

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**Unidad Irapuato**

**Departamento de Ingeniería Genética**

**“Estudio del mecanismo de transmisión de la señal de pH en *Ustilago  
maydis.*”**

**Tesis que presenta**

MC. Juan Antonio Cervantes Montelongo

**Para obtener el grado de**

Doctor en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas

**Director de Tesis:**

Dr. José Ruiz Herrera

### Agradecimientos al CONACYT

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del investigador emérito Dr. José Ruiz Herrera.

Agradezco a CONACyT por el apoyo económico recibido correspondiente a la beca de doctorado.

## Agradecimientos

Agradezco al Dr. Ruiz por su infinita paciencia y conocimiento, los cuales me hicieron mejorar día con día en este camino académico y de ciencia que escogí.

Agradezco a mis sinodales, Dra. Doralinda, Dr. de Luna, Dr. Plinio, Dr. Guevara y al Dr. Sentandreu por todos sus comentarios y sugerencias que mejoraron este trabajo.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos por el tiempo compartido y las enseñanzas que tuve a lo largo de mi estancia en el CINVESTAV.

Agradezco a mis amigos Memo, Roberto, Faby, Fer y Carmen por TODA su paciencia y ayuda que me brindaron dentro y fuera del laboratorio.

También quiero agradecer a mi madre, por su paciencia, amor y sacrificio que nos da día con día a mis hermanos y a mí.

A la Sra. Raquel y al Sr. Salvador por todo el apoyo y amor que recibo de parte de ellos y que nunca lograré compensