



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO

EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

RAC-1 EN EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL HONGO

Neurospora Crassa

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.B.P. César Ismael Ortiz García

Tutor principal: Dr. Jesús Aguirre Linares
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Comité Tutor: Dr. Luis Cardenas Torres
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Comité Tutor: Dr. Felipe Cruz García
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Marzo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se agradece el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González, durante la realización de este trabajo.

César Ismael Ortiz García realizó sus estudios de Posgrado en el Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Número de CVU 390046). Este trabajo fue posible gracias a los donativos 153256 de CONACYT, IN209211 e IN207913 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico -UNAM (PAPIIT-UNAM) y el donativo en colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 75306.

Se agradece a la Unidad de Biología Molecular del instituto de Fisiología Celular por los servicios prestados, mismos que permitieron que este trabajo se llevara a cabo.

Agradecimientos personales

A mis padres Ismael Ortiz Lezama y Silvia D. García Navarrete por su apoyo a lo largo de mi formación.

A mis grandes amigos Marco Adán Juárez y Yolanda Ortega por haber compartido su experiencia no solo del trabajo en el laboratorio, sino de la vida, gracias por la confianza brindada y por nunca dejar de creer en mí.

A Estefani Ortega por su apoyo y por su paciencia conmigo.

A mis compañeros de laboratorio Nallely, Jenny, Sol, Ariann, Fernando, Rafael, José Antonio y Tadeo por sus consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A Danaí Montalvan por su amistad y por creer en mí.

Contenido

Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Las Especies Reactivas del Oxígeno y la diferenciación celular	10
Las ERO y la diferenciación celular en los hongos filamentosos	11
Las NADPH oxidasas y su regulación.....	11
Interacción de la proteína G pequeña Rac con el complejo Nox2 en células fagocíticas	11
Las NADPH oxidasas en <i>N. crassa</i>	14
Regulación de las NOX en los hongos filamentosos	14
Las funciones de Rac en los hongos.....	15
<i>N. crassa</i> como organismo modelo	16
Ciclo de vida de <i>N. crassa</i>	17
Ciclo asexual	17
El ciclo sexual	18
La recombinación en <i>N. crassa</i> como herramienta en la generación de mutantes.....	19
Metabolismo del ácido quínico en <i>N. crassa</i>	21
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Materiales y métodos	26
Cepas, vectores y oligonucleótidos.....	26

Tabla 1 Cepas de <i>N. crassa</i> utilizadas en este trabajo	26
Tabla 2 Plásmido empleados en este trabajo.....	28
Tabla 3 Oligonucleótidos empleados en este trabajo	29
Condiciones de crecimiento de <i>N. crassa</i>	29
Obtención de conidios.....	29
Obtención de colonias aisladas de <i>N. crassa</i>	29
Medios de enriquecimiento de mutantes de <i>N. crassa</i>	30
Transformación por electroporación de <i>N. crassa</i>	30
Extracción del ADN.	31
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	31
Resultados	32
<i>N. crassa</i> presenta un homólogo de Rac1	32
Obtención de mutantes de <i>N. crassa</i> en las que el alelo silvestre se sustituyó por alelos bajo el control del promotor inducible del gen <i>qa-2</i>	33
Las mutantes TCOR17 (<i>rac-1</i> NF) y TCORDN (<i>rac-1</i> DN) presentan defectos en el desarrollo de las hifas.....	35
Evaluación del papel de RAC-1 en el desarrollo de <i>N. crassa</i>	41
El promotor <i>qa-2</i> de <i>N. crassa</i> presenta secuencias que regulan la transcripción genética en <i>E. coli</i>	48
Discusión	49
<i>rac-1</i> no es un gen esencial en <i>N. crassa</i>	49
El equilibrio GDP/GTP de RAC-1 es esencial para el desarrollo asexual.....	49
RAC-1 promueve la germinación en <i>N. crassa</i>	50
El equilibrio GDP/GTP de RAC-1 es esencial para el desarrollo sexual.....	50

El promotor inducible <i>qa-2</i> no es un buen sistema de inducción para el estudio de RAC-1 en <i>N. crassa</i>	51
No fue posible expresar en <i>E. coli</i> una mutación <i>rac-1</i> DA bajo el control del promotor inducible del gen <i>qa-2</i>	52
Conclusiones	54
Perspectivas	55

Lista de abreviaturas

ERO Especies reactivas del Oxígeno

O₂ Oxígeno molecular

O₂⁻ Anión superóxido

HO· Radical hidroxilo

H₂O₂ Peróxido de hidrogeno

Δ¹O₂ Oxígeno en singulete

GTP Guanosín trifosfato

GDP Guanosín difosfato

NOX NADPH oxidasas

CAT Tubos de anastomosis

Mutación DA Mutación dominante activa

Mutación DN Mutación dominante negativa

Resumen

Hansberg y Aguirre propusieron en 1990 que las especies reactivas de oxígeno (ERO) regulan la diferenciación celular en los microorganismos eucariontes. Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas que catalizan la producción regulada de anión superóxido mediante la transferencia de electrones del NADPH al O₂. La NOX de células fagocíticas está compuesta por varias subunidades, la subunidad catalítica denominada flavocitocromo b₅₅₈ que se encuentra localizada en la membrana plasmática y que a su vez está compuesta por las subunidades gp91^{phox} (conocida como Nox2) y p22^{phox}, y las proteínas reguladoras citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la GTPasa Rac1. La interacción de Rac1 con Nox2 y p67^{phox} es esencial para la activación de Nox2 en humanos. El hongo *Neurospora crassa* posee dos NOX: NOX-1 y NOX-2. NOX-1 es esencial para la diferenciación de los cuerpos fructíferos. NOX-2 es esencial para la germinación de las esporas sexuales. *N. crassa* también posee un ortólogo de Rac1 de humanos que podría regular la función de las NOX en este organismo. Para estudiar el papel de RAC-1 en el desarrollo de *N. crassa* se substituyó el gen silvestre por un alelo no funcional mediante recombinación homóloga. Esta mutante carente de RAC-1 presenta una hiperramificación de las hifas y un desarrollo de colonias compactas, lo que sugiere que esta proteína participa en el mantenimiento de la polaridad de las hifas durante el crecimiento de la colonia. Por otro lado, esperando poder regular la función de las NOX en *N. crassa* mediante RAC-1 se integraron en el gen *his-3* diferentes alelos de *rac-1* bajo el control del promotor inducible *qa-2* (un alelo silvestre y un alelo constitutivamente inactivo) y de esta forma poder evaluar efecto de la proteína RAC-1 sobre el ciclo asexual y sexual. En las mutantes con el alelo silvestre inducible se presenta una germinación temprana de las conidiosporas. Mientras que la mutante con un alelo constitutivamente inactivo se observa una disminución en la producción de micelio aéreo y en el número de conidios, además de no poder funcionar como cepa receptora en el ciclo sexual, fenotipo similar al de una mutante $\Delta nox-1$. Estos resultados sugieren que RAC-1 si regula la función de las NOX en el desarrollo de *N. crassa* pero tiene funciones que independientes de las NOX, por lo que se debe realizar un estudio más detallado de esta proteína para demostrar la interacción de RAC-1 con las NOX.

Abstract

Hansberg and Aguirre proposed in 1990 that the reactive oxygen species (ROS) regulates cell differentiation in eukaryotic microorganisms. NADPH oxidases (NOX) are enzymes that catalyze the regulated production of superoxide anion by the transfer of electrons from NADPH to O₂. The NOX of fagocytic cells is composed of several subunits: the catalytic subunit called flavocytochrome b₅₅₈ which is located in the plasmatic membrane and is composed by the subunits gp91^{phox} (Nox2) and p22^{phox}, the cytosolic regulatory proteins p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} and the GTPase Rac1. The interaction of Rac1 with Nox2 and p67^{phox} is essential for the activation of the NOX's in humans. The fungi *N. crassa* possess two NOX's, NOX-1 and NOX-2. NOX-1 is required for differentiation of the fruiting body and NOX-2 is essential for germination of sexual spores. *N. crassa* also possesses an orthologous of the human Rac1 that could regulate the NOX function in this microorganism. In order to study the role of RAC-1 in the development of *N. crassa* the wild type gen was substituted for a nonfunctional allele by homologous recombination. The mutant lacking RAC-1 presents hyphae hyperbranching and compact colonies, which suggests this protein participates in the maintenance of the polarity of hyphae during colony growth. Hoping to regulate the NOX function in *N. crassa* through RAC-1, two different alleles of *rac-1* were integrated on *his-3* under the control of the inductable promoter *qa-2* by homologous recombination. These alleles, a wild type allele and a constitutively inactive allele, allow us to study the effect of the RAC-1 protein in asexual and sexual cycle. The mutants carrying the inductable wild type allele showed an earlier germination of conidiospores. On the other hand, the mutant with the constitutively inactive allele showed a decrease both in the production of aerial mycelium and in the number of conidia. This mutant was not able to function as a recipient strain in the sexual cycle, a phenotype similar to the $\Delta nox-1$ mutant. Although this result suggests that RAC-1 in fact regulates the functions of NOX during the development of *N. crassa*, RAC-1 has another function independent of the NOX's protein, so it is suggested that a more detailed study is necessary to probe the interaction between RAC-1 and NOX's.

Introducción

Las Especies Reactivas del Oxígeno y la diferenciación celular

Las especies reactivas del Oxígeno (ERO) engloban a las especies químicas formadas a partir de la excitación o la reducción incompleta del oxígeno molecular (O_2). Estas incluyen al anión superóxido (O_2^-), al radical hidroxilo ($HO\cdot$), al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y al oxígeno en singlete (Δ^1O_2). En condiciones fisiológicas las células mantienen un balance entre la generación y la eliminación de ERO. Este equilibrio se mantiene debido a los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que poseen los organismos. Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa que dismuta el O_2^- a H_2O_2 , la catalasa que descompone el H_2O_2 a $H_2O + O_2$ y las peroxidasas que son enzimas que catabolizan el H_2O_2 mediante la oxidación de un cosustrato, el cloruro (Cl^-) en el caso de la mieloperoxidasa. Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión (GSH) (D'Autreaux & Toledano, 2007, Trachootham, *et al.*, 2008).

Los sistemas biológicos están expuestos continuamente a fuentes intrínsecas y extrínsecas de ERO. La respiración mitocondrial, la formación de radicales libres por ionización y por radiación con luz ultravioleta (UV), son fuentes importantes de ERO. Además, diversos organismos cuentan con de contar con sistemas enzimáticos regulados como las NADPH oxidasas (NOX), que son enzimas que producen anión superóxido de forma regulada por la transferencia de electrones del NADPH al O_2 . Las NOX están compuestas por una flavoproteína, un citocromo *b* y subunidades reguladoras citosolicas (Winterbourn, 2008). Estas enzimas se describieron primero en células fagocíticas de mamíferos (Nox2), en las que tienen un papel crítico en la defensa contra patógenos. Posteriormente se describieron isoformas de Nox2 en células no fagocíticas y se describieron integrantes de esta familia de proteínas en varios grupos de eucariontes (amibas, hongos, plantas y animales), en los que se describió que las NOX presentan funciones comunes y se activan en condiciones de estrés, como la falta de nutrientes, el daño físico de tejidos o el ataque de patógenos (Aguirre & Lambeth, 2010).

La diferenciación celular puede ser descrita como la transición de un estado metaestable a otro a través de un estado inestable. Se ha propuesto que las ERO tienen un papel esencial en la diferenciación celular en los microorganismos eucariontes. Cuando se presenta un estado

hiperoxidante, estado transitorio e inestable en el cual las ERO superan la capacidad antioxidante de las células, un organismo puede compensar dicho estado y regresar a las condiciones anteriores, adaptarse a un nuevo estado oxidante o puede pasar de un estado no diferenciado a uno diferenciado, cuando no se llevan a cabo ninguno de los procesos anteriores el organismo muere (Hansberg & Aguirre, 1990, Aguirre, *et al.*, 2005).

Las ERO y la diferenciación celular en los hongos filamentosos

En hongos filamentosos una fuente importante de ERO se genera por las NOX y estas juegan un papel esencial en el desarrollo y en la diferenciación celular. En *Aspergillus nidulans* NoxA es esencial para el desarrollo de las estructuras sexuales denominadas cleistotecios (Lara-Ortiz, *et al.*, 2003). En *N. crassa* se reportó que la producción de oxígeno en singulete ($\Delta^1\text{O}_2$) durante la germinación de los conidios. La catalasa Cat-1 solo es oxidada en presencia de $\Delta^1\text{O}_2$. Al ser oxidada Cat-1 modifica su movilidad electroforética y esta característica la hace un marcador específico de la producción de esta ERO. Dicha oxidación es mayor en cepas que carecen de carotenos o que producen carotenos con baja afinidad por el $\Delta^1\text{O}_2$ (Lledias, *et al.*, 1998, Lledias, *et al.*, 1999).

Las NADPH oxidasas y su regulación

Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas que catalizan la producción de superóxido mediante la transferencia de electrones del NADPH al O_2 . La NOX de células fagocíticas está compuesta por varias subunidades, la subunidad catalítica denominada flavocitocromo b558 que se encuentra localizada en la membrana plasmática y que a su vez está compuesta por las subunidades gp91^{phox} (Nox2) y p22^{phox}, y las proteínas reguladoras citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la GTPasa Rac. La interacción de Rac con Nox2 y p67^{phox} es esencial para la activación de Nox2 (Diebold & Bokoch, 2001).

Interacción de la proteína G pequeña Rac con el complejo Nox2 en células fagocíticas

Rac es una proteína G pequeña que pertenece a la familia Rho. Esta familia está formada por proteínas monoméricas de un peso de 20 a 40 kDa que unen GTP. Estas proteínas funcionan como reguladores de múltiples vías de señalización. Por ejemplo, algunos miembros de estas GTPasas juegan papeles fundamentales en la reorganización del citoesqueleto y la producción

de superóxido. En humanos Rac presenta 3 isoformas Rac1, Rac2 y Rac3 (Rac1/2/3) que se expresa de forma ubicua y existe en dos conformaciones. Una inactiva, unida a GDP, y otra activa unida a GTP. El paso de un estado inactivo (unido a GDP) a uno activo (unido a GTP) ocurre vía factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), mientras que proteínas que promueven la actividad intrínseca de GTPasa de Rac (GAP) la inactivan mediante la hidrólisis de GTP a GDP. Otro punto de regulación de Rac está mediado por los inhibidores de disociación de guanina (GDI) los cuales reconocen un motivo de geranyl-geranilación el cual permite que Rac interactúe con las membranas. Los GDI regulan la interacción de Rac con las membranas pero permiten que Rac interactúe con proteínas citoplasmáticas (ver figura 1) (Gregg, *et al.*, 2003, Bosco, *et al.*, 2009, Raad, *et al.*, 2009).

En células fagocíticas Rac1/2 regula a las NADPH oxidasas en 2 puntos esenciales para la generación de anión superóxido a partir de O₂. El primer punto consiste en la interacción con la subunidad catalítica gp91^{phox} (Nox2) por el dominio de inserción de Rac y el segundo punto es la interacción con el dominio de unión a Rac de la subunidad p67^{phox} mediada por un dominio de activación presente en Rac (Nisimoto, *et al.*, 1997, Diebold & Bokoch, 2001, Sumimoto, 2008). Esta interacción es muy importante para el transporte de electrones del NADPH al O₂. Así, la producción de anión superóxido por el complejo NOX es dependiente de Rac-GTP (Diebold & Bokoch, 2001).

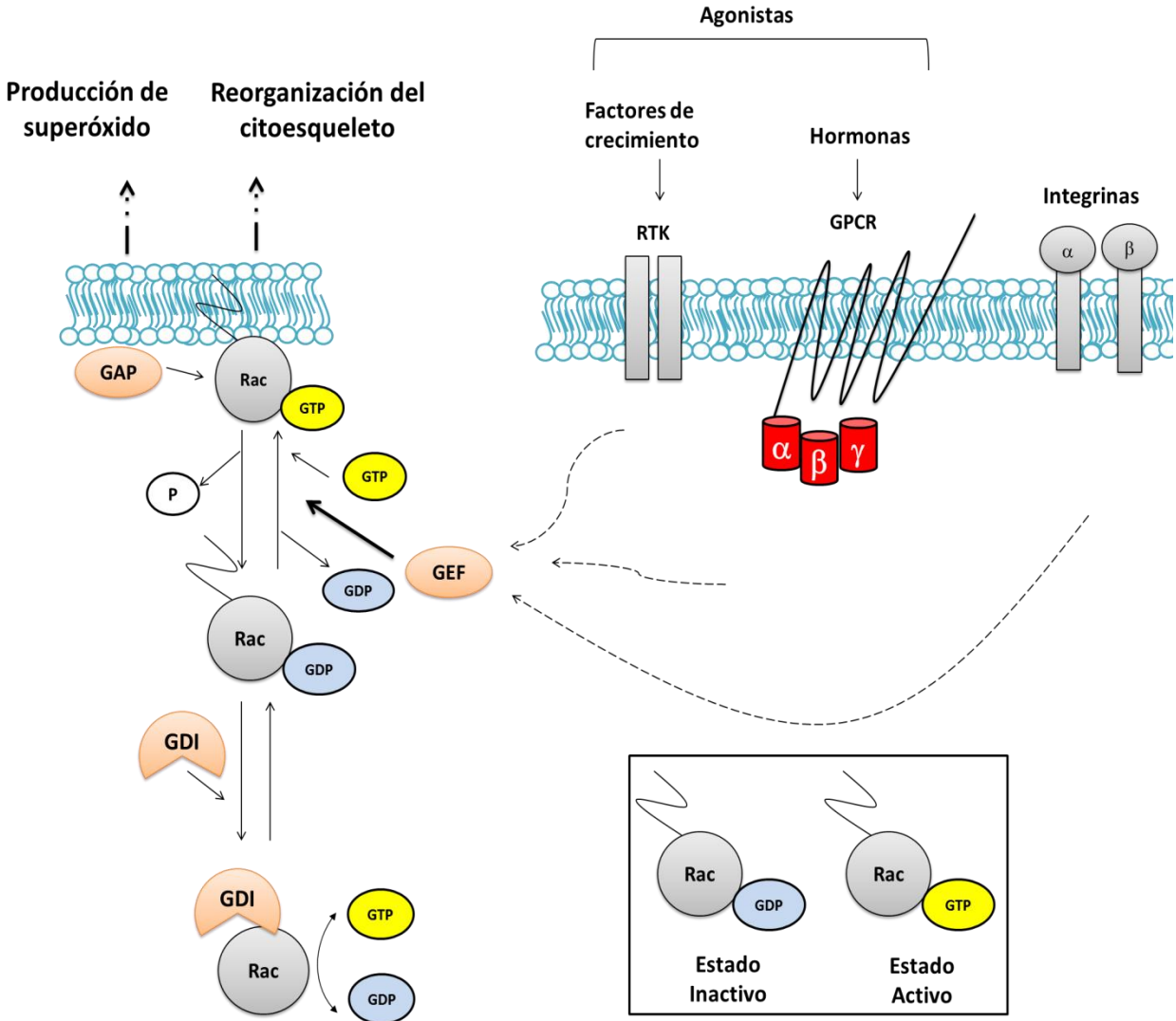


Figura 1. Rac1/2 actúa como un transductor de señales. Rac recibe las señales vía GEF específicos que son activados por distintos receptores (RTK, GPCR, integrinas, etc.). Los cuales son activados por estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento, hormonas, etc. Rac unido a GTP adopta una conformación capaz de unirse a moléculas efectoras y de esta manera regular funciones celulares como la producción de anión superóxido y reorganización del citoesqueleto. Los GAP favorecen la actividad intrínseca de GTPasa inhibiendo la activación de Rac. Además, Rac también posee un dominio de geranyl-geranilación el cual es reconocido por los GDI los cuales impiden la interacción de Rac con las membranas (Gregg, *et al.*, 2003, Bosco, *et al.*, 2009).

