

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



**Programa de Posgrado en Ciencias en Ciencias de la
Vida con orientación en Microbiología**

**El papel de la RhoGAP RGA-1 en la regulación del crecimiento
de *Neurospora crassa*.**

Tesis

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

Presenta:

Héctor Blancket Melchum

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Héctor Blancket Melchum

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de tesis

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez**

Dra. Rocío del Carmen Navarro Olmos



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la
Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Héctor Blancket Melchum 2017 ©

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Héctor Blancket Melchum** 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 RhoGAP RGA-1 en la regulación del crecimiento de *Neurospora crassa*.

Resumen elaborado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de Tesis

Las Rho GTPasas son pequeñas proteínas G que juegan un papel importante en la polaridad celular en eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos, regulando su crecimiento y desarrollo. Las Rho GTPasas ciclan entre un estado activo y uno inactivo, en un proceso regulado por tres clases de proteínas; los factores de intercambio del nucleótido de guanina (GEFs), las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) y los inhibidores de disociación del nucleótido de guanina (GDIs). En levaduras, el rol de CDC-42 y sus reguladores es bien conocido, pero no hay un homólogo de RAC en éstos organismos. En *Neurospora crassa*, las Rho GTPasas CDC-42 y RAC son componentes claves que regulan el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular por medio de la reorganización del citoesqueleto de actina. Por medio de un ensayo de actividad *in vitro*, se ha reportado a RGA-1 como una de las tres Rho GAPs para las Rho GTPasas CDC-42, RAC y RHO-3 en *N. crassa*. Sin embargo, no se han llevado a cabo más análisis respecto a su rol en la morfogénesis celular. Por lo tanto, para determinar los efectos morfológicos causados por la falta de este regulador, se generó la cepa mutante $\Delta rga-1$. La mutante $\Delta rga-1$ se vió afectada en la tasa de crecimiento, longitud de hifas aéreas y producción de biomasa. En contraste, $\Delta rga-1$ no mostró diferencias en la cantidad de conidios y número de ramificaciones producidas en comparación con la cepa silvestre. Debido al fenotipo encontrado, se infiere que RGA-1 podría estar regulando primordialmente a la Rho GTPasa RHO-3, sin embargo no hay información acerca de la función de RHO-3 en *N. crassa*. Adicionalmente, se analizó la dinámica de la proteína GFP-RGA-1 por microscopía confocal. GFP-RGA-1 se vió localizada en las puntas de hifas maduras y co-localizando con el Spitzenkörper. Bajo condiciones de estrés, GFP-RGA-1 se dirige a la membrana plasmática, con un patrón de localización similar al de RAC. RGA-1 podría estar involucrada en regular a RAC bajo condiciones de estrés para mantener el crecimiento polarizado en cierta dirección. GFP-RGA-1 también se localiza en septos desde el inicio de su formación, al igual que CDC-42 y RAC. De esta manera, RGA-1 podría estar actuando como una GAP para CDC-42 y RAC durante la formación del septo. También se observaron puntos de fluorescencia dispersos en el citoplasma de germínulas, sin un patrón de localización específica. En contraste, la RhoGAP BEM-3 se localiza en puntas de germínulas e hifas maduras. Por lo que, se infiere que RGA-1 y BEM-3 podrían regular a CDC-42 y RAC de manera distintiva.

Palabras clave: RGA-1, Rho GTPasa, Crecimiento polarizado.

Abstract of the thesis presented by **Héctor Blancket Melchum** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of the life with orientation in Microbiology.

Role of the Rho GAP RGA-1 in the regulation of *N. crassa* growth

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

Rho GTPases are small G proteins that play a critical role in cell polarity in eukaryotes, from yeast to mammals, by regulating their growth and development. Rho GTPases cycle between active and inactive states, by a process regulated by three classes of proteins: guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs) and guanine dissociation inhibitors (GDIs). In yeast, the role of CDC-42 and its regulators are well known, but there is no RAC homologue in these organisms. However, in filamentous fungi the regulators of the Rho GTPases CDC-42 and RAC are not fully studied. In *Neurospora crassa*, the Rho GTPases CDC-42 and RAC are key components that regulate the establishment and maintenance of cellular polarity by reorganization of the actin cytoskeleton. By an *in vitro* assay, RGA-1 has been reported as one of the three Rho GAPs for the Rho GTPases CDC-42, RAC and RHO-3 in *N. crassa*. However, no further analysis was carried out regarding its role in cellular morphogenesis. Therefore, to determine the morphological effects caused by the lack of this regulator, a $\Delta rga-1$ mutant was generated. The $\Delta rga-1$ mutant was affected in growth rate, aerial hyphae length and biomass production. In contrast, $\Delta rga-1$ did not show differences in conidia and number of branches produced in comparison with the wild type strain. Given the phenotype found, it is inferred that RGA-1 may be primarily regulating RHO-3, however there is no information about the RHO-3 function in *N. crassa*. In addition, the dynamics of GFP-RGA-1 was analyzed by confocal microscopy. GFP-RGA-1 localized at tips of mature hyphae co-localizing with the Spitzenkörper. Under stress conditions, GFP-RGA-1 is directed towards the plasma membrane, in a pattern similar to that observed for RAC. RGA-1 may be involved in regulating RAC under stress conditions to maintain polarized growth in a certain direction. GFP-RGA-1 also localizes in septa from the beginning of its formation, just like CDC-42 and RAC. Thus, RGA-1 could be acting as a GAP for CDC-42 and RAC during septum formation. It was also observed fluorescence spots dispersed in the cytoplasm of germlings, with no specific localization pattern. In contrast, the Rho GAP BEM-3 localizes at the tip of germlings and mature hyphae. Therefore, it is inferred that RGA-1 and BEM-3 may regulate CDC-42 and RAC in a distinctive way.

Keywords: RGA-1, Rho GTPase, Polarized growth.

Dedicatoria

A mi familia...

Agradecimientos

Al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Microbiología por prestar las instalaciones y equipo para la realización del trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo por medio de la beca (340081) otorgada durante los 2 años de estudio del posgrado. Este trabajo fue financiado por el proyecto de ciencia básica SEP-CONACyT CB2011/169154.

A mi directora de tesis la Dra. Ernestina Castro Longoria por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de laboratorio y realizar el presente trabajo de investigación, por su dirección y apoyo.

A mi comité de tesis: a la Dra. Meritxell Riquelme Pérez y la Dra. Carmen Paniagua por sus consejos, revisiones y correcciones en los avances y escrito de tesis, a la Dra. Rocío del Carmen Navarro Olmos por su apoyo y asesoría en cada etapa en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y al Dr. Salomón Bartnicki García por sus sugerencias y apoyo en las presentaciones de avance de proyecto en los seminarios del departamento de Microbiología.

Al técnico la Dra. Olga Callejas Negrete por su asesoría en el uso del equipo de laboratorio y en el presente trabajo. A Guillermo González por mantener en condiciones adecuadas el laboratorio para trabajar.

A mis compañeros de generación: Ivan, Briceida, Lupita, Dulce, Anayatzin, Nayeli, Marco, Ricardo, Pamela, Aimee y Leonardo por su amistad e influir en mi formación desde el inicio de la maestría.

A mis compañeros de laboratorio: Nallely Cano, Leobardo, Juan Manuel, Fausto, Arianne, Raquel, Adriana, Lluvia, Leonora y Marisela que siempre estaban dispuestos a brindar ayuda, sugerencias y por su puesto su amistad.

Tabla de contenido

Resumen	ii
Abstract	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Crecimiento polarizado	1
1.1 Spitzenkörper	1
1.2 Rho GTPasas	2
1.3 Rho GTPasas en hongos	3
1.4 RhoGAPs	4
1.5 RhoGAPs de Cdc42 en levaduras y hongos filamentosos	5
1.6 Antecedentes	5
1.6.2 Biología de <i>Neurospora Crassa</i>	5
1.6.3 Rho GTPasas y GAPs en <i>Neurospora Crassa</i>	7
1.7 Justificación	9
1.8 Hipótesis.....	10
1.9 Objetivos	10
1.9.1 Objetivo general.....	10
1.9.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Análisis bioinformático.....	11
2.2 Cepas utilizadas en este estudio	11
2.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	12
2.4 Biología molecular	12
2.4.1 Diseño de oligonucleótidos.....	12
2.4.2 Extracción de DNA genómico y plasmídico	13
2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
2.4.4 Electroforesis.....	14
2.4.5 Construcción del vector para el etiquetamiento con GFP en el amino terminal de la RGA-1.....	14

2.5 Construcción de cepas de <i>N. crassa</i>	14
2.6 Caracterización fenotípica de las cepas de <i>N. crassa</i>	16
2.6.1 Morfología colonial	16
2.6.2 Tasa de crecimiento	17
2.6.3 Ramificación	17
2.6.4 Conidiación e hifas aéreas.....	17
2.6.5 Biomasa	17
2.6.6 Microscopía de cepas de <i>N. crassa</i> con fluorescencia.	17
Capítulo 3. Resultados	18
3.1. Análisis bioinformático.....	18
3.2. Obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta rga-1$	22
3.3. Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta rga-1$	24
3.3.1 Tasa de crecimiento	24
3.3.2 Producción de conidios e hifas aéreas.	25
3.3.4 Biomasa e índice de ramificación.....	27
3.4. Obtención de la cepa GFP-RGA-1.....	28
3.4.1 Localización intracelular de la RhoGAP RGA-1 en <i>N. crassa</i>	29
3.4.2. Localización de la RhoGAP RGA-1 en la zona apical de las hifas de <i>N. crassa</i>	31
3.4.3. Localización de la RhoGAP RGA-1 en septos de <i>N. crassa</i>	33
3.4.4. Localización de la RhoGAP RGA-1 en germínulas de <i>N. crassa</i>	36
3.5. Localización de las proteínas CDC-42 y RAC en hifas de <i>N. crassa</i>	37
Capítulo 4. Discusión	38
Capítulo 5. Conclusiones	43
Literatura citada	44

Lista de Figuras

Figura	Página
1	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>6
2	Ensayos de actividad <i>in vitro</i> de Rho GTPasas con las Rho GAPs de <i>N. crassa</i>8
3	Casete de reemplazo con <i>nat</i>15
4	Mapa del vector PCCG-N-GFP clonado con el gen de <i>rga-1</i>15
5	Comprobación de la integración de <i>gfp-pccg1::rga-1</i> en His-316
6	Esquema representativo de los dominios de la RhoGAP predictiva RGA-1 de <i>N. crassa</i> y sus ortólogos en otros organismos..18
7	Alineamiento múltiple de la RGA-1 de <i>N. crassa</i> , <i>M. oryzae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. gossypii</i> y <i>S. cerevisiae</i>21
8	Morfología de la cepa heterocarión Δ <i>rga-1</i>22
9	Cruza de la cepa heterocarión Δ <i>rga-1</i>23
10	PCR de comprobación de la cepa mutante homocarión Δ <i>rga-1</i>23
11	Morfología de la cepa homocarión Δ <i>rga-1</i>24
12	Crecimiento radial de la cepa Δ <i>rga-1</i>25
13	Longitud de hifas aéreas de la cepa Δ <i>rga-1</i>26
14	Producción de conidios.....26
15	Producción de biomasa.....27
16	Frecuencia de ramificaciones.....28
17	PCR y purificación del ORF de <i>rga-1</i>28
18	Digestiones del ORF <i>rga-1</i> y pccg-N-GFP29
19	Micrografía de la cepa transformante de <i>N. crassa</i>30
20	PCR de comprobación para la integración de la construcción <i>pccg-n-gfp::rga-1</i>30
21	GFP-RGA-1 en la zona apical de hifas de <i>N. crassa</i>32
22	Serie de tiempo de hifa madura de la cepa marcada, en condiciones de estrés..33
23	GFP-RGA-1 en septos de <i>N. crassa</i>34
24	Serie de tiempo de la formación del septo en hifa de <i>N. crassa</i>35
25	Reconstrucción del septo en 3D con la proteína GFP-RGA-1.36
26	Localización de la GFP-RGA-1 en germínulas de <i>N. crassa</i>36
27	Localización de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC en hifas maduras de <i>N. crassa</i> teñidas con FM4-6437

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Lista de cepas y plásmidos	11
2 Oligonucleótidos	13
3 Porcentajes de identidad	22

Capítulo 1. Introducción

1.1 Crecimiento polarizado

Una de las características principales de los hongos filamentosos y dimórficos es que tienen la capacidad de crecer polarizadamente extendiendo sus hifas o filamentos con la finalidad de explorar y colonizar nuevos sustratos en busca de nutrientes. En este proceso la célula, o espora en este caso, termina de crecer de manera isotrópica para entrar a una etapa de crecimiento apical que le permite desarrollar una morfología tubular, que en primera instancia es llamado tubo germinativo, y una vez que comienza a extenderse se genera una hifa (Wendland y Philippsen, 2001; Momany, 2002; Riquelme, 2013).

El establecimiento de la polaridad requiere de una maquinaria morfogenética que es reclutada a sitios específicos en la membrana celular del hongo formando un eje de polarización durante la germinación de la espora. En levaduras esto permite la separación de la célula madre e hija y posteriormente se reanuda el crecimiento isotrópico. Sin embargo, en hongos filamentosos se mantiene este eje de polaridad para que las hifas sigan extendiéndose de manera apical (Momany, 2002).

1.1 Spitzenkörper

Unos de los componentes importantes para el crecimiento polarizado en hongos filamentosos es el Centro Suministrador de Vesículas (VSC, por sus siglas en inglés), que se encuentra en la zona apical de las hifas y que, como su nombre lo indica, suministra o distribuye las vesículas hacia la punta de las hifas (Bartnicki et al., 1989).

El Spitzenkörper (SPK), una estructura en las puntas de las hifas que se encuentra en hongos filamentosos como *N. crassa*, parece estar estrechamente relacionado con el VSC por su posicionamiento tan similar (Bartnicki et al., 1989). Por medio de microscopía electrónica de transmisión se ha observado que la conformación del Spitzenkörper es un núcleo de microvesículas (quitosomas), microfilamentos de actina, ribosomas y un material amorfo sin caracterizar, rodeado por un cúmulo de macrovesículas (Girbardt, 1969; Bourett y Howard, 1981; Riquelme et al., 2011). Se ha propuesto que el Spitzenkörper proporciona las vesículas, y por lo tanto, enzimas y material de membrana para sintetizar nueva pared celular en los sitios de crecimiento, para permitir el crecimiento de la hifa (Bartnicki et al., 1989; Riquelme et al., 1998).

1.2 Rho GTPasas

Las Rho GTPasas pertenecen a la superfamilia de las pequeñas Ras GTPasas, la cual está compuesta por más de 130 miembros, divididos en las subfamilias: Ras, Rho, Arf/Sar1 y Rab/Ran (Riching y Keely, 2014; Hanna y El-Sibai, 2013). Las Ras GTPasas en general participan en la transducción de señales de varias funciones celulares, tales como el ciclo celular, la diferenciación celular, la organización del citoesqueleto y el transporte y secreción de proteínas (Settleman et al., 1992).

Las Rho GTPasas son pequeñas proteínas G monoméricas con sitio de unión a GTP, con un tamaño entre los 20 y 40 KDa. Tienen la habilidad de regular una gran cantidad de respuestas celulares. En mamíferos controlan rutas de señalización para la generación de protrusiones de membrana (filopodia, lamelopodia y fibras de estrés), la polimerización de actina, activación de cinasa, transcripción de genes o localización de proteínas (Symons, 2004; Riching y Keely, 2015). Como miembros de la superfamilia de las pequeñas GTPasas Ras, las Rho GTPasas se caracterizan por ciclar entre un estado inactivo, unidas a GDP, en el cual se encuentran secuestradas en el citosol por GDI, y un estado activo, unidas a GTP, que les permite unirse a la membrana plasmática. En el estado unido a GTP, las GTPasas pueden interactuar con efectores y activar rutas de señalización río abajo.

