



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Título de la Tesis:

Participación de los genes *arf* en el dimorfismo y/o desarrollo en *Mucor circinelloides*

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Guadalupe Maldonado Herrera

Asesor: Doctor en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza-Carmen

Co Asesor: Doctor en Ciencias en Biotecnología Jesús Campos García

Comité Evaluador: D. C. Irvin Eduardo Jácome Galarza

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

D.C. Homero Reyes de la Cruz

Morelia, Mich., Noviembre 2015

	Índice	II
	Índice de figuras	VI
	Índice de tablas	X
	Abreviaturas y símbolos	X
	Prefijos	XI
	Resumen	XII
1.	Introducción	14
1.1	Tráfico vesicular	14
1.1.1	Exocitosis	16
1.1.2	Endocitosis	18
1.1.3	Componentes del tráfico vesicular	20
1.1.4	Proteínas G en el tráfico vesicular	21
1.2	Generalidades de las proteínas ARF	22
1.2.1	Regulación de la actividad de las proteínas ARF	26
2.	Función de las proteínas ARF en eucariontes	27
2.1	Participación de las proteínas ARF en hongos	28
3.	<i>Mucor circinelloides</i>	31
3.1	Generalidades	31
3.1.1	Transiciones morfológicas en <i>M. circinelloides</i>	32
3.2	Genes involucrados en la diferenciación morfológica de <i>M. circinelloides</i>	34
4.	Justificación	38
4.1	Hipótesis	38
4.2	Objetivo General	38
4.2.1	Objetivos particulares	38
5.	Metodología experimental general	39
6.	Materiales y Métodos	40
6.1	Análisis <i>in silico</i>	40
6.1.1	Identificación de las proteínas Arf en <i>M. circinelloides</i>	40
6.1.2	Modelado tridimensional de las proteínas Arf de	40

	<i>M. circinelloides</i>	
6.2	Cultivo de <i>Mucor circinelloides</i>	41
6.2.1	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i>	41
6.2.2	Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	42
7.	Cepas y plásmidos	42
8.	Medios de cultivo	43
8.1	YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)	43
8.2	MMC (Medio Mínimo Casaaminoácidos)	43
8.3	LB Modificado	43
8.4	Análisis de imágenes	46
9.	Manipulación de ácidos nucleicos y transformaciones	46
9.1	Extracción y cuantificación de RNA	46
9.2	Tratamiento con DNAsa I de las muestras de RNA	47
9.3	Ensayo de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)	47
9.3.1	Determinación de las eficiencias de amplificación de RT-qPCR	49
9.3.2	Análisis matemático de los niveles de expresión relativa en los ensayos de RT-qPCR	49
9.4	Análisis estadístico de los resultados	50
9.5	Aislamiento de DNA genómico de <i>M. circinelloides</i>	50
9.6	Análisis por Electroforesis de ácidos nucleicos	51
10.	Deleción génica mediante recombinación homóloga	52
10.1	Transformación de <i>E. coli</i>	52
10.2	Transformación de <i>M. circinelloides</i>	52
10.3	Integración de DNA exógeno en el genoma de <i>M. circinelloides</i>	53
10.4	Aislamiento de DNA plasmidico	54
10.5	Tratamiento del DNA con enzimas	54
10.6	Amplificación de DNA por PCR	55

11.	Hibridación de DNA tipo Southern	56
11.1	Marcado de Fragmentos de DNA	57
12.	Resultados	58
12.1	Identificación de proteínas Arf en <i>M. circinelloides</i>	58
12.2	Alineamiento de probables Arf en <i>M. circinelloides</i>	58
12.3	Probables proteínas Arf en <i>M. circinelloides</i>	61
12.4	Modelado tridimensional de proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i>	61
13	Análisis de Expresión de los genes <i>arf</i> en <i>M. circinelloides</i>	66
13.1	Determinación de eficiencias de amplificación de las sondas <i>arf</i> de <i>M. circinelloides</i> utilizadas en el ensayo de RT-qPCR	67
13.2	Expresión de los genes que codifican a proteínas Arf en <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	67
13.3	Deleción de los genes que codifican a proteínas Arf3-5 en <i>M. circinelloides</i> mediante recombinación homologa	70
13.3.1	Construcción de plásmidos de recombinación en la generación de mutantes en los genes <i>arf</i> en <i>M. circinelloides</i>	71
13.3.2	Confirmación molecular de mutantes en los genes <i>arf</i> en <i>M. circinelloides</i>	77
14.	Pruebas del efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	84
14.1	Efecto de la mutación de los genes <i>arfe</i> en el crecimiento radial de <i>M. circinelloides</i>	84
14.2	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la esporulación de <i>M. circinelloides</i>	84
14.3	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> sobre la morfología de las esporas.	85
14.4	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la	87

	germinación en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	
14.5	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en el crecimiento en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	87
14.6	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la germinación en anaerobiosis en <i>M. circinelloides</i>	87
14.7	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en el crecimiento en anaerobiosis en <i>M. circinelloides</i>	88
14.7.1	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la transición micelio-levadura en <i>M. circinelloides</i>	90
14.7.2	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la transición levadura-micelio en <i>M. circinelloides</i>	91
14.7.3	Efecto de la mutación de los genes <i>arf</i> en la morfología en aerobiosis, anaerobiosis, en las transiciones micelio-levadura, levadura-micelio y esporangio en <i>M. circinelloides</i>	92
15.	Discusión	95
16.	Conclusión	101
17.	Perspectivas	102
18	Bibliografía	103

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema de las principales vías de comunicación mediante vesículas entre diferentes organelos	16
Figura 2	Formación de vesículas cubiertas de COPII y COPI.	25
Figura 3	Mecanismo de activación de proteínas ARF	27
Figura 4	Diferenciación de <i>M. circinelloides</i> en cultivo líquido	33
Figura 5	Alineamiento de las probables proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i>	60
Figura 6	Regiones exónicas, intrónicas en secuencias probables genes <i>arf</i> de <i>M. circinelloides</i>	62
Figura 7	Alineamiento de proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i>	64
Figura 8	Estructuras tridimensionales predichas para las proteínas Arf identificadas en <i>M. circinelloides</i>	65
Figura 9	Distribución de Cq para diferentes concentraciones de RNA total para <i>mctfc-1</i>	68
Figura 10	Análisis de expresión de los genes <i>arf</i> durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	69
Figura 11	Esquema de participación del gen <i>ArfB</i> en el crecimiento polarizado de <i>A. nidulans</i> y dendograma de los genes <i>arf</i> de <i>M. circinelloides</i>	70
Figura 12	Esquema de evento de doble recombinación homóloga para realizar la delección de los genes <i>arf</i>	71
Figura 13	Amplificación por PCR y clonación del gen <i>arf3</i> de <i>M. circinelloides</i>	73
Figura 14	Amplificación por PCR y clonación del gen <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i>	74
Figura 15	Amplificación por PCR y clonación del gen <i>arf5</i> de <i>M. circinelloides</i>	74
Figura 16	Esquema de construcción de amplificación de regiones	75

	5´y 3´UTR del plasmido pMAT1573 y obtención del gen <i>pyrG</i>	
Figura 17	Construcción del vector pMAT1576 que porta el fragmento de recombinación del gen <i>arf3</i>	76
Figura 18	Construcción del vector pMAT1577 que porta el fragmento de recombinación del gen <i>arf4</i>	76
Figura 19	Construcción del vector pMAT1578 que porta el fragmento de recombinación del gen <i>arf5</i>	77
Figura 20	Confirmación molecular mediante PCR de la mutante <i>arf3</i> de <i>M. circinelloides</i>	79
Figura 21	Confirmación molecular mediante Southern Blot de la mutante <i>arf3</i> de <i>M. circinelloides</i>	80
Figura 22	Confirmación molecular mediante RT-PCR de la mutante <i>arf3</i> <i>M. circinelloides</i> .	80
Figura 23	Confirmación molecular mediante PCR de la mutante <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i>	81
Figura 24	Confirmación molecular mediante Southern Blot de la mutante <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i>	82
Figura 25	Confirmación molecular mediante RT-PCR de la mutante <i>arf4</i> <i>M. circinelloides</i> .	82
Figura 26	Confirmación molecular mediante PCR de la mutante <i>arf5</i> de <i>M. circinelloides</i>	83
Figura 27	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre el crecimiento radial	85

Figura 28	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la esporulación	86
Figura 29	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la morfología de las esporas	86
Figura 30	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la germinación en aerobiosis	88
Figura 31	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre el crecimiento en aerobiosis	89
Figura 32	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la germinación en anaerobiosis	89
Figura 33	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre el crecimiento en anaerobiosis	90
Figura 34	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> en la transición Micelio-Levadura	91
Figura 35	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloide</i> : la transición Levadura- Micelio.	92
Figura 36	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la morfología en aerobiosis y anaerobiosis	93
Figura 37	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la morfología de transición micelio-levadura y levadura-micelio	93
Figura 38	Efecto de la mutación de los genes <i>arf3-5</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la morfología del esporangioforo en medio solido	94

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Cepas de <i>E. coli</i> y <i>M. circinelloides</i> utilizadas en este trabajo	44
Tabla 2	Plásmidos utilizados en este trabajo	45
Tabla 3	Oligonucleótidos y sondas empleados para los ensayos de RT-PCR en tiempo real	48
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR	55
Tabla 5	Probables proteínas Arf identificadas en <i>M. circinelloides</i>	59
Tabla 6	Probables proteínas Arf identificadas en hongos	63
Tabla 7	Identities de las probables proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i>	66
Tabla 8	Identidad entre las proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i> con proteínas Arf y Arl caracterizadas	66
Tabla 9	Porcentajes de eficiencia para los genes <i>arf</i> de <i>M. circinelloides</i> y el gen normalizador <i>tfc-1</i>	68

Abreviaturas y símbolos

A: Absorbencia

λ : Longitud de onda

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GAP: Proteína activadora de GTPasa (GTPase-activating protein).

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (G Protein Coupled Receptor)

kDa: kilo Daltons

PGH: Proteínas G Heterotriméricas

PI: Punto Isoeléctrico

PM: Peso molecular

PKA: Proteína cinasa A

RGS: Regulador de señalización de proteínas G (Regulator of G-protein signaling)

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

TAE: Tris-Acetato- EDTA

Prefijos

M: Mega (1×10^6)

μ : micro (1×10^{-6})

n: nano (1×10^{-9})

Resumen

Las proteínas Arf pertenecen a la superfamilia de proteínas G monoméricas, cuya función está asociada al tráfico vesicular. Se ha descrito la participación de los genes *Arf* en diversos organismos. Por ejemplo, *Sacharomyces cerevisiae* posee 3 genes *ARF*; *ARF1* participa en el funcionamiento del aparato de Golgi, mientras que la mutación del gen *ARF2* no generó un fenotipo detectable. Sin embargo, la doble mutante en los genes *ARF1/ARF2* es letal.

Un modelo para estudiar el proceso de diferenciación celular es el hongo *Mucor circinelloides*, quien presenta diversos estadios morfológicos dependiendo de las condiciones de cultivo. En este trabajo se identificaron seis marcos de lectura en el genoma de *M. circinelloides* que codifican a probables proteínas Arf y dado que estas proteínas participan en la formación de vesículas necesario para la emisión del tubo germinativo de las hifas, en donde en otros hongos filamentosos el cuerpo multivesicular denominado spitzenkörper tiene un papel fundamental. Por lo que, las proteínas Arf pueden participar en el crecimiento de *M. circinelloides*, quizás a través de la generación de las vesículas que son utilizadas por este cuerpo multivesicular.

Los objetivos de este trabajo fueron la identificación de los genes *arf*, la cuantificación del RNAm de cada uno de ellos en el proceso dimórfico de *M. circinelloides*. Esta información permitió la delección del gen *arf5*, ya que mostró una mayor expresión respecto al resto de los genes *arf*. La delección del gen *arf5* resultó ser esencial en el crecimiento, sin embargo la caracterización fisiológica de la cepa heterocariote reveló un menor esporulación, además de alteraciones en el crecimiento micelial, respecto a la cepa parental.

Las proteínas Arf3 y Arf4 de *M. circinelloides* mostraron la mayor identidad con la proteína ArfB de *A. nidulans* (>70%), quien está involucrada en el crecimiento micelial. Las mutantes homocariotes, en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*, mostraron alteraciones en la velocidad de germinación y crecimiento en aerobiosis. En conclusión la pérdida de función de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* condujo principalmente a alteraciones en la esporulación y crecimiento micelial.

Palabras Clave: *Mucor circinelloides*, proteínas Arf, Tráfico vesicular, spitzenkörper, homocariote.

Abstract

The Arf proteins belong to the superfamily of monomeric G proteins, whose function is associated with the vesicular trafficking. It has described the participation of *Arf* genes in various organisms. For example, *Saccharomyces cerevisiae* has three genes *ARF*; ARF1 participates in Golgi apparatus operation, while mutation of the gene *ARF2* not generate a detectable phenotype. However, the double mutant *ARF1/ARF2* is lethal.

A model to study the process of cell differentiation is *Mucor circinelloides*, which exhibit various morphological stages depending on growth conditions. In this work, we have identified six reading frames in the genome of *M. circinelloides* encoding probable proteins that belong to Arf members, and since these proteins are involved in vesicle formation, this process is necessary for aerial spore germination, where in other filamentous fungi were identified the multivesicular body called Spitzenkörper plays a fundamental role. The Arf proteins may be involved in the growth of *M. circinelloides*, perhaps through the generation of vesicles that are used by the multivesicular body.

The aims of this study were to identify the genes *arf*, characterize the mRNA expression level of each of them in different stages of the dimorphic process. This information allowed the deletion of the gene *arf5* which showed increased expression relative to other *arf* genes. Deletion of the gene *arf5* suggest to be essential for the growth of *M. circinelloides*, however physiological characterization revealed lower sporulation on strain heterocarionte, along with alterations in the mycelial growth compared to the parental strain. Another approach was the deletion of *arf3-4* genes of *M. circinelloides* based on the protein comparison with the product of the gene *ArfB* of *A. nidulans* whose product was involment in mycelial growth. It was found that proteins Arf3 and Arf4 of *M. circinelloides* showed the highest identity with ArfB protein of *A. nidulans* (> 70%). Homocarions mutant in the genes *arf3 and arf4* of *M. circinelloides*, showed changes in the aerial spore germination and aerobic growth. In conclusion the loss of function of genes *arf3-5* of *M. circinelloides* led mainly to changes in the aerial growth processes and sporulation.

Keywords: *Mucor circinelloides*, Arf proteins, vesicular traffic, Spitzenkörper, homokaryon.

1. Introducción

1.1 Tráfico vesicular

Todas las células están rodeadas por una membrana que sirve como una barrera entre el interior de la célula y su exterior, la membrana plasmática (MP) es necesaria para comunicarse con el mundo que la rodea. Las células eucariotas contienen compartimientos intracelulares delimitados por membranas que interactúan entre sí y con el medio que la rodea. Muchas de las funciones en las células eucariontes están compartimentalizadas y muchos de estos compartimientos están delimitados por membranas formando diversos organelos. Cada organelo celular está especializado en una o varias funciones interrelacionadas con las funciones de los demás organelos. Por ejemplo, en términos muy generales, el retículo endoplasmico (RE) es un gran productor de moléculas como proteínas; mientras que el aparato de Golgi modifica tales moléculas, mediante la adición de carbohidratos y envía a estas proteínas a otros organelos; los lisosomas son centros de degradación de moléculas que están defectuosas o que necesitan ser degradadas para controlar un proceso biológico; las mitocondrias y los cloroplastos son centrales energéticas (*Alberts y col. 2008*).

La comunicación celular, la cual es indispensable y necesaria entre muchos de los compartimientos intracelulares está mediada en gran medida por distintos tipos de vesículas, las cuales transportan moléculas, ya sea en el interior o aquellas que vienen desde el exterior celular. A esta comunicación se le denomina como tráfico vesicular (*Tokarev y col. 2000*).

En general las vesículas se han especializado en funciones concretas, dichas funciones dependen en parte de las moléculas que contienen. La función de las vesículas es almacenar, transportar o digerir moléculas o residuos celulares. Son una herramienta fundamental de la célula para la organización del metabolismo. Muchas vesículas se originan principalmente desde en el RE, sin embargo también pueden provenir del aparato de Golgi, o se forman a partir de porciones

de la membrana plasmática. Las vesículas brotan continuamente de una membrana y se fusionan con otra, llevando componentes de la membrana y moléculas solubles conocidas como moléculas “carga”, este tráfico altamente organizado fluye a lo largo de membrana, lo que permite a la célula secretar o incluir moléculas hacia o desde el exterior, respectivamente. Para llevar a cabo su función, cada vesícula que brota de un compartimiento debe ser selectiva, es decir, debe incluir sólo las moléculas adecuadas y debe fusionarse con la membrana blanco apropiado. Por ejemplo, una vesícula carga que transporta moléculas desde el aparato de Golgi hacia la MP, debe excluir las proteínas que son residentes del aparato de Golgi y reclutar sólo las moléculas que van a la MP y debe fusionarse sólo con la MP y no con la membrana de otro organelo, lo cual requiere un proceso de regulación (*Alberts y col. 2008*).

Este proceso altamente regulado tiene implicaciones directas en las respuestas celulares tanto a estímulos externos e internos, como es el caso de la presencia de factores de crecimiento o variaciones en el medio extra e intracelular. Dichas respuestas son mediadas en gran parte por el tráfico vesicular, generando finalmente las alteraciones apropiadas en el metabolismo, crecimiento, movimiento e incluso en la muerte celular (*Eden y col. 2009*).

Hay dos grandes rutas de comunicación entre los organelos. La primera se inicia en el RE y envía vesículas al aparato de Golgi, el cual también envía vesículas a la membrana plasmática o lisosomas en un proceso denominado **exocitosis**. La otra gran ruta es la importadora o proceso denominado **endocitosis** y comienza en la membrana plasmática donde se forman vesículas, dichas vesículas pueden fusionarse con los lisosomas u otros organelos (**Figura 1**). Por lo tanto el tráfico vesicular implica tanto la internalización de moléculas mediada por vesículas como el transporte de estas desde el aparato de Golgi hacia otros compartimientos celulares, la MP e incluso la excreción fuera de las células (*Ponnambalam y Baldwin, 2003*).

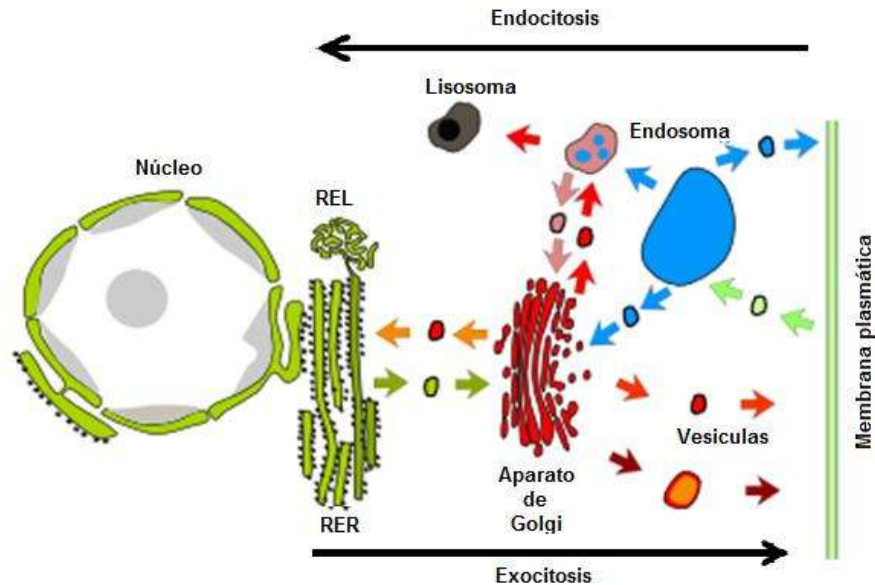


Figura 1. Esquema de las principales vías de comunicación mediante vesículas entre diferentes organelos. Se representa las principales vías de comunicación mediadas por el tráfico vesicular, la vía de exocitosis se origina en el RER (Reticulo endoplasmico rugoso) hacia el aparato de Golgi, además se representa el REL (Reticulo endoplasmico liso), la otra vía representada en la vía endocítica que inicia en la membrana plasmática hacia el aparato de Golgi en color rojo. Existe comunicación bidireccional entre la mayoría de los organelos que se comunican directamente (Modificado de Atlas de Histología Animal y Vegetal, 2008).

1.1.1 Exocitosis

El transporte de proteínas y lípidos desde su lugar de síntesis en el RE a la superficie celular está mediado por la vía secretora o exocitosis y es un proceso esencial en los organismos eucariontes. Esta vía incluye moléculas de señalización y componentes de la matriz extracelular que proporcionan la base para la construcción de tejidos y órganos en mamíferos. Además, esta vía desempeña un papel importante en la biogénesis de la membrana plasmática y su expansión antes de la división celular. Por lo tanto, sin la secreción no habría células, tejidos u órganos. La vía secretora mueve las moléculas cargo desde el RE a través del aparato de Golgi a la MP. En el RE y el aparato de Golgi, las proteínas son modificadas por la adición de azúcares y lípidos. (Lodish, 2010).

El aparato de Golgi está formado por una serie de cisternas aplanadas que se disponen regularmente formando pilas (cis, media y trans). Entre las cisternas, dentro de cada pila, existen numerosas proteínas que se encuentran embebidas. Este entramado, denominado matriz, ayuda en el mantenimiento de la estructura del organelo. Además, se ha demostrado que la integridad del aparato de Golgi depende de la organización del sistema de microtúbulos, por ejemplo, durante la mitosis este organelo desaparece, ocurriendo lo mismo que si se detiene el tráfico vesicular desde el retículo endoplásmico. Una vez que las vesículas formadas en el trans-Golgi contienen a las moléculas cargo, estas se pueden fusionar con la membrana plasmática para suministrarle proteínas residentes tales como receptores, canales iónicos, etc. (Hua y col. 2000).

En el lado cis del aparato de Golgi existe un proceso continuo de formación de cisternas con material procedente de la fusión de compartimientos túbulo-vesiculares denominados ERGIC (por sus siglas en inglés endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), este compartimento se forma con material proveniente del retículo endoplásmico. El lado trans también posee una organización túbulo-vesicular denominada TGN (por sus siglas en inglés: Trans Golgi Network), donde las cisternas con las moléculas procesadas se incorporan en vesículas que se dirigen a otros compartimientos celulares. Por lo tanto se da un traslado constante de moléculas desde el lado cis al trans, pero también hay un flujo de reciclado (transporte retrogrado) en sentido contrario mediado por vesículas recubiertas con proteínas tipo COPI (por sus siglas en inglés **CO**at **P**rotein complex I) las cuales parten de las zonas laterales de las cisternas *trans* y se dirigen hacia cisternas más próximas al lado *cis*. Desde el TGN salen vesículas con diferentes direcciones, hacia las cisternas previas del propio aparato de Golgi, hacia los endosomas y hacia la membrana plasmática (Gundelfinger y col. 2003). La fusión de las membranas intracelulares provenientes del aparato de Golgi con la membrana plasmática controla la composición de la superficie celular, influye en la morfología celular y permite la liberación de factores hacia el espacio

extracelular, a esta liberación de moléculas a partir de vesículas se le denomina exocitosis (*Horton y Ehlers, 2003; Lippincott-Schwartz, 2004; Sudhof, 2004*).

Hay dos tipos de exocitosis: constitutiva y regulada. **La exocitosis constitutiva** se produce en todas las células y se encarga de liberar moléculas que van a formar parte de la matriz extracelular o bien sirven para regenerar la propia membrana celular. Es un proceso constante de producción, desplazamiento y fusión, con diferente intensidad de tráfico según el estado fisiológico de la célula.

Mientras que en **la exocitosis regulada** se produce sólo en aquellas células especializadas en la secreción, como por ejemplo las productoras de hormonas, las neuronas, las células del epitelio digestivo, las células glandulares (*Sollner y col. 1993*).

En la exocitosis regulada se liberan moléculas que realizan funciones para el organismo como la digestión o que afectan a la fisiología de otras células que están próximas o localizadas en regiones alejadas en el organismo, a las cuales llegan a través del sistema circulatorio, como es el caso de las hormonas. La forma más intensamente estudiada de una exocitosis regulada es la liberación de neurotransmisores disparada por una despolarización eléctrica de terminales presinápticas (*Sudhof, 2004*). Las vesículas que participan en el proceso de secreción regulada no se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática sino que necesitan una señal, como el aumento de la concentración de calcio intracelular, ATP y GTP, entre otros factores (*Gil, 2010*).

1.1.2 Endocitosis

Las células toman material extracelular a través de una variedad de mecanismos que colectivamente se denominan endocitosis. Los mecanismos endocíticos sirven para satisfacer muchas funciones celulares importantes, incluyendo el consumo de nutrientes, la regulación de la función de los receptores de membrana, el mantenimiento de la polaridad celular y la presentación de antígenos. Las rutas endocíticas son también utilizadas por virus, toxinas y

organismos simbióticos para penetrar en la célula. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es la endocitosis mediada por receptores vía vesículas cubiertas de clatrina, en la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis. Hay que tener en cuenta que durante cualquier tipo de endocitosis también se incorporan lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que son las que forman la membrana de la propia vesícula (*Mukherjee y col. 1997*).

La endocitosis consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares: tanto a nivel celular, como del organismo completo. La vía endocítica utiliza distintos mecanismos para ingresar porciones de la membrana plasmática, las cuales dependen en parte de las proteínas de cubierta de las vesículas. La morfología ultra estructural de los intermediarios endocíticos nacientes en la MP provee una manera simplista de definir la ruta endocítica. Se reconocen cuatro diferentes tipos de vesículas: vesículas cubiertas de clatrina, vesículas cubiertas de caveolina, invaginaciones membranales polimórficas y vesículas macropinocitócicas (*Hansen y col. 2009*).

Los receptores membranales, como el receptor de insulina, se internalizan a través de vesículas recubiertas de una clatrina, mientras que otras proteínas y los virus son internalizados por vesículas recubiertas de caveolina. Se han descrito unos 25 tipos de receptores que usan en este tipo de endocitosis-clatrina dependiente. Estas rutas de internalización dependen de la GTPasa llamada dinamina, proteína que forma una espiral alrededor del cuello de la vesícula, una vez que la espiral está en su lugar, se extiende longitudinalmente y se constriñe a través de la hidrólisis de GTP a GDP. Este alargamiento y ajustamiento alrededor del cuello de la vesícula hace que ésta se rompa y se libere de la membrana para la fisión de la vesícula de la membrana plasmática (*Kumari y col. 2010*).

Cada una de estas rutas de internalización entrega su cargo a un compartimiento interno, los endosomas, aunque la naturaleza de los compartimientos endosomales puede diferir entre las distintas rutas de internalización (*Tokarev y col. 2000*).

Los endosomas representan el mayor compartimiento membranoso y son la vía de tráfico vesicular hacia los lisosomas. Las moléculas endocitadas, como los receptores pueden seguir esta vía para su degradación en los lisosomas o pueden ser reciclados hacia la membrana plasmática. Muchas moléculas también son transportadas en endosomas desde la membrana plasmática y pueden dirigirse a los lisosomas o reciclarse en el aparato de Golgi (*Mellman, 1996*).