Debido a las dos conformaciones que presenta Rac con respecto al ciclo de intercambio de GDP/GTP, esta proteína puede funcionar como regulador de diferentes procesos celulares (Figura 1). Una forma de abordar el estudio de esta proteína es realizando mutaciones que impidan que dicho ciclo se lleve a cabo y que favorezcan la unión de Rac al GDP o al GTP de

forma permanente. Estas mutaciones reciben el nombre de mutaciones dominantes activas (DA) cuando Rac se mantiene unido al GTP y mutaciones dominantes negativas (DN) cuando se mantiene unido al GDP. En el hongo filamentoso *Colletotrichum trifolii* una mutación DA consiste en el cambio de la glicina 17 por una valina (G17V) y para la mutación DN el cambio de la treonina 22 por una asparagina (T22N). Estos cambios se realizaron en el dominio de unión a GDP/GTP de Rac (Chen & Dickman, 2004).

Las NADPH oxidasas en *N. crassa*

En los hongos filamentosos se han descrito tres subfamilias de las NOX, denominadas A, B y C (Lara-Ortiz, *et al.*, 2003). *N. crassa* presenta dos genes de NADPH oxidasas en su genoma (Aguirre, *et al.*, 2005), que codifican para 2 proteínas denominadas NOX-1 y NOX-2. NOX-1, pertenece a la subfamilia A y es esencial para el desarrollo de las estructuras sexuales. Cuando una cepa $\Delta nox-1$ se utiliza como receptora en una cruce esta no produce cuerpos fructíferos (protoperitecios), por lo que es estéril. Sin embargo, los conidios de esta misma cepa son capaces de funcionar como donadores en una cruce con una cepa silvestre. Además una cepa $\Delta nox-1$, también presenta una reducción en la formación de micelio aéreo y el crecimiento radial, con respecto a una cepa silvestre. NOX-2 pertenece a la subfamilia B, una mutante $\Delta nox-2$ no muestra ningún defecto obvio en el desarrollo sexual o asexual pero es esencial para la germinación de las ascosporas; cuando se obtienen ascosporas de una cruce homociga entre cepas $\Delta nox-2$, las ascosporas resultantes de la cruce no germinan (Cano-Dominguez, *et al.*, 2008).

Regulación de las NOX en los hongos filamentosos

En hongos filamentosos se han descrito proteínas ortólogas de algunas subunidades que forman el complejo NOX. Para $p67^{phox}$ se ha descrito a NoxR (NADPH oxidase regulator) en *Epichloë festucae*. Esta subunidad regula junto con RacA la producción de ERO, vía NoxA, para mantener el crecimiento simbiótico entre el hongo y una planta (Takemoto, *et al.*, 2006, Scott, *et al.*, 2007, Tanaka, *et al.*, 2008). Otra subunidad importante para la regulación de las NOX es la GTPasa Rac, en *Aspergillus niger* se demostró que la GTPasa RacA interactúa con RiaA (NOXR), independientemente del estado GDP/GTP de esta proteína (Kwon, *et al.*, 2011). En *N. crassa*

NOR-1, ortólogo de p67^{phox}, se requiere para la función de NOX-1 y NOX-2. Mutantes en NOR-1 presentan defectos en el desarrollo sexual, la esporulación asexual y el crecimiento radial, mientras que las ascosporas no germinan. Es decir que las mutantes *Δnor-1* comparten los fenotipos de las mutantes *Δnox-1* y *Δnox-2* (Cano-Dominguez, *et al.*, 2008).

Las funciones de Rac en los hongos

En las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* no se han descrito ortólogos de Rac. Sin embargo, en los hongos dimórficos *Penicillium marneffeii* se describió cflB, homólogo de Rac1; en *Yarrowia lipolytica* se describió YIRAC1, homólogo de Rac 1/2/3 (Hurtado, *et al.*, 2000, Boyce, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2011) y en *Ustilago maydis* se describió Rac1 (Weinzierl, *et al.*, 2002). En estos hongos Rac promueve el crecimiento de las hifas, la citocinesis y favorece la virulencia (Mahlert, *et al.*, 2006, Li, *et al.*, 2011).

En el hongo filamentoso *C. trifolii* se describió a Ct-Rac1. En esta proteína la presencia de una mutación DA aumenta la producción intracelular de ERO, mientras que una mutación DN disminuye la producción de ERO (Chen & Dickman, 2004). En el hongo *E. festucae* RacA (homólogo de Rac2 de humanos) interactúa con NoxR y esta interacción sirve para activar a NoxA. De esta forma se regula la producción de ERO, observándose que la falta de ERO aumenta la ramificación de las hifas de este hongo en la planta de la que es simbiote (Takemoto, *et al.*, 2006). En el hongo patógeno *Aspergillus fumigatus* se describió a RacA como homólogo de Rac1/2/3 de humanos (Li, *et al.*, 2011) y se mostró que esta proteína está involucrada en la producción intracelular de ERO, en el mantenimiento del crecimiento polarizado y en la virulencia del hongo. En el hongo fitopatógeno *Claviceps purpurea* al eliminar el gen *rac* se afecta la polaridad de las hifas, se presenta hiperramificación de hifas y disminuye la capacidad de penetrar los tejidos vegetales (Rolke & Tudzynski, 2008).

En general, en los hongos filamentosos se ha descrito a Rac como una proteína importante para mantener la polaridad de las hifas y el desarrollo asexual del hongo (conidiación). Al eliminar esta proteína se observa que el crecimiento del micelio se reduce, la conidiación se reduce y el número de ramificaciones de las hifas aumenta (Figura 2) (Rolke & Tudzynski, 2008, Tanaka, *et al.*, 2008, Kwon, *et al.*, 2011, Li, *et al.*, 2011).

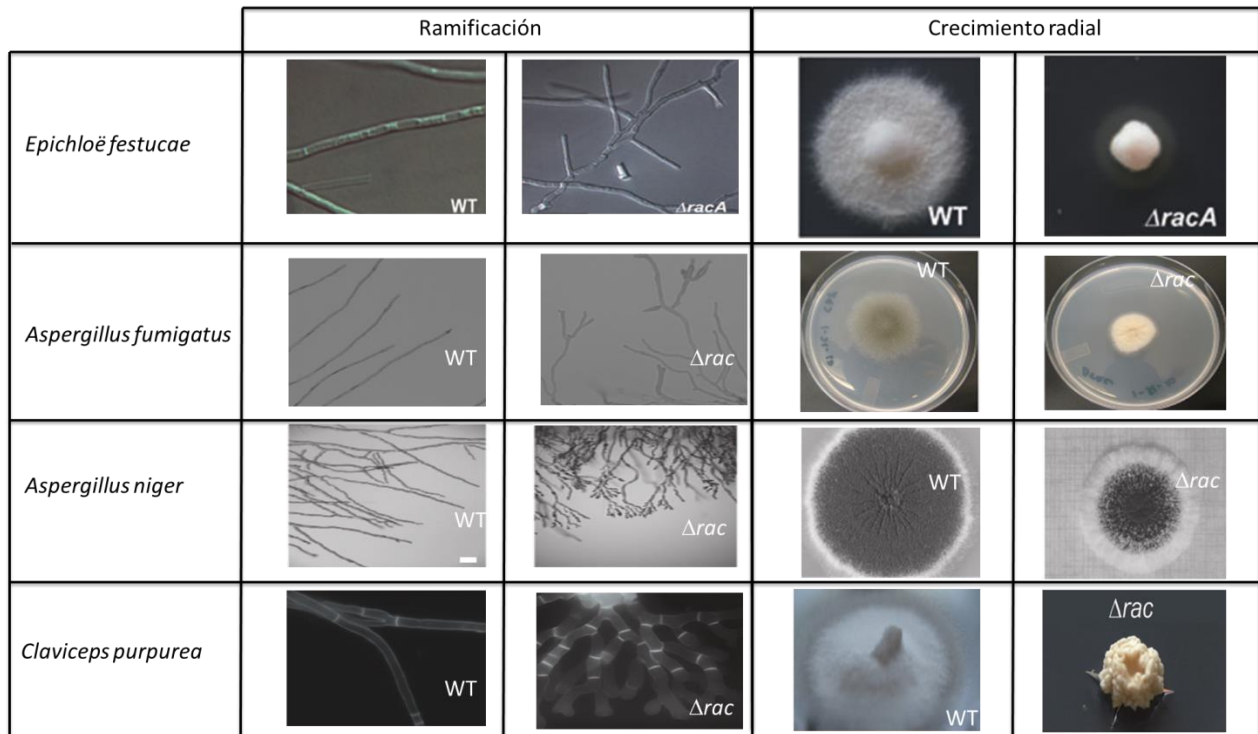


Figura 2. Efecto de la carencia de Rac en el crecimiento y el desarrollo de diferentes hongos filamentosos. La eliminación del gen *rac* en diferentes hongos filamentosos se observa un aumento en el número de ramificaciones y disminución del crecimiento radial de las colonias. Tomado de Rolke and Tudzynski 2008, Tanaka, Takemoto et al. 2008; Kwon, Arentshorst et al. 2011; Li, Barker et al. 2011.

***N. crassa* como organismo modelo**

N. crassa presenta varias características que lo hacen un modelo adecuado para estudios genéticos, citogenéticos, bioquímicos, moleculares y de genética de poblaciones. Algunas de ellas son que puede crecer en un medio mínimo (sales inorgánicas, sacarosa y biotina), presenta un crecimiento vegetativo rápido, un ciclo de vida de 2-3 semanas y presenta un ciclo asexual y un ciclo sexual (Figura 3) con dos distintos tipos de sexo (*mat a* y *mat A*).

Además se cuenta con el genoma secuenciado de este organismo (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>), una colección de plásmidos y de mutantes en el Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/>). Por estas características y herramientas *N. crassa* es considerado dentro de los 12 modelos de organismos eucariontes para la investigación biomédica (<http://www.nih.gov/science/models/>).

Ciclo de vida de *N. crassa*

Ciclo asexual

El micelio vegetativo de *N. crassa* es haploide, aunque las hifas poseen múltiples núcleos que no están separados en células individuales, formando un sincicio (Springer & Yanofsky, 1989). En contacto con el aire se desarrollan hifas de micelio aéreo, del cual se forman los macroconidióforos que producen macroconidios. Estos tienen varios núcleos haploides, siendo los macroconidios con dos núcleos los más frecuentes. En cultivos viejos se producen microconidios, que son conidios pequeños y uninucleados (Davis, 2000).

Durante la germinación de los macroconidios y microconidios, en condiciones de bajos nutrientes y con la densidad adecuada de conidios en el medio, se forman en las germinulas unas estructuras denominadas tubos de anastomosis (CAT). Morfológicamente los CAT son más cortos y delgados que los tubos germinales y no presentan ramificaciones. Fisiológicamente presentan un tamaño determinado y presentan quimiotropismo entre ellos. La formación de CAT es dependiente de la densidad celular. Los CAT una vez fusionados están relacionados con acelerar el crecimiento del tubo germinal y en el establecimiento de la colonia, gracias a que se forma una red de hifas interconectadas (Roca, *et al.*, 2005, Fleissner, *et al.*, 2008, Leeder, *et al.*, 2011).

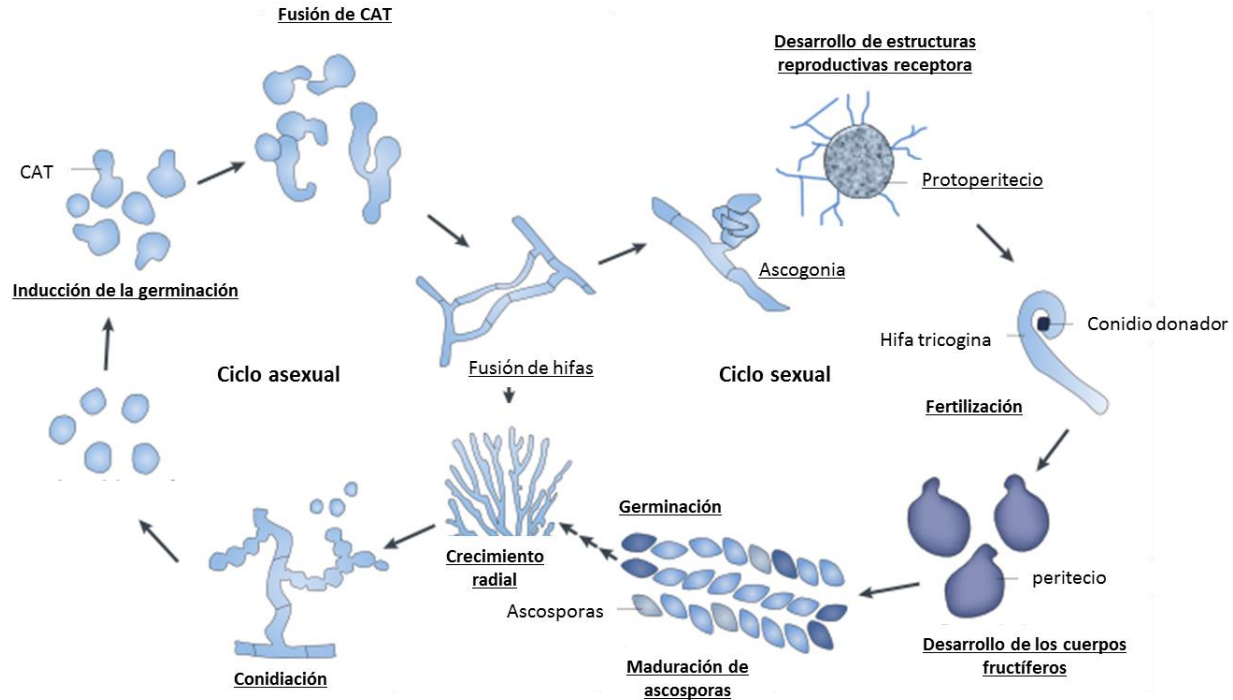


Figura 3. Ciclo de vida de *N. crassa*. El ciclo asexual consiste en la formación de esporas asexuales o conidios. Los conidios dan origen a los CAT y al tubo germinal. Los CAT se fusionan entre ellos y con los tubos germinales. Los tubos germinales forman las hifas del micelio vegetativo. Del micelio vegetativo surgen las hifas del micelio aéreo, estas sufren constricciones para formar los conidios. El ciclo sexual comienza con la formación de la ascogonia, la cual es cubierta por hifas estériles que forman el protoperitecio. La cepa que forma esta estructura se denomina femenina o receptora. El protoperitecio es fertilizado por el núcleo de un conidio de la cepa masculina o donadora. Después de la fertilización, el protoperitecio se desarrolla hasta formar un peritecio maduro. En el interior de este se lleva a cabo la formación de las esporas sexuales o ascosporas (Davis, 2000, Leeder, *et al.*, 2011).

El ciclo sexual

Esta etapa del desarrollo se lleva a cabo en condiciones de bajo nitrógeno y carbono, se requiere de una cepa donadora y una cepa receptora de sexos opuesto (*mat a* y *mat A*), debido a que *N. crassa* es un hongo heterotalico. La cepa receptora forma una estructura denominada ascogonia que es rodeada por hifas estériles que dan lugar al protoperitecio. La ascogonia actúa como gameto femenino. Esta produce una hifa especializada denominada hifa tricogina, la cual presenta quimiotropismo por conidios del sexo opuesto. Cuando se fusionan las paredes celulares de la hifa tricogina y el conidio donador el protoperitecio da lugar al desarrollo del peritecio, en el cual se encuentra la hifa ascogena, después de ocurridas varias divisiones nucleares por separado, comienza la fusión entre núcleos de la cepa receptora y de la cepa

donadora en la región subapical, asca inicial. Esta fusión nuclear completa el proceso de fertilización, único estado diploide del ciclo de vida. Los núcleos diploides dan lugar a divisiones meióticas seguidas de divisiones por mitosis, dando lugar a ocho núcleos que son protegidos por una pared rígida y melanizada para formar las ascosporas, que se encuentran dentro de un asca (Davis, 2000).

La recombinación en *N. crassa* como herramienta en la generación de mutantes

La recombinación homóloga es el método más eficiente para interrumpir, modificar o reemplazar algún gen. En *N. crassa* se presentan dos tipos de recombinación, la heteróloga y la homóloga, siendo la recombinación heteróloga favorecida en una cepa silvestre. Mientras que en cepas que carecen de las proteínas *mus-51* o *mus-51*, involucradas en la recombinación heteróloga, se favorece la recombinación homóloga (Ninomiya, *et al.*, 2004).

En *N. crassa* el marcador genético más utilizado para dirigir la integración de genes de interés es el locus *his-3*. El locus *his-3* codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa, la cual lleva a cabo tres reacciones en la síntesis de histidina (Catcheside, 1960, Minson & Creaser, 1969). Los primeros plásmidos utilizados derivan del plásmido pH303 y estos se integraban en el genoma por un solo evento de recombinación, lo que implicaba que en el locus *his-3* se integrara todo el plásmido y que se generaran dos copias del gen *his-3* (*his-3⁺::gen X::his-3*; solo *his-3⁺* es funcional). Sin embargo, esta duplicación del gen *his-3* no permite cruzar estas cepas debido a que en *N. crassa* se presenta un proceso de inactivación de genes duplicados denominado RIP (repeat-induced point mutation). Este consiste en realizar mutaciones por transición (cambio de pares G:C a pares A:T) en la secuencia de los genes duplicados (Cambareri, *et al.*, 1989), lo que implica la inactivación de ambos genes, dando como resultado transformantes auxótrofos a histidina. Para evitar este problema, la segunda generación de plásmidos que se generaron se basó en buscar dos eventos de recombinación y la sustitución completa de un gen por otro. El primer plásmido de este tipo se llamó pRAW122 (Figura 4), diseñado para reemplazar el locus *his-3* defectuoso por uno funcional e introducir entre la región 5' y el marco de lectura de *his-3*, un marcador de selección y la construcción de interés (Pratt & Aramayo, 2002, Lee, *et al.*, 2003). Las desventajas que se presentan para estos plásmidos son el tamaño relativamente grande (>14Kb) y que el segundo evento de recombinación homóloga se da en un alto porcentaje

inmediatamente después del primero y esto deja fuera la construcción de nuestro interés. La mayor ventaja es que se elimina el RIP en tejidos premeióticos y durante la meiosis vegetativa (Lee, *et al.*, 2003).

