



**UNIVERSIDAD  
MICHUACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

**Presenta:**

**I.B.Q. José Alberto Patiño Medina**

**Título de la Tesis:**

**Participación de los productos de los genes *arf1* y *arf2* en  
el crecimiento y virulencia de *Mucor circinelloides***

**Asesor:** D.C. Víctor Meza Carmen

**Co-Asesora:** D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

**Morelia Michoacán, Octubre 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres José y Rosa por motivarme cada día con sus acciones admirables, por ser un ejemplo a seguir y por su apoyo incondicional.*

*A mis hermanos Julio y Karina por expandir mi visión del mundo con sus opiniones.*

*A mi asesor el D. C. Víctor Meza Carmen por su completo interés durante el desarrollo del proyecto y a mi Co-asesora la D. C. Martha Isela Ramírez Díaz por su apoyo y aportes a la mejora del proyecto.*

*A mis amigas de vida Gina, Bety y Seles por apoyarme cada momento desde que las conocí, por ayudarme a equilibrar mis prioridades y por todos los momentos felices que hemos vivido juntos.*

*A mis compañeros de generación; Eli, Ale, Lupis, Iván, Belem, Pedro, Richi, Alberto y Pau por hacer que el camino que comenzamos juntos fuera divertido.*

*A mis compañeros de laboratorio; Nan, Marco, Sharo, Mau, Xoch, Lau, Said, David, Viri, Wicho, Lore, Ale Guzmán, Ere, Yessi, Katy, Javier, Gonzalo y Blanca por su apoyo técnico y personal, gracias por compartir su tiempo conmigo.*

*Al D.C. Victoriano Garre Mula por aceptarme en su grupo de trabajo en la Universidad de Murcia, España y por la confianza brindada.*

*A mis compañeros de laboratorio en Murcia; Carlos, Maribel, Sergio, Elena, José, Pablo, PJ, Joseto, Dani, Pepe, Aranza y Ricardo por su completo apoyo técnico para la generación de las mutantes arf y por hacerme sentir en casa.*

*A los D. C. Homero Reyes de la Cruz, Josué Altamirano Hernández y Jesús Campos García, mi comité de evaluación; por sus sugerencias y observaciones a la mejora del proyecto.*

*A Conacyt por la beca otorgada; a la UMSNH y al CIDAM por las instalaciones brindadas; a los grupos de trabajo de los laboratorios de Biotecnología Microbiana y Microbiología por su apoyo técnico.*

**A. ÍNDICE**

<b>A.</b>	<b>Índice.....</b>	<b>2</b>
<b>B.</b>	<b>Índice de figuras.....</b>	<b>7</b>
<b>C.</b>	<b>Índice de tablas.....</b>	<b>12</b>
<b>D.</b>	<b>Abreviaturas y símbolos.....</b>	<b>13</b>
<b>E.</b>	<b>Prefijos.....</b>	<b>13</b>
<b>F.</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>14</b>
<b>G.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>I.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Mucor circinelloides</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Generalidades.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Propagación de <i>M. circinelloides</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Crecimiento de <i>M. circinelloides</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>Tráfico vesicular.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Endocitosis.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Exocitosis.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3</b>	<b>Proteínas G.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Proteínas G monoméricas.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Proteínas G en el tráfico vesicular.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Características generales de las proteínas de la familia Arf.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Regulación de la actividad de las proteínas Arf.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.5</b>	<b>Participación de las proteínas de la familia Arf en hongos.....</b>	<b>35</b>
<b>1.4</b>	<b>Factores de virulencia en hongos.....</b>	<b>39</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Factores de virulencia.....</b>	<b>39</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Hongos patógenos de humanos.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Mucormicosis.....</b>	<b>42</b>
<b>II.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>46</b>
<b>III</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>46</b>
<b>IV</b>	<b>Objetivo General.....</b>	<b>47</b>

4.1	Objetivos específicos.....	47
V.	Estrategia experimental general.....	47
VI.	Materiales y métodos.....	48
6.1	Cepas utilizadas.....	48
6.2	Manipulación de ácidos nucleicos.....	48
6.2.1	Aislamiento de ADN genómico de <i>M. circinelloides</i> ...	48
6.2.2	Amplificación de ADN por PCR.....	49
6.2.3	Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos.....	52
6.2.4	Transformación de <i>E. coli</i> .....	52
6.2.5	Aislamiento de ADN plasmídico.....	52
6.2.6	PCR en colonia.....	53
6.2.7	Tratamiento del ADN con enzimas.....	53
6.3	Construcción del fragmento recombinante arf1R mediante clonaciones y subclonaciones en el vector pJET1.2/blunt.....	53
6.4	Amplificación del fragmento recombinante arf2R mediante PCR en fusión.....	54
6.5	Construcción del fragmento recombinante arf1RL para la generación de la doble mutante en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> .....	57
6.6	Deleción génica mediante recombinación homóloga en <i>M. circinelloides</i> .....	57
6.6.1	Integración de ADN exógeno en el genoma de <i>M. circinelloides</i> .....	59
6.6.2	Transformación de <i>M. circinelloides</i> .....	60
6.6.3	Complementación de cepas mutantes de <i>M. circinelloides</i> .....	61
6.6.4	Secuenciación de fragmentos de ADN.....	62
6.6.5	Corroboración de las mutantes mediante PCR.....	62
6.6.6	Corroboracion de las mutantes mediante Southern blot.....	63

6.6.7	Corroboración de las mutantes mediante RT-qPCR...	64
6.7	Cultivo de <i>E coli</i> .....	66
6.8	Cultivo de <i>M. circinelloides</i> .....	66
6.8.1	Condiciones generales de crecimiento de <i>M. circinelloides</i> .....	66
6.8.2	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i> ..	67
6.9	Crecimiento radial de <i>M. circinelloides</i> .....	68
6.10	Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. circinelloides</i> .....	68
6.10.1	Determinación de porcentajes de germinación de <i>M. circinelloides</i> .....	68
6.11	Cuantificación del crecimiento.....	69
6.12	Ensayos de virulencia en <i>Mus musculus</i> .....	69
6.13	Crecimiento y mantenimiento de <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i> .....	69
6.13.1	Ensayos de virulencia en <i>C. elegans</i> .....	70
6.14	Análisis de imágenes.....	70
6.15	Análisis estadístico.....	70
VII.	Resultados.....	71
7.1	Construcción y clonación del fragmento de recombinación del gen que codifica a la proteína Arf1 de <i>M. circinelloides</i> .....	71
7.2	Construcción del fragmento de recombinación del gen que codifica a la proteínas Arf2 de <i>M. circinelloides</i> .....	76
7.3	Transformación de <i>M. circinelloides</i> con los fragmentos recombinantes arf1R y arf2R.....	77
7.4	Confirmación molecular de mutantes en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	78

7.5	Confirmación molecular de la integración del fragmento recombinante <i>arf1RL</i> para generar la cepa doble mutante $\Delta arf1/\Delta arf2$ de <i>M. circinelloides</i> .....	84
7.6	Corroboración de la mutación en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> mediante RT-qPCR.....	87
7.7	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en el crecimiento de <i>M. circinelloides</i> .....	89
7.7.1	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en el crecimiento aerobio radial de <i>M. circinelloides</i> .....	89
7.7.2	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología de las esporas de <i>M. circinelloides</i> .....	90
7.7.3	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la producción de esporas de <i>M. circinelloides</i> .....	92
7.7.4	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología macroscópica del esporangióforo de <i>M. circinelloides</i> .....	93
7.7.5	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología celular durante el crecimiento aerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	94
7.7.6	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la filamentación, el tamaño de célula madre y la longitud de la hifa durante el crecimiento aerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	94
7.7.7	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la velocidad de germinación durante el crecimiento aerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	97
7.7.8	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la generación de biomasa durante el crecimiento aerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	98
7.7.9	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la reproducción sexual de <i>M. circinelloides</i> .....	99

7.7.10	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología celular durante el crecimiento anaerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	99
7.7.11	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la velocidad de germinación durante el crecimiento anaerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	100
7.7.12	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la generación de biomasa durante el crecimiento anaerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	102
7.7.13	Complementación de las cepas mutantes $\Deltaarf1$ y $\Deltaarf2$ con los genes silvestres y con los genes mutantes que codifican la proteína constitutivamente activa.....	102
7.8	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la virulencia de <i>M. circinelloides</i> .....	109
7.8.1	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la virulencia de <i>M. circinelloides</i> en el modelo de <i>M. musculus</i> .....	109
7.8.2	Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la toxicidad del sobrenadante de <i>M. circinelloides</i> en el modelo de <i>C. elegans</i> .....	110
VIII.	Discusión.....	113
IX.	Conclusión.....	122
9.1	Perspectivas.....	123
X.	Bibliografía.....	124

**B. ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Crecimiento en medio líquido de <i>M. circinelloides</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Proceso general del tráfico vesicular.....	23
<b>Figura 4.</b> Endocitosis mediada por clatrina.....	26
<b>Figura 5.</b> Exocitosis constitutiva y regulada.....	27
<b>Figura 6.</b> Interacción con membranas de las proteínas Rab y Arf.....	30
<b>Figura 7.</b> Cambio conformacional de las proteínas Arf al ser activadas.....	32
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la brefeldina A.....	34
<b>Figura 9.</b> Regulación de las proteínas Arf.....	35
<b>Figura 10.</b> Clasificación taxonómica de mucorales.....	44
<b>Figura 11.</b> Patogénesis de la mucormicosis.....	45
<b>Figura 12.</b> Esquema de la estrategia de la PCR en fusión para generar el fragmento recombinante del gen <i>arf2</i> .....	56
<b>Figura 13.</b> Evento de doble recombinación homóloga.....	59
<b>Figura 14.</b> Construcción del fragmento recombinante para la delección del gen <i>arf1</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	72
<b>Figura 15.</b> Clonación de los fragmentos 5' y 3' del gen <i>arf1</i> y del gen <i>pyrG</i> en el vector pJET 1.2/blunt y su confirmación por PCR en colonia.....	74
<b>Figura 16.</b> Subclonación del gen <i>pyrG</i> en el plásmido p- <i>arf1</i> -3'.....	75

<b>Figura 17.</b> Subclonación del fragmento 5' del gen <i>arf1</i> en el plásmido p- <i>arf1</i> -3'P.....	75
<b>Figura 18.</b> Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR convencional para la construcción del fragmento de recombinación para la delección del gen <i>arf2</i> .....	76
<b>Figura 19.</b> Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR en fusión para la construcción del fragmento recombinante usado en la delección del gen <i>arf2</i> .....	77
<b>Figura 20.</b> Confirmación molecular mediante PCR de la mutación en el gen <i>arf1</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	79
<b>Figura 21.</b> Confirmación molecular mediante PCR de la mutación en el gen <i>arf2</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	80
<b>Figura 22.</b> Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa mutante en el gen <i>arf1</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	82
<b>Figura 23.</b> Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa mutante en el gen <i>arf2</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	83
<b>Figura 24.</b> Confirmación molecular mediante PCR de la cepa doble mutante $\Delta arf1/\Delta arf2$ de <i>M. circinelloides</i> .....	85
<b>Figura 25.</b> Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa doble mutante $\Delta arf1/\Delta arf2$ de <i>M. circinelloides</i> .....	86
<b>Figura 26.</b> Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>arf</i> en las cepas mutantes $\Delta arf1$ , $\Delta arf2$ y $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$ de <i>M. circinelloides</i>	88

<b>Figura 27.</b> Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en el crecimiento en medio sólido.....	90
<b>Figura 28.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en el tamaño de espora de <i>M. circinelloides</i> .....	91
<b>Figura 29.</b> Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la producción de esporas <i>M. circinelloides</i> .....	92
<b>Figura 30.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología del esporangióforo de <i>M. circinelloides</i> .....	93
<b>Figura 31.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología micelial de <i>M. circinelloides</i> .....	95
<b>Figura 32.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la filamentación, el tamaño de célula madre y la longitud de la hifa de <i>M. circinelloides</i> .....	96
<b>Figura 33.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la velocidad de germinación en el crecimiento aerobio.....	97
<b>Figura 34.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la generación de biomasa en el crecimiento aerobio.....	98
<b>Figura 35.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> durante la reproducción sexual de <i>M. circinelloides</i> .....	100
<b>Figura 36.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la morfología en el crecimiento anaerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	101

<b>Figura 37.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la velocidad de germinación en el crecimiento anaerobio de <i>M. circinelloides</i> .....	104
<b>Figura 38.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la generación de biomasa durante el crecimiento anaerobio.....	104
<b>Figura 39.</b> Representación esquemática del mapa del plásmido pEUKA4 que contiene los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> silvestres y los genes mutantes que codifican la proteínas constitutivamente activas.....	105
<b>Figura 40.</b> Corroboración mediante secuenciación de la integridad de los genes silvestres <i>arf1</i> y <i>arf2</i> y los genes mutantes que codifican las proteínas constitutivamente activas.....	106
<b>Figura 41.</b> Efecto de la complementación del gen <i>arf2</i> silvestre y mutante en la cepa $\Delta arf2$ en la velocidad de germinación en crecimiento anaerobio.....	107
<b>Figura 42.</b> Morfología levaduriforme de la mutante $\Delta arf2$ complementada con el gen <i>arf2</i> silvestre y con el gen mutante que codifica la proteína constitutivamente activa.....	107
<b>Figura 43.</b> Análisis del nivel de transcrito del gen <i>adh1</i> en la cepa mutante $\Delta arf2$ y en las cepas mutantes $\Delta arf2$ complementadas.....	108
<b>Figura 44.</b> Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>M. musculus</i> .....	111

---

<b>Figura 45.</b> Efecto de la toxicidad en <i>C. elegans</i> de los sobrenadantes del crecimiento micelial de las cepas mutantes en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> de <i>M. circinelloides</i> .....	111
<b>Figura 46.</b> Efecto del tratamiento con proteasa de los sobrenadantes del crecimiento micelial de las cepas mutantes en los genes <i>arf1</i> y <i>arf2</i> en la toxicidad sobre <i>C. elegans</i> .....	112
<b>Figura 47.</b> Modelo propuesto de las funciones de las proteínas Arf de <i>M. circinelloides</i> en el dimorfismo y virulencia.....	121

**C. ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Funciones asociadas a las proteínas Arf según su clasificación en mamíferos.....	33
<b>Tabla 2.</b> Cepas usadas.....	50
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR.....	51
<b>Tabla 4.</b> Plásmidos y fragmentos recombinantes usados.....	58
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos y sondas utilizados para RT-qPCR.....	65

## D. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

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

**GEF:** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (guanine nucleotide exchange factor)

**GDP:** Guanosín difosfato

**GTP:** Guanosín trifosfato

**kDa:** kilo Daltons

**PGH:** Proteínas G heterotriméricas

**PM:** Peso molecular

**ARN:** Ácido ribonucleico

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa en tiempo real

**TAE:** Tris-Acetato- EDTA

## E. PREFIJOS

**M:** mega ( $1 \times 10^6$ )

**K:** kilo ( $1 \times 10^3$ )

**μ:** micro ( $1 \times 10^{-6}$ )

**n:** nano ( $1 \times 10^{-9}$ )

## F. RESUMEN

Las proteínas de la familia Arf pertenecen a la superfamilia Ras de las proteínas G monoméricas, cuya función está asociada al tráfico vesicular en las rutas endocítica y secretora. Se ha descrito la participación de genes *arf* en el crecimiento polarizado y virulencia en diversos organismos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Candida albicans*. *Mucor circinelloides* es un hongo que presenta varios estadios de crecimiento y es considerado un patógeno oportunista, siendo un modelo de estudio para entender procesos de diferenciación celular y virulencia, en donde se han reportado seis miembros pertenecientes a la familia Arf (Arf1-Arf4 y Arl1-Arl2). Las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides* son 96% idénticas en secuencia primaria, pudiendo tener funciones redundantes. Por otra parte, el nivel del transcrito del gen *arf2* incrementó en el estadio levaduriforme 6.2 veces respecto al estadio de espora, sugiriendo la participación del gen *arf2* en el desarrollo de la morfología levaduriforme de *M. circinelloides*. El objetivo de este trabajo fue interrumpir los genes *arf1* y *arf2* de *M. circinelloides* y evaluar su efecto en procesos morfológicos y de virulencia. La delección del gen *arf1* mostró defectos en el crecimiento polarizado, disminución en la producción de esporas y la incapacidad de reproducirse sexualmente, así como un incremento en la virulencia en los modelos de nematodo y ratón inmunosuprimido; mientras que la delección del gen *arf2* reveló una disminución en la producción de esporas y la incapacidad de desarrollar la morfología levaduriforme, así como un incremento en la virulencia en el modelo de nematodo. En conclusión, las proteínas Arf1 y Arf2 regulan el adecuado crecimiento en sustrato sólido y la producción de esporas de forma redundante. Por otra parte la proteína Arf1 regula el desarrollo de la morfología micelial controlando el tamaño de célula madre, la filamentación, la longitud de la hifa, la reproducción sexual y la secreción de proteínas que actúan como factores de virulencia; mientras que la proteína Arf2 es la única proteína Arf de las cuatro proteínas Arf de *M. circinelloides* que es indispensable para el desarrollo de la morfología levaduriforme.

**Palabras Clave:** crecimiento polarizado, *Mucor circinelloides*, proteínas Arf, tráfico vesicular, virulencia.

## G. ABSTRACT

The proteins of the Arf family belong to the Ras superfamily of the monomeric G proteins, whose function is associated with vesicular traffic in the endocytic and secretory pathways. The involvement of *arf* genes in polarized growth and virulence has been described in several organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* and *Candida albicans*. *Mucor circinelloides* is a fungus that presents several stages of growth and is considered an opportunistic pathogen, which makes it a biological model to understand cell differentiation and virulence processes, in which six members belonging to the Arf family (Arf1-Arf4 and Arl1-Arl2) have been reported. The Arf1 and Arf2 proteins of *M. circinelloides* are 96% identical in primary sequence, being able to have redundant functions. On the other hand, the transcript level of the *arf2* gene was higher at the yeast form stage 6.2 times more than the spore stage, suggesting the involvement of the *arf2* gene in yeast development. The objective of this work was to interrupt the *arf1* and *arf2* genes in *M. circinelloides* and to evaluate their effect in morphological and virulence processes. Deletion of the *arf1* gene showed defects in polarized growth, decrease in spore production and inability to reproduce sexually, as well as increased virulence in the nematode and immunosuppressed mouse models, while deletion of the *arf2* gene revealed a decrease in spore production and the inability to develop yeast morphology, as well as an increase in virulence in the nematode model. In conclusion the proteins Arf1 and Arf2 control both vegetative aerobic growth as well as the production of spores, redundantly. On the other hand, the Arf1 protein regulates the development of mycelial morphology by controlling mother cell size, filamentation, length of the hyphae, sexual reproduction and secretion of proteins that act as virulence factors; whereas the Arf2 protein is the only Arf protein of the four Arf proteins of *M. circinelloides* that is indispensable for the development of yeast morphology.

**Key words:** Arf proteins, *Mucor circinelloides*, polarized growth, vesicular traffic, virulence.

## I. INTRODUCCIÓN

En células eucariotas, la comunicación intra y extra celular esta mediada en parte por un flujo de vesículas. El transporte de macromoléculas entre organelos y la homeostasis de estos, depende de un flujo bidireccional de vesículas o de estructuras tubo-vesiculares. Desde un organelo, ciertos mecanismos específicos permiten el acarreo de moléculas de naturaleza lipídica y proteica mediante vesículas que están destinadas a otro organelo receptor o para ser secretadas. Esas vesículas entonces podrán reconocer específicamente a la membrana con la cual se fusionaran y liberaran su contenido **(Chavrier y Goud, 1999)**.

Tanto la formación como el direccionamiento de las vesículas están basados en una compleja red de interacciones de moléculas reguladoras. Las moléculas seleccionadas dejan el organelo y se incorporan a vesículas, en donde proteínas citoplasmáticas se ensamblan en la membrana donadora para formar la cubierta. Una vez ensamblada la cubierta, se provoca un cambio en la membrana donadora e induce la liberación de las vesículas. El direccionamiento y fusión con la membrana aceptora requiere interacción con los microtúbulos y filamentos de actina. Posteriormente sucederá el reconocimiento específico de proteínas integrales de la membrana aceptora y la membrana donadora, dándose así la fusión y liberación del contenido de las vesículas en el organelo aceptor o en la membrana plasmática liberando el contenido al espacio extracelular **(Chavrier y Goud, 1999)**.

Este proceso es altamente conservado en todas las células eucariotas y es fundamental en las mismas debido a sus implicaciones en el crecimiento, la diferenciación celular y la comunicación. Por lo que entender los mecanismos que regulan el tráfico de vesículas permitirá tener influencia en la regulación de distintos fenómenos como son el tratamiento de infecciones causadas por hongos patógenos.

## 1.1 *Mucor circinelloides*

### 1.1.1 Generalidades

El hongo *M. circinelloides*, un mucoral dimórfico, es un modelo de estudio en la regulación de la diferenciación celular (**Lübbehüsen y col., 2003**) y en respuestas celulares a luz (**Murcia-Flores y col., 2008**). Se considera como un patógeno emergente en pacientes inmunocomprometidos (**Bastidas y col., 2012**) y se le ha asociado también a la contaminación de plantas como el noni (**Nishijima y col., 2011**). También se ha utilizado como posible fuente de ácidos grasos para la obtención de fuentes de energía renovables como el biodiesel (**Xia y col., 2011; Wei y col., 2013**) y su metabolismo fermentativo ha sido investigado para la obtención de etanol (**Wikandari y col., 2012**). Ha sido empleado como un huésped heterólogo para la producción de enzimas importantes de carácter industrial, como la producción de glucosa oxidasa (**Bredenkamp y col., 2010**).

El evento diferenciativo más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo (**Lübbehüsen y col., 2003**). No obstante este hongo presenta otros eventos diferenciativos como la síntesis de carotenos inducida por la presencia de luz (**Murcia-Flores y col., 2008**). Al crecer en presencia de luz, las colonias se tornan amarillentas, mientras que en ausencia de luz, las colonias son albinas. Además, el desarrollo de estructuras reproductivas y la esporulación se ven acelerados por la presencia de luz.

El genoma de este organismo ha sido secuenciado 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 de 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**), el basidiomiceto *Ustilago maydis* con 20 Mb (**Kämper y col., 2006**), y los zigomicetos *Rhizopus oryzae* con 45.3 Mb (**Ma y col., 2009**) y *Phycomyces blakesleeanus* con 30 Mb (**Corrochano y col., 2004**).

La existencia de un sistema eficaz de transformación genética, que permite la introducción de ADN exógeno en *M. circinelloides* (**Roncero y col., 1984; Gutiérrez y col., 2011**); así como el desarrollo de vectores autorreplicativos, capaces de complementar auxotrofías presentes en distintas cepas de *M. circinelloides* (**Roncero y col., 1989; Benito y col., 1995**); como la generación de procedimientos para la integración, por recombinación homóloga, de fragmentos lineales de ADN en el genoma de *M. circinelloides*, ha permitido tanto la generación de mutantes por reemplazamiento génico como la integración en un locus concreto (**Navarro y col., 2001**). Todas estas herramientas moleculares han convertido a *M. circinelloides* en la especie, dentro de los zigomicetos, con el mayor repertorio de recursos moleculares para analizar una función específica (**López-García, 2015**).

### 1.1.2 Propagación de *M. circinelloides*

Algunas especies del género *Mucor* son capaces de generar tres tipos esporas: 1) zigospora, producto de la recombinación genética, 2) esporangiospora, producto de la reproducción asexual, que sirve como mecanismo de dispersión y 3) artrospora, que asegura la supervivencia bajo condiciones adversas (**Orlowski, 1991**).

Las especies del género *Mucor* son heterotálicas, con dos tipos sexuales: (+) y (-), idénticos morfológicamente. La zigospora deriva de la reproducción sexual, la cual sucede cuando hay fusión de hifas de los diferentes tipos sexuales, lo que conduce finalmente a la formación de la zigospora. Esta permanece en reposo durante meses o incluso años antes de germinar y producir una única estructura alargada conocida como esporangioforo, similar a la que se produce en la reproducción asexual, que en la punta presenta un cuerpo esférico conocido como esporangio del cual se desprenden las zigoesporas (figura 1). El proceso de reproducción sexual es mediado por la feromona ácido trispórico, un compuesto volátil de 18 carbonos derivado del  $\beta$ -caroteno (**Lee y Heitman, 2014**).

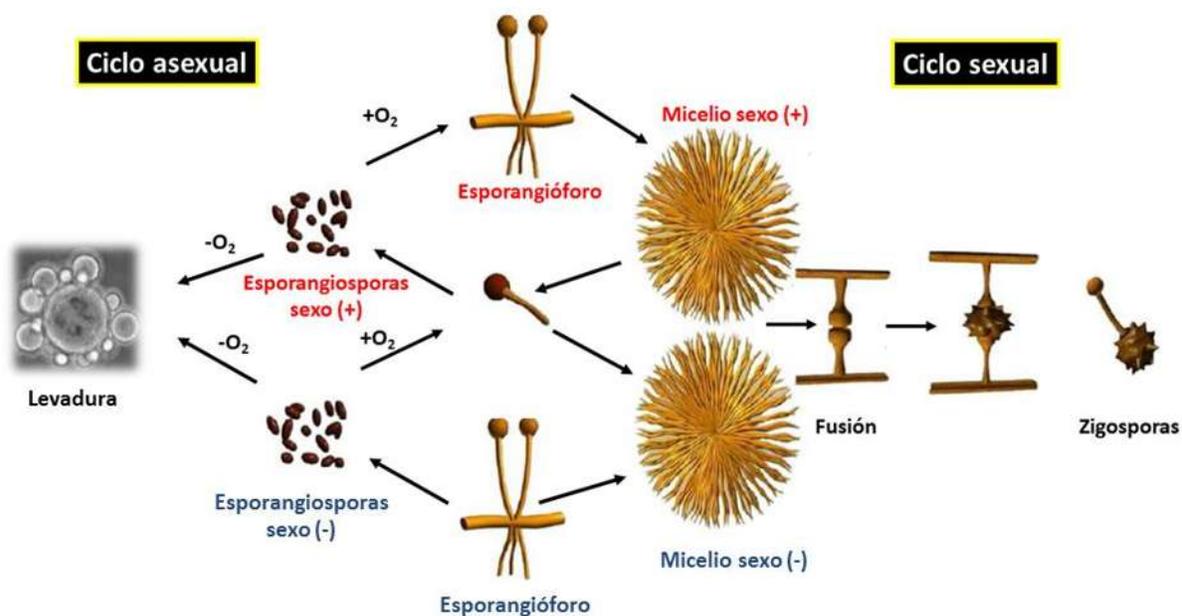
Por otra parte, las esporangiosporas derivadas de la reproducción asexual, son elipsoidales y aunque derivan exclusivamente del hábitat micelial, son capaces de desarrollarse hacia la morfología levaduriforme o micelial dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono (**Lübbehüsen y col., 2003**) (figura 1).

La artrospora es la estructura menos estudiada y se ha propuesto su funcionalidad como un mecanismo de supervivencia ya que se forma al final del crecimiento estacionario o bajo condiciones nutricionales desfavorables (**Orlowski, 1991**).

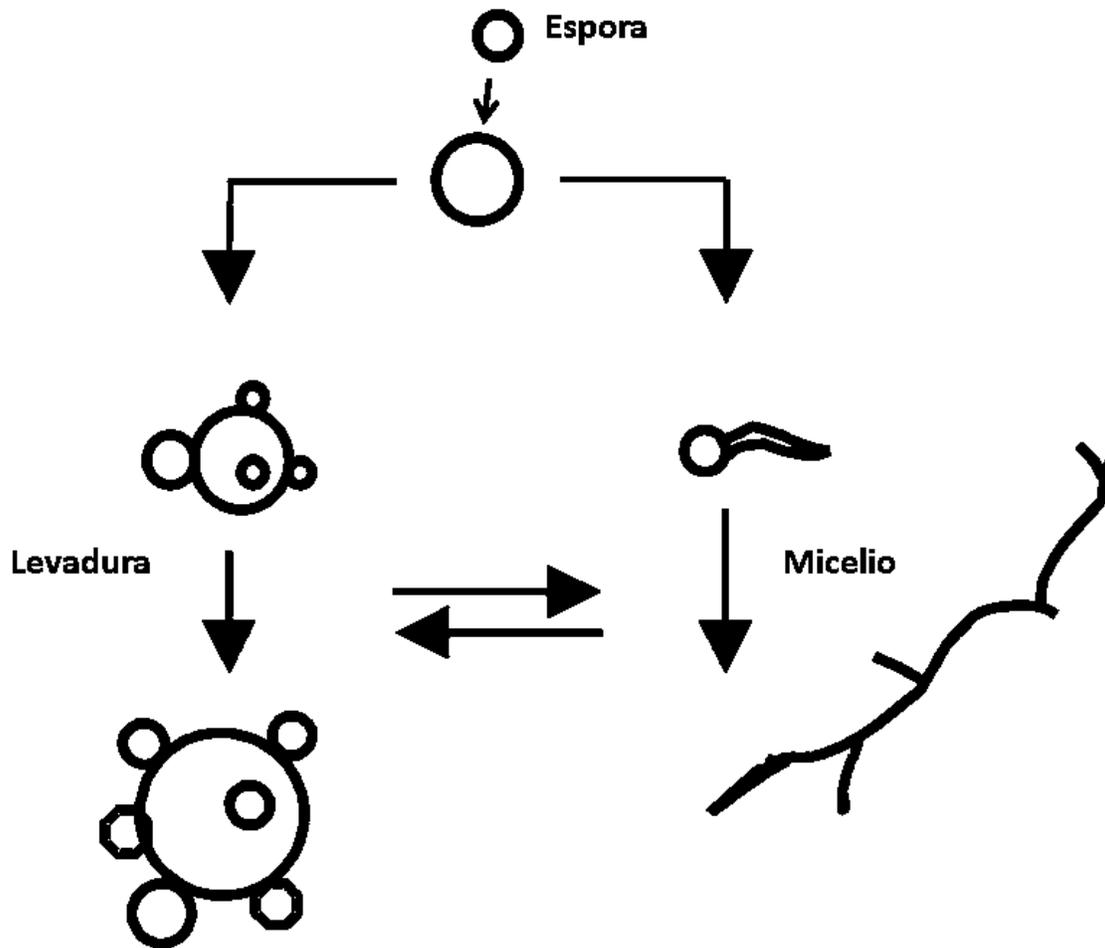
### **1.1.3 Crecimiento de *M. circinelloides***

El crecimiento y desarrollo de muchas células está condicionado por los nutrientes y las condiciones fisicoquímicas del entorno; el desarrollo de *M. circinelloides* no es la excepción. Si las esporangiosporas (en adelante espora) se crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis el crecimiento es polarizado (filamentoso) (figura 2). Además del ambiente gaseoso, el crecimiento levaduriforme requiere de 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**) (figura 2).

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**).



**Figura 1. Ciclo de vida de *M. circinelloides*.** En el ciclo asexual a partir de la esporangiospora, una célula haploide, si se crece en presencia de oxígeno está desarrollará la morfología de micelio, mientras que si crece en ausencia de oxígeno y en presencia de una fuente de carbono fermentable desarrollará la morfología de levadura. Por otra parte, en el ciclo sexual, a partir del micelio de los dos tipos sexuales (+) y (-), estos se fusionaran mediante hifas especializadas, a partir de cada tipo sexual, las cuales se generan una vez desencadenado el proceso de reproducción sexual, mediado por la hormona ácido trispórico (derivada del  $\beta$ -caroteno) para dar lugar a la zigospora, una célula producto de la meiosis (Tomada y modificada de López-García, 2015).



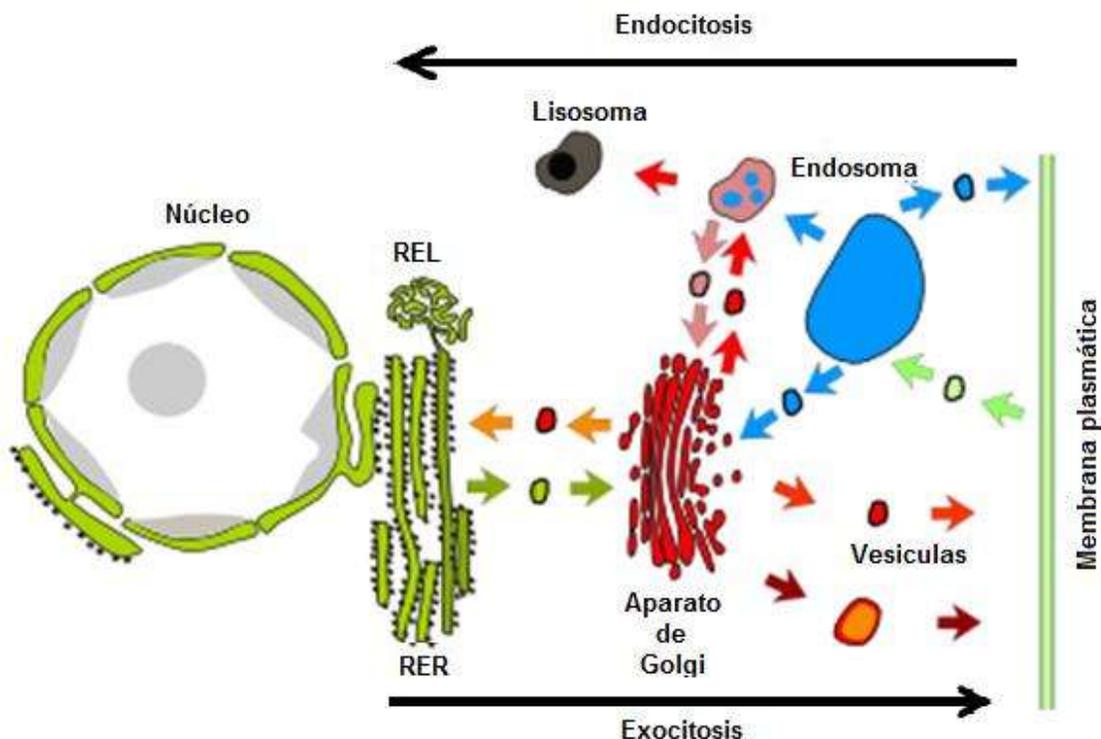
**Figura 2. Crecimiento en medio líquido de *M. circinelloides*.** A partir de la espora y una vez que se han detectado condiciones favorables para el desarrollo vegetativo, la espora aumenta su tamaño y toma forma esférica. Dependiendo de las condiciones nutricionales y ambientales, *M. circinelloides* crece como micelio en presencia de oxígeno y crece como levadura en ausencia de oxígeno y una fuente de carbono fermentable. Si las condiciones cambian, este mucoral es capaz de hacer transición de una morfología a otra (Tomada y modificada de Lübbehüsen y col., 2003).