1.1.3 Componentes del tráfico vesicular

El transporte vesicular, es controlado en distintos puntos: la clasificación de la proteína cargo, la formación y transporte de vesículas, la liberación de la proteína cargo a la membrana donadora y en el reciclado de la maquinaria de transporte hacia la membrana donadora. En primer lugar, el transporte vesicular depende de la presencia de distintas proteínas de cubierta de la vesícula, y por lo tanto una membrana donadora debe reclutar las proteínas citosolicas que formarán la cubierta de la vesícula. Se ha descrito que las proteínas adaptadoras transmembranales, están involucradas en la formación de la vesícula naciente, mediante la unión directa de sus dominios citosolicos a las proteínas de cubierta. Unas de estas proteínas adaptadoras son las proteínas adaptadoras de clatrina AP-1 y AP-2. Diferentes proteínas adaptadoras cargo que funcionan en distintas vías del tráfico vesicular se regulan de manera similar a través de la unión a la proteína denominada Factor de ADP-ribosilación (Arf) (*Paczkowski y col. 2015*).

Las proteínas v-SNARE (v del inglés vesicle; SNARE, por sus siglas en inglés: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor), son necesarias para la fusión con la membrana aceptora, estas tienen una proteína cognada denominada t-SNARE (t- del inglés target) localizada en las

membranas blanco en donde se fusiona la vesícula en tránsito, la t-SNARE interactúa con su v-SNARE específica; estas proteínas v-SNARE deben ser incluidas en las vesículas para generar una alta fidelidad con la membrana aceptora. Finalmente, las proteínas cargo tienen que ser reconocidas e incluidas en las vesículas de origen. Estas cubiertas son utilizadas como un medio mecánico para que las vesículas puedan gemar y dirigirse hacia su destino (*Springer y col. 1999*).

1.1.4 Proteínas G en el tráfico vesicular

En la biogénesis vesicular actúan diversas proteínas, como las proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), (*McCudden y col.2005*). Existen dos familias generales de proteínas G: monoméricas y heterotriméricas ambas involucradas en diversas funciones celulares. Dentro de las proteínas G monoméricas existen las familias Ras, Rho, Ran, Rab y Arf (*Takai y col. 2001*).

La familia Ras ha sido asociada a procesos de transducción de señales y su disfunción conduce a oncogénesis (*Repasky y col. 2004*), la familia Rho está involucrada en la regulación de la organización de actina, del ciclo celular y de la expresión celular (*Etienne-Manneville y Hall, 2002*), la familia Ran participa en el transporte nucleocitoplásmico de RNAs y proteínas (*Weis, 2003*), la familia Rab cumple la función de regular el transporte vesicular y el tráfico de proteínas entre diferentes organelos de las rutas endocíticas y exocíticas (*Zerial y McBride, 2001*), la familia Arf está involucrada en la formación de vesículas (*Nielsen y col. 2008*).

La otra gran familia de las proteínas G está compuesta por las proteínas G heterotriméricas, que sirven de intermediarios entre el receptor localizado en la membrana plasmática y los efectores intracelulares, son el componente transductor de señales. Estructuralmente están compuestas de tres proteínas distintas: una subunidad G α , una subunidad G β y una subunidad G γ (*McCudden y col. 2005*), dentro de las funciones que han sido descritas en hongos se

encuentran cambios morfológicos (*Sánchez y col. 2002*), patogénesis (*Mukherjee y col. 2004*), detección de nutrientes y reproducción (*Kays y col. 2000*).

1.2 Generalidades de las proteínas ARF

Las proteínas G monoméricas de la familia ARF tienen un peso molecular de alrededor de 20 kDa y han sido descritas en todas las células eucariontes. Las proteínas ARF se describieron por primera vez como un factor alosterico de la toxina del cólera (CTX), dicha interacción aumentaba la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) por la ADP-Ribosil transferasa (CTX) de *Vibrio cholerae*, se encontró que el aumento de la actividad de AC se relacionaba proporcionalmente con la cantidad de factor (ARF) presente en la reacción enzimática *in vitro* (*Schleifer y col. 1982*)

La proteína ARF se ha detectado solamente en tejidos o células de organismos eucariontes. Se localizó principalmente en el citosol, mientras que los niveles en las membranas plasmáticas fueron menores. Finalmente se demostró que la proteína ARF era bloqueada en su extremo amino terminal por el ácido mirístico, específicamente en el segundo aminoácido glicina, una característica única comparada con las otras proteínas monoméricas, dicha modificación le permite interactuar con las membranas biológicas (*Kahn y col. 1988*).

La delección de 17 residuos del extremo amino terminal de la proteína ARF1 de humano generó una proteína carente de la actividad biológica, debido a su incapacidad de unirse a las membranas, pero conservo una alta afinidad por unir nucleótidos de guanina, por lo cual se determinó que el extremo amino es un componente crítico para la actividad ARF ya que en el mismo se encuentra el dominio de miristilación (*Kahn y col. 1992*).

Por otra parte la proteína ARF1 de *Saccharomyces cerevisiae* está asociada a la membrana de la cara cis-Golgi, mutantes en *arf1* muestran defectos en la vía secretora (*Stearns y col. 1990*).

La familia ARF incluye tres grupos diferentes de proteínas: las ARF; las AR-like (ARL) y SAR, las proteínas ARL son proteínas que están estructuralmente relacionada con ARF (50-60% identidad) (*Tamkun y col. 1991*). Por lo tanto, las proteínas ARL no son un grupo coherente, ya sea funcional o filogenéticamente, poseen una glicina en el extremo amino terminal (al igual que las ARF), pero no pueden ser susceptibles de las N-miristoiltransferasas. Las proteínas SAR1 fueron uno de los primeros miembros de la familia ARF secuenciados, y actúan como un supresor de sec12 (una glicoproteína integral de membrana) en *S. cerevisiae* (*Nakano y Muramatsu, 1989*). El nombre de SAR se deriva de su identificación como una proteína relacionada con Ras y asociada a la secreción. Las proteínas SAR son ligeramente más cercanas en secuencia con ARF que a otras familias de GTPasas, pero también comparten una considerable relación funcional con las proteínas ARF, ya que actúan a través del reclutamiento de proteínas de la cubierta o complejos para iniciar la gemación de vesículas (*Kahn y col 2006*).

Las proteínas ARF tienen una función crucial en el metabolismo de las vesículas, incluyendo el reclutamiento de las proteínas de cubierta para iniciar la formación y gemación de las mismas (*Popoff y col.2011*). De esta manera, las proteínas ARF participan en el tráfico vesicular entre diversos compartimientos celulares, como son el RE, el aparato de Golgi, los endosomas, la envoltura nuclear, etc. (*Moss y Vaughan, 1995*). Las proteínas ARF en su estado activado (Arf-GTP) se unen directamente con sus efectores. Algunos efectores pertenecen a los complejos de la cubierta vesicular como clatrina, COPI, las proteínas adaptadoras AP1-2 y GGA 1-3 (Golgi-associated, Gamma adaptin ear-containing Arf-binding proteins). Las proteínas ARF reclutan a las proteínas de cubierta y adaptadoras, conduciendo a la formación y al destino de vesículas junto con la proteína cargo contenida en el interior de éstas (*Dell'Angelica y col. 2000; Donaldson y Jackson, 2011*).

Además, las proteínas Arf en su estado activado tienen la capacidad de interactuar y activar ciertas enzimas modificadoras de lípidos como la fosfolipasa D1 (PLD), fosfatidilinositol-4,5-cinasa (PI(4)P5K) y la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), las

cuales se cree promueven la remodelación de las membranas (*Donaldson y Jackson, 2011*). Se ha sugerido, que algunos miembros de las proteínas ARF están involucrados en la biogénesis de ciertos organelos como en el caso de los peroxisomas en *S. cerevisiae* (*Anthonio y col. 2009*).

El mecanismo de ensamblado de los constituyentes de las proteínas de cubierta involucra a la proteína ARF con diversas proteínas como son las proteínas GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que favorecen la activación y GAP (proteínas activadoras de GTPasa) que inducen la inactivación de las proteínas ARF. Las vesículas de las membranas donadoras poseen un (GEF), además la proteína Arf-GTP se une a la membrana donadora. La proteína Arf-GTP recluta una red de proteínas de cubierta que prepara la gemación de la vesícula, las proteínas de cubierta no se separan tras la escisión de la vesícula de la membrana donadora, sino hasta que llega a la membrana receptora. Las proteínas ARF/SAR activadas experimentan un cambio conformacional exponiendo la hélice α anfipática, localizada en su extremo N-terminal, permitiéndole la inserción en las membranas. Este proceso desencadena en el reclutamiento y montaje de proteínas de la cubierta a las membranas, seguido por la formación de vesículas revestidas y su escisión. En las plantas, ARF/SAR también desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de los organelos en la vía secretora. La proteína SAR1 controla estrictamente transporte anterógrado desde el ER a través del reclutamiento de los componentes de proteína de cubierta COPII a las membranas. El transporte de vesículas COPII es responsable de la organización de las redes de ER. Por el contrario, las proteínas ARF contribuyen a la regulación de múltiples rutas de tráfico, incluido el transporte a través del aparato de Golgi y transporte endocítico. Estos sistemas de transporte se han diversificado en el reino vegetal de forma independiente y presentan varias características específicas con respecto a la organización del aparato de Golgi, la vía endocítica, la polaridad celular y la citocinesis. La diversificación funcional de los sistemas de tráfico vesicular garantiza el desarrollo multicelular de las plantas superiores (*Yorimitsu y col. 2014*) **(Figura 2)**.

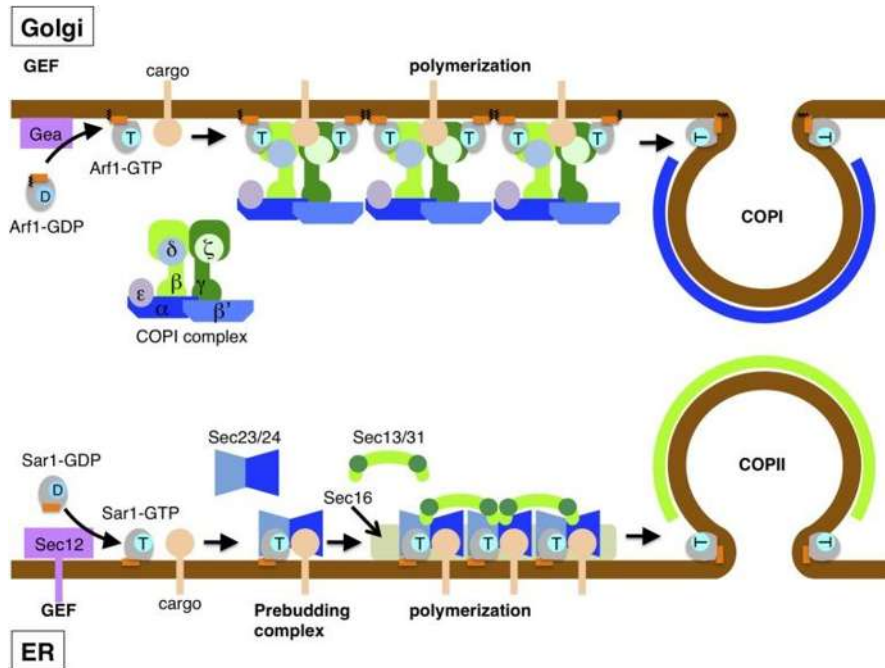


Figura 2. Formación de vesículas cubiertas de COPII y COPI. La formación de vesículas se inicia en el reclutamiento de SAR1 y ARF1 del ER rugoso (inferior) y las membranas del aparato de Golgi (superior), respectivamente. En la formación de vesículas COPII, la proteína integral de membrana SEC12 del ER intercambia el GDP por GTP, uniendo GTP a SAR1 través de su actividad GEF. Asociada a la membrana unida a GTP Sar1 recluta a la capa interna el complejo SEC23/24 y luego ensambla junto con las proteínas cargo en el complejo pre-ciernes. La capa externa complejo SEC13/31 son reclutados a los complejos pre-ciernes y auto-ensamblado por reticulación. La polimerización de SEC13/31 por autoensamblaje conduce a la curvatura de la membrana para formar una vesícula de forma esférica. La formación de vesículas COPI también se inicia mediante intercambio de GDP por GTP en ARF1 a través de la acción de la proteína GEF, que se encuentra en la periferia de la membrana del Aparato de Golgi. ARF1 unida a GTP de forma estable se une a la membrana por una hélice anfipática miristilada, como lo hace SAR1. El complejo heptámero de la capa COPI es reclutado en bloque y se asocia con cargo, así como dos moléculas ARF1 a través del complejo de la capa capa interna ($\beta / \gamma / \delta / \zeta$ -COP). Al igual que en COPII, las vesículas se forman en la polimerización de la capa exterior ($\alpha / \beta / \epsilon$ -CP). La hélice anfipática de SAR1 y ARF1 tiene una función en la escisión de vesículas generadas (Yorimitsu y col. 2014).

1.2.1 Regulación de la actividad de las proteínas ARF

El estado de actividad de las proteínas ARF es regulado por las tasas de intercambio de GDP por GTP y por la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP. El primer proceso es catalizado por proteínas tipo GEF, este intercambio es un paso crítico para la regulación vesicular. Todos los complejos ARF-GEP identificados hasta el momento poseen un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos denominado SEC7, responsable de la actividad de GEP. El dominio SEC7 es el blanco molecular del metabolito fúngico brefeldina A (BFA), el cual se usa como un inhibidor de la función de las proteínas ARF (*Misumi y col. 1986*), lo cual ha permitido clasificar a las proteínas GEP en sensibles (*Morinaga y col. 1997*) y resistentes a la acción de BFA (*Chardin y col. 1996*). El estado activado de las proteínas ARF finaliza cuando la actividad intrínseca de GTPasa es aumentada significativamente por las proteínas activadoras tipo GAP (**Figura 3**).

Se han identificado más de 30 genes en humano que codifican proteínas con dominios catalíticos de ARF-GAP (*Shin y col. 2008*).

De esta manera, las proteínas GEF y GAP son reguladoras de la función de las proteínas G y se denominan por sus siglas en inglés RGS (regulator of G protein signaling) se considera que proteínas reguladoras concretas y expresadas en células específicas en momentos definidos, tienen un papel importante en la modulación de la transducción de señales (*Vries y col. 2000*).

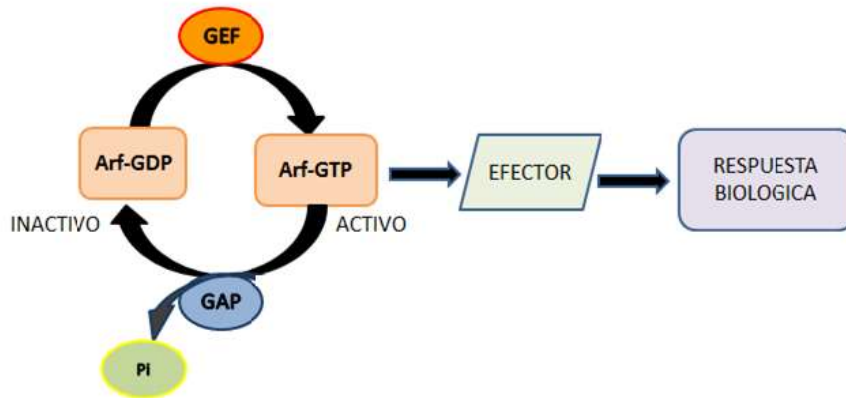


Figura 3. Mecanismo de Activación de proteínas ARF. La proteína ARF en estado unida a GDP, permanece en estado inactivo, el intercambio por GTP es un proceso catalizado por una proteína denominada GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). La unión de GTP a ARF le provoca un cambio conformacional que permite que la proteína interactúe con sus efectores, desencadenando un respuesta biológica, como es el caso de la formación de vesículas, ARF es inactivada al hidrolizarse el GTP unido, por acción de una GAP (GTPasa Activating Protein) que libera fosforo inorgánico a partir del nucleótido, produciendo GDP-ARF (East y col., 2011).

2. Función de las proteínas ARF en eucariontes

Las proteínas ARF son ubicuas y muy conservadas, sus funciones biológicas son el resultado de sus interacciones específicas con las diversas proteínas efectoras (Donaldson y Jackson, 2011). A continuación se describen algunos procesos en los que se ha descubierto participación.

Plantas

Se encontró en *Arabidopsis thaliana*, un miembro de la familia Arf denominado Arf1A1C, el cual al ser mutado mediante transposición, resulto en un defecto en la respuesta a auxina, defectos del desarrollo, incluyendo anomalías en el patrón embrionario y detención del crecimiento, sugiriendo así que Arf1A1C es esencial para el reciclaje de los transportadores PIN y procesos de desarrollo dependientes de auxina en esta planta (Tanaka y col. 2014).

Mediante ensayos de sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* de la proteína ZmArf2 de *Zea mays*, sugieren que ZmArf2 desempeña una función importante sobre el crecimiento y el desarrollo de *Arabidopsis* aumentando el tamaño de la semilla mediante la promoción de la expansión de células (Wang y col. 2015).

Invertebrados

En *Drosophila melanogaster* que posee 3 genes *arf*, se ha descrito que la pérdida de la función del gen *arf72A* cambió la distribución de moléculas de la membrana del RE, modificando el equilibrio de moléculas entre la membrana del RE y el complejo de Golgi, lo que resulta en la proliferación del aparato de Golgi y una acelerada secreción de proteínas. Por lo que se sugiere una función para la proteína ARF72A en la maquinaria de control de transporte del retículo endoplasmico hacia, para distinguir las proteínas de secreción de las proteínas de degradación (Lee y col. 2011).

En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual posee 3 genes *arf* mediante el uso de RNA de interferencia que codifica para el gen *Arl2* resulto en una germinación desorganizada y esterilidad en sus descendientes, lo que indica un papel esencial del producto de este gen en *C. elegans* (Li y col., 2004).

2.1 Participación de las proteínas ARF en hongos.

Saccharomyces cerevisiae

Se conocen tres genes *ARF* (*ARF1-3*) en *S. cerevisiae* *ARF1* y *ARF2* participan en el tráfico vesicular específicamente en la ruta exocítica (Lee, 1994). Las proteínas codificadas por estos dos genes son 96% idénticas entre sí. La interrupción del gen *ARF1* causa un crecimiento lento, sensibilidad al frío y a las concentraciones normalmente subletales de ion fluoruro. La interrupción del gen *ARF2* no causa ningún fenotipo detectable, por lo contrario la interrupción de ambos genes es letal, por lo que las proteínas *ARF1* y *2*, tienen funciones parcialmente redundantes y en conjunto son esenciales para el crecimiento. Las proteínas codificadas por estos dos genes, *ARF1-2* son funcionalmente homólogas y las

diferencias fenotípicas entre las mutaciones en los dos genes puede ser explicada por el nivel de expresión; *ARF1* produce aproximadamente el 90% del total de las proteínas ARF, pero la interrupción de alguno de los dos genes (*ARF1*, *ARF2*) puede ser reparado por alguno de los dos presentes (*Stearns, 1990*).

Mientras que la proteína ARF3 de *S. cerevisiae* muestra un 60% de identidad con las proteínas ARF1 de la clase III de mamífero, las proteínas ARF1 y ARF2 presentan 52-56% de similitud respectivamente con ARF3. La proteína ARF3 tiene una función importante en el crecimiento polarizado, en la emergencia de la gema (*Huang y col. 2003*).

Aspergillus nidulans

Las proteínas ARF presenta una participación importante en el crecimiento polarizado de *Aspergillus nidulans* el cual es un hongo monoformico, Ascomicota que presenta un homólogo denominado *ArfB*, con un 72% de identidad con *ARF6* de humano y con un 59% de identidad con *ARF3* de *S. cerevisiae*, las cepas de tipo silvestre presentan crecimiento radial distribuido en toda la placa, mientras que la mutante *arfB* presento un crecimiento reducido. Una explicación al respecto de dicha reducción del crecimiento fue que la mutante en *arfB* muestra híper-ramificación con acortamiento de las hifas (*Lee y col. 2008*).

La proteína ArfA de *A. nidulans* mostró un 75% de similitud de secuencia de aminoácidos con ScARF1p y ScARF2p. La fusión de ArfA::GFP se localizó en compartimentos celulares similares al aparato de Golgi. El motivo de N-miristolación en el extremo amino terminal es crítico para la localización de ArfA, El tratamiento con Brefeldina A, un inhibidor del transporte desde el aparato de Golgi, conduce a una deslocalización de ArfA::GFP y se acumuló en un compartimento subcelular, sugiriendo además que ArfA se localiza en la red del aparato de Golgi, probablemente este localizada en compartimentos subcelulares que participan en la exocitosis. La delección del gen *ArfA*, indica que el gen es esencial en *A. nidulans* ya que no se pudo recuperar la cepa con la delección. Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína ArfA suprime parcialmente el fenotipo de defectos en la polaridad de una mutante N-miristoiltransferasa. En conjunto, estos

resultados sugieren que ArfA participa en el crecimiento micelial a través del sistema de secreción (Lee y col. 2008).

Candida albicans

El principal patógeno fúngico de los seres humanos *C. albicans*, presenta un gen *AGE3* el cual codifica para una proteína ARF-GAP, mutantes en *age3* mostraron sensibilidad a esteroides e inhibidores de pared, como fluconazol y caspofungina. Estudios de infección *in vivo* llevados a cabo en ratón demostraron que mutantes *age3* son avirulentas en ratones normales y, con un efecto atenuado en ratones inmunocomprometidos. Estos datos indican que el metabolismo de las proteínas ARF está involucrado en procesos de virulencia en hongos (Epp y col. 2010).

3. *Mucor circinelloides*

3.1 Generalidades

El hongo *Mucor circinelloides* es un zigomiceto dimorfo (Lübbenhüsen y col. 2003). Es un modelo de estudio en la regulación de diferenciación celular, respuestas celulares a la luz (Murcia-Flores y col. 2007). Se considera como un patógeno emergente en pacientes inmunodeprimidos (Bastidas y col. 2012), se le ha asociado también a la contaminación de frutos como el noni (Nishijima y col. 2011); además recientemente se le considera como posible fuente de ácidos grasos para la obtención de fuentes de energía renovables como el biodiesel (Xia y col. 2011). Su metabolismo fermentativo ha sido investigado para de la obtención de etanol, además de que se ha evaluado el rendimiento de esta producción modificando condiciones de crecimiento (Wikandariy col. 2012).

El evento diferenciativo más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo (Lübbenhüsen y col. 2003). No obstante *M. circinelloides* presenta otros eventos diferenciativos, como la síntesis de carotenos, inducida por la presencia de luz (Murcia-Flores y col. 2008), generando colonias con tonalidad amarillenta a diferencia de colonias crecidas en obscuridad que son albinas. Además el desarrollo de estructuras reproductivas y la esporulación igualmente se ven acelerados por la presencia de luz.

M. circinelloides ha sido estudiado como huésped heterólogo para la producción de enzimas importantes de carácter industrial, como el efecto del dimorfismo en el proceso de producción y actividad enzimática de glucosa oxidasa. Encontrándose una mayor producción de esta enzima durante la morfología levaduriforme (Bredenkamp y col. 2010).

El genoma de este organismo ha sido secuenciado recientemente y está disponible en la red (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). El material genómico de este organismo está distribuido en 9 cromosomas tratándose de 11,719 genes en 36.6 millones pares de bases (Mb) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2804>). Se trata de un tamaño de genoma similar en comparación con otros hongos, por ejemplo, el ascomiceto *Aspergillus nidulans* con 30 Mb (David y col., 2008), en el basidiomiceto *Ustilago maydis* 20

Mb (Kämper y col. 2006), y en los zigomicetos *R. oryzae* con 45.3 Mb (Ma y col. 2009), *P. blakesleeanus* con 30 Mb (Corrochano y Ruiz-Albert, 2004).

3.1.1. Transiciones morfológicas en *M. circinelloides*

Algunas especies del género *Mucor* son capaces de generar tres tipos esporas: 1) zigospora producto de la recombinación genética, 2) la esporangiospora sirve como mecanismo de dispersión y 3) las artrosporas aseguran la supervivencia bajo condiciones de crecimiento adversas (Orlowski, 1991). La reproducción sexual sucede cuando hay fusión de hifas de origen homotálico o heterotálico y conduce finalmente a la formación de zigospora.

La zigospora permanece en reposo durante muchas semanas o meses antes de germinar y producen una estructura alargada conocida como esporangioforo que en la punta presenta un cuerpo esférico conocido como esporangio del cual se desprenden las esporangiosporas. Las esporangiosporas son elipsoidales y aunque derivan exclusivamente del hábitat micelial del género *Mucor* son capaces de desarrollar hacia la morfología levaduriforme o micelial dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono (Lübbehüsen y col. 2003). Si las esporangiosporas se crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis *M. circinelloides* su crecimiento es polarizado (filamentoso) (**Figura 4**). Además del ambiente gaseoso, el crecimiento levaduriforme en el caso de *M. rouxii* requiere que una fuente de carbono fermentable (Bartnicki-Garcia, 1968).

El crecimiento filamentoso y levaduriforme de *M. circinelloides* no es terminal y puede haber conversión de levadura a micelio o de micelio a levadura, esto modificando las condiciones de crecimiento (McIntyre y col.2002). Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas, es decir no presentan septos (divisiones). Por otro lado, las levaduras son, esféricas y multinucleadas (Ocampo y col. 2012). La artrospora es la estructura menos estudiada y entendida del género *Mucor*, y se ha propuesto su funcionalidad como un mecanismo de supervivencia ya que se forma al fin del crecimiento logarítmico o bajo condiciones nutricionales desfavorables (Orlowski, 1991).

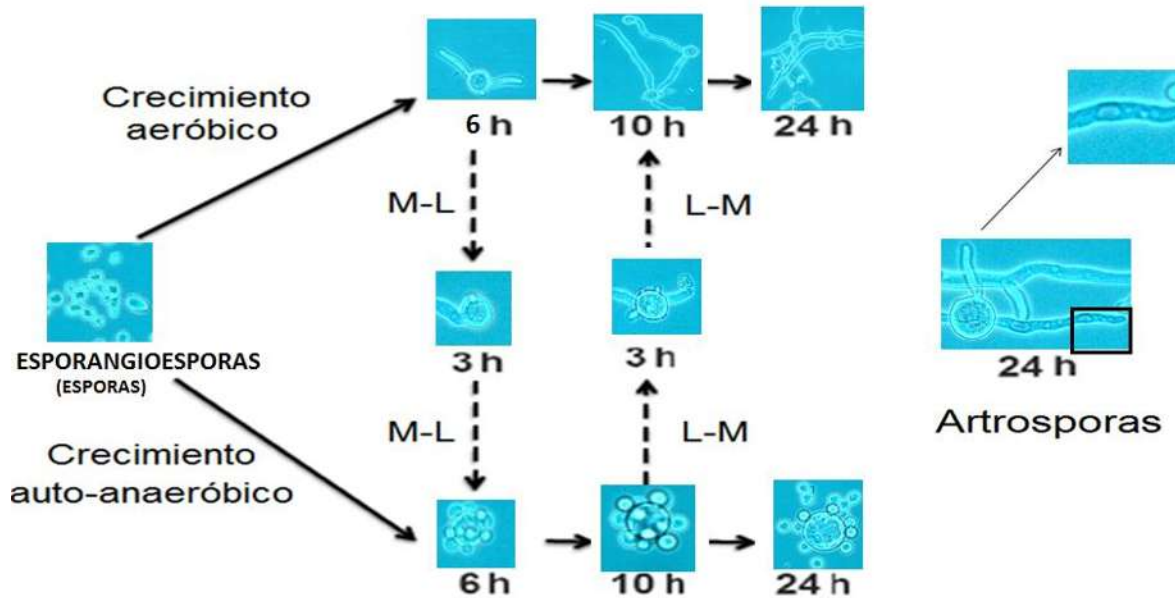


Figura 4. Diferenciación de *M. circinelloides* en cultivo líquido. Las esporangiosporas son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Cultivos maduros de micelio pueden conducir a la formación de artrosporas que son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones de crecimiento. Intercambios entre las morfologías de levadura y micelio son posibles modificando las condiciones atmosféricas. El cambio de condiciones aérobicas a anaeróbicas conduce a que el micelio produzca levaduras, el cambio de anaerobiosis a aerobiosis conduce a la formación de micelio a partir de levaduras. (Modificada de Valle-Maldonado, Tesis de Maestría, 2013).