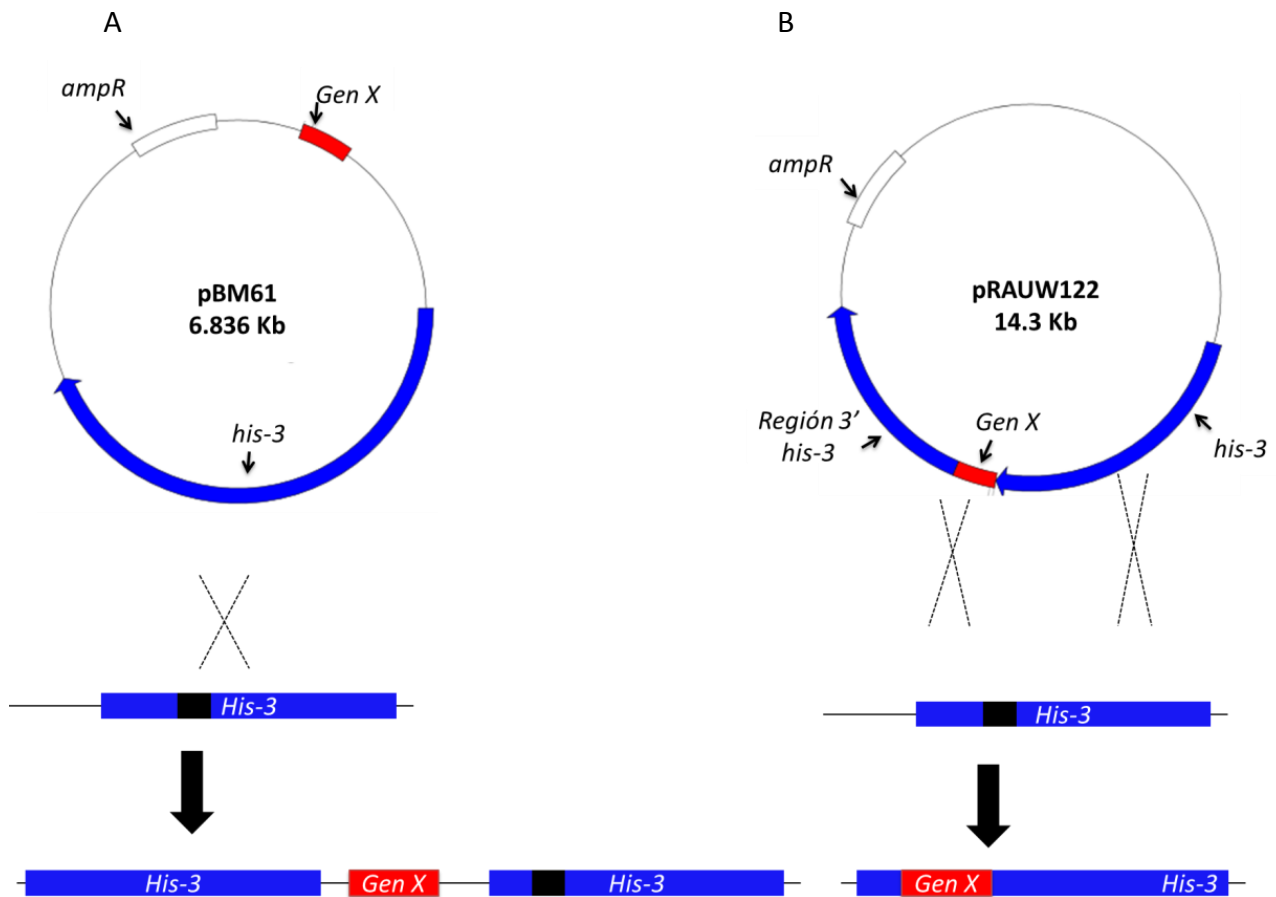
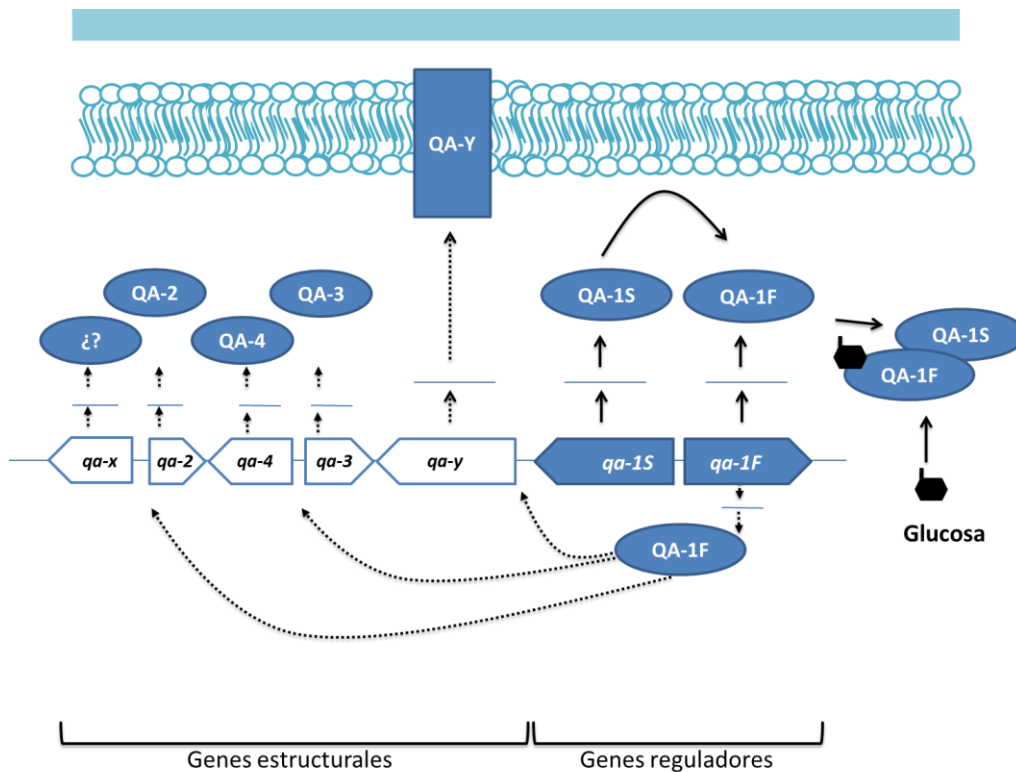


Figura 4. Tipos de recombinación que se presentan en el locus *his-3* con los plásmidos que se utilizan para realizar recombinación homóloga en *N. crassa*. A) plásmido pBM61, derivado del plásmido pH303, el cual se integra en el genoma por un solo evento de recombinación. B) Plásmidos derivados de pRAUW122 (dos eventos de recombinación). La doble recombinación integra en el locus *his-3* la construcción deseada, dejando así solo un gen *his-3* funcional (Pratt & Aramayo, 2002).

Metabolismo del ácido quínico en *N. crassa*

El ácido quínico (QA) es un polialcohol cíclico que se encuentra en concentraciones altas en la vegetación muerta y en las hojas de algunas plantas. El catabolismo del QA está relacionado directamente con la vía del protocatecuato y con la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. *N. crassa* puede utilizar el QA como única fuente de carbono. En presencia de glucosa o sacarosa los niveles de transcripción de los genes estructurales para la degradación de QA son basales (Figura 5). La regulación de la ruta metabólica para la degradación de QA en *N. crassa* es por represión por catabolito por lo que en medios que tienen al QA como única fuente de carbono se induce la transcripción de estas proteínas hasta 100 veces con respecto a las condiciones basales. Los genes de asimilación del QA se encuentran cercanos al centrómero y ocupan una región de 17.5kb. Esta región contiene siete genes de los que cuatro son estructurales (*qa-2*, *qa-3*, *qa-4*, *qa-y*), dos reguladores (*qa-1F* activador y *qa-1S* represor), y uno cuya función se desconoce (*qa-x*) (Giles, *et al.*, 1985, Tang, *et al.*, 2011).

A



B

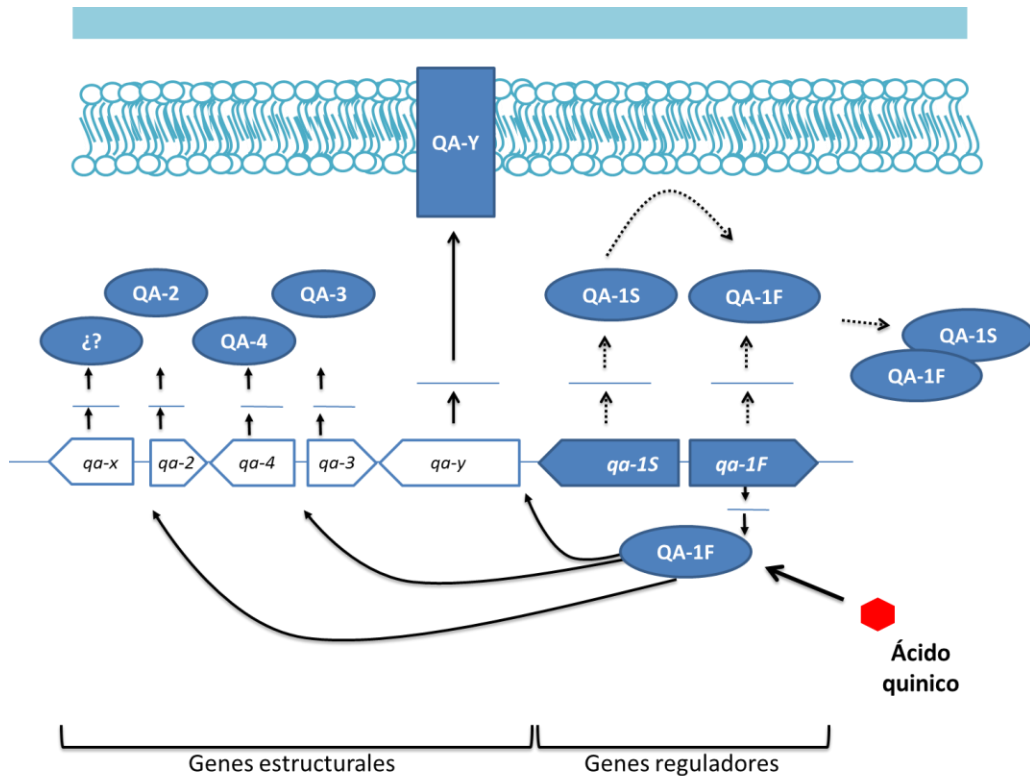


Figura 5. Regulación de los genes de asimilación del ácido quínico. **A)** El activador transcripcional QA-1F promueve la transcripción de todos los genes de la ruta incluyendo al gen del represor (*qa-1S*). QA-1S y la glucosa (hexágono negro) se unen a QA-1F para reprimir la transcripción de los genes estructurales. Sin embargo, QA-1F aún en presencia de glucosa tiene una expresión basal (fechas punteadas). **B)** Cuando el QA (hexágono rojo) es la única fuente de carbono presente este entra a la célula por QA-Y (permeasa de QA) y se une a QA-1F. Esta unión induce la transcripción de los genes de asimilación del QA (Giles, *et al.*, 1985, Tang, *et al.*, 2011). El estudio de los genes del catabolismo del QA se realizó mediante la transformación de *E. coli* con cósmidos en los que se encontraban los genes estructurales *qa-2*, *qa-3* y *qa-4*. Debido a que el metabolismo del QA está relacionado con la síntesis de aminoácidos aromáticos, las cepas de *E. coli* utilizadas eran poliauxotrofas a los aminoácidos aromáticos. Los resultados mostraron que el gen *qa-2*, no así *qa-3* y *qa-4*, de *N. crassa* era capaz de expresarse en *E. coli* de forma estable y constitutiva (independiente de la regulación por QA-1F), curando la auxotrofia por aminoácidos aromáticos (Giles, *et al.*, 1985).

Una estrategia para controlar los niveles de expresión genética en *N. crassa* es sustituir el promotor del gen de interés por el promotor inducible del gen *qa-2*. De esta forma, en presencia de glucosa en el medio de cultivo, la expresión del gen es baja. Sin embargo, al utilizar un medio de cultivo en el que el QA sea la única fuente de carbono se induce la expresión del gen de interés. Con esta estrategia se pretende estudiar genes esenciales en *N. crassa* debido a que la proteína de interés está presente pero en concentraciones basales y de esta forma se pueden analizar las funciones de dicha proteína (Larrondo, *et al.*, 2009).

Justificación

Las NADPH oxidasas son una fuente regulada de ERO (anión superóxido, O_2^-), estas proteínas fueron descritas por primera vez en células fagocíticas donde se observó que la carencia de actividad de esta enzima tiene consecuencia una enfermedad denominada granulomatosis crónica en la que no se puede eliminar a los microorganismos patógenos fagocitados por las células especializadas del sistema inmune. Las NOX también se han descrito en células no fagocíticas y en diferentes organismos en los que la producción de ERO ha sido relacionado con procesos de señalización y diferenciación celular. En células fagocíticas el complejo NOX está formado por las proteínas de membrana gp91^{phox} (Nox2) y p22^{phox}, y las proteínas citosolicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la GTPasa Rac. Un punto importante para la regulación de la activación del complejo NOX es la interacción con las GTPasas pequeñas Rac1 o Rac2 unidas a GTP, si esta interacción no se da con ninguna de las dos GTPasas el complejo NOX no producen ERO. En *N. crassa* se ha observado que en puntos específicos del desarrollo se necesita de un estado hiperoxidante previo a procesos de diferenciación celular. La presencia de dos ortólogos de gp91^{phox} (Nox2), NOX-1 y NOX-2, y de poseer un ortólogo de Rac1 en *N. crassa* permite pensar que la regulación de las NOX en este organismo es mediado por RAC-1. Por esta razón es importante realizar el estudio de la GTPasa RAC-1 en diferentes etapas del desarrollo de *N. crassa*.

Hipótesis

Si RAC-1 participa en la regulación de las NADPH oxidasas en *N. crassa* entonces modificaciones que afecten el ciclo de intercambio de GTP/GDP de esta proteína tendrán efectos en el crecimiento y la diferenciación celular similares a las mutantes carentes de NOX.

Objetivo general

Determinar el papel de la proteína RAC-1 en el crecimiento y la diferenciación celular en el hongo *N. crassa*.

Objetivos particulares

- Obtención de mutantes de *N. crassa* en las que el gen *rac-1* se encuentre inactivado.
- Obtención de mutantes de *N. crassa* con alelos silvestre y dominante negativo (DN) de *rac-1* bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*, integrados en el locus *his-3*
- Caracterización de mutantes *rac-1* durante las diferentes etapas del desarrollo de *N. crassa*.

Materiales y métodos

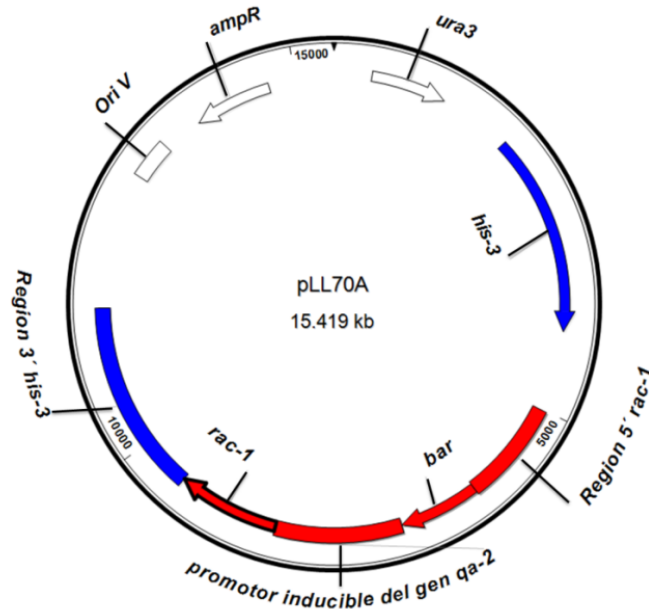
Cepas, vectores y oligonucleótidos

Tabla 1 Cepas de *N. crassa* utilizadas en este trabajo

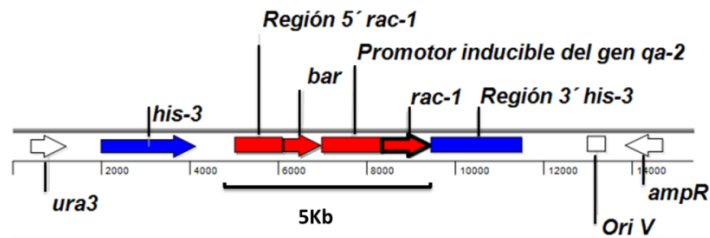
Cepa	Genotipo	Origen	Fenotipo
74-OR23-1A	<i>mat A</i>	FGSC1 #987	Silvestre (WT1)
RPNCR3A	<i>mep^r, his-3⁽¹⁻²³⁴⁻⁷²³⁾, InI^{Δ(SacI-BglIII)}::λA, mat A</i>	(Pratt & Aramayo, 2002)	His ⁻ , InI ⁻ (WT2)
74-OR8-1a	<i>mat a</i>	FGSC1 #988	Silvestre (WT3)
TCOR17	<i>Bar::qa-2::V5::rac-1 NF, mat A</i>	Este trabajo, transformación de la cepa 74-OR23-1A con fragmento de PCR <i>Bar::qa-2::V5::rac-1</i> del plásmido pLL89A.	Alelo silvestre de <i>rac-1</i> sustituido por alelo no funcional (NF) de <i>rac-1</i>
TCORDN	<i>Bar::qa-2::V5::rac-1 DN, mat A</i>	Este trabajo, transformación de la cepa 74-OR23-1A con fragmento de PCR <i>Bar::qa-2::V5::DN rac-1</i> del plásmido pLL90A	Alelo silvestre de <i>rac-1</i> sustituido por alelo dominante negativo de <i>rac-1</i>
TCOR1SH	<i>mep^r, his-3:: Bar::qa-2::V5::rac-1 WT, InI^{Δ(SacI-BglIII)}::λA, mat A</i>	Este trabajo, transformación de la cepa RPNCR3A con el plásmido pLL70A	Integración en el locus <i>his-3</i> del alelo silvestre inducible de <i>rac-1</i>
TCOR17H	<i>mep^r, his-3:: Bar::qa-2::V5::rac-1 NF, InI^{Δ(SacI-BglIII)}::λA, mat A</i>	Este trabajo, transformación de la cepa RPNCR3A con el plásmido pLL89A	Integración en el locus <i>his-3</i> del alelo no funcional de <i>rac-1</i>
TCOR1DNH	<i>mep^r, his-3:: Bar::qa-2::V5::rac-1 WT, InI^{Δ(SacI-BglIII)}::λA, mat A</i>	Este trabajo, transformación de la cepa RPNCR3A con el plásmido pLL90A	Integración en el locus <i>his-3</i> del alelo dominante negativo inducible de <i>rac-1</i> .

