



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**NCU00239, una proteína con dos dominios de
adenilación, y su papel en la regulación del
crecimiento y la diferenciación celular en
*Neurospora crassa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Emilio Alonso Martínez Sandoval



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jesús Aguirre Linares
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. , 2017



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Martínez
Sandoval
Emilio Alonso
26522329
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309240734

2. Datos del tutor

Dr.
Jesús
Aguirre
Linares

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Carlos Leonardo
Peraza
Reyes

7. Datos del trabajo escrito

NCU00239, una proteína con dos dominios de adenilación, y su papel en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en *Neurospora crassa*
63pp
2017

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

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al donativo proporcionado por los proyectos CB-2014-01-238492 (CONACYT México) e IN208916 (PAPIIT-UNAM).

Agradezco a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Agradecimientos personales

Quiero agradecer en gran medida a los profesores que me acercaron a entender el infinito mundo de la Biología. En particular al Dr. Gio Argáez que con sus clases, paleovideos y paleoreportes me hizo asombrarme ante la inmensa variedad de formas y de procesos biológicos que ocurren durante el paso del tiempo en los ambientes diversos. Al Dr. Rodolfo Salas que me contagió la pasión por el conocimiento sobre los hongos y los particulares misterios de su fisiología, diversidad y evolución. Al Dr. Sigfrido Sierra que me ayudó a entender la parte aplicada y de campo de la micología, además de enseñarme que un ambiente académico puede ser divertido. A la Dra. Martha Juana que me enseñó que la reproducción de las plantas también es interesante, y cuyos métodos de enseñanza dudo que puedan ser mejorados.

Al Dr. Jesús Aguirre. El primer día que lo conocí me platicó acerca de los descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico vesicular, y me dijo que no podía quedarme al laboratorio a hacer servicio social, sino a hacer un aporte a la ciencia. Su impulso por entender los procesos biológicos es el motor que proporciona la energía que necesita el laboratorio. De igual forma agradezco a Olivia Sánchez, que fue mi primera tutora, mantiene el laboratorio funcionando, y me enseñó a trabajar con *Aspergillus*.

A mis compañeros de laboratorio, Tadeo, Rafael, Minerva, Vero, Silvana y Ana Karen. Hasta el momento no se de ningún laboratorio que tenga un mejor ambiente que el nuestro, y es gracias a ustedes.

A los Licóna, especialmente a José Luis por su paciencia y disposición a enseñar, y por haber iniciado las investigaciones sobre la intrincada proteína CpsA en el laboratorio.

A Nallely Cano, que conoce *Neurospora crassa* como la palma de su mano y la maneja con una facilidad impresionante. Los experimentos que realicé en este trabajo ella los hubiera hecho cantando. Su disposición a ayudar y a escuchar amablemente hacen que sea una persona excepcional.

A Ariann Mendoza, que se sabe todos los trucos del negocio de *Aspergillus*, que obtiene mutantes cuadruples, y que siempre me ayuda con las dudas que tengo. Recuerdo bien que el primer día que entré al laboratorio me ayudó a conseguir la firma del Dr. Hansberg.

A mis compañeros de la Facultad, en especial a los güeros, Alinn, Axel, Fernanda y Gerardo; a las sensacionales Karol y Karina; a Carla de Tabasco que fue mi compañera en las paleoclases; a Elisa y Alejandra; a Iván, Raziél, Antonio, Miguel, Ulises, Alexander, Mauricio y Mizael, por su amistad exigente y por el rato que fuimos casi familia.

A mi mamá en quien confío más que cualquier amigo.

A mi papá que es un ejemplo de responsabilidad y trabajo.

A mi hermano que tiene un enfoque más claro que el agua, que lo hará llegar a donde él quiera. Y con quién siempre hay algo interesante que platicar.

Contenido

Resumen	6
Introducción.....	7
1. CPS1 participa en la acción virulenta de hongos fitopatógenos por medio de un mecanismo desconocido.....	7
2. CPS1 es una proteína ampliamente distribuida con tres dominios conservados	8
3. Dip2 es la proteína ortóloga de CPS1 en los animales.	10
4. <i>decpsA</i> participa en la diferenciación celular en <i>Aspergillus nidulans</i>	11
5. <i>N. crassa</i> como organismo modelo para el estudio de procesos biológicos.....	11
Ciclo de vida de <i>N. crassa</i>	12
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
Materiales y métodos.....	16
Resultados.....	22
1. El gen <i>NCU00239</i> de <i>N. crassa</i> es el ortólogo de CPS1	22
2. Los dominios de adenilación en la proteína <i>NCU00239</i> tienen características que sugieren que tienen actividad de enzimas tipo FAAL.....	23
3. El dominio similar al dominio de interacción con DMAP de la DNMT1, así como las regiones interdominios, presentan sitios conservados, lo cual sugiere que son necesarios para la función de la proteína.	29
4. Eliminación del gen <i>NCU00239</i>	32
5. La eliminación del gen <i>NCU00239</i> causa una reducción en la velocidad de crecimiento lineal y radial.....	36
6. Las mutantes carentes del gen <i>NCU00239</i> muestran una drástica reducción en la producción de micelio aéreo y en la esporulación asexual	38
7. El gen <i>NCU00239</i> es necesario para el desarrollo sexual.....	40
8. Cosegregación del fenotipo mutante y la resistencia a higromicina	41
Discusión.....	45
Conclusiones	52
Perspectivas	53
Referencias	54
Anexos.....	61

Resumen

La familia de proteínas CPS1 se identificó inicialmente en los hongos fitopatógenos *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus victoriae* y *Gibberella zae*, como proteínas necesarias para la virulencia. Proteínas homólogas se han identificado en otros hongos y en animales como *Drosophila*, nematodos y mamíferos, en donde se conocen como proteínas DIP2, cuya expresión se ha detectado en tejidos animales durante el desarrollo así como en estadios adultos. Los homólogos de CPS1 tienen al menos 3 dominios conservados. Un dominio de unión a DMAP (DNA methyl transferase associated protein) en el extremo amino y dos dominios consecutivos de unión a AMP. Se ha propuesto que las proteínas DIP2 funcionan como receptores de la glucoproteína extracelular *follistatin-like 1* (FSTL1). Sin embargo, aún se desconoce la función exacta de las proteínas CPS1/DIP2.

La eliminación de *cpsA*, el gen ortólogo de *cps1* en *Aspergillus nidulans*, provoca una drástica reducción de la conidiación, la incapacidad de desarrollar estructuras sexuales y una fuerte pigmentación del micelio. En este trabajo identificamos el gen *cps-1* como un gen que codifica para la proteína ortóloga de CPS1/DIP2A en *Neurospora crassa*. Nuestro análisis de alineamientos y modelos estructurales indica que los dominios AMP1 y AMP2 muestran similitud con las enzimas FAAL (*fatty acyl-AMP ligases*). Estas enzimas producen adenilatos de ácidos grasos que son transferidos al grupo SH de la fosfoproteína unida a policétido sintetasas (PKS) específicas, para la síntesis de glicolípidos fenólicos, sulfolípidos y ácidos micólicos en bacterias. La eliminación del gen *cps-1* y la caracterización fenotípica de las mutantes resultantes muestra que la proteína CPS-1 se requiere para el crecimiento radial y la conidiación normales, así como para la producción de protoperitecios durante el desarrollo sexual, indicando que además de la virulencia, las proteínas de la familia CPS1/DIP2 regulan el desarrollo en los hongos y que este papel podría estar conservado en los animales.

Introducción

1. CPS1 participa en la acción virulenta de hongos fitopatógenos por medio de un mecanismo desconocido

La proteína CPS1 se identificó inicialmente por medio de un análisis de identificación de mutantes del hongo patógeno del maíz *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) Drechsler, afectadas en la virulencia. Las mutantes se obtuvieron por mutación mediante integración mediada por enzimas de restricción (REMI). A las mutantes con el gen CPS1 interrumpido se les detectó una notable disminución en su acción virulenta hacia el maíz. Después de esta observación, se obtuvieron mutantes carentes del gen CPS1 en los hongos *Cochliobolus victoriae* (Nelson) y *Giberella zeae* (Schwein) Petch, y los resultados confirmaron que esta proteína participa en la virulencia de éstos hacia la avena y el trigo, respectivamente (Fig. 1) (Lu, S.-W, et al., 2003).

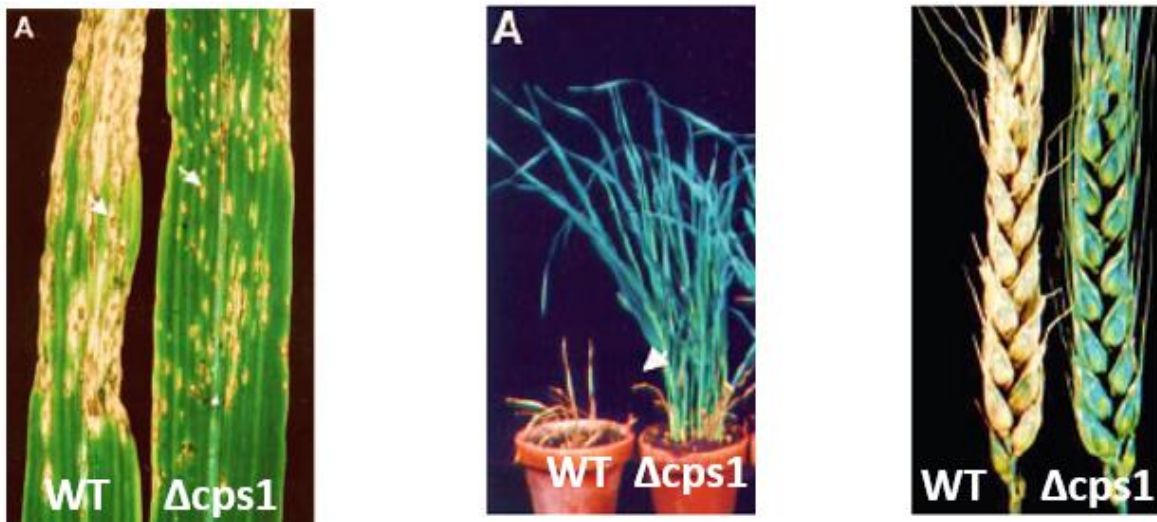


Figura 1: Las mutantes *cps1* en hongos fitopatógenos presentan una disminución en la virulencia.

Izquierda: cepas silvestre (WT) y mutante ($\Delta cps1$) de *Cochliobolus heterostrophus* sobre una hoja de maíz. Centro: cepas silvestre (WT) y mutante ($\Delta cps1$) de en *Cochliobolus victoriae* en una planta de avena. Derecha: cepas silvestre (WT) y mutante ($\Delta cps1$) de *Giberella zeae* en una espiga de trigo. Imagen modificada de (Lu, S.-W, et al., 2003).

En las mutantes obtenidas en estos tres hongos fitopatógenos, el fenotipo observado consiste únicamente en la disminución de la capacidad virulenta. No se reporta algún otro fenotipo en relación al crecimiento o diferenciación celular de estos organismos y tampoco

se realizaron pruebas en diferentes condiciones de estrés, aunque los autores mencionan que esta proteína podría ser un factor de resistencia general a condiciones de estrés ambiental (Lu, S.-W, et al., 2003).

2. CPS1 es una proteína ampliamente distribuida con tres dominios conservados

La distribución de los ortólogos de la proteína CPS1, además de localizarse en hongos fitopatógenos, se extiende a otras clases de hongos filamentosos y a todos los grupos de animales, mientras que no hay ortólogos presentes en hongos basidiomicetos, bacterias o plantas (Lu, S.-W, et al., 2003).

En los trabajos iniciales que se realizaron sobre esta proteína en hongos fitopatógenos se reportan dos dominios conservados en las proteínas CPS1, ambos dominios de unión a AMP, llamados *AMP1* y *AMP2*. Un análisis más reciente realizado en el laboratorio revela la presencia de un tercer dominio, localizado en el extremo amino terminal, que muestra similitud con el dominio de unión a DMAP1 (*DNA methyltransferase asociated protein*) de la proteína DNA metil transferasa 1 (DNMT1) (Fig. 2).

La proteína DNMT1 es la enzima principal encargada de mantener la metilación del DNA en los mamíferos. A esta proteína también se le ha asignado un papel como represora de la transcripción, acción en la que participa la proteína correpresora DMAP1 por medio de la interacción con los primeros 121 aminoácidos (dominio DMAP1) del extremo amino terminal de la proteína DNMT1 (Rountree, M. et al., 2000).



Figura 2: Esquema de la conformación de los dominios de las proteínas CPS1 y sus homólogos. En el extremo amino hay una región (1 en la figura) que muestra una alta similitud con un segmento del dominio DMAP1 presente en la proteína DNMT1. La proteína tiene además dos dominios de formación de adenilato, anotados en la figura como **AMP1** y **AMP2**.

La presencia de los dominios de unión a AMP en CPS1 es criterio suficiente para que esta proteína sea clasificada dentro de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato (Lu, S.-W, et al., 2003). Esta superfamilia tiene la característica de ser un grupo muy heterogéneo de enzimas con funciones muy diversas. Sin embargo, estas enzimas tienen en común que realizan la activación de diversos sustratos carboxílicos por medio de la unión de AMP, dependiente de ATP, para formar acil adenilatos que participan en múltiples reacciones bioquímicas. La reacción ocurre en dos pasos (**Fig. 3**). En el primero, el ATP y el sustrato se unen formando pirofosfato y un sustrato-adenilato reactivo. En el segundo paso, un nucleófilo reacciona con el intermediario reactivo y el producto final y el monofosfato de adenosina son liberados (Schmelz, S., y Naismith, J. H., 2009).

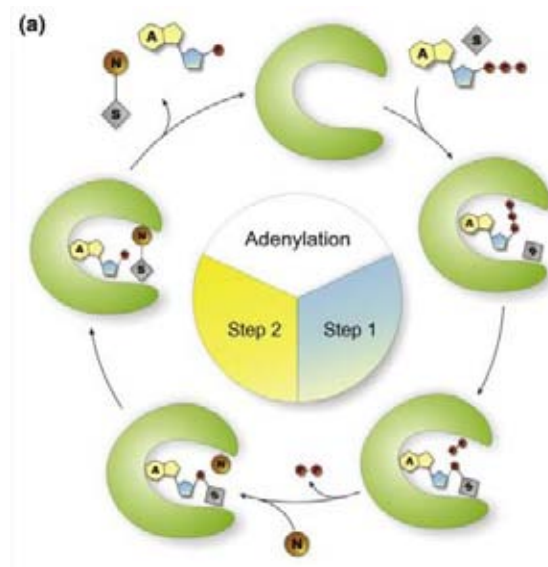


Figura 3: Pasos del proceso de adenilación. En la primera reacción, ATP (A) y el sustrato (S) son unidos por la enzima para formar un sustrato-adenilato y pirofosfato. En la segunda etapa un nucleófilo (N) reacciona con el intermediario y el producto final es liberado junto con adenosina monofosfato. Modificado de Schmelz, S., y Naismith, J. H., 2009.

Este mecanismo de formación de adenilatos intermediarios se encuentra conservado en los eucariontes y los procariontes para realizar la activación de diversos sustratos. La variedad de enzimas incluidas en esta familia incluye las Acil CoA sintetasas, las cumarato ligasas, los dominios de adenilación de las sintetasas de péptidos no ribosomales, las aminoacil tRNA sintetasas y la luciferasa (Conti, E., et al. 1996).

3. Dip2 es la proteína ortóloga de CPS1 en los animales.

En los animales se conocen a los ortólogos de CPS1 como proteínas DIP2, y se ha propuesto que son receptores de membrana de la proteína *follistatin-like 1* (FSTL1). Esta proteína es una glucoproteína extracelular de mamíferos que tiene efectos pro y antiinflamatorios, y participa en la respuesta en la acción ante estrés del miocardio.

Como evidencia de que DIP2 es un receptor de la proteína FSTL1 están ensayos de coimmunoprecipitación que muestran una interacción física directa entre la FSTL1 y DIP2, la presencia de DIP2 en la superficie celular, y que la acción de un RNA de interferencia causa una disminución en la unión de FSTL1 a células endoteliales y una disminución en la sobrevivencia, migración y diferenciación mediadas por FSTL1 (Ouchi, N., et al., 2010).

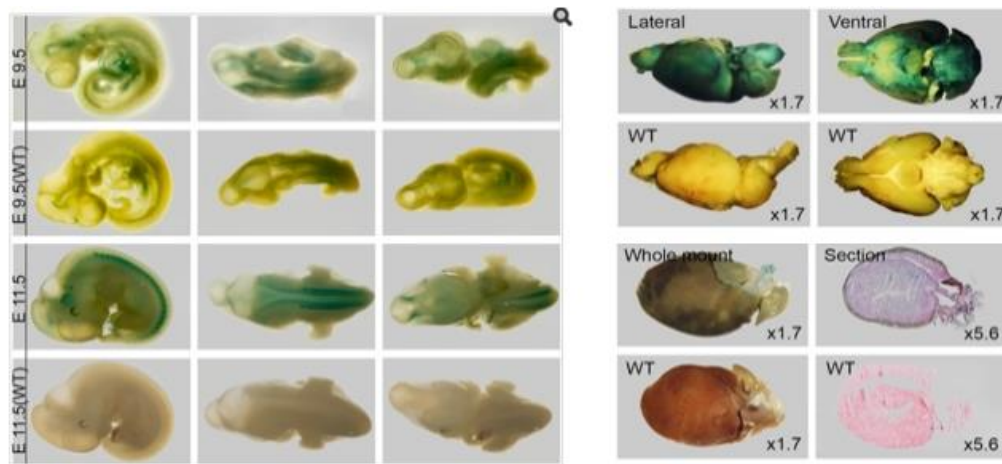


Figura 4: Patrones de expresión del gen de Dip2 (color azul) durante el desarrollo embrionario (lado izquierdo) y en tejidos adultos (lado derecho). El panel derecho superior corresponde a la expresión en el cerebro y el derecho inferior a corazón (Zhang, L., et al., 2015).

Más recientemente se ha encontrado que Dip2a (isoforma a de la proteína) se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario en el ratón y que se expresa de forma importante en tejidos neuronales, reproductivos y vasculares, así como en el corazón, riñón, hígado y pulmón (**Fig. 4**). El patrón de expresión de Dip2a coincide con el de la expresión de FSTL1, lo cual apoya la idea de que se trata de un receptor. La expresión extensa en tejidos embrionarios y adultos sugiere que Dip2a tiene múltiples papeles fisiológicos. Los autores de este trabajo mencionan que este gen no ha sido estudiado

sistemáticamente y que no se conocen sus funciones a pesar de que se ha propuesto que participa en funciones biológicas importantes (Zhang, L., et al., 2015).