Para mediar el ciclo de encendido y apagado de las Rho GTPasas, son necesarias 3 clases de proteínas reguladoras; las intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEFs), las cuales catalizan la reacción de intercambio de GDP a GTP; las proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAPs), las cuales catalizan la reacción de hidrólisis de GTP; y por último los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), los cuales inhiben la disociación de GDP para evitar la activación espontánea (Hoffman et al., 2000; Jaffe & Hall, 2005). Además, pueden ser reguladas por varios procesos postraduccionales, como fosforilación, isoprenilación, ubiquitinación y SUMOilación (Murali y Rajalingam, 2013).

Las Rho GTPasas son sintetizadas como proteínas citosólicas, con la capacidad de anclarse a membrana por medio de modificaciones postraduccionales en el motivo C-terminal CAAX, como la prenilación, proteólisis y metilación de carboxilo. De esta manera, el extremo C-terminal adquiere un grupo hidrofóbico, que le permitirá anclarse a la membrana en un sitio específico. La localización de las GTPasas en la membrana es crítica para su funcionamiento, obedeciendo patrones de unión que les permitirán interactuar con sus correspondientes activadores y efectores (Symons, 2004).

Las Rho GTPasas juegan un papel importante en la regulación de la polaridad tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Los sitios de crecimiento polarizado se establecen por marcadores corticales,

donde las GTPasas traducen y amplifican las señales para generar cambios en el citoesqueleto y dirigir la fusión de membranas por vesículas a la punta de la hifa permitiendo que se siga extendiendo apicalmente (Momany, 2002; Sudbery, 2008).

Las proteínas Rho (1-4), Cdc42 y Rac pertenecen a la familia de las Rho GTPasas, en las que varios miembros de esta familia están involucrados en la reorganización del citoesqueleto de actina, de manera que pueden regular la estructura y movilidad celular (Murali, y Rajalingam, 2013; Tanaka y Takai, 1998). Cdc42 participa de manera conservada en varios organismos eucariotas, con la función de regular la polaridad celular y el citoesqueleto de actina. Los miembros de ésta familia son de los más estudiados, y se ha mostrado que estimulan la formación de filopodia en células de mamíferos, además de estar involucradas en el mantenimiento de la polaridad celular (Murali, y Rajalingam, 2013; Heasman y Ridley, 2008).

1.3 Rho GTPasas en hongos

Las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son de los organismos modelo más utilizados para el estudio sobre el control del crecimiento polarizado, y se han reportado gran cantidad de GTPasas involucradas en dicho proceso. Una de las más estudiadas es la Rho GTPasa Cdc42 que en *S. cerevisiae* es de vital importancia durante la gemación para formar la célula hija, y la localización de Cdc42p en los sitios de crecimiento es crítica para que la yema pueda emerger y se establezca el crecimiento polarizado (Adams et al., 1990; Ziman et al., 1993). Además de Cdc42p, *S. cerevisiae* cuenta con las Rho GTPasas Rho1-5, algunas de las cuales se han reportado involucradas en el crecimiento polarizado. Por ejemplo, Rho1p estimula la síntesis de pared celular durante el mantenimiento de la polaridad, mientras que Rho3p está involucrada en dirigir las vesículas secretoras a la membrana plasmática (Cabib et al., 1998; Adamo et al., 1999). A Rho4p, se le ha atribuido un rol en la organización de la actina polarizada y en el mantenimiento del crecimiento polarizado de la yema (Matsui et al., 1992).

En la levadura *S. pombe*, también se encuentran las Rho GTPasas anteriormente mencionadas, Cdc42 y Rho1-5, que tienen funciones similares a las establecidas en *S. cerevisiae*. Cdc42 en *S. pombe* es esencial para el hongo y juega un papel importante en el crecimiento polarizado (Miller y Johnson, 1994). Rho1 está involucrada en la localización de parches de actina, en la polaridad celular, septación y síntesis de pared celular (Nakano et al., 1997). En el caso de Rho3, parece regular la separación celular por medio de la septación (Wang et al., 2003). Mientras que Rho4, además de estar involucrada en la septación, también es importante para el control de la morfología celular (Nakano et al., 2003).

A diferencia de las levaduras, los hongos filamentosos (a excepción de *Ashbya gossypii*) y dimórficos, además de Cdc42 tienen un homólogo de Rac1. Las Rho GTPasas Cdc42 y Rac son necesarias para regular el crecimiento polarizado en esta clase de hongos, ya que juegan funciones distintas durante la morfogénesis y crecimiento apical, por lo que no puede ser sustituida una por otra, como se muestra en *N. crassa*. Sin embargo las mutantes nulas de estas GTPasas no son letales pero muestran aberraciones en el crecimiento polarizado (Lichius et al., 2014; Araujo-Palomares et al., 2011). En *Aspergillus niger*, la doble mutante de Cdc42 y Rac es letal, ya que ambas Rho GTPasas son necesarias para el crecimiento y morfogénesis (Kwong et al., 2011). En el caso del hongo filamentosos *A. gossypii*, el cual no tiene un homólogo de Rac1, la mutante nula de Cdc42 es letal ya que esta proteína es la única reguladora esencial para el cambio del crecimiento isotrópico a filamentosos (Wendland y Philippsen, 2001). También se ha descrito a Cdc42 y Rac como formadores del eje primario de la polaridad en *Aspergillus nidulans*, siendo además Cdc42 la encargada de la formación de ramificaciones laterales (Virag et al., 2007). En el hongo dimórfico *Candida albicans*, Rac y Cdc42 son importantes para el crecimiento filamentosos, sin embargo tienen diferentes roles en el desarrollo de este hongo.

1.4 RhoGAPs

Las proteínas GTPasas en general tienen una actividad de hidrólisis de GTP bastante lenta, por lo que, las proteínas GAPs son requeridas para acelerar la reacción y promover la formación del estado unido a GDP, la cual es la conformación inactiva (Bos et al., 2007).

Las GAPs tienen un dominio conservado llamado "Dominio GAP" de 20-50 KDa, y otros dominios que permiten su interacción con otras proteínas o lípidos. La actividad de las GAPs pueden estar regulada por fosforilación, interacción con proteínas o lípidos, translocación subcelular y degradación proteolítica (Bernards et al., 2004). El dominio GAP contiene un dedo de arginina el cual se inserta en el sitio activo de la GTPasa correspondiente, creando una maquinaria dentro del sitio activo que hidroliza el GTP. El resto de los aminoácidos se localizan en dos regiones del estado unido a GTP, "Interruptor 1" e "Interruptor 2", donde realizan un ataque nucleofílico con una molécula de agua, el dedo de arginina estabiliza un residuo de glutamina en el "Interruptor 2" para mantener la molécula de agua en la posición correcta, de lo contrario la hidrólisis de GTP no se lleva a cabo (Bourne, 1997).

1.5 RhoGAPs de Cdc42 en levaduras y hongos filamentosos

Se han identificado más de 70 GAPs en eucariotas, desde levaduras a mamíferos (Tcherkezian y Philippsen, 2001). En levaduras, se han descrito las siguientes GAPs que regulan a Cdc42: Bem3p, Rga1p, Rga2p, Lgr1p y Rgd1p. (Roumanie et al., 2001)

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que las GAPs que tienen actividad compartida sobre Cdc42 son: Bem3 y Rga1, las cuales tienen dominios GAP muy similares (Smith et al., 2002). Rga1 contiene dos dominios LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) en tándem que se unen a iones de zinc para mediar interacciones proteína-proteína, mientras que Bem3 contiene el dominio "Pleckstrin homology" (PH), el cual se cree está implicado en permitir la interacción con proteínas (Smith et al., 2002; Stevenson et al., 1995; Liu et al., 1988). En el caso de *S. pombe* la GAP Rga4 regula negativamente a Cdc42 y Rho2; no se han encontrado otras GAPs para Cdc42 en este hongo (Cansado et al., 2010). En *C. albicans* las GAPs predictivas para Cdc42, Bem3 y Rga2, parecen estar involucradas en la regulación tanto del crecimiento polarizado como en la localización del anillo de septinas (Court and Sudbery, 2007).

En el hongo filamentosos y patógeno de plantas, *Magnaporthe oryzae*, se ha demostrado por medio de ensayos de doble híbrido e inmunoprecipitación que tanto MoRga1 y MoLrg1 pueden interactuar con las Rho GTPasas MoCdc42 y MoRac1, lo que sugiere que actúan como GAPs para éstas (Ye et al., 2014).

1.6 Antecedentes

1.6.1 *Neurospora crassa*

N. crassa es uno de los hongos filamentosos más utilizados como modelo representante de los organismos eucariotas, para estudiar una gran variedad de procesos celulares. Su genoma está completamente secuenciado, por lo que se pueden realizar estudios para describir o comprobar funciones de componentes celulares a nivel de gen, RNA mensajero y/o proteína. Este hongo crece rápidamente y es fácil de manipular genéticamente integrando DNA foráneo (Deacon y Deacon, 2006; Esser, 2006).

1.6.2 Biología de *Neurospora Crassa*

El ascomiceto *N. crassa*, es un hongo filamentosos heterotálico con dos tipos de cepas compatibles de apareamiento *mat a* y *mat A*, los cuales están controlados por un solo locus con los alelos alternativos *a* y *A*. Estos son requeridos para la reproducción sexual, que se lleva a cabo a través de una estructura

proveniente del protoperitecio llamada hifa receptora o tricógina, la cual es fertilizada por una espora masculina, el espermatio, perteneciente del tipo de apareamiento opuesto. El espermatio puede ser un macroconidio, microconidio o fragmento de hifa que al fusionarse con la tricógina, inicia la formación del peritecio. Las células que posteriormente formarán ascas se separan en septos, donde contendrán dos núcleos haploides, uno de cada tipo de apareamiento. Las ascas comienzan a elongarse una vez que se forma el diploide por la fusión de los dos núcleos, en cada asca ocurre la meiosis, produciendo 4 núcleos haploides que realizarán mitosis, formando un asca con 8 núcleos alineados empaquetados en ascosporas (Figura 1) (Davis, 2000; Borkovich et al, 2004). Durante el ciclo asexual, se producen esporas o macroconidios que contienen de uno a varios núcleos haploides, los cuales germinan y crean un tubo germinativo que se extiende formando hifas que permanecen creciendo apicalmente, generando ramificaciones para producir micelio. Una vez se acaban los nutrientes en el medio, las hifas comienzan a ramificarse formando hifas aéreas que se segmentan y germinan produciendo conidios que colonizaran nuevos sustratos (Figura 1) (Davis, 2000).

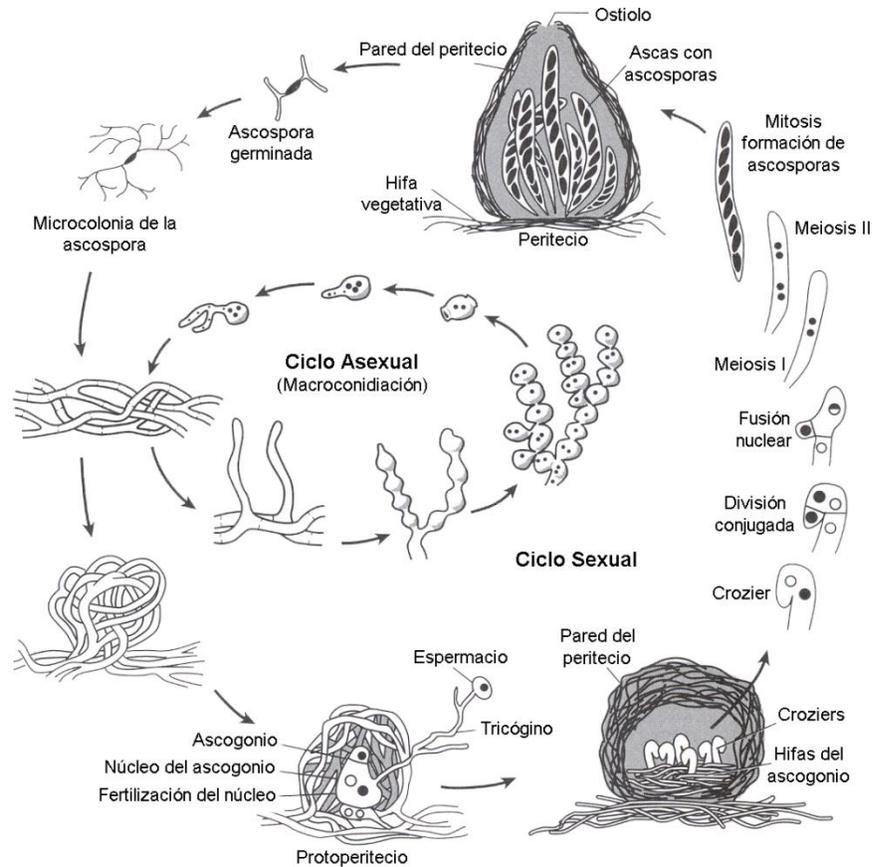


Figura 1. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Se representa el desarrollo asexual con el desarrollo de macroconidios y su germinación, a partir de hifas aéreas del micelio. El ciclo sexual, desde la formación del protoperitecio, la fertilización de la tricógina y la producción de ascas y ascosporas (Davis, 2000).

1.6.3 Rho GTPasas y GAPs en *Neurospora Crassa*

En el genoma de *N. crassa* codifican 6 Rho GTPasas, las cuales son: CDC-42, RAC y las RHO (1-4). Se han descrito la mayoría de estas GTPasas en *N. crassa*; sin embargo, hay poca información o nula sobre la función que desempeña RHO3. Richthammer y colaboradores en el 2012, asignan a RHO1 una función en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, además de estar involucrada en la organización del citoesqueleto de actina a través de la interacción con la formina BNI1. Adicionalmente, sugieren que RHO2 tiene una función redundante con RHO1 en el mantenimiento de la pared celular. Cabe mencionar, que para RHO1 ya se ha caracterizado a su GAP específica, LGR1, esencial para la extensión apical de la punta de la hifa, restringe la formación excesiva de ramificaciones y está involucrada en la determinación del tamaño de los compartimentos de la hifa (Vogt et al., 2008).

RHO4, parece estar involucrada en la iniciación del proceso de septación, debido a que la mutante nula de *rho-4* en *N. crassa* no genera septos. También se sugiere que tiene un papel en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, ya que en la mutante de RHO4 activa se observan puntas de hifas lisadas, además de generar mayor cantidad de septos (Rasmussen et al., 2005).

En el caso de las Rho GTPasas restantes, se ha identificado a CDC-42 como un importante componente para el establecimiento de la polaridad, y por otro lado RAC está involucrada primordialmente en el mantenimiento de la polaridad. Las mutantes nulas de RAC y CDC-42 no son letales; sin embargo, muestran grandes defectos en la morfología de las hifas como hinchazón e hiper-ramificación, respectivamente. Además, la doble mutante de éstas Rho GTPasas es letal, ya que las ascosporas germinan de manera apolar y mueren, de manera similar a la mutante de CDC-24, la cual es el regulador positivo o GEF de ambas Rho GTPasas (Araujo-Palomares et al., 2011). Sin embargo, como se explica anteriormente, las Rho GTPasas requieren ciclar entre un estado activo y uno inactivo para llevar a cabo correctamente su función. Así que, para elucidar el panorama completo de la regulación de estas Rho GTPasas, es necesario identificar y estudiar a las GAPs que las regulan.

Se han realizado ensayos de actividad *in vitro* de las GTPasas de *N. crassa* con las GAPs predictivas, y se lograron identificar tres RhoGAPs que tienen actividad sobre CDC-42 y RAC: RGA-1, BEM-3 y RGD-1. Además, RGA-1 y BEM-3 comparten actividad sobre la Rho GTPasa RHO3 (Figura 2).

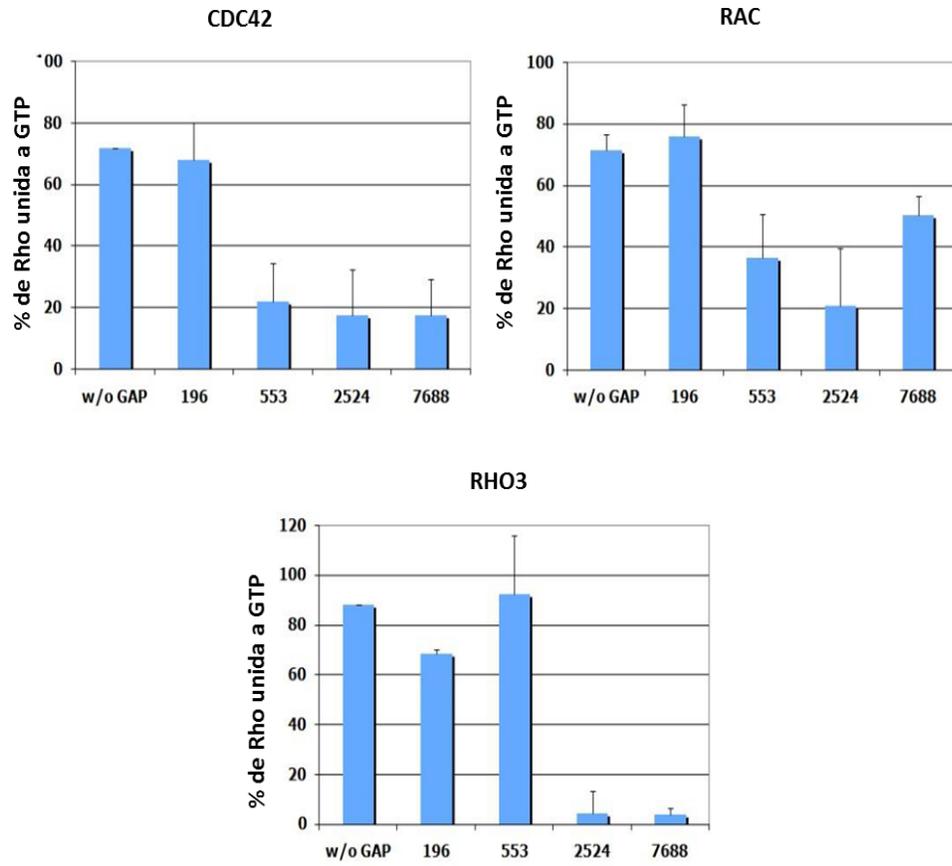


Figura 2. Ensayos de actividad *in vitro* de Rho GTPasas con las Rho GAPs de *N. crassa*. En las gráficas se observa la capacidad de las RhoGAPs predictivas NCU00553/RGD-1, NCU02524/BEM-3 y NCU07688/RGA-1 de hidrolizar el GTP en el sitio activo de las Rho GTPasas CDC-42, RAC y RHO3. W/o GAP/Control sin GAP. (Extraído de Ludwig, 2015).

1.7 Justificación

De acuerdo a lo reportado en levaduras y al análisis de actividad *in vitro* en *N. crassa* (Ludwig, 2015), se infiere que las RhoGAPs BEM-3, RGD-1 y RGA-1 regulan a las Rho GTPasas CDC-42 y RAC, componentes esenciales en el crecimiento polarizado en hongos filamentosos.

Resultados anteriores indican que las RhoGAPs BEM-3 y RGD-1 son importantes en la regulación del crecimiento de *N. crassa* ya que se observa que la ausencia de cada una de estas proteínas afecta de manera distinta el desarrollo del hongo (Castro-Longoria, sin publicar).

Por todo lo anterior es importante conocer qué efecto tiene la ausencia de la proteína RGA-1, ya que estos datos nos sugerirán si la regulación de CDC42 y RAC es diferente en cada etapa de desarrollo o si la actividad de RGD-1, BEM-3 y RGA-1 es redundante.

1.8 Hipótesis

Debido a que la RhoGAP RGA-1 podría estar implicada en la regulación negativa de CDC-42, al igual que BEM-3 y RGD-1, la ausencia de tal proteína provocaría defectos en la morfogénesis y crecimiento polarizado.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Determinar el papel de la Rho GAP RGA-1 en el desarrollo de *N. crassa*.

1.9.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la delección de *rga-1* en el crecimiento de *N. crassa*
- Determinar la localización intracelular de la Rho GAP RGA-1.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis bioinformático

Se analizó la secuencia peptídica de la proteína hipotética RhoGAP RGA-1 (NCU07688) de *N. crassa* obtenida de la base de datos de FungiDB Fungal and Oomycete Genomics Resources (<http://fungidb.org/fungidb/>), realizando un BLAST (blastp) desde la página web del NCBI para obtener los dominios conservados en este tipo de proteínas. Por otro lado, se llevó a cabo un alineamiento múltiple en Clustal Omega con las secuencias de aminoácidos del GeneBank de genes ortólogos de RGA-1 en los siguientes organismos: *S. cerevisiae* (NP_014770.1), *M. oryzae* (EHA47270.1), *C. albicans* (AOW28971.1) y *A. gossypii* (ACR205W) para obtener el porcentaje de identidad e identificar aminoácidos conservados.

2.2 Cepas utilizadas en este estudio

Las cepas y plásmidos que se utilizaron en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de cepas y plásmidos. Descripción y fuente de las cepas utilizadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente
ORS-SL6a	mat a	FGSC #4200
OR74A	mat A	FGSC #9013
Δ rga-1	Δ rga-1::nat ^R	Presente estudio
9718	Δ mus-51::bar ⁺ mat a	FGSC #9718
9717	Δ mus-51::bar ⁺ ; his-3; Mat A	FGSC #9717
GFP-RGA-1	Δ mus-51::bar ⁺ ; his-3 ⁺ ; Mat A; pccg::gfp::rga-1	Presente estudio
YFP-CDC-42	pgpd-yfp-cdc-42::his-3; Δ cdc-42::hphR A	Araujo-Palomares, 2011
YFP-RAC	Pgpd-yfp::rac::his-3 ⁺	Araujo-Palomares, 2011
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	Invitrogen
Plásmidos	Genotipo	Fuente
pCCG::N-GFP	Pccg1::sgfp+::8xGly	Honda and Selker, 2009
pETNaTR	Ptrpc::natR:pgpd::trpC	Feldbürgg, 2014

2.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas de *N. crassa* se cultivaron a 30°C en Medio Mínimo de Vogel (MMV líquido) (Vogel, 1956) que contiene sales de Vogel 1X, sacarosa 1.5%, H₂O destilada, y agar al 1.8% si se requiere medio sólido. En el caso de las cepas con resistencia a nourseotricina se cultivaron en MMV sólido suplementado con nourseotricina (100 µg/mL). Para el crecimiento de la cepa FGSC# 9717 con auxotrofia a histidina el medio MMV se suplementó con L-histidina a una concentración de 0.5 mg/mL.

Las cruas entre cepas se realizaron por inducción al ciclo sexual cultivándolas en Medio Sintético de Cruza (MSC) (Westergaard and Mitchel, 1947) conteniendo KNO₃ (0.1%), KH₂PO₄ (0.1%), MgSO₄-7H₂O, CaCl₂ (0.01%), NaCl (0.01%), biotina (5X10⁻⁷%), elementos traza (0.02%) y agar (1.8%). Primero, se sembraron los conidios de un tipo de apareamiento a 25°C por 24 horas, para la formación de protoperitecios. Posteriormente, se inocularon los conidios del tipo de apareamiento opuesto y se incubó a 25°C por 14-21 días en oscuridad. Las ascosporas obtenidas se activaron a 60°C por 1 hora, se inocularon en MMV sólido, y se incubaron a 30°C de 12-14 horas.

Para aislar colonias transformantes se utilizó el medio FGS (fructosa, glucosa y sorbosa) conteniendo sales de Vogel 1X, fructosa (0.05%), glucosa (0.05%), L-sorbosa (2%) y agar (1.5%).

Las cepas de *E. coli* DH5α se cultivaron a 37°C en medio LB (Luria Bertani) el cual contiene bacto-triptona (1%), extracto de levadura (0.05%), NaCl (1%) y agar (1.5%). Para la selección de colonias transformantes se utilizó medio LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

2.4. Biología molecular

2.4.1 Diseño de oligonucleótidos

Se obtuvo la secuencia del gen para la proteína putativa RGA-1 por medio de la base de datos de "The Broad's Institute Neurospora Crassa". Se procedió a diseñar un par de oligonucleótidos para amplificar el marco abierto de lectura para *rga-1*. A cada oligo se le añadió la secuencia de un sitio de restricción, una para el oligo Forward y otra diferente para el oligo Reverse, tal como se muestra en el Tabla 2.

También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de un 1Kb río arriba y río abajo del marco abierto de lectura de *rga-1*, además de un par de oligonucleótidos para amplificar el gen de resistencia a nourseotricina (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos diseñados en el presente estudio.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')
<i>rga-1</i>	Fw–A ggcgcgcc ATG GAT GAC TAT- (Ascl) Rv–GG actagt T CCT TAT TCC TCA AAG- (SpeI)
Rga-1 (1Kb)	Fw–CGCCAAACTGAAGGTGCCTAC- Rv–GCTGGCTATGTGCTCGAAAGTGG-
natR	Fw–GCATTTTTTGGGCTTGGCTGGAGCTAGTGG- Rv–CAGGGGCAGGGCATGCTCATGTAGAGC-
3' RGA-1 natR	Fw– GCTCTACATGAGCATGCCCTGCCCTGGGAGTTAGCGAGCGCGTGAGC-
5' RGA-1 natR	Rv–GCTCCAGCCAAGCCCAAAAAGGTTGCGGTGTTACCC-
Fw 5' UTR RGA-1	Fw-CTAGACCGACGGAGCTGTTGAC
Rv en RGA-1 (5')	Rv-CGCCGTCGATTCTTCTTGTCTG
pMR12	Fw-ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAG
pMR13	Rv-ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAG

2.4.2 Extracción de DNA genómico y plasmídico

Para la extracción de DNA genómico de *N. crassa* se creció micelio en medio MMV líquido durante 72h en total oscuridad. Posteriormente, se filtró, se secó el micelio por liofilización (liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5) para ser triturado con mortero y pistilo. Por último, se utilizó el kit de extracción de DNA genómico ZR Fungal/Bacteria DNA Miniprep (ZYMO RESEARCH) con el protocolo del fabricante.

La extracción de DNA plasmídico de las células de *E. coli* DH5α se llevó a cabo con el Kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) y el protocolo especificado en el mismo.

2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de DNA se llevaron a cabo con la técnica de PCR en un termociclador T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), utilizando la enzima *Ex taq* DNA Polymerase (TaKaRa) en una reacción con las condiciones especificadas por el proveedor. Las condiciones estándar del ciclo de PCR fueron las siguientes: 95 °C por 5 min para la temperatura inicial, 30 ciclos de: 95 °C por 30 s para la desnaturalización, 30 segundos a una temperatura de alineamiento que varió de 52 a 60 °C

dependiendo de la T_m (melting temperature) de los oligonucleótidos utilizados y 72 °C con un tiempo de extensión a una razón de 1 min/Kb del fragmento a amplificar. Después de los 30 ciclos se dejó la reacción 10 min a 72 °C para una última extensión y, finalmente a 4 °C por tiempo indefinido hasta retirar la reacción.

2.4.4 Electroforesis

Para confirmar el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR y observar la integridad del DNA extraído, se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, con buffer TAE 1X (Tris base 40mM-Ácido acético 20mM-EDTA 5mM, pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. Las condiciones de corrida para los geles fueron: voltaje constante de 85V durante 40-50 minutos en una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, BIO-RAD) utilizando un regulador PowerPac Basic™ de BIO-RAD. Se utilizó el buffer de carga Gel Loading Dye Purple (6X) de BioLabs y los marcadores de peso molecular de BIO-RAD EZ Load 1 kb y PROMEGA 1kb DNA Ladder Molecular Weight Marker 250bp/10,000bp. Por último, el DNA en los geles se visualizó con luz UV en el transiluminador Molecular imager GelDoc Xr de BIO-RAD.

2.4.5 Construcción del vector para el etiquetamiento con GFP en el amino terminal de la RGA-1

Se amplificó por PCR el gen de *rga-1* por medio de los oligonucleótidos Fw y Rv de la Tabla 2. Se corrió por electroforesis el producto de PCR y se cortó la banda correspondiente al gen de *rga-1* para purificar por el Kit de extracción de DNA en gel Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH). Posteriormente, se realizó una digestión enzimática con las enzimas de restricción *Ascl* y *SpeI* al producto de PCR purificado del gen *rga-1* y al vector pCCG-N-GFP. Después de la digestión, se purificó el producto de PCR y el vector para someterlos a una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligase de New England utilizando el protocolo del proveedor. El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α por choque térmico y se sembraron en medio LB con ampicilina. Se seleccionaron las colonias transformantes y se realizó extracción de DNA plasmídico (Miniprep), para después someterlos a reacciones de digestión y analizar por electroforesis el patrón de bandas correspondiente a la construcción del vector *pccg-n-gfp::rga-1*.

2.5 Construcción de cepas de *N. crassa*

Para la obtención de la cepa mutante $\Delta rga-1$ se transformaron 125×10^6 conidios de la cepa FGSC# 9718 por medio de electroporación con el casete de reemplazo con el gen de resistencia a nourseotricina.

La construcción del casete de reemplazo se llevó a cabo amplificando a partir de DNA genómico de la cepa #4200 las regiones 5' UTR río arriba del codón de inicio del gen de *rga-1*, la región 3' UTR después del codón de paro del gen, y la amplificación del gen de resistencia a nourseotricina a partir del vector pETNaTR. Los fragmentos 5' UTR y 3'UTR contienen fragmentos del gen de nourseotricina para poder unir estos fragmentos con dicho gen en una PCR de fusión (Figura 3).

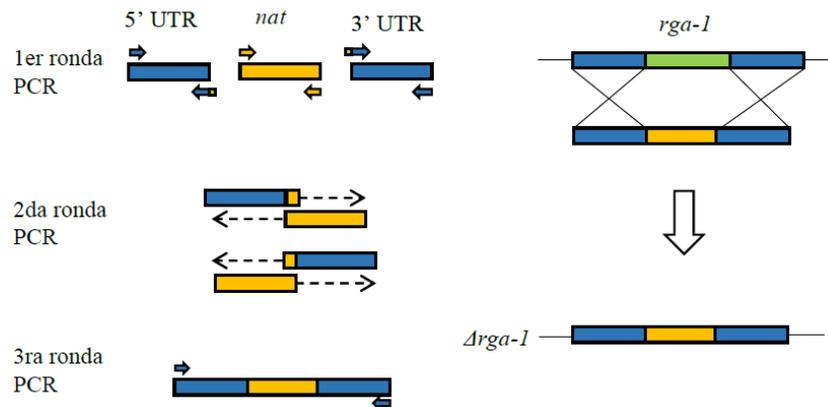


Figura 3. Casete de reemplazo con *nat*. Rondas de PCR para la construcción del casete de reemplazo con el gen de nourseotricina.

Para la obtención de la cepa con la proteína RGA-1 etiquetada con GFP, se transformaron conidios de la cepa FGSC# 9717 con la construcción *pccg-n-gfp::rga-1* (Figura 4).

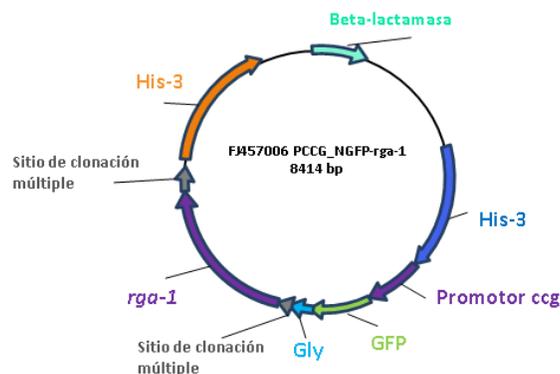


Figura 4. Mapa del vector PCCG-N-GFP clonado con el gen de *rga-1*. El vector contiene el gen de resistencia a ampicilina, el gen la proteína verde fluorescente bajo el promotor constitutivo ccg, y los fragmentos 5' y 3' del sitio de histidina en *N. crassa* (12,325 bp).

Los conidios fueron lavados 2 veces con sorbitol 1M y se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm, 4°C. Después del lavado, se agregaron 10 μ L de la ligación del plásmido *pccg-n-gfp::rga-1* ó 5 μ g del casete de

reemplazo, según el caso, y se incubó 30 min a 4°C. Se pasaron 40 µL de la muestra a una cubeta de electroporación (0.2 cm) para darles un pulso eléctrico con los siguientes parámetros: 1.5 Kvolts, 600 Ω y 25 µF. Se les añadió inmediatamente 960 µL de sorbitol 1M, y se mezcló en un tubo Falcon conteniendo 15 mL de solución de recuperación, la cual contiene 2% de sales de vogel. Se incubó a 30°C y 100 rpm por 2 horas. Posteriormente, se mezcló con 15mL de medio FIGS y se plaqueó en una caja Petri conteniendo 30 mL de medio para aislar colonias (FIGS con agar al 2%) suplementado con 100 µg/mL de nourseotricina (sólo en el caso de la cepa mutante), y se incubaron a 30°C por 3 días.

2.6 Comprobación de la integración en His-3 de la construcción *pccg-n-gfp::rga-1*

Se realizó un PCR con los oligos pMR12 y pMR13 (Tabla 2) para comprobar que el gen de *rga-1* con la secuencia de la GFP en el N-terminal se integró en el sitio his-3, con DNA genómico de las cepas con fluorescencia (Figura 5).



Figura 5. Comprobación de la integración de *gfp-pccg1::rga-1* en His-3. Esquema representativo donde se señalan los sitios de la amplificación con los oligos pMR12 y pMR13.

2.6 Caracterización fenotípica de las cepas de *N. crassa*

Cada ensayo de la caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta rga-1$ se llevó a cabo tres veces y por triplicado, utilizando como control y punto de comparación la cepa parental #9718.

2.6.1 Morfología colonial

Se inocularon 1×10^4 conidios de cada cepa contenidos en un volumen de 10 µL en el centro de cajas Petri con MMV sólido. Se incubaron a 30 °C por 24 h, y se capturaron imágenes digitales.

2.6.2 Tasa de crecimiento

Para obtener la tasa de crecimiento de las cepas de *N. crassa*, se procedió a inocular 1×10^4 conidios de cada cepa contenidos en un volumen de 10 μL en cajas Petri con MMV. Se monitoreó y marcó la superficie de la colonia cada 2 h a partir de las 12 h de incubación a 30 °C. Las mediciones se llevaron a cabo tomando en cuenta la distancia desde el inóculo, en un extremo de la caja Petri, hasta cada marca de la superficie colonial. Para cada marca se midieron 10 transectos perpendiculares a lo largo de la superficie colonial, y se promedió su crecimiento.

2.6.3 Ramificación

Se inocularon 1×10^4 conidios de cada cepa de *N. crassa* en un extremo de una caja Petri con MMV y se incubaron a 30 °C por 20-22 h. Se contaron el número de ramificaciones que se produjeron en los 500 μm apicales de 30 hifas de cada cepa.

2.6.4 Conidiación e hifas aéreas

Para obtener la producción de conidios generada por cada cepa, se inocularon 1×10^4 conidios en tubos de borosilicato con MMV. Se incubaron tres días en oscuridad y dos días en luz a 30 °C. Se recuperaron los conidios en 1 mL de agua destilada estéril, agitando con vortex para desprender los conidios. Se contaron los conidios producidos utilizando una cámara de Neubauer.

2.6.5 Biomasa

La biomasa se obtuvo a partir de 1×10^4 conidios inoculados en matraces de 250 mL con 50 mL de MMV líquido, incubados a 30 °C por 48 h. Se filtró y secó el micelio y se liofilizó por 24 h, finalmente se midió el peso seco.

2.6.6 Microscopía de cepas de *N. crassa* con fluorescencia.

Las cepas que presentaron fluorescencia por la expresión de la proteína RGA-1 etiquetada con GFP (Green fluorescent protein) se observaron en el microscopio confocal Olympus Fluoview FV-1000 con un filtro de excitación de 488 nm, emisión de 500-550 nm y un objetivo PLAN apocromático de 60X/1.4. Las muestras de *N. crassa* fueron tomadas a partir de cajas inoculadas con MMV sólido al 1.5% e incubadas a 30 °C, 14-16 h. Se realizaron cortes en el agar tomando parte de la periferia de la colonia. El bloque obtenido se montó sobre un cubre objetos de manera invertida (Hickey et al. 2005) y se tomaron imágenes y videos por medio del programa FV10-ASW 4.2 Viewer.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Análisis bioinformático

La secuencia de aminoácidos de la proteína predictiva RGA-1 (NCU07688) de *N. crassa* presenta dos dominios LIM en el extremo amino terminal y el dominio RhoGAP en el extremo carboxilo, los cuales son muy conservados en estas proteínas, tal como se observa en los ortólogos en *S. cerevisiae*, *M. oryzae*, *C. albicans* y *A. gossypii* que han sido reportados como RGAs anteriormente (Figura 6).

El alineamiento múltiple reveló que las regiones con mayor identidad en las secuencias peptídicas se encontraban en los extremos amino y carboxilo (Figura 7), acorde a la posición de los dominios conservados LIM y RhoGAP. Dentro del dominio RhoGAP se logró identificar el dedo de arginina conservado en GAPs, el cual es utilizado para promover la hidrólisis del GTP en el sitio activo de las GTPasas.

El porcentaje de identidad obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia peptídica de la RGA-1 (NCU07688) con los ortólogos se muestra en la Tabla 3. El mayor porcentaje de identidad se obtuvo con la RGA-1 de *M. oryzae* (63.76%), mientras que para *C. albicans*, *A. gossypii* y *S. cerevisiae* fue de 29.58%, 27.87% y 25.58%, respectivamente.

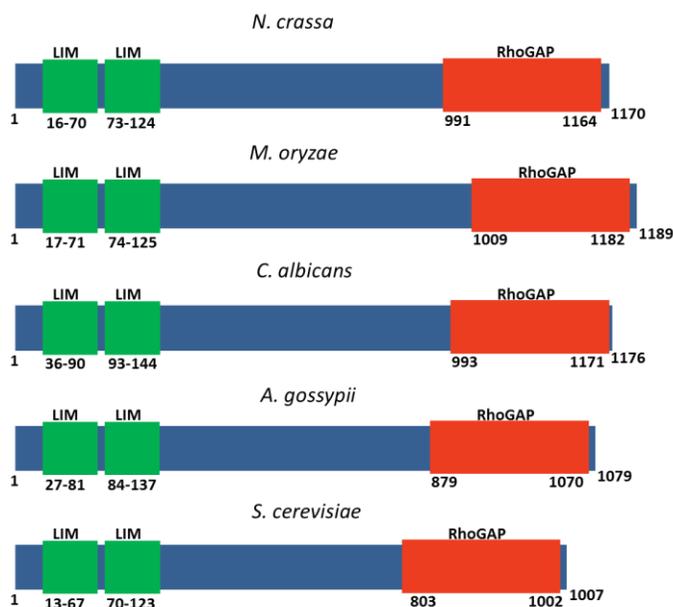


Figura 6. Esquema representativo de los dominios de la RhoGAP predictiva RGA-1 de *N. crassa* y sus ortólogos en otros organismos. Todas las RGA-1 presentan 2 dominios LIM en tándem en el extremo N-terminal y un dominio RhoGAP en el extremo C-terminal, tal como la RGA-1 predicha de *N. crassa*.

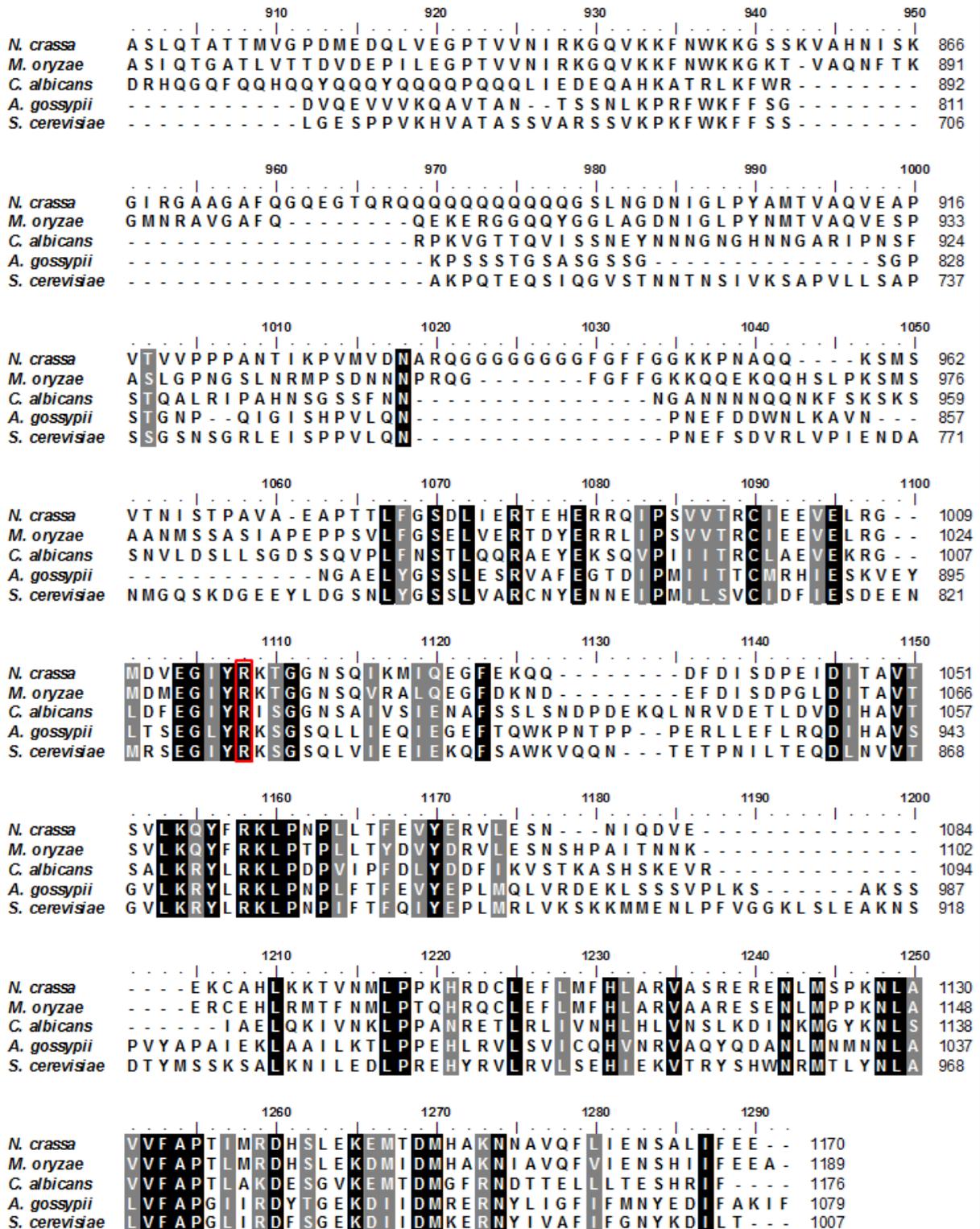


Figura 7. Alineamiento múltiple de la RGA-1 de *N. crassa*, *M. oryzae*, *C. albicans*, *A. gossypii* y *S. cerevisiae*. Fondo negro y gris indican amino ácidos idénticos y similares, respectivamente. El recuadro rojo señala la arginina (R) conservada en el dominio RhoGAP de las RGA-1.

Tabla 3. Porcentajes de identidad. Valores obtenidos a partir del alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de los ortólogos de la RGA-1 de *N. crassa* en otros organismos.

RGA-1	<i>N. crassa</i> % identidad
<i>M. oryzae</i>	63.76
<i>albicans</i>	29.58
<i>A. gossypii</i>	27.87
<i>S. cerevisiae</i>	25.58

3.2. Obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta rga-1$

Con el motivo de obtener la cepa mutante por sustitución del gen de *rga-1*, se transformó con el casete de reemplazo que inserta el gen de resistencia a nourseotricina en el genoma de *N. crassa* por medio de recombinación homóloga. Se procedió a seleccionar 6 colonias aisladas que lograron crecer, y se inocularon en medio MMV sólido con nourseotricina para obtener conidios. Las mutantes heterocariontes obtenidas presentaron una disminución en el diámetro de la colonia con respecto a la cepa parental (WT), percibiendo a primera vista que la eliminación de *rga-1* en algunos núcleos de *N. crassa* provoca defectos en el crecimiento (Figura 8).

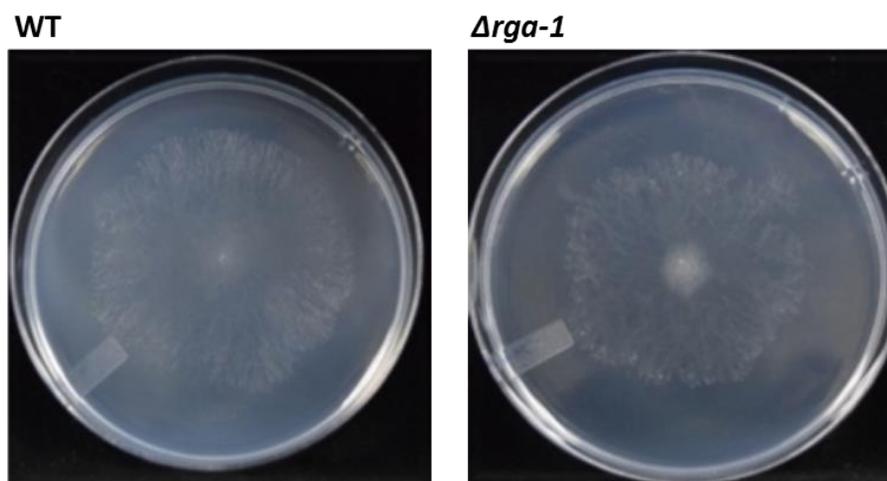


Figura 8. Morfología de la cepa heterocarión $\Delta rga-1$. Cepa silvestre parental (FGSC #9718) y la cepa heterocarión #5, respectivamente.

Para obtener una cepa mutante homocarión de *N. crassa*, en la que ningún núcleo contiene el gen *rga-1*, se procedió a realizar las cruza de las cepas het $\Delta rga-1$ con la cepa silvestre FGSC# 9013 para producir ascosporas (Figura 9), y de esta manera, determinar qué tan importante es la proteína RGA-1 para el hongo.