Las mutantes obtenidas en el presente trabajo se obtuvieron por transformación por electroporación con los plásmidos pLL70A, pLL89A y pLL90A. En la Figura 6 se muestran el mapa de los plásmidos y las construcciones que se utilizaron para obtener las mutantes. NF corresponde a un alelo *rac-1* no funcional que inicialmente se consideraba Dominante Activo (ver resultado).

A



B



C

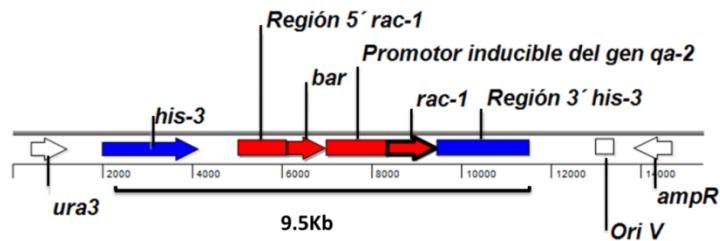


Figura 6. Plásmidos utilizados en el desarrollo del trabajo. A) Mapa del plásmido pLL70A, el cual contiene 1Kb de la región del promotor del gen *qa-2*, el gen *bar* que confiere resistencia al iginite, las secuencia para integrarse en el locus *rac-1* o en el locus *his-3*. Además tiene el gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*) y las secuencias necesarias para ser replicado en *E. coli* (OriV) y en levadura (*ura3*). **B)** construcciones obtenidas mediante PCR con los oligonucleótidos *rac-1* (F) y *rac-1* (R), utilizadas para sustituir al gen *rac-1* y para la integración en el locus de *his-3*. Las construcciones tienen un tamaño de 5Kb. **C)** Los plásmidos pLL70A, pLL89A y pLL90A tienen las secuencias homólogas al gen *his-3*, el tamaño de la construcción para recombinar en este gen es de 9Kb.

Tabla 2 Plásmido empleados en este trabajo

Nombre del plásmido	Características	Origen
pLL70A	<ul style="list-style-type: none"> • Confiere resistencia a ampicilina (<i>amp^r</i>, <i>E. coli</i>) • Confiere resistencia a ignite (gen <i>bar</i>, <i>N. crassa</i>) • Cura la auxotrofia a histidina cuando se integra en el locus <i>his-3</i> de <i>N. crassa</i> • Se puede replicar en <i>S. cerevisiae</i> (<i>ura3</i>) o en <i>E. coli</i> (OriV) • Alelo silvestre de <i>rac-1</i>, donde la expresión está controlada por el promotor inducible del gen <i>qa-2</i> de <i>N. crassa</i>. 	(Larrondo, et al., 2009)
pLL89A	<ul style="list-style-type: none"> • Confiere resistencia a ampicilina (<i>amp^r</i>, <i>E. coli</i>) • Confiere resistencia a ignite (gen <i>bar</i>, <i>N. crassa</i>) • Cura la auxotrofia a histidina cuando se integra en el locus <i>his-3</i> de <i>N. crassa</i> • Se puede replicar en <i>S. cerevisiae</i> (<i>ura3</i>) o en <i>E. coli</i> (OriV) • Alelo no funcional (NF) <i>rac-1</i> que contiene las regiones homologas necesarias para realizar recombinación homóloga en el locus <i>rac-1</i>. 	
pLL90A	<ul style="list-style-type: none"> • Confiere resistencia a ampicilina (<i>amp^r</i>, <i>E. coli</i>) • Confiere resistencia a ignite (gen <i>bar</i>, <i>N. crassa</i>) • Cura la auxotrofia a histidina cuando se integra en el locus <i>his-3</i> de <i>N. crassa</i> • Se puede replicar en <i>S. cerevisiae</i> (<i>ura3</i>) o en <i>E. coli</i> (OriV) • Alelo DN de <i>rac-1</i>, donde la expresión está controlada por el promotor inducible del gen <i>qa-2</i> de <i>N. crassa</i>. 	

La sustitución del gen silvestre *rac-1* se realizó con una construcción que tiene las secuencias homologas a la región 5' y al ORF de *rac-1* con las mutaciones correspondientes y tiene un tamaño de 5Kb. Esta construcción se obtuvo con los oligonucleótidos *rac-1* (F) y *rac-1* (R) (ver secuencia en la tabla 2). La integración en el locus *his-3* se realizó con los tres plásmidos por separado, en la cepa RPNCR3A, los cuales tienen las secuencias homologas al gen *his-3*.

Tabla 3 Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia
<i>rac-1</i> (F)	5'-GCCCCGCTTTTCTTCGAGTT-3'
<i>rac-1</i> (R)	5'-TTAGAGGATAGTGCACTTGG-3'
LC-07 (F)	5'-GCGCCCATCTCCCACAAGCC-3'
DA <i>rac-1</i> (F)	5'-CTGGTGACGTCGCTGTAGG-3'
DA <i>rac-1</i> (R)	5'- CCTACAGCGACGTCACCAG-3'

Todas las reacciones de PCR se realizaron a una temperatura de alineamiento de 55°C.

Condiciones de crecimiento de *N. crassa*

Obtención de conidios

N. crassa se creció en medio mínimo Vogel con 1.5% de sacarosa (VS) (Voguel, 1964) y los suplementos requeridos para cada cepa (ver en la tabla de las cepas los requerimiento según el genotipo). Para preparar medio sólido, se adicionó agar al 1.8%. Para obtener esporas o conidios, se inocularon 100 mL de medio mínimo sólido VS con suplementos en matraces de 500 mL. Los matraces se incubaron a 30 °C durante tres días en la oscuridad y dos días en la luz. Las esporas se colectaron agregando 50mL de agua fría a los matraces, el agua se filtró a través de "micracloth". El filtrado se colectó en frío en un matraz de 250 mL, el cual tenía un agitador magnético. Para hacer las alícuotas de conidios se homogenizó el filtrado por agitación con un agitador magnético, y con una micropipeta de 1 mL se fracciona en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las alícuotas de conidios se almacenaron a -20 °C y se descongelaron a temperatura ambiente en el momento de ser utilizadas.

Obtención de colonias aisladas de *N. crassa*

Para obtener colonias aisladas de conidios o ascosporas, se utilizó medio sólido con sorbosa al 2%, fructuosa y glucosa al 0.05%, y sales de Vogel 1X y se incubaron a 30° C por dos días en la oscuridad. En este medio no se agrega sacarosa por el efecto tóxico que tiene la mezcla sorbosa/sacarosa en *N. crassa* (De Terra & Tatum, 1961, De Serres, *et al.*, 1962, Voguel, 1964).

Medios de enriquecimiento de mutantes de *N. crassa*

Para los medios con higromicina (hph) se preparó un concentrado de higromicina a 0.05 g/mL. Se disolvió 1 g de higromicina en 20 mL de agua desionizada. Se esterilizó por filtración (filtros e con un poro de 22 μm) y se conservó a 4 °C. Los medios se prepararon con una concentración final de 200 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina.

Para extraer el ignite, agente activo del herbicida comercial Finale, se realizaron dos extracciones con butanol en una proporción 1:1 en un embudo de separación, se agitan bien las dos fases hasta formar una emulsión y se deja reposar en el embudo para que se separe la fase orgánica (fase superior) de la acuosa (fase acuosa) que es en la que se encuentra el ignite (Hays, 2000). Los medios tienen una concentración final de ignite aproximada de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Para agregar cualquiera de los agentes selectivos (hph o ignite), los medios de cultivo se esterilizaron por autoclave y se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50 °C para evitar que estos compuestos se descompusieran.

Transformación por electroporación de *N. crassa*

La cepa silvestre 74-OR23-1A (WT) y la cepa RPNCR3A se utilizaron para obtener las transformantes de este trabajo (Tabla 3). Se inocularon conidios de las cepas 74-OR23-1 y RPNCR3A en matraces de 500 mL con 100 mL medio mínimo sólido Vogel y se incubaron según el protocolo de obtención de conidios. Se colectaron los conidios y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 2.5×10^9 conidios y se realizaron 3 lavados con 500 μL de sorbitol 1 M frío. La solución de conidios con sorbitol se centrifugó 30 seg a 5000 RPM y se retiró el sobrenadante. Los conidios se mezclaron con 10 μL del DNA de interés y se incubaron en hielo por 5 min. Se tomaron 40 μL de esa mezcla y se transfirieron a una celda de electroporación de Bio-Rad de 0.2 cm. Las condiciones de electroporación fueron 1.5 kV, 600 Ω y 2.3 μF en el Gene Pulser II y el Controlador Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA). Después de la electroporación, se agregaron 960 μL de una solución 1 M de sorbitol frío y los conidios se mezclaron con 25 mL de solución de recuperación (sales de Vogel 1X con glucosa al 0.1%), y se incubó a 25 °C durante 2 h. Pasado este tiempo, la solución de recuperación se mezcló con 25 mL de Top Agar (medio Vogel con sorbosa al 2% y agar al 1.8%). Antes de que este medio (solución de recuperación más Top Agar) solidificara se agregó a cajas

Petri que contenían medio CA sólido con 10 µg/mL de ignite ó con 25 mg/mL de higromicina (medio base). Las placas se incubaron a 30 °C por cinco días en la oscuridad. Las transformantes se purificaron estriando cuatro veces consecutivamente en medio CA con 10 µl/mL de ignite.

Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN se sembraron 1 x 10 conidios en 10 mL de medio líquido VS y se crecieron por 48 h a 30 °C en la oscuridad y sin agitación. El micelio se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y se pulverizó con una espátula. El método de purificación del ADN fue adaptado a partir del protocolo de *A. nidulans* (Timberlake, 1980).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Para la amplificación de los genes de interés, se trabajó con un volumen total de 50 µL de reacción de PCR la cual contenía 5 µL de regulador 10X (KCl a 50 mM y Tris-HCl a 10 mM a pH 9.3), 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de cada oligonucleótido en sentido y antisentido (10 pM) (Tabla 1), 1.0 µL de DNA molde y 1 U de enzima TaqDNA-polimerasa. La reacción se realizó en las siguientes condiciones 94 °C por 4 min seguido de 35 ciclos a 94 °C, 30 s, 55 °C, 45 s, 72 °C, 45 s. Finalmente la reacción se mantuvo a 72 °C por 10 min. Para observar los productos amplificados por PCR se realizó el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2% a 100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó exponiéndose a la luz UV en un transiluminador.

Resultados

N. crassa presenta un homólogo de Rac1

Utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la secuencia de la isoforma Rac1 de *Homo sapiens*, se realizó un blastp contra las proteínas hipotéticas de *N. crassa* (Altschul, *et al.*, 1997). La proteína NCU02160 presentó una identidad de 77% ($E=4e^{-109}$). Esta proteína muestra similitud con la GTPasa pequeña RacA de *A. nidulans* por esta razón la proteína se nombró RAC-1 (Larrondo, *et al.*, 2009). RAC-1 es una proteína de 201 aminoácidos que presenta un dominio de unión al GTP y un motivo de geranil-geranilación (CaaX). Posteriormente se realizó un alineamiento para comparar esta secuencia con la de otros hongos filamentosos, incluido *Epichloe festucae*, en donde se había reportado a RacA como un ortólogo de Rac1 de *H. sapiens* (Takemoto, *et al.*, 2006, Tanaka, *et al.*, 2008). Las proteínas comparadas corresponden a las de *N. crassa*, *H. sapiens*, *C. trifolii*, *E. festucae*, *A. nidulans*, *Magnaporthe oryzae*, y *Sordaria macrospora*. El porcentaje de identidad de RAC-1 de *N. crassa* con los posibles ortólogos de las proteínas utilizadas en el alineamiento fueron del 77%, 85%, 83%, 63%, 56% y 98%, respectivamente.

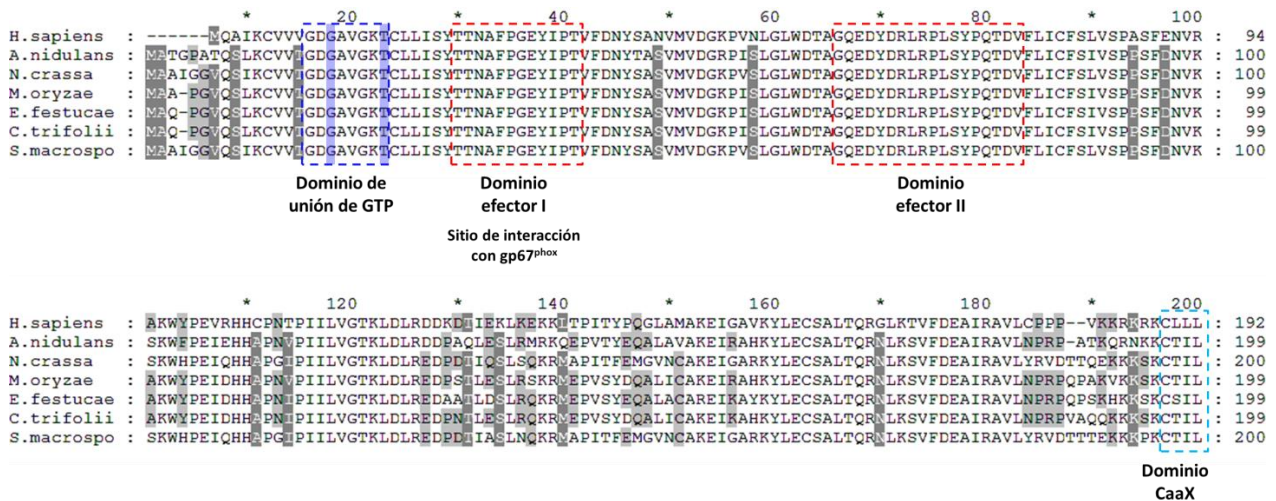


Figura 7. Alineamiento de la secuencia de ortólogos de Rac1 en hongos filamentosos. Se muestra el dominio de unión a GTP (cuadro azul), los 2 dominios efectores (cuadros rojos) que sirven para interactuar con otras proteínas y la caja CaaX, sitio de geranil-geranilación. Además en los rectángulos azules se muestran los aminoácidos importantes para obtener una mutación dominante activa (G18V) o una mutación dominante negativa (T23N) de RAC-1 de *N. crassa*. Para realizar el alineamiento se utilizó el programa Bioedit y para editarlo se utilizó el programa GeneDoc.

El alineamiento y el porcentaje de identidad de estas secuencias (Figura 7) indican que el gen NCU02160 codifica para una GTPasa pequeña perteneciente a la subfamilia Rac. Para estudiar los efectos de RAC-1 en *N. crassa* se realizaron mutaciones en el gen *rac-1* para obtener mutaciones DA (G18V) y DN (T23N). Estas mutaciones corresponden a los cambios G12V para la mutación DA y T17N para la mutación DA en la proteína Rac1 de humanos (Sundaresan, *et al.*, 1996, Chen & Dickman, 2004).

Obtención de mutantes de *N. crassa* en las que el alelo silvestre se sustituyó por alelos bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*

Los plásmidos pLL70A, pLL90A y pLL89A fueron donados por el Dr. Jay Dunlap y el Dr. Luis F. Larrondo (Dartmouth University, USA). En la Tabla 3 se mencionan las características de los alelos *rac-1* que tienen estos plásmidos. En los tres plásmidos el promotor de *rac-1* se sustituyó por una región de 1Kb localizada río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *qa-2* de *N. crassa*. Esta región contiene la región promotora del gen *qa-2*. El plásmido pLL70A contiene el alelo silvestre, el plásmido pLL90A contiene el alelo DN y el plásmido pLL89A se informó originalmente que contenía el alelo DA de *rac-1*. Sin embargo, al secuenciar estos plásmidos para corroborar las construcciones, se observó que el plásmido pLL89A no contenía la secuencia necesaria para obtener una mutación DA (G18V). Por el contrario, este plásmido presenta una delección de la citosina antes del codón GAC que codifica para el aspartato 17 de RAC-1. Esta mutación corre el marco de lectura de la secuencia e introduce dos codones de terminación de la transcripción, TAG y TAA, que se encuentran adyacentes (Figura 11) y de manera teórica codifica para un polipeptido de 17 aminoácidos. Sin embargo el plásmido contienen las secuencias necesarias para remplazar el gen silvestre *rac-1* por recombinación homóloga por lo que se utilizó como alelo no funcional (NF).

Para sustituir el alelo silvestre de *rac-1* por los alelos inducibles de los plásmidos pLL70A, pLL89A y pLL90A se realizó la amplificación de una región de 5Kb por PCR, con el uso de los oligonucleótidos *rac-1* (F) y *rac-1* (R) (Figura 6B). Dentro de las construcciones se encuentra el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida ignite, el cual es un tripéptido formado de 2 L-alaninas y un análogo del ácido aspártico conocido como fosfotricina (PPT). El ignite inhibe la función de la glutamina sintasa (Thompson, *et al.*, 1987).