## 1.2 TRÁFICO VESICULAR

*M. circinelloides* al igual que cualquier organismo eucariota está rodeado por una membrana que sirve como una barrera entre el interior de la célula y su exterior, la membrana plasmática, la cual es necesaria para comunicarse con su entorno. Muchas de las funciones en las células eucariotas están compartimentalizadas y muchos de estos compartimientos están delimitados por membranas formando diversos organelos llevando a cabo funciones especializadas, los cuales interactúan entre sí (figura 3). Cada organelo celular está especializado en una o varias funciones interrelacionadas entre sí. Por ejemplo, en términos generales, en el núcleo se almacena la información genética y se controla su expresión; en el retículo endoplásmico se producen proteínas que son enviadas al aparato de Golgi, en el cual se modifican mediante la adición de carbohidratos y nuevamente son enviadas a otros organelos; por otra parte los lisosomas son centros de degradación de moléculas que están defectuosas o que han cumplido su tiempo de vida media para un proceso biológico determinado; mientras que las mitocondrias y los cloroplastos son centrales energéticas **(Alberts y col., 2014)**.

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, en el interior o desde el exterior celular **(Tokarev y col., 2000)**.

Este proceso es altamente dinámico e involucra la fisión y fusión de vesículas desde el interior y exterior celular así como entre sus organelos (figura 3).



**Figura 3. Proceso general del tráfico vesicular.** Las células eucariotas se comunican mediante un flujo bidireccional de vesículas o de estructuras tubo-vesiculares entre sus organelos y el entorno. Cada organelo cumple con funciones específicas y especializadas, y cada función se interrelaciona con las funciones de los demás organelos (Tomada y modificada de *Atlas de Histología Animal y Vegetal*, 2008).

En general, las vesículas se han especializado en funciones concretas, dichas funciones dependen en parte de su composición de lípidos y proteínas y de las moléculas que transportan. Las vesículas almacenan, transportan o digieren moléculas o residuos celulares. Son una herramienta fundamental de la célula para la organización del metabolismo. Muchas vesículas se originan principalmente desde el retículo endoplásmico, sin embargo también pueden provenir del aparato de Golgi, o se forman a partir de porciones de la membrana plasmática.

Las vesículas emergen continuamente de una membrana y se fusionan con otra, llevando componentes de la membrana y moléculas solubles conocidas como moléculas “carga”.

Este tráfico de vesículas altamente organizado fluye a través de la membrana, lo que permite a la célula secretar o incluir moléculas hacia o desde el exterior, respectivamente **(Alberts y col., 2014)**.

Para llevar a cabo su función, cada vesícula que emerge de un compartimiento debe ser selectiva, es decir, debe incluir sólo las moléculas adecuadas y debe fusionarse con la membrana blanco apropiada. Por ejemplo, una vesícula cargo que transporta moléculas desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, debe excluir las proteínas que son residentes del aparato de Golgi y reclutar sólo las moléculas que van a la membrana plasmática, y debe fusionarse con esta y no con la membrana de otro organelo, lo cual requiere un proceso de regulación **(Alberts y col., 2014)**. Este proceso altamente regulado tiene implicaciones directas en las respuestas celulares, tanto a estímulos externos como internos (concentración de nutrientes, crecimiento en medio sólido o líquido, presencia o ausencia de oxígeno, etc.)

*Cada célula eucariota es dependiente de este proceso para su crecimiento y diferenciación.*

El flujo vesicular puede ir en dos direcciones generales: del interior celular al exterior celular, conocido como exocitosis, o viceversa, del exterior celular al interior celular conocido como endocitosis.

### **1.2.1 Endocitosis**

La endocitosis es un mecanismo que controla la composición de lípidos y proteínas de la membrana plasmática, regulando la forma en la que las células interactúan con su medio ambiente **(Doherty y McMahon, 2009)**.

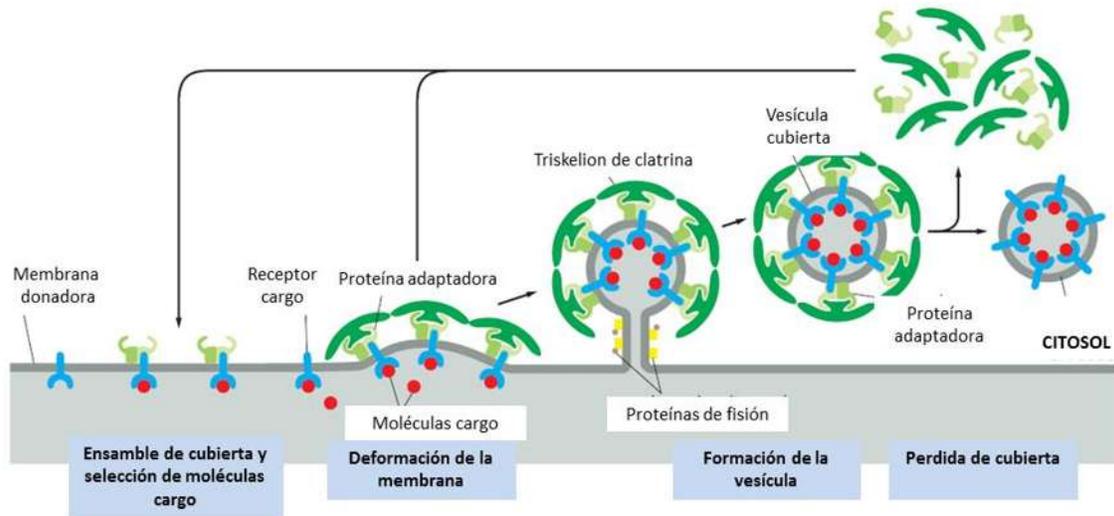
Este proceso es llevado a cabo por la internalización de vesículas a partir de la membrana plasmática, en donde estas vesículas acarrean nutrientes, iones y receptores de membrana involucrados en la señalización celular, entre otros **(Sorkin y Zastrow, 2009)**.

La formación de vesículas en este proceso es llevado a cabo de 2 maneras: dependiente o independiente de clatrina, una proteína que media la formación e internalización de vesículas a partir de la membrana plasmática en la célula (figura 4).

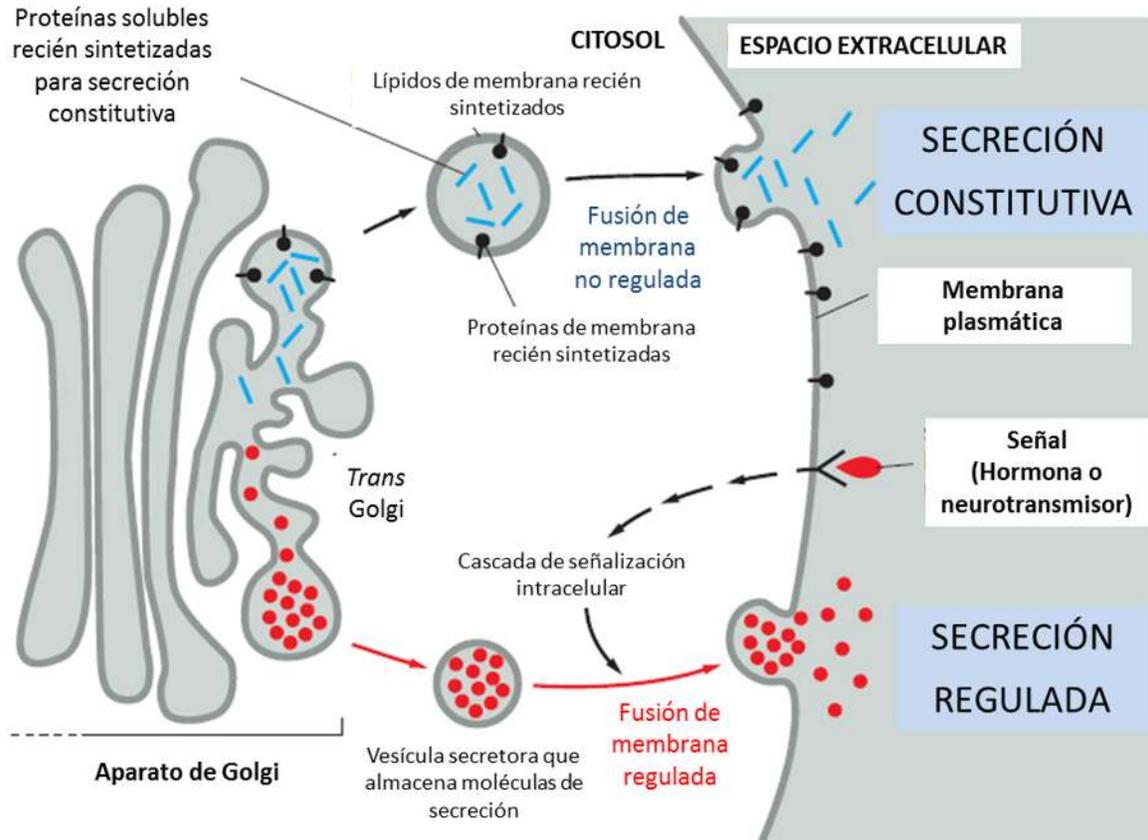
### 1.2.2 Exocitosis

La exocitosis por otra parte es un proceso ubicuo que ocurre en todas la células eucariotas. Se incluye en procesos tan diversos como la expansión de la membrana plasmática durante el crecimiento y en la liberación altamente regulada de neurotransmisores. La exocitosis es definida como la fusión de vesículas formadas intracelularmente con la membrana plasmática **(Jahn, 2004)**.

Se distinguen dos formas de exocitosis: constitutiva y regulada. La exocitosis constitutiva incluye todos los eventos de fusión, en donde las vesículas son generadas, transportadas y liberadas continuamente. Mientras que la exocitosis regulada usualmente requiere que precursores de membrana sean almacenados en vesículas especializadas y movilizados mediante la activación de cascadas de señalización (figura 5). Así, la exocitosis regulada permite el control en la liberación de productos de secreción (neurotransmisores, enzimas, etc.). En la mayoría de los casos la exocitosis regulada, es activada por segundos mensajeros (predominantemente  $\text{Ca}^{2+}$ ) en respuesta a la activación de receptores o la despolarización de la membrana **(Jahn, 2004)**.



**Figura 4. Endocitosis mediada por clatrina.** El montaje del revestimiento introduce una curvatura en la membrana, lo que conduce a su vez a la formación de un brote recubierto (llamado pozo recubierto si está en la membrana plasmática). Las proteínas adaptadoras se unen tanto a los triskeliones de clatrina como a los receptores de carga ligados a la membrana, mediando de ese modo el reclutamiento selectivo de membrana y moléculas cargo solubles en la vesícula. Otras proteínas de membrana y de fisión se reclutan en el cuello de la vesícula, donde se introduce una curvatura de membrana. La capa se pierde rápidamente poco después de que la vesícula se fisiona (Tomada y modificada de Alberts y col., 2014).



**Figura 5. Exocitosis constitutiva y regulada.** Las dos vías divergen en el la red de trabajo del trans Golgi. La vía secretora constitutiva opera en todas las células. Muchas proteínas solubles se secretan continuamente desde la célula por esta vía, que también suministra a la membrana plasmática con lípidos de membrana recién sintetizados y proteínas. Las células secretoras especializadas también tienen una vía secretora regulada, mediante la cual las proteínas seleccionadas en el trans Golgi se desvían a vesículas secretoras, donde las proteínas se concentran y almacenan hasta que una señal extracelular estimula su secreción. La secreción regulada de moléculas pequeñas, como la histamina y los neurotransmisores, ocurre por una vía similar; estas moléculas se transportan activamente desde el citosol hacia vesículas secretoras preformadas. Allí se suelen ligar a macromoléculas específicas (proteoglicanos para histamina) para que puedan ser almacenados a alta concentración sin generar una presión osmótica excesivamente alta (Tomada y modificada de Alberts y col., 2014).

### 1.3 Proteínas G

La organización espacio-temporal de muchos procesos celulares está determinada por proteínas que unen nucleótidos de guanina, conocidas como proteínas G, las cuales actúan como interruptores en la regulación de la actividad y localización de proteínas involucradas en una gran diversidad de procesos celulares (**Gillingham y Munro, 2007**).

Las proteínas G se clasifican en dos grandes tipos: las proteínas G heterotriméricas (PGH) y las proteínas G monoméricas (superfamilia Ras), las proteínas G monoméricas son divididas en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (**Wennerberg y col., 2005**).

#### 1.3.1 Proteínas G monoméricas

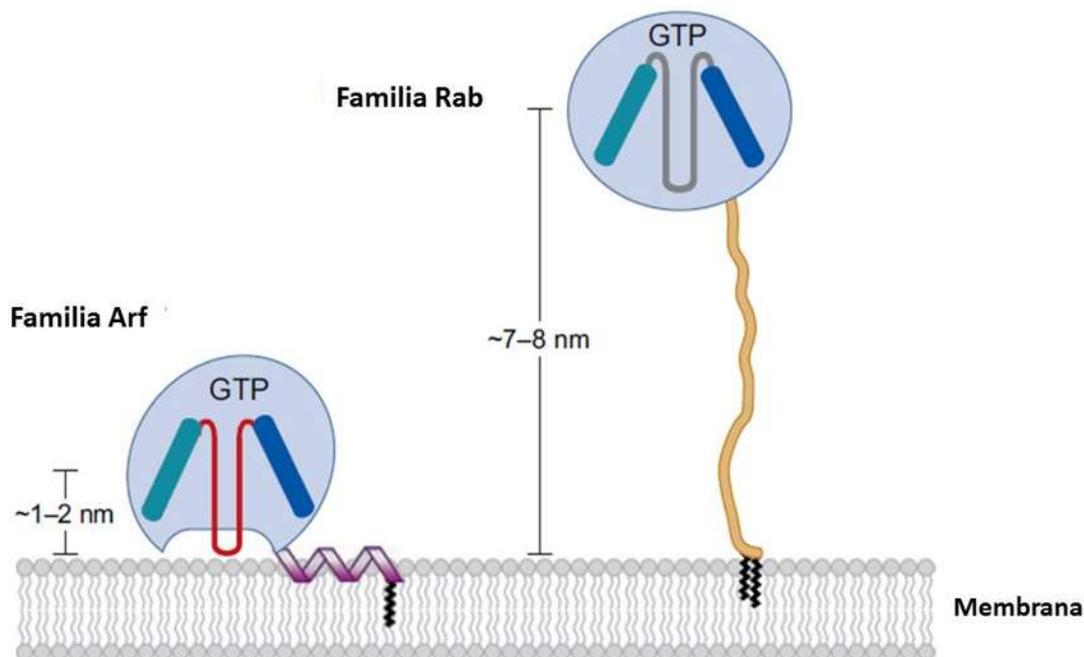
- **Familia Ras:** (Ras sarcoma oncogénesis) son proteínas que han sido ampliamente estudiadas por su rol en la oncogénesis humana. Las proteínas Ras sirven como nodos de señalización activados en respuesta a diferentes estímulos extracelulares. Las proteínas activadas interactúan con múltiples efectores corriente abajo, los cuales regulan la red de señalización citoplasmática involucrada en el control de la expresión génica, regulación de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia.
- **Familia Rho:** (Ras homologos) proteínas que también son clave en la red de señalización que regula la organización del citoesqueleto de actina, la progresión del ciclo celular y la expresión génica.
- **Familia Rab:** Fueron primeramente descritas como proteínas parecidas a Ras en cerebro (Ras-like proteins in brain). Son reguladores en el transporte intracelular de vesículas y en el tráfico de proteínas entre orgánulos de la vía endocítica y secretora. Las proteínas Rab facilitan la formación de vesículas, la gemación, la fusión y liberación del contenido de las mismas. La localización de las proteínas Rab es dependiente del motivo de prenilación y la especificidad esta dictada por secuencias divergentes en la región C-terminal de las proteínas.

- **Familia Ran:** (Ras-like nuclear) Son bien conocidas por su función en el transporte núcleo-citoplasma de ARN y proteínas. Las proteínas Ran funcionan de forma dependiente a un gradiente de Ran-GTP, el cual facilita la importación y exportación nuclear. También regulan la formación del huso mitótico, la replicación del ADN y el ensamble de la envoltura nuclear.
- **Familia Arf:** (ADP ribosylation factor) Como las proteínas Rab, la familia Arf también está involucrada en la regulación del transporte vesicular. Ciclan entre estados activos e inactivos. Poseen un motivo de miristoilación en la región N-terminal. Regulan la formación de vesículas en diferentes pasos a diferencia de las proteínas Rab que actúan en un solo paso. Participan en el transporte retrogrado entre el Golgi y el RE (COPI), con proteínas adaptadoras 1 y 3 (clatrina y trans-Golgi), en la organización del citoesqueleto de actina y en la regulación de COPII en el RE.

Una característica importante de la bioquímica de la superfamilia Ras es su modificación postratduccional por lípidos que dicta la interacción con membranas y su localización subcelular (**Wennerberg y col., 2005**).

### 1.3.2 Proteínas G en el tráfico vesicular

Las proteínas G juegan un rol central en la organización de la ruta endocítica y secretora. Las proteínas de la familia Rab se anclan a la bicapa por su extremo C-terminal mediante grupos prenilo. Sin embargo, el reclutamiento de algunos efectores, incluyendo vesículas con cubierta de proteínas, es mediada por una segunda clase de proteínas G que tienen únicamente una hélice antipática en su extremo N-terminal, la cual les permite anclarse a una membrana al unir GTP, dichas proteínas son las proteínas de la familia Arf (figura 6) (**Gillingham y Munro, 2007**).



**Figura 6. Interacción con membranas de las proteínas Rab y Arf.** Representación esquemática de las proteínas Arf y Rab en una membrana. En las proteínas Rab, la región hipervariable extendida (amarilla) que conecta la proteína G al anclaje lipídico permite que los efectores unidos se alejen más de la bicapa que en el caso de las proteínas Arf. Esta característica de las proteínas Arf puede explicar porque sus efectores son proteínas de cubierta o enzimas modificadoras de lípidos y porque algunas de ellas pueden ayudar a la distorsión de la membrana en la formación de vesículas (Tomada y modificada de Gillingham y Munro, 2007).

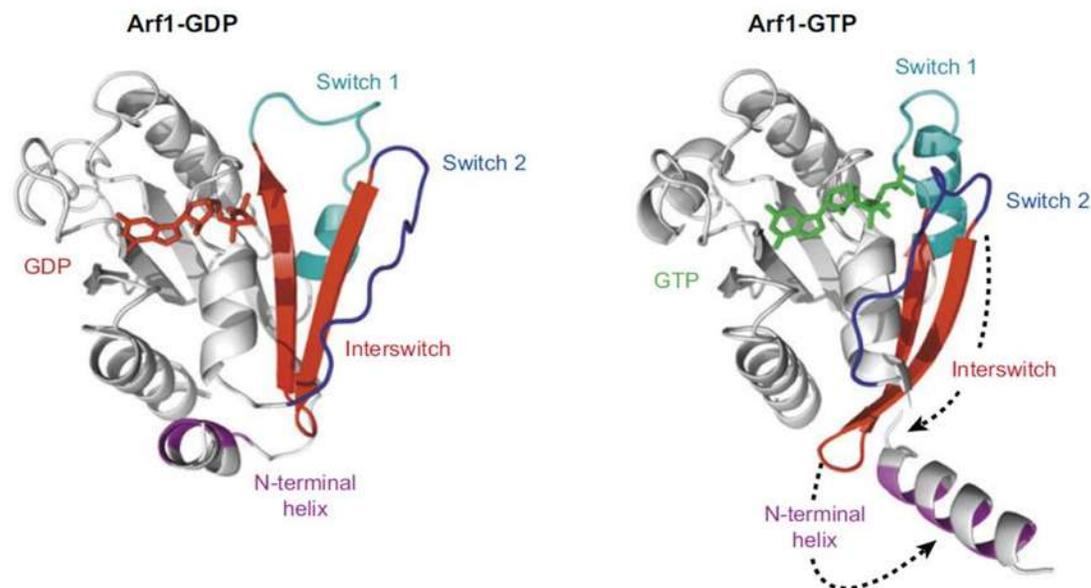
### 1.3.3 Características generales de las proteínas de la familia Arf

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 eucariotas. Los miembros de la familia Arf fueron identificados como un factor requerido por la toxina del cólera para ADP-ribosilar a la subunidad  $G_s$  de las proteínas G heterotriméricas y que esta ejerza su efecto tóxico (Kahn y Gilman, 1986).

Sin embargo, las funciones de las proteínas Arf no involucran la ADP-ribosilación o la regulación de las proteínas G heterotriméricas, si no por su participación en el tráfico de membrana y la organización del citoesqueleto (**Gillingham y Munro, 2007**).

Tienen una hélice anfipática en el extremo N-terminal, a la cual se le agrega un grupo miristoilo (C:14) que les permite anclarse a la membrana objetivo (figura 7). También presentan motivos conservados conocidos como cajas G (G1-G5), responsables de la interacción con el factor intercambiador de nucleótidos (GEF) de guanina y la proteína activadora de GTPasa (GAP). Mutaciones puntuales en dichos motivos de la proteína Ras de humano conducen a una alteración en la capacidad de intercambiar GDP/GTP. Por ejemplo; la mutación S17N en el motivo G<sub>1</sub> altera la afinidad para unir nucleótidos de guanina, resultando en una forma constitutivamente inactiva: la mutación Q61L en el dominio G<sub>2</sub> conduce a un proteína constitutivamente activa, es decir incapaz de hidrolizar el GTP a GDP; mientras que mutaciones en el dominio G<sub>3</sub> (N116I o D119N) altera la velocidad de intercambio de nucleótidos de guanina (**Dascher y Balch, 1994**).

La característica más importante de esta familia es su habilidad para unir efectores específicos de manera dependiente de GTP. Entre ellos se encuentra el complejo de cubierta COPI y las proteínas adaptadoras PA-1 y PA-3, enzimas modificadoras de lípidos como la fosfatidilinositol 4-5 cinasa y la fosfatidilinositol 4 cinasa (**Kahn y col., 2006**).



**Figura 7. Cambio conformacional de las proteínas Arf al ser activadas.** Estructura de la proteína Arf1 de la familia Arf en los estados unidos a GDP y GTP (Amor y col., 1994, Shiba y col., 2003). Tras el enlace GTP, el interswitch (rojo) se aleja de las regiones switch y desplaza la hélice N-terminal del espacio que ocupa en el estado unido al GDP. Esta hélice anfipática (modelado para Arf1-GTP) permite la interacción con bicapas lipídicas adyacentes (Tomada de Gillingham y Munro, 2007).

La familia Arf incluye tres grupos diferentes de proteínas: las proteínas Arf (ADP ribosylation factor), las proteínas Arf-like (Arl) y las proteínas Sar (Secretion-Associated and Ras-related protein). Las proteínas Arl son proteínas que están estructuralmente relacionada con las proteínas Arf (50-60% identidad); no son un grupo coherente, ya sea funcional o filogenéticamente, poseen una glicina en la posición +2 en el extremo amino terminal (al igual que las Arf), pero no todas son susceptibles de las N-miristoiltransferasas ni actúan como factores alostéricos de la toxina del cólera. El nombre de las proteínas 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 las proteínas Arf que a otras familias de GTPasas monoméricas, pero también comparten una considerable

relación funcional con las proteínas Arf, ya que actúan a través del reclutamiento de proteínas de cubierta para iniciar la gemación de vesículas (**Kahn y col. 2006**).

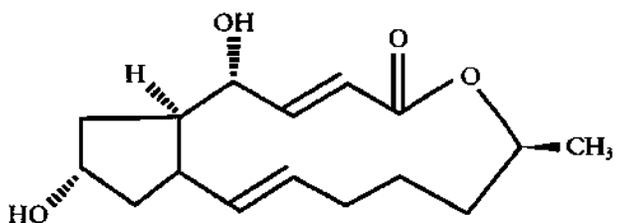
Las proteínas Arf de mamífero se clasifican en tres grupos en base a su secuencia y relación filogenética (tabla 1). La clase I está conformada por las proteínas Arf1-Arf3, la clase II por las proteínas Arf4-Arf5 y la clase III por la proteína Arf6.

**Tabla 1. Función asociada a proteínas Arf según su clasificación en mamíferos**

Clase	Función
I	Reclutan efectores en el aparato de Golgi, participan en la formación de COPI, en el reclutamiento de la proteína adaptadora de clatrina I, en el reclutamiento de proteínas transportadoras de lípidos en el trans-Golgi y regulan el intercambio de enzimas sintetizadoras de quitina en levadura.
II	La función de las proteínas de la clase II no es del todo clara. Mediante silenciamiento génico se ha observado que hay redundancia de función entre la clase I y II en el tráfico de membrana del aparato de Golgi y la mutación de genes <i>arf</i> pertenecientes a la clase II, muestra efectos similares a funciones asociadas con genes <i>arf</i> de la clase I.
III	Son las más divergentes en secuencia. Se localizan en la membrana plasmática y en el sistema endocítico regulando procesos como la endocitosis, citocinesis y la organización del citoesqueleto de actina (motilidad celular). La disrupción de <i>arf6</i> en ratón causa la pérdida de viabilidad a los pocos días del nacimiento por defectos en el desarrollo del hígado.

(Gillingham y Munro, 2007)

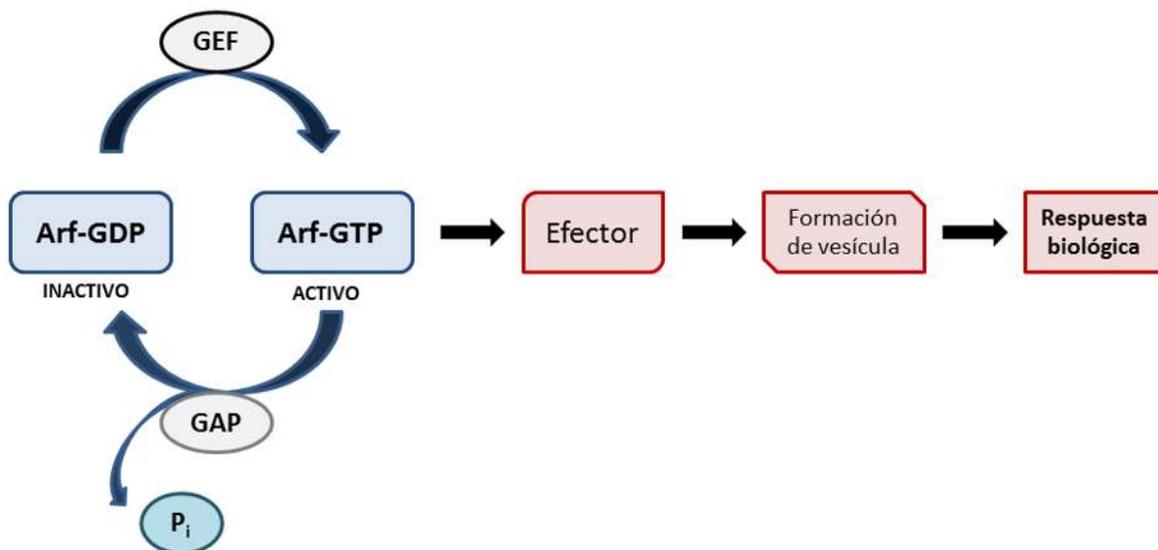
Otra característica de las proteínas de la familia Arf es la inhibición de su función por la Brefeldina A (figura 8), un metabolito fúngico que se ha demostrado interferir de manera reversible con el transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, esto debido a que la brefeldina A estabiliza el complejo ternario Arf-GDP-GEF y atrapa así al GEF en un complejo improductivo con su sustrato. El análisis estructural reveló que la brefeldina A se une a la interfaz de unión entre el dominio Sec7 y Arf1 y por lo tanto estabiliza la interacción **(Renault y col., 2003)**.



**Figura 8. Estructura química de la brefeldina A.** Es un antibiótico lactónico producido por organismos fúngicos como *Eupenicillium brefeldianum*. Aunque inicialmente fue aislado como antibiótico (con una amplia gama de actividad), se utiliza principalmente como una herramienta de investigación biológica para estudiar el transporte de proteínas **(Alvarez y Sztul, 1999)**. El tratamiento conduce a una rápida acumulación de proteínas dentro del retículo endoplásmico y el colapso de las pilas de Golgi. El tratamiento con BFA también puede inhibir la secreción de proteínas y la exposición prolongada puede inducir la apoptosis.

#### 1.3.4 Regulación de la actividad de las proteínas Arf

La actividad de las proteínas Arf es regulada por GEF (Factor intercambiador de nucleótidos de guanina) y GAP (Factor activador de GTPasa). Las proteínas Arf oscilan entre un estado activo cuando unen GTP e inactivo cuando unen GDP (figura 9); en su estado activo se anclan a la membrana diana y permiten el reclutamiento de proteínas de cubierta en la formación de vesículas, su gemación y fusión con la membrana objetivo, mientras que en su estado inactivo se encuentran solubles en el citoplasma o formando interacciones débiles con las membranas **(Gillingham y Munro, 2007)**.



**Figura 9. Regulación de las proteínas Arf.** Las proteínas Arf oscilan entre un estado activo cuando unen GTP y un estado inactivo cuando unen GDP. El Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina (GEF) contribuye a la activación de las proteínas Arf, lo que conduce a la interacción con un efector, la formación de la vesícula y por consiguiente una función asociada a una respuesta biológica específica. Por otro lado, la Proteína Activadora de GTPasa (GAP) contribuye a la desactivación de las proteínas Arfs al estimular la actividad intrínseca de GTPasa de las proteínas Arf conduciendo a la hidrólisis de un grupo fosfato del GTP y disociación de la proteína Arf del anclaje a la membrana (Tomada y modificada de East y col., 2011).

### 1.3.5 Participación de las proteínas de la familia Arf en hongos

Las proteínas Arf han sido identificadas en todos los organismos eucariotas y se ha caracterizado la participación de algunas de estas proteínas en hongos.

- ***Saccharomyces cerevisiae***: en el ascomiceto monomórfico levaduriforme se ha reportado la presencia de tres genes que codifican a proteínas Arf (ARF1-3). Las proteínas ARF1 y ARF2 son 96% idénticas entre ellas. La disrupción de ARF1 generó un crecimiento lento, sensibilidad a frío y sensibilidad de normal a subletal al ion fluoruro; la disrupción del gen ARF2 no causó fenotipo aparente. Sin embargo, la doble mutación en los genes

*ARF1* y *ARF2* causó un fenotipo letal (**Stearns y col., 1990**); la proteína *ARF3* por otra parte es 54% idéntica a *ARF1* y *ARF2*, y el gen *ARF3* no es necesario para la viabilidad de este hongo. Se piensa que *ARF3* no está involucrada en el tráfico vesicular (**Lee y col., 1994**) si no en la organización del citoesqueleto de actina (**Lambert y col., 2007**).

Por otra parte, análisis bioquímicos de la proteína ARL1 purificada revelaron propiedades similares a las de las proteínas ARF, incluyendo la capacidad de unir e hidrolizar GTP. Al igual que otras ARL, la proteína ARL1 recombinante no estimuló la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del cólera. En el fraccionamiento subcelular, ARL1, similar a *ARF1*, se localizó en la fracción soluble. El amino terminal de ARL1, como el de *ARF1*, fue miristoilado. A diferencia de la proteína Arl1 de *Drosophila*, ARL1 de *S. cerevisiae* no es esencial para la viabilidad celular (**Lee y col., 1997**).

- ***Aspergillus nidulans***: en este ascomiceto monomórfico micelial se han reportado dos genes denominados *arfA* y *arfB*. La proteína ArfA es un homólogo de Arf1 y Arf2 de *S. cerevisiae* con un 75% de similitud de secuencia de aminoácidos con cada uno, se localiza en compartimentos celulares consistentes con equivalentes del aparato de Golgi y el motivo de miristoilación es fundamental para la localización de ArfA. La disrupción de *arfA* generó un fenotipo letal, indicando que el gen es esencial. En conjunto, estos datos sugieren que ArfA participa en el crecimiento polarizado a través del sistema secretor (**Lee y col., 2008a**); la proteína ArfB presenta un 72% de identidad con Arf6 de humano y un 59% de identidad con Arf3 de *S. cerevisiae*, se localiza en la membrana plasmática y en las endomembranas, y el motivo de miristoilación es fundamental para la localización de ArfB. La disrupción de *arfB* presentó un crecimiento reducido mostrando una hiper-ramificación con acortamiento de las hifas. Estos datos sugieren que ArfB participa en endocitosis y en el establecimiento de la polaridad durante el crecimiento de la hifa (**Lee y col., 2008b**).

- ***Candida albicans***: el principal patógeno fúngico de los seres humanos, un hongo dimórfico, presenta 5 proteínas pertenecientes a la familia Arf: Arf1, Arf2, Arf3, Arl1 y Arl3. La proteína Arf2 es necesaria para la viabilidad. La mutante heterocigota en el gen *arf2* presenta defectos en el crecimiento filamentoso y la integridad de la pared celular, además de ser avirulenta, probablemente debido a la alteración del aparato de Golgi; la proteína Arl1 se requiere para el crecimiento filamentoso invasivo y, aunque la cepa  $\Delta arl1/\Delta arl1$  puede iniciar el crecimiento de hifas, las hifas son sustancialmente más cortas, presentando virulencia atenuada respecto a la cepa silvestre. En conjunto, estos datos ponen de relieve la importancia de Arl1 y Arf2 como reguladores clave del crecimiento polarizado y la virulencia en *C. albicans* (Labbaoui y col., 2017).
- ***Aspergillus fumigatus***: es uno de los hongos patógenos más importantes del aire, que tiene el potencial de causar Aspergillosis Pulmonar Invasiva (IPA). Los esfingolípidos son el componente principal de la membrana plasmática eucariota y están implicados en la integridad y virulencia de la pared celular. ARF-GAPs son necesarias para la formación de recubrimiento vesicular en la vía endocítica y se han relacionado con el crecimiento de las hifas, la resistencia a fármacos y la virulencia en *C. albicans* (Epp y col., 2010). En *A. fumigatus* se ha identificado a *gcsA*, el gen ortólogo a *AGE3* de *C. albicans*. La disrupción del gen *gcsA* presentó crecimiento de hifas normal y una disminución de la polarización celular en presencia de miriocina, un inhibidor de la serina palmitoiltransferasa que cataliza el primer paso en la biosíntesis de esfingolípidos. Además la cepa mutante es incapaz de formar biopelículas y presenta una virulencia atenuada en un modelo de IPA en ratón (Almeida y col., 2012).

### ***Mucor circinelloides***

En nuestro grupo de trabajo se identificaron 6 genes pertenecientes a la familia Arf, denominados *arf1-arf4* y *arl1-arl2*. Mediante un análisis de alineamiento se observó que las proteínas Arf1 y Arf2 son 96% idénticas entre sí; mientras que Arf3 y Arf4 son 89% idénticas entre sí, sugiriendo funciones redundantes para cada pareja de proteínas; un análisis de expresión mostró que hay genes que se expresan de manera mayoritaria en un estadio en específico, como es el caso de *arl1* que se expresa en mayor nivel en micelio, mientras que *arf2* se expresa en mayor nivel en el estadio levaduriforme. La interrupción de los genes *arf3*, *arf4* y *arl1* mostró que *arl1* es un gen esencial para este hongo, debido a que solo se obtuvieron mutantes heterocariontes, no siendo así para la mutación sencilla de los genes *arf3* y *arf4*, sin embargo la cepa doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  fue heterocarionte para la mutación en el gen *arf3* usando como fondo genético la mutación en el gen *arf4*, lo que sugiere que la doble mutación en los genes *arf3* y *arf4* es letal. Por otra parte la evaluación funcional mostró que las cepas mutantes  $\Delta arf3$  y  $\Delta arf4$  disminuyeron en la producción de esporas en un 36% aproximadamente respecto a la cepa silvestre, mientras que la cepa mutante  $\Delta arl1^{(+)(-)}$  lo hizo en un 90% respecto a la cepa silvestre. En el crecimiento levaduriforme no se observaron diferencias mientras que en el crecimiento micelial se observó que las cepas mutantes  $\Delta arf3$  y  $\Delta arf4$  generaron dicotomías en las puntas de las hifas (**Maldonado-Herrera, 2015**). Por otra parte se evaluó la toxicidad de los productos secretados por las cepas mutantes en *C. elegans* observándose que la cepa mutante  $\Delta arl1^{(+)(-)}$  presentó una mayor virulencia en el estadio espora y micleio, mientras que la cepa mutante  $\Delta arf3$  presentó una mayor virulencia en los tres estadios y la cepa mutante  $\Delta arf4$  es avirulenta (**Alejandro-Castañeda 2017, tesis de licenciatura**).