4. *cpsA* participa en la diferenciación celular en *Aspergillus nidulans*

En el laboratorio del Dr. Jesús Aguirre se llevó a cabo la identificación del gen homólogo de *cps-1* en el hongo *Aspergillus nidulans* y se le denominó *cpsA*. Las mutantes en las que el gen *cpsA* se ha eliminado muestran defectos importantes en el desarrollo sexual y asexual, incluyendo la formación de un pigmento café en el medio, una drástica reducción en la conidiación (esporulación asexual) y la incapacidad de desarrollar estructuras. Otros fenotipos que se han observado son defectos en la morfología de las hifas y una alta sensibilidad a agentes desestabilizadores de la pared celular (Angoa, A., et al., sin publicar).

5. *N. crassa* como organismo modelo para el estudio de procesos biológicos

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Shear & B.O. Dodge), phylum Ascomycota dentro del reino Fungi, ha servido como modelo para investigación desde 1927. Habita en bosques tropicales y subtropicales, siendo un fuerte colonizador después de un incendio, debido entre otros factores a la disponibilidad de nutrientes. Anteriormente se le conocía como el moho naranja del pan, ya que infestaba panaderías en las que la temperatura y el pan proveían un buen ambiente para su crecimiento, que se observa como una masa de polvo color naranja intenso. Este color se debe a su elevada producción de carotenos (Raju, N. B., 2009).

Entre las características que hacen que este hongo sea un buen modelo están que tiene requerimientos nutricionales definidos, crecimiento rápido y ciclo de vida de 2 a 3 semanas. También tiene ciclo de vida sexual, lo que permite el análisis genético y el estudio de la diferenciación de estructuras sexuales (Raju, N. B., 2009). Su genoma se encuentra secuenciado (Galagan, J. E., et al., 2003) y existe un banco de cepas mutantes (Colot, H. V., et al., 2006) y de herramientas genéticas disponibles en el Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/>). Las hifas gruesas, fácilmente observables al microscopio y de

rápido crecimiento hacen que sea ideal para estudios de biología celular y del crecimiento polarizado (Riquelme, M., et al., 2011). Recientemente se han desarrollado herramientas moleculares para la interrupción dirigida de genes y la integración de DNA recombinante, el uso de promotores inducibles y constitutivos, y el uso de marcadores selectivos (Roche, C. M., et al., 2014). Recientemente, también se ha adaptado la tecnología CRISPR Cas9 para realizar edición genómica específica en este organismo (Matsu-ura, T., et al., 2015).

Con la adopción de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de genética, biología celular y biología molecular en organismos eucariontes, *N. crassa* comenzó a usarse como modelo para el estudio de procesos relacionados con la multicelularidad. Así la investigación en *N. crassa* se enfocó hacia el estudio del desarrollo y la diferenciación celular, el silenciamiento de genes y la metilación del DNA, así como el estudio de los ritmos circadianos y de la fotobiología (Roche, C. M., et al., 2014).

Ciclo de vida de *N. crassa*

1. Crecimiento vegetativo y diferenciación asexual

El micelio de *N. crassa* es haploide. Tras la germinación de los conidios en condiciones adecuadas, el tubo germinal se extiende hasta formar una hifa. Esta hifa se extiende y ramifica hasta formar el micelio. Una vez que se agotan los nutrientes, se forman hifas aéreas que forman los conidios sobre el sustrato. Las células, y en especial los conidios desarrollan una pigmentación naranja intensa en presencia de luz, debida a la formación de carotenos (Davis, R. H., 2000).

En la etapa asexual del ciclo de vida de *N. crassa* se producen conidios de dos tipos. Los macroconidios son multinucleados y tienen un diámetro de 5 a 10 μm . Los microconidios en cambio tienen un diámetro de 1 μm y un solo núcleo. La formación de los macroconidios ocurre en estructuras llamadas macroconidióforos. Estos crecen en la parte apical de las hifas aéreas. El desarrollo de los macroconidióforos inicia con la constricción de las hifas aéreas, produciendo una cadena con divisiones que se conocen como constricciones menores. La cadena continúa creciendo y las divisiones continúan

desarrollándose formando las constricciones mayores, produciendo cadenas que parecen un collar de perlas. Tras 12 horas de haberse inducido el ciclo asexual, el crecimiento se detiene y los núcleos migran al interior de la cadena. A las 14 horas se establecen las paredes entre los conidios, pasando su forma de barril a esfera, y de este modo pueden separarse individualmente como esporas (Springer, M. L., y Yanofsky, C., 1989).

Cuando los conidios germinan en medio con nutrientes limitados y cerca unos de otros, éstos se empiezan a fusionar por medio de estructuras en forma de tubos llamadas CAT (Conidial Anastomosis Tubes) o tubos de anastomosis, que son más delgados que los tubos germinales. Durante el establecimiento de la colonia también ocurren eventos de fusión celular, ahora entre hifas, que se encuentran más favorecidos al interior de la colonia y casi no ocurren en la periferia, en donde el crecimiento es hacia el exterior. Como regla general, condiciones limitantes de nutrientes favorecen los eventos de fusión celular (Fleissner et al., 2008).

1. La reproducción sexual

N. crassa es heterotálico con dos sexos (*mat A* y *mat a*). Cualquiera de los dos puede servir como progenitor materno y formar los protoperitecios. El agente fertilizador es normalmente un conidio o una hifa del sexo opuesto. Los protoperitecios se forman en condiciones de limitación de nitrógeno y comienzan formándose como un nudo de hifas que rodea a unas células especializadas. Estas células se diferencian en un ascogonio, del cual una célula actúa como el gameto femenino. Las hifas externas del protoperitecio forman una capa protectora densa a través de la cual emerge una o más hifas tricóginas provenientes de la célula gamética. Las tricóginas responden a una feromona emitida por los conidios del sexo opuesto, y crecen hacia éstos hasta que ocurre el contacto y la fusión celular. Después de la fusión, un núcleo del conidio viaja a través de la tricógina hasta la célula ascógena en el protoperitecio.

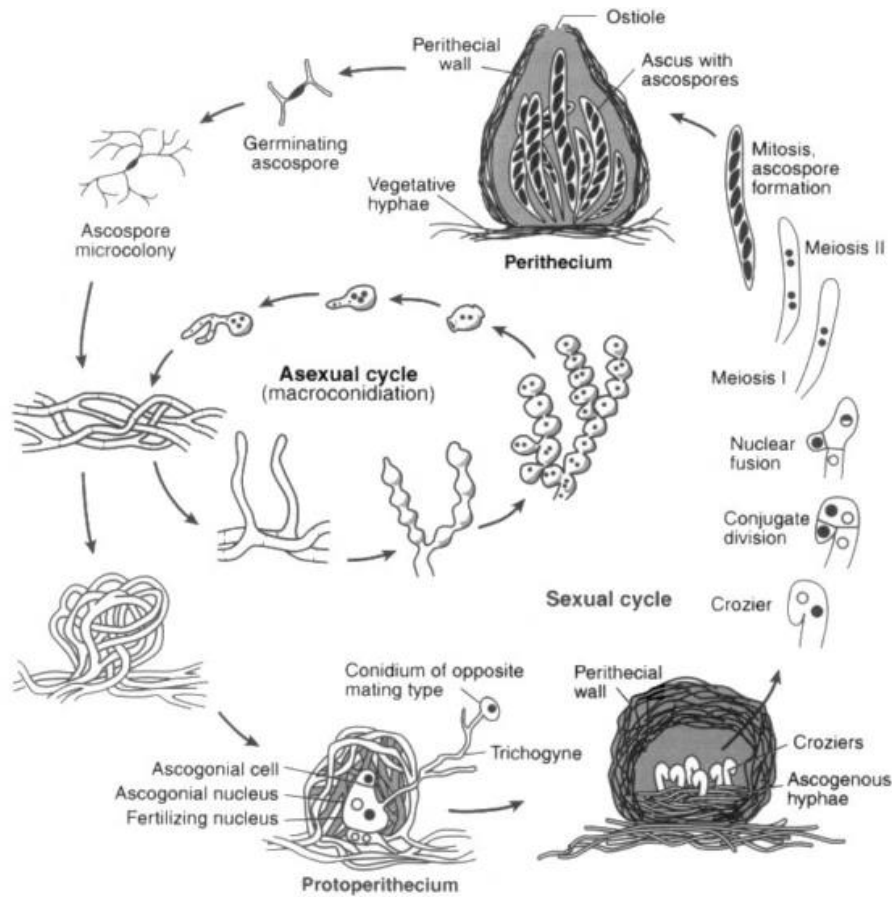


Figura 5: Ciclo asexual y sexual de *N. crassa*. En el ciclo asexual, después de la germinación de los conidios se forman las hifas, que se extienden y ramifican formando el micelio. Del micelio surgen las hifas aéreas que después originan los conidios. En el ciclo sexual, la formación de los protoperitecios ocurre cuando una estructura llamada ascogonio es envuelta por hifas. El protoperitecio es fertilizado por el núcleo de un conidio de una cepa con el sexo opuesto. Tras la fertilización el protoperitecio se desarrolla hasta formar un peritecio maduro, dentro del cual ocurre la cariogamia, la meiosis y la diferenciación de las esporas sexuales o ascosporas (Modificado de Davis, R. H., 2000).

Después de eventos de división nuclear, ocurren múltiples divisiones celulares en las puntas de las hifas ascógenas. En la célula subapical del llamado crozier, ocurre la replicación premeiótica del DNA. La fusión nuclear completa el proceso de fertilización, originando la única célula diploide del ciclo de vida. El núcleo diploide sufre dos divisiones meióticas inmediatamente, con lo que el meiocito asca crece en un tubo largo en forma de

saco. Cada uno de los productos meióticos tiene una división mitótica, y los ocho núcleos resultantes son englobados al interior de las esporas, para producir finalmente ocho ascosporas binucleadas por asca. Cada peritecio puede formar de 200 a 400 ascas, derivadas de un par de núcleos haploides.

Conforme progresa el ciclo sexual, los peritecios crecen y las paredes se vuelven duras y melanizadas. Una estructura similar a una cuenta se forma en la parte superior del peritecio, con un poro llamado ostiolo. Las puntas de las ascas maduras se insertan en el revientan cerca de la punta, arrojando las ascosporas por el ostiolo. Las ascosporas maduras germinan después de ser activadas con calor a 60°C durante 30 minutos y crecen en presencia de los nutrientes adecuados (Davis, R. H., 2000).

La información hasta ahora muestra que CPS-1 es una proteína ampliamente distribuida que participa en diferentes procesos importantes en una gran diversidad de organismos y que ha sido muy poco estudiada. En este trabajo identificamos el ortólogo de CPS-1 en *N. crassa* y eliminamos el gen correspondiente para obtener mayor información sobre la conservación de sus funciones en los hongos filamentosos y acercarnos a entender mejor el papel de esta proteína en otros organismos.

Hipótesis

Si CPS-1 es una proteína que regula el desarrollo y la diferenciación celular en hongos filamentosos no fitopatógenos, es de esperarse que la proteína correspondiente en *N. crassa* regule la diferenciación sexual y asexual en este hongo.

Objetivo general

Determinar el papel de la proteína CpsA en el desarrollo y la diferenciación celular en el ascomiceto filamentoso *N. crassa*.

Objetivos particulares

1. Encontrar el gen homólogo de CPS-1 en *N. crassa*, determinar sus dominios conservado y definir las características de estos dominios.
2. Caracterizar mutantes nulas en el gen ($\Delta cps-1$) en cuanto a su desarrollo y diferenciación celular.

Materiales y métodos

Para realizar este trabajo se utilizaron las siguientes cepas.

Cepa	Genotipo	Origen
74-OR23-1a	<i>mat A</i>	FGSC #987
74-OR8-1a	<i>mat a</i>	FGSC #988
$\Delta mus-51$	<i>mus-51^Abar⁺mat a</i>	FGSC #9718
$\Delta NCU00239-1$	<i>mus-51^Abar⁺cpsA^A::hph⁺mat a</i>	Este trabajo, $\Delta mus-51$ transformada con la construcción para eliminar CPS1
$\Delta NCU00239-2$	<i>mus-51^Abar⁺cpsA^A::hph⁺mat a</i>	Este trabajo, $\Delta mus-51$ transformada con la construcción para eliminar CPS1
$\Delta NCU00239-3$	<i>mus-51^Abar⁺cpsA^A::hph⁺mat a</i>	Este trabajo, $\Delta mus-51$ transformada con la construcción para eliminar CPS1
H10.1	<i>nox-1^A::hph⁺mat a</i>	Cano-Domínguez, et al., 2008

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo

Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento vegetativo y el almacenamiento se utilizó medio mínimo de Vogel (Vogel, H.J., 1956) con sacarosa al 1.5%. Para que el medio fuera sólido se agregó agar al 1.8%. Para inducir el crecimiento en forma de colonias, se agregó al medio mínimo de Vogel sorbosa al 2%, glucosa al 0.05% y fructosa al 0.05%. Para la inducción del ciclo sexual se preparó el medio sintético para cruces de Westergaard y Mitchell (Weestergaard, M., Mitchell H.K., 1947).

Para el crecimiento vegetativo y el desarrollo de colonias se utilizó una temperatura de incubación de 30°C en la obscuridad, mientras que para el desarrollo de estructuras sexuales y la realización de las cruces sexuales se utilizó una temperatura de 25°C con luz blanca constante.

Obtención y conteo de conidios

Se inocularon de uno a cinco matraces con medio mínimo de Vogel sólido con 1×10^5 conidios de la cepa requerida. Después de esto, se incubaron por 2 días a 30°C en obscuridad y por 3 días a 25°C con luz. Una vez transcurrido este tiempo, se colectaron los conidios en condiciones de esterilidad, agregando agua esterilizada al interior de los matraces y agitando vigorosamente. La suspensión obtenida fue decantada por un embudo con tela para separar la suspensión de conidios de los fragmentos de micelio. Posteriormente se recolectó el total de la suspensión en tubos Falcon de 50 mL estériles. Se realizaron uno o dos lavados con agua esterilizada y en ocasiones un tercer lavado con sorbitol 1 M, para lo cual se centrifugó la suspensión a 5000 rpm por 3-5 minutos. Finalmente se ajustó el volumen de los conidios, generalmente a 5-20 mL, y se realizaron alícuotas en tubos Eppendorf de 1.5 mL a un volumen final de 1 mL de suspensión por tubo.

Para el conteo de los conidios se utilizó un hemocitómetro. En caso de ser requerido para el conteo se hicieron diluciones de la suspensión final de conidios 1:100.

Cruzas sexuales y germinación de ascosporas

Para la obtención de cruzas sexuales se inocularon 5-10 μL de suspensión de conidios de la cepa receptora a una concentración de 1×10^6 conidios por mililitro en el centro de una caja Petri con medio Sintético de Cruza de Westergar y Mitchell. Después se sellaron las cajas con Parafilm y se incubaron a 25°C con luz por 7 -10 días o hasta que se observaron protoperitecios. A continuación los protoperitecios fueron fertilizados agregando gotas de 20 μL de suspensión concentrada de conidios de la cepa donadora ($>1 \times 10^7$ esporas/mL) distribuidas a lo largo del área de la caja en al menos 5 puntos. Después de esto se sellaron con Parafilm y se pusieron a incubar nuevamente a 25°C con luz, esperando el desarrollo de peritecios.

De 7 a 10 días después se recolectaron las ascosporas arrojadas a la tapa de la caja Petri agregando un mililitro de agua, agitando y recuperando la suspensión en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Después de la recolección, se realizó un conteo con un hemocitómetro. Para la activación de las ascosporas, éstas se colocaron en un baño de agua a 60°C por 30 minutos. Después de esto, se inocularon en medio para aislar colonias.

Almacenamiento de las cepas

Los conidios recolectados se guardaron en agua estéril o en una solución de sorbitol a concentración 1 M y se almacenaron a -20°C . Las transformantes recién obtenidas se almacenaron a 4°C en un vial con medio Mínimo de Vogel adicionado con el agente selectivo (higromicina a 150mg/mL de medio).

Eliminación del gen ortólogo a CpsA en *N. crassa*

Para la eliminación del gen *NCU00239* se generó una construcción empleando la técnica de Double-Joint PCR (PCR de doble ligadura) (Yu, J., et al., 2004). Se amplificaron mediante reacciones de PCR independientes tres fragmentos de DNA. El primero fue un fragmento híbrido compuesto por la región río arriba de la secuencia codificante del gen con un segmento de la región 5' del cassette de resistencia a higromicina (de origen bacteriano, que codifica para la higromicina B fosfotransferasa), con un tamaño total de 1348 pb. El

segundo fue un fragmento híbrido compuesto por la región río abajo de la secuencia codificante del gen con un segmento de la región 3' del cassette de resistencia a higromicina, con un tamaño de 1413 pb (**Fig. 6**). El tercero el fue cassette de resistencia a higromicina. Empleando oligonucleótidos anidados se obtuvo el producto de fusión de los tres fragmentos que se usó para transformar una cepa Δ mus-51 de *N. crassa*, esperando que por un evento de doble recombinación homóloga se reemplazara el gen silvestre por el marcador de selección. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar dichos fragmentos se muestran en la **Tabla 2**.

La cepa Δ mus-51 se utilizó como cepa receptora para la eliminación del gen *NCU00239* ya que en ella se favorece la integración de DNA exógeno por recombinación homóloga (Ninomiya, Y., et al., 2004). Se sembraron 1×10^5 conidios de la cepa Δ mus-51 en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio mínimo de Vogel y se crecieron a 30°C por tres días en oscuridad y dos días en la luz. Se colectaron los conidios y se contaron. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregaron 2.5×10^6 conidios y 500 μ L de sorbitol frío 1 M. Esta suspensión se centrifugó por 30 segundos a 5000 RPM y se tiró el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado y al final los conidios se recuperaron en 40 μ L. Los conidios se mezclaron con 1 μ g del producto de PCR de fusión descrito en el párrafo anterior, previamente purificado con el Kit PCR Purification de Qiagen, y se incubaron en hielo por 5 minutos. Se tomaron 40 μ L de esa mezcla y se transfirieron a una celda de 0.2 cm y se electroporaron a 1.5 kV, 600 Ω y 2.3 μ F en el Gene Pulser II y el Controlador Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA).

Después de la electroporación, se agregaron 960 μ L de una solución 1 M de sorbitol frío, se mezcló con 25 mL de la solución de recuperación (Medio Mínimo de Vogel con 2% de extracto de levadura), y se incubó a 30 °C durante 2 horas con agitación a 200 RPM. Esta solución se mezcló con 25 mL de medio Top Agar fundido y se virtió en cajas con medio para aislar colonia adicionado de 200 μ g/mL de higromicina B.

Las placas se incubaron a 30°C por 5 días en la oscuridad. Las transformantes se purificaron estriando cuatro veces consecutivamente en medio para aislar colonias con 150

µg/mL de higromicina B, incubando a 30°C entre cada estríado. Una vez purificadas, las transformantes se sembraron en medio mínimo de Vogel con 150 µg de Higromicina B para obtener conidios y almacenarlos.