Nuestra primera estrategia para estudiar las funciones de RAC-1 fue obtener cepas de *N. crassa* en las que el gen silvestre de *rac-1* se sustituyó por alelos inducibles de *rac-1*, mediante dos eventos de recombinación homóloga, uno en la región 5' de *rac-1* y el otro en el ORF de *rac-1* (Figura 8). De esta forma, la única proteína RAC-1 disponible en la célula se encuentra en sus formas DA o DN (Thompson, *et al.*, 1987)

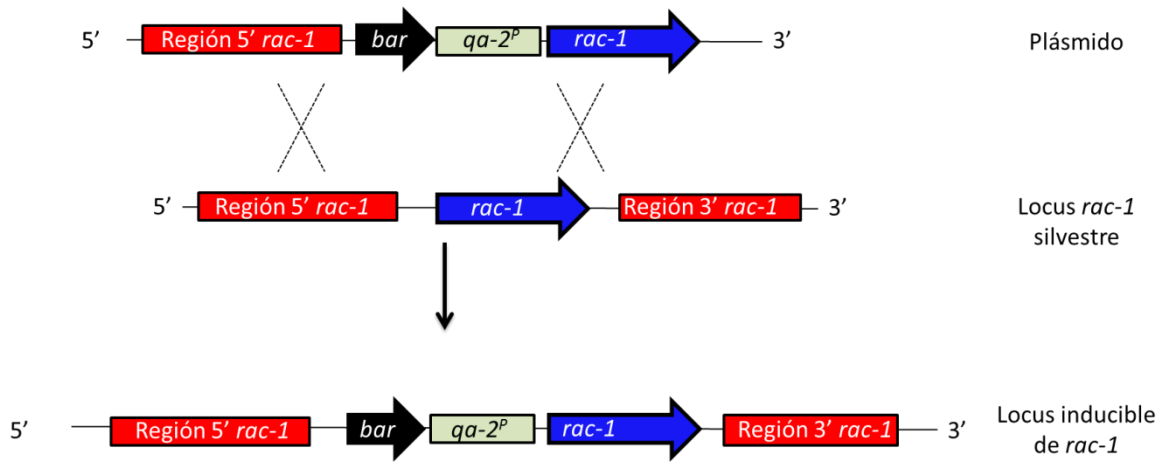


Figura 8. Eventos de recombinación homóloga para sustituir a *rac-1* en la cepa 74-OR23-1 (WT). Se esperaban eventos de recombinación en la región 5' del gen de *rac-1* y en la región codificante de *rac-1*. Al llevarse a cabo estos eventos de recombinación se integraron en el genoma el gen *bar* que confiere la resistencia al iginite y el promotor inducible del gen *qa-2*.

Las mutantes TCOR17 (*rac-1* NF) y TCORDN (*rac-1* DN) presentan defectos en el desarrollo de las hifas.

Con respecto a la cepa 74-OR23-1A (WT1), las mutantes TCOR17 (*rac-1* NF) y TCORDN (*rac-1* DN) mostraron grandes diferencias en el crecimiento radial de la colonia (Figura 9).

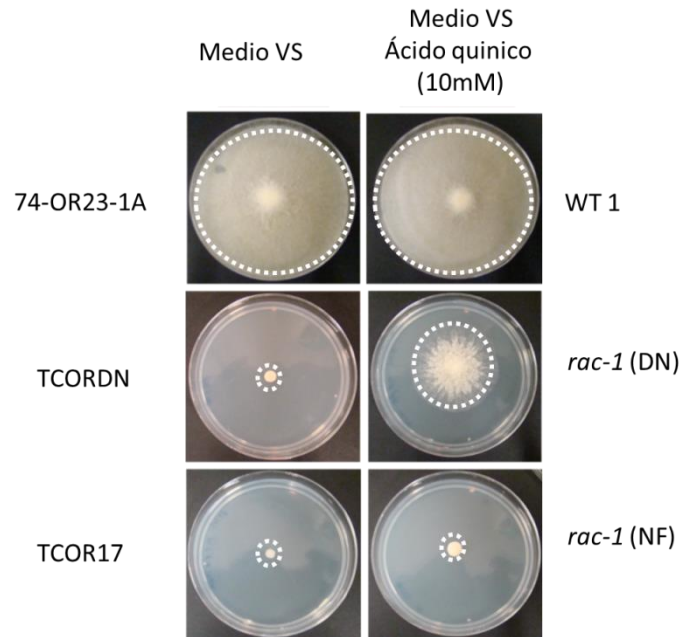


Figura 9. Tanto la carencia de RAC-1 como la presencia de un alelo DN resultan en la disminución del crecimiento del micelio vegetativo y aéreo en comparación con una cepa silvestre. Micelio de las cepas WT1, TCOR17 (*rac-1* NF) y TCORDN (*rac-1* DN) Se inoculó en el centro de las placas con medio VS con y sin el inductor (ácido quinico) y se incubaron a 30°C durante 48h en la oscuridad.

En la cepa WT1, independientemente del inductor, a las 48h de incubación se presenta un crecimiento radial sobre toda la superficie del medio de cultivo, mientras que las cepas TCORDN (*rac-1* DN) y TCOR17 (*rac-1* NF) en ausencia del inductor no presentan crecimiento radial con respecto a la cepa silvestre. Cuando en el medio se encuentra el inductor, la cepa TCORDN (*rac-1* DN) presenta una mejora en el crecimiento radial, pero este crecimiento no iguala al de la cepa WT1. Sin embargo, la cepa TCOR17 (*rac-1* NF) no presenta diferencias en el crecimiento radial. Esta disminución en el tamaño de las colonias sugiere que RAC-1 está involucrada en el desarrollo de las hifas del micelio vegetativo. Para poder observar el desarrollo de las hifas en forma más detallada se inoculó medio líquido VS y se realizaron preparaciones en fresco que se observaron al microscopio de luz blanca (Figura 10).

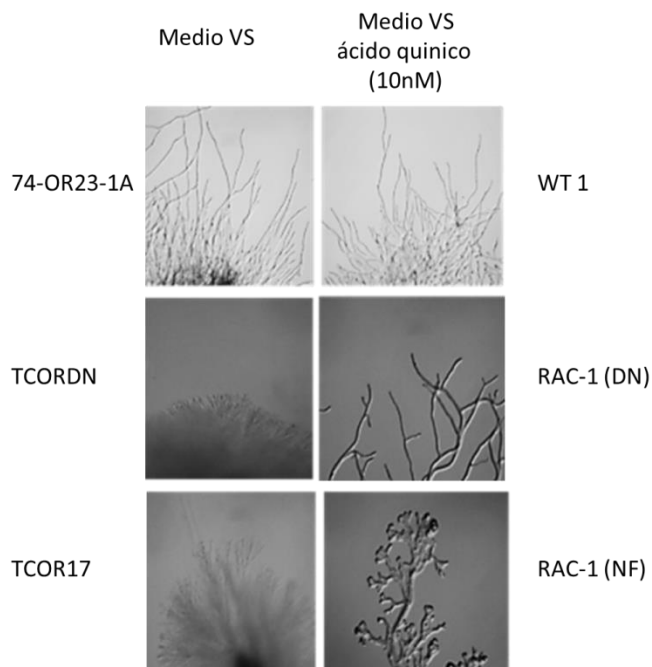


Figura 10. RAC-1 tiene un papel esencial en el mantenimiento de la polaridad de las hifas de *N. crassa*. Micelio de las cepas WT1, TCOR17 (*rac-1* NF) y TCORDN (*rac-1* DN) se inocularon en 50mL de medio líquido VS con y sin el inductor. Este medio se incubó a 30°C durante 12h en la oscuridad. Para realizar las observaciones al microscopio el micelio se colocó en un portaobjetos y se realizaron las observaciones a 40X de aumento.

En la cepa WT1, independientemente del inductor, a las 12h de incubación no se presentaron cambios en la elongación ni en el patrón de ramificación de las hifas. En ausencia del inductor las cepas TCORDN (*rac-1* DN) y TCOR17 (*rac-1* NF) muestran una disminución de la elongación de las hifas con respecto a la cepa WT1. En presencia del inductor la cepa TCORDN (*rac-1* DN) recupera de forma parcial la elongación de las hifas. Sin embargo, la cepa TCOR17 (*rac-1* NF) no presenta una recuperación en la elongación de las hifas y además se observa un aumento en el número de ramificaciones de las hifas con respecto a las cepas WT1 y TCORDN (*rac-1* DN) (Figuras 9 y 10).

Se debe enfatizar que la cepa TCORDN (*rac-1* DN) expresa permanentemente la forma DN de RAC-1, mientras que la cepa TCOR17 carece por completo de la proteína RAC-1 (Figura 11), por lo que el fenotipo observado en esta cepa es equivalente al de una mutante nula en *rac-1*. En efecto recientemente se han reportado los mismos fenotipos para una mutante carente del gen *rac-1* (Araujo-Palomares, *et al.*, 2011)

```

          *           380           *           400           *           420
NCU02160 : ACTGGTGACGGTGCTGTAGGAAAGGTAAACTCACTCCCACCGCTTCCCCTCTCAGAGTCA : 261
pLL70    : ACTGGTGACGGTGCTGTAGGAAAGGTAAACTCACTCCCACCGCTTCCCCTCTCAGAGTCA : 415
pLL89    : ACTGGTGA-GTCGCTGTAGGAAAGGTAAACTCACTCCCACCGCTTCCCCTCTCAGAGTCA : 308
pLL90    : ACTGGTGACGGTGCTGTAGGAAAGGTAAACTCACTCCCACCGCTTCCCCTCTCAGAGTCA : 405

          *           440           *           460           *           480
NCU02160 : CCGTGTCCCGCACCGCGCAAGGACTAACCCTTGATTGCCAGACATGTCCTTCTCATCTCAT : 321
pLL70    : CCGTGTCCCGCACCGCGCAAGGACTAACCCTTGATTGCCAGACATGTCCTTCTCATCTCAT : 475
pLL89    : CCGTGTCCCGCACCGCTCAAGGACTAACCCTTGATTGCCAGACATGTCCTTCTCATCTCAT : 368
pLL90    : CCGTGTCCCGCACCGCGCAAGGACTAACCCTTGATTGCCAGAATGTCCTTCTCATCTCAT : 465

```

Figura 11. Alineamiento de las secuencias obtenidas para los alelos inducibles de *rac-1*. El alineamiento incluye la secuencia del gen NCU02160 (*rac-1*) de *N. crassa* y la secuencia presente en los plásmidos pLL70A (*qa-2^p::rac-1* WT), pLL89A (*qa-2^p::rac-1* NF) y pLL90A (*qa-2^p::rac-1* DN). En gris se muestra uno de los intrones en la secuencia del gen *rac-1*. En rojo se muestran los codones que generan una mutación DA (GTC) y una mutación DN (AAT). En azul se muestra en pLL89A el sitio de la citosina ausente que genera un alelo no funcional de *rac-1*. En cuadros naranja se muestran los dos codones de paro que se generan en el plásmido pLL89A.

Estos resultados muestran que la expresión de RAC-1 en un estado inactivo (unida a GDP) permite la elongación de las hifas con una ramificación similar al de la cepa WT1. Por otro lado también muestran que la carencia de RAC-1 produce una severa inhibición del crecimiento radial y una alta ramificación de las hifas. Una conclusión inmediata de estos experimentos es que el sustituir el alelo silvestre de *rac-1* por alelos inducibles DN o DA no es un buen sistema para estudiar la función de RAC-1 en puntos específicos del desarrollo de *N. crassa* debido a que RAC-1 solo se expresaría en una de las dos conformaciones posibles (DN o DA) y no es posible encender a voluntad el gen de interés debido al efecto pleiotrópico de RAC-1 en el desarrollo y solo se pueden evaluar condiciones de todo o nada.

Con el objeto de modular mejor la actividad de RAC-1 en la célula se decidió expresar los distintos alelos de *rac-1* en un fondo genético con el alelo silvestre de *rac-1*, integrando el alelo inducible en el locus *his-3*. De esta forma se esperaba poder controlar la expresión de los alelos inducibles en puntos específicos del ciclo asexual y sexual de *N. crassa*, mediante la inducción por ácido quínico.

Para esta nueva estrategia se utilizó la cepa RPNCR3A y los plásmidos pLL70A [*his-3::rac-1* (WT)], pLL89A[*his-3::rac-1* (NF)] y pLL90A [*his-3::rac-1* (DN)]. Estos plásmidos poseen las secuencias que permiten llevar a cabo recombinación homóloga en el locus *his-3* (Figura 6A y 6C) y sólo cuando se integran en este locus son capaces de curar la auxotrofía por histidina, ya

que mediante dos eventos de recombinación homóloga se integra al genoma la construcción deseada. La cepa RPNCR3A es auxótrofa de histidina, ya que posee un alelo no funcional del gen *his-3* (Figura 12).

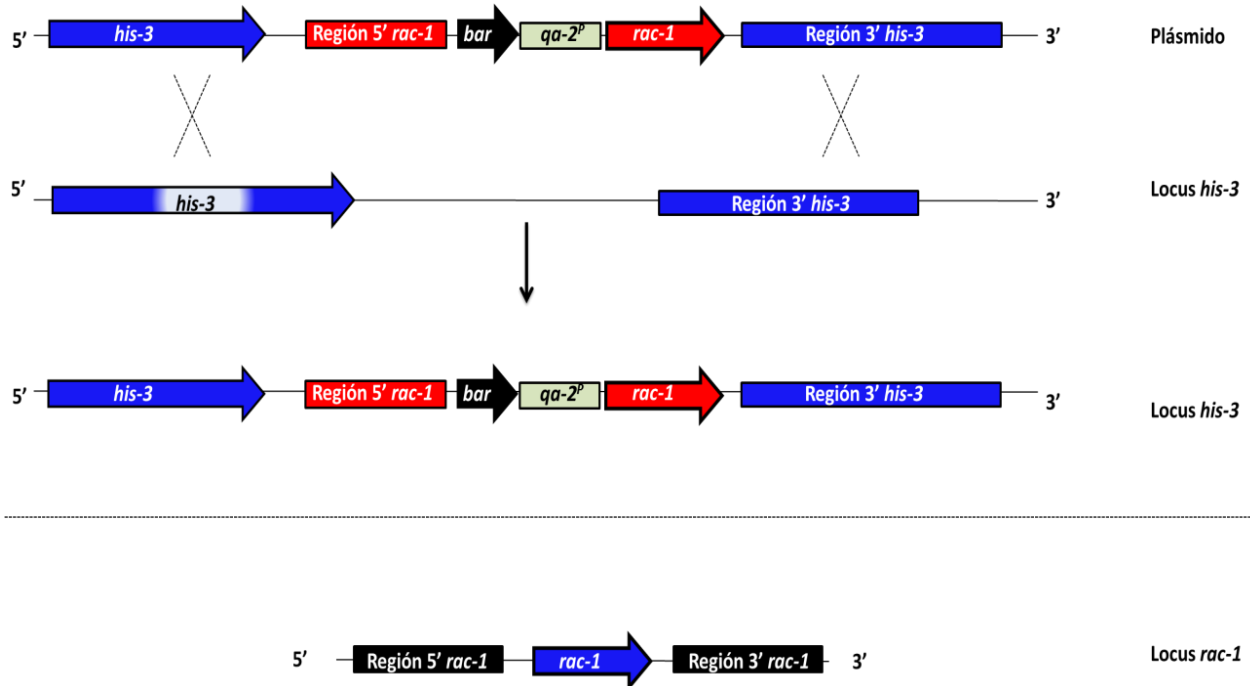


Figura 12. Eventos de recombinación homóloga esperados en el locus *his-3* en la cepa RPNCR3A. Se espera un primer evento de recombinación en la región codificante de *his-3* y un segundo evento en la región 3' de *his-3*. Al llevarse a cabo estos eventos, se integra en el genoma el gen *bar* que confiere resistencia a ignite y el promotor inducible del gen *qa-2* el cual regula la expresión de *rac-1*; el resto del plásmido no se integra.

Esta transformación se realizó por electroporación y la selección de las transformantes se realizó en medio Vogel con sorbosa al 2% y que contenía inositol (la cepa RPNCR3A es también auxótrofa de inositol) e ignite. Las cepas obtenidas se purificaron en medio Vogel sorbosa 2% con inositol e ignite para la obtención de homocariones (Figura 13).

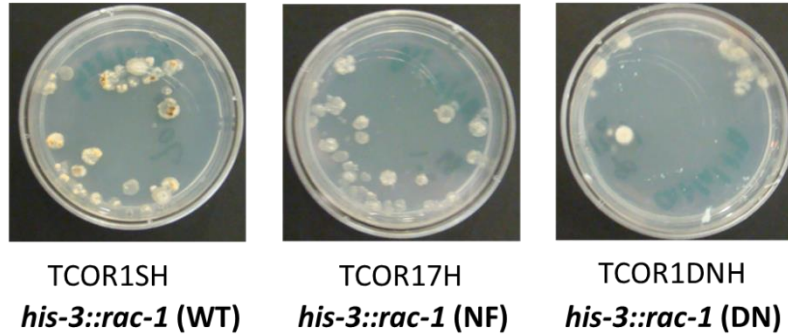
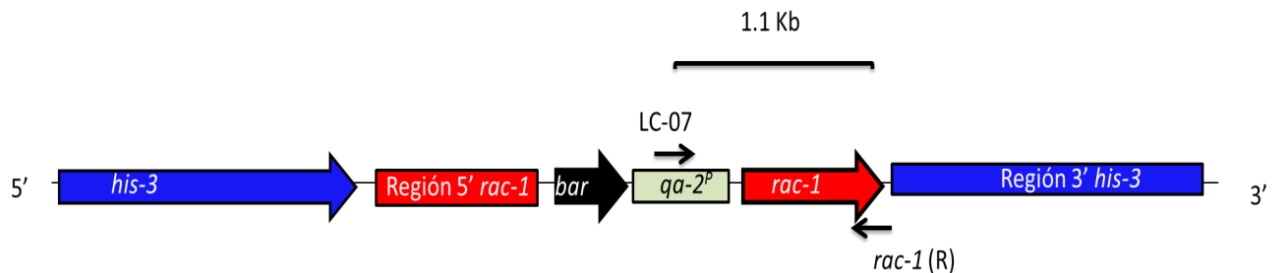


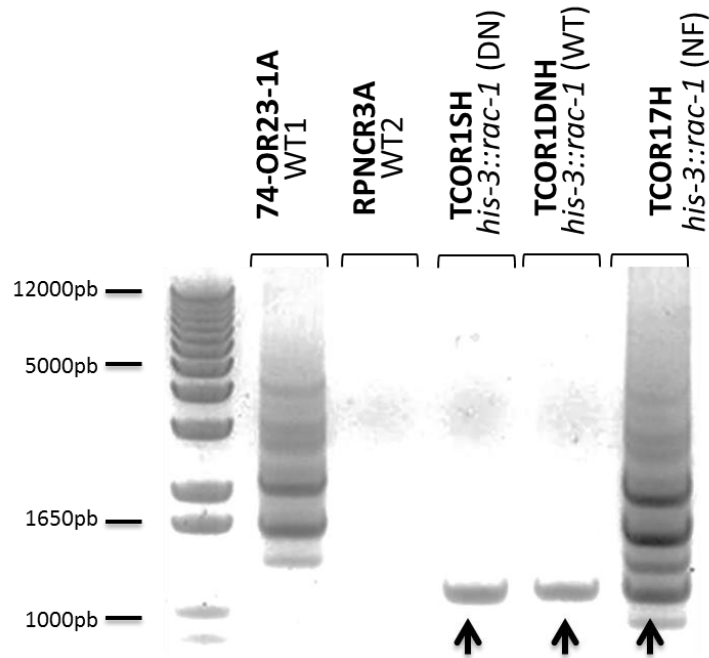
Figura 13 Transformantes *his⁺*, *bar^r* obtenidas de la transformación de la cepa RPNCR3A con los plásmidos pLL70A [cepa TCOR1SH, *his-3::rac-1* (WT)], pLL89A [cepa TCOR17H, *his-3::rac-1* (NF)] y pLL90A [cepa TCOR1DNH, *his-3::rac-1* (DN)]. Las cepas obtenidas de la transformación se inocularon en medio Vogel con sorbosa al 2% e ignite. Para la obtención de homocariones se realizaron 4 pases en este medio de selección.