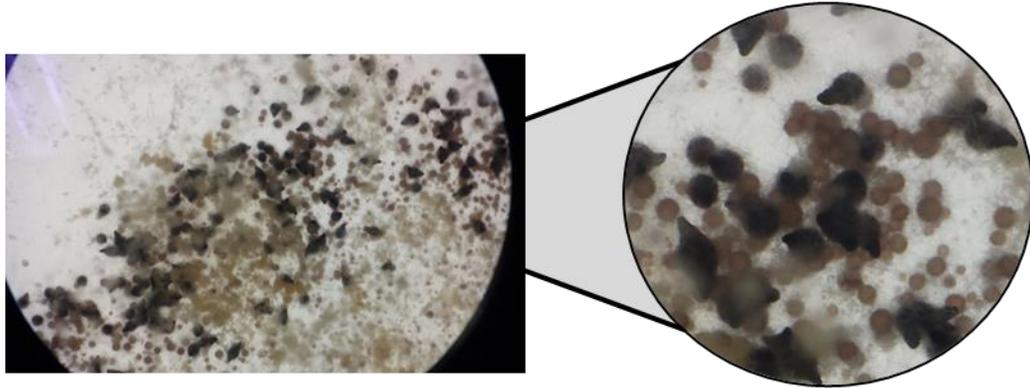


Figura 9. Cruza de la cepa heterocarión $\Delta rga-1$. Peritecios producto de la cruza de las cepas het $\Delta rga-1$ X WT, para la obtención de ascosporas homocarión. Se incubaron a 25°C de 14-21 días en MSC.

Se recuperaron las ascosporas resultantes de la cruza y se plaquearon ya activadas en una caja Petri con medio MMV sólido adicionado con nourseotricina, posteriormente se incubaron a 30°C para la obtención de conidios. Se extrajo DNA genómico y se realizó un PCR de comprobación con los oligonucleótidos Fw 5' UTR RGA-1 y Rv en RGA-1 (5') que amplifican desde el extremo 5' UTR hasta parte del ORF del gen de *rga-1*, teniendo como resultado en una cepa WT una banda de ~2,710 bp, y la ausencia de ella en el caso de la cepa mutante homocarión $\Delta rga-1$ como resultado de la delección del gen *rga-1* (Figura 10).

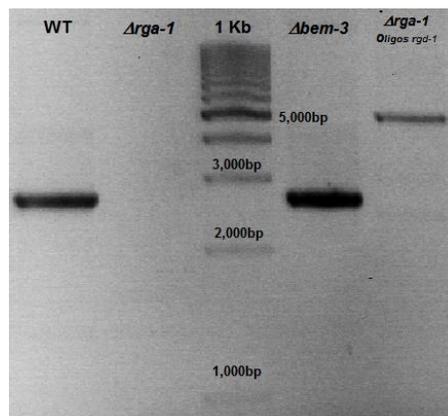


Figura 10. PCR de comprobación de la cepa mutante homocarión $\Delta rga-1$. En el 1er y 2do carril se observan los amplicones con los oligos Fw 5' UTR RGA-1 y Rv en RGA-1 (5') de la cepa silvestre (FGSC# 9718) y $\Delta rga-1$ homocarión, respectivamente. En el 3er carril se utiliza la cepa $\Delta bem-3$ como otro control positivo de la amplificación. En el 5to carril se utiliza la cepa $\Delta rga-1$ con los oligos *rgd-1* Fw y Rv que amplifican ~5,200bp, para

comprobar la integridad del DNA genómico. Marcador de peso molecular EZ Load 1kb de BIORAD. Gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio.

Las cepas homocariotes obtenidas a partir de la cruce mostraron incluso un menor diámetro que la cepa heterocarión como se observa en la figura 11A, formando colonias con un crecimiento drásticamente disminuido comparado con la cepa WT (Figura 11).

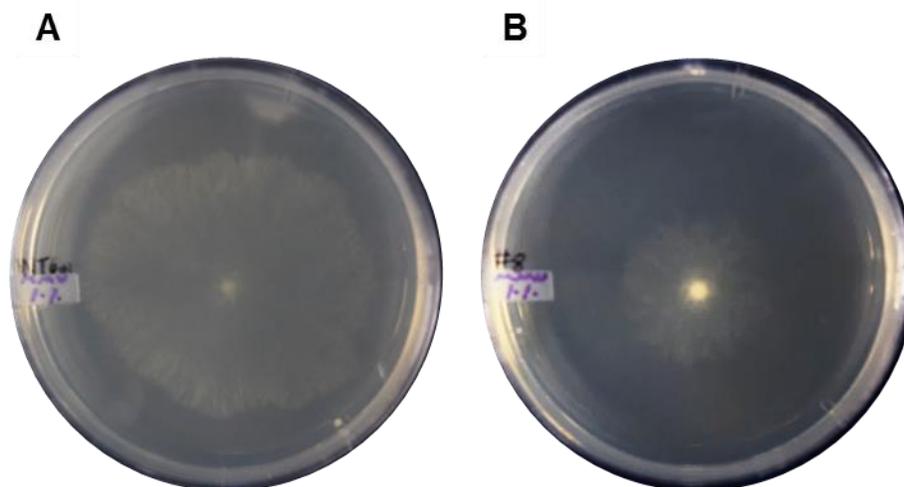


Figura 11. Morfología de la cepa homocarión $\Delta rga-1$. Cepa silvestre FGSC# 9718 (A) y homocarión $\Delta rga-1$ (B).

3.3. Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta rga-1$

Una vez identificada la cepa mutante homocarión se procedió a realizar su caracterización al igual que la cepa parental FGSC# 9718 para comparar el fenotipo y analizar efecto de la ausencia de la proteína RGA-1.

3.3.1 Tasa de crecimiento

Se midió el crecimiento de las cepas silvestre y $\Delta rga-1$ desde las 12 horas hasta las 28 h, y se observó una disminución en el crecimiento de la cepa mutante del 48.8% comparado con la cepa silvestre (Figura 12). La mutante presentó una velocidad de crecimiento de 0.333 cm h^{-1} comparado con la velocidad de la cepa silvestre, la cual fué de 0.638 cm h^{-1} .

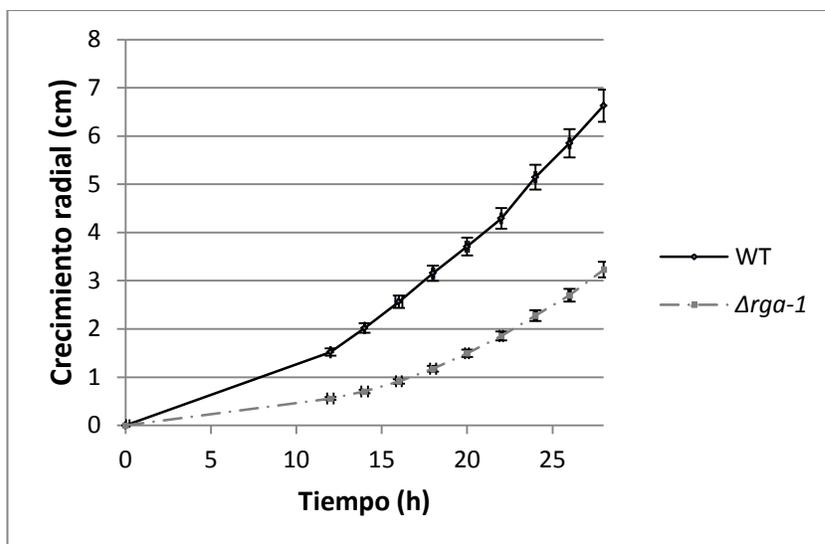


Figura 12. Crecimiento radial de la cepa $\Delta rga-1$. Cepa silvestre (WT) y mutante $\Delta rga-1$, la velocidad de crecimiento de la cepa mutante $\Delta rga-1$ fue 48.8% menor que la cepa silvestre. Las barras de error representan la desviación estándar.

3.3.2 Producción de conidios e hifas aéreas.

La cepa mutante $\Delta rga-1$ presentó una producción de hifas aéreas de una longitud del 43.8% menor comparado con la cepa silvestre (Figura 13). Debido a que se observó una longitud considerablemente menor de las hifas aéreas, también se decidió evaluar si la producción de conidios estaba afectada en la mutante. Sin embargo, la cantidad de conidios producidos en la cepa $\Delta rga-1$ no mostró grandes diferencias comparado con la producción de la cepa silvestre (Figura 14).

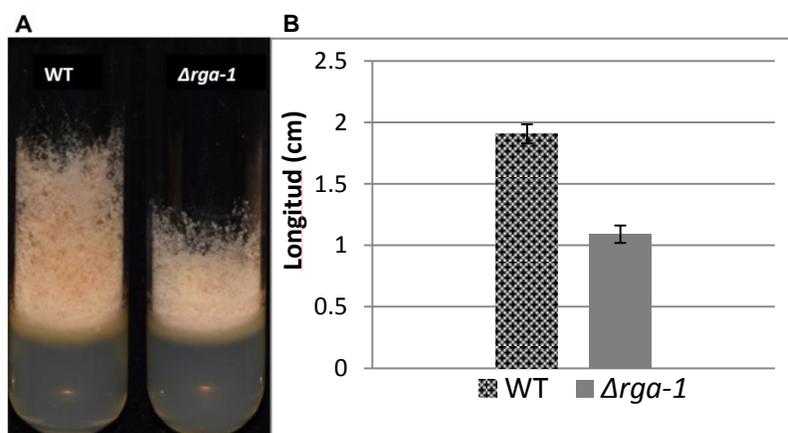


Figura 13. Longitud de hifas aéreas de la cepa $\Delta rga-1$. (A) Imagen de la cepa silvestre y mutante $\Delta rga-1$. (B) Se compara la longitud de las hifas aéreas entre la cepa silvestre (WT) (azul) y $\Delta rga-1$ (rojo). Las barras de errores representan la desviación estándar.

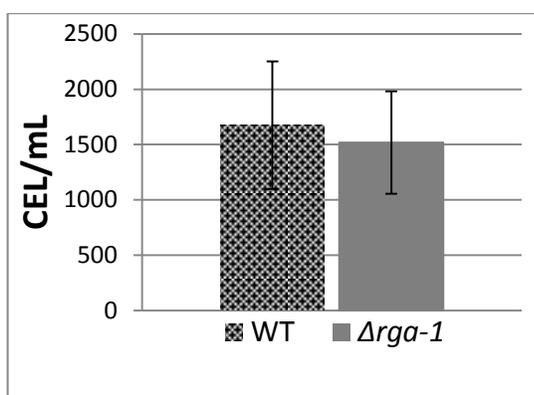


Figura 14. Producción de conidios. Cepa silvestre (WT) (azul) y la mutante $\Delta rga-1$ (rojo). Las barras de error representan la desviación estándar.

Aparentemente, el producir hifas aéreas con menor longitud no afecta a la cantidad o concentración de conidios que puede producir la cepa mutante $\Delta rga-1$, por lo que, se infiere que la RhoGAP RGA-1 no tiene un gran efecto en esta etapa del ciclo asexual de *N. crassa*, sin embargo, la elongación de las hifas aéreas parece depender en gran medida de esta proteína.

3.3.4 Biomasa e índice de ramificación

Se llevó a cabo la cuantificación de la biomasa de la cepa $\Delta rga-1$, ya que se observó que la tasa de crecimiento se vio drásticamente afectada y se infirió que la biomasa producida en medio MMV líquido de la misma mutante reflejaría el efecto encontrado.

Se observó una disminución del 27.8% en la biomasa de la cepa mutante $\Delta rga-1$ comparado con la cepa silvestre (Figura 15), comprobando que hay una relación directa entre la capacidad de crecimiento vegetativo y la biomasa total que puede producir el hongo.

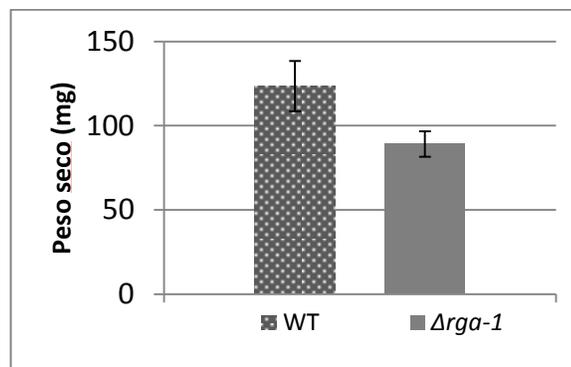


Figura 15. Producción de biomasa. Cepa silvestre (WT) y la mutante $\Delta rga-1$. Las barras de error representan la desviación estándar.

Otro aspecto importante durante el crecimiento polarizado en los hongos filamentosos, es que, durante este proceso pueden generar ramificaciones de hifas que les permiten extenderse para abarcar mayor área de la superficie de su sustrato, se generan entrelazamientos de hifas y se forma el micelio. Por lo que, se decidió cuantificar el número de ramificaciones producidas en las hifas principales de la cepa mutante $\Delta rga-1$. La cepa silvestre produjo 1 a 5 ramas por hifa principal, a diferencia de la cepa $\Delta rga-1$ que produjo de 3 a 7 ramas por hifa (Figura 16).

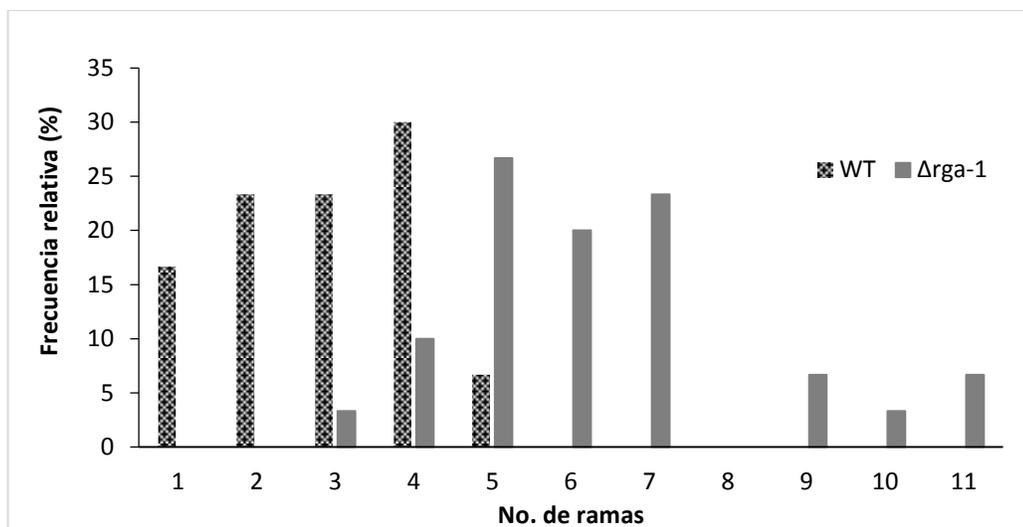


Figura 16. Frecuencia de ramificaciones. Hifas principales de la cepa silvestre (WT) y la cepa mutante $\Delta rga-1$. Escala 500 μ m.

3.4. Obtención de la cepa GFP-RGA-1

Con el objetivo de observar la dinámica intracelular de la GAP RGA-1, se llevó a cabo la amplificación por PCR del marco abierto de lectura del gen *rga-1* con los oligonucleótidos *rga-1* Fw y Rv (Tabla II). Además de la banda correcta, se observaron bandas inespecíficas por lo que se procedió a purificar por kit la banda de interés (3,911 bp) (Figura 17 A y B).