Estos datos en conjunto sugieren que el metabolismo de las proteínas de la familia Arf está implicado en procesos de diferenciación y virulencia en hongos.

## 1.4 FACTORES DE VIRULENCIA EN HONGOS

La virulencia es el grado de patogenicidad de un microorganismo y esta mediado por factores de virulencia. Un factor de virulencia es cualquier proceso o molécula que le permite al patógeno aprovechar los recursos metabólicos del huésped causando un daño a este.

### 1.4.1 Factores de virulencia

Algunos factores de virulencia descritos en hongos son:

- **Termotolerancia.** Es la capacidad que tienen ciertos hongos de crecer y reproducirse a 37°C y pH fisiológico. La transición de levadura a micelio en *Blastomyces dermatitidis* se induce a 37°C y se asocia con la expresión de factores de virulencia tales como la proteína de superficie BAD1, este es quizás el mejor ejemplo de expresión de genes regulada por la temperatura que es relevante para la patogénesis fúngica (**Rooney y col., 2001**); la remodelación de la membrana también puede ser necesaria para un crecimiento óptimo a alta temperatura. La disrupción del factor de transcripción Mga2 de *Cryptococcus neoformans*, que se cree regula genes que codifican a enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos, es inducida a 37°C y es necesaria para un crecimiento óptimo a esta temperatura (**Kraus y col., 2004**).
- **Dimorfismo.** Es la capacidad de algunos hongos de presentar dualidad fenotípica, la cual es un proceso de diferenciación celular, que es debido a cambios ambientales como humedad, pH, temperatura, nutrientes, disponibilidad de oxígeno, entre otros factores; con este proceso se modifica su fisiología y morfología para adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento (**Klein y Tebbets, 2007**). En el caso de patógenos de humano, este proceso permite evadir la respuesta inmunológica del huésped.

Por ejemplo, *C. albicans* tiene la capacidad de desarrollarse como levadura en las mucosas de humano; sin embargo, al formar micelio, se infiltra en tejidos internos, causando infección invasiva altamente mortal (**Jacobsen y col., 2012**), cabe hacer mención que mutantes de *C. albicans* incapaces de hacer la transición de levadura a micelio son menos virulentas.

- **Adhesión.** La adherencia de los microorganismos al tejido huésped es un prerrequisito para la invasión a los tejidos y la correspondiente infección. La adhesión y la habilidad de formar filamentos están pensados por contribuir a la patogenicidad. INT1 es una proteína de superficie de *C. albicans*. La expresión de INT1 en *S. cerevisiae* fue suficiente para permitir su adhesión en células epiteliales. Además la disrupción de *int1* suprime el crecimiento hifal, la adhesión a células epiteliales y la virulencia en ratones. Así, INT1 está ligado a adhesión, crecimiento polarizado y patogenicidad en *C. albicans* (**Gale y col., 2001**).
- **Producción de hidrolasas.** Algunas enzimas, están implicadas en el proceso intrínseco de alimentación del hongo (múltiples hidrolasas), facilitando la multiplicación del mismo en el huésped. Estas hidrolasas favorecen la diseminación por los tejidos del huésped y por ello muchas de ellas están relacionadas con el proceso de virulencia. Proteasas, lipasas y fosfolipasas permiten en conjunto la degradación de tejidos y la diseminación en el cuerpo como es el caso de *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *C. neoformans* (**Ghannoum, 2000**). Asimismo, en *C. neoformans* existe un gran número de enzimas relacionadas con la virulencia y algunas de ellas son transportadas y/o secretadas por vesículas: ureasa, lacasa y fosfolipasas, entre otras (**Almeida y col., 2015**).
- **Producción de toxinas.** Las micotoxinas, son producidas por muchas especies de hongos, son metabolitos secundarios que son tóxicos para los seres humanos y los animales. La mayoría de ellos son de pequeño tamaño molecular (<300). La contaminación de los alimentos y bebidas por micotoxinas ha sido un problema grave en animales y seres humanos, y lo sigue siendo en algunos países en desarrollo.

*Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son los géneros productores de micotoxinas más comunes (**Kamei y Watanabe, 2005**). La aflatoxina B<sub>1</sub> producida por *A. flavus* presenta propiedades hepatocarcinógenas y hepatotóxicas, es el carcinógeno natural más potente; las ocratoxinas presentan propiedades nefrotóxicas, inmunosupresoras, teratogénicas y carcinógenas; la gliotoxina posee propiedades inmunosupresoras, ya que puede suprimir y causar apoptosis en ciertos tipos de células del sistema inmunológico, y también exhibe propiedades antibacterianas y antivirales. Es un importante factor de virulencia en casos de aspergilosis invasiva causada por *A. fumigatus* (**Varga y col., 2015**).

- Aunque los efectos de la luz sobre la patogenicidad de algunos hongos se conocen desde hace bastante tiempo, la base molecular de este efecto es aún poco conocida. La luz puede influir directa o indirectamente en el desarrollo de la enfermedad mediante la modulación de la esporulación, la motilidad, la adhesión, la biosíntesis o la activación de toxinas y las respuestas de defensa del huésped (**Idnurm y Crosson, 2009**). En *F. oxysporum*, mutantes knockout que carecen del fotorreceptor Wc1 usado en experimentos de infección con plantas de tomate y ratones inmunodeprimidos revelaron que Wc1 es dispensable para la patogenicidad en plantas pero requerido para virulencia completa en mamíferos (**Ruiz-Roldan y col., 2008**). La inyección de microconidios de tipo silvestre y de la cepa  $\Delta wc1 + wc1$  en ratones inmunodeprimidos dio como resultado una mortalidad del 65% y del 80%, respectivamente. Por el contrario, la infección con la mutante  $\Delta wc1$  produjo sólo una tasa de mortalidad del 20%, aunque durante la infección de ratones, el hongo permanece en la oscuridad. Se han reportado resultados similares para los mutantes en el gen ortólogo (Bwc1) del patógeno humano *C. neoformans*, que, aunque no es esencial para la virulencia, contribuye significativamente a la gravedad de la enfermedad (**Idnurm y Heitman, 2005**).

Los factores de virulencia son de gran interés para la patogénesis porque estos son, a menudo, el blanco farmacológico para interferir con su función biológica o incluso para generar una respuesta inmune del huésped contra dichos factores mediante la generación de vacunas, lo que muy frecuentemente puede neutralizar la acción de estos.

#### 1.4.2 Hongos patógenos de humanos

Algunos hongos son patógenos de humanos y requieren medidas de control. Estos pertenecen a 4 grupos: zigomicetos, ascomicetos, deuteromicetos y basidiomicetos. Los hongos pueden causar un número importante de enfermedades a humanos y están representadas por *Trichophyton sp*, *Epidermophyton sp*, *Histoplasma sp*, *Blastomyces sp*, *Sporothrix sp*, *Coccidioides sp*, y *Paracoccidioides sp*, capaces de infectar a personas sanas o invasores oportunistas como *Aspergillus sp*, *Candida sp*, *Cryptococcus sp*, *Fusarium sp*, y *Rhizopus sp*, los cuales son normalmente avirulentos en personas sanas pero pueden infectar tejidos y causar enfermedades fatales en personas inmunocomprometidas.

Las infecciones fúngicas han aumentado en las últimas décadas debido a los problemas de salud mundial como lo son el padecimiento de enfermedades como la diabetes mellitus, hipertensión, SIDA, cáncer, entre otras y gracias a que las herramientas moleculares y de caracterización actuales en el diagnóstico de organismos fúngicos en pacientes inmunocomprometidos han mejorado.

Dentro de estas enfermedades se encuentra la Mucormicosis.

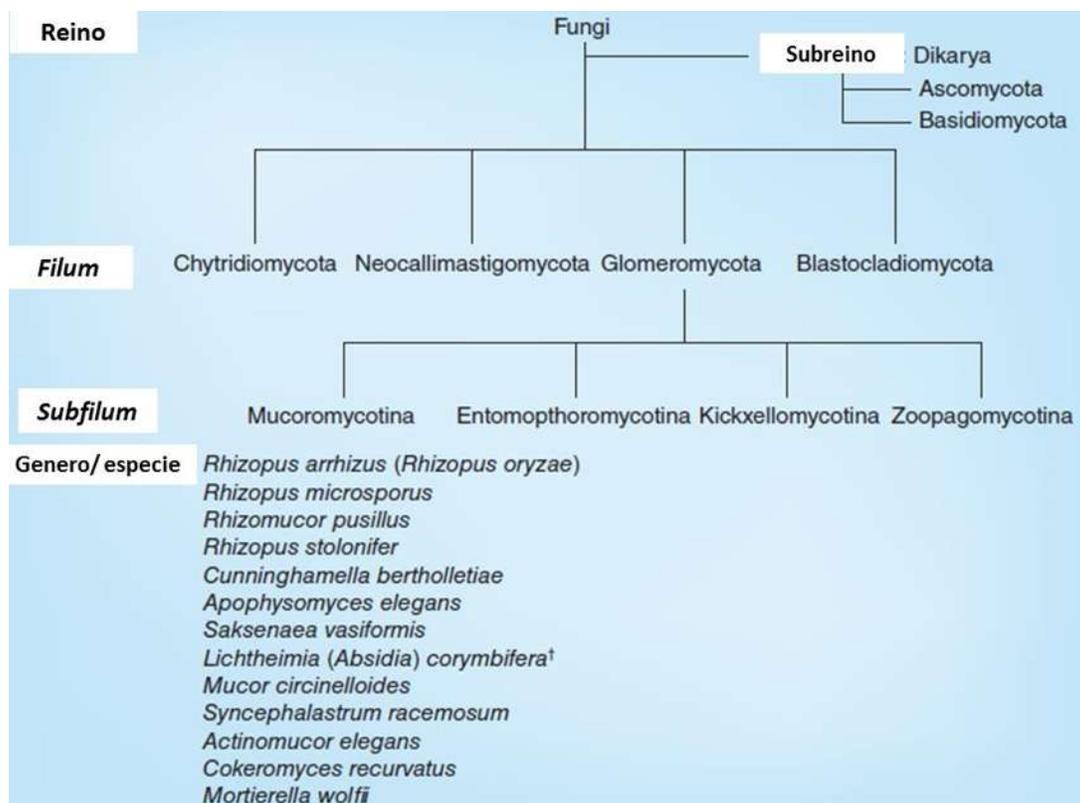
#### 1.4.3 Mucormicosis

El término mucormicosis, engloba a un grupo de micosis causadas por hongos de la clase Zigomicetos (figura 10). Después de la aspergilosis y la candidiasis, la mucormicosis es la tercera causa más frecuente de infección invasiva por hongos, y son infecciones graves que pueden causar la muerte (**Iñiguez-García y col., 2015; Petrikos y col., 2015**).

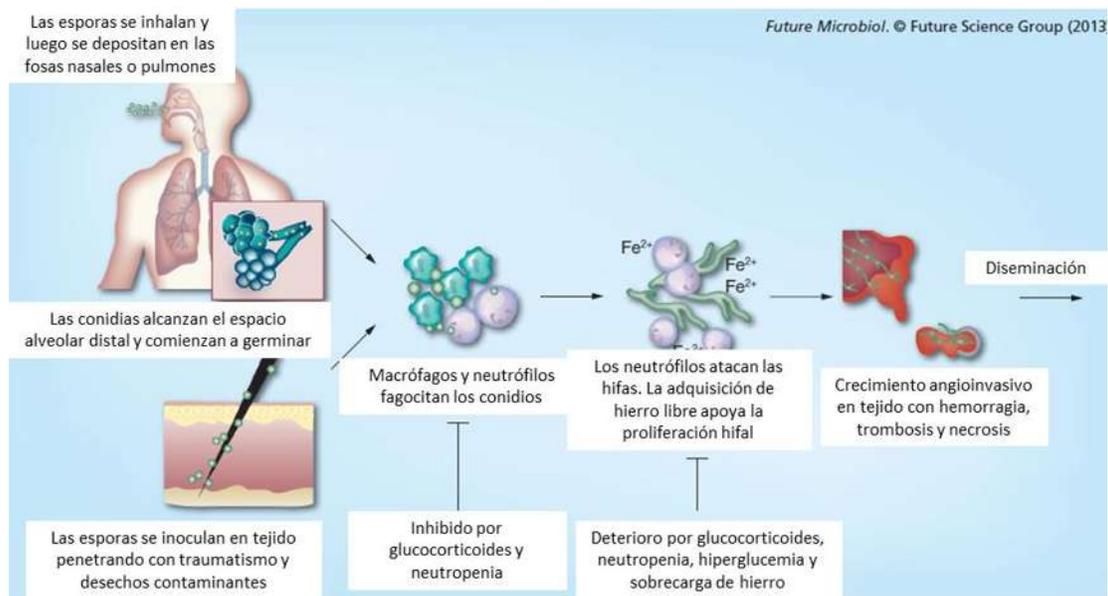
Los microorganismos son cosmopolitas y se localizan en el suelo, en tejidos muertos de animales y viven como saprófitos en aproximadamente 3% de las personas sanas **(Lara y Duran, 2004)**. Los hongos pueden penetrar en el organismo por inhalación de esporas a través de la vía aérea, en la piel por heridas contusas abiertas, catéteres, líneas venosas o por vía gastrointestinal. El ser humano se infecta por la inhalación de esporas que se depositan en los senos paranasales y pulmones, pero la función normal de los macrófagos y neutrófilos brinda protección inmunitaria y neutralizan la infección (figura 11). Sin embargo, existen múltiples factores que cursan con disfunción de estas células, lo que favorece el crecimiento del hongo. La mayoría de los casos se presenta en personas con factores que favorecen la instalación de oportunistas, como la diabetes mellitus descompensada, especialmente aquellos casos que se caracterizan por descontrol metabólico con hiperglucemia y acidosis metabólica. Se ha reportado la presencia de hongos oportunistas hasta en un 70% de los pacientes con cáncer, inmunosupresión iatrogénica, inmunodeficiencia adquirida, pacientes con quemaduras extensas, insuficiencia renal crónica, usuarios de drogas por vía intravenosa y neoplasias hematológicas **(Iñiguez-García y col., 2015; Petrikos y col., 2015)**.

Se han descrito cinco localizaciones de la mucormicosis: rinocerebral, pulmonar, cutánea, gastrointestinal y diseminada. Las más comunes son la rinocerebral y pulmonar **(Iñiguez-García y col., 2015; Petrikos y col., 2015)**.

Los síntomas principales asociados son: fiebre (38-64%), tos (50-61%), dolor torácico (26-37%), disnea (19-29%), hemoptisis (16-26%), esputo (21%), malestar general (18%), pérdida de peso (16%) y aproximadamente el 9% cursan asintomáticos **(Iñiguez-García y col., 2015; Petrikos y col., 2015)**.



**Figura 10. Clasificación taxonómica de mucorales.** La aplicación de técnicas moleculares a la taxonomía fúngica ha llevado a una reciente reclasificación fundamental de patógenos asociados con la mucormicosis humana. En el pasado, los agentes de mucormicosis se clasificaron bajo el filo Zygomycota, que incluía los órdenes Mucorales y Entomophthorales. Un exhaustivo reanálisis filogenético del reino de los hongos en 2007 dio como resultado la eliminación propuesta del filo Zygomycota, basada en la falta de evidencia de un antepasado común y similitudes dentro del filo establecido Glomeromycota. Este sistema de reclasificación también llevó a la promoción de los Mucorales y Entomophthorales a un estado de subfilo (Mucormycotina y Entomophthoromycotina) junto con otros órdenes de hongos zoopatógenos (Tomada y modificada de Lewis y Kontoyiannis, 2013).



**Figura 11. Patogénesis de la mucormicosis.** Las esporas de mucorales inhaladas o inoculadas provocan una respuesta inflamatoria robusta. Para establecer la infección, las esporas deben evitar la muerte por fagocitos mononucleares y polimorfonucleares residentes para germinar en hifas de la forma angioinvasiva de la infección, que eventualmente se disemina a otros órganos (Tomada y modificada de Lewis y Kontoyiannis, 2013).

## II. JUSTIFICACIÓN

*Mucor circinelloides* es un hongo dimórfico y patógeno oportunista, el cual contiene 6 genes que codifican a proteínas de la familia Arf. Se conoce que las proteínas Arf3 y Arf4 están implicadas en distintos procesos del desarrollo de *M. circinelloides* e incluso la pérdida de función de Arf3 aumenta la virulencia de este mucoral.

Por lo que el conocer la función de las proteínas Arf1 y Arf2 nos permitirá tener un conocimiento más amplio a cerca de la participación conjunta de todas las proteínas Arf en procesos de diferenciación y virulencia.

## III. HIPÓTESIS

Los productos de los genes *arf1* y *arf2* están implicados de forma redundante en el desarrollo de la morfología levaduriforme y la regulación negativa de la virulencia de *M. circinelloides*.

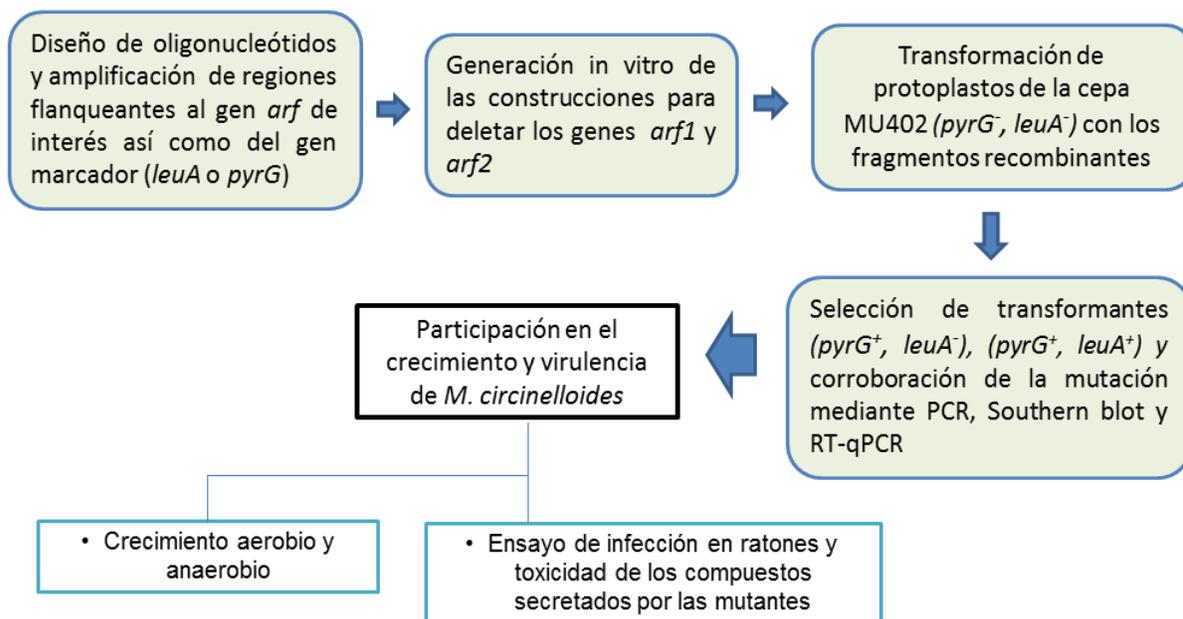
## IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la participación de los productos de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento y virulencia de *Mucor circinelloides*.

### 4.1 Objetivos específicos

- Evaluar la función de los productos de los genes *arf1* y *arf2* en el proceso de crecimiento aerobio y anaerobio de *M. circinelloides*.
- Establecer la participación de los productos de los genes *arf1* y *arf2* en la virulencia de *M. circinelloides*.

## V. Estrategia experimental general



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas utilizadas

Fueron utilizadas las cepas de *M. circinelloides* R7B ATCC 90680 (*leuA*<sup>-</sup>), auxótrofa a leucina (**Roncero y col., 1984**), obtenida mediante mutagénesis química a partir de la cepa silvestre de sexo (-) CBS 277.49 (**Schipper, 1976**). Además se utilizó la cepa MU402 (*leuA*<sup>-</sup>, *pyrG*<sup>-</sup>) que a su vez fue obtenida por mutagénesis química a partir de la cepa R7B (**Nicolás y col., 2007**) la cual es auxótrofa a leucina y uracilo, y finalmente fue usada la cepa MU-P (*leuA*<sup>-</sup>, *pyrG*<sup>+</sup>), generada a partir de la cepa MU402 mediante la inserción genómica del gen *pyrG*, donada por el Dr. Victoriano Garre de la Universidad de Murcia, España (tabla 2).

La cepa de *Escherichia coli* DH5α (**Hanahan, 1983**) fue utilizada en los experimentos de clonación y propagación de plásmidos bacterianos (tabla 2). Entre sus características más significativas destacan: que no permite la recombinación debido a la mutación *recA*<sup>-</sup>, 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.

### 6.2 Manipulación de ácidos nucleicos

#### 6.2.1 Aislamiento de ADN genómico de *M. circinelloides*

El ADN de *M. circinelloides* se aisló siguiendo el protocolo descrito por **Heeswijk y Roncero (1984)**, con ligeras modificaciones. La extracción de ADN se realizó de muestras de micelio de *M. circinelloides* que se filtraron a través de papel filtro Whatman, las muestras se mantuvieron 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 agregó 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 eppendorf, posteriormente se adicionó 80 µL de SDS al 10%, seguido

de 8  $\mu\text{L}$  de proteínasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 60°C, enseguida se adicionó 320  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M. Posteriormente se centrifugó la muestra por 30 minutos a 12,000 rpm. Se colectó el sobrenadante en tubo nuevo, se adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 12,000 rpm, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se retiró el exceso de etanol y se procedió a secar la muestra de ADN a 37°C, finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y 3  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de RNAasa, dejando incubar por 10 minutos a 37°C. Las muestras de ADN se conservaron a -70°C.

### 6.2.2 Amplificación de ADN por PCR

El proceso de amplificación de ADN se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido (tabla 3), y la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineamiento (1 minuto a la  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizando la fórmula  $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C\%) - 650/\text{pb oligonucleótido}$ ) y polimerización (30 segundos por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejó las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf.

Tabla 2. Cepas usadas

Cepa	Características
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Cepa estándar de laboratorio; F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , $\lambda$ .
<i>Mucor circinelloides</i> R7B (ATCC 90680)	Auxótrofa a leucina ( <i>leuA</i> <sup>-</sup> ) derivada de la cepa ATCC 1216b ( <b>Roncero y col. 1989</b> ).
<i>Mucor circinelloides</i> MU402	Auxótrofa a leucina ( <i>leuA</i> <sup>-</sup> ) y uracilo ( <i>pyrG</i> <sup>-</sup> ); obtenida mediante mutagénesis química. Derivada de la cepa R7B ( <b>Nicolás y col., 2007</b> ).
<i>Mucor circinelloides</i> MU-P	Derivada de la cepa MU402 ( <i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>pyrG</i> <sup>-</sup> ) auxótrofa a leucina y uracilo a la cual se le integro el gen <i>pyrG</i> restaurando la auxotrofia a uracilo ( <i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>pyrG</i> <sup>+</sup> ); donada por el D.C. Victoriano Garre Mula de la Universidad de Murcia, España.
<i>Mucor circinelloides</i> NRRL3631	<i>M. circinelloides f. lusitanicus</i> tipo sexual (+)
<i>Mucor circinelloides</i> MU801	Derivada de MU402, mutante en el gen <i>arf1</i> - (ID157293) (En este trabajo)
<i>Mucor circinelloides</i> MU804	Derivada de MU402, mutante en el gen <i>arf2</i> - (ID156501) (En este trabajo)
<i>Mucor circinelloides</i> MU809	Derivada de MU804, mutante en el gen <i>arf1</i> - (ID157293) (En este trabajo)
MU804 + <i>arf2wt</i>	Mutante MU804 complementada con el ORF del gen <i>arf2</i> silvestre clonado en el vector pEUKA4.
MU804 + <i>arf2GTP</i>	Mutante MU804 complementada con el ORF del gen <i>arf2</i> mutante (contiene la mutación Q71L) que codifica la proteína Arf2 constitutivamente activa, clonado en el vector pEUKA4.
<i>Mus musculus</i> BALB/c	Albinos, uso general, investigación inmunológica (producción de anticuerpos monoclonales, así como, hibridomas), defectos en desarrollo neuronal.
<i>Escherichia coli</i> OP50	Cepa resistente a estreptomicina, auxótrofa a uracilo, usada como alimento de nematodos.
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol ( <b>Brenner, 1974</b> ). Cepa estándar utilizada para investigación de <i>C. elegans</i> .

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	TM(°C)/GC%
arf15'FWR	TTTTTGGTGGTGCTTACATTACAGAGCATC	68.45/40
arf15'REV	GGAAAgagctcGGAGGGAGATGGAAGGAAA	73.29/53.33
arf13'FWR	CTGAAgagctcATACTTTGACTAACTTTAC	64.58/36.67
arf13'REV	TTCACtctagaCAGATATTCGGCGTAGAAT	67.66/40
(1) arf2-UFwd	TACTTctcgagCTCAACGCTCGAACCTTTCC	73.3/51.61
(3) arf2-URev-pyrG	<b>caagtaccaatgctgaggca</b> AAGGTGTTTTGCTCCAAGAGGA	77.45/47.73
(4) arf2-DFwd-pyrG	<b>cgatagcatggccagtgtagc</b> AAAAATCTACCTGCTTCGGCC	77.43/52.5
(2) arf2-DRev	GCAGCgaattcTAATGCGCGGTGTTGAGAGA	75.75/51.61
PyrG-FWR	GCACCGgagctcTGCCTCAGCATTGGTACTTG	76.66/59.38
PyrG-REV	GTGTGGgagctcGTACACTGGCCATGCTATCG	76.33/59.38
LeuA-FWR	gagctcCTTCTATTATGCAACTCAAGTCCGATGAG	71.82/45.71
LeuA-REV	cgagctcCTGCAGTAGCTGTTGATGTTGTTGTTGTATCG	75.56/48.72
arf1 5' FWR CR	ATGGTGCTCGTACAATTGGGATGC	68.13/50
arf2 5' FWR CR	GGGGAACAGCAAATGATGAGGCTAC	68.19/52
PyrG10	GGCAGAAGGGAGGAGGCACACG	71.8/68
PyrG-R2	ATCCCACCAGAAGGAGTACATGG	67/52.1
LeuA-arf1CR	CTGCATCTCCTCTCCTACTAATCTC	64.15/48
arf1-XhoI-FWR	AAAAActcgagATGGGTTTAAGTTTTAGCAA	66.82/32.26
arf1-NotI-REV	CGTgcgccgcTTATGCTCCTCTCTTCAAGT	76.45/58
arf2-XhoI-FWR	AAAAActcgagATGGGTGTAAGTTTCTCTTC	68/38.71
arf2-NotI-REV	GCTgcgccgcTTAAGAACGTCTCTTCAAAT	74.2/51.61
Mutarf2-1	GTTGGAGGACT <b>CG</b> ACAAGATTCGCCCTCTCTGGAGACATT	78/52.5
Mutarf2-2	AATCTTGTCG <b>AG</b> TCCTCCAACATCCCAAACAGTGAACGAG	76.48/47.5
Mutarf1-1	GTAGGAGGACT <b>CG</b> GATAAGATTCGTCCTCTCTGGAGACATT	74.76/47.5
Mutarf1-2	AATCTTATCG <b>AG</b> TCCTCCTACATCCCAAACAGTGAACGAA	74.35/42.5
pEUKA4-FWR	GAGACATTGCGAAATGTTATATAAACCCAAT	65.47/32.26
pEUKA4-REV	ATGAGCTGTATCTGGAAGAGGTAACCCGAA	71.15/45.16

\*Las letras en minúsculas ilustran la secuencia diana de los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos y las letras en minúscula y negrita la secuencia del gen marcador *pyrG* para el caso de los oligos de fusión del gen *arf2*. Las letras en mayúscula y negrita indican el cambio de nucleótido para generar la mutación puntual Q71L al expresar las proteínas Arf1 y Arf2.

### 6.2.3 Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño producto de las digestiones con enzimas de restricción o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el ADN se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Bio-Rad). Se utilizó buffer TAE 1X y las concentraciones de agarosa variaron entre 0.7-1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de ADN 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 ADN 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  $\lambda$  DNA/*Hind*III (Fermentas) y GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), respectivamente.

### 6.2.4 Transformación de *E. coli*

Para propagar ADN plasmídico en *E. coli* se emplearon células competentes. La obtención de células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  se realizó por el procedimiento del cloruro de calcio. Para la transformación se utilizó el procedimiento de electroporación (**Sambrook y Russell, 2001**).

### 6.2.5 Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico 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 mayor pureza (secuenciación).

### 6.2.6 PCR en colonia

Consistió en la selección al azar de colonias de transformantes que crecieron en placas LB suplementadas con el marcador de selección (antibiótico a cual confiere resistencia el plásmido); dicho experimento se realizó posterior a los eventos independientes de transformación con los vectores donde estaban contenidas las diferentes construcciones utilizadas en este trabajo. Una muestra de cada colonia se colocó en el tubo de reacción (6 muestras por tubo) con oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación del plásmido, obteniendo fragmentos de tamaño variable dependiendo el fragmento analizado.

### 6.2.7 Tratamiento del ADN con enzimas

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

**Digestión** con enzimas de restricción (Promega o Fermentas), que se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor.

**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 a las especificaciones del proveedor.

**Ligación** de fragmentos de ADN. Se realizó en volúmenes de 20  $\mu$ L totales, buffer de ligación 1X (Roche o Fermentas) y una unidad de la enzima ADN T4 ligasa (Roche o Fermentas). Las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante un mínimo de 2 horas. En general la relación molar de vector: inserto usada fue de 1:5. Siempre que fue necesario se inactivaron las enzimas por medio de calor, siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 6.3 Construcción del fragmento recombinante *arf1R* mediante clonaciones y subclonaciones en el vector pJET1.2/blunt

La generación del fragmento recombinante para la mutación del gen *arf1* se realizó amplificando por PCR a partir de ADN genómico de la cepa R7B un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen *arf1*, y un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf1*.

Para ello se diseñaron los oligonucleótidos arf15'FWR y arf15'REV que amplifican la región 5'. Al oligonucleótido arf15'REV se le incluyó un sitio de restricción *SacI* en su extremo 3'. La región 3' fue amplificada con los oligonucleótidos arf13'FWR y arf13'REV; el primero contiene un sitio de restricción en su extremo 5' para la enzima *SacI* y el segundo para la enzima *XbaI* en su extremo 3'. De forma independiente a partir de ADN genómico de la cepa R7B se amplificó el gen *pyrG* (gen que codifica para la enzima orotidina fosfato descarboxilasa; necesario para la síntesis de uracilo) con los oligonucleótidos PyrG-FWR y PyrG-REV donde ambos oligonucleótidos contienen sitios de restricción para la enzima *SacI*. Las regiones 5' y 3' del gen *arf1* y el gen *pyrG* (2 kb), fueron clonados de forma independiente en el vector de clonación pJET1.2/blunt que contiene un gen que confiere resistencia a ampicilina, y fueron llamados p-arf1-5' (para la región 5'), p-arf1-3' (para la región 3') y p-PyrG (para el gen *pyrG*) (tabla 4). La presencia de los sitios de corte *SacI* permitió realizar la subclonación del gen *pyrG* en el plásmido p-arf1-3'. El plásmido resultante que contenía la región 3' y el gen *pyrG* se denominó p-arf13'-P (tabla 4). Por último, se realizó la subclonación del fragmento de la región 5' del gen *arf1* en el vector p-arf13'-P utilizando los sitios de corte *SacI* y *XbaI* y fue nombrado como p-arf13'-P-5' (tabla 4), dicho plásmido se usó para la posterior transformación en *E. coli*. Se corroboró la clonación de dichos fragmentos en el vector pJET1.2/blunt mediante ensayos de PCR en colonia y restricción enzimática.

#### **6.4 Amplificación del fragmento recombinante arf2R mediante PCR en fusión**

La técnica de PCR en fusión (figura 12) se basa en la generación de ADN recombinante fusionado a partir de dos o más fragmentos de ADN en donde no se requieren vectores plasmídicos ni digestiones con enzimas de restricción.

Para la construcción del fragmento recombinante por PCR en fusión del gen *arf2* con el gen de selección *pyrG*, se amplificaron tres fragmentos que contenían secuencias solapantes entre ellos. Para esto se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron fragmentos de 1 kb correspondiente a la región 5' río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *arf2* y a la región 3' río abajo del codón de paro

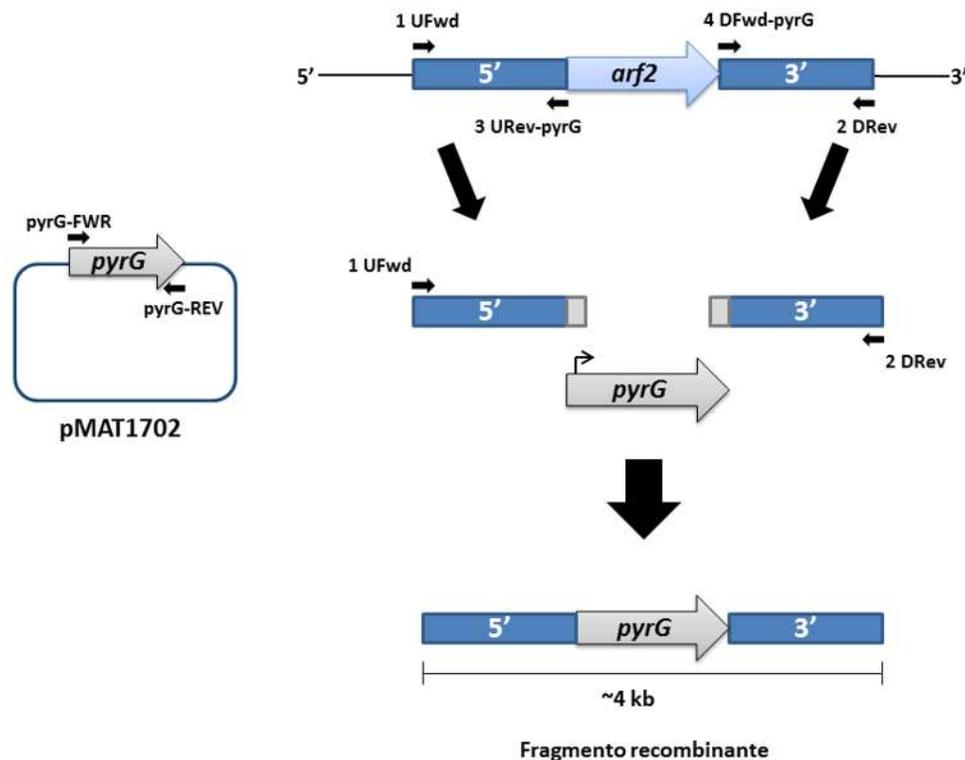
de la traducción del gen *arf2*, estos oligonucleótidos contaban con una secuencia de 20 nucleótidos que hibridan con los extremos 5' y 3' del gen *pyrG*; el gen *pyrG* fue amplificado por separado, permitiendo así la hibridación por complementariedad de bases durante la PCR en fusión.