Oligonucleótido	Secuencia
1. Nc5'For	CTTACCACTTGTAGCGATGC
2. Nc5'Rev	TATCATCTTCTGTCTCCGACGTTGGCCAAAGTATATTTTC
3. Hph For	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC
4. Hph Rev	GTT GGA GAT TTC AGT AAC GTT AAG TGGAT
5. Nc3'For	TTAACGTTACTGAAATCTCCAACGCGAGCTGTTGTATGCG
6. Nc3'Rev	AGCTGTCATCCTTTCTCTCG
7. Nc Nest For	TCATCAGTGAAGTGGGCATCAGA
8. Nc Nest Rev	CGATGGAGAAGGGGTGAAGTGAAG

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados

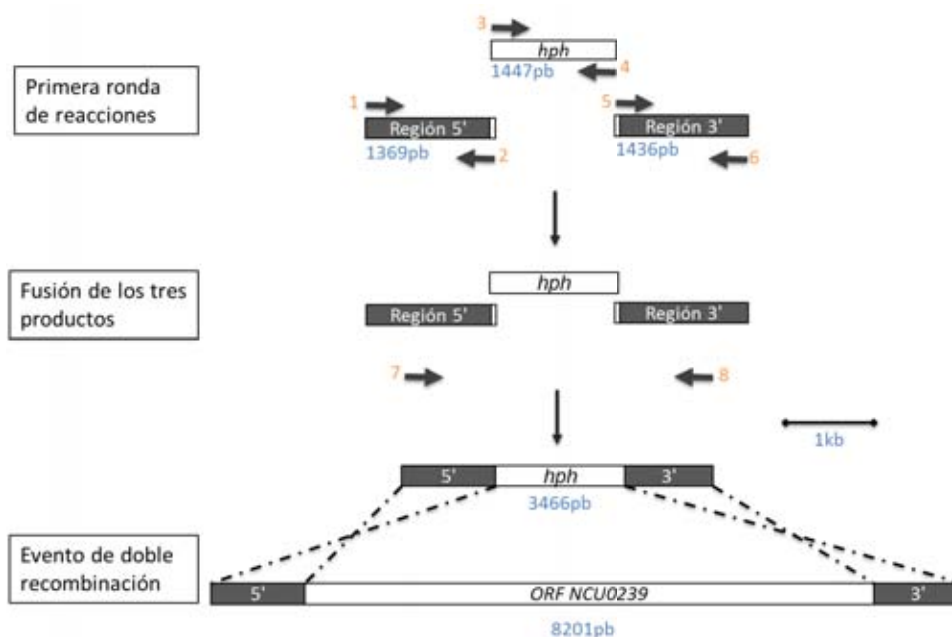


Figura 6. Estrategia para eliminar el gen *NCU0239*. Primera ronda de reacciones: Se amplificaron mediante reacciones de PCR independientes las regiones 1369 río arriba y 1436 río abajo del ORF del gen *NCU0239*. La región río arriba (Región 5') se amplificó con los oligonucleótidos Nc5'For y Nc5'Rev, incluye 11 pb de la región 5' del gen de resistencia a

higromicina B. La región río abajo se amplificó con los oligonucleótidos Nc3'For que incluye 23 pb de la región 3' del gen de resistencia a higromicina B, y con Nc3'Rev. **Fusión de los tres productos:** Mediante una nueva PCR realizada con los oligonucleótidos Nc NestFor y Nc Nest Rev se obtuvo la fusión de los tres productos. Se espera que durante la transformación la construcción que contiene el marcador de resistencia a higromicina B reemplace al ORF del gen *NCU00239* por un evento de recombinación homóloga. En azul se muestra el tamaño esperado de los productos y en naranja el número de oligonucleótido con correspondencia en la **Tabla 2**.

Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA se sembraron 1×10^7 conidios en 10 mL de medio líquido mínimo de Vogel y se crecieron por 48 horas a 30°C en oscuridad y sin agitación. El micelio se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y se pulverizó con una espátula. El método de purificación de DNA fue adaptado a partir del protocolo para *Aspergillus* (Timberlake, W. E., 1980).

Pruebas de correspondencia con el genotipo

Para disminuir la probabilidad de eventos de contaminación, se realizaron pruebas de resistencia a los agentes selectivos ignite e higromicina a las transformantes obtenidas. Como muestra la **Tabla 1**, la cepa silvestre es sensible a ambos agentes selectivos, mientras que el fondo que se transformó es resistente a ignite debido a la presencia del gen *bar*, las transformantes son resistentes tanto a higromicina como a ignite, y las cepas H10.1 ($\Delta nox-1$) son resistentes únicamente a higromicina. Las pruebas se realizaron inoculando a confluencia las cepas correspondientes en medio mínimo de Vogel o con los agentes selectivos a las concentraciones de 200µL/mL para el ignite y 150mg/mL para la higromicina. Después de esto se incubaron las cepas en oscuridad a 30°C y se dejaron crecer 36 horas en oscuridad y luego con luz otras 12 horas, a 25°C.

Bioinformática

Las secuencias de las proteínas utilizadas para este trabajo se obtuvieron de la base de datos del UniProt Consortium (Bateman, A., et al., 2015. Sitio <http://www.uniprot.org/>), así como de la base de datos del genoma de *N. crassa* del Broad Institute, ahora disponible en

el sistema de EnsemblFungi (Kersey, P. J., et al., 2016. Sitio <http://fungi.ensembl.org/index.html>), y la base de datos de proteínas del NCBI (O'Leary, N. A., et al. 2016. Sitio <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Para la búsqueda de dominios conservados en las secuencias se utilizó la herramienta CD Search (Conserved Domain Search) del NCBI (Marchler-Bauer, A., et al., 2011 Sitio <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), así como la herramienta Sequence Search de la base de datos del Pfam (Finn, R. D., et al., 2014, Sitio <http://pfam.xfam.org/>).

Para realizar los alineamientos se utilizó el servicio de T-Coffee del Center for Genomic Regulation (Notredame, C., et al., 2000. Sitio <http://tcoffee.crg.cat/>), y para su visualización se utilizó el software Jalview (Waterhouse, A. M., et al., 2009. Sitio <http://www.jalview.org/>).

Para los análisis estructurales se utilizó el predictor de estructura tridimensional por homología MODELLER (Eswar, N., et al., 2006. Sitio <https://salilab.org/modeller/>), por medio del servidor para identificación de regiones funcionales en proteínas ConSurf (Ashkenazy, H., et al., 2016. Sitio <http://consurf.tau.ac.il/2016/>), servidor que también se utilizó para la identificación de sitios evolutivamente conservados. Los gráficos y análisis moleculares se realizaron utilizando el paquete Chimera, desarrollado por la Universidad de California (Pettersen, E. F., et al., 2004. Sitio <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Resultados

1. El gen *NCU00239* de *N. crassa* es el ortólogo de CPS1

La secuencia de aminoácidos de CPS1 de *C. heterostrophus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>, AAG53991.2) se utilizó en búsquedas BLASTp utilizando el sistema del Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/Blast.html>) para identificar el gen ortólogo en *N. crassa*. La proteína codificada por el gen *NCU00239* fue la única detectada como resultado de esta búsqueda, mostrando una identidad del 66% con un E-value de 0 (probabilidad de que las

proteínas sean similares por azar), y esta proteína está anotada como Proteína de interacción con AMP. El alineamiento pareado de ambas secuencias de aminoácidos se muestra en el **Anexo 1**.

Posteriormente se realizó un análisis para determinar los dominios conservados en la proteína NCU00239. Para esto se utilizó el análisis de secuencia del Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). El análisis de secuencia del Pfam muestra que esta proteína contiene los siguientes dominios: un dominio de unión a DMAP-1 (aa 6-75), y dos dominios de unión a AMP. El dominio AMP1 incluye los aminoácidos 308-861 y el AMP2 incluye a los aminoácidos 1076-1525 (**Fig. 7**).



Figura 7. Dominios predichos en la proteína NCU00239 por el análisis de secuencia Pfam. El análisis muestra que la proteína NCU00239 contiene parte del dominio de unión a DMAP (en verde) y dos dominios de unión a AMP (en rojo).

2. Los dominios de adenilación en la proteína NCU00239 tienen características que sugieren que tienen actividad de enzimas tipo FAAL

Se realizó la búsqueda de dominios conservados utilizando la herramienta del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). El análisis sugiere que la proteína cuenta con un dominio similar al dominio de unión a DMAP de la DNMT1 y dos dominios que pertenecen a la clase I de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato. Como se observa en el esquema de la **Fig. 8**, entre el dominio de unión a DMAP y el primer dominio de adenilación se encuentra un dominio que está anotado como DUF3824, de función desconocida, que se encuentra en proteínas de hongos y que es rico en prolinas.

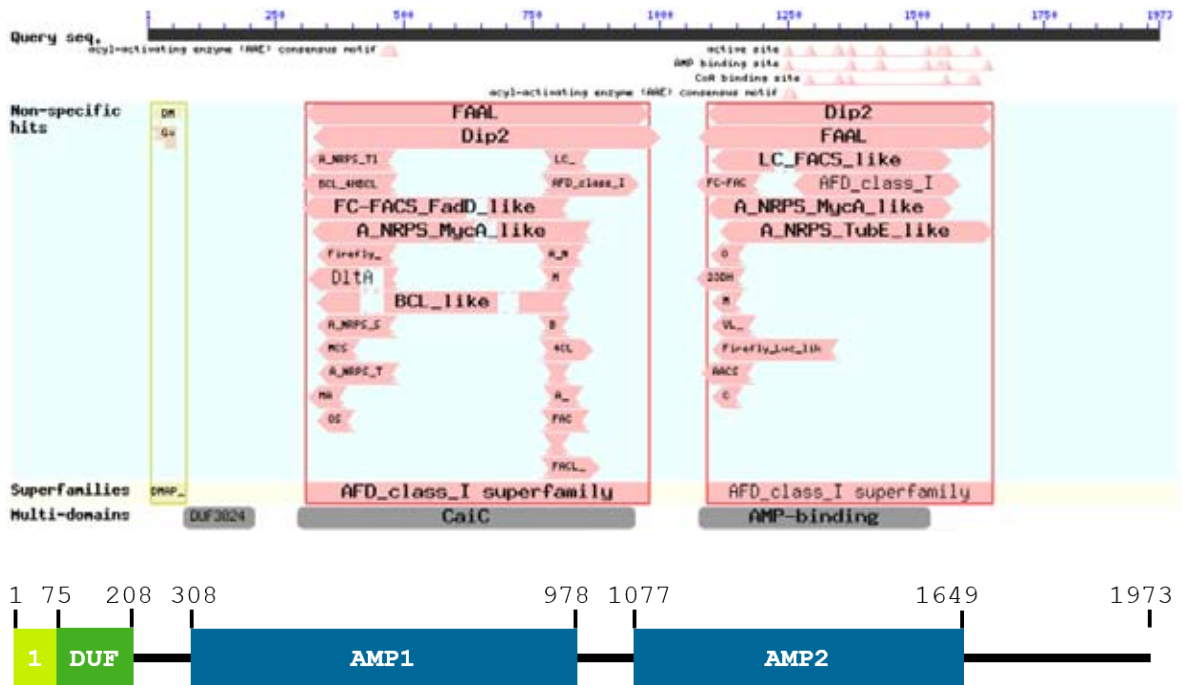


Figura 8: Dominios identificados en la proteína NCU00239 de *N. crassa*. Los resultados detallados de la búsqueda de dominios conservados muestran que tanto el dominio **Amp1** como el **Amp2** podrían ser dominios tipo FAAL. También se identificó el dominio de interacción con la proteína DMAP (**1** en el esquema) y un dominio de función desconocida anotado como DUF3824 (**DUF** en el esquema). En el esquema se muestran los aminoácidos en los que se localizan estas regiones.

Como se observa en la **Fig. 8**, los dominios Amp1 y Amp2 de la proteína NCU00239 muestran similitud con diversas proteínas de la supefamilia de enzimas formadoras de adenilatos, principalmente con las enzimas tipo FAAL (Fatty Acid Acyl-AMP Ligase). El E-Value del alineamiento entre el dominio AMP1 y las enzimas FAAL es de 1.83×10^{-40} y el del dominio 2 es de 3.33×10^{-44} razón por la cual se les nombró a estos dominios de la proteína NCU00239 como “FAAL Like”.

2.1 Inserciones en los dominios de adenilación indican similitud entre los dominios Amp y las enzimas FAAL

Para averiguar más a fondo si es que los dominios de adenilación del ortólogo de CPS1 en *N. crassa* corresponden a los de enzimas tipo FAAL, se realizó una búsqueda de las inserciones de aminoácidos características de las FAAL en los dominios de

adenilación. Las enzimas FAAL (Fatty Acid Acyl-AMP Ligase) se distinguen de las enzimas FACL (Fatty Acid CoA Ligase) por que en su secuencia de aminoácidos hay una inserción de 22 aminoácidos que modula los movimientos del dominio C terminal (Arora, P., et al., 2009). Como se observa en la **Fig. 9**, en el dominio Amp1 la inserción correspondiente a los 22 aminoácidos de las enzimas FAAL (caja verde) es 10 aminoácidos más grande (caja azul). En la región cercana a esta inserción hay otras inserciones, una de 38 aminoácidos y otra de 6 aminoácidos (cajas naranjas), mismas que no están presentes en la secuencia de las otras enzimas formadoras de adenilato alineadas.

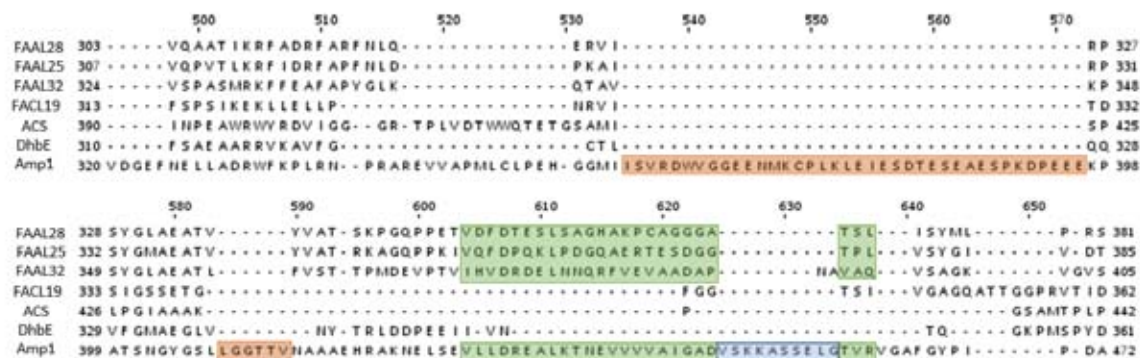


Figura 9: El dominio Amp1 presenta una inserción más grande que la que caracteriza a las enzimas tipo FAAL. Se realizó un alineamiento entre 3 enzimas FAAL de *Mycobacterium tuberculosis* (FAAL28, FAAL25 y FAAL 32), una enzima FACL (FACL19), la enzima acetil-CoA sintetasa de este mismo organismo (ACS), el arquetipo del dominio de activación de arilación de una sintetasa de péptidos no ribosomales (DhbE) y el dominio Amp1 de la proteína NCU00239 de *N. crassa* (Amp1). Se encontró que el dominio Amp1 tiene diferencias importantes respecto a la inserción que caracteriza a las FAAL. La caja verde señala la inserción característica de 22 aminoácidos de las enzimas FAAL, la caja azul señala los 10 aminoácidos adicionales de esta inserción en el dominio Amp1. Las cajas naranjas muestran otras inserciones cercanas a la inserción característica de 22 aminoácidos, presentes en el dominio Amp1 pero no en las enzimas FAAL, una de 38 aminoácidos y la otra de 6.

A diferencia de esto, la inserción presente en el dominio Amp2 muestra diferencias menores en cuanto al tamaño de la inserción presente en las enzimas tipo FAAL (cajas verdes en la **Fig. 10**). Esto quiere decir que las inserciones presentes en el

dominio AMP2 o FAAL Like 2 son más similares en longitud a las inserciones que están en las proteínas tipo FAAL.

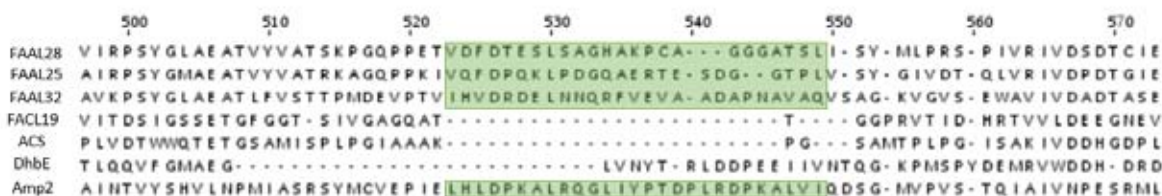


Figura 10: El dominio Amp2 presenta una la inserción de longitud muy similar a la que caracteriza a las enzimas FAAL. Se realizó un alineamiento entre 3 enzimas FAAL de *Mycobacterium tuberculosis* (FAAL28, FAAL25 y FAAL 32), una enzima FAAL (FACL19), la enzima acetil-CoA sintetasa de este mismo organismo (ACS), el arquetipo del el dominio de activación de aril ácido de una sintetasa de péptidos no ribosomales (DhbE) y el dominio Amp2 de la proteína NCU00239 de *N. crassa* (Amp2). Con esto se encontró que el dominio Amp2 tiene una inserción de aminoácidos en la misma región que la de las enzimas FAAL y de una longitud similar. La caja verde señala la inserción característica de las enzimas FAAL. La inserción presente en el dominio Amp2 tiene uno a tres aminoácidos más que la inserción presente en las enzimas FAAL.

2.2 Análisis estructurales sugieren que los dominios FAAL-L (FAAL-Like) podrían tener una función similar a las FAAL

Después de observar que las inserciones de aminoácidos no son iguales en ambos dominios, y que el dominio Amp2 tiene una inserción más grande además de otras inserciones cercanas a la primera (Fig. 9), se realizaron modelos tridimensionales para comparar la localización de las inserciones de aminoácidos en la topología de la proteína. Esto se realizó ya que la inserción característica de las FAAL interactúa con el dominio carboxilo terminal de modo que interrumpe su movimiento, lo que resulta en que las enzimas FAAL no puedan adoptar la “conformación de tiolación”, lo que hace que su actividad enzimática consista en la formación de Acil Adenilatos (Goyal, A., et al., 2012).

Para realizar los un modelo tridimensional de los dominios AMP de la proteína NCU00239 y así poder evaluar la posición de las inserciones de aminoácidos se utilizó el servidor ConSurf que realiza un modelado por homología. Este servidor realiza una

búsqueda con HHPred para encontrar templados potenciales de estructuras tridimensionales conocidas, y luego utiliza el algoritmo MODELLER para predecir un modelo tridimensional de la proteína (Ashkenazy, H., et al., 2016). A la fecha no existen estructuras 3D de homólogos deNCU00239.