Una vez realizados los pases en el medio de selección se realizó la extracción del DNA genómico para comprobar que se contaba con las cepas deseadas. Se realizó una PCR diagnóstica, la cual amplifica una región de los alelos de *rac-1*, para comprobar la integración de las construcciones y secuenciar los fragmentos de DNA correspondientes y así comprobar la presencia de las mutaciones de interés. El fragmento de DNA con las mutaciones deseadas tiene un tamaño de 1100pb y se amplificó con los oligonucleótidos LC-07 y *rac-1* (R) (Figura 14).

A



B



C

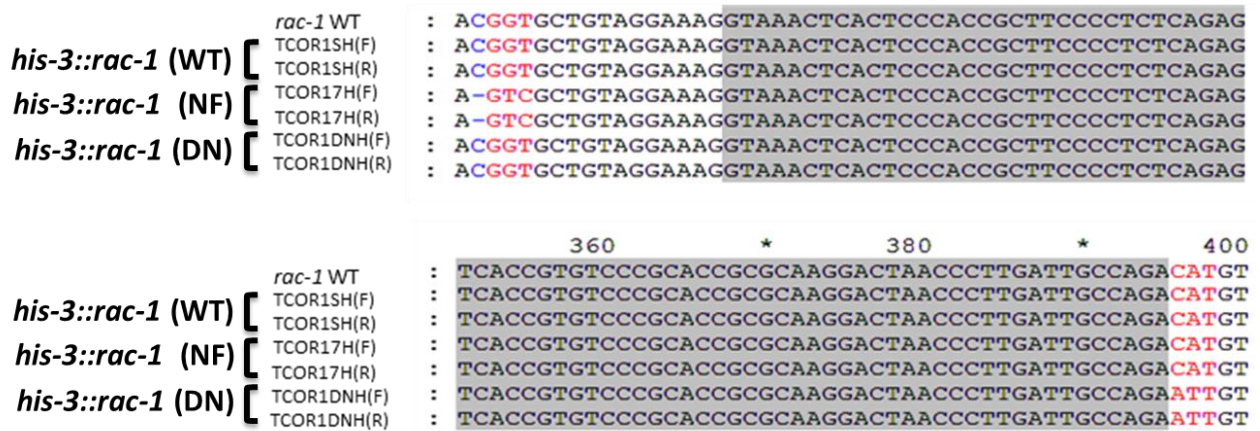


Figura 14. Comprobación de las transformantes de la cepa RPNCR3A. A) Esquema de la PCR diagnóstica que se utilizó para comprobar la integración de la construcción *Bar::qa-2::V5::rac-1*. Con los oligonucleótidos LC-07 y *rac-1* (R), flechas azules, los cuales amplifican una región de 1.1Kb. B) Amplicones obtenidos del DNA genómico de las transformantes obtenidas de la cepa RPNCR3A con los plásmidos pLL70A (cepa TCOR1SH, *rac-1* WT), pLL89A (TCOR17H, *rac-1* NF) y pLL90A (TCOR1DNH, *rac-1* DN). Sólo en las transformantes se espera un amplificado de 1.1Kb. C) Resultados obtenidos de la secuenciación del fragmento de 1.1Kb obtenido de las transformantes para comprobar que poseen los alelos de *rac-1* correctos.

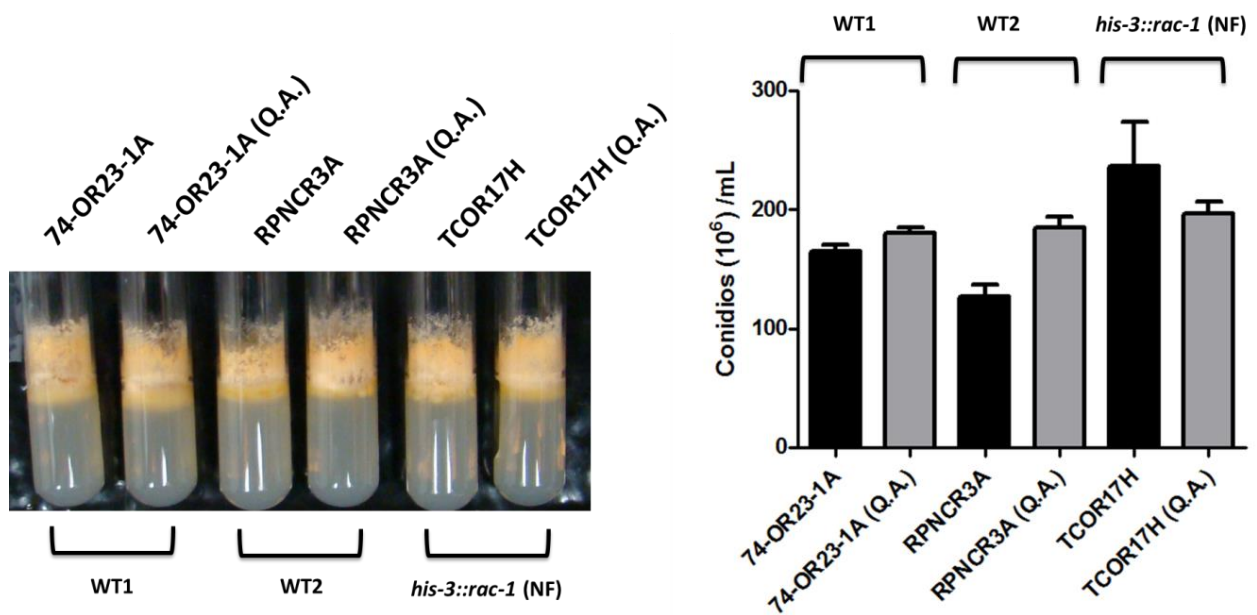
La PCR diagnóstica y la secuenciación indican la integración de los diferentes alelos de *rac-1* muy probablemente en el locus *his-3* de *N. crassa*, debido a que el medio selectivo que se utilizó para

la selección de transformantes contenía ignite y carecía de histidina. La cepa original (RPNCR3A) es auxótrofa de histidina y sensible al ignite. Por lo que las cepas que crecen en este medio curan la auxotrofia y adquieren la resistencia al ignite al realizar el remplazamiento del alelo no funcional de *his-3* de la cepa RPNCR3A (Figura 12).

Evaluación del papel de RAC-1 en el desarrollo de *N. crassa*

Una vez que se confirmó que las cepas obtenidas de la transformación eran las deseadas, se realizó la caracterización fenotípica de estas. Se caracterizó la formación de micelio aéreo, número de conidios producidos y crecimiento radial. La cepa TCOR17H (*rac-1* NF) no mostró diferencias en el número de conidios producidos y en el crecimiento radial al compararla con las cepas silvestres 74-OR23-1A y RPNCR3A (Figura 15).

A



B

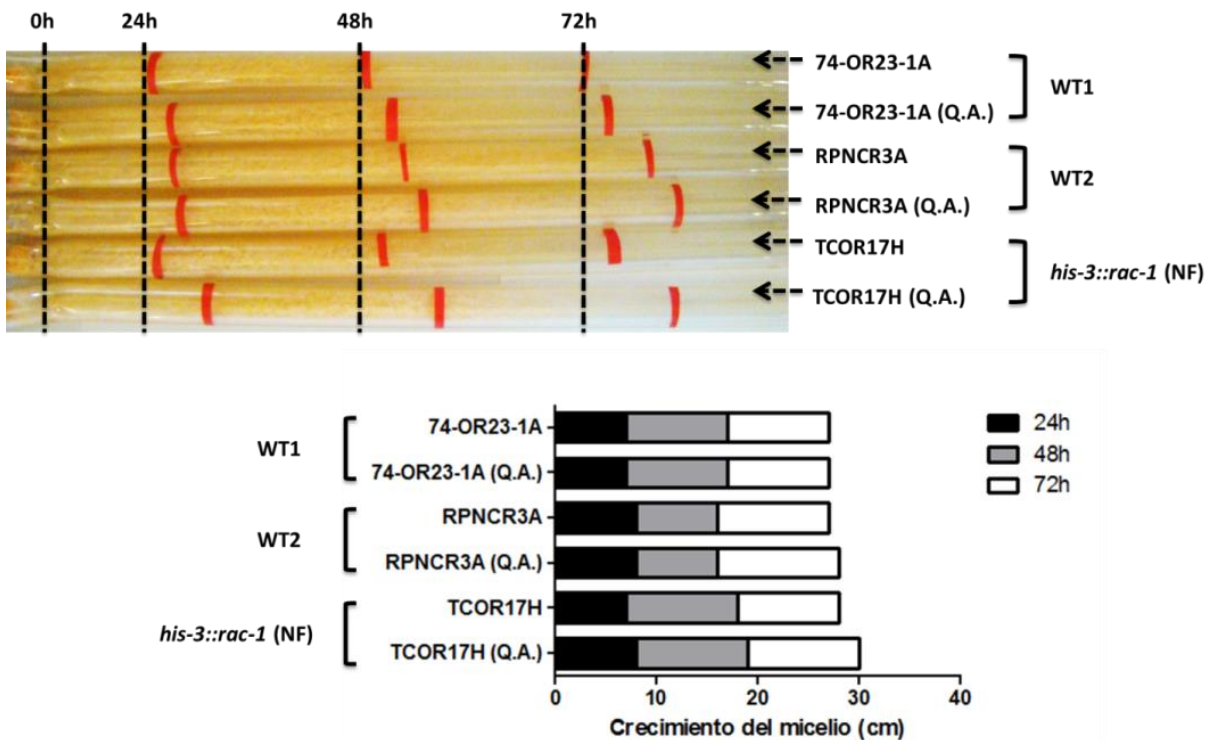


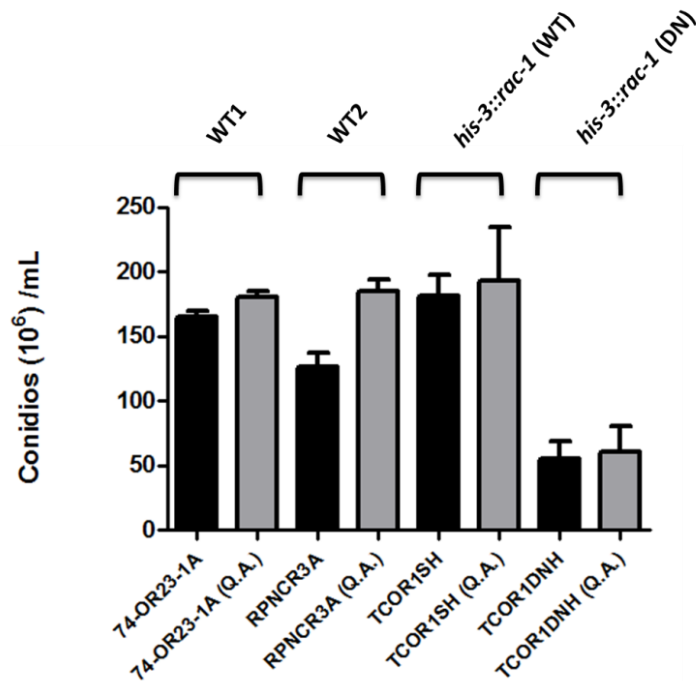
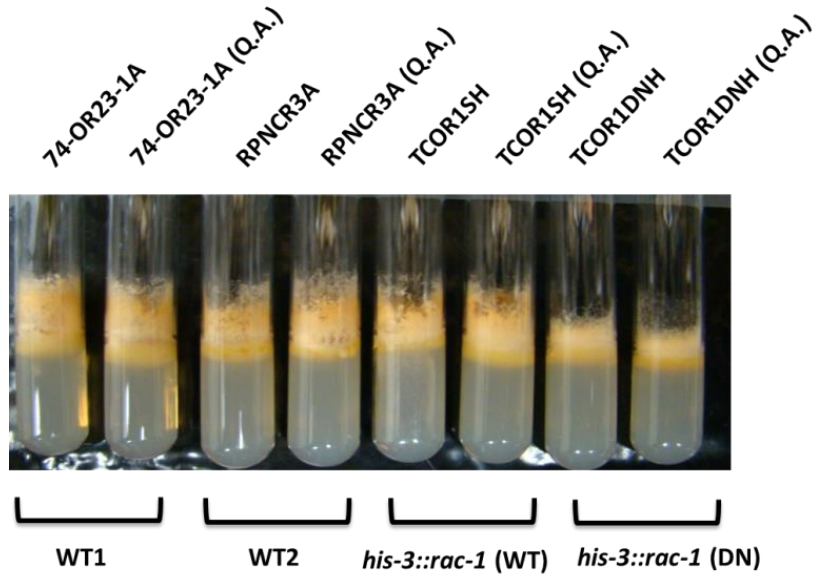
Figura 15. La expresión en trans del alelo NF *rac-1* no afecta el desarrollo en *N. crassa*. A) Número de conidios producido por las cepas 74-OR23-1 (WT), RPNCR3A y TCOR17H. En tubos de ensayo con 3mL de medio VS se inocularon por triplicado con 1×10^6 conidios, estos tubos se incubaron a 30°C, dos días en la oscuridad y tres días en luz. Los conidios se colectaron en agua fría y se cuantificaron en una cámara de Neubauer, en ausencia o presencia del inductor (ácido quínico 10mM). B) Cuantificación del crecimiento vegetativo de las cepas 74-OR23-1 (WT), RPNCR3A y TCOR17H en “race tubes”. 1×10^6 conidios se inocularon en placas de medio VS y se incubaron 12h a 30°C en la oscuridad. Los “race tubes” se inocularon en uno de los extremos con un fragmento de 0.5mm de diámetro de una colonia crecida en medio VS inoculado y se midió el crecimiento del micelio cada 24h.

La conidiación de las cepas silvestres 74-OR23-1A y RPNCR3A es semejante y no se ve afectada por la presencia del inductor (ácido quínico 10mM). Lo mismo ocurre con la cepa TCOR1SH (*rac-1* silvestre desde el promotor *qa-2*). La cepa TCOR17H (*rac-1* NF integrado en el locus *his-3*) tampoco presenta un cambios en el número de conidios y en el crecimiento micelial lo que permite concluir que la construcción integrada en el locus *his.3* no tiene otro efecto sobre el desarrollo de *N. crassa* y solo complementa la auxotrofia a histidina de la cepa RPNCR3A.

En la Figura 16 se muestra que la cepa TCOR1SH que expresa el alelo silvestre bajo el promotor *qa-2* presenta una disminución en el crecimiento radial, pero no se vio afectada la producción

de conidios ni de micelio aéreo con respecto a las cepas control. En cambio, la transformante que expresa el alelo *rac-1* dominante negativo de RAC-1 la cual mostró una disminución en el crecimiento radial, en el número de conidios y en el crecimiento del micelio aéreo, independientes de la presencia o ausencia del inductor (ácido quínico 10mM). Esto indica que aun la expresión basal de este alelo tiene un efecto negativo en estos procesos.

A



B

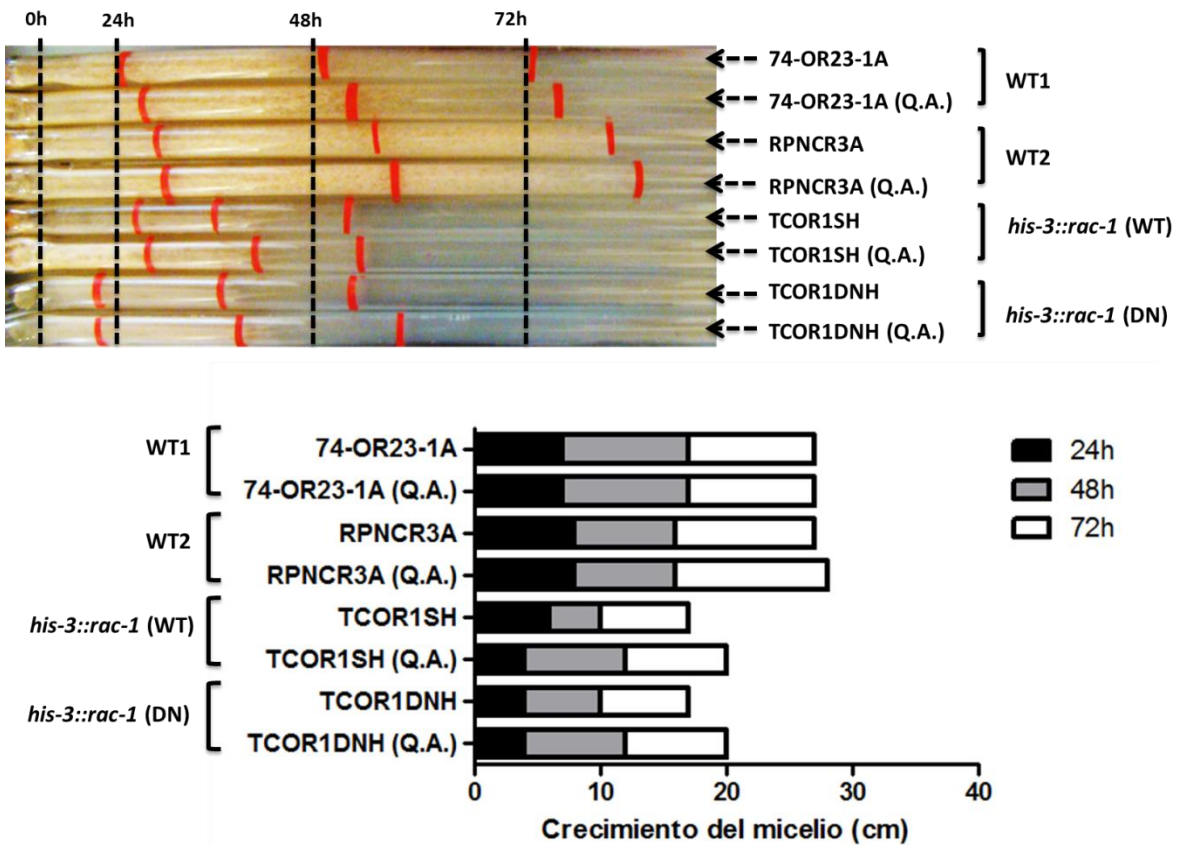
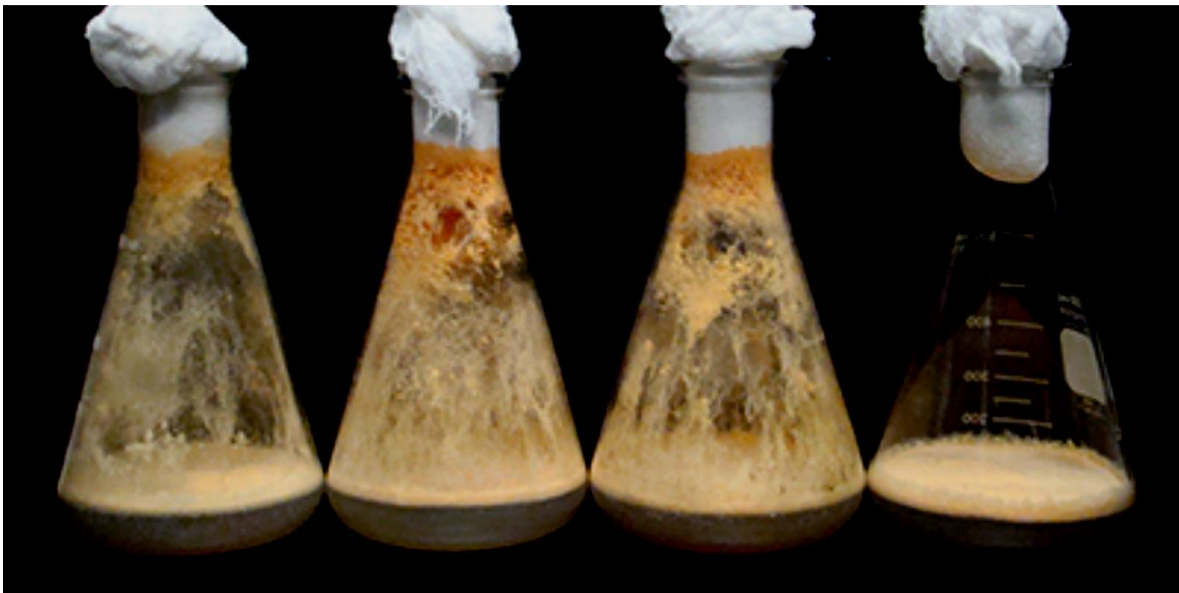