Se diseñaron 4 oligonucleótidos:

- (1) *arf2*-UFwd (oligonucleótido directo) y (3) *arf2*-URev-*pyrG* (oligonucleótido reverso) usados para amplificar la región 5' del gen *arf2*. En el oligonucleótido (3) *arf2*-URev-*pyrG* se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que hibrida con el extremo 5' del gen *pyrG*.
- (4) *arf2*-DRev (oligonucleótido directo) y (2) *arf2*-DFwd-*pyrG* (oligonucleótido reverso) usados para amplificar la región 3' del gen *arf2*. En el oligonucleótido (2) *arf2*-DFwd-*pyrG* se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 5' que hibrida con el extremo 3' del gen *pyrG*.

De forma independiente se utilizaron los oligonucleótidos *PyrG*-FWR y *PyrG*-REV para amplificar el gen *pyrG* por PCR convencional a partir del plásmido pMAT1702 (Trieu y col., 2017) que contiene el gen *pyrG* silvestre; la amplificación del gen *pyrG* incluyó su propio promotor y terminador. Se realizaron 3 PCRs individuales para obtener los tres fragmentos de ADN que componen la región 5', la región 3' y por otra parte el gen *pyrG*. Las condiciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo utilizando 100 ng/ $\mu$ L de templado; 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 1  $\mu$ L de la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN y posteriormente se sometieron a 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineamiento (45 segundos a 60°C) y la elongación (30 segundos por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de elongación durante 5 minutos y un último paso de 4°C. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf. Una vez finalizadas las PCRs se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron los amplicones. Una vez purificados los amplicones se cuantificaron sus concentraciones. Para la PCR en fusión se utilizaron como templado los productos ya purificados de los tres fragmentos: región 5', *pyrG*,

región 3' en proporción 1:2:1. Para dicha reacción se utilizó un programa de PCR especial con un paso inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 10 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 segundos a 95°C), temperatura de descenso (1 minuto a 70°C), temperatura de alineamiento (30 segundos a 70°C), temperatura de elongación (2 minutos a 68°C), seguido de 25 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 segundos a 95°C), temperatura de descenso (1 minuto a 70°C), temperatura de alineamiento (30 segundo a 70°C), elongación (2 minutos a 68°C) y un paso final de 5 minutos a 68°C para finalmente quedarse a 4°C ∞, hasta el procesamiento de las muestras amplificadas.



**Figura 12. Esquema de la estrategia de la PCR en fusión para generar el fragmento recombinante del gen *arf2*.** Se muestra la amplificación de las regiones 5' y 3' del gen *arf2* exceptuando el marco de lectura abierto con los oligonucleótidos señalados por las flechas en color negro y con la adición de nucleótidos correspondientes a la secuencia de *pyrG* en gris. La fusión se llevó a cabo por la hibridación de las regiones del gen *pyrG* contenidas en los fragmentos 5' y 3' del gen *arf2* en sus extremos, dando lugar al fragmento recombinante.

## 6.5 Construcción del fragmento recombinante *arf1RL* para la generación de la doble mutante en los genes *arf1* y *arf2*

Para la generación de la cepa doble mutante en los genes *arf1* y *arf2*, se utilizó el plásmido p-*arf13'*-P-5' previamente obtenido para la generación del fragmento recombinante del gen *arf1*. Por otra parte se obtuvo mediante PCR el gen de selección *leuA* (gen que codifica para la enzima  $\alpha$ -isopropil malato isomerasa; necesario para la síntesis de leucina) (Heeswijk y Roncero, 1984) con los oligonucleótidos LeuA-FWR y LeuA-REV usando como templado el plásmido pLeuA (Arnau y Strøman, 1993).

En ambos oligonucleótidos se les adicionaron sitios de restricción para la enzima *SacI*. El gen *leuA* (3.7 kb) y el vector p-*arf13'*-P-5' se sometieron a digestión con la enzima *SacI*. Ambos productos fueron purificados y posteriormente ligados con la enzima T4 DNA ligasa. El plásmido resultante fue nombrado p-*arf15'*-L-3' (tabla 4), el cual se usó para transformar a *E. coli*.

## 6.6 Delección génica mediante recombinación homóloga en *M. circinelloides*

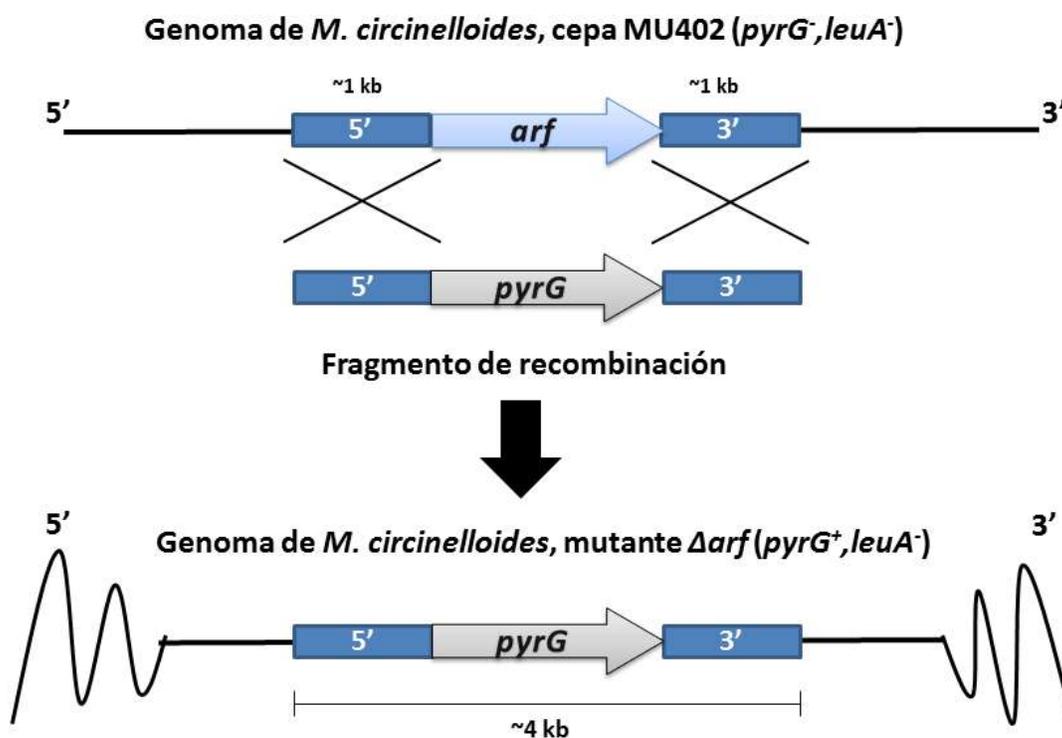
Se amplificó mediante PCR los genes *arf* de interés a interrumpir y el gen que permitió la selección de las transformantes: *pyrG* para las mutaciones sencillas y *leuA* para la doble mutación. Se obtuvieron los fragmentos de los genes *arf* mediante PCR de las regiones 5' y 3' río arriba y río abajo del ORF de cada gen para flanquear el gen *pyrG* o *leuA*. El producto de PCR generado se denominó fragmento de recombinación (figura 13), el cual fue utilizado para la transformación de protoplastos de *M. circinelloides* MU402 mediante electroporación. Posteriormente se hizo la selección de transformantes bajo la condición selectiva correspondiente al marcador de selección usado, seguido de la identificación mediante PCR, Southern blot y Rt-qPCR para determinar el evento de integración en el locus deseado.

Tabla 4. Plásmidos y fragmentos recombinantes usados

<b>Plásmido o fragmento</b>	<b>Características</b>
p-arf1-5'	Región 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen <i>arf1</i> clonado en dirección 5' a 3' en el vector pJET1.2/blunt.
p-arf1-3'	Región 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen <i>arf1</i> clonado en dirección 5' a 3' en el vector pJET1.2/blunt.
p-pyrG	Gen <i>pyrG</i> clonado en dirección 5' a 3' en el vector pJET1.2/blunt.
p-arf13'-P	Vector que contiene al gen <i>pyrG</i> subclonado en dirección 3' a 5' en el vector p-arf13'.
p-arf13'-P-5'	Región 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen <i>arf1</i> subclonado en dirección 5' a 3' en el vector p-arf13'-PyrG.
arf1R	Fragmento recombinante que contiene el gen de selección <i>pyrG</i> flanqueado por las regiones 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen <i>arf1</i> y 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen <i>arf1</i> .
arf2R	Fragmento recombinante que contiene el gen de selección <i>pyrG</i> flanqueado por las regiones 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen <i>arf2</i> y 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen <i>arf2</i> .
p-arf1-UTRs	Vector que contiene las regiones 5' y 3' del gen <i>arf1</i> , exceptuando el ORF del gen <i>arf1</i> .
p-arf15'-L-3'	Gen de selección <i>leuA</i> clonado en dirección 5' a 3' en el vector p-arf1-UTRs.
arf1RL	Fragmento recombinante que contiene el gen de selección <i>leuA</i> flanqueado por las regiones 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen <i>arf1</i> y 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen <i>arf1</i> .
pEUKA4- <i>arf1wt</i>	Plásmido que restaura la auxotrofia a leucina y que tiene clonado el gen silvestre <i>arf1</i> .
pEUKA4- <i>arf1GTP</i>	Plásmido que restaura la auxotrofia a leucina y que tiene clonado el gen <i>arf1</i> que expresa la proteína constitutivamente activa.
pEUKA4- <i>arf2wt</i>	Plásmido que restaura la auxotrofia a leucina y que tiene clonado el gen silvestre <i>arf2</i> .
pEUKA4- <i>arf2GTP</i>	Plásmido que restaura la auxotrofia a leucina y que tiene clonado el gen <i>arf2</i> que expresa la proteína constitutivamente activa.

### 6.6.1 Integración de ADN exógeno en el genoma de *M. circinelloides*

La transformación en *M. circinelloides* se realizó transformando protoplastos por el procedimiento descrito en el apartado anterior, empleando ADN linearizado (fragmento recombinante). Los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3.2 con 0.5 M de sorbitol o medio YNB pH 3.2 con 0.5 M de sorbitol. Para identificar los transformantes que habían integrado el ADN exógeno se determinó el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG* o *leuA* durante cinco ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo.



**Figura 13. Evento de doble recombinación homóloga.** Se muestran las regiones 5' y 3' del gen *arf* que flanquean al marcador de selección (en este caso el gen *pyrG*). El diseño del fragmento recombinante favorece el evento de doble recombinación homóloga en el locus del gen silvestre. Se usó como cepa receptora a MU402 ( $pyrG^-$ ,  $leuA^-$ ) de *M. circinelloides*, lo cual genera la restauración de la auxotrofía a uracilo y la delección del gen *arf* de interés.

### 6.6.2 Transformación de *M. circinelloides*

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (Gutiérrez y col., 2011) generados según el protocolo descrito por Heeswijk y Roncero (1984). Los protoplastos al carecer de pared celular permiten la incorporación de ADN exógeno mediante electroporación. Para obtener protoplastos transformables se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas/mL en 25 mL de medio líquido YPG pH 4.5 suplementado cuando se requería con 200  $\mu\text{g/mL}$  de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación (250 rpm) durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las germinulas se precipitaron durante 5 minutos a 2000 rpm 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), finalmente se resuspendieron en buffer fosfato-sorbitol a razón de 5 mL por cada  $1 \times 10^7$  esporas inoculadas inicialmente. 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 germinulas se incubaron a 30°C con agitación suave (50 rpm) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de pared celular. Para detener la digestión se añadieron 5 mL de sorbitol 0.5 M frío, se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 1000 rpm, se resuspendieron las células nuevamente en 5 mL de sorbitol 0.5 M frío y se centrifugaron en las mismas condiciones. Finalmente los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800  $\mu\text{L}$  de sorbitol 0.5 M.

Para la transformación se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de ADN (1  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico o 3  $\mu\text{g}$  de ADN lineal) a 200  $\mu\text{L}$  de protoplastos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm estéril previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros de electroporación: 0.8 kV, 25  $\mu\text{F}$  de capacitancia y una resistencia constante de 400  $\Omega$ .

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 estéril. La mezcla de transformación se incubó durante 1 hora a 26°C con una agitación de 150 rpm para permitir la recuperación de los protoplastos. Seguido los protoplastos se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm, se resuspendieron en 600 µL de YNB pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol + niacina + tiamina + leucina cuando fue necesario. Los protoplastos transformados se sembraron cuidadosamente en cajas del medio mínimo adecuado para la selección de las transformantes.

### 6.6.3 Complementación de cepas mutantes de *M. circinelloides*

La complementación se llevó a cabo con el plásmido pEUKA4, el cual contiene el gen *leuA* que restaura la auxotrofia a leucina y un promotor inducible por glucosa *gpd1*: el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus niger* (Wolff y Arnau, 2002).

Se generaron los plásmidos que contienen el gen silvestre y el gen mutante que codifica la proteína constitutivamente activa para los genes *arf1* y *arf2* con los cuales se transformó a las cepas  $\Delta arf1$  y  $\Delta arf2$ . Para el caso de los plásmidos que complementan a la cepa  $\Delta arf1$ , primero se amplificó el gen silvestre y posteriormente se generó el gen mutante. Se amplificó el ORF del gen *arf1* con los oligonucleótidos *arf1-FWR-XhoI* y *arf1-REV-NotI* (tabla 2) a partir de ADN genómico de la cepa R7B; los sitios de restricción incluidos en los oligonucleótidos permitieron la posterior clonación en el vector pEUKA4. Para el segundo caso se diseñaron 2 oligonucleótidos adicionales (Mutarf1-1 y Mutarf1-2) (tabla 2) con una región solapante entre ellos en donde está incluida la mutación para generar el cambio Q71L en la proteína Arf1 (Dascher y Balch, 1994). Con los oligonucleótidos *arf1-FWR-XhoI* y Mutarf1-2 se amplificó un fragmento de 295 pb y con los oligonucleótidos Mutarf1-1 y *arf1-REV-NotI* se amplificó un fragmento de 512 pb. Mediante PCR en fusión se generó el gen recombinante de 786 pb con la mutación sitio dirigida en el gen *arf1* para codificar el cambio de aminoácido Q71L, el cual fue clonado en el vector pEUKA4.

La misma estrategia se siguió para la complementación de la cepa  $\Delta arf2$ . Se amplificó el ORF del gen *arf2* con los oligonucleótidos *arf2-FWR-XhoI* y *arf2-REV-NotI* (tabla 2) a partir de ADN genómico de la cepa R7B. Para el obtener el gen *arf2* mutante, con los oligonucleótidos *arf2-FWR-XhoI* y *Mutarf2-2* se amplificó un fragmento de 283 pb y con los oligonucleótidos *Mutarf2-1* y *arf2-REV-NotI* se amplificó un fragmento de 529 pb. Mediante PCR en fusión se generó el gen mutante de 791 pb con la mutación sitio dirigida en el gen *arf2* para codificar el cambio de aminoácido Q71L, el cual fue clonado en el vector pEUKA4.

#### 6.6.4 Secuenciación de fragmentos de ADN

Se secuenciaron los fragmentos clonados en el plásmido pEUKA4 (*arf1wt*, *arf1GTP*, *arf2wt* y *arf2GTP*) correspondientes a los genes que codifican a las proteínas silvestres *Arf1* y *Arf2* y a las proteínas *Arf1* y *Arf2* constitutivamente activas mediante el analizador de 4 capilares, modelo *ABY Prism 3130* de Applied Biosystems en el servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia, España para verificar la mutación sitio dirigida y la no alteración del ORF del gen silvestre.

#### 6.6.5 Corroboración de las mutantes mediante PCR

A partir de ADN genómico de la cepa silvestre y las clonas transformantes se amplificó como control positivo la región 3' con los oligonucleótidos 3'FWR y 3'REV para cada gen. Para determinar la mutación en el locus *arf* de interés se usó un oligonucleótido directo que hibrida en la región 5' fuera del fragmento recombinante (*arfCR*) (tabla 2) y un oligonucleótido que hibrida en el gen de selección *pyrG* para cepas mutantes sencillas (*pyrG10* o *pyrG-R2*) (tabla 2) o el oligonucleótido que hibrida en el gen *leuA* para la identificación de la cepa doble mutante (*leuACR*) (tabla 2).

### 6.6.6 Corroboración de las mutantes mediante Southern blot

ADN genómico (1  $\mu\text{g}$ ) de *M. circinelloides* se sometió a digestión con las enzimas de restricción adecuadas para cada cepa a analizar. Posteriormente el producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa (0.8%). 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 ADN se transfirió a una membrana de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0.4 N durante toda la noche (**Sambrook y Russell, 2001**). La hibridación se realizó en todos los casos con sondas marcadas radiactivamente (<sup>32</sup>P) las cuales fueron preparadas en un tubo eppendorf con 1  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix, 50 ng de ADN de la sonda a utilizar (región 5' o 3' del fragmento recombinante), 2  $\mu\text{L}$  de hexanucleótidos y se completó con agua bidestilada hasta 6  $\mu\text{L}$ . En otro tubo se preparó 2  $\mu\text{L}$  de buffer klenow, 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs sin citosina y 7  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. Se calentaron en termoblock por 10 minutos a 100°C y posteriormente se juntó el contenido de ambos tubos, se adiciono 1  $\mu\text{L}$  de enzima klenow y 2  $\mu\text{L}$  de dCTP radioactivo con las debidas precauciones, se dejó 1 hora en termoblock a 37°C. La prehibridación se llevó a cabo a 65°C un mínimo de 2 horas con 20 mL de solución de prehibridación (NaCl 4 M y SDS al 10%) y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche con 10 mL de solución de hibridación (NaCl 0.9 M, SDS 1%, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado), a la que se añadió la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C) y enfriada rápidamente en hielo. Finalmente las condiciones de lavado fueron: un primer lavado con una solución 2X SSC (17.5 g de NaCl y 8.85 g de citrato de sodio dihidratado, a pH 7) 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 la 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 el último lavado se verificaron 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. Posteriormente, las membranas se pusieron en contacto en películas Kodak® BioMax™ MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a 4°C. En algunos casos las membranas se expusieron a pantallas Phosphorimager BAS-MP2040 (Fujifilm) que fueron escaneadas en el lector Molecular Imager FX (BioRad).

### 6.6.7 Corroboración de las mutantes mediante RT-qPCR

Para llevar a cabo la corroboración de la mutación de los genes *arf1* y *arf2* en las cepas mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  se realizó la extracción de ARN de micelio de 15 horas de germinación de cada mutante con el método usado por **Valle-Maldonado y col., 2015**. Las muestras de ARN 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**). Se evaluó la relación  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ , en donde una relación  $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.90 - 2.0$ , indica una calidad óptima del ácido nucleico (**Yamaguchi y col., 1992; Wilfinger y col., 1997**). Las muestras de ARN total cuyo valor de relación  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR.

La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas (tabla 5) con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies ([www.biosearchtech.com](http://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  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción contenía 5  $\mu\text{L}$  de ARN templado (100  $\mu\text{g}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de mezcla de enzimas (retrotranscriptasa y ADN polimerasa), 12.5  $\mu\text{L}$  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 nucleasas. La mezcla de reacción 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 detectadas 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 5. Oligonucleótidos y sondas utilizados para RT-qPCR**

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5´-3´) Oligonucleótido reverso (5´-3´) Sonda (5´-3´) FAM-BHQ1	Tm(°C) / GC (%)
<i>arf1</i> (157293)	GCCCAATGCCATGAATGC	67.9/55.56
	GGTAGCACAAGTGGTCTGGAT	63.4/52.38
	TGCTGAAATCACCGATAAGCTTGGTC	71.5/46.15
<i>arf2</i> (156501)	TGCCAACAAGCAGGATTTGC	68.6/50
	GGAGTGAAGGCCAAGTTTATCAG	65.1/47.83
	CAACGCCATGAACGCTGCCGAAAT	77.5/54.17
<i>arf3</i> (155350)	TTGGACGCTGCAGGAAAGAC	68.0/55.0
	CCAACGGTTGGGATAGTAGTGA	65.1/50.0
	TCTCTACAAGCTGAACTGAACCAATCA	68.7/39.29
<i>arf4</i> (32250)	GGACCTTCCAGGAGCATTTACAC	67.0/52.17
	CGCAGGAAGGATGCACATACC	69.0/57.14
	TGCAGAAGTTACTGAAATACTGGGTCTGA	69.3/41.38
<i>tfc-1</i> (106349)	AGCAGGATATGGAAGGCGCTTTATC	69.7/48
	GGGCATCTGTGGCAATCTTTC	68.1/52.38
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	74.1/52

\*Los números entre paréntesis indican el número ID en la base de datos de *M. circinelloides* (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>)

\*Las sondas para detectar los genes *arf* fueron diseñadas por Maldonado-Herrera 2015, tesis de maestría.

## 6.7 Cultivo de *E. coli*

*E. coli* se cultivó a 37°C en medio LB.

Cada litro de LB contenía 10 g de peptona de caseína (Solbiosa), 5 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker) y 15 g de agar bacteriológico en caso de medio sólido. Cuando fue necesario, tras esterilizar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL o el antibiótico estreptomina a una concentración final de 10 µg/mL.

## 6.8 Cultivo de *M. circinelloides*

### 6.8.1 Condiciones generales de crecimiento de *M. circinelloides*

*M. circinelloides* se cultivó a 28°C en los diferentes medios.

#### **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 glucosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH a 4.5 (**Bartnicki-García, 1968**).

#### **MMC (Medio Mínimo Casa-aminoácidos)**

Cada litro contenía 10 g de medio bacto casa-aminoácidos (BD Difco), 0.5 g de bacto yeast nitrogen w/o aminoacids (BD Difco), 20 g de glucosa (BD Bioxon) y 15 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido. Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina y niacina a una concentración final de 1 µg/mL respectivamente (**Nicolás y col., 2007**).

**YNB (Yeast Nitrogen Base)**

Cada litro contenía 1,5 g de sulfato de amonio, 1,5 g de ácido glutámico, 0,5 g de yeast nitrogen w/o aminoacids and amonium sulfate (BD Difco), 10 g de glucosa (BD Bioxon) y cuando fue necesario 20 g de agar (BD Bioxon) para medio sólido. Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina y niacina a una concentración de 1 µg/mL respectivamente (**Lasker y Borgia, 1980**).

**YPD agar (Dextrosa, Peptona, Extracto de levadura) (BD Difco)**

Cada litro contenía 20 g de glucosa, 20 g de peptona bacteriológica, 10 de extracto de levadura y 15 g de agar.

Se suplemento con uridina (200 µg/mL) o leucina (10 µg/mL) cuando fue necesario. En experimentos de transformación se añadió sorbitol a una concentración de 0.5 M para evitar que la diferencia de presión osmótica provocara el estallido de los protoplastos generados. El pH fue 4.5 cuando se requirió un crecimiento micelial estándar y pH 3.2 cuando se necesitó obtener un crecimiento colonial restringido, que permitiera analizar un gran número de individuos por caja.

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

Placas de Petri con medio YPG sólido, se inocularon con 100 esporas de *M. circinelloides* y se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas se colectaron agregando 9 mL de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas se aspiraron y se depositaron en un tubo de 50 mL. Las esporas se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y centrifugadas de la misma manera tres veces. Finalmente las esporas se resuspendieron en 35 mL de agua destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika). Se depositó 20 µL en la parte superior y 20 µL en la inferior, respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Las esporas cuantificadas se multiplicaron por el factor de dilución  $2.5 \times 10^4$ .

El resultado expresa las esporas por mililitro de muestra. Las esporas contadas y lavadas se conservaron a 4°C y se emplearon en un máximo de 15 días después de su obtención.

### **6.9 Crecimiento radial de *M. circinelloides***

Placas de Petri con medio YPG sólido, se inocularon con 50 esporas de *M. circinelloides* en el centro de la placa y se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 6 días. Se midió el diámetro colonial (cm) cada día de incubación.

### **6.10 Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de *M. circinelloides***

Para llevar a cabo el crecimiento aeróbico y anaeróbico se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento aerobio los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 150 rpm, usando 20 mL de medio en matraces de 125 mL. Para el crecimiento anaerobio, se usaron matraces de 125 mL con medio de cultivo (aprox. 137mL), tapados con un tapón de corcho y con una barra magnética permitiendo una agitación constante, dichos tapones se atravesaron con una aguja para la salida de CO<sub>2</sub>; El sistema se conoce como sistema “auto-anaeróbico” (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993).

#### **6.10.1 Determinación de porcentajes de germinación de *M. circinelloides***

Se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas por cada mililitro de medio de cultivo, se tomaron alícuotas de cada matraz cada hora hasta la hora seis de incubación para el crecimiento aerobio y cada dos horas hasta la hora ocho de incubación de para el crecimiento anaerobio. Inmediatamente se realizó el conteo de 100 células por muestra, identificando las células germinadas. El resultado determina el porcentaje de esporas germinadas al tiempo evaluado.

### 6.11 Cuantificación del crecimiento

El crecimiento celular se determinó midiendo la biomasa total generada en medio líquido como peso seco. La biomasa de *M. circinelloides* (micelio o levaduras) se colectó en papel filtro previamente seco y pesado. Las células se lavaron dos veces con agua destilada y se secaron por 96 horas a 80°C. Después del secado y enfriado, los filtros con la biomasa se pesaron hasta que el peso se mantuvo constante.

### 6.12 Ensayos de virulencia en *M. musculus*

Se utilizaron ratones machos Balb/c diabéticos de aproximadamente 10-12 semanas de edad, a los cuales se les inoculó  $20 \times 10^6$  esporas en 300  $\mu$ L de solución salina vía intraperitoneal con una jeringa de insulina 27G x ½ in., de 1 mL marca BD. Los animales se mantuvieron en observación por aproximadamente 10 días post-inoculación. Se realizó cada ensayo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, tanto en su cuidado como en su manejo. Se reportó el peso de los animales así como su fallecimiento cada 24 horas durante todo el transcurso del experimento.

### 6.13 Crecimiento y mantenimiento de *C. elegans*

Para la preparación de la fuente de comida de *C. elegans*, se inoculó *E. coli* OP50 en medio LB líquido con estreptomina (10  $\mu$ g/mL), se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 48 horas. Posteriormente se tomaron 500  $\mu$ L del precultivo de *E. coli* OP50, el cual fue esparcido con un hisopo estéril en cada caja Petri con medio NGM a utilizar. Se incubaron a 37°C por 48 horas hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron pequeñas partes de agar con al menos un nematodo a cada caja Petri previamente crecidas con la cepa de *E. coli* OP50 y se dejó incubar por 3 días a 18° C hasta la fase adulta del nematodo.

### **Medio NGM (Nematode Growth Medium)**

Medio utilizado para la obtención de *C. elegans*. Se preparó con 2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker), 4 g de peptona de caseína (Solbiosa), 3 g de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.05 g de fosfato de potasio dibásico (Meyer), y 20 g de agar (BD Bioxon) por cada litro de medio. Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente se adicionó 1 mL de una solución de colesterol (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker) y 0.5 mg de estreptomicina por cada litro de medio.

#### **6.13.1 Ensayos de virulencia en *C. elegans***

Se colocó 1 mL de los distintos sobrenadantes de crecimiento micelial de las mutantes en genes *arf* de *M. circinelloides*, a cada uno de los pozos de placas de 24 pozos (Corning). Mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75) los nematodos (10-20) fueron transferidos con un “picker” a cada uno de los pozos utilizados. En todos los ensayos de virulencia los nematodos fueron observados cada 12 horas por un tiempo no mayor a 48 horas. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo, fue cuando éste permaneció inmóvil a la estimulación física.

#### **5.14 Análisis de imágenes**

Se empleó un microscopio Optihot-2 (NIKON) y una cámara Coolpix S10 (NIKON) para capturar las imágenes correspondientes a las morfologías obtenidas a los diferentes tiempos de crecimiento usando el objetivo 40X.

Se usaron los software Q-capture PRO 7 y Leica Application Suite para la medición del tamaño de espora, célula madre y longitud de hifa.

#### **5.15 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se usó el software STATISTICA10. La prueba post hoc empleada fue Fisher. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos: \* ( $\alpha < 0.05$ ).

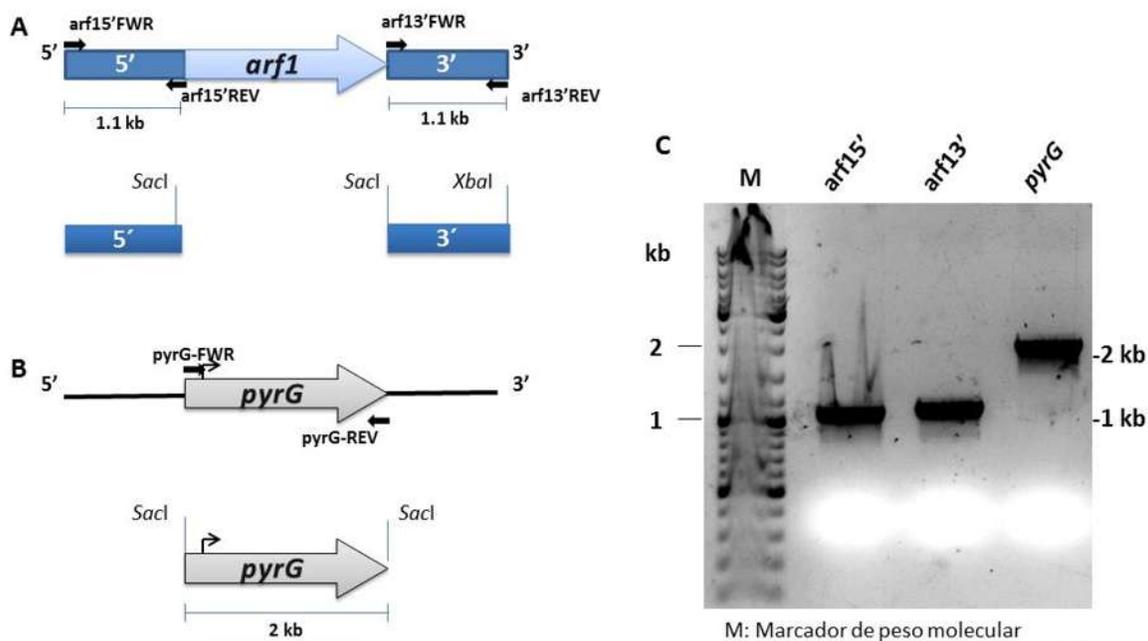
## VII. RESULTADOS

### 7.1 Construcción y clonación del fragmento de recombinación del gen que codifica a la proteína Arf1 de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de determinar la participación de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento y virulencia de *M. circinelloides*, se llevó a cabo la delección de dichos genes en la cepa MU402 (*leuA*<sup>-</sup>, *pyrG*<sup>-</sup>) mediante eventos de doble recombinación homóloga. Para lo cual se usó la inserción del gen de selección (*pyrG*, necesaria para restaurar la auxotrofia a uracilo o *leuA*, necesario para restaurar la auxotrofia a leucina) flanqueado por las regiones 5' y 3' aledañas al ORF de cada gen *arf*.

Para llevar a cabo dicho proceso, se amplificó mediante PCR aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción (región 5') y un 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción (región 3') del gen que se mutó. Dichas regiones previamente amplificadas por PCR se usaron para flanquear al marcador de selección *pyrG* para realizar las mutaciones sencillas en los genes *arf1* y *arf2* y *leuA* para llevar a cabo las mutaciones dobles (*arf1/arf2*). Con este proceso, se eliminó todo el ORF (Marco de Lectura Abierto) del gen *arf* de interés mediante las diferentes estrategias descritas en materiales y métodos, generando finalmente los fragmentos de recombinación para realizar las mutaciones en los genes *arf1* y *arf2*. Se seleccionaron transformantes protótrofos a uracilo o leucina que hayan incorporado el fragmento de recombinación dependiendo del gen interrumpido.

Para hacer la mutación del gen *arf1* de *M. circinelloides*, se llevó a cabo la construcción del fragmento de recombinación *arf1R*. A partir de ADN genómico de la cepa R7B se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que comprende a 1.1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción (región 5') del gen *arf1* y 1.1 kb río abajo del codón de paro de la traducción (región 3') del gen *arf1* con los oligonucleótidos correspondientes descritos previamente en materiales y métodos. De forma independiente se llevó a cabo la amplificación del gen *pyrG* (figura 14).

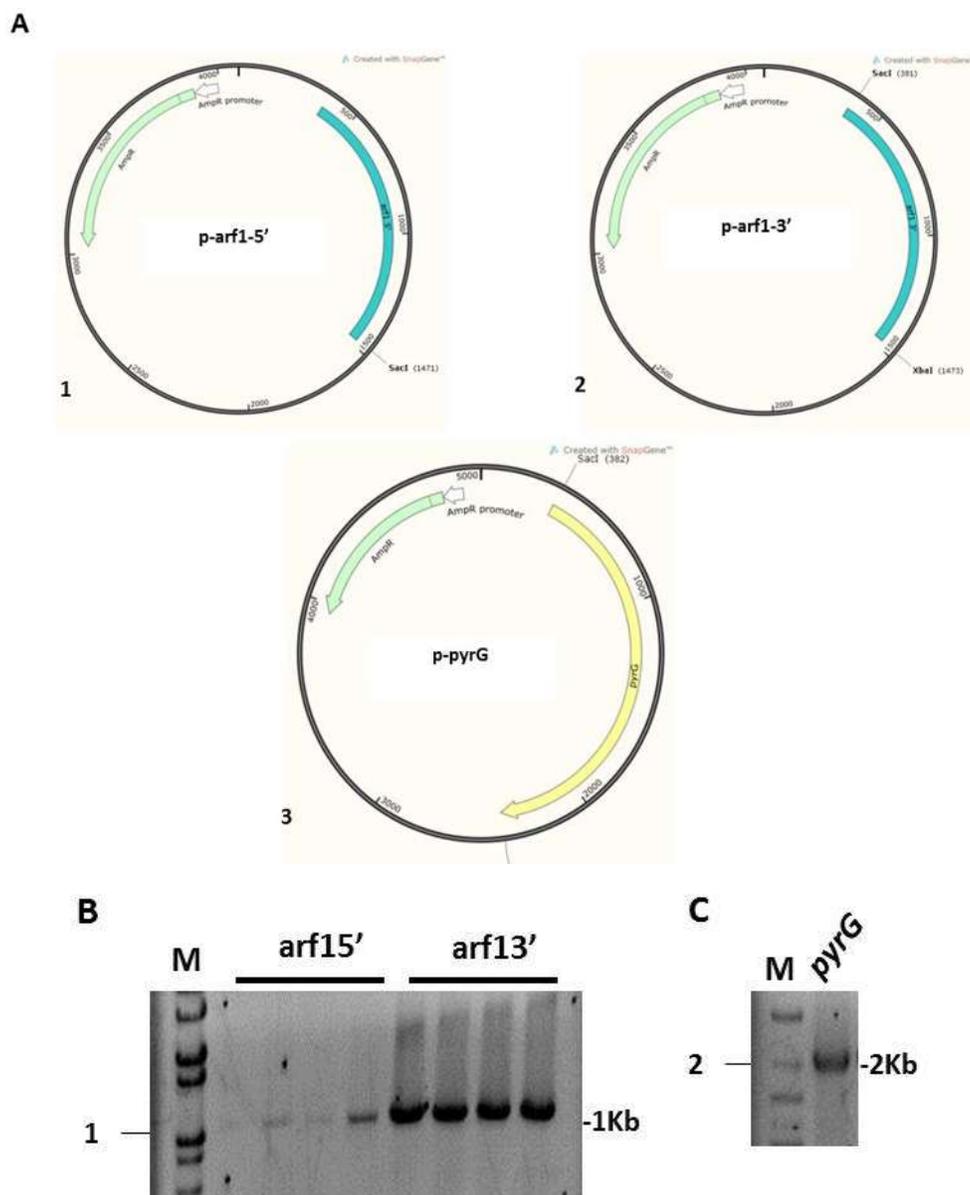


**Figura 14. Construcción del fragmento recombinante para la delección del gen *arf1* de *M. circinelloides*.** (A) Esquema del gen *arf1* con las regiones 5' y 3' de 1.1 kb cada una, las cuales fueron amplificadas por PCR. (B) Esquema del gen silvestre *pyrG* de *M. circinelloides* amplificado por PCR, el cual contiene su propio promotor. (C) Gel de agarosa en donde se corrobora los tamaños de fragmentos de ADN esperados de 1.1 kb y 2 kb para las regiones 5', 3' del gen *arf1* y *pyrG*, respectivamente.

