

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



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

**El papel de la GTPasa BUD-1
en el hongo filamentoso *Neurospora crassa***

Tesis

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

Presenta:

Ana Marión Pérez Chávez

Ensenada, Baja California, México

2014

Tesis defendida por:

Ana Marión Pérez Chávez

y aprobada por el siguiente comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Dra. Rosa R. Mouriño Pérez
Miembro del comité

Dra. Nallely Cano Domínguez
Miembro del comité

Dr. Gilberto Gaxiola Castro
Miembro del comité

Dr. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del posgrado
en Ciencias de la Vida*

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Junio, 2014

Resumen de la tesis de **Ana Marión Pérez Chávez**, 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 GTPasa BUD-1 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de Tesis

Los hongos filamentosos crecen de manera polarizada desde la germinación de una espora hasta la formación de una red de hifas denominada micelio. El proceso está altamente regulado por diversos complejos de proteínas intracelulares que actúan mediante ciclos de señalización para dirigir y ensamblar el material nuevo de membrana y pared celular en los sitios activos de las puntas de las hifas en crecimiento. Se conoce muy poco acerca de las rutas moleculares que originan la morfogénesis fúngica durante el desarrollo de hifas. Sin embargo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han estudiado los mecanismos que regulan el crecimiento polarizado y se sabe que durante la gemación participan proteínas del tipo Rho GTPasas y Ras GTPasas las cuales seleccionan el sitio adecuado para la formación de una nueva gema y además mantienen el crecimiento apical en esa zona, específicamente el módulo de la Ras GTPasa Bud1p. En este trabajo se investigó el posible papel de la proteína BUD-1 de *Neurospora crassa* y se encontró que es necesaria para la conidiogénesis y la formación normal de hifas y que sin ella la morfología colonial cambia por completo afectando el crecimiento de hifas aéreas y disminuyendo la producción de biomasa. La búsqueda los complejos que regulan el crecimiento polarizado en hongos modelo como *N. crassa* es de creciente interés por ser un sistema ideal para la investigación de la morfogénesis de hongos filamentosos.

Palabras clave: **Polarización, crecimiento polarizado, morfología apical.**

Abstract of the thesis presented by **Ana Marión Pérez Chávez**, as a partial requirement to obtain the Master in Sciences degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

The Role of BUD-1 GTPase in the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Dr. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

Filamentous fungi grow in a polarized manner from the germination of a spore until the formation of a hyphal colony, known as mycelium. The process is highly regulated by different intracellular protein complexes that act through signaling pathways to direct and assemble the new cell wall and plasma membrane material in the active sites of the growing hyphal tips. Little is known about the molecular pathways that regulate fungal morphogenesis during development of hyphae. However in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the molecular components that regulate the polarized growth have been studied and it is known that during budding, several Rho and Ras GTPases are involved in selecting the appropriate site for bud formation and also maintain apical growth in that area, specifically the Rsr1p/Bud1p GTPase module. In this work the possible role of the BUD-1 protein of *Neurospora crassa* has been investigated and we found that it is required for conidiogenesis and for normal development of vegetative and aerial hyphae. Mutant strain $\Delta bud-1$ shows differences in colonial morphology compared with wild type strain; the lack of this protein affects the growth of aerial hyphal and diminishes the biomass production. The search for complexes that regulate polarized growth in a model system like *Neurospora crassa* is of increasing interest for being an ideal system to investigating the morphogenesis of filamentous fungi.

Key words: Polarization, polarized growth, apical morphology.

*Esta tesis va dedicada a todos aquellos que nunca
dejaron de creer en mí.*

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los dos años de estudio sin la cual no hubiera sido posible la realización de esta Maestría. Gracias al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Microbiología por abrirme las puertas de esta gran Institución así como de brindarme todo el apoyo necesario. Además agradezco enormemente el financiamiento de mi trabajo de tesis por parte del proyecto de ciencia básica SEP-CONACyT CB-2011/169154.

A mi comité de tesis por seguir mi trabajo, por sus consejos y por su apoyo incondicional. A la Dra. Ernestina Castro por acogerme bajo su tutela y hacerme sentir como en casa. A la Dra. Nallely Cano quien fue mi guía y sin ella este trabajo no hubiera sido posible. A la Dra. Rosa Mouriño quien fue un respiro de aire fresco y un apoyo sobre todo psicológico cuando más lo necesité. Al Dr. Gilberto Gaxiola por su disposición y buenos consejos. A la M.C. Olga Callejas quien me ayudó sin dudarle cuando lo necesité y aunque ella no perteneciera a mi comité de tesis.

A mis amigos y compañeros en el posgrado especialmente a Serch, Katrin y Eddy que sin sus consejos mi trabajo no sería tan valioso. A Marisol quien fue mi compañera en el ruedo tanto laboral como personal. A Fausto quien me ayudó en mi trabajo como si fuera el suyo cuando más lo necesité. A mis compañeros de mesa Isa, Leo, Juanpy quienes siempre estuvieron al pendiente así como a Celia y Maricela que facilitaron muchísimo mi trabajo.

También gracias a la Dr. Rufina Hernández porque fue más que una asesora y sus consejos siempre los tendré en mente. Gracias a mis amigos del alma Paty, Diego, Lisset, Ivonne, Ricardo y Sergio porque jamás dejaron de creer en mis capacidades científicas, siempre supieron escucharme y estuvieron siempre cuando lo necesité, incluso aun cuando no sabía que los necesitaba.

A mi familia que siempre estuvo al pendiente, a mi nana, mis tíos y a mi papá, les doy las gracias más sinceras por haber mostrado interés en mi trabajo y en mi vida. Y el último agradecimiento pero más especial de todos, a mi mamá quien fue un ángel durante todo este tiempo y lo sigue siendo, agradezco tanto su comprensión, y que siempre me puso primero sobre todas las cosas, no hay manera humana de pagarle todo su apoyo.

Contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1. GTPasas del tipo Ras.....	3
2.2. Módulo Bud1p GTPasa.....	5
2.3. <i>Neurospora crassa</i> como organismo modelo.....	9
2.4. Regulación de la polaridad en <i>Neurospora crassa</i>	12
Capítulo 3. Hipótesis	13
Capítulo 4. Justificación	14
Capítulo 5. Objetivos	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos particulares.....	15
Capítulo 6. Materiales y Métodos	16
6.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	16
6.2. Medios de cultivo.....	15
6.3. Extracción de DNA.....	17
6.3.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	17
6.3.2. Extracción de DNA genómico de <i>Neurospora crassa</i>	18
6.4. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.....	19
6.5. Identificación de BUD-1 en el genoma de <i>N. crassa</i> y alineamientos.....	19
6.6. Diseño de oligonucleótidos y amplificación del gen <i>bud-1</i>	20
6.7. Transformación y fusiones génicas.....	22
6.7.1. Vector pCCG::N-GFP.....	23
6.7.2. Vector pMF334.....	24
6.7.3. Digestión del inserto y del vector.....	25
6.7.4. Ligación del inserto y del vector.....	25
6.7.5. Transformación por choque térmico en <i>E. coli</i>	25
6.7.6. Selección y análisis de las transformantes de <i>E. coli</i>	26
6.7.7. Transformación por electroporación en <i>N. crassa</i>	26
6.7.8. Selección y análisis de transformantes de <i>N. crassa</i>	27
6.8. Obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta bud-1$	27
6.9. Análisis y caracterización fenotípica de la cepa $\Delta bud-1$	28
6.9.1. Conteo de los conidios.....	28
6.9.2. Morfología colonial.....	29
6.9.3. Morfología microscópica.....	29
6.9.4. Tasa de crecimiento.....	30
6.9.5. Índice de ramificación.....	30
6.9.6. Producción de conidios.....	30
6.9.7. Medición de biomasa.....	31

Contenido (continuación)

	Página
6.9.8. Observación de protoperitecios.....	31
6.9.9. Observación de los tubos de anastomosis (CATs).....	31
6.9.10. Observación de conidióforos.....	32
Capítulo 7. Resultados	33
7.1. El gen <i>bud-1</i> de <i>N. crassa</i> codifica para una proteína con actividad GTPasa y de unión a membrana.....	33
7.2. BUD-1 se localiza en todo el citoplasma y no en un sitio en específico.....	37
7.3. La proteína BUD-1 no es indispensable pero si es requerida durante eventos de polarización celular de <i>Neurospora crassa</i>	43
7.4. La cepa $\Delta bud-1$ genera un micelio laxo, fino y escaso.....	45
7.5. La cepa $\Delta bud-1$ produce menos biomasa debido a una disminución en la ramificación de las hifas y en la producción de conidios.....	50
7.6. El crecimiento y desarrollo de las colonias está retraído en la mutante $\Delta bud-1$	55
7.7. La mutante $\Delta bud-1$ es capaz de producir estructuras sexuales y de producir progenie.....	56
Capítulo 8. Discusiones	58
8.1. BUD-1 se encuentra dispersa en el citoplasma celular durante todo el ciclo de vida de <i>N. crassa</i>	58
8.2. <i>bud-1</i> es necesario para el crecimiento pero no para la viabilidad celular.....	59
8.3. BUD-1 no es necesaria para el proceso de fusión celular.....	61
Conclusiones	63
Lista de referencias	64
Anexos	69

Lista de figuras

Figura		Página
1	Regulación de la actividad GTPasa.....	4
2	Dominios que caracterizan a las proteínas que pertenecen a la familia Ras.....	5
3	Representación esquemática del ciclo de activación/inactivación de Bud1p GTPasa y regulación del establecimiento de la polaridad hacia un sitio específico.....	6
4	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	10
5	Vector pCCG::N-GFP.....	23
6	Vector pMF334.....	24
7	Alineamiento proteico entre YGR152C y NCU02167.7.....	34
8	Dominios estructurales de NCU02167.7.....	35
9	Alineamiento de proteínas Ras-like GTPasa en hongos filamentosos.....	37
10	Amplificación del gen <i>bud-1</i>	38
11	Digestión del producto de PCR que corresponde a <i>bud-1</i> y del plásmido pCCG::N-GFP.....	38
12	Digestión del producto de PCR que corresponde a <i>bud-1</i> y del plásmido pMF334.....	38
13	Construcción del plásmido pNC::N-GFP- <i>bud-1</i>	39
14	Construcción del plásmido pRFP-N- <i>bud-1</i>	39
15	Comprobación de la construcción del plásmido pNC::N-GFP- <i>bud-1</i> ..	40
16	Comprobación de la construcción del plásmido pRFP-N- <i>bud-1</i>	40
17	Localización de la proteína GFP-BUD1 y RFP-BUD1 en diferentes estadios de <i>N. crassa</i>	41
18	Localización de la proteína BUD-1 en un hifas maduras de <i>N. crassa</i>	42
19	Distribución de la proteína GFP-BUD-1 durante la fusión de dos hifas de <i>N. crassa</i>	43
20	Comprobación de la cepa homocariote de $\Delta bud-1$ mediante amplificaciones por PCR.....	44
21	Morfología colonial.....	46
22	Morfología del borde de las colonias.....	47
23	Tinción con FM4-64.....	48
24	Tinción con calcofluor 0.1 M.....	48
25	Medición del diámetro de hifas.....	49
26	Índice de ramificación.....	50
27	Fusión celular entre hifas durante el crecimiento vegetativo.....	51
28	Formación de CATs entre germínulas.....	52
29	Cuantificación de esporas.....	53
30	Morfología de los conidióforos.....	53
31	Producción de biomasa.....	54
32	Tasa de elongación micelial.....	55
33	Protoperitecios.....	57
34	Peritecios.....	57

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas de <i>Neurospora crassa</i> utilizadas.....	17
2	Secuencias diseñadas en este estudio.....	21
3	Condiciones de PCR para amplificar el gen <i>bud-1</i>	22
4	Dominios identificados en la secuencia NCU02167.7.....	36

Capítulo 1. Introducción

En *Neurospora crassa* y muchos otros hongos filamentosos, la sobrevivencia y dispersión de las especies se logra principalmente mediante la generación de esporas; y la diversidad de estos organismos se refleja directamente en la variedad de esporas que son capaces de producir (d'Enfert, 1997). Las esporas o conidios germinarán con la finalidad de proliferar y dar formación a una colonia o micelio, únicamente cuando encuentren las condiciones adecuadas para establecerse en un sustrato.

Para poder crecer, una célula atraviesa desde un estado simétrico a un estado asimétrico. En el caso de los hongos filamentosos el crecimiento va desde la espora, que corresponde al estado simétrico hasta la polarización de una célula tubular o hifa, el cual corresponde a un patrón asimétrico. Un patrón asimétrico es solamente el resultado de la activación de mecanismos de señalización altamente conservados causados por señales externas o internas.

Por lo general, los organismos del reino Fungi poseen mecanismos de tigmotropismo muy parecidos a los de las plantas, los cuales consisten en la capacidad de orientar su crecimiento vegetativo en torno al reconocimiento de una superficie mediante el contacto íntimo con la misma. De esta manera, los hongos recolectan una gran cantidad de información vectorial que puede ser traducida en señales activadoras de mecanismos biológicos que inducen procesos internos de señalización en cascada, en las cuales participan un sinnúmero de proteínas que finalmente regulan el crecimiento polarizado (Brand & Gow, 2012). Los principios moleculares que subyacen el desarrollo de la polaridad celular están muy conservados no solo en los hongos, si no entre muchos organismos eucariotas, incluyendo mamíferos (Cabib et al, 1998).

La polarización pareciera ser un proceso sencillo, pero en realidad es un sistema complejo y dinámico que principalmente involucra el ciclamiento de la membrana y la pared celular, la polarización del citoesqueleto de actina y un gradiente de Ca^{2+} enfocado en la punta. Estos componentes esenciales están interconectados, coordinados y regulados por una extensiva red de rutas de señalización que involucran

iones de calcio, fosfolípidos, proteínas GTPasas, especies reactivas del oxígeno, proteínas cinasas, entre otros (Cole & Fowler, 2006).

Se cree que el establecimiento de la polaridad requiere la especificación de sitios por marcadores corticales, seguido del reclutamiento y mantenimiento de la maquinaria morfogenética para la deposición localizada de pared celular (Harris & Momany, 2004). La información posicional del eje de polarización es transmitida por los módulos de señalización de proteínas GTPasas del tipo Ras y Rho hacia el citoesqueleto de actina y finalmente la organización del mismo y del aparato secretor hacia el ápice en crecimiento (Gulli & Peter, 2001).

Es así que es posible que los sitios de emergencia de las hifas durante el proceso de germinación de las esporas en hongos filamentosos, sean especificados por proteínas que funcionan como señales corticales, quienes responden a feromonas u otras moléculas (Harris & Momany, 2004). En principio, la especificación de ese eje de polaridad implica el marcaje de un sitio cortical que será distinto de todos los otros sitios de la superficie celular y se cree que este marcaje es el primer indicador de la maquinaria de polarización que va encabezado por la GTPasa Cdc42 (Momany, 2002); sin embargo la manera en que se lleva a cabo esta señalización y las moléculas involucradas en el proceso, en particular en *N. crassa*, aún no se conocen completamente.

Capítulo 2. Antecedentes

En muchas células eucariotas Cdc42, un miembro de la familia de las GTPasas Rho, ha sido identificado como un componente clave en la polarización celular debido a que coordina muchos procesos celulares como: la motilidad, la morfología, la diferenciación y la proliferación (Etienne-Manneville, 2004). Cdc42 y otras Rho a menudo funcionan en cascada río abajo de una Ras GTPasa. En general todas las proteínas de esta naturaleza se clasifican dentro de la superfamilia Ras y son activadas a través de diversos estímulos extracelulares, controlando una diversidad de intermediarios citoplasmáticos en cascadas de señalización y funciones celulares (Zhang & Du, 2009).

2.1. Las GTPasas del tipo Ras

La superfamilia Ras se divide en cinco ramas principales en base a su secuencia y similaridad funcional: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf. Estas proteínas se caracterizan por su pequeño peso molecular ~20 kDa y funcionan como moduladores de la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación, la organización de actina, el tráfico vesicular, y la expresión génica (Mitin et al, 2005) y lo hacen mediante el control de redes de señalización importantes para la regulación de dichos procesos (Colicelli, 2004; Wennenberg et al, 2005).

Todas las proteínas Guanosin-Trifosfatasa (GTPasas) se comportan como *switches* o interruptores moleculares debido a que su actividad recae en la capacidad de transitar desde un estado activo (cuando está unida a GTP) a uno inactivo (cuando está unida a GDP) en un patrón cíclico (Takai et al, 2001). Su actividad se regula por otras proteínas como son los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), los cuales influyen en la disociación de GDP y por las proteínas de activación de GTPasas (GAPs por sus siglas en inglés), que controlan la velocidad de hidrólisis de GTP: (Cabib et al, 1998). Otros de los factores reguladores son los inhibidores de la

disociación de nucleótidos de guanina (GDIs por sus siglas en inglés), quienes impiden la disociación del estado GDP de la GTPasa y el enlace a la membrana con el fin de prevenir la autoactivación (Park et al, 2010) (Figura 1).

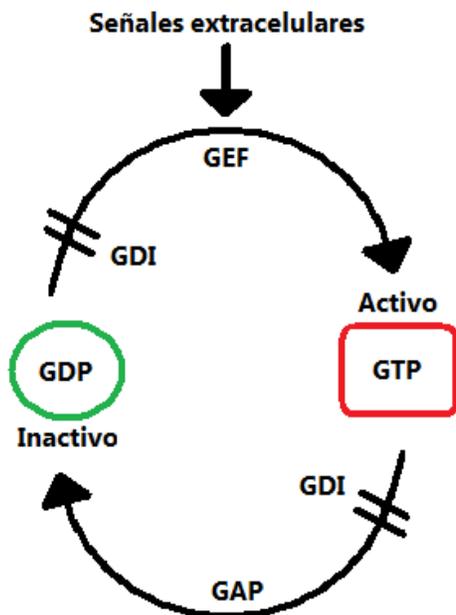


Figura 1. Regulación de la actividad GTPasa. Las GTPasas ciclan entre una conformación inactiva (unida a GDP) y una activa (unida a GTP). La activación ocurre en respuesta a señales extracelulares que promueven el intercambio de GDP a GTP catalizado por GEFs. La inactivación del módulo es mediado por GAPs a través de la hidrólisis de GTP. Las GDIs intervienen en el bloqueo del estado en que se encuentran para la correcta función del ciclo (Modificado de Boguski & McCormick, 1993).

Así como otras proteínas G, las pequeñas Ras GTPasas poseen cinco secuencias consenso de aminoácidos que son responsables de la interacción específica con GDP/GTP, se denominan cajas G e inician desde el N-terminal y además tienen una región efectora: la región *switch* o interruptor I (Takai et al, 2001) (Figura 2).

Las proteínas Ras son sintetizadas en el citosol y se asocian al lado interno de la membrana plasmática después de sus modificaciones post-traduccionales como la prenilación, la cual se lleva a cabo en la mayoría de estas proteínas (Santos & Nebreda, 1989). La señal de prenilación se conforma principalmente del motivo CaaX (a = alifático, X = aminoácido terminal) (Figura 2), que dirige la farnesilación de la cisteína y la proteólisis de los tres residuos terminales así como la metilación de la cisteína modificada lipídicamente (Colicelli, 2004). Este procesamiento post-transduccional ocurre en el retículo endoplásmico, y una vez modificada, la proteína migra al aparato de Golgi para finalmente ser transportada a la membrana plasmática (Michaelson et al, 2002). Las GTPasas completamente procesadas carecen de los últimos tres

aminoácidos y en el C-terminal poseen una cisteína carboximetilada, unida al lípido farnesilo. Otros miembros de la familia Ras tienen un grupo geranilgeranil en lugar del grupo farnesilo, en combinación con una región polibásica cercana o una cisteína palmitoilada cercana (Bos, 2000).

