UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

FACULTAD DE MEDICINA

Papel de los componentes de la cascada de MAK-2, NRC-1 y STE50, durante el crecimiento y la diferenciación celular en *Neurospora crassa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL SARABIA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. WILHELM LUDWIG HANSBERG Y TORRES

MÉXICO, D.F. 2016

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 103 Ote.
del Departamento de Biología Celular y Desarrollo
en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM
bajo la asesoría del Dr. Wilhelm Hansberg y Torres
y fue financiado por los proyectos
CONACYT CB2009-132687Q y
PAPIIT IN209313.

AGRADECIMIENTOS

Después de tan largo viaje este ciclo llega a su fin. A pesar de que mi nombre está en la portada no es mérito sino el de todos los esfuerzos que me apoyaron los que permitieron este trabajo.

Es difícil para mí pretender agradecer a cada persona que aportó de alguna forma en la realización de la presente tesis. Muchos han estado ahí desde el inicio hasta el fin, otros quizás solo una parte pero el valor al tiempo que he compartido con cada uno no lo mido en días, semanas o meses sino en consejos, en experiencias, en anécdotas, en sueños compartidos y en metas cumplidas.

En primer lugar agradezco a Dios, porque me acompaña a cada paso en mi camino. A mi madre, la cual amo y admiro, por enseñarme los sentimientos más nobles y a seguir adelante por más dura que sea la vida, que se puede ser duro para alcanzar lo que quieres pero sin dejar de ser noble contigo y con los demás. A mi padre, a quien amo y admiro, por enseñarme la fé en mí mismo, el fruto del trabajo constante y por su apoyo incondicional. Ustedes son mi principal motor en el día a día y sé que ustedes disfrutaran (incluso más que yo) este logro.

Al Dr. Hansberg que fue mi guía académico en este trayecto. Agradezco su paciencia y comprensión en mis aprendizajes, por permitirme empezar, permanecer y terminar el proyecto en su laboratorio, aún en los momentos más sombríos de su realización.

A Vane por su disponibilidad siempre a guiarme, a corregirme y a aconsejarme. A Sammy por compartir sus conocimientos, sus aprendizajes, sus opiniones, sus anécdotas y su sentido del humor. Al Dr. Pablo por sus aprendizajes dentro y fuera del laboratorio que me ayudaron a madurar en lo académico y en lo personal. A ustedes les agradezco ser amigos, por tantas experiencias y vivencias. Por enseñarme que el día a día en el laboratorio no solo te fortalece como estudiante, sino como compañero, como amigo, como hijo y como ser humano.

A Tere por su alegría y su carisma, por los momentos graciosos y por su sonrisa incondicional en el laborar del día. A Itzel por enseñarme que el trabajo duro requiere mano dura y esfuerzo, que exige disciplina y seriedad, pero también buen humor.

Aun siendo el laboratorio lugar de los experimentos, no fue sino la apertura para conocer a personas extraordinarias más allá de sus cuatro paredes. A Jhonathan, Nayeli y a Fer por compartir conmigo desde el saludo en el pasillo hasta los convivios, tantas risas y tantas pláticas amenas.

A Rafa por hacerme romper la rutina del laboratorio y a César por enseñarme el valor de la perseverancia en la ciencia. Les agradezco su sentido del humor aun en los momentos más serios y por aligerar los días en el laboratorio que terminaban ya en la noche.

Al laboratorio 106 Oriente por brindarme con toda la amabilidad y atención desde un reactivo hasta los alientos para continuar y acabar la presente tesis.

Y aun siendo difícil quiero agradecer a quienes sin estar en el constante día a día en el instituto me alentaron, personas que aún tengo la oportunidad de ver y personas que las circunstancias no me permiten externarles mi agradecimiento pero que se hace constar con la presente tesis con lo que correspondo a esa confianza.

Al equipo de futbol de biomédicas, quienes me alentaron para la realización y término de la presente tesis. Sé que son muchas las experiencias que compartimos pero más allá de las anécdotas nunca dejaron de motivarme para acabar esta tesis y qué mejor que con el ejemplo. A Hugo, a Miguel, a Vlad, a Daniel (costeño), a Paco, a Juan Pablo, a Daniel (men), a Martín, a Isaac, a todos los que estuvieron y ya no están, y a los que siguen estando.

A Edgar por enseñarme que un amigo no siempre es el que comparte tu gusto por la ciencia o por estar en el laboratorio, sino el que confía en ti, el que te alienta a aspirar a cosas grandes y el que te apoya para alcanzar tus metas, aún en los momentos más difíciles.

Finalmente en la última etapa de esta tesis, agradezco a las personas que con su apoyo me alientan a superarme cada día y a no resignarme. A ti Marce por compartir conmigo esta etapa y ser ejemplo en la superación personal y académica, por enseñarme el valor de buscar el bienestar en la familia, en los amigos, en el laboratorio y en la sociedad. Por confiar en mí, por darme ánimos y por las lecciones de vida que hemos vivido juntos.

También a la Dra. Eli por darme la confianza de empezar un nuevo camino en la ciencia, por ser paciente en mis enseñanzas y errores, por enseñarme a ser optimista, a ser crítico y por guiarme en estos nuevos pasos de mi vida académica.

Como ya lo escribí fue largo el camino y me disculpo por las personas que dejo de mencionar, aun así han sido ustedes los que me han llevado a disfrutar el transcurrir de esta etapa. Gracias a mi familia, a mi novia, a mis amigos y a mis compañeros.

"*…un largo camino se inicia con el primer paso*"

EN MEMORIA DE

MI HERMANO LEANDRO ISRAEL SARABIA SÁNCEZ

Y LA DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR

ÍNDICE

Resumen…… 8

Introducción…….. 9

Especies Reactivas del Oxígeno como moléculas de señalización……. 9

La diferenciación celular, respuesta a las ERO…….. 10

Papel de las ERO en el desarrollo de *Neurospora crassa*…… 12

La conidiación cíclica en *Neurospora crassa*…….. 18

RAS-1 como proteína de señalización…….. 19

Efectores de RAS-1: NRC-1 y STE50…….. 22

NRC-1……. 22

STE50……. 24

Planteamiento del problema..... 26

Hipótesis…… 26

Objetivo General……... 26

Objetivos Particulares…….. 26

Materiales y métodos..... 27

Cepas y plásmidos utilizados……. 27

Transformación de DH5α……. 27

Condiciones de cultivo……..... 27

Extracción del ADN…….. 29

Cancelación de los genes *ste50* y *nrc-1* en *N. crassa*…….. 30

Obtención de los conidios de *N. crassa*…… 34

Transformación de los conidios de *N. crassa*…….. 34

Propagación de las colonias transformadas de *N. crassa*…… 34

Análisis de las cepas mutantes mediante hibridación tipo “Southern”…… 34

Caracterización fenotípica…….. 36

Resultados……. 39

Construcción de las mutantes Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en *N. crassa*……... 39

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en condiciones basales……. 41

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en presencia de peróxido de hidrógeno……. 44

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en presencia de luz……. 48

Discusión…….. 51

Conclusiones…… 55

Perspectivas……. 57

Referencias…… 58

ABREVIATURAS:

ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
SOD	Superóxido dismutasa
NOX	NADPH oxidasa
CAT	Catalasa
GEF	Factor de intercambio del nucleótido guanina
GTP	Guanosina trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
MAPKKK	Proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno
MAPKK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MAP	Proteína activada por mitógeno
RA	Dominio de asociación a RAS
SAM	Dominio de motivo alfa estéril
OS	Sensible al estrés osmótico
NRC	Sin represión de la conidiación
HOG	Alta osmolaridad por glicerol
AC	Adenilato Ciclasa
CM-H_2DCFDA	5-(y -6)-clorometil-2´.7´-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil éster
hyg^r	Resistencia a Higromicina B
rpm	Revoluciones por minuto
VS	Vogel- Sacarosa
MV	Medio de cultivo Vogel
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
RNC	Región No Codificante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Tm	Temperatura media
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Lx	Unidad para el nivel de iluminación equivalente a 1 lumen/m^2
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
Bp	Bases de pares de nucleótidos
N. crassa	*Neurospora crassa*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) no solo son productos secundarios del metabolismo sino que también participan en procesos como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Existen mecanismos dentro de la célula que sensan un aumento de las ERO y lo transducen en una respuesta fisiológica.

Con base en los estudios en el hongo *Neurospora crassa* el grupo de investigación del Dr. Hansberg propuso que la diferenciación celular se da como respuesta a un aumento en las ERO (estado hiperoxidante).

En el ciclo asexual de *N. crassa* se presentan tres transiciones morfogenéticas: la adhesión de las hifas, el desarrollo de las hifas aéreas y la formación de los conidios. Al inicio de cada transición hay un estado hiperoxidante donde la célula deja de crecer, alcanza un estado diferenciado y en éste nuevo estado la célula reinicia el crecimiento. El presente trabajo busca entender parte de los mecanismos detrás de esto.

En *N. crassa* la cepa *ras-1*^{bd} muestra en condiciones de crecimiento la alternancia cíclica entre el crecimiento y la diferenciación (conidiación) lo que sugiere que RAS-1 determina el destino celular. Los ciclos pueden afectarse al cambiar el estado redox. Mientras que el periodo se acorta en presencia de agentes pro-oxidantes, el ciclo se cancela con la adición de agentes antioxidantes.

No son claros los mecanismos por los cuales RAS señaliza en *N.* crassa, tanto en condiciones normales como bajo estrés oxidante. El análisis genómico mostró que tres genes codifican proteínas con un dominio de asociación a RAS: *ac* (una adenilato ciclasa), *nrc-1*(una MAPKKK) y *ste50* (una proteína de andamiaje).

El objetivo de la presente tesis fue analizar la respuesta de *N. crassa* en condiciones de mayor estrés oxidante a lo largo del ciclo asexual y como se afecta esta respuesta en ausencia de *nrc-1* ó *ste50*.

Los resultados muestran que STE50 y NRC-1 participan en el crecimiento y la conidiación, tanto en condiciones normales como en respuesta a un mayor estrés oxidante. Estos datos permiten suponer que en efecto estas dos proteínas representan efectoras posibles de RAS-1 para la alternancia entre el crecimiento y la conidiación, la cual depende del estado redox de la célula.

INTRODUCCIÓN

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO COMO MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término dado a las moléculas que se generan por la absorción de radiación del oxígeno diatómico (dioxigeno), que así puede formar oxígeno singulete, oxígeno atómico y ozono, y también por la reducción incompleta del mismo, formando superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Además de estas ERO hay otras especies reactivas que son compuestos de oxígeno unido a nitrógeno o al carbono, como el óxido nítrico y los compuestos que se derivan de este, el peroxinitrito y el dióxido de nitrógeno, así como el radical carbonato.

Inicialmente la formación de las ERO sólo se asoció con el daño y la muerte celular, suponiendo que eran productos secundarios que se generaban de manera desregulada. Con la edad aumenta la formación de las ERO y se acumula el daño intracelular. Cuando la célula ya no puede contender con dicho daño se desencadena el proceso de muerte celular.

Sin embargo las características biológicas de cada ERO, como la reactividad química, la vida media y la solubilidad lipídica, les permite reaccionar preferentemente con distintos compuestos celulares, sugiriendo un efecto específico para cada una. Así, sólo el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) y el oxígeno singulete ($^1O_2$) son capaces de reaccionar con el ADN y producir mutaciones. El superóxido (O_2^-) en cambio reacciona con los centros hierro-azufre [Fe-S] de proteínas como SoxR y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacciona sólo con algunos residuos de cisteína de proteínas como OxyR. Además hay enzimas que producen de manera regulada el superóxido o el peróxido de hidrógeno, como las NADPH oxidasas y otras oxidasas.

Actualmente se acepta que distintos procesos celulares, además de la muerte celular, se asocian con la formación de las ERO, lo que apoya la idea de que, además de su toxicidad, desempeñan un papel como moléculas señalizadoras. Por ejemplo, en *Dictyostelium discoideum* hay un incremento en la concentración del superóxido, tanto intracelular como extracelular, durante la agregación y la subsecuente diferenciación celular (Bloomfield G 2003). De manera interesante, dicha agregación no ocurre cuando se elimina el superóxido extracelular o al incrementar la expresión de la superóxido dismutasa A: Sod A (Fig. 1A). En *Aspergillus nidulans* la enzima pro-oxidante NADPH-oxidasa A (NOXA) es necesaria para la formación del cleistotecio durante el desarrollo sexual (Fig. 1B) pero no para el desarrollo de las células Hülle (Lara-Ortiz T 2003). En *Volvox carteri* el desarrollo sexual inducido por el estrés calórico está mediado por un aumento en las ERO (Fig. 1C) (Nedelcu AM 2004).

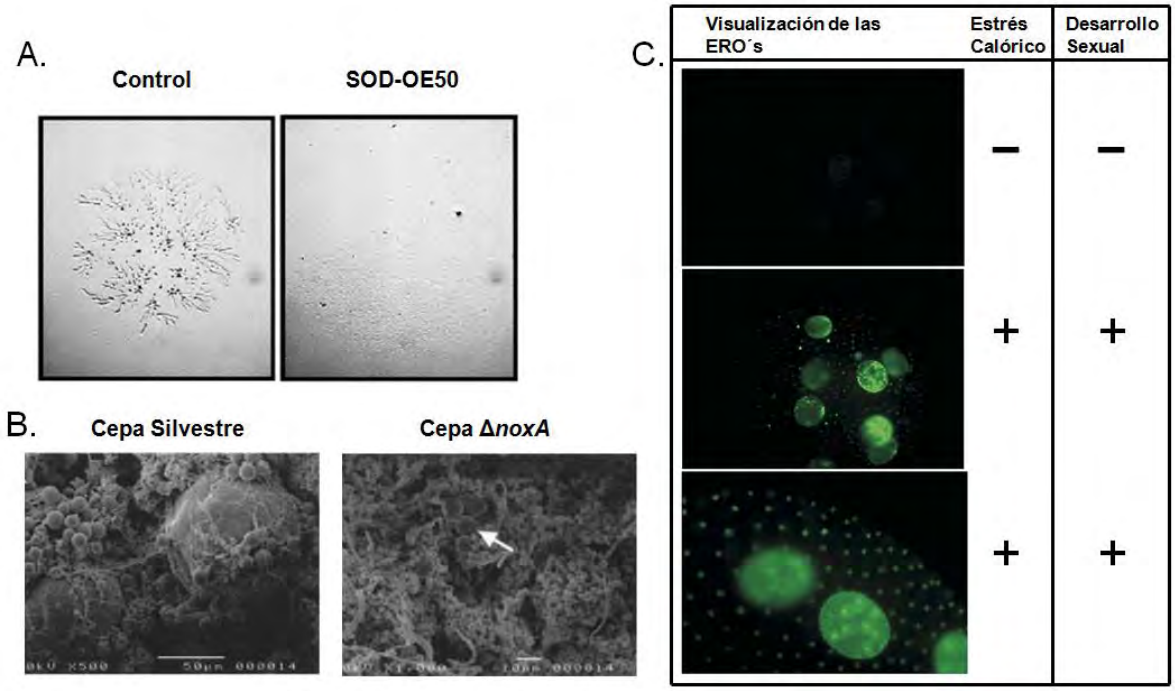


Figura 1. Las ERO se requieren para la diferenciación celular de los microorganismos. A. Fotografías por microscopía de luz de las células de *Dictyostelium discoideum*. La sobre-expresión de la SodA (SOD-OE50) inhibe la formación de los agregados, precursores de los cuerpos fructíferos. Figura modificada de Bloomfield G 2003. **B**. Fotografías por microscopía de escaneo electrónico de *Aspergillus nidulans*. La cepa Δ*noxA* no desarrolla los cleistotecios pero sí las células Hülle (flecha blanca). Figura modificada de Lara-Ortiz T 2003. **C.** Fotografías por microscopía de fluorescencia de *Volvox carteri*. Las ERO se detectan por CM-H_2DCFDA (color verde). Panel superior. Células femeninas sin estrés calórico y sin embriones (magnificación x 75). Panel intermedio. Células femeninas con estrés calórico y con embriones (magnificación x 75). Panel inferior. Embriones dentro de la colonia madre (magnificación x 150). Figura modificada de Nedelcu AM 2004.

Asimismo, en *Sclerotium rolfsii* el radical hidroxilo es clave para la diferenciación del esclerocio (Georgiou CD 2000, Sideri M 2000) y en *Ustilago maydis* el peróxido de hidrógeno es importante para la transición al crecimiento filamentoso y para la patogenicidad (Leuthner B 2005). En el caso del óxido nítrico, éste promueve la formación del cuerpo fructífero en *Flammulina velutipes* (Song NK 2000) y el desarrollo de los conidios en *Neurospora crassa* (Ninneman H 1996).

Estos datos indican que las ERO actúan como intermediarios en la señalización durante la diferenciación celular en microorganismos eucariotes (Aguirre J 2005). Lo interesante resulta en que las ERO también son relevantes en procesos de diferenciación en animales (Mody N 2001, Chen CT 2008, Schröder K 2009, Higuchi M 2013).

LA DIFERENCIACIÓN CELULAR, RESPUESTA A LAS ERO

En 1990 el laboratorio del Dr. Hansberg propuso que la diferenciación celular es una respuesta a un estado hiperoxidante, es decir, un estado inestable en el cual se forman las ERO en cantidad por arriba de la capacidad antioxidante celular (Hansberg W 1990, Aguirre J 2005, Hansberg W 2008).

Dicho estado hiperoxidante se puede generar por:

1) Un incremento en las ERO, ya sean de origen endógeno ó exógeno.
2) Un decremento en los sistemas antioxidantes de la célula.

En la Figura 2 se esquematiza el ciclo de vida de un microorganismo y la posible respuesta ante un aumento en la concentración de las ERO: la adaptación a condiciones más oxidantes, la diferenciación celular o la muerte (Aguirre J 2005).

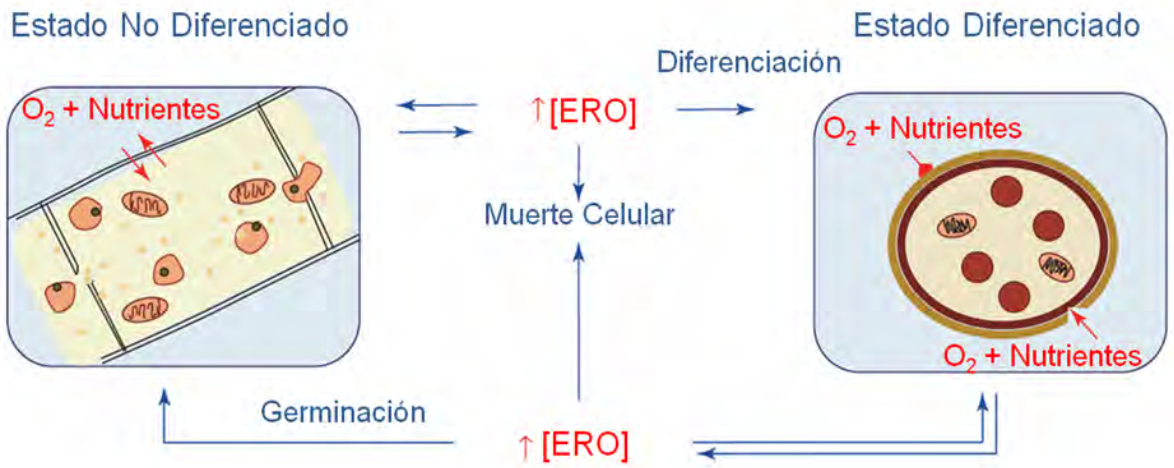


Figura 2. Modelo de la diferenciación celular por ERO. La figura esquematiza el paso de un estado no diferenciado o de crecimiento a un estado diferenciado como la espora y su retorno al estado de crecimiento mediante la germinación. En las dos transiciones se incrementa la formación de las ERO. En ambos casos el destino celular puede ser la adaptación, el aislamiento del oxígeno ambiental, que es la diferenciación celular o la muerte. Aguirre J 2005.

A continuación se describen de manera breve los puntos que se representan en dicho modelo.

Estado no diferenciado o de crecimiento ilimitado

Durante el desarrollo no diferenciado la célula incorpora el oxígeno y los nutrientes del medio ambiente, lo que le permite llevar a cabo las reacciones de oxido-reducción del metabolismo aeróbico. Éste genera las ERO que participan en la señalización celular y que son neutralizadas por los mecanismos antioxidantes. Las células crecen (proliferan) dependiendo de su capacidad para incorporar oxígeno y nutrimentos. Si las condiciones ambientales no cambian el crecimiento es ilimitado.

Adaptación

Cuando en condiciones de crecimiento hay un aumento en la concentración intracelular de las ERO (estado hiperoxidante) y la célula puede obtener suficiente poder reductor para neutralizarlas, permanece en el estado de crecimiento y se adapta a las condiciones más oxidantes.

Diferenciación celular

Si la célula no se puede adaptar, pone en juego mecanismos que la aíslan del oxígeno del medio ambiente, volviéndola diferente. Al aislarse del oxígeno también se aísla de los nutrimentos, por lo que la célula está limitada para crecer. Si en un estado diferenciado se vuelven a formar las ERO se activan mecanismos adicionales que aíslan la célula del medio ambiente hasta llegar a un estado en el cual ya no se forman las ERO pero tampoco puede crecer, permaneciendo en un estado de vida latente como lo es la espora.

Germinación

La transición de una espora (estado diferenciado) al crecimiento celular (estado no diferenciado) implica la ruptura del aislamiento celular y la generación de un estado hiperoxidante al entrar el dioxígeno a la célula. Con el oxígeno entran los nutrimentos que al metabolizarse producen poder reductor que puede ser suficiente para compensar el estado hiperoxidante e iniciar el crecimiento. Un proceso equivalente a la germinación de una espora puede ocurrir a partir de cualquier estado diferenciado intermedio.