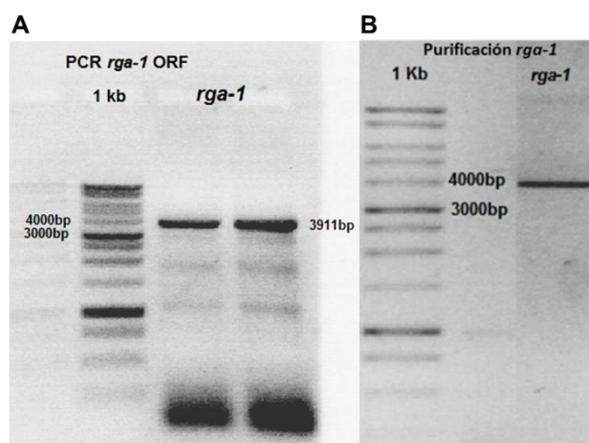


Figura 17. PCR y purificación del ORF de *rga-1*. A) Amplicón del marco abierto de lectura de *rga-1* (3,911 bp). B) Amplicón de *rga-1* después de purificar de gel de agarosa. Marcador de peso molecular 1kb DNA de PROMEGA. Gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio.

En la figura 18 se muestran las bandas de los amplicones del ORF de *rga-1* después de la purificación y digestión, al igual que el vector *pccg-N-GFP* digerido.

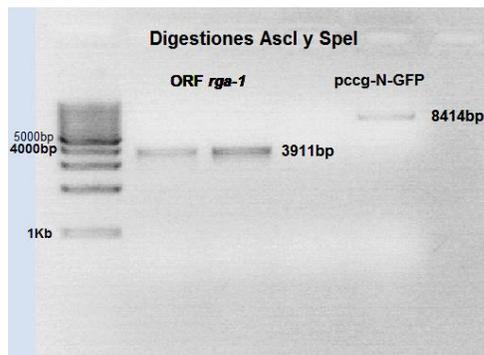


Figura 18. Digestiones del ORF *rga-1* y *pccg-N-GFP*. Gen de *rga-1* (3,911 bp) y el vector *pccg-N-GFP* (8,404 bp) digeridos con las enzimas *Ascl* y *SpeI*. Marcador de peso molecular EZ Load 1kb de BIORAD. Gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio.

Se procedió a transformar conidios de la cepa de *N. crassa* FGSC# 9717 con la construcción *pccg-n-gfp::rga-1* extraída por KIT de purificación de DNA plasmídico de una de las colonias de *E. coli* transformadas.

3.4.1 Localización intracelular de la RhoGAP RGA-1 en *N. crassa*

Se realizó un cribado de las cepas obtenidas mediante microscopía confocal buscando fluorescencia en hifas maduras. Se encontró fluorescencia tanto en septos, puntas y en membrana plasmática de hifas maduras (Figura 19).

Una vez identificadas las cepas que presentaron fluorescencia, se procedió a comprobar mediante PCR la integración de la construcción *pccg-n-gfp::rga-1* en el sitio de *his-3* del genoma de *N. crassa* (Figura 20).

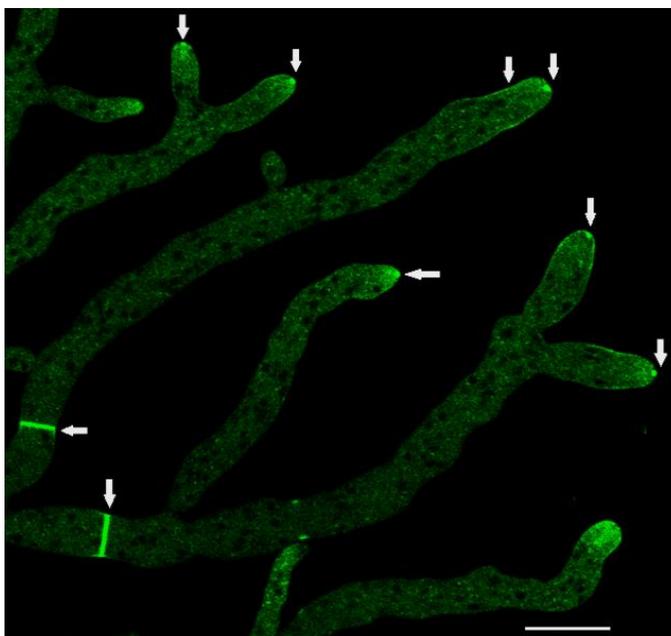


Figura 19. Micrografía de la cepa transformante de *N. crassa*. Se observa la fluorescencia (flechas) de la proteína etiquetada GFP-RGA-1, tomada mediante microscopía confocal. Barra de escala: 20 μ m.

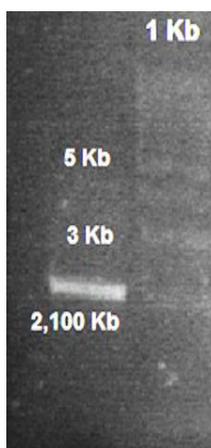


Figura 20. PCR de comprobación para la integración de la construcción *pccg-n-gfp::rga-1*. A la izquierda se observa un fragmento de \sim 2,100 Kb que corresponde a la amplificación del promotor *ccg1* más parte de la secuencia 3' *his-3*. Marcador de peso molecular EZ Load 1kb de BIORAD. Gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio.

3.4.2. Localización de la RhoGAP RGA-1 en la zona apical de las hifas de *N. crassa*

Mediante microscopía confocal se logró localizar a la proteína GFP-RGA-1 en las puntas de las hifas maduras de *N. crassa*, en la zona donde se localiza el Spitzenkörper. Además, en la zona subapical se logra observar una nube de fluorescencia de la gama del verde cercana a la punta (Figura 21A). Al teñir con el colorante anfifílico FM4-64, éste se une a la membrana plasmática, se internaliza y distribuye por medio de la endocitosis y el transporte vesicular hasta llegar a las vesículas que conforman el SPK. De esta manera se logró observar que la GFP-RGA-1 co-localiza con el SPK en la punta de la hifa cuando se combinan ambas señales (merge) (Figura 21A).

Como ya se había mencionado anteriormente, RGA-1 tiene actividad de GAP sobre CDC-42 y RAC, por lo que se esperaba que la localización de esta proteína fuera similar a la de estas Rho GTPasas en la zona apical, sin embargo se observó una localización abundante de la GFP-RGA-1 en el SPK, así que se llevó a cabo un análisis de intensidad de fluorescencia (Figura 21 B y C) para saber realmente que tanto se traslapan las señales, comprobando de esta manera una co-localización casi total de la GFP-RGA-1 y el SPK. Por lo que, se infiere que RGA-1 podría estar desempeñando otro papel aparte de la función de GAP para CDC-42 y RAC, por su localización en el SPK.

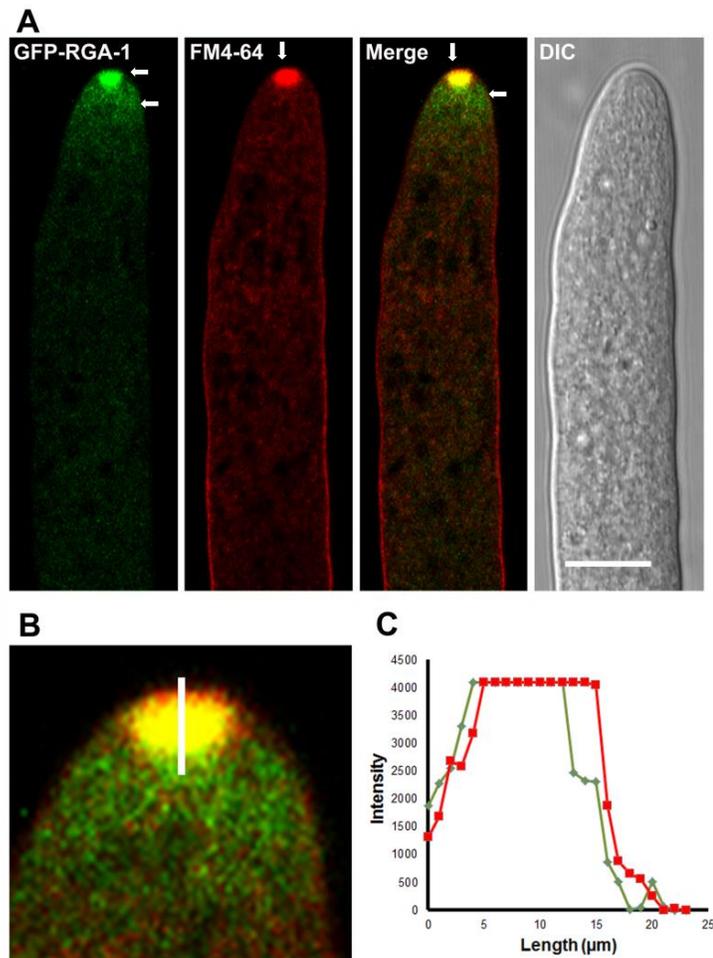


Figura 21. GFP-RGA-1 en la zona apical de hifas de *N. crassa*. A) Localización de la GFP-RGA-1 de manera puntiforme en la punta (flecha) de una hifa de *N. crassa*. Tinción con FM4-64 para observar el Spitzenkörper (flecha). Traslape de las señales de la GFP-RGA-1 y FM4-64, donde se observa una aparente co-localización de ambas señales. DIC; contraste por interferencia diferencial de la hifa. B) Acercamiento de la hifa para trazar el área donde co-localizan las señales. C) Gráfica de intensidad de fluorescencia donde se muestra el traslape de señales de la GFP-RGA-1 (verde) y el FM4-64 (rojo), indicando una co-localización parcial de la proteína RGA-1 con el Spitzenkörper. Barra de escala: 10 μm.

Adicionalmente, se realizaron análisis de la dinámica de la GFP-RGA-1 a través del tiempo durante el crecimiento de las hifas maduras, donde se observó que la proteína se localiza cerca de la membrana plasmática de la zona apical de la hifa, de manera similar a la localización de RAC. Un dato interesante es que esta localización de la GFP-RGA-1 sólo se observa en cortos periodos de tiempo a manera de pulsos hacia la membrana plasmática, y cuando las hifas presentan un estrés aparente creciendo en “zig-zag”, además en ningún momento se pierde la co-localización con el SPK (Figura 22).

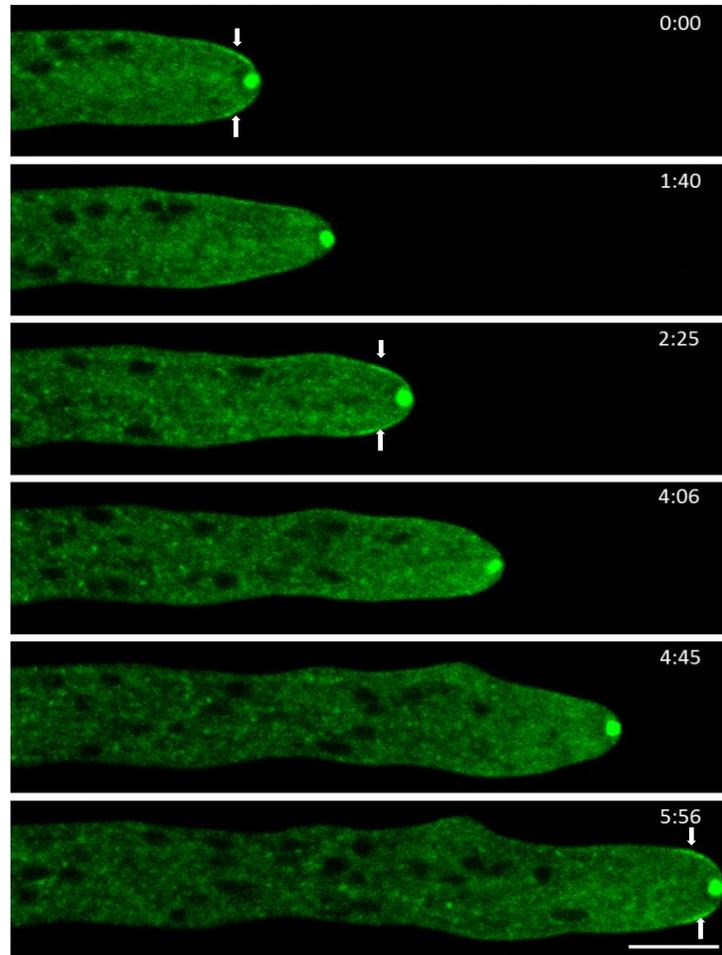


Figura 22. Serie de tiempo de hifa madura de la cepa marcada, en condiciones de estrés. Muestra la localización de la GFP-RGA-1 en el Spitzenkörper y fluorescencia a manera de “pulsos” hacia la membrana plasmática de la punta de las hifas (flechas blancas). Barra de escala: 10 μ m. Tiempo en min:seg.

3.4.3. Localización de la RhoGAP RGA-1 en septos de *N. crassa*

Al analizar los septos de las zonas distales al margen de la colonia, se observó fluorescencia en ellos (Figura 23A), por lo que se utilizó el marcador FM4-64 para observar si había una completa co-localización con la membrana plasmática del septo y la GFP-RGA-1. Se logró identificar, como se observa en la figura 23 panel C, dicha co-localización. CDC-42 y RAC se localizan de igual manera en septos de *N. crassa* involucradas en el proceso de la formación del septo, sugiriendo así, que RGA-1 posiblemente esté regulando a estas Rho GTPasas durante la formación del septo.

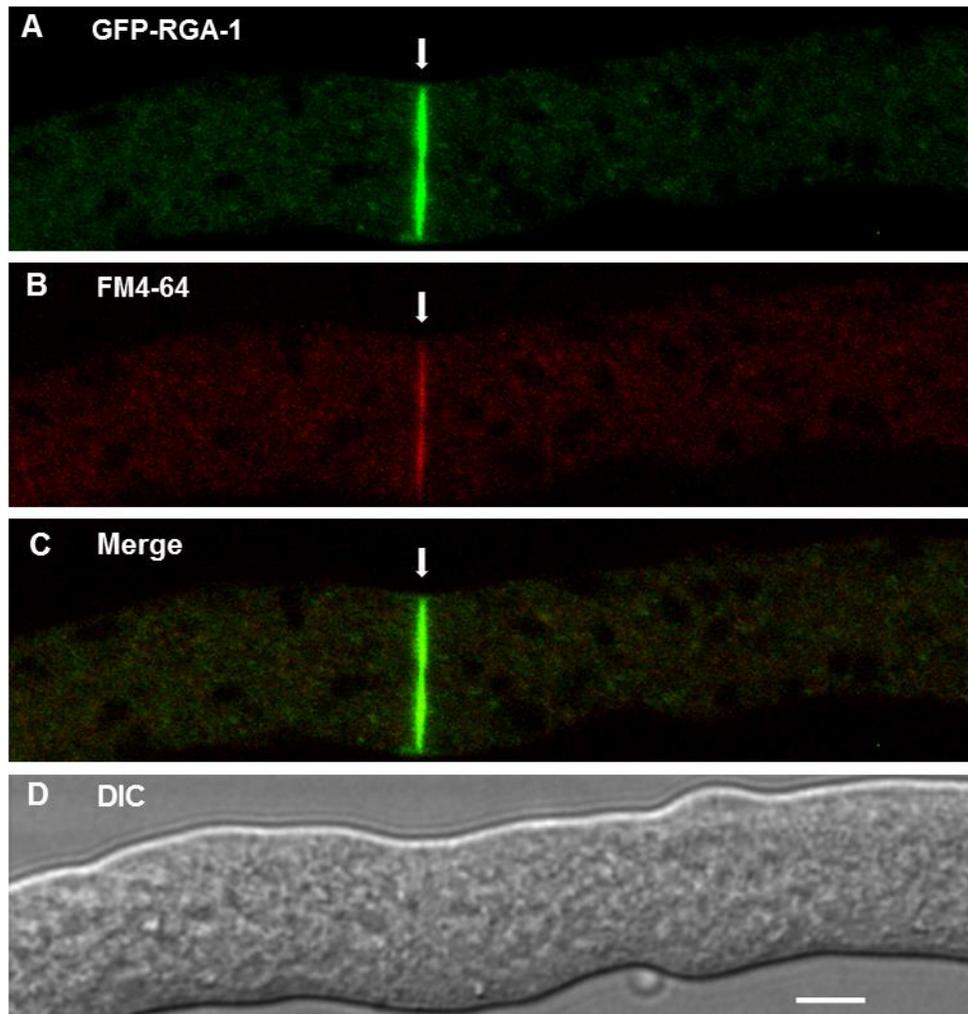


Figura 23. GFP-RGA-1 en septos de *N. crassa*. A) Localización de la GFP-RGA-1 en el septo (flecha) de una hifa de *N. crassa*. B) Tinción con FM4-64 para observar el septo (flecha). C) Traslape de las señales de la GFP-RGA-1 y FM4-64, donde se observa una co-localización de ambas señales en el septo (flecha). D) DIC; contraste por interferencia diferencial de la hifa. Barra de escala 10 μm .