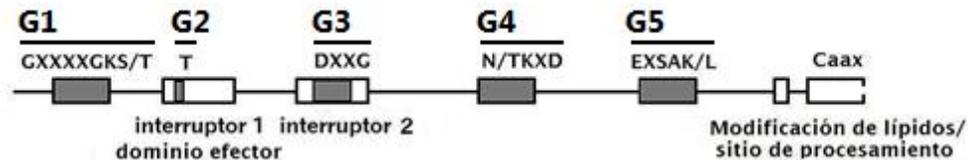


Figura 2. Dominios que caracterizan a las proteínas que pertenecen a la familia Ras. Las cinco regiones conservadas involucradas en el enlace a nucleótidos de guanina se enumeran como cajas G del 1 al 5 y se indican con cajas grises. La región del interruptor 1 es en donde se encuentra el dominio efector y junto con la región del interruptor 2, son regiones que muestran diferencias conformacionales significativas en el estado de enlace a GDP y GTP. El sitio de procesamiento o de modificación lipídica es una caja CaaX (a, alifático; X, cualquier residuo) con una cisteína o una región polibásica cercana al C terminal (Modificado de Bos, 2000).

2.2. Módulo de la GTPasa Bud1p

El proceso de polarización ha sido estudiado principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y una gran cantidad de información ha sido acumulada durante los últimos años.

La polarización y morfogénesis en las levaduras requiere de la regulación temporal y espacial de las interacciones entre distintos efectores que responden a las señales que regulan este proceso. Es así que durante la división celular por gemación en las levaduras, se requiere organizar y orientar a la maquinaria de polarización hacia el lugar donde se originará la célula hija, por lo que se requiere de la selección previa del sitio específico en donde ocurrirá la gemación. Se ha documentado que la posición del sitio de emergencia de la gema, no ocurre de manera azarosa si no que está pre-determinada por señales corticales o *land marks* que especifican el sitio correcto (Pruyne & Bretscher, 2000b). Las proteínas Bud3p, Bud4p y Axl2 determinan el patrón axial de gemación mientras que Bud8p, Bud9p y Rax2p determinan el patrón bipolar (Pringle et al, 1995; Harris & Momany, 2004).

La polarización del citoesqueleto para formar una gema está gobernada por la GTPasa del tipo Ras Bud1p, también denominada Rsr1p, la cual es activada en respuesta a las señales corticales, dependiendo de la naturaleza de la levadura (axial o bipolar). Inicialmente Bud1p se encuentra distribuida de manera uniforme en la membrana plasmática al igual que sus reguladoras Bud5p (GEF) y Bud2p (GAP). Se cree que la función del módulo Bud1p-Bud5p-Bud2p es determinar la localización de una o más proteínas reguladoras de la polaridad celular en el sitio de gemación a través del ciclo GTPasa de Bud1p; la hidrólisis del GTP a GDP otorga un dispositivo regulador para el ensamblaje ordenado del complejo macromolecular de polarización en el sitio de la gemación (Park et al, 1997) y además le permite a la proteína Bud1p coexistir en dos estados activos y asociarse con diferentes partícipes en el sitio de gemación en la membrana y el citosol. En la figura 3 se ilustra como Bud5p y Bud2p, ambas reguladoras de la actividad GTPasa de Bud1p, se asocian a las señales corticales para designar el sitio próximo de la división y contribuyen al control específico espacial de la Bud1p GTPasa (Marston et al, 2001).

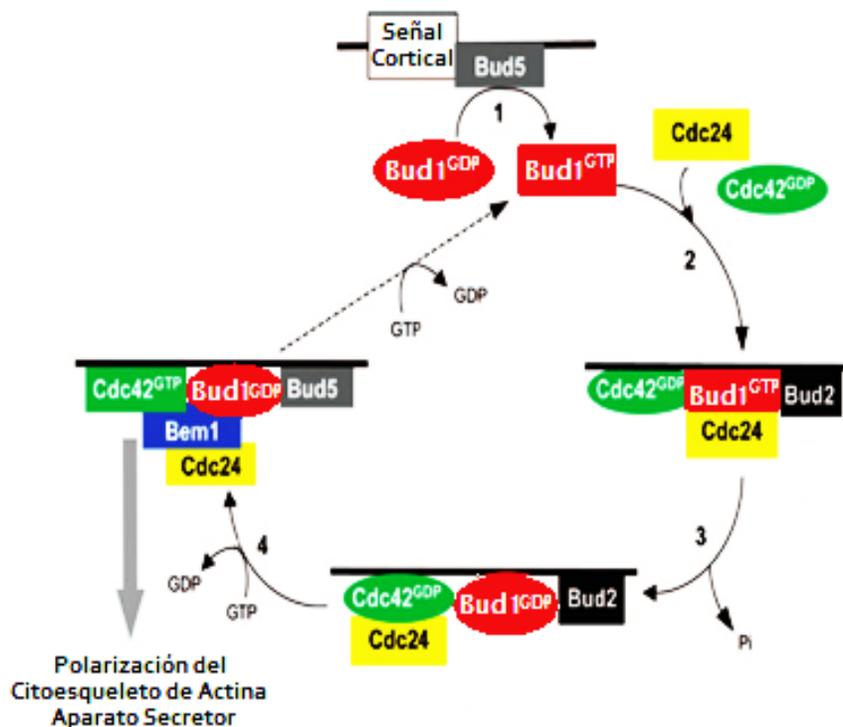


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de activación/inactivación de Bud1p GTPasa y regulación del establecimiento de la polaridad hacia un sitio específico. En el paso 1, Bud5p intercambia GDP por GTP de la Bud1p. En el paso 2, Bud1p-GTP se asocia con Cdc24p y Cdc42p y guía a ambos hacia el sitio de la gema. En el paso 3, Bud2p activa la hidrólisis del enlace GTP de Bud1p. En el paso 4, disociación de Bud1p-GDP que podría activar a Cdc24p, quien es GEF de Cdc42p. Cdc42p-GTP promueve el ensamblaje de la actina y la localización de los componentes del exocisto para establecer un eje de polaridad. Bud5p localizado en el sitio de la gema, podría convertir a Bud1p a su estado unido a GTP permitiendo otro ciclo de transducción de señales (Modificado de Park & Bi, 2007).

Las interacciones de Bud1p-GTP con Cdc24p y Bud1p-GDP con Bem1p son de gran importancia para la regulación de la GTPasa Cdc42p ya que al fallar en la localización de Cdc24p-Cdc42p-Bem1p, este módulo se ve afectado y retraído por su activación tardía o estocástica, lo cual se refleja en el establecimiento irregular y mantenimiento y deficiente de la polarización (Konsminski et al, 2003). Por otro lado, Park y su equipo probaron que aunque la ausencia de este gen no resulta letal para *S. cerevisiae*, la presencia del motivo CaaX y una región de polilisina de Bud1p son componentes necesarios para su localización en la membrana plasmática y su correcta función (Park et al, 2002).

Ashbya gossypii pertenece al orden de los *Saccharomycetales* y está muy cercanamente relacionado a la levadura *S. cerevisiae* mostrando más del 90% de sus genes en homología. Sin embargo, a diferencia de *S. cerevisiae*, este hongo produce principalmente células tubulares o hifas (Dietrich et al, 2004) por lo que se presume que los componentes que generan el crecimiento por gemación en *S. cerevisiae* también participan en la generación de las hifas (Sudbery, 2008). En el 2004 se reportó la existencia de la proteína Bud1p, llamada AgRsr1 en este hongo dimórfico, la cual funciona como un regulador clave de la dirección de las hifas en crecimiento. Bauer y colaboradores observaron que los componentes de este módulo se localizan en la región apical de las hifas y consideran que están involucrados con el proceso de polarización apical del citoesqueleto de actina, un determinante de la dirección del crecimiento. La supresión del gen AgRsr1, trae como consecuencia que las hifas inicien su crecimiento presentando un diámetro constante en un corto tramo de la hifa, pero en tiempos posteriores se detiene desviando los ejes de polaridad y ocasionando que presente diámetros variables, lo que resulta en el cambio de la forma de la hifa (la cual generalmente presenta una forma de tubo) a una forma de “zig-zag”. Además, el proceso de ramificación lateral se inicia, pero estas ramas no logran emerger, lo que resulta en la formación de bultos o engrosamientos. Por lo tanto se concluyó que AgRsr1 dirige la selección del sitio de ramificación (Bauer et al, 2004).

Hausauer y colaboradores (2005) reportaron que Rsr1p (Bud1p) se localiza a lo largo de la corteza del estado levaduriforme del patógeno dimórfico *Candida albicans*, así como en alta concentración en el sitio presuntivo de la gema. Asimismo Bud1p se encontró en la periferia de los tubos germinales y en los septos de las hifas durante el estado filamentoso. En ausencia de la proteína Bud1p, el crecimiento polarizado se lograba establecer y mantener, pero la trayectoria de las hifas no presentó el patrón observado en las hifas que si expresaban Bud1p. Estos defectos se asociaron a la localización anormal de los parches de actina de polarización, la localización inestable del polarisoma en la punta de la hifa y la pérdida de la localización habitual del anillo de septinas. Con estos resultados, se concluyó que Bud1p participa en la delimitación del sitio de crecimiento y en el establecimiento de los ejes de polaridad primaria y además puede ser un mediador de señales extracelulares durante los procesos de invasión. Además se observó que las mutantes exhiben baja virulencia con respecto a las cepas

silvestres por lo que también se concluyó que el módulo Bud1p-Bud2p-Bud5p, está involucrado en los procesos de invasión y de infección (Hausauer et al, 2005)

2.3. *Neurospora crassa* como organismo modelo

Neurospora crassa es un hongo filamentoso que actualmente se ha utilizado como organismo modelo para el estudio de la morfogénesis celular, lo cual nos proporciona un mejor entendimiento de este mecanismo en otros hongos filamentosos. Este conocimiento es de gran importancia debido a que los procesos que regulan el crecimiento y la morfogénesis, se encuentran altamente conservados en varios grupos de hongos patógenos y en algunos otros hongos utilizados en procesos industriales tales como la producción de enzimas y metabolitos secundarios (Hynes, 2003).

El ciclo vital de *N. crassa* comprende un ciclo asexual y uno sexual (Figura 4). El primer ciclo inicia cuando una conidiospora rompe su estado de latencia permitiendo que emerja el tubo germinal, el cual se extiende dando origen a las hifas y finalmente al micelio. Las hifas de *N. crassa* crecen por extensión apical y se requiere presión de turgencia para un crecimiento normal y rápido. El material de la pared y la membrana celular, son adicionados a la punta a través de vesículas de secreción que pueden contener materiales como de β -glucanos, quitina, poligalactosamina y proteínas (Davis, 2000).

Durante las etapas iniciales del establecimiento de una colonia, los conidios de *N. crassa* producen unas estructuras especializadas para la fusión celular denominadas tubos de anastomosis (CATs por sus siglas en inglés), los cuales permiten una conexión entre los conidios, lo que favorece el paso de nutrientes y núcleos. Esta estrategia les permite el flujo de citoplasma y organelos, incluyendo vacuolas y mitocondrias (Roca et al, 2003). Posteriormente las hifas crecen, forman septos y también se fusionan, pero solamente lo realizan en la parte interna de la colonia y no en la periferia (Hickey et al, 2002). Algunas hifas crecen hacia arriba y se denominan “hifas aéreas”, éstas dan origen a los macroconidios, que son células elipsoidales con varios núcleos y que provienen de la constricción de las hifas aéreas. (Carlile et al, 2001). Cuando maduran las esporas, desarrollan un pigmento carotenoide

de color naranja intenso que se asocia al crecimiento en la presencia de luz y estrés oxidativo. Además se producen microconidios miniatura que son uninucleadas y se forman por extrusión directa y serial desde los centros de pequeños conidióforos ramificados (Davis, 2000).

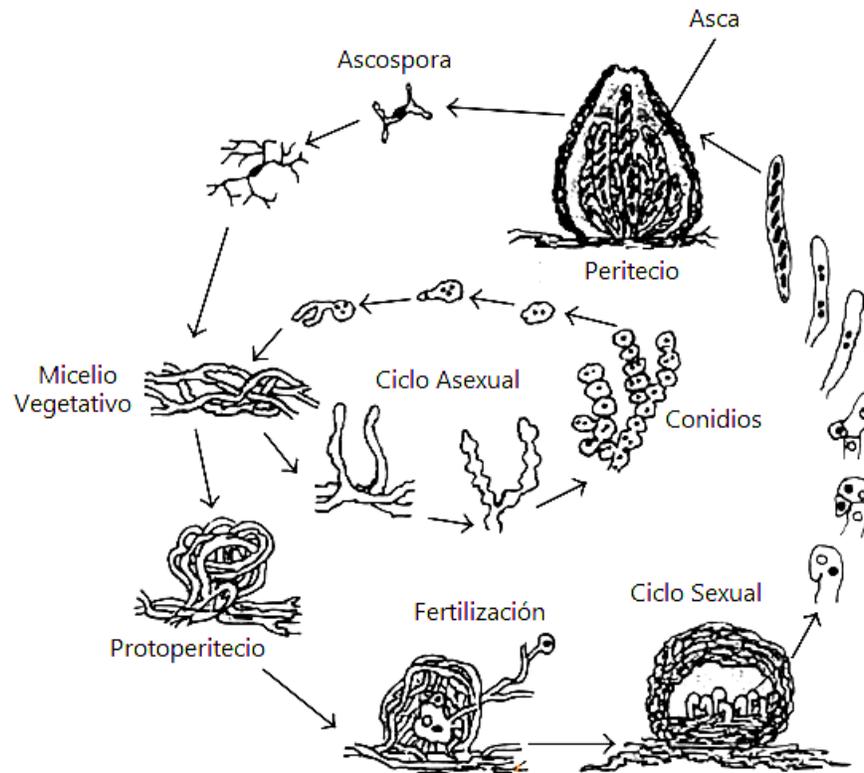


Figura 4. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Dependiendo de las condiciones ambientales, el micelio vegetativo inicia el proceso de esporulación asexual (macroconidiación y microconidiación). En condiciones de limitación de la fuente de Nitrógeno, *N. crassa* puede entrar al ciclo sexual formando protoperitocios. Tras la fecundación, inician el desarrollo que lleva a la producción de ascosporas derivadas de la meiosis (modificado de openi.nlm.nih.gov).

Para que ocurra el ciclo sexual, se requiere que ambas cepas parentales sean de diferente tipo de apareamiento (*mat A* y *mat a*); una cepa puede presentarse como femenina al formar un ascogonio (gameto femenino) y la contraparte masculina presentará un espermacio o conidio de fertilización (gameto masculino) (Deacon, 2006). En condiciones de limitación de nitrógeno y a temperaturas menores de 30 °C, se induce la formación del ascogonio, el cual en etapas posteriores se envuelve por un

conjunto de hifas, las cuales se fusionan entre ellas y generan una estructura esférica denominada “protoperitecio”. A partir del protoperitecio, surge una hifa modificada denominada “hifa tricógina” que busca al conidio o gameto masculino. Cuando la hifa tricógina lo reconoce, el núcleo que procede del conidio migra hacia el interior del protoperitecio. El protoperitecio fertilizado, madura y se melaniza, dando origen al “peritecio”. Durante el proceso de maduración del peritecio, en el interior de éste, los núcleos de ambos tipos de apareamiento se dividen dentro de una hifa ascógena dicariótica diferenciando un *crozier*, donde ocurre la fusión nuclear o cariogamia (Kavanagh, 2005) y se genera el único estado diploide del ciclo vital. Inmediatamente después de dos divisiones meióticas dentro del asca inmadura, cada uno de los cuatro productos se somete a una división mitótica lo que resulta en ocho núcleos encerrados por paredes rígidas melanizadas dando origen a las ascosporas (Davis, 2000).

Este hongo ascomiceto tiene la ventaja de cultivarse en el laboratorio mediante simples requerimientos nutricionales. El medio mínimo de Vogel es el más utilizado y contiene una fuente de azúcar (glucosa o sacarosa), una fuente de nitrógeno (nitrato de amonio y sales de nitrato), fosfato, sulfato, potasio, magnesio, calcio, metales traza y una pequeña cantidad de biotina. *N. crassa* es un aerobio obligado que lleva a cabo su respiración por el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial. Su tasa de crecimiento es relativamente alta, alcanza a crecer de 3 a 5 mm por hora a una temperatura de 25-35 °C, por lo que se piensa que es el crecimiento más veloz entre los hongos (Davis, 2000).

Neurospora crassa ha sido el hongo filamentoso más estudiado desde los 1940's, a partir de que Beadle y Tatum descubrieron la regulación génica de eventos bioquímicos enzimáticos, y formularon el modelo “un gen-una enzima”, evento que establece las bases de la bioquímica genética (Beadle & Tatum, 1941). La existencia de una base de datos del genoma secuenciado de este hongo (Galagan *et al*, 2003), así como sus características biológicas únicas, tales como la generación de mutaciones inducidas por repetición (RIP por sus siglas en inglés), la metilación del DNA, el ritmo circadiano reproductor, entre otros, lo hacen un buen modelo genético para el estudio de procesos conservados que se llevan a cabo en los hongos filamentosos. Además, la elucidación de los mecanismos del crecimiento polarizado, la función proteica, la

expresión y la regulación génica, nos permitirá determinar cuáles características de los hongos filamentosos se conservan en otros organismos no fúngicos y cuales son únicas de este reino.

2.4. Regulación de la polaridad en *Neurospora crassa*

El crecimiento polarizado en *N. crassa* resulta de la extensión unidireccional de las hifas para formar el micelio. Así como otros hongos filamentosos, posee un citoesqueleto de actina que soporta la morfología celular polarizada y un aparato secretor altamente dinámico. Las hifas se extienden apicalmente mediante la secreción de vesículas a través de los microtúbulos y proteínas motoras. Estas vesículas las provee un *centro suministrador de vesículas* llamado Spitzenkörper (Girbardt, 1957; Bartnicki-Garcia, 2002).

La GTPasa CDC-42 es un componente esencial en la morfogénesis de los hongos y en particular, en la polarización celular. En *N. crassa* tanto CDC-42 como la GTPasa RAC, son reguladas por la proteína GEF CDC-24 (Araujo-Palomares *et al*, 2011). BEM-1 forma parte de esta maquinaria de polarización y aunque no es una proteína esencial, es necesaria para la estabilización del complejo GTPasa-GEF (Schürg *et al*, 2012). En *S. cerevisiae*, Bem1p (ortólogo de BEM-1) se localiza en sitios de crecimiento polarizado en donde su interacción con Cdc24p y Cdc42p es indispensable para la regulación de estas (Butty *et al*, 2002); así mismo, Bem1p y Cdc24p son guiadas al sitio de crecimiento gracias a la actividad de Bud1p, quien a su vez es regulada por Bud2p y Bud5p (Park & Bi, 2007). Teniendo estos antecedentes, es necesario determinar si la proteína BUD-1 lleva a cabo un papel importante durante la polarización del hongo *N. crassa*.

Capítulo 3. Hipótesis

La proteína BUD-1 está presente en sitios de crecimiento apical del hongo filamentoso *Neurospora crassa* y probablemente está involucrada en la regulación del establecimiento y direccionalidad del sitio activo de polarización durante el crecimiento de las hifas.

Capítulo 4. Justificación

Es escaso el conocimiento acerca de los procesos moleculares que originan la morfogénesis fúngica durante el desarrollo de hifas. Se sabe que los mecanismos que rigen estos procesos son muy conservados entre células eucariotas y ya se han encontrado algunas de las proteínas centrales del crecimiento de levaduras en hongos filamentosos, o al menos sus ortólogos. Así pues, es de gran importancia conocer la existencia de los complejos proteicos y sus interacciones que llevan a cabo el establecimiento de la polaridad celular. El entendimiento de este proceso podrá ser de gran utilidad para combatir enfermedades causadas por hongos patógenos de plantas y animales, los cuales en su forma virulenta son de forma filamentosa. Aunado a esto, la información obtenida podrá ser empleada con la finalidad de mejorar las actividades antropológicas que involucran el uso de especies de hongos como la biorremediación de la agricultura y en el mejoramiento de especies económicamente importantes en la biotecnología, entre otras.