Muerte celular

Cuando la célula es incapaz de adaptarse o diferenciarse ante un estado hiperoxidante, se desencadena el proceso de muerte. Esto también puede ocurrir durante la germinación. La muerte celular es el equilibrio redox entre el medio intracelular y el medio extracelular.

Para cada transición morfogénica puede haber células que se adapten, se diferencien o se mueran. Como se describe en el modelo (Fig. 2) la diferenciación celular es un mecanismo de respuesta que aisla la célula del oxígeno del medio ambiente y contiende así con el estado hiperoxidante. Esto se observó por primera vez en estudios sobre *N. crassa* los que se describen con mayor detalle en el siguiente apartado.

PAPEL DE LAS ERO EN EL DESARROLLO DE *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un hongo filamentoso que al utilizarse como modelo de estudio permitió reconocer el papel de las ERO en el desarrollo. A continuación se describen sus ciclos de vida y la influencia de las ERO sobre éstos.

Ciclo Sexual

Para este ciclo se requiere de la participación de dos cepas que tienen el tipo de apareamiento opuesto. El ciclo inicia a partir de hifas en crecimiento (micelio) de la cepa que actúa como cepa receptora. En ciertas condiciones ambientales (limitación de nitrógeno) algunas hifas forman una hifa especial que se enrosca sobre sí misma, llamada ascogonia. Otras hifas envuelven la ascogonia para formar una estructura esférica llamada protoperitecio. A través del protoperitecio salen de la ascogonia hifas especializadas, llamadas tricóginas, que van en busca de células del sexo opuesto, ya sean conidios o hifas. Cuando se encuentran, se fusionan las células y los núcleos de la cepa donadora migran hacia el interior del protoperitecio (Fig. 3).

Dentro del protoperitecio los núcleos de ambos sexos se replican, la estructura crece, se melaniza y adquiere una forma de pera, que se denomina peritecio. Dentro del peritecio se forman hifas que tienen núcleos de ambos sexos. Al crecer, la sección apical se curva, dando una apariencia de bastón. En la curva se forman dos septos que separan dos núcleos del resto, siendo uno de cada sexo. Estos núcleos se fusionan formándose una célula diploide transitoria. Después el núcleo diploide lleva a cabo las dos divisiones meióticas, seguidas de una división mitótica, con lo cual se forman ocho núcleos haploides que permanecen alineados en la célula. Esta célula adquiere forma de saco, por lo que se le llama asco. Alrededor de cada núcleo se forma una capa gruesa de pared celular que posee melanina. Esto da lugar a las ascosporas que son esporas grandes y surcadas (de ahí el nombre de *Neurospora crassa* que significa esporas grandes que tienen nervaduras).

Una vez formadas las ascosporas, éstas son expulsadas a través de la apertura que se encuentra en el peritecio (el ostiolo) hacia el medio ambiente. Las ascosporas, al ser activadas con calor o mediante algunos compuestos, germinan en presencia de nutrimentos. Así se forman nuevamente las hifas en crecimiento y se inicia un nuevo ciclo de vida.

Ciclo Asexual

El ciclo asexual también se origina a partir de las hifas en crecimiento. Inicia cuando las hifas están en condiciones en las que ya no pueden crecer, particularmente cuando la fuente de carbono es insuficiente. En estas condiciones las hifas más expuestas al aire se adhieren entre sí y sirven de sustrato para el desarrollo de las hifas aéreas.

Las hifas aéreas crecen, se ramifican y en las puntas producen constricciones menores formando así los conidióforos. En las constricciones se forma un septo doble (constricciones mayores) lo que da lugar a las esporas asexuales, llamadas conidios (Fig. 3). Los conidios grandes se llaman macroconidios y contienen de dos a cinco núcleos.

Algunas hifas menos ramificadas pueden formar microconidióforos de los cuales se generan los microconidios que son conidios pequeños con un solo núcleo (Fig. 3).

La formación de los conidios también ocurre en condiciones sumergidas, cuando el cultivo en un medio líquido se encuentra en crecimiento estacionario (Plesofsky-Vyg N 1983, Guignard R 1984).

Los conidios se pueden desprender de los conidióforos con facilidad por acción mecánica (viento, agua, insectos) y dispersarse en el medio ambiente. En un medio con nutrimentos los conidios germinan y forman hifas en crecimiento que pueden iniciar un nuevo ciclo, ya sea sexual o asexual.

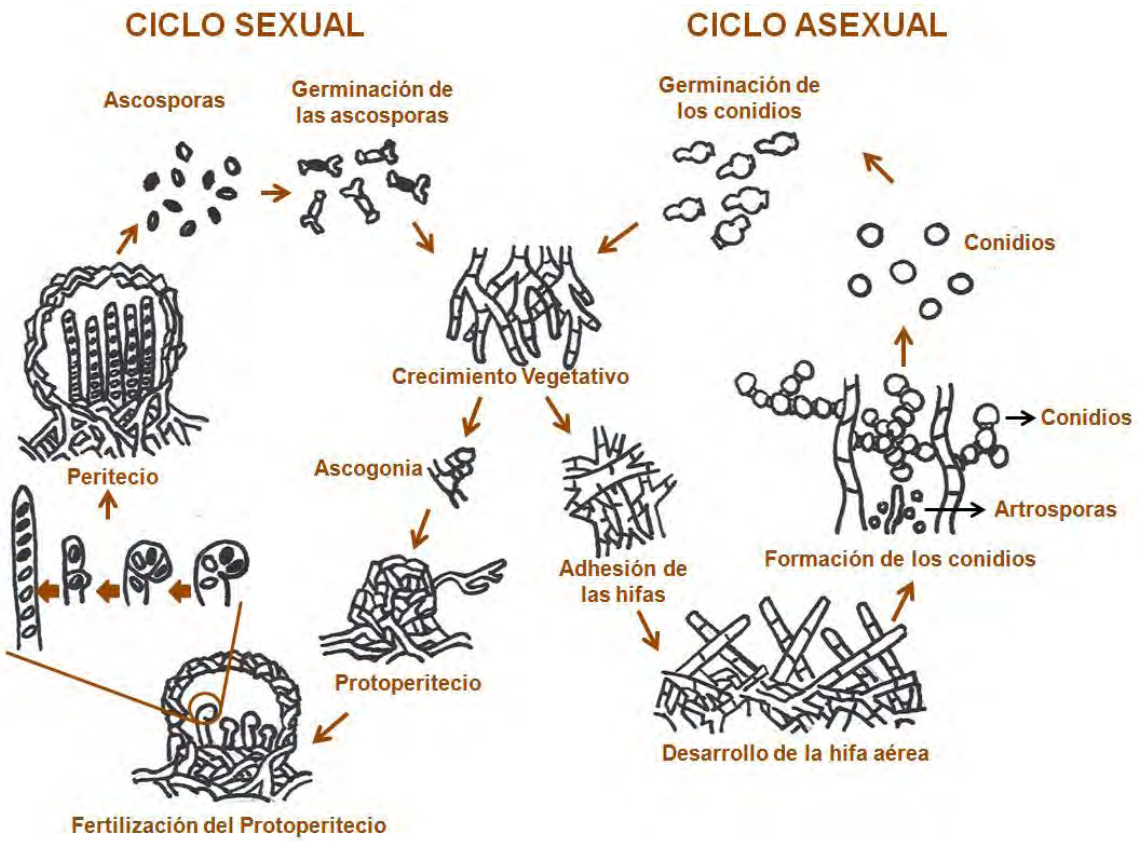


Figura 3. Esquema del ciclo sexual y asexual de *N. crassa*..

Durante el ciclo asexual se presentan tres transiciones morfogenéticas: 1) de las hifas en crecimiento a las hifas adheridas, 2) de las hifas adheridas a la formación de las hifas aéreas, 3) de las hifas aéreas a la producción de los conidios (Toledo I 1986). Al inicio de cada transición se presenta un estado hiperoxidante (Fig. 4) que se caracteriza por un aumento en las proteínas oxidadas (Toledo I 1990), así como la oxidación de enzimas específicas, como la glutamina sintetasa (Aguirre J 1986) y la glutamato deshidrogenasa (Aguirre J 1989, Toledo I 1994), además de la oxidación del NAD(P)(H) y del glutatión (Toledo I 1991, Toledo I 1995).

Una vez desencadenado el estado hiperoxidante se presenta: a) la detención inmediata del crecimiento (Wanke V 1999), b) la autofagia, caracterizada por una vacuolización celular (Toledo I 1986), la degradación de proteínas oxidadas (Toledo I 1990) y la excreción de amonio (Cárdenas ME 1984), c) la diferenciación celular (Aguirre J 2005) que involucra cambios en la pared celular y en el medio intracelular, d) una respuesta antioxidante (Lledías F 1999, Michán S 2003, Gyöngyösi N 2013).

Una vez que se alcanza el nuevo estado estable se puede reanudar el crecimiento celular. Por ejemplo, una vez que se forman los primordios de las hifas aéreas, éstas crecen hasta que nuevamente se desarrolla un estado hiperoxidante que llevará a la formación de los conidios.

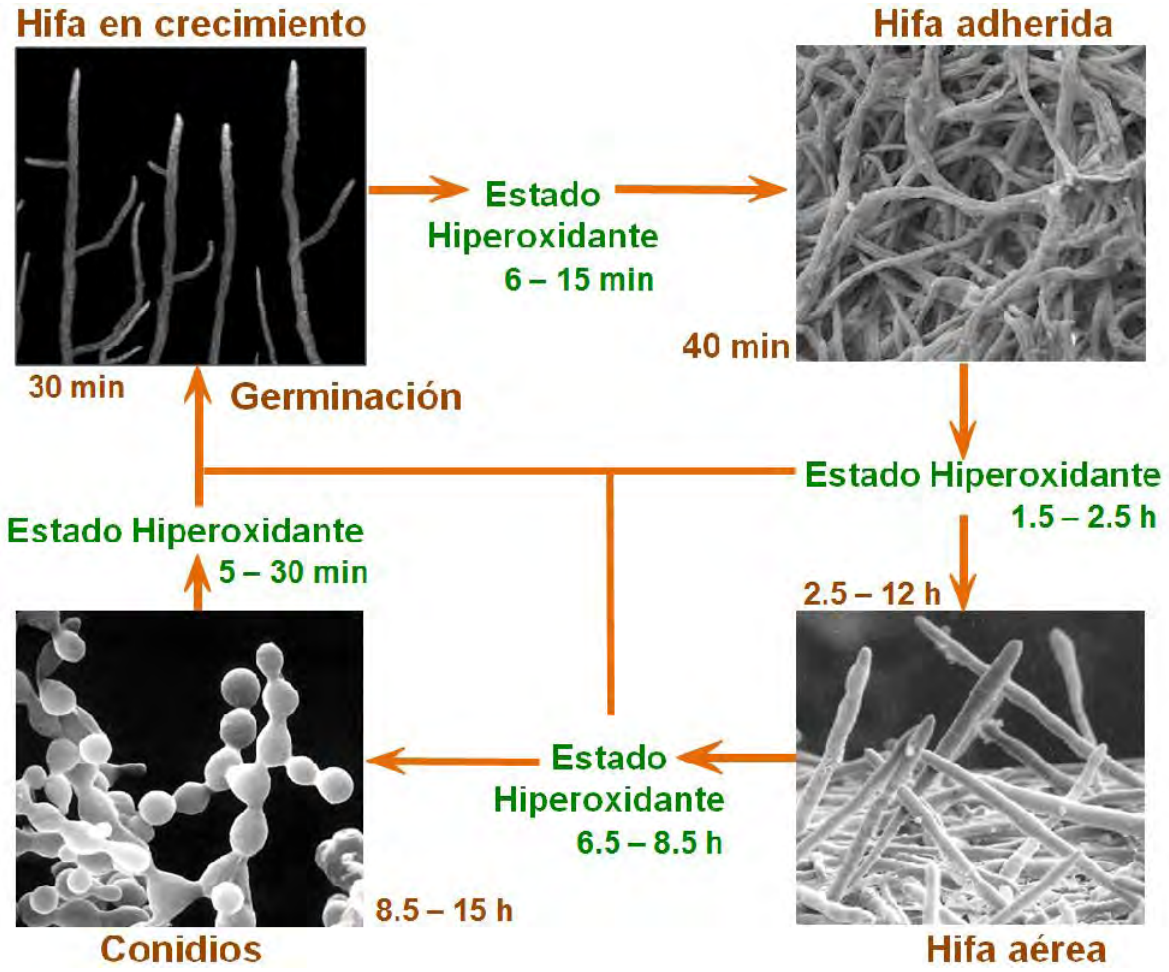


Figura 4. Estados hiperoxidantes se asocian con las transiciones morfogenéticas durante la conidiación en *N. crassa.* Se indican los periodos de tiempo en los que se presenta el estado hiperoxidante (color verde) y la aparición del nuevo estadio celular (color naranja) para cada transición morfogenética.

En la figura 4 se esquematiza cada Estado Hiperoxidante que lleva a cada transición morfogenética del ciclo asexual de *N. crassa*. Estas transiciones pueden sincronizarse a

partir de micelio creciendo en medio líquido que es filtrado y expuesto al aire (Toledo I 1986). Las hifas que quedan expuestas al aire comienzan a adherirse unas a otras durante los primeros 40 minutos de exposición al aire. El Estado Hiperoxidante que lleva a esta transición va de los 6 a los 15 minutos iniciales de exposición al aire. Las hifas que no se exponen al aire permanecen sueltas y no se diferencian.

La hifa adherida sirve de sustrato para la hifa aérea. La hifa aérea comienza a desarrollarse a las 2.5 h de exposición al aire y su crecimiento se observa hasta las 12 h. El Estado Hiperoxidante que lleva al desarrollo de la hifa aérea se observa en un lapso de 1.5 a 2.5 h de exposición al aire.

Los conidióforos pueden observarse en las puntas de la hifa aérea desde las 8.5 h de exposición del micelio al aire, hasta las 15 h donde los conidios ya se desprenden.

El Estado Hiperoxidante también se da al inicio de la germinación de los conidios, en un periodo de 5 a 30 minutos, lo que da lugar a hifas capaces de crecer hasta que un nuevo Estado Hiperoxidante se genere.

Con estos antecedentes se predice que la diferenciación celular en *N. crassa* se promueve en condiciones oxidantes y se inhibe en condiciones reductoras. Un ejemplo se observa en la cepa sin el gen para la catalasa 3 (CAT-3) (Michán S 2003). La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno. La cepa Δ*cat-3* afecta la adhesión de las hifas y forma más hifas aéreas y más conidios que la cepa silvestre (Fig. 5B, C y E). Por el contrario, cuando se cancela el gen para la NADPH-oxidasa 1 (NOX-1), una enzima que produce superóxido, la cepa Δ*nox-1* forma menos hifas aéreas y conidios que la cepa silvestre (Fig. 5D y E) (Cano-Domínguez N 2008). Una mutante sin el gen de la CAT-1 (Wang N 2007) también afecta la germinación (Fig 5A). Esto refuerza la idea de que el estado redox afecta el desarrollo de *N. crassa.*

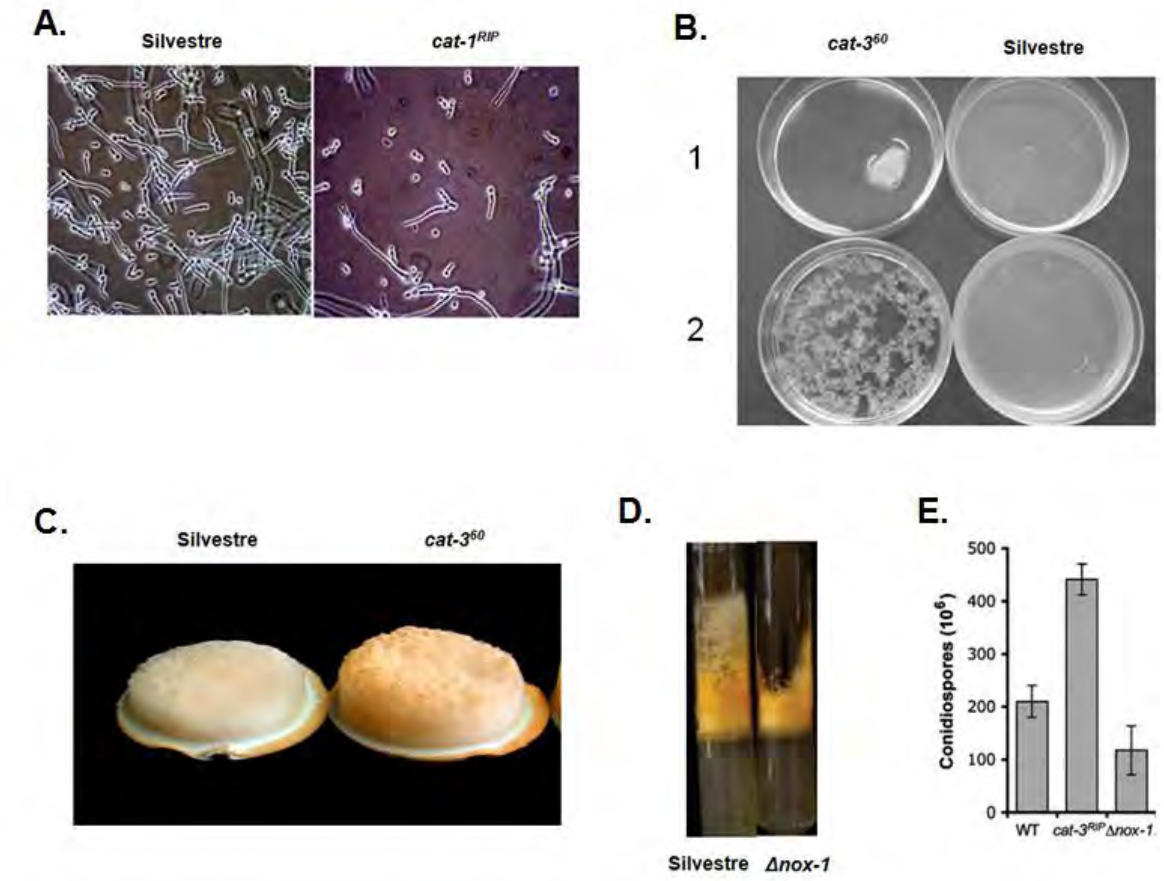


Figura 5. La cancelación del gen *cat-1*, *cat-3* o *nox-1* afecta el ciclo asexual de *N. crassa*. A. La germinación disminuye en la cepa *cat-1^{RIP}* en comparación a la cepa silvestre (Wang N 2007). **B.** La adhesión de las hifas se incrementa cuando se aumenta la relación aire/medio de cultivo (Michán S 2003). También se incrementa en la cepa *cat-3^{60},* así como la formación de las hifas aéreas y de los conidios, **C,** (Michán S 2003)**. D.** La formación del micelio aéreo disminuye en la cepa Δ*nox-1* respecto a la cepa silvestre y la formación de los conidios aumenta en la cepa *cat^{RIP}* y disminuye en la cepa *Δnox-1*, **E,** (Cano-Domínguez N 2008).

Las ERO participan también en el ciclo sexual de *N. crassa.* Se observó que la cepa Δ*nox-2* en una cruza homozigótica produce ascosporas que no germinan (Fig. 6A) y la cepa Δ*nox-1* no formó los protoperitecios (Fig. 6B) demostrándose que estas enzimas pro-oxidantes son claves para el desarrollo sexual (Cano-Domínguez N 2008).

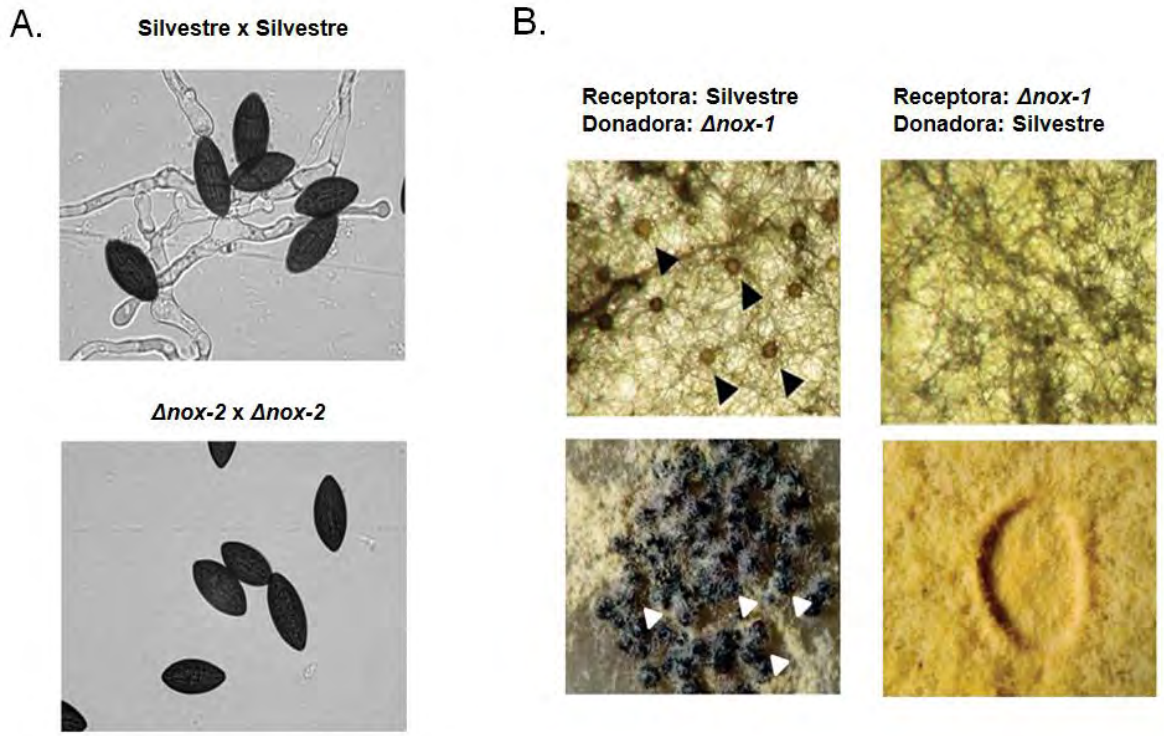


Figura 6. La ausencia de NOX-1 o NOX-2 afecta la fertilidad de *N. crassa.* A. Las cruzas homocigóticas de la cepa *Δnox-2* forman ascosporas que no germinan. **B.** La cepa *Δnox-1* no forma protoperitecios como lo hace la cepa silvestre (cabezas de flecha de color negro) y por lo tanto no puede formar los peritecios (cabezas de flecha de color blanco); es estéril como cepa receptora (Cano- Domínguez 2008).