Figura 16. El alelo *rac-1* DN produce una disminución en la formación de micelio aéreo, número de conidios y crecimiento radial. A) Número de conidios producido por las cepas 74-OR23-1 (WT), RPNCR3A, TCOR1SH y TCOR1DNH. En tubos de ensayo con 3mL de medio VS en ausencia o presencia del agente inductor ácido quínico 10mM. Se inocularon por triplicado con 1×10^6 conidios, estos tubos se incubaron a 30°C, dos días en la oscuridad y tres días en luz. Los conidios se colectaron en agua fría y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. **B)** El crecimiento micelial de la cepa TCOR1DNH en "race tubes" presenta una severa disminución con respecto a las cepas silvestres. Se inocularon 1×10^6 conidios en placas de medio VS y se incubaron 12h a 30°C en la oscuridad. Los "race tubes" se incubaron en uno de los extremos con un fragmento de 0.5mm de diámetro del medio VS inoculado y se midió el crecimiento del micelio cada 24h.

Los fenotipos observados en la cepa TCOR1DNH (mutación DN), sugieren que el promotor inducible del gen *qa-2* tiene una expresión basal y que esta expresión provoco una severa disminución en la conidiación, el crecimiento radial y el crecimiento del micelio aéreo, con respecto a las cepas silvestres 74-OR23-1 (WT), RPNCR3A (Ver figura 17).

74-OR23-1A TCOR17H TCOR1SH TCOR1DNH



WT1

his-3::rac-1 (NF)

his-3::rac-1 (WT)

his-3::rac-1 (DN)

Figura 17. Disminución de la producción de micelio aéreo en la cepa TCOR1DNH en ausencia del inductor con respecto a las cepas 74-OR23-1 (WT), RPNCR3A, TCOR1SH y TCOR17H. Matraces de 500mL con 100mL de medio VS se inocularon con 1×10^6 conidios 74-OR23-1 (WT), TCOR17H, TCOR1SH y TCOR1DNH, se incubaron a 30°C, dos días en la oscuridad y tres días en la luz.

Debido a la diferencia en el desarrollo de micelio aéreo (Figura 17) se decidió analizar la germinación y fusión de las hifas (Figura 18) para saber si la disminución del crecimiento era consecuencia de una germinación tardía o por una deficiencia en la fusión celular.

Como se observa en la Figura 18 la germinación de la cepa 74-OR23-1A se aprecia a partir de las 3h y a las 4h la fusión de las hifas es en la mayoría de los conidios. En la cepa TCR1SH la germinación de los conidios comienza a las 2h y la fusión es evidente desde las 3h. En las cepas TCOR17H y TCOR1DNH la germinación a las 4h aún no es un proceso general en los conidios

observados pero debido q que el desarrollo del micelio aéreo en la cepa TCOR17H es similar al de una cepa silvestre se concluye que la germinación y la fusión son procesos que se dan más allá de las 4h por lo que se necesita analizar a mayor tiempo estos fenómenos.

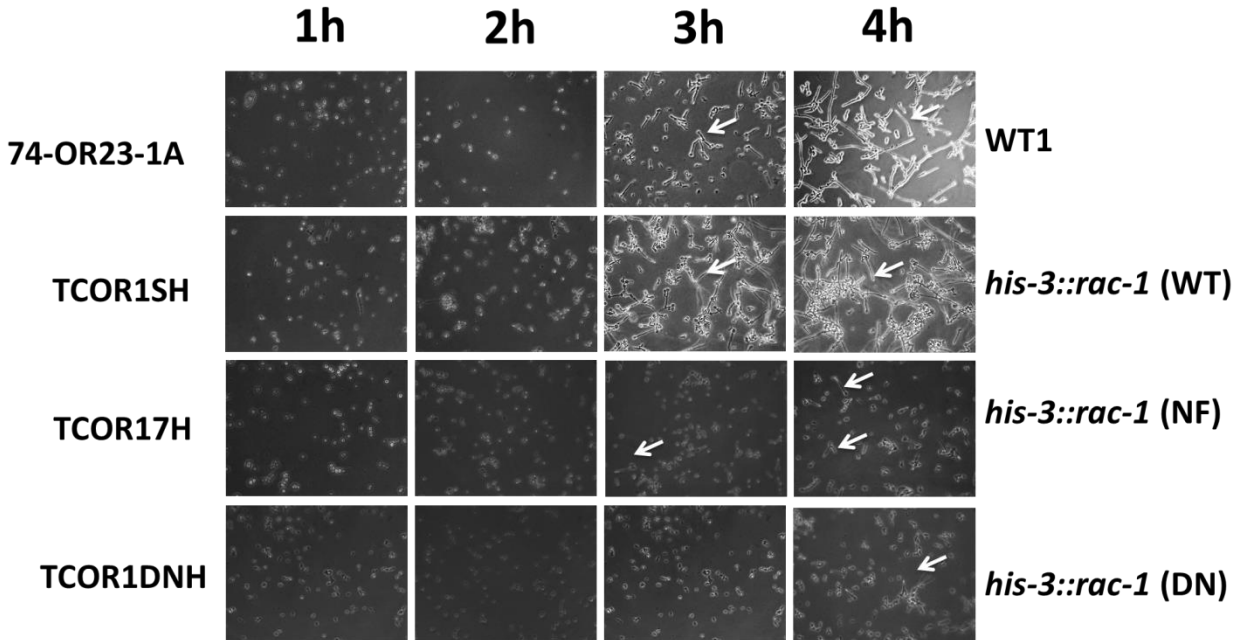


Figura 18. RAC-1 promueve la germinación de los conidios. Conidios de las cepas 74-OR23-1 (WT), TCOR17H, TCOR1SH y TCOR1DNH se inocularon en cuatro placas de medio VS por cepa y dispersados con una varilla de vidrio. Las placas se incubaron a 35°C durante 4h Cada 60min se retiró una caja de cada cepa y se fijó con metanol acetona para detener el crecimiento de la cepa y se observó al microscopio con un aumento de 20X.

Para evaluar parte del ciclo sexual de estas cepas se realizaron cruces en las que las cepas RPNCR3A, TCOR17H (alelo NF *rac.1* en *his-3*), TCOR1SH (WT *rac-1* en *his-3*), TCOR1DNH (DN *rac-1* en *his-3*) y TCOR17 (alelo NF en locus *rac-1*) fueron las cepas receptoras y la cepa 74-OR8-1a (WT3) fue la cepa donadora, con estas cruces se buscaba saber si las mutantes eran capaces de realizar el ciclo sexual (Figura 19). Los resultados indican que la carencia de RAC-1 o la presencia de RAC-1-GDT durante el ciclo sexual resultan en la incapacidad de la formación de peritecios.

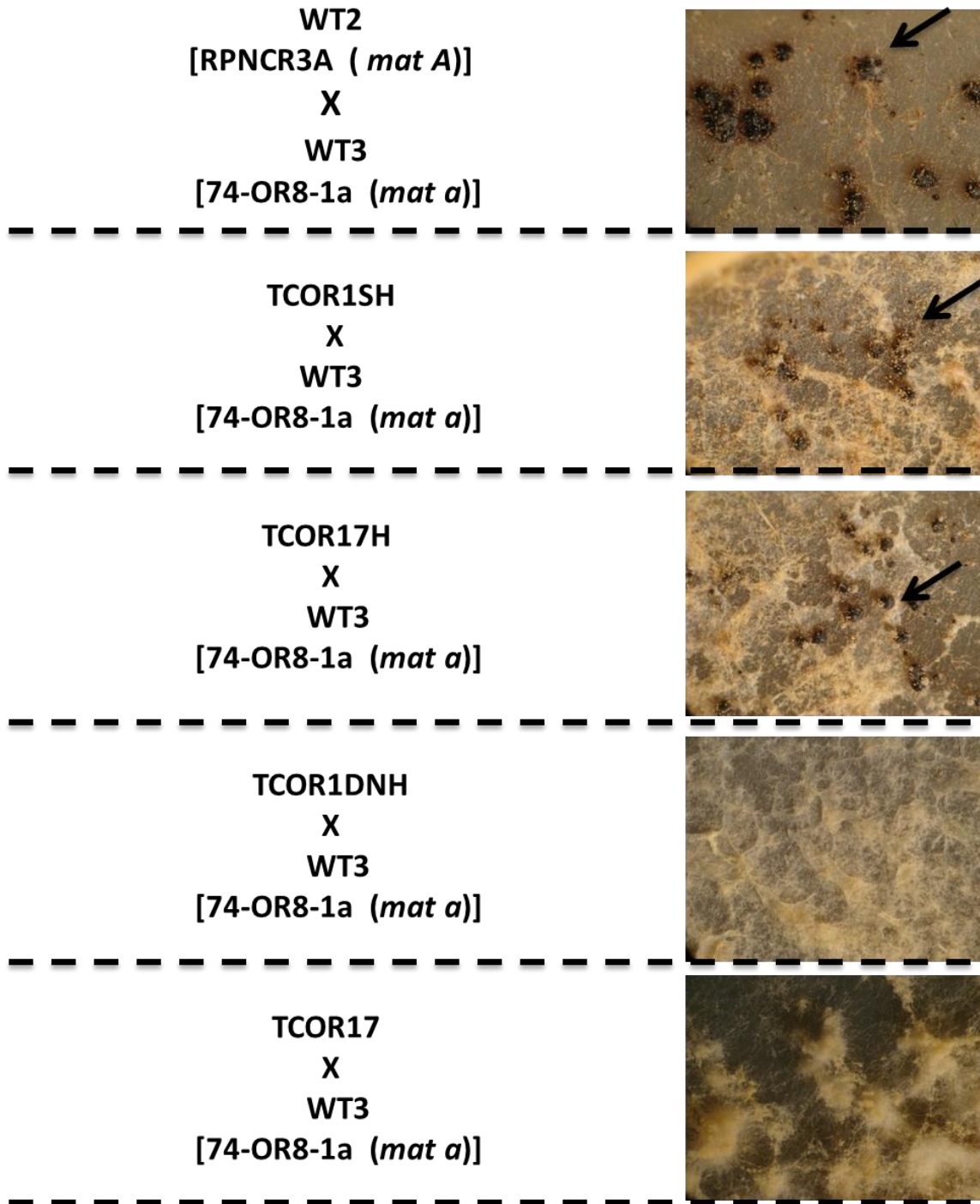


Figura 19. La activación de RAC-1 durante el ciclo sexual es necesario para que *N. crassa* funcione como cepa receptora en una cruce con una cepa silvestre. El ciclo sexual fue inducido en medio SC, inoculando en el centro de una placa 5×10^6 conidios. Estos medios fueron incubados durante seis días a 25°C en luz. Pasado este tiempo las placas se fertilizaron con 100mL de una suspensión de conidios del sexo opuesto y la incubación continuo hasta los catorce días.

El promotor *qa-2* de *N. crassa* presenta secuencias que regulan la transcripción genética en *E. coli*

En el presente trabajo se deseaba incluir una cepa que expresa una mutación DA bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*, para ver el efecto que está tendría sobre el desarrollo y sobre la activación de NOX-1 en *N. crassa*. Con esta estrategia se buscaba aumentar la producción de ERO a voluntad. Después de múltiples intentos infructuosos de conseguir la construcción DA de *rac-1* en *E. coli* mediante experimentos de subclonación se realizó el análisis de la secuencia del promotor *qa-2* para localizar secuencias características de un promotor que permitiera pensar que el alelo DA de *rac-1* podría ser tóxico para *E. coli* (Figura 20).

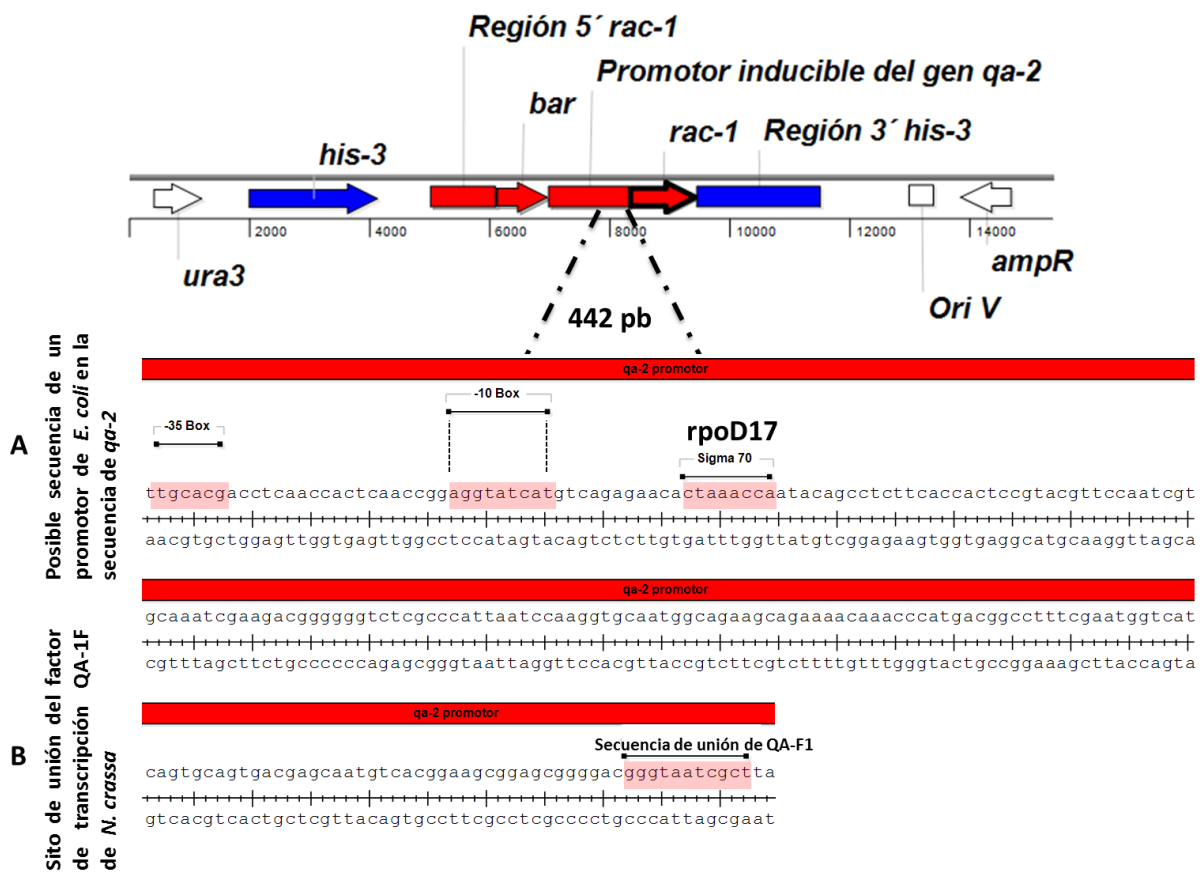


Figura 20. La secuencia del promotor *qa-2^P* presenta regiones características de un promotor de *E. coli*. 442 pb antes del gen *rac-1* se encuentran regiones que regulan la transcripción tanto en *E. coli* como en *N. crassa*. **A)** Se muestran las secuencias reguladoras características de un promotor de *E. coli* y de unión del factor sigma 70, *rpoD17* el cual está implicado en la transcripción de genes constitutivos. **B)** Se muestra la secuencia que reconoce el factor de transcripción QA-1F de *N. crassa* necesario para la inducción del gen *qa-2*. La búsqueda de promotores de *E. coli* se realizó en <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>.

Discusión

rac-1* no es un gen esencial en *N. crassa

En *N. crassa* no se habían logrado obtener mutantes carentes de la proteína RAC-1, por lo que se concluía que el gen era esencial (Larrondo, *et al.*, 2009). Con la mutante TCO17 (*rac-1* NF) se demuestra que el gen *rac-1* no es esencial para la viabilidad del hongo. Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente en cepas $\Delta rac-1$ (Araujo-Palomares, *et al.*, 2011). En hongos filamentosos se ha demostrado que ortólogos de Rac1 de humanos juegan un papel importante en procesos como el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de las hifas y en el desarrollo asexual (Boyce, *et al.*, 2003). Se han realizado estudios sobre la distribución celular de RAC-1 en el desarrollo de *N. crassa* en los cuales se observó un enriquecimiento de esta proteína en las puntas de hifas en crecimiento, lo que sugiere que RAC-1 regula la polaridad de las hifas (Araujo-Palomares, *et al.*, 2011). En el presente trabajo al sustituir el locus silvestre de *rac-1* en la cepa TCORDN (*rac-1* DN) con un alelo DN y con un alelo no funcional en la cepa TCO17 (*rac-1* NF) en ambas cepas en ausencia del inductor (ácido quínico 10mM) se presenta una notable disminución en el crecimiento de las hifas y solo en la cepa TCORDN (*rac-1* DN) se rescata parcialmente el fenotipo al adicionar el inductor al medio de cultivo, no así en la cepa TCO17 (*rac-1* NF) que presenta hifas hiperramificadas lo que sugiere que RAC-1 participa en el mantenimiento de la polaridad de las hifas.