Capítulo 5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinación del papel de la proteína BUD-1 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

5.2. Objetivos particulares

Determinación la localización de la proteína GFP-BUD-1 y dsRFP-GFP durante la germinación de esporas de *N. crassa*.

Determinar la dinámica intracelular de la proteína GFP-BUD-1 y dsRFP-GFP en hifas maduras de *N. crassa*.

Determinar el efecto de la ausencia de la proteína BUD-1 mediante la caracterización fenotípica de la cepa $\Delta bud-1$ de *N. crassa*.

Capítulo 6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Neurospora crassa* que se utilizaron se enlistan en la tabla 1. Así mismo, se emplearon células calcio-competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen®).

6.2 Medios de cultivo

Las cepas de *Neurospora crassa* se crecieron en Medio Mínimo de Vogel (MMV) con agar al 1% (Vogel, 1956), y se incubaron a 30 °C para observaciones coloniales y producción de esporas o a 37 °C cuando se analizaron las germínulas. Para los experimentos de producción de biomasa, se sembraron 5×10^7 conidios en MMV sin agar y se mantuvieron en completa oscuridad a 30 °C con una agitación de 200 rpm. Para inducir el crecimiento aislado de las colonias, se sembraron esporas en Medio Fructosa, Glucosa y Sorbosa (FGS) e incubaron a 30 °C. El Medio Sintético para Cruzas (MSC) se utilizó para (Westergaard y Herschel, 1947) para inducir el ciclo sexual incubando los cultivos a temperatura ambiente con luz hasta la producción de peritecios y la expulsión de las ascosporas. Para observar a los protoperitecios, se sembraron esporas en el centro de una caja Petri con Medio Agar-Agua (MAA) durante 4 días a temperatura ambiente y posteriormente, se colocaron cuatro discos de 1 cm² de medio MSC.

Las cepas de *Escherichia coli* se sembraron en Medio Luria-Bertani (LB) con agar al 1.3% y ampicilina 100 μ g/mL para obtener colonias aisladas y sin agar para los cultivos de cada cepa. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión. La lista completa de los medios de cultivo y sus contenidos se especifican en la sección de Anexos.

Tabla 1. Cepas de *Neurospora crassa* utilizadas. Las siglas FGSC corresponden a *Fungal Genetic Stock Center*.

Cepa	Genotipo	Referencia
4200	wt <i>mat a</i>	FGSC
9013/N150	wt <i>mat A</i>	FGSC

11651	$\Delta bud-1::hph^R$ <i>het mat A</i>	FGSC
$\Delta bud-1$	$\Delta bud-1::hph^R$ <i>hom mat a</i>	Presente estudio
9717	<i>his⁻³Δmus-51::bar+</i> <i>mat A</i>	FGSC

6.3. Extracción de DNA

6.3.1. Extracción de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Los plásmidos bacterianos se obtuvieron mediante el método de lisis alcalina que se detalla a continuación: En un tubo de 1.5 ml se colectó 1 ml de un cultivo bacteriano de máximo 12 horas de incubación; se centrifugaron las células durante 3 minutos a 10,000 rpm, se resuspendió el precipitado en el buffer GTE o sacarosa (50mM Tris-Cl pH 8; 10mM EDTA- Na_2 y 25% w/v glucosa) y se agitó en vortex. Rápidamente se agregaron 250 μ l de buffer SDS-NaOH recién preparado (1%SDS; 0.2M NaOH y agua destilada) y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente; luego se agregaron 250 μ l de Acetato de Potasio 3M pH 5.2 y se mezcló por inversión. La solución se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 4 °C durante 8 minutos a 10,000 rpm. Posteriormente se recuperaron 600 μ l del sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 900 μ l de etanol al 95%. Se dejó incubando a -80 °C durante 5 minutos y se centrifugó otros 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el precipitado. La pastilla obtenida en el paso anterior, se lavó con 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó durante 2 minutos a 10,000 rpm. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el precipitado a 50 °C durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendió agua destilada estéril o TE 1X.

6.3.2. Extracción del DNA genómico de *Neurospora crassa*

Se sembraron esporas de *N. crassa* en medio líquido MMV durante 3 días y los cultivos se mantuvieron a 30 °C en completa oscuridad. En condiciones de esterilidad, se recuperó el micelio del medio líquido y se secó lo mejor posible con papel secante.

Después, se colocó dentro de un tubo *falcon*, el cual se congeló con nitrógeno líquido y se dejó liofilizar toda la noche a una presión 0.133 mBar a una temperatura de -50 °C (Liofilizador FreeZone® 2.5 Dry Systems LABCONCO); la extracción del DNA se realizó con el método de extracción con fenol-cloroformo que se describe a continuación: El micelio se trituró manualmente y se colocó en un tubo eppendorf en donde se le agregaron 600 µL del buffer BE y se mezcló con vortex hasta que quedó completamente húmedo; se incubó el micelio a 68 °C. El buffer de extracción (BE) se preparó fresco con 10% de EDTA 0.5M pH 8.0, 2% de SDS (al 10%), 0.01% de DEPC y agua destilada. Pasados 30 minutos de incubación se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperaron 600 µL del sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo. Al sobrenadante se le agregaron 600 µL de una mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico frío (25:24:1) y se mezcló por vortex; se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo en donde se le agregaron 600 µL de isopropanol frío. Se mezcló con vortex y se centrifugó nuevamente. El isopropanol se decantó y la pastilla restante se resuspendió en 300 µL de agua destilada durante una hora de incubación a 68 °C. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo en el cual se le añadieron 800 µL de etanol frío al 96% y 15 µL de cloruro de litio 10 M; se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos para desechar el sobrenadante y se obtuvo un precipitado el cual se lavó con 600 µL de etanol frío al 70%. Se centrifugó durante 2 minutos y se repitió este lavado. Finalmente se dejó evaporar el etanol incubando a 55 °C durante 5 minutos y se resuspendió la pastilla en 40 µL de agua destilada durante 15 minutos adicionales a 55 °C.

Otro método utilizado es el de extracción con acetato de potasio que se basa en el procedimiento anterior, solo que en lugar de utilizar la mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico frío (25:24:1), se utilizó Acetato de Potasio 3 M pH 5.2 y se mezcló suavemente. Se incubó 8 minutos en hielo y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm para recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5ml. Se adicionaron 600 µl de isopropanol y se mezcló suavemente. Se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm y se resuspendió el precipitado en 300 µl de agua destilada calentando a 68 °C

durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo en el cual se le agregaron 800 µl de etanol al 95% y 15 µl de cloruro de litio 10 M, se mezcló y se incubó a 4 °C por 5 minutos. Finalmente se centrifugó 2 minutos para descartar el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a 55 °C por máximo 5 minutos; después se resuspendió en 40 µl de agua destilada a 68 °C.

6.4. Electroforesis en geles de agarosa al 1%

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% en el buffer amortiguador TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 5 mM pH 8.0) con Bromuro de Etidio 10mg/mL (0.1µg/mL) como tinción de revelado. Para determinar el tamaño de los fragmentos analizados, se utilizó como patrón, el marcador de peso molecular de DNA 1 Kb (Promega®) y 1 Kb Plus (Invitrogen™). Los geles se corrieron a 75-95 Volts sumergidos en el buffer TAE 1X durante 30-40 min.

6.5. Identificación de BUD-1 en el genoma de *N. crassa* y alineamientos

Se realizó un análisis *BLAST* (*Basic Local Alingment Search Tool*) en la página del Broad Institute of Harvard and MIT (broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora) con la secuencia primaria de la proteína Bud1p de *Saccharomyces cerevisiae* (nombre estándar Rrs1p y nombre sistemático YGR152C) que se obtuvo de la página *Saccharomyces genome data base* (yeastgenome.org) con la finalidad de encontrar el ortólogo de la proteína BUD-1 en el genoma de *Neurospora crassa*, el cual tiene el número de acceso NCU02167.7 y se le ha nombrado hipotéticamente *krev-1-like*.

Una vez identificada la secuencia proteica que corresponde a BUD-1 de *N. crassa*, se analizó la secuencia primaria en la base de datos del NCBI

(ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), para identificar los dominios estructurales de la proteína.

Así mismo se realizó un alineamiento de la proteína BUD-1 de *N. crassa*, con las secuencias proteicas ortólogas de otros hongos filamentosos como *Podospora anserina* (XP-001907366.1), *Magnaporthe oryzae* (XP-003721031.1), *Aspergillus niger* (XP-001391506.1) y *Aspergillus nidulans* (CBF77002.1) con la finalidad de identificar las semejanzas en los dominios proteicos.

6.6. Diseño de oligonucleótidos y amplificación del gen *bud-1*

A partir de la secuencia de nucleótidos del gen *bud-1*, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el *Open Reading Frame* (marco abierto de lectura). A los dos oligonucleótidos diseñados (*Forward* y *Reverse*), se les adicionaron la secuencia que corresponde al sitio de corte de la enzima *Ascl* en el extremo 5, con el objetivo de clonar el ORF de *bud-1* en el sitio múltiple de clonación del plásmido pCCG::N-GFP (FJA57006 FGSC).

Para probar otra versión del marcaje molecular con otra proteína fluorescente, se diseñaron oligos para clonar el ORF de *bud-1* en el sitio múltiple de clonación del plásmido pMF334 (Pccg-1-tdimerRedN) (DQ250999 FGSC) que porta el gen de la dsRFP, por lo que se les adicionaron la secuencia del sitio de corte de la enzima *SpeI* al oligo *Forward*, y la secuencia del sitio de corte de la enzima *BglII*, al oligo *Reverse*. Adicionalmente se verificó la ausencia de dímeros de timina y las temperaturas de alineamiento para las reacciones de PCR mediante el programa FastPCR® versión 5.4.12.

Tabla 2. Secuencias diseñadas en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Enzima de Restricción	%GC	T _m (°C)
bud-1-Ascl-F	5'-atacaaggcgcgctATG ATGCGCACTTAC-3'	Ascl	54.8	66.4

bud-1-Ascl-R	5'-atacaaggcgcgcaaaTC ACATGATTATGC-3'	Ascl	46.6	62.8
N-Bud1-Spel-F	5'-ggactagtATGATGCGCA CTTACGGATT-3'	SpeI	78	57.3
N-Bud1-BglII-R	5'-ggaagatctTCACATGA TTATGCACTTGTG-3'	BglII	61	58.3
F-5bud-1	5'-CAGCCGGTGGGCTT GAACTCATCTAGG-3'	-	59.3	64.3
R-3bud-1	5'-CGAGGAAGGACAAG AAGAGGGAAGAGG-3'	-	55.6	61.6
bud-1 5R	5'-ATCCACTTAACGT TACTGAAATGGGCTT ATACGAACTGAAGG-3'	-	40	118
bud-1 3F	5'-GCTCCTTCAATATC ATCTTCTGTACACCT TAGTGCCTCACAGC-3'	-	47	126
bud-1 nested F	5'-GCTTGCGCCCAGC TGAAAGCAACG-3'	-	64	82
bud-1 nested R	5'-GGTGGATGGGGAGAAC AGGGCGGTAGACAGG-3'	-	65	102
HphF-pCSN44	5'-GATTTTCAGTAACG TTAAGTGG-3'	-	38.0	49.0
HphR-pCSN44	5'-GACAGAAGATGA TATTGAAGG-3'	-	38	48.1
pMF272 F-2	5'-CAAATCAACACAACAC TAAACCACTTTCACAACC-3'	-	40	61.5
pMF272 R-4	5'-ATCTGGGTCATTTTGGGC ACATAGAGTAATGATAACG-3'	-	50	62
Msb1-XbaF	5'-GCTCTAGAATGTTGC GCCCAACTTT-3'	XbaI	48	59.8
Msb1-PacR	5'-CCTTAATTTAAAGAT CGTGCGGCTG-3'	PacI	44	56.7

Con los oligonucleótidos bud-1-Ascl-F, bud-1-Ascl-R, N-Bud1-Spel-F y N-Bud1-BglII-R se amplificó por PCR el gen *bud-1* a partir del DNA genómico que se extrajo de la cepa silvestre no. 4200 de *N. crassa* (Tabla 1). Se realizó un PCR de gradiente para seleccionar la temperatura de fusión más adecuada para cada par de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se preparó según la recomendación del productor del kit

TaKaRa LA Taq[™] y las condiciones del programa de PCR utilizadas se especifican en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificar el gen *bud-1*

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	3 min
30	94	10 seg
	55-60	30 seg
	72	2 min
1	72	7 min
1	18	∞

Para las amplificaciones posteriores de *bud-1* con *TaKaRa LA Taq*[™], se programó la temperatura de alineamiento (Ta) a 56 °C debido a que esta temperatura resultó ser la ideal para amplificar el *ORF* del gen *bud-1*. El producto de PCR se purificó mediante el kit QIAquick® *Gel Extraction* de QIAgen.

6.7. Transformación y fusiones génicas

Para realizar los etiquetamientos de la proteína BUD-1 con las proteínas GFP y dsRFP, se transformó con los plásmidos a la cepa 9717 de *N. crassa* (Tabla 1). La cepa 9717 tiene la ventaja de ser capaz de integrar DNA exógeno en secuencias homólogas en el genoma de *N. crassa* debido a que ésta cepa carece de del gen *mus-51* lo cual trae como consecuencia que los eventos de integración heteróloga sean menos frecuentes (Ninomiya, et al, 2004).

6.7.1. Vector pCCG::N-GFP

El plásmido pCCG::N-GFP permite la expresión constitutiva de la proteína de interés etiquetada en la parte amino terminal con la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*) en *N. crassa* (Figura 5). Su expresión constitutiva es gracias a que este vector contiene la secuencia del promotor del gen *ccg-1* (antes *grg-1*) (McNally & Free, 1988). El vector contiene el locus de *his-3* para la orientación de genes y para la integración de la construcción por recombinación homóloga en dicho *locus* (Honda & Selker, 2009).

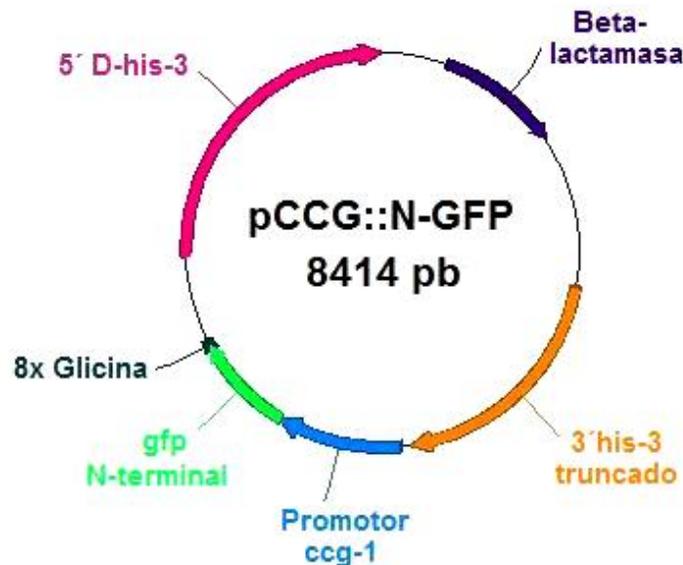


Figura 5. Vector pCCG::N-GFP. El plásmido para el etiquetamiento de las proteínas en su parte N- terminal con GFP, contiene el promotor *ccg-1* de *N. crassa* en un sitio río arriba del gen *gfp*. Enseguida del gen *gfp*, se encuentra una secuencia corta que corresponde a una bisagra de 8 glicinas. Después de esta región, se encuentra el sitio múltiple de clonación. El vector también posee el gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; una región $5'\Delta$ -*his-3*, y el alelo $3'$ -*his-3* truncado (flanco río abajo del gen *his-3*) de *N. crassa* para la integración de la construcción en el *locus* (Honda & Selker, 2009).

6.7.2. Vector pMF334

El plásmido pMF334 expresa la proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein*) en el extremo amino terminal de la proteína de interés (Figura 6). Así mismo

posee el promotor *ccg-1* y el *locus* de *his-3* para la integración por recombinación homóloga de la construcción en dicho *locus* (Freitag & Selker, 2005).

Se utilizaron ambos vectores para el etiquetamiento de BUD-1 con la proteína fluorescente en el N-terminal debido a que el dominio proteico del carboxilo terminal de las proteínas del tipo Ras es de gran importancia por ser un sitio de prenilación y de interacción con la membrana plasmática y otros blancos celulares.

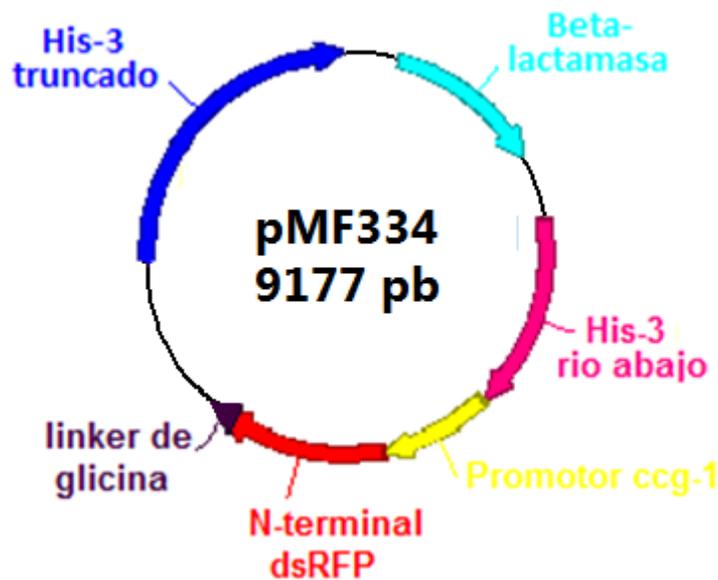


Figura 6. Vector pMF334. El plásmido para la expresión de la proteína RFP citosólica, posee el promotor *ccg-1* de *N. crassa* y posteriormente dos copias del gen *tdimerRed* para el etiquetamiento en el N-terminal de las proteínas de interés. Después de esta región, contiene una secuencia que codifica para 8 glicinas y un sitio múltiple de clonación. Además, el vector contiene el gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina a *E. coli*; un fragmento 5' Δ -*his-3*, y el alelo 3'-*his-3* de *N. crassa* para la integración homóloga del vector construido en el sitio *his-3* en *N. crassa* (Freitag & Selker, 2005).

6.7.3. Digestión del inserto y del vector

Las reacciones de restricción se prepararon en 50 μ L, con el ADN a digerir, las enzimas de restricción correspondientes (10U) y su buffer correspondiente 10X (1X)

(todos los reactivos provenientes de New England BioLabs®), y se aforaron con agua destilada estéril. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 3 horas y transcurrido este tiempo, se adicionó una unidad de enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (Promega®) con el fin de impedir reacciones intramoleculares de ligación en el mismo vector. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 1 hora y posteriormente se inactivó la SAP mediante la incubación de la reacción a 65 °C por 15 minutos.

Las reacciones de digestión se purificaron mediante el kit GenJET™ *PCR Purification* Kit de Thermo Scientific™ siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.7.4. Ligación del inserto y el vector

Se preparó una reacción de ligación con el vector y el inserto purificados para cada transformación. En un tubo de 1.5 mL se colocó 12µL del inserto *bud-1*, 3 µL del vector y 1U de DNA T4 ligasa, 2 µL del buffer T4 ligasa 10X, (Promega®). La reacción se aforó a 20 µL con agua destilada estéril y se incubó a 16 °C toda la noche.

6.7.5. Transformación por choque térmico en *E. coli*

La transformación se realizó en 100 µL de células calcio-competentes DH5α de *Escherichia coli* (Invitrogen®) con 10 µL de la reacción de ligación y 100 µL del buffer KCM 1M (preparado con KCl 100 mM, CaCl₂ 30 mM y MgCl₂ 50 mM). La mezcla se dejó 30 minutos en hielo y se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. Después del choque de calor, las células se transfirieron inmediatamente a 4 °C y posteriormente se incubaron a 37 °C en LB líquido durante 2 horas con agitación a 200 rpm para su recuperación. Pasado el tiempo de incubación, las bacterias se centrifugaron y se desechó el sobrenadante y la pastilla de las células se resuspendió en aproximadamente 100 µL del medio. Esta cantidad se esparció en placas con medio LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche.