Estos datos señalan una relación del estado redox con los cambios morfogenéticos que se llevan a cabo durante el ciclo sexual y asexual de *N. crassa*.

LA CONIDIACIÓN CÍCLICA EN *N. crassa*

La conidiación cíclica de *N. crassa* se caracteriza por la alternancia de periodos de crecimiento y de conidiación en un cultivo solido (en pista). El periodo del ciclo de crecimiento y de conidiación es de 22 horas. Este fenotipo se presenta cuando se adiciona al medio de cultivo un agente pro-oxidante, como la menadiona, o cuando se cancela el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), enzima que descompone el superóxido. También cuando se añade a un cultivo 3 amino-1, 2,4-triazol (3-AT), un inhibidor de las catalasas, la cepa silvestre conidia de manera cíclica, como la cepa *Δsod-1* (Yoshida Y 2011). La cepa *ras-1*^{bd} no requiere de agentes pro-oxidantes para conidiar cíclicamente, ya que se comporta así de manera endógena (Fig. 7C). Pero este fenotipo se puede modificar al cambiar el estado redox de manera exógena, acortando el periodo en presencia de un agente pro-oxidante como el Paraquat (Chávez-Canales M 2010) y restituyendo el fenotipo silvestre en presencia de un antioxidante, como la N-acetilcisteína (Belden WJ 2007, Gyöngyösi N 2013).

De manera notable, en comparación a la cepa silvestre, la cepa *ras-1*^{bd} presenta niveles mayores de ERO durante el proceso de conidiación, incluso superiores a los de la cepa *Δsod-1* (Rangel P , Yoshida Y 2011). Esto sugiere que la conidiación cíclica puede ser consecuencia de que las ERO, al sobrepasar la capacidad antioxidante de cada cepa, desencadena una conidiación prematura.

Siendo entonces que hifas que no pueden compensar niveles mayores de ERO, detienen su crecimiento y forman conidióforos lo que da lugar a los períodos de conidiación, mientras que hifas que logran compensar un estado más oxidante, posiblemente por una menor exposición al aire, permanecen creciendo y dan lugar a los periodos de crecimiento.

RAS-1 COMO PROTEÍNA DE SEÑALIZACIÓN

RAS es una GTPasa pequeña que regula una variedad de procesos celulares transduciendo estímulos extracelulares en una respuesta biológica específica como: la proliferación, la diferenciación y la supervivencia. La cepa *ras-1*^{bd} tiene una mutación puntual en el gen *ras-1* que lleva a sustituir una treonina por una isoleucina en la posición 79 dentro de la región Switch II (Fig. 7A). Este alelo es activo y es dominante, ya que una cepa que tiene el gen silvestre y el gen mutado *bd* (*band*) se comporta como el mutado (Hansberg W datos no publicados). Para determinar la mutación en la cepa *ras-1*^{bd} el grupo de Belden analizó cepas heterocariones. Cruzó la cepa Oak Ridge con el gen mutado con la cepa Mauriceville con el gen silvestre permitiendo así mapear el genoma a través de SNP (por las siglas en inglés *single-nucleotide polymorphism*). Observaron que todos los heterocariones que tuvieron el alelo *bd* tuvieron el fenotipo de conidicación cíclica, independientemente del radio de los núcleos, lo que corroboró que el alelo mutado es dominante (Belden WJ 2007).

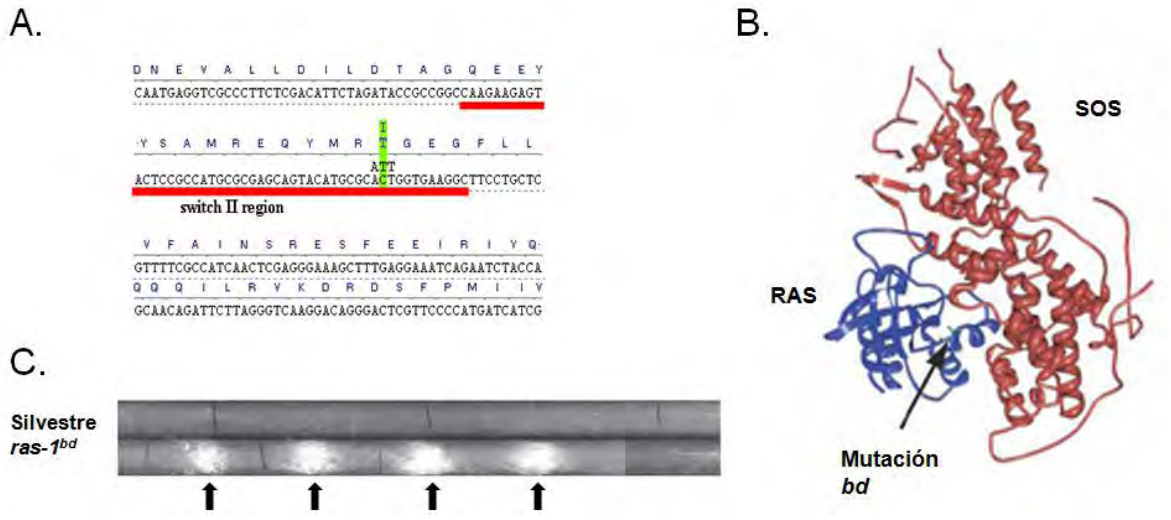


Figura 7. Mutación de RAS-1 en la cepa *ras-1*^{bd} de *N. crassa*. A. El análisis genómico identificó una mutación puntual en la región Switch II del gen *ras-1*. **B.** Estructura cristalográfica del complejo RAS y SOS. Se indica la localización de la mutación en la cepa *ras-1*^{bd}. **C.** Imágenes del

crecimiento de la cepa silvestre y la cepa *ras-1^{bd}.* Se señalan con flechas los periodos de conidiación (Belden WJ 2007).

La mutación en RAS-1 es en la región de unión a la proteína GEF. GEF activa a RAS intercambiando GDP por GTP, por lo que esta mutación podría afectar su estado de activación. Los estudios *in vitro* mostraron que se favorece el intercambio de GDP por GTP mientras que la actividad de GTPasa no se afecta. Aun se desconoce si esto sucede *in vivo*.

Dado lo descrito para la cepa *ras-1^{bd}* de *N. crassa*, es probable que RAS-1 determine si las hifas crecen o conidian, dependiendo de su estado redox. Para conocer las vías de transducción de señales reguladas con RAS-1 se buscaron en el genoma las proteínas que tienen un dominio de interacción con RAS, llamado RA (por las siglas en inglés: *RAS Association*).

La búsqueda identificó a tres genes: *cr-1* (adenilato ciclasa), *nrc-1* (una MAPKKK) y *ste50* (una proteína que en *S. cereviciae* actúa unida al homólogo de NRC-1). Esto permitió plantear un modelo de señalización mediante el cual RAS-1 podría regular el crecimiento, la conidiación e incluso el desarrollo sexual. Dicho modelo se esquematiza en la Figura 8 y se explica a continuación.

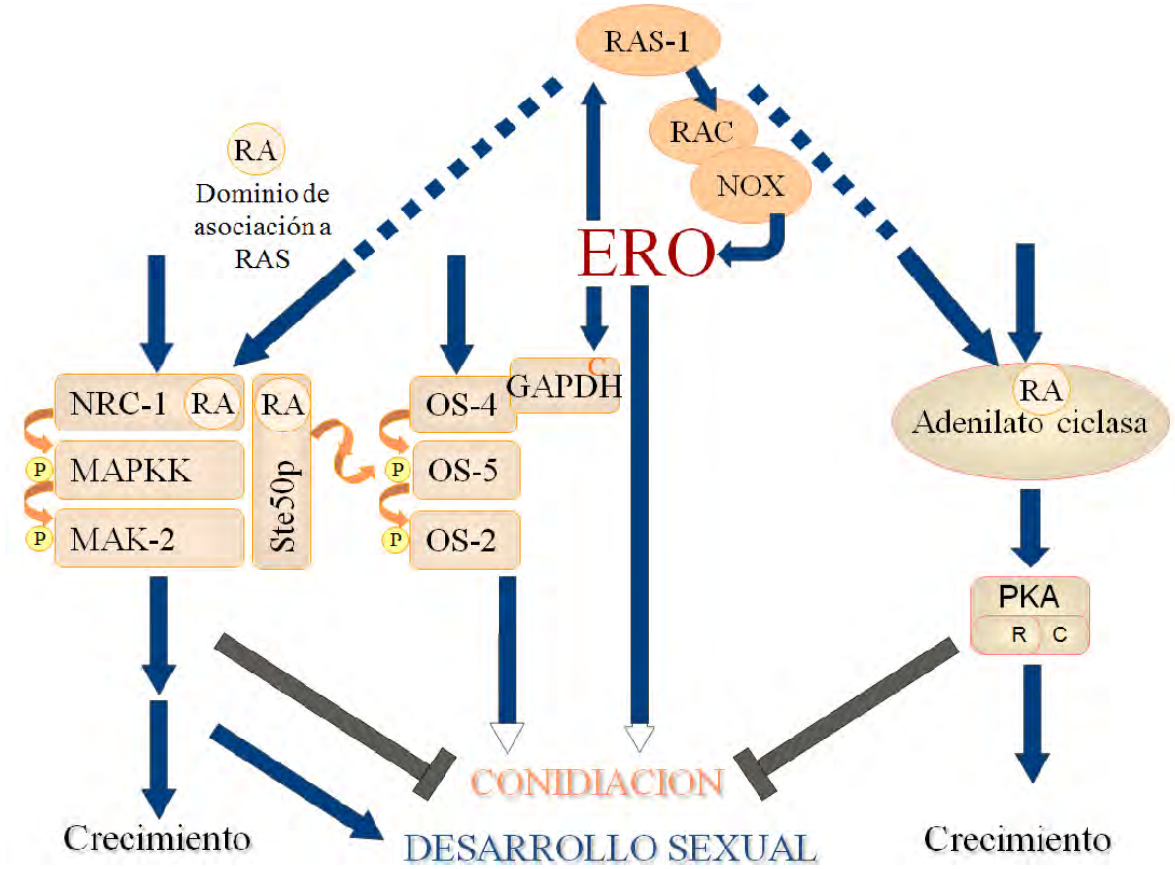


Figura 8. Modelo de señalización a través de RAS-1. Esquema de las vías por las cuales RAS-1 podría regular el crecimiento, la conidiación y el desarrollo sexual. Esta regulación es mediada en parte por las proteínas con dominios de asociación a RAS (RA).

Regulación del crecimiento.

Existen dos vías mediante las cuales RAS-1 podría regular el crecimiento. El primero es un módulo de MAP cinasas y el segundo es a través de la adenilato ciclasa. En el módulo de MAP cinasas participa NRC-1, MAPKKK que en su ausencia se afecta el crecimiento radial y lleva a una conidiación constitutiva, por lo que se denominó NRC-1 por sus siglas en ingles: nonrepressible conidiation (Kothe GO 1998). NRC-1 tiene el dominio RA lo que sugiere una regulación directa por RAS. MAK-2 es una MAPK que forma parte de esta vía y cuya ausencia lleva a un fenotipo similar a Δ*nrc-1* (Li D 2005).

Por otra parte la adenilato ciclasa (AC) también participa en el crecimiento de *N. crassa*, ya que su ausencia disminuye el crecimiento de las hifas (Terenzi HF 1974) y produce conidios en abundancia pero sin que el micelio crezca (Kays AM 2000). La AC tiene un dominio RA lo que también le permitiría ser regulada directamente por RAS.

El módulo de MAP cinasas y la vía de la AC son vías independientes, ya que al cancelar los genes que codifican para la MAK-2 y AC se disminuye aún más el crecimiento que al cancelar un solo gen.

Regulación de la conidiación.

Las vías antes descritas para el crecimiento no son importantes para la conidiación. Esto porque al cancelar los genes que codifican para NRC-1 o AC no se disminuye la conidiación, sino al contrario se promueve. Para este proceso la vía importante es el módulo de MAP cinasas compuesta por OS-4, OS-5 y OS-2. La cancelación de estos genes lleva a un cambio en la composición de la pared celular (Livingston LR 1969) y a una disminución tanto en la hifa aérea como en la conidiación (Grindle M 1982, Zhang Y 2002). En *Botrytis cinérea* BcSAK1, el homólogo de OS-2, también es importante para la formación de los conidios e incluso se fosforila bajo el estrés oxidante (Segmüller N 2007).

La importancia de OS-2 bajo el estrés oxidante también se observa para sus homólogos FgHog1 que se activa en *Fusarium graminearum* (Zheng D 2012) y HogA en *Aspergillus nidulans* bajo estas condiciones. Para este último se demostró la participación indispensable de PbsB y SskB, homólogos de OS-5 y OS-4 respectivamente (Furukawa K 2005).

OS-2 también es importante en la respuesta a distintos tipos de estrés en *N. crassa* (Zhang Y 2002, Fujimura M 2003, Jones CA 2007, Noguchi R 2007) por lo que esta vía podría establecer el vinculo entre el estrés oxidante y la formación de los conidios como respuesta a éste.

La activación de OS-2 puede regularse por RAS, similar a *Beauveria bassiana* donde la cancelación de Ras3 lleva a defectos en la fosforilación de Hog1, homólogo de OS-2, y a una mayor sensibilidad al estrés oxidante (Guan Y 2015). La regulación de la vía de OS-2 en *N. crassa* no parece ser directa por RAS-1 sino que podría ser a través de NRC-1 y/o STE50. Esto en base a lo observado en *S. cerevisiae* donde sus homólogos STE11 y STE50 regulan a HOG1, homólogo de OS-2, en condiciones de estrés oxidante.

Además de la vía de MAP cinasas de OS-2, se describe en *Cryptococcus neoformans* que el homólogo de RAC funciona río abajo de RAS1, controlando el crecimiento y la diferenciación celular a altas temperaturas (Vallim MA 2005). En *Collectotrichum trifolii* la conidiación que disminuyó por una forma activa dominante de RAS, se restableció en presencia de una forma activa dominante de RAC (Chen C 2004) lo que sugiere que RAS, a través de RAC, también puede regular la conidiación en *N. crassa*.

De manera interesante RAS puede llevar a un estado más oxidante a través de NOX, tal como se describe para Yno1p, una NADPH oxidasa en *S. cerevisiae* (Leadsham JE 2013). Una de las vías por el cual se propone que esto sucede es a través de RAC. RAC regula la generación de ERO, ya sea activando de forma directa a NOX o a través de subunidades reguladoras como NoxR, como se describe en *Epichloë festucae* (Takemoto D 2006).

Regulación del desarrollo Sexual.

Cancelar los genes de las proteínas que participan en el módulo de MAP cinasas MAK-2 o en el de OS-2 afecta el desarrollo sexual, en particular la formación del cuerpo fructífero (Lichius A 2012). Esto señala que, a pesar de que en el ciclo asexual ambas vías participan en procesos diferentes, en el ciclo sexual tienen un papel clave en la fertilidad femenina.

Por su lado cancelar el gen para la AC solo lleva a un retraso en la maduración de los peritecios lo que indica que esta vía es dispensable para el desarrollo sexual. El papel de RAS-1 en el desarrollo sexual aún se desconoce pero las vías de OS-2 y MAK-2 representan dos vías por las cuales se podría regular este desarrollo.

EFECTORES DE RAS-1: NRC-1 Y STE50

NRC-1 y STE50 son proteínas que por su dominio RA pueden interactuar directamente con RAS-1, participando en la regulación del crecimiento y de la conidiación de *N. crassa* dependiendo del estado redox. En este apartado se describe lo que hasta ahora se conoce acerca de su papel en el ciclo asexual.

NRC-1

Las MAP cinasas regulan distintos procesos celulares como la diferenciación celular, la progresión del ciclo celular o la respuesta a distintos tipos de estrés (Lewis TS 1998, Garrington TP 1999). En *N. crassa* se identifican tres vías de MAP cinasas. La vía compuesta por NRC-1, MEK-2 y MAK-2 es homóloga a la que participa en la respuesta a feromona en *S. cerevisiae*: STE11, STE7 y FUS3, respectivamente (Pandey A 2004, Li D 2005, Maerz S 2008, Fleissner A 2009).

NRC-1 es una MAPKKK que reprime la conidiación en *N. crassa* (Kothe GO 1998). NRC-1 es clave para la fosforilación de MAK-2 durante la germinación (Fig. 9) señalando que efectivamente ambas proteínas participan en la misma vía.

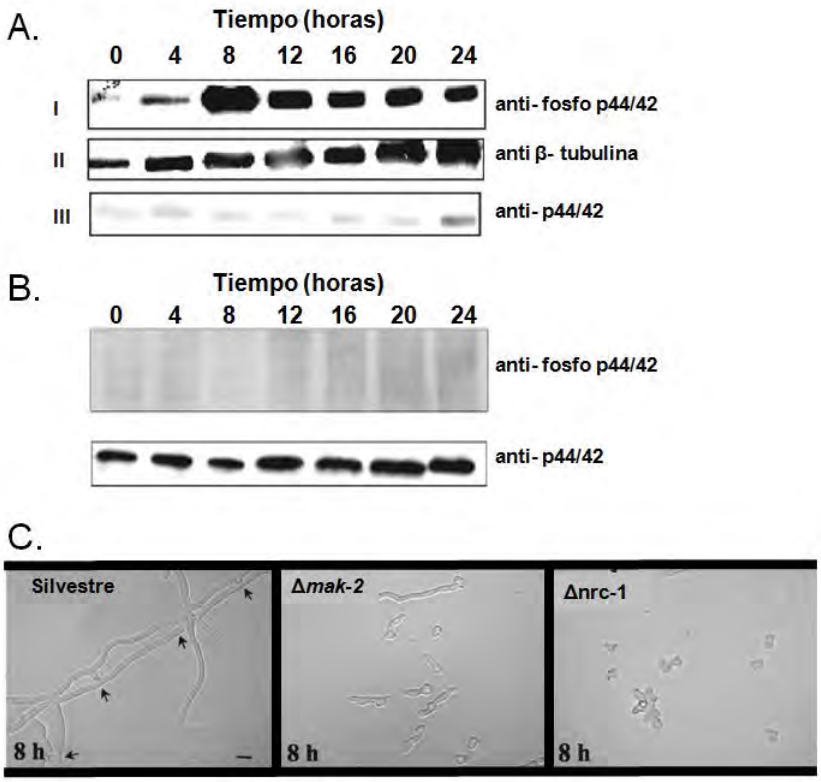


Figura 9. La fosforilación de MAK-2 depende de NRC-1 durante la germinación de *N. crassa.* Inmunodetección de la fosforilación de MAK-2 (anti-fosfo p44/42) (I), proteína total de MAK-2 (anti p44/42) (III) y β-tubulina como control de carga (II) de conidios de la cepa silvestre que están germinando (**A**) y de la cepa Δ*nrc-1* (**B**). Imágenes de los conidios germinando de las cepas: silvestre, Δ*mak-2* y Δ*nrc-1* (**C**). La barra representa una longitud de 30 µm. Imágenes modificadas de Pandey A 2004.

Cuando se cancela el gen *mak-2* se obtiene un fenotipo similar a la de la cepa Δ*nrc-1*, es decir, conidia en condiciones de crecimiento. También se afecta el crecimiento apical, la fusión celular y el desarrollo de la hifa aérea (Fig. 10). Esto muestra que la vía es importante para promover el crecimiento e inhibir la conidiación, sin embargo se desconoce si su participación es dependiente del estado redox de *N. crassa*.