Con el motivo de averiguar en qué parte del proceso de la formación del septo está involucrada RGA-1, se procedió a analizar la dinámica de la GFP-RGA-1 en las zonas donde comienzan a formarse los septos. Se pudo observar una acumulación de fluorescencia cercana a la membrana plasmática justo en los sitios donde posteriormente comienza a invaginarse, la fluorescencia se extiende hacia el centro de la hifa de manera constante y al mismo tiempo que la membrana plasmática hasta que termina de formarse el septo (Figura 24 A y C). Sumado a esto, se logra apreciar a la GFP-RGA-1 localizada cerca de la membrana plasmática adyacente al septo de manera desvanecida (Figura 24 A y C).

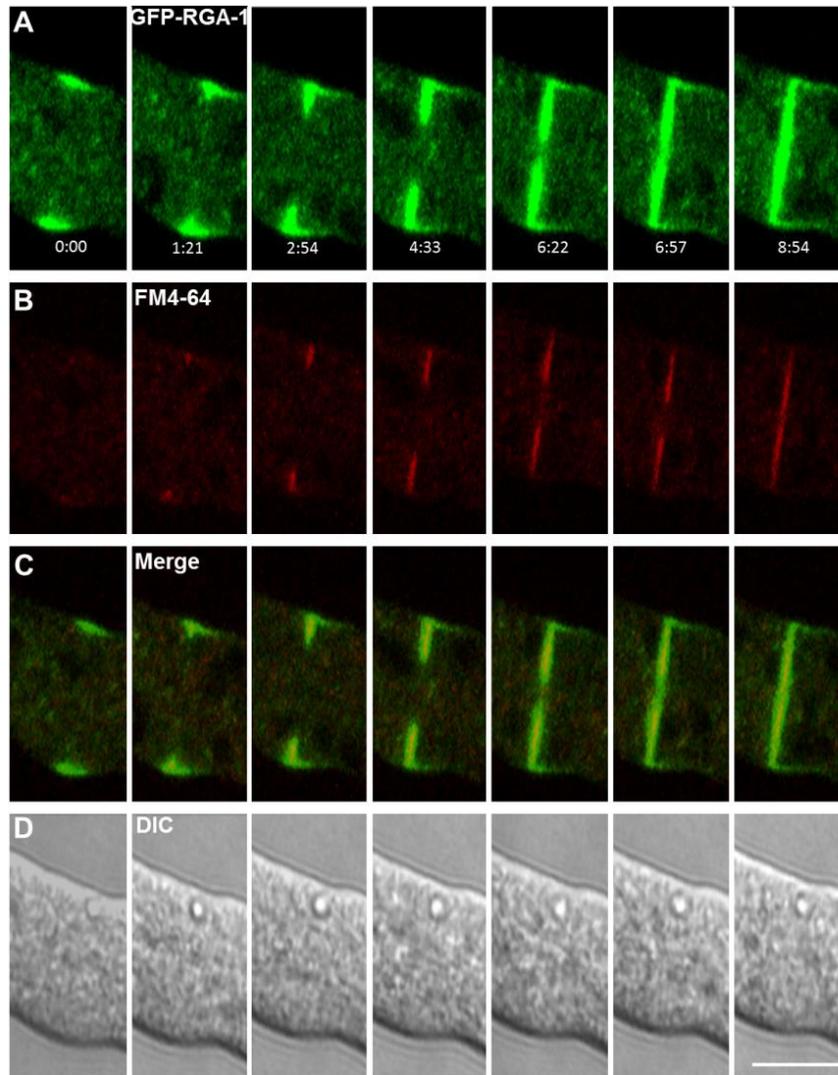


Figura 24. Serie de tiempo de la formación del septo en hifa de *N. crassa*. A) La proteína GFP-RGA-1 se observa acumulándose en ambos lados de la membrana antes de comenzar a invaginarse, y se mantiene durante y después de la formación del septo. B) Se observa el proceso de invaginación de la membrana durante la formación del septo por medio de la tinción con el colorante FM4-64. C) Co-localización de la GFP-RGA-1 con la membrana plasmática invaginándose. D) DIC; contraste por interferencia diferencial. Barra de escala: 20 μm . Tiempo en min:seg.

Se realizó una reconstrucción en 3D del septo, con el motivo de aclarar de qué manera se encuentra distribuida la proteína GFP-RGA-1 en dicha estructura. Se observó que efectivamente se encuentra localizada en toda la membrana plasmática del septo, desde la periferia hasta el centro de la hifa excluyendo el área del poro septal (Figura 25).

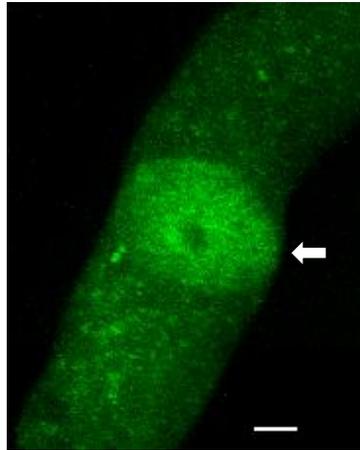


Figura 25. Reconstrucción del septo en 3D con la proteína GFP-RGA-1. Se logra observar a la proteína localizada en toda la membrana del septo. Barra de escala 10 μm .

Las observaciones realizadas nos sugieren que RGA-1 posiblemente esté regulando la formación del septo a través de CDC-42 y/o RAC desde el inicio de dicho proceso, además de que es necesario que permanezca incluso después de haberse formado el septo.

3.4.4. Localización de la RhoGAP RGA-1 en germínulas de *N. crassa*

En la etapa de germinación de conidios de *N. crassa* no se observó una localización determinada de la proteína GFP-RGA-1, sin embargo, las germínulas presentan fluorescencia de estructuras puntiformes dispersas por el citoplasma con movimiento aparente (Figura 26). El hecho de que CDC-42 y RAC están involucradas en la formación de los tubos germinativos y su localización se encuentra en la punta de dichas estructuras (Lichius et al., 2014) sugiere que RGA-1 no tiene una función de GAP en el inicio de la formación de los tubos germinativos.

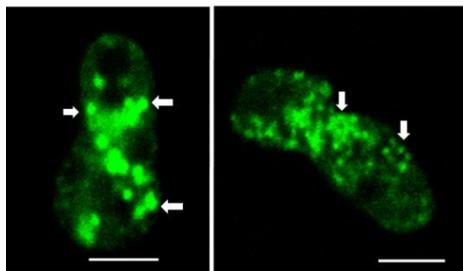


Figura 26. Localización de la GFP-RGA-1 en germínulas de *N. crassa*. Se observan estructuras puntiformes dispersas en toda la germínula (flechas), sin una localización aparente específica. Barra de escala 20 μm .

3.5. Localización de las proteínas CDC-42 y RAC en hifas de *N. crassa*

Debido a que CDC-42 y RAC se encuentran reguladas negativamente por la RhoGAP RGA-1, se procedió a observar la localización de éstas Rho GTPasas para poder compararla con el patrón de fluorescencia de la GFP-RGA-1 en puntas de hifas maduras. Las cepas utilizadas para observar tal localización, contienen a las proteínas CDC-42 y RAC etiquetadas en el extremo amino terminal con la proteína YFP (Yellow fluorescent protein), obtenidas del laboratorio de la Dra. Ernestina Castro Longoria.

Se logró observar a la proteína YFP-CDC-42 en las puntas de las hifas de *N. crassa*, permaneciendo en un área entre el Spk y la membrana plasmática de la punta de la hifa en crecimiento (Figura 27A). Por otro lado, la proteína YFP-RAC se observó localizada en la membrana plasmática de la zona apical excluyendo el área donde se localiza YFP-CDC-42, formando un anillo que cubre en parte al SPK (Figura 27B), tal como lo describe Araujo Palomares (2011).

La localización de la YFP-RAC parece coincidir con el de la GFP-RGA-1 cuando las hifas se encuentran en condiciones de estrés, en el cuál se observan pulsos de fluorescencia hacia la membrana plasmática de la zona apical, así mismo, excluye el área donde se localiza YFP-CDC-42. Sin embargo, YFP-RAC no co-localiza con el SPK como se describe anteriormente para el caso de la GFP-RGA-1.

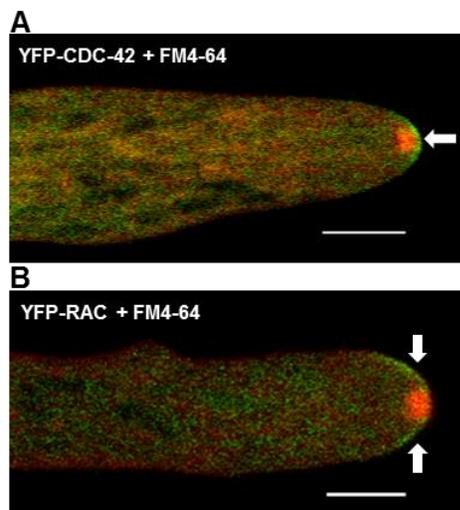


Figura 27. Localización de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC en hifas maduras de *N. crassa* teñidas con FM4-64. A) YFP-CDC-42 se logra observar localizada en la punta de la hifa (flecha blanca) en un área entre el Spk y la membrana plasmática. B) La fluorescencia de la YFP-RAC se encuentra adyacente a la membrana plasmática en la zona apical, rodeando al Spk y excluyendo la zona de CDC-42 en la punta de la hifa. Barra de escala 5 μm .

Capítulo 4. Discusión

Las Rho GTPasas son una importante familia de proteínas presentes en todos los eucariotas, están involucradas en diversos procesos biológicos importantes como el crecimiento, la organización del citoesqueleto, diferenciación y división celular. Es por ello que en hongos filamentosos es suma importancia estudiar la regulación de las Rho GTPasas, en particular las que participan en el crecimiento polarizado. En la levadura *S. cerevisiae* se ha reconocido a la Rho GTPasa CDC-42 como el regulador maestro del crecimiento polarizado. Sin embargo, en hongos filamentosos, y particularmente en nuestro modelo de estudio *N. crassa*, además de CDC-42 se encuentra la Rho GTPasa RAC. Ambas GTPasas se han reportado como importantes reguladores del establecimiento y mantenimiento de la polaridad, ya que las mutantes nulas $\Delta cdc-42$ y Δrac mostraron un crecimiento drásticamente disminuido y la doble mutante es letal (Araujo-Palomares et al., 2011). El estudio del crecimiento polarizado en *N. crassa* toma importancia, ya que es un buen modelo para entender cómo se está regulando éste proceso en otros organismos. En mamíferos, también se encuentra la Rho GTPasa RAC al igual que CDC-42, por lo que es posible hacer comparaciones en las funciones que realizan éstas proteínas en organismos tan lejanos filogenéticamente.

Dada la gran cantidad de procesos en los que participan las Rho GTPasas, estas proteínas están altamente reguladas. Como se describió en los antecedentes, las Rho GTPasas requieren de reguladores positivos (GEF) y negativos (GAP) ya que funcionan como interruptores moleculares que cuando están unidos a GTP se encuentran activos y participan en la cascada de señalización que da lugar, entre otras cosas, al crecimiento polarizado. En este sentido, la proteína CDC-24 se ha reportado como el único regulador positivo o GEF para las Rho GTPasas CDC-42 y RAC en *N. crassa* (Araujo-Palomares et al., 2011). Sin embargo, hay muy poca información acerca de los reguladores negativos o GAPs.

En el presente trabajo se investigó a la RhoGAP RGA-1 (NCU07688) para conocer cuál es su posible función en el crecimiento de *N. crassa*. Esta proteína fue identificada como GAP por medio de ensayos de actividad *in vitro*, en donde, se muestra que comparte actividad sobre CDC-42 y RAC con las Rho GAPs identificadas como BEM-3 (NCU02524) y RGD-1 (NCU00553). Sin embargo, RGA-1 y BEM-3 a su vez presentaron actividad sobre la Rho GTPasa RHO3 (Ludwig, 2015) (Figura 2).

A pesar de la especificidad que tienen las Rho GAPs por su Rho GTPasa sustrato, se ha reportado que algunas Rho GTPasas pueden ser reguladas por más de una Rho GAP, e incluso una sola Rho GAP puede tener actividad sobre más de una Rho GTPasa. Ya que como se ha reportado en *S. cerevisiae*, las GAPs Rga1p, Rga2p, Bem3p y Bem2p (homólogo a RGD-1 en *N. crassa*) comparten especificidad hacia Cdc42p

(Stevenson et al., 1995; Smith et al., 2002; Marquitz et al., 2002). Por otro lado, en el hongo filamentoso *M. oryzae* la RhoGAP MoRga1, la cual tiene un 63% de identidad con RGA-1 de *N. crassa* (Tabla 3), mostró interacción con MoCdc42 y MoRac1 unidos a GTP. Además, la falta de MoRga1 en *M. oryzae* produjo defectos en la morfología de los conidios (alargados) y una disminución en su producción (Ye et al., 2014). La mutante obtenida Δ rga-1 de *N. crassa*, presentó una tendencia a la disminución de la producción de los conidios. Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre (Figura 13), por lo que se infiere que RGA-1 no es importante para esta etapa del ciclo asexual del hongo. Además, se observaron cúmulos de fluorescencia de la GFP-RGA-1 en el citoplasma de los conidios y germínulas, pero no se logra apreciar una localización específica, por lo que, probablemente en esta etapa se esté sintetizando la proteína para realizar su función ya que la hifa alcance cierto grado de madurez (Figura 26).

Por otro lado, para la mutante nula de RGA-1 se esperaba un fenotipo con un mayor crecimiento del micelio debido a una mayor acumulación de los estados activos de las Rho GTPasas en la punta, en este caso CDC-42-GTP y RAC-GTP. En *S. cerevisiae*, la falta de Rga1p genera células elongadas, y un aumento en el crecimiento invasivo, en donde Cdc42p está involucrada (Smith et al., 2002). En el hongo dimórfico *C. albicans*, la pérdida de CaRga1 provoca células con gemas altamente polarizadas y en condiciones donde se producen pseudohifas, la mutante Δ rga1 genera células más largas y delgadas como las de las hifas (Helen y Sudbery, 2006). Sin embargo, el fenotipo de la mutante nula de RGA-1 en *N. crassa* provocó una disminución en la tasa de crecimiento y longitud de las hifas aéreas del 48.8% y 43.8%, respectivamente (Figura 12 y 13), además de una disminución en la biomasa (Figura 15) y un aumento en el número de ramificaciones por hifa (Figura 16). En trabajos previos, donde se caracterizaron mutantes nulas de GAPs de *N. crassa* obtenidas del FGSC (Fungal Genetic Stock Center), se observó que la mutante nula Δ rga-1 igualmente disminuye la tasa de crecimiento, y la producción de conidios se asemeja a la WT, acorde a lo encontrado en éste estudio (Ludwig, 2015).

