales, los cuales son depositados en el sitio de gemación y en los tubos de apareamiento (shmoos) durante la reproducción sexual. En estos sitios marcados, la GTPasa Cdc42 actúa como el regulador

maestro en distintos aspectos del crecimiento celular y morfogénesis (Sudbery y Court, 2007). La célula construye un eje en la dirección escogida como un reflejo de la asimetría del citoesqueleto, nuevo crecimiento de pared celular y la posición de secreción e inserción de membrana. Esto es controlado por la Cdc42 y otras Rho GTPasas (Chant, 1999).

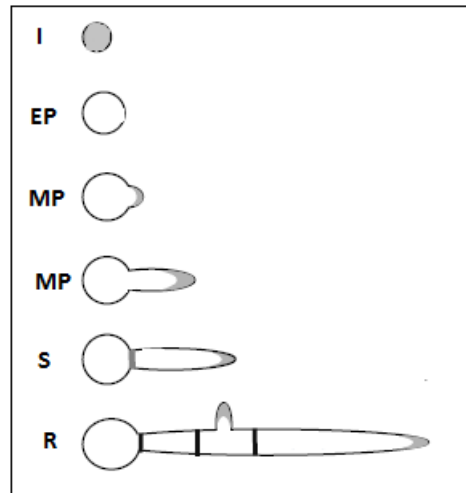


Figura 1. Morfogénesis de los hongos filamentosos. La sombra gris muestra las áreas de crecimiento. I, crecimiento isotrópico; EP, establecimiento de polaridad; MP, mantenimiento; S, septación; R, ramificación. Modificado de Momany, 2002 p580.

1.2 Las GTPasas de la familia Rho

Las GTPasas se dividen en dos principales grupos: la superfamilia de Ras y las Rho GTPasas. La superfamilia de las Ras GTPasas tiene alrededor de 60 miembros en mamíferos y 150 en humanos, sin embargo se dividen en cinco grupos principales: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Wennenberg *et al.*, 2005). Las GTPasas de la familia Rho constituyen un subgrupo de la superfamilia de las proteínas G pequeñas. Están altamente conservadas en todos los eucariotas y participan en funciones importantes dentro de la célula como la regulación del citoesqueleto de actina, la polaridad celular, el

tráfico de vesículas, el ciclo celular y la expresión génica (Villar, 2009). Así mismo, se les ha visto involucradas en la biogénesis de pared celular (Park y Bi, 2007).

Las proteínas G pequeñas tienen un tamaño regularmente entre 20/25 KDa y ciclan entre su estado inactivo de unión a GDP y su estado activo de unión a GTP. En su conformación activa, las proteínas G interactúan con proteínas efectoras que inducen a una serie de eventos de señalización río abajo (Bos *et al.*, 2007). Mientras tanto, cuando se encuentran unidas a GDP no pueden interactuar con sus blancos, por lo cual la señal no es transmitida (Pérez y Rincón, 2010). Es por ello que las GTPasas se les conoce como interruptores moleculares ya que ciclan entre ambos estados conformacionales: (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Schmidt y Hall, 2002).

Se han identificado 22 miembros de esta familia en los mamíferos, siendo RhoA, Rac1 y Cdc42 los mayormente estudiados. En células de mamíferos RhoA promueve la formación de las fibras de actina; Rac1 promueve la formación de protrusiones en superficies ricas en actina (lamelopodios) y el ruffling de la membrana; y Cdc42 promueve la formación de extensiones en la membrana (filopodios) (Etienne y Hall, 2002; Tuck y Manser, 2011; Köting C y Gerwert, 2013). La conclusión de que Rho, Rac y Cdc42 regulan 3 señales de transducción uniendo receptores de membrana plasmática hasta el ensamblaje de distintas estructuras ricas en actina ha sido confirmada en una gran variedad de células de mamífero así como en las levadura y las moscas (Etienne y Hall, 2002).

En los hongos, se ha encontrado que dentro de los marcadores espaciales y temporales que seleccionan el inicio de un proceso de polarización están involucradas las proteínas Cdc42 y Cdc24 (Araujo-Palomares, 2011). En *S. cerevisiae* no hay miembros de la familia de las RacGTPasas, sin embargo se han identificado GTPasas del tipo Rac en *Candida albicans* y *Penicillium marneffeii*

(Sudbery y Court, 2007). La GTPasa Rho1 es un regulador esencial de la síntesis de los principales componentes estructurales de la pared celular de *S. cerevisiae* y regula el transporte de una variedad de componentes de la pared celular que están involucrados en su biogénesis, organización de actina y la secreción polarizada (Cabib *et al.*, 1998; Levin, 2005). Poco se sabe del papel de la GTPasa Rho2, sin embargo se ha visto que la inactivación del gen no es esencial para la viabilidad de la célula, además que comparte parcialmente homología con la Rho1 (Madaule *et al.*, 1987; Levin, 2005). Las proteínas Rho3 y Rho4 son otras GTPasas involucradas en el crecimiento polarizado de *S. cerevisiae*. La interrupción del gen que codifica para de RHO4 no afecta el crecimiento, sin embargo, las mutantes que carecen de RHO3 si presentan defectos en dicho proceso (Matsui y Toh., 1992). Además, la eliminación de RHO3 y RHO4 o mutaciones específicas, causan la despolarización de los parches de actina: por lo tanto, ambas proteínas están involucradas en el mantenimiento de la polaridad celular (Park y Bi, 2007).

La levadura por fisión *Schizosaccharomyces pombe* también es un excelente sistema para el estudio de la morfogénesis celular y la división celular, esta tiene una forma cilíndrica, crece principalmente por la elongación de sus puntas y se divide por fisión binaria después de formarse un septo en la parte central que las divide (Nakano *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003). En el genoma de *S. pombe* se han encontrado 6 Rho GTPasas, de las cuales Cdc42 que juega un papel importante en el establecimiento de la polaridad. La proteína homóloga de la levadura por gemación, Rho1 regula la actividad de β 1,3- glucano sintasa principalmente y la Rho2 se involucra en la morfogénesis celular (Nakano *et al.*, 2003). Aunque Rho4 no es esencial, las mutantes que carecen de esta proteína crecen de manera defectuosa a altas temperaturas con células defectuosas durante la división. Así mismo Rho4 se localiza principalmente en el septo pero no en los polos celulares (Santos *et al.*, 2003). La proteína Rho3 ha mostrado tener distintas funciones como por ejemplo durante el proceso de polaridad celular, las

mutantes *rho3Δ* se hinchan cuando crecen a temperatura de 37° C y muestran una deslocalización de los parches de actina y los microtúbulos desorganizados. Además Rho3 también participa en la citocinesis debido a que se localiza en el sitio de división durante la mitosis y la septación, la ausencia de rho3 forma células con varios septos a temperaturas superiores a los 34 °C y algunas son incapaces de realizar la citocinesis a 37 °C (Nakano, 2002). En el ascomiceto *Neurospora crassa* se ha reportado que la proteína RHO-4 está involucrada en la septación y la formación del anillo de actina, esto es porque la proteína RHO-4 se localiza en los septos y las cepas carentes de esta proteína han resultado en hifas sin septos y sin la formación del anillo de actina. Por otro lado ha mostrado un crecimiento más lento con respecto a la cepa silvestre (Rasmussen y Glass, 2005).

1.3 Regulación de las proteínas Rho

El ciclo GDP-GTP es altamente regulado por la presencia de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que estimulan el intercambio de GDP a GTP para generar un estado activo, el cual es capaz de reconocer a las proteínas blanco río abajo, o a las proteínas efectoras (Bos *et al.*, 2007). Por otro lado, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) aceleran la actividad GTPasa intrínseca de los miembros de la familia de las Rho. Finalmente, los inhibidores de disociación de GDP (GDI) interactúan con la unión GDP-prenilada para el control del ciclo en la membrana y el citosol (Figura 2) (Schmidt y Hall, 2002). Los grupos prenilo (tales como farnesil y geranylgeranil) se incorporan a las GTPasas actúan como anclaje de lípidos, lo que contribuye a su localización en la membrana (Bos *et al.*, 2007). Las proteínas RhoA, Rac y Cdc42 son reguladas por una gran diversidad de GEFs y GAPs, las cuales utilizan similarmente una gran variedad de efectores río abajo (Wannenberg *et al.*, 2005).

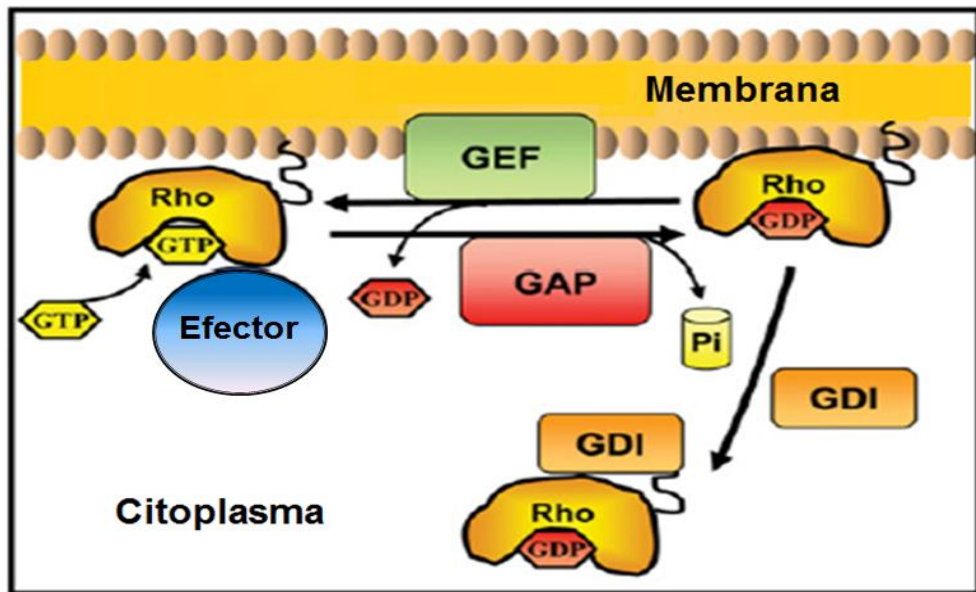


Figura 2. Ciclo de las GTPasas. Las GTPasas con unión a GDP (estado inactivo) son activadas por GEFs que promueven la liberación de GDP, permitiendo su reemplazo por GTP. Una vez activas promueven la activación de distintos efectores hasta que regresan a su estado inactivo a través de la hidrólisis de GTP a GDP, la cual es catalizada por las GAPs. Las GDIs disocian a las RhoGTPasas de la membrana. Modificado de Pérez y Rincón, 2010 p244.

1.4 Mecanismo de acción y función de las RhoGAPs

Las GAPs de las GTPasas Rho se definen por la presencia del dominio RhoGAP altamente conservado. Este dominio consta de unos 150 aminoácidos y es diferente al módulo GAP de otros reguladores negativos para las GTPasas Ras, Ran o ARF, pero es suficiente para la unión a proteínas Rho activas y para acelerar su actividad de GTPasa (Moon y Zheng, 2003). La reacción de hidrólisis de GTP por parte de la GTPasa es poco eficiente y por ello requiere de la interacción de una GAP que acelere dicha reacción varias órdenes de magnitud (Bos *et al.*, 2007).

El dominio RhoGAP consiste de nueve α -hélices y un residuo de arginina altamente conservado el cual interacciona con los switch I y II y el P-loop de las

proteínas Rho, que es lo que constituye el sitio de unión de GTP (Moon y Zheng, 2003). Estudios basados en la estructura cristalográfica del complejo Ras con GpppNH (un análogo de GTP no hidrolizable), muestran el mecanismo de la reacción de catálisis de las proteínas con actividad GAP en la hidrólisis de GTP. En la estructura cristalográfica, se observa una molécula de agua posicionada frente al fosfato y del GTP la cual realiza un ataque nucleofílico al fosfato y del GTP y por lo tanto lo convierte a GDP (Figura 3) (Bos *et al.*, 2007).

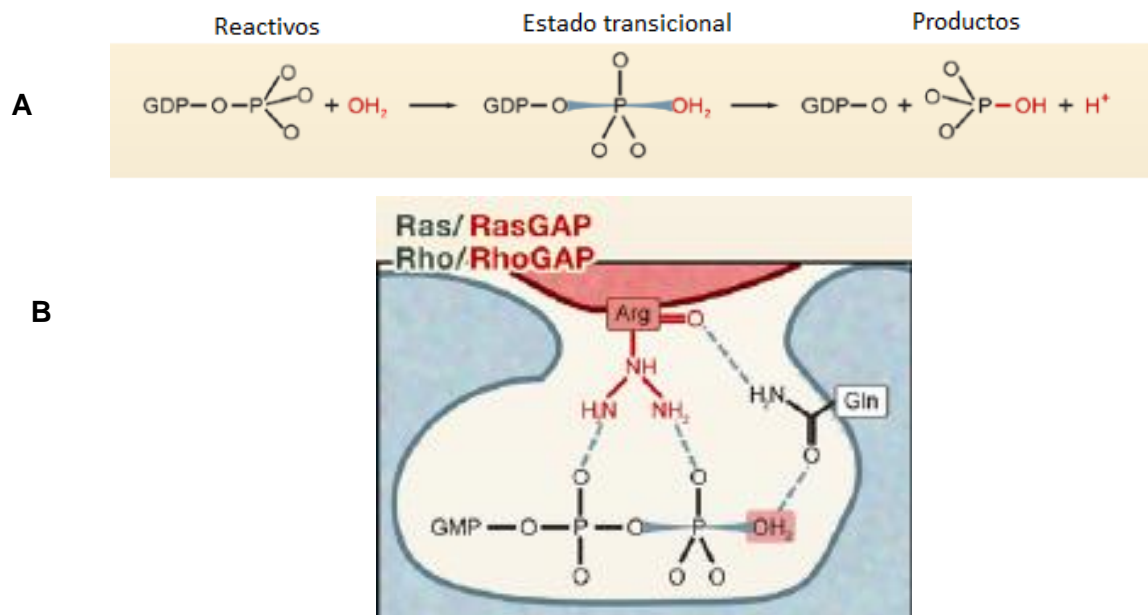


Figura 3. Mecanismo de acción de las RhoGAPs. (A) Representación esquemática de la hidrólisis del GTP mediante un ataque nucleofílico de una molécula de agua. (B) Representación esquemática de la estabilización que realiza el residuo de arginina de la proteína con actividad GAP y la glutamina de la proteína Rho, para posicionar correctamente la molécula de agua, la cual es necesaria para que se produzca la hidrólisis de GTP. Modificado de Bos *et al.*, 2007 p. 869.

El espectro de actividad de las RhoGAPs con las Rho GTPasas puede variar ampliamente *in vitro*. Algunas GAPs pueden reconocer a una sola proteína Rho y favorecer su actividad GTPasica, mientras que otras regulan un amplio rango de especificidad hacia tres sustratos que comúnmente son: RhoA, Rac1 y Cdc42 (Moon y Zheng, 2003). Para realizar esta dedicada y compleja función estas proteínas a su vez deben de estar muy reguladas. Las GAPs son reguladas por interacciones proteína-proteína o lípido-proteína, por su unión a segundos mensajeros y/o modificaciones postraduccionales. Estas interacciones y modificaciones inducen la translocación de las GAPs hacia el sitio donde las proteínas G pequeñas son localizadas y se liberan de su autoinhibición por un dominio que las flanquea y en algunos casos, por las modificaciones alostéricas de su actividad catalítica (Bos *et al.*, 2007).

1.5 La GTPasa Cdc42 y sus reguladores en hongos

La GTPasa Cdc42 y otras Rho GTPasas, desempeñan un papel vital en la traducción de señales que controlan la generación y mantenimiento de la polaridad celular en la gran mayoría de las células eucariotas (Johnson, 1999). Un evento clave durante el establecimiento de la polaridad en la levadura *S. cerevisiae*, es el reclutamiento de Cdc42p hacia los sitios de crecimiento en la membrana plasmática, donde la GTPasa, activa los efectores que modulan al citoesqueleto de actina (Pruyne y Brestecher, 2000).

En las levaduras, la proteína Cdc42p fue identificada por primera vez a partir de una cepa termosensible (*cdc42-1ts*) de *S. cerevisiae*; en esta mutante se observó que no había formación de la yema, permitiendo un aumento de la masa y el volumen de la célula. El crecimiento a temperaturas permisivas de la mutante *cdc42-1ts*, permitió que un poco porcentaje de ellas mostrara la formación de

yemas alargadas, estas observaciones sugieren que la proteína Cdc42p participa en la selección del sitio de gemación y regula eventos calve durante el crecimiento polarizado (Adams *et al.*, 1990; Johnson, 1999).