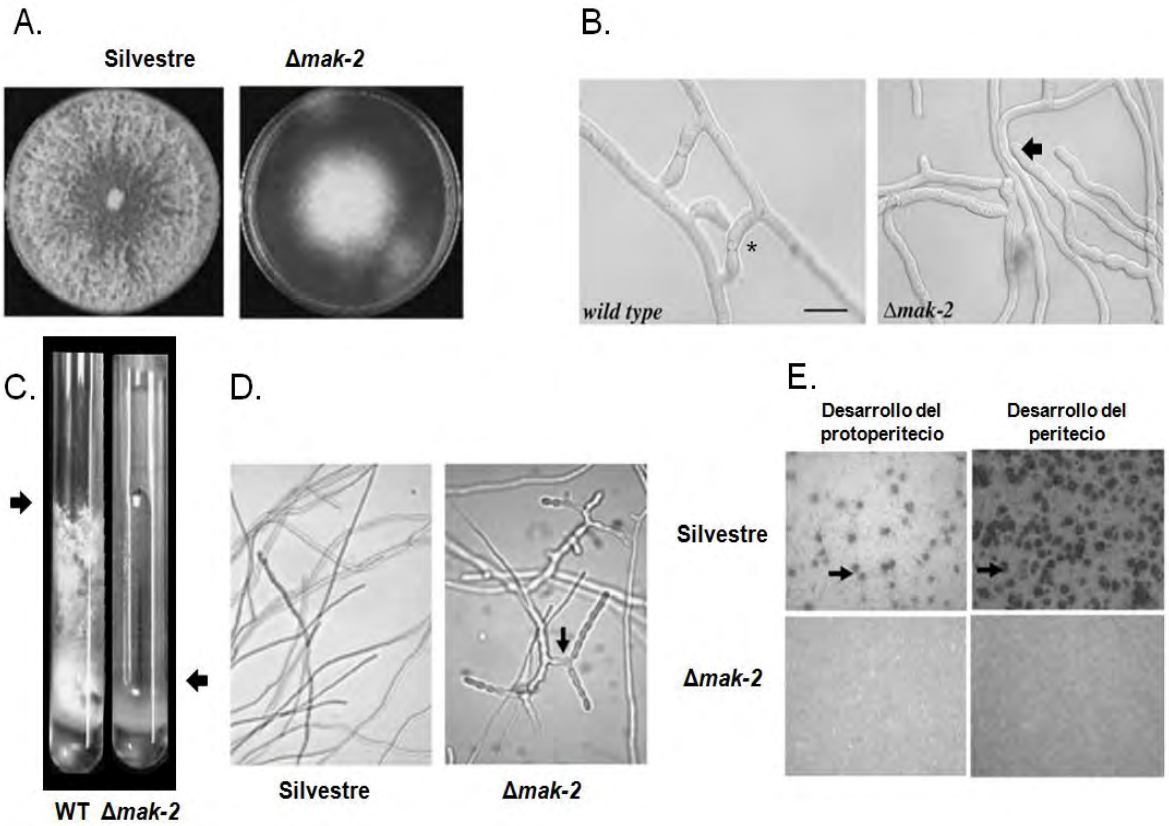


Figura 10. MAK-2 contribuye al crecimiento, la fusión celular y el desarrollo del protoperitecio en *N. crassa*. A. El crecimiento apical disminuye en la cepa Δ*mak-2* **B.** La microscopía muestra la fusión de las hifas en la cepa silvestre (asterisco) pero no en la cepa Δ*mak-2*, a pesar de que haya contacto célula-célula (flecha negra). **C.** La altura de las hifas aéreas (flechas negras) se reduce en la cepa Δ*mak-2*. **D.** Los conidióforos se desarrollan en la cepa Δ*mak-2* (flecha negra) en condiciones de crecimiento. **E.** La formación del protoperitecio y su maduración a peritecio no se observa en la cepa Δ*mak-2*. Imágenes modificadas de: Dan Li 2005 y Maerz S 2008.

STE50

STE50 es una proteína que se compone estructuralmente de un dominio SAM (por las siglas en inglés *Sterile-α Motif*) en el extremo amino terminal y un dominio RA en el extremo carboxilo terminal. De aquí que se proponga que mediante el RA interactúa directamente con RAS-1. El dominio SAM le permite formar homodímeros o hetero-oligómeros con otros dominios SAM (Qiao F 2005).

El nombre STE50 proviene de *S. cerevisiae*. En este organismo es importante para el apareamiento, ya que al cancelar el gen la cepa es estéril (Ramezani Rad M 1992, Xu G 1996). STE11, el homólogo de NRC-1, también participa en el apareamiento.

STE11 y STE50 interactúan directamente. Un análisis *in vivo* mostró que STE50 se une a STE11 a través del dominio SAM (Posas F 1998, Wu C 1999, Jansen G 2001). También se determinó *in vitro* que el dominio SAM de STE50 homodimeriza y heterodimeriza con el

dominio SAM de STE11 (Bhattachariya S 2004, Grimshaw SJ 2004, Kwan JJ. Warner N 2006).

STE11 y STE50 señalizan de manera conjunta durante el crecimiento vegetativo, el apareamiento y la respuesta al estrés en *S. cerevisiae* (Ramezani-Rad M 2003), sin embargo se desconoce si esta participación conjunta también sucede en *N. crassa.*

STE50 es una proteína adaptadora que se encarga de reclutar proteínas a la membrana plasmática. En *S. cerevisiae* recluta a STE11, en conjunto con Sho1 y Cdc42 que también son proteínas adaptadoras. Esto permite una señalización eficiente en condiciones como el estrés osmótico (Tatebayashi K 2006). Aunque está ampliamente descrito el papel de STE50 en *S. cerevisiae,* aún se desconoce su función en *N. crassa*. Dado que es posible la interacción de STE50 con RAS-1, quizás participe en el control del crecimiento y la conidiación, dependiendo del estado redox.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La conidiación es una respuesta ante un estado hiperoxidante en *N. crassa*, es decir crece y ante un aumento en las ERO detiene el crecimiento, se diferencia y continúa creciendo. Los mecanismos que participan en esta respuesta aún no son claros. Se sabe que RAS-1 regula la alternancia entre el crecimiento y la diferenciación dependiendo del estado redox de la célula, sin embargo se desconocen las vías que regula.

NRC-1 y STE50 podrían ser parte de estas vías ya que poseen un dominio RA, sin embargo no se ha evaluado su relevancia bajo el estrés oxidante. La cancelación de *nrc-1* ó *ste50* permitirá saber si participan en la respuesta fisiológica ante un aumento en las ERO.

HIPÓTESIS

La cancelación de NRC-1 ó STE50 en *N. crassa* llevará a defectos similares a lo largo del ciclo asexual: una menor germinación de los conidios, un menor crecimiento de las hifas y una mayor conidiación.

Asimismo la vía de OS-2 que lleva a la conidiación, también se activa en respuesta ante el estrés oxidante. Por lo que la ausencia de NRC-1 ó STE50 no solo llevará a una mayor conidiación, sino también a una mayor respuesta en condiciones de estrés oxidante (como la presencia de peróxido de hidrógeno y la exposición a l luz)..

OBJETIVO GENERAL

Comparar los fenotipos de la cepa silvestre, Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en condiciones sin estrés y con estrés de tipo: oxidante y lumínico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cancelar el gen *nrc-1* en *N. crassa*.
2. Cancelar el gen *ste50* en *N. crassa*.
3. Comparar los estadios del ciclo asexual de las cepas: silvestre, Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en condiciones de oscuridad, estrés oxidante y estrés lumínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plásmido utilizados

- Cepas de *N. crassa*

La cepa silvestre 74-OR231A y la cepa Δ*mus-51* utilizadas en este trabajo provinieron de la colección del centro de genética de hongos "Fungal Genetics Stock Center" (FGSC) del linaje ST. Lawrence (Oak Ridge, Cal. EUA).

- Plásmido

El plásmido pCSN44 también provino de la colección del centro de genética de hongos "Fungal Genetics Stock Center" (FGSC). El plásmido pCSN44 tiene el gen hyg^r que confiere la resistencia a Higromicina B.

- Cepa de *E. coli*

Se usó la cepa DH5α para almacenar y mantener el plásmido pCSN44.

Transformación de DH5α

Se transformó la cepa DH5α para la propagación del plásmido pCSN44. Se agregaron 50 ng del plásmido a la cubeta de electroporación de 0.2 cm. Se adicionaron 35 µl de células competentes. Se electroporó usando 1.8 kV, 200 Ω y 25 µF en los instrumentos: Gene Pulser II y Pulse Controller II (Bio-Rad, Hercules, CA). Inmediatamente se añadió 1 ml de 2XYT a las células.

Se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo. Se incubaron a 37°C, 1-1.5 h. Las células se plaquearon en medios sólidos de LB y se incubaron a 37°C entre 16 y 24 h. Las colonias se aislaron y se incubaron en medio líquido LB a 37°C durante 12 h, agitando a 280 rpm. Una vez crecidas, se almacenaron a -70°C con glicerol al 15%.

Condiciones de cultivo.

- Ciclo Asexual

Las cepas se cultivaron en medio mínimo de Vogel-Sacarosa (VS) que contiene 1.5% de sacarosa como fuente de carbono y sales de Vogel (Tabla I) (Davis RH 1970).

Los medios de cultivo sólidos se hicieron con agar al 2% con una relación aire/medio de cultivo 5:1.

Los medios de cultivo líquidos se hicieron con una relación aire/medio de cultivo 5:2 con agitación orbital a 200 rpm.

Tabla I. Solución Vogel 50X

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Agua	H_2O	755 ml
Citrato de sodio tribásico dihidratado	$HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \cdot 2H_2O$	125 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	250 g
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	100 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5 g
Solución de biotina*	-	2.5 ml
Solución de elementos traza**	-	5 ml

Compuestos para 1 L de Vogel 50X. * La solución de biotina se preparó al disolver 10 mg en 100 ml de Etanol al 50%. Se mantuvo a -20°C hasta su uso. ** La solución de elementos traza se describe en la Tabla II.

Tabla II. Solución de Elementos Traza

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Ácido cítrico monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	5 g
Sulfato de zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
Sulfato de amonio hierro (II) hexahidratado	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_20$	1 g
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_20$	0.25 g
Sulfato de manganesio monohidratado	$MnSO_4 \cdot 1H_2O$	0.05 g
Ácido ortobórico	H_3BO_3	0.05 g
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.05 g

Compuestos para 100 ml de elementos traza.

- Ciclo sexual

Para las cruzas sexuales se inocularon 5 X 10^6 conidios en cajas petri con medio de inducción para el ciclo sexual (Tabla III). Se incubaron a 25° C en presencia de luz durante 7 días para la formación de los protoperitecios.

Tabla III. Medio de Inducción para el Ciclo Sexual de *N. crassa*

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Nitrato de potasio	KNO_3	1 g
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	0.7 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	0.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_20$	0.5 g
Cloruro de calcio	$CaCl_2$	0.1 g
Cloruro de sodio	NaCl	0.1 g
Solución de biotina*	-	100 µl
Solución de elementos traza**	-	15 g
Agar	-	20 g

Compuestos para 1 L de medio de inducción del ciclo sexual. *, ** Descritos anteriormente.

Una vez formados los protoperitecios, los cultivos fueron fertilizados con $1X10^6$ de conidios del tipo de apareamiento opuesto y la incubación continuó entre 12 y 14 días para la formación y maduración de los peritecios.

Las ascosporas expulsadas de los peritecios se cosecharon en agua estéril y se activaron a 60°C durante 30 min. Se plaquearon en el medio para aislar colonias (Tabla IV) y se incubaron de 24 a 48 h a 30°C en oscuridad.

Tabla IV. Medio para aislar colonias de *N. crassa*

Solución A		Solución B	
Compuesto	**Cantidad**	**Compuesto**	**Cantidad**
Vogel 50X	2 ml	L-sorbosa	2 g
Fructuosa	0.05 g	Agar (Difco)	1.8 g
Glucosa	0.05 g	Agua	65 ml
Agua	35 ml		

Para 100 ml se preparan las soluciones A y B, se esterilizan a 121°C durante 15 min y se mezclan antes de verter en cajas Petri.

Las colonias de las ascosporas que germinaron se aislaron y se transfirieron a medios sólidos VS para su propagación.

Extracción del ADN

Los cultivos líquidos se inocularon con $1X10^6$ conidios/ml y se incubaron durante 48 h a 30°C sin agitación. El micelio se filtró y se congeló con nitrógeno líquido. Se secó al vacío utilizando una centrifuga Speed Vac SC110 (Savant) durante 4 h y el micelio se pulverizó con una espátula.

Para la purificación del ADN genómico de *N. crassa* se utilizó el método de Timberlake (Timberlake WE 1980) y que se describe brevemente a continuación:

- 10 mg de micelio se homogenizó con 600 µl de Amortiguador de Extracción. Se incubó a 68°C durante 30 min y se centrifugó a 755 xg durante 5 min
- El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 50 µl de 3 M de acetato de potasio, mezclando por inversión.
- Se incubó a 4°C durante 8 min y se centrifugó a 755 xg durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se mezcló con 600 µl de isopropanol.
- Se centrifugó a 755 xg durante 10 min y se removió el isopropanol. La pastilla se resuspendió en 300 µl de Amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)
- Se añadieron 800 µl de etanol al 95% y 15 µl de 1 M de cloruro de litio.
- Se incubó a 4°C durante 5 min y se centrifugó a 755 xg durante 2 min. Se descartó el sobrenadante.
- Se le agregó 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 755 xg durante 2 min. Se descartó el sobrenadante.
- La pastilla se resuspendió en 100 µl de Amortiguador TE y se guardó a -20°C.

Cancelación de los genes *ste50* o *nrc-1* en *N. crassa*

El método “Cassette Knockout” permite generar mutantes en *N. crassa*. Se basa en el uso de un marcador de selección que está sitiado por regiones de ADN circundante al gen de interés (Aronson BD 1994). El rendimiento inicial fue bajo pero la eficiencia se mejoró con el uso de tecnologías de marcadores divididos (Catlett NL 2003). Este método es la base del proyecto del genoma *Neurospora* con el cual se cancelaron la mayoría de los genes (Darmouth [Internet] Nuevo Hampshire: Dartmouth [citado 1 ago 2011] Disponible en http://www.dartmouth.edu/%7Eneurosporagenome/).

Se usó la resistencia a Higromicina, que se confiere por el gen *hyg*^{r} del plásmido pCSN44, como marcador de selección.

A partir del ADN genómico de *N. crassa*, los cebadores C1 y C2 amplifican mediante PCR una región no codificante (RNC) en el extremo 5´ del gen que se desea cancelar, antes del codón de inicio. El cebador C2 se complementa con el extremo 5´ de *hyg*^{r} (Fig. 11A)

Los cebadores C3 y C4 amplifican con la PCR una RNC en el extremo 3´ del mismo gen, después del codón de paro. El cebador C3 se complementa con el extremo 3´de *hyg*^{r} (Fig. 11A).

A partir del plásmido pCSN44, los cebadores C5 y C6 amplifican con la PCR a *hyg*^{r}. Los cebadores C5 y C6 se complementan a las RNC de los extremos 5´y 3´ del gen a cancelar, respectivamente (Fig. 11B).

El siguiente paso es construir *hyg*^{r} sitiado de las RNC 5´ y 3´ del gen a cancelar. Con la complementariedad entre la RNC 5´ del gen blanco y el 5´de *hyg*^{r}, así como la RNC 3´ del gen blanco y el 3´de *hyg*^{r}, se unen los tres fragmentos mediante una PCR de fusión (Fig. 11C).

Una vez con la construcción *hyg*^{r} sitiado con las RNC 5´ y 3´ del gen, mediante la recombinación homóloga se sustituye *hyg*^{r} por el gen blanco en el genoma de *N. crassa* (Fig. 11D).

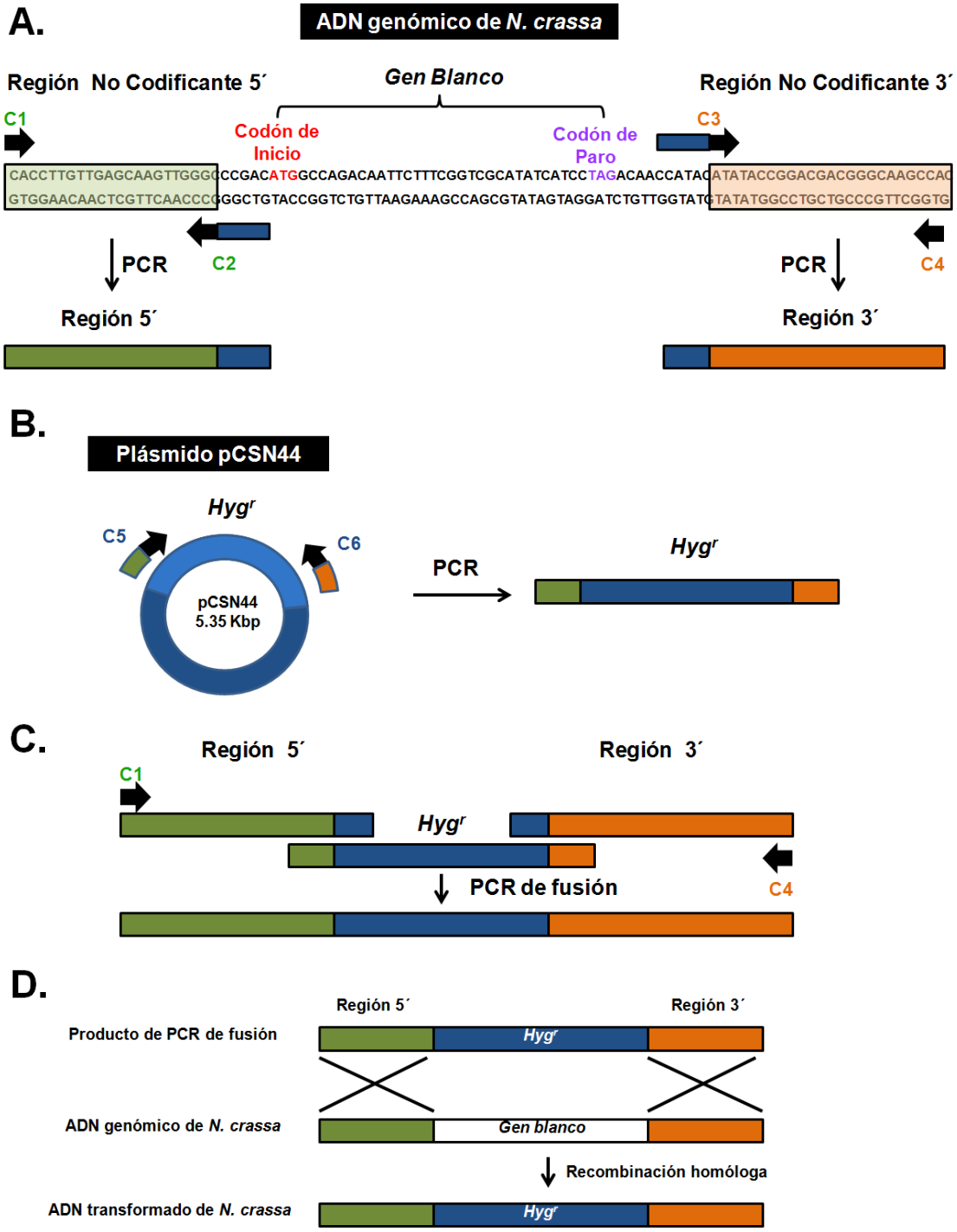


Figura 11. Método de "Cassette Knockout". A. Amplificación por PCR de las regiones no codificantes en los extremos 5´ y 3´ del gen que se desea cancelar usando como templado el ADN genómico de *N. crassa*. **B.** Amplificación por PCR del gen *hygr* usando como templado el plásmido pCSN44. **C.** Fusión y amplificación con la PCR del gen *hygr* con las regiones no codificantes 5´y 3´ del gen. **D.** Recombinación homóloga del producto de PCR de fusión en **C** y el ADN genómico de *N. crassa*, dando lugar a la supresión del gen blanco. C: Cebador

Las Tablas V y VI muestran la secuencia de los cebadores que se utilizaron para la cancelación de *nrc-1* y *ste50*, respectivamente.

Tabla V. Secuencia de cebadores para la cancelación de *nrc-1* en *N. crassa.*

Nombre del Cebador	Secuencia 5´- 3´	Tm para PCR	Producto de PCR
C1 Nrc5kb	**GCAGGGAAGTCTTGCAGGGTAAGT**	67°C	RNC 5´
C2 Hyg5Nrc5kb	**TATCATCTTCTGTCCTGTCCGGCAATCA**	67°C	RNC 5´
C3 Hyg3Nrc3Kb	**AGTTCTAGAGCGGCCGTGTATGTGTTGCTA**	67°C	RNC 3´
C4 Nrc3kb	**CCTGCAGGGCTTGCATACCTTAAGAA**	67°C	RNC 3´
C5 Nrc5Hyg5	**TGATTGCCGGACTGAGGACAGAAGATGATA**	69°C	hyg^r
C6 Nrc3Hyg3	**TAGCAACACATACAGGCCGCTCTAGAACT**	69°C	hyg^r

Se indican las complementariedades de los cebadores. Verde: RNC 5´ de *nrc-1*, Azul: hyg^r, Naranja: RNC 3´ de *nrc-1*.

Tabla VI. Secuencia de cebadores para la cancelación de *ste50* en *N. crassa.*

Nombre del Cebador	Secuencia 5´-3´	Tm para PCR	Producto de PCR
1 Ste505kb	**GCAGGCACTCAATCGGCCA**	65°C	RNC 5´
2 Hyg5Ste505kb	**TATCATCTTCTGTCAAGCGGGTATCAGC**	65°C	RNC 5´
3 Hyg3Ste503Kb	**AGTTCTAGAGCGGCCTTCGGTATCAACGTG**	67°C	RNC 3´
4 Ste503kb	**CTGCAGGATCGATGTACGGTTCC**	67°C	RNC 3´

5 Ste50Hyg5	**GCTGATACCCGCTTGACAGAAGATGATA**	67°C	*hyg*^{r}
6 Ste50Hyg3	**CACGTTGATACCGAAGGCCGCTCTAGAACT**	67°C	*hyg*^{r}

Se indican las complementariedades de los cebadores. Verde: RNC 5´ de *ste50*, Azul: *hyg*^{r}, Naranja: RNC 3´ de *ste50*.

- Reacción de la PCR

Para el método de la PCR se usó la enzima Elongase-mix (Invitrogen, Carisbad, CA, EUA). El programa que se utilizó para la amplificación de cada fragmento consistió en una desnaturalización inicial de 94°C (3 minutos), 1 ciclo, seguido por 30 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por una desnaturalización a 94°C (30 segundos), una alineación a la Tm que se indica en la Tabla respectiva (45 seg), una extensión a 68°C (3 min) y una extensión final a 68°C (10 min). Las reacciones se realizaron en presencia de 1.5 y 2 mM de cloruro de magnesio.