6.7.6. Selección y análisis de las transformantes de *E. coli*

Con la finalidad de corroborar la integración de éste plásmido a las células de *E. coli*, se picó con un palillo de madera las colonias resistentes a ampicilina y se colocó en un tubo de borosilicato con 3 ml de LB-ampicilina los cuales se dejaron incubando a 37° C con agitación a 200 rpm toda la noche. Se extrajo el DNA plasmídico mediante el método de extracción por lisis alcalina. El vector fabricado de la ligación de pCCG::N-GFP con el inserto *bud-1* se denominó pNC::N-GFP-*bud-1* y el vector de la ligación de pMF334 con *bud-1* se denominó pdsRFP-*bud-1*. Finalmente se corroboró la presencia del gen *bud-1* en cada vector mediante una reacción de digestión con *Ascl* para pNC::GFP-*bud-1* y *SpeI/BglII* para pdsRFP-*bud-1*.

Adicionalmente se purificó el plásmido pCCG::N-GFP con el kit de extracción QIAprep® *Spin Miniprep* de QIAGEN y se envió a secuenciar a los laboratorios Quimera Biolabs S. de R.L. de C.V. (Ensenada, BC, Méx.). La secuenciación se llevó a cabo con los oligonucleótidos pMF272 F2 y pMF272 R4 que amplifican desde un sitio dentro del fragmento 5'Δ-*his-3* hasta otro sitio dentro del alelo 3'-*his-3* (Tabla 2).

6.7.7. Transformación por electroporación en *N. crassa*

Se colectaron 1.25×10^6 conidios/ml de la cepa de *N. crassa* que se transformó (en un volumen de 40µL), se lavaron con 500 µL de sorbitol 1 M frío, se resuspendieron suavemente y se centrifugaron a 4 °C por 1 minuto a 10,000 rpm. Una vez lavados los conidios, se mezclaron con 300 ng del vector y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se transfirió la mezcla a una celda de electroporación de 0.2 cm. Se colocó la celda en un electroporador (BioRad®) y se aplicó un pulso eléctrico voltaje a 1500 V, capacitancia a 25 µF y resistencia a 600 Ω, durante 14 milisegundos. Inmediatamente se agregaron 960 µL de sorbitol 1M a la celda con los conidios transformados y se mezcló suavemente; la suspensión se vació en un tubo *falcon* con 25 mL de una solución de recuperación preparada con sales de Vogel 50X (2%) y agua

destilada. La mezcla se incubó a 30 °C en agitación a 100 rpm durante 2 horas. Posteriormente se agregaron 25 mL de *Top Agar* y se vació esta mezcla en placas frías con MAC. Los cultivos se incubaron a 30 °C de 3 a 5 días (Colot *et al*, 2006).

6.7.8. Selección y análisis de las transformantes de *N. crassa*

Las transformantes se seleccionaron al azar y se resembraron en tubos de cultivo con MMV sólido para su observación individual. Posteriormente se inoculó cada cepa en placas con MMV sólido y todas se analizaron mediante microscopía confocal durante distintas etapas de desarrollo de las colonias. Para analizar las germínulas y los tubos de anastomosis, se sembraron 8×10^6 conidios por mililitro en una placa de MMV sólido y se esparcieron con perlas de vidrio estériles de 4 mm de diámetro hasta su absorción. Posteriormente se incubaron a 37 °C por cuatro horas. Para analizar las hifas maduras, se sembraron conidios frescos en el centro de la placa sin esparcirlos y se incubaron a 30 °C de 18 a 20 horas.

Se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser FV1000D Spectral Type (invertedMicroscopeIX81) de OLYMPUS® equipado con un objetivo de contraste de fases 60x (PlanApo N 1.42 Oil, Olympus). Para examinar la expresión de la GFP se utilizó un láser de Argon a 488 nm y para visualizar RFP se utilizó el láser a 543 nm.

6.8. Obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta bud-1$

La estrategia utilizada para obtener la cepa mutante homocarión $\Delta bud-1$, fue la de la cruce sexual inducida. En un extremo de una placa con MSC, se sembraron conidios de la cepa silvestre 4200 *mat a* y en el extremo contrario de la misma placa se sembraron conidios de la cepa 11651 *mat A* (Tabla 1). Se dejaron incubando a temperatura ambiente en luz constante durante 6 días, hasta que se observaron peritecios; 10 días después se observaron ascosporas en la tapa de la placa y se

recuperaron con 50 μ L de agua destilada estéril y se colectaron en un tubo estéril de 1.5mL. Se contaron en un hematocitómetro de Neubauer (Cat. No. 1103, China) y se realizó el cálculo para obtener un total de 100 ascosporas. Las ascosporas se activaron aplicando calor de 60 °C durante 30 minutos y posteriormente se sembraron en medio de colonia aislada con 200 μ g/mL de higromicina. Se obtuvieron colonias aisladas resistentes a higromicina y se analizaron individualmente mediante amplificaciones con PCR para comprobar la ausencia del gen *bud-1* y verificar la presencia del gen *hph*.

6.9. Análisis y caracterización fenotípica de la cepa Δ *bud-1*

6.9.1. Conteo de los conidios

Los conidios de la cepa Δ *bud-1* se sembraron en medio MMV sólido y el cultivo se creció durante 3 días a 30° C en oscuridad y 3 días más a temperatura ambiente en periodo circadiano. Se filtró el micelio obtenido con agua fría destilada en condiciones estériles a través de un embudo con tela sintética tipo Magitel®. La suspensión de conidios se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min y se obtuvo un pellet de conidios, el cual se resuspendió en un volumen menor de agua destilada estéril o sorbitol 1 M.

Se contaron los conidios en una cámara de Neubauer (Cat. No. 1103, China) y se preparó un stock con 500,000 conidios /ml de la cepa Δ *bud-1* así como también se obtuvo un stock de la cepa N-150 del mismo tipo de apareamiento (Tabla 1). Por último, se guardaron las diluciones en alícuotas y se guardaron a -80 °C con glicerol al 80% para preservarlas.

6.9.2. Morfología colonial

Para determinar la morfología colonial de la cepa mutante y de la cepa silvestre, se inocularon en el centro de una caja Petri con medio sólido MMV, 5000 conidios (concentrados en un volumen de 10 μ L) de la cepa $\Delta bud-1$ en una caja y de la cepa silvestre N-150 en otra caja como control. Se incubaron a 30 °C y se hicieron observaciones con un el estereoscopio a las 12 y a las 24 para comparar las morfologías coloniales de ambas cepas.

6.9.3. Morfología microscópica

Con la finalidad de observar estructuras membranosas y el Spitzenkörper en hifas maduras, se utilizó el fluoróforo FM4-64 (N-(3-trietilamoniopropil)4-(6-(4-dietilamino) fenil) hexatrienil) piridio dibromuro) que tiene un espectro de Abs/Em 514/670 nm. Se colocaron 10 μ L del colorante a una concentración de 25 μ M (diluido en DMSO) en un cubreobjetos y posteriormente se colocó un bloque invertido de agar con micelio en crecimiento para que las hifas absorban el colorante. Las observaciones se hicieron en un microscopio confocal invertido de escaneo LSM-510 META con láser de Argón/2 Exc/Em 514/670 nm y equipado con un objetivo de inmersión 100X de contraste de fases (A.N. 1.3, Plan Neofluar, Carl Zeiss). También se utilizó la tinción Calcofluor White (Abs/Em 514/670 nm) (American Cyanamid Co.) por tener afinidad a los depósitos de quitina como lo son los septos y la pared celular. Se siguió el mismo método de observación de bloque invertido de agar pero la tinción se utilizó al 0.1% en agua destilada estéril (Hoch *et al.*, 2005). Las observaciones se realizaron mediante el microscopio invertido Axiovert 200 equipado con lámpara de Mercurio y con un objetivo de inmersión 40X de contraste de fases (A.N. 0.60, LD Apochroplan, Carl Zeiss).

6.9.4. Tasa de crecimiento

Para medir la tasa de crecimiento, se inocularon 1000 conidios (concentrados en un volumen de 2 μ L) en la periferia de una caja Petri de 15 cm de diámetro con MMV sólido. Se monitoreó el crecimiento de las cepas cada 6 horas (t1, t2, t3, t4 y t5) a partir de un periodo de 12 horas de incubación a 30 °C (que corresponde al t0 o “tiempo cero”). Se realizaron seis repeticiones del experimento y en cada experimento se contó con triplicados de cada cepa (n=18). Se hizo un análisis estadístico para determinar la velocidad de crecimiento en mm por min.

6.9.5. Índice de ramificación

Con la finalidad de determinar el índice de ramificación, se inocularon 1000 conidios (concentrados en 2 μ L) en la periferia de una caja Petri con medio MMV y se incubaron a 30 °C durante 18 horas. Pasado este tiempo, se contaron las ramificaciones laterales producidas en los últimos 500 μ m 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.

6.9.6. Producción de conidios

Se inocularon 5000 conidios (concentrados en 10 μ L) en tubos de borosilicato con 5 mL de MMV sólido y se dejaron crecer a 30 °C durante 4 días en oscuridad y 3 días en ciclo circadiano a temperatura ambiente. Los conidios se colectaron en 2 mL de agua destilada estéril y se contaron en una cámara de Neubauer. El experimento también se realizó tres veces por triplicado (n=9), y se graficaron los valores promedio de cada cepa.

6.9.7. Medición de la Biomasa

Para calcular la producción de biomasa total, se inocularon 5×10^7 conidios en matraces que contenían 50 mL de MMV líquido y se dejaron incubar a una temperatura de 30° C a 200 rpm. Después de 24 horas, los cultivos se filtraron con filtros de papel cualitativos de 7.5 cm (Cat. No. 28310-026, VWR) previamente esterilizados y tarados. El micelio mojado se pesó en una balanza analítica (modelo 1712 MP8, Sartorius) y posteriormente se dejaron secar en una incubadora a 60 °C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se registró el peso del micelio seco. Las mediciones se realizaron por triplicado y en tres ocasiones (n=9) para el análisis estadístico.

6.9.8. Observación de los protoperitecios

Los protoperitecios son las estructuras sexuales femeninas que contienen al ascogonio y que aún no se encuentran fertilizados. Estas estructuras son una etapa anterior a los peritecios. (Figura 3). Se sabe que la formación de protoperitecios ocurre al tener una privación de nutrientes, principalmente de nitrógeno. Para su observación, se sembraron conidios de la cepa $\Delta bud-1$ en el centro de una caja Petri con MAA y se incubaron a temperatura ambiente con luz ambiental durante 2 días; posteriormente se colocaron pequeños bloques de MSC distribuidos en cinco puntos de la caja para inducir la formación de estas estructuras y a los 6 días se observaron pequeños nudos de micelio con pigmentación más oscura por lo que se procedió a su análisis en el estereomicroscopio.

6.9.9. Observación de los tubos de anastomosis (CATs)

Se analizó la fusión celular mediada por los tubos de anastomosis de conidios o CATs (*Conidial anastomosis tubes*) en la cepa $\Delta bud-1$. Se sembraron 8×10^6 conidios por mililitro en una placa de MMV sólido, se esparcieron con perlas de vidrio estériles de 4 mm de diámetro hasta su absorción y se incubaron a 37 °C. Pasadas 4-5 horas, se observaron en el microscopio invertido.

6.9.10. Observación de los conidióforos

Los conidióforos son estructuras formadas durante la reproducción asexual de *N. crassa* las cuales generan conidios (Figura 3). Se analizaron zonas maduras de la cepa $\Delta bud-1$, muestreando mediante una asada al micelio aéreo y colocándola en una gota de agua destilada estéril con cuidado de no romper las estructuras. Se hicieron observaciones en el microscopio invertido.

Capítulo 7. Resultados

7.1. El gen *bud-1* de *N. crassa* codifica para una proteína con actividad GTPasa y de unión a membrana.

La proteína Bud1p/Rrs1p de *S. cerevisiae* (YGR152C) posee 272 aminoácidos y está descrita como una proteína que pertenece a la superfamilia Ras que se encuentra localizada en la membrana plasmática y se requiere para la selección del sitio de gemación en *S. cerevisiae*, así como para los cambios morfológicos en respuesta a la feromonas de apareamiento y la eficiente fusión celular.

Con la secuencia proteica de Bud1p/Rsr1 de *S. cerevisiae* YGR152C, se realizó un BLAST en la página web del Broad Institute (broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora) contra todo el genoma de *N. crassa* y se obtuvieron 25 secuencias de las cuales, la secuencia NCU02167.7 que lleva por nombre *krev-1-like* presentó el mayor porcentaje de identidad con la secuencia de Bud1p/Rsr1 de *S. cerevisiae* (53%). Posteriormente, se alinearon las secuencias mediante el programa LALIGN en el portal web ExPASy (ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) y se obtuvo un porcentaje de identidad del 54.2% y 168 coincidencias de los aminoácidos (Figura 7).

```

Comparison of:
(A) ./wwwtmp/.31328.1.seq >YGR152C 272 bp                = 272 aa
(B) ./wwwtmp/.31328.2.seq >NCU02167_7 225 bp            = 225 aa
using matrix file: BL50 (15/-5), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

 54.2% identity in 168 aa overlap (2-169:11-177); score: 651 E(10000): 1.3e-58

      10      20      30      40      50      60
YGR152 RDYKLVVLGAGGVGKSCLTIVQFVQGVYLDYDPTIIEDSYRKTIEIDNKVFLEILDITAGI
      .....
NCU021 REFHIVVLGIGGVGKSCLTIAQFVHNEWIESYDEPTIIEDSYRIQVAVDGRQVILEILDITAGT
      20      30      40      50      60      70

      70      80      90     100     110     120
YGR152 AQFTAMRELYIKSGMGFLLVYSVTDRQSLEELMELREQVLRKDSDRVFMVLIGNKADLI
      .....
NCU021 EQFVAMRDLYMKAGQGFLLVFSITISQASLDELATLREEIIRIKDDENIPIVMVGNEKADLL
      80      90     100     110     120     130

      130     140     150     160
YGR152 NERVISVEEGIEVSSKNGRVFFYETSALLRSNVDEVFVLDLVRQIIRNE
      .....
NCU021 DQRAVDRAKAFITISQQWN-APYYEASARTRINVDEVFIDLRCQMLRRD
      140     150     160     170

```

Figura 7. Alineamiento proteico entre YGR152C y NCU02167.7. La secuencia proteica YGR152C corresponde a la proteína Rsr1p de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee 272

aminoácidos; la secuencia proteica NCU02167.7 corresponde a la proteína BUD-1 de *Neurospora crassa*, que posee 225 aminoácidos. Las secuencias se alinearon y compararon utilizando el programa LALIGN en el portal web ExPASy. Se obtuvo 54.2% de identidad y 168 coincidencias de aminoácidos entre ambas proteínas.

Para corroborar la identificación de *bud-1*, se hizo una búsqueda de los dominios estructurales en la base de datos del NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) y se identificaron las siguientes características: un dominio de enlace a GTP/Mg²⁺, un dominio putativo de interacción con GEF, un dominio hipotético de interacción efectora, un dominio putativo de modificación de lípidos (post-traducciona), una región interruptora I y una región interruptora II, las cuales sufren cambios conformacionales al enlazarse a GTP. Así mismo se identificaron 5 cajas G que se relacionan con la actividad GTPasa e hidrólisis: el motivo G1, también conocido como P-loop o motivo Walker A que es específico para el enlace a fosfatos, el motivo G2 que es altamente conservado por su residuo de treonina y se localiza en la región interruptor I que reorienta la función de enlace a GDP o GTP (región efectora), el motivo G3 sobrepuesto con el motivo Walker B o la región interruptor II en el residuo altamente conservado de ácido aspártico y forma enlaces con Mg²⁺ y GTP, el motivo G4 que forma enlaces de hidrógeno con el anillo de guanina confiriendo especificidad con GTP por encima de ATP y provee interacciones estables con los residuos de G1, y por último el motivo G5 que permite asociaciones indirectas con los nucleótidos de guanina y es menos conservado entre los miembros del supergrupo (Colicelli, 2004).

Todos los dominios encontrados son correspondientes al dominio Ras altamente conservado de la proteína Rsr1p de *S. cerevisiae*, por lo que es muy probable que NCU02167.7 se trate de la proteína Ras BUD-1 de *N. crassa* (Figura 8). Los dominios identificados y su localización en la secuencia se resumen en la tabla 4.

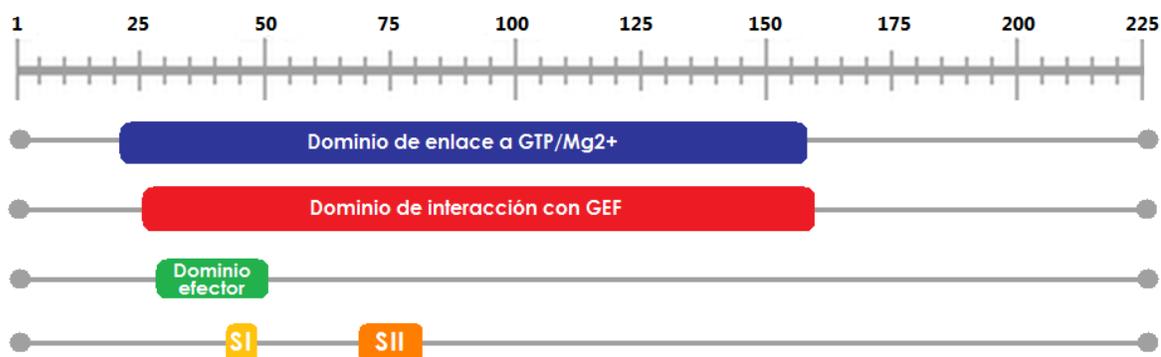


Figura 8. Dominios estructurales de NCU02167.7. Se esquematizan los dominios encontrados en la secuencia proteica de NCU02167.7: Sitio de enlace a GTP/Mg²⁺, sitio de interacción GEF, sitio de interacción efectora e interruptores SI y SII. Todas estas características son específicas del dominio Ras de la proteína Rsr1p de *S. cerevisiae* y se identificaron en la proteína BUD-1 de *N. crassa*.

Tabla 4. Dominios identificados en la secuencia NCU02167.7

Dominios	Aminoácidos	Localización
Dominio de enlace a GTP/Mg ²⁺	GGVGKSC	21-27, 66, 69, 125, 126, 128, 156, 157
Dominio putativo de interacción con GEF	SC	26, 27, 41, 43, 49, 50, 63, 64, 66, 68, 69, 158
Dominio hipotético de interacción efectora	[Q/H]SXDXXIEDSYR	34, 40, 42, 45-50
Región de interruptor I	DPTIED	42-47

Región de interruptor II	AGT[E/D]QFS	68-74, 77-82
G1 (P-loop o Walker A)	GXXXXGK[T/S]	19-26
G2 (Residuo de treonina)	T	44
G3 (Walker B)	DXXG	66-69
G4	[N/T]KXD	125-128
G5	[C/S]A[K/L/T]	156-158
Dominio putativo de modificación de lípidos	CAAX	226-229

Posteriormente, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0 (Copyright© 1997-2007 Tom Hall) se realizó un alineamiento de la secuencia NCU02167.7 de *N. crassa* con otras secuencias hipotéticas ortólogas de BUD-1 en otros hongos filamentosos como *Podospora anserina* (XP-001907366.1), *Magnaporthe oryzae* (XP-003721031.1), *Aspergillus niger* (XP-001391506.1) y *Aspergillus nidulans* (CBF77002.1) y se encontraron todos los dominios en las 5 proteínas y además la región terminal de la caja CaaX que facilita la localización membranal de las proteínas Ras (Figura 9).