Cdc24 es la única proteína con actividad GEF específica para Cdc42 en *S. cerevisiae* (Zheng *et al.*, 1994). En las células haploides, Cdc24p es secuestrada en el núcleo durante la fase G1 del ciclo celular, uniéndose al adaptador Far1p. Luego al ser fosforilada por la cinasa dependiente de ciclina Cdc28p durante la emergencia de la célula hija, Far1 se degrada y Cdc24 se libera y sale del núcleo (Gulli *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2000). Esto conduce a la relocalización de Cdc24 en la zona del inicio de la gemación, probablemente mediada por su interacción con GTP-Bud1 (Park *et al.*, 1997). Mediante ensayos *in vitro*, se determinó que Bem3, Rga1 y Rga2 son GAPs específicas para Cdc42, mientras que Bem2 tiene actividad GAP para Rho1 y Cdc42 (Park y Bi, 2007). La levadura *S. cerevisiae* tiene cuatro GAPs para Cdc42: Bem2p, Bem3p, Rga1p y Rga2p (Pérez y Rincón, 2010). Además existen otras GAPs como Bag7p que regula la actividad de Rho1p. Lrg1p es una GAP reguladora de la actividad de Rho2. También se ha descrito a Sac7, una GAP reguladora de Rho1. En el caso de Rho4 y Rho5 ambas son reguladas por la GAP Rgd-2 (Roumanie *et al.*, 2001). La proteína Rgd1p como reguladora de la actividad de Rho3 y Rho4 (Doignon *et al.*, 1999)

S. pombe también posee un módulo similar al de *S. cerevisiae*, debido a que la misma GTPasa Cdc42 es controlada por dos GEFs: Scd1p y Gef1p. Scd1, también llamada Ral1p, es homóloga de Cdc24p de *S. cerevisiae*. Ésta es necesaria para mantener la forma alargada de la célula (Coll *et al.*, 2002). La otra GEF es la proteína Gef1p, la cual forma parte de un anillo en el sitio de la septación, que se compacta durante la citocinesis (Hirota *et al.*, 2003). En el hongo patógeno *Candida albicans* la actividad de Cdc24/Cdc42 se requiere para la invasión hifal, lo cual sugiere que el módulo de estas GTPasas tienen un papel

crítico en la patogenicidad (Bassilana *et al.*, 2003). En el caso de la proteína Rac1 se encontró que no es necesaria para la viabilidad o la organización del citoesqueleto, sin embargo es esencial durante el crecimiento filamentoso cuando las células se encuentran embebidas en una matriz de agar. Así mismo se demostró que aunque existe una gran similitud entre Rac1 y Cdc42, tienen papeles diferentes durante el desarrollo de *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2005).

Se ha reportado que las GAPs Bem2p y Bem3p de *S. cerevisiae* se regulan por su fosforilación. Al suprimir a Bem2p, hay una hiperactivación de Cdc42 la cual es localizada en múltiples sitios de la membrana plasmática en la célula, por tanto, Bem2p contribuye a la restricción de la localización de Cdc42 hacia un solo sitio (Knaus *et al.*, 2007). Así mismo, Cid *et al.*, (1998) encontró en cepas mutantes del gen Bem2p, una pérdida de la polaridad celular y despolarización del citoesqueleto de actina, causando un defecto en la emergencia de la yema. La Bem3p también es una proteína con actividad GAP para Cdc42. Análisis fenotípicos sugieren que Bem3p debe moderar la función de Cdc42 durante la morfogénesis, las cepas mutantes *bem3Δ* producen células con formas aberrantes (Smith *et al.*, 2002; Knaus *et al.*, 2007) lo cual no se muestra con las mutantes *rga1Δ* y *rga2Δ*, sin embargo los ensayos con las dobles y triples mutantes, *rga1Δbem3Δ* y *rga1Δrga2Δbem3Δ* respectivamente, muestran mayor número de células afectadas que en las delecciones sencillas. Así mismo, mostraron células hiperpolarizadas (Smith *et al.*, 2002). Por otra parte, Rga1 y Rga2 son dos GAPs de Cdc42 de *S. cerevisiae* que regulan por la adición de fosfolípidos de membrana (Villar, 2009).

La proteína Rgd1p ha sido reportada como un activador de la hidrólisis de GTP de las GTPasas Rho3 y Rho4. Siendo consistente con esta información, la Rgd1p se localiza en la punta de la yema y del cortex durante el crecimiento polarizado, así como en el anillo en la citocinesis (Lefebvre *et al.*, 2009). La

proteína Rgd1 de *S. cerevisiae* presenta dos dominios con distintas funciones en la célula: el dominio F-BAR y el RhoGAP. En la región del C-terminal se encuentra el dominio RhoGAP el cual activa la hidrólisis de las GTPasas Rho3 y Rho4. En la región N-terminal se localiza el dominio F-BAR el cual interactúa con la membrana plasmática, específicamente a través de la unión a fosoinositoles (Figura 4).

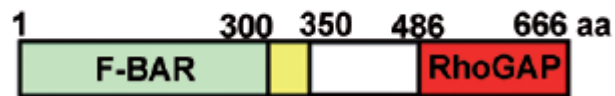


Figura 4. Esquema que muestra la organización de los dominios de la proteína Rgd1p de la levadura *S. cerevisiae*. Modificado de Lefebvre *et al.*, 2009 p191.

Por medio de análisis *in silico*, en el hongo patógeno *C. albicans* se ha demostrado que la proteína CaRgd1, tiene una organización similar a la Rgd1p de *S. cerevisiae*. Además esta proteína ha mostrado tener actividad GAP *in vitro* con las GTPasas CaRho3, CaRho4 y CaCdc42. En el etiquetamiento de la CaRgd1 con la GFP, se encontró que está localizada en las áreas del crecimiento tanto en las células en fase levaduriforme como en las células en fase filamentosa (Ness *et al.*, 2010).

1.6 La GTPasa Cdc42 y sus reguladores en los hongos filamentosos

En el ascomiceto *Aspergillus nidulans*, se ha observado que Cdc42 se localiza en los ápices celulares de las hifas en forma de media-luna, sugiriendo que esta proteína desempeña una función importante durante la morfogénesis hifal y en la formación de las ramificaciones laterales (Virag, *et al.*, 2007). Las cepas mutantes $\Delta cdc-42$ mostraron menor crecimiento comparado con la cepa silvestre y una reducción de 45 veces menos en el número de conidiosporas. La polarización de las conidiosporas durante el proceso de germinación se encontró

disminuido y las ramificaciones laterales de la mutante $\Delta cdc-42$ es reducida. Sin embargo, la mutante Δrac muestra una morfología normal, pero genera conidióforos incompletos y deformes a una temperatura de 42 °C. Así mismo, se propone que Cdc42 y Rac tienen una función compartida durante el establecimiento de la polaridad porque la cepa doble mutante $\Delta cdc42 \Delta rac$ no es viable (Virag *et al.*, 2007).

En el caso del hongo filamentoso *N. crassa* se ha propuesto que el módulo CDC42-RAC-CDC24 se requiere para el establecimiento normal de la polaridad: CDC-42, se localiza en la membrana de los conidios, en el ápice del tubo germinal y de las hifas maduras, así como en septos. Durante la caracterización fenotípica se observó que las cepas mutantes en el gen *cdc-42*, presenta defectos en la polaridad tanto en la morfología colonial como en las hifas maduras, debido que los ápices se muestran hinchados, así mismo la tinción con el colorante vital FM4-64 presenta una acumulación en áreas apicales y subapicales con spitzenkörper no definido. En el caso de la mutante Δrac las hifas principales se observan con producción abundante de ramificaciones apicales y durante la aplicación del colorante la acumulación es mucho menor en comparación a la $\Delta cdc42$. Cabe mencionar que la cepa doble mutante $\Delta cdc-42;\Delta rac$ resultó letal, las ascosporas pudieron germinar por un periodo limitado con defectos severos de polaridad, pero no pudieron mantener un crecimiento polarizado. Por lo tanto, se concluyó que RAC y CDC-42 son componentes críticos para mantener la polaridad y son requeridos para el ensamblaje del spitzenkörper (Araujo-Palomares *et al.*, 2011).

1.7 *Neurospora crassa*

En 1843 *Neurospora crassa* se empezó a documentar como un contaminante del pan en las panaderías de Francia. Este moho era conocido como *Monila sitophila* el cual estaba presente en el pan y otras fuentes de

carbohidratos como en las procesadoras de azúcar de caña (Davis y Perkins, 2002). Subsecuentemente en los 1940's, Beadle y Tatum establecieron su hipótesis de un gen-una enzima en base a trabajos hechos con mutantes de *N. crassa* afectadas en la vía de síntesis de arginina (Galagan *et al.*, 2003). Estos experimentos estimularon el uso de los microorganismos para el análisis genético y de esta manera iniciar una revolución molecular en la biología (Davis y Perkins, 2002).

Debido a sus atributos genéticos y celulares, *N. crassa* se ha convertido en un modelo genético básico entre los hongos filamentosos, debido a que posee un genoma completamente secuenciado (Galagan *et al.*, 2003; Seiler y Plamann, 2003).

Se ha utilizado para realizar estudios genéticos, reparación y recombinación del DNA, regulación del ritmo circadiano, biogénesis mitocondrial y el crecimiento polarizado (Perkins y Davis, 2001; Riquelme *et al.*, 2011) entre otros. Esto es posible debido a que *N. crassa* presenta características únicas para su estudio porque es fácil de cultivar en el laboratorio y completa su ciclo de vida en corto tiempo (Deacon, 1990). Además, su genoma se encuentra secuenciado y por lo tanto, se han desarrollado numerosas herramientas genéticas que permiten hacer estudios muy detallados (Galagan *et al.*, 2003).

El ciclo de vida de *N. crassa* comprende una fase sexual y una fase asexual (Figura 5). Durante su ciclo de vida la fase asexual, forma macroconidios que tienen de uno a varios núcleos haploides. Estos germinan en las condiciones ideales de crecimiento y continúan hasta formar un micelio. Durante la privación de nutrientes, las hifas aéreas pueden gemar o fragmentarse formando estructuras llamadas arthroconidios, los cuales, se caracterizan por ser hidrofóbicas y dispersarse fácilmente a través del aire. En condiciones específicas de humedad y temperatura, *N. crassa* produce microconidias, las cuales son esporas asexuales

uninucleadas y se forman a partir de la extensión y seriación de los microconidióforos (Davis, 2000).

Durante la fase sexual se requiere de la participación de cepas sexualmente compatibles, es decir la fusión de dos individuos con sexos diferentes genéticamente determinados por los loci *mat-a1* y *mat-A1* (Sexo “a” y “A” respectivamente). El ciclo inicia cuando el hongo crece en un ambiente restringido de nitrógeno y a temperaturas menores de 30° C. En estas condiciones, una de las cepas genera el ascogonio o gameto femenino (comúnmente referida como cepa femenina o “receptora”), el cual se envuelve por un conjunto de hifas vegetativas hasta formar una estructura llamada protoperitecio, la cual posteriormente es fertilizada por los microconidios de la cepa del sexo contrario (cepa masculina o “donadora”). La fertilización y la meiosis resultan del desarrollo de la estructura femenina en un cuerpo fructífero llamado peritecio, el cual contiene las ascas, y en cada una de ellas se encuentran 8 esporas sexuales llamadas ascosporas (Figura 6) (Davis, 2000; Borkovich *et al.*,2004).

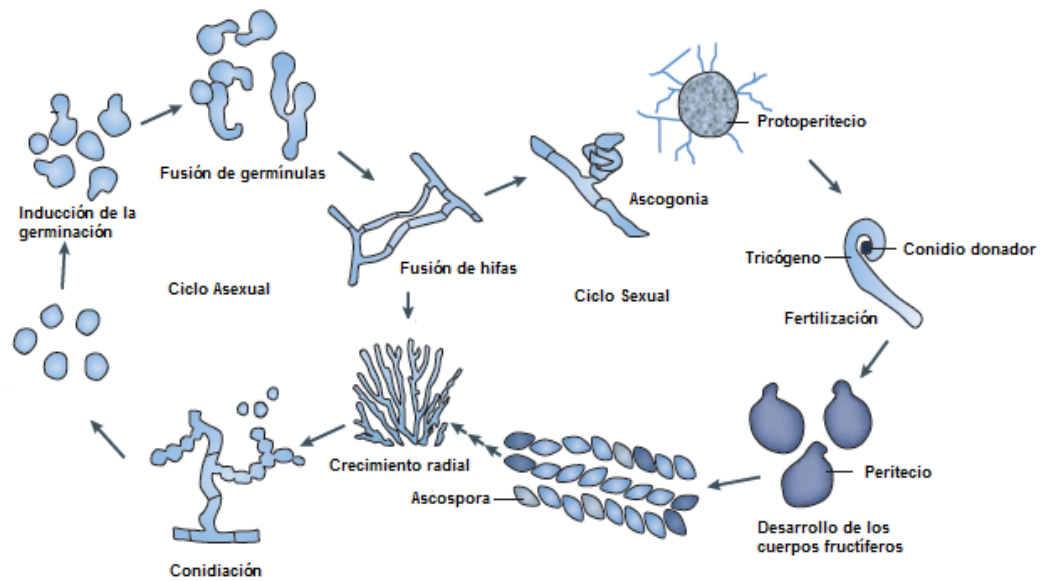


Figura 5. Ciclo de vida de *Neurospora*. El ciclo asexual inicia con la formación de esporas asexuales o conidios, los conidios germinan y forman el tubo germinal, los cuales se fusionan y forman las hifas del micelio vegetativo. El ciclo sexual es inducido por una privación de nitrógeno, lo cual da lugar a la formación de la hifa ascogonia (cepa femenina o receptora), la cual es cubierta por un conjunto de hifas dando lugar al protoperitecio, el cual es fertilizado por el núcleo de un conidio de la cepa masculina o donadora. Después de la fertilización, el protoperitecio (cuerpo fructífero) se desarrolla hasta formar un peritecio maduro. En el interior de este se lleva a cabo la formación de las esporas sexuales o ascosporas, más tarde dará lugar a la formación del asca, que contiene las ascosporas. Modificado de Leeder *et al.*, 2011 p.441.

Capítulo 2

Justificación

Los hongos son uno de los grupos de organismos de mayor importancia en nuestro planeta ya que juegan distintos papeles en nuestra vida. El establecimiento de la polaridad celular en estos organismos es fundamental para varios de sus procesos biológicos. En levaduras la proteína Rgd1p ha sido reportada como un componente importante en la regulación del establecimiento de la polaridad celular. En *N. crassa* no hay estudios sobre la función de RGD-1, por lo tanto en este trabajo mediante la obtención de la mutante $\Delta rgd-1$ y de la microscopía confocal se pretende estudiar el papel *Neurospora crassa* para elucidar el papel de esta proteína en el establecimiento de la polaridad celular, contribuyendo así al estudio de la morfogénesis de los hongos filamentosos.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el papel de RGD-1 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

3.2 Objetivos particulares

Caracterizar el fenotipo de la cepa mutante de $\Delta rgd-1$ de *N. crassa*.

Caracterizar el fenotipo de la doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$ de *N. crassa*.

Investigar el reclutamiento de CDC-42 en la cepa mutante de $\Delta rgd-1$ de *N. crassa*.

Determinar la distribución de la actina durante el crecimiento en la cepa mutante de $\Delta rgd-1$ de *N. crassa*.

Capítulo 4

Hipótesis

La proteína RGD-1 contribuye a la regulación del crecimiento polarizado de *Neurospora crassa* y su ausencia causa defectos en la morfología celular del hongo.

Capítulo 5

Materiales y métodos

5.1 Cepas utilizadas

Las cepas y plásmidos de *Neurospora crassa* que se utilizaron se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Neurospora crassa* y plásmidos utilizados durante este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
4200	wt <i>mat a</i>	FGSC
9717	Δ <i>mus-51:: bar+</i> ; <i>his-3</i> ; <i>mat A</i>	FGSC
Δ <i>sad-2</i>	Δ <i>sad-2 mat a</i>	<i>Shiu et al., 2006</i>
11328	Δ <i>rgd-1 het mat A</i>	FGSC
Δ <i>rgd-1</i>	Δ <i>rgd-1 hom mat a</i>	Este estudio
11747	Δ <i>bem-3 het mat a</i>	FGSC
Δ <i>bem-3</i>	Δ <i>bem-3 hom mat A</i>	Este estudio
Δ <i>rgd-1/his-3</i>	<i>mat a</i> Δ <i>rgd-1</i> ; <i>his-3-</i>	Este estudio
Δ <i>rgd-1/\Delta</i> <i>bem-3</i>		Este estudio
Δ <i>rgd-1;his-3;lifect</i>	Δ <i>rgd-1;his-3⁺ :Pccg-1-lifect-egfp⁺</i>	Este estudio
YFP::CDC-42	<i>pgpd-yfp-cdc-42::his-3; Δcdc-42::hphR A</i>	Araujo-Palomares
Δ <i>rgd-1;YFP::CDC-42</i>	Δ <i>rgd-1::hph pgpd-yfp-cdc-42::his-3; mat</i>	Este estudio
<u>Plásmidos utilizados</u>		
<i>pPgdYFP- Cdc-42</i>	<i>pPgd-yfp;cdc-42</i>	Araujo-Palomares, 2011
<i>pRM49-OC30</i>	<i>Pccg-1-lifect-egfp⁺</i>	Delgado-Álvarez, 2010

5.2 Medios de cultivo

Las cepas de *N. crassa* se cultivaron en medio mínimo de Vogel (MMV), el cual contiene sales de Vogel 1X (Apéndice), sacarosa 2% (w/v) y agua destilada (Vogel, 1956). En el caso de medio sólido se utilizó agar bacteriológico (Agarmex S.A de C.V) al 1.5%. Para cultivar a la cepa FGSC #9717, se le adicionó al medio 25 mg/mL de histidina. Para inducir a la reproducción sexual se utilizó el medio sintético para cruzas (MSC) (Westergaard y Mitchell, 1947) que contiene sales para cruzas 2X (Apéndice), sacarosa al 2% (w/v), agar al 2% y agua destilada.

5.3 Análisis bioinformático

Se realizó la búsqueda en el genoma de *N. crassa* de la secuencia homóloga del gen *rgd-1p* de *Saccharomyces cerevisiae*. La búsqueda se llevó a cabo a través de la página del Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>), en donde se identificó a la secuencia NCU00553.5 como una secuencia homóloga. Se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search tool) en la página del NCBI con el objetivo de identificar los dominios de la secuencia en estudio. Así mismo se hicieron otros alineamientos múltiples con las secuencias homólogas identificadas de otros organismos utilizando como herramienta la página del EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk>).

5.4 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento que va desde 1310 pares de bases río arriba del inicio del marco de lectura abierto de *rgd-1*, hasta 1302 pares de bases río abajo del codón de “paro” del marco de lectura. Los oligonucleótidos se diseñaron en base a la secuencia reportada en el Broad

Institute con el número de acceso NCU00553.5. Estos oligonucleótidos se utilizaron para determinar si la cepa FGSC #11328 contiene la eliminación del marco de lectura abierto y no interrumpido, además de saber si la cepa se encuentra en estado de homocarión o heterocarión, es decir, si contenía núcleos con una copia Silvestre del gen.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Tm (°C)
rgd-1 5F	GGAGACCAAGTTCAACCTCAG	55.0
rgd-1 3R	GTCAGGTTCTATCACGGAGC	57.9
bem-3 5F	GGCCCATCTGCATCCAACCTAAGC	60.5
bem-3 3R	CGTATGGGTCTGGATCAGCCAGTCG	62.6

Tm= Melting temperature.

5.5 Cruzas genéticas y obtención de ascosporas

Se sembraron conidios en el centro de una caja Petri con MSC (Medio sintético de cruzas) sólido, se dejaron crecer por 4 días a 30°C. Posteriormente se inocularon conidios del sexo contrario en 6 diferentes puntos de esta misma caja, se dejaron en incubación por un lapso de 3 semanas a 25°C en completa oscuridad. Una vez que se observó el desarrollo abundante de los peritecios, se recuperaron las ascosporas liberadas en 1mL de agua destilada estéril. Para inducir la germinación de las ascosporas obtenidas, se tomó un volumen de 5 µL de la solución con ascosporas en 50 µL de agua destilada estéril; de éste se tomaron 25 µL y se plaquearon en una caja Petri con MMV. El cultivo se incubó

por una hora a 60°C para la activación de las ascosporas y luego a 30°C por 12 horas para el crecimiento de las colonias. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron observaciones en el microscopio estereoscópico (SZXILLB2-100 Olympus®) y se aislaron las ascosporas germinadas transfiriéndolas por separado a tubos de vidrio con MMV. Los tubos se incubaron a 30°C en oscuridad durante 5 días.

5.6 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

Para realizar la extracción de DNA genómico de *N. crassa* se inocularon conidios en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio MMV líquido. El cultivo se incubó a 30°C durante 2 días en completa oscuridad para favorecer el crecimiento del hongo y evitar la formación de los conidios. Posteriormente el cultivo se filtró a través de un embudo cubierto con la tela sintética tipo “Magitel” estéril y se lavó con agua destilada estéril para eliminar el exceso de MMV.

El micelio se guardó en un ultracongelador (VWR®) a una temperatura de -80°C hasta su uso. Posteriormente, se congelaron las muestras con nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero 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.

5.7 Separación de DNA mediante electroforesis

Para la separación del DNA mediante la técnica de electroforesis. Se prepararon geles de agarosa al 1% disueltos en el amortiguador TAE 1X (Tris 40mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5mM, pH 8.0) con bromuro de etidio al 0.1%. Los geles con las muestras se sometieron a un voltaje constante de 85 V

por un tiempo de 40-50 minutos en una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, BioRad®) utilizando un regulador PowerPac Basic™ de BioRad. El DNA se visualizó al irradiar el gel con luz ultravioleta con un transiluminador (Molecular imager GelDoc XR, BioRad®). El tamaño de las bandas se determinó por la comparación con los marcadores de tamaño de DNA (1 kb plus Invitrogen®).

5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico que se obtuvo de la cepa FGSC #4200, se utilizó como patrón para realizar la amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones por PCR de los fragmentos de DNA, se llevaron a cabo en un termociclador Boeco®. En estos experimentos se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés, se utilizó una mezcla de reacción que contenía: 1.5 µL del oligonucleótido sentido a 10 µM, 1.5 µL del oligonucleótido antisentido a 10 µM, 2 µL de DNA genómico y 20 µL de SuperMix (PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen®) con capacidad de amplificación de 1 kb min⁻¹. Esta mezcla se sometió a una serie de ciclos de desnaturalización del DNA, de unión y alineamiento de los oligonucleótidos y la extensión del fragmento bajo la acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando en la amplificación del fragmento de DNA de interés, cuyos extremos quedaron definidos por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

5.9 Transformaciones en *N. crassa*

Se recuperaron los conidios y se transfirieron a tubos cónicos estériles de 50 ml (FALCON®) previamente fríos. La mezcla de conidios, se centrifugó a 4°C en una centrífuga MultiFuge 15-R Heraeus, durante 10 min a 8000 RPM.

Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada estéril fría. Para optimizar la transformación de los conidios, se transfirieron 125×10^6 conidios, a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se realizaron 3 lavados con 500 μ L de sorbitol 1 M frío. La solución de conidios con sorbitol se centrifugó por un minuto a 10 000 RPM y se retiró el sobrenadante. La transformación de los conidios de *N. crassa* se realizó mediante la técnica de electroporación de la siguiente manera: en una celda para electroporación se colocaron 40 μ L de conidios y 10 μ L de plásmido respectivo y se colocó en hielo por 30 minutos. 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 (μ F) y una resistencia de 600 Ohms (Ω) durante 14 milisegundos (ms). Inmediatamente después del pulso eléctrico, los conidios se resuspendieron en 960 mL de sorbitol 1 M, y posteriormente, la mezcla de conidios-sorbitol, se resuspendió en 25 ml de solución de recuperación incubándose a 30°C con agitación suave (100 RPM) por 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación, la solución de recuperación se mezcló con 25 mL de “Top agar” (medio Vogel con sorbosa al 2% y agar 1.8%). La mezcla se vertió en cajas Petri con medio CA (colonia aislada) sólido y se incubaron 30°C en oscuridad de 4 a 5 días.

5.10 Recuperación de transformantes de *N. crassa*

Las transformantes se recuperaron del medio sólido con una aguja de disección y se sembraron en tubos de borosilicato de 12 X 75mm (PYREX®) conteniendo MMV sólido. Se incubaron a una temperatura de 30°C hasta que el micelio se encontraba maduro y con abundante producción de conidios.

5.11 Recuperación y conteo de conidios

Se sembraron conidios de la cepa silvestre FGSC#4200 , de la Δ rgd-1 y de la Δ rgd-1 :: Δ bem-3 en medio MMV sólido y se dejaron crecer a 30 °C durante 3 días y a temperatura ambiente durante 4 días. Se agregaron 100 mL de agua destilada estéril para resuspender los conidios y se recuperaron por medio de filtración en tela tipo Magitel. Se realizó una dilución con 10 μ L del stock de conidios en 990 μ L de agua destilada para hacer el conteo en cámara de Neubauer. Se determinó la concentración de conidios obtenidos y se hicieron los cálculos pertinentes, con el fin de tener 1 000 conidios concentrados en un volumen de 2 μ L para cada una de las cepas analizadas y así realizar los experimentos de la caracterización fenotípica.

5.12 Morfología colonial

Se inocularon 1000 conidios en cajas Petri con MMV sólido, se mantuvieron a 30°C durante 12 horas. Esto se llevó a cabo por triplicado en cada una de las cepas y se tomaron imágenes digitales para comparar el fenotipo de las cepas en el estudio.

5.13 Determinación de la tasa de crecimiento

Para medir la tasa de crecimiento se inocularon en la periferia de una caja Petri de 15 cm de diámetro con MMV sólido, 1 000 conidios concentrados en un volumen de 2 μ L. Se monitoreó el crecimiento de las cepas cada 6 horas (t1, t2, t3, t4 y t5) a partir de un periodo de 24 horas de incubación a 30°C, el cual corresponde al tiempo cero. Se realizaron tres repeticiones del experimento y en

cada experimento se contó con triplicados de cada cepa (n=9). Los resultados obtenidos se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar.

5.14 Índice de ramificación

Con la finalidad de determinar el índice de ramificación se inocularon 1000 conidios en el centro de una caja Petri con MMV sólido y se incubaron a 30°C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se contaron las ramificaciones laterales producidas en los últimos 200 μm de los ápices de 30 hifas parentales de cada cepa (n=9). El índice de ramificación se obtuvo calculando el promedio del número de ramas cuantificadas.

5.15 Conidiación

Se inocularon 1000 conidios de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta\text{rgd-1}$ y $\Delta\text{rgd-1};\Delta\text{bem-3}$ en tubos de borosilicato con 4 ml de MMV sólido y se dejaron crecer a 30°C durante 7 días (n=9). Los conidios se colectaron en 1 mL de agua estéril dándoles vortex durante un minuto. La suspensión obtenida se diluyó 1000 veces para cuantificar el número de conidios por mL. Los conidios se cuantificaron con una cámara de Neubauer. Las cifras obtenidas se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar.

5.16 Medición de biomasa

Para obtener la biomasa total se inocularon 100×10^6 de conidios en matraces Erlenmeyer que contenían 100 mL de MMV líquido y se dejaron incubar a una temperatura de 30°C durante 24 horas a 200 rpm de agitación constante.

Concluído el tiempo de incubación los cultivos se filtraron al vacío con un embudo Buchner y con los filtros Whatman 90 mm de diámetro (Cat No.1001090). El micelio húmedo se pesó en una balanza analítica marca Sartorius modelo No. 11712MP8 y posteriormente se dejó secar a 60°C durante 24 horas y se secó. Pasado ese tiempo, se registró el peso seco. Los experimentos se realizaron por triplicado y en tres ocasiones (n=9). El análisis estadístico consistió en el cálculo del promedio, la, desviación estándar y se graficó.

5.17 Métodos de microscopía

5.17.1 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 Controler Olympus compatible para Windows.

5.17.2 Microscopía de alto aumento

Para analizar las células de *N. crassa* se utilizó la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2004). Primero, los conidios se cultivaron en MMV sólido y se incubaron a 30°C. Cuando las células formaron una colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro, se cortó 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.

Para las observaciones, se utilizó microscopio confocal marca Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan). Para examinar la expresión de la YFP y la GFP se usó el láser Argón/2 con una Exc/Em 514/527nm para la YFP y una Exc/Em 488/505-530 nm para la GFP. Se usó el objetivo 60x, *Plan Apocromático*

de inmersión en aceite. Este microscopio, es equipado con un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases.

Capítulo 6

Resultados

6.1 La proteína NCU00553.5 es homóloga a la proteína Rgd1p de *S. cerevisiae*

Se identificó, mediante un alineamiento de la secuencia proteica de Rgd1p de *S. cerevisiae* con el genoma de *N. crassa*, a la secuencia del locus NCU00553.5, como un posible homólogo de la proteína Rgd1p. Se llevó a cabo el análisis de los dominios de esta secuencia y se encontró que al igual que Rgd1p de *S. cerevisiae*, la proteína hipotética NCU00553.5 posee un dominio F-BAR en la región amino terminal que abarca desde la posición 46 hasta el aminoácido 282. El dominio F-BAR se encuentra involucrado en la regulación de la dinámica de la actina y en la unión con fosfoinosítidos (fosfatidil inositol 4 fosfato y fosfatidil inositol 4,5 bifosfato), lo cual indica que esta proteína es capaz de unirse a la membrana (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2008). Adicionalmente, la secuencia contiene un dominio RhoGAP en el extremo C-terminal, que abarca del aminoácido 543 hasta el 738. En este dominio se encuentran los sitios catalíticos importantes de las proteínas activadoras de las GTPasas, porque contiene una arginina conservada en la posición 81, la cual es característica de los dominios RhoGAP porque interactúa con la glutamina que está conservada en el dominio switch 2 de la GTPasa que regulan estas GAPs (Cherfils y Zeghouf, 2012) (Figura 6). Por lo tanto, la secuencia primaria reportada con el NCU00553.5 contiene los dominios que indican que es una proteína homóloga a Rgd1p de *S. cerevisiae* y, a esta secuencia de *N. crassa* se le nombró RGD-1.

Se realizó un alineamiento entre las secuencias RGD-1 de *N. crassa*, con la secuencias Rgd1p de *S. cerevisiae*, Rga7 de *S. pombe*, la proteína hipotética MGG_0348 de *Magnaporthe oryzae*, MgcRacGAP de *Homo sapiens* y Rgd-1 de *C. albicans* (Figura 7)



Figura 6. Esquema de los dominios encontrados en la secuencia de *N. crassa* correspondiente al NCU00553.5. La secuencia cuenta con 743 aminoácidos y contiene el dominio F-BAR en el extremo N-terminal y un dominio Rho-GAP en el C-terminal característico de las proteínas GAP.

<i>M. oryzae</i>	TSEIERQVQEVLSSEIGISTLLNRLKQTISSAKEFAQFLKKRAAIEEDHAYGMRKLCCKTT	119
<i>N. crassa</i>	T---KSHVQDVLSSSEIGIATMLNRLKQSIASAKEFATFLKRRSVLEDEHANGLRKLCCKAS	94
<i>S. cerevisiae</i>	HLFSTPEIKKVLNSDVAINALLSRLKQSLLTCEEFMKFIKKKYAIEEEHVQELSKQYKHF	87
<i>C. albicans</i>	LLDTPKIQKILNSDYTIDVLLNRLKESLNTGEEFSKFIKKKAQIEDDHYNQLKKEAGHV	101
<i>S. Pombe</i>	AVLKEPKVEAILNSELGLAFLNDRIKIYLLTCKELAGFFKKRSIIEEESGKNLQKLAKSY	87
<i>H. sapiens</i>	EILSEGNEVQFIQLAKDFEDFRKKWQRIDHELKGYKDLIMKAETERSALDVKLKHARNQV	79
	. . . : : . : : : : * . . : :	
<i>M. oryzae</i>	QDMM--QRPDHKQGSFSDAYHSMMLTHDKMAQNELQFSSSLQOMHDDLVELAAIAEKNRK	177
<i>N. crassa</i>	HES--SRSEHRGGTFAKAYEDMMTHERMAENGTQFAMSLHQMHEDLLELAGIAEKSRK	152
<i>S. cerevisiae</i>	FN----IQGSTNSSLKMIHEVLGFDGKMAQVQKQSYITALQKMYSEISSLLTMTKLRK	142
<i>C. albicans</i>	RTNMKNNSRNKNDLQFQMDKI IQFDSESLYGVGNSYVVALNTMYDELTSLIGTIGTRK	161
<i>S. Pombe</i>	LETF--QSKHHSPOFSASVITSMETHEQLANHSLLTQKTLFAFSQVIEFHKAERKRK	145
<i>H. sapiens</i>	DVEIK---RRQRAEADCEKLERQIQLIREMLMCDTSGSIQLSEEQKSALAFINRGQPSSS	136
	: : : : * . . : :	
<i>M. oryzae</i>	AAQHEDDLLRQVQALDQDFRSRVDMLQAEKSELINSTRPEAVKALQDIIKECDAGLALQI	294
<i>N. crassa</i>	AAQHEEDLLRKAQAADQDYQAKVNTVQTERGELINKIRPDTIKALQEIIVRECDAGVVLQK	270
<i>S. cerevisiae</i>	TKEQEEELLRKIDNADLEYKQKVDHNSLRNFTIKERPRIVQELKDLILEIDTAMTIQL	256
<i>C. albicans</i>	VEQQEDELRSKVDTDQEQYKSKVATCKKLDKDEIIVIHRRPNTKLLKNILEMIDTALNLQY	274
<i>S. Pombe</i>	LTKLEDEARLKAENAESDMHSKIENACNVQKQLLCIHRPNYIKQFFSLQREIESSLIANY	265
<i>H. sapiens</i>	RRSTSRQFVDGPPGPVKKTRSIGSAVDQGNESIVAKTTVTPNDGGPIEAVSTIETVPYW	242
	. . : : . . : : : :	
<i>M. oryzae</i>	QKFA SFNEKLLLSNG-LSISPLRKEGDIKSLRDVVTAINNENDLSNYLAGHHRQLPSRAG	353
<i>N. crassa</i>	QKFA SFNEKLLLSNG-LSVSPKLGPDARSLRECVQAINNDKDLDEYLLSQYPRLPPTG	329
<i>S. cerevisiae</i>	QKYTIWTENLVLNTG-VTISPLD--STKS-MKSFAGSVSNERDLYSFLNKYN-----	304
<i>C. albicans</i>	QKYTIWTENLIMNSG-VLISPLQ--SSKASMKSMASDIDNEKDLYQYLLRNG-----	323
<i>S. Pombe</i>	LRYSKLCESNTILLNG-LTIRPQKPTPTNCGLQHALDNINANTDFVQYVVLHASIKHEDNKN	324
<i>H. sapiens</i>	TRSRRTGTIQFWNSDSLNSRQLEPRTETDSVGTPOQSNNGMRLHDFVSKTVIK-----	296
	: . . . : . : : : : :	
<i>M. oryzae</i>	PPQHGNGRPGSPGYQGGRNQSPPHGASVRPVGSSLNRLYERD-GLAVPQVYQCIQA	578
<i>N. crassa</i>	PAPLASPTQQAYPSPGVQARQSTPPMAQTRPVPVGVSLSKLYERD-GLAVPMPVYQCIQA	568
<i>S. cerevisiae</i>	PEELINSLSDRPI SHIQTNMPPGVQKNFKTFGVPLESLIEFE-QDMVPAIVRQCIYV	495
<i>C. albicans</i>	PAVSQTSS----PSLHIKGPK---PLSTFQHPTFGASIEDVIQFAGVDNVPPIVHKCIEV	502
<i>S. Pombe</i>	APPPSSINSNRAASPFRPTSVSPQSSPTKSLLFGARLDAILRE-HSNIPNIVMOCTSQ	529
<i>H. sapiens</i>	DDIHAICSLKDFLRNLKEPLLTFRNLRAFMEAAEITDEDNSIAAMYQAVGELPQANRDT	472
	. . . : : :	
<i>M. oryzae</i>	VDFYGLNVEGIYELSGSVPHVNLKKNMFDITSDSPSLDFR---NPENFFHDVNSVAGLLK	635
<i>N. crassa</i>	VDLFGLGLEGIYELSGSVPHVNLKTLFDITSDGSSNLDFR---NPENFFHDVNSVAGLLK	625
<i>S. cerevisiae</i>	IDKFGLDQEGIYKKSANVLDVSKLKEEIDKDPANISMILPSKPHS---DSDIYLVGSLIK	552
<i>C. albicans</i>	IESYGLNLVGIYELISSNQSVNKLKESIDANFTNYLTIGKIDIPSNVYESEVFCVASLLK	562
<i>S. Pombe</i>	VENFGLNLQGIYELVPS SARVNMRSQFENNP-----LLQLHPEDYENDVHAVADLLK	583
<i>H. sapiens</i>	LAFIMIHLQRVAQSPHTKMDVANLAKVFGPTIVAHAVPNP---DPVTMLQDIKRQPKVVE	529
	: : : . . * * : : . : : :	

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de los ortólogos de RGD-1 de otros hongos. Los números indican la posición de los aminoácidos; los puntos y los asterísticos corresponden a los residuos similares o idénticos respectivamente. Se muestran los sitios de interacción del dominio F-BAR (azul), del dominio Rho-GAP (amarillo) y el residuo catalítico (rojo). El residuo de arginina se encuentra señalado por una flecha.