Cada producto de la PCR se analizó en gel de agarosa al 1%. El ADN se recuperó de los fragmentos cortados del gel, utilizando el estuche QiaQUICK Gel Extraction (No. Cat. 28704 QIAGEN GmbH, Alemania), de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante.

- Reacción de la PCR de fusión

Para el método de la PCR se usó el estuche “Expand Long Template PCR System” (No. Cat. 11681834001 Roche).

Los productos de la PCR (RNC 5´, RNC 3´ y el gen *hyg*^{r}) se mezclaron en un mismo tubo de reacción y se usaron como templado para la PCR. Se utilizaron los cebadores C1 y C4 (NRC5kb y NRC3kb ó Ste505kb y Ste503kb) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	94° C	2 min
10 ciclos iniciales de:		
Desnaturalización	94° C	15 s
Alineación	60° C	30 s
Extensión	68° C	5 min
20 ciclos finales de:		
Desnaturalización	94° C	15 s
Alineación	60° C	30 s
Extensión	68° C	5 min*

* 5 s adicionales con cada ciclo

Extensión final	72° C	7 min

El producto de la PCR se analizó en gel de agarosa al 1% y se recuperó con el método anteriormente descrito. Una vez obtenida la construcción se evaluó su pureza mediante un gel de agarosa y se usó para la transformación de la cepa Δ*mus-51* de *N. crassa*.

Obtención de los conidios de *N.* crassa

Los medios de cultivo sólido VS se inocularon con $1X10^6$ de conidios/ml. Los cultivos se incubaron 3 días a 25°C en oscuridad y 2 días a 30°C en luz. Los conidios se recuperaron con agua estéril fría y agitando en frío. La suspensión de conidios se colectó en tubos Eppendorff de 1.5 ml y se almacenó a -70°C.

Transformación de los conidios de *N. crassa*

Se usaron 50 µl de una suspensión de conidios ($1.25 X 10^8$) de la cepa Δ*mus-51* para la transformación. La suspensión de conidios se preparó en 1 M de sorbitol. Se mezcló con 40 µl (10 µg) de ADN del producto de la PCR de fusión.

La mezcla se incubó en hielo durante 5 min. De esta mezcla se transfirieron 40 µl a cubetas de electroporación de 0.2 cm y se electroporó usando 1.5 kV, 600 Ω y 2.5 µF en los instrumentos: Gene Pulser II y Pulse Controller II (Bio-Rad, Hercules, CA).

Después de la electroporación, se añadieron 960 µl de 1 M de sorbitol frío. Se mezcló con 25 ml de la solución de recuperación (medio Vogel 1x con 2% de extracto de levadura) y se incubó a 30°C durante 2 h. Al término de las 2 h se mezcló con 25 ml de agar de regeneración (medio Vogel 1X con 1 M de sorbitol, 2% de extracto de levaduras y 1% de agar) y se plaqueó inmediatamente en cajas petri con medio sólido Vogel 1X con 2% de L-sorbosa, 0.05% de fructuosa y 0.05% de glucosa. Los conidios transformados se incubaron a 25°C en oscuridad de 24 a 48 h. Como método de selección las placas se adicionaron con 200 µg/ml de Higromicina B.

Propagación de las colonias transformadas de *N. crassa*

Se seleccionaron colonias al azar y se estriaron en medio sólido para aislar colonias. Se incubaron a 25°C en oscuridad de 24 a 48 h. De cada medio se seleccionó una colonia y se estrió en medio nuevo para aislar colonias. Este paso se repitió 3 veces en presencia de 200 µg/ml de Higromicina B en el medio de cultivo.

Finalmente las colonias seleccionadas se propagaron en VS sólido a 25°C en oscuridad durante 3 días, se recuperaron los conidios y se almacenaron a -70°C.

Análisis de las cepas mutantes mediante hibridación tipo “Southern”

Para demostrar la sustitución del gen *nrc-1* ó *ste50* por el gen hyg^r en el ADN genómico de *N. crassa* se realizó un análisis mediante hibridación tipo “Southern”. Esta hibridación

se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Sambrook y Rusell (Sambrook J 2001).

Se extrajo el ADN genómico conforme al protocolo descrito anteriormente y a partir de 10-15 µg de ADN se digirió con la endonucleasa de restricción correspondiente. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis a 85 mV durante 3 h en un gel de agarosa al 1%.

El gel se incubó en una solución 0.25 N de ácido clorhídrico durante 15 min a temperatura ambiente en agitación constante. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se incubó en una solución desnaturalizante (1.5 M de NaCl y 0.5 M de NaOH) durante 30 min a temperatura ambiente en agitación constante.

El gel se enjuagó 3 veces con agua destilada y se incubó en una solución neutralizante (1.5 M de NaCl y 0.5 M de Tris-HCl pH 7.2) durante 30 min a temperatura ambiente.

El ADN en el gel se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech #RPN303N, Buckinghamshire, UK). El ADN se fijó a la membrana mediante una exposición de 120000 µJoules con 25 y 50 s de luz ultravioleta en un equipo Stratalinker 2400 (STRATAGENE).

Para el marcaje de la sonda se utilizó el estuche “Rediprime II Random Prime Labelling System” (#TRK432 Amersham) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se diluyó el ADN por marcar a una concentración de 2.5-25 ng en 45 µl de Buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) Se desnaturalizó incubando a 95-100°C durante 5 min. Se fragmentó incubando en hielo durante 5 min y se pasó al tubo de reacción.

Se añadieron 5 µl de [α-^{32}P] dCTP y se mezcló succionando con una pipeta 12 veces. Se incubó a 37°C durante 10 min. Para detener la reacción se añadieron 5 µl de 0.2 M de EDTA. Antes de la hibridación se desnaturalizó incubando a 95-100°C durante 5 min y después incubando en hielo durante 5 min.

La solución de pre-hibridación se precalentó a 42°C. La solución de esperma de salmón se desnaturalizó calentándolo a 95°C durante 5 min, se enfrió y se centrifugó. Se adicionó a la solución de pre-hibridación a 100 µg/ml.

En el tubo de hibridación se colocó la membrana y se adicionó la solución de pre-hibridación. Se incubó a 42°C durante 5 h en horno de hibridación.

Se precalentó la solución de hibridación a 49°C y se le agregó la sonda. Se descartó la solución de pe-hibridación y se agregó la solución de hibridación. Se incubó a 49°C por un mínimo de 12 h en horno de hibridación.

Se precalentó la solución de lavado a 49°C. Se removió la solución de hibridación al término de las 12 h y la membrana se incubó en la solución de lavado a 49°C durante 15 min.

Se precalentó la solución de lavado 2X a 49°C. Se descartó la solución de lavado 6X y se agregó la solución de lavado 2X. Se incubó a 49°C durante 10 min. Se descartó la solución de lavado y se dejó secar la membrana.

La membrana marcada se expuso a una película BioMat, sensible a los rayo X (Kodak), se guardó a -75°C y se reveló después de una semana de exposición.

- **Soluciones para la hibridación tipo "Southern"**

Solución Denhardt 10X

2% (w/v) Ficol
2% (v/v) PVP
2% (w/v) BSA
Disolver en agua con DEPC
Filtrar con filtro Whatman
Guardar a -20° C

Solución Scc 20X

Cloruro de sodio	175.3 g
Ácido cítrico	77.43 g

Ajustar con ácido clorhídrico a pH 7
Filtrar con flitro Whatman y esterilizar
Aforar a 1 L con agua destilada

Amortiguador de fosfatos 2M

Fosfato de sodio monobásico	1.67 M
Fosfato de sodio dibásico	0.33 M

Ajustar a pH 6.5

Solución de hibridación

Solución Denhardt´s 5X	5 ml
Scc 20X	25 ml
Buffer de fosfatos de sodio 2M	5 ml
SDS 10%	2 ml
Agua con DEPC	63 ml

SSPE 20X

Cloruro de sodio	701.2 g
Fosfato de sodio monobásico	110.4 g
EDTA	29.6 g
Hdróxido de sodio	34 g

Ajustar a pH 7.4
Aforar a 4 L con agua destilada

Solución de lavado

SSPE 20X	180 ml (final = 6X)
SDS 10%	12 ml (final = 0.2%)
Agua destilada	408 ml

Caracterización fenotípica.

- Cuantificación de la germinación

Se inocularon $1X10^6$ conidios/ml en medio líquido VS. Se incubaron a 30°C en agitación orbital a 200 rpm. Para la cuantificación se tomó 1 ml del medio de cultivo en los tiempos indicados y se diluyó 1:10 con agua destilada. Los conidios germinados se mantuvieron a 4°C y se contaron mediante una cámara de Neubauer.

Para las condiciones en estrés oxidante, el medio líquido VS se adicionó con 0.5 mM de peróxido de hidrógeno antes de la inoculación.

- Cuantificación del crecimiento apical

Una suspensión de conidios se inoculó en medio sólido VS y se incubó durante 24 h. Se tomó un área circular de 1 cm de radio con hifas crecidas y se colocó en medio sólido VS nuevo. Se incubó a 30°C en oscuridad durante 24 h y se midió la longitud de la hifa vegetativa desde el área circular previamente crecida.

Para las condiciones en estrés oxidante, el medio sólido VS nuevo se adicionó previamente con 5 y 10 mM de peróxido de hidrógeno antes de solidificarse.

Para las condiciones en estrés lumínico, el cultivo se expuso a 341 lx durante las 24 h de incubación en el medio VS nuevo.

- Cuantificación del micelio

Se inocularon $1X10^6$ conidios/ml en medio líquido VS en matraces Erlenmeyer de 25 ml, manteniendo la relación aire: medio de cultivo de 5:2. Se incubaron durante 5 días a 30°C en oscuridad. El micelio se filtró y se congeló con nitrógeno líquido. Se secó al vacío utilizando una centrifuga Speed Vac SC110 (Savant) durante 4 h. El micelio se pesó en una balanza analítica.

Para las condiciones en estrés oxidante, el medio líquido VS se adicionó con 1 mM de peróxido de hidrógeno antes de la inoculación.

Para las condiciones en estrés lumínico, el cultivo se expuso a 341 lx durante los 5 días de incubación.

- Cuantificación de la hifa aérea

Se inocularon $1X10^6$ conidios/ml en medio sólido VS en tubos de ensaye, manteniendo la relación aire: medio de cultivo de 5:1. Se incubaron durante 5 días a 30°C en oscuridad y se midió la altura de las hifas aéreas..

Para las condiciones en estrés oxidante, el medio sólido VS se adicionó con 1 mM de peróxido de hidrógeno antes de solidificarse.

Para las condiciones en estrés lumínico, el cultivo se expuso a 341 lx durante los 5 días de incubación.

- Cuantificación de los conidios

Se inocularon $1X10^6$ conidios/ml en medio sólido VS en tubos de ensaye, manteniendo la relación aire:medio de cultivo de 5:1. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30°C en oscuridad. Los conidios se recuperaron en 1 ml de agua estéril fría y agitando en frío. La

suspensión de conidios se colectó en tubos Eppendorff de 1.5 ml. Se diluyó 1:10 y los conidios se contaron mediante una cámara de Neubauer.

Para las condiciones en estrés oxidante, el medio sólido VS se adicionó con 1 mM de peróxido de hidrógeno antes de solidificarse. La cuantificación de las artrosporas se realizó del mismo modo.

Para las condiciones en estrés lumínico, el cultivo se expuso a 341 lx durante los 5 días de incubación.

RESULTADOS

Construcción de las mutantes Δ*ste50* y Δ*nrc-1* en *N. crassa*

La cancelación de los genes *ste50* y *nrc-1* se realizó mediante la transformación de conidios con un producto de la PCR de fusión. En la PCR de fusión se sitió el gen de resistencia a Higromicina B (*hph*^{r}) entre dos fragmentos de 1000 bp de ADN no codificante del extremo 5´y 3´ del gen blanco. Los fragmentos del ADN no codificante permitieron la sustitución del gen blanco por el gen *hph*^{r} mediante la recombinación homóloga.

Para la transformación se emplearon los conidios de la cepa Δ*mus-51*, la cual carece del mecanismo de recombinación heteróloga por lo que solo ocurre la recombinación homóloga (Ninomiya Y 2004). Los conidios transformados fueron aislados en colonias y la sustitución del gen blanco por el gen *hph* se comprobó mediante el análisis de la hibridación tipo Southern.

En el caso de *ste50*, la detección de un fragmento de 3171 bp indica la presencia del gen endógeno mientras que un fragmento de 1570 bp señala la sustitución del gen por el *hph*^{r} en el ADN genómico de *N. crassa*. Dado que la transformación se llevó a cabo en conidios, los cuales tienen más de un núcleo, se detectaron colonias con solo el fragmento de 1570 bp (cepas homocariones) y colonias con ambos fragmentos, 1570 bp y 3171 bp (cepas heterocariones) (Figura 12).

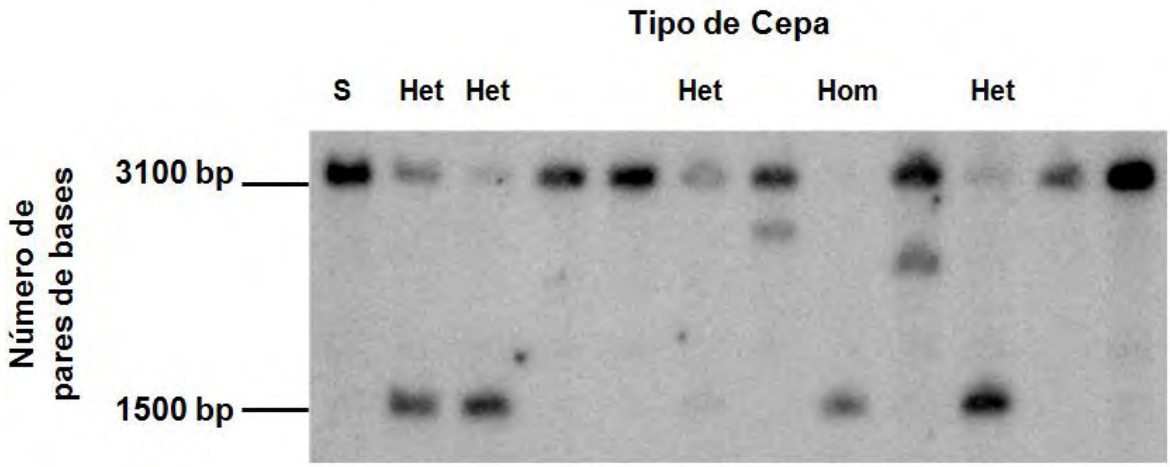


Figura 12. Análisis por hibridación tipo Southern de las cepas transformadas para la cancelación de *ste50* en *N. crassa*. Patrón del número de pares de bases en las cepas: silvestre (S), heterocarión (Het) y homocarión (Hom).

Para el gen *nrc-1*, la detección de un fragmento de 4301 bp indica la presencia del gen endógeno y un fragmento de 1732 bp marca la sustitución del gen por el de *hph*^{r} (Figura

13). A diferencia de las cepas transformadas para la cancelación de *ste50*, la cancelación de *nrc-1* solo generó cepas homocariones.

Figura 13. Análisis por hibridación tipo Southern de las cepas transformadas para la cancelación de *nrc-1* en *N. crassa*. Patrón del número de pares de bases en las cepas: silvestre (S) y homocarión (Hom).

Una vez que se identificaron las cepas mutantes homocariotas en los genes *ste50* ó *nrc-1* se realizó la cruza sexual de cada una con la cepa silvestre. Debido a que ambos tipos de cepas mutantes no fueron capaces de formar los protoperitecios, actuaron como cepa donadora en la cruza sexual. Esta cruza generó ascosporas viables. Se seleccionaron las colonias con resistencia a Higromicina B y se comprobaron para la sustitución del gen *ste50* ó *nrc-1* por el gen *hph*^{r} a través del análisis de la hibridación tipo Southern.

Este análisis demostró que las cepas obtenidas por la cruza sexual presentan el patrón de peso molecular para la cancelación del gen *ste50*, por la presencia de un fragmento de 1570 bp (Fig. 14A) ó del gen *nrc-1*, con un fragmento de 4301 bp (Fig. 14B).

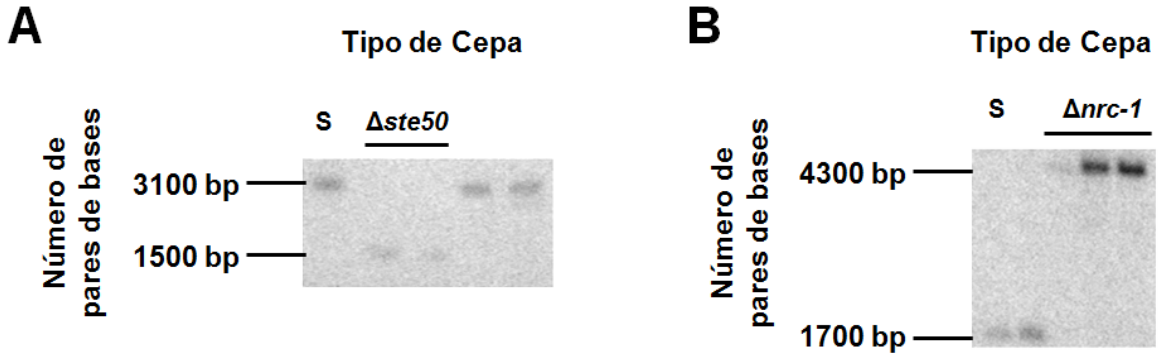


Figura 14. Análisis por hibridación tipo Southern de la progenie por cruza sexual de las cepas *Δste50* y *Δnrc-1* en *N. crassa*. Patrón del número de pares de bases en las cepas: silvestre (S), *Δste50* (Panel A) y *Δnrc-1* (Panel B).

Estos resultados demuestran que la transformación de los conidios con el producto de la PCR de fusión sustituyó los genes *ste50* o *nrc-1* por el gen de resistencia *hph*^{r} en el ADN genómico de *N. crassa*. Tras una cruza sexual se generaron cepas homocariones Δ*ste50*

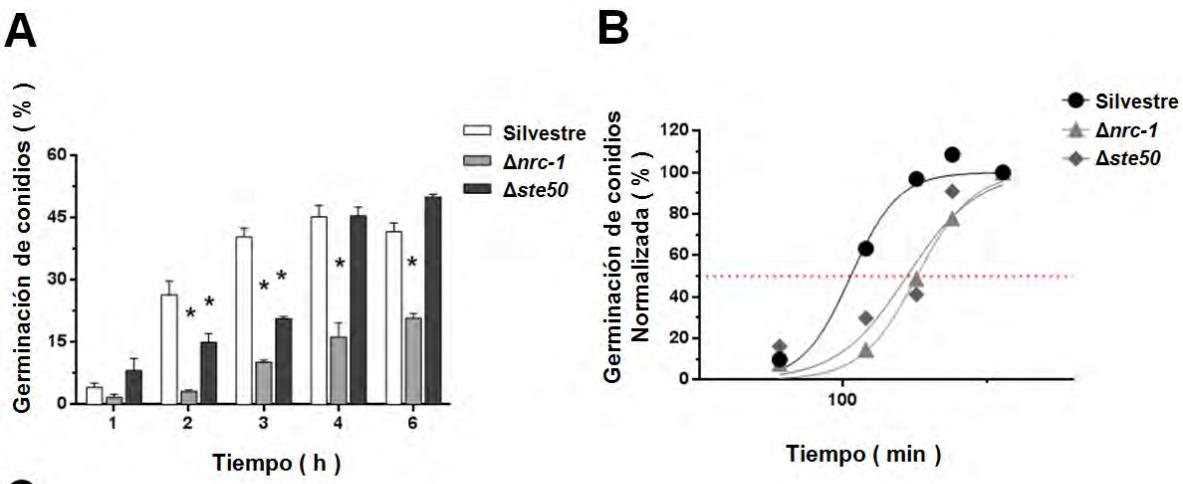
y Δ*nrc-1*. Las cepas Δ*ste50* y Δ*nrc-1* se caracterizaron fenotípicamente para conocer el papel de STE50 y NRC-1 en condiciones basales, estrés oxidante y estrés lumínico.

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en condiciones basales

La germinación de los conidios es un proceso en el cual se contiende con un estado hiperoxidante, por lo que se evaluaron los efectos de cancelar *nrc-1* o *ste50* en el mismo. Para ello se midió el porcentaje de germinación durante las primeras 6 h post-inoculo de los conidios.

Los resultados mostraron que la cepa Δ*nrc-1* tuvo porcentajes menores en cada tiempo respecto a la cepa silvestre y a la cepa Δ*ste50* (Fig. 15A). La cepa Δ*ste50* también tuvo porcentajes menores al comparar con la cepa silvestre pero solo a las 2 y 3 h. La germinación fue similar a las 4 h e incluso fue mayor a las 6 h. Esto último puede deberse a la metodología ya que conforme crecieron las hifas se recuperaron menos conidios germinados, por lo que un retraso en el crecimiento de la cepa Δ*ste50* llevaría a recuperar más conidios germinados. Esto explicaría también porque disminuyó el porcentaje de conidios germinados en la cepa silvestre a las 6 h (Fig. 15A).

Tras normalizar la germinación tomando el porcentaje a las 6 h como el 100%, se observó un retraso en alcanzar el 50% de germinación (G_{50}) en ambas cepas mutantes (Fig. 15B). Para la cepa Δ*nrc-1* el G_{50} fue de 180.6 min y para la cepa Δ*ste50* fue de 166.7 min, mientras que la cepa silvestre correspondió a 106.2 min (Fig. 15C). Esto señala un mayor retraso en la cepa Δ*nrc-1* que la cepa Δ*ste50*. Por tanto el efecto de cancelar *nrc-1* afecta más a la germinación que cuando se cancela *ste50*.