3.2 Genes involucrados en la diferenciación morfológica en *M. circinelloides*

Se han descrito algunos genes involucrados en procesos de diferenciación de *M. circinelloides*, es el caso del gen *mcwc-1a* que codifica para un fotoreceptor asociado a las esporangioesporas en *M. circinelloides* responden a la luz mostrando fototropismo positivo, la mutación en dicho gen condujo en las esporangioesporas la incapacidad de orientarse respecto a la dirección de la luz (Silva y col. 2008).

La participación de la proteína cinasa A (PKA) en el crecimiento polarizado de *M. circinelloides* ha sido evidenciada usando análogos de AMPc como N⁶-monobutiril-AMPc, N⁶-benzoil-AMPc (Sorol y col. 2000). Estos análogos imitan la actividad del AMPc y resulta en crecimiento levaduriforme, aún en condiciones aérobicas. La regulación conferida por el AMPc es muy importante, ya que al remover los análogos del AMPc hay una transición morfológica inmediata de crecimiento isotrópico a filamentoso (Wolff y col. 2002; Ocampo y col. 2009), siendo de esta manera el AMPc a su vez es un regulador clave en el crecimiento polarizado procesos de desarrollo, apareamiento y virulencia en el hongo *Ustilago maydis* (Gold y col.1997). La PKA consiste en dos subunidades regulatorias (PKAR) que se unen e inhiben la actividad de dos subunidades catalíticas (PKAC), el AMPc interactúa con la subunidad regulatoria de PKA provocando su disociación de la subunidad catalítica y consecuentemente la activación de esta, la cual se manifiesta en fosforilación de sustratos proteicos en residuos de serina y treonina a través de PKA. La proteína PKA tiene una función importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de *M. circinelloides*, se generaron mutantes en cuatro genes que codifican las isoformas de la subunidad regulatoria, PKAR1, PKAR2, PKAR3 y PKAR4, demostrando que cada isoforma tiene una función diferente en el crecimiento y diferenciación, sin embargo el hallazgo más sorprendente fue para el gen *pkaR4* como un gen esencial, ya que solo heterocariontes fueron generadas en experimentos de interrupción, esta cepa generada en la isoforma R4 de PKA mostraron alteraciones en la emisión del tubo germinativo, el resto de las mutantes generadas en las subunidades, mostraron

alteraciones en la esporulación y el volumen de la célula madre (*Ocampo y col.2012*).

La enzima CrgA es una proteína con dominios tipo dedos de zinc, que tiene una actividad asociada de ubiquitina ligasa E3, el cual media la unión de residuos de ubiquitina a proteínas blanco, dicha señal es necesaria para su posterior proteólisis. La mutación de *crgA* causa desregulación de la esporulación, sugiriendo que su mutación podría estar impidiendo la degradación de proteínas reguladoras en respuesta a la luz incluyendo la esporulación. CrgA reprime la carotenogénesis (*Navarro y col.2000*) y regula positivamente la esporulación (*Lorca-Pascual y col. 2004*).

Se encontró que el gen *crgA* reprime la expresión del gen *cigA*, la cual muestra una homología con la proteína O-fucosiltransferasa de unión a GDP-fucosa, fueron generadas mutantes *cigA*- provocando una ligera reducción en el crecimiento vegetativo que es independiente de la luz en *M. circinelloides* (*Quiles y col. 2003*).

Otro gen descrito es el *Adh1* el cual codifica para una enzima alcohol deshidrogenasa necesaria para la fermentación de glucosa a etanol y dióxido de carbono así como la regeneración de NAD oxidado y permitir la continuación de la glicolisis, la mutación en dicho gen impidió el crecimiento de levadura en anaerobiosis condujo a un fenotipo monofómico es decir solo permitió el crecimiento como micelio (*Meza-Carmen, 1999; Rangel-Porras, 2005*).

Los niveles de transcrito del gen *mcchs1*, que codifica a un miembro de la familia de sintasas de quitina, hibridaciones northern mostraron que la transcripción de *mcchs1* se acumula sólo durante la etapa de micelio en crecimiento exponencial, mientras que no se detectó su expresión en la forma de levadura (*López y col.2000*).

La calcineurina es una proteína serin-treonin fosfatasa dependiente de Ca^{+2} y activada por calmodulina, que se conserva desde la levadura hasta el ser humano, y una enzima objetivo para dos novedosos antifúngicos inmunosupresores no relacionados estructuralmente, ciclosporina A y FK506. Ambos fármacos forman complejos abundantes con proteínas de unión intracelular, la ciclosporina A con la ciclofilina A y FK506 con FKBP12, que se

unen e inhiben a la calcineurina. La calcineurina está compuesta de dos componentes (A y B), el componente A es la subunidad catalítica y el componente B es la subunidad regulatoria. La calcineurina juega un papel clave en la regulación del factor de transcripción NF-AT durante la activación de células T, y en la mediación de las respuestas de los microorganismos a la tensión de cationes (Hemenway- Heithman, 1999).

Se encontró que *M. circinelloides* posee tres genes que codifican para tres subunidades catalíticas de la calcineurina A (CnaA, CnaB, and CnaC) y un gen de la subunidad regulatoria de la calcineurina B (CnbR), mutaciones en la región pistillo de CnbR y en los dominios de unión FKBP12-FK506 de CnaB, resultaron en el crecimiento hifal de *M. circinelloides* en presencia de FK506. La interrupción del gen que codifica la CnbR única subunidad necesaria para la actividad de la calcineurina B, produjo mutantes bloqueadas en la fase de crecimiento de forma permanente como levadura. Estos resultados revelan que la vía de la calcineurina tiene una función clave en la transición dimórfica de levadura a micelio. Además las mutantes *cnbR* como levaduras son menos virulentas que la cepa de tipo silvestre en un sistema heterólogo, proporcionando evidencia de que la forma micelial o la transición de levadura-micelio están vinculados a la virulencia. Una actividad de la proteína cinasa (PKA) es elevada durante el crecimiento de la levadura en condiciones anaerobias, en presencia de FK506, o en los mutantes de levadura *cnbR*, lo que sugiere una nueva conexión entre PKA y la calcineurina (Lee y col. 2013).

Mutantes *cnaA* que carecen de la subunidad catalítica, son hipersensibles a inhibidores de la calcineurina, mostraron defectos en el crecimiento polarizado micelial y producen una mezcla de levadura e hifas en cultivo aerobio. Los mutantes *cnaA* también producen esporas que son más grandes que los de tipo silvestre. Hasta el momento se sugiere que la vía de la calcineurina orquesta la transición dimórfica de levadura a micelio y el tamaño de la espora que contribuyen a la virulencia de este patógeno fúngico zigomicota (Lee y col. 2013). La interrupción del gen *fkbA* que codifica FKBP12, también confiere resistencia a la rapamicina y FK506. Mediante la expresión de FKBP12 de *M. circinelloides* se

complementó una cepa mutante de FKBP12 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fue capaz de restaurar la resistencia a la rapamicina en *S. cerevisiae* (Bastidas y col. 2012).

Un patrón similar fue detectado para los niveles de los transcritos de *mras1* y *mras3*, que codifican proteínas G monoméricas del tipo RAS en este mismo trabajo, a diferencia de *mras1*, altos niveles del transcrito *mras3* fueron detectados durante la esporulación (Roze y col.1999)

En *M. circinelloides* se detectaron mayores niveles de las proteínas G monoméricas Rho1p y Rho3p en el crecimiento polarizado (De la Cruz y col.2007). Los niveles de transcrito de la subunidad *mcgpa3*, la cual codifica para una subunidad G α de proteínas G heterotriméricas, fueron evaluados en esporas y en crecimiento vegetativo, encontrándose en esporas los niveles más altos de transcrito (Meza y col. 2006).

4. Justificación

Mucor circinelloides presenta múltiples estados morfológicos siendo escasa la información a nivel molecular que explique dichos fenómenos diferenciativos, por lo que es importante conocer la posible participación de los genes *arf* en los diversos estadios del dimorfismo y/o crecimiento.

4.1 Hipótesis

Los genes *arf* están implicados en el dimorfismo y/o crecimiento de *Mucor circinelloides*.

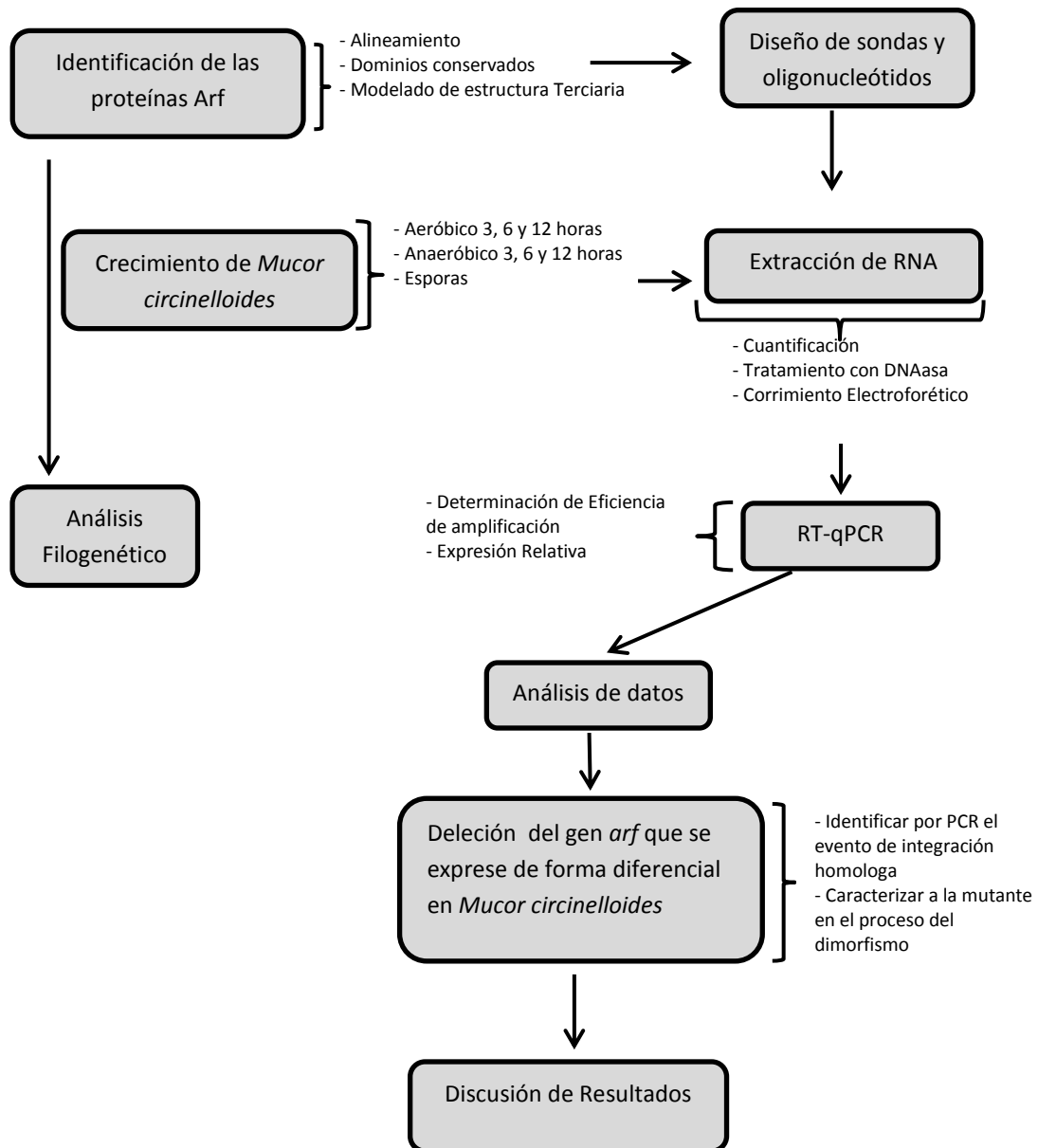
4.2 Objetivo general

Identificar y caracterizar la participación de los genes *arf* en el dimorfismo y/o desarrollo de *Mucor circinelloides*.

4.2.1 Objetivos Particulares

1. Identificar los genes *arf* y seleccionar un gen *arf* que se exprese de forma diferencial durante el dimorfismo de *M. circinelloides*.
2. Demostrar la participación en el dimorfismo del gen *arf* de *M. circinelloides* que se exprese de forma diferencial en un estadio en particular.

5. Metodología experimental general



6. Materiales y métodos

6.1 Análisis de *in silico*

6.1.1 Identificación de las proteínas Arf en *M. circinelloides*

La búsqueda de proteínas homólogas se llevó a cabo mediante el programa blastp, usando como sonda la secuencia del gen *Arf1* de *S. cerevisiae* (CAA98769) tomada de la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y posteriormente se hizo una búsqueda tipo Blastp en la página de *Mucor circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). Para el análisis de las secuencias de aminoácidos se utilizaron los servidores EMBL-EBI, NCBI y ExPasy, posteriormente las proteínas identificadas correspondientes a proteínas Arf de *M. circinelloides*. Los análisis de comparación de secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW2 del EMBL-EBI. Por otra parte se hizo una búsqueda en la herramienta KOG (Grupos de genes ortólogos eucarióticos por sus siglas en inglés: EuKaryotic Orthologous Groups), por medio del uso de palabra clave ADP-ribosylation factor. Las predicciones de dominios conservados se realizaron con los programas “InterProScan” (EMBL-EBI), “Conserve Domain Database” (NCBI) y “Pfam” (Sanger Institute). El peso molecular y el punto isoeléctrico de proteínas se determinó con el programa “Compute pI/Mw” (ExPasy).

6.1.2 Modelado tridimensional de las proteínas Arf de *M. circinelloides*

Se empleó el programa SWISS Model (*Arnold y col. 2006*), para generar los modelos tridimensionales de las supuestas proteínas Arf de *M. circinelloides* identificadas, se emplearon los parámetros predeterminados del programa. Las estructuras obtenidas fueron comparadas con la secuencia ARF1 de *S. cerevisiae* (NP_010089) cuya estructura cristalográfica fue previamente determinada.

6.2. Cultivo de *Mucor circinelloides*

6.2.1 Condiciones generales de crecimiento de *M. circinelloides*

M. circinelloides se cultivó a 26°C en medio nutritivo YPG (Bartnicki-García 1968) o en medio mínimo MMC (Nicolás y col. 2007). Cuando fue necesario, después de esterilizar, el medio mínimo MMC e YPG con urídina (0,2 mg/ml). En experimentos de transformación se añadió sorbitol a una concentración de 0,5 M para evitar que la diferencia de presión osmótica hiciese estallar los protoplastos generados previamente. El pH fue 4,5 cuando se requirió un crecimiento micelial normal y 2,9-3,2 cuando se necesitó obtener un crecimiento colonial, que permitiera analizar un gran número de individuos por caja.

6.2.2 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides*

Placas de Petri con medio YPG sólido, se inocularon 50 esporas de *M. circinelloides* y se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas fueron colectadas agregando 7 ml de H₂O sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas fueron aspiradas y depositadas en un tubo de 50 ml. Las esporas fueron concentradas al centrifugar a 5000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas con H₂O destilada estéril y centrifugadas de la misma manera. Las esporas fueron resuspendidas en 10 ml de H₂O destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika), depositando 15 µl en la parte superior y 15 µl en la inferior, respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Dicha cantidad fue multiplicada por el factor de 25000 y el resultado obtenido expresa esporas por mililitro de la muestra. Las esporas fueron conservadas a 4°C y empleadas en un máximo de 15 días después de su obtención.

Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de *M. circinelloides*

Para llevar a cabo los crecimientos aérobicos y anaeróbicos 500,000 esporas fueron inoculadas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentosos los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 200 rpm, usando 20 ml de medio en matraces de 125 mL. Para el crecimiento levaduriforme, matraces Erlenmeyer de 125 mL fueron llenados con medio de cultivo (aprox. 137ml), a los que se les colocó un tapón de corcho en la boca de cada uno de los matraces, dichos tapones estuvieron atravesados con una aguja que permitió la salida del CO₂ producido durante el metabolismo anaeróbico, dentro del matraz se colocó una barra magnética, el matraz se colocó sobre un agitador magnético permitiendo una agitación constante. Todo este sistema se le conoce como sistema “auto-anaeróbico” (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993).

7. Cepas y plásmidos

Fueron utilizadas en el presente trabajo, cepas de *E. coli* utilizadas como portadoras de los vectores de clonación y cepas *M. circinelloides*, las cepas con el prefijo MU han sido obtenidas en la Universidad de Murcia y derivan de la estirpe MU402 (*leuA*⁻,*pyrG*⁻), la estirpe se generó por mutagénesis química a partir de la estirpe R7B (*leuA*⁻), a su vez la cepa R7B, silvestre para la carotenogénesis y auxótrofa para la leucina, fue obtenida mediante mutagénesis química a partir de la estirpe silvestre de sexo (-) CBS 277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b; Schipper, 1976) (Tabla 1).

La cepa DH5α de *Escherichia coli* se utilizó en los experimentos de clonación de plásmidos bacterianos. Entre sus características más significativas destacan: i) que no permite la recombinación debido a la mutación *recA*⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos; ii) que porta una mutación *lacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente y iii) que puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo las construcciones generadas para la posterior transformación de *M. circinelloides*, se reportan en la Tabla 2.

8. Medios de cultivo

8.1. YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH 4.5 (Bartnicki-García, 1968).

8.2. MMC (Medio Mínimo Casaaminoácidos)

Cada litro contenía 10 g de Medio Bacto Casaaminoácidos, 0.5 g de Bacto Yeast Nitrogen w/o aminoácidos, 20 g de Dextrosa, para la preparación de medio sólido se añade agar (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina y niacina 1 µg/ml respectivamente.

8.3. LB modificado (Peptona de Caseína, Extracto de levadura, Cloruro de Sodio)

Cada litro contenía 10 g de Peptona de Caseína, 5 g de Extracto de levadura, 5 g de Cloruro de Sodio, para la preparación de medio sólido se añade agar (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. Cuando fue necesario, tras esterilizar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
<i>DH5α Escherichia coli</i>	Cepa estándar de laboratorio; F-, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , λ- (Hanahan, 1983)
<i>R7B</i> (ATCC 90680), <i>Mucor circinelloides</i>	Auxótrofa a leucina derivada de la cepa ATCC 1216b (Roncero y col., 1989).
<i>MU402</i> , <i>Mucor circinelloides</i>	Derivada de la cepa <i>R7B</i> , <i>leuA-</i> <i>pyrG-</i> (Nicolás y col., 2007)
<i>MU628</i> , <i>Mucor circinelloides</i>	Derivada de <i>MU402</i> , mutante en el gen <i>arf3</i> -(ID155350) (En este trabajo)
<i>MU629</i> , <i>Mucor circinelloides</i>	Derivada de <i>MU402</i> , mutante en el gen <i>arf4</i> -(ID32250) (En este trabajo)
<i>Mu630</i> , <i>Mucor circinelloides</i>	Derivada de <i>MU402</i> , mutante en el gen <i>arf5</i> -(ID155647) (En este trabajo)

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmidos	Descripción
<i>pUC18</i>	Vector de alto número de copias, de 2686 pb, contiene 2 genes que actúan como marcadores de selección, un gen de resistencia a Amp ^R y una copia defectuosa de lacZ, que codifica para la β-galactosidasa, un MCS, y un origen de replicación pMB1 (Yanisch- Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>pMAT1573</i>	Plásmido de 5281 pb, resultante de clonar pUC18 con regiones 1 kb rio arriba y abajo del gen mcarf3 (ID155350, 2868 pb) con sitios EcoRV y SphI (En este trabajo)
<i>pMAT1574</i>	Plásmido de 5222 pb, resultante de clonar pUC18 con regiones 1 kb rio arriba y abajo del gen mcarf4 (ID32250, 2669pb) con sitios SacI y XbaI(En este trabajo)
<i>pMAT1575</i>	Plásmido de 5582 pb, resultante de clonar pUC18 con regiones 1 kb rio arriba y abajo del gen mcarf5 (ID155647, 2983 pb) con sitios SmaI y EcoRI(En este trabajo)
<i>pMAT1576</i>	Plásmido de 8148 pb, proviene de pMAT1573 al que se le ha realizado una PCR con los oligonucleótidos BgIII-FW-ARF3 y BgIII-REV-ARF3 y se ha clonado el gen <i>pyrG</i> con la enzima BgIII (En este trabajo)
<i>pMAT1577</i>	Plásmido de 8055 pb, proviene de pMAT1574 al que se le ha realizado una PCR con los oligonucleótidos BamHI-FW-ARF4 y BamHI-REV-ARF4 y se ha clonado el gen <i>pyrG</i> con la enzima BamHI
<i>pMAT1578</i>	Plásmido de 8176 pb, proviene de pMAT1575 al que se le ha realizado una PCR con los oligonucleótidos BgIII-FW-ARF5 y BgIII-REV-ARF5 y se ha clonado el <i>pyrG</i> con las enzima BgIII
<i>pMAT1579</i>	Plásmido de 8176 pb, proviene de pMAT1573 al que se le ha realizado una PCR con los oligonucleótidos PstI-FW-ARF3 y PstI-REV-ARF3 y se ha clonado el gen <i>Leu4</i> con la enzima PstI
<i>pEMP1</i>	Plásmido de 6348 pb que contiene el fragmento BamHI de 3.2 kb de <i>Mucor circinelloides</i> (tiene el fragmento BamHI- Ava II de 1.8 kb correspondiente al gen <i>pyrG</i>) clonado en pBluescript kSt. Cedido por A.P.Eslava.

8.4 Análisis de Imágenes tomadas al microscopio de *M. circinelloides*

Se empleó un microscopio Olympus CKX41 para capturar las imágenes correspondientes a las morfologías obtenidas a los diferentes tiempos de crecimiento, fueron tomadas usando el objetivo 40X, también se utilizó una cámara Panasonic DMC-T25.

9. Manipulaciones de ácidos nucleicos y transformaciones

9.1 Extracción y cuantificación de RNA de *M. circinelloides*

La extracción de RNA se realizó de muestras de distintos tiempos de crecimiento que incluyeron micelio, levaduras, esporas o muestras de las transiciones morfológicas de *Mucor circinelloides* que fueron filtradas a través de papel filtro whatmann (para el caso de micelio) o membranas 0.45µm Millipore (para las otras morfologías), las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento, el cual se realizó posterior a la filtración de las células.

La lisis celular se realizó mediante rompimiento con nitrógeno líquido, empleando un mortero con pistilo. Para realizar la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante (SV RNA total Isolation kit, PROMEGA), empleando la micro centrifuga 5417R (Eppendorf).

Todas las manipulaciones de muestras de RNA, como extracción, diluciones, tratamiento con DNAsa fueron realizadas en el gabinete de bioseguridad clase II Tipo A2 (Thermo Scientific). Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a $\lambda=260\text{nm}$ y $\lambda=280\text{nm}$, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (Krebs y col., 2009). De manera que se evaluó la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$, una relación $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.90 - 2.0$ indica una calidad óptima de extracción (Yamaguchi y col., 1992; Wilfinger y col., 1997). Las muestras de RNA total cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR.

9.2 Tratamiento con DNAsa I de las muestras de RNA de *M. circinelloides*

A 1 µg total de RNA se le agregó 1 µl (1U) de DNAsa I (DNAsa I, Invitrogen), 1 µl de buffer de reacción de DNAsa (200mM Tris-HCl pH 8.4, 20mM MgCl₂, 500mM KCl, Invitrogen). La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La DNAsa se inactivó al agregar 1 µl de EDTA 25 mM (Invitrogen) a la muestra de RNA y posterior incubación a 65°C durante 10 minutos, para ello se empleó un incubador para microtubos de 2 ml (Eppendorf Thermomixer).

9.3 Ensayo de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) de muestras de *M. circinelloides*

La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas (**Tabla 3**) con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 µl de volumen de reacción contenía 5 µl de RNA templado (100 ng), 0.5 µl de mezcla de enzimas, 12.5 µl de mezcla de reacción 2X, 0.5 µl de oligonucleótido directo 10 µM, 0.5 µl de oligonucleótido reverso 10 µM, 0.5 µl de sonda 5 µM, y 5.5 µl de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP). La RT-qPCR se inició por la adición de la transcriptasa reversa (50°C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 min), seguidas por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm. En cada experimento fueron incluidos genes de expresión constitutiva como controles positivos y agua como control negativo.

Tabla 3. Oligonucleótidos y sondas empleados para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5´-3´) Oligonucleótido reverso (5´-3´) Sonda (5´-3´) FAM-BHQ1	Tm(°C) / GC (%)
	TTGGACGCTGCAGGAAAGAC	68.0/55.0
arf1(155350)	CCAACGGTTGGGATAGTAGTGA	65.1/50.0
	TCTCTACAAGCTGAACTGAACCAATCA	68.7/39.29
	GGACCTTCCAGGAGCATTTACAC	67.0/52.17
arf2 (32250)	CGCAGGAAGGATGCACATACC	69.0/57.14
	TGCAGAAGTTACTGAAATACTGGGTCTGA	69.3/41.38
	GCCCAATGCCATGAATGC	67.9/55.56
arf3 (157293)	GGTAGCACAAGTGGTCTGGAT	63.4/52.38
	TGCTGAAATCACCGATAAGCTTGGTC	71.5/46.15
	TGCCAACAAGCAGGATTTGC	68.6/50
arf4 (156501)	GGAGTGAAGGCCAAGTTTATCAG	65.1/47.83
	CAACGCCATGAACGCTGCCGAAAT	77.5/54.17
	AGCAGGATATGGAAGGCGCTTTATC	69.7/48
arf5 (155647)	TGCACTGGTTCTGTAGATGGA	63.8/47.62
	CTGCAGAAGTGGCCGATGCACTC	74.3/60.87
	TTGGCGGAACAAGAATTGCA	68.9/45.0
arf6 (112008)	GCTGCACCCAATGATCCTTTTC	68.1/52.38
	TGATGGATAGCGATCAACTACAAAATGCCA	73.9/40
	ATGGCGGTGACGAGGGTTT	69.2/57.89
Mctfc-1 (106349)	GGGCATCTGTGGCAATCTTTTC	68.1/52.38
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	74.1/52

9.3.1 Determinación de las eficiencias de amplificación de las sondas usadas en los ensayos de RT-qPCR

Las eficiencias de amplificación de RT-qPCR para cada gen, fueron determinadas mediante los valores de Cq (Cq es el valor donde la curva de amplificación de la reacción pierde linealidad y adopta una tendencia exponencial) correspondientes a la amplificación para cada uno de todos los genes usando las siguientes concentraciones de RNA total por reacción: 500 ng, 50 ng, 5 ng, 0.5 ng, 0.05 ng. Estos datos se utilizaron para generar una curva estándar de concentración, en donde se graficaron los \log_{10} de concentración con sus Cq correspondientes. Se trazó una recta que une estos puntos. Y se determinó la pendiente de dicha recta

La eficiencia de amplificación se calculó de la siguiente manera:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}} \right)} - 1 \right) \times 100$$

9.3.2 Análisis matemático de los niveles de expresión relativa en los ensayos de RT-qPCR

El modelo matemático empleado para los análisis de datos fue el Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001), con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001). Mediante esta fórmula se puede saber el número de transcrito del gen de interés de manera relativa al gen (o genes) normalizador (normalizadores) en cierta condición.

La fórmula empleada es la siguiente:

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{2^{(E_{\text{gen interés}})(Cq_{\text{gen interés}})}}{2^{(E_{\text{gen normalizador}})(Cq_{\text{gen normalizador}})}}$$

Donde E significa eficiencia de amplificación y los Cq del gen de interés y del gen normalizador corresponden al mismo estadio morfológico.

9.4 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. Además, la prueba post hoc empleada fue Fisher para el análisis de los genes *arf*, las diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) se muestran con letras, en los experimentos de participación de los genes *arf* en el dimorfismo de *M. circinelloides* la prueba post hoc empleada fue Bonferroni, las diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) se muestran con asteriscos.

9.5 Aislamiento de DNA genómico de *M. circinelloides*

El DNA de *M. circinelloides* se aisló siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984), con ligeras modificaciones. La extracción de DNA se realizó de muestras de micelio de *Mucor circinelloides* que fueron filtradas a través de papel filtro whatmann, las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento, el cual se realizó posterior a la filtración de las células. La lisis celular se realizó mediante rompimiento con nitrógeno líquido, empleando un mortero con pistilo. Se agregaron 0.4 mL de regulador de extracción (NaCl 0.4M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8) a aproximadamente 0.5 mL de polvo (muestra) contenidos en un microtubo, posteriormente se adicionaron 80 uL de SDS al 10%, seguido de 8 uL de proteínasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 60°C, enseguida se adicionó 320 uL de NaCl 5M. Posteriormente se centrifugó la muestra por 30 minutos a 12,000Xg. Se colectó el sobrenadante en tubo nuevo, se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 12,000Xg, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12,000Xg, se retiró el exceso de etanol y se procedió a secar la muestra de DNA a 37°C, finalmente se resuspendió en 50 uL de agua estéril y 3 uL de RNAasa, dejando incubar por 10 minutos a 37°C, las muestras de DNA fueron conservadas a -70°C.

9.6 Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos.

Para observar la integridad de la extracción de RNA y los amplicones generados por el ensayo de RT-qPCR, los geles de agarosa fueron preparados al 1 % (p/v) con agarosa grado molecular (BIO RAD) y buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA (1 mM). Se agregó bromuro de etidio (0.075 µl/ml de gel). Se montó el gel y las muestras se cargaron en una cámara de electroforesis (BIO RAD) conectada a una fuente de poder (PowerPac Basic, BIO RAD 300 V). Se empleó un buffer de carga que tiene glicerol (30% p/v), xilencianol (0.25% p/v) y azul de bromofenol (0.25% p/v) como colorantes de referencia. El marcador de tamaño molecular empleado fue el de 1 kb DNA Ladder Track-It (Invitrogen). Las condiciones de corrida fueron 90 V durante 30 minutos. El registro de la imagen del gel se obtuvo mediante el empleo de un foto documentador (Gel Doc XR+ Imager, Bio-Rad). Los geles para corrimientos de RNA fueron llevados a cabo con material y reactivos esterilizados dos veces. Mientras que las cámaras, moldes para geles y peines fueron lavados con solución degradadora de ribonucleasa (RNase Zap, Ambion), para posteriormente removerla con H₂O destilada estéril.

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño generados en las digestiones con enzimas de restricción o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el DNA se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó buffer TAE 1X y las concentraciones de agarosa variaron entre 0,7 % y 1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta se añadió Bromuro de etidio a la agarosa a una concentración final de 0,5 µg/ ml.

La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en geles de agarosa. Las porciones del gel que contenían los fragmentos de interés se recortaron con un bisturí y el DNA se purificó con columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y el tamaño de los plásmidos y fragmentos lineales purificados se calculó usando como referencia los marcadores λ DNA/*HindIII* (Fermentas) y GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), respectivamente.

10. Delección génica mediante recombinación homóloga en *M. circinelloides*.

Se amplificó mediante PCR el gen *Arf* de *Mucor circinelloides* de nuestro interés para interrumpir, y por otro lado amplificar por PCR el gen que permita la selección de transformantes, *pyrG* que codifica para la enzima orotina-5-fosfato carboxilasa, y restaura la auxotrofia a uracilo, de manera que se puedan obtener fragmentos del gen *Arf* para poder flanquear el gen *pyrG* que permite la selección, mediante dicha construcción permitió la transformación de protoplastos de *M. circinelloides* MU402, posteriormente se hizo la selección de transformantes bajo la condición selectiva correspondiente al marcador de selección, seguido de la identificación mediante PCR, para determinar el evento de integración homóloga.

10.1 Transformación de *E. coli*.

Para introducir DNA plasmidico en *E. coli* es necesario que las células se encuentren en un estado especial denominado de competencia. La obtención de células competentes de la estirpe DH5 α se realizó por el procedimiento del cloruro cálcico. Para la transformación se utilizó el procedimiento de choque térmico y electroporación (*Sambrook y Russell, 2001*).

10.2 Transformación de *M. circinelloides*.

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (*Gutiérrez y col. 2011*), generados básicamente según el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984). Los protoplastos, al carecer de pared celular, permiten la incorporación de DNA exógeno, en este caso mediante electroporación. Para obtener protoplastos transformables se inocularon 10⁷ esporas/ml en 25 ml de medio líquido YPG pH 4,5 suplementado, cuando se requería, con 0,2 mg/ml de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente antes de incubarse toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación fuerte (250 r.p.m.) durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las esporas se precipitaron durante 5 minutos a 2000 r.p.m. en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en buffer fosfato-sorbitol (Sorbitol

0,5 M, fosfato sódico pH 6,5 10 mM), para resuspenderse finalmente en este mismo buffer a razón de 5 mL por cada 10^7 esporas. Para la digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/ml de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0,15 mg/ml de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals). Las germínulas se incubaron a 30°C con agitación suave (60 r.p.m.) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de la envoltura refringente. Para parar la digestión se añadieron 5 ml de sorbitol 0,5 M, se centrifugó durante 5 minutos a 900 r.p.m., resuspendiendo nuevamente en 5 ml de sorbitol 0,5 M y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 μ l de sorbitol 0,5 M. Para la transformación se añadieron 10 μ l de DNA (1 μ g de DNA circular o 3 μ g de DNA lineal) a 100 μ l de protoplastos y la mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en el electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros de electroporación: 0,8 KV, 25 μ F de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω .

Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico se añadió 1 ml de YPG pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol frío y se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Las mezclas de transformación se incubaron durante 1 hora a 26°C con una agitación de 150 r.p.m para permitir la recuperación de los protoplastos. Seguidamente, los protoplastos se centrifugaron durante 5 minutos a 1100 r.p.m., resuspendiéndose el precipitado en 600 μ l de MMC pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol. Esta solución se sembró cuidadosamente en cajas del medio adecuado para la selección de los transformantes.

10.3 Integración de DNA exógeno en el genoma de *M. circinelloides*.

La transformación integrativa en el hongo *M. circinelloides* se realizó transformando protoplastos del hongo por el procedimiento descrito en el apartado anterior, empleando DNA linearizado. Los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3,2 con 0,5 M de sorbitol. Para identificar los transformantes que

habían integrado el DNA exógeno se determinó el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG* durante cinco ciclos de crecimiento en medio selectivo. Para ello, se comparó el número de individuos resultantes de la siembra en medio selectivo (MMC pH 3,2) y no selectivo (MMC pH 3,2 con uridina). Los transformantes con un mayor porcentaje de esporas Ura+ se seleccionaron como presuntos portadores del DNA integrado. Para el aislamiento de individuos con el DNA exógeno integrado en todos los núcleos (homocariontes) se realizaron de 5 a 6 pases en medio selectivo.

10.4 Aislamiento de DNA plasmidico.

El DNA plasmidico de *E. coli* se aisló por el procedimiento de lisis alcalina (Holmes y Quigley, 1981) cuando no se necesitaba gran pureza (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *M. circinelloides*, etc.) o mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Applied Science o GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) cuando se requería una gran pureza (secuenciación, PCR).

10.5 Tratamiento del DNA con enzimas.

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

Digestión con enzimas de restricción (Fermentas), que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Desfosforilación del extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) para evitar la autoligación de vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Ligación de fragmentos de DNA. Se realizó en volúmenes pequeños (20 ul) de buffer de ligación (Fermentas) y una unidad de la enzima ligasa de T4 (Fermentas). Las mezclas de ligación se incubaron a 22°C durante un mínimo de 4 horas. En general, la relación molar de vector: inserto usada fue de 1:3. Siempre que fue necesario, las enzimas se inactivaron por medio de calor, siguiendo las especificaciones del fabricante.

10.6 Amplificación de DNA por PCR

El proceso de amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido y la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 94°C para la desnaturalización del DNA y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los oligonucleótidos (**Tabla 4**), utilizando la fórmula $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C \%) - 650/\text{pb cebador}$) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. Dada la riqueza en pares G+C de *M. circinelloides*, en todos los casos se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 5 %. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR.

Secuencia	Oligonucleótidos(5´-3´)	T _m (°C)/ GC (%)
FW-ARF3	TATAACCCAGTAGCGCCTTCACC	62.29/52
RV-ARF3	TTCCACCCTCACCGTCATCTGC	67.4/59
BgIII-FWD-ARF3	GAAGG AGATCT TCAAGGCTTGAATTGGTTGAG	70.25/44
BgIII-REV-ARF3	GAATA AGATCT TCTTTGCTACCAAACATCTTGG	66.18/36
SacI-FW-ARF4	CTCTG GAGCTC TTGAGGTCATCCTCATCCAGC	74.64/56
XbaI-RV-ARF4	TGCAT TCTAGAT GGATTGATTGAAGCATTTCG	69.60/38
BamHI-FWD-ARF4	TGGTA GGATCC TCCTTCCTGCGCTACCACAGG	76.68/59
BamHI-REV-ARF4	ATCTT GGATCC CGCCTTTGACATATTGGCTCC	75.37/55
FW-INT-ARF4	GTGGTGTAGGTTCCAAATAGC	54.79/48
RV-INT-ARF4	GCTTCATCAACAAAGGACTGC	58.37/48
FW-SMAI-ARF5	ACTAG CCCGGG GCAGGAATCCACTGTGAGTAC	75.92/59
RV-ECORI-ARF5	TACGT GAATTC ATGAACCTAATCCACGCACAG	71.51/44
FW-BGLII-ARF5	AACAA AGATCT GTTTCATTTCCAGCACACATG	69.59/38
RV-BGLII-ARF5	GCGTC AGATCT ACCCATTTGATATGTTTATAC	64.31/38
FW-INT-ARF5	GCAACATCGTATAACCCATC	53.94/45
RV-INT-ARF5	GGACAGATTATTCCTTCTCTC	50.66/43

Los nucleótidos marcados en rojo indican sitios de restricción para facilitar la digestión.

11. Hibridación de DNA tipo Southern.

El DNA genómico (1 µg) se digirió con las enzimas de restricción adecuadas y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 20-25 minutos en una solución de HCl 0,4 N, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20-25 minutos en una solución de NaOH 0,4 N. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0,4 N durante un mínimo de 2 horas (*Sambrook y Russell, 2001*). Una vez transferido, se secó el filtro a temperatura ambiente. La hibridación se realizó en todos los casos con sondas marcadas radiactivamente. La prehibridación se llevó a cabo a 65°C un mínimo de 2 horas con 20 ml de solución de prehibridación NaCl y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche con 10 ml de solución de hibridación (NaCl 0,9 M, SDS 1 %, 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado), a la que se añadió la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C) y enfriada rápidamente en hielo.

Las condiciones de lavado fueron: un primer lavado con una solución 2x SSC con 0,1 % de SDS a temperatura ambiente durante 1-2 minutos para eliminar el exceso de radiactividad, un segundo lavado de 20 minutos a 65°C con esa misma solución, un tercer lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 1x SSC con 0,1 % de SDS y un cuarto lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,5x SSC con 0,1 % de SDS. Tras este lavado se checkaron las membranas con un contador Geiger para valorar la conveniencia de aplicar un último lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,1x SSC con 0,1 % de SDS. Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak® BioMax™ MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a -70°C. En algunos casos las membranas se expusieron a pantallas Phosphorimager BAS-MP2040 (Fujifilm) que fueron escaneadas en el lector Molecular Imager FX (BioRad).

11.1 Marcado de fragmentos de DNA.

El DNA que se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación tipo Southern y se marcó mediante la introducción del nucleótido dCTP marcado con fósforo-32 (^{32}P) en la posición α (Easytides® Deoxycytidine 5'-Triphosphate, [α - ^{32}P], Perkin Elmer) (*Feinberg y Vogelstein, 1983*). El marcado se realizó con el kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para detener la reacción de marcado se añadieron 50 μl de agua bidestilada a la reacción. A continuación se pasó toda la solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 3 minutos a 2.000 r.p.m. para eliminar los nucleótidos no incorporados, que quedan retenidos en la columna.

12. Resultados

12.1 Identificación de las proteínas Arf en *M. circinelloides*

Actualmente, se encuentra disponible la información correspondiente a la secuencia del genoma de *M. circinelloides*, lo que supone una importante ventaja metodológica, esto debido a que los análisis bioinformáticos son herramientas valiosas en identificación de secuencias, análisis filogenéticos, modelado molecular y estudio de compuestos hipotéticos (Vedani y Smiesko, 2009). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas como alineamientos tipo BLAST, y reconocimiento de dominios conservados se identificaron distintas secuencias con cierta identidad a proteínas Arf en *M. circinelloides* cuando fue usado como sonda a ARF1 de *S. cerevisiae*. Se identificaron en *M. circinelloides* 23 secuencias (Tabla 5), que mostraron desde un 25% de identidad o más con las proteínas ARF de *S. cerevisiae* y ArfB de *A. nidulans*.

12.2 Alineamiento de las probables proteínas Arf de *M. circinelloides*

Aunado al primer criterio de inclusión anteriormente mencionado y con la finalidad de determinar los motivos y dominios característicos de las proteínas Arf en las 23 secuencias de aminoácidos seleccionadas previamente de *M. circinelloides*, se realizó un alineamiento de las dichas secuencias encontradas y fueron comparadas con las secuencias de aminoácidos ARF1-3 de *S. cerevisiae*, ArfB de *A. nidulans* y ARF6 de humano, con este criterio se encontraron seis secuencias en *M. circinelloides* que presentan los dominios característicos de proteínas Arf (Figura 5). El motivo MGXXXS en el extremo amino terminal y la presencia de la glicina en la segunda posición, la cual es el sitio canónico de miristilación predicho para todas las proteínas Arf descritas hasta la fecha. El peso molecular predicho es alrededor de 20 kDa de cada una de las 6 supuestas proteínas Arf de *M. circinelloides*, además de encontrarse regiones consenso que están involucradas en unión al nucleótido de guanina, los sitios de interacción con proteínas tipo GEF y GAP, además de la presencia de una región central, común en las proteínas Arf conocidas TVWDVGGQD (Vaughan y col. 1990), nos sugieren

que estas 6 proteínas de *M. circinelloides* posiblemente pertenecen a proteínas tipo Arf.

Tabla 5. Identificación en *M. circinelloides* de proteínas con cierta identidad a proteínas Arf ya descritas.

PROTEINA (Numero de ID)	Numero de aminoácidos	P.M. (KDa)	ScARF1 (CAA98769)	ScARF3 (CAA99291)	AnArfB (AN5020)
Mc(157293)	181	20.7	80.9	57.1	63.7
Mc(156501)	181	20.7	78.7	55.9	63.1
Mc (155350)	188	21.3	62	62.7	74.9
Mc (32250)	184	21	60.7	61.6	73
Mc(155647)	201	22.8	59.4	49.2	55.3
Mc(112008)	180	20.1	50.3	48.3	44.5
Mc(109853)	185	20.8	38.4	43.8	32.8
Mc(153030)	183	20.7	36	34.9	34.1
Mc(154740)	187	21.2	34.9	32.9	32.7
Mc(155041)	206	22.9	34.1	24.4	27.7
Mc(49041)	198	22.4	30.8	33.5	37.1
Mc(155352)	234	25.4	30.8	27.6	26.3
Mc(10955)	168	19.5	29.2	27.4	23.9
Mc(156831)	168	19.2	29.2	24.6	23.9
Mc(150775)	205	22.9	28.9	32.2	24
Mc(176169)	210	23.7	28.8	36.7	26.7
Mc(45435)	203	22.6	28.2	25.2	28
Mc(184378)	210	23.5	25.7	27.6	22.5
Mc(156855)	210	23.5	25.7	25	22.5
Mc(154773)	356	40.9	24.6	29.3	27.9
Mc(142505)	352	40.7	22.3	25.3	24
Mc(154655)	320	40	28	29.2	26.9
Mc(32511)	357	41.5	26.3	26.3	27.9

Se representan números de acceso, número de aminoácidos, Peso Molecular (P.M.) y porcentajes de identidad de las secuencias identificadas en el genoma de *M. circinelloides* como probables Arf, respecto a las proteínas ARF1 y ARF3 de *S. cerevisiae* y ArfB de *A. nidulans*.

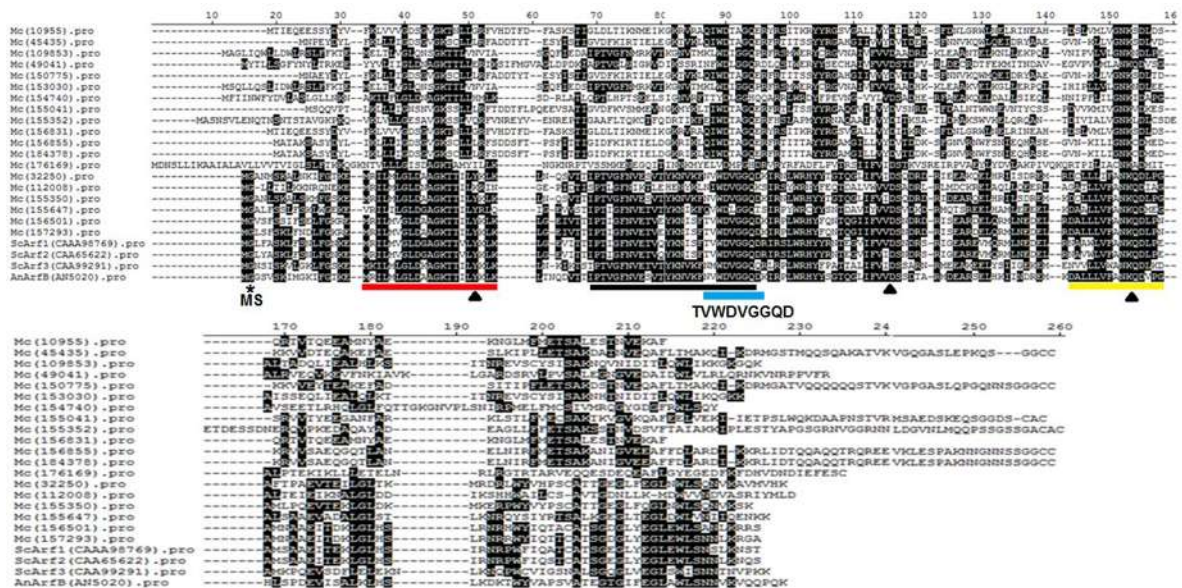


Figura 5. Alineamiento de las probables proteínas Arf de *M. circinelloides*. Las secuencias 23 secuencias de aminoácidos previamente identificadas en *M. circinelloides* fueron alineadas mediante Clustal, se incluyeron a manera de comparación, las secuencias de las proteínas ARF1-3 de *S. cerevisiae* y ArfA, ArlA y ArfB de *A. nidulans*. Se muestran con las letras MS el sito de miristilación resaltando el residuo de Gli-2 con una estrella, susceptible de ADP-ribosilación por la toxina cólera (*Freissmuth y Gilman, 1989*). Además los dominios de unión a guanina se muestran en triángulos, en barras en color rojo regiones de interacción con proteínas GEF, en barras de color negras regiones de interacción con efectores, en barras de color amarillas regiones de interacción con proteínas GEF, y en barra de color azul la región consenso en las proteínas Arf conocidas TWWDVGGQD.

12.3 Probables proteínas Arf en *M. circinelloides*

Fueron identificados seis genes que codifican para probables proteínas Arf en *M. circinelloides* (*arf1-arf6*). Estos genes presentan una cantidad y distribución de exones e intrones diferente, lo que indica que se tratan de genes distintos, la única excepción es *arf1* y *arf2* que muestran sus orf un tamaño, número y distribución de exones e intrones similar, (**Figura 6**). Las distintas secuencias Arf identificadas en *M. circinelloides* fueron empleadas como sondas para una búsqueda de secuencias de proteínas Arf en hongos depositadas en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para lo cual se utilizó la herramienta Blastp (Altschul y col., 1997), con $e=10^{-10}$, empleando la base de datos de proteínas no redundantes (Non-redundant protein sequences nr) y se restringió la búsqueda al tipo de organismo deseado (hongos), usando la matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, 1993) se generó una tabla representativa de cada phylum (**Tabla 6**). Encontrado de 3 a 7 proteínas probables Arf en ascomicotas, de 4 a 7 miembros en basidiomicotas y de 5 a 7 miembros en zigomicotas.

Tanto el alineamiento, como el análisis de dominios y motivos de las proteínas Arf, nos indica que las proteínas identificadas en *Mucor circinelloides* (Arf1-Arf6) cuentan con los elementos que sugieren que se tratan de proteínas Arf (**Figura 7**). Además es probable que algunos de los genes *arf* de *M. circinelloides*, puedan ejercer funciones redundantes pues presentan porcentajes de identidad similares como son los casos de las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides* además de las proteínas Arf3 y Arf4 (**Tabla 7**), por otra parte existen dos proteínas nombradas como Arf5 y Arf6 de *M. circinelloides* donde la secuencia Arf5 mantiene un porcentaje superior al 65% de identidad con las proteínas Arf miembros de la familia Arf (**Tabla 8**).

12.4 Modelado tridimensional de proteínas Arf de *M. circinelloides*

Con la finalidad de verificar la estructura tridimensional hipotética de las proteínas Arf identificadas en *M. circinelloides* como parte del criterio de identificación de las proteínas, se realizó la comparación de las estructuras

cristalinas predichas para las proteínas Arf de *M. circinelloides* en relación a ARF1 de *S. cerevisiae*, la cual es una estructura cristalina ya determinada (Click y col. 2002). Se empleó el programa SWISS MODEL. Observando la orientación y presencia de estructuras terciarias características, las cuales consisten en láminas β y hélices α muy similares a la proteína ARF1 de *S. cerevisiae*, y la presencia de dominios característicos de las proteínas hipotéticas de *M. circinelloides* se sugiere que efectivamente se tratan de proteínas Arf (Figura 8).






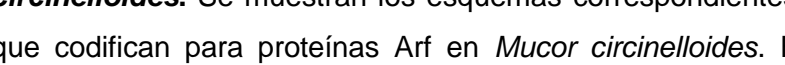
Nombre (ID secuencia)	Tamaño (pb)	MW (kDa)	Tamaño de Amplicón (pb)
arf1 (157293) 	892pb	20.69	94
arf2 (156501) 	985pb	20.67	70
arf3 (155350) 	872pb	21.33	71
arf4 (32250) 	669pb	20.95	96
arf5 (155647) 	963pb	22.83	101
arf6 (112008) 	909pb	20.1	97

Figura 6. Regiones exónicas, intrónicas en secuencias probables Arf de *Mucor circinelloides*. Se muestran los esquemas correspondientes a los seis genes (*arf1-arf6*) que codifican para proteínas Arf en *Mucor circinelloides*. En paréntesis se muestra el número de acceso del gen, se muestra a la derecha el número de pares de bases correspondientes al marco de lectura abierto, el peso molecular en kilodaltones y el tamaño del amplicón producto de RT-PCR, y la distribución de los exones en color rojo, intrones en color amarillo, oligonucleótidos utilizados en ensayo de RT-qPCR en puntas de flecha color azul y sondas en cuadros color verde. Los marcos de lectura abiertos no están representados a escala.

Tabla 6. Probables proteínas ARF identificadas en hongos.