6.2 Obtención de la cepa homocarión $\Delta rgd-1$

Para obtener la condición de homocarión se propiciaron cruzas sexuales para la producción de la progenie y la caracterización fenotípica de las mismas. Se sembró en MSC (Medio sintético de cruza) la cepa #11328 mat A reportada por el Fungal Genetics Stock Center como la cepa mutante *rgd-1*, se dejó crecer por 4 días a 30°C. Posteriormente se inoculó la cepa $\Delta sad-2$ en 6 puntos de la placa, se dejó en incubación por un lapso de 3 semanas a 25°C en completa oscuridad. Una vez que se observó el desarrollo abundante de peritecios, se procedió a recuperar las ascosporas liberadas en 1 mL de agua estéril. Para su aislamiento se tomó un volumen de 5 μ L de la solución con ascosporas en 50 μ L de agua estéril, de éste se tomaron 25 μ L y se plaquearon en caja Petri con MMV. Una vez sembradas las ascosporas, se incubaron por una hora a 60°C para su activación y luego a 30°C por 12 horas (Figura 8).

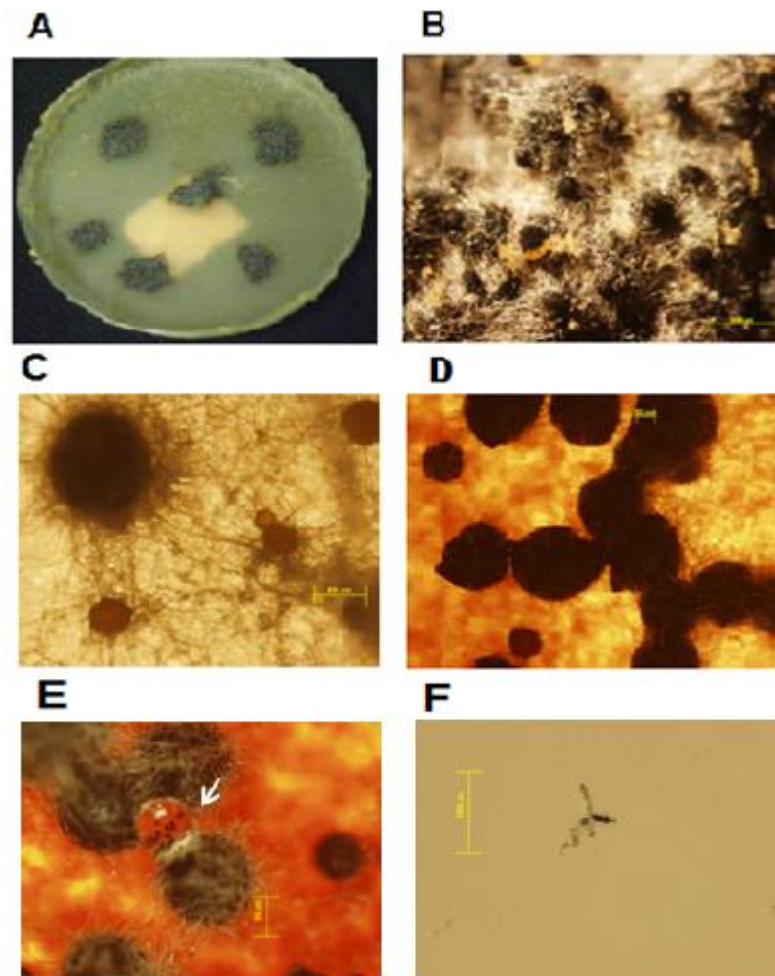


Figura 8. Productos obtenidos de la cruce sexual entre las cepas $\Delta sad-2$ y $\Delta rgd-1$. A) Morfología macroscópica de la cruce entre la cepa $\Delta sad-2$ y $\Delta rgd-1$. La cepa #11328 ($\Delta rgd-1$) se utilizó como cepa receptora o “femenina” y la cepa $\Delta sad-2$ se utilizó como cepa donadora o “masculina”. B) Imagen que muestra los peritecios de la cruce en A con un aumento de 10x en el microscopio estereoscópico. C) Formación de protoperitecios y peritecios inmaduros, D) Peritecios maduros. E) Peritecios maduros expulsando las ascosporas (se indican con una flecha). F) Germinación de las ascosporas en medio CA.

6.3 Comprobación de las cepa mutantes $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ mediante PCR

De las colonias que provienen de la cruce de las cepas $\Delta sad-2$ con $\Delta rgd-1$ que resultaron resistentes a higromicina, se llevó a cabo la extracción del ADN genómico de las cepas (ver apartado 5.6.). Para comprobar la ausencia del gen *rgd-1*, se usaron oligonucleótidos que amplificaron las regiones del fragmento que va desde 1310 pares de bases río arriba del inicio del marco de lectura abierto de *rgd-1*, hasta 1302 pares de bases río abajo del codón de “alto” del marco de lectura abierto, lo cual corresponde a regiones 5 “forward” y 3 “reverse”. Los oligonucleótidos utilizados son *rgd-1* 5F y *rgd-1* 3R para el gen *rgd-1* que amplifica un tamaño de 5.2 kb aproximadamente. Para el gen *bem-3* se usaron los oligonucleótidos *bem-3* 5F y *bem-3* 3R que amplifican las regiones del fragmento que va desde 259 pares de bases río arriba del inicio del marco de lectura abierto de *bem-3*, hasta 354 pares de bases río abajo del codón de “alto” del marco de lectura abierto, lo cual corresponde a regiones 5 “forward” y 3 “reverse” (Figuras 9 y 10).

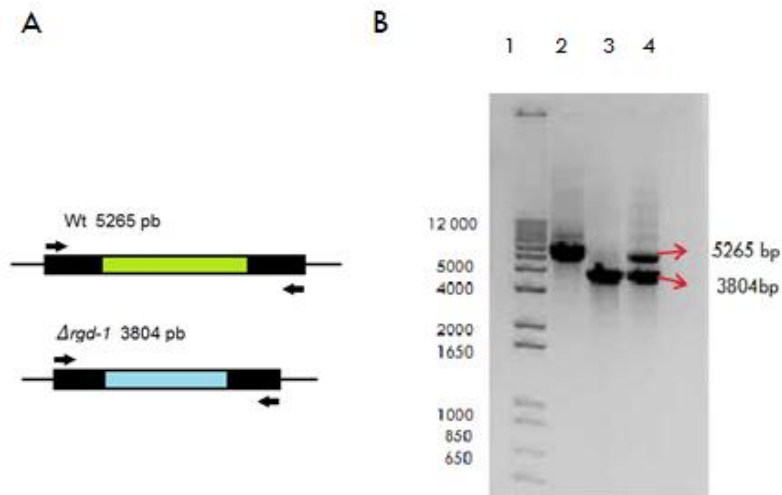


Figura 9. Identificación mediante PCR de la cepa mutante $\Delta rgd-1$. (A) Esquema que representa el tamaño de los fragmentos amplificados para la cepa silvestre y $\Delta rgd-1$. (B) Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra una banda de 5 265 pb que corresponde al fragmento amplificado con los oligos *rgd-1* 5F y *rgd-1* 3R utilizando como templado el ADN de la cepa silvestre #4200. En el carril 3 se encuentra un fragmento de 3804 bp amplificado por PCR a partir del ADN genómico de la cepa #11328 que resultó homocarión. El carril 4 corresponde a dos fragmentos esperados que corresponden a núcleos silvestres y núcleos $\Delta rgd-1$, lo cual indica que la cepa se encuentra en un estado heterocarión.

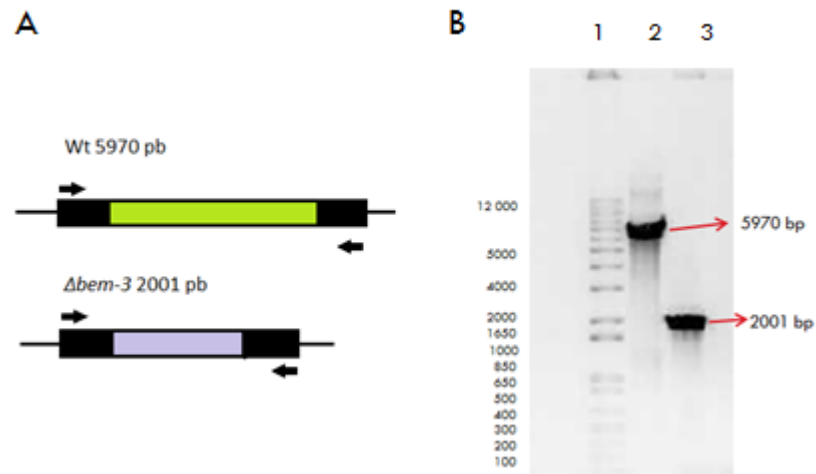


Figura 10. Identificación mediante PCR de la cepa mutante $\Delta bem-3$. Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra una banda de 5 970 pb que corresponde al fragmento amplificado a partir de DNA genómico de la cepa silvestre #4200 con los oligos bem-3 5F y bem-3 3R. En el carril 3 se encuentra un fragmento de 2001 pb amplificado por PCR a partir del ADN genómico de la cepa #11747 que resultó homocarión.

6.4 Obtención de la cepa doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$

La cepa doble mutante se obtuvo mediante cruzas genéticas. El método que se llevó a cabo fue similar al descrito en la sección 5.5; la diferencia radica en las cepas utilizadas para las cruzas; ambas eran homocariones mutantes. De las progenies obtenidas de la craza $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$, se seleccionaron aquellas que crecieron en higromicina y se analizaron mediante la amplificación por PCR para comprobar la ausencia del gen *rgd-1* y posteriormente para el gen *bem-3* (Figura 11). De las mutantes obtenidas se caracterizaron fenotípicamente como se describe más adelante.

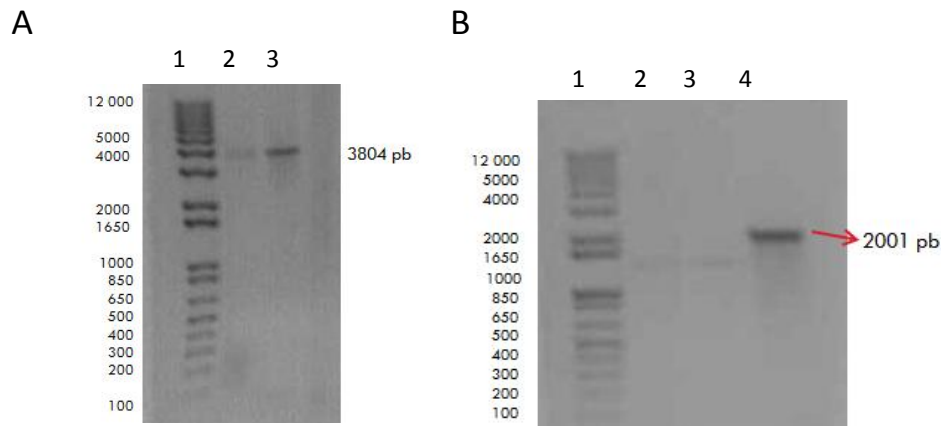


Figura 11. Identificación mediante PCR de la cepa doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$. Geles de agarosa al 1% que muestran los productos de PCR obtenidos utilizando como templado ADN genómico de la cepa doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$. A) Muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 3 se muestra una banda de 3804 pb que corresponde al fragmento esperado para cepa homocarión $\Delta rgd-1$ al utilizar los oligos *rgd-1* 5F y *rgd-1* 3R. B) El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 4 muestra un fragmento de 2001 pb esperado para la cepa homocarión $\Delta bem-3$ al utilizar los oligos *bem-3* 5F y *bem-3* 3 R.

6.5 La mutante $\Delta rgd-1$ crece de igual manera que una cepa silvestre

En la levadura *S. cerevisiae*, el gen *RGD-1* codifica para una proteína no esencial: al inactivar el gen *RGD1*, la levadura crece de manera similar a una cepa silvestre. Sin embargo, la mutante muestra ligeramente un defecto en la viabilidad en la fase estacionaria cuando crece en medio mínimo (Barthe *et al.*, 1998). Por estos antecedentes se decidió evaluar el efecto de la eliminación del gen *rgd-1* de las cepas mutantes de *N. crassa* mediante la comparación con el crecimiento de la cepa silvestre a diferentes tiempos (Figura 12).

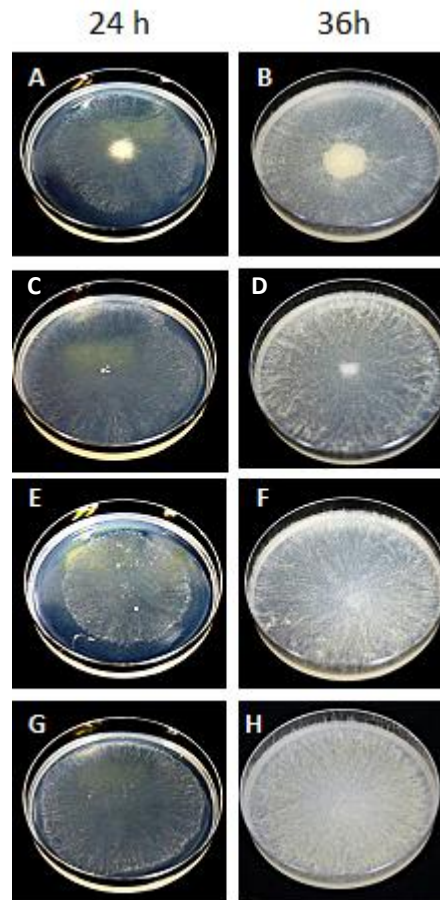


Figura 12. Morfología colonial de la cepa silvestre y de las mutantes a las 24 y 36 horas. El experimento se realizó por triplicado durante 3 ocasiones. (A-B) Cepa silvestre. (C-D) Mutante $\Delta rgd-1$. (E-F) Mutante $\Delta bem-3$. (G-H) Doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$.

Se realizaron observaciones de la morfología colonial de todas las cepas en el estudio, y se encontró que a las 24 h después de inocularlas en medio mínimo, el crecimiento de la mutante $\Delta rgd-1$ (C-D) es ligeramente mayor que la cepa silvestre (A-B). En el caso de la mutante $\Delta bem-3$, su crecimiento a las 24 y 36 hrs (E-F) fue menor con respecto al resto de las cepas y muy similar al de la cepa silvestre (A-B). Tanto la mutante $\Delta rgd-1$ como la doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$ (C, D, G, H) se observó el mismo patrón de crecimiento entre ambas cepas y ligeramente mayor que la cepa silvestre (A-B).

En una cepa de *S. cerevisiae* que expresa a Rgd1p etiquetada con GFP, se ha observado que Rgd1p se encuentra principalmente en sitios de crecimiento, es decir, en los sitios de emergencia de la célula hija y en el cortex (Roumanie *et al.*, 2000; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2008).

En los hongos filamentosos el crecimiento se lleva a cabo a través de la extensión de la punta de las hifas y por ramificaciones (Bartnicki García, 1989; Watters *et al.*, 2011). Debido al posible papel que podría tener esta proteína en el crecimiento apical, se midió la tasa de elongación micelial, con el objetivo de establecer cuantitativamente las diferencias del crecimiento entre las cepas mutantes y la silvestre (Figura 13). Las cepas se crecieron bajo las mismas condiciones, y se tomaron medidas a partir de las 24 horas de crecimiento post inoculación, observándose a partir de ese punto, que la mutante $\Delta rgd-1$ crece más que la cepa silvestre. Las diferencias en cuanto al crecimiento entre las cepas silvestre y $\Delta rgd-1$ se hizo más evidente conforme pasaba el tiempo. A las 48 h, la cepa silvestre alcanzó un crecimiento promedio de 12.23 cm mientras, que la mutante $\Delta rgd-1$ llegó a medir 12.97 cm, lo que equivale a un incremento del 7.5% de crecimiento de la mutante $\Delta rgd-1$ con respecto a la silvestre. En cambio, la mutante $\Delta bem-3$ mostró un retraso en el crecimiento poco significativo en el punto de las 24 h, pero a medida que se pasó el tiempo, ese retraso fue más evidente a partir de las 30 h.