C

Parámetros de ajuste de la curva de la germinación

Parámetro	Silvestre	Δ*nrc-1*	Δ*ste50*
G_{50}	106.2[a]	166.7[b]	180.6[b]
R^2	0.97	0.88	0.98

[a,b] Distintas literales entre cepas indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$

Figura 15. La ausencia de NRC-1 ó STE50 disminuye la germinación de los conidios. A. Porcentaje de germinación de los conidios durante las primeras 6 h post-inoculo en medio de cultivo líquido (N=5). * indica diferencia significativa con $p < 0.05$ respecto a la cepa silvestre. **B.** Cinética normalizada de la germinación durante las primeras 6 h post-inoculo. La línea roja indica el 50% de la germinación (G_{50}). **C.** Parámetros de ajuste para la curva normalizada de la germinación de los conidios. Se muestra el valor de G_{50} para cada cepa. Distintas literales indican diferencia significativa entre las cepas con $p < 0.05$.

Una vez que los conidios germinan, las hifas vegetativas se desarrollan a lo largo del sustrato. Aunque en este desarrollo no se contiende contra un Estado Hiperoxidante, también se propone la participación de NRC-1 y STE50. Es por ello que se midió el crecimiento apical a las 24 h post-inoculo. El inoculo fue de hifas previamente crecidas para excluir las diferencias en la germinación observadas anteriormente.

El análisis mostró que el crecimiento disminuyó en la cepa Δ*nrc-1* en comparación a la cepa silvestre (6.117 cm ± 0.288 y 6.91 cm ± 0.362, respectivamente). La cepa Δ*ste50* tuvo aún un menor crecimiento que la cepa Δ*nrc-1* (4.316 ± 0.312) (Fig. 16A). Esto indica que efectivamente NRC-1 y STE50 participan en este crecimiento pero de manera interesante la ausencia de *ste50* lo afecta más.

El crecimiento de la hifa vegetativa lleva a la formación del micelio. Para conocer si también se afecta la formación del micelio se cuantificó su peso seco. Los datos mostraron que la cepa Δ*nrc-1* redujo la formación del micelio (9.828 mg ± 0.492) y la cepa Δ*ste50* disminuyó aún más (9.514 mg ± 0.291) en comparación a la cepa silvestre (10.014 mg ± 0.536), sin embargo estas diferencias no fueron significativas (Fig. 16B) por lo que la

ausencia de NRC-1 ó STE50 parece no afectar la formación del micelio a pesar del retraso en el crecimiento apical.

El estadio siguiente al micelio es la formación de la hifa aérea. En éste también se sugieren a NRC-1 y STE50 como elementos importantes por lo que se midió su altura en las cepas mutantes. La cepa Δ*nrc-1* creció menos en comparación a la cepa silvestre (3.348 cm ±Δ 0.2 y 3.728 cm ± 0.163 respectivamente). La cepa Δ*ste50* creció menos que la cepa Δ*nrc-1* (1.895 ± 0.05) (Fig. 16C). Estos datos sugieren que tanto NRC-1 como STE50 participan en el crecimiento tanto de la hifa vegetativa como de la hifa aérea. De manera relevante cancelar el gen para STE50 lleva a un mayor defecto en ambos casos.

Lo que se evaluó después fue la conidiación, ya que siendo un proceso de diferenciación celular el analizarlo permitiría saber si NRC-1 y STE50 participan en procesos distintos al crecimiento. Para ello se cuantificaron los conidios formados para cada cepa y se compararon. Los datos mostraron que el número de conidios incrementó en la cepa Δ*nrc-1* respecto a la cepa silvestre (383.571 conidios/µl ± 71.833 y 260.357 conidios/µl ± 40.244 respectivamente). De manera inesperada la cepa Δ*ste50* disminuyó el número de conidios (113.928 conidios/µl ± 26.254) en comparación a las otras dos cepas (Fig. 16D). Las diferencias de ambas cepas mutantes fueron significativas respecto a la cepa silvestre. Estos datos señalan que el cancelar *nrc-1* o *ste50* lleva a efectos opuestos en la conidiación, lo que sugiere que en este proceso estas proteínas tienen papeles opuestos.

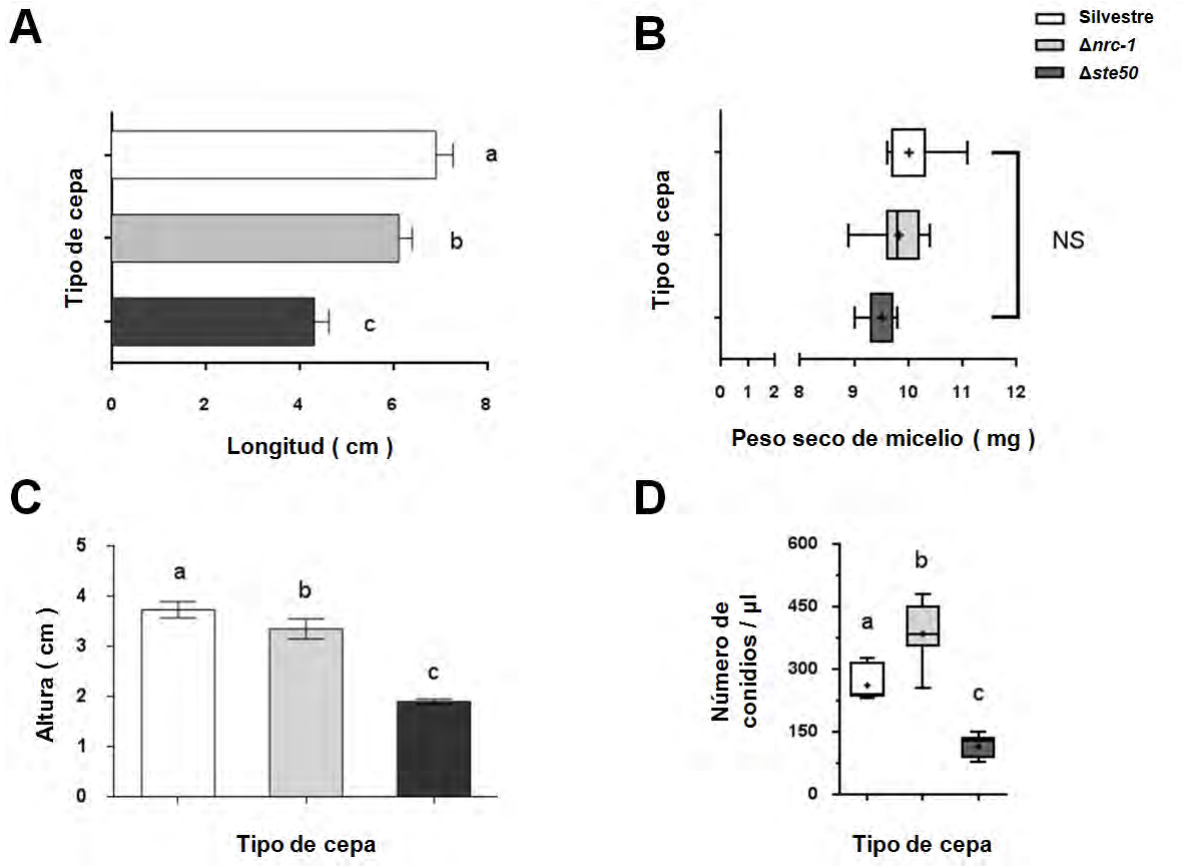


Figura 16. La ausencia de NRC-1 ó STE50 afecta el crecimiento y la conidiación. A. Longitud del crecimiento apical a las 24 h post-inoculo de hifas (N=10). **B.** Peso seco del micelio (N=7). **C.** Altura de la hifa aérea (N=8). **D.** Cuantificación de los conidios (N=7). Los datos de B, C y D se obtuvieron a partir de cultivos de 5 días post-inoculo de conidios. Los cultivos se realizaron en condiciones de oscuridad. [a,b,c] Distintas literales indican diferencia significativa con $p < 0.05$. NS indica diferencia no significativa.

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en presencia de peróxido de hidrógeno.

En el ciclo asexual de *N.* crassa, la transición entre los estadios celulares se da como respuesta a un estado redox más oxidante. Para conocer si NRC-1 ó STE50 participan en ésta respuesta, se analizaron las cepas mutantes en presencia de peróxido de hidrógeno, la cual genera un estrés oxidante.

En primer lugar se analizó la germinación de los conidios. La cepa Δ*nrc-1* germinó menos que la cepa silvestre, con diferencia significativa a partir de las 2 h post-inoculo (Fig. 17A). Dado que esto fue similar a lo observado en ausencia del peróxido de hidrógeno, se compararon las cinéticas de germinación en ambas condiciones. Esta comparación mostró que la germinación de la cepa Δ*nrc-1* no cambió, excepto a las 6 h en el que incrementó de 20.72% a 48.57% en presencia de peróxido de hidrógeno (Fig. 17C Panel central).

Dado que la germinación incrementó en la cepa Δ*nrc-1* con el peróxido de hidrógeno a las 6 h, se analizó si la cepa silvestre tenía el mismo comportamiento. Las cinéticas mostraron que la germinación de la cepa silvestre también aumentó en presencia del peróxido de hidrógeno, incluso a partir de las 3 h. La mayor diferencia se observó a las 6 h cambiando de 41.59% a 80.73% (Fig. 17C Panel Izquierdo).

Por su parte la cepa Δ*ste50* tuvo porcentajes menores de germinación que la cepa silvestre, con diferencia significativa a partir de las 2 h post-inoculo (Fig. 17A). Al compararlo ahora con su cinética de germinación sin el peróxido de hidrógeno se observó que la germinación disminuyó con el peróxido de hidrógeno, con el mayor decremento a las 4 h pasando de 45.36% a 21.63% (Fig. 17C Panel derecho). Esto resultó opuesto a lo observado en la cepa silvestre y a la cepa *Δnrc-1*. Finalmente la presencia del peróxido de hidrógeno no llevó a que las cepas mutantes recuperaran los porcentajes de germinación observados en la cepa silvestre (Fig. 17B).

Con estos datos se demuestra que el peróxido de hidrógeno promueve la germinación de los conidios en la cepa silvestre. NRC-1 parece ser dispensable en esta respuesta ya que también se observó este incremento en su ausencia. De manera interesante la ausencia de STE50 llevó a no observar este incremento e inclusive disminuyó aún mas la germinación. Esto sugiere papeles distintos para NRC-1 y STE50 durante la germinación bajo condiciones de estrés oxidante.

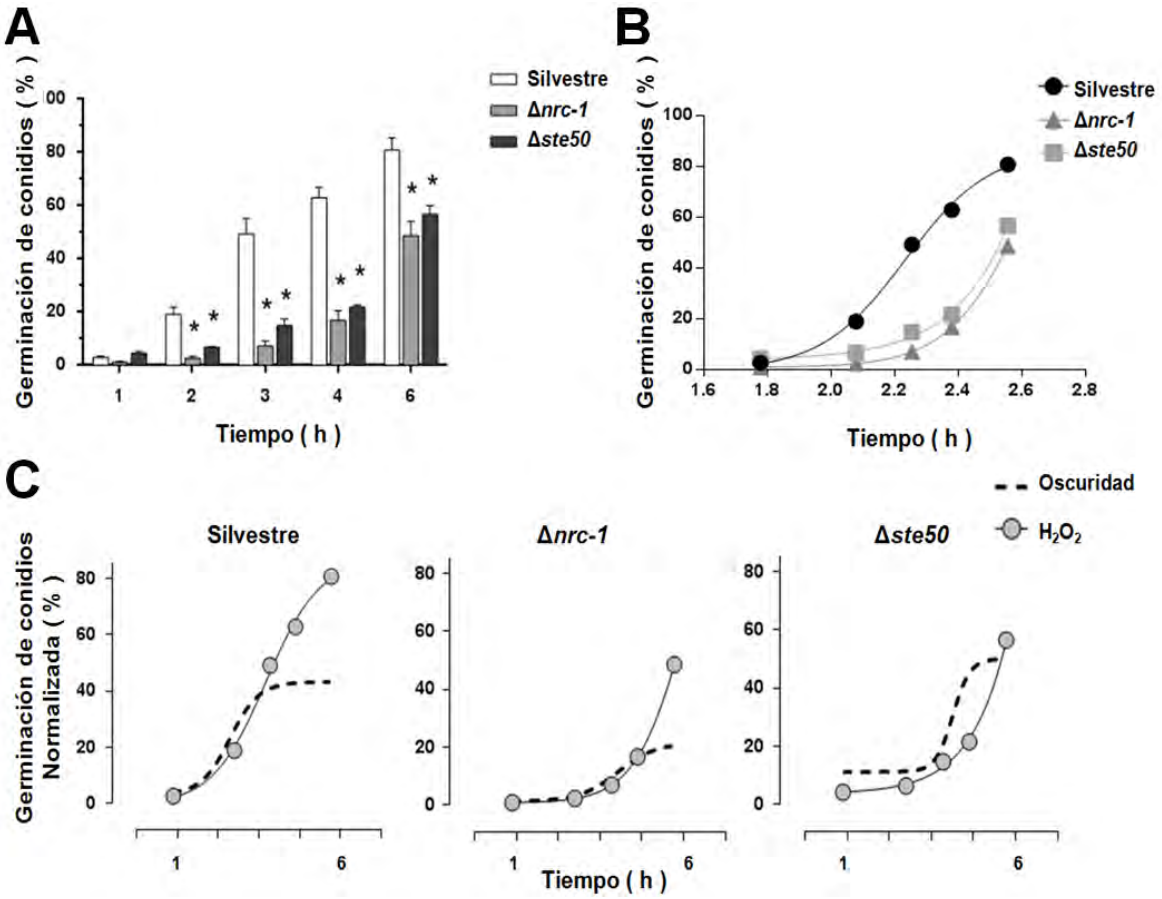


Figura 17. La germinación de los conidios incrementa en la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1* y disminuye en la cepa Δ*ste50* en presencia de peróxido de hidrógeno. A. Porcentaje de los conidios germinados en los tiempos indicados post-inoculo de 1 X 10^6 conidios/ml en MV líquido adicionado con 0.5 mM de H_2O_2 (N=3). * indica diferencia significativa respecto a la cepa silvestre de $p < 0.05$. **B.** Comparación de las cinéticas de germinación entre la cepa silvestre, la cepa Δ*nrc-1* y la cepa Δ*ste50*. **C.** Comparación de las cinéticas de germinación de cada cepa en ausencia (línea discontínua) o presencia (círculo) de 0.5 mM de H_2O_2.

Después se analizó el crecimiento de las hifas vegetativas. Para esto se tomaron hifas previamente crecidas y se colocaron en MV sólido adicionado con 5 mM de peróxido de hidrógeno para permitir su crecimiento.

Los resultados mostraron que el efecto del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de las hifas vegetativas fue similar entre la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1*, reduciéndose 63% y 58% dicho crecimiento, respectivamente. La cepa Δ*ste50* disminuyó 96% el crecimiento con el peróxido de hidrógeno (Fig. 18A).

Estos datos mostraron que el crecimiento de la cepa Δ*ste50* es más sensible al estrés oxidante, no así en la cepa Δ*nrc-1*. Dado que la reducción del crecimiento con 5 mM de peróxido de hidrógeno fue similar entre la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1*, se analizó este mismo crecimiento aumentando la concentración a 10 mM de peróxido de hidrógeno.

La cepa Δ*ste50* fue incapaz de crecer en MV adicionado con 10 mM de peróxido de hidrógeno, mientras que no se observó diferencia entre la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1*, disminuyendo su crecimiento 85% y 80%, respectivamente.

Posteriormente se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno en la formación del peso seco del micelio. La cepa silvestre disminuyó de 10.01 mg ± 0.53 a 5.52 mg ± 0.629, es decir 45% menos en presencia del peróxido de hidrógeno. De manera similar la cepa *Δnrc-1* se redujo de 9.82 mg ± 0.49 a 5.75 mg ± 0.53, siendo 52% menos micelio. Por su parte la cepa Δ*ste50* formó menos micelio, cambiando de 9.51 mg ± 0.29 a 8.2 mg ± 0.87, que corresponde a 10% menos. La disminución en la formación del micelio en presencia del peróxido de hidrógeno fue estadísticamente significativo para las tres cepas (Fig. 18B).

El desarrollo de la hifa aérea es un estadio de crecimiento que, similar al crecimiento de la hifa vegetativa, es sensible a un estado redox más oxidante. Se evaluó la cantidad del micelio aéreo en presencia de peróxido de hidrógeno para conocer la respuesta de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50*.

Para ello se crecieron los cultivos en presencia de peróxido de hidrógeno y se midió la altura de la hifa aérea. Los resultados mostraron que en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno la hifa aérea disminuyó 17% en la cepa silvestre, 14% en la cepa Δ*nrc-1* y 11% en la cepa Δ*ste50*. (Fig. 18C). Estos datos apuntan a que en estas condiciones la hifa aérea se afecta en baja magnitud. Es difícil distinguir si NRC-1 ó STE50 participan en este tipo de respuesta durante el desarrollo de la hifa aérea, dado los porcentajes similares con la cepa silvestre.

En *N. crassa* la formación de los conidios es el mecanismo que mejor refleja la respuesta fisiológica ante un estrés oxidante. Por lo tanto se espera que este proceso se promueva en presencia del peróxido de hidrógeno y que si NRC-1 ó STE50 participan en ésta respuesta, se evidencie en las cepas mutantes.

Para este análisis se realizaron cultivos adicionados con 1 mM de peróxido de hidrógeno, de los cuales se obtuvieron los conidios, se cuantificaron y se compararon con cultivos libres de peróxido de hidrógeno.

Los resultados mostraron que la cepa silvestre incrementó la formación de los conidios, cambiando de 260.35 conidios/µl ± 40.24 a 418.5 conidios/µl ± 67.67 con peróxido de hidrógeno, lo que correspondió a 60% más y que fue estadísticamente significativo (Fig. 18D)

La cepa Δ*nrc-1* también incrementó la formación de los conidios con peróxido de hidrógeno, pasando de 383.57 conidios/µl ± 71.833 a 475.9 conidios/µl ± 77.93 un incremento de alrededor del 24%. A pesar de ello el análisis estadístico no mostró diferencia significativa (Fig. 18D). Con estos datos no es posible determinar si NRC-1 participa en la formación de los conidios como respuesta al estrés oxidante, ya que este proceso se desreprime al cancelar *nrc-1* aún en condiciones basales. Sin embargo al no

observar un cambio similar a la cepa silvestre sugiere que la vía que media NRC-1 participa parcialmente en ésta respuesta.

Por su lado la cepa Δ*ste50* mostró números similares en ambas condiciones, con 113.92 conidios/µl ± 26.25 en ausencia y 117 conidios/µl ± 38.29 en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que llevó a descartar una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 18D). Estos datos sugieren que STE50 es importante para la formación de los conidios, no solo en condiciones basales (Fig. 16D) sino también en condiciones más oxidantes (Fig. 18D).

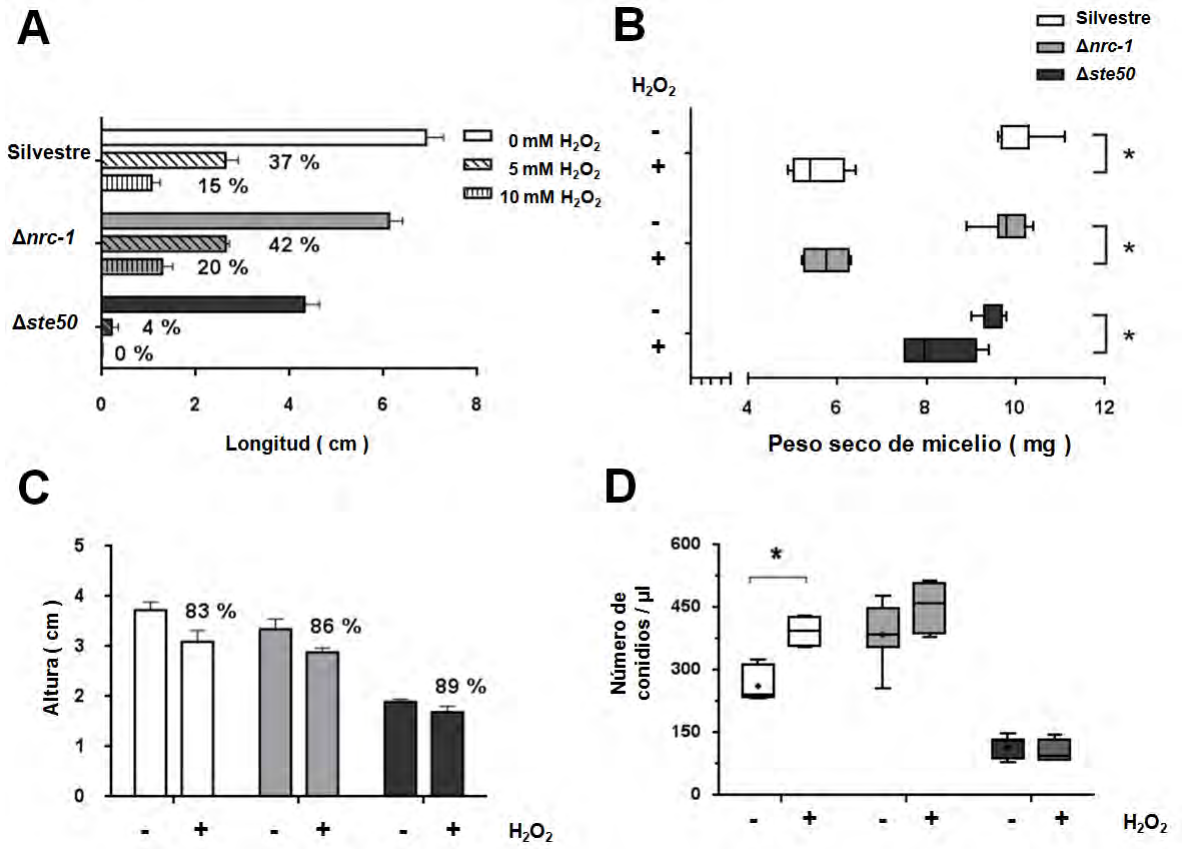


Figura 18. La presencia de peróxido de hidrógeno afecta el crecimiento y la conidiación. A. Longitud de las hifas medido a las 24 h post-inoculo. Crecimiento en MV adicionado con 0 mM (cuadro vacío), 5 mM (cuadro con líneas diagonales) y 10 mM (cuadro con líneas verticales) de peróxido de hidrógeno (N=3). **B.** Peso seco del micelio en ausencia (-) y presencia (+) de 1 mM de peróxido de hidrógeno (N=3). **C.** Efecto de 1 mM de peróxido de hidrógeno en la altura de la hifa aérea (N=3). Los porcentajes en A y C son respecto al crecimiento en ausencia de peróxido de hidrógeno. **D.** Cuantificación de los conidios (N=4). * indica diferencia significativa con $p < 0.05$.