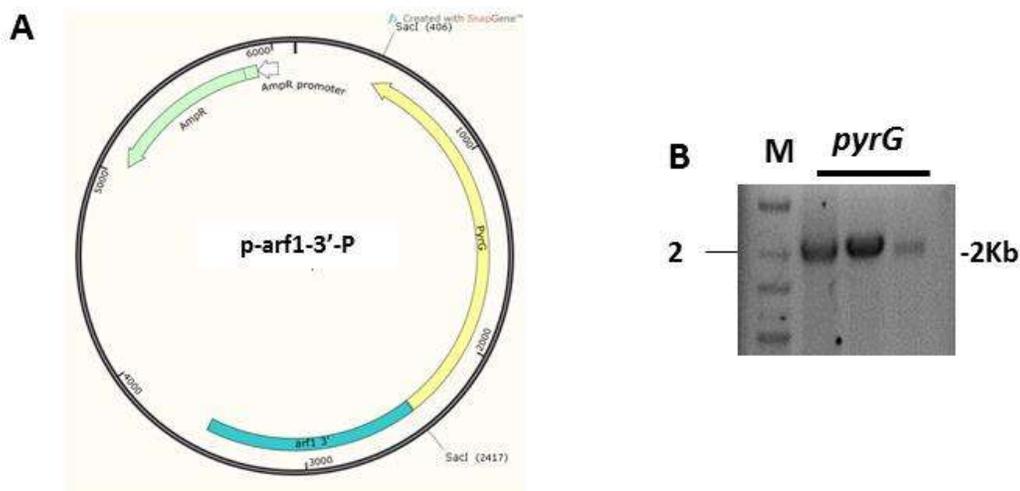
Las regiones 5' y 3' del gen *arf1*, y el gen *pyrG*, fueron clonados de forma independiente en el vector de clonación pJET1.2/blunt que tiene un gen que confiere resistencia a ampicilina. Los plásmidos recombinantes fueron nombrados como p-*arf1*-5' (para el que porta la región 5', figura 15-A1), p-*arf1*-3' (para el que porta la región 3', figura 15-A2), y el plásmido p-*pyrG* (que porta el gen *pyrG*, figura 15-A3). Se corroboró la clonación de dichos fragmentos en el vector pJET1.2/blunt mediante ensayos de PCR en colonia, descrito en la sección de materiales y métodos, esperando obtener fragmentos de 1.1 kb tanto para la región 5' como para la región 3' del gen *arf1* (figura 15-B) y una amplificación de 2 kb para el gen *pyrG* (figura 15-C)

Una vez que fueron clonadas las regiones 5' y 3' del gen *arf1* y el gen *pyrG*, y corroborados mediante restricción (resultados no mostrados), se procedió a realizar la subclonación del gen *pyrG* en el plásmido p-*arf1*-3'. Primero se realizó una digestión del plásmido p-*pyrG* con la enzima *SacI*, lo cual liberó el gen *pyrG*, posteriormente dicho gen fue purificado para su posterior ligación en el vector p-*arf1*-3' que también se digirió previamente con la enzima *SacI* para linearizarlo y se purificó dicho vector. Ambos productos se ligaron y el plásmido resultante p-*arf1*-3'-*pyrG* se usó para transformar a *E. coli*, finalmente la construcción se corroboró mediante PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos *pyrG*-FWD y *pyrG*-REV que amplificaron un fragmento de 2 kb correspondiente al gen *pyrG* (figura 16).

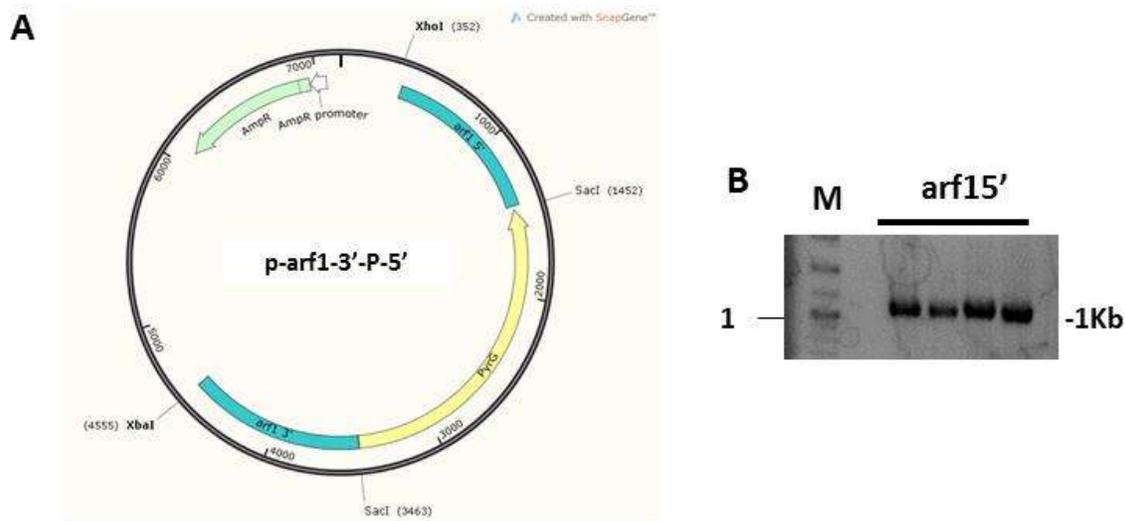
Finalmente, se realizó la subclonación del fragmento de 1.1 kb de la región 5' del gen *arf1* en el vector p-*arf1*-3'-*pyrG*. Primero, el vector p-*arf1*-5' se sometió a una doble digestión con las enzimas *SacI* y *XbaI*. Por otro lado el plásmido p-*arf1*-3'-*pyrG* se le realizó una digestión con la enzima *XbaI* y una digestión parcial con la enzima *SacI*, esto con la finalidad de que los extremos tanto del plásmido como del inserto fueran compatibles, posteriormente se ligaron para su transformación en *E. coli*. La construcción final fue nombrada p-*arf1*-3'-*pyrG*-5' y corroborada mediante PCR en colonia (figura 17) utilizando los oligonucleótidos *arf1*5'-FWD y *arf1*3'-REV generando una banda de amplificación de 4.2 kb correspondientes al fragmento de recombinación del gen *arf1*; también se corroboró mediante digestión (datos no mostrados) con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, las cuales liberan el fragmento recombinante de 4.2 kb y el vector pJET1.2/blunt de 3kb.



**Figura 15. Clonación de los fragmentos 5' y 3' del gen *arf1* y del gen *pyrG* en el vector pJET 1.2/blunt y su confirmación por PCR en colonia. (A) 1) Esquema del plásmido p-arf1-5' que contiene la región 5' del gen *arf1*. 2) Esquema del plásmido p-arf1-3' que contiene la región 3' del gen *arf1*. 3) Esquema del plásmido p-pyrG que contiene al gen *pyrG*. (B) Gel de agarosa en donde se muestra la amplificación de las regiones 5' y 3' de gen *arf1*, producto de PCR en colonia. (C) Gel de agarosa en donde se muestra la amplificación del gen *pyrG*, producto de PCR en colonia. Se utilizó el marcador de ADN 1 Kb Plus DNA Ladder.**



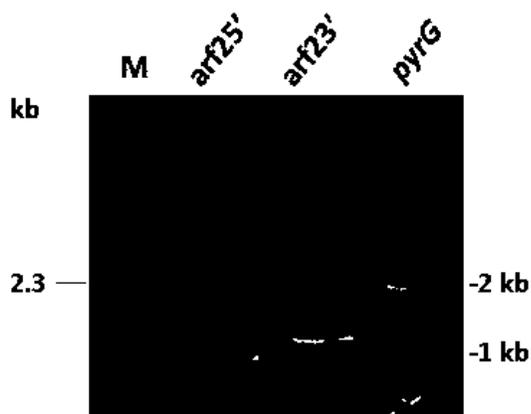
**Figura 16. Subclonación del gen *pyrG* en el plásmido p-arf1-3'.** (A) Esquema del plásmido p-arf1-3'-P que contiene la región 3' y el gen *pyrG* clonados. (B) Gel de agarosa en donde se muestra la amplificación mediante PCR en colonia del gen *pyrG*. Se utilizó el marcador de ADN 1 Kb Plus DNA Ladder.



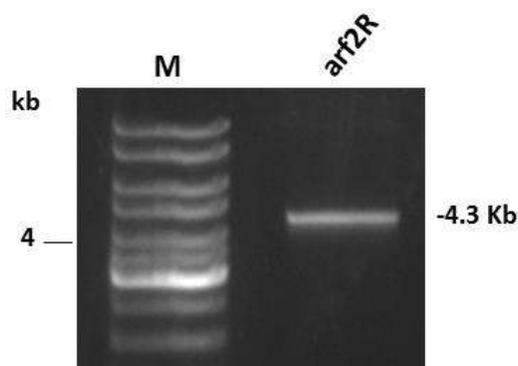
**Figura 17. Subclonación del fragmento 5' del gen *arf1* en el plásmido p-arf1-3'-P-5'.** (A) Esquema del plásmido p-arf1-3'-P-5' ilustrando las regiones 5' y 3' del gen *arf1*, las cuales flanquean al gen *pyrG* (fragmento recombinante) (B) Corroboración en gel de agarosa del plásmido p-arf1-3'-P-5', en donde se amplificó la región 5' del gen *arf1*, usando como templado dicho plásmido. Se utilizó el marcador de ADN 1 Kb Plus DNA Ladder.

## 7.2 Construcción del fragmento de recombinación del gen que codifica a la proteína Arf2 de *M. circinelloides*.

Por otra parte, para llevar a cabo la interrupción del gen *arf2* de *M. circinelloides*, se realizó la construcción del fragmento recombinante mediante la estrategia de PCR en fusión, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se amplificó aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción y una región de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf2*, y al gen *pyrG*. Esta técnica permitió generar los fragmentos recombinantes sin necesidad de enzimas de restricción ni vectores de clonación. Los productos de PCR se corroboraron en un gel de agarosa al 1%, y cada uno de los fragmentos de ADN se purificaron y se cuantificó su concentración (figura 18). Los 3 fragmentos correspondientes a la región 5' del gen *arf2*, la región 3' del gen *arf2* y el gen *pyrG*, se utilizaron como templado para el último paso, la PCR en fusión. El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificó recortando únicamente la banda correspondiente al tamaño esperado de la fusión de los 3 fragmentos, es decir el fragmento recombinante de aproximadamente 4 kb (figura 19).



**Figura 18. Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR convencional para la construcción del fragmento de recombinación para la delección del gen *arf2*.** M: marcador de peso molecular ADN Lambda DNA/*HindIII*; en el carril 1) el fragmento de 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *arf2*; en carril 2) el fragmento de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf2*; en el carril 3) el gen *pyrG*.



**Figura 19. Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR en fusión para la delección del gen *arf2*.** M: marcador de peso molecular de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; en el carril 1) el fragmento recombinante arf2R (~4kb) formado por el gen de selección *pyrG* flanqueado por las regiones 5' y 3' del gen *arf2*.

### 7.3 Transformación de *M. circinelloides* con los fragmentos recombinantes arf1R y arf2R.

Para determinar la función de los genes *arf1* y *arf2*, se generaron las mutantes en los genes *arf1* y *arf2* mediante reemplazamiento del ORF del gen a interrumpir por el gen de selección *pyrG* o *leuA*.

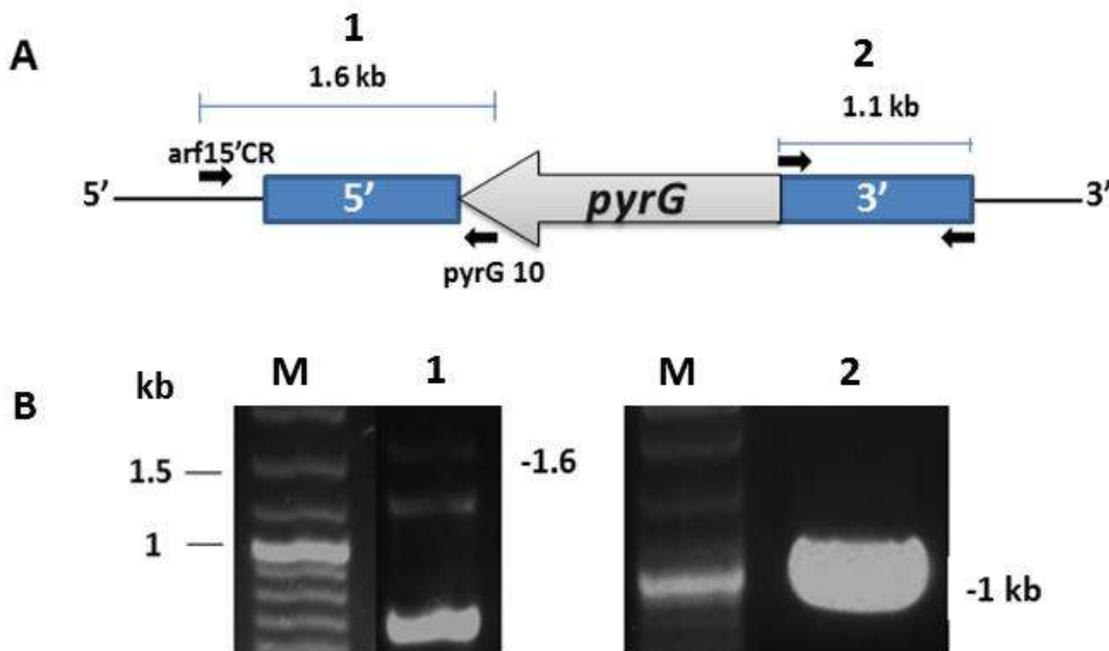
Se realizaron las transformaciones como se describe en materiales y métodos con los fragmentos de recombinación de los genes *arf1* y *arf2*. Se obtuvieron 8 transformantes para el gen *arf1* y 4 transformantes para el gen *arf2*. Los transformantes de *M. circinelloides* en el primer pase de selección son normalmente mutantes heterocarióntes (presencia de núcleos silvestres y mutantes en la misma célula), ya que el ADN exógeno (fragmentos recombinantes) no se integra en todos los núcleos. Para la obtención de las mutantes homocarióntes (solo núcleos mutantes) fue necesario realizar varios ciclos de esporulación (5 ciclos, cada uno de 10 días de duración en promedio) en medio selectivo, esto para favorecer el enriquecimiento de los núcleos transformados. Tras los ciclos de esporulación en medio MMC sin uracilo, se seleccionaron solo 3 transformantes para el gen *arf1* y 2 transformantes para el gen *arf2* para el análisis molecular de la mutación.

#### **7.4 Confirmación molecular de mutantes en los genes *arf1* y *arf2* de *M. circinelloides*.**

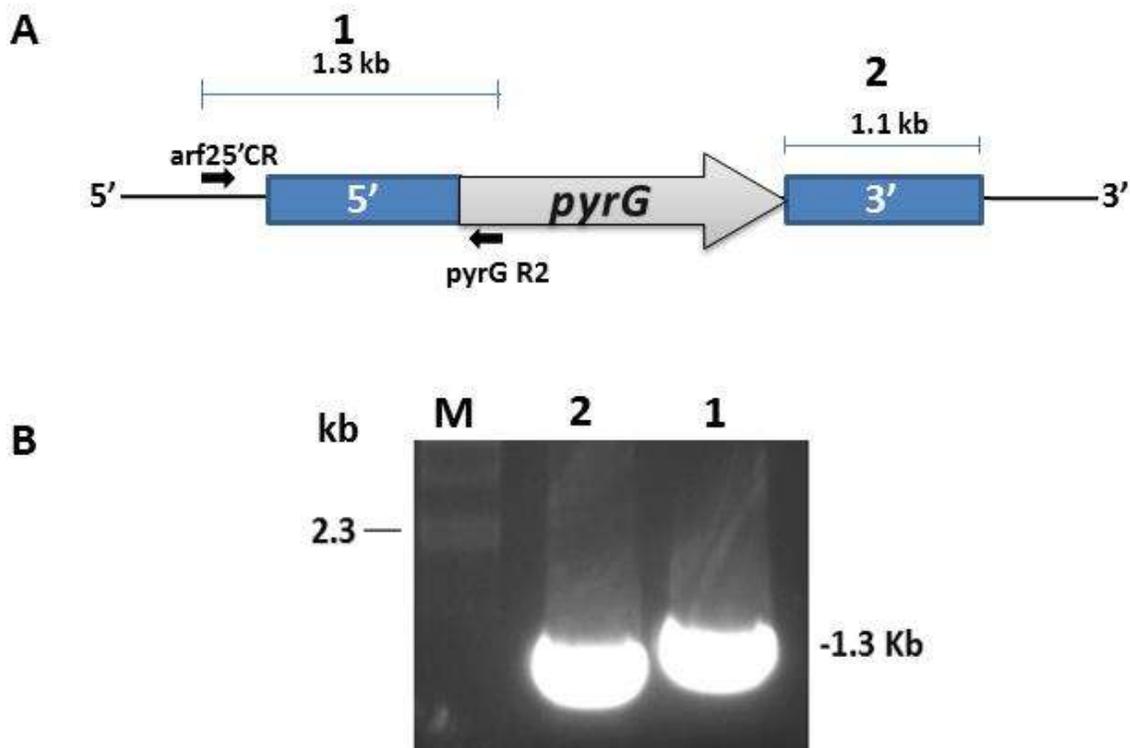
Después de la selección de las presuntas mutantes en los genes *arf1* y *arf2*, se procedió al análisis molecular de las mismas con la finalidad de corroborar la delección de los genes en *M. circinelloides*. Se realizó el ensayo de análisis de PCR con el cual se corrobora rápidamente si ocurrió el doble evento de recombinación homóloga en el locus deseado; además se realizó análisis tipo Southern blot con el cual además de demostrar la integración del fragmento recombinante, nos indica si ocurrió más de un evento de integración. En ambos análisis fue necesario la extracción de ADN genómico tanto de la cepa silvestre como de las presuntas cepas mutantes. Para la confirmación de la mutación en el gen *arf1*, se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *arf1*-5'-CR y *pyrG*-10 (tabla 2), el oligonucleótido directo hibrida río arriba excluyendo el fragmento de recombinación del gen *arf1*, y el oligonucleótido reverso hibrida en el gen *pyrG*. Por lo tanto una banda de amplificación positiva de 1.6 kb indicaría que el gen *pyrG* se ha integrado al genoma suplantando al ORF del gen *arf1* (figura 20), y por consecuencia la presencia de la mutación esperada; mientras que la no amplificación sugeriría la presencia de un genotipo silvestre. Un enfoque similar se llevó a cabo para la confirmación de la mutación en el gen *arf2*, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos *arf2*-5'-CR como oligonucleótido directo y *pyrG*-R2 como oligonucleótido reverso (tabla 2), con los cuales en caso de haber integración del fragmento recombinante en el locus deseado se esperaría una banda de amplificación de 1.3 kb (figura 21). La no amplificación sugeriría un genotipo silvestre.

Como un control interno de amplificación positiva, se amplificó la región 3' presente tanto en la cepa silvestre como en las clonas transformantes, y de esa forma asegurar que la no amplificación se debe a la ausencia de la mutación y no a fallas técnicas durante la PCR.

El resultado obtenido mostró que de las clonas analizadas para la mutación en el gen *arf1*, las tres de las clonas poseía la banda de tipo mutante; El resultado para la mutación en el gen *arf2* mostró que las dos clonas poseían la banda de tipo mutante. Estos resultados indican que se logró la obtención del reemplazamiento de los genes silvestres *arf1* y *arf2* por sus respectivos fragmentos recombinantes generando mutantes en los dos casos.



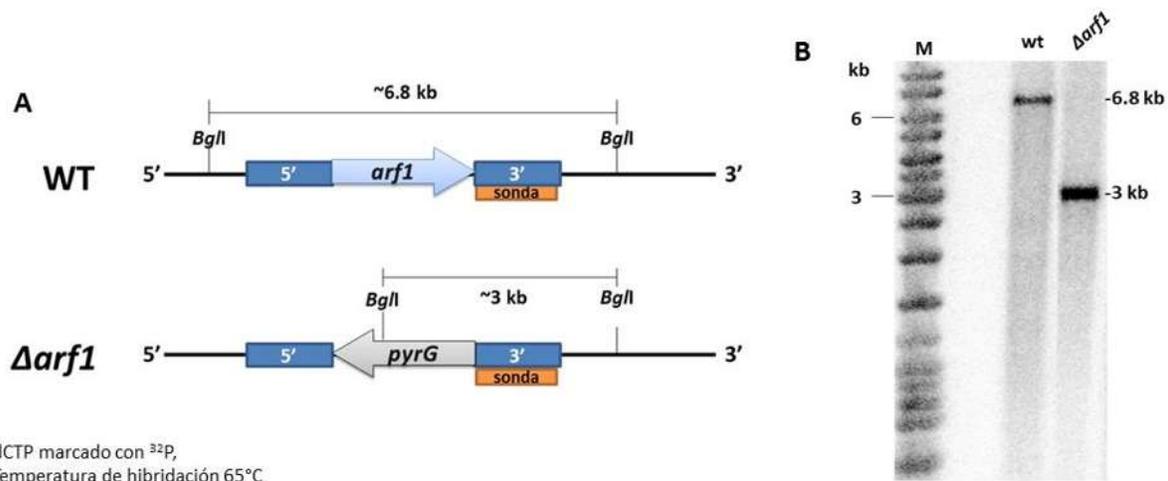
**Figura 20. Confirmación molecular mediante PCR de la mutación en el gen *arf1* de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *arf1*, donde un fragmento de 1.6 kb amplificado con los oligonucleótidos *arf15'CR* y *pyrG10* indica la integración en el locus deseado (B) Gel de agarosa al 1%. M: marcador de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix. En el carril 1: la amplificación de la banda mutante (1) para la delección del gen *arf1*; en el carril 2: la amplificación de la región 3' (2) del gen *arf1* con los oligonucleótidos *arf13'FWR* y *arf13'REV* como control positivo. Se muestran fotografías representativas de una clona.



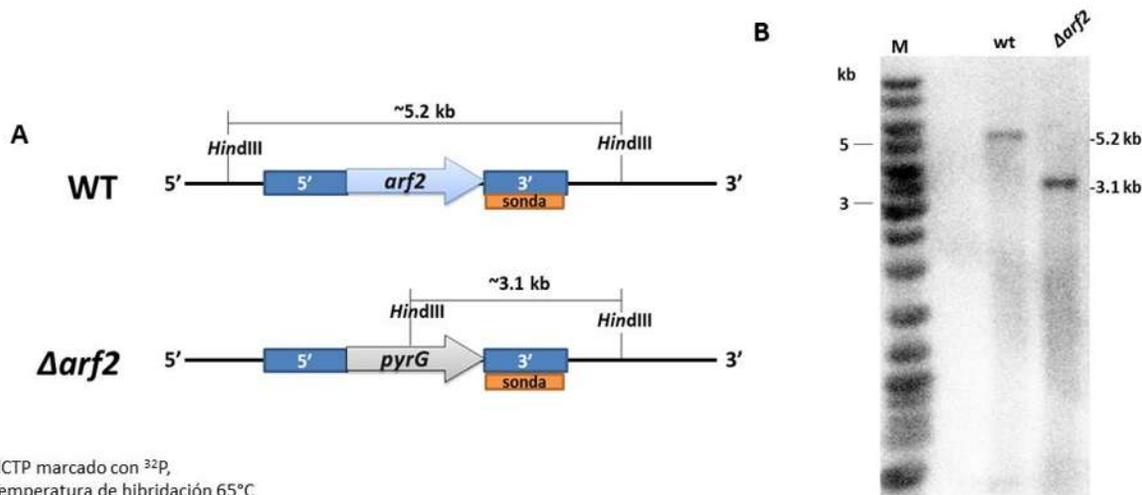
**Figura 21. Confirmación molecular mediante PCR de la mutación en el gen *arf2* de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *arf2*, donde un fragmento de 1.3 kb amplificado con los oligonucleótidos *arf25'CR* y *pyrG-R2* indica la integración en el locus deseado (B) Gel de agarosa al 1%. M: marcador de tamaño ADN Lambda DNA/*Hind*III. En el carril 1: la amplificación de la región 3' (2) del gen *arf2* con los oligonucleótidos (4) *arf2-DRev* y (2) *arf2-DFwd-pyrG* como control positivo; en el carril 2: la amplificación de la banda mutante (1) para la delección del gen *arf2*. Se muestran fotografías representativas de una clona.

Por otra parte, con la finalidad de comprobar que se llevó un único evento de integración en el genoma de *M. circinelloides*, se realizó un ensayo tipo Southern blot usando como sonda el fragmento de 1 kb del extremo 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf1*, el cual fue marcado previamente con radioactividad ( $^{32}\text{P}$ ); para lo cual se aisló el ADN genómico tanto de la cepa silvestre como de las cepas mutantes, a dicho material genético se le realizó una restricción enzimática con la enzima *Bgl*I, esperando la detección de fragmentos de distintos tamaños para cada genotipo (figura 22-A). Se observó una banda de hibridación de 6.8 kb que identificó al genotipo de tipo silvestre (MU402); mientras que para la cepa mutante en el gen *arf1*, se observó una banda de hibridación de 3 kb, que identificó al genotipo de tipo mutante, indicando que se obtuvo un único evento de integración en el locus deseado, con lo cual se corroboró la existencia de una cepa mutante homocariónte en el gen *arf1* (figura 22-B).

En el caso del gen *arf2*, se realizó de forma similar un ensayo tipo Southern blot, en donde se marcó con radioactividad el fragmento 3' del gen *arf2*. El ADN genómico proveniente de la cepa silvestre (MU402) y de las mutantes fueron digeridos con la enzima *Hind*III (figura 23-A). Se observó una banda de hibridación de 5.2 kb, que identificó al genotipo de tipo silvestre (MU402); mientras que para la cepa mutante en el gen *arf2*, se observó una banda de hibridación de 3.1 kb, que identificó al genotipo de tipo mutante, indicando que se obtuvo un único evento de integración en el locus deseado, con lo cual se corroboró la existencia de una cepa mutante homocariónte en el gen *arf2* (figura 23-B).



**Figura 22. Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa mutante en el gen *arf1* de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de la restricción del ADN genómico de las mutantes corroboradas por PCR con la enzima *BglI*. Se usó como sonda un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf1* (sonda ilustrada en color anaranjado marcada con  $^{32}\text{P}$ ). La presencia de una banda de hibridación de 6.8 kb identificó al gen *arf1* silvestre; mientras que una banda de 3 kb indicó la presencia del gen *arf1* mutado. (B) Se muestra la autoradiografía del Southern blot. M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; wt: ADN genómico digerido con *BglI* de la cepa silvestre MU402;  $\Delta arf1$ : ADN genómico digerido con *BglI* de una clona mutante en el gen *arf1*, donde se observó una única banda de hibridación de 6.8 kb, lo que indicó un solo evento de integración en el locus esperado.



**Figura 23. Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa mutante en el gen *arf2* de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de la restricción del ADN genómico de las mutantes corroboradas por PCR con la enzima *HindIII*. Se usó como sonda un fragmento de 1 kb correspondiente a la región 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf2* (sonda ilustrada en color anaranjado) marcada con  $^{32}\text{P}$ . La presencia de una banda de hibridación de 5.2 kb identificó al gen *arf2* silvestre; mientras que una banda de hibridación de 3.1 kb indicó la presencia del gen *arf2* mutado. (B) Se muestra la autoradiografía del Southern blot. M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; wt: ADN genómico digerido con *HindIII* de la cepa silvestre MU402;  $\Deltaarf2$ : ADN genómico digerido con *HindIII* de la clona mutante en el gen *arf2*, donde se observó una única banda de hibridación de 3.1 kb, lo que indicó un solo evento de integración en el locus esperado.

## 7.5 Confirmación molecular de la integración del fragmento recombinante *arf1RL* para generar la cepa doble mutante $\Delta arf1/\Delta arf2$ de *M. circinelloides*.

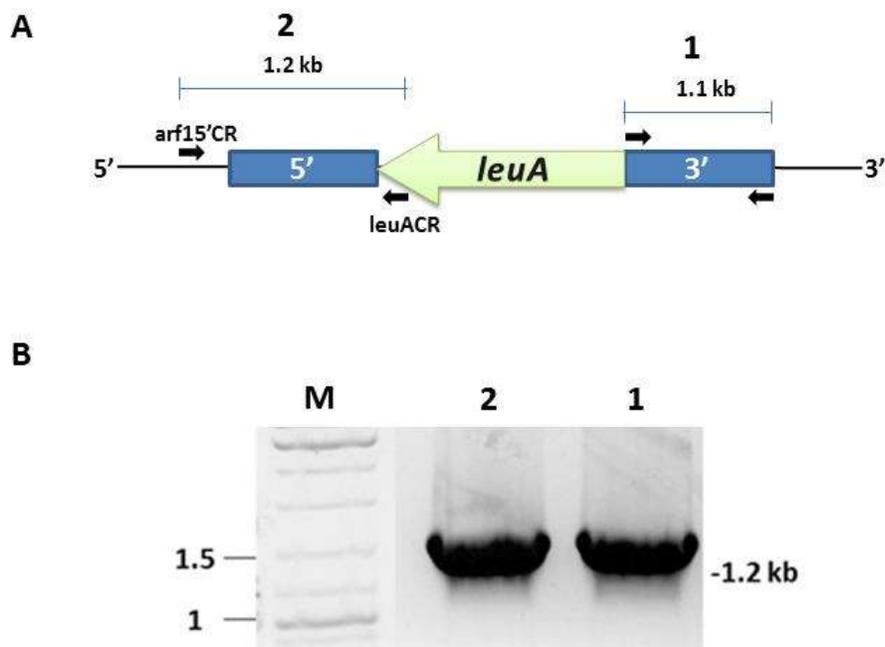
Debido a que las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides* presentan un 96% de identidad entre ellas, lo que sugiere posibles funciones redundantes, se decidió hacer una cepa doble mutante en dichos genes.

Los experimentos de transformación de la mutante  $\Delta arf2$  (previamente caracterizada molecularmente) con el fragmento recombinante para deletar el gen *arf1* dieron lugar a 13 transformantes protótrofos a leucina (*leuA*<sup>+</sup>) en medio mínimo YNB. Las transformantes fueron sometidas a cinco ciclos de esporulación en medio selectivo para aumentar el porcentaje de núcleos transformados. Finalmente fueron analizadas 6 clonas mediante PCR para comprobar la integración del gen *leuA* en el locus del gen *arf1*. La reacción de PCR con los oligonucleótidos *arf15'*CR y *LeuA-arf1*CR (tabla 2) se llevó a cabo usando ADN genómico de las colonias transformantes y de la cepa mutante  $\Delta arf2$ . El oligonucleótido directo hibrida río arriba excluyendo el fragmento de recombinación usado para interrumpir el gen *arf1* y el oligonucleótido reverso hibrida en el gen *leuA*; por lo tanto una amplificación de 1.2 kb indicaría la inserción del fragmento de recombinación en el locus del gen *arf1*, mientras que una no amplificación sugeriría la presencia de un genotipo silvestre para el gen *arf1*.

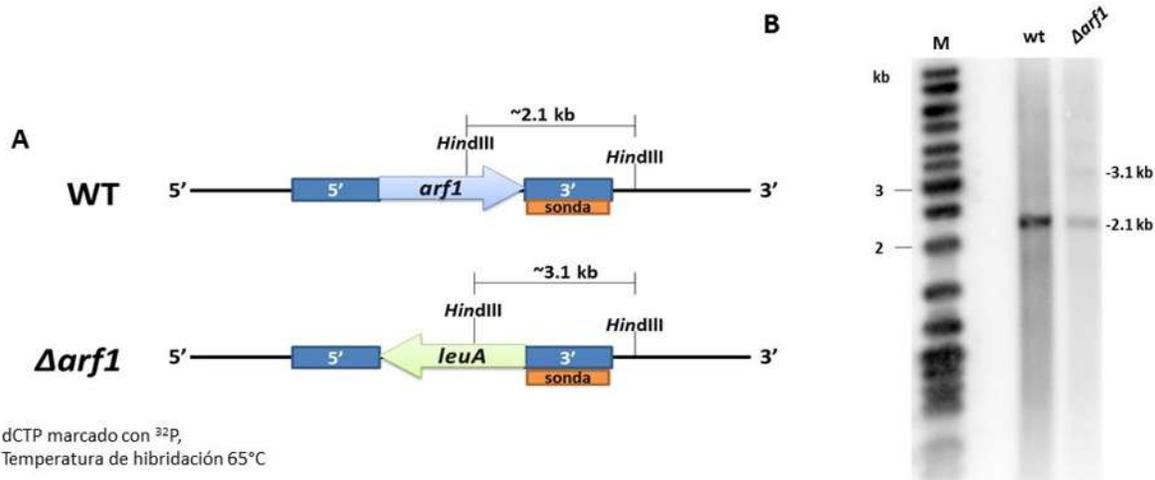
Se utilizó como control positivo un producto de 1.1 kb correspondiente a la región 3' del gen *arf1*. Cuatro de las seis clonas analizadas mostraron la mutación en el gen *arf1* (figura 24).