El crecimiento de la doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$, se encuentra en el mismo rango que la cepa silvestre, y se mantiene así hasta las 48 h post inoculación, mostrando en ese tiempo una disminución poco significativa con respecto al crecimiento de la mutante simple $\Delta bem-3$. Estos datos sugieren que en la mutante doble, la carencia de ambas GAPs tiene un efecto compensatorio, es decir, que el incremento en el crecimiento de la cepa $\Delta rgd-1$, equilibre el efecto en la disminución del crecimiento que produce el carecer de BEM-3. Estos datos sugieren que la cepa $\Delta rgd-1$ presenta una ligera desregulación en el proceso del

crecimiento apical y que probablemente, la función de RGD-1 es importante para modular de manera negativa este proceso

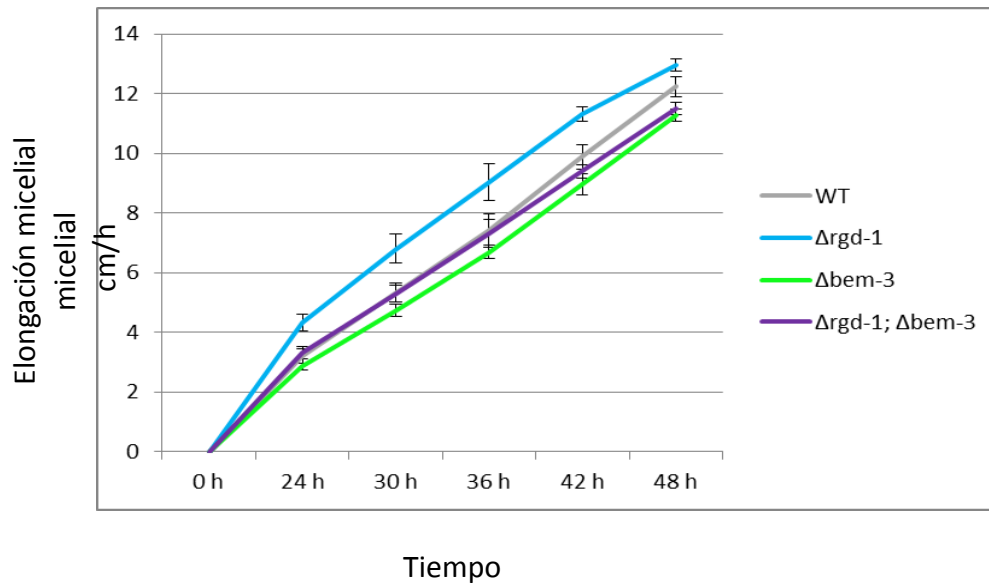


Figura 13. Gráfica que muestra la elongación micelial de las cepas mutantes simples y la doble mutante. Las mediciones de la longitud de la colonia (cm) fueron realizadas cada 6 horas, a partir de las 24 horas de crecimiento (tiempo “cero”). La gráfica corresponde a los promedios de tres experimentos independientes con sus correspondientes triplicados. Las barras de punto en la gráfica representan las desviaciones estándar.

6.6 Las cepas mutantes crecen con mayor número de ramificaciones

El crecimiento en los hongos filamentosos incrementa través de la continua extensión de la punta de la hifa de la cual emergen las ramas, las cuales son capaces de extenderse mediante ramificación (Watters *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la ramificación se inicia cuando la concentración de vesículas en la punta de la hifa alcanza una densidad crítica en el ápice (Trinci, 1974; Watters y

Griffiths, 2001). Hasta el momento, la evidencia más fuerte en relación al inicio de la ramificación, proviene de los estudios realizados sobre el comportamiento del spk (Watters *et al.*, 2011) el cual se ha visto durante la ramificación apical y lateral (Riquelme y Batnicki-García 2004).

Mediante la caracterización masiva de mutantes disponibles de *N. crassa*, se han identificado alrededor de 100 loci que codifican para genes involucrados en el crecimiento apical y la ramificación (Watters y Griffiths, 2001). Además, teniendo en cuenta que se ha descrito en otros hongos que las proteínas homólogas a RGD-1 y BEM-3 modulan la actividad de CDC-42 y otras RhoGTPasas, las cuales se encuentran relacionadas con la polarización, con el control de la ramificación y de la morfología de las hifas, se realizó un conteo del índice de ramificación en las mutantes $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y en la doble mutante $\Delta rgd-1 \Delta bem-3$ para determinar si este evento se encontraba afectado en dichas cepas (Ness., *et al* 2010).

Se observó que las mutantes simples $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y la doble mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem3$ presentaron un mayor número de ramas comparado con la cepa silvestre (FGSC#4200) (Figura14). Estas diferencias son claramente significativas, y es de resaltar que las mutantes $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ ramificaron entre 3.3 y 3.1 veces más que la cepa silvestre. Por otro lado, la doble mutante muestra una ligera disminución en el índice de ramificación con respecto a las cepas mutantes dobles, pero la diferencia con respecto a la ramificación de la cepa silvestre es bastante grande, ya que la cepa doble mutante ramificó 2.7 veces con respecto a la silvestre (Figura 15). Estos datos sugieren que RGD-1 y BEM-3 tiene un papel importante en el control de la ramificación de las hifas.

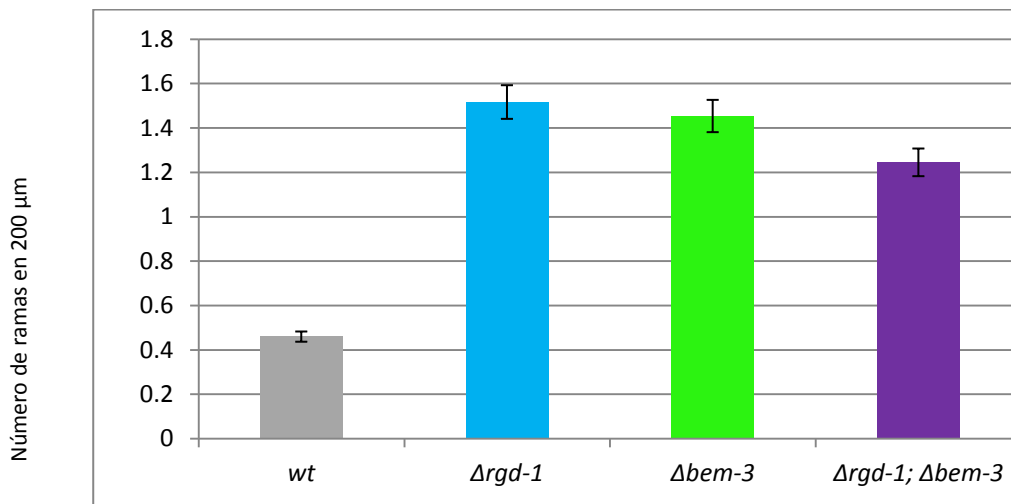


Figura 14. Gráfica que muestra el número de ramas en 200 μm, en las cepas mutantes simples y en la doble mutante. Las cantidades graficadas corresponden a los promedios de tres experimentos independientes con sus correspondientes triplicados. Las barras sobre cada columna representan las desviaciones estándar.

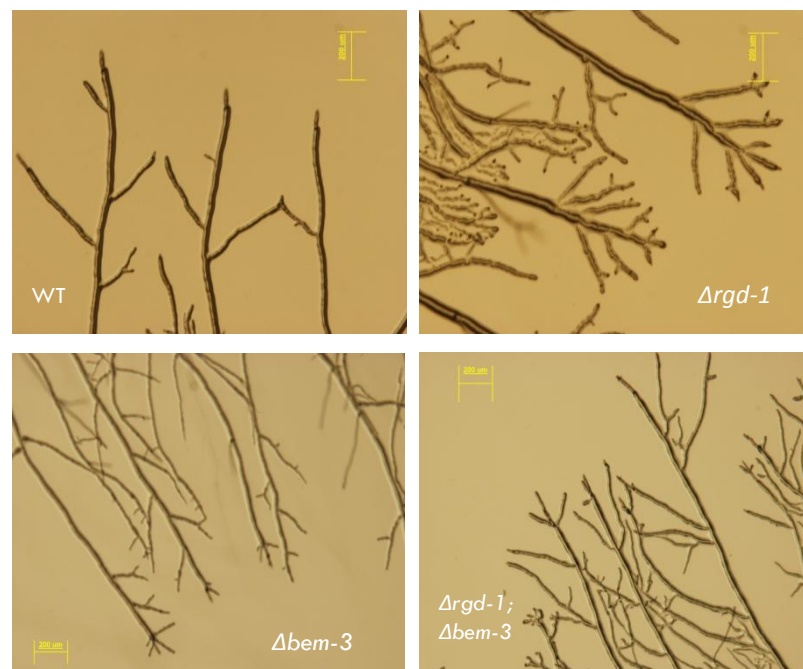


Figura 15. Ramificación de las cepas silvestres y mutantes de *N. crassa*. Las cepas se crecieron a 30 °C y las ramificaciones fueron contadas a una distancia de 200 μm a partir del ápice de la hifa principal.

6.7 Las mutantes sencillas $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ muestran diferencias en la producción de biomasa

Otro aspecto considerado, fue la producción de biomasa a las 24 h de crecimiento (Figura 16). La cepa silvestre y la cepa $\Delta rgd-1$ produjeron una biomasa similar de entre 0.38 g y 0.36 g respectivamente. Sin embargo la cepa $\Delta bem-3$, presentó un peso de 0.17 g, lo que representa aproximadamente la mitad de la biomasa que produjeron la cepa silvestre y la cepa $\Delta rgd-1$. Por otro lado, la cepa mutante doble $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$ presentó un peso en seco de 0.36 g, cifra similar al peso seco de la cepa silvestre y de la cepa $\Delta rgd-1$. Estos datos indican claramente que la cepa $\Delta bem-3$ produce menos masa micelial en *N. crassa*, sin embargo la doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$ no se ve afectada probablemente por la característica observada con la mutante $\Delta rgd-1$, la cual es conservada.

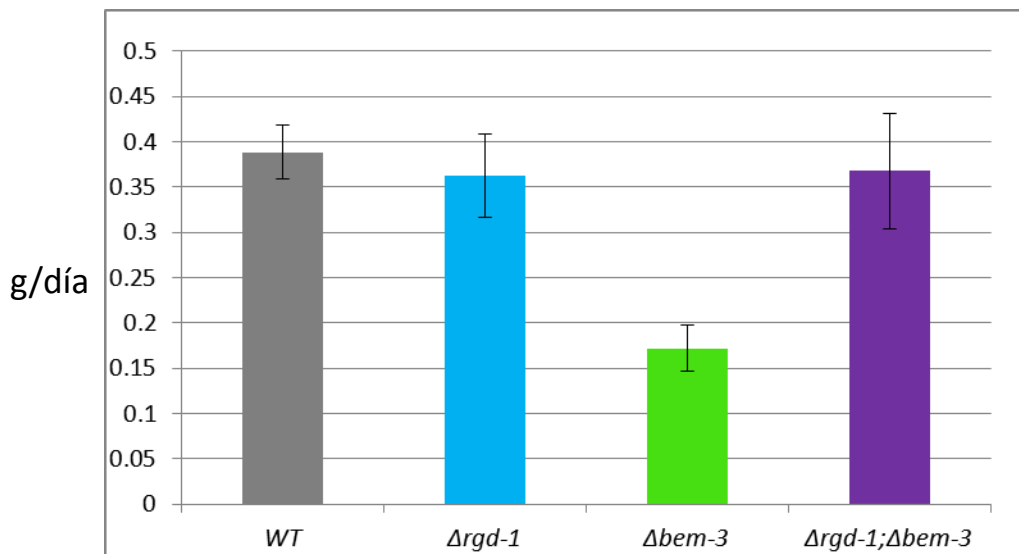


Figura 16. Gráfica que muestra el promedio del peso en seco de la cepa silvestre y de las mutantes $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ a las 24 h de crecimiento. Las barras sobre cada columna representan la desviación estándar.

6. 8 La mutante $\Delta rgd-1$ se encuentra afectada en la producción de las esporas pero no en la formación del micelio aéreo.

Con el fin de examinar si la proteína RGD-1 tiene un papel importante en el desarrollo asexual, se evaluó la producción de conidios de la mutante $\Delta rgd-1$. La cuantificación de conidios se llevó a cabo después de incubar las cepas por 5 días a 30° C. En la gráfica se puede observar que la cepa silvestre produce 87.89×10^5 conidios, mientras que la cepa $\Delta rgd-1$ se presentó con una producción de 14.44×10^5 conidios /mL lo cual es aproximadamente 6 veces menos que los conidios que produce la cepa silvestre. La cepa mutante $\Delta bem-3$ mostró una producción de 82.78×10^5 conidios /mL, lo cual no presenta diferencia con respecto a la cepa silvestre. En el caso de la doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$, se produjeron 67×10^5 conidios /mL, observándose características similares a las de la mutante $\Delta bem-3$ (Figura17).

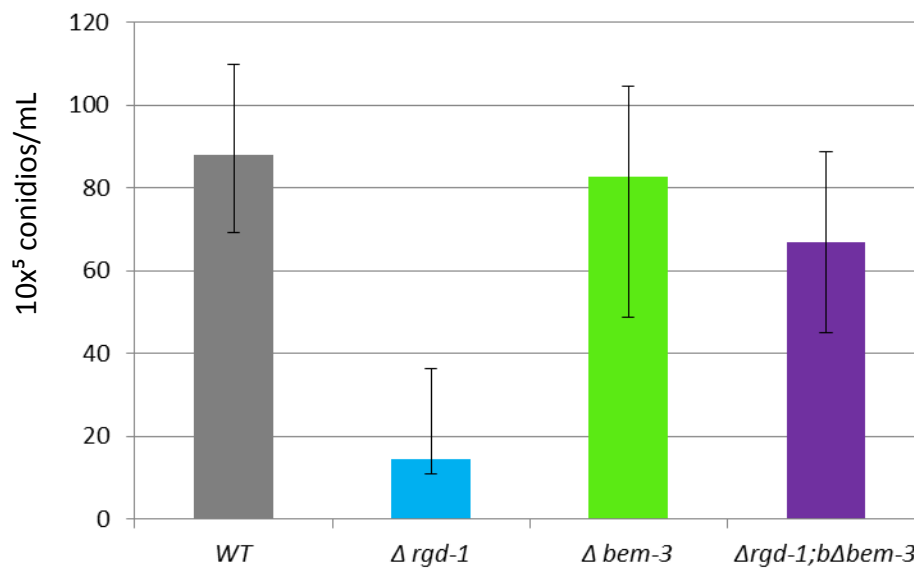


Figura 17. Gráfica de la concentración de conidios en las cepas silvestre, mutantes simples y en la doble mutante. Las cantidades graficadas corresponden a los promedios de tres experimentos independientes con sus correspondientes triplicados. Las barras sobre cada columna representan la desviación estándar.

Cabe mencionar que durante este experimento se tomaron fotografías después de 5 días para comparar la producción de micelio aéreo de las cepas examinadas (Figura 18). La mutante $\Delta rgd-1$ produce un micelio aéreo de mayor longitud y mayor coloración, con respecto a la cepa silvestre, pero éste presentó menor coloración y una estructura más esponjosa o “fluffy”. En cuanto a la mutante $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$ el micelio no solamente se presentó longitud y coloración similar a la mutante simple $\Delta bem-3$, si no que el micelio tenía una apariencia más densa.

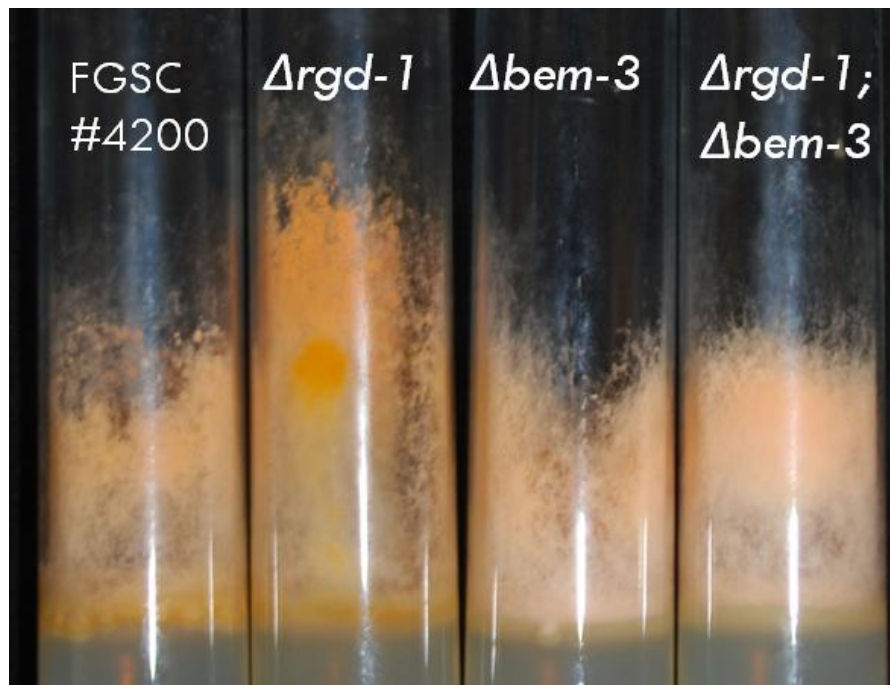


Figura 18. Hifas aéreas de las cepas silvestres, las mutantes simples $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y la mutante doble $\Delta rgd-1; \Delta bem-3$. Las fotografías se tomaron a los 7 días de incubación a 30 °C. El experimento se realizó como se describe en la sección 5.13.5.