A diferencia de los cultivos sin peróxido de hidrógeno, los cultivos en presencia de peróxido de hidrógeno formaron también artrosporas, esporas asexuales. Para conocer si NRC-1 ó STE50 participan en su formación, las artrosporas se recuperaron en 1 ml de agua para cada cepa y se cuantificó su concentración.

Al comparar el número de artrosporas entre las cepas se observó que la cepa Δ*nrc-1* genera un mayor número, con 196.5 artrosporas/µl ± 37.38 respecto a la cepa silvestre que tuvo 146 artrosporas/µl ± 24.38, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 19A). Mientras la cepa Δ*ste50* formó 147.25 artrosporas/µl ± 36.8, número similar a la cepa silvestre (Fig. 19A). Esto sugiere que NRC-1 y STE50 no participan en la formación de artrosporas en presencia de peróxido de hidrógeno.

No obstante la formación de las artrosporas en presencia de peróxido de hidrógeno sugirió que este tipo de estrés llevó a una mayor esporulación. Dado que la esporulación involucra la formación tanto de conidios como de artrosporas, se evaluó el número total de esporas formadas en cada cepa. Con la comparación se observó que la cepa silvestre incrementó de 260.35 a 564.5 esporas asexuales/µl en presencia de peróxido de hidrógeno, correspondiendo a 116%. Bajo la misma tendencia la cepa Δ*nrc-1* aumentó de 383.57 a 672.4 esporas asexuales/µl, que fue 75% más. Finalmente la cepa Δ*ste50* cambió de 113.92 a 264.25 esporas asexuales/µl, siendo un porcentaje de 132% similar a la cepa silvestre (Fig. 19B). Con estos datos podemos señalar que la presencia de peróxido de hidrógeno lleva a una mayor esporulación. Sin embargo NRC-1 y STE50 no participan en la formación de éstas.

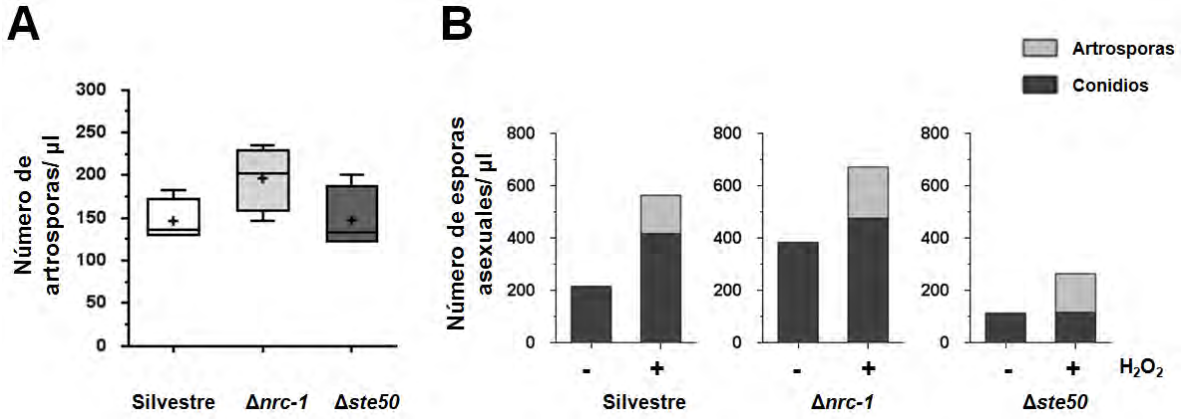


Figura 19. Esporulación en presencia del peróxido de hidrógeno. A. Cuantificación de las artrosporas obtenidas de cultivos adicionados con 1 mM de peróxido de hidrógeno (N=4). **B.** Cuantificación de las esporas asexuales en ausencia (-) o presencia (+) de 1 mM de peróxido de hidrógeno (N=4). Se indican los conidios de color negro y las artrosporas de color gris.

Caracterización de las cepas Δ*nrc-1* y Δ*ste50* en presencia de luz.

La luz es un estímulo que afecta tanto del ciclo sexual como asexual de *N. crassa* (Park HS 2012). En estos efectos se describe que las ERO participan (Peraza L 2002), por lo que es interesante analizar el efecto de la luz sobre el crecimiento y la esporulación en las tres cepas.

Primero se compararon los crecimientos de las hifas vegetativas en ausencia y presencia de luz. Los datos mostraron que la cepa silvestre redujo el crecimiento en presencia de luz de 6.91 cm ±0.36 a 5.73 cm ± 0.26, disminuyendo 18%. La cepa Δ*ste50* también se

acortó al exponerse a la luz, pasando de 4.31 cm ± 0.31 a 3.63 cm ± 0.33, lo que significó 17% menos. Los porcentajes de estas dos cepas fueron similares y estadísticamente significativos (Fig. 20A). La cepa Δ*nrc-1* siguió la misma tendencia y disminuyó de 6.11 cm ± 0.28 a 5.78 cm ± 0.25, lo que equivalió a 7% (Fig. 20A). Este decremento fue menor en comparación a la cepa silvestre y la cepa Δ*ste50*, siendo estadísticamente no significativo. Estos datos sugieren que STE50 no participa en el efecto de la luz sobre el crecimiento de la hifa vegetativa ya que disminuyó como la cepa silvestre. La ausencia de NRC-1 cambia mínimamente el crecimiento.

Se evaluó también el peso seco del micelio, para saber si el retraso en el crecimiento de la hifa tenía efecto sobre éste. Se observó que la cepa silvestre disminuyó de 10.01 mg ± 0.53 a 8.48 mg ± 0.76 tras la exposición a la luz (15.2% menos) siendo estadísticamente significativo. Por su parte la cepa Δ*nrc-1* se comportó de manera similar y se redujo de 9.82 mg ± 0.49 a 9.2 mg ± 0.49, sin embargo, fue solo 6.3% menos y no fue estadísticamente significativo. De manera interesante la cepa Δ*ste50* se comportó de manera contraria, incrementando en presencia de luz y cambiando de 9.51 mg ± 0.29 a 10.28 mg ± 0.25, lo que correspondió a 8.1% más y que fue estadísticamente significativo (Fig. 20B). Estos datos señalan que a pesar de que las tres cepas tienden a disminuir el crecimiento de la hifa al exponerse a la luz, el peso seco del micelio se afecta de manera distinta en ausencia de *nrc-1* ó *ste50*, lo que sugiere que NRC-1 y STE50 tienen un papel distinto en la respuesta a la luz durante este estadio.

Para la cepa silvestre el desarrollo de la hifa aérea se redujo 42%, cambiando de 3.72 cm ± 0.16 a 2.17 cm ± 0.17. La cepa Δ*nrc-1* también disminuyó en un porcentaje similar: 43%, es decir pasó de 3.34 cm ± 0.2 a 1.91 cm ± 0.14 en presencia de luz. La cepa Δ*ste50* siguió esta tendencia de reducir la hifa aérea con luz, sin embargo el cambio fue de 1.89 cm ± 0.05 a 1.69 cm ± 0.03, lo que correspondió a solo 11%. (Fig. 20C). Estos datos señalan en primer lugar que el crecimiento de la hifa aérea es más sensible que el de la hifa vegetativa al exponer a la luz. También que la ausencia de *nrc-1* no cambia ésta respuesta, a diferencia de la ausencia de *ste50* que lleva a un cambio menor, siendo la diferencia para las tres cepas estadísticamente significativa.

Finalmente se evaluó la formación de los conidios como respuesta a la luz para conocer el papel de NRC-1 y STE50 en ésta. Los resultados mostraron que la cepa silvestre incrementó de 260.35 conidios/µl ± 40.24 a 719.64 conidios/µl ± 92.08 en presencia de luz, reflejándose en un aumento del 176 %, La cepa Δ*nrc-1* también incrementó con luz, formando 383.57 conidos/µl ± 71.83 en ausencia y 606.57 conidios/µl ± 119.57 en presencia de luz. Esta diferencia fue de 59% más. El incremento observado en la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1* fue estadísticamente significativo. De manera sorprendente la cepa Δ*ste50* no mostró este incremento e incluso disminuyó de 113.92 conidios/µl ± 26.25 a 84.28 conidios/µl ± 49.04 al exponer a la luz, lo que correspondió a 26% menos. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 20D). Estos resultados señalan que NRC-1 no participa en la formación de los conidios como respuesta a la luz, a diferencia de STE50 la cual tras su ausencia no se incrementó el número de conidios.

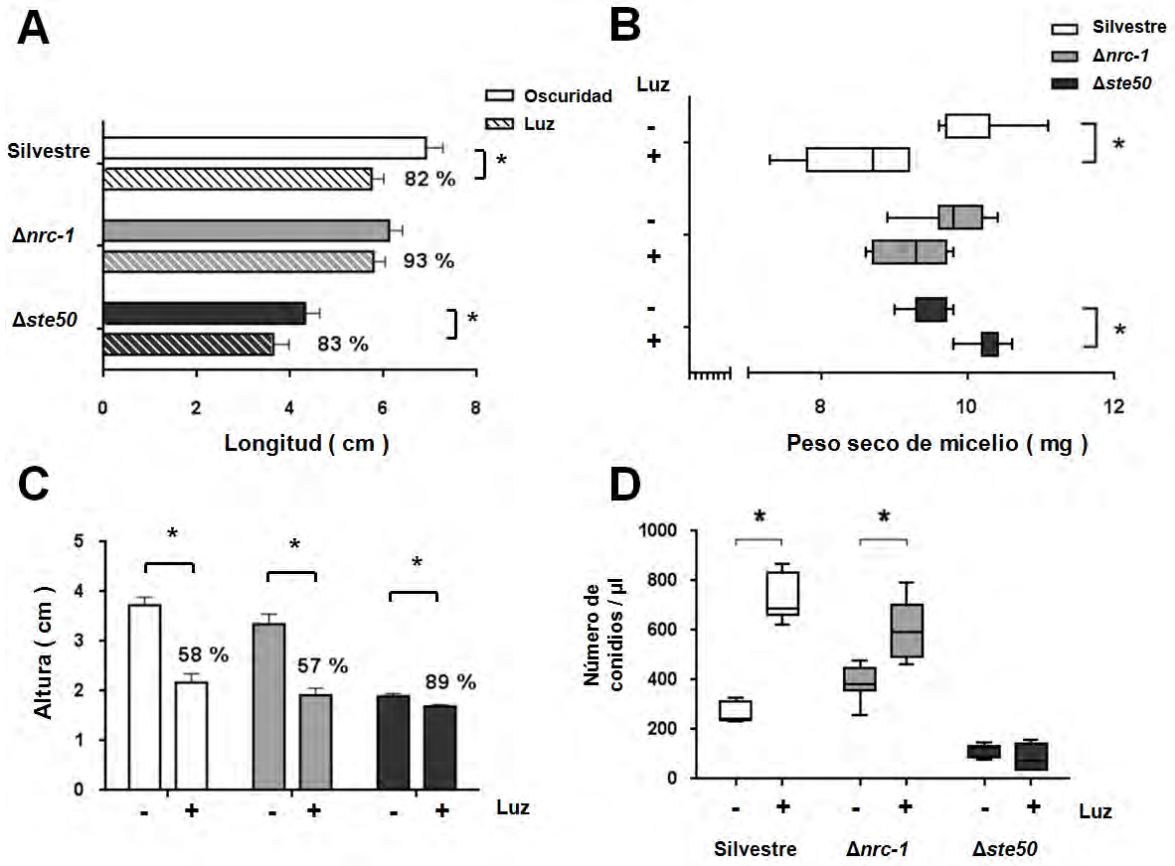


Figura 20. La exposición a la luz afecta el crecimiento y la conidiación en las cepas mutantes de manera distinta. A. Longitud del crecimiento apical medido a las 24 h post-inóculo de hifas en ausencia (cuadro vació) y presencia (cuadro con líneas diagonales) de 341 lx (N=4). **B.** Peso seco del micelio (N=3). **C.** Altura de la hifa aérea (N=8). **D.** Cuantificación de los conidios. Los porcentajes en A y C son en comparación a sí misma pero en ausencia de luz (N=7). Se indica en B, C y D la ausencia (-) o presencia (+) de luz. * indica diferencia significativa con $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Las ERO participan como intermediarios en la señalización celular, mediando procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación o la muerte celular. En *N. crassa* un estadio de crecimiento se mantiene hasta que un estado hiperoxidante se genera. Cuando esto sucede una de las respuestas fisiológicas es la diferenciación celular: conidiación (Hansberg W 1990). De esta manera la alternancia entre el crecimiento y la conidiación depende del estado redox.

La conidiación cíclica permitió saber que RAS-1 regula esta alternancia. Las vías por las cuales actúa RAS-1 aún se desconocen, sin embargo NRC-1 y STE50 representan dos posibles proteínas efectoras dado que poseen un dominio RAD (Broad Institute [Internet]. Cambridge: Broad Institute [citado 1 ago 2013]. Disponible en http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html). El dominio RAD les permitiría interactuar directamente con RAS-1. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue cancelar el gen *nrc-1* ó el gen *ste50* para analizar sus fenotipos y evaluar su posible participación en el crecimiento y la conidiación.

Los resultados mostraron que NRC-1 es importante para la germinación de los conidios de *N. crassa*¸ donde previamente se había descrito que esta cinasa fosforila a MAK-2 permitiendo así la elongación del tubo germinal (Pandey A 2004).

También es importante para el crecimiento óptimo de la hifa vegetativa y de la hifa aérea, procesos en donde también participa MAK-2 (Dan Li 2005, Maerz S 2008), lo que sugiere que la vía de NRC-1 y MAK-2 representa una vía regulada por RAS-1 relacionada con el crecimiento.

La conidiación, al contrario que el crecimiento, se incrementó en ausencia de NRC-1 tanto en condiciones de crecimiento en MV sólido (presente trabajo), como en MV líquido (Kothe GO 1998). NRC-1 regula negativamente la conidiación en *N. crassa* a diferencia de lo observado en *Cochliobolus heterostrophus* donde cancelar su gen homólogo ChSte11 mostró una disminución en la conidiación (Izumitsu K 2009) lo que señala un papel de la proteína específico del organismo.

STE50 también resultó importante para la germinación de los conidios, sin embargo a diferencia de la cepa Δ*nrc-1*, la cepa Δ*ste50* solo retrasó la germinación en las primeras tres horas, mostrando que NRC-1 es más importante que STE50 en esta etapa. En *S. cerevisiae* la participación de Ste50 en la señalización de Ste11 depende de la respuesta (Ramezani Rad M 2003). Por ejemplo, en el crecimiento tipo pseudo-hifa y en presencia de feromona, Ste50 no es clave para la traducción de la señal sino que se encarga solo de sostener la respuesta. Esto se concluyó porque al sobre-expresar a Ste11 se compensaron los defectos que se observaron en la cepa carente del gen que codifica a Ste50 (Jansen G 2001). Esto podría suceder en la germinación de *N. crassa* donde el defecto es mayor con la ausencia de NRC-1 que con STE50, siendo ésta importante para el inicio de la germinación.

En cambio, el crecimiento de la hifa vegetativa y de la aérea de *N. crassa* se afectó más en ausencia de STE50 que de NRC-1, lo que sugiere que STE50 podría regular otras vías. Es posible que STE50 participe en la vía de NRC-1 y MAK-2, dado que STE50 y NRC-1 pueden interactuar directamente, tal y como se describe en *S. cerevisiae* (Posas F 1998, Wu C 1999, Jansen G 2001).

La idea de que en *N. crassa* STE50 puede mediar la señalización para el crecimiento de manera independiente de NRC-1 discrepa a lo observado en *S. cerevisiae* (Ramezani Rad M 1998). Para este organismo el homólogo de STE50:Ste50 solo señaliza a través del homólogo de NRC-1:Ste11 durante el crecimiento tipo pseudo-hifa (Ramezani Rad M 1998). Sin embargo en este mismo organismo se demostró la interacción genética de Ste50 con la vía de Ras-cAMP para regular la vida media de *S. cerevisiae* (Poplinski A 2007). Lo interesante es que en *N. crassa* la adenilato ciclasa también es relevante para el crecimiento vegetativo y aéreo (Ivey FD 2002), por lo que STE50 podría regular también esta vía sin la participación de NRC-1.

La cepa Δ*ste50* disminuyó la conidiación, contrario a lo observado en la cepa Δ*nrc-1*, lo que implica que ambas regulan de manera distinta entes proceso en *N. crassa*. Esto resulta interesante ya que se describe que en *S. cerevisiae* Ste50 y Ste11 interactúan constitutivamente (Xu G 1996, Posas F 1998, Wu C 1999) traduciendo en forma conjunta la respuesta a la feromona, el crecimiento invasivo o la osmotolerancia (Ramezani Rad M 2003).

La vía importante para la conidiación en *N. crassa* es el módulo de MAP cinasas: OS-2 (Perkins DD 2001). La activación de esta vía podría depender de STE50 y no de NRC-1. Esta idea se ve reforzada en vista de que la cepa Δ*ste50* de *S. cerevisiae* presenta defectos en la activación de HOG1 (homólogo de OS-2) en respuesta a condiciones de estrés osmótico. Dichos defectos no se compensaron al sobre-expresar Ste11 (Jansen G 2001).

La cepa *ras-1*^{bd} de *N. crassa* responde a cambios en la concentración de las ERO, promoviendo la conidiación e inhibiendo el crecimiento ante un aumento en éstos (Chávez-Canales M 2010, Gyöngyösi N 2013). Como RAS-1 posiblemente regula el destino celular dependiendo del estado redox, en la segunda parte del presente trabajo se evaluó esta respuesta en ausencia de las proteínas efectoras de RAS-1: *nrc-1* o *ste50*.

El peróxido de hidrógeno es un modelo de estrés oxidante ampliamente utilizado, debido a su solubilidad en el agua y su estabilidad relativa. Este pro-oxidante no solo lleva a un estrés oxidante sino que puede actuar como molécula de señalización (Veal EA 2007).

La germinación de los conidios de la cepa silvestre se incrementó en presencia de peróxido de hidrógeno. Esto está acorde a los datos que señalan que se requiere de un estado hiperoxidante para esta transición celular (Lledías F 1999). En cambio la ausencia de STE50 llevó a una disminución, sugiriendo una sensibilidad hacia el estrés oxidante. Por otro lado, con la ausencia de NRC-1 no se observó alguna disminución.

La sensibilidad hacia el estrés oxidante en la cepa Δ*ste50* no solo se observó durante la germinación, sino también durante el crecimiento vegetativo. En *N. crassa* el módulo de MAP cinasas: OS-2 es la vía clave para responder ante el estrés osmótico (Zhang Y 2002, Fujimura M 2003) y podría también ser importante en el estrés oxidante, como se ha observado para su homólogo, HOG-1, en *S. cerevisiae* (Bilsland E 2004).

Ste50 participa en la activación de HOG-1 en *S. cerevisiae* (Tatebayashi K 2006) por lo que en *N. crassa* STE50 podría actuar sobre OS-2 y así permitir la respuesta ante el estrés oxidante, tal y como se propone en el modelo de señalización celular dictada por RAS-1 (Fig. 2).

STE50 también podría regular a HAM-9, ya que esta última posee un dominio SAM lo que les permitiría una interacción directa. Se describe que HAM-9 participa en la respuesta ante el estrés oxidante generado por menadiona (Zhu J 2013). No obstante se requieren de más estudios para conocer las proteínas que interactúan con STE50, y cuáles de ellas son importantes ante el estrés oxidante. Se demostró que durante la comunicación celular Ste50 interactúa con RAS-2 (Dettmann A 2014), pero queda por determinar si también interactúa con RAS-1 en otros procesos celulares.

Por su lado, la ausencia de NRC-1 no afectó la sensibilidad al estrés oxidante en *N. crassa*. Esto es distinto a lo observado en *Cochliobolus heterostrophus* ya que al cancelar el gen homólogo, ChSte11, se afectó la respuesta ante el estrés oxidante (Izumitsu K 2009). Es importante mencionar que también se disminuyó la conidiación en la ausencia de ChSte11 lo que sugiere que a pesar de ser homólogo a NRC-1, cumplen funciones distintas en cada organismo.

La conidiación en la cepa silvestre incrementó en presencia del peróxido de hidrógeno, lo cual está acorde a lo propuesto en donde un estado más oxidante lleva a una mayor diferenciación asexual (Michán S 2003). De manera relevante no se observaron cambios en ausencia de NRC-1 ó STE50. Aunque esto implica un mismo comportamiento no quiere decir que tienen el mismo papel.