Organismo	Phylum	Numero
<i>Arthroderma otae</i>	Ascomicota	7
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomicota	6
<i>Botrytis cinerea</i>	Ascomicota	5
<i>Candida albicans</i>	Ascomicota	7
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense race</i>	Ascomicota	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomicota	3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomicota	4
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	Basidiomicota	7
<i>Laccaria bicolor</i>	Basidiomicota	7
<i>Rhizoctonia solani</i>	Basidiomicota	7
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomicota	4
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomicota	6
<i>Mucor circinelloides</i>	Zigomicota	6
<i>Rhizopus oryzae</i>	Zigomicota	5
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	Zigomicota	7

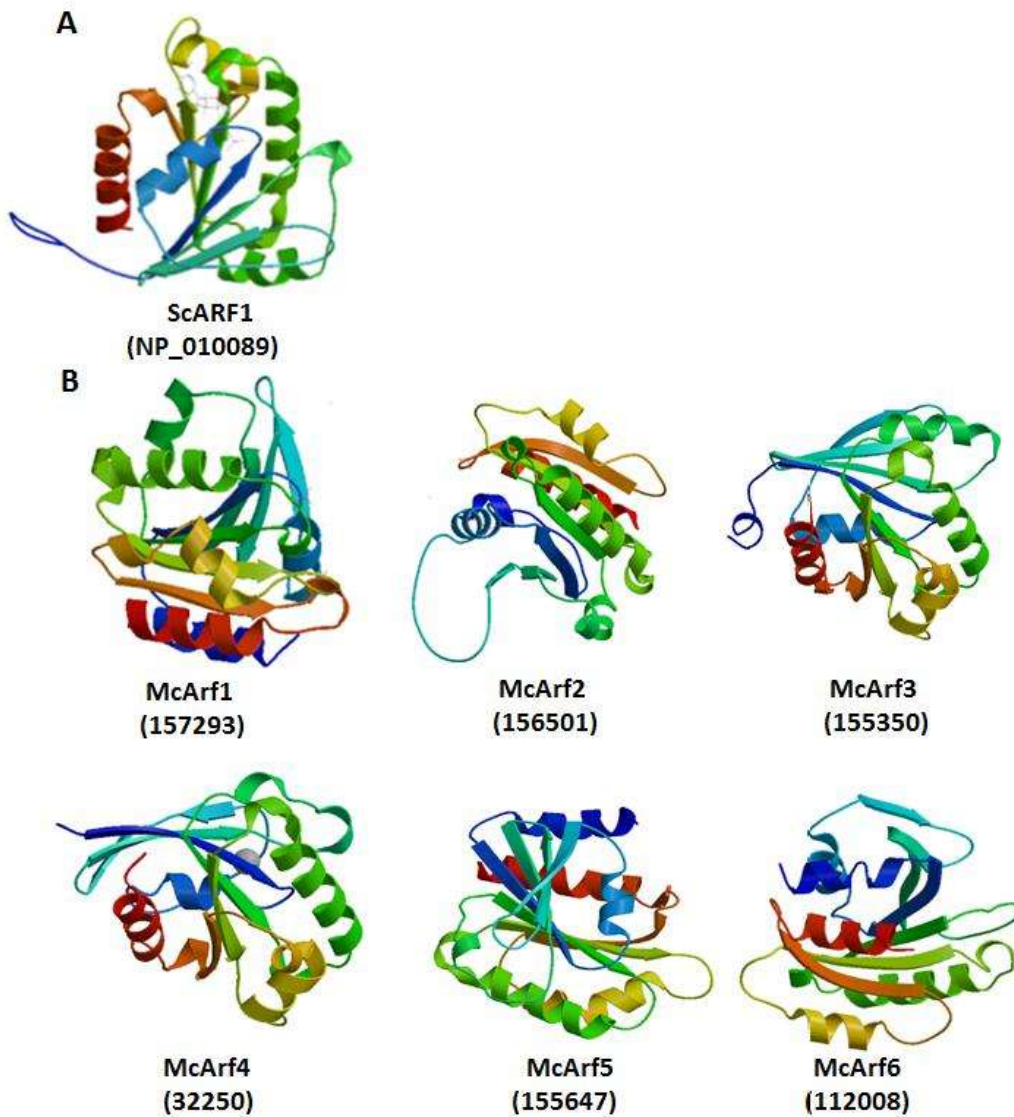


Figura 8. Estructuras tridimensionales predichas para las proteínas Arf identificadas en *M. circinelloides*. A. Estructura de ARF1 (*S. cerevisiae* NP_010089) de *Saccharomyces cerevisiae* determinada previamente por cristalografía (Click y col. 2002). **B.** Se muestran las estructuras predichas para las proteínas Arf identificadas en *M. circinelloides* (Arf1-Arf6); la determinación fue hecha en el programa SWISS Model (Arnold y col. 2006).

Tabla 7. Identidades de las probables proteínas Arf de *M. circinelloides*

Proteínas Arf				% IDENTIDAD					
Nombre	Número de Aminoácidos	P.M. (KDa)	P.I.	Arf1	Arf2	Arf3	Arf4	Arf5	Arf6
Arf1	181	206.93	6.39	100	95.5	66.3	66.3	60.7	52.6
Arf2	181	206.74	6.15	95.5	100	65.6	65.2	61.8	51.4
Arf3	188	213.39	8.98	66.3	65.6	100	88.8	55.1	48.6
Arf4	184	209.51	8.98	88.8	65.2	88.8	100	52.2	49.7
Arf5	201	228.39	5.70	60.7	61.8	55.1	52.2	100	56.3
Arf6	180	201.09	6.12	52.6	51.4	48.6	49.7	56.3	100

Tabla 8. Identidad entre las proteínas Arf de *M. circinelloides* con proteínas Arf y Arl caracterizadas.

Proteínas Arf	% IDENTIDAD					
Nombre	ScARF1	ScARF3	AnArfB	HsARF6	ScARL1	AnArl
Arf1	80.9	57.1	63.7	70.9	56.4	57.3
Arf2	78.7	55.9	63.1	71.3	58	57.3
Arf3	62	62.7	74.9	78.3	53.6	51.7
Arf4	60.7	61.6	73	80	52.5	51.4
Arf5	59.4	49.2	55.3	53.6	73.1	65.2
Arf6	50.3	48.3	44.5	47	54.9	56.3

Se representan las proteínas ARF1, ARF3 y ARL1 de *S. cerevisiae* (Sc), las proteínas ArfB y Arl de *A. nidulans* (An) y las proteínas ARF6 y ARL de *Homo sapiens* (Hs).

13. Análisis de expresión de los genes *arf* en *M. circinelloides*

Se diseñaron los oligonucleótidos y sondas (Sonda de Hidrólisis) para la cuantificación de los niveles de transcrito de cada gen *arf* de *M. circinelloides* (**Figura 6**). Se evaluó la estabilidad de expresión de las sondas correspondientes a los genes de interés y se usó como gen normalizador *mctfc-1*, el cual fue estudiado previamente en el grupo de trabajo demostrando su expresión constitutiva durante el dimorfismo de *M. circinelloides* (Valle-Maldonado y col. 2015).

13.1 Determinación de eficiencias de amplificación de las sondas *arf* de *M. circinelloides* utilizadas en el ensayo de RT-qPCR

Se calcularon las eficiencias de amplificación para el gen normalizador y los genes que codifican para proteínas Arf, ya que en los cálculos de los niveles de expresión se toma en cuenta la corrección de eficiencias de amplificación en la fórmula matemática (Pfaffl, 2001). Se ejemplifica con el gen *mctfc-1* la obtención de la pendiente de la curva estándar, que es un valor requerido para el cálculo de la eficiencia de amplificación, como se explica en Materiales y Métodos (**Figura 9, Tabla 9**), se muestran los porcentajes de eficiencia de las sondas de los genes *arf* los cuales son superiores al 80% en todos los casos, indicando que son válidas para los posteriores estudios.

13.2 Expresión de los genes que codifican a proteínas Arf en *M. circinelloides* durante el dimorfismo

Se analizaron los niveles de transcrito de los genes que codifican para proteínas Arf durante el dimorfismo en *M. circinelloides* mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real en las siguientes condiciones morfológicas: esporas, 3, 6 y 12 horas para crecimiento micelial y levaduriforme (ver Materiales y Métodos) en donde se registraron los valores de Cq correspondientes a los diferentes genes *arf* (*arf1-arf6*), en *M. circinelloides*. Posteriormente, se compararon los diferentes Cq mediante la fórmula del Δ -Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de las eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001), y a *mctfc-1* como normalizador, se generó el gráfico de expresión de los genes *arf* de *M. circinelloides* como se observa en la **Figura 10**. Donde se puede observar que la expresión de los genes *arf* se lleva a cabo en todos los estadios de desarrollo.

Tabla 9. Porcentajes de eficiencia para los genes *arf* de *M. circinelloides* y el gen normalizador *tfc-1*

Gen	Eficiencia (%)
<i>arf1</i>	98.15
<i>arf2</i>	93.87
<i>arf3</i>	96.49
<i>arf4</i>	100
<i>arf5</i>	85.05
<i>arf6</i>	96.45
<i>tfc-1*</i>	91

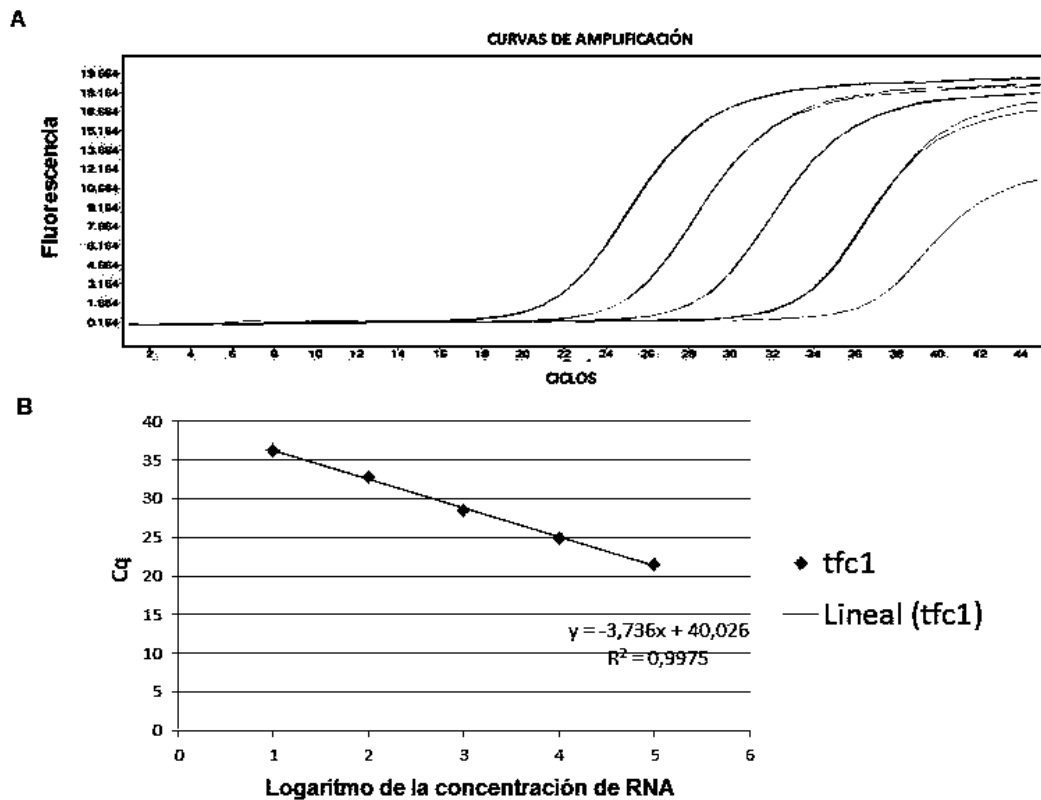


Figura 9. Distribución de Cq para diferentes concentraciones de RNA total para *mctfc-1*. **A.** Curvas de amplificación de RT-qPCR, se emplearon como plantillas concentraciones de RNA total de 500, 50, 5, 0.5 y 0.05 ng. **B.** Gráfica con escala logarítmica donde el punto 5 es para la concentración de 500 ng es, el punto 4 para 50 ng es, y así sucesivamente, mostrando línea de tendencia con su pendiente y R².

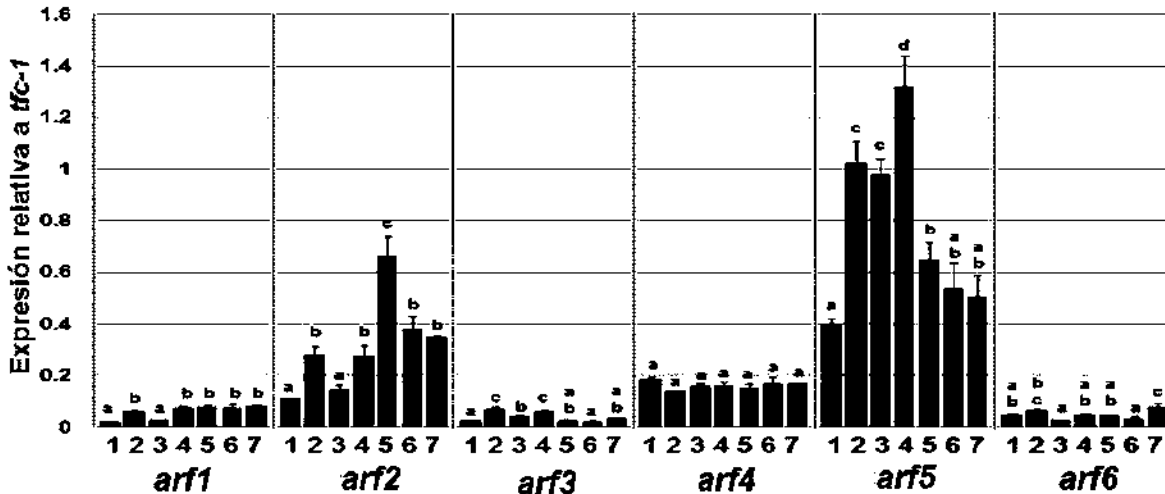


Figura 10. Análisis de expresión de los genes *arf* durante el dimorfismo de *M. circinelloides*. Se midieron los niveles de transcrito de los genes *arf1-arf6* de *M. circinelloides* durante el dimorfismo mediante RT-qPCR. Los estadios morfológicos estudiados fueron: 1.Esporas, 2,3 y 4. Crecimiento en aerobiosis (3, 6 y 12 horas), 5, 6 y 7. Crecimiento en anaerobiosis (3, 6 y 12 horas). Los niveles de transcrito están en relación al gen normalizador *tfc-1*. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes, las barras corresponden al error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con letras. Análisis ANOVA, prueba de Fisher, $p < 0.05$.

Cabe destacar que se observó un nivel de expresión mayor para *arf5* en prácticamente todos los estadios respecto al resto de los genes *arf*. Algunos genes son expresados mayormente en el crecimiento micelial como son los genes *arf3* y *arf5*, mientras que los niveles de transcrito del gen *arf2* se acumula en el estadio *levaduriforme*. Sin embargo los genes *arf1*, *arf4* y *arf6* parecen no ser modulados durante el proceso dimorfo, todo lo anterior nos permitió elegir como primer candidato a interrumpir al gen *arf5*, debido a que los niveles de RNAm de este gen fueron 12 veces mayor en la condición de micelio de 12 horas con respecto a la expresión en espora del gen *arf1*, quien presenta la menor expresión en esta condición. Por otro parte, fue de nuestro interés llevar a cabo la delección de los genes *arf3* y *arf4* para demostrar su participación en el dimorfismo de *M. circinelloides* ya sus productos presentaron un porcentaje alrededor de un 75% de

identidad con la proteína ArfB de *A. nidulans*. ArfB presentaba una función sobre el crecimiento polarizado, además sus secuencias de aminoácidos está estrechamente relacionada con ARF3 de *S. cerevisiae* como se puede apreciar en el dendograma (**Figura 11**).

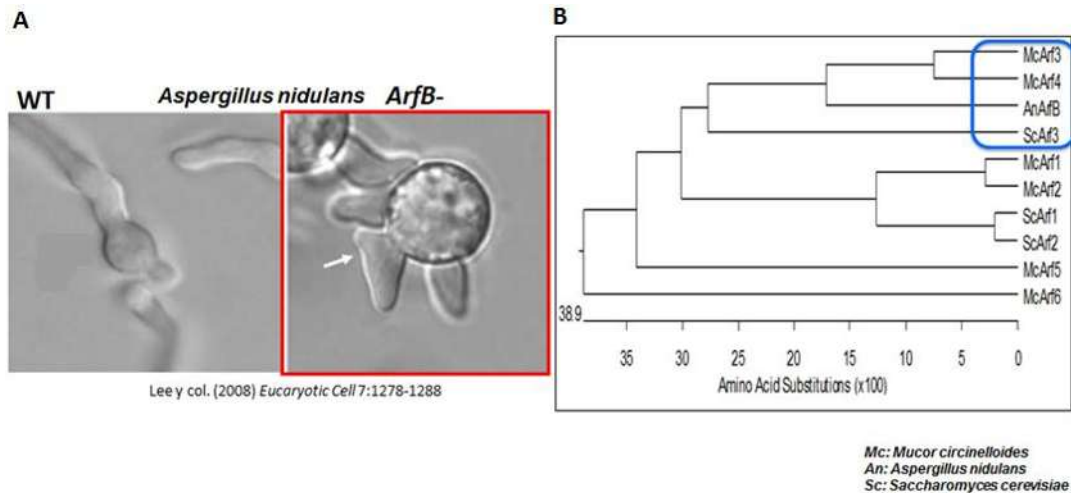


Figura 11. Esquema de participación del gen *ArfB* en el crecimiento polarizado de *A. nidulans* y dendograma de los genes *arf* en *M. circinelloides*. A Se muestra el efecto de la mutación del gen *ArfB* en el crecimiento polarizado de *A. nidulans*. **B** Dendograma de las probables secuencias de proteínas Arf de *M. circinelloides* comparadas con las proteínas caracterizadas ARF1, ARF2 y ARF3 de *S. cerevisiae* y ArfB de *A. nidulans*.

13.3 Delección de los genes que codifican a proteínas Arf3-5 en *M. circinelloides* mediante recombinación homóloga

Con la finalidad de determinar la participación de los genes *arf* en el dimorfismo de *M. circinelloides* se llevó a cabo la delección de los genes *arf3-5*, mediante eventos de doble recombinación homóloga. Para lo cual se usó la inserción del gen de selección *pyrG* (codifica para la enzima orotidina-5-fosfato descarboxilasa, necesaria para la síntesis de uracilo), el cual restaura la auxotrofia a uracilo de la cepa parental MU402.

Para llevar a cabo dicho proceso, se adicionaron regiones flanqueantes al marcador de selección de aproximadamente 1 kb, que corresponden a las regiones 5' y 3'UTR del gen de interés. Con lo cual se pretende eliminar todo el

ORF (Marco de Lectura Abierto) del gen de interés, generando una mutante en el gen *arf* y prototrofa a uracilo (**Figura 12**).

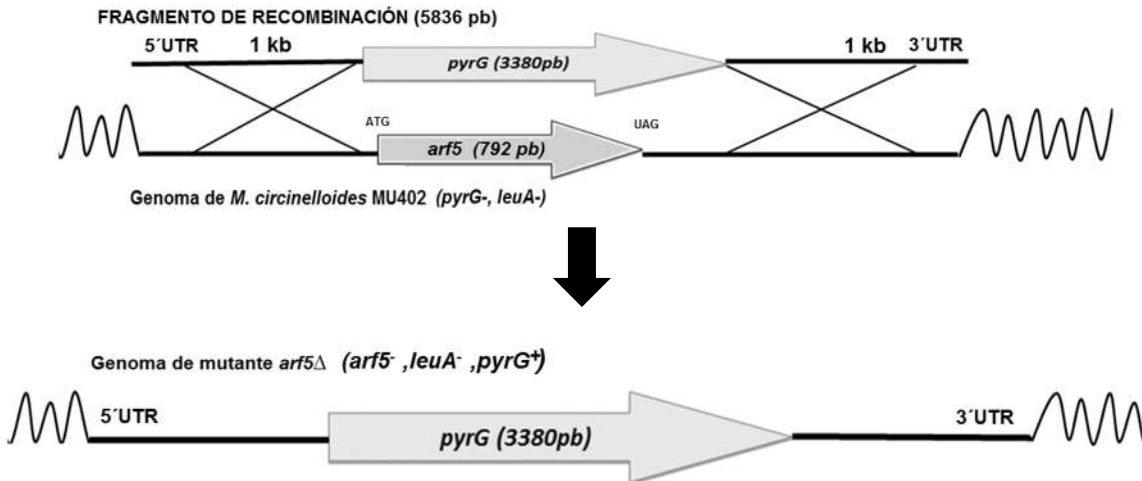


Figura 12. Esquema del evento de doble recombinación homóloga para realizar la delección de los genes *arf*. Se muestran las regiones 5' y 3'UTR (Regiones no traducidas) del gen *arf* que flanquean al marcador de selección el gen *pyrG* de 3.4 kb aproximadamente, las cuales permiten el evento de recombinación usando la cepa MU402 (*pyrG⁻* y *leuA⁻*) de *M. circinelloides*, lo cual permite restaurar la auxotrofia a uracilo y la delección del gen *arf*.

13.3.1 Construcción de plásmidos de recombinación en la generación de mutantes en los genes *arf* en *M. circinelloides*.

Para llevar a cabo la construcción del fragmento de recombinación, se procedió a amplificar mediante PCR, un fragmento de DNA que comprende 1 kb río arriba y río abajo del codón de inicio y terminación de la traducción, respectivamente de los genes *arf3*, *4* y *5*.

Se llevó a cabo una PCR utilizando los oligonucleótidos nombrados como FW-ARF3 y RV-ARF3 los cuales amplifican un producto que tiene un tamaño aproximado para el gen *arf3* de 2.9 kb, para amplificar el gen *arf4* se utilizaron los oligonucleótidos nombrados como SacI-FW-ARF4 Y XbaI-RV-ARF4 para generar una banda de tamaño de 2.7 kb y para amplificar el gen *arf5* se utilizaron los oligonucleótidos nombrados como FW-SMAI-ARF5 Y RV-ECORI-ARF5 para

generar una banda de tamaño de 2.9 kb, todos fueron clonados en el vector pUC18. Los plásmidos resultantes fueron nombrados como pMAT1573 (*arf3*) cortado con las enzimas *EcoRI* y *PstI* obteniendo dos bandas de 4.3 y 0.9 kb (**Figura 13**), pMAT1574 (*arf4*) cortado con la enzima *PstI* generando dos bandas de 4 y 1.2 Kb aproximadamente (**Figura 14**) y pMAT1575 (*arf5*), cortado con la enzima *SphI* generando dos bandas de 3.9 y 1.6 Kb aproximadamente (**Figura 15**).

Posteriormente se realizó la amplificación mediante PCR de las regiones 5' y 3' exceptuando el marco de lectura de los genes *arf3-5*, para el caso del gen *arf3* se utilizaron los oligonucleótidos BgIII-FWD-ARF3 y BgIII-REV-ARF3 que amplifican todo este vector generando un fragmento de aproximadamente de 4.7 kb. Por otra parte el marcador de selección *pyrG* fue obtenido a partir del plasmido pEPM1 mediante restricción enzimática con BamHI, generando un fragmento de 3.4 kb aproximadamente (**Figura 16**).

Se llevó a cabo la ligación del fragmento que contiene las regiones 5' y 3' UTR del gen *arf3* con los sitios *BgIII* con el gen *pyrG*, la construcción fue corroborada por análisis de restricción con enzimas *SphI* y *SacI* obteniendo dos bandas de 5.5 y 2.7 kb aproximadamente que corresponden al vector esperado PMAT1576. Se usó solamente el fragmento de recombinación de 5.5 kb para la transformación de *M. circinelloides* (**Figura 17**).

Respecto al gen *arf4*, se amplificó las regiones 5' y 3' UTR con los oligonucleótidos BamHI-FWD-ARF4 y BamHI-REV-ARF4 para obtener un fragmento de 4.7 kb, se llevó a cabo la ligación de este fragmento que contiene del gen *arf4* con el gen *pyrG*, en el sitio de restricción *BgIII* del vector pMAT1577, la construcción fue corroborada por análisis de restricción con enzimas *SphI* y *SacI* obteniendo dos bandas de 5.5 y 2.7 kb aproximadamente que corresponden al vector esperado, dichas bandas fueron observadas en gel de agarosa. Se usó solamente el fragmento de recombinación de 5.5 kb para la transformación de *M. circinelloides* (**Figura 18**).

En cuanto al gen *arf5*, se amplificó las regiones 5' y 3' UTR con los oligonucleótidos FW-BGLII-ARF5 y RV-BGLII-ARF5 para obtener un fragmento de

4.8 kb, se llevó a cabo la ligación de este fragmento que contiene del gen *arf4* con el gen *pyrG*, en el sitio de restricción *BglIII* generando la construcción pMAT1578 que porta las regiones 5' y 3'UTR del gen *arf5* flanqueando al gen *pyrG* el cual se corrobora mediante análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *SmaI* generando dos bandas de 5.5 y 2.7 kb, también se usó solamente el fragmento de recombinación de 5.5 kb para la transformación de *M. circinelloides* (Figura 19).

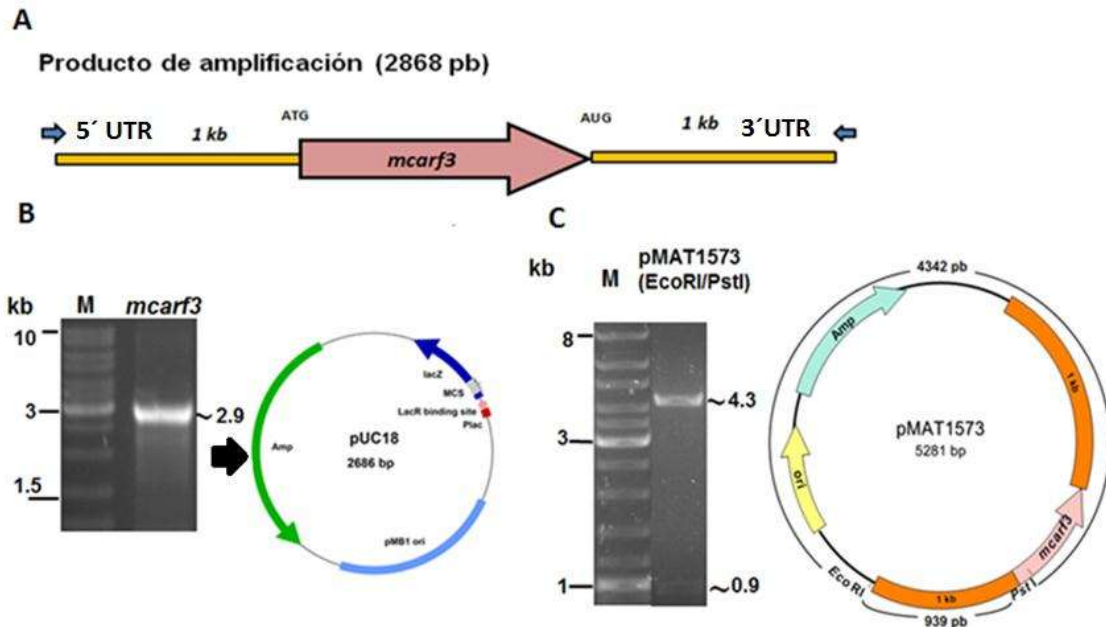


Figura 13. Amplificación por PCR y clonación del gen *arf3* de *M. circinelloides*. **A.** Se muestra el esquema del gen *arf3* con las regiones 5' y 3'UTR (Regiones no traducidas) de 1 kb a usar en los experimentos de transformación, **B.** Se amplificó mediante PCR y se corroboró en gel de agarosa el tamaño de la banda de 2.9 kb aproximadamente correspondiente al gen *arf3* y sus UTRs (gel izquierda), la cual fue clonada en el vector pUC18 **C.** El vector pMAT1573 generado se corrobora mediante análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *PstI* (gel de la derecha) generando dos bandas de 4.3 y 0.9 aproximadamente.