	Cristal	Prob	E-value	TMScore	Query HMM	Template HMM	Identidad
AMP1	5ey9_A	100.0	4E-111	0.8471	1-491	27-595 (629)	22%
	3kxw_A	100.0	9E-117	0.8442	1-491	19-550 (590)	27%
	3ta_A	100.0	1E-106	0.8196	1-410	32-480 (480)	24%
AMP2	5ey9_A	100.0	2E-118	0.8469	1-511	27-610 (629)	21%
	3kxw_A	100.0	3.5E-83	0.8292	1-511	19-565 (590)	22%
	3ta_A	100.0	2E-85	0.8082	1-410	32-480 (480)	20%

Tabla 3: Puntajes de los alineamientos estructurales y del modelo tridimensional. **Prob** indica la probabilidad de que la secuencia identificada sea homóloga a la secuencia templado. **E-value** es el número esperado de falsos positivos por búsqueda con el puntaje de la secuencia identificada (Söding, J., et al., 2005). **TMScore** evalúa la topología del modelo de la proteína, y cuando es mayor a 0.5 generalmente indica un plegamiento similar entre el blanco y el templado (Xu, J., y Zhang, Y., 2010). Las otras columnas describen el rango de residuos alineados.

Utilizando como secuencia de búsqueda los aminoácidos 308-978 para el dominio AMP1 y 1077-1649 para el dominio AMP2, para ambos dominios se encontraron como estructuras templado los cristales de la proteína FadD32 de *Mycobacterium marinum* (5ey9_A), la saframicina MX1 sintasa de *Legionella pneumophila* (3kxw_A) y la proteína FadD28 de *Mycobacterium tuberculosis* (3ta_A). Las tres estructuras corresponden a proteínas FAAL. Los puntajes de los alineamientos estructurales y del modelo tridimensional se muestran en la **Tabla 3**.

Como se puede ver en la **Tabla 4** la longitud de los templados varía respecto a la longitud de los dominios AMP1 y AMP2. Estas diferencias explican que los modelos generados muestren porciones que no pudieron ser modeladas y que no muestran una estructura determinada. Sin embargo, como se observa en la **Tabla 3**, el TMScore

de los modelos es mayor a 0.5 y con esto se puede suponer una topología similar a *grosso modo* entre los modelos obtenidos y los templados (Xu, J., y Zhang, Y., 2010).

	Longitud aa
AMP1	600
AMP2	573
5ey9_A	629
3kxw_A	590
3ta_A	480

Tabla 4: Longitud que fue alineada de los dominios Amp1 y Amp2 y de los templados utilizados para el modelado tridimensional de los dominios.

Como muestra la **Fig. 11**, la estructura predicha de cada dominio AMP está compuesta por dos subdominios. Un subdominio C-terminal grande de aproximadamente 558 aa en el dominio Amp1 y 467 aa en el dominio Amp2 (**Fig. 11** color naranja), y un subdominio N-terminal pequeño de aproximadamente 113 aa en el dominio Amp1 y 103 aa en el dominio Amp2 (**Fig. 11**, color verde). Esta topología es congruente con la estructura de los miembros de la Clase I de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato (Schmelz, S. & Naismith, J. H., 2009). Estas enzimas tienen alternación de dominios durante la catálisis, queriendo decir que después de un primer paso en la “conformación de adenilación”, el dominio C-terminal rota cerca de 140° para adoptar la “conformación de tiolación”, que se necesita para el segundo paso de la reacción de catálisis (Goyal, A., et al., 2012).

Como puede verse en la **Fig. 11**, las inserciones de los dominios Amp1 y Amp2 (en azul) de NCU00239 también se encuentran localizadas entre los dos subdominios, lo cual ocurre de manera similar en las enzimas FAAL, en las que interrumpen el movimiento del dominio C-terminal. Esto sugiere que los dominios Amp podrían jugar un papel análogo al que juegan en las enzimas FAAL.

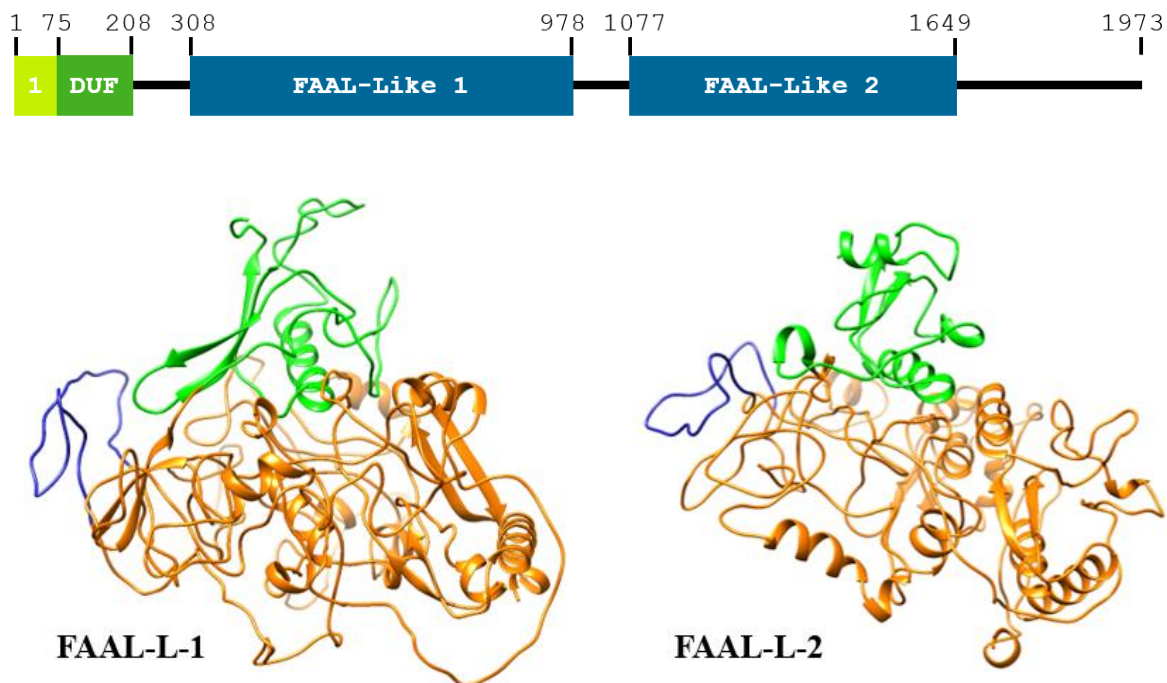


Figura 11. Los dominios Amp de NCU00239 y las enzimas FAAL poseen inserciones entre sus subdominios N- y C-terminales que podrían jugar un papel análogo en la catálisis.

Arriba de los modelos se muestra un esquema con los dominios de la proteína, y considerando el análisis estructural se nombró a los dominios Amp como **FAAL-Like**. Abajo: Representaciones de estructura en listones de los dominios FAAL Like 1 (Izquierda) y FAAL Like 2 (Derecha), mostrando los dominios C-terminal (verde), N-terminal (naranja) y la inserción (azul). La inserción se localiza topológicamente entre el dominio N-terminal y C-terminal, y es posible que interrumpa el movimiento del dominio C-terminal.

3. El dominio similar al dominio de interacción con DMAP de la DNMT1, así como las regiones interdominios, presentan sitios conservados, lo cual sugiere que son necesarios para la función de la proteína.

Para analizar el dominio de la proteína NCU00239 que es similar al dominio de interacción con DMAP presente en la proteína DNMT1, se realizó un alineamiento en el que se incluyeron secuencias de ortólogos de la proteína CPS1 de hongos y animales (Fig. 12). Se encontró que este dominio presenta una región altamente conservada entre estos organismos, al inicio de la secuencia de la proteína.

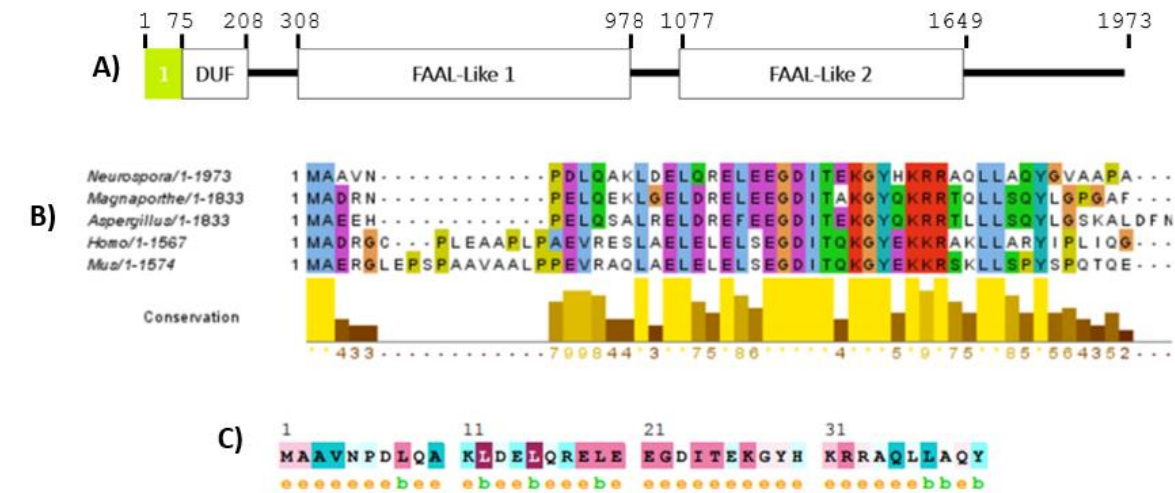


Figura 12: La secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal del dominio de interacción con DMAP de las proteínas CpsA está altamente conservado. Se realizó un alineamiento entre la secuencia de los ortólogos de la proteína CPS1 en hongos filamentosos (*N. crassa*, *Magnaporthe oryzae* y *Aspergillus nidulans*) y entre la secuencia de los ortólogos en mamíferos (*Homo sapiens* y *Mus musculus*), mismo que se muestra en el Panel B de la figura. Se encontró que en la región anotada como dominio de interacción con DMAP (Panel A, color amarillo) se encuentra una región conservada de aminoácidos. En el Panel C se muestra el resultado del análisis con la herramienta ConSurf para identificación de sitios funcionales. En magenta se muestran sitios altamente conservados y en azul sitios variables (e: exposed, b: buried, s: structural, f: functional). Como se observa en la figura, este dominio similar al dominio de interacción con DMAP de la DNMT1 presenta una región altamente conservada entre los distintos organismos.

Como se mencionó anteriormente, la herramienta de búsqueda de dominios conservados identifica la presencia de un dominio anotado como DUF3824 entre los dominios DMAP y FAAL-Like 1. Para verificar la conservación en esta región se compararon diferentes secuencias tanto de hongos como de mamíferos utilizando un alineamiento. Como se observa en la Fig. 13, hay 14 aminoácidos altamente conservados en esta región (indicados con un punto verde). Esto sugiere que esta región también podría ser importante para la función de la proteína.

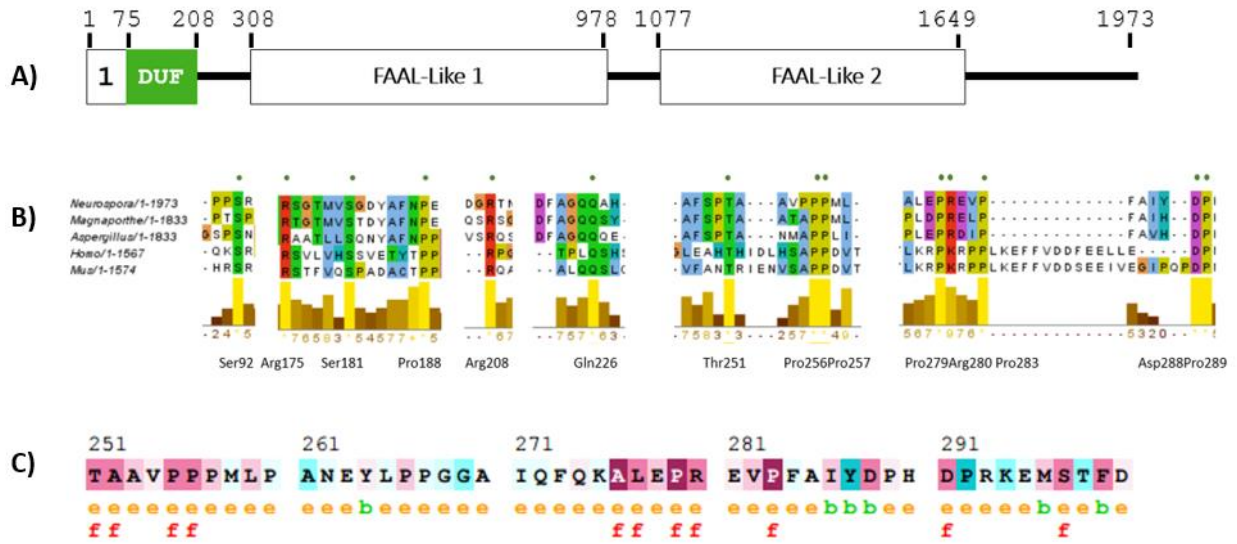


Figura 13: El dominio DUF tiene algunos sitios conservados entre los ortólogos de *Cps1*. Relizando un alineamiento entre las secuencias de los ortólogos de *Cps1* en *N. crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Homo sapiens* y *Mus musculus* se observa la presencia de algunos sitios altamente conservados . en la región indicada en el Panel **A** de con color verde. El alineamiento se muestra en el Panel **B**, en el que se marcon con un punto verde sobre las secuencias los aminoácidos conservados **C**: Resultado del análisis con la herramienta ConSurf para identificación de sitios funcionales. El código de colores es el mismo que el del Panel **C** de la Fig. 12.

Ya que la herramienta de búsqueda de dominios no identificó la presencia de algún dominio conservado en la región entre los dominios FAAL-L-1 y FAAL-L-2, también llevamos a cabo alineamientos en esta región. La **Fig. 14** muestra una región conservada entre las proteínas de los hongos y animales, la cual también podría ser importante para la función de estas proteínas.



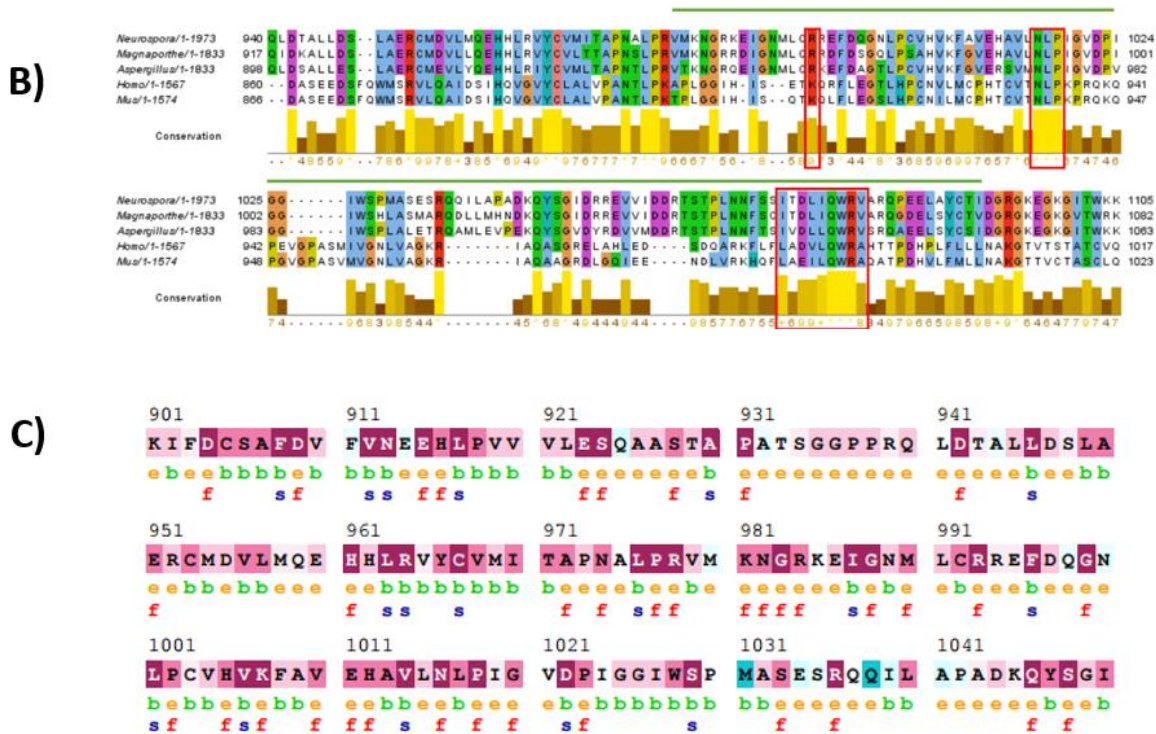


Figura 14: La región de aminoácidos entre los dominios FAAL-Like 1 y FAAL-Like 2 está conservada entre los hongos y los animales. Panel A: Región de aminoácidos de la que trata ésta figura. Panel B: Realizando un alineamiento entre las secuencias de los ortólogos de CpsA en *N. crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Homo sapiens* y *Mus musculus* se encontraron tres regiones conservadas entre las cinco secuencias. En el alineamiento la línea verde arriba de las secuencias es la región entre los dominios FAAL-L-1 y FAAL-L-2. Las cajas rojas corresponden a regiones conservadas que podrían ser relevantes. Debajo de la secuencia se muestra una gráfica de conservación (amarillo claro indica alta conservación y colores oscuros baja conservación). Los aminoácidos conservados son Arg993, Asn-Leu-Pro 1016-1018, I/L-X-D/E-L/V-LI-Q-W-R-V/A 1071-1079. Panel C: Resultado del análisis con la herramienta ConSurf para identificación de sitios funcionales. El código de colores es el mismo que el del Panel C de la Fig. 12.

4. Eliminación del gen *NCU00239*

Para eliminar el gen *NCU00239* se realizaron las PCRs para obtener los productos que remplazaran al gen silvestre por el cassette de resistencia a higromicina, con la estrategia indicada en la sección de materiales y métodos. Se obtuvieron los productos 5', Hph, y 3' que se muestran en la Fig. 15, los cuales se fusionaron empleando los oligonucleótidos

anidados Nc Nest For y Nc Nest Rev. El producto final de de la fusión se muestra en el carril 5 de la Fig. 15.