En cuanto a la cepa Δ*nrc-1*, es posible que no se haya visto cambios con el peróxido de hidrógeno ya que la conidiación se incrementó incluso en condiciones libres de estrés. Esto se relaciona con la cepa Δ*gna-1* que también muestra una conidiación desreprimida en condiciones libres de estrés (Ivey FD 2002). En este antecedente se sugiere que GNA-1 actúa sobre distintas vías de señalización para reprimir la conidiación. Una vía propuesta es la adenilato ciclasa por que en la cepa donde se cancelan los genes *cr-1* y *gna-1* se recupera parcialmente la represión de la conidiación al agregar cAMP al medio de cultivo. Esto sugiere a NRC-1 como una vía adicional para reprimir la conidiación.

Respecto a la cepa Δ*ste50* que no mostró diferencias en la conidiación con el peróxido de hidrógeno va acorde a lo propuesto anteriormente. STE50 no solo se requiere para que el crecimiento se adapte a condiciones más oxidantes, sino también a la formación de los conidios cuando este estrés sobrepasa la capacidad antioxidante. Como se propone en el modelo de señalización celular por RAS-1 (Fig. 2) esto lo llevaría a cabo a través de la vía de OS-2. A pesar de esto queda por describir el mecanismo molecular de RAS-1 para

llevar a cabo el crecimiento y la conidiación, sin embargo estos resultados señalan a STE50 como proteína clave.

Para reforzar esta idea, la última parte del presente trabajo fue evaluar el crecimiento y la conidiación ante un estímulo como la luz, la cual lleva a un aumento de las ERO en los hongos (Peraza L 2002).

Mientras que la cepa silvestre y la cepa Δ*nrc-1* disminuyeron el desarrollo de la hifa aérea e incrementaron el número de conidios al exponerse a la luz los cultivos, la cepa Δ*ste50* mostró cambios discretos en la hifa aérea y sin cambios en el número de conidios formados. Esto indica que STE50 se requiere para la conidiación ya sea como respuesta al peróxido de hidrógeno o a la luz, por lo que se le debe considerar en el mecanismo del control genético en *N. crassa* ante este último estímulo (Park HS 2012).

CONCLUSIÓNES PARTICULARES

Caracterización fenotípica en condiciones basales

NRC-1 promueve la germinación, el crecimiento de la hifa vegetativa y la hifa aérea; e inhibe la conidiación. Siendo que el crecimiento y la conidiación son dos destinos celulares distintos, NRC-1 solo lleva al crecimiento y no así a la conidiación del hongo.

STE50 participa en la germinación y en el crecimiento de la hifa vegetativa y la hifa aérea, similar a NRC-1. De manera interesante también se requiere para la conidiación, contrario a lo observado para NRC-1. Esto señala que STE50 se requiere tanto para el crecimiento como la conidiación de *N. crassa*.

Caracterización fenotípica en presencia de peróxido de hidrogeno

La cepa silvestre disminuye el crecimiento, particularmente el de la hifa vegetativa, mientras que conidia más en respuesta al peróxido de hidrógeno.

A pesar de que NRC-1 participa en el crecimiento, su ausencia no afecta que el crecimiento disminuya en presencia del peróxido de hidrógeno. Respecto a la conidiación no se observan cambios, posiblemente porque la conidiación ya está elevada en ausencia de NRC-1.

En cambio, STE50 participa en la respuesta ante el peróxido de hidrógeno, ya que en su ausencia disminuye casi en su totalidad el crecimiento de la hifa vegetativa además de que no conidia más.

La presencia de artrosporas por el peróxido de hidrógeno no tuvo cambios por la ausencia de NRC-1 ó STE50, por lo que son dispensables para esta respuesta.

Caracterización fenotípica en presencia de luz

La cepa silvestre disminuye el crecimiento, en particular el de la hifa aérea, mientras que produce más conidios en presencia de luz.

La ausencia de NRC-1 no participa en esta respuesta, ya que disminuye el crecimiento de manera similar. También conidia más, a pesar de que ya hay una mayor conidiación por la ausencia de NRC-1.

Por su parte STE50 sí participa en la respuesta fisiológica ante la luz, ya que tras su ausencia tanto el crecimiento de la hifa aérea como la formación de conidios permanecieron similares ya sea en ausencia o presencia de luz.

Tabla VII. Resumen de la caracterización fenotípica

Condiciones	Basales			Presencia de peróxido de hidrógeno			Presencia de luz		
Cepa / Estadio celular	S	Δ*nrc-1*	Δ*ste50*	S	Δ*nrc-1*	Δ*ste50*	S	Δ*nrc-1*	Δ*ste50*
Germinación	++++	++	+++	++++	++	++	S.C.	S.C.	S.C.
Crecimiento vegetativo	++++	+++	++	+++	++	+	+++	+++	+
Micelio	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	++++
Hifa aérea	++++	+++	++	+++	+++	+	++	+	+
Conidios	++	+++	+	+++	+++	+	++++	++++	+
Artrosporas	N.D.	N.D.	N.D.	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
Esporas asexuales	N.D.	N.D.	N.D.	+++	++++	++	N.D.	N.D.	N.D.

Se representa una escala de los valores cuantificados donde + es el más bajo y ++++ es el más alto. S: silvestre. ND: No Detectado. SD: Sin Cuantificar.

CONCLUSIONES

NRC-1 participa en los mecanismos que llevan al crecimiento mientras que regula negativamente la conidiación en *N. crassa*. En cambio STE50 es importante para regular positivamente tanto el crecimiento como la conidiación.

Cuando el crecimiento disminuye en respuesta al peróxido de hidrógeno, NRC-1 no participa, mientras que STE50 es importante pues su ausencia lleva a un mayor arresto en el crecimiento. De manera relevante NRC-1 y STE50 juegan un papel en el incremento de la conidiación como respuesta ante el peróxido de hidrógeno. Los datos señalan que la que NRC-1 debe inactivarse para permitir una mayor conidiación. En cambio STE50 debe activarse para la formación de los conidios

Finalmente la exposición a la luz llevó también a un menor crecimiento y a una mayor conidiación. En esta respuesta NRC-1 no es importante, mientras que STE50 tiene un papel relevante en esta respuesta, pues su ausencia llevó a que el crecimiento y la conidiación no se afectaran por la luz.

PERSPECTIVAS

Los resultados señalan que NRC-1 y STE50 representan dos proteínas importantes a lo largo del ciclo asexual de *N. crassa*. El interés de estudiarlas radica en que representan efectores de RAS-1, sin embargo no se ha establecido si efectivamente NRC-1 ó STE50 interaccionan directamente con RAS-1 por lo que queda por comprobar si esto ocurre y bajo qué condiciones a través de ensayos como la transferencia de energía resonante por fluorescencia (FRET).

Por otro lado NRC-1 y STE50 comparten la regulación de ciertos estadios como la germinación o el crecimiento y dado que ambos poseen un dominio SAM, queda por demostrar si existe una interacción directa entre éstas, tal y como se describe para sus homólogos en otros organismos como *S. cerevisaie*. Para demostrar esto se usará el método de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC)

Finalmente STE50, y no NRC-1, participa también en la respuesta fisiológica ante un estrés oxidante lo que sugiere que STE50 señaliza de manera independiente de NRC-1 por lo que resulta interesante identificar dichas vías. Dado que STE50 es una proteína de andamiaje, participa en complejos proteicos durante la señalización, por lo que identificar las proteínas con las que interacciona permitirá conocer los mecanismos que regula. Esto se logrará a través de ensayos de co-inmunoprecipitación de STE50, la separación de las proteínas unidas mediante una electroforesis bidimensional y la identifiación de dichas proteínas mediante la espectrometría de masas.

Los mecanismos que regula RAS-1 aún quedan por esclarecerse pero los resultados señalan a STE50 como una herramienta que permita conocer acerca de cómo *N. crassa* da como resultado el crecimiento o la conidiación y su versatilidad ante cambios en el estado redox.

REFERENCIAS

Aguirre J, H. W. (1986). "Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase." J Bacteriol **166**(3): 1040-1045.

Aguirre J, R.-M. M., Hewitt D, Hansberg W (2005). "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes." Trends Microbiol **13**(3): 111-118.

Aguirre J, R. R., Hansberg W (1989). "Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species." J Bacteriol **171**(11): 6243-6250.

Aronson BD, L. K., Dunlap JC, Loros JJ (1994). "An efficient method for gene disruption in *Neurospora crassa*." Mol Gen Genet **242**: 490-494.

Belden WJ, L. L., Froehlich AC, Shi M, Chen CH, Loros JJ, Dunlap JC (2007). "The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of ras-1 implicating RAS signaling in circadian output." Genes Dev **21**(12): 1494-1505.

Bhattachariya S, X. P., Gingras R, Shaykhutdinov R, Wu C, Whiteway M, Ni F (2004). "Solution structure of the dimeric SAM domain of MAPKKK Ste11 and its interactions with the adaptor protein Ste50 from the budding yeast: implications for Ste11 activation and signal transmission through the Ste50-Ste11 complex." J Mol Biol **344**(4): 1071-1087.

Bilsland E, M. C., Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P (2004). "Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance." Mol Microbiol **53**(6): 1743-1756.

Bloomfield G, P. C. (2003). "Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3387-3397.

Cano-Domínguez N, A.-D. K., Hansberg W, Aguirre J (2008). "NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*." Eukaryotic Cell **7**(8): 1352-1361.

Cárdenas ME, H. W. (1984). "Glutamine metabolism during aerial growth of *Neurospora crassa*." J Gen Microbiol **130**(7): 1733-1741.

Catlett NL, L. B., Yoder OC, Turgeon BG (2003). "Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes." Fungal Genet News **50**: 9-11.

Chávez-Canales M, H. W. (2010). Modulación de la conidiación cíclica de *Neurospora crassa* con oxidantes y antioxidantes. Facultad de Biología. México, Universidad Nacional Autónoma de México. **Licenciatura**.

Chen C, D. M. (2004). "Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways." Mol Microbiol **51**(5): 1493-1507.

Chen CT, S. Y., Kuo TK, Lee OK, Wei YH (2008). "Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." Stem Cells **26**(4): 960-968.

Dan Li, B. P., Wilkinson HH, Ebbole DJ (2005). "A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*." Genetics **170**(3): 1091-1104.

Davis RH, d. S. F. (1970). "Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*." Meth Enzymol **17**: 79-143.

Dettmann A, H. Y., Valerius O, Ludwig S, Seiler S (2014). "Fungal communication requires the MAK-2 pathway elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 adapter STE-50 and the MAP kinase scaffold HAM-5." PLoS Genet **10**(11): e1004762.

Fleissner A, L. A., Roca MG, Read ND, Glass NL (2009). "Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion." Proc Natl Acad Sci USA **106**(46): 19387-19392.

Fujimura M, O. N., Oshima M, Motoyama T, Ichiishi A, Usami R, Horikoshi K, Yamaguchi I (2003). "Putative homologs of SSK2 MAPKK kinase and PBS2 MPAK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by os-4 and os-5 genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*." Biosci Biotechnol Biochem **67**(1): 186-191.

Furukawa K, H. Y., Maeda T, Nakajima T, Abe K (2005). "*Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress." Mol Microbiol **56**(5): 1246-1261.

Garrington TP, J. G. (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 211-218.

Georgiou CD, T. N., Sotiropoulou A (2000). "Hydroxyl radicals scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in phytopathogenic fungi." Mycologia **92**(5): 825-834.

Grimshaw SJ, M. H., Stott KM, Nielsen PR, Evetts KA, Hopkins LJ, Nietlispach D, Owen D (2004). "Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Ssccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM." J Biol Chem **279**(3): 2192-2201.

Grindle M, T. W. (1982). "Fungicide resistance of os mutants of *Neurospora crassa*." Neurospora Newsl **29**: 16-17.

Guan Y, W. D., Ying SH, Feng MG (2015). "A novel Ras GTPase (Ras3) regulates conidiation, multi-stress tolerance and virulence by acting upstream of Hog1 signaling pathway in *Beauveria bassiana*." Fungal Genet Biol **82**: 85-94.

Guignard R, G. F., Turian G (1984). "Microcycle conidiation induced by partial nitrogen deprivation in *Neurospora crassa*." Canadian Journal of Microbiology **30**(10): 1210-1215.

Gyöngyösi N, N. D., Makara K, Ella K, Káldi K (2013). "Reactive oxygen species can modulate circadian phase and period in *Neurospora crassa*." Free Radic Biol Med **58**: 134-143.

Hansberg W, A. J. (1990). "Hyperoxidant state cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen." J Theor Biol **142**(2): 201-221.

Hansberg W, A. J., Ríos-Momberg M, Rangel P, Peraza L, Montes de Oca Y (2008). Cell differentiation as a response to oxidative stress. Stress in Yeasts and Filamentous Fungi. M. S. Simon V Avery, Pieter Van West, British Mycological Society Symposium Series.

Higuchi M, D. G., Peshavariya H, Jiang F, Hsiao ST, Chan EC, Liu GS (2013). "Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes." Stem Cells Dev **22**(6): 878-888.

Ivey FD, K. A., Borkovich KA (2002). "Shared and independent roles for Galpha(i) protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*." Eukaryotic Cell **1**(4): 634-642.

Izumitsu K, Y. A., Kubo D, Morita A, Saitoh Y, Tanaka C (2009). "The MAPKK kinase ChSte11 regulates sexual/asexual development, melanization, pathogenicity, and adaptation to oxidative stress in *Cochliobolus heterostrophus*." Curr Genet **55**(4): 439-448.

Jansen G, B. F., Hollenberg CP, Ramezani Rad M (2001). "Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." 265 **1**(102-17).

Jones CA, G.-P. S., Borkovich KA (2007). "The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in *Neurospora crassa*." Mol Biol Cell **18**(6): 2123-2136.

Kays AM, R. P., Baasiri RA, Borkovich KA (2000). "Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the Galpha protein GNA-3 in *Neurospora crassa*." Mol Cell Biol **20**(20): 7693-7705.

Kothe GO, F. S. (1998). "The isolation and characterization of nrc-1 and nrc-2, two genes encoding protein kinases that control growth and development in *Neurospora crassa*." Genetics **149**(1): 117-130.

Kwan JJ. Warner N, M. J., Chan Tung KW, Zakaria H, Pawson T, Donaldson LW (2006). "*Saccharomyces cerevisiae* Ste50 binds the MAPKKK Ste11 through a head-to-tail SAM domain interaction." J Mol Biol **356**(1): 142-154.

Lara-Ortiz T, R.-R. H., Aguirre J (2003). "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **50**(4): 1241-1255.

Leadsham JE, S. G., Glannaki S, Bastow EL, Hutton R, Naeimi WR, Breitenbach, Gourlay CW (2013). "Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast." Cell Metab **18**(2): 279-286.

Leuthner B, A. C., Oehmen E, Koopmann E, Müller O, Müller P, Kahmann R, Bölker M, Schreier PH (2005). "A H2O2-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*." Mol Genet Genomics **272**(6): 639-650.

Lewis TS, S. P., Ahn NG (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Adv Cancer Res **74**: 49-139.

Li D, B. P., Wilkinson HH, Ebbole DJ (2005). "A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*." Genetics **170**(3): 1091-1104.

Lichius A, L. K., Jeffree CE, Oborny R, Boonyarungsrit P, Read ND (2012). "Importance of MAP kinases during protoperithecial morphogenesis in *Neurospora crassa*." PLos One **7**(8): e42565.

Livingston LR (1969). "Locus-specific chages in cell wall composition characteristic of osmotic mutants of *Neurospora crassa*." J Bacteriol **99**: 85-90.

Lledías F, R. P., Hansberg W (1999). "Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination." Free Radic Biol Med **26**(11-12): 1396-1404.

Maerz S, Z. C., Vogt N, Helmstaedt K, Cohen N, Gorovits R, Yarden O, Seiler S (2008). "The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*." Genetics **179**(3): 1313-1325.

Michán S, L. F., Hansberg W (2003). "Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains." Eukaryotic Cell **2**(4): 798-808.

Mody N, P. F., Sarafian TA, Demer LL (2001). "Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells." Free Radic Biol Med **31**(4): 509-519.

Nedelcu AM, M. O., Michod RE (2004). "Sex as a response to oxidative stress: a twofold increase in cellular reactive oxygen species activates sex genes." Proc Biol Sci **271**(1548): 1591-1596.

Ninneman H, M. J. (1996). "Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*." Photochem Photobiol **64**(2): 393-398.

Ninomiya Y, S. K., Ishii C, Inoue H (2004). "Highly efficient gene replacement in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining." Proc Natl Acad Sci USA **101**(33): 12248-12253.

Noguchi R, B. S., Ichikawa R, Fukumori F, Ichiishi A, Kimura M, Yamaguchi I, Fujimura M (2007). "Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*." Fungal Genet Biol **44**(3): 208-218.

Pandey A, R. M., Read ND, Glass NL (2004). "Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*." Eukaryotic Cell **3**(2): 348-358.

Park HS, Y. J. (2012). "Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi." Curr Opin Microbiol **15**(6): 669-677.

Peraza L, H. W. (2002). "*Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation." Biol Chem **383**(3-4): 569-575.

Perkins DD, R. A., Sachs MS (2001). "*The Neurospora Compendium Chromosomal Loci*." Cary, NC: Academic Press.

Plesofsky-Vyg N, L. D., Brambl R (1983). "Paedogenetic conidiation in *Neuropora crassa*." Exptl Mycol **7**: 283-286.

Poplinski A, H. C., Ramezani-Rad M (2007). "Ste50 adaptor protein influences Ras/cAMP-driven stress-response and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **51**(4): 257-268.

Posas F, S. H. (1998). "Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator." EMBO J **17**(5): 1385-1394.

Posas F, W. E., Saito H (1998). "Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway." Mol Cell Biol **18**(10): 5788-5796.

Qiao F, B. J. (2005). "The many faces of SAM." Sci STKE **286**: re7.

Ramezani-Rad M (2003). "The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast." Curr Genet **43**(3): 161-170.

Ramezani Rad M (2003). "The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signaling pathways of yeast." Curr Genet **43**: 161-170.

Ramezani Rad M, J. G., Bühring F, Hollenberg CP (1998). "Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p." Mol Gen Genet **259**(1): 29-38.

Ramezani Rad M, X. G., Hollenberg CP (1992). "*STE50*, a novel gene required for activation of conjugation at an early step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **236**: 145-154.

Rangel P, H. W. datos no publicados.

Sambrook J, R. D. (2001). "*Molecular cloning: a laboratory manual*." Cold Spring Harbor, N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schröder K, W. K., Helmcke I, Brandes RP (2009). "Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(2): 239-245.

Segmüller N, E. U., Tudzunski B, Tudzynski P (2007). "BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*." Eukaryotic Cell **6**(2): 211-221.

Sideri M, G. C. (2000). "Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii* are induced by the oxidizing growth factors, light and iron." Mycologia **92**(1-6): 1033-1042.

Song NK, J. C., Choi HS (2000). "Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes*." Mycologia **92**(1-6): 1027-1032.

Takemoto D, T. A., Scott B (2006). "A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis." Plant Cell **18**(10): 2807-2821.

Tatebayashi K, Y. K., Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H (2006). "Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway." EMBO J **25**(13): 3033-3044.

Terenzi HF, F. M., Torres HN (1974). "A *Neurospora crassa* morphological mutant showing reduced adenylate cyclase activity." Biochem Biophys Res Commun **58**(4): 990-996.

Timberlake WE (1980). "Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*." Science **202**: 973-974.

Toledo I, A. J., Hansberg W (1986). "Aerial growth in *Neurospora crassa* characterization of an experimental model system." Exptl Mycol **10**(2): 114-125.

Toledo I, A. J., Hansberg W (1994). "Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*." Microbiology **140**(Pt 9): 2391-2397.

Toledo I, H. W. (1990). "Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*." Exptl Mycol **14**(2): 184-189.

Toledo I, N.-D. A., Hansberg W (1991). "Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*." J Bacteriol **173**(10): 3243-3249.

Toledo I, R. P., Hansberg W (1995). "Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation." Arch Biochem Biophys **319**(2): 519-524.

Vallim MA, N. C., Fernandes L, Cramer KL, Alspaugh JA (2005). "A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic Cell **4**(6): 1066-1078.

Veal EA, D. A., Morgan BA (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." Mol Cell Biol **26**(1): 1-14.

Wang N, Y. Y., Hasunuma K (2007). "Catalase-1 (CAT-1) and nucleoside diphosphate kinase- (NDK-1) play and important role in protecting conidial viability under light stress in *Neurospora crassa*." Mol Genet Genomics **278**(3): 235-242.

Wanke V, A. K., Porro D, Esposito F, Russo T, Vanoni M (1999). "In budding yeast, reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest." Mol Microbiol **32**(4): 753-764.

Wu C, L. E., Thomas DY, Whiteway M (1999). "Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **10**(7): 2425-2440.

Xu G, J. G., Thomas DY, Hollenberg CP, Ramezani Rad M (1996). "Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **20**(4): 773-783.

Yoshida Y, I. H., Wang N, Hasunuma K (2011). "Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in *Neurospora*." PLos One **6**(12): e28227.

Zhang Y, L. R., Pillonel C, Lam S, Xu JR (2002). "Osmoregulation and fungicie resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue." Appl Environ Microbiol **68**(2): 532-538.

Zheng D, Z. S., Zhou X, Wang C, Xiang P, Zheng Q, Xu JR (2012). "The FgHOG1 pathway regulates hyphal growth, stress response, and plant infection in *Fusarium graminearum*." PLos One **7**(11): e49495.

Zhu J, Y. X., Xie, B, Gu X, Zhang Z, Li S (2013). "Transcriptomic profiling-based mutant screen reveals three new transcription factors mediating menadione resistance in *Neurospora crassa*." Fungal Biol **117**(6): 422-430.