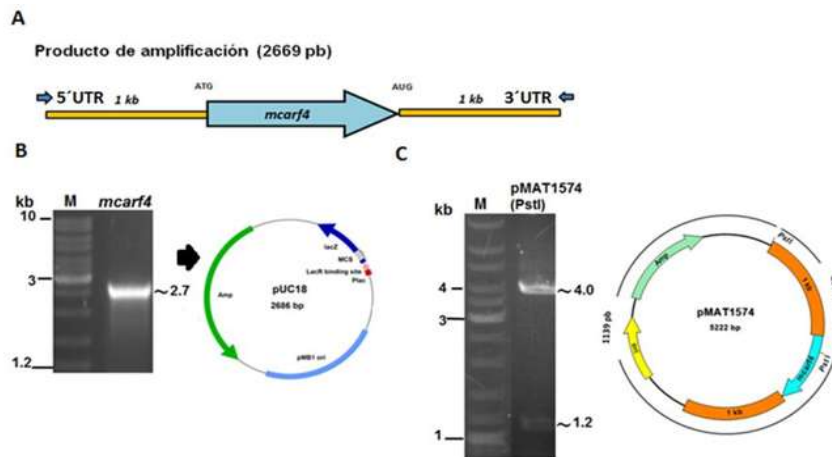


Figura 14. Amplificación por PCR y clonación del gen *arf4* de *M. circinelloides*. A. Se muestra el esquema del gen *arf5* con las regiones 5' y 3'UTR (Regiones no traducidas) de 1 kb a usar en los experimentos de transformación, B. Se amplificó mediante PCR y se corroboró en gel de agarosa el tamaño de la banda de 2.7 kb aproximadamente correspondiente al gen *arf3* y sus UTRs (gel izquierda), la cual fue clonada en el vector pUC18. C. El vector pMAT1573 generado se corroboró mediante análisis de restricción con las enzimas *PstI* (gel de la derecha) generando dos bandas de 4 y 1.2 kb aproximadamente.

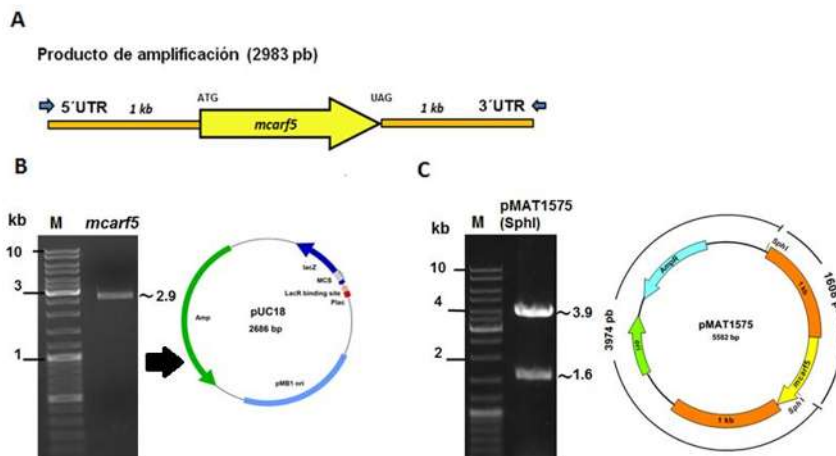


Figura 15. Amplificación por PCR clonación del gen *arf5* de *M. circinelloides*. A. Se muestra el esquema del gen *arf5* con las regiones 5' y 3'UTR (Regiones no traducidas) de 1 kb a usar en los experimentos de transformación, B. Se amplificó mediante PCR y se corroboró en gel de agarosa el tamaño de la banda de 2.9 kb aproximadamente correspondiente al gen *arf5* y sus UTRs (gel izquierda), la cual fue clonada en el vector pUC18. C. El vector pMAT1573 generado se corroboró mediante análisis de restricción con las enzimas *SphI* (gel de la derecha) generando dos bandas de 3.9 y 1.6 aproximadamente.

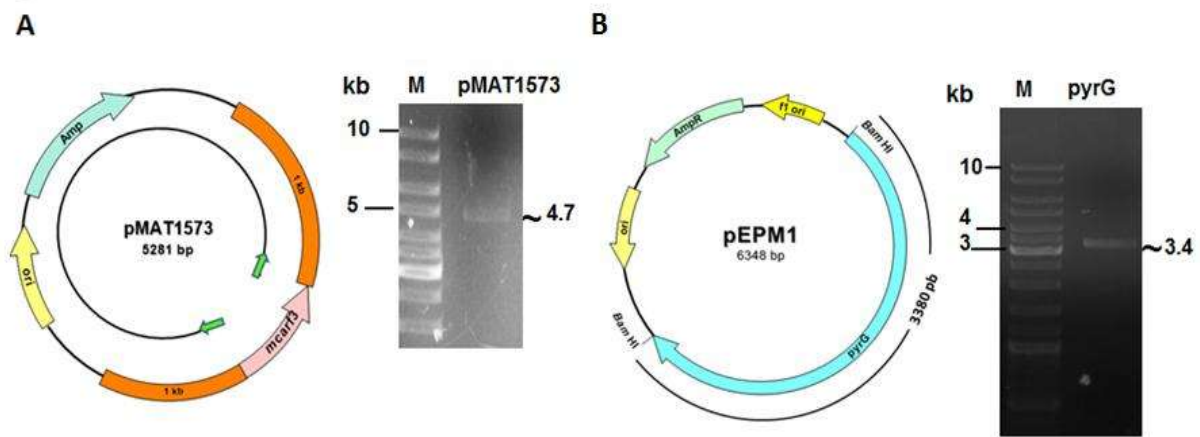


Figura 16. Esquema de amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del plasmido pMAT1573 y obtención del gen *pyrG*. **A.** Se muestra el producto de amplificación de PCR conteniendo las regiones 5' y 3'UTR exceptuando el marco de lectura de *arf3* con los oligonucleótidos señalados por las flechas en color verde, a los cuales se les adicionaron sitios *BgIII*, generando un fragmento aproximado de 4.7 kb, el cual fue visualizado en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (gel de la izquierda) **B.** El marcador de selección *pyrG* fue obtenido a partir del plasmido pEPM1 mediante restricción enzimática con la enzima *BamHI*, generando un fragmento de 3.4 aproximadamente, el cual fue purificado y su tamaño fue visualizado en gel de agarosa (gel de la derecha). Las bandas de 4.7 kb y el marcador de selección *pyrG* de 3.4 kb, fueron puestas a ligar mediante el uso de T4 DNA ligasa.

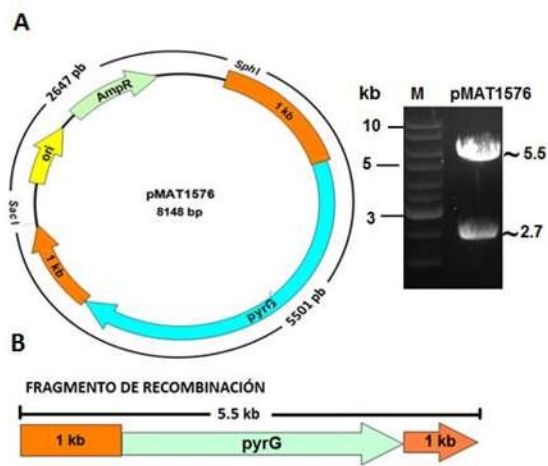


Figura 17. Construcción del vector pMAT1576 que porta el fragmento de recombinación del gen *arf3*. **A.** Se muestra la construcción del plasmido que porta las regiones 5' y 3' UTR del gen *arf3* flanqueando al marcador de selección *pyrG*, denominado pMAT1576, la construcción fue corroborada por análisis de restricción con las enzimas *SphI* y *SacI* obteniendo dos bandas de tamaño aproximado de 5.5 y 2.7 kb correspondientes al vector esperado, dichas bandas fueron observadas en gel de agarosa, **B.** Se observa el esquema del fragmento de recombinación de 5.5 kb utilizado para la transformación de *M. circinelloides*.

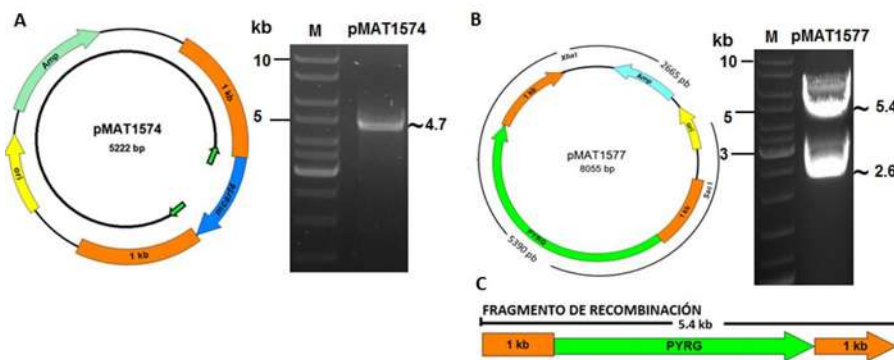


Figura 18. Construcción del vector pMAT1577 que porta el fragmento de recombinación del gen *arf4*. **A.** Se muestra la construcción del plasmido que porta las regiones 5'-3' UTR del gen *arf4* obtenidas del vector pMAT1574 mediante PCR y corroborado su tamaño en gel de agarosa de 4.7 kb **B.** Flanqueando al marcador de selección *pyrG*, el plasmido generado fue pMAT1577, se corroboró por análisis de restricción con enzimas *XbaI* y *SacI* obteniendo dos bandas de 5.4 y 2.6 kb aproximadamente que corresponden al vector esperado, dichas bandas fueron observadas en gel de agarosa, **C.** Se observa el esquema del fragmento de recombinación de 5.4 kb utilizado para la transformación de *M. circinelloides*.

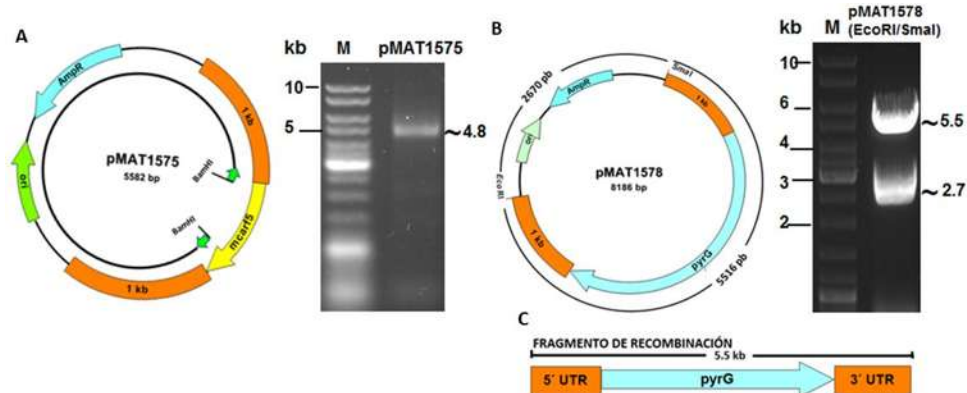


Figura 19. Construcción del vector que porta el fragmento de recombinación *arf5*.

A. Se muestra la construcción que porta las regiones 5´-3´ UTR del gen *arf5* obtenidas del vector pMAT1575 mediante PCR. Flanqueando al marcador de selección *pyrG* generando la construcción pMAT1578, el vector fue corroborado por análisis de restricción con enzimas *EcoRI* y *SmaI* obteniendo dos bandas de 5.5 y 2.7 kb aproximadamente que corresponden al vector esperado, dichas bandas fueron observadas en gel de agarosa **C**. Se observa el esquema del fragmento de recombinación de 5.5 kb utilizado para la transformación de *M. circinelloides*.

13.3.2 Confirmación molecular de mutantes en los genes *arf* en *M. circinelloides*

Después de la transformación de la cepa MU402 con los fragmentos para la delección de los genes *arf* y selección de las transformantes con los porcentajes más altos de esporas Ura⁺ se procedió a su análisis con la finalidad de corroborar la delección de los genes *arf* en *M. circinelloides*, se realizaron los ensayos de amplificación por PCR, Southern Blot y RT-PCR, para lo cual fue necesario la extracción de DNA y RNA.

Para el caso de la confirmación del gen *arf3* mediante amplificación por PCR se espera un tamaño de la banda de amplificación por PCR usando los oligonucleótidos FW-ARF3 y RV-ARF3 de aproximadamente 2.9 kb correspondiente al gen de tipo silvestre; por otra parte la delección del gen *arf3* se detectó por la presencia de una banda de 5.5 kb. El resultado mostró que las

clonas analizadas poseían únicamente la banda de tipo mutante, indicando una mutante homocariote en el gen *arf3* (**Figura 20**).

Con la finalidad de comprobar que se haya llevado un único evento de recombinación homóloga en el genoma de *M. circinelloides*, en las dos mutantes independientes generadas para el gen *arf3* para lo cual se llevó a cabo el ensayo de Southern Blot, utilizando DNA genómico y mediante la restricción enzimática con la enzima *Nsil*, se observó la banda de tipo silvestre de 4.1 kb para la cepa MU402, mientras que para las dos mutantes independientes se observó la banda de tipo mutante es 7 kb, indicando que las dos mutantes independientes tienen una única banda de tipo mutante, sugiriendo que se llevó a cabo un único evento de recombinación (**Figura 21**). Se determinó la expresión del gen *arf3* en la mutante en dicho gen, mediante el ensayo de RT-PCR, con el uso de los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de RT-qPCR del gen *arf3*, donde se observó que no hay expresión del gen *arf3* en la mutante con respecto a la cepa parental MU402 con un fragmento de 70 pb (**Figura 22**).

El evento de delección también fue corroborado para el gen *arf4*, se observó mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos FW-INT-ARF4 y RV-INT-ARF4 un fragmento de 2.7 kb para el gen silvestre; mientras que se observó un fragmento de amplificación del gen mutante *arf4* una banda de 5.4 kb. Se analizaron tres clonas independientes para la selección de la mutante *arf4*, siendo en el caso de las tres mutantes independientes la banda de tipo mutante de 5.4 Kb (**Figura 23**). Indicando una mutante homocariote en el gen *arf4*.

Con la finalidad de comprobar que se haya llevado un único evento de recombinación homóloga en el genoma de *M. circinelloides*, en las tres mutantes independientes generadas para el gen *arf4*, para lo cual se llevó a cabo el ensayo de Southern Blot, utilizando DNA genómico y mediante restricción enzimática con la enzima *Clal*, se observó dos bandas en la cepa de tipo silvestre MU402 de 2.6 y 2.4 kb, mientras que se observó dos bandas de tipo mutante es 5.2 y 2.4 kb, se puede observar que las tres mutantes independientes tienen las banda de tipo mutante, lo cual indica que se llevó a cabo un único evento de recombinación (**Figura 24**). Se determinó la expresión del gen *arf4* en la mutante en dicho gen,

mediante el ensayo de RT-PCR, con el uso de los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de RT-qPCR del gen *arf4*, donde se observó que no hay expresión del gen *arf4* en la mutante con respecto a la cepa parental MU402 con un fragmento de 70 pb (**Figura 25**).

Finalmente, se corroboró el evento de delección del gen *arf5*, donde se esperaba una banda de amplificación mediante PCR con los oligonucleótidos FW-INT-ARF5 y RV-INT-ARF5 en el caso del gen silvestre una banda de 3 kb y un fragmento de amplificación de 5.7 kb para el gen mutante *arf5*. Se analizaron dos mutantes independientes de *arf5*, ambas clonas mostraron bandas correspondientes tanto para el gen silvestre y el gen mutante de 5.7 kb indicando que el gen *arf5* es esencial para la viabilidad de *M. circinelloides* ya que solo fue posible generar mutantes heterocariontes (celulas con núcleos silvestres y mutantes), no se realizó el ensayo de Southern Blot y ensayo de RT-PCR para este caso particular de la mutante *arf5* (**Figura 26**).

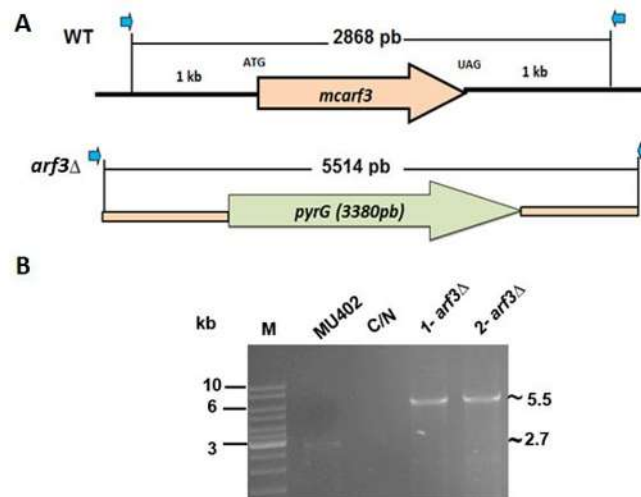


Figura 20. Confirmación molecular mediante PCR de la mutante *arf3* de *M. circinelloides*. **A.** Se muestra el esquema de amplificación de PCR correspondientes al gen *arf3* silvestre de 2.9 kb y un fragmento de amplificación de 5.5 kb indicando la mutación de *arf3*, **B.** Gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño plus DNA ladder MU402: DNA genómico de la cepa silvestre; C/N: control negativo utilizando agua y se analizaron dos mutantes independientes de *arf3*, ambas muestran la banda de tipo mutante de 5.5 Kb.

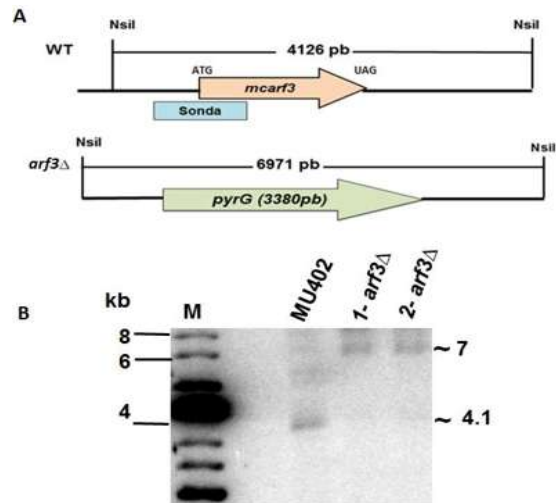


Figura 21. Confirmación molecular mediante Southern Blot de la mutante *arf3* de *M. circinelloides*. A. Se muestra el esquema de la restricción del DNA genómico con las enzimas *NsiI*, esperando una banda para el gen *arf3* de tipo silvestre de 4.1 kb y una banda de 7 kb indicando la recombinación del gen en el locus *arf3*, se usó como sonda un fragmento de cuantas pares de 953 pb B. Se muestra el autoradiograma del Southern Blot M: marcador de tamaño plus DNA ladder; MU402: DNA genómico de la cepa silvestre; se analizaron dos mutantes independientes de *arf3*, ambas mutantes muestran una única banda de tipo mutante de 7 Kb.

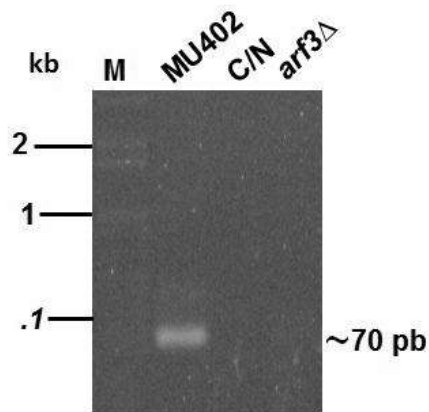


Figura 22. Confirmación molecular mediante RT-PCR de la mutante *arf3* de *M. circinelloides*. A. Se muestra el gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño plus DNA ladder, MU402: DNA genómico de la cepa silvestre con una banda de 70 pb; C/N: control negativo utilizando agua y se analizó la mutante *arf3* la cual no presenta la banda de amplificación.

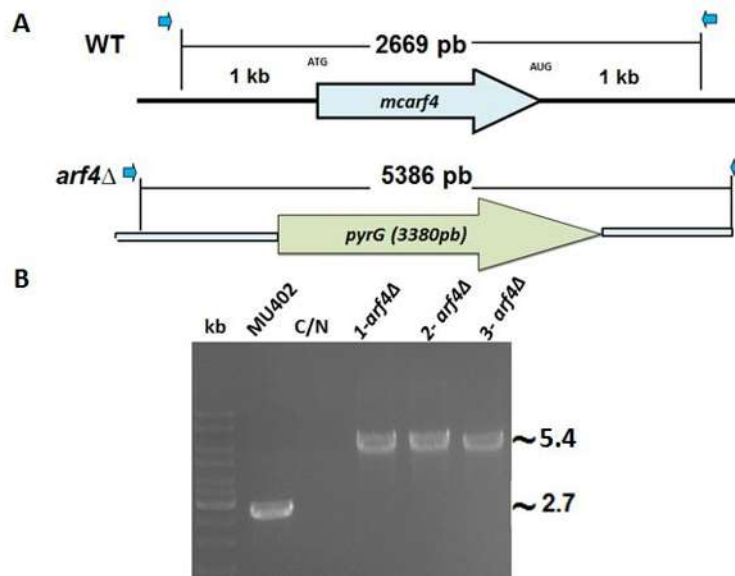


Figura 23. Confirmación molecular mediante PCR de la mutante *arf4* de *M. circinelloides*. **A.** Se muestra el esquema de la amplificación mediante PCR correspondientes al gen *arf4* silvestre de 2.7 kb y un fragmento de amplificación de 5.4 kb indicando la mutación de *arf4*, **B.** Gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño plus DNA ladder MU402: DNA genómico de la cepa silvestre; C/N: control negativo utilizando agua y se analizaron dos mutantes independientes de *arf4*, ambas muestran la banda de tipo mutante de 5.4 Kb.

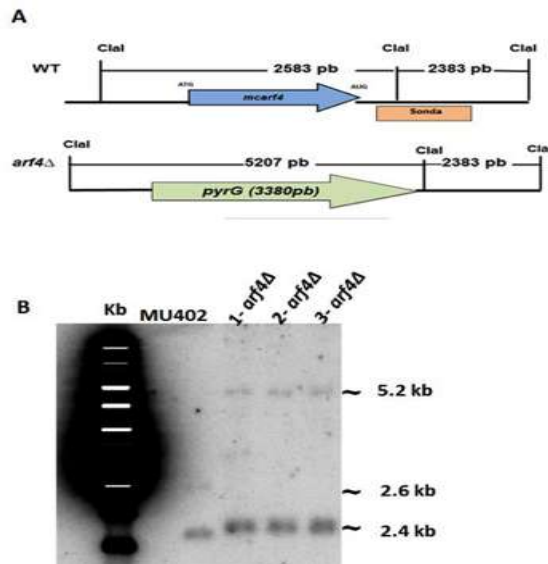


Figura 24. Confirmación molecular mediante Southern Blot de la mutante *arf4* de *M. circinelloides*. **A.** Se muestra el esquema de la restricción del DNA con las enzimas *Cla*I del DNA genómico, esperando dos bandas de 2.4 y 2.6 kb para el gen *arf4* silvestre y dos bandas de 5.2 y 2.4 kb indicando el evento de recombinación en el gen *arf4*. Se usó como sonda un fragmento de cuantas pares de 926 pb **B.** Se muestra el autorradiograma del Southern Blot para las mutantes *arf4* M: marcador de tamaño plus DNA ladder MU402: DNA genómico de la cepa silvestre; se analizaron tres mutantes independientes de *arf4*, ambas muestran las bandas de tipo mutante de 5.2 y 2.4 Kb.

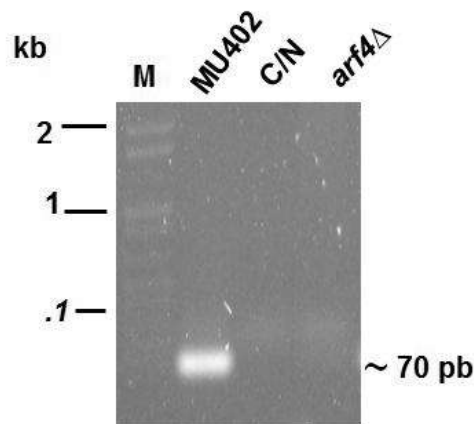


Figura 25. Confirmación molecular mediante RT-PCR de la mutante *arf4* de *M. circinelloides*. **A.** Se muestra el gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño plus DNA ladder, MU402: DNA genómico de la cepa silvestre con una banda de 70 pb; C/N: control negativo utilizando agua y se analizó la mutante *arf4* la cual no presenta la banda de amplificación.

14. Pruebas del efecto de la mutación de los genes *arf3-5* en el dimorfismo de *M. circinelloides*

Se realizaron diversas pruebas para determinar el efecto de las mutaciones tanto en la formación de esporas, como el crecimiento micelial, levaduriforme, transiciones micelio-levadura y levadura-micelio, así como la morfología de las mutantes homocariontes (*arf3Δ* y *arf4Δ*) y la mutante heterocarionte (*arf5Δ*).

14.1 Efecto de la mutación de los genes *arf* en el crecimiento radial de *M. circinelloides*

Con la finalidad de demostrar la participación del crecimiento de *M. circinelloides*, se llevó a cabo en primer lugar un ensayo de crecimiento radial, para lo cual se inocularon en placas de medio YPG mas uracilo (200 ug/mL) 50 esporas por placa, midiendo su crecimiento a lo largo de 6 días, donde se registró el crecimiento del diámetro de la colonia, se observaron una disminución significativa al 4º día del crecimiento tanto para la cepa *arf3Δ* y *arf5Δ*, con un diámetro de 60 y 50 mm, respectivamente con respecto a la cepa parental MU402 que mostro un diámetro de 74 mm de crecimiento, por otra parte no se observaron cambios significativos para la mutante *arf4Δ* de *M. circinelloides* (**Figura 27**).

14.2 Efecto de la mutación de los genes *arf* en la esporulación de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de determinar si la disminución en el crecimiento radial, era dada por una afectación en la esporulación de las cepas, se realizó en ensayo de esporulación inoculando en medio YPG más uracilo, 100 esporas se inocularon por placa. Se procedió a incubar por 6 días, finalmente las esporas fueron cosechadas y contadas. Se encontró que hay una disminución significativa en la producción de esporas en las mutantes *arf3Δ* y *arf4Δ* de aproximadamente de

$5 \times 10^5/\text{cm}^2$ mientras que la mutante *arf5* es de hasta diez veces menos con respecto a la cepa parental MU402 con un promedio de $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ (Figura 28).

14.3 Efecto de la mutación de los genes *arf* sobre el tamaño de las esporas.

Para determinar si la alteración en los procesos de crecimiento radial y esporulación en las cepas mutantes *arf* eran un resultado en cambios en el tamaño de la espora, se observó su morfología al microscopio y se analizó su tamaño mediante citometría de flujo, donde se tomó un gráfico representativo de cada ensayo. No hay diferencia entre el tamaño de la espora, de las cepas mutante *arf4* Δ con respecto a la parental, pero si en las mutantes *arf3* Δ y *arf5* Δ donde aproximadamente un 30% de las esporas presentan un menor tamaño (Figura 29).