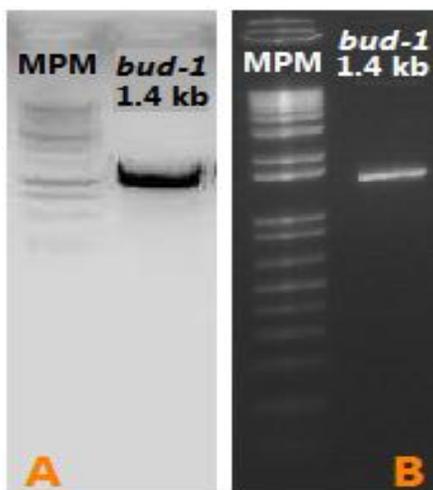


Figura 10. Amplificación del gen *bud-1*. A) Amplificación del gen *bud-1* con los oligos *bud-1-Ascl-F* y *bud-1-Ascl-R* para su clonación en el vector pCCG::N-GFP-*bud-1* B) Amplificación del gen *bud-1* con los oligos N-Bud1-SepI-F y N-Bud1-BgIII-R para su clonación en el vector pMF334

Mediante una reacción de digestión se generaron extremos *Ascl-Ascl* en el inserto amplificado con los oligos *bud-1-Ascl-F* y *bud-1-Ascl-R* y en el vector pCCG::N-GFP. En otra reacción se generaron extremos *SpeI-BgIII* en el inserto amplificado con los oligos N-Bud1-SepI-F y N-Bud1-BgIII-R y para el plásmido pMF334. Todas las reacciones se comprobaron en un gel de agarosa (Figura 11 y 12).

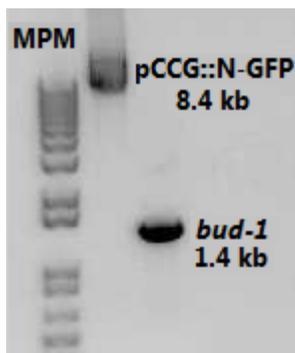


Figura 11. Digestión del producto de PCR que corresponde a *bud-1* y del plásmido pCCG::N-GFP. Se generaron extremos *Ascl-Ascl* en el inserto amplificado con los oligos *bud-1-Ascl-F* y *bud-1-Ascl-R* y en el vector pCCG::N-GFP.

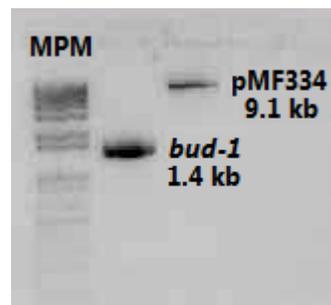


Figura 12. Digestión del producto de PCR que corresponde a *bud-1* y del plásmido pMF334. Se generaron extremos *SpeI-BgIII* en el producto de PCR obtenido con los oligos N-Bud1-*SpeI-F* y N-Bud1-*BgIII-R* y en el plásmido pMF334.

Se prepararon dos ligaciones para la construcción de los plásmidos de clonación, una con el inserto de extremos *Ascl-Ascl* y el plásmido pCCG::N-GFP y otra con el inserto de extremos *SpeI-BglII* y el plásmido pMF334. Se comprobaron las ligaciones en un gel de agarosa; para la ligación del gen *bud-1* y del plásmido pCCG::N-GFP se esperaba un peso de 9.8 kb (Figura 13), mientras que para la ligación de *bud-1* con pMF334 el peso esperado fue de 10.5 kb (Figura 14). Al constructo fabricado con el fragmento y el plásmido pCCG::N::GFP se le nombró pNC::N-GFP-*bud-1* y al constructo con el fragmento y el plásmido pMF334, se denominó pRFP-N-*bud-1*.

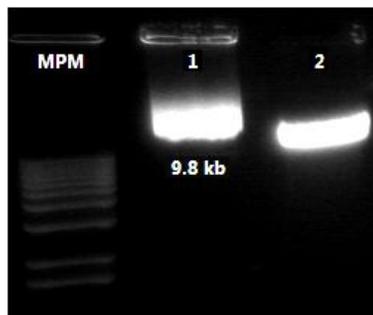


Figura 13. Construcción del plásmido pNC::N-GFP-*bud-1*. 1) Ligación del gen *bud-1* y del plásmido pCCG::N-GFP 2) Linearización del plásmido pNC::N-GFP-*bud-1* con la enzima *NdeI*.

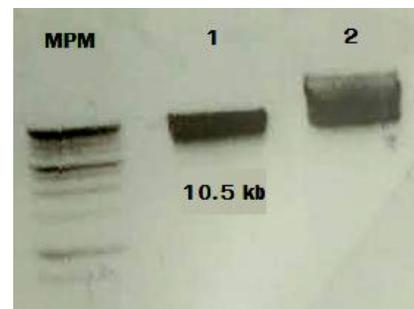


Figura 14. Construcción del plásmido pRFP-N-*bud-1*. 1) Linearización del plásmido pRFP-N-*bud-1* con la enzima *NdeI*. 2) Ligación del gen *bud-1* y del plásmido pMF334

Se verificó la integración del inserto en el plásmido pCCG::N-GFP, mediante una digestión con la enzima *Ascl*. Para el plásmido con la integración correcta, se esperaban bandas de 8.4 kb y 1.4 kb resultantes de la restricción (Figura 15). Posteriormente, el plásmido de la clona pMF334-*bud-1*, se digirió con las enzimas *BglII/SpeI* para liberar el inserto y de esta manera comprobar que el fragmento del ORF de *bud-1* se encontrara clonado en el sitio *BglII/SpeI* del plásmido pMF334. En esta restricción, se esperaba una banda de 9.1 kb y otra de 1.4 kb (Figura 16).

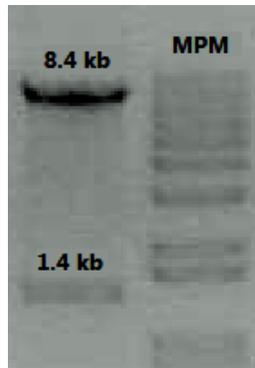


Figura 15. Comprobación de la construcción del plásmido pNC::N-GFP-*bud-1*. Digestión del plásmido con la enzima *Ascl* como verificación de la integración correcta del inserto. La banda de 8.4 kb es la del plásmido pCCG::N-GFP y la banda de 1.4 kb es la del inserto.

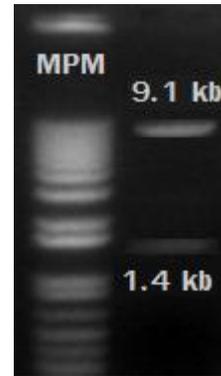


Figura 16. Comprobación de la construcción del plásmido pRFP-N-*bud-1*. Digestión del plásmido con las enzimas *BglII* y *SpeI* como verificación de la fusión con el inserto. La banda de 9.1 kb es del plásmido pMF334 y la banda de 1.4 kb corresponde a la del inserto.

Se transformó con los plásmidos obtenidos a la cepa 9717 de *N. crassa* (Tabla 1), se aislaron las colonias y se crecieron. Posteriormente, se observaron por microscopía confocal. Se analizó la localización intracelular de la proteína GFP-BUD-1 y de la proteína dsRFP-BUD-1. Se siguió el crecimiento desde las etapas tempranas de los conidios, hasta la formación de hifas. En la figura 17 se observa la distribución de la proteína GFP-BUD-1 en un conidio (Fig. 17-A), una germínula (Fig. 17-E) y la formación de una hifa joven (Fig. 17-I). Así mismo se puede observar la distribución de la proteína BUD-1 etiquetada en el N-terminal con la proteína dimérica RFP en un conidio (Fig. 17-C), una germínula (Fig. 17-G) y en una hifa joven (Fig. 17-K). Las imágenes de RFP-BUD-1 muestran mayor definición en la fluorescencia pero no se observa una localización en específico; esto último se presenta de igual manera en las imágenes de GFP-BUD-1, en donde se aprecia la fluorescencia de manera casi homogénea en el citoplasma. En la figura 17-E se observa un parche de fluorescencia en un conidio en germinación el cual desapareció a los pocos segundos. De igual manera se observa un parche en la figura 17-G en un sitio lateral al tubo germinativo pero no logra permanecer más de unos segundos. Peculiarmente se observaron diferencias en las hifas jóvenes de GFP-BUD-1 (Fig. 17-I) y RFP-BUD-1 (Fig. 17-K) ya que la GFP-BUD-1 se desaparecía conforme la hifa crecía y la fluorescencia permanecía de la zona media hacia atrás y nula o escasa en la zona apical. Lo contrario sucedió con RFP-BUD-1 en

donde la fluorescencia se observó con un flujo intracelular muy dinámico y constante en todas las zonas de la hifa joven.

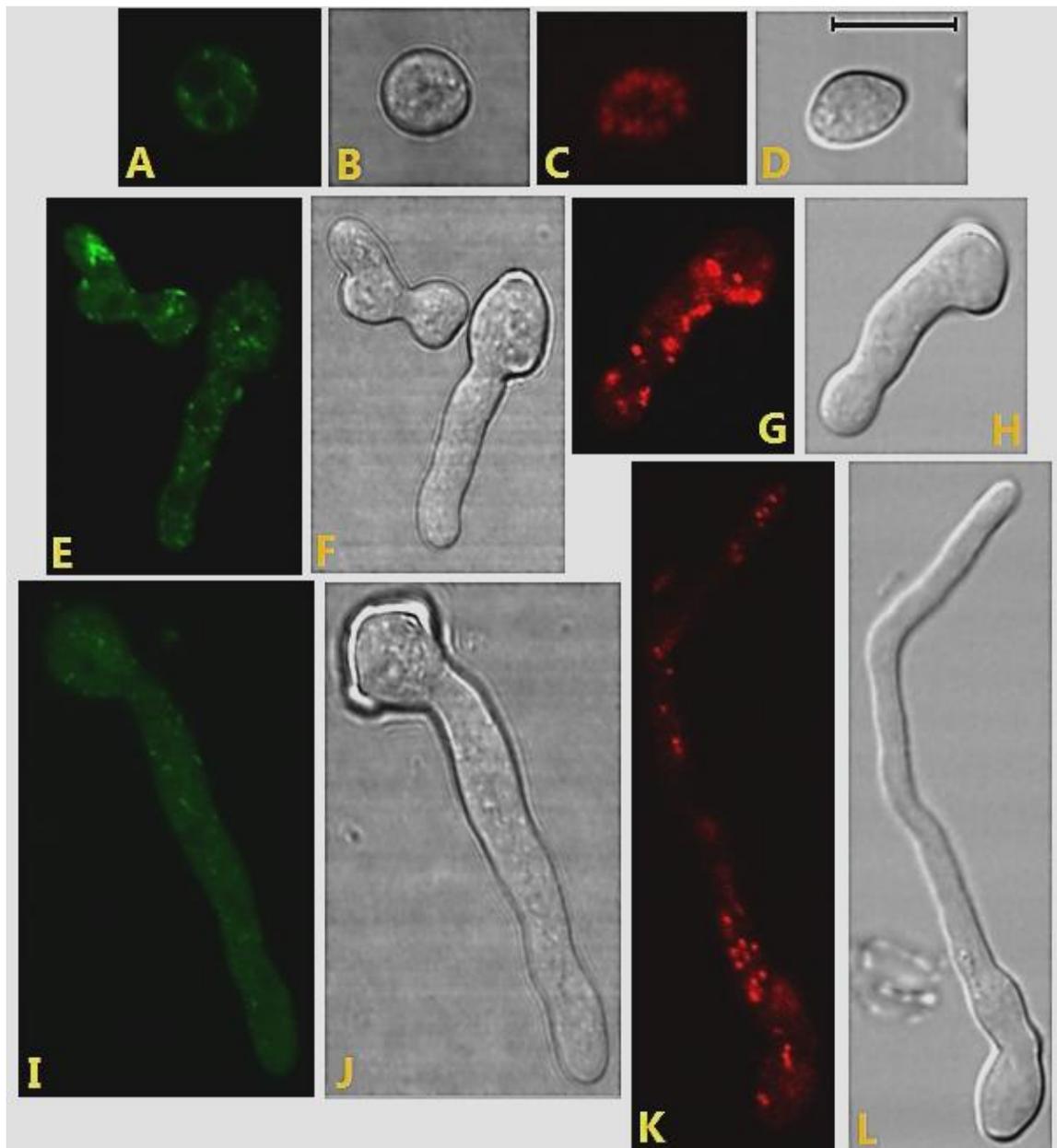


Figura 17. Localización de la proteína GFP-BUD1 y RFP-BUD1 en diferentes estadios de *N. crassa*. (A, E, I) Imágenes de fluorescencia de la localización de GFP-BUD-1. (C, G, K) Imágenes de fluorescencia de la localización de RFP-BUD-1. (B, D, F, H, J, L) Imágenes en contraste de fases. Escala 10 μ m.

Se observaron hifas maduras de GFP-BUD-1 pero no se observó ninguna localización específica de la fluorescencia, se hizo evidente la misma pérdida de la fluorescencia conforme se extendían las células (Figura 18).

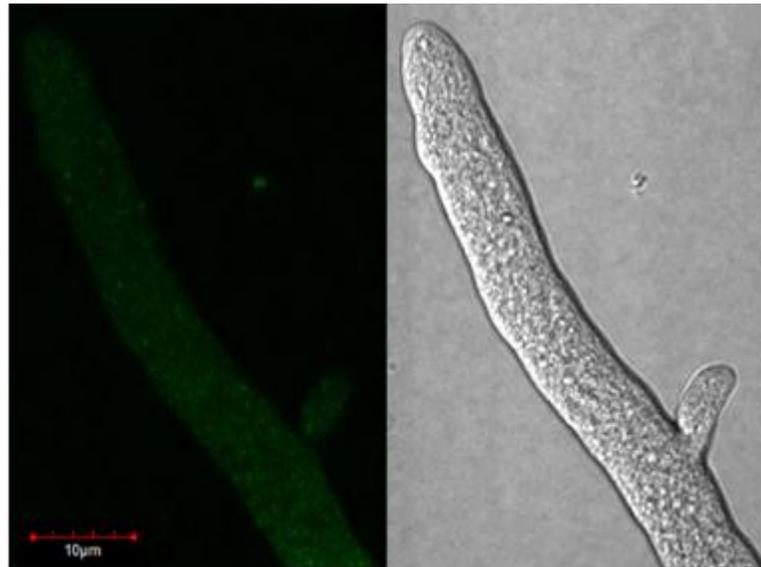


Figura 18. Localización de la proteína BUD-1 en un hifas maduras de *N. crassa*. Proteína GFP-BUD-1 en el canal de fluorescencia y la imagen en contraste de fases.

Por último se observaron los eventos de fusión entre hifas de GFP-BUD-1 y se encontraron muchos puntos de fluorescencia en el citoplasma de ambas hifas, además un alto dinamismo individual intracelular y el intercambio activo de la fluorescencia a través del puente formado entre ellas (Figura 19).

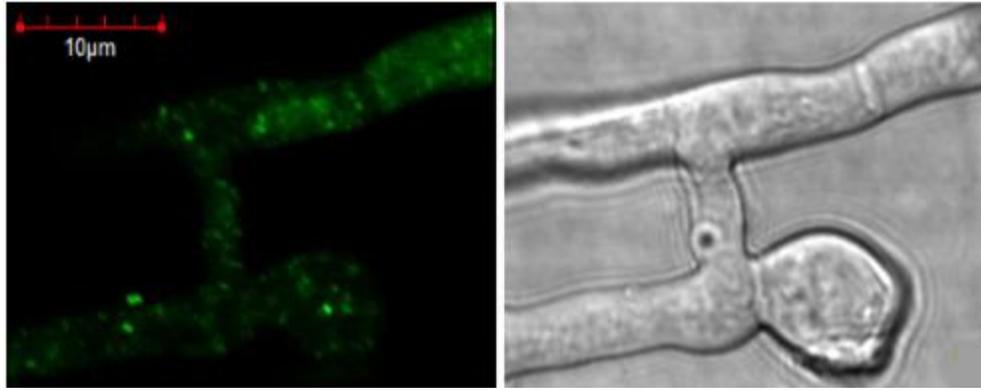


Figura 19. Distribución de la proteína GFP-BUD-1 durante la fusión de dos hifas de *N. crassa*. Imagen de fluorescencia e imagen de contraste de fases.

7.3. La proteína BUD-1 no es indispensable pero si es requerida durante eventos de polarización celular de *Neurospora crassa*.

La función de la proteína GTPasa BUD-1 aún no ha sido caracterizada en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Se sabe por estudios en otros hongos que BUD-1 (Rsr1p/Bud1p) forma parte de un importante complejo de proteínas que es altamente conservado y que se especializa en el crecimiento polarizado sitio-dirigido. Así mismo ha sido concurrente que en la ausencia de esta proteína la morfogénesis de varios hongos se afecta de alguna manera o simplemente disminuye la capacidad de polarizarse.

Para investigar la posible función de BUD-1 en *N. crassa* se obtuvieron mutantes mediante la cruce de la cepa heterocarionte de $\Delta bud-1$ (FGSC #11560 con la silvestre N-150 (Tabla 1) y subsecuente aislamiento de la progenie homocarionte de $\Delta bud-1$. Todas las cepas fueron analizadas en busca de la homocarionte $\Delta bud-1$ para poder realizar la caracterización fenotípica. El análisis se hizo de la siguiente manera: se extrajo el DNA de las cepas aisladas y en cada DNA se amplificó el gen *bud-1* mediante PCR con los oligos bud-1-Ascl-F y bud-1-Ascl-R y el gen *hph* con los oligos HphF-pCSN44 y HphR-pCSN44 (Las condiciones utilizadas se enuncian tabla 3). Se utilizó el

DNA de una cepa heterocarionte $\Delta agm-1$ como control positivo de las amplificaciones para los genes *bud-1* y *hph* (Pérez-Mozqueda, 2013 sin publicar) (Figura 20).

Se logró obtener una cepa homocarionte de $\Delta bud-1$, es decir que únicamente posee núcleos que contienen el reemplazo del gen *bud-1* con el gen *hph* (Figura 20). Con la cepa 7 se realizaron los análisis morfológicos correspondientes.

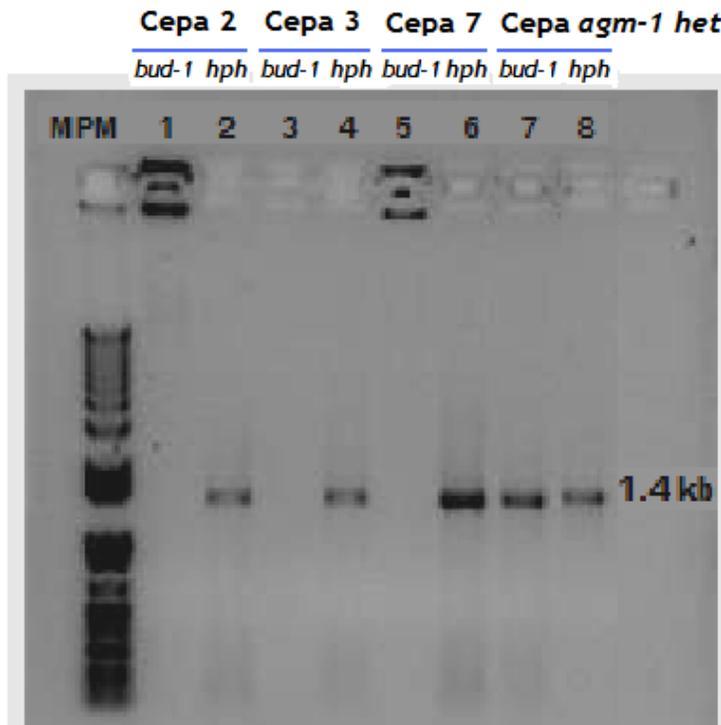


Figura 20. Comprobación de la cepa homocarionte de $\Delta bud-1$ mediante amplificaciones por PCR. 1) ORF de *bud-1* de la cepa #2. 2) Amplificación del gen *hph* de la cepa #2. 3) ORF de *bud-1* de la cepa #3 4) ORF de *hph* de la cepa #3. 5) ORF de *bud-1* de la cepa #7. 6) ORF de *hph* de la cepa #7. 7) ORF de *bud-1* de la cepa *het* $\Delta msb-1$. 8) ORF de *hph* de la cepa *het* $\Delta msb-1$. Ambos pesan 1.4 kb.