6.9 El Spk de las mutantes $\Delta rgd-1$, $\Delta bem3$ y $\Delta rgd-1; \Delta bem3$ muestran una localización similar al de la cepa silvestre

Una característica de los hongos filamentosos es la presencia del Sptizenkörper (Spk), una estructura celular, que es bastante dinámica y se se

encuentra ubicada adyacente al sitio de polarización (Virag y Harris, 2006). El Spk es considerado como un componente esencial para la exocitosis, el cual sirve como centro suministrador de vesículas importante para la extensión de la hifa porque regula la liberación de vesículas que contienen los elementos necesarios para construir la pared en la superficie apical (Bartnicki-García *et al.*, 1989). Y también se ha demostrado que actina. Esta estructura se ha correlacionado con el estudio de crecimiento de la hifa y la direccionalidad de su crecimiento (Riquelme *et al.*, 1998). Debido a que los datos anteriores muestran que la mutante $\Delta rgd-1$ presenta diferencias en cuanto al crecimiento y la ramificación de las hifas, se decidió definir si también se encuentra afectada en la posición y/o formación del Spitzenkörper.

Se ha demostrado que la internalización del colorante FM4-64 en hongos filamentosos (Read y Kalkman, 2003) es dependiente de actina y que este proceso se lleva a cabo a través de la endocitosis. Este marcador se adhiere a la membrana plasmática así como los organelos membranosos (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Para observar la localización del Spk en las cepas mutantes se llevó a cabo la tinción con este colorante utilizando el método de agar invertido (Hickey *et al.*, 2004), esto con la finalidad de determinar si en los ápices y ramificaciones de las cepas mutantes se seguía observando (Figura 19). En la cepa silvestre se observó que el Spk se encuentra localizado en el ápice de las hifas, como se ha reportado anteriormente y este cuerpo se encuentra más denso que el resto de las cepas. En el caso de las cepas $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ se observó que el Spk se encuentra localizado en las hifas principales y de las hifas laterales, de igual manera que una cepa silvestre, pero se observa una ligera disminución en la densidad de este cuerpo. Esto sugiere que el suministro de vesículas hacia el ápice, probablemente nos e encuentra muy afectado en las cepas que carecen de cualquiera de estas dos GAPs.

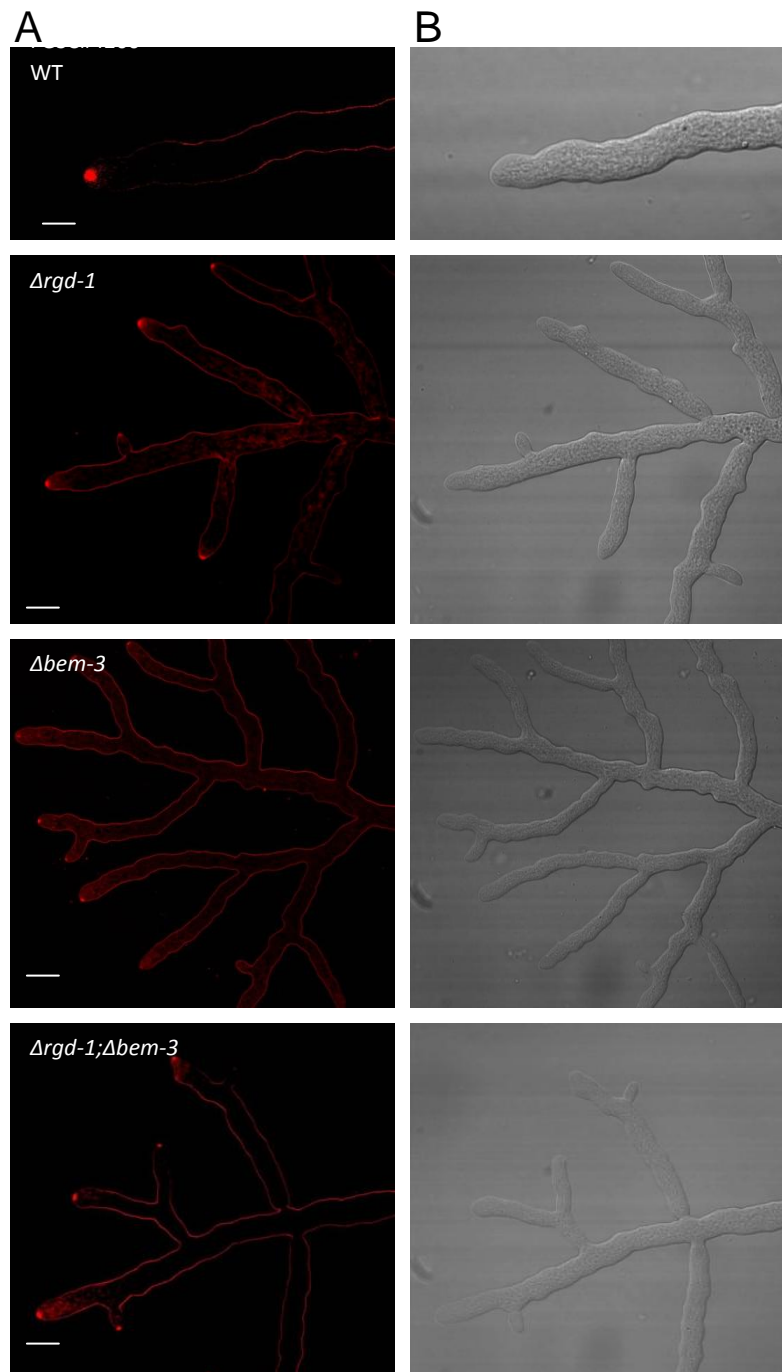


Figura 19. Localización del Spk de las hifas en las cepas silvestre y mutantes. Las cepas se montaron con 10 μ L de FM4-64(5 μ M) y se observaron a través de la técnica de bloque invertido (A) Tinción con FM4-64. (B) Contraste por interferencia diferencial. Escala=20 μ m.

6.10 La cepa *Δrgd-1* no muestra alteraciones durante la formación de pared celular

La pared celular en los hongos es una estructura dinámica, la cual cambia su composición de acuerdo a los diversos eventos celulares (germinación, ramificación y formación de septos). Esta estructura se encarga de regular la morfogénesis y la integridad celular (Adams, 2004). En *N. crassa* la pared celular está compuesta de polisacáridos y proteínas, la cual contiene β -1,3-glucano, α -1,3-glucano, quitina y un diverso número de glicoproteínas (Maddi y Free, 2010). El blanco de calcofluor ha mostrado ser un marcador que interactúa con distintos polisacáridos, mostrando gran afinidad por la quitina y la celulosa (Roncero y Durán, 1985).

Con la finalidad de analizar la integridad de la pared celular en las cepas mutantes, se realizaron tinciones con el colorante calcofluor (Figura 20), el colorante se integró en la pared celular. En la mutante *Δrgd-1* se observó que las hifas tienen una morfología regular, muy semejante a la cepa silvestre. Por otro lado la mutante *Δbem-3* y la doble mutante *Δrgd-1;Δbem-3* presentan una forma irregular en los bordes de la pared. Además la pared de doble mutante se encuentra un poco más delgada que en el resto de las cepas. Por lo tanto, aunque la falta de GAPs no tiene efectos en la localización de la estructura principal que provee los materiales para la síntesis de la pared (Spk), la carencia de la Rho GAP BEM-3 tiene consecuencias en la morfología de las hifas. Además, este defecto se acentúa cuando adicionalmente, RGD-1 está ausente.

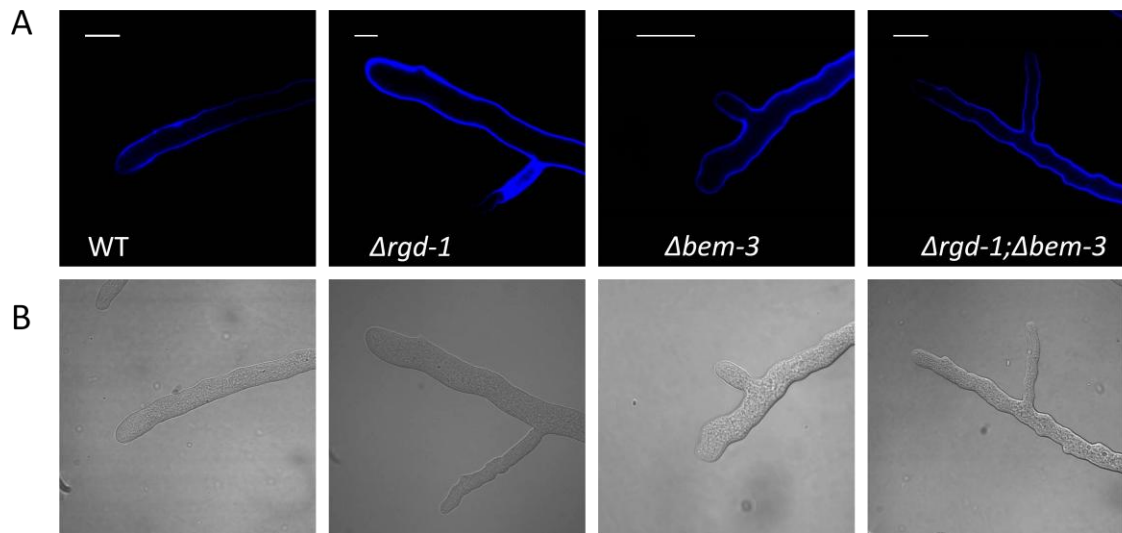


Figura 20. Microscopía confocal de las cepas silvestre, mutantes y doble mutante. (A) Tinción con calcofluor. (B) Contraste de fases. Escala=20 μ m.

6.11 La cepa mutante $\Delta rgd-1$ muestra una organización de actina en el collar endocítico y en el Spk

En los hongos filamentosos, podemos encontrar a la actina en los sitios de crecimiento celular durante la elongación de las hifas. Específicamente, los parches de actina se acumulan en los ápices de las hifas y en el anillo contráctil de actina (CAR) durante la formación de los septos (Upadhyay y Shaw., 2008). La actina tiene un papel central en la morfología de las hifas y en su crecimiento porque participa en procesos como endocitosis, además de que es una proteína muy abundante que interactúa con distintos componentes que dirigen el crecimiento polarizado (Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

Recientemente se ha desarrollado una herramienta que ha resultado efectiva para visualizar a la F-actina. Esta herramienta consiste en la expresión de un péptido de 17 aminoácidos denominado “Lifeact” que tiene la capacidad de unirse a la F-actina. El péptido se encuentra etiquetado con la proteína GFP para su visualización. En *N. crassa* se observó que la actina se encontraba distribuida

en el Spk y en el collar endocítico de la zona subapical, (Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

Se ha observado que existe una relación entre la actividad de las RhoGTPasas y la actina. En las levaduras se ha reportado que una de las RhoGTPasas que se encuentra involucrada en el ensamblaje de la actina es Cdc42. Tomando en cuenta que RGD-1 podría ser una reguladora GAPs de CDC-42, se decidió determinar si el citoesqueleto de actina se encontraba afectado en la mutante que no tiene a RGD-1. Por otro lado, VRP1 codifica una proteína de unión a actina llamada verprolina, esencial para una correcta polarización de los parches de actina durante el crecimiento celular (Vedova *et al.*, 1997) interacciones genéticas han demostrado que las mutaciones *rgd1Δ* y *vrp1Δ* son sintéticamente letales, así mismo se demostró que la sobreexpresión de la Rgd1p o la verprolina en un fondo mutante para *VRP1* y *RGD1*, respectivamente, mostró efectos negativos no observados en una cepa silvestre (Roumanie *et al.*, 2000).

Para determinar la relación entre la actina y la proteína RGD-1 durante el crecimiento apical, se transformó la cepa mutante *Δrgd-1* expresando el marcador Lifeact-GFP la cual mostró la actina presente. La actina pudo observarse en los sitios reportados por (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010), es decir en el ápice de la hifa, en la localización del spk, en la parte subapical lo que es el collar endocítico, así como en la formación de los septos. Cabe mencionar que estos parches de actina se observan en los sitios nuevos de polarización como son las ramificaciones apicales y laterales (Figura 21).

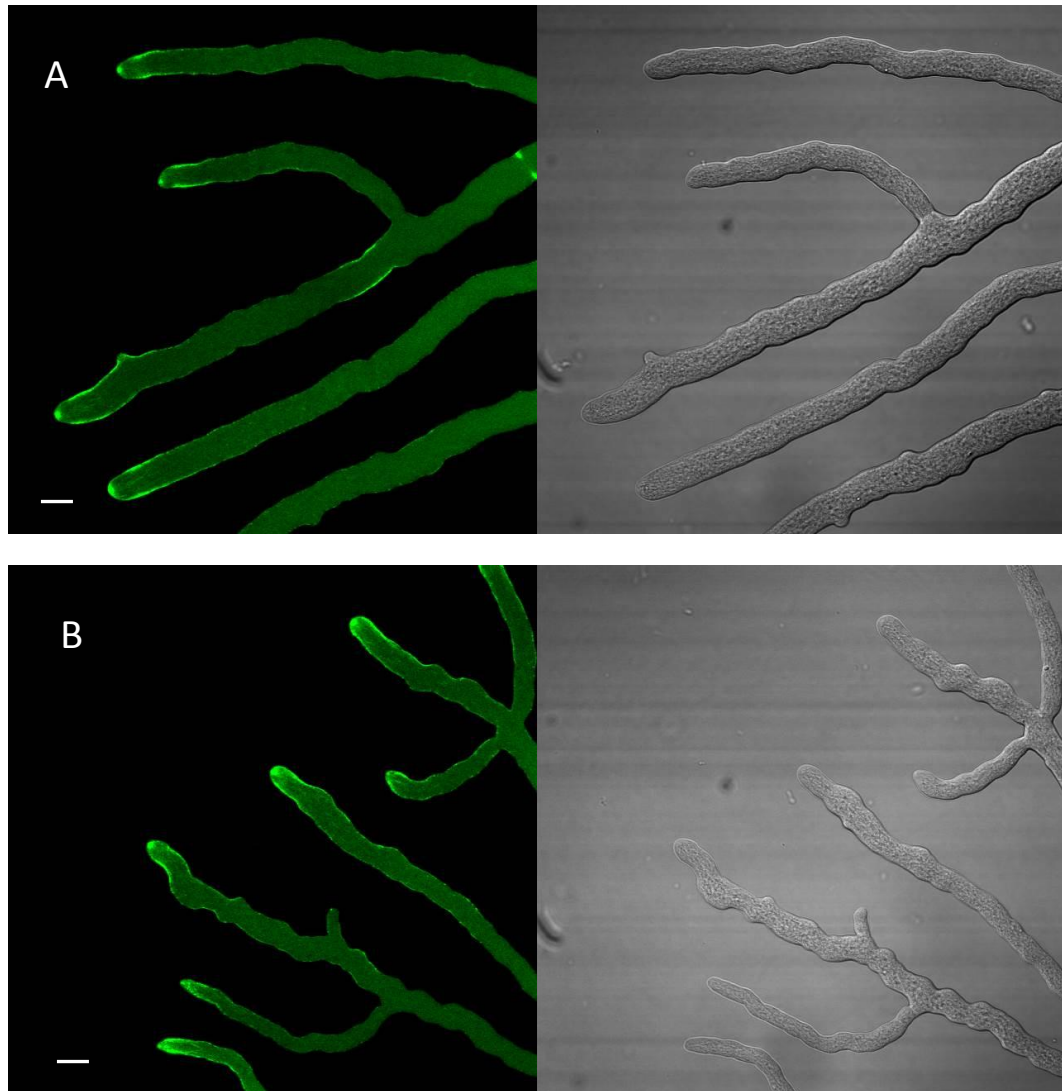


Figura 21. Distribución de actina (Lifeact-GFP) en una cepa silvestre (A) y en la cepa mutante $\Delta rgd-1$ (B). La distribución de actina se observa en el collar endocítico en la zona subapical de la hifa, en el spk y durante la formación de los septos. Escala= 10 μm

6.12 La cepa mutante Δ rgd-1 muestra una localización apical de la proteína YFP-CDC-42

Se ha reportado en *N. crassa* que la GTPasa CDC-42 se localiza en los sitios de polarización en forma creciente asociadas a membrana plasmática, así mismo se observan en el futuro sitio donde se formará la emergencia de una ramificación subapical (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Por lo anterior se observó la localización de la proteína CDC-42 en ausencia de la proteína RGD-1, la cual es reguladora de CDC-42. Se encontró que CDC-42 se encuentra localizada en los sitios reportados por (Araujo-Palomares *et al.*, 2011) en forma creciente asociada a la membrana en el ápice de las hifas (Figura 22) y en ramificaciones laterales. Sin embargo se observa una ligera disminución en el área que ocupa CDC-42, lo que indicaría que la proteína CDC-42 sigue siendo regulada por la presencia de otras GAP's.