Para identificar un único evento de integración se realizó un ensayo tipo Southern blot. Se aisló el ADN genómico tanto de la cepa silvestre como de las cepas mutantes caracterizadas por PCR; a dicho material genético se le realizó una restricción enzimática con la enzima *HindIII*, esperando la detección de fragmentos de distintos tamaños para cada genotipo (figura 25-A). Se observó una banda de hibridación de 2.1 kb que identificó al genotipo de tipo silvestre ( $\Delta arf2$ ); mientras que para la cepa mutante en el gen *arf1* identificada previamente por PCR, se observó la banda de hibridación de 3.1 kb, que identificó al genotipo de tipo

mutante y la banda de 2.1 kb que identificó el genotipo silvestre en todas las clonas analizadas, indicando que se obtuvo un único de integración en el locus deseado pero no todos los núcleos fueron transformados, con lo cual se corroboró que son cepas mutantes heterocariontes en el gen *arf1* (figura 25-B).



**Figura 24. Confirmación molecular mediante PCR de la cepa doble mutante  $\Delta arf1/\Delta arf2$  de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *arf1* usando como fondo genético la cepa con la mutación en el gen *arf2* previamente analizada, donde un fragmento de 1.2 kb amplificado con los oligonucleótidos arf15'CR y LeuA-*arf1*CR indica la integración en el locus deseado (B) Gel de agarosa al 1%. M: marcador de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix. En el carril 1, la amplificación de la región 3' río debajo de codón de paro de la traducción del gen *arf1* (1) como control positivo; en el carriles 2, la amplificación de la banda mutante para la deleción en el locus del gen *arf1* (2).

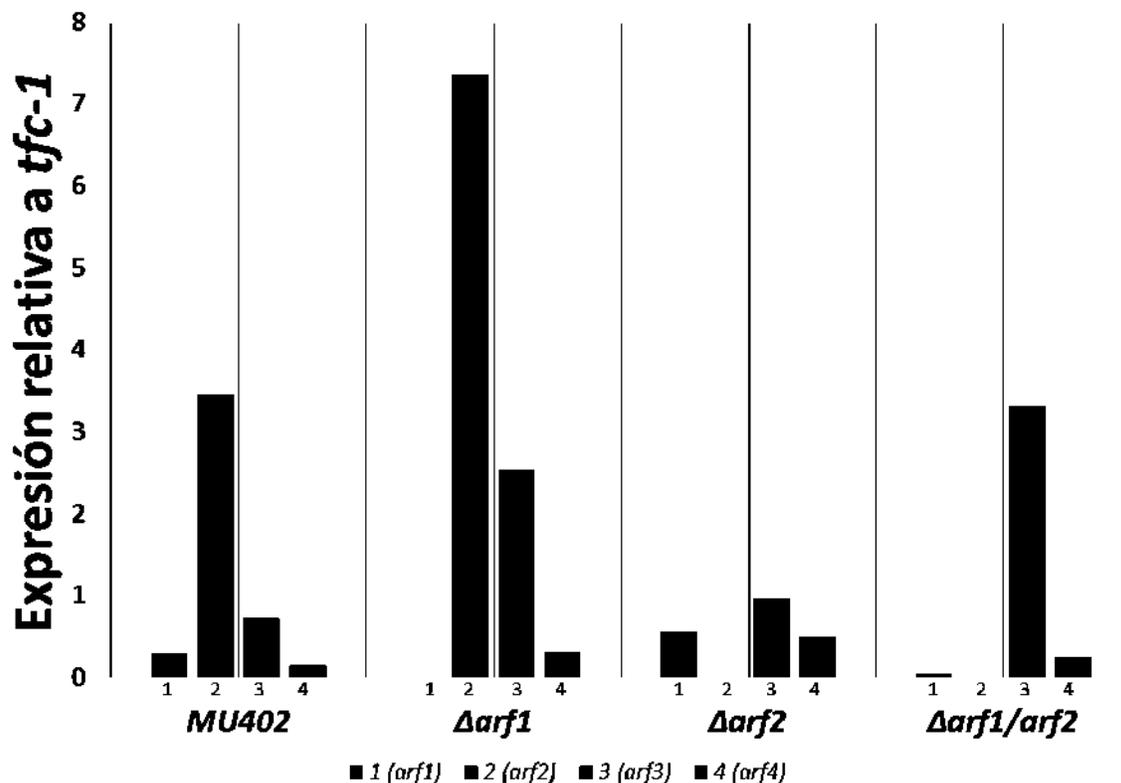


**Figura 25. Confirmación molecular mediante Southern blot de la cepa doble mutante  $\Delta arf1/\Delta arf2$  de *M. circinelloides*.** (A) Esquema de la restricción del ADN genómico de las mutantes corroboradas por PCR con la enzima *HindIII*. Se usó como sonda un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *arf1* (sonda ilustrada en color anaranjado) marcada con  $^{32}\text{P}$ . La presencia de una banda de hibridación de 2.1 kb identificó al gen *arf1* silvestre; mientras que una banda de hibridación de 3.1 kb indicó la presencia de la mutación. (B) Se muestra la autoradiografía del Southern blot. M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; wt: ADN genómico digerido con *HindIII* de la cepa  $\Delta arf2$ ;  $\Delta arf1$ : ADN genómico digerido con *HindIII* de las clonas mutantes en el gen *arf1*, donde se observó la banda de tipo silvestre y de tipo mutante, lo que indicó un solo evento de integración en el locus esperado pero no la transformación de todos los núcleos de la cepa  $\Delta arf2$ , obteniendo mutantes heterocariontes para la mutación en el gen *arf1*.

## 7.6 Corroboración de las mutaciones en los genes *arf1* y *arf2* mediante RT-qPCR.

Con el fin de corroborar la nula expresión de los genes *arf1* y *arf2* en las mutantes sencillas y los niveles de expresión del gen *arf1* en la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$ , se llevó a cabo un ensayo de RT-qPCR. A partir de micelio de 15 horas de crecimiento se hizo extracción de ARN total siguiendo el protocolo reportado por (Valle-Maldonado y col., 2015) de cada una de las mutantes así como de la cepa silvestre, en donde para cada reacción se usaron las sondas correspondientes a los genes: *arf1*, *arf2*, *arf3* y *arf4* (figura 26).

Se observó que efectivamente no hay expresión de los genes *arf1* y *arf2* para las mutaciones sencillas. Para la doble mutante se observó una disminución del nivel de expresión para el gen *arf1*, algo esperado debido a que la mutación en el gen *arf1* para la cepa doble mutante es una mutación de tipo heterocarionte, siendo la expresión del gen *arf1* en la cepa doble mutante 11000 veces menor respecto a la cepa silvestre. Interesantemente también se observó la alteración del nivel de expresión de los genes *arf* al estar ausente alguno de ellos, por ejemplo; la ausencia del gen *arf1* conduce a una sobreexpresión de los genes *arf2*, *arf3* y *arf4* en 2.1, 3.5 y 2.1 veces respectivamente, en relación a la cepa silvestre; la ausencia del gen *arf2* conduce a una sobreexpresión de los genes *arf1* y *arf3* en 2 y 3.3 veces respectivamente, en relación a la cepa silvestre; la ausencia del gen *arf2* y muy baja expresión del gen *arf1* conduce a una sobreexpresión de los genes *arf3* y *arf4* en 4.5 y 1.7 veces respectivamente, en relación a la cepa silvestre, sugiriendo un entrecruzamiento en la regulación de la expresión de esta familia de genes.



**Figura 26. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *arf* en las cepas mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  de *M. circinelloides*.** Para el caso de la cepa silvestre se observó expresión para los cuatro genes *arf* evaluados; para el caso de la mutante  $\Delta arf1$  no se observó expresión en el gen *arf1*, por lo que se corroboró que el marco de lectura abierto del gen *arf1* fue completamente reemplazado; para el caso de la mutante  $\Delta arf2$  no se observó expresión en el gen *arf2*, por lo que se corroboró que el marco de lectura abierto del gen *arf2* fue completamente reemplazado; y para el caso de la doble mutante  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  se observó expresión en el gen *arf1* y no en el gen *arf2*, por lo que se corroboró que la mutación en el gen *arf1* es una mutación heterocarionte. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

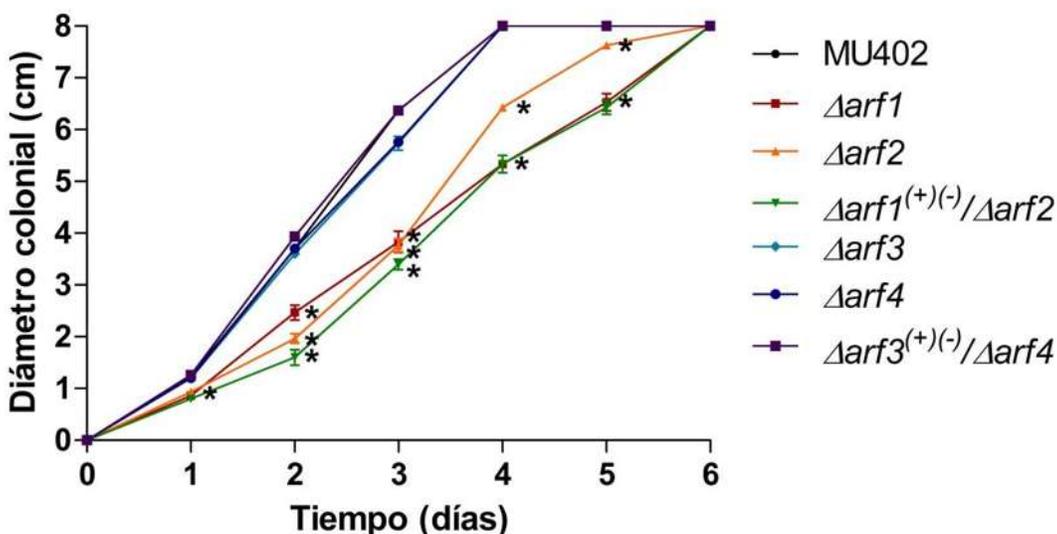
## 7.7 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento de *M. circinelloides*.

Una vez que se obtuvieron las mutantes en los genes *arf1* y *arf2* se prosiguió con su caracterización fenotípica en el contexto de crecimiento y desarrollo. Debido a que el crecimiento y desarrollo de cualquier hongo es dependiente de que componentes de membrana y pared celular sean sintetizados y transportados de forma dirigida, y que las proteínas Arf son reguladores clave en las rutas endocítica y secretora, es de esperar que varios procesos morfológicos se vean afectados al interrumpir genes que los codifican.

Para poner en contexto la función de las proteínas Arf de *M. circinelloides* y como controles adicionales se incluyeron en los análisis las mutantes:  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  (Maldonado-Herrera, 2015) y  $\Delta arf3^{(+/-)}/\Delta arf4$  (Maldonado-Herrera, datos sin publicar)

### 7.7.1 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento aerobio radial de *M. circinelloides*.

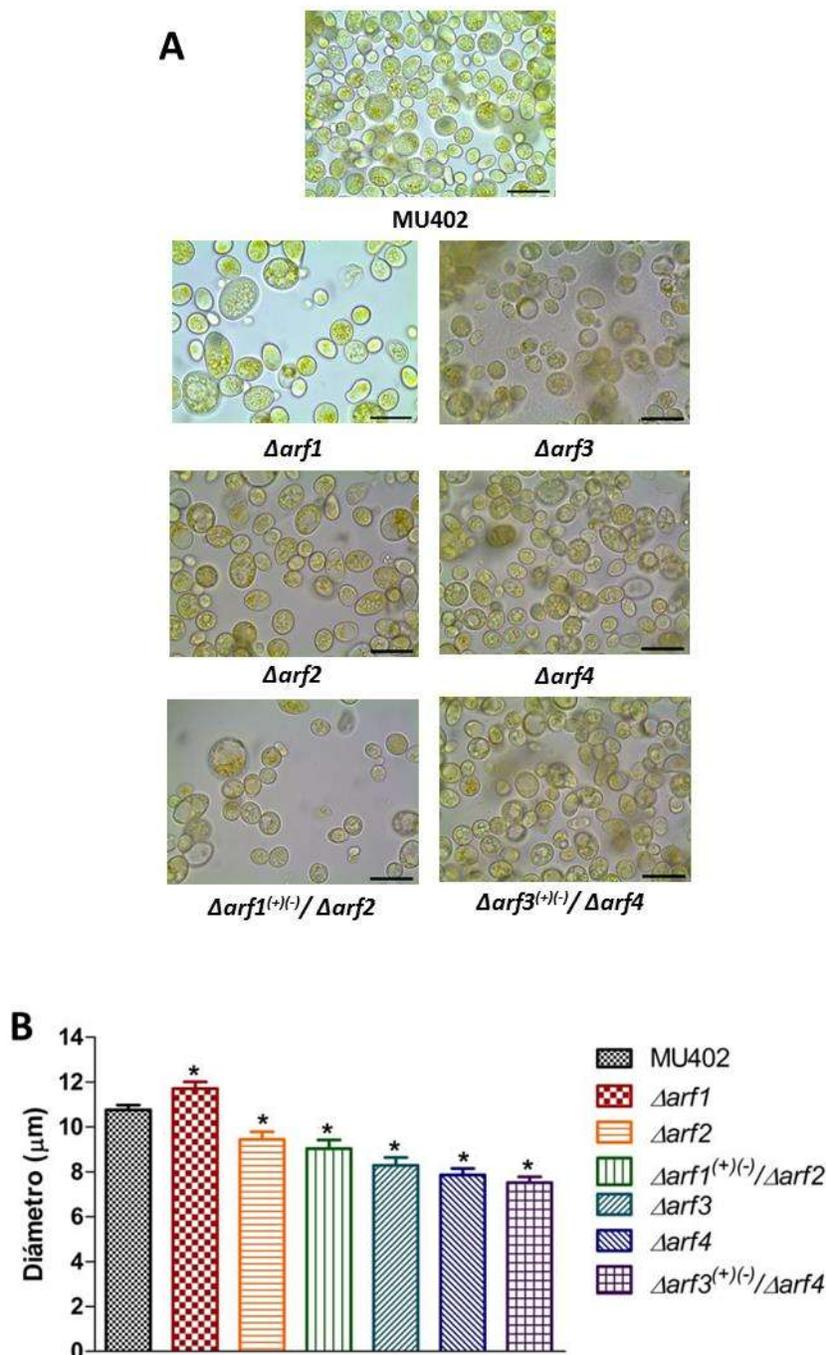
Con la finalidad de demostrar la participación de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento y desarrollo de *M. circinelloides*, se llevó a cabo en primer lugar un ensayo de crecimiento radial para evaluar la capacidad de las mutantes de crecer en medio sólido. Se inocularon en placas de medio YPG sólido 50 esporas por placa, en donde se midió su crecimiento a lo largo de 6 días, registrándose el diámetro de la colonia (cm). Se observó una disminución del 30% en el crecimiento desde las 24 horas en las cepas mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre. Dicho fenómeno se mantuvo a lo largo del experimento, en donde la cepa silvestre cubrió la totalidad de la placa al cuarto día, mientras que las cepas  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  lo hicieron hasta el sexto día. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+/-)}/\Delta arf4$  se comportó como la cepa silvestre (figura 27).



**Figura 27. Efecto de las mutaciones en los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento en medio sólido.** En medio YPG sólido se inocularon 50 esporas por placa y se incubaron seis días a 28°C, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05.

### 7.7.2 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología de las esporas de *M. circinelloides*.

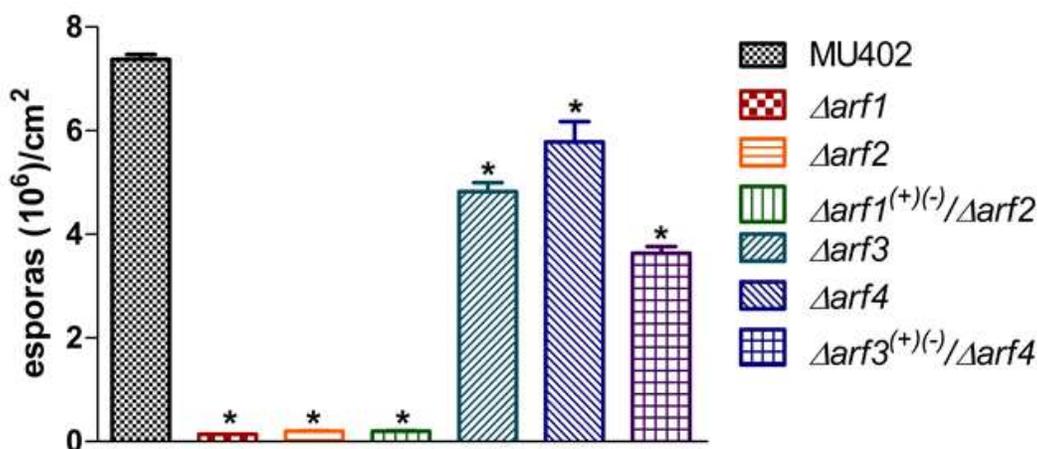
Se ha reportado en *M. circinelloides* como un factor de virulencia el tamaño de las esporas, en donde esporas más grandes germinan más rápido y son más virulentas respecto a esporas más pequeñas que germinan más lento. Por lo que se midió el tamaño de las esporas de las mutantes en los genes *arf1* y *arf2* respecto a la cepa silvestre (figura 28A). Se observó un incremento de tamaño de espора en la cepa mutante  $\Delta arf1$  respecto a la cepa silvestre de un 9%, mientras que se observó un decremento de tamaño de esporas en las cepas mutantes  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  de un 12% y 16% respectivamente en comparación con la cepa silvestre (figura 28B); por otra parte las cepas mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  y  $\Delta arf3^{(+/-)}/\Delta arf4$  presentaron tamaño de espора menor a la cepa silvestre en un 23%, 27% y 30% respectivamente.



**Figura 28. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en el tamaño de espora.** Se cuantificó el diámetro de espora con el software Leica Application Suite. **(A)** Se muestran fotografías representativas de las esporas de las diferentes mutantes con los objetivos 40x y 100x; barras de 40 y 20  $\mu\text{m}$  **(B)** Se cuantificó el diámetro de las esporas de las diferentes cepas,  $n=100$ , las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher,  $*p<0.05$ .

### 7.7.3 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la producción de esporas de *M. circinelloides*.

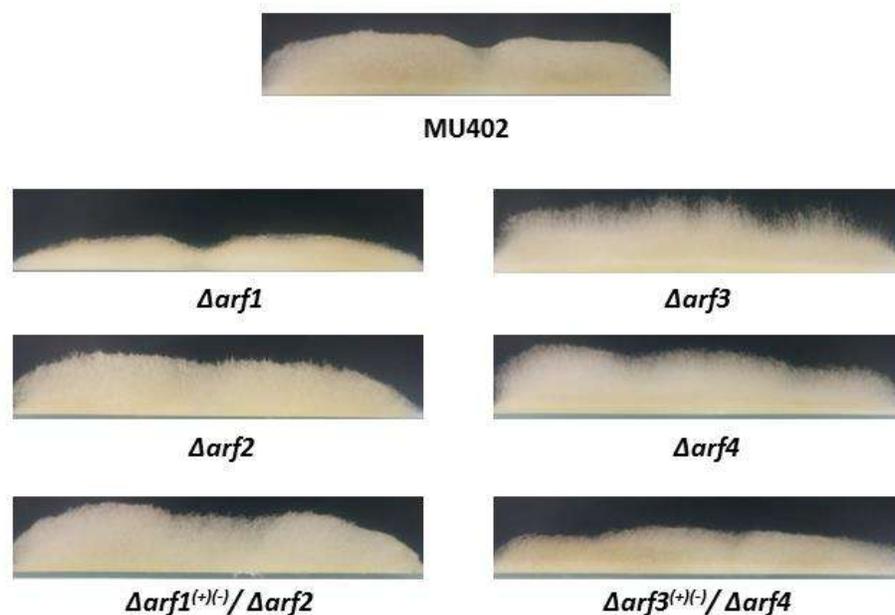
Un proceso derivado de la capacidad de crecer en medio sólido es la producción de esporas, siendo un proceso fundamental para la dispersión de hongos, por lo que se evaluó la producción de esporas de las mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre. Se inocularon 50 esporas en medio YPG sólido en presencia de luz durante 6 días, las esporas fueron cosechadas y contadas. Se observó una disminución dramática en la producción de esporas de un 98% en las mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  presentó una disminución en la producción de esporas del 51% respecto a la cepa silvestre (figura 29).



**Figura 29. Efecto de las mutaciones en los genes *arf1* y *arf2* en la producción de esporas.** En medio YPG sólido se inocularon 50 esporas por placa y se incubaron seis días a 28°C en presencia de luz, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05.

#### 7.7.4 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología macroscópica del esporangióforo de *M. circinelloides*.

Debido a la observación de una dramática disminución en la generación de esporas por parte de las cepas  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$ , se analizó la estructura del esporangióforo, en donde se forma el esporangio que contiene las esporas. Se observó que la mutante  $\Delta arf1$  presentó un tamaño reducido del esporangióforo respecto a la cepa silvestre, mientras que las mutantes  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  no muestran diferencias respecto a la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+/-)}/\Delta arf4$  también mostró un tamaño reducido del esporangióforo respecto a la cepa silvestre (figura 30).



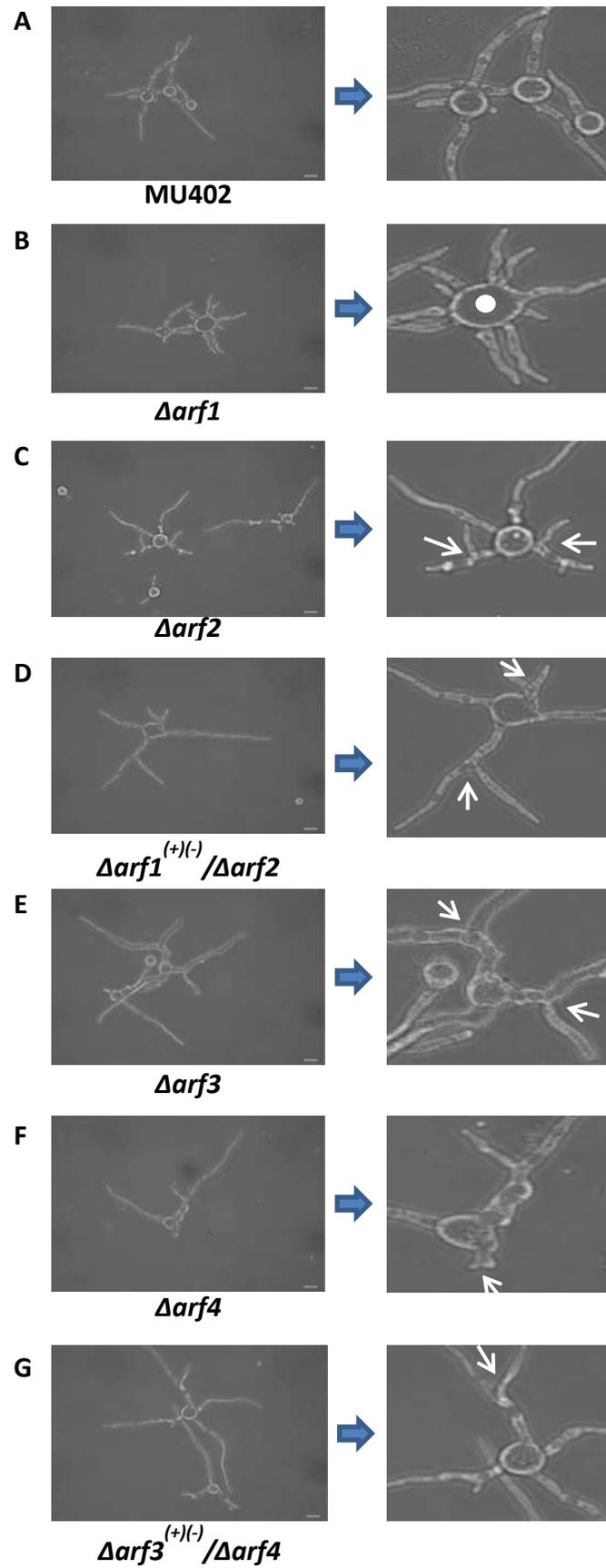
**Figura 30. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología del esporangióforo.** En un portaobjeto cubierto de medio sólido YPG se inocularon 50 esporas de las diferentes cepas en dos puntos equidistantes. Se muestran fotografías representativas del día tres de crecimiento, n=4.

### **7.7.5 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología celular durante el crecimiento aerobio de *M. circinelloides*.**

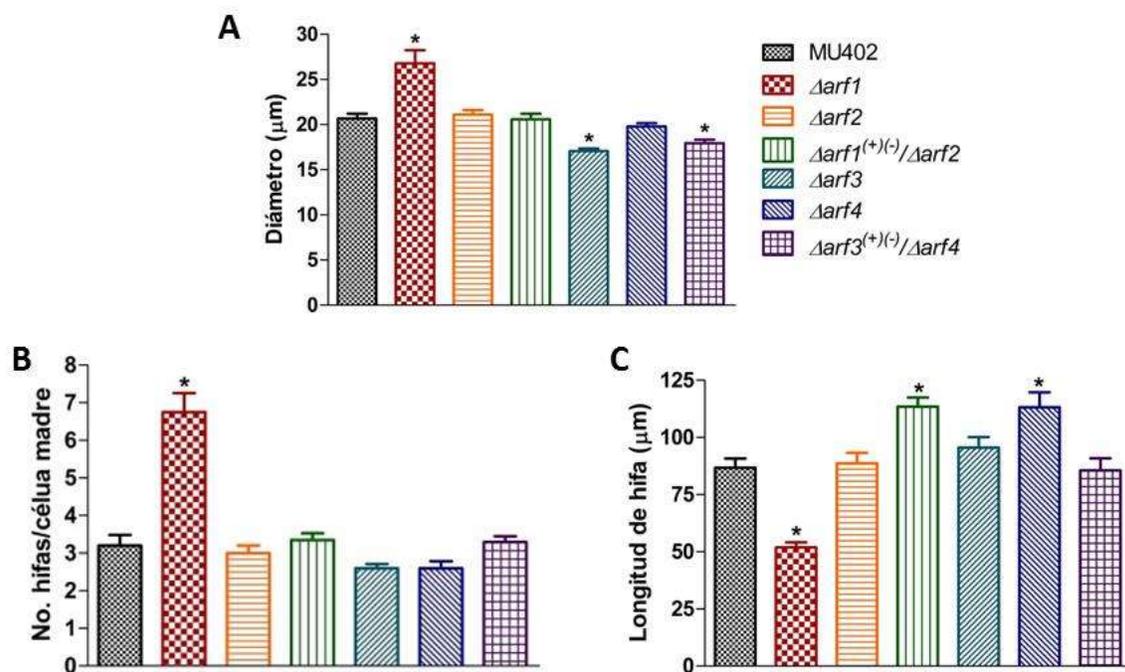
Debido a la participación fundamental del tráfico vesicular en el crecimiento y diferenciación de las células eucariotas se evaluó la morfología micelial (figura 31). Se observó que la cepa silvestre presentó una forma específica y esférica de la célula madre y la presencia de 2 a 3 hifas por célula madre, mientras que la mutante  $\Delta arf1$  presentó un aumento en el tamaño de la célula madre así como la presencia de 6-8 hifas por célula madre (hiperfilamentación) las cuales parecen ser de menor longitud respecto a la cepa silvestre. Para el caso de las mutantes  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  se observó la formación de dicotomías en la punta de las hifas (bifurcación) respecto a la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  también generó dicotomías en la punta de las hifas.

### **7.7.6 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la filamentación, el tamaño de célula madre y la longitud de la hifa durante el crecimiento aerobio de *M. circinelloides*.**

De las observaciones del apartado anterior se cuantificó el número de hifas por célula madre, el tamaño de célula madre (diámetro) y la longitud de la hifa. Se observó que la cepa silvestre generó una célula madre definida y esférica así como la presencia de 2 a 3 hifas por célula madre; para el caso de la mutante  $\Delta arf1$  se observó un aumento en el tamaño de la célula madre del 30% respecto a la cepa silvestre, la generación de 6-8 hifas que representa un aumento de 50% en el número de hifas por célula madre las cuales son más cortas en 50% respecto a la cepa silvestre; para el caso de  $\Delta arf2$  no se observaron diferencias significativas en los tres contextos respecto a la cepa silvestre, mientras que para la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  se observó un aumento del 30% en la longitud de las hifas; en las cepas mutantes  $\Delta arf3$  y  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  se observó un decremento del tamaño de célula madre de un 15% y un incremento en la longitud de la hifa del 25% de la mutante  $\Delta arf4$  en relación a la cepa silvestre (Figura 32).



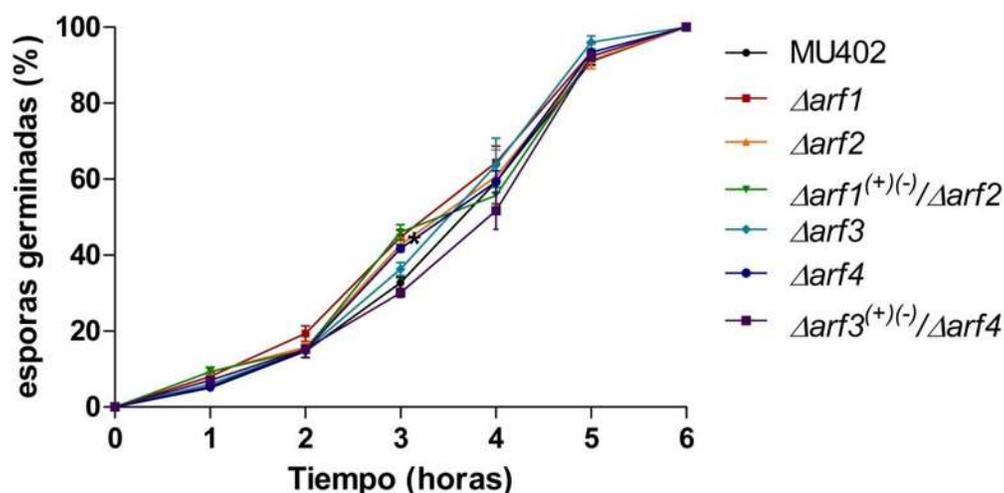
**Figura 31. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* sobre la morfología micelial.** Se muestran fotografías representativas de la morfología del crecimiento aerobio a la hora 6 de germinación. (Fotografía original al lado izquierdo y un acercamiento al lado derecho). Barra de longitud 20  $\mu\text{m}$ . **(A)** Se observó la forma definida y esférica de la célula madre de donde emergen 2-3 hifas de un tamaño específico. **(B)** Se observó un aumento de tamaño en la célula madre (punto blanco) así como la formación de 6-8 hifas de tamaño más corto respecto a la cepa silvestre. **(C, D, E, F, G)** Se observó la formación de bifurcaciones en la punta de las hifas (dicotomía) señaladas con flechas.



**Figura 32. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la filamentación, el tamaño de célula madre y la longitud de la hifa.** Del ensayo de germinación aerobia se midió el número de hifas por célula madre, el tamaño de la célula madre y la longitud de la hifa con el software Q-capture PRO7. **(A)** Se determinó el número de hifas por célula madre **(B)** Se determinó el tamaño de la célula madre expresado como diámetro **(C)** Se determinó la longitud de las hifas; n=100, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05.

### 7.7.7 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la velocidad de germinación durante el crecimiento aerobio de *M. circinelloides*.

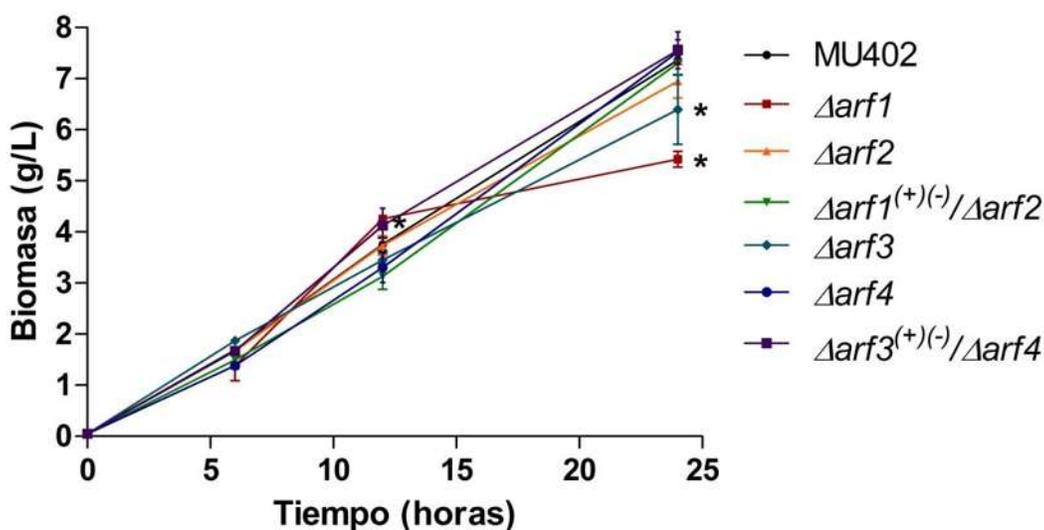
Debido a que la velocidad de germinación está asociada a una mayor capacidad virulenta por la incapacidad del huésped de neutralizar el efecto del hongo (invasividad, secreción de enzimas hidrolíticas o toxinas) al colonizar velozmente, se realizó un ensayo de velocidad de germinación, en donde la germinación es el momento en que existe la emergencia de la hifa, sin importar el número de hifas o su longitud. Los resultados mostraron que a la hora tres hay diferencia significativa en la velocidad de germinación de las cepas mutantes  $\Delta arf1$ ,  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  se comportó similar a la cepa silvestre (Figura 33).



**Figura 33. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la velocidad de germinación en el crecimiento aerobio.** En medio YPG líquido se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/mL de medio y se incubaron seis horas a  $28^\circ\text{C}$  y 150 rpm,  $n=3$ , las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher,  $p < 0.05$

### 7.7.8 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la generación de biomasa durante el crecimiento aerobio de *M. circinelloides*.

La capacidad de generar biomasa por parte de un patógeno en una medida asociada a la capacidad invasiva, por ello se realizó una cinética de crecimiento expresada en gramos de biomasa en peso seco por litro de medio de cultivo. Se observó que la cepa silvestre produce más de 7 g/L de biomasa, mientras que la mutante  $\Delta arf1$  presentó una disminución del 30% respecto a la cepa silvestre, las cepas mutantes  $\Delta arf2$  y  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  se comportaron como la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  se comportó como la cepa silvestre (figura 34).