7.4. La cepa $\Delta bud-1$ genera un micelio laxo, fino y escaso

Es congruente pensar que la ausencia de un gen trascendente en el proceso de polarización celular como ha demostrado serlo *bud-1* en las levaduras, traería como consecuencia alteraciones morfológicas. En base a las afectaciones que se han observado en otros organismos que carecen de dicho gen, se hicieron observaciones de la cepa $\Delta bud-1$ a nivel macroscópico y microscópico, para determinar el papel de BUD-1 en la morfología del hongo.

En la figura 21 se muestra una comparación de la morfología colonial entre la cepa $\Delta bud-1$ vs la cepa N-150. En el panel superior (24 horas) se observa que la colonia de la cepa silvestre presenta abundantes hifas aéreas en la periferia de la colonia, además que a ese tiempo, el crecimiento es de 7.55cm. En el caso de la colonia que pertenece a la cepa $\Delta bud-1$, se observa que ésta produce micelio aéreo escaso en la periferia. Sin embargo, en el centro de la colonia hay una mayor cantidad de micelio aéreo, a diferencia de la cepa silvestre, además de que esta cepa presentó un crecimiento promedio de 5.20 cm. Pasadas las 36 horas de incubación, se observan las colonias totalmente desarrolladas en donde a parte de la evidente diferencia en el patrón de crecimiento del micelio de la cepa $\Delta bud-1$, este se observa más fino y deficiente del color amarillo-naranja que es característico de *Neurospora crassa*. (Figura 21, panel inferior).

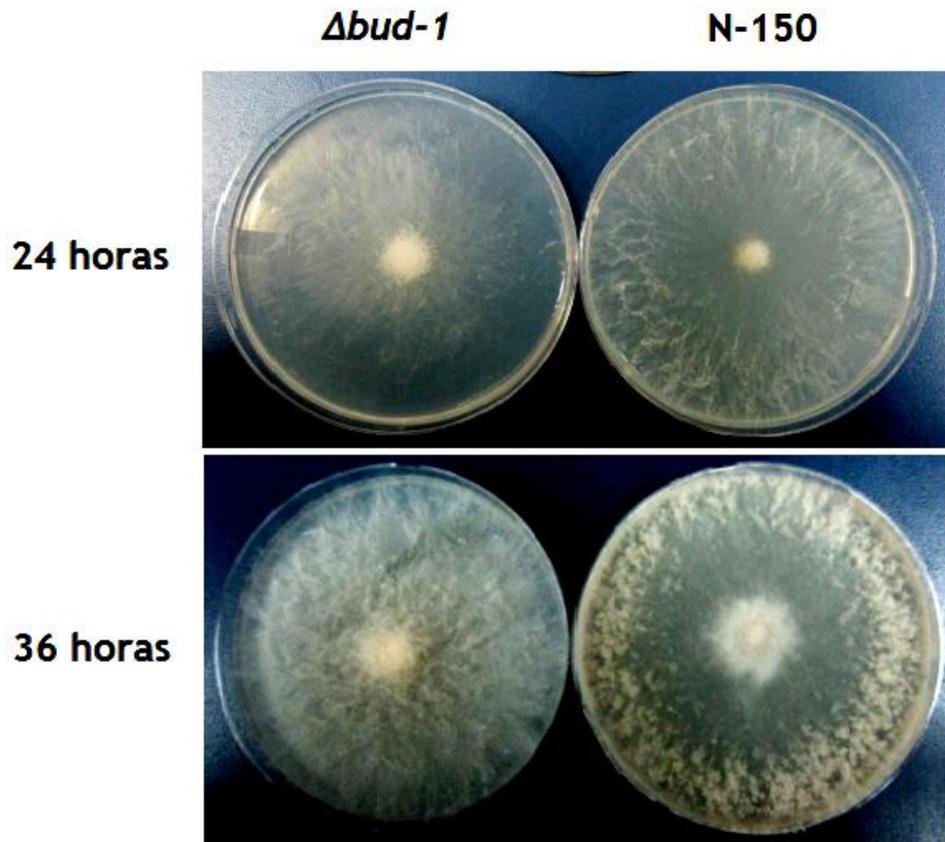


Figura 21. Morfología colonial. En el panel superior del lado izquierdo se muestra la cepa *Δbud-1* a las 24 horas después de su siembra e incubación a 30 °C; en el lado superior derecho se observa a la cepa silvestre N-150 sembrada bajo las mismas condiciones. En el panel inferior del lado izquierdo se observa la cepa *Δbud-1* transcurridas 36 horas de incubación y del lado inferior derecho se ve la cepa N-150 también a las 36 horas de incubación.

Se hicieron observaciones a un aumento de 16X para analizar a profundidad las diferencias que se presentaron a simple vista; las hifas de la cepa *Δbud-1* parecen más finas o más delgadas y se observa una gran diferencia en la cantidad de hifas que conforman la colonia. Así mismo las hifas se alargan alejándose del centro como en la cepa N-150 pero al contrario de la silvestre parecen que se también se alejan entre ellas y hay escasa interacción entre ellas, no se entrelazan con tanta frecuencia como ocurre en la cepa N-150 (Figura 22).

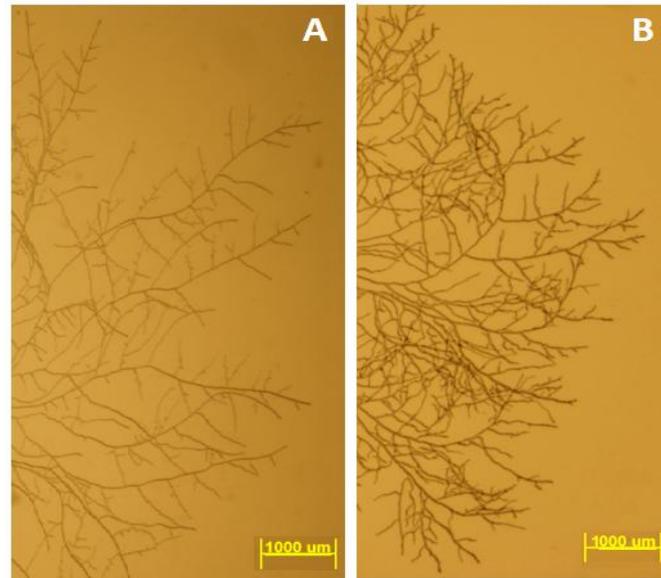


Figura 22. Morfología del borde de las colonias. Borde de la cepa $\Delta bud-1$ (A) y borde de la cepa N-150 (B), ambas a las 12 horas después de su siembra e incubación a 30 °C. Escala 1000 μm .

Utilizando microscopía de alto aumento en las hifas de *Neurospora crassa* es normal encontrar estructuras como el Spitzenkörper, membranas celulares, septos, pared celular e incluso organelos y se pueden observar mediante fluorescencia con los colorantes adecuados. El Spitzenkörper es una estructura dinámica que está presente en sitios de crecimiento altamente polarizado durante la morfogénesis de hifas y es asociado a funciones celulares necesarias para la formación de pared celular (Virag & Harris, 2006).

Realizamos tinciones con FM4-64 para visualizar el Spitzenkörper y las membranas celulares y así determinar si existe alguna anomalía referente a la funcionalidad de esta estructura en la cepa mutante. Encontramos que la morfología y localización del Spk es similar entre las hifas de las cepas $\Delta bud-1$ y N-150, por lo que concluimos que la proteína BUD-1 no es importante para la localización del Spk y por lo tanto, para la direccionalidad del crecimiento de las hifas (Figura 23). Con el objetivo de observar la morfología de las hifas de la cepa silvestre y $\Delta bud-1$, se realizaron tinciones con el colorante de pared calcoflúor y se llevaron a cabo observaciones en el microscopio confocal.

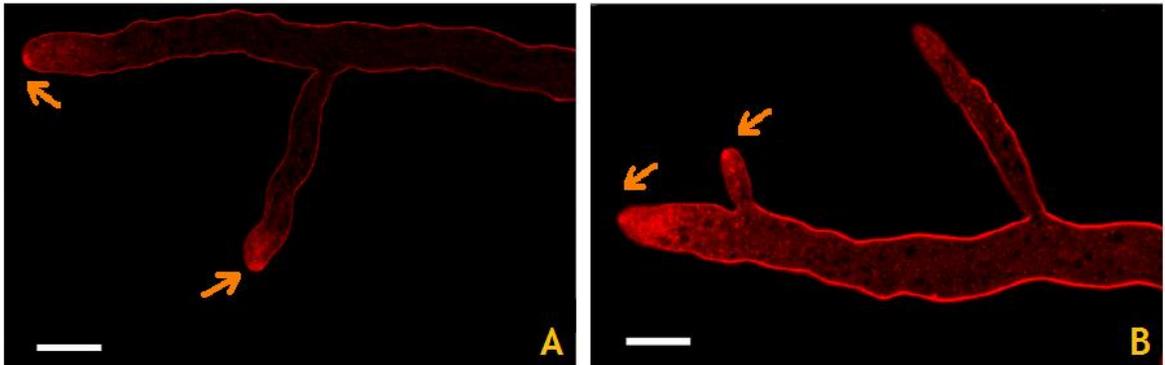


Figura 23. Tinción con FM4-64. A) Ceba $\Delta bud-1$. B) Ceba N-150. Las flechas indican los Spk teñidos con FM4-64. Escala 100 μm .

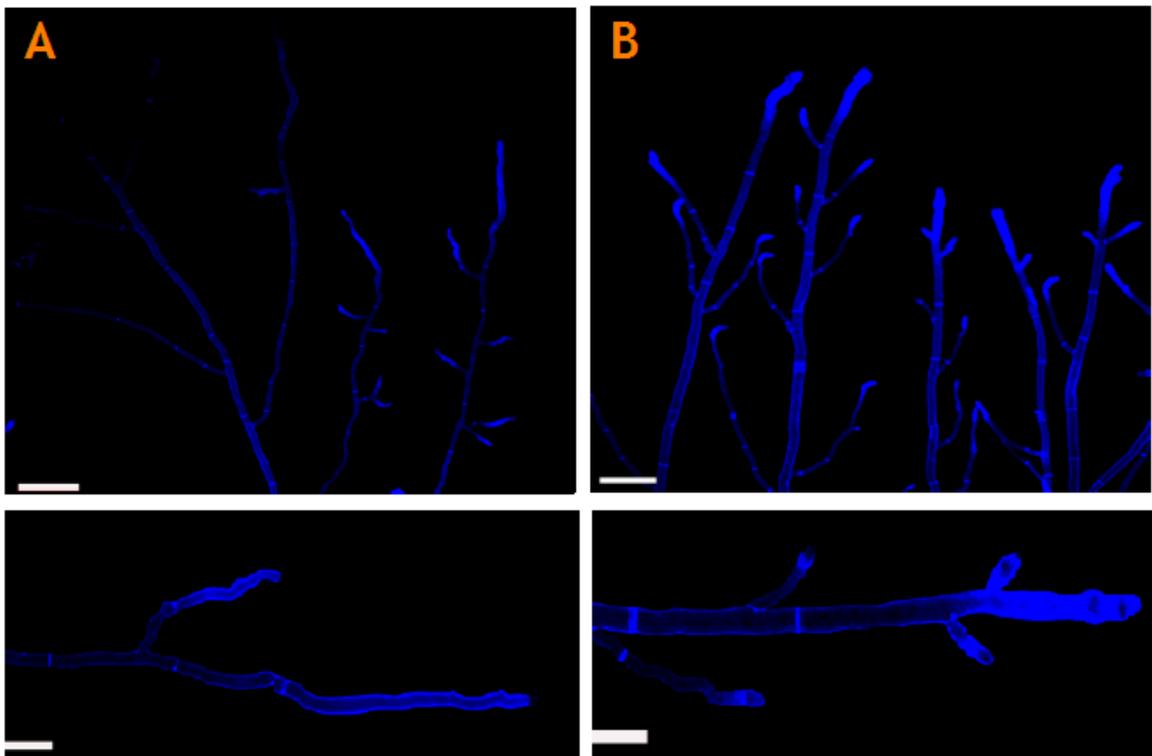


Figura 24. Tinción con calcofluor 0.1 M. A) Ceba $\Delta bud-1$. B) Ceba N-150. En ambas se observan teñidos los septos y paredes celulares. Escala 20 μm .

En el panel superior de la figura 24, observamos que las hifas de la cepa $\Delta bud-1$ crecen más delgadas en comparación con la cepa silvestre. En las partes proximales a las regiones apicales de las hifas, éstas se van estrechando, diferente de lo que sucede con la cepa silvestre. En el panel inferior de la misma figura, es más evidente la diferencia del ancho de las hifas de la cepa $\Delta bud-1$ y la N-150. Este fenotipo se confirmó mediante mediciones del diámetro de las hifas en una dimensión para comprobar esta hipótesis. Aunque la cepa mutante presentó un promedio de $13.6 \mu\text{m}$ mientras que la cepa silvestre obtuvo un promedio de $15 \mu\text{m}$ de diámetro, la desviación estándar muestra que estas diferencias no son significativas (Figura 25).

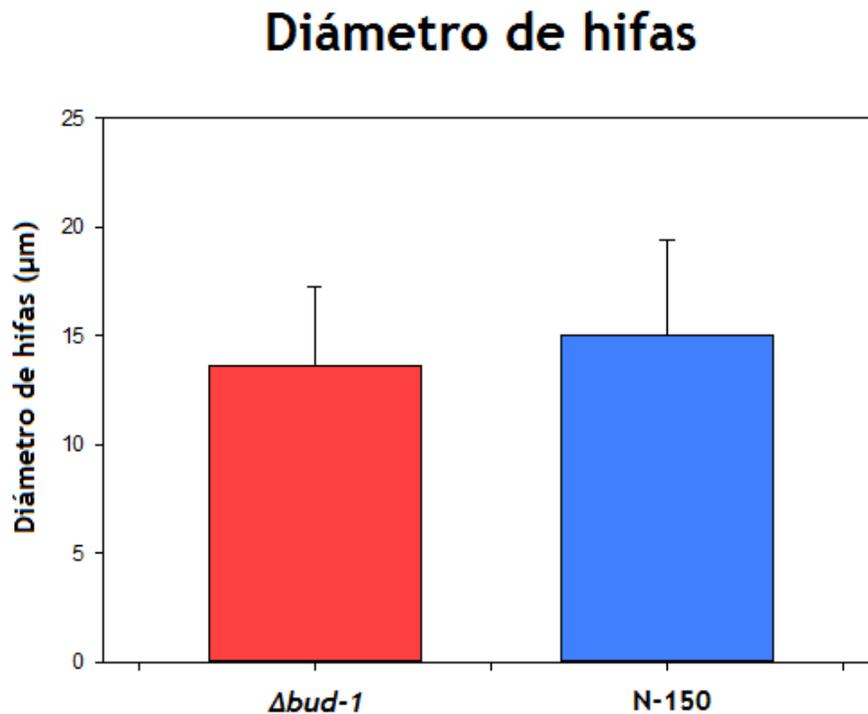


Figura 25. Medición del diámetro de hifas. Medición del diámetro de cada hifa a los $100 \mu\text{m}$ de la punta hacia la zona media apical. La cepa $\Delta bud-1$ (rojo) mide en promedio $13.6 \mu\text{m}$ de diámetro y la cepa N-150 (azul) mide en promedio $15 \mu\text{m}$ de diámetro ($n=30$). Se midieron los diámetros de un total de 30 hifas.

7.5. La cepa $\Delta bud-1$ produce menos biomasa debido a una disminución en la ramificación de las hifas y en la producción de los conidios

En las observaciones macroscópicas, es de notar que la cepa $\Delta bud-1$ presenta una estructura laxa cuando se compara con la colonia silvestre. En la figura 22-A se observa que el micelio es escaso pero es difícil determinar si se debe solamente al grosor de las hifas o si en realidad hay una carencia de hifas y/o una baja producción de conidios. Contamos las ramas laterales producidas en los últimos 500 μm de los ápices de 30 hifas parentales de la cepa $\Delta bud-1$ y de la cepa N-150 para obtener el promedio de ramificación y hacer comparaciones entre ambas cepas. El promedio de ramas contadas para $\Delta bud-1$ es de ~ 2 con una desviación estándar de 0.52 y el promedio de ramas de N-150 fue de ~ 3 con una desviación estándar de 0.67 (Figura 26).

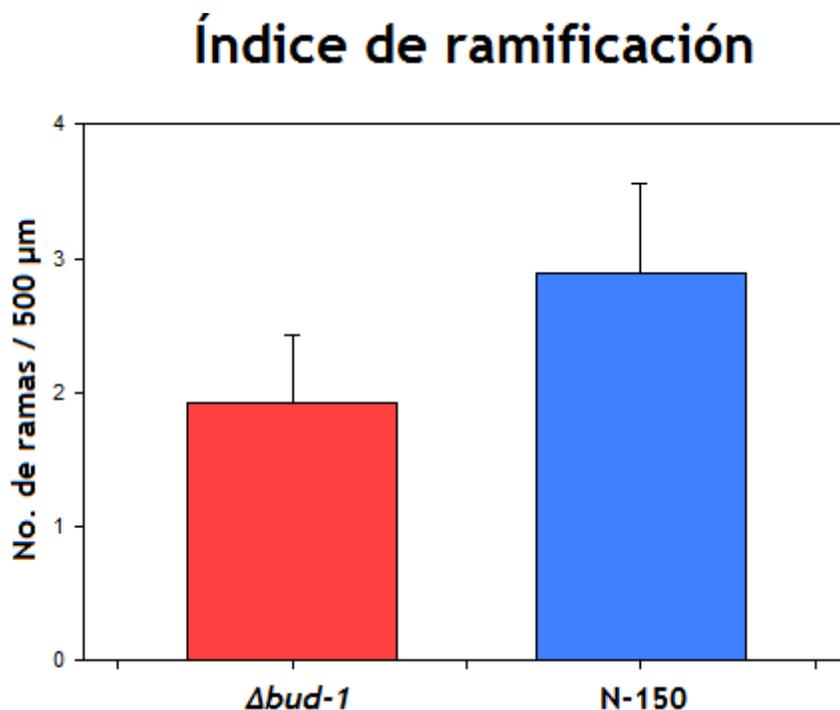


Figura 26. Índice de ramificación. Promedio del número de ramas cuantificadas en los últimos 500 μm de los ápices de 30 hifas parentales de cada cepa ($n=6$). La cepa $\Delta bud-1$ (rojo) produjo un promedio de ~ 2 y la cepa N-150 (azul) produjo un promedio de ~ 3 .

La cepa $\Delta bud-1$ produce menos ramas laterales que la cepa N-150 lo que nos llevó a pensar que debido a esta disminución, podrían existir menos interacciones de fusión celular entre ellas, lo que afectaría la morfología del micelio. Analizamos los eventos de fusión entre las hifas y encontramos que aunque se producen menos hifas, estas son capaces de fusionarse entre ellas ya sea durante el crecimiento de la colonia (Figura 27) o durante la germinación de los conidios cuando ocurre la formación de los tubos de anastomosis CATs como se observa en la figura 28.