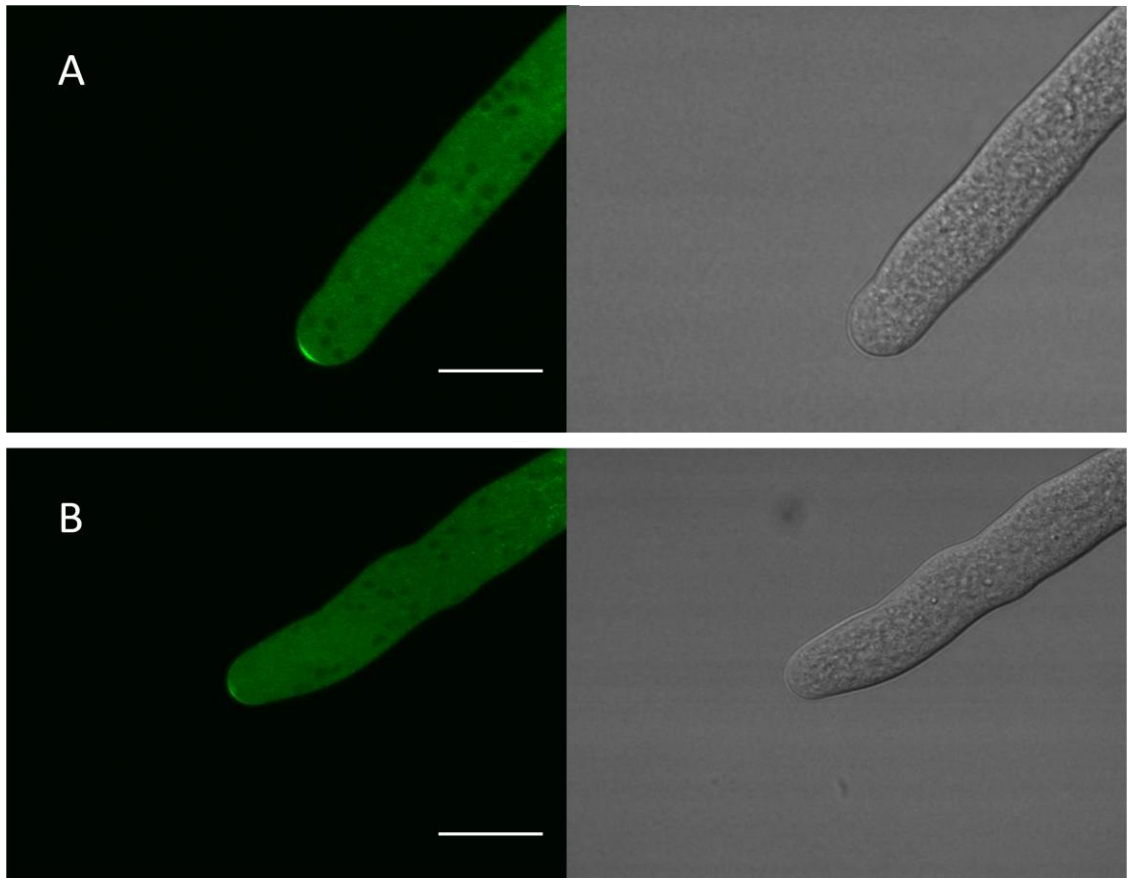


Figura 22. Localización de la YFP-CDC-42 en la cepa mutante $\Delta rgd-1$. En (A) se observa la YFP-CDC-42 localizada en el ápice de las hifas en una cepa silvestre. (B) la localización de la YFP-CDC-42 en la cepa mutante $\Delta rgd-1$. Escala= 10 μm

Capítulo 7

Discusión

Las Rho GTPasas de la superfamilia de las Ras son reguladores maestros de una amplia variedad de funciones celulares en los organismos eucariotas (Haffe y Hall, 2005). Las GTPasas se encuentran en estado activo cuando están unidas a GTP y pueden interactuar con una serie de proteínas efectoras. Por lo tanto las GTPasas actúan como interruptores moleculares que ciclan entre un estado activo, unido a GTP y uno inactivo unido a GDP. Esta actividad es controlada por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio de GDP por GTP para activar las GTPasas (Schmidt y Hall 2002). Por otro lado las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) estimulan la actividad intrínseca de las GTPasas para la inactivación de la proteína (Bishop y Hall, 2000). En la levadura por gemación *S. cerevisiae* se ha identificado una serie de proteínas GAP's como: Lrg1p, Bem3p, Rga1p, Bem2p, Bag7p, Sac7p y Rgd1p y sus ortólogos Rga1, Rga2, Rga3, Rga4, Rga5 Rga6 y Rga7 en la levadura por fisión *S. pombe* (Nakano *et al.*, 2001). Ensayos realizados con distintas GAP's de la GTPasa CDC-42 en *S. cerevisiae* han mostrado que las mutantes sencillas *rga1Δ*, *rga2Δ*, *bem3Δ* muestran morfología normal entre el 59 y el 90% de su totalidad, la mutante doble *rga1Δrga2Δ* un 49%, sin embargo al suprimir dos genes, la cepa *rga1Δbem3Δ* resultó la más afectada con un 60% de células con defectos severos en la morfología (Smith *et al.*, 2002).

En el hongo filamentoso *N. crassa* solamente se ha identificado a la proteína LRG-1 como una reguladora de la proteína RHO-1 (Vogt y Seiler, 2008). RGD-1 contiene 743 aminoácidos y dos dominios definidos en su estructura primaria: F-BAR en la región N-terminal y RhoGAP en la región C-terminal, mostrando el mismo patrón de Rgd-1 de *Saccharomyces cerevisiae* misma que ha sido ya caracterizada. Rgd-1p ha mostrado estimular la actividad GTPasica tanto para la Rho3p y la Rho4p (Doignon *et al.*, 1999). Uno de los aspectos

fundamentales que caracteriza a la familia de las RhoGAP's es la presencia del dominio RhoGAP en su secuencia primaria y consiste en alrededor de 150 aminoácidos y comparte al menos un 20% de identidad con otros miembros de la familia RhoGAP (Moon y Zheng, 2003). El sitio catalítico del dominio RhoGAP se pudo observar en todas las secuencias analizadas a excepción de la de *H.sapiens*.

En *N. crassa* se ha observado que las Rho GTPasas CDC-42 y RAC, participan en la formación de ramificaciones laterales y en germínulas. CDC-42 presenta un papel sumamente importante durante el establecimiento de la localización del crecimiento polarizado (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). También se reportó que al parecer tanto CDC-42 como RAC son reguladas por la GEF CDC-24, ya que las cepas carentes de este gen son letales. Sin embargo se desconoce que proteínas GAP son las que actúan como reguladoras negativas de estas proteínas. Recientemente se realizó un análisis de actividad de las distintas RhoGTPasas con las distintas RhoGAPs hipotéticas en *N.crassa* (Seiler, sin publicar), estos resultados mostraron que tanto RGD-1 como BEM-3 tienen actividad con CDC-42 y RAC, las cuales corresponden al NCU0553 y NCU02524 respectivamente (Figura, 22). Estos resultados sugieren que tanto CDC-42 como RAC son reguladas por RGD-1 y BEM-3 y que ambas GAPs podrían tener un papel redundante en la regulación de estas GTPasas.

Para un mejor entendimiento del papel de la proteína RGD-1 durante el crecimiento polarizado en los hongos filamentosos, se estudió el efecto de la carencia de esta proteína y se comparó con la cepa silvestre de *N. crassa*. Así mismo se estudió el efecto de la carencia de dos proteínas GAP mediante la obtención de la doble mutante de RGD-1 y de la proteína BEM-3. La morfología colonial se observó muy similar tanto en las mutantes simples como en la doble mutante, lo que sugiere que existen varias proteínas con actividad GAP para CDC-42 y RAC

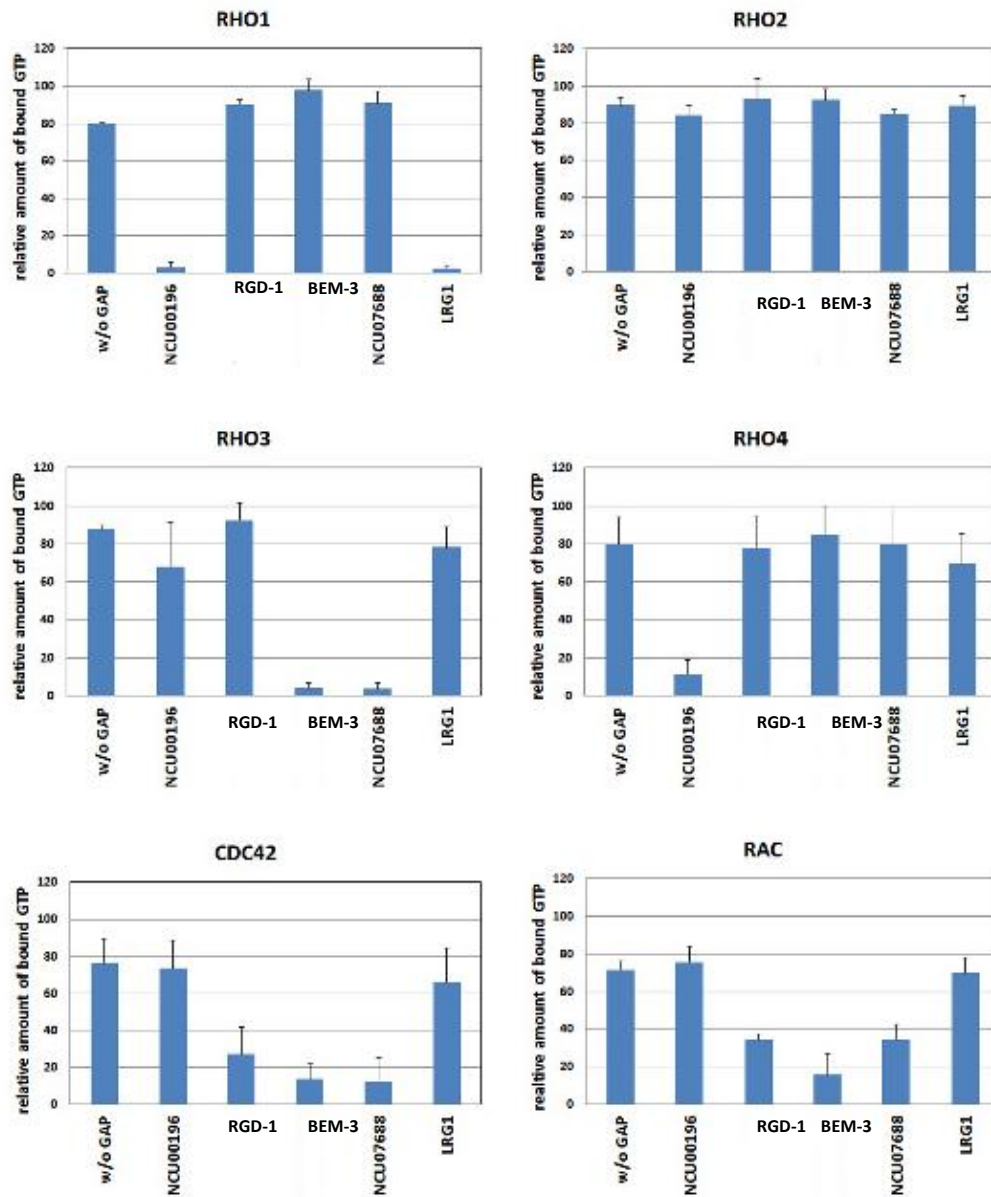


Figura 23. Ensayo de actividad de las RhoGTPasas RHO-1 a RHO-4, CDC-42 y RAC con las distintas GAPs de *N. crassa*. Los NCU corresponden a los distintos ortólogos tanto en *S. cerevisiae* como *S. Pombe*. (Modificado de Seiler, sin publicar)

La cepa $\Delta rgd-1$ mostró un incremento en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Este incremento podría estar dado por una desregulación en este proceso, debido a que RDG-1 es una RhoGAP que se ha propuesto que modula de manera negativa la actividad de las RhoGTPasas CDC-42 y RAC (Seiler sin publicar). Araujo-Palomares reportó que CDC-42 es importante para el establecimiento de la polaridad celular, mientras que RAC participa en su mantenimiento (Araujo-Palomares 2011). Las mutantes de *N. crassa* que carecen de estas proteínas, muestran un crecimiento aberrante y bastante disminuido, en comparación con la cepa silvestre; contrario a lo que sucede en la cepa $\Delta rgd-1$. Esto sugiere que RGD-1 podría tener una función moduladora de la actividad de CDC-42 y RAC, al favorecer el intercambio de GTP a GDP en estas RhoGTPasas durante el crecimiento, tal como lo hace una GAP, y de esta manera permite su activación. Sin embargo, cuando la proteína GAP ha inducido la hidrólisis de GTP, las RhoGAP vuelven a su estado inactivo unidas a GDP. Por lo tanto, en ausencia de RGD-1, estas RhoGTPasas podrían encontrarse activas y unidas a GTP por un mayor periodo de tiempo, lo que propicia el aumento en el crecimiento. Los efectos de la carencia de RGD-1 no parecen ser tan drásticos, probablemente porque esta RhoGAP es importante durante un estadio muy específico del crecimiento; y en las etapas posteriores, esta función es suplida por alguna de las otras 10 RhoGAPs que tiene *N. crassa*.

Análisis fenotípicos han demostrado que la mutante *lrg-1(12-20)* de *N. crassa* a temperaturas permisivas (25 °C) no muestra diferencias en la morfología de las hifas y en sus ramificaciones con respecto a la cepa silvestre, sin embargo si se observan alteraciones al exponer la cepa a temperatura restrictiva de 37 °C, la mutante dejó de extenderse y con numerosas ramas con forma de aguja. Después de un tiempo prolongado de incubación las hifas se observaron hinchadas en forma de bulbos, así mismo la germinación de *lrg-1(12-20)* a la

temperatura restrictiva resultó en la formación de colonias compactas (Vogt y Seiler, 2008).

El incremento en la ramificación de las hifas de las mutantes $\Delta rgd1$ y $\Delta bem-3$, podría estar relacionado con el estado de activación de CDC-42 y RAC. Mutantes en Δrac y $\Delta cdc-42$ en *N. crassa* muestran una ramificación profusa en la parte apical de las hifas, lo que sugiere que RGD-1 y BEM-3, participan en la ramificación a través de la modulación de la actividad de RAC y CDC-42 (Araujo-Palomares, 2011). Por ejemplo, se ha reportado que cepas de *Aspergillus nidulans* que expresan a RAC con una mutación que impide que hidrolice GTP, y que por lo tanto se encuentre en permanentemente activa, pierden su polaridad celular (Kwon, 2011). La ausencia de *rgd-1* y *bem-3*, podría ser equivalente de cierto modo, a la mutación dominante activa de RAC y de CDC-42, lo que explicaría, el incremento en la ramificación de las hifas. Sin embargo, aún queda por discutir el hecho de que este incremento no afecte de manera severa el tamaño de la colonia, como es el caso de las mutantes Δrac y $\Delta cdc-42$. Se ha sugerido que el inicio de la ramificación es controlado por un sistema de homeostasis que compensa el crecimiento, es decir, que en condiciones de crecimiento lento, la ramificación aumenta y de manera contraria, si se favorecen las condiciones de crecimiento rápido, se suprime la ramificación, lo cual no es el caso para la mutante $\Delta rgd-1$ y lo es en cierto grado para la mutante $\Delta bem-3$ (Watters, 2011).

Durante la medición del índice de ramificación, a una temperatura de 30 °C la cepa mutante $\Delta rgd-1$ se mostró más ramificada que la cepa silvestre en los ápices de las hifas, así mismo se observó un patrón similar con la mutante simple $\Delta bem-3$ y la mutante doble $\Delta rgd-1; \Delta bem3$, sugiriendo que en la ausencia GAP's ocurre una mayor acumulación de vesículas exocíticas, probablemente por un desequilibrio en la falta de regulación de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC durante el establecimiento del crecimiento polarizado. Estos datos concuerdan

con la localización del Spk, al observarse en el ápice de las hifas principales y en las ramificaciones laterales de las cepas mutantes sencillas y doble mutante.

En cuanto a la tasa de ramificación, es notablemente alto el número de ramas que presentan las mutantes simples $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y la doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem3$, comparado con las que presenta la cepa silvestre. Aunque no es claro el mecanismo que regula el número de ramas que las hifas producen subapicalmente durante su crecimiento, al parecer las proteínas GAP juegan un papel importante en la regulación de este proceso, ya que Vogt y Seiler (2008) también reportan a la GAP LRG-1 como una proteína esencial no solo para la extensión apical, sino también para restringir la ramificación excesiva en *N. crassa*. Vogt y Seiler mencionan que la carencia de LRG-1 incrementa la formación de glucano, el cual pudiera interferir con la plasticidad de la pared celular, restringiendo la extensión apical e induciendo la formación excesiva de ramificaciones apicales. Sin embargo esta hipótesis no concuerda del todo con los resultados de este trabajo, ya que la extensión apical de las mutantes analizadas solo se ve ligeramente afectada y la pared celular de las mutantes $\Delta rgd-1$ y $\Delta bem-3$ y la doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem3$, al parecer no muestran diferencias con respecto a la pared celular de la cepa silvestre, al menos en cuanto a su grosor el cual se observa similar mediante la tinción con calcofluor. Sin embargo, para corroborar si hay diferencias en la formación de glucano en las mutantes de las GAPS, sería necesario analizar la actividad de la β 1-3-glucano sintasa ya que en levaduras se ha reportado un incremento en la actividad de la glucano sintasa en mutantes de $\Delta lrg-1$ (Lorberg et al., 2001; Watanabe et al., 2001; Fitch et al., 2004).