El fenotipo inesperado en la disminución de la tasa de crecimiento puede ser debido a que en los ensayos de actividad *in vitro* la RhoGAP RGA-1 también parece regular a la Rho GTPasa RHO-3. Es posible que el efecto obtenido en cuanto al fenotipo sea por la función que RHO-3 desempeña en *N. crassa*, aunado o no a la función de CDC-42 y/o RAC. Se ha reportado en *S. cerevisiae* que Rga1p interactúa *in vivo* preferencialmente con Rho3p unido a GTP, por lo que es posible que esté actuando como GAP para Rho3p durante el crecimiento polarizado y la exocitosis, regulando éste proceso al modular las funciones de Cdc42p y Rho3p de manera coordinada (Adamo et al., 1999; He et al., 2015). En *N. crassa* no se conoce la función de RHO-3, pero es posible que suceda algo similar que en *S.*

cerevisiae. En otros hongos filamentosos se han reportado funciones distintas de Rho3, por ejemplo, en *A. gossypii* es importante para el mantenimiento del crecimiento de las hifas, como lo describen Wendland y Philippsen en el 2000, debido a que la mutante nula de *Agrho3* genera un crecimiento isotrópico en ciertos periodos del crecimiento polarizado. Por el contrario, MgRho3 no es necesaria para el crecimiento polarizado en *M. grisea*, pero está involucrada en la formación del apresorio (Zheng et al., 2000). La información en hongos filamentosos es escasa, por lo tanto, es necesario el análisis de una mutante nula de *Rho3* en *N. crassa* para obtener información acerca de la función que desempeña en el crecimiento del hongo, además de etiquetar a la proteína para conocer su localización e identificar si co-localiza con el patrón de la RhoGAP RGA-1, y las Rho GTPasas CDC-42 y/o RAC.

La GFP-RGA-1 se encontró co-localizando con el SPK casi en su totalidad, y de una manera dispersa en la zona apical cercana al SPK y a la punta de la hifa (Figura 21). Este patrón de localización de la GFP-RGA-1 en el ápice, puede ser debido a que la proteína se transporte en las vesículas, y que además haya una gran concentración en el citoplasma cercana a éste para cuando sea necesaria en su función como GAP para CDC-42 y/o RAC, las cuales se encuentran en la punta de la hifa asociadas a membrana (Figura 26A y B). Tal como se observa con CDC-24, la GEF para CDC-42 y RAC, que presenta un patrón similar de localización, en dónde además de localizarse cerca de la membrana plasmática de la punta de la hifa, también se observa en el citoplasma rodeando y co-localizando parcialmente con el SPK, excluyendo el núcleo de éste (Araujo-Palomares, 2011) a diferencia de la GFP-RGA-1.

Por otro lado, en situaciones de estrés cuando la hifa presenta un crecimiento en “zig-zag”, la proteína GFP-RGA-1 parece asociarse a la membrana plasmática de la punta de la hifa de igual manera que YFP-RAC (Figura 22 y 27B). Sin embargo, esto se lleva a cabo en cortos periodos de tiempo, a manera de pulsos de fluorescencia hacia la membrana, simultáneamente, se mantiene co-localizando con el SPK durante éste fenómeno (Figura 22). Cabe mencionar que la GAP RGA-1 no contiene dominios transmembranales, pero si cuenta con el dominio RhoGAP, por lo que si aparenta una localización como asociada a membrana podría ser debido a la interacción con otra proteína como lo es RAC, la cual por medio de su grupo prenilo hidrofóbico se une a membrana plasmática. Esto sugiere que RGA-1 en *N. crassa* efectivamente podría estar actuando como GAP de la Rho GTPasa RAC *in vivo*. Además, este patrón de fluorescencia se asemeja al de la RhoGAP BEM-3 etiquetada con GFP en el N-terminal, la cual parece localizar en la zona de RAC de manera constante, pero además, se intercala localizándose de forma intermitente en la zona de CDC-42 durante el crecimiento de las hifas maduras (Castro-Longoria, sin publicar). Es posible que en casos de estrés en las hifas, RGA-1 se encargue de regular negativamente

a RAC para mantener la polaridad de la hifa en cierta dirección, mientras que BEM-3 es requerida para regular a RAC durante todo el crecimiento.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que RHO-3 esté siendo regulada por RGA-1 en la punta, debido a la función que se le ha dado en la exocitosis y crecimiento polarizado en otros hongos. En condiciones de estrés, tal vez sea requerido un mayor flujo o transporte de vesículas hacia la membrana plasmática de la punta de la hifa para mantener el crecimiento por medio de la fusión de nuevo material en la membrana, lo cual, podría estar mediado por RHO3 y ésta, a su vez, regulada por RGA-1 y BEM-3 que como ya se mencionó anteriormente, presentaron ambas gran actividad sobre RHO3.

Adicionalmente, GFP-RGA-1 parece estar involucrada en la formación del septo. Se lograron observar cúmulos de fluorescencia en los sitios donde, posteriormente, comienza a invaginarse la membrana plasmática, manteniéndose asociada a ella durante y después de la formación del septo (Figura 23 y 24). Debido a que CDC-42 y RAC se encuentran localizadas desde el inicio de la formación del septo (Araujo-Palomares et al., 2011), se puede asumir que RGA-1 podría estar desempeñando su papel como GAP durante dicho proceso.

De manera similar, MoRga1-GFP se localiza en el poro septal de los conidios de *M. oryzae*, donde de igual manera interactúa con MoCdc42 y MoRac1. Además, MoRga1 contiene los dominios conservados LIM (2 en tándem) y RhoGAP, ambos son importantes para la localización y función de ésta RhoGAP (Ye et al., 2014). Sumado a esto, en *N. crassa*, Vogt y Seiler en el 2008 describieron la localización de la RhoGAP LGR1 (específica para Rho1), la cual contiene tres dominios LIM y un dominio RhoGAP, está involucrada en el crecimiento polarizado y se localiza en el poro septal y en puntas de hifas. Encontraron que, GFP-LGR1 además de localizarse de manera dispersa "retículo-vesicular" en la zona apical, también se localiza en forma de media luna en las puntas de las hifas, y que, ésta localización tanto en puntas como en el poro septal, depende de los dominios LIM que contiene LGR1. Por lo que, el patrón y dinámica que observamos de la RhoGAP RGA-1 de *N. crassa* en puntas de hifas y en septos sea posiblemente debido a los dominios LIM (2 en tándem) y RhoGAP encontrados en su secuencia peptídica, donde los dominios LIM le permitirían a RGA-1 interactuar con otras proteínas o componentes para localizarla en sitios específicos donde, por medio del dominio RhoGAP interactúe y realice su función como regulador negativo para las Rho GTPasas, ya sea CDC-42, RAC y/o RHO3.

En contraste a la localización de la RGA-1 descrita anteriormente, la GAP BEM-3 etiquetada con GFP en el extremo N-terminal, no se presenta en los septos, sino que se localiza cercana a la membrana plasmática en el ápice de germínulas e hifas maduras, cubriendo la zona de CDC-42 y RAC al mismo

tiempo (Castro-Longoria, sin publicar). Por lo que, es posible que BEM-3 desempeñe su función de GAP, para CDC-42 y RAC, desde el inicio del crecimiento polarizado y por lo tanto tiene una función diferencial a la GAP RGA-1. Quedan varias incógnitas sobre el rol que tiene RGA-1 en el desarrollo de *N. crassa*, como por ejemplo si en realidad está encargada primordialmente en regular el crecimiento polarizado por medio de las Rho GTPasas CDC-42, RAC y RHO3 o si, está involucrada en otro proceso, ruta de señalización y/o interacción debido a la localización que presenta constantemente en el SPK y que posiblemente de manera indirecta afecta el crecimiento del hongo.

Capítulo 5. Conclusiones

- RGA-1 es importante en el desarrollo micelial, en la etapa de producción de hifas aéreas y ramificación de *N. crassa*.

- La falta de RGA-1 no afecta la producción de conidios y la ramificación en el hongo.

- RGA-1 puede estar involucrada en otras rutas de señalización debido al efecto que causa en el crecimiento la ausencia de esta proteína, ya que no presenta los defectos esperados para una GAP de CDC-42 y RAC.

-Es posible que RGA-1 esté involucrada en la regulación de la Rho GTPasa Rho3.

- RGA-1 co-localiza con el SPK y se localiza de manera intermitente cerca de la membrana plasmática de la zona apical en hifas maduras.

- La localización de la GFP-RGA-1 en septos indica que posiblemente esté actuando como GAP para las Rho GTPasas CDC-42 y RAC, durante la formación del septo.

Literatura citada

- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F., & Pringle, J. R. 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 111(1), 131-142.
- Araujo-Palomares, C., Richthammer, C., Seiler, S., & Castro-Longoria, E. 2011. Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC-24 Module in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., & Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 46-57.
- Bassilana, M., & Arkowitz, R. A. 2006. Rac1 and Cdc42 have different roles in *Candida albicans* development. *Eukaryotic cell*, 5(2), 321-329.
- Bernards, A., & Settleman, J. 2004. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends in cell biology*, 14(7), 377-385.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., ... & Plamann, M. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(1), 1-108.
- Bos, J., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. 2007. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 865-877.
- Bourne, H.R. 1997. G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature*. 389: 673-674.
- Cabib, E., Drgonová, J., & Drgon, T. 2002. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis.
- Cansado, J., Soto, T., Gacto, M., & Pérez, P. 2010. Rga4, a Rho-GAP from fission yeast: finding specificity within promiscuity. *Communicative & integrative biology*, 3(5), 436-439.
- Court, H. and Sudbery, P. 2007. Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell*, 18(1), 265-281.
- Csépanyi-Kömi, R., Lévy, M., & Ligeti, E. 2012. Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 10-20.
- Davis, R. H. 2000. *Neurospora: contributions of a model organism*. Oxford University Press.
- Deacon, J., & Deacon, J. 2006. *Fungal biology* (4th ed.). Malden, MA: Blackwell Pub.
- Esser, K. 2006. *The Mycota a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* 2nd ed. Berlin [etc.: Springer.
- Hakoshima, T., Shimizu, T., & Maesaki, R. 2003. Structural basis of the Rho GTPase signaling. *Journal of biochemistry*, 134(3), 327-331.
- Hanna, S., & El-Sibai, M. 2013. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*, 1955-1961.

- Harris, S. D., & Momany, M. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology*, 41(4), 391-400.
- He, F., Nie, W. C., Tong, Z., Yuan, S. M., Gong, T., Liao, Y., ... & Gao, X. D. 2015. The GTPase-activating protein Rga1 interacts with Rho3 GTPase and may regulate its function in polarized growth in budding yeast. *PLoS one*, 10(4), e0123326.
- Heasman, S., & Ridley, A. 2008. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nat Rev Mol Cell Biol, 690-701.
- Hoffman, G., Nassar, N., & Cerione, R. 2000. Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI. *Cell*, 345-356.
- Jaffe, A., & Hall, A. 2005. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 247-269.
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Roos, E. D., van den Hondel, C. A., Meyer, V., & Ram, A. F. 2011. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Molecular microbiology*, 79(5), 1151-1167.
- Lichius, A., Goryachev, A., Fricker, M., Obara, B., Castro-Longoria, E., & Read, N. 2014. CDC-42 and RAC-1 regulate opposite chemotropisms in *Neurospora crassa*. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 1953-1965.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., & Staunton, D. E. 1998. NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell*, 95(2), 269-277.
- Ludwig, S. 2015. Characterization of Rho GTPase GAP/GEF modules in the ascomycete *Neurospora crassa*. Tesis de doctorado "Doctor rerum naturalium". Georg-August University School of Science (GAUSS). 69 pp.
- Marquitz, A. R., Harrison, J. C., Bose, I., Zyla, T. R., McMillan, J. N., & Lew, D. J. 2002. The Rho-GAP Bem2p plays a GAP-independent role in the morphogenesis checkpoint. *The EMBO Journal*, 21(15), 4012-4025.
- Matsui, Y. A. S. U. S. H. I., & Toh-E, A. K. I. O. 1992. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5690-5699.
- Miller, P. J., & Johnson, D. I. 1994. Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1075-1083.
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: Establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology*, 580-585.
- Murali, A., & Rajalingam, K. 2013. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cellular and Molecular Life Sciences Cell. Mol. Life Sci.*, 1703-1721.
- Nakano, K., Arai, R., & Mabuchi, I. 1997. The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells*, 2(11), 679-694.

- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R., & Mabuchi, I. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells*, 8(4), 357-370.
- Ness, F., Prouzet-Mauleon, V., Vieillehard, A., Lefebvre, F., Noël, T., Crouzet, M., ... & Thoraval, D. 2010. The *Candida albicans* Rgd1 is a RhoGAP protein involved in the control of filamentous growth. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12), 1001-1011.
- Rasmussen, C. G., & Glass, N. L. 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 4(11), 1913-1925.
- Riching, K., & Keely, P. 2015. Rho family GTPases: Making it to the third dimension. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 59, 111-115.
- Riquelme, M. 2013. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual review of microbiology*, 67, 587-609.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S., . . . Watters, M. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 446-474.
- Richthammer, C., Enseleit, M., Sanchez-Leon, E., März, S., Heilig, Y., Riquelme, M., & Seiler, S. 2012. RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 85(4), 716-733.
- Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M., & Doignon, F. 2001. Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 149-156.
- Settleman, J., Albright, C., Foster, L., & Weinberg, R. 1992. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature*, 153-154.
- Smith, G., Givan, S., Cullen, P., & Sprague, G. 2002. GTPase-Activating Proteins For Cdc42. *Eukaryotic Cell*, 469-480.
- Sudbery, P. 2008. Regulation of polarised growth in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 44-55.
- Stevenson, B. J., Ferguson, B., De Virgilio, C., Bi, E., Pringle, J. R., Ammerer, G., & Sprague, G. F. 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 9(23), 2949-2963.
- Symons, M. 2004. *Rho GTPases*. Georgetown, Tex.: Landes Bioscience/Eurekah.com ;
- Tanaka, K., & Takai, Y. 1998. Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 112-116.
- Tcherkezian, J., & Lamarche-Vane, N. 2007. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the Cell*, 99(2), 67-86.
- Virag, A., Lee, M. P., Si, H., & Harris, S. D. 2007. Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 66(6), 1579-1596.

- Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microb. Genet. Bull*, 13(4), 2-43.
- Vogt, N., & Seiler, S. 2008. The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Molecular biology of the cell*, 19(11), 4554-4569.
- Wang, H., Tang, X., & Balasubramanian, M. K. 2003. Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 164(4), 1323-1331.
- Wendland, J., & Philippsen, P. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*, 157(2), 601-610.
- Westergaard, M., & Mitchell, H. K. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 573-577.
- Ye, W., Chen, X., Zhong, Z., Chen, M., Shi, L., Zheng, H., . . . Wang, Z. 2014. Putative RhoGAP proteins orchestrate vegetative growth, conidiogenesis and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 37-50.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-981.
- J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-98.
- Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'brien, J. M., Botstein, D., & Johnson, D. I. 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Molecular biology of the cell*, 4(12), 1307-1316.