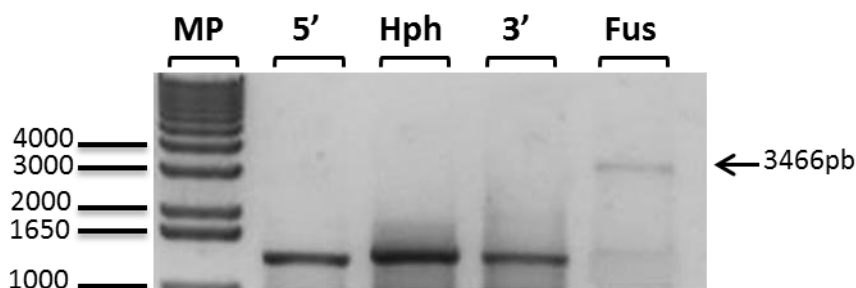


Figura 15: Productos de PCR y amplicón final para eliminar el ORF del gen *NCU00239*. En un gel de agarosa al 1% se corrieron 5µl por carril de cada eluido resultante de la purificación de los productos de PCR. De izquierda a derecha, 1: marcador de peso molecular, 2: producto de PCR 5' con un tamaño esperado de 1346pb, 3: producto de PCR del gen de resistencia a higromicina B con un tamaño esperado de 1447pb, 4: producto de PCR 3' con un tamaño esperado de 1436pb, 5: producto de la fusión de los tres fragmentos amplificado con los oligonucleótidos anidados, con un tamaño esperado de 3466pb.

En la base de datos de las cepas de delección de *N. crassa* obtenidas como parte del Neurospora Genome Project se observó que la cepa con el gen *NCU00239* eliminado está disponible únicamente como heterocarión. En la página del proyecto se indica que si una cepa no está disponible como homocarión probablemente el gen correspondiente es esencial (<http://geiselmed.dartmouth.edu/dunlaploros/genome/>). Sin embargo, la información de los trabajos previos (la interrupción del gen ortólogo en hongos fitopatógenos y la eliminación en *Aspergillus nidulans*) sugieren que las mutantes nulas en este gen deben ser viables.

El producto de fusión mostrado en la Fig. 15 se utilizó para electroporar conidios de la cepa Δ mus-51, las cuales se sembraron en medio selectivo con higromicina B (150µg/mL). Como se puede observar en la Fig. 16 se obtuvieron 7 transformantes resistentes a higromicina, mientras que en el control negativo (sin DNA), no se observó ningún crecimiento.

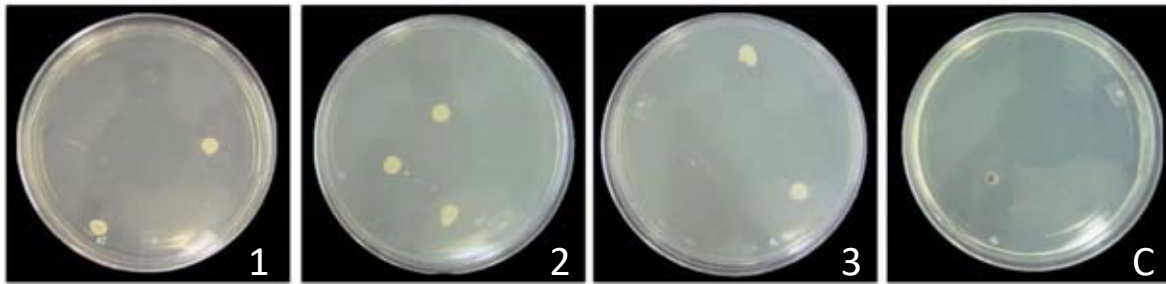
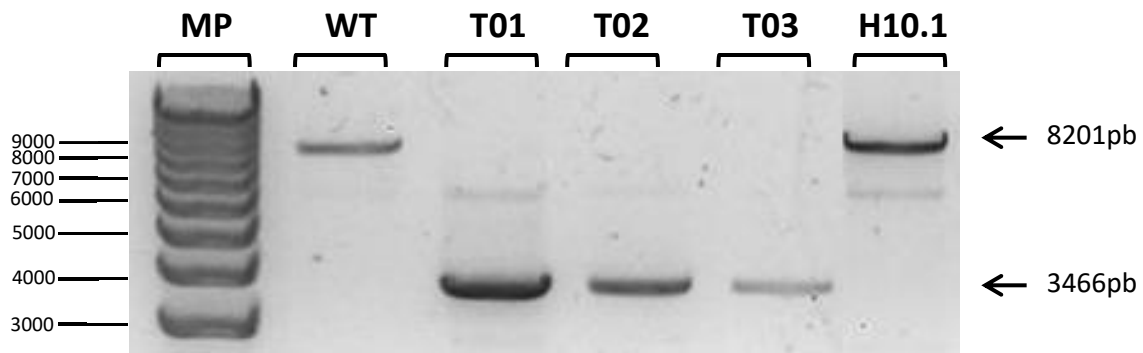


Figura 16. Transformantes obtenidas por electroporación de conidios. La fotografía se tomó después de incubar 4 días a 30°C. La **Caja C** es un control negativo y se inoculó con 200mL de una solución obtenida igual que en las otras cajas pero sin de DNA. El medio en el que se crecieron las transformantes fue el medio para aislar colonias con la mitad de concentración de sorbosa y con higromicina (150µg/mL).

De estas 7 transformantes se aislaron 3 transformantes estables y se purificaron 4 veces mediante resiembras sucesivas de colonias aisladas en medio con Higromicina B (150µg/mL). Se realizó la extracción del DNA de las transformantes aisladas y este se utilizó como templado para comprobar el evento de recombinación mediante análisis por PCR. Como controles negativos, en este análisis se incluyó DNA de las cepas 74-OR8-1a (WT, mat a) y H10.1 ($\Delta nox-1$, cepa de delección generada con el mismo marcador selectivo). Como se muestra en la **Fig. 17**, a partir del DNA de las mutantes T1-T3 se puede amplificar un producto de PCR de 3466 pb, mientras que las cepas silvestre y control éste corresponde a un fragmento de 8201 pb, lo cual indica que las tres transformantes obtenidas muestran el evento de recombinación esperado.



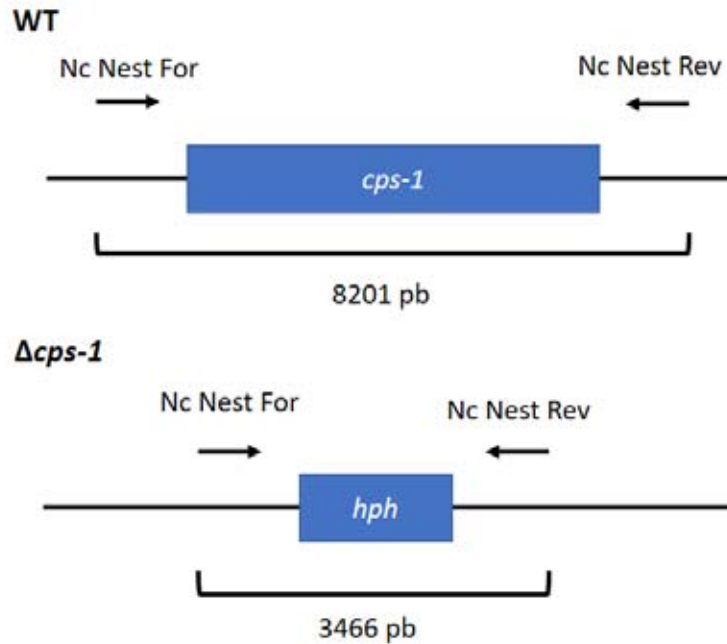


Figura 17. Comprobación de la eliminación del gen *NCU00239*. En un gel de agarosa al 1% se corrieron los productos obtenidos de la PCR de comprobación. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos Nc Nest For y Nc Nest Rev. Como controles negativos se utilizaron las cepas WT mat a (carril 2) y H10.1 ($\Delta nox-1$) (carril 6) Los tamaños esperados de los productos de PCR son 3466pb para las mutantes y 8201pb para las cepas silvestres. Carril 1: Marcador de peso molecular. Abajo del gel se muestra esquema de la reacción realizada. Con el uso de dichos oligonucleótidos para la reacción de PCR, una cepa silvestre da un producto de 8201 pb ya que este producto incluye la totalidad del ORF del gen *cps-1*, mientras que una cepa $\Delta cps-1$ da un producto de 3466 pb, considerando que el cassette de resistencia a higromicina es mucho más pequeño que el ORF del gen.

También se realizaron pruebas de resistencia al ignite y a la higromicina utilizando la cepa silvestre, las tres transformantes estables aisladas, la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$) y la cepa $\Delta mus-1$ para verificar la congruencia entre el genotipo esperado de cada cepa y la resistencia a estos marcadores. Los resultados, presentados en la **Fig. 18**, muestran que de acuerdo con lo esperado, la cepa silvestre resultó sensible tanto al ignite como a la higromicina. La cepa receptora que se utilizó para la transformación ($\Delta mus-1$) posee el gen bar y por lo tanto es resistente al ignite pero sensible a la higromicina. Las cepas transformantes conservan el gen de resistencia al ignite de la cepa $\Delta mus-1$, y además tienen el fragmento insertado por transformación que confiere resistencia a higromicina, por lo que son resistentes a ambos

agentes selectivos. La cepa H10.1 tiene el cassette de resistencia a higromicina reemplazando al gen *nox-1* pero se le ha quitado el fondo *mus-51Δbar+*, por lo que es resistente a higromicina pero no a ignite.

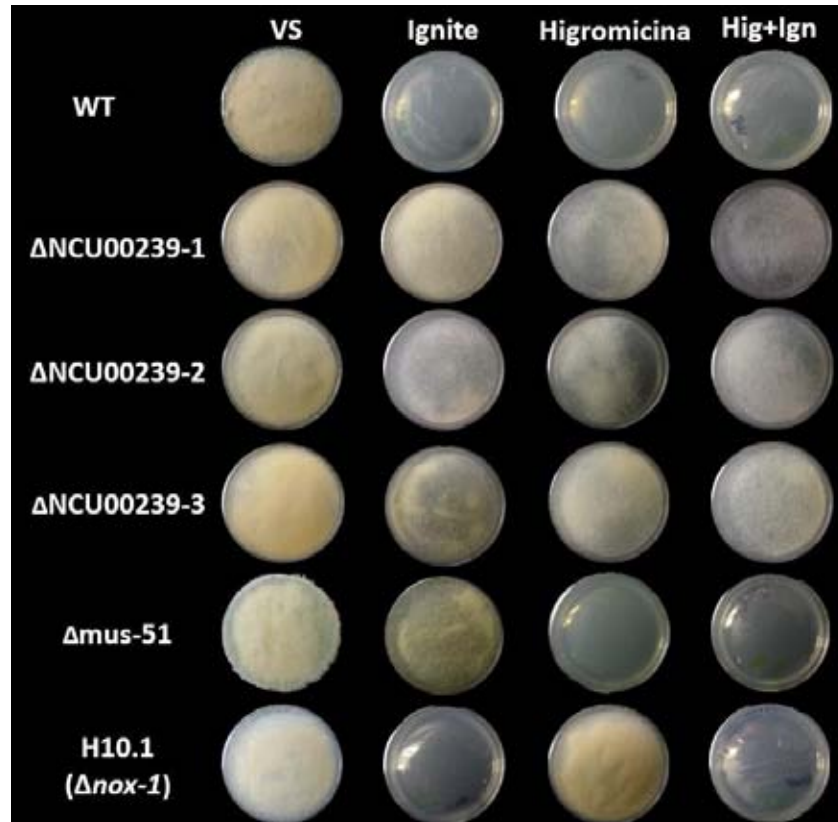


Figura 18. Las transformantes Δ NCU00239 son resistentes al ignite y a la higromicina, lo cual corresponde con su genotipo (*mus-51^Abar⁺cpsA^A::hph⁺mat a*). Las cepas indicadas se inocularon a confluencia en medio mínimo de Vogel solo, con ignite (200μg/mL), con Higromicina B (150mg/mL) o con ignite e Higromicina y se pusieron a crecer por 36 horas en oscuridad a 30°C y luego por 12 horas con luz a 25°C.

5. La eliminación del gen *NCU00239* causa una reducción en la velocidad de crecimiento lineal y radial

Para evaluar los efectos de la eliminación de *NCU00239* en *N. crassa*, se realizaron pruebas de crecimiento radial y de crecimiento lineal. Como muestran las Figs. 19 y 20, las mutantes carentes este gen muestran una disminución notoria en su crecimiento radial y lineal, en comparación con la cepa 74-OR8-1a (WT, mat a).

Respecto al crecimiento lineal (Fig. 19), y como se observa en la gráfica, este disminuye a aproximadamente la mitad en diámetro en comparación con una cepa silvestre (74-OR8-1a, anotada como WT en la Fig.) después de 24 horas a 30°C. El crecimiento registrado es menor al de la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$) que también se encuentra afectada en el crecimiento radial (Cano-Domínguez, et al., 2008).

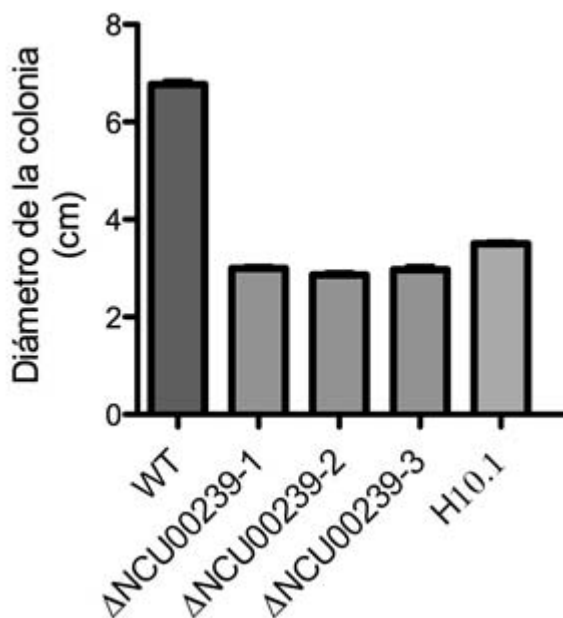
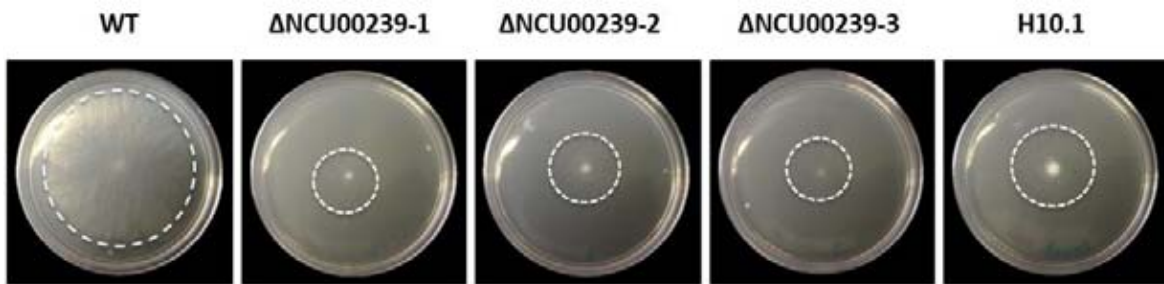


Figura 19. La eliminación del gen *NCU00239* produce disminución en el crecimiento radial del micelio. Se inocularon 1×10^4 esporas de las cepas 74-OR8-1a (WT, mat a), las tres mutantes $\Delta NCU00239$ y la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$) en placas con medio mínimo de Vogel sólido, por triplicado. Se crecieron en oscuridad a 30°C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron fotografías y mediciones del diámetro de las colonias. En líneas punteadas blancas se muestra el perímetro observado de cada colonia. A la izquierda se muestra la gráfica del promedio del diámetro de las colonias

Respecto al crecimiento lineal, como se observa en la Fig. 20, este es similar entre las cepas 74-OR8-1a (WT) y las transformantes a las 24 horas (segunda marca negra en los tubos de izquierda a derecha, la primera marca negra en los extremos de los tubos corresponde al sitio de inicio del experimento). Posteriormente, a las 48 y 72 horas el crecimiento se desfasa, alcanzando la silvestre un crecimiento de cerca del doble que el de las transformantes.



Figura 20. Las mutantes $\Delta NCU00239$ presentan disminución en la velocidad de crecimiento lineal.

Se inocularon bocados de micelio de 0.5cms de diámetro en tubos de vidrio con medio mínimo de Vogel sólido, de las cepas 74-OR8-1a (WT, mat a), y las tres transformantes. Luego se crecieron en obscuridad a 30°C. Se colocaron 12 horas a la luz para inducir la pigmentación y después de eso se tomaron fotografías. Se colocaron marcas en el borde del micelio al inicio del experimento y a las 24, 48 y 72 horas.

6. Las mutantes carentes del gen $NCU00239$ muestran una drástica reducción en la producción de micelio aéreo y en la esporulación asexual

Además de la reducción en el crecimiento radial, observamos que las mutantes carentes del gen $NCU00239$ mostraban una clara reducción en la formación del micelio aéreo, por lo cual decidimos comparar este fenotipo con el de la mutante H10.1 ($\Delta nox-1$) que forma muy poco micelio aéreo (Cano-Domínguez, et al., 2008). Como se puede ver en la **Fig. 21**, el crecimiento aéreo en la cepa 74-OR8-1a (WT, mat a) se observa como un desarrollo de hifas sobre las paredes de los matraces de vidrio que tiene una coloración naranja intensa. Como se mencionó, este crecimiento se encuentra severamente disminuido en la mutante H10.1 ($\Delta nox-1$), que en la figura se encuentra en el extremo derecho. Como se observa en la figura, las 3 mutantes ($\Delta NCU00239-1$ a 3, en el centro de la figura) producen una cantidad semejante de micelio aéreo, la cual es notablemente inferior que el producido por la cepa silvestre y menor que el de la mutante H10.1 ($\Delta nox-1$, mat a).