En *N. crassa* se ha descrito que RHO-1 es la GTPasa encargada del mantenimiento de la pared celular. La RhoGAP que regula esta RhoGTPasa es Lrg-1. Sin embargo, las mutante $\Delta rgd-1$, $\Delta bem-3$ y la doble mutante $\Delta rgd-1$, $\Delta bem-3$ no mostraron cambios en la síntesis de pared, lo cual se relaciona con el

análisis de Seiler en donde muestra que RhoGAPs no parece regular la actividad de RHO-1 GTPasa de *N. crassa* (Figura 22).

La producción de la biomasa en la mutante $\Delta rgd-1$ no se vio afectada, lo cual es de llamar la atención si relacionamos estos datos con los resultados de la ramificación de las hifas y el crecimiento de la cepa. Por otro lado, la mutante $\Delta bem-3$ presenta una disminución significativa (Casi del 50%) de biomasa, con respecto a la cepa silvestre. Probablemente es porque la cepa que carece de BEM-3 aún posee a RGD-1, y éste último podría trabajar como un regulador negativo de algún efector involucrado en el proceso, lo que trae como consecuencia una reducción significativa en la producción de la biomasa. Mientras que BEM-3 está ausente, no puede modular la función inhibitoria de RGD-1. Esta hipótesis se sustenta en los resultados de la doble mutante $\Delta rgd-1 bem-3$, en donde se observa que la cepa produce cantidades similares de biomasa que la cepa silvestre y que la cepa $\Delta rgd-1$, porque ni BEM-3 ni RGD-1 se encuentran en el sistema para competir por algún efector que participa en este proceso y el cual podría ser regulado de manera diferente por ambas RhoGAPs.

Se sabe que las GTPasas juegan un papel clave en la organización de citoesqueleto de actina, además de regular otros procesos celulares como la organización del citoesqueleto y el transporte de vesículas. Por lo que estas funciones pudieran estar afectadas sin la adecuada regulación por parte de las proteínas GEFs y GAPs. En *N. crassa* se visualizó la F-actina en el Spk y en el collar endocítico de la zona subapical, esto mediante el marcaje del reportero Lifeact, un péptido de 17 aminoácidos, el cual es bastante conservado entre varias especies de hongos y ha mostrado ser un buen marcador de la F-actina (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Es por ello que se analizó la localización de la actina por medio del reportero Lifeact en la cepa mutante $\Delta rgd-1$, sin embargo ésta no se vio afectada, en contraste con lo que se ha reportado para *S. Pombe*, en la que la carencia de la GAP *rgd-1* (homólogo de LRG1) provoca la deslocalización de los parches de actina (Nakano *et al.*, 2001).

A través del dominio F-BAR la proteína Rgd1p interacciona con los fosfoinosítoles, los cuales son esenciales para la localización correcta de la proteína Rgd1p durante la emergencia de la célula hija *in vivo* (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2008). Por ello se observó la localización de la proteína CDC-42-YFP en una cepa mutante $\Delta rgd-1$ y ver si existe algún efecto en el reclutamiento correcto de la proteína CDC-42, esto podría esperarse por la actividad redundante de las proteínas activadoras de las GTPasas (GAP's), siendo varias las que podrían determinar su localización y organización. Se observó que CDC-42 se localiza de manera apical en las hifas y ramificaciones laterales, sin embargo el área que ocupa en el ápice se ve ligeramente disminuida. Pudiera ser que la regulación de CDC-42 y RAC por RGD-1 sea específica para el desarrollo del micelio aéreo y que al carecer de RGD-1 se produzcan mayor número de hifas aéreas lo que se ve reflejado en la mutante (Fig. 18).

Aunque aún faltan más estudios por realizar, es claro que las proteínas GAP juegan un papel importante en la morfogénesis celular de *N. crassa* ya que la carencia de ellas afecta el patrón de ramificación, la reproducción asexual (producción de conidios) y la formación de micelio aéreo.

Conclusiones

- La proteína RGD-1 de *N. crassa*, es homóloga a la proteína Rgd1p de *S. cerevisiae*.
- La carencia de la proteína activadora de GTPasas RGD-1 genera defectos durante el crecimiento del hongo, generando un mayor número de ramificaciones y un decremento en la producción de conidios.
- El fenotipo de la cepa doble mutante $\Delta rgd-1;\Delta bem-3$ mostró defectos en el índice de ramificación, observándose ligeramente disminuido, comparado con la cepa silvestre.
- La ausencia de la proteína RGD-1 no afecta la localización de los parches de actina.
- La localización de la proteína CDC-42 no se ve afectada por la ausencia de la proteína RGD-1.

Referencias Bibliográficas

Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat & J.R. Pringle. 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111:131-142.

Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* 150(7): 2029-2035.

Araujo-Palomares, C., Rchthammer, C., Seiler, S., & Castro-Longoria, E. 2011. Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC-42-RAC- CDC-24 Module in *Neurospora crassa*. *Plos ONE.* 6(11): e27148.

Barthe, C., de Bettgnies, G., Louvet, O., Peypouquet, M., More, I C., Doignon, F & Crouzet, M. 1998. First characterization of the gene *RGD1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 321:453-462.

Bartnicki-García, S., Hergert, F. & G, Gierz 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma.* 153(1): 46-57.

Bassilana, M., J, Blyth & R.A. Arkowitz. 2003. Cdc24, the GDP-GTP exchange factor for Cdc42, is required for invasive hyphal growth of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 2:9-18.

Bassilana,, M., J, Hopkins & R.A, Arkowitz. 2005. Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukariotic Cell.* 4:588-603.

Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J., Tilsner, J & Read N. 2010. F-actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukariotic Cell.* 9(4): 547-557.

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

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.

Bos, J., Rehmann H. & Wittinghofer, A. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 129(5):865-877.

Butty, A., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segal, J., Hofmann, K., Zwaalen, C., & Peter M. 2002. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *The EMBO Journal.* 7: 1565-1576.

Cabib, E., Drgonová & Drgon, Tomás. 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 67:307–33.

Chant, J. 1999. Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:365-391.

Cid, V., Cenamor, R., Sánchez, M & Nombela, C. 1998. A mutation in the Rho-GAP-encoding gene *BEM2* of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology.* 144: 25-36.

Coll, P.M., Trillo, A. Ametzazurra & P. Pérez. 2002. Gef1p, a new guanine nucleotide Exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* 14:313-323.

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

Davis, R.H., 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, D. F. 350p.

Delgado-Álvarez, D.L., O.A. Callejas Negrete, N. Gómez, M. Freitag, R.W. Roberson, L.G. Smith & 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.

Doignon, F., Weinachter, C., Roumnaie, O & Crouzet, M. 1999. The yeast Rgd1p is a GTPase activating protein of the Rho3 and Rho4 proteins. FEBS Letters. 459: 438-462.

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

Ferreira, JM., Graaff L. 2011. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 89:225–237.

Fischer, R., Zekertan, N., Takeshita, N. 2008. Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. Molecular Biology. 68: 813-826.

Fischer-Parton, S., Parto R. M., Hickey P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., & Read, N. D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analyzing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. Journal of Microscopy. 198: 246–259.

Fitch, P., Gammie, A., Lee, D., Brizzio, V & Rose M. 2004. Lrg1p Is a Rho1 GTPase-Activating Protein Required for Efficient Cell Fusion in Yeast. Genetics 168: 733–746

Gallagan, J., Calvo, S., Borkovich, K., Selker, U., Read, N., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Lanakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-M., Selitrennikoff, C., Kinsey, J., Braun E. Zelter A. Schulte U. Kothe G. Jedd G. Mewes W. Staben C. Marcotte E. Greenberg D. Roy A. Foley K. Naulor J. Stange-Thomann N. Barrett R. Gnerre S. Kamal M. Kamvysselis M.

Mauceli E. Bielke C. Rudd S. Frishman D. Krystofova S. Rasmussen C. Metzenberg R. Perkins D. Kroken S. Cogoni C. Macino G. Catcheside D. Li W. Pratt R. Osmani S. DeSouza C. Glass L. Orbach M. Berglund A. Voelker R. Yarden O. Plamann M. Seiler S. Dunlap J. Radford A. Aramayo R. Natvig D. Alex L. Mannhaupt G. Ebbole D. Freitag M. Paulsen I. Sachs M. Lander E. Nusbaum C and Birren B. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature 422: 859-868.

Gulli, M., Peter, M. 2001. Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factor: the yeast perspective. Genes Development. 15: 365-379.

Hickey, P.C., S.R. Swift., M.G. Roca & 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 & M. Yamamoto. 2003. Gef1p and Scd1p, the two GDTGTP Exchange factors for Cdc42p, from a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Biol. Cell. 14:3617-3627.

Jaffe, A.B., A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:247-269.

Johnson, D. 1999. Cdc42: An Essential Rho-Type GTPase Controlling Eukaryotic Cell Polarity. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 1-54.

Kavanagh, K. 2005. Fungi: Biology and Applications. Wiley. West Sussex. 2p.

Knaus, M., Gulli, MP., Van Drogen, F., Springer S., Jaquenoud M & Peter M. 2007. Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. The EMBO Journal. 26: 4501-4513.

Kötting, C., Gerwert, K. 2013. The dynamics of the catalytic site in small GTPases, variations on a common motif. FEBS letters. 587: 2025-2027.

Kwon, M. J., Nitsche, B., Arentshorst, M., Jorgensen, T & Ram, A. 2013. The Transcriptomic Signature of RacA Activation and Inactivation Provides New Insights into the Morphogenetic Network of *Aspergillus niger*. Plos ONE. 8(7): e68946.

Leeder, A., Palma-Guerrero, J & Glass, L. 2011. The social network: deciphering fungal language. Nature Rev Microbiol. 9:440-451.

Lefebvre, F., Prouzet-Mauléon, V., Vieillemand, A., Thoraval, D., Crouzet, M & Doignon F. 2009. Through its F-BAR and RhoGAP domains, Rgd1p acts in different polarized growth processes in budding yeast. Communiactive & Integrative Biology. 2(2):120-122.

Levin, D. 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69: 262-291.

Lorberg, A., Schmitz, H., Jacoby, J & Heinisch J. 200. Lrg1p functions as a putative GTPase-activating protein in the Pkc1p-mediated cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Genet. Genomics. 266(3):514-26.

Madaule, P., Axel, R & Myers, A. 1987. Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 779-783.

Maddi, A., Free, S. 2010. α -1,6-Mannosylation of N-Linked Oligosaccharide Present on Cell Wall Proteins Is Required for Their Incorporation into the Cell Wall in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. Eukariotic Cell (9)11: 1766-1775.

Maheshwari, R. 2005. Fungal biology in the 21st century. Current Science. 88: 1406-1418.

Maheshwari, R. 2005. Fungi: Experimental Methods in Biology. Taylor and Francis. Boca Raton FL.

Matsui, Y., Toh-E, A. 1992. Yeast *RH03* and *RHO4* ras Superfamily Genes Are Necessary for Bud Growth, and Their Defect Is Suppressed by a High Dose of Bud

Formation Genes *CDC42* and *BEM1*. *Molecular and Cellular Biology*, 12:5690-5699.

Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:580-585.

Moon, S.Y., Zheng Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *TRENDS in Cell Biology.* 13(1): 13-22.

Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Tho-E, A., Matusui, Y & Mabuchi, I. 2002. The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *Journal of Cell Science* 115(23): 4629-4639.

Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R & Mabuchi I. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells.* 8: 357–370.

Ness, F., Prouzet-Mauleon, V., Vieillemard, A., Lefebvre, F., Noël, T., Crouzet, M., Doignon, F & Thoraval D. 2010. The *Candida albicans* Rgd1 is a RhoGAP protein involved in the control of filamentous growth. *Fungal Genetics and Biology* 47: 1001-1011.

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, O., Bi, E. 2007. Central Roles of Small GTPases in the Development of Cell polarity in Yeast and Beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 71:48-96.

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

Perkins, D., Rowland, H.D. 2000. Evidence for Safety of *Neurospora* Species for Academic and Commercial Uses. *Applied and Environmental Microbiology* 10:3-7.

Perkins, D., Rowland, H.D. 2001. *Neurospora* at the Millenium. Fungal Genetics and Biology. 31: 153-167.

Prouzet-Mauléon, V., Lefebvre, F., Thoraval, D., Crouzet, M & Doignon F. 2008. Phosphoinositides Affect both Cellular Distribution and Activity of the F-BAR-containing RhoGAP Rgd1p in Yeast. Journal of Biological Chemistry 283(48):33249-33257.

Pruyne, D. and Bretscher, A. 2000. Polarization of cell growth in yeast. Journal of Cell Science. 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.

Rasmussen, C.G., N.L. Glass. 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. Eukariotic Cell. 4:1913-1925.

Read, N. D., Kalkman, E. R. 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? Fungal Genetics and Biology. 39: 199–203.

Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gires, G. & Bartnicki-García, S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae?. Fungal Genet. Biol. 24(1-2):101-109.

Riquelme, M., Bartnicki-García, S. 2004. Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 41(9):842-851.

Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-García, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., J. Free S., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R., Mouriño-Perez, R., Plamann M. Rasmussen, C., Richthammer, C. W., Roberson, R., Sánchez-Leon, Seiler, S. & Watters, M. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha- a model cell for polarized growth. Fungal Biology. 115:446-474.

Roncero, C., Duran, A. 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* 163(3):1180-1185.

Roumanie, O., Peypouquet, M., Bonneau, M., Thoraval, D., Doignon, F & Crouzet M. 2000. Evidence for the genetic interaction between the actin-binding protein Vrp1 and the Rho GAP Rgd1 mediated through Rho3p and Rho4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 36(6):1403-1414.

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

Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T & Pérez P. 2003. Novel Rho GTPase Involved in Cytokinesis and Cell Wall Integrity in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukariotic Cell.* 2(3): 521-533.

Scmidt, A., Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development.* 16:1587-1609.

Schmidt, A., Schmelzle, T & Hall N. 2002. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology.* 45: 1433-1441.

Seiler, S., Plamann M. 2003. The Genetic Basis of Cellular Morphogenesis in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell.* 14: 4352-4364.

Shimada, Y., M.P., Gulli & 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., Wiget, P., Gulli, MP., Bi, E & Peter M. 2004. The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *The EMBO Journal.* 23: 1051-1062.

Shiu, P.K., Zickler, D., Raju N. B., Robert-Ruprich and Metzenberg, R.L. 2006. SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNAPolymerase. *The National Academy of Sciences of the USA (PNAS)*. 103(7): 2243-2248.

Slaughter, B., Smith, S and Li, R. 2009. Symmetry Breaking in the Life Cycle of the Budding Yeast. *Cold Spring Harb Perspect*. 1:a003384.

Smith, G., Givan, S., Cuellen, P., Sprague Jr. 2002. GTPase-Activating Proteins for Cdc42. *Eukariotic Cell* 1.3: 469-480.

St. Germain, G., Summerbell, R. 1996. Identifying Filamentous Fungi. A clinical laboratory handbook. Edit. Star.

Sudbery, P., Court, H. 2007. *Biology of the Fungal Cell, The Mycota VIII*. 2nd Edition. Springer. Berlin.

Tcuk-Sit, S., Manser, E, 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 124: 679-683.

Trinci A. P. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology*. 81(1) 225-236.

Upadhyay, S., Shaw, B. D. 2008. The Role of actin, fimbrin, and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*. 68(3):690-705.

Vaduva, G., Martin, N & Hopper A. 1997. Actin-binding Verprolin Is a Polarity Development Protein Required for the Morphogenesis and Function of the Yeast Actin Cytoskeleton. *J Cell Biol* 139: 1821-1833.

Villar, M. A. 2009. Rga2 es un regulador de las GTPasas de la familia Rho que participa en la morfogénesis y la integridad celular de *Schizosaccharomyces pombe*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense. Madrid.

- Virag, A., S. D. Harris. 2006. The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol. Res.* 110:4-13.
- Virag, A., M.P. Lee, H. Si & S.D. Harris. 2007. Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 66:1579-1596.
- Vogt, N., 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.
- Watanabe, D., Abe, M & Ohya, Y. 2001. Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-b-glucan synthesis. *Yeast.* 18: 943–951.
- Watters, M.K., 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.
- Watters, M.K., Bodersma, M., Johnson, M., Reyes, C., Westrick, E., Lindamood, E. 2011. A screen for *Neurospora* knockout mutants displaying growth rate dependent branch density. *Fungal Biology* 115: 296-301.
- Wennerberg, K., Rossman, K. & J. Der 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science.* 118: 843- 846.
- Wendland, J., Philippsen, P. 2000. Determination of cell polarity in germinated spores and hyphal tips of the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii* requires a rhoGAP homolog. *Journal of Cell Science.* 113: 1611-1621.
- Wendland, J., and P, Philippsen. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple Rho-protein modules in filamentous Ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics.* 157:601-610.
- Zheng, Y., R. Cerione & 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.

Solución de sales de Vogel

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

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

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

1. Solución de elementos traza

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

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
2. Solución de elementos traza g/95ml de agua destilada		
• Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
• Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
• Sulfato de amonio ferroso	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
• Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
• Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
• Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05g
• 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.

2. Solución de biotina

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

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

3. Solución de sales para cruza 2X

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

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

4. Solución de elementos traza

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

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
Solución de elementos traza destilada		g/95ml de agua
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
Sulfato de amonio ferroso	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05g
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.