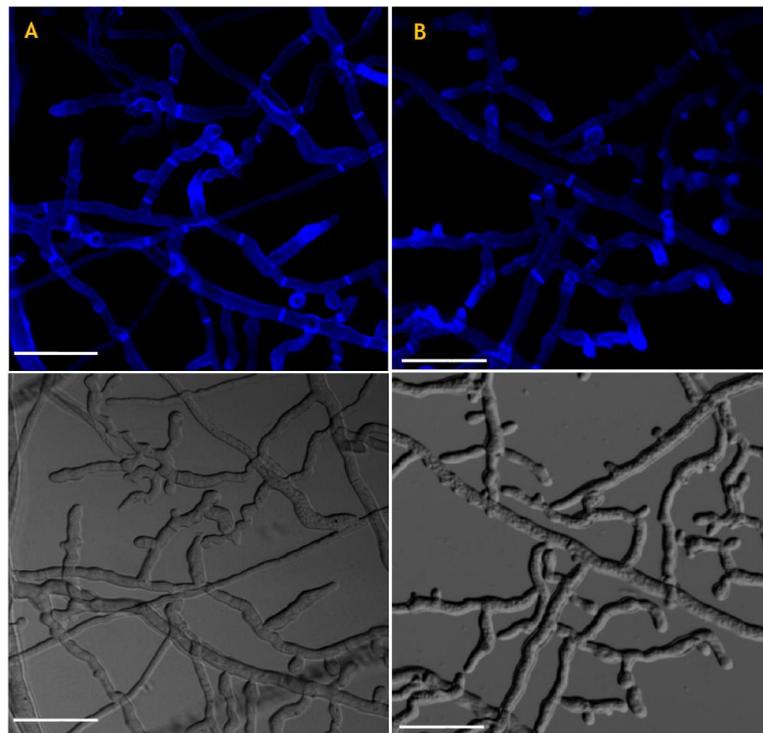


Figura 27. Fusión celular entre hifas durante el crecimiento vegetativo. A) Imagen de la cepa $\Delta bud-1$ al confocal con tinción calcofluor (superior) e imagen en DIC (inferior) B) Imagen de la cepa N-150 al confocal con tinción calcofluor (superior) e imagen en DIC (inferior). Escala 100 μ m

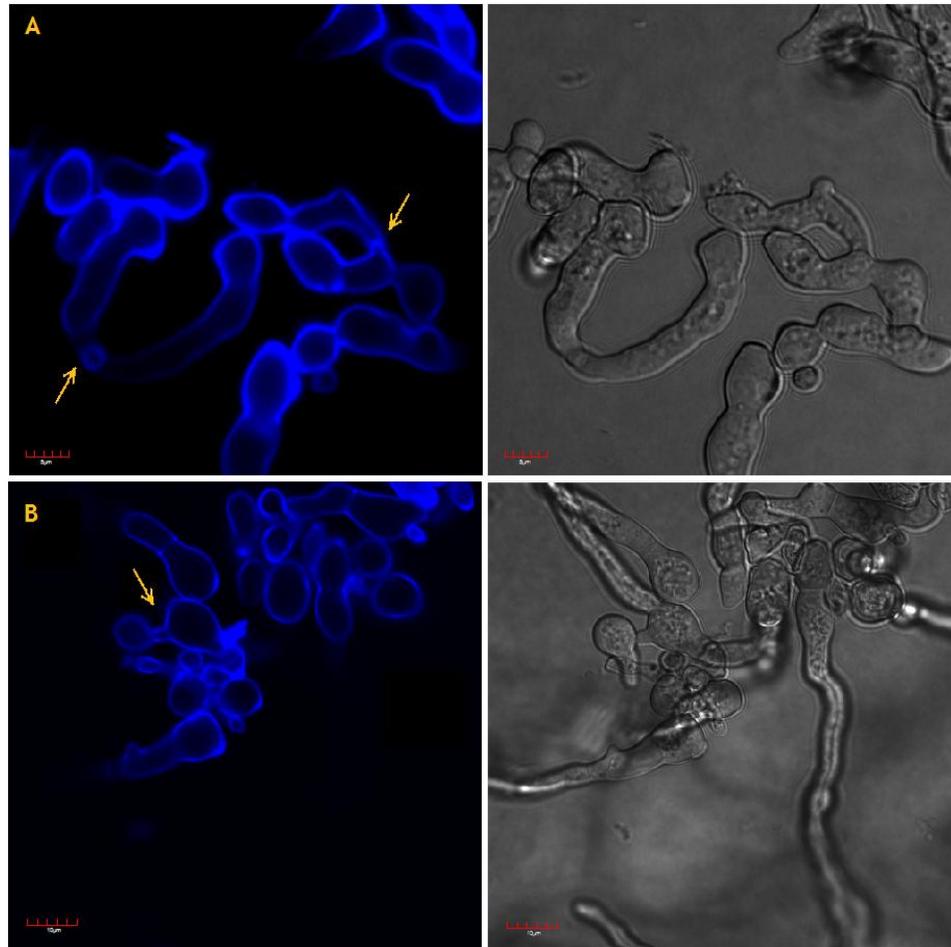


Figura 28. Formación de CATs entre germinulas. A) Cepa $\Delta bud-1$ al confocal con tinción FM4-64 e imagen en DIC (panel superior) B) Cepa N-150 al confocal con tinción FM4-64 e imagen en DIC (panel inferior). Las flechas indican eventos de fusión entre CATs.

Posteriormente verificamos la producción de esporas de las cepas $\Delta bud-1$ y N-150. El número promedio de esporas producidas por la cepa *KO* fue de 3.12×10^7 esporas/ml (± 6291528.7) mientras que en la cepa silvestre fue significativamente mayor con 2.08×10^8 esporas/ml (± 78885465.5), lo que resulta en la producción de solo el 15% de las esporas que produce la cepa silvestre (Figura 29).

Cuantificación de esporas

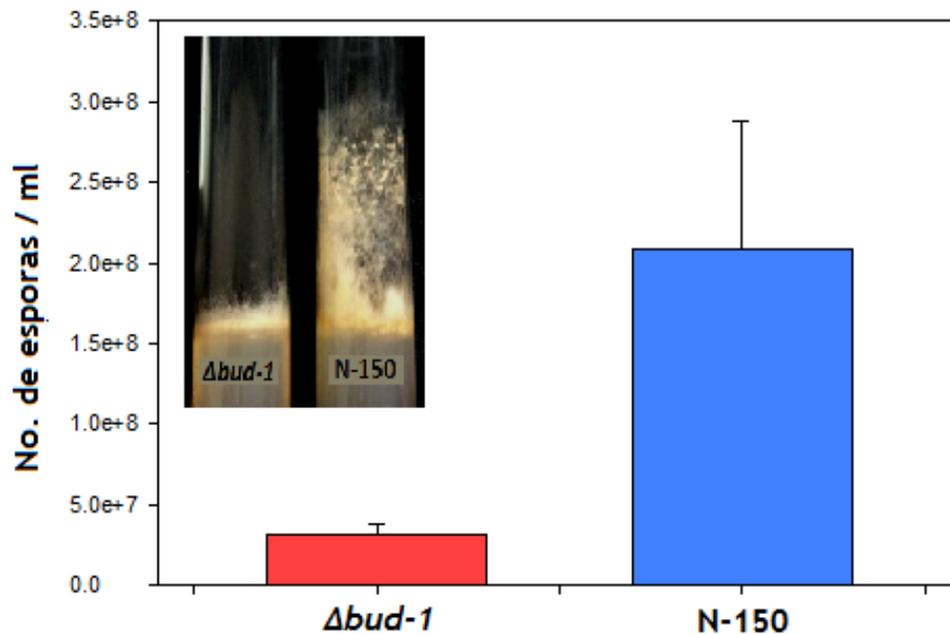


Figura 29. Cuantificación de esporas. La cepa $\Delta bud-1$ (rojo) produce un promedio total de 3.12×10^7 esporas/ml y la cepa N-150 (azul) produjo un promedio total de 2.08×10^8 esporas/ml ($n=6$). En el recuadro se observan cultivos de 3 días a 30 °C en oscuridad de la cepa $\Delta bud-1$ (izquierda) y la cepa N-150 (derecha).

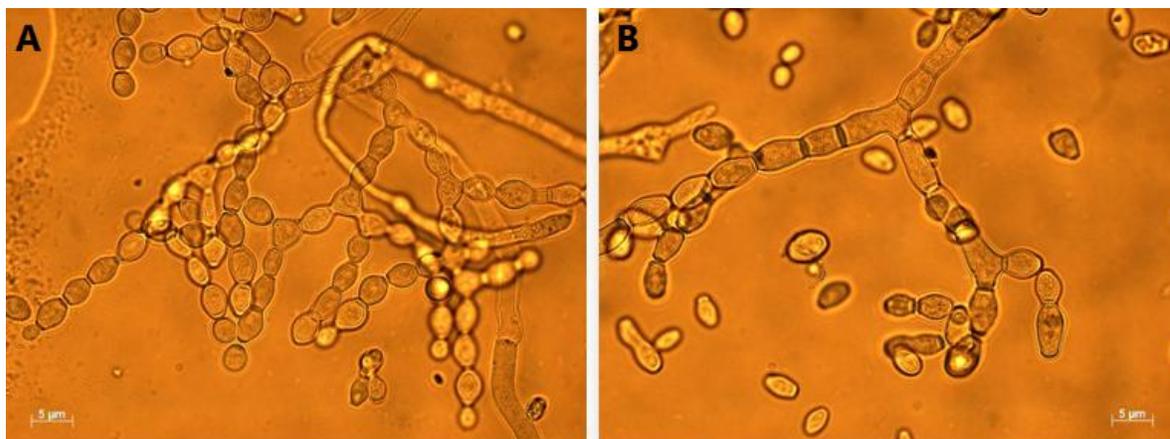


Figura 30. Morfología de los conidióforos. A) Conidióforos de la cepa $\Delta bud-1$ B) Conidióforos de la cepa N-150

Aparentemente la cepa $\Delta bud-1$ tiene alguna falla en la generación de conidios por lo que realizamos observaciones de las estructuras formadoras de estos, los

conidióforos, con el propósito de encontrar la causa de la disminución en la conidiación. No se observaron diferencias entre las estructuras de la cepa mutante y la cepa silvestre (Figura 30), lo que indica que no hay malformación en esta estructura.

Se puede asegurar que las colonias de la cepa $\Delta bud-1$ tienen una morfología cercana a la normal pero es claro que hay algún defecto en la producción de biomasa en general, específicamente en la producción de las hifas y los conidios. Para correlacionar estos últimos resultados con la producción de biomasa, comparamos el peso seco de ambas cepas. La cepa N-150 produjo 2.70 g (± 1.04) mientras que la cepa $\Delta bud-1$ produjo una cantidad ligeramente menor, 1.81 g (± 0.48) lo cual era totalmente esperado (Figura 31).

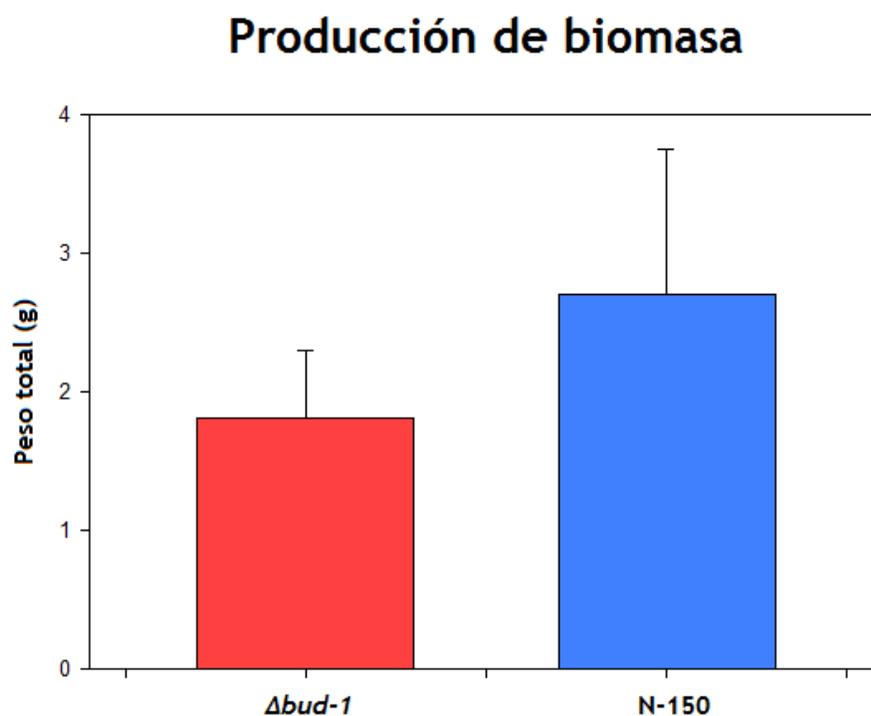


Figura 31. Producción de biomasa. La cepa $\Delta bud-1$ (rojo) produjo en promedio 1.81 g de biomasa seca y la cepa N-150 (azul) produjo en promedio 2.70 g de biomasa seca (n=3).

7.6. El crecimiento y desarrollo de las colonias está retraído en la mutante $\Delta bud-1$

En *C. albicans* BUD-1 tiene un papel importante durante la polarización de las hifas cuando las células colonizan agar. La ausencia de la proteína no impide la germinación ni el crecimiento pero si lo retrae, por lo que se realizaron mediciones del radio de la colonia en función del tiempo. Con estos datos se elaboró una gráfica que compara el promedio de elongación micelial de la cepa mutante contra el promedio de la cepa silvestre (Figura 32). La velocidad de extensión promedio fue de 0.758 cm/h para la cepa $\Delta bud-1$ y de 1.031 cm/h para la cepa N-150. Se observó un retraso en el crecimiento de la cepa mutante de 0.272 cm/h para la cepa $\Delta bud-1$ y de 1.031 cm/h para la cepa N-150. Se observó un retraso en el crecimiento de la cepa mutante de 0.272 cm/h.

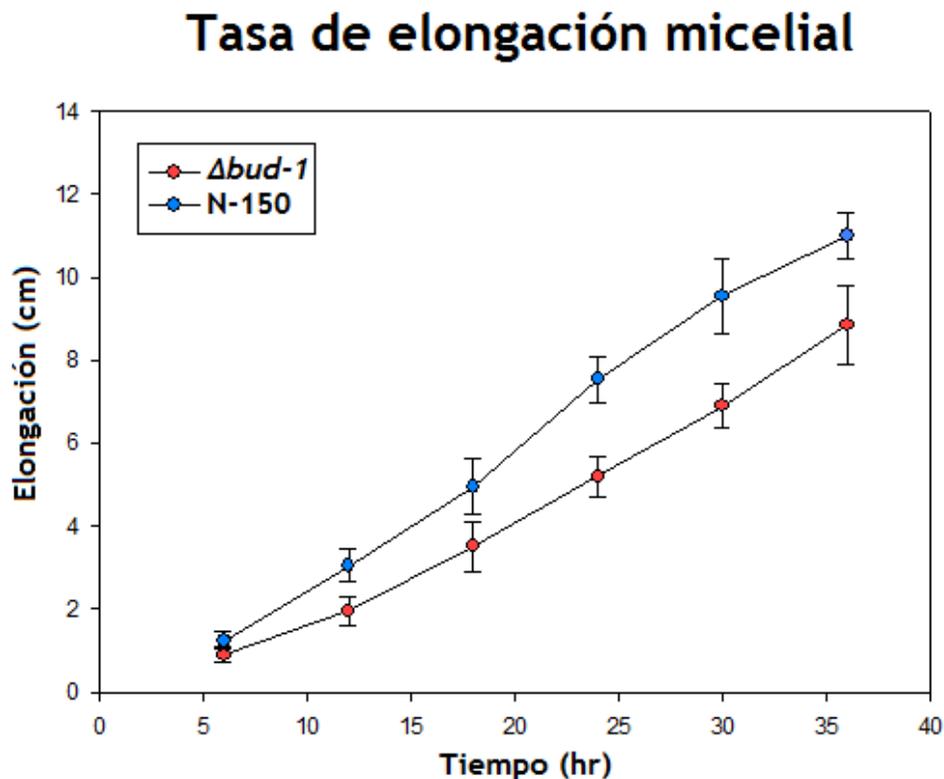


Figura 32. Tasa de elongación micelial. La gráfica muestra los promedios del crecimiento (n=6) de la cepa $\Delta bud-1$ (rojo) y la cepa N-150 (azul), en cm en función al tiempo en horas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

7.7. La mutante $\Delta bud-1$ es capaz de producir estructuras sexuales y de producir progenie.

Varias mutantes reportadas de *N. crassa* que se encuentran deficientes en la producción de esporas, micelio aéreo y crecimiento radial, también están afectadas en la formación de las estructuras sexuales (Aldabbous, et al 2010). Basados en el hecho de que la cepa $\Delta bud-1$ presenta defectos en la diferenciación asexual y crecimiento, quisimos identificar el efecto de la carencia de BUD-1 en el desarrollo sexual para determinar si esos fenotipos estaban asociados en esta mutante.

Las cepas $\Delta bud-1$ y N150 se crecieron en un medio sintético de cruzas (MSC) inducir la formación de los protoperitecios (Figura 33) y posteriormente generar las cruzas y maduración de los peritecios (Figura 34). Tanto la cepa silvestre, como la $\Delta bud-1$ produjeron protoperitecios muy similares morfológicamente. Estos protoperitecios también fueron capaces de cruzarse con conidios de la cepa del sexo opuesto y llegar a su madurez hasta formar las ascosporas viables. Por lo tanto, BUD-1 no participa en el proceso de diferenciación sexual.

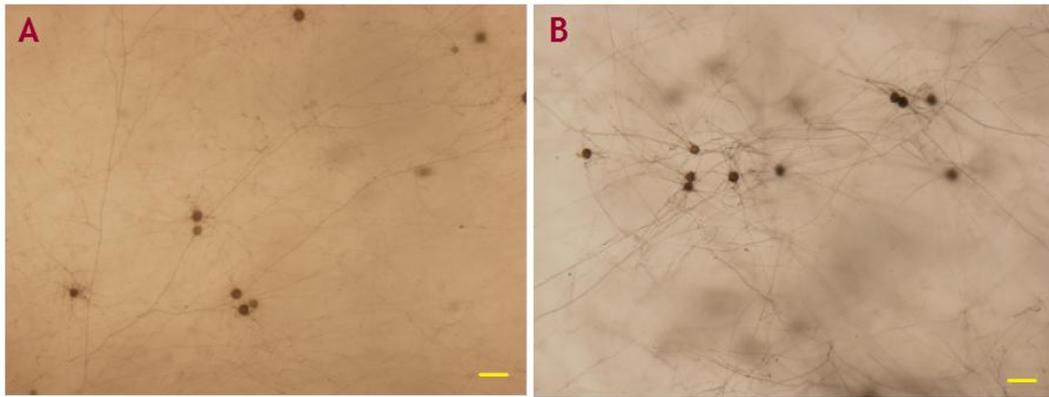


Figura 33. Protoperitecios. Imágenes al estereoscopio de los protoperitecios en la cepa A) $\Delta bud-1$ y en la cepa B) N-150. Barra de escala 100 μm

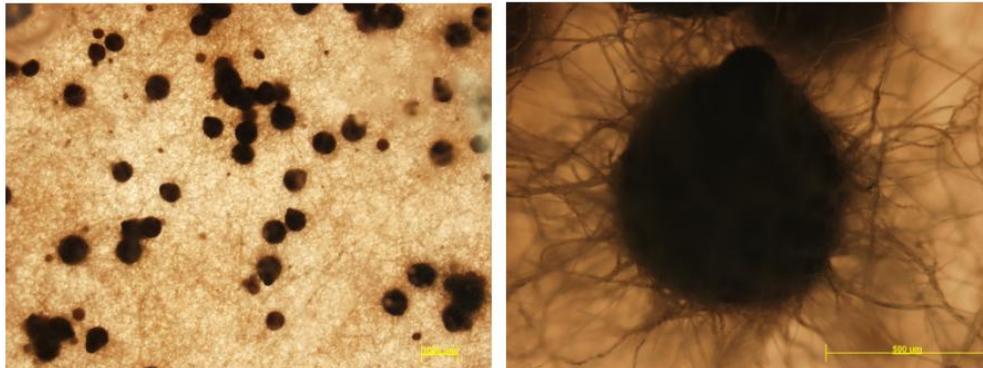


Figura 34. Peritecios. Imágenes de los peritecios formados de la cruce de las cepas $\Delta bud-1$ x wt 4200 al estereomicroscopio. A la izquierda se observan peritecios en maduración y a la derecha se muestra un peritecio maduro a mayor aumento.