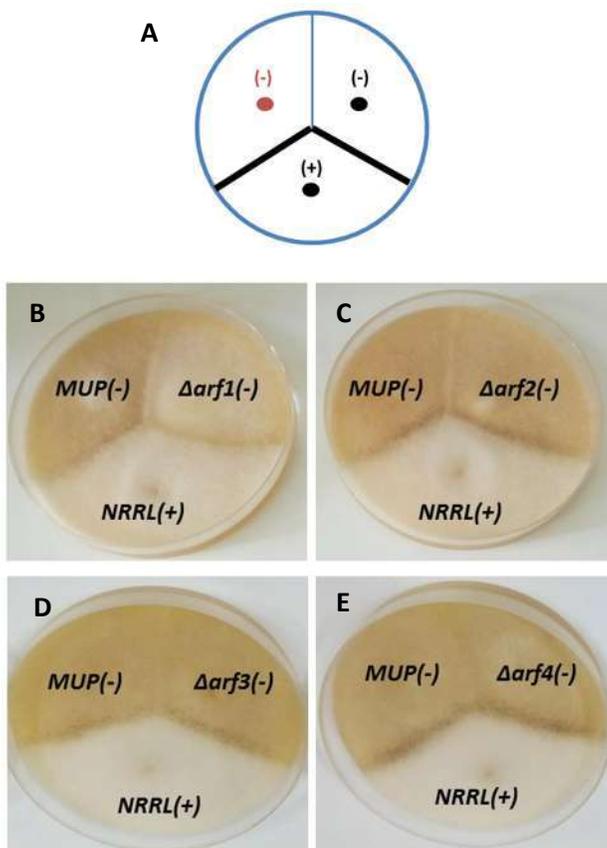
**Figura 34. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en generación de biomasa en el crecimiento aerobio.** En medio YPG líquido se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/mL de medio y se incubaron 6, 12 y 24 horas a 28°C y 150 rpm, para posteriormente recuperar la biomasa, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05

### **7.7.9 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la reproducción sexual de *M. circinelloides*.**

Debido a que la reproducción sexual es un fenómeno regulado espacio-temporalmente y que el reconocimiento de los tipos sexuales (+) y (-) es mediado por la percepción de la hormona ácido tripórico por un receptor, fue de interés evaluar si las proteínas Arf1 y Arf2 participan en el control de la ruta reguladora del receptor de la reproducción sexual. En medio YPD solido se inoculó micelio de forma equidistante (cepa NRRL3631 (+), como control positivo la cepa MU402 (-) y las mutantes a evaluar de tipo (-) derivadas de MU402) y se incubaron 20 días en oscuridad. La formación de zigosporas se aprecia en el borde del micelio de la cepa de tipo sexual (+) con las de tipo sexual (-). Se observó que las cepas  $\Delta arf2$ ,  $\Delta arf3$  y  $\Delta arf4$  generan zigosporas de forma muy similar a la cepa silvestre mientras que la mutante  $\Delta arf1$  es una cepa estéril al generar pocas zigosporas (figura 34).

### **7.7.10 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología celular durante el crecimiento anaerobio de *M. circinelloides*.**

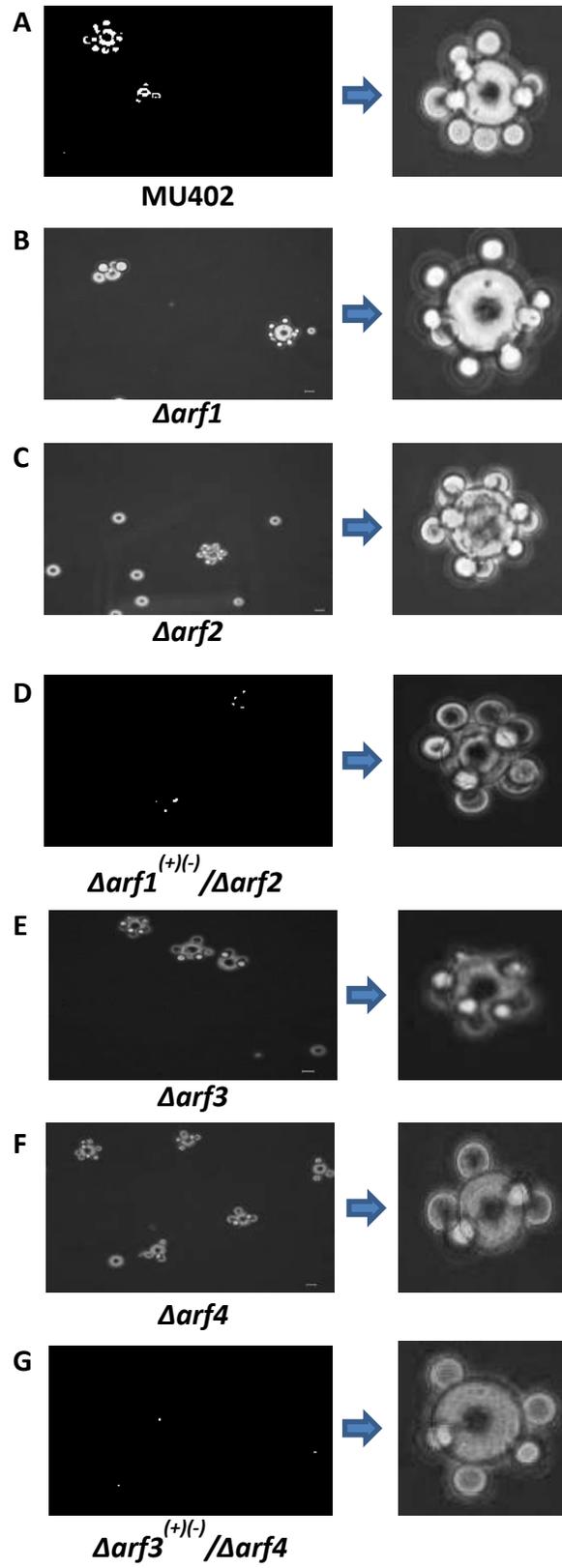
Debido a que *M. circinelloides* es un hongo dimórfico, se evaluó también el crecimiento en anaerobiosis. Primeramente se analizó la morfología levaduriforme, en donde no se observaron diferencias en las mutantes  $\Delta arf1$  y la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre, no siendo así para la mutante  $\Delta arf2$  en donde solo el 15% de las esporas son capaces de desarrollar la morfología de levadura, el resto solo sufren el proceso de hinchamiento característico antes de germinar. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  se comportaron como lo reportó Maldonado-Herrera; mientras que la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  se comportó como la cepa silvestre (figura 35).



**Figura 35. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* durante la reproducción sexual.** En medio YPD solido se inoculó micelio de las cepas de tipo sexual (-): MUP y  $\Delta arf$ , y la cepa de tipo sexual (+): NRRL3631, se incubaron 20 días a 26°C en ausencia de luz, n=4. Interacción sexual de la cepa: (A) Esquema representativo de la inoculación de micelio de los dos tipos sexuales, en donde la línea negra representa el área de formación de zigosporas. (B)  $\Delta arf1$  (C)  $\Delta arf2$  (D)  $\Delta arf3$  (E)  $\Delta arf4$ . Se muestran una imágenes representativas.

#### 7.7.11 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la velocidad de germinación durante el crecimiento anaerobio de *M. circinelloides*.

De las observaciones del apartado anterior se cuantifico la velocidad de germinación en crecimiento anaeróbico. Se observó que las mutantes evaluadas presentan una germinación acelerada (15%) respecto a la cepa silvestre, no siendo el caso de la cepa mutante  $\Delta arf2$ , la cual estanca el proceso de germinación en un 15% respecto a la cepa silvestre (figura 36).



**Figura 36. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la morfología en el crecimiento anaerobio.** Se muestran fotografías representativas de la morfología del crecimiento anaerobio a la hora 6 de germinación. (Fotografía original al lado izquierdo y un acercamiento al lado derecho). Barra de longitud 20  $\mu\text{m}$ . **(A)** Se observa la forma definida y esférica de la célula madre de donde emergen gemas. **(C)** Se observa una espora germinada en levadura así como esporas solamente hinchadas, incapaces de desarrollar la morfología levaduriforme. **(B, D, E, F, G)** Se observa la forma definida y esférica de la célula madre de donde emergen gemas.

#### **7.7.12 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la generación de biomasa durante el crecimiento anaerobio de *M. circinelloides*.**

La capacidad de generar biomasa por parte de un patógeno es una medida asociada a la capacidad invasiva. Aunque se sabe que la forma invasiva de *M. circinelloides* es el micelio fue de interés corroborar la generación de biomasa en crecimiento anaerobio expresado en gramos de biomasa en peso seco por litro de medio de cultivo. Se observó que la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  es la única cepa mutante que presentó diferencias significativas en la producción de biomasa respecto a la cepa silvestre, la cual genera un 25% más de biomasa (figura 37).

#### **7.7.13 Complementación de las cepas mutantes $\Delta arf1$ y $\Delta arf2$ con los genes silvestres y con los genes mutantes que codifican las proteínas constitutivamente activas.**

Con el objetivo de asociar la función de los genes *arf1* y *arf2* en los efectos morfológicos observados en las mutantes  $\Delta arf1$  y  $\Delta arf2$  se decidió complementar dichas mutantes con el gen silvestre y con el gen que codifica la proteína constitutivamente activa. Debido a que las proteínas Arf son reguladas en espacio-tiempo, es decir, es necesario que sufran un proceso de activación, se optó por generar una proteína incapaz de hidrolizar el GTP a GDP una vez unido GTP, esto mediante mutación sitio dirigida (materiales y métodos) al cambiar dos nucleótidos dentro del codón que codifica la glutamina 71 para codificar leucina dentro del

motivo G<sub>3</sub> (Q71L) (**Dascher y Balch., 1995**), tanto para la proteína Arf1 como la proteína Arf2.

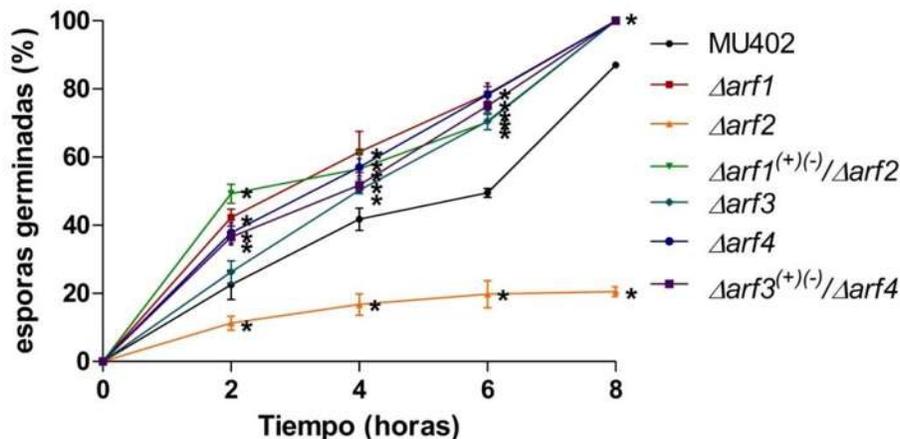
Una vez obtenidos los fragmentos correspondientes al gen silvestre y al gen mutante para cada caso, se clonaron en el vector pEUKA4 (figura 39), el cual contiene el gen *leuA* que restaura la auxotrofia a leucina y contiene un promotor inducible por glucosa (**Wolff y Arnau, 2001**). Posteriormente de clonados dichos fragmentos, se secuenciaron para corroborar la mutación puntual en el caso de los genes mutantes y la no alteración de la secuencia del ORF en el caso de los genes silvestres (figura 40).

Corroborado lo anterior las mutantes  $\Delta arf1$  y  $\Delta arf2$  se transformaron para complementar con los plásmidos correspondientes a cada cepa mutante. Durante el proceso de obtención de mutantes complementadas no fue posible la generación de mutantes  $\Delta arf1$  complementadas debido a que los protoplastos de dichas mutantes no superaron el proceso de electroporación (tres intentos independientes).

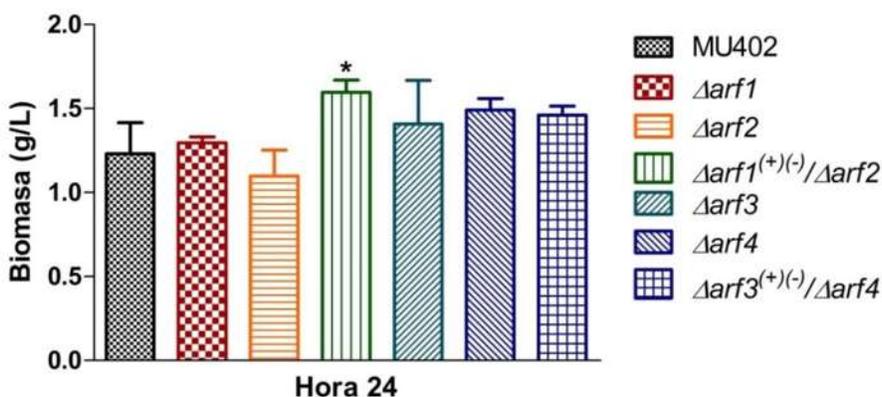
Para el caso de las mutantes  $\Delta arf2$  complementadas con el gen silvestre y con el gen que codifica la proteína constitutivamente activa, se analizó la morfología levaduriforme y la velocidad de germinación. Se observó que la proteína silvestre y la proteína constitutivamente activa restauran el fenotipo silvestre (figuras 41 y 42).

Debido a que no se observaron diferencias en cuanto a la biomasa generada por la mutante  $\Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre, aun cuando esta no genera levaduras, se analizó un marcador molecular de la morfología levaduriforme: el gen *adh1* involucrado en la ruta fermentativa, así como el gen *arf2* de control positivo. A levaduras de 24 horas se les hizo extracción de ARN total y se evaluó el nivel de transcrito del gen *adh1* (se usó la sonda reportada por Valle-Maldonado y col., 2015). Se observó que el nivel de transcrito del gen *arf2* se aprecia claramente en la cepa silvestre como en las mutantes complementadas en un nivel similar, no siendo así para mutante  $\Delta arf2$  ya corroborado anteriormente (figura 43A).

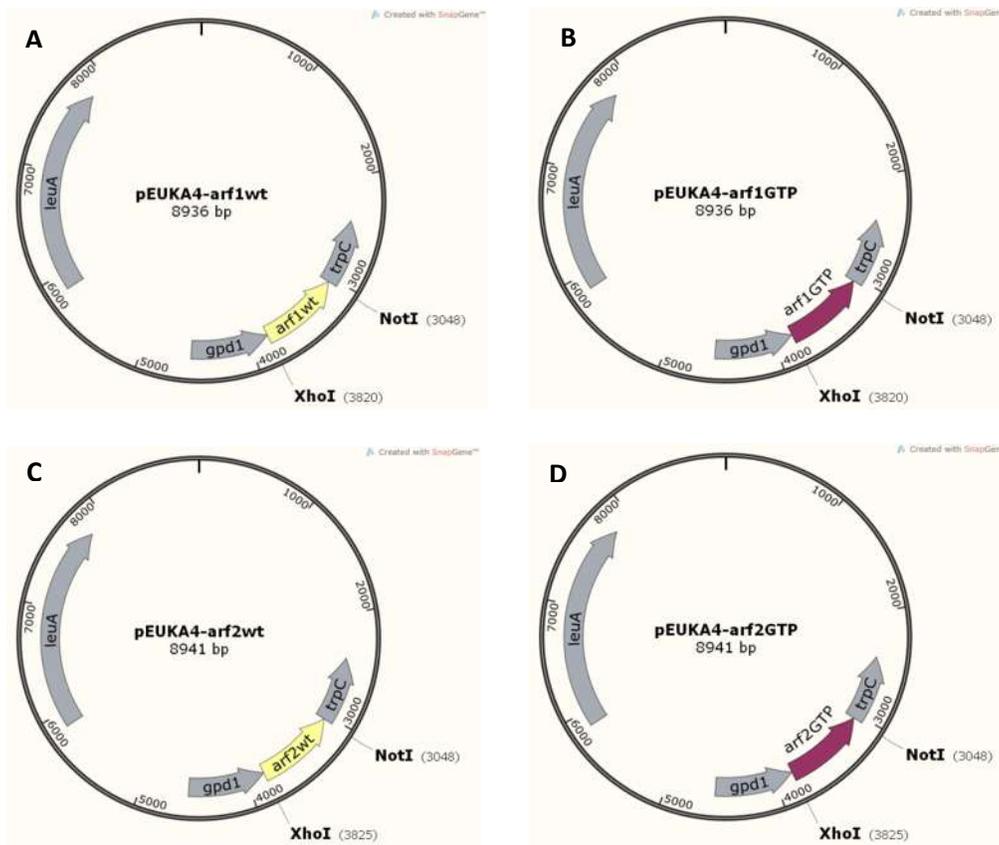
También se observó que el nivel de transcrito del gen *adh1* en la mutante  $\Delta arf2$  está claramente disminuido respecto a la cepa silvestre y a las cepas complementadas (figura 43B).



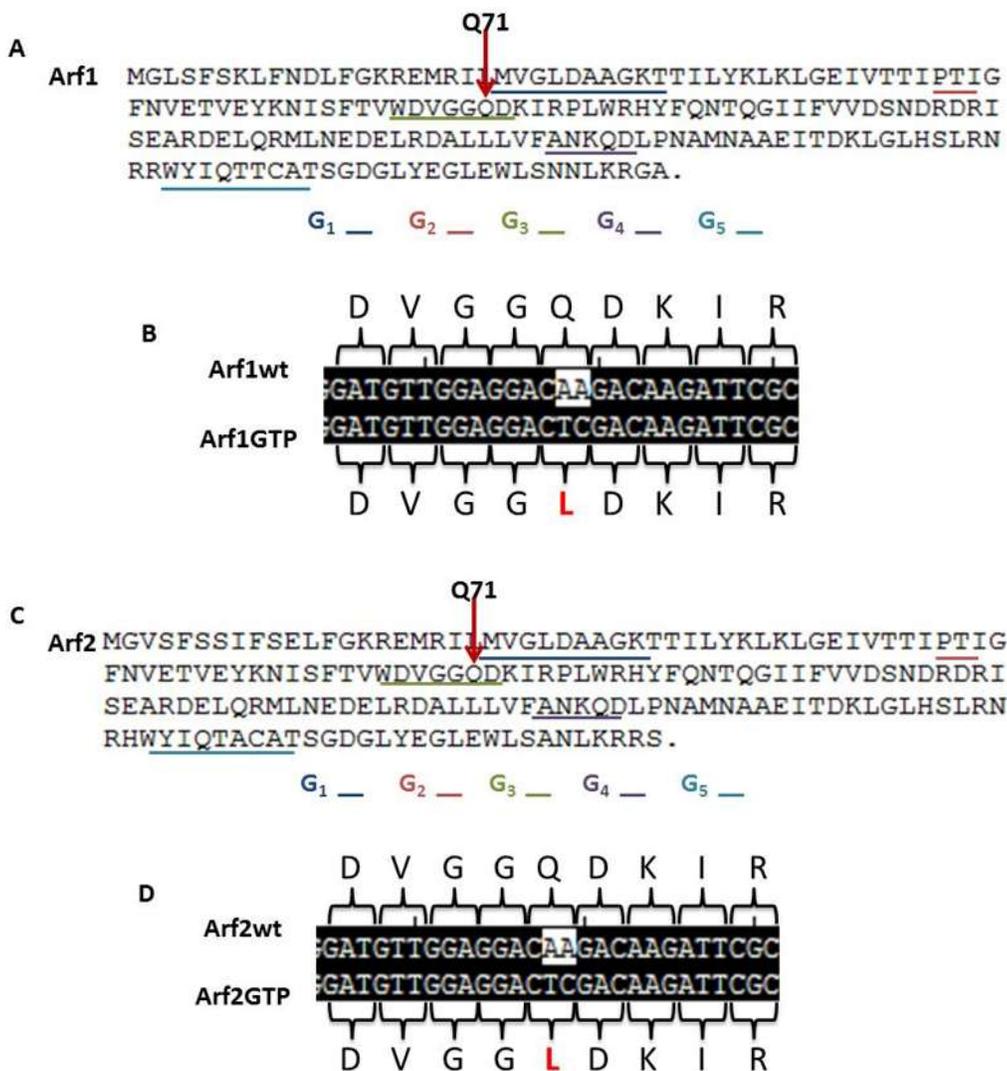
**Figura 37. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la velocidad de germinación en el crecimiento anaerobio.** En medio YPG líquido se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/mL de medio y se incubaron ocho horas a 28°C en ausencia de oxígeno, n=4, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05.



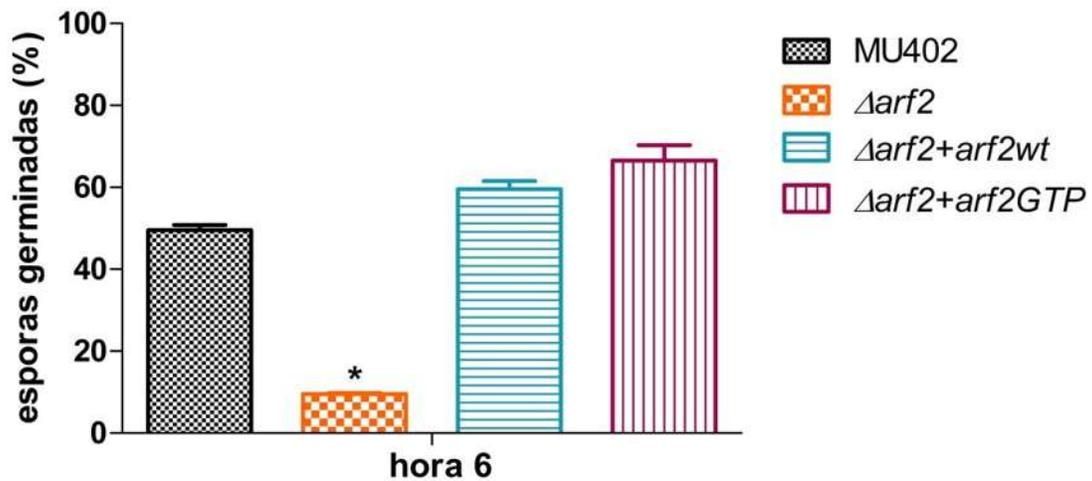
**Figura 38. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la generación de biomasa en el crecimiento anaerobio.** En medio YPG líquido se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/mL de medio y se incubaron 24 horas a 28°C en ausencia de oxígeno para recuperar la biomasa, n=4, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, p<0.05.



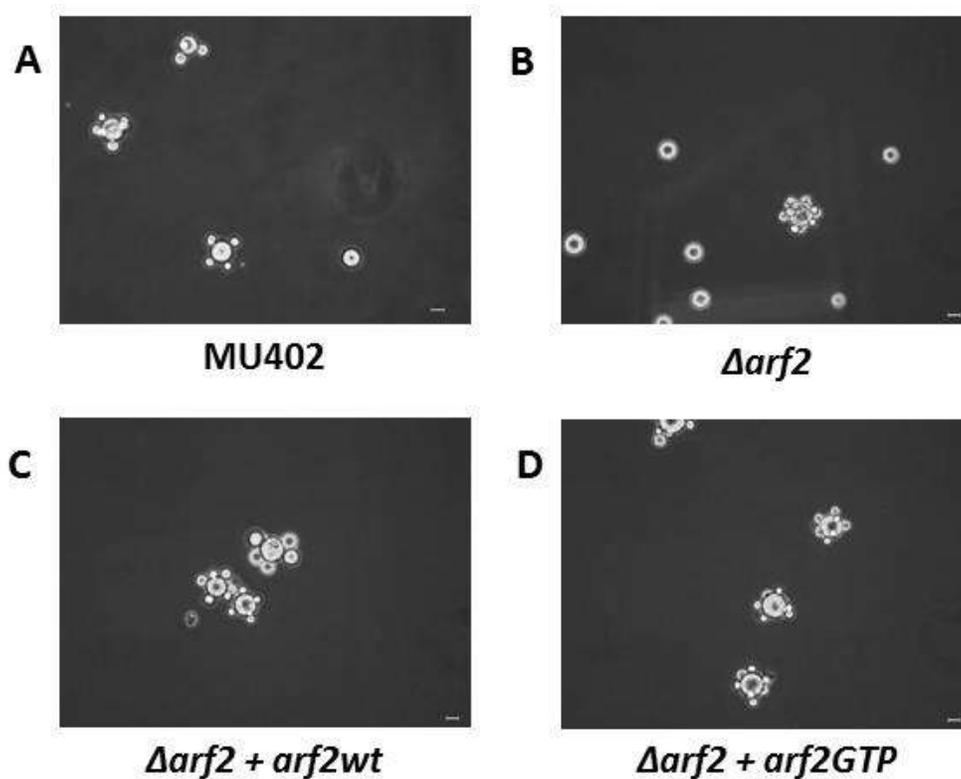
**Figura 39. Representación esquemática del mapa del plásmido pEUKA4 que contiene los genes *arf1* y *arf2* silvestres y los genes mutantes que codifican las proteínas constitutivamente activas.** Los fragmentos correspondientes al gen silvestre y al gen recombinante para *arf1* y *arf2* obtenidos mediante PCR, se clonaron en el vector pEUKA4. **(A)** Se muestra el esquema del plásmido pEUKA4-*arf1*wt, el cual codifica la proteína silvestre Arf1 **(B)** Se muestra el esquema del plásmido pEUKA4-*arf1*GTP, el cual codifica la proteína constitutivamente activa Arf1. **(A)** Se muestra el esquema del plásmido pEUKA4-*arf2*wt, el cual codifica la proteína silvestre Arf2 **(B)** Se muestra el esquema del plásmido pEUKA4-*arf2*GTP, el cual codifica la proteína constitutivamente activa Arf2.



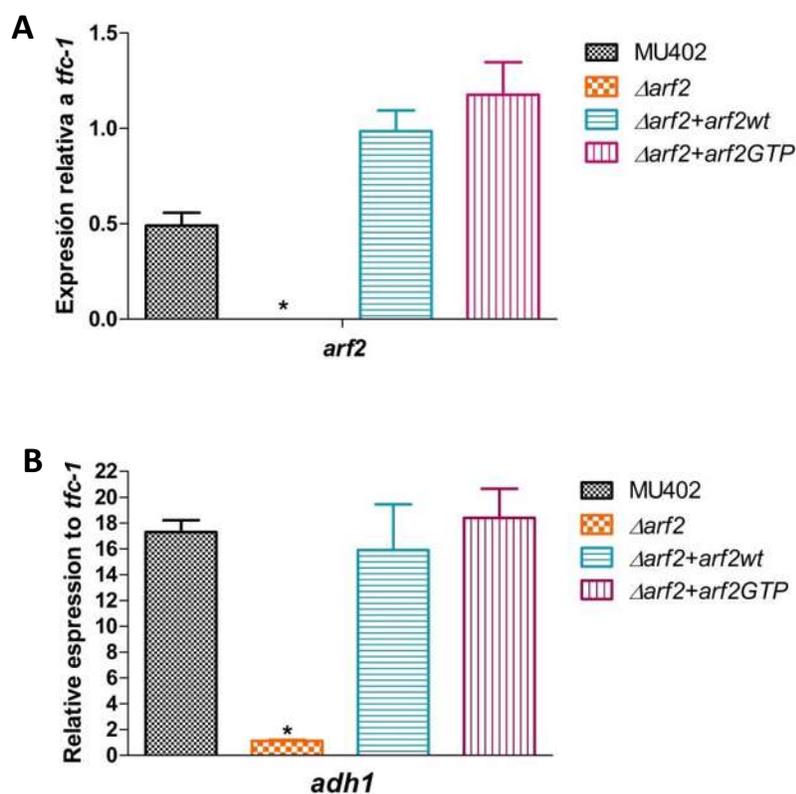
**Figura 40. Corroboración mediante secuenciación de la integridad de los genes silvestres *arf1* y *arf2* y los genes mutantes que codifican las proteínas constitutivamente activas. (A, C) Se muestra la secuencia primaria de las proteínas Arf1 y Arf2 así como los dominios de unión a nucleótidos de guanina conocidos como cajas G y se señala con flecha roja la glutamina 71 la cual fue el sitio de mutación para generar la proteína incapaz de hidrolizar GTP. (B, D) Se muestra el contexto nucleotídico del codón que codifica la glutamina 71 en un alineamiento de pb de la secuencia producto de secuenciación de los genes silvestres *arf1* y *arf2* y los genes mutantes, donde se aprecia el cambio de dos nucleótidos para el caso de cada gen mutante para codificar leucina.**



**Figura 41. Efecto de la complementación del gen *arf2* silvestre y mutante en la cepa  $\Delta arf2$  en la velocidad de germinación en crecimiento anaerobio.** En medio YPG líquido se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/mL de medio y se incubaron seis horas a 28°C en ausencia de oxígeno, n=4, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, \*p<0.05.



**Figura 42. Morfología levaduriforme de la mutante  $\Delta arf2$  complementada con el gen  $arf2$  silvestre y con el gen mutante que codifica la proteína constitutivamente activa.** Se muestran fotografías representativas de la morfología del crecimiento anaerobio a la hora 6 de germinación. Barra de longitud 20  $\mu\text{m}$ . **(A)** Se observa la forma definida y esférica de la célula madre de donde emergen gemas. **(B)** Se observa una espora germinada en levadura así como esporas solamente hinchadas, incapaces de desarrollar la morfología levaduriforme. **(C, D)** Se observa que las esporas son capaces de desarrollar la morfología de levadura restaurándose el fenotipo silvestre.



**Figura 43. Análisis del nivel de transcrito del gen  $adh1$  en la cepa mutante  $\Delta arf2$  y en las cepas mutantes  $\Delta arf2$  complementadas.** Se analizó el nivel transcrito del gen **(A)**  $arf2$  y el gen **(B)**  $adh1$  en levaduras de la mutante  $\Delta arf2$ , las mutantes  $\Delta arf2$  complementadas y la cepa silvestre a las 24 horas de germinación,  $n=3$ , las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher,  $*p<0.05$ .

## **7.8 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la virulencia de *M. circinelloides*.**

El crecimiento (extensión de la hifa y el desarrollo de la gema) como los cambios morfológicos (transición micelio-levadura, levadura-micelio) y el transporte de componentes de membrana y pared celular o la secreción (enzimas hidrolíticas, toxinas, sideróforos) esta mediado por el tráfico de vesículas. Es por ello el interés de evaluar mutantes en genes reguladores clave del tráfico vesicular y la relación con la virulencia.

### **7.8.1 Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* en la virulencia de *M. circinelloides* en el modelo *M. musculus*.**

Con el objetivo de evaluar la virulencia de las mutantes en los genes *arf1* y *arf2* se infectaron ratones machos de la cepa Balb/c de 10-12 semanas de edad, a los cuales se les trato con una única dosis de estreptozotocina (200 mg/kg), se monitoreo la concentración de glucosa en sangre durante 4 días y se consideraron ratones diabéticos cuando la concentración de glucosa fue mayor a 350 mg/dL, posteriormente se inocularon vía intraperitoneal con  $20 \times 10^6$  esporas de las diferentes cepas. Se usó como control negativo solución salina. Se monitorearon durante 8 días post inoculación y se registró la muerte cada 24 horas. Se observó que la mutante más virulenta es  $\Delta arf1$ , causando la muerte del 75% de la población al tercer día, la mutante  $\Delta arf2$  se comportó como la cepa silvestre con un porcentaje de muerte del 50% al tercer día, el cual se mantuvo así hasta el final del experimento, mientras que la doble  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  mutante es avirulenta (datos no mostrados). Por otra parte la mutante  $\Delta arf3$  es la cepa más virulenta de las cepas mutantes en genes *arf* matando el 100% de la población al tercer día, mientras que la mutante  $\Delta arf4$  mata solo el 25% de la población al segundo día post inoculación (figura 43).

### 7.8.2 Efecto de la mutación de los genes *arf1* y *arf2* en la toxicidad del sobrenadante de *M. circinelloides* en el modelo *C. elegans*.

Debido a que las rutas secretoras son controladas en parte por proteínas Arf se decidió evaluar la toxicidad de los compuestos secretados por las mutantes. Para esto se enfrentó los sobrenadantes libres de células de las diferentes cepas del crecimiento micelial (morfología asociada a virulencia en hongos) contra *C. elegans*. Se colocó 1 mL del sobrenadante de cada cepa en un pozo y se transfirieron de 10-20 nematos por pozo. El experimento se monitoreo durante 48 horas. Se usó como control negativo el medio de crecimiento YPG. Se observó que el sobrenadante de la mutante  $\Delta arf1$  causa un 50% de letalidad al final del experimento, el sobrenadante de la mutante  $\Delta arf2$  un 35% (figura 44). El sobrenadante de la doble mutante  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  presenta un 50% de letalidad al final del experimento (datos no mostrados). Por otra parte la mutante  $\Delta arf3$  es la cepa más virulenta de las cepas mutantes en genes *arf* presentando el 70% de letalidad, mientras que la mutante  $\Delta arf4$  presentó el 35% de letalidad al final del experimento.

Con el objetivo de identificar el carácter químico de los posibles factores de virulencia secretados por las mutantes, se evaluó la posibilidad de que fueran proteínas. Al sobrenadante proveniente de la morfología micelial libre de células se le trato con una proteasa (proteinasas K) y se evaluó el efecto de dicho tratamiento a los sobrenadantes sobre la supervivencia de *C. elegans*. Se observó que el sobrenadante de las mutantes pierden la toxicidad y se comportan similares al sobrenadante de la cepa silvestre (figura 46).

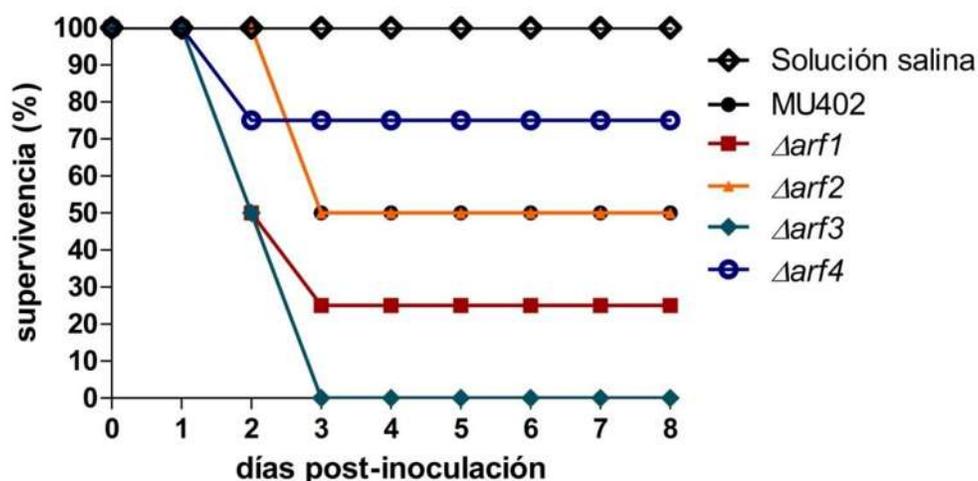


Figura 44. Efecto de las mutaciones de los genes *arf1* y *arf2* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *M. musculus*. Se inocularon vía intraperitoneal  $20 \times 10^6$  esporas de las diferentes cepas en cada ratón diabético macho Balb/c de 10-12 semanas de edad,  $n=6$  para cada grupo; se muestra el promedio de dos ensayos independientes.

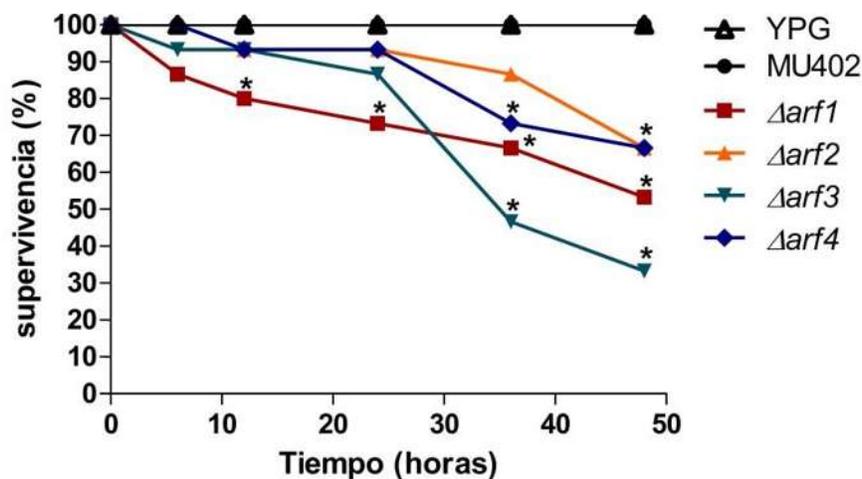


Figura 45. Efecto de la toxicidad en *C. elegans* de los sobrenadantes del crecimiento micelial de las cepas mutantes en los genes *arf1* y *arf2* de *M. circinelloides*. Se enfrentó el sobrenadante libre de células proveniente del crecimiento micelial de 24 horas de las diferentes cepas contra *C. elegans*. Se usó como control negativo medio YPG suplementado con uracilo,  $n=15$  nematodos para cada ensayo; se muestra el promedio de seis ensayos independientes.