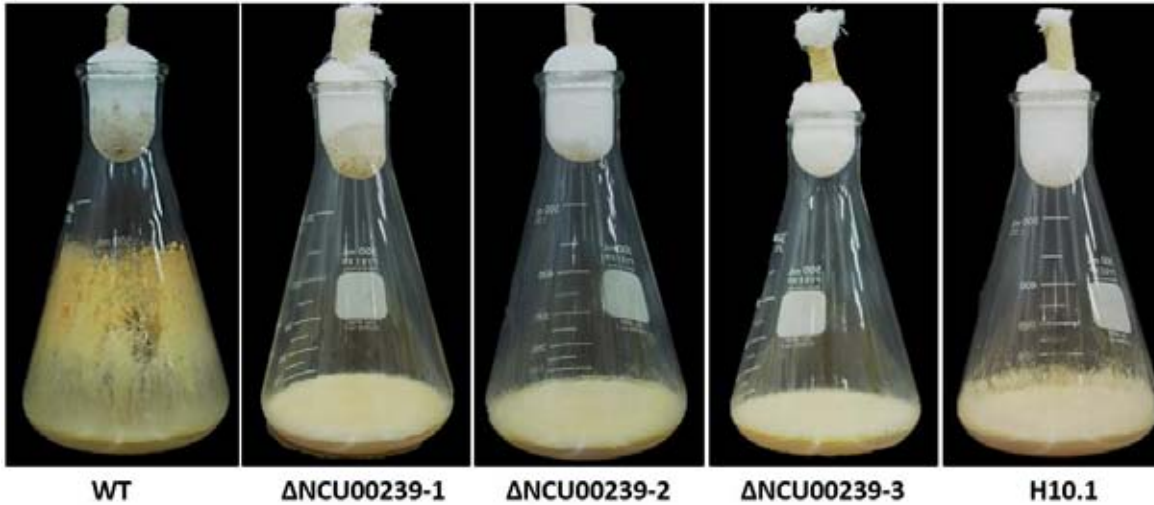


Figura 21. Las mutantes $\Delta NCU002391$ muestran una severa disminución en la formación de micelio aéreo. El micelio aéreo corresponde a la masa de hifas que se desarrolla sobre la pared de los matraces. La cepa 74-OR8-1a (WT, izquierda) desarrolla micelio aéreo y conidios casi hasta el cuello del matraz, mientras que la cepa $\Delta nox-1$ (H10.1, izquierda) produce muy poco micelio aéreo y menos pigmentado. Las mutantes $\Delta NCU00239$ (1-3) producen una cantidad de micelio aéreo todavía menor que el de la cepa $\Delta nox-1$. Se inocularon 1×10^4 conidioesporas de cada cepa en matraces con Medio Mínimo de Vogel. Se crecieron a 30°C en oscuridad por 48 horas y posteriormente a 25°C con luz por 72 horas.

La menor producción de micelio aéreo suele estar asociada con una menor producción de conidios (Davis, R.H., 2000), por lo cual decidimos cuantificar la producción de conidiosporas. Como muestra la **Fig. 22**, la producción de conidiosporas se encuentra drásticamente disminuída en las mutantes $\Delta NCU002391$. La cepa 74-OR8-1a (WT, mat a) produce cerca de 180 millones de conidios por colonia en tubo de ensayo (primera columna en la gráfica), la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$) produce aproximadamente un tercio de las conidioesporas que produce la cepa silvestre (quinta columna en la gráfica) (Cano-Domínguez, et al., 2008). Las mutantes $\Delta NCU00239-1$ a 3 (tres columnas en el centro de la gráfica) producen cerca de 1 millón de esporas, lo cual corresponde a 180 veces menos conidios que la cepa silvestre.

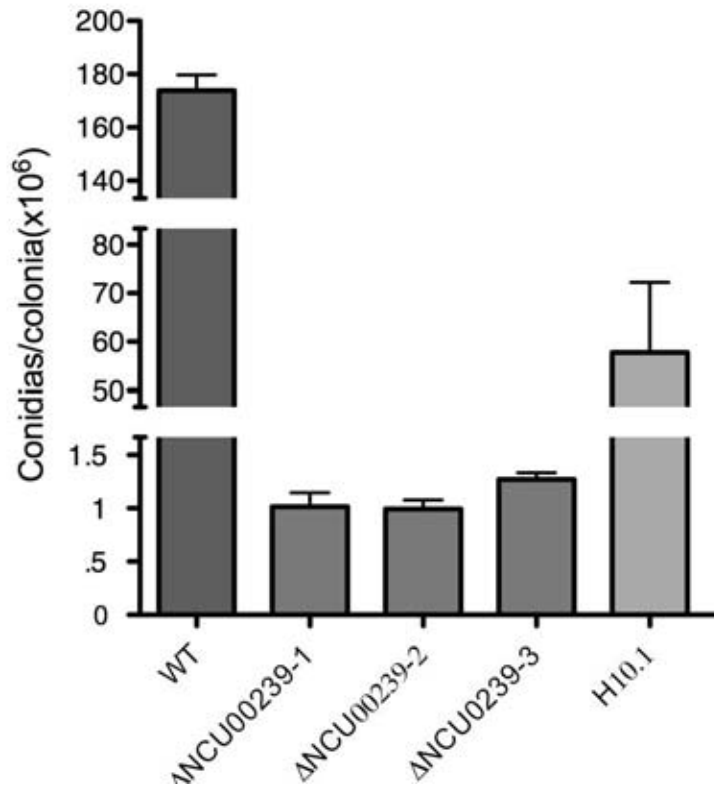


Figura 22. La carencia del gen *NCU00239* produce una severa disminución en la producción de conidios. Las cepas indicadas se inocularon en tubos de ensayo con medio VS sólido (1×10^4 conidiosporas de cada cepa por triplicado). Se incubaron a 30°C por 48 horas en la oscuridad y luego a 25°C por 72 horas con luz. Posteriormente se agregó a cada tubo 1mL de agua, se agitó cada tubo con el vórtex por 5 segundos, se recuperó la suspensión obtenida de conidios y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos para excluir el micelio. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las esporas en 1mL de agua. Después se hizo el conteo de las esporas en un hemocitómetro. Los valores representan el promedio de 3 experimentos y las líneas la desviación estándar.

También se realizaron pruebas de resistencia a diferentes fuentes de estrés osmótico. Como se muestra en el **Anexo 2**, no se encuentran diferencias significativas entre una silvestre y las mutantes $\Delta\text{NCU00239}$ respecto a este fenotipo.

7. El gen *NCU00239* es necesario para el desarrollo sexual

Como parte del análisis de los efectos que tiene la eliminación del gen *NCU00239* en el desarrollo de *N. crassa* y con el objetivo de analizar la cosegregación genética del fenotipo

mutante con la resistencia a higromicina, decidimos inducir el ciclo sexual en las mutantes. Para esto, se inocularon 1×10^4 conidios de las tres transformantes en cajas de medio sintético de cruza de Wetergar y Mitchel. Como control positivo se inocularon conidios de la cepa 74-OR8-1a (WT, mat a), que como cepa silvestre es capaz de producir protoperitecios en el medio mencionado, y como control negativo se inocularon conidios de la cepa de la H10.1 ($\Delta nox-1$), esta última incapaz de desarrollar protoperitecios (Cano-Domínguez, et al., 2008). En la **Fig. 23** se observa que las mutantes ($\Delta NCU00213-1$ a $\Delta NCU00239-3$, las tres fotografías en el centro de la figura), al igual que la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$), son incapaces de producir protoperitecios (que se observan como estructuras con forma semiredonda y color marrón, marcados en la cepa silvestre con flechas azules). Esto señala que el gen *NCU00239* es necesario para el desarrollo sexual en *N. crassa*.

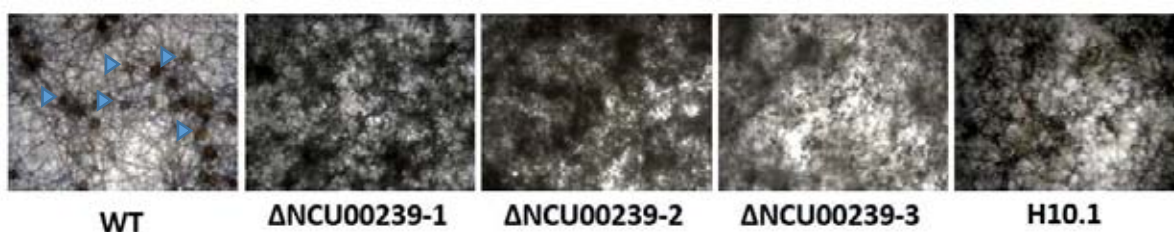


Figura 23. Al igual que una cepa $\Delta nox-1$, las transformantes $\Delta NCU00239$ no muestran desarrollo de protoperitecios. Se inocularon 5×10^4 conidiesporas de la cepa 74-OR8-1a (WT, mat a), las tres transformantes ($\Delta NCU00213-1$ a $\Delta NCU00239-3$) y la cepa H10.1 ($\Delta nox-1$) en medio para inducir ciclo sexual, y se pusieron a crecer a 25°C con luz. Se tomaron fotografías con un microscopio estereoscópico después de 14 días. En la figura las flechas azules señalan algunos protoperitecios.

8. Cosegregación del fenotipo mutante y la resistencia a higromicina

Para obtener progenie y considerando que las mutantes no pueden producir protoperitecios, se tomó la mutante $\Delta NCU00239-3$ y se utilizó como cepa macho o donadora en una cruce sexual con la cepa 74-OR23-1A (WT mat A). Esta cruce produjo peritecios y ascosporas normales, lo que indica que las cepas $\Delta NCU00239$ como donadoras (contraparte masculina) son fértiles. Las ascosporas obtenidas se activaron por calor y se plaquearon en medio para aislar colonias con y sin el antibiótico higromicina. Los

resultados en la **Tabla 5**, muestran que la cruce entre 2 cepas silvestres es incapaz de generar progenie resistente a higromicina, mientras que aproximadamente el 50% de la progenie de la cruce entre la mutante $\Delta NCU00239-3$ y la cepa silvestre es resistente a higromicina, y por lo tanto este fenotipo muestra una segregación mendeliana.

De las colonias provenientes de las ascosporas obtenidas de la cruce $\Delta NCU00239 a \times 74-OR23-1A$ (WT mat A) se tomaron 20 resistentes a higromicina y se les realizó la prueba fenotípica de desarrollo de micelio aéreo. Los resultados muestran que todas las segregantes muestran un desarrollo de micelio aéreo disminuido respecto a la cepa silvestre. Las segregantes 4, 12, 14, 19 y 20 parecen formar más micelio aéreo que el resto de las segregantes, pero una cantidad notablemente menor que el de la cepa silvestre (**Fig. 24**).

	(WT mat A) x (WT mat a)	$\Delta NCU00239-3 \times (WT mat A)$
CA	68	60
CA + Hig	0	28

Tabla 5. La segregación del marcador de resistencia a higromicina en la progenie de las cruces indicadas. Se activaron por calor las ascosporas resultantes de las cruces 74-OR23-1A (WT mat A) x 74-OR8-1a (WT mat a) y $\Delta NCU00239 a \times 74-OR23-1A$ (WT mat A). Luego se plaquearon en medio para aislar colonias (CA) y en el mismo medio con higromicina añadida (150 μ g/mL). Se incubaron a 30°C por 24 horas. Luego se contaron el total de colonias. De las 28 colonias provenientes de la cruce $\Delta NCU00239 \times 74-OR23-1A$ (WT mat A) que germinaron en higromicina se aislaron 20 y se utilizaron para pruebas fenotípicas adicionales.

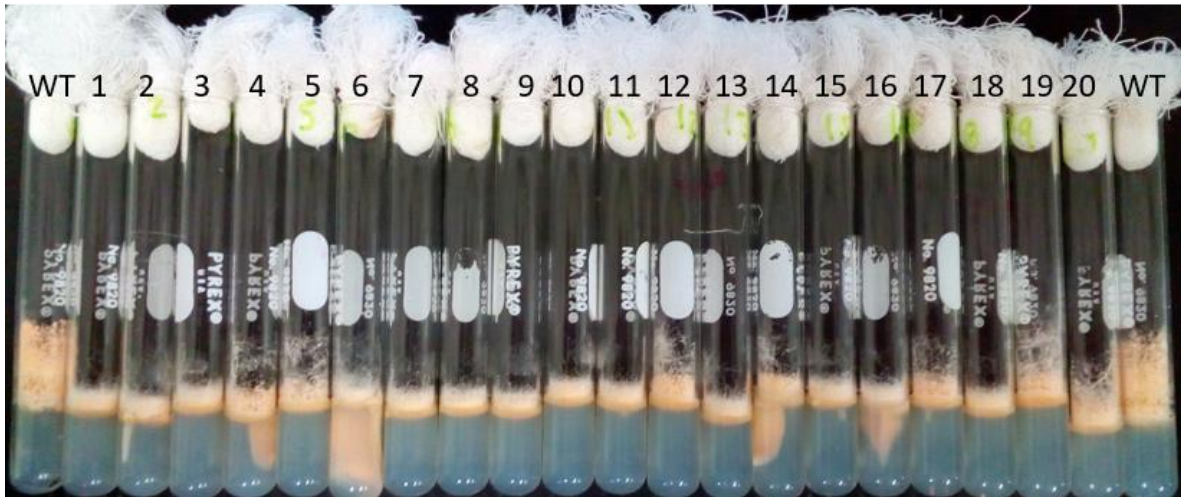


Figura 24: Fenotipo de desarrollo de micelio aéreo de las segregantes de la cruce Δ NCU00239 x 74-OR23-1A (WT mat A). Se inocularon en tubos de ensayo con medio mínimo de Vogel conidios de las segregantes de la cruce Δ NCU00239 x 74-OR23-1a resistentes a higromicina. En los extremos izquierdo y derecho se observan tubos inoculados con la cepa 74-OR23-1A (WT mat A), en los que se observa un mayor desarrollo de micelio aéreo que en la progenie analizada.

Cepa	Conidios	%	Cepa	Conidios	%	Cepa	Conidios	%
WT	110000000	100.00	S7	700000	0.64	S14	6500000	5.91
S1	1650000	1.50	S8	2400000	2.18	S15	1450000	1.32
S2	2650000	2.41	S9	1300000	1.18	S16	3700000	3.36
S3	1300000	1.18	S10	1500000	1.36	S17	1200000	1.09
S4	9300000	8.45	S11	1200000	1.09	S18	1150000	1.05
S5	3000000	2.73	S12	7000000	6.36	S19	9000000	8.18
S6	4500000	4.09	S13	2300000	2.09	S20	9250000	8.41

Tabla 6 Conteo de conidios producidas por las segregantes. A cada tubo en el que se realizó la prueba de desarrollo de micelio aéreo se agregó 1mL de agua. Posteriormente se agitaron con el vortex a intensidad elevada por 10 segundos. Se recuperaron 200 μ L de la suspensión de conidios y se realizó el conteo. En la gráfica se muestra una columna con el porcentaje de esporas producidas respecto a una silvestre (%).

Posteriormente se realizó el conteo de las esporas producidas por cada cepa. Los resultados muestran que en estas condiciones la cepa silvestre produjo 1.1×10^8 conidios por tubo. La mayor parte de las segregantes produce menos de 5×10^6 conidios por tubo, mientras que las segregantes 4, 12, 14, 19 y 20 producen una

cantidad mayor que 5×10^6 esporas por tubo pero menos de 1×10^7 , cantidad notablemente menor que la observada en la cepa silvestre (Tabla 6).

También se determinó el fenotipo de crecimiento radial en las cosegregantes. Como se observa en la Fig. 25, la mayoría de las cosegregantes tienen un crecimiento radial mínimo a las 12 horas, mientras que las cepas 4, 15 y 20 muestran crecimiento radial notorio pero menor al de una cepa silvestre.

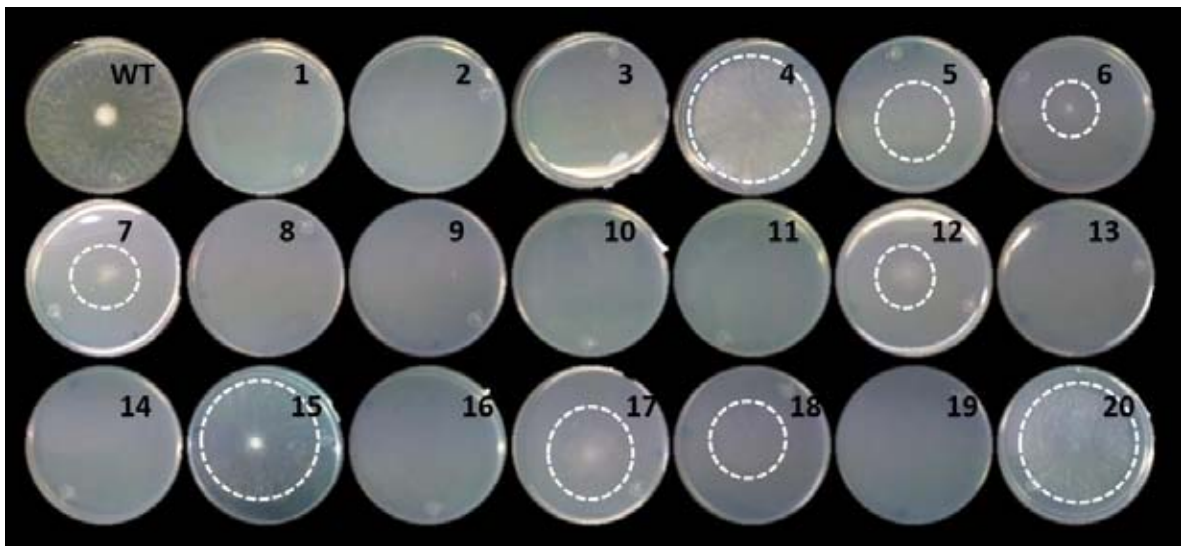


Figura 25: Crecimiento radial de las cosegregantes. Se inoculó una suspensión de esporas al centro de la caja con medio mínimo de Vogel y se pusieron a incubar a 30°C por 12 horas. La mayoría de las cosegregantes muestran un crecimiento mínimo únicamente al centro de la caja. Tres cosegregantes (4, 15 y 20) muestran un crecimiento considerablemente mayor al de las demás pero menor al de una silvestre (WT), cuyo micelio ocupa la totalidad del área de la caja.

Estos resultados muestran que la resistencia a higromicina y el fenotipo de menor micelio aéreo y crecimiento radial disminuido cosegregan, y que éste fenotipo de las segregantes es igual al de las 3 mutantes $\Delta NCU00239$, originales, indicando que los fenotipos reportados son resultado de la mutación del gen *NCU00239*.

Discusión

1. Diferencias fenotípicas entre las mutantes $\Delta NCU00239$ de *N. crassa*, las mutantes $\Delta cpsA$ de *Aspergillus nidulans* y otras mutantes $\Delta cps-1$ de hongos fitopatógenos.

Las observaciones hasta el momento muestran que tanto el gen *NCU00239* de *N. crassa*, como su homólogo *cpsA* en *A. nidulans* son importantes para el desarrollo y la diferenciación celular. En *A. nidulans* las mutantes $\Delta cpsA$ no muestran una disminución en la velocidad de crecimiento radial de su micelio, mientras que en *N. crassa* las mutantes $\Delta NCU00239$ muestran una disminución de cerca del 50 %, tanto en crecimiento lineal como en crecimiento radial. En *A. nidulans* se observa una pigmentación café en el centro de las colonias, misma que no se observa en las cepas silvestres, y que podría estar relacionada con el metabolismo secundario del hongo y con la formación de esporas (Calvo, A. M., et al., 2002). En *N. crassa* no se observa alguna pigmentación atípica en la colonia. Sin embargo, la drástica disminución en la conidiación y la incapacidad de desarrollar estructuras sexuales (protoperitecios en *N. crassa* y cleistotecios en *A. nidulans*) son fenotipos compartidos por las mutantes de ambos hongos.

Fenotipo	<i>N. crassa</i>	<i>A. nidulans</i>
Conidiación	Disminuída drásticamente	Disminuída drásticamente
Pigmentación de las colonias	No se observan defectos en la pigmentación de las colonias	Pigmentación marrón en las colonias
Velocidad de crecimiento radial	Se observa una disminución importante	No se observa disminución
Ciclo sexual	No puede formar estructuras sexuales (protoperitecios)	No puede formar estructuras sexuales (cleistotecios)

Tabla 7: comparación fenotípica entre las mutantes $\Delta NCU00239$ de *N. crassa* y las mutantes $\Delta cpsA$ de *A. nidulans*

En los hongos fitopatógenos *C. heterostrophus*, *C. victoriae* y *G. zae* se reporta como único fenotipo la disminución en la capacidad virulenta del hongo (Lu, S.-W, et al., 2003). Estas importantes diferencias fenotípicas en los distintos hongos sugieren una divergencia

funcional de las proteínas CPS1 o de las vías de señalización en las que éstas actúan. Es posible que la función de CPS1 en los hongos fitopatógenos esté relacionada con la patogenicidad, mientras que en los hongos saprófitos esté relacionada con la diferenciación celular.

2. Posibles mecanismos de acción de la proteína CPS1

a) CPS1 como parte de una vía de NRPS

Las proteínas CPS1 pertenecen a la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato (Lu, S.-W, et al., 2003) y otras proteínas de esta familia regulan la diferenciación celular en *A. nidulans*. Las enzimas AfeA y TmpB son un ejemplo de esto y participan en la autocomunicación entre las hifas y en el ciclo sexual en *A. nidulans*. AfeA es parecida a las enzimas similares a las cumarato ligasas (coumarate ligase-like) y se localiza en cuerpos lipídicos y en la membrana plasmática. TmpB es similar a los dominios de adenilación de las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS). La mutación de los genes *afeA* y *tmpB* genera un fenotipo en el que la esporulación está severamente disminuida (Soid-Raggi, G., et al., 2016). Este fenotipo es similar pero no igual al observado en las mutantes $\Delta cpsA$ en *A. nidulans*. Tanto AfeA como CpsA podrían participar en la generación de metabolitos derivados de lípidos.

Los dominios de adenilación de las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) también pertenecen a la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato (Schmelz, S., y Naismith, J. H., 2009). En *C. heterostrophus* se encontró que el gen *nps6* codifica para una NRPS que se encuentra conservada en los hongos y que se requiere para la virulencia contra el maíz y para la resistencia al estrés oxidante. El fenotipo de mutantes dobles *cps1 nps6* es el mismo que el de la mutante sencilla *nps6*, lo cual sugiere que NPS6 y CPS1 actúan en una misma vía, relacionando así la función de CPS1 con la de una NRPS (Lee, B. N., et al., 2005). No se puede excluir la posibilidad de que uno de los dominios FAAL-L de CpsA pudiesen estar involucrados en la activación de un aminoácido y que éste fuese transferido a una NRPS,

mediante un mecanismo semejante al de las enzimas FAAL, que utilizan ácidos grasos como sustratos.

b) CPS1 en la activación de ácidos grasos a acil-adenilatos que luego son sustrato de policétido sintetetasas

Como indiqué anteriormente, la proteína CPS1 contiene dos dominios que muestran características de las enzimas FAAL que activan ácidos grasos a acil-adenilatos. En *M. tuberculosis* los acil-adenilatos se transfieren a las policétido sintetetasas (PKS) para continuar con la síntesis de lípidos complejos (Arora, P., et al., 2009). Suponiendo un mecanismo semejante, el sustrato de la proteína CPS1 podría ser un ácido graso que luego sea activado en un acil adenilato que después sea transferido a la región acarreadora de acilos de una policétido sintetasa. Esta posibilidad conlleva interrogantes sobre si cada dominio FAAL utiliza distintos ácidos grasos como sustratos y si los acil-adenilatos generados se transfieran a una o diferentes PKS y si lo hacen simultáneamente o no.

En *A. nidulans* se han registrado 32 marcos de lectura que predeciblemente codifican para PKS (Klejnstrup, M. L., 2012) y se ha inferido la participación de algunas de éstas en la producción de señales químicas que regulan la conidiación (Márquez-Fernández, O., et al., 2007). En *Aspergillus fumigatus* se ha relacionado la síntesis de policétidos con el desarrollo del hongo. La acumulación de propionil-CoA en este organismo afecta la síntesis de policétidos, el crecimiento y la morfología de los conidios (Maerker, C., et al., 2005). El genoma de *N. crassa* predice la existencia de 7 PKS (Galagan, J. E., et al., 2003) y se ha encontrado al menos otra proteína más de este grupo (Funa, N., 2007). En *N. crassa* y en otros hongos ascomicetos existen PKS reductoras involucradas en la producción de la melanina de los cuerpos fructíferos (Nowrousian, M., 2009). Se ha propuesto que otro gen que codifica para una PKS y está corregulado con genes regulados por la cinasa MAK-2 durante la formación de los cuerpos fructíferos, participa en la síntesis de un metabolito que regula la comunicación intrahifal (Li, D., et al., 2005).

En *Sordaria macrospora* se ha observado que el gen *pks4* se necesita para el desarrollo sexual y regula la formación de los cuerpos fructíferos (Schindler, D., y Nowrousian, M.,

2014). En relación a la patogenicidad, en *C. heterostrophus* se ha observado que una policétido sintasa se requiere para la síntesis de la toxina T, que participa en la virulencia (Yang, G., 1996).

c) **CPS1 en procesos de señalización regulados por lípidos y en la formación de las balsas lipídicas**

Se ha propuesto que las proteínas Dip2a, que son los ortólogos de las proteínas Cps1 en animales, funcionan como receptores de la proteína parecida a folistatina (folistatin like protein) en dichos organismos. Además se ha propuesto que los efectos de la FSTL1 ocurren al interior celular por medio de la activación de la vía Akt/PKB (Ouchi, N., et al., 2010).

Tanto la cinasa PKC como la cinasa Akt se regulan por segundos mensajeros lipídicos y por fosforilación (Newton, A. C., 2009). En la transducción de señales por lípidos se observan una relación e interconversión entre mediadores lipídicos, así como una relación entre las vías en las que participan los lípidos (Eyster, K. M., 2007). Debido a esto, cabe contemplar la posibilidad de que el producto de la enzima Cps1 (posiblemente un lípido activado), o el producto lipídico de la vía en la que ésta participe, podría interactuar y tener algún efecto sobre los lípidos mediadores o con los ligandos lipídicos que participan en una vía de señalización por cinasas en los hongos, por ejemplo, participando en la formación de sitios de acoplamiento de las señales o en la estabilización de las balsas lipídicas.

Se ha observado que la producción de un RNA antisentido contra PkcA, la otra cinasa regulada por lípidos, en *A. nidulans* provoca disminución en el crecimiento y en la conidiación, y defectos en la biosíntesis de la penicilina. La eliminación de PKC en *S. cerevisiae* hace que la proliferación de este organismo ocurra únicamente en presencia de estabilizadores osmóticos (Herrmann, M., et al., 2006). La cinasa Ypk1p es la cinasa más parecida a Akt/PKB en la levadura. Su fosforilación es regulada por la concentración intracelular de esfingolípidos, y participa en la proliferación celular y en la integridad de la pared (Roelants, F. M., et al., 2011). Esto muestra la relación entre procesos de diferenciación celular y señalización mediada por lípidos en hongos.

Ya que los dominios FAAL-L de la proteína Cps1 posiblemente activan ácidos grasos, cabe considerar la hipótesis de que esta proteína participe en la formación o estabilización de las balsas lipídicas, dado que éstas participan en la activación de múltiples cascadas de señalización (Simons, K. y Toomre, D., 2000) y dada la diversidad de procesos de diferenciación en los que participa esta proteína (crecimiento, ciclo sexual, desarrollo de esporas). Considerando esta hipótesis, es posible que la proteína Cps1, más que ser el receptor de la proteína FSTL1 en animales, participe en la formación de plataformas en las que se concentre el receptor de la proteína FSTL1 y en la que se cree un microambiente en el que la fosforilación pueda ser modificada de forma local, resultando en la activación río debajo de la señalización celular, proceso que es común en las balsas lipídicas (Simons, K. y Toomre, D., 2000). Esto explicaría que la acción de un RNA de interferencia contra el homólogo de Cps1 en animales provoque una disminución en la unión de FSTL1 a células endoteliales (ya que no se podrían ensamblar las plataformas en las que esta proteína señala), así como la disminución de la respuesta de señalización de Akt que ocurre como resultado de la acción del mismo RNA de interferencia (ya que no se podrían formar los microambientes de señalización) (Ouchi, N., et al., 2010).

3. CpsA podría regular a la proteína NoxA.

La hipótesis de que CpsA participa en la formación o en la estabilización las balsas lipídicas también podría relacionar a las proteínas Cps1 y las enzimas Nox. Estas son enzimas transmembranales que se encuentran altamente conservadas en los eucariontes y que producen especies reactivas de oxígeno por medio de la oxidación de NADPH, de forma regulada (Dirschnabel, D., et al., 2014). El efecto de la eliminación de la eliminación de los genes que codifican para estas enzimas resulta en defectos en el crecimiento de las hifas, en la formación de conidios, así como en la reproducción sexual en *Neurospora crassa* (Cano-Domínguez, et al., 2008).

En relación a la regulación de las enzimas Nox por las balsas lipídicas, se ha reportado que estas últimas se agrupan para reclutar y ensamblar las subunidades de la Nox y proteínas relacionadas, formando plataformas de señalización redox. Algunas de las proteínas relacionadas que se ensamblan en estas plataformas son la SOD (SuperÓxido Dismutasa) y la tioreductasa. Estas plataformas, que producen moléculas redox en respuesta a diferentes estímulos, regulan la actividad y la función celular, y se conocen como LR-redox signaling platforms (plataformas de señalización redox de balsas lipídicas) (Yi, F., et al., 2009).

En este sentido, es interesante de que tanto en *N. crassa* como en *A. nidulans* las mutantes carentes del gen *CpsA* y de los genes *Nox* compartan ciertos fenotipos. En *N. crassa*, eliminar cualquiera de los dos genes produce disminución en el crecimiento radial y en la producción de esporas asexuales, e incapacidad de formar protoperitecios (Cano-Domínguez, et al., 2008). En *A. nidulans* eliminar cualquiera de los dos genes produce incapacidad para desarrollar estructuras sexuales (Lara-Ortíz, T., et al., 2003).

4. El dominio de interacción con DMAP podría ser un dominio de interacción con diferentes proteínas.

La proteína DMAP es una proteína asociada a la DNMT1 y se une a ésta por medio de su dominio de interacción a DMAP (Schultz, J., et al., 1998), mismo que se detecta en la proteína NCU00239 y en sus homólogos. Esto hace suponer que la proteína NCU00239 tiene actividad nuclear.

El dominio de interacción con DMAP también está presente en las enzimas n-acetilglucosamina-1-fosfotransferasas, que participan en la formación de la señal de reconocimiento de la manosa-6-fosfato en las hidrolasas ácidas. Este dominio en dichas enzimas juega un papel de reconocimiento de sus sustratos, que son las hidrolasas ácidas (Qian, Y., et al., 2013). Esto muestra que la anotación de este dominio como dominio de interacción con DMAP proporciona una visión reducida sobre su posible función. Resulta poco probable que las enzimas n-acetilglucosamina-1-fosfotransferasas tengan actividad nuclear o que interactúen con la DNA metil transferasa, y considerando este dato es

posible que el dominio de interacción con DMAP se trate más bien de un dominio de interacción proteína-proteína. Un resultado preliminar indica que los dominios DMAP de las proteínas CpsA son más parecidos a los dominios DMAP presentes en las enzimas n-acetilglucosamina-1-fosfotransferasas, que a los de las DNMT1 (**Anexo 4**).

Considerando la hipótesis de que CpsA participa en la formación de balsas lipídicas (u otros dominios membranales), el dominio DMAP podría reclutar alguna enzima que participe en este proceso a la membrana plasmática, como la esfingomielinasa ácida. La formación de balsas lipídicas está asociada con la producción de ceramidas como resultado de la hidrólisis de la esfingomielina realizada por la enzima mencionada (Jin, S., et al., 2008), misma que tiene la característica única de hidrolizar esfingomielina tanto en el compartimento endolisosomal como en la capa externa de la membrana plasmática (Jenkins, R. W., et al., 2009), lo que ocurre tras la traslocación de la esfingomielinasa de los lisosomas a la capa externa de la membrana plasmática (Milhas, D., et al., 2011)

Esta enzima además es responsable de la formación de las plataformas de señalización redox mencionadas en el punto anterior. La esfingomielinasa promueve la formación de dichas plataformas al formar microdominios membranales enriquecidos en ceramidas, que espontáneamente se fusionan para formar plataformas en las que las Nox son ensambladas para producir ROS (Zhang, A., et al., 2007).

Conclusiones

1. La proteína NCU00239 de *N. crassa* es homóloga de la proteína CpsA de *A. nidulans* y presenta tres dominios conservados tanto en hongos como en animales: un posible dominio de interacción con DMAP y dos dominios de unión a AMP. Proponemos que estos dominios pertenecen a la subfamilia de proteínas FAAL, involucradas en la activación de ácidos grasos y en la síntesis de policétidos. También proponemos que el posible dominio de interacción con DMAP podría tratarse de un dominio de interacción proteína-proteína y que por lo tanto no tendría funciones nucleares.
2. El gen *NCU00239* de *N. crassa* se requiere para el crecimiento, la conidiación, la formación de micelio aéreo y la formación de estructuras sexuales.
3. La conservación alta de esta proteína en animales y hongos, así como los fenotipos observados al momento, sugiere que participa en la regulación de la diferenciación y el desarrollo en múltiples organismos por medio de un mecanismo desconocido a la fecha.

Perspectivas

1. Poner a prueba las hipótesis de que esta proteína participe en una vía de señalización por sintetasas de péptidos no ribosomales, así como en las vías de transducción mediadas por lípidos-
2. Etiquetar la proteína para conocer su localización durante el desarrollo, en diferentes estructuras y ante condiciones de estrés.
3. Determinar si los tres dominios son indispensables para el funcionamiento de la proteína, obteniendo mutantes con versiones trucas de la proteína.
4. Determinar si los genes homólogos en *A. nidulans* y *N. crassa* son funcionalmente intercambiables.
5. Determinar la importancia de esta proteína en el ensamblado de microdominios membranales.

Referencias

- Angoa, A., Aguirre, J. y Ramos-Balderas, J. El gen *cpsA* en la diferenciación celular de *Aspergillus nidulans*. Texto no publicado.
- Arora, P., Goyal, A., Natarajan, V. T., Rajakumara, E., Verma, P., Gupta, R., ... Gokhale, R. S. (2009). Mechanistic and functional insights into fatty acid activation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Chemical Biology*, 5(3), 166–173. <http://doi.org/10.1038/nchembio.143>
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), 1–7. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Apweiler, R., Alpi, E., ... Zhang, J. (2015). UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212. <http://doi.org/10.1093/nar/gku989>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Nancy, P., Calvo, A. M., Wilson, R. A., ... Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3), 447–459. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447>
- Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, 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*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1352–1361. <http://doi.org/10.1128/EC.00137-08>
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., ... Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10352–10357. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601456103>
- Conti, E., Franks, N. P., & Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 4(3), 287–298. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00033-0](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00033-0)
- Davis, R.H. (2000) *Neurospora*. Contributions of a model organism. Oxford University Press, Inc. New York.
- Dirschnabel, D., Nowrousian, M., Cano-Dominguez, N., Aguirre, J., Teichert, I. and Kuck, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore, 196(March), 729–744. <http://doi.org/10.1534/genetics.113.159368>
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., ... Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics* (Vol. Chapter 5). <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15.Comparative>
- Eyster, K. M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advances in Physiology Education*, 31(1), 5–16. <http://doi.org/10.1152/advan.00088.2006>

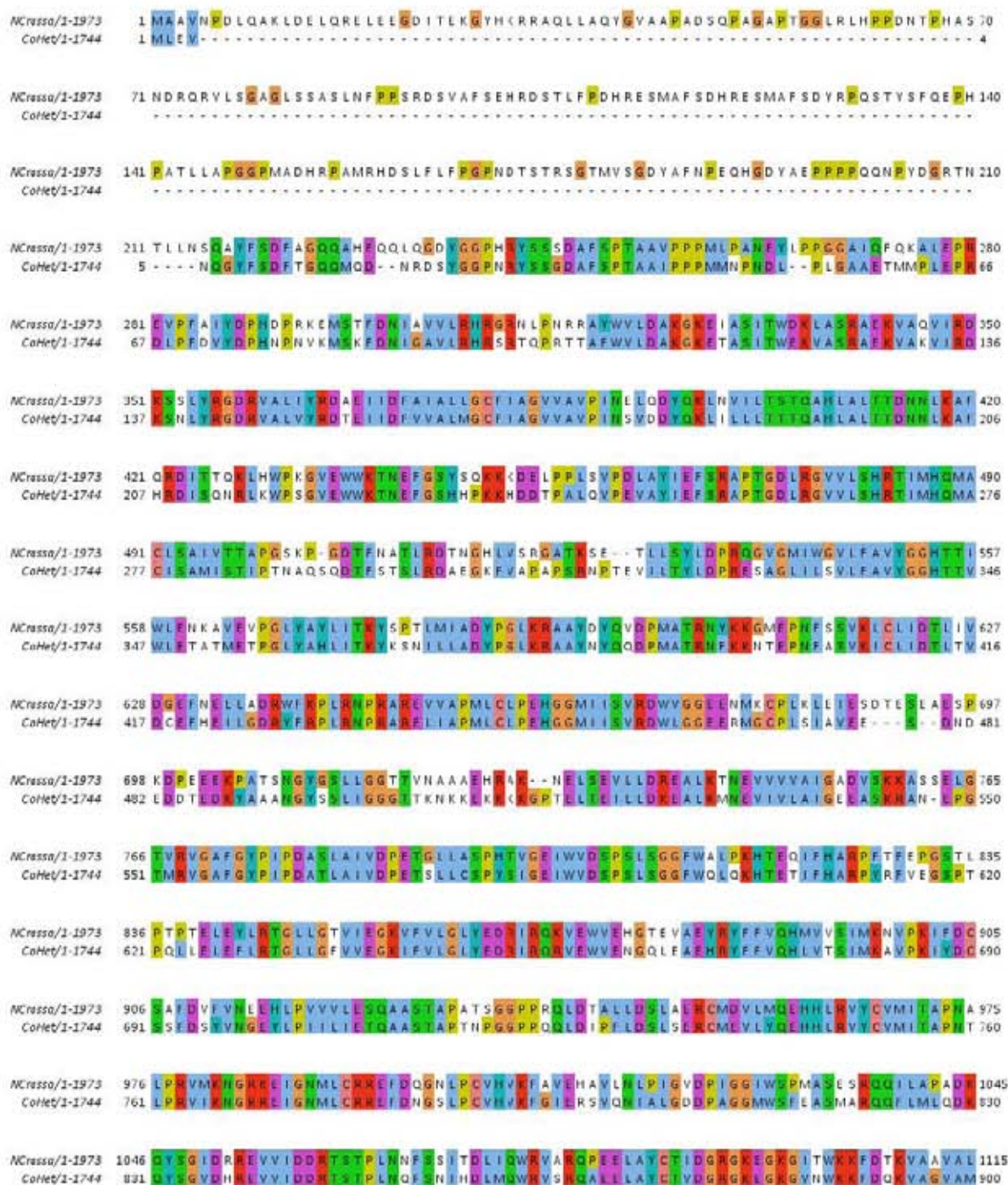
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., ... Punta, M. (2014). Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 222–230. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- Fleissner, A., A. R. Simonin y N.L. Glass. (2008) Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* 475: 21-38
- Funa, N., Awakawa, T., & Horinouchi, S. (2007). Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14476–14481. <http://doi.org/10.1074/jbc.M701239200>
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., ... Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–868. <http://doi.org/10.1038/nature01554>
- Goyal, A., Verma, P., Anandhakrishnan, M., Gokhale, R. S., & Sankaranarayanan, R. (2012). Molecular basis of the functional divergence of fatty Acyl-AMP ligase biosynthetic enzymes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, 416(2), 221–238. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.031>
- Herrmann, M., Spröte, P., & Brakhage, A. A. (2006). Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2957–2970. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2957-2970.2006>
- Jenkins, R. W., Canals, D., & Hannun, Y. A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular Signalling*, 21(6), 836–846. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.026>
- Jin, S., Yi, F., Zhang, F., Poklis, J. L., & Li, P. L. (2008). Lysosomal targeting and trafficking of acid sphingomyelinase to lipid raft platforms in coronary endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 2056–2062. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.172478>
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Armean, I., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., ... Staines, D. M. (2016). Ensembl Genomes 2016: More genomes, more complexity. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D574–D580. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1209>
- Klejnstrup, M. L., Frandsen, R. J. N., Holm, D. K., Nielsen, M. T., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., & Nielsen, J. B. (2012). Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites* (Vol. 2). <http://doi.org/10.3390/metabo2010100>
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1241–1255. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x>
- Lee, B. N., Kroken, S., Chou, D. Y. T., Robbertse, B., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2005). Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryotic Cell*, 4(3), 545–555. <http://doi.org/10.1128/EC.4.3.545-555.2005>
- Li, D., Bobrowicz, P., Wilkinson, H. H., & Ebbole, D. J. (2005). A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 170(3), 1091–1104. <http://doi.org/10.1534/genetics.104.036772>