El equilibrio GDP/GTP de RAC-1 es esencial para el desarrollo asexual

Al integrar cualquiera de los alelos inducibles de *rac-1* (silvestre, DN o NF) en el locus *his-3* y dejar intacto el locus silvestre de *rac-1* se esperaba no afectar el desarrollo de *N. crassa* cuando no estuviera presente el agente inductor. Esto sucedió en las cepas TCOR17H con el alelo NF (Figura 15) y en la cepa TCOR1SH con el alelo silvestre inducible (Figura 16). Estas cepas presentan una producción de conidios y un crecimiento micelial similar a la cepa silvestre WT1 y WT2. Además tampoco la producción de micelio aéreo se afectó con respecto a las cepas silvestres WT1 y WT2 (Figura 17). Con estos resultados se esperaba concluir que la presencia de un alelo silvestre inducible o de uno no funcional en un sitio distinto al del locus *rac-1* silvestre, no altera el desarrollo de *N. crassa*. Pero el resultado obtenido para la cepa TCOR1DNH con el

alelo DN de *rac-1*, muestra una clara disminución en la producción de conidios, en el crecimiento micelial y en la producción de micelio aéreo. Esto indica que el alelo DN de *rac-1* tiene una expresión basal en ausencia del inductor y por lo tanto esto sugiere que el promotor permite la expresión basal de los genes que están bajo su control y permite inferir que los productos de los alelos inducibles (RAC-1 silvestre, RAC-1 DN y péptido de 17 aminoácidos del alelo no funcional) se encuentra presentes durante todo el desarrollo de *N. crassa*. Por lo que la falta de fenotipo en la cepa TCOR1SH puede ser atribuida a que no se requiere la proteína RAC-1 en los procesos evaluados. Sin embargo, sugiere que RAC-1 podría regular puntos distintos en el desarrollo a los cuantificados. En la cepa TCOR17H se esperaba que el desarrollo fuera similar al de las cepas WT1 y WT2, esto debido a que en el alelo integrado de *rac-1* es no funcional y por lo tanto solo se curó la auxotrfía a histidina y se confirió la resistencia a ignite.

RAC-1 promueve la germinación en *N. crassa*

Se ha propuesto que la proteína RAC-1 está involucrada el mantenimiento de la polaridad en las hifas en crecimiento (Larrondo, *et al.*, 2009) por ese motivo en este trabajo se realizaron ensayos de germinación de conidios en los que se buscaba encontrar diferencia en el patrón de ramificación del tubo germinal o en el número de tubos germinales observados en los conidios de las cepas en las que se integró el alelo inducible en el locus *his-3* (Figura 18). Los resultados muestran que el expresar RAC-1 silvestre (cepa TCOR1SH) de forma constitutiva tiene como consecuencia la germinación temprana de los, mientras que la expresión de RAC-1 DN (cepa TCOR1DN) retarda la germinación de los conidios con respecto a una cepa silvestre. Lo que indica que RAC-1 está involucrada en la germinación y el establecimiento de la polaridad del tubo germinal. Este resultado sugiere que no solo el alelo DN de *rac-1* de la cepa TCOR1DN se expresa de forma basal, sino que también el alelo silvestre inducible bajo el control del promotor *qa-2* permite la expresión basal de RAC-1.

El equilibrio GDP/GTP de RAC-1 es esencial para el desarrollo sexual

Al evaluar el ciclo sexual de las mutantes de *N. crassa* (Figura 19) en las que reemplazó el gen silvestre *rac-1* por un alelo no funcional (cepa TCR17) o por un alelo que produce una forma DN de RAC-1, se observó una incapacidad de éstas para funcionar como receptoras en cruza con una cepa silvestre, pero si pueden funcionar como donadoras (dato no mostrado). Estos

resultados son similares a los obtenidos en mutantes $\Delta nox-1$ en donde se ha demostrado que NOX-1 es esencial para la formación de protoperitecios y, por lo tanto, para el ciclo sexual, pero los conidios de estas mutantes pueden funcionar como donadores en una cruce (Cano-Dominguez, *et al.*, 2008). De la misma forma, en las cepas donde los alelos inducibles fueron integrados en el locus *his-3*. La cepa TCOR1DNH es estéril, pero las cepas TCOR1SH y TCOR17H (alelo no funcional y alelo silvestre inducibles respectivamente) presentan un desarrollo normal de peritecios maduros con producción de ascosporas similar al de una cepa silvestre. Los resultados obtenidos para las cepas con carencia por completo de RAC-1 o un alelo DN ya sea en lugar del alelo silvestre o en un locus diferente (*his-3* en este trabajo) sugieren que RAC-1 podría estar regulando a NOX-1. Por otro lado RAC-1-GTP interactúa con NOX-1 para activarla en otros hongos y células de mamíferos (Diebold & Bokoch, 2001, Tanaka, *et al.*, 2008) por lo que es posible que una proteína RAC-1 inactiva constitutivamente sea incapaz de activar a NOX-1. Esto podría explicar la esterilidad de estas mutantes.

El promotor inducible *qa-2* no es un buen sistema de inducción para el estudio de RAC-1 en *N. crassa*

La expresión basal de las proteínas que sirven para la asimilación del ácido quínico aun en presencia de glucosa (Tang, *et al.*, 2011) indica que la represión de este promotor no es total, Por lo que cualquier gen de interés bajo el control del promotor *qa-2* mostraría una expresión basal de esta proteína. Aun con estos niveles basales de expresión se esperaría no se observar efectos mayores en el desarrollo de *N. crassa*, hasta que se añadiera el agente inductor (ácido quínico). Como se puede observar en la Figura 17 la expresión del alelo DN (TCOR1DNH) aun en presencia de glucosa tiene consecuencias severas sobre el desarrollo de *N. crassa* con respecto a una cepa silvestre. En la Figura 18 se muestra que la expresión basal del alelo silvestre de *rac-1* bajo el promotor *qa-2* promueve la germinación de los conidios. Esto sugiere que la proteína RAC-1 juega un papel importante en el desarrollo general de *N. crassa* y que se requiere de un control estricto de su síntesis y activación para un correcto desarrollo, ya que la expresión basal de un alelo DN afecta el ciclo sexual y asexual; mientras que la expresión de un alelo silvestre promueve la germinación de los conidios.

Una forma de evitar esta expresión basal de los alelos de *rac-1* es utilizar un promotor diferente al *qa-2*, En *N. crassa* se cuenta con dos promotores inducibles que pueden ser utilizados para evitar la expresión basal uno es *bli-4* (Bruchez, *et al.*, 1996) el cual se induce por luz azul y el promotor *cmt* (promotor de la metalotioneína) (Schilling, *et al.*, 1992) el cual es inducido por cobre (10mM CuSO₄), de estas dos opciones solo el promotor *cmt* es reprimido al 100% en ausencia del inductor razón por la cual sería una buena opción para evitar la expresión basal y los efectos observados en las mutantes obtenidas en este trabajo.

No fue posible expresar en *E. coli* una mutación *rac-1* DA bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*

En el presente trabajo se deseaba incluir una cepa que expresa una mutación DA bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*, para ver el efecto que está tendría sobre la posible activación de NOX-1 y el desarrollo en *N. crassa* y de esta manera aumentar la producción de ERO a voluntad. Se realizaron ensayos de subclonación para obtener el plásmido con dicha mutación y poder transformar la cepa RPNCR3A y así expresar la construcción DA desde el locus *his-3*. Para lograr esto se diseñaron los oligonucleótidos DA *rac-1* (F) y DA *rac-1* (R) (tabla 2) los cuales son complementarios entre sí pero que difieren de las secuencia silvestre de *rac-1* en un codón que es el responsable del cambio G18V en la proteína RAC-1. Para obtener el alelo DA de *rac-1* se realizó una PCR sobre el plásmido pLL70A (alelo silvestre inducible) con estos oligonucleótidos. Posteriormente la reacción de PCR se digirió con la enzima *DpnI*, endonucleasa dependiente de DNA metilado, para obtener solo el DNA no metilado (mutación de interés) y con este producto se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*. Después de múltiples intentos no se logró obtener una transformante con el plásmido de interés. Otra estrategia para obtener esta construcción fue amplificar la construcción con la mutación DA a partir del plásmido pLL70 y con este amplificado realizar ensayos de subclonación en el plásmido pLL70 sin la construcción de *rac-1* silvestre. Al realizar este ensayo en el control donde se religaban fragmentos que daban origen al plásmido pLL70A se obtenía un gran número de transformantes de *E. coli*. Sin embargo, en el ensayo para obtener el plásmido con la mutación DA no se obtuvieron transformantes. En *C. trifolii* (Chen & Dickman, 2004) se han reportado las construcciones DN y DA de *Ct-Rac1* y todas las construcciones fueron clonadas en *E. coli* DH5 α . La expresión de *Ct-*

rac1 DN se realizó bajo el control del promotor inducible del gen *qa-2*. En cambio, la expresión de *Ct-rac1 DA* se llevó a cabo bajo el control del promotor de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gpd*) de *A. nidulans* (Bunkers, 1991), sin justificar el cambio de promotor. Por otro lado el alelo no funcional con el que se realizó el presente trabajo se obtuvo al intentar obtener la construcción *rac-1 DA*. Posteriormente la secuenciación del alelo mostró la delección de una citosina en la región codificante del dominio de unión a GDP/GTP. Cuando se realizó la clonación de los genes necesarios para la asimilación del ácido quínico en *N. crassa*, se observó que la proteína QA-2 se expresa en *E. coli* y que es capaz de curar la auxotrofia por aminoácidos aromáticos en cepas que carecen de la proteína AroD (Vapnek, *et al.*, 1977). Además, en *E. coli* la expresión de QA-2 ocurre de forma constitutiva e independiente de la regulación que se da en *N. crassa* por la proteína QA-1F (Figura 5) (Giles, *et al.*, 1985). Por otro lado se ha demostrado que Rac1 de humanos puede ser expresada en *E. coli* DH5 α y que la proteína resultante no presenta las modificaciones postraduccionales (geranil geranilación) pero si tiene actividad de GTPasa (Kreck, *et al.*, 1994). Aunque los datos obtenidos en este trabajo no son concluyentes, nuestros resultados sugieren que los alelo silvestre, DN y DA, podrían estarse expresando en *E. coli* (Figura 20) de forma constitutiva y que la expresión del alelo DA resulta tóxico para *E. coli*, motivo por el cual no se obtuvieron transformantes con el plásmido con el alelo *rac-1 DA* bajo el control del promotor del gen *qa-2*. Una opción para poder obtener la construcción DA de *rac-1* es construir vectores que tengan solo la región de unión de QA-1F (GGGTAATCGCT) y de esta forma evitar que se presenten secuencias promotoras que reconozca *E. coli*.

Conclusiones

La sustitución del alelo silvestre por un alelo no funcional de *rac-1* en *N. crassa* no es letal, pero afecta severamente el desarrollo de *N. crassa* en el ciclo sexual y asexual.

El equilibrio GDP/GTP de RAC-1 es esencial para el desarrollo del micelio vegetativo y del micelio aéreo, la germinación de los conidios y para el desarrollo de estructuras sexuales como los peritecios. La inactivación de RAC-1 causa una severa disminución en el desarrollo del micelio vegetativo y aéreo. Además de impedir la formación de estructuras sexuales maduras (peritecios).

El promotor inducible del gen *qa-2* no se reprime totalmente por la glucosa y permite la expresión de forma basal de los alelos de *rac-1*, por lo que resulta de poca utilidad cuando se desean comparar condiciones de todo o nada en puntos específicos del desarrollo de *N. crassa*.

Perspectivas

Obtención de vectores con el sitio de unión de QA-1F con los alelos WT, DN y DA de *rac-1*.

Obtención de los alelos de *rac-1* (silvestre, DN y DA) bajo el control del promotor *cmt* para controlar la expresión de RAC-1 en los puntos deseados a evaluar.

Evaluar las en un fondo genético $\Delta nox-1$ y $\Delta nox-2$, a las mutantes con los alelos de *rac-1* integrados en el locus *his-3*.

Evaluar la producción de ERO en las mutantes con los alelos de *rac-1* integrados en el locus *his-3*.

Bibliografía

Aguirre J & Lambeth JD (2010) Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic Biol Med* **49**: 1342-1353.

Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D & Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111-118.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Araujo-Palomares CL, Richthammer C, Seiler S & Castro-Longoria E (2011) Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **6**: e27148.

Bosco EE, Mulloy JC & Zheng Y (2009) Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci* **66**: 370-374.

Boyce KJ, Hynes MJ & Andrianopoulos A (2003) Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* RAC homolog. *J Cell Sci* **116**: 1249-1260.

Bruchez JJ, Eberle J, Kohler W, Krufft V, Radford A & Russo VE (1996) bli-4, a gene that is rapidly induced by blue light, encodes a novel mitochondrial, short-chain alcohol dehydrogenase-like protein in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **252**: 223-229.

Bunkers GJ (1991) Expression of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene in *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2896-2900.

Cambareri EB, Jensen BC, Schabtach E & Selker EU (1989) Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science* **244**: 1571-1575.

Cano-Dominguez N, Alvarez-Delfin K, Hansberg W & Aguirre J (2008) NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **7**: 1352-1361.

Catcheside DG (1960) Complementation among histidine mutants of *Neurospora crassa*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **153**: 179-194.

Chen C & Dickman MB (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol Microbiol* **51**: 1493-1507.

D'Autreaux B & Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 813-824.

Davis RH (2000) *Neurospora: Contributions of a model organism. Oxford University Press, Inc., New York.*

De Serres FJ, Kolmark HG & Brockman HE (1962) Factors influencing the survival of *Neurospora crassa* conidia in sorbose-sucrose media. *Nature* **193**: 556-557.

De Terra N & Tatum EL (1961) Colonial growth of *Neurospora*. Sorbose and enzymes alter the composition of the cell wall and induce morphological changes. *Science* **134**: 1066-1068.

Diebold BA & Bokoch GM (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* **2**: 211-215.

Fleissner A, Simonin AR & Glass NL (2008) Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* **475**: 21-38.

Giles NH, Case ME, Baum J, Geever R, Huiet L, Patel V & Tyler B (1985) Gene organization and regulation in the qa (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* **49**: 338-358.

Gregg D, Rauscher FM & Goldschmidt-Clermont PJ (2003) Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C723-734.

Hansberg W & Aguirre J (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* **142**: 201-221.

Hays S, Selker, (2000) Making the selectable marker bar tighter and more economical. *Fungal Genetics Newsletter* **47**.

Hurtado CA, Beckerich JM, Gaillardin C & Rachubinski RA (2000) A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **182**: 2376-2386.

Kreck ML, Uhlinger DJ, Tyagi SR, Inge KL & Lambeth JD (1994) Participation of the small molecular weight GTP-binding protein Rac1 in cell-free activation and assembly of the respiratory burst oxidase. Inhibition by a carboxyl-terminal Rac peptide. *J Biol Chem* **269**: 4161-4168.

Kwon MJ, Arentshorst M, Roos ED, van den Hondel CA, Meyer V & Ram AF (2011) Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol Microbiol* **79**: 1151-1167.

Lara-Ortiz T, Riveros-Rosas H & Aguirre J (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**: 1241-1255.

Larrondo LF, Colot HV, Baker CL, Loros JJ & Dunlap JC (2009) Fungal functional genomics: tunable knockout-knock-in expression and tagging strategies. *Eukaryot Cell* **8**: 800-804.

Lee DW, Haag JR & Aramayo R (2003) Construction of strains for rapid homokaryon purification after integration of constructs at the histidine-3 (his-3) locus of *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **43**: 17-23.

Leeder AC, Palma-Guerrero J & Glass NL (2011) The social network: deciphering fungal language. *Nat Rev Microbiol* **9**: 440-451.

Li H, Barker BM, Grahl N, Puttikamonkul S, Bell JD, Craven KD & Cramer RA, Jr. (2011) The small GTPase RacA mediates intracellular reactive oxygen species production, polarized growth, and virulence in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **10**: 174-186.

Lledias F, Rangel P & Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637.

Lledias F, Rangel P & Hansberg W (1999) Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic Biol Med* **26**: 1396-1404.

Mahlert M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B & Bolker M (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**: 567-578.

Minson AC & Creaser EH (1969) Purification of a trifunctional enzyme, catalysing three steps of the histidine pathway, from *Neurospora crassa*. *Biochem J* **114**: 49-56.

Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C & Inoue H (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12248-12253.

Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M & Lambeth JD (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* **272**: 18834-18841.

Pratt RJ & Aramayo R (2002) Improving the efficiency of gene replacements in *Neurospora crassa*: a first step towards a large-scale functional genomics project. *Fungal Genet Biol* **37**: 56-71.

Raad H, Paclet MH, Boussetta T, *et al.* (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J* **23**: 1011-1022.

Roca MG, Arlt J, Jeffree CE & Read ND (2005) Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**: 911-919.

- Rolke Y & Tudzynski P (2008) The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol Microbiol* **68**: 405-423.
- Schilling B, Linden RM, Kupper U & Lerch K (1992) Expression of *Neurospora crassa* laccase under the control of the copper-inducible metallothionein-promoter. *Curr Genet* **22**: 197-203.
- Scott B, Takemoto D & Tanaka A (2007) Fungal Endophyte Production of Reactive Oxygen Species is Critical for Maintaining the Mutualistic Symbiotic Interaction Between *Epichloe festucae* and Perennial Ryegrass. *Plant Signal Behav* **2**: 171-173.
- Springer ML & Yanofsky C (1989) A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **3**: 559-571.
- Sumimoto H (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* **275**: 3249-3277.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, *et al.* (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* **318 (Pt 2)**: 379-382.
- Takemoto D, Tanaka A & Scott B (2006) A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell* **18**: 2807-2821.
- Tanaka A, Takemoto D, Hyon GS, Park P & Scott B (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloe festucae* and perennial ryegrass. *Mol Microbiol* **68**: 1165-1178.
- Tang X, Dong W, Griffith J, *et al.* (2011) Systems biology of the qa gene cluster in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **6**: e20671.
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M & Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6**: 2519-2523.
- Timberlake WE (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **78**: 497-510.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD & Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1343-1374.
- Vapnek D, Hautala JA, Jacobson JW, Giles NH & Kushner SR (1977) Expression in *Escherichia coli* K-12 of the structural gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3508-3512.
- Voguel H (1964) Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. *American Naturalist* **98**: 435-446

Weinzierl G, Leveleki L, Hassel A, Kost G, Wanner G & Bolker M (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**: 219-231.

Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**: 278-286.