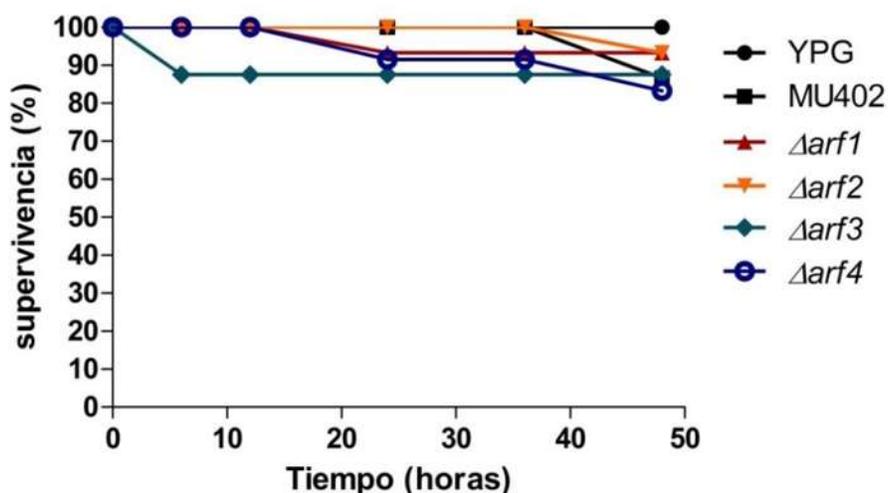


Figura 46. Efecto del tratamiento con proteasa de los sobrenadantes del crecimiento micelial de las cepas mutantes en los genes *arf1* y *arf2* en la toxicidad sobre *C. elegans*. Se enfrentó el sobrenadante del crecimiento micelial de las diferentes mutantes tratado con proteasa contra la supervivencia de *C. elegans*. Se usó como control negativo medio YPG suplementado con uracilo, n=15 nematodos para cada ensayo; se muestra el promedio de tres ensayos independientes.

## VIII. DISCUSIÓN

Se conoce que *M. circinelloides* posee en su genoma cuatro genes que codifican a proteínas Arf (*arf1-arf4*), de los cuales dos de ellos ya fueron evaluados funcionalmente en el contexto dimórfico: *arf3* y *arf4* (**Maldonado-Herrera, 2015**). Por lo que en este trabajo se evaluó funcionalmente la participación de los genes *arf1* y *arf2* en el dimorfismo y virulencia de este mucoral.

Los genes *arf1* y *arf2* presentan una distribución estructura similar, de cuatro exones y tres intrones. El producto de ambos genes codifican a proteínas 96% idénticas entre sí, con 181 aminoácidos para cada caso, peso molecular y punto isoeléctrico muy similar de 20.69 kDa y 20.67 kDa, y 6.15 y 5.95 respectivamente, lo que sugiere la participación de estas proteínas en el mismo contexto celular y funcional. Este fenómeno de similitud entre las proteínas Arf1 y Arf2 ha sido reportado en otros hongos. Los genes *ARF1* y *ARF2* de *S. cerevisiae* (**Stearns y col., 1990**) codifican a proteínas 96% idénticas entre ellas, producto de una duplicación genética, y con un 80% de identidad a las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides*. Los genes *arf1* y *arf2* de *C. albicans* (**Labbaoui y col., 2017**) codifican a proteínas 90% idénticas entre ellas y con un 85% de identidad a las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides*. También se conoce el patrón de expresión de los genes que codifican a proteínas Arf durante el dimorfismo: espora, micelio y levadura (**Maldonado-Herrera, 2015**). Donde el gen *arf1* presenta niveles de transcrito menores al gen *arf2*, sin embargo en los dos casos se observó que la expresión dependiendo del estadio morfológico evaluado es diferente, así, para el gen *arf1* los niveles de transcrito en el estadio micelio son 3.1 veces más respecto al estadio inicial espora y los niveles de transcrito en el estadio levadura son 4.2 veces más respecto al estadio inicial espora; para el gen *arf2* los niveles de transcrito en el estadio micelio son 2.6 veces más respecto al estadio inicial espora y los niveles de transcrito en el estadio levadura son 6.2 veces más respecto al estadio inicial espora. El gen *arf2* es el único de los 4 genes *arf* que presentó un mayor nivel de transcrito en el estadio levaduriforme, con lo cual podría pensarse que el gen *arf2* tiene una participación importante en

dicho estadio. Lo datos anteriores sugieren que la función de los productos de los genes *arf1* y *arf2* participan en el dimorfismo.

Las proteínas Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides* presentan porcentajes de identidad mayores a 85% con proteínas involucradas en la ruta exocítica: Arf1 y Arf3 de humano, ARF1 y ARF2 de *S. cerevisiae*, ArfA de *A. nidulans*, Arf1 y Arf2 de *C. albicans*, entre otros. Lo cual sugiere que Arf1 y Arf2 de *M. circinelloides* participan en la regulación de dicha vía.

Para poder demostrar la participación de los genes *arf1* y *arf2* se generaron las mutantes por delección en dichos genes. Se obtuvo la mutante sencilla  $\Delta arf1$  homocariote, la mutante sencilla  $\Delta arf2$  homocariote, la mutante  $\Delta arf2$  complementada con el gen silvestre *arf2*, la mutante  $\Delta arf2$  complementada con el gen *arf2* mutante que codifica la proteína constitutivamente activa y la doble mutante  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  heterocariote para el gen *arf1*, esta última en varios experimentos de transformación solo se obtuvieron mutantes heterocariotes, lo que sugiere que la doble mutación en los genes *arf1* y *arf2* es letal, algo similar como lo que sucede en *S. cerevisiae* para los mismos genes (**Stearns y col., 1990**), *arfA* de *A. nidulans* (**Lee y col., 2008b**) y *arf2* de *C. albicans* (**Labbaoui y col., 2017**). *M. circinelloides* es un hongo multinucleado, y esto ofrece 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 *mcm5* el cual también generó una mutante heterocariote cuyo fenotipo mostró alteraciones en el crecimiento micelial y en la producción de esporas (**Trieu y col., 2017**).

Del primer proceso evaluado que fue la morfología y producción de esporas se observó que las mutantes en los genes *arf1* y *arf2* aumentaron el tamaño de espora respecto a la cepa silvestre en un 9% para la mutante  $\Delta arf1$ , mientras que en las mutantes  $\Delta arf2$  y doble mutante  $\Delta arf1^{(+/-)}/\Delta arf2$  se observó un decremento de tamaño de espora del 12% y 16% respectivamente; para la producción de esporas se observó una dramática disminución en la generación de las mismas siendo la producción un 98% menos que la cepa silvestre. Las mutantes  $\Delta arf3$ ,

$\Deltaarf4$  y  $\Deltaarf3^{(+)(-)}/\Deltaarf4$  presentaron tamaño de espora menor respecto a la cepa silvestre en un 23%, 27% y 30% en comparación a la cepa silvestre, mientras que la producción de esporas se redujo en la mutante  $\Deltaarf3$  en un 35%, en la mutante  $\Deltaarf4$  un 22% y en la doble mutante  $\Deltaarf3^{(+)(-)}/\Deltaarf4$  un 51%. Así, las proteínas Arf1, Arf2, Arf3 y Arf4, regulan el tamaño de espora, las proteínas Arf1 y Arf2 regulan la producción de las mismas de manera crucial y redundante, mientras que las proteínas Arf3 y Arf4 lo hacen de forma parcial y redundante.

Respecto al crecimiento en sustrato sólido se observó un retraso del 30% en el crecimiento radial de las mutantes  $\Deltaarf1$ ,  $\Deltaarf2$  y la doble mutante  $\Deltaarf1^{(+)(-)}/\Deltaarf2$  respecto a la cepa silvestre. Un fenotipo similar se observó también en la mutante  $mcm5^{(+)(-)}$ , la cual presenta crecimiento radial disminuido y baja producción de esporas (Trieu y col., 2017). El gen  $mcm5$  codifica para una miosina de clase V, la cual participan en el direccionamiento vesicular acarreado vesículas a los diferentes organelos a través de los filamentos de actina (Trybus, 2009); las mutantes  $\Deltaarf3$ ,  $\Deltaarf4$  y  $\Deltaarf3^{(+)(-)}/\Deltaarf4$  no presentaron diferencias en el crecimiento en sustrato sólido respecto a la cepa silvestre. Por lo que, las proteínas Arf1 y Arf2 son necesarias para el adecuado crecimiento en medio sólido.

Posteriormente se evaluó la morfología del esporangióforo, en donde se observó que la mutante  $\Deltaarf1$  presentó un acortamiento importante de dicha estructura respecto a la cepa silvestre, mientras que la mutante  $\Deltaarf2$  y la doble mutante  $\Deltaarf1^{(+)(-)}/\Deltaarf2$  presentaron morfologías similares a la cepa silvestre; las mutantes  $\Deltaarf3$  y  $\Deltaarf4$  no presentaron diferencias en el desarrollo del esporangióforo mientras que la doble mutante  $\Deltaarf3^{(+)(-)}/\Deltaarf4$  también presentó un decremento en el tamaño de dicha estructura aérea. De tal manera que la proteína Arf1 y las proteínas Arf3 y Arf4 en conjunto regulan el desarrollo del esporangióforo.

La producción de esporas es un proceso derivado de la formación de micelio en sustrato sólido y el desarrollo de estructuras aéreas. Si existe una alteración en dichas estructuras o en la capacidad de crecer en sustrato sólido, probablemente dichos fenotipos se relacionen con una producción de esporas disminuida.

Para el caso de la morfología en crecimiento líquido en aerobiosis, la mutante  $\Delta arf1$  mostró una marcada alteración, algo que no se observó en las demás mutantes en genes *arf* de *M. circinelloides*, en donde dicha mutante aumentó el tamaño de la célula madre en 30% respecto a la cepa silvestre, además de presentar hiperfilamentación con un 50% más hifas que la cepa silvestre, las cuales son 50% más cortas, fenómeno similar observado en la mutante en el gen *arfA* de *A. nidulans* (Lee y col., 2008b). Para el caso de la mutante  $\Delta arf2$  y la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  en el mismo contexto se observó la formación de dicotomías (formación de dos hifas a partir de la hifa primaria) a tiempos muy tempranos, algo inusual en el crecimiento polarizado; las mutantes  $\Delta arf3$ ,  $\Delta arf4$  y la doble mutante  $\Delta arf3^{(+)(-)} / \Delta arf4$  también presentaron dicotomías en la punta de las hifas (Maldonado-Herrea, 2015; Alejandro-Castañeda, 2017). Así, la proteína Arf1 regula el desarrollo de la morfología micelial, mientras que las demás proteínas Arf regulan la polaridad de la hifa.

Respecto a la velocidad de germinación, no se observaron diferencias importantes de las mutantes respecto a la cepa silvestre.

En la generación de biomasa, la mutante  $\Delta arf1$  presentó una disminución en la cantidad de biomasa del 27%, la mutante  $\Delta arf3$  de un 14% respecto a la cepa silvestre, mientras que las demás mutantes producen biomasa similar a la cepa silvestre. La disminución en la generación de biomasa de la cepa  $\Delta arf1$  puede deberse a que sus hifas son pequeñas respecto a la cepa silvestre y a las de más cepas mutantes.

Otro fenómeno relacionado con la morfología micelial de *M. circinelloides* es la interacción sexual. De donde se observó que la mutante  $\Delta arf1$  es incapaz de interaccionar sexualmente conduciendo a una baja producción de esporas sexuales (zigosporas), mientras que la mutante  $\Delta arf2$  y la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  (dato no mostrado) se comportaron como la cepa silvestre; las mutantes  $\Delta arf3$  y  $\Delta arf4$  también producen zigosporas de igual manera a la cepa silvestre. El resultado anterior demuestra que poca cantidad de proteína Arf1 es necesaria para dar lugar a la interacción sexual. Por lo que la proteína Arf1 es esencial para el proceso de reproducción sexual.

Un fenómeno similar de poca producción de zigosporas se observó en las mutantes en los genes *rdrp-1* y *rdrp-2*, involucrados en la maquinaria de silenciamiento génico de *M. circinelloides* (Nicolás y col., 2015).

Para el caso de la morfología del crecimiento en medio líquido en anaerobiosis se observó que no existe diferencia de las levaduras generadas por las mutantes respecto a la cepa silvestre. Para el caso de la velocidad de germinación se observó que la mutante  $\Delta arf2$  estanca su germinación en 15% a lo largo del experimento, mientras que las demás mutantes germinan más rápido en un 15% respecto a la cepa silvestre durante todo el ensayo. La incapacidad de formar levaduras de la mutante  $\Delta arf2$  correlaciona con el análisis de expresión, en donde el transcrito del gen *arf2* es 6.2 veces más respecto al estadio espora. Para demostrar experimentalmente el resultado anterior, la mutante  $\Delta arf2$  se complementó con el gen silvestre *arf2* y con el gen mutante *arf2* que codifica la proteína constitutivamente activa, siendo evaluadas durante la germinación anaerobia, observándose que ambas complementaciones restauran el fenotipo silvestre en la generación de levaduras y en la velocidad de germinación, demostrándose así, la participación fundamental del gen *arf2* en el desarrollo de la morfología levaduriforme. Otro gen asociado a la morfología levaduriforme es el gen *adh1*, el cual codifica para una alcohol deshidrogenasa dependiente de  $NAD^+$ , involucrada en el proceso fermentativo al transformar acetaldehído a etanol (Rangel-Porras y col., 2005). La mutante *adh1*<sup>-</sup> de *M. circinelloides* no produce levaduras (Díaz-Pérez, 2016), las esporas solo aumentan de tamaño como el caso de la mutante  $\Delta arf2$ . De tal manera que la proteína Arf2 es esencial para el desarrollo de las levaduras. En el caso de la generación de biomasa en crecimiento anaerobio se observó diferencia significativa de la doble mutante  $\Delta arf1^{(+)(-)} / \Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre, la cual genera mayor biomasa en un 25%. Un dato incongruente es que no existió diferencia en la biomasa generada de la mutante  $\Delta arf2$  respecto a la cepa silvestre ya que la mutante  $\Delta arf2$  no genera más células al paso del tiempo.

Para demostrar que la mutante  $\Delta arf2$  no genera levaduras al nivel que la cepa silvestre, se evaluó el nivel de transcrito del gen *adh1* en la mutante  $\Delta arf2$  y en las mutantes  $\Delta arf2$  complementadas, evidenciando que las mutantes  $\Delta arf2$  complementadas presentan un nivel de transcrito del gen *adh1* similar a la cepa silvestre mientras que la mutante  $\Delta arf2$  presenta un nivel de transcrito del gen *adh1* 90% menos respecto a la cepa silvestre. En conjunto los resultados anteriores revelan la participación crucial del gen *arf2* en el desarrollo de la morfología levaduriforme, siendo *arf2* el único gen *arf* indispensable para dicha función.

Por otra parte, la virulencia en hongos ha sido asociada a la secreción de enzimas hidrolíticas, toxinas y a la morfología micelial, entre otras **(Almeida y col., 2015; Klein y Tebbets, 2007)**. Las proteínas Arf al ser reguladores clave del tráfico vesicular pudieran tener relevancia en la virulencia ya que se asocian a la regulación en la secreción de moléculas al medio extracelular, crecimiento y diferenciación celular.

En *M. circinelloides* se han caracterizado varios genes asociados a virulencia. La interrupción de los genes *cnbR* y *cnaA* que codifican a la única subunidad B regulatoria de calcineurina necesaria para la actividad de la calcineurina y una de las tres subunidades A catalíticas de calcineurina respectivamente, produjo para el primer caso mutantes bloqueadas en crecimiento de levadura y la mutante  $\Delta cnbR$  es menos virulenta que la cepa silvestre. Estos hallazgos revelan que la vía de la calcineurina desempeña un papel clave en la transición dimórfica de levadura a micelio. Por otra parte la mutante  $\Delta cnaA$  produce esporas que son más grandes **(Lee y col., 2013)**, y el tamaño de espora se correlaciona con el potencial de virulencia, esporas más grandes germinan más rápido y por consiguiente pueden invadir al huésped al evadir la respuesta inmune **(Li y col., 2011)**; la falta de actividad de alcohol deshidrogenasa (*adh1*<sup>-</sup>) generó una mutante (M5) hipervirulenta, en donde se determinó que el factor de virulencia es el acetaldehído, el cual es secretado al medio extracelular.

Dicha molécula genera la muerte en ratones no inmunosuprimidos al desencadenar respuestas inflamatorias generalizadas y en los nematodos (**Díaz-Pérez, 2016**); el gen *mcpID* codifica una enzima fosfolipasa D (PLD), esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster de glicerofosfolípidos. La mutante  $\Delta mcpID$  mostró un crecimiento deficiente acompañado de la reducción en la producción de esporas y el aumento de la producción de  $\beta$ -caroteno, y más importante, la virulencia reducida en los modelos *Galleria mellonella* y *M. musculus*. El gen *mcpID* pudiera regular algunas vías de señalización implicadas en la germinación y el crecimiento de hifas, ya que la mutante en este gen mostró una germinación retardada (**Trieu y col., 2017**).

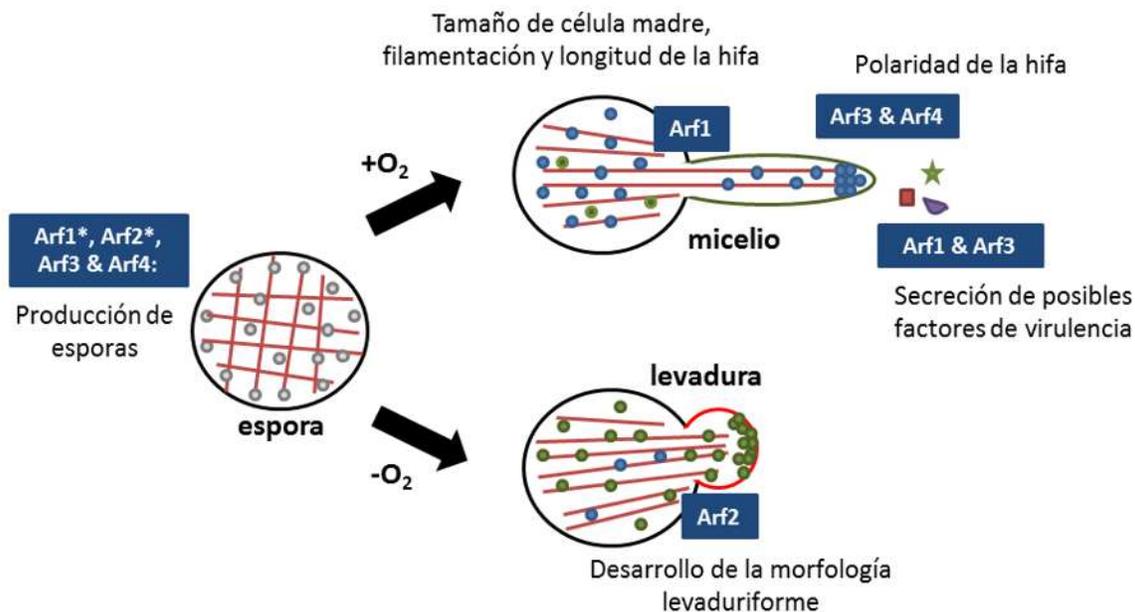
En otros hongos como *C. albicans* se ha observado la relevancia de genes de la familia *arf* y su implicación en la virulencia. En 2010 Epp y col., demostraron que el gen *AGE3* (codifica para una proteína activadora de GTPasa) de *C. albicans* es necesario para lograr la completa invasión del huésped y conferir resistencia a antifúngicos; En 2017 Labbaoui y col., demostraron que los genes *arf2* y *arf1* son necesarios de igual forma para lograr la completa invasión del huésped debido a que la transición levadura-micelio se ve retardada en las mutantes correspondientes en presencia de suero. En el caso de *A. fumigatus* el cual posee un gen ortólogo del gen *AGE3* de *C. albicans* (*gcsA*) mostró deficiencia en la formación de biopelículas y virulencia atenuada (**Almeida y col., 2012**).

La ausencia del gen *arf1* de *M. circinelloides* incrementó la virulencia tanto en modelo de ratón inmunosuprimido como en modelo de nemato en comparación a la cepa silvestre en un 25% y 50% respectivamente, sugiriendo que existe uno o varios componentes que son secretados y que actúan como posible factor de virulencia. Para el caso de la ausencia del gen *arf2* solo se observó un incremento en la virulencia contra el modelo de nematodo de un 25%, similar a lo que ocurre con la ausencia del gen *arf4*. La cepa más virulenta es la cepa mutante  $\Delta arf3$ , tanto en modelo de nematodo como de ratón inmunosuprimido. Así, las proteínas Arf1 y Arf3 son reguladores negativos de la virulencia.

Estos datos demuestran la implicación del metabolismo de las proteínas Arf (reguladoras del tráfico vesicular) en la virulencia fúngica.

En conjunto los resultados obtenidos en este proyecto ponen en evidencia la participación de la proteína Arf1 en la regulación de la morfología micelial y la virulencia, y por otra parte la participación de la proteína Arf2 en la regulación de la morfología levaduriforme.

Con los datos obtenidos por el grupo de trabajo en relación a la participación de las proteínas Arf en el dimorfismo y virulencia de *M. circinelloides* se propone el siguiente modelo (figura 47).



**Figura 47. Modelo propuesto de las funciones de las proteínas Arf de *M. circinelloides* en el dimorfismo y virulencia.** Se resumen las funciones probables de todas las proteínas Arf de *M. circinelloides* en el dimorfismo y virulencia. La proteína Arf1 regula la producción de esporas de manera importante, el desarrollo de la morfología micelial y la secreción de factores de virulencia; la proteína Arf2 regula la producción de esporas de manera importante y el desarrollo de la morfología levaduriforme; la proteína Arf3 regula la producción de esporas de manera parcial, la polaridad de la hifa y la secreción de factores de virulencia; finalmente la proteína Arf4 regula la producción de esporas de manera parcial y la polaridad de la hifa.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Las proteínas Arf1 y Arf2 regulan el adecuado crecimiento en sustrato sólido y la producción de esporas de forma redundante. Por otra parte la proteína Arf1 regula el desarrollo de la morfología micelial controlando el tamaño de célula madre, la filamentación, la longitud de la hifa, la reproducción sexual y es un regulador negativo de la virulencia; mientras que la proteína Arf2 es la única proteína Arf indispensable para el desarrollo de la morfología levaduriforme.

## 9.1 Perspectivas

- Identificar los posibles factores de virulencia secretados por las mutantes  $\Deltaarf1$  y  $\Deltaarf3$ .
- Generar una cepa doble mutante  $\Deltaarf1/\Deltaarf3$  y caracterizarla en el contexto de virulencia.
- Identificar y caracterizar funcionalmente a proteínas reguladoras (GEFs y GAPs) de la función de las proteínas Arf.
- Identificar y caracterizar funcionalmente proteínas Sar en *M. circinelloides*.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2014) *Molecular Biology of the cell*, sixth edition. Published by Garland Science, Taylor & Francis Group. Chapters 10-13 and 16.
- Alejandro-Castañeda V. (2017) Virulencia de los genes *arf3* y *arf4* de *Mucor circinelloides*. Tesis de licenciatura en la UMSNH.
- Almeida F., Wolf J. M., Casadevall A. (2015) Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 14: 1173–1185.
- Almeida R., Gratieri-Maciel A. C., Goldman G., Malavazi I., von Zeska-Kress M. R. (2012) *gcsA*, an ARF-GAP-encoding gene in *Aspergillus fumigatus*.
- Alvarez C., Fujita H., Hubbard A., Sztul E. (1999) ER to Golgi transport: requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *The Journal of Cell Biology* 147: 1205–1222.
- Alvarez C., Sztul E. (1999) Brefeldin A (BFA) disrupts the organization of the microtubule and the actin cytoskeletons. *European Journal of Cell Biology* 78(1): 1-14.
- Amor J. C., Harrison D. H., Kahn R. A., Ringe D. (1994) Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* 372: 704-708.
- Arnau J., Strøman P. (1993) Gene replacement and ectopic integration in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Current Genetics* 23: 542–546.
- Bartnicki-Garcia S. (1968) Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of Bacteriology* 96: 1586-1594.
- 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.
- Benito E. P., Campuzano V., López-Matas M. A., De Vicente J. I., Eslava A. P. (1995) Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circineiloides* OMPdecase-deficient mutants. *Molecular Genetics and Genomics* 248: 126-135.

- Bhabhra R., Askew D. S. (2005) Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology Supplement 1* 43: S87-S93.
- Bredenkamp A., Velankar H., van Zyl W. H., Görgens J. F. (2010) Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast* 27: 849–860.
- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71-94.
- Chavrier P., Goud B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology* 11(4): 466-475.
- Corrochano L. M., Ruiz-Albert J. (2004) Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycological Research* 108(8): 858-863.
- Dascher C., Balch W. E. (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to golgi transport and trigger disassembly of the golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry* 269(2): 1437-1448.
- David H., Özçelik İ. Ş, Hofmann G., Nielsen J. (2008) Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9(1): 163.
- Díaz-Pérez S. P. (2016) Elucidación del mecanismo de virulencia del producto del gen *adh1* en *Mucor circinelloides*. Tesis de maestría en la UMSNH.
- Doherty G. J., McMahon H. T. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 78: 857-902.
- East M. P., Kahn R. A. (2011) Models for the Functions of Arf GAPs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22(1): 3–9.
- Epp E., Vanier G., Harcus D., Lee A. Y., Jansen G., Hallett M., Sheppard D. C., Thomas D. Y., Munro C. A., Mullick A., Whiteway M. (2010) Reverse genetics in *Candida albicans* predicts Arf cycling is essential for drug resistance and virulence. *PLoS Pathogens* 6(2): e1000753.

- Gale C., Gerami-Nejad M., McClellan M., Vandoninck S., Longtine M. S., Berman J. (2001) *Candida albicans* Int1p Interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Molecular Biology of the Cell* 12: 3538–3549.
- Ghannoum M. A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13(1): 122–143.
- Gillingham A. K., Munro S. (2007) The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 579-611.
- 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): 442-446.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-80.
- Heeswijk R van, Roncero M. I. G. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications* 49: 691-702.
- Holmes D. S., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114(1): 193-197.
- Idnurm A., Crosson S. (2009) The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathogens* 5(11): e1000470.
- Idnurm A., Heitman J. (2005) Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biology* 3(4): e95
- Iñiguez-García M. A., Villar-Trujillo A., Cardona-Infante V., Carrillo-Ponce C., Téllez-Becerra J. L. (2015) Diagnóstico y tratamiento de la mucormicosis pulmonar. *Revista Facultad de Medicina UNAM* 59(2): 28-37
- Jacobsen I. D., Wilson D., Wächtler B., Brunke S., Naglik J. R., Hube B. (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10(1): 85-93.
- Jahn R. (2004) Principles of Exocytosis and Membrane Fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014: 170–178.

- Kahn R. A., Gilman A. G. (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(17): 7906-7911.
- Kahn R. A., Cherfils J., Elias M., Lovering R. C., Munro S., Schurmann A. (2006) Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of Cell Biology* 172(5): 645.
- Kamei K., Watanabe A. (2005) *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology Supplement 1* 43: S95-/S99.
- 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.
- Klein B. S., Tebbets B. (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 10(4): 314–319.
- Kocsubé S. (2015) Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biologica Szegediensis* 59(2): 151-167.

- Kraus P. R., Boily M., Giles S. S., Stajich J. E., Allen A., Cox G. M., Dietrich F. S., Perfect J. R., Heitman J. (2004) Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-dna microarray. *Eukaryotic Cell* 3(5): 1249–1260.
- Labbaoui H., Bogliolo S., Ghugtyal V., Solis N. V., Filler S. G., Arkowitz R. A., Bassilana M. (2017) Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. *PLoS Pathogens* 13(2): e1006205.
- Lambert A. A., Perron M. P., Lavoie E., Pallotta D. (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* Arf3 protein is involved in actin cable and cortical patch formation. *FEMS Yeast Res* 7(6): 782-795.
- Lara R., Durán M. (2004) Un caso de gastroenterocolitis necrosante por zigomicosis. *Revista Mexicana de Pediatría* 71(6): 283-5.
- Lasker B. A., Borgia P. T. (1980) High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* 141(2): 565–569.
- Lee F. S., Huang C., Yu W., Buu L., Ching-Yi L., Huang M., Moss J., Vaughan M. (1997) Characterization of an ADP-ribosylation Factor-like 1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 272(49): 30998-31005.
- Lee F. S., Stevens L. A., Kao Y. L., Moss J., Vaughan M. (1994) Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation Factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 269(33): 20931-20937.
- Lee S. C., Heitman J. (2014) Sex in the Mucoralean Fungi. *Mycoses* 57: 18–24.
- 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 Pathogens* 9(9): e1003625.
- Lee S. C., Schmidtke S. N., Dangott L. J., Shaw B. D. (2008b) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryotic Cell* 7(8): 1278–1288.

- Lee S. C., Shaw B. D. (2008a) Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 283(2): 216-222.
- Lewis R. E., Kontoyiannis D. P. (2013) Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future Microbiology* 8(9): 1163–1175
- Li C. H., Cervantes M., Springer D. J., Boekhout T., Ruiz-Vazquez R. M., Torres-Martinez S., Heitman J., Lee S. C. (2011) Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. *PLOS Pathogens* 7(6): e1002086.
- López-García S. (2015) Análisis genómico-funcional de la regulación de la expresión génica por la luz en el hongo *Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral en la Universidad de Murcia, España.
- 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.
- Ma L. J., Ibrahim A. S., Skory C., Grabherr M. G., Burger G., Butler M., Elias M., Idnurm A., Lang B. F., Sone T., Abe A., Calvo S. E., Corrochano L. M., Engels R., Fu J., Hansberg W., Kim J. M., Kodira C. D., Koehrsen M. J., Liu B., Miranda-Saavedra D., O’Leary S., Ortiz-Castellanos L., Poulter R., Rodriguez-Romero J., Ruiz-Herrera J., Shen Y. Q., Zeng Q., Galagan J., Birren B. W., Cuomo C. A., Wickes B. L. (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* 5(7): e1000549.
- Maldonado-Herrera G. (2015) Participación de los genes *arf* en el dimorfismo y/o desarrollo en *Mucor circinelloides*. Tesis de maestría en la UMSNH.
- McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. (2002) Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 495-502.
- 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.

- Navarro E., Lorca-Pascual J. M., Quiles-Rosillo M. D., Nicolás F. E., Garre V., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R. M. (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics* 266: 463-470.
- Nicolás F. E., de Haro J. P., Torres-Martínez 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 and Biology* 44: 504–516
- Nicolás F. E., Vila A., Moxon S., Cascales M. D., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R. M., Victoriano G. (2015) The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics* 16: 237.
- 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.
- NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- 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.
- Orłowski M. (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews* 55: 234-258.
- Petrikos G., Skiada A., Lortholary O., Roilides E., Walsh T. J., Kontoyiannis D. P. (2012) Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases* 54: S23-S34.
- Rangel-Porras R. A., Meza-Carmen V., Martínez-Cadena G., Torres-Guzmán J. C., González-Hernández G., Arnau A. 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.

- Renault L., Guibert B., Cherfils J. (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426: 525-530.
- Roncero M. I. G. (1984) Enrichment method for the isolation of auxotrophic mutants of *Mucor* using the polyene antibiotic *N*-glycosyl-polyfungin. *Carlsberg Research Communications* 49: 685–690.
- Roncero M. I. G., Jepsen L. P., Strøman P., van Heeswijck R. (1989) Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* 84: 335-343.
- Rooney P. J., Sullivan T. D., Klein B. S. (2001) Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. *Molecular Microbiology* 39(4): 875-889.
- Ruiz-Roldán M. C., Garre V., Guarro J., Mariné M., Roncero M. I. G. (2008) Role of the White Collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7(7): 1227–1230.
- Salcedo-Hernández R., Ruiz-Herrera J. (1993) Isolation and Characterization of a Mycelial Cytochrome *aa*<sub>3</sub>-Deficient Mutant and the Role of Mitochondria in Dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* 17(2): 142-154.
- Sambrook J., Russell R. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N.Y.
- Schipper M. A. A. (1976) On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies in Mycology* 12: 1-40.
- Shiba T., Kawasaki M., Takatsu H., Nogi T., Matsugaki N., Igarashi N., Suzuki M., Kato R., Nakayama K., Wakatsuki S. (2003) Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport. *Nature Structure Biology* 10: 386–393.

- Sorkin A., Zastrow M. Von (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 609-622.
- Stearns T., Kahn R. A., Botstein D., Hoyt M. A. (1990) ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Molecular and Cellular Biology* 10(12): 6690–6699.
- Stefan K., Marlis F., Helmut B. (2009) A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Analytical Biochemistry* 387(1): 136-138.
- Stewart P. E., Thalken R., Bono J. L., Rosa P. (2001) Isolation of a circular plasmid region sufficient for autonomous replication and transformation of infectious *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 39: 714–721.
- Tokarev A., Alfonso A., Segev N. (2000) Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways. *Madame Curie Bioscience Database Austin: Landes Bioscience*.
- Trieu T. A., Navarro-Mendoza M. I., Pérez-Arques C., Sanchis M., Capilla J., Navarro-Rodríguez P., López-Fernández L., Torres-Martínez S, Garre V., Ruiz-Vázquez R. M., Nicolás F. E. (2017) RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathogens* 13(1): e1006150.
- Trybus K. M. (2008) Myosin V from head to tail. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (9): 1378–1389.
- 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.
- Varga J., Baranyi N., Chandrasekaran M., Vágvölgyi C., Sándor K. (2015) Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biologica Szegediensis* 59(2): 151-167.

- Wei H., Wang W., Yarbrough J. M., Baker J. O., Laurens L., Van W. S y col. (2013) Genomic, proteomic, and biochemical analyses of oleaginous *Mucor circinelloides*: evaluating its capability in utilizing cellulolytic substrates for lipid production. *PLoS ONE* 8(9): e71068.
- Wennerberg K., Rossman K. L., Der C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118: 843-846.
- 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.
- Wilfinger W. W., Mackey K., Chomczynski P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 (3): 474-481.
- Wolff A. M., Arnau J.. (2002) Cloning of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase-Encoding Genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and Use of the *gpd1* Promoter for Recombinant Protein Production. *Fungal Genetics and Biology* 35 (1): 21-29.
- Xia C., Zhang J., Zhang W., Hu B. (2011) A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology and Biofuels* 4: 15-24.
- 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.