Capítulo 8. Discusiones

Neurospora crassa es un hongo filamentoso que presenta crecimiento polarizado a lo largo de su ciclo vital. En este estudio nos preguntamos si la proteína BUD-1, ortóloga a Bud1p/Rsr1p, podría estar presente en los sitios de crecimiento apical de este hongo filamentoso y de alguna manera regular, el establecimiento y direccionalidad del sitio activo de polarización durante el crecimiento celular. Encontramos que la GTPasa BUD-1 se localiza enteramente en el citoplasma y no se concentra en sitios de polarización o en membranas celulares como se esperaba por su naturaleza GTPasa. Así mismo, la proteína BUD-1 es necesaria más no indispensable durante el crecimiento polarizado en *N. crassa* debido a que la mutante que carece del gen *bud-1* y que aunque la cepa es capaz de mantener el crecimiento polarizado, resultó deficiente en la producción de biomasa y conidios además de presentar menor elongación micelial.

8.1. BUD-1 se encuentra dispersa en el citoplasma celular durante todo el ciclo de vida de *N. crassa*

La proteína Rsr1p/Bud1p de *S. cerevisiae* se localiza en la membrana plasmática cuando está unida a GTP o en el citoplasma cuando se encuentra unida a GDP debido a su naturaleza Ras GTPasa; es natural creer que en *Neurospora crassa*, el comportamiento proteico sería similar. Se realizó un análisis por microscopía confocal para observar la localización intracelular de la proteína BUD-1 marcada con las proteínas verde y roja fluorescentes desde la germinación de una spora y a lo largo del ciclo de vida de *N. crassa* lo que nos daría una idea de que función realiza o en que procesos se relaciona e incluso, con cuales proteínas podría estar interactuando. La fluorescencia encontrada en cepas GFP-BUD-1 fue similar a la observada en las cepas RFP-BUD-1, únicamente en el citoplasma y en ningún momento fue específicamente localizada en septos o membrana plasmática como se esperaba. Tampoco se observó algún patrón en la dinámica intracelular debido a que la fluorescencia fluía hacia todas

direcciones de las hifas y a través de puentes de fusión celular sin tener un sitio específico de localización. Esto fue desconcertante debido a que por su actividad GTPasa, se predice que en algún momento estará anclada a la membrana plasmática y al no ocurrir de esta manera, pudiera significar que la expresión de la proteína transformante no fuese funcional. Probablemente, el etiquetamiento con la proteína fluorescente verde o roja en su parte N-terminal estuviera interfiriendo en la actividad de GTPasa, debido a que el dominio que corresponde al dominio de interacción con GEF se encuentra a partir del aminoácido y el switch 1 se encuentra a una distancia. Se sabe que esta actividad define en gran manera, la localización de la proteína hacia la membrana o que tal vez no ocurrió una correcta prenilación del dominio CAAX posiblemente por algún defecto post-transduccional y por ende es incapaz de enlazarse a membranas celulares. Se sugieren experimentaciones exhaustivas de la fusión de GFP con la proteína BUD-1, así como análisis de localización más profundos de BUD-1 y en co-localización con sus proteínas reguladoras BUD-2 y BUD-5 para determinar exactamente la dinámica que pudiera estar ocurriendo entre estas proteínas debido a que la regulación localizada del ciclo de Rsr1p/Bud1p de *S. cerevisiae*, se alcanza por la localización de las proteínas Bud2p y Bud5p y sus actividades (Pringle et al, 1995).

8.2. *bud-1* es necesario para el crecimiento pero no para la viabilidad celular

La proteína Bud1p ha sido muy bien estudiada en la levadura *S. cerevisiae* y se le conocen papeles importantes más no indispensables durante la polarización y división celular. El estudio de ésta proteína data desde 1989 cuando se identificó como un supresor multicopia de Cdc24p en *S. cerevisiae* (Bender & Pringle, 1989). La función de la proteína de *S. cerevisiae* Bud1p (o Rsr1p) se caracterizó en estudios posteriores en los que le atribuyen la selección del sitio apropiado para el crecimiento polarizado, la polarización del citoesqueleto, la localización de otras proteínas reguladoras de la polaridad celular y la regulación del ensamblaje ordenado del complejo de polarización Cdc42p-Cdc24p-Bem1p (Chant & Herskowitz, 1991; Ozbudak et al, 2005; Park et al, 1997; Park et al, 2002).

La ausencia de BUD-1 parece ser la causa de la formación deficiente del micelio y la escasa producción de conidios; el número de conidios de la cepa mutante está reducido en un 75% lo cual parece estar directamente relacionado con la disminución de la biomasa que se está produciendo. Asimismo se observaron hifas ligeramente más delgadas pero que aun así, logran llevar a cabo el crecimiento polarizado, lo que nos indica que en general el problema no está en la polarización. Sin embargo, la forma de las hifas en la parte apical muestra que BUD-1 tiene algún papel importante durante el crecimiento, y que no participa en el establecimiento del eje de polarización como se ha visto en cepas mutantes *rsr1* de *A. gossypii*, las cuales presentan grandes anomalías morfológicas durante la elongación de las hifas debido a la desestabilización del citoesqueleto de actina (Bauer et al, 2004).

En *S. cerevisiae* la ausencia de esta proteína no afecta el crecimiento pero causa la gemación azarosa de la célula hija, lo que indica que Bud1p determina la localización de la polaridad celular en el sitio correcto de formación de una nueva gema (Ruggieri et al, 1992). *N. crassa* es un hongo filamentoso que no se divide por gemación pero si forma estructuras equivalentes durante el proceso de germinación de esporas. Al parecer la ausencia de este gen en *N. crassa* no afecta de ninguna manera la germinación de las esporas ni su capacidad de polarización porque aunque ocurre una disminución en la cantidad de células en desarrollo y en la división celular, las pocas que lo están llevando a cabo lo están haciendo de manera normal.

La cepa *KO* de *bud-1* se comporta como la mutante de *bem-1* de *N. crassa* porque presenta una disminución significativa de hifas aéreas y un patrón de conidiación alterado (Schrüg et al, 2012). La esporulación se observa distribuida en toda la superficie colonial mientras que en la cepa mutante la esporulación se restringe al área central de la colonia, exactamente como ocurre con la mutante de *bud-1*.

8.3. BUD-1 no es necesaria para el proceso de fusión celular

Las cepas con problemas en la fusión celular, normalmente presenta fenotipos asociados como son: un crecimiento micelial disminuido y una reducción significativa en la producción de conidiosporas. La mutante $\Delta bud-1$ mostró estos fenotipos de manera clara, por lo que en este trabajo se examinó si BUD-1 podría participar en algún proceso de fusión celular. Se observó que la cepa $\Delta bud-1$ es capaz de generar fusiones celulares entre las hifas, lo que muestra que estos defectos no son causado por una deficiencia en ellos. Además, a diferencia del retraso que tiene la cepa $\Delta bem-1$ en este proceso, la cepa $\Delta bud-1$ genera las fusiones celulares al mismo tiempo que la cepa silvestre, lo cual muestra que BUD-1 no participa en el proceso de fusión vegetativa ni en la fusión por CATs. Por lo tanto, los fenotipos observados no son una consecuencia de un retraso en la fusión celular, como sucede en la cepa mutante en BEM-1 (Schrüg et al, 2012).

En contraste con *S. cerevisiae*, CaRsr1p de *C. albicans* es muy importante para la morfogénesis. Las cepas mutantes de Rsr1p presentaron formas anormales tanto en la fase de levadura como en las hifas (Hausauer et al, 2005), fenotipo que no se presentó en hifas de las mutantes $\Delta bud-1$ de *N. crassa*. Por lo tanto es probable que BUD-1 tenga una función diferente en este hongo filamentoso, la cual no está relacionada con el establecimiento y direccionalidad del sitio activo de polarización.

El hallazgo más importante de este estudio es que la GTPasa BUD-1 no es esencial para la polarización celular en *N. crassa* y para la viabilidad celular, pero si es necesaria para el crecimiento y la esporulación.

Ito y colaboradores reportaron por primera vez el gen en *N. crassa* homólogo a la proteína GTPasa Ras de humanos KREV-1, al cual le denominaron de igual manera. Esta secuencia corresponde a la secuencia que nosotros hemos identificado como BUD-1, el gen homólogo a la proteína Bud1p/Rsr1 de *S. cerevisiae* (Ito et al, 1997). En dicho reporte se caracterizaron mutantes generadas por “Ripping” o RIP (Repeat-induced point mutation) en el gen que identificaron como “krev-1”. Las mutantes no

presentaron anomalías durante la fase vegetativa de las cepas ni en el desarrollo asexual, por lo que se propone que el gen es dispensable o que probablemente exista otro gen funcionalmente análogo a *krev-1*. Estos resultados coinciden parcialmente con los nuestros, a excepción de que las cepas mutantes por RIP en *krev-1*, se encuentran afectadas en la producción de estructuras sexuales, muy diferente a lo que sucede con las cepas con la eliminación completa del gen *bud-1* (o *krev-1*), las cuales no presentaron anomalías durante el proceso de diferenciación sexual. Resultados como este distinguen a los hongos filamentosos de las levaduras, donde las mutaciones que afectan ortólogos aparentes de estos mismos genes no tienen defectos morfológicos similares.

Sería importante determinar en qué partes de la secuencia se encuentran las mutaciones generadas por RIP, y por lo tanto, identificar los dominios proteicos afectados por dichas mutaciones. Esta información nos permitiría entender por qué difieren los fenotipos de las mutantes generadas por RIP y la mutante con la eliminación completa del gen.

Con los datos obtenidos de la caracterización fenotípica podemos arriesgarnos a decir que, correlacionando con los ensayos de localización, la proteína BUD-1 no tiene una función evidente durante las etapas de polarización *per se* pero sí es necesaria durante el crecimiento y morfogénesis de las hifas. Además, BUD-1 juega un papel importante durante formación de micelio y muy probablemente sea uno de los componentes importantes en la conidiogénesis.

Conclusiones

La proteína BUD-1 no es indispensable pero si es requerida durante los eventos de morfogénesis de hifas de *Neurospora crassa*.

La cepa $\Delta bud-1$ no es capaz de generar una colonia normal si no que produce un micelio laxo, fino y escaso.

La cepa $\Delta bud-1$ produce menor cantidad de biomasa debido a que produce menor cantidad de hifas y conidios.

La proteína BUD-1 parece ser necesaria durante el proceso de conidiogénesis.

Lista de referencias

- Aldabbous MS, Roca MG, Stout A, Huang IC, Read ND, y Free SJ (2010) The ham-5, rcm-1 and rco-1 genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 156 (9), 2621–2629
- Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., y 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.
- Bartnicki-Garcia, S. (2002). Hyphal tip growth: outstanding questions. *Mycology series*, 15, 29-58.
- Bauer, Y., Knechtle, P., Wendland, J., Helfer, H., y Philippsen, P. (2004). A Ras-like GTPase is involved in hyphal growth guidance in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular biology of the cell*, 15(10), 4622-4632.
- Beadle, G. W., y Tatum, E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27(11), 499.
- Bender, A., y Pringle, J. R. (1989). Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the Ras-related gene RSR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9976-9980.
- Brand, A., y Gow, N. A. (2012). Tropic orientation responses of pathogenic fungi. In *Morphogenesis and pathogenicity in fungi* (pp. 21-41). Springer Berlin Heidelberg.
- Boguski, M. S., y McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, 366(6456), 643-654.
- Bos, J. L. (2000). Ras. In Hall, A. (Ed.). *GTPases* (Vol. 24) (pp. 67-88). *Oxford University Press*
- Butty, A. C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J. E., Hofmann, K., y Peter, M. (2002). A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *The EMBO journal*, 21(7), 1565-1576.

- Cabib, E., Drgonová, J., y Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 307-333.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., y Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (Vol. 2). London: Academic Press.
- Chant, J., y Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell*, 65(7), 1203-1212.
- Cole, R. A. y Fowler, J. E. (2006). Polarized growth: maintaining focus on the tip. *Current opinion in plant biology*, 9(6), 579-588.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science Signaling*, 2004(250), re13.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., y Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10352-10357.
- Davis, R. H. (2000). *Neurospora: contributions of a model organism* (p. 333). New York: Oxford University Press.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal biology*. 4th edition Blackwell Publishing Ltd.
- d'Enfert, C. (1997). Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and Biology*, 21(2), 163-172.
- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., y Philippsen, P. (2004). The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*, 304(5668), 304-307.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42-the centre of polarity. *Journal of cell science*, 117(8), 1291-1300.
- Freitag, M., y Selker, E. U. (2005). Expression and visualization of red fluorescent protein (RFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter*, 52, 14.

- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., y Kroken, S. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-868.
- Girbardt, M. (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta*, 50(1), 47-59.
- Gulli, M. P., y Peter, M. (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes & development*, 15(4), 365-379.
- Harris, S. D., y Momany, M. (2004). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology*, 41(4), 391-400.
- Hausauer, D. L., Gerami-Nejad, M., Kistler-Anderson, C., y Gale, C. A. (2005). Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. *Eukaryotic cell*, 4(7), 1273-1286.
- Hickey, P. C., Jacobson, D. J., Read, N. D., y Louise Glass, N. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 37(1), 109-119.
- Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowski, D. H., y Turner, J. N. (2005). Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*, 97(3), 580-588.
- Honda, S., y Selker, E. U. (2009). Tools for fungal proteomics: multifunctional neurospora vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics*, 182(1), 11-23.
- Hynes, M. J. (2003). The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biol*, 4(6), 217.
- Ito, S., Matsui, Y., Toh-e, A., Harashima, T., y Inoue, H. (1997). Isolation and characterization of the *krev-1* gene, a novel member of ras superfamily in *Neurospora crassa*: involvement in sexual cycle progression. *Molecular and General Genetics* MGG, 255(4), 429-437.
- Kavanagh, K. (Ed.). (2005). *Fungi: Biology and applications*. 2da. Edición John Wiley & Sons.

- Kozminski, K. G., Beven, L., Angerman, E., Tong, A. H. Y., Boone, C., y Park, H. O. (2003). Interaction between a Ras and a Rho GTPase couples selection of a growth site to the development of cell polarity in yeast. *Molecular biology of the cell*, 14(12), 4958-4970.
- Marston, A. L., Chen, T., Yang, M. C., Belhumeur, P., y Chant, J. (2001). A localized GTPase exchange factor, Bud5, determines the orientation of division axes in yeast. *Current Biology*, 11(10), 803-807.
- McNally, M. T., y Free, S. J. (1988). Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Current genetics*, 14(6), 545-551.
- Michaelson, D., Ahearn, I., Bergo, M., Young, S., y Philips, M. (2002). Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Molecular biology of the cell*, 13(9), 3294-3302.
- Mitin, N., Rossman, K. L., y Der, C. J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology*, 15(14), R563-R574.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 580-585.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., y Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12248-12253.
- Ozbudak, E. M., Becskei, A., y van Oudenaarden, A. (2005). A system of counteracting feedback loops regulates Cdc42p activity during spontaneous cell polarization. *Developmental cell*, 9(4), 565-571.
- Park, G., Jones, C. A., y Borkovich, K. A., (2010). Signal transduction pathways. In Borkovich, K. A., y Ebbole, D. J. (2010). *Cellular and molecular biology of filamentous fungi* (pp. 50-59). ASM Press.
- Park, H. O., y Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 48-96.
- Park, H. O., Bi, E., Pringle, J. R., y Herskowitz, I. (1997). Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4463-4468.

- Park, H. O., Kang, P. J., y Rachfal, A. W. (2002). Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 26721-26724.
- Pringle, J. R., Bi, E., Harkins, H. A., Zahner, J. E., De Virgilio, C., Chant, J., y Fares, H. (1995). Establishment of cell polarity in yeast. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 60, pp. 729-744). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pruyne, D., y Bretscher, A. (2000b). Polarization of cell growth in yeast. *Journal of Cell Science*, 113(4), 571-585.
- Roca, M. G., Davide, L. C., Mendes-Costa, M. C., y Wheals, A. (2003). Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology*, 40(2), 138-145.
- Ruggieri, R., Bender, A., Matsui, Y., Powers, S., Takai, Y., Pringle, J. R., y Matsumoto, K. (1992). RSR1, a Ras-like gene homologous to Krev-1 (smg21A/rap1A): role in the development of cell polarity and interactions with the Ras pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 12(2), 758-766.
- Santos, E., y Nebreda, A. R. (1989). Structural and functional properties of Ras proteins. *The FASEB Journal*, 3(10), 2151-2163.
- Schürg, T., Brandt, U., Adis, C., y Fleißner, A. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* BEM1 homologue in *Neurospora crassa* promotes co-ordinated cell behaviour resulting in cell fusion. *Molecular microbiology*, 86(2), 349-366
- Sudbery, P. E. (2008). Regulation of polarised growth in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 22(2), 44-55.
- Takai, Y., Sasaki, T., y Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 81(1), 153-208.
- Virag, A., y Harris, S. D. (2006). The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycological research*, 110(1), 4-13.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., y Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 118(5), 843-846.
- Zhang, Y., y Du, G. (2009). Phosphatidic acid signaling regulation of Ras superfamily of small guanosine triphosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(9), 850-855.

Anexos

Medio mínimo de Vogel (MMV):

1. Sales de Vogel 50X (2%)
2. Sacarosa (2%)
3. Agar (1%)
4. Agua destilada/desionizada

Sales de Vogel 50X:

1. Citrato de sodio (12.3%)
2. Fosfato monobásico de potasio (25%)
3. Nitrato de amonio (10%)
4. Sulfato de magnesio heptahidratado (0.5%)
5. Cloruro de calcio (0.3%)
6. Solución de elementos traza (0.5%)
7. Solución de biotina 2.5mg/mL (0.25%)
8. Agua destilada/desionizada.

Elementos traza:

1. Ácido cítrico (5%)
2. Sulfato de zinc (5%)
3. Sulfato de amonio ferroso (1%)
4. Sulfato de cobre (0.25%)
5. Sulfato de manganeso (0.05%)
6. Ácido bórico (0.05%)
7. Molibdato de sodio (0.05%)
8. Agua destilada/desionizada

Medio fructosa, glucosa y sorbosa (FGS):

1. Sales de Vogel 50X (2%)
2. Fructosa (0.05%)
3. Glucosa (0.05%)
4. Sorbosa (2%)
5. Agar (1.8%)
6. Agua destilada/desionizada

Medio Sintético para Cruzas (MSC):

1. Nitrato de potasio (0.1%)
2. Fosfato dibásico de sodio (0.07%)
3. Fosfato monobásico de sodio (0.05%)
4. Sulfato de magnesio heptahidratado (0.05%)
5. Cloruro de calcio (0.01%)
6. Cloruro de sodio (0.01%)
7. Sacarosa (1.5%)
8. Solución de elementos traza (0.01%)
9. Biotina 2.5mg/mL (0.5%)
10. Agar (1.8%)
11. Agua destilada/desionizada

Medio Agar-Agua (MAA):

1. Agar (1.5%)
2. Agua destilada/desionizada

Medio Luria-Bertani (LB):

1. Triptona (1%)
2. Extracto de levadura (0.5%)
3. Cloruro de sodio (1%)
4. Agar (1.5% si se requiere)
5. Agua destilada/desionizada

Solución de recuperación de la electroporación

1. Sales de Vogel 50X (2%)
2. Agua destilada/desionizada

Top Agar:

1. Sorbitol 1M
2. Sales de Vogel 50X (2%)
3. Agar (1%)
4. Fructosa (0.10%)
5. Glucosa (0.10%)
6. Sorbosa (4%)
7. Agua destilada/desionizada