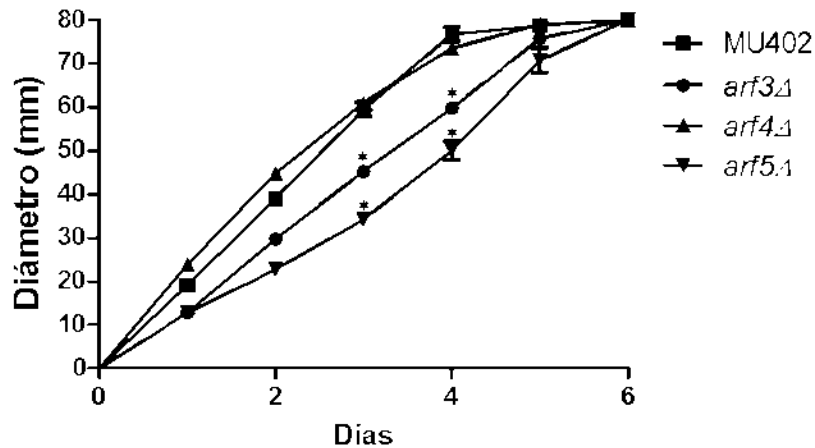


Figura 27. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento radial. 50 esporas de las cepas ensayadas fueron inoculadas en el centro de la placa en, medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se incubaron a 28°C en presencia de luz blanca. N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

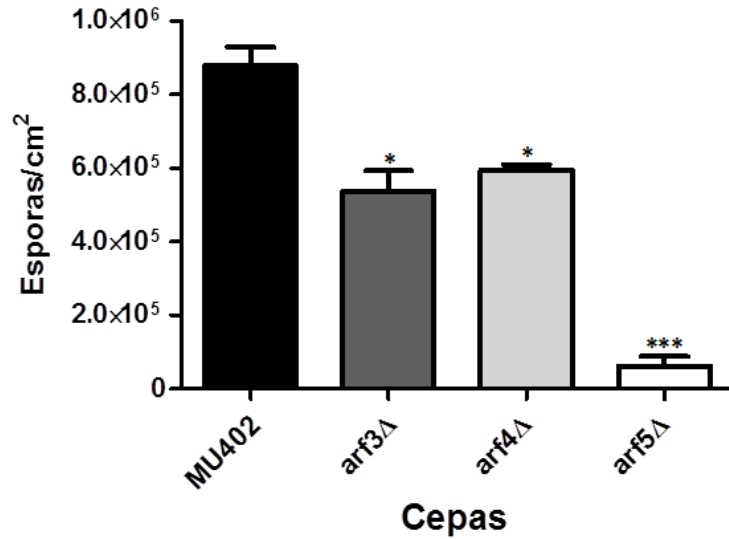


Figura 28. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la esporulación. Se inocularon 200 esporas en placas de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL sólido), se incubaron a 28°C en presencia de luz blanca por 6 días, al final de este tiempo fueron cosechadas y contadas con cámara de Neubauer, N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

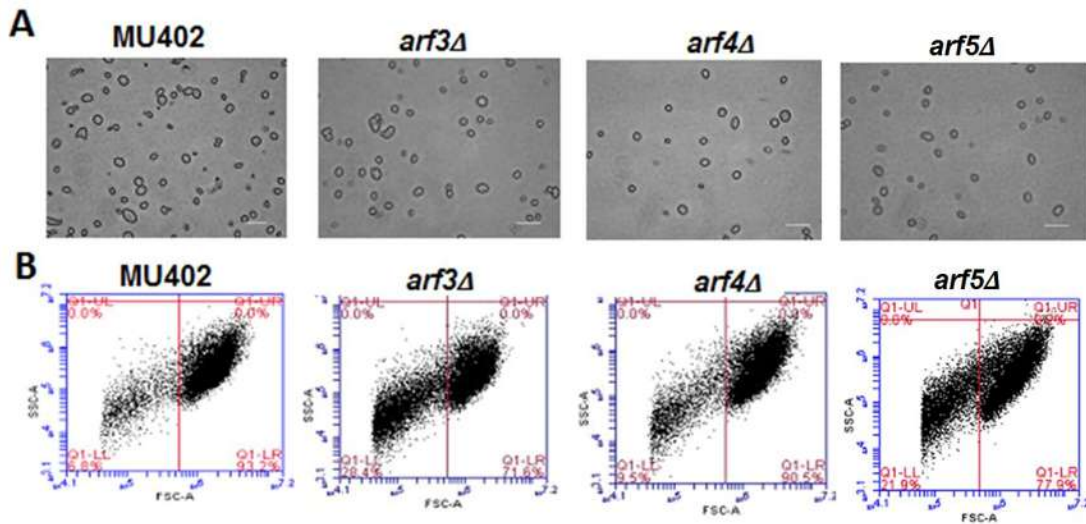


Figura 29. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre el tamaño de las esporas. **A.** Se muestra la morfología de esporas tomadas en microscopio invertido con objetivo 40X, microscopio óptico Olympus CKX41 barra de magnitud 20 μ m. **B.** Ensayo de citometría de flujo de las esporas de las cepas MU402, mutantes *arf3-5*, fueron contadas 20,000 células, citómetro Accuri C6 Flow cytometer.

14.4 Efecto de la mutación de los genes *arf* sobre la germinación en aeróbiosis

Con la finalidad de observar el efecto de la mutación de los genes *arf* sobre la germinación en aerobiosis, se realizó el ensayo de germinación inoculando en medio YPG líquido más uracilo 500 mil esporas por ml. Se determinó el porcentaje de células que emitieron el tubo germinal a las 3 y 6 horas de crecimiento, no se observan cambios significativos a las 3 horas entre las distintas cepas, sin embargo a las 6 horas, la cepa mutante *arf4* Δ y *arf5* Δ presentan una germinación acelerada con respecto a la cepa parental MU402 (**Figura 30**).

14.5 Efecto de la mutación de los genes *arf* sobre el crecimiento en aeróbiosis.

Para determinar si la biomasa del micelio era afectado durante el crecimiento en aerobiosis, se llevó a cabo una curva de crecimiento en medio YPG líquido suplementado con uracilo 200 ug/mL, inoculando 500,000 esporas /mL, la biomasa fue cuantificada en gramos por cada 100 ml de medio, a los tiempos de 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento, se observó una disminución significativa a las 48 horas en la cepa mutante *arf3* Δ , concluyendo que la mutación en *arf3* Δ provoca un menor crecimiento en aerobiosis (**Figura 31**).

14.6 Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* sobre la germinación en anaerobiosis.

Se determinó la germinación levaduriforme en las mutantes, realizando el ensayo en medio YPG líquido, se cuantificó el porcentaje de germinación a las 3, 6 y 12 horas de germinación, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tiempos medidos. Concluyendo que los genes *arf* no presentan alteraciones en la germinación en anaerobiosis (**Figura 32**).

14.7 Efecto de la mutación de los genes *arf* sobre el crecimiento en anaerobiosis

Con la finalidad de conocer el efecto de la mutación de los genes *arf* sobre el crecimiento en anaerobiosis, se realizó una curva de crecimiento en medio YPG liquido suplementado con uracilo 200 ug/mL, inoculando 500,000 esporas /mL. Se cuantifico la biomasa en gramos por cada 100 ml de medio a las 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento., se encontraron diferencias significativas a las 48 horas en la mutante *arf5* con una disminución del 15% de la biomasa (**Figura 33**).

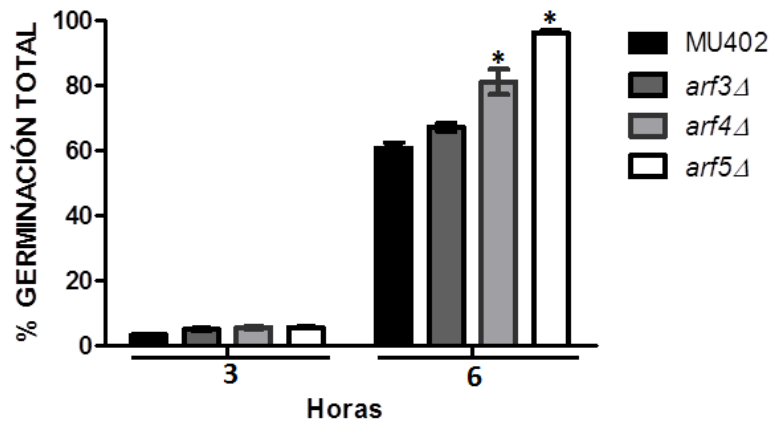


Figura 30. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la germinación en aerobiosis. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la germinación en aerobiosis a las 3 y 6 horas. N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

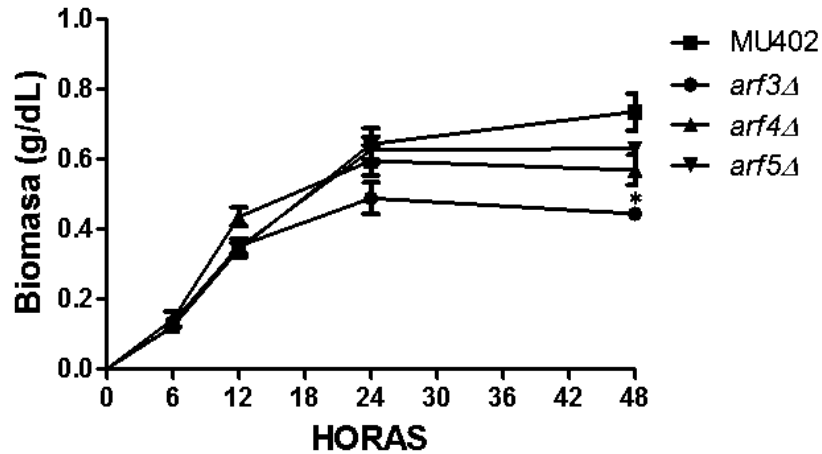


Figura 31. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento en aerobiosis. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la biomasa generada a las 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

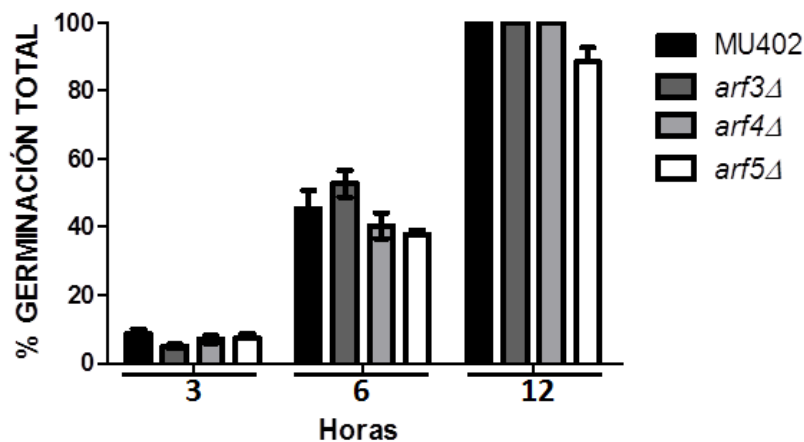


Figura 32. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la germinación en anaerobiosis. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la germinación en anaerobiosis a las 3, 6 y 12 horas. N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

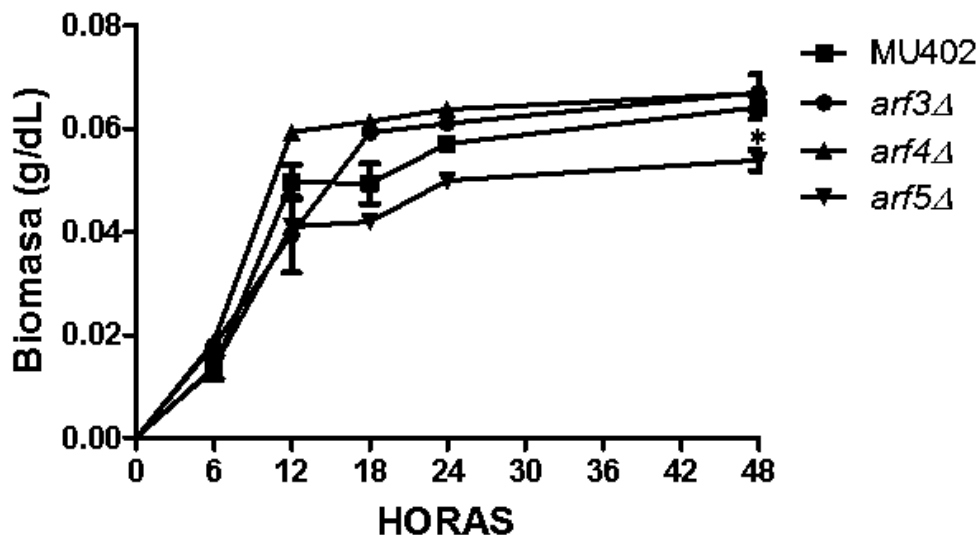


Figura 33. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento en anaerobiosis. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la biomasa generada a las 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento en anaerobiosis=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

14.7.1 Efecto de la mutación de los genes *Arf3-5* sobre la transición Micelio-Levadura.

Con la finalidad de determinar si las cepas mutantes *arf3-5* eran capaces de realizar la transición micelio-levadura se realizó un ensayo de germinación en medio YPG líquido suplementado con uracilo 200 ug/mL, se inocularon 500,000 esporas /mL, las cuales fueron puestas en crecimiento en aerobiosis por 4 horas y posteriormente fueron filtradas y transferidas a medio nuevo en anaerobiosis, se cuantifico el porcentaje de células con emisión de brotes a las 1, 2, 4 y 6 horas de crecimiento en anaerobiosis. La mutante *arf3* mostro un aumento en la generación de levaduras a las 2 horas y una disminución a las 4 y 6 horas durante la transición micelio-levadura, sin embargo en las mutantes *arf4* y *arf5* esta transición fue acelerada a las 2 y 6 horas (**Figura 34**).

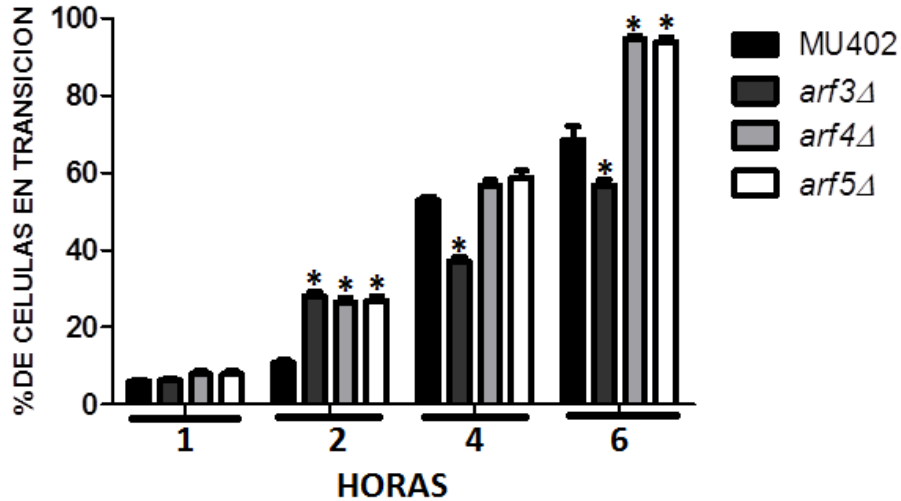


Figura 34. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la transición Micelio-Levadura. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la germinación en la transición micelio-levadura, medio YPG, uracilo 200 ug/mL sólido, 500,000 esporas/ml, N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

14.7.2 Efecto de la mutación de los genes *Arf* sobre la transición Levadura-Micelio

Con la finalidad de determinar si las cepas mutantes *arf* eran capaces de realizar la transición levadura-micelio, se realizó un ensayo de germinación en medio YPG líquido suplementado con uracilo 200 ug/mL, se inocularon 500,000 esporas /mL, las cuales fueron puestas en crecimiento en anaerobiosis por 6 horas y posteriormente fueron filtradas y transferidas a medio nuevo en aerobiosis, se cuantifico el porcentaje de células con emisión del tubo germinativo a las 1, 2 y 5 horas de crecimiento en aerobiosis. Ambas mutantes *arf4* y *arf5*, presentan una acelerada emisión del tubo germinal durante la transición levadura-micelio (**Figura 35**)

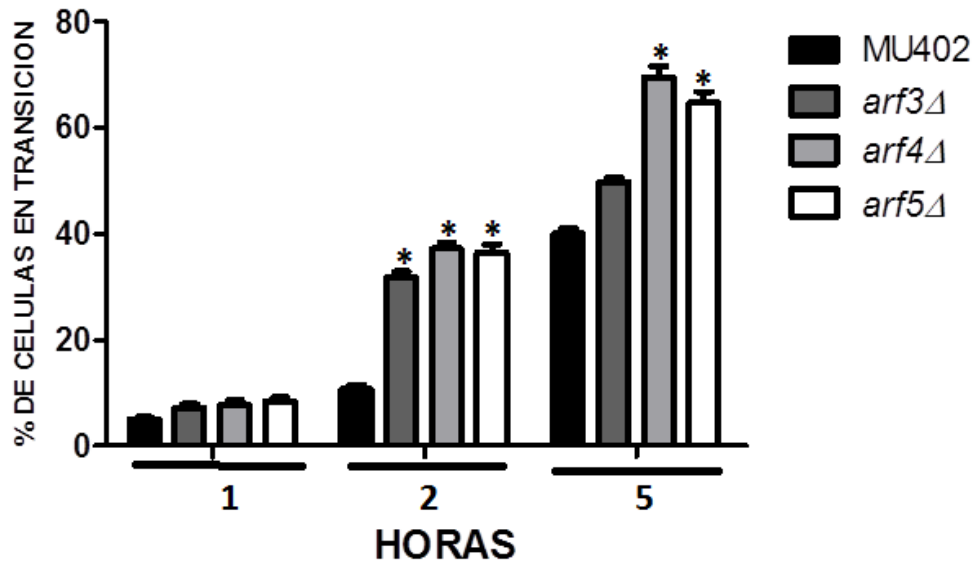


Figura 35. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la transición Levadura- Micelio. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG suplementado con uracilo (200 ug/mL), se registró la germinación en la transición levadura-micelio N=4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

14.7.3 Efecto de la mutación de los genes *arf* en la morfología en aeróbiosis, anaerobiosis, transiciones y el esporangio de *M. circinelloides*.

Se observó la morfología de las cepas parental y mutantes al microscopio, en la condiciones de germinación en aerobiosis, anaerobiosis, a las 6 horas de germinación (**Figura 36**). Se tomaron fotos representativas a las 6 horas de la transición micelio-levadura y levadura- micelio (**Figura 37**). Se observó el desarrollo del esporangio a los 6 días de crecimiento en luz de todas las mutantes generadas (**Figura 38**).

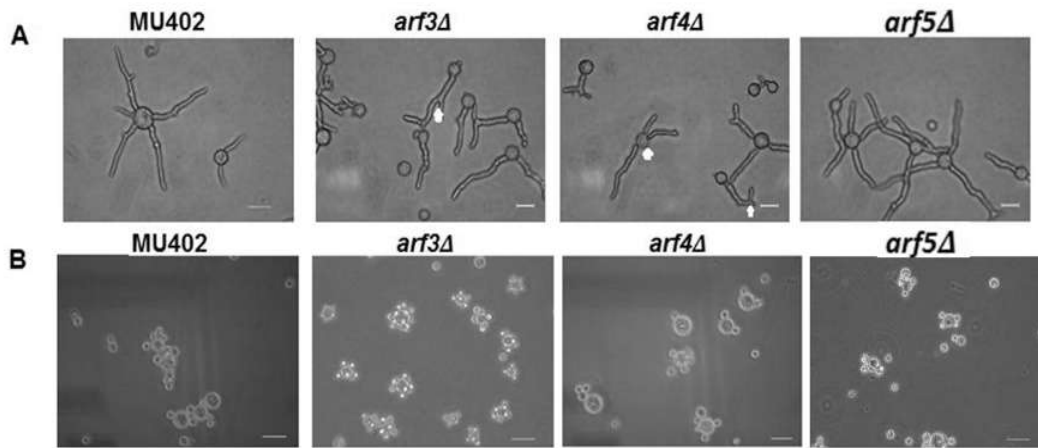


Figura 36. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la morfología en aerobiosis y anaerobiosis. A. Se muestran fotografías de germinación en aerobiosis, puntas de flecha indican la bifurcación de las hifas en las cepas mutantes **B.** Se muestran fotografías de germinación en anaerobiosis. Fotos tomadas a las 6 horas de germinación. Medio YPG, uracilo 200 ug/mL líquido, 500,000 esporas/ml, N=4, Barra 20 um.

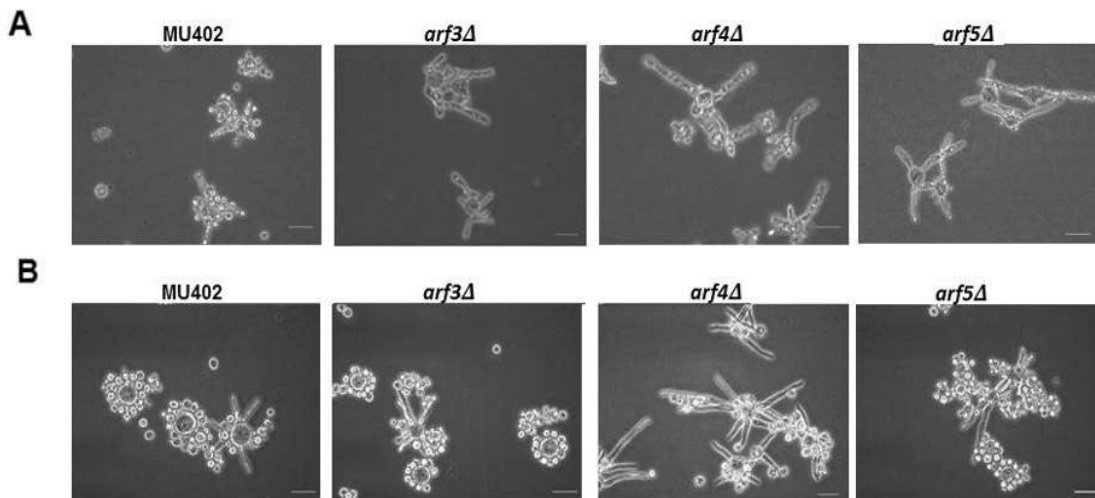


Figura 37. Efecto de la mutación de los genes *arf3-5* de *M. circinelloides* sobre la morfología de transición micelio-levadura y levadura-micelio. A. Se muestra imagen representativa de la transición micelio-levadura, **B.** Se muestra imagen representativa de la transición levadura-micelio. Fotos tomadas a las 6 horas de germinación. Medio YPG, uracilo 200 ug/mL, 500,000 esporas/ml, N=4, Barra 20 um.

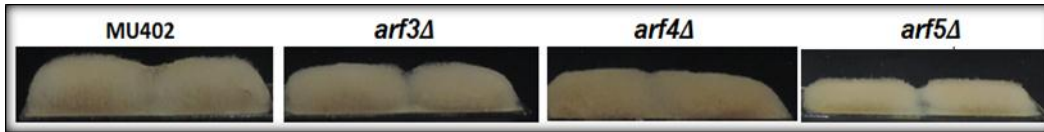


Figura 38. Efecto de la mutación de los genes *arf* de *M. circinelloides* sobre la morfología del esporangio en medio sólido. Fueron inoculadas 20 esporas/portaobjetos e incubadas en luz a 28°C en medio YPG, uracilo 200 ug/mL sólido se muestra imagen representativa de fotos tomadas a los 6 días de crecimiento, N=4.

15. Discusión

Se identificaron seis secuencias en *M. circinelloides* que corresponden a genes que codifican a probables proteínas que pertenecen de la subfamilia Arf (**Figura 5**), estas supuestas proteínas Arf de *M. circinelloides* muestran porcentajes de identidad relativamente altos (>50%) respecto a proteínas Arf ya caracterizadas como las de *S. cerevisiae* (**Tabla 9**) (Lee, 1994).

Además estas proteínas muestran la presencia de motivos y dominios conservados que son característicos en las proteínas de la subfamilia Arf (Click y col. 2002) (**Figura 7**).

El número de genes que codifican a proteínas Arf que identificamos en este trabajo en el zigomiceto *M. circinelloides*, coincide con otros zigomicetos como *Rhizopus oryzae* quien cuenta con 5, mientras que *Phycomyces blakesleeianus* cuenta con 7 probables proteínas Arf. Por otra parte, En los ascomicotas como *N. crassa*, presenta 7, *A. nidulans* y *C. albicans* presentan 6 probables proteínas Arf cada uno de ellos (Lee y col. 2008 y Denich y col. 1992), lo cual indica que al parecer los hongos muestran un número muy similar de genes que codifican a proteínas Arf, sin embargo una excepción es el hongo ascomiceto *S. cerevisiae*, ya que este tiene únicamente 3 genes (**Tabla 6**) (Huang y col. 2003).

En ciertos casos se ha reportado la duplicación de estos genes que pueden acarrear funciones redundantes como el caso de *S. cerevisiae* en donde los genes ARF1 y ARF2, son producto de una duplicación genética, ambas proteínas tienen un 96% de identidad entre ellas y cabe hacer mención que el producto de ambos genes tienen ciertas funciones redundantes, y solo la mutación de ambos genes genera un fenotipo letal (Stearn, 1990). Mientras que en *A. nidulans* mutaciones en el gen *arfA* por si solo genera un fenotipo letal y no hay redundancia al respecto (Lee y col. 2008). Algunos de los genes *arf* de *M. circinelloides* al parecer también son producto de duplicación genética, como es el caso de los genes *arf1* y *arf2*, los cuales incluso a nivel de estructura genómica, muestran un número idéntico de exones e intrones (4 y 3, respectivamente), y la longitud del tamaño de sus ORF es muy cercano (892 y 985 pb), los productos de ambos genes muestran un 95% de identidad entre ellos y estas muestran alrededor de un 80% de identidad con

las proteínas ARF1-2 de *S. cerevisiae*) (**Figura 6**), de hecho ambas proteínas Arf1-2 de *M. circinelloides* contienen el mismo número de aminoácidos entre ellas, con un pI de Arf1 de 6.39 y Arf2 de 6.15 (**Tabla 9**).

Por otra parte el producto de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* muestran un 89% de identidad entre ellos, conteniendo 188 y 184 aminoácidos, respectivamente. Aunque la estructura genómica es diferente para ambos genes ya que *arf3* contiene 1 exón, mientras que *arf4* tiene dos exones (**Figura 6**). Ambas proteínas se agrupan en el mismo clado del dendograma sugiriendo que pudiesen tener ciertas funciones redundantes, además de que se agrupan con otros miembros como ArfB de *A. nidulans* y ARF3 de *S. cerevisiae* (**Figura 11**).

Los productos de los genes *arf5* y *arf6* de *M. circinelloides*, no se agrupan con ninguna de las proteínas Arf descritas y analizadas en el dendograma. Ambas proteínas tienen niveles de identidades menores con respecto a las proteínas ARF de *S. cerevisiae* (50-60% de identidad) y con 55% de identidad con ArfB de *Aspergillus*. El alineamiento con proteínas ARL (ARF-like proteins), las cuales también son miembros de subfamilia de las proteínas Arf, indica que Arf5 podría tratarse de una Arl, lo que sugiere que el gen que hemos denominado en un principio como *arf5* puede ser ciertamente un miembro de las proteínas Arf más específico de tipo Arl, es necesario llevar más análisis a nivel de secuencia aminoacidicos que confirmen estos datos (**Tabla 9**).

Una vez identificados los genes que codifican para probables proteínas de la subfamilia Arf en *M. circinelloides* se procedió a realizar el análisis de la cuantificación del transcrito para cada uno de estos genes en el proceso dimorfo (espora, micelio y levadura). La importancia de registrar los niveles de transcrito de un gen en varias condiciones puede sugerir una probable participación de dicho gen en el proceso biológico analizado. Por ejemplo, los niveles de *gpgA*, un transcrito que codifica para una proteína G (subunidad Gg) de *A. nidulans* se acumula principalmente en esporas sexuales y la delección de este gen inhibe la producción de estas estructuras (Seo et al. 2005).