- Lu, S.-W., Kroken, S., Lee, B.-N., Robbertse, B., Churchill, A. C. L., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2003). A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5980–5985. <http://doi.org/10.1073/pnas.0931375100>
- Maerker, C., Ronde, M., Brakhage, A. A., & Brock, M. (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*: Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS Journal*, 272(14), 3615–3630. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04784.x>
- Matsu-ura, T., Baek, M., Kwon, J., & Hong, C. (2015). Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2(1), 4. <http://doi.org/10.1186/s40694-015-0015-1>
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., ... Bryant, S. H. (2011). CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1), 225–229. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq1189>
- Márquez-Fernández, O., Trigos, Ángel, Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-González, G., Deising, H. B., & Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 710–720. <http://doi.org/10.1128/EC.00362-06>
- Milhas, D., Clarke, C. J., & Hannun, Y. a. (2011). Sphingomyelin Metabolism at the Plasma Membrane: Implications for Bioactive Sphingolipids. *NIH Public Access*, 584(9), 1887–1894. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.058>
- Newton, A. C. (2009). Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S266-71. <http://doi.org/R800064-JLR200> [pii]\r10.1194/jlr.R800064-JLR200
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., & Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12248–12253. <http://doi.org/10.1073/pnas.0402780101>
- Notredame, C., Higgins, D., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Nowrousian, M. (2009). A novel polyketide biosynthesis gene cluster is involved in fruiting body morphogenesis in the filamentous fungi *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 55(2), 185–198. <http://doi.org/10.1007/s00294-009-0236-z>
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733–D745. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Ouchi, N., Asami, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., & Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7127–7134. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.069468>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <http://doi.org/10.1002/jcc.20084>

- Qian, Y., Flanagan-Steet, H., van Meel, E., Steet, R., & Kornfeld, S. a. (2013). The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), 10246–51. <http://doi.org/10.1073/pnas.1308453110>
- Raju, N. B. (2009). *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. *Journal of Biosciences*, 34(1), 139–159. <http://doi.org/10.1007/s12038-009-0015-5>
- Roche, C. M., Loros, J. J., McCluskey, K., & Louise Glass, N. (2014). *Neurospora crassa*: Looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany*, 101(12), 2022–2035. <http://doi.org/10.3732/ajb.1400377>
- Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S., & Thorner, J. (2011). Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19222–19227. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116948108>
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., ... Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–474. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.008>
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., & Baylin, S. B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*, 25(3), 269–277. <http://doi.org/10.1038/77023>
- Schindler, D., & Nowrousian, M. (2014). The polyketide synthase gene pks4 is essential for sexual development and regulates fruiting body morphology in *Sordaria macrospora*. *Fungal Genetics and Biology*, 68, 48–59. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.008>
- Schmelz, S., & Naismith, J. H. (2009). Adenylate-forming enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6), 666–671. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.09.004>
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 5857–64. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5857>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39. <http://doi.org/10.1038/35036052>
- Soid-Raggi, G., Sánchez, O., Ramos-Balderas, J. L., & Aguirre, J. (2016). The adenylate-forming enzymes AfeA and TmpB are involved in *Aspergillus nidulans* self-communication during asexual development. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00353>
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 244–248. <http://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Springer, M. L., & Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 3(4), 559–571. <http://doi.org/10.1101/gad.3.4.559>

- Timberlake, W. E. (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*. 78:497-510.
- Vogel, H. J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microb. Genet Bull.* 13:42-43
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weestergaard, M., Mitchell H.K. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am. J. Bot.* 34:573-577
- Xu, J., & Zhang, Y. (2010). How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*, 26(7), 889–895. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066>
- Yang, G., Rose, M. S., Turgeon, B. G., & Yoder, O. C. (1996). A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *The Plant Cell*, 8(November), 2139–2150. <http://doi.org/10.1105/tpc.8.11.2139>
- Yi, F., Jin, S y Li, P. (2009). Lipid Raft-Redox Signaling Platforms in Plasma Membrane. *Methods Mol Biol.* 580: 93-107.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>
- Zhang, A. Y., Yi, F., Jin, S., Xia, M., Chen, Q.-Z., Gulbins, E., & Li, P.-L. (2007). Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(7), 817–828. <http://doi.org/10.1089/ars.2007.1509>
- Zhang, L., Mabwi, H. A., Palange, N. J., Jia, R., Ma, J., Bah, F. B., ... Zheng, Y. (2015). Expression Patterns and Potential Biological Roles of Dip2a. *PLoS ONE*, 10(11), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0143284>

Anexo 1. Alineamiento pareado entre las secuencias de CPS1 de *C. heterostrophus* y de la proteína NCU00239 de *N. crassa*



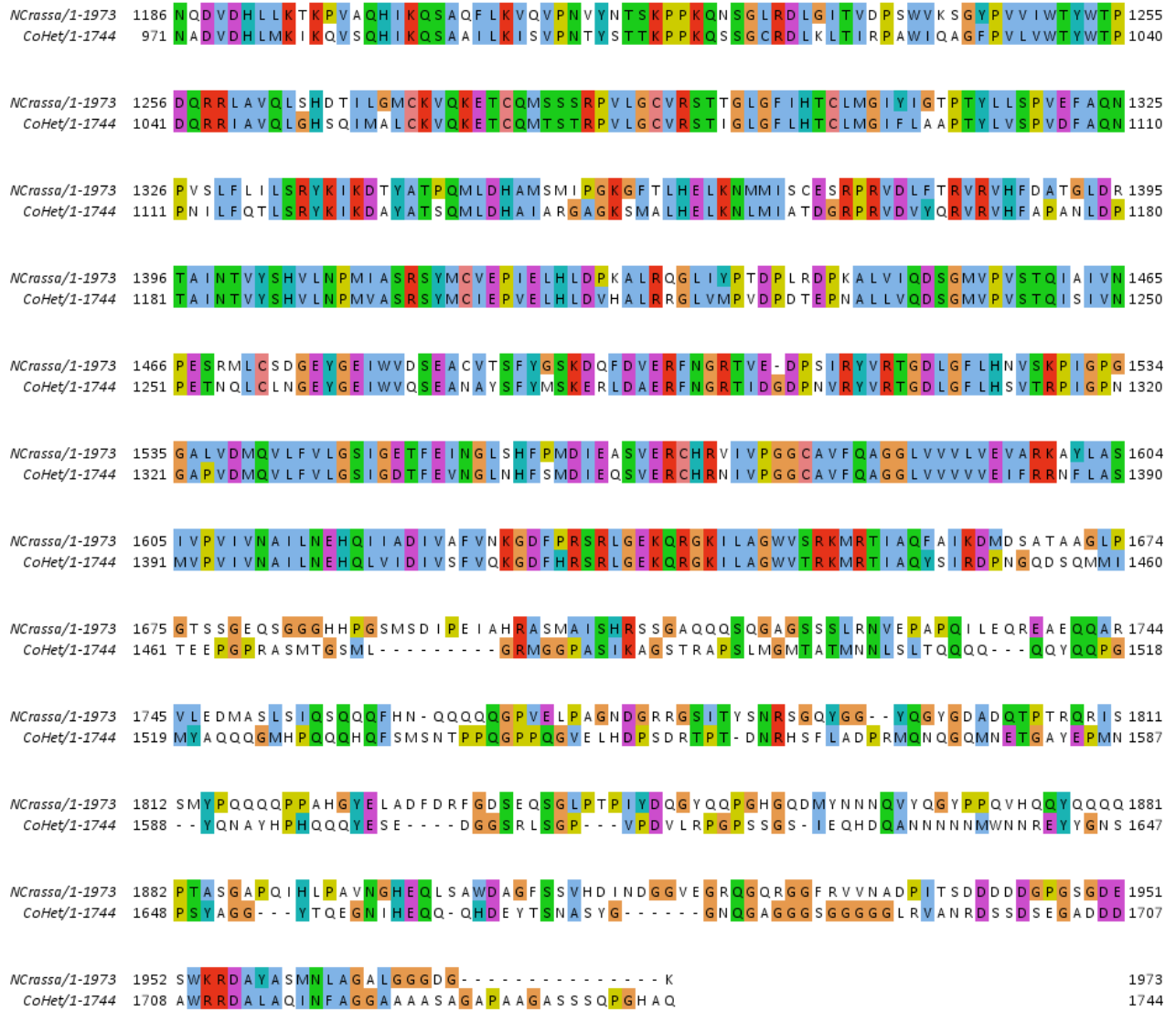


Figura 26: El alineamiento pareado entre ambas secuencias muestra múltiples sitios conservados. La primera región de aminoácidos que corresponde al dominio de interacción con DMAP en la secuencia de *N. crassa* no se encuentra presente en la proteína de *C. heterostrophus*.

Anexo 2. La mutante $\Delta NCU00239$ no muestra resistencia disminuida a estrés osmótico.

Considerando que la proteína NCU00239 podría participar en resistencia a condiciones de estrés, se realizaron pruebas para evaluar la capacidad de crecer en medio con fuentes de estrés osmótico.

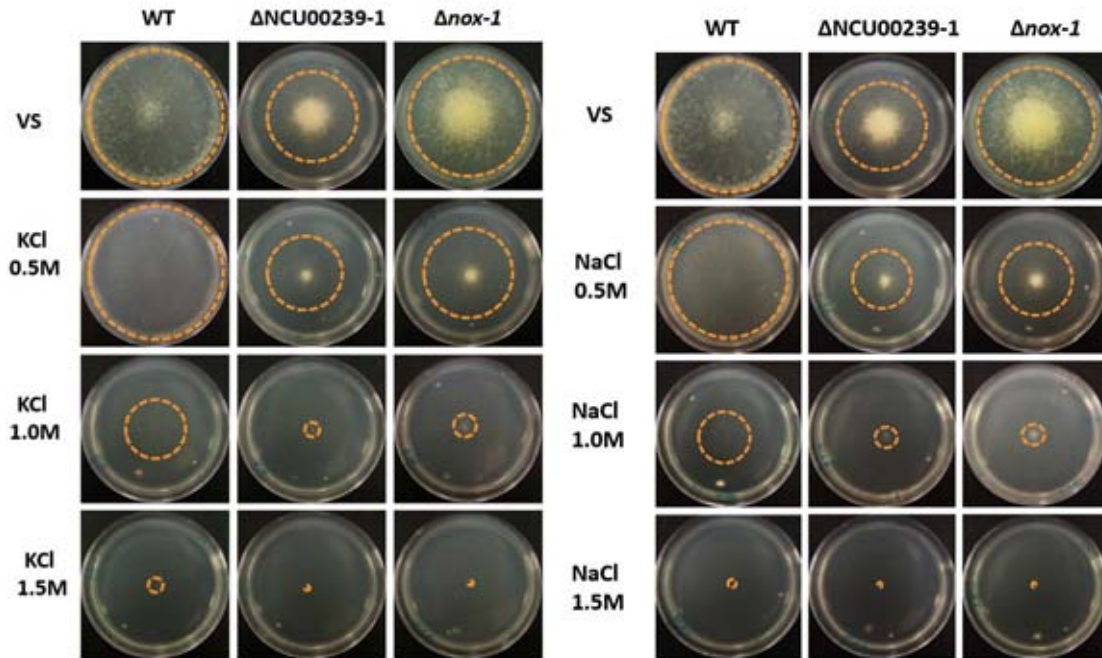


Figura 27: Las mutantes $\Delta NCU00239$ no muestran sensibilidad elevada a estrés osmótico. Se inocularon 1×10^4 conidios en medios con concentraciones de 0.5M, 1.0M y 1.5M de KCl y NaCl como fuentes de estrés osmótico, así como en medio VS como control. Se utilizó una celda $\Delta nox-1$ con fines comparativos. Después de ser inoculadas, se incubaron las cepas por 24 horas a 30°C.

Anexo 4: Cladograma de dominios anotados como “Dominios de interacción con DMAP”

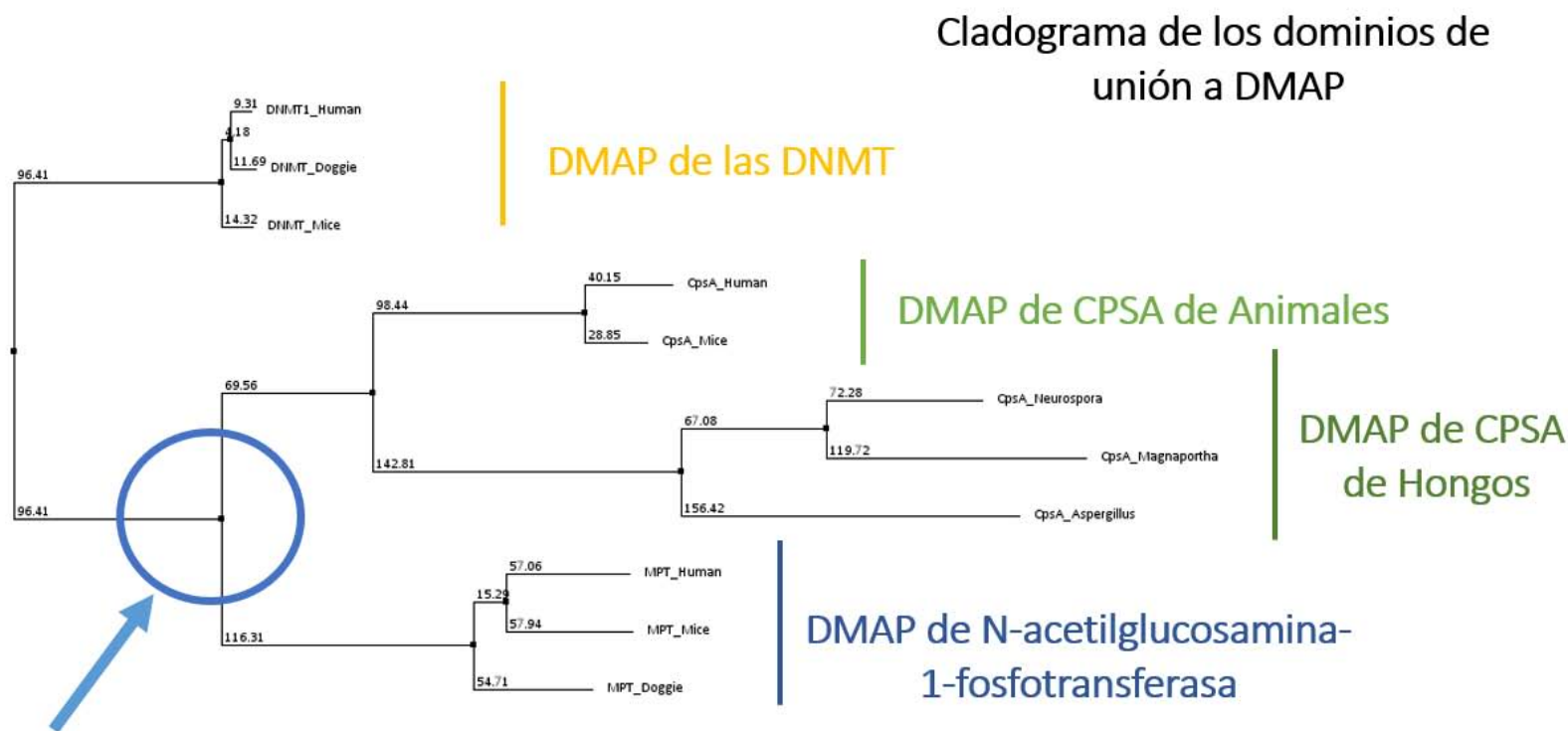


Figura 29: Los dominios de unión a DMAP de las proteínas N—acetil glucosamina-1-fosfotransferasas forman un grupo con los dominios de unión a DMAP de las proteínas CpsA, que está marcado con un círculo azul en el cladograma. Esto quiere decir que dichos dominios son más similares entre sí que con los dominios de unión a DMAP de la DNMT1. Esta región en la enzima N—acetil glucosamina-1-fosfotransferasa es una región de reconocimiento de enzimas lisosomales. Para realizar el cladograma se realizó un alineamiento con 73 aminoácidos de éste dominio en las diferentes proteínas, se realizó un alineamiento con T-Coffee (Notredame, C., et al., 2000), y se realizó el árbol en JalView con el algoritmo “Unir Vecinos con Pam250” (Waterhouse, A. M., et al., 2009).