La mayor expresión correspondió para el gen *arf5* respecto a todos los genes *arf* en los estadios de espora y micelio. Por ejemplo, la expresión de *arf5* en esporas

corresponde a casi un 50% del total de la expresión del resto de los genes *arf*, mientras que en micelio de 12 horas la expresión de *arf5* corresponde a cerca del 80% del total de la expresión de todos los genes *arf* en conjunto en dicho tiempo, estos datos sugieren un papel importante durante el proceso de espora y micelio de este gen. Por otra parte, los niveles de transcrito del gen *arf3* aunque bajos en términos generales en comparación a *arf5*, mostró una mayor expresión (3 veces más) durante la condición de micelio, respecto a espora, indicando una expresión diferencial de dicho gen. Los niveles de RNAm de *arf5* también se expresan de manera diferencial siendo 3 veces más en la condición de micelio de 12 horas respecto al estadio de espora.

Mientras que el gen *arf2* tiene una mayor expresión (cerca de 5 veces) durante la condición de levadura de 3 horas respecto a espora o casi el doble respecto a micelio. Los genes *arf1*, *arf4* y *arf6* prácticamente no son modulados por el proceso dimorfo, sin embargo sus productos pudieran ser importantes en la ausencia de algún otro de los genes *arf* presentes en *M. circinelloides* (**Figura 10**). Para poder dilucidar la participación de los genes *arf* en el dimorfismo de *M. circinelloides*, fueron utilizadas dos estrategias una de ellas se basó en el análisis de expresión, donde el gen *arf5* fue el primer candidato por el nivel de expresión mayor, otra estrategia utilizada fue seleccionando los genes con el mayor porcentaje de identidad con el gen *ArfB* de *A. nidulans* y *ARF3* de *S. cerevisiae* los cuales presentaron una participación en el crecimiento polarizado, de acuerdo a esto los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* poseen el mayor porcentaje de identidad con un 75% aproximadamente (**Figura 11**).

No fue posible obtener la mutante homocariote en el gen *arf5*, ya que solo se observaron mutantes heterocariotes en los distintos eventos de transformación llevados a cabo y en las distintas mutantes seleccionadas (**Figura 26**). *M. circinelloides* es un hongo multinucleado, y esto ofrece cierta ventaja en el momento de recuperar mutaciones en genes esenciales ya que es posible estudiar el fenotipo (parcial) correspondiente a la pérdida de función de dicho gen esencial. Como ha sido el caso del gen *pkaR4* el cual también generó una mutante heterocariote cuyo fenotipo mostró alteraciones en la emisión del tubo

germinativo (Ocampo y col. 2012). La mutante heterocarionte del gen *arf5* mostro una disminución exacerbada en la generación de esporas, la cual se disminuyó en más de un 90% con respecto a la cepa parental (MU402), sugiriendo fuertemente que una mutante homocarionte sería inviable debido a la incapacidad de formar esporas (**Figura 28**). Estos datos correlacionan con el análisis de expresión dado a que el transcrito de *arf5* corresponde cerca del 50% del total de todos los genes *arf* en la condición de espora (**Figura 10**). Por otra parte, la velocidad de germinación aumentó en aerobiosis y generó una menor biomasa (40% aproximadamente) a las 48 horas, el crecimiento radial disminuyo en un 30% al tercer día de crecimiento respecto a la cepa parental, manteniendo la misma diferencia al cuarto día. Por otra parte en levadura no aumento la velocidad de germinación pero disminuyo ligeramente (15% aproximadamente) la biomasa a las 48 horas. Y en ambas transiciones se aumentó la velocidad de generación de la siguiente morfología, siendo marcada en la transición de micelio a levadura (un 30% aproximadamente) (**Figuras 29, 30, 31,32 y 33**).

El crecimiento de las estructuras aéreas (esporangioforo) de la mutante *arf5* también se ve afectado, es decir se observó un acortamiento de estas estructuras respecto a la cepa parental. Estos datos en conjunto sugieren que el producto del gen *arf5* es esencial debido a su papel preponderante en la generación de estructuras aéreas y esporas (**Figura 38**).

Por otra parte, la delección de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* generaron en términos generales fenotipos similares, sin embargo hay ciertas diferencias. Por ejemplo, en el crecimiento radial la mutante *arf3* tiene un 20% de disminución respecto a las cepas parental y la mutante *arf4*, de estas dos últimas no hay diferencias. Ambas cepas mutantes (*arf3* y *arf4*) fue afectada la generación de esporas casi en la misma proporción, ambas mutantes disminuyeron en un 25% aproximadamente la esporulación respecto a la cepa parental (MU402) (Figura 28). Por otra parte, la cepa mutante *arf3* mostro un 30% de sus esporas con un tamaño menor respecto a las cepas parental y a la mutante *arf4* (**Figura 29**). Solo en la mutante *arf4* se aumentó la velocidad de germinación (20% aproximadamente) respecto a la cepa parental, no siendo el caso para la mutante

arf3 quien mostro valores similares al control. La generación de biomasa solo fue afectada en la mutante *arf3*, quien mostro una menor generación de micelio (30% aproximadamente) a las 48 horas, mientras que la mutante *arf4* aunque hay una tendencia a disminuir, sin embargo estos valores no son significativos respecto al control (**Figura 31**). Por otra parte, en la germinación de levaduras no hubo cambios significativos en ambas mutantes *arf3* y *arf4*, en la velocidad de germinación respecto a la cepa parental, así como tampoco se observaron cambios en la generación de biomasa en crecimiento anaeróbico (**Figuras 32,33**). Respecto a la transición se aumentó la velocidad en la transición de micelio a levadura en ambas cepas, ya que generan más levaduras respecto a la cepa parental a las dos horas de crecimiento, sin embargo la cepa mutante *arf3* a tiempos posteriores (4 y 6 horas) detiene drásticamente la generación de levaduras en esta transición respecto a la cepa parental; por otra parte la cepa mutante *arf4* continuo manifestando un aumento en la generación de levaduras (20% aproximadamente) respecto al control y un 35% más respecto a la mutante *arf3* a las 6 horas de crecimiento (**Figura 34**). La velocidad de transición de levadura a micelio fue aumentada en ambas cepas siendo marcada en la mutante *arf4* siendo casi un 40% de aumento en la formación de micelio respecto a la cepa parental y aumento en casi un 20% respecto a la mutante *arf3* a las 5 horas de crecimiento (**Figura 35**).

Estos datos en conjunto muestran que ambas mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* conducen a ciertos fenotipos similares y está en correlación con el dendograma obtenido, en donde ambas proteínas se asocian en el mismo clado, al igual que con ArfB de *A. nidulans*, cuya mutante mostro defectos en la emisión de tubo germinativo con estructuras dicotómicas en las mismas, dichas estructuras también fueron observadas en las mutantes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sugiriendo funciones similares durante la germinación de ambos hongos. Sin embargo el fenotipo fue más drásticamente alterado en la mutante en el gen *arfB* de *A. nidulans* respecto a las mutantes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*, esto puede ser posible debido a que en *A. nidulans* no existe otra proteína homóloga a ArfB, mientras que en *M. circinelloides*, Arf3 y Arf4 pudieran tener funciones parciamente

redundantes, se está avanzando con la obtención de la doble mutante *ar3/arf4* para validar esta hipótesis. Estos resultados son la primera evidencia de la participación de las proteínas Arf en la fisiología de *M. circinelloides*, y las implicaciones no solamente están circunscritas en el proceso dimorfo, si no como al igual que en *C. albicans*, en donde las proteínas Arf están involucradas en la virulencia, ya que una mutante en una Arf-GAP al ser mutada generó menor virulencia en ratones (*Epp y col. 2010*), quizás ciertos factores de virulencia son exportados a través de vesículas o glicoproteínas de superficie que hacen contacto y reconocimiento con las células huésped usan este mecanismo de transporte en donde las proteínas Arf son reguladores clave.

16. Conclusiones

M. circinelloides tiene seis genes *arf* (*arf1-6*), siendo el gen *arf5* el que muestra el nivel más alto de expresión respecto al resto de los genes *arf* en espora y micelio. La expresión del gen *arf2* es mayor durante el crecimiento levaduriforme, mientras que los genes *arf3* y *arf5* se expresan mayoritariamente durante el crecimiento micelial, los genes *arf1*, *arf4* y *arf6* no son modulados a nivel de transcrito durante el proceso dimórfico.

La mutación en el gen *arf5* generó únicamente esporas heterocariontes, sugiriendo una función esencial en el crecimiento de *M. circinelloides*, presentó un marcado decremento en la generación de esporas y una velocidad de germinación en aerobiosis acelerada.

Las mutaciones en los genes *arf 3* y *4* conducen a una menor esporulación, siendo aún mucho menor la esporulación por la mutante *arf5*; además de la emisión anormal de las hifas.

La mutante *arf3* disminuye la generación de levaduras durante la transición micelio-levadura.

La mutante *arf4* presenta un crecimiento acelerado en la emisión del tubo germinativo durante la transición levadura-micelio.

17. Perspectivas

Complementación de las mutantes sencillas con los genes *arf3* y *arf4*.

Transformación de las mutantes *arf3*, 4 y 5 de *M. circinelloides* con el gen *goxC* de *A. nidulans*, el cual es un marcador de secreción. Además de usar el marcador de endocitosis neutral red cell culture N4638 Sigma Aldrich.

Generación de la doble mutante *arf3/arf4* de *M. circinelloides*.

Fusión traduccional de *arf3* y *arf4* a proteínas fluorescentes, para su localización celular.

18. Bibliografia

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J. 2008. Intracellular Compartments and Protein Sorting. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Chapter 12. *Garland Science*. 695-7042.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J. 2008. Intracellular Vesicular Traffic. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Chapter 13. *Garland Science*. 750-800.
3. Anthonio E.A, Brees C., Baumgart-Vogt E, Hongu T., Huybrechts S.J., Van Dijck P., Mannaerts G.P., Kanaho Y., Van Veldhoven P.P., Franssen M. 2009. Small G proteins in peroxisome biogenesis: the potential involvement of ADP-ribosylation factor 6. *BMC cell biology*. 17; 10:58.
4. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195-201.
5. Bartnicki-Garcia, S. 1968. Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journal of Bacteriology*. 96: 1586-1594.
6. Bastidas R.J., Shertz C.A., Lee S.C., Heitman J. 2012. Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryotic Cell*. 11:270-281.
7. Bredenkamp A., Velankar H., Van Zyl W.H., Gorgens J.F. 2010. Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast*. 27: 849-860.
6. Click, E. S., Stearns, T., & Botstein, D. 2002. Systematic structure-function analysis of the small GTPase Arf1 in yeast. *Molecular biology of the cell*. 13(5), 1652-1664.
8. Chardin P., Paris S., Antony B., Robineau S., Béraud-Dufour S., Jackson C.L., Chabre M. 1996. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*. 384 (6608):481-4.
- Click E.S, Stearns T., Botstein D. 2002. Systematic structure-function analysis of the small GTPase Arf1 in yeast. *Molecular biology of the cell*. 13(5):1652-64

9. Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde JH, Gorwa MF, Colavizza D, Thevelein JM. 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*; 17(12):3326-3341
10. Corrochano L.M., Ruiz-Albert J. 2004. Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeianus*. *Mycological Research* 108(8): 858-863.
11. Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., & Rappuoli, R. 2004. Cellular microbiology (No. Ed. 2). Toxins Acting on G Proteins. *American Society for Microbiology*: 209.
12. David H., Ozcelik I.S., Hoffman G., Nielsen J. 2008. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BioMed Central Genomics* 9: 163.
13. Dell'Angelica E.C., Puertollano R., Mullins C., Aguilar R.C., Vargas J.D., Hartnell L.M., Bonifacino J.S. 2000. GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 149(1):81-94.
14. De la Cruz JO, García-Soto J, Uriostegui C, Carranza L, Novoa G, Reyna G, Martínez-Cadena G. 2007. Differential expression of Rho1GTPase and Rho3GTPase during isotropic and polarized growth of *Mucor circinelloides*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 168-176.
15. Donaldson J.G., Jackson C.L. 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*_12(6):362-75

16. Eden E. R, White I. J y Futter C. E. 2009. Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. *Biochemical Society Transactions*.37:173-177.
17. Epp E, Vanier G, Marcus D, Lee AY, Jansen G, Hallett M, Sheppard DC, Thomas DY, Munro CA, Mullick A, Whiteway M. 2010. Reverse genetics in *Candida albicans* predicts ARF cycling is essential for drug resistance and virulence. *PLoS Pathogens*.5;6(2)
18. Etienne-Manneville S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916): 629-635.
19. Feinberg A.P., Vogelstein B.1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt Biochem*. 132(1):6-13.
20. Freissmuth M., Gilman A.G. 1989. Mutations of GS alpha designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG187 result in loss of GTPase activity. . *The Journal of Biological Chemistry*. 264(36):21907-14.
21. Gil A. 2010. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Volume 1. Cap. 5 Síntesis, degradación y recambio de las proteínas. *Editorial Médica Panamericana. S.A. España. Madrid*.137
22. Gold SE, Brogdon SM, Mayorga ME, Kronstad JW. 1997. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP- dependet protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell*.9(9):1585-94.
23. Gundelfinger E. D, Kessels M. M y Qualmann B.2003. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosi. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:127-139.
24. Gutiérrez, A., López-García, S., & Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*. 84 (3): 442-6.
25. Hansen C. G y Nichols B. J. 2009. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal Cell Science*. 122: 1713–1721.

26. Hemenway CS, Heitman J. 1999. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 30(1):115-51
27. Henikoff S., Henikoff J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 10915-10919.
28. Holmes, D.S. & Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*. 114 (1): 193-7.
29. Horton A. C y Ehlers M. D. 2003. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *The Journal of Neuroscience*. 23:6188-6199.
30. Hua Z y Graham T. R. 2000. Madame Curie Bioscience Database. The Golgi Apparatu. *Landes Bioscience*. Available from. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6268/>.
31. Kahn R., Goddard C., and Nneawkirk M. 1988. Chemical and Immunological Characterization of the 21-kDa ADP-ribosylation Factor of Adenylate Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(17): 8282-8287.
32. Kahn y Gilman. 1984. Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 259:6228-6234.
33. Kahn R., Randazzo P., Serafini T., Weiss O., Rulka C., Clark J., Amherdt M., Roller P., Orci L., and Rothman J. 1992. The Amino Terminus of ADP-ribosylation Factor (ARF) Is a Critical Determinant of ARF Activities and Is a Potent and Specific Inhibitor of Protein Transport. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(18):13039-13046
34. Kahn R., Cherfils J., Elias M., Lovering R., Munro S. and Schurmann A. 2006. Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J Cell Biol*. 27;172(5):645-50.
35. Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Müller O., Perlin M.H., Wösten H.A., de Vries

R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña C.G., Snetselaar K., McCann M., Pérez-Martín J., Feldbrügge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., González-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Münch K., Rössel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Häuser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schlüter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnirke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Güldener U., Münsterkötter M., Haase D., Oesterheld M., Mewes H.W., Mauceli E.W., DeCaprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J., Birren B.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444(7115): 97-101.

36. Kays A, Rowley P, Baasiri R, **Borkovich KA**.2000. Regulation of Conidiation and Adenylyl Cyclase Levels by the G α Protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*;20(20):7693-7705

37. Kruglyak S., Durrett R., Schug M.D., Aquadro C.F. 2000. Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. *Molecular Biology and Evolution* 17(8): 1210-1219.

38. Kumari S, Swetha M. G y Satyajit M. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research*. 20:256–275.

39. Laz, T., D. Pietras, and F. Sherman.1984. Differential regulation of the duplicated isocytochrome c genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.81:4475-4479.

40. Lee J, Lee J, Ju BG.2011. Drosophila arf72A acts as an essential regulator of endoplasmic reticulum quality control and suppresses autosomal-dominant

retinopathy. *The International of Journal of Biochemistry and Cell Biology*:43(9):1392-401.

41. Lee S.C., Li A, Calo S, Heitman J. 2013. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogen*. 9(9):e1003625.

42. Lee S.C., Shaw BD.2008. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett*. 283(2):216-22.

43. Lee S.C., Schmidtke S.N., Dangott L.J., Shaw B.D. 2008. *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell*.7(8):1278-88

44. Li Y., Kelly WG, Logsdon JM Jr, Schurko AM, Harfe BD, Hill-Harfe KL, Kahn RA.2004. Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*.18(15):1834-50.

45. Lippincott-Schwartz J. 2004. Dynamics of secretory membrane trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1038:115-124.

46. Livak K.J., Schmittgen T.D.2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C (T) Method. *Methods*. 25(4):402-8

47. Lodish H, Berk A, Zipursky S. L.2010 Descripción de la ruta secretora. *Biología Celular Molecular*. 17.3. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471>.

48. López-Matas M.A., Eslava A.P., Díaz-Mínguez J.M. 2000. *Mcchs1*, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides* is differentially expressed during dimorphism. *Current microbiology* 40(3): 169-175.

49. Lorca-Pascual J.M., Murcia-Flores L., Garre V., Torres-Martinez S., Ruiz-Vázquez R.M. 2004. The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Molecular Microbiology* 52(5): 1463-1474.

50. Lübbehüsen T.L., Nielsen J., McIntyre M. 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1152–1160.
51. McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P., Willard F.S. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62: 551-577.
52. McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 495-502.
53. Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12:575–625.
54. Meza-Carmen V., García-Soto J., Ongay-Larios L., Coria R., Pedraza-Reyes M., Arnau J., Reyna- Lopez G., Martínez-Cadena G. 2006. Molecular characterization of a G protein α -subunit-encoding gene from *Mucor circinelloides*. *The Canadian Journal of Microbiology*. 52: 627-635.
55. Misumi Y., Miki K., Takatsuki A., Tamura G., Ikehara Y. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 261(24):11398-403
56. Morinaga N., Moss J., Vaughan M. 2007. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(24):12926-31
57. Moss J. y Vaughan M. 1995. Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *Journal of Biology Chemistry*. 270:12327-12330.
58. Mukherjee P.K., Latha J., Hadar R., Horwitz B.A. 2004. Role of Two G-Protein Alpha Subunits, TgaA and TgaB, in the Antagonism of Plant Pathogens by *Trichoderma virens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 542-549.

59. Murcia Flores L., Garre V Ruiz-Vázquez R.M., Torres-Martínez S. 2008. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters* 280(1): 81-88.
60. Murcia-Flores L., Lorca-Pascual J.M., Garre V., Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R.M. 2007. Non-AUG Translation Initiation of a Fungal RING Finger Repressor Involved in Photocarotenogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 15394–15403.
61. Nakano, A., and M. Muramatsu. 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 109:2677–2691.
62. Navarro E., Ruiz-Pérez V.L., Torres-Martínez S. 2000. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry.* 267: 800-807.
63. Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolas FE, Garre V, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM. 2001 A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics.* 266:463-470.
64. Nicolas F.E., de Haro J.P., Torres-Martinez S., Ruiz-Vázquez R.M. 2007. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics Biology.* 44:504-516
65. Nielsen E., Cheung A.Y., Ueda T. 2008. The regulatory *RAB* and *ARF* GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147(4): 1516-1526.
66. Nishijima K.A., Wall M.M. 2011. First Report of Association of *Mucor circinelloides* on Noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. *Plant Disease* 95(3): 360.
67. Ocampo J., Fernández-Núñez L., Silva F., Pereyra E., Moreno S., Garre V., Rossi S. 2009. A Subunit of Protein Kinase A Regulates Growth and Differentiation in the Fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell* 8: 933-944.
68. Ocampo, J., McCormack, B., Navarro, E., Moreno, S., Garre, V., & Rossi, S. 2012. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and

differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell*.11(8), 989-1002.

69. Orlowski M, 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews* 55: 234-258.

70. Paczkowski J.E., Richardson B.C., Fromme J.C.2015. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell and Biology*:25(7):408-16

71. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9):2000-2007.52.

72. Ponnambalam S, Baldwin SA. 2003. Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Molecular Membrane Biology*.20(2):129-39

73. Quiles-Rosillo M.D., Torres-Martínez S., Garre V. 2003. *cig A*, a light inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crg A*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 122-132.

74. Rangel-Porras, R. A., Meza-Carmen, V., Martinez-Cadena, G., Torres-Guzmán, J. C., González-Hernández, G. A., Arnau, J., & Gutiérrez-Corona, J. F.2005. Molecular analysis of an NAD-dependent alcohol dehydrogenase from the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*. 274(4), 354-363.

75. Rangel Serrano Ángeles.1995. Función y Propiedades de las Proteínas G. IPN pág. 53-59.

76. Repasky G.A., Chenette E.J., Der C.J. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does *Raf* function alone to mediate *Ras* oncogenesis?. *Trends in cell biology* 14(11): 639-647.

77. Richard A. Kahn and Alfred G. Gilman. 1986.The Protein Cofactor Necessary for ADP-ribosylation of G, by Cholera Toxin is Itself a GTP Binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*.261 pp. 7906-7911.

78. Roncero MI, Jepsen LP, Strøman P, van Heeswijck R. 1989. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*. 84: 335-343.

79. Roze L.V., Mahanti N., Mehigh R., McConnell D.G., Linz J.E. 1999. Evidence that *MRas1* and *MRas3* proteins are associated with distinct cellular functions during growth and morphogenesis in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal genetics and biology*.28(3): 171-189.
80. Rosenkrantz, M., T. Alam, K. Kim, B. Clark, P. Srere, and L. Guarente. 1986. Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes. *Mol. Cell. Biol.* 6:4509-4515.
81. Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.*
82. Sánchez M., Pérez M. 2002. Gpa2, a G-protein alpha subunit required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1(6):865-74.
83. Salcedo-Hernández R., Ruiz-Herrera J.1993. Isolation and characterization of a mycelial cytochrome *aa3*-deficient mutant and the role of mitochondria in dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology.* 17: 142–154.
84. Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., & Garre, V. 2008. A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Molecular microbiology.*70(4), 1026-1036.
85. Singh L.P., Gill S.S., Tuteja N. 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior.* 6(2): 175-191.
86. Singh R., Recinos R.F., Agresti M., Schaefer R.B., Bosbous M., Gosain A.K. 2006. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: an improvement in detecting mRNA levels in mouse cranial tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7):2227-34
87. Schipper M.A. 1976. Induced azygospore formation in *Mucor* (*Rhizomucor*) *pusillus* by *Absidia corymbifera*. *Antonie Van Leeuwenhoek* .42:141-144
88. Schleifer, L. S., Kahn, R. A., Hanski, E., Northup, J. K., Sternweis, P. C., & Gilman, A. G.1982. Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of

the purified regulatory component of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 257(1), 20-23.

89. Shin H. W y Nakayama K. 2004. Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *Journal of Biological Chemistry*. 136:761-767.

90. Söllner T , Bennett M. K , Whiteheart S. W , Scheller R. H y Rothman J. E.1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75:409-418.

91. Sorol, M.R., Pastori R.L., Muro a., Moreno S., Rossi S.2000. Structural and functional analysis of the cAMP binding domain from the regulatory subunit of *Mucor rouxii* protein kinase A. *Archives of biochemistry and biophysics*. 382(2): 173-181.

92. Spiering M.J., Moran G., Chauvel M., MacCallum D.M., Higgins J., Hokamp K., Yeomans T., D'Enfert C., Coleman D.C., Sullivan D.J. 2010. Comparative Transcript Profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Identifies SFL2, a *C. albicans* Gene Required for Virulence in a Reconstituted Epthelial Infection Model. *Eukayotic Cell*. 9(2):251-265.

93. Springer S, Spang A y Schekman R. 1999. A primer on vesicle budding. *Cell*. 97: 145-148.

94. Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., & Kahn, R. A.1990. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(3), 1238-1242.

95. Stearns, Kahn, Botsteint, y Hoyt.1990. ADP Ribosylation Factor Is an Essential Protein in *Saccharomyces cerevisiae* and Is Encoded by Two Genes. *Molecular Cellular Biology*.10(12), 6690-6699

96. Stearns, Willingham, Botstein y Kahn. 1990. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.87,1238-1242.
97. Sudhof T. C. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annual Reviews Neuroscience*. 27:509-547.
98. Sun J., Sun X.X., Tang P.W., Yuan Q.P. 2012. Molecular cloning and functional expression of two key carotene synthetic genes derived from *Blakeslea trispora* into *E. coli* for increased β -carotene production. *Biotechnology Letters*. 34(11):2077-2082.
99. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. 2001. Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*.81(1): 154-188.
100. Tamkun, J.W., R.A. Kahn, M. Kissinger, B.J. Brizuela, C. Rulka, M.P. Scott, and J.A. Kennison. 1991. The arf1 like gene encodes an essential GTP-binding protein in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:3120–3124.
101. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2008. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
102. Tanaka H, Nodzyński T, Kitakura S, Feraru MI, Sasabe M, Ishikawa T, Kleine-Vehn J, Kakimoto T, Friml J. 2014. BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*.55(4):737-49.
103. Teste M.A., Duquenne M., François J.M., Parrou J.L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Central Molecular Biology*.10: 99-114.
104. Tokarev A. A, Alfonso A y Segev N. 2000. Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways. *Madame Curie Bioscience Database Austin: Landes Bioscience*.

105. Valle-Maldonado M.I., Jácome-Galarza I.E., Gutiérrez-Corona F., Ramírez-Díaz M.I., Campos-García J., Meza-Carmen V. 2015. Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular biology reports*. 42(3):705-11.
106. Van Heeswijck, R. 1984. The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49: 597-609.
107. Vandesomepele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7): 1-12.
108. Vaughan M. and Moss J.1990. ADP-Ribosylating. Toxins and G Proteins. Insights into Signal Transduction. *Science*. 250(4982):841-2.
109. Vedani A., Smiesko M.2009. In silico toxicology in drug discovery - concepts based on three-dimensional models. *Alternatives to laboratory animals*. 37(5):477-96.
110. Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., Farquhar M.. 2000. THE REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALING FAMILY. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40 (1): 235-271
111. Wacker M.J., Godard M.P. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of Biomolecular Techniques*.16(3): 266-271.
112. Wang Q, Xue X, Li Y, Dong Y, Zhang L, Zhou Q, Deng F, Ma Z, Qiao D, Hu C, Ren Y.2015. A maize ADP-ribosylation factor ZmArf2 increases organ and seed size by promoting cell expansion in Arabidopsis. *Physiology Plant*. 10,12359.
113. Weis K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*. 112(4): 441-451.

114. West R.E. Jr, Moss J., Vaughan M., Liu T., Liu T.Y. 1985. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *The Journal of Biological Chemistry*.260(27): 14428-14430.
115. Wikandari R., Millati R., Lennartsson P.R., Harmayani E., Taherzadeh M.J.2012. Isolation and Characterization of Zygomycetes Fungi from Tempe for Ethanol Production and Biomass Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(6):1501-1512.
116. Wolff A.M., Appel K.F., Petersen J.B., Poulsen U., Arnau J. 2002. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Research*. 2(2): 203-213.
117. Xia C., Zhang J., Zhang W., Hu Bo. 2011. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology and Biofuels*. 4: 15-24.
118. Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., Sharefkin J.B. 1992. Effect of different laboratory techniques for guanidium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *Genome Research*. 1: 286-290.
119. Yorimitsu T., Sato K., Takeuchi M. 2014. Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Front Plant Sci*. 21;5:411.
120. Zerial M., McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(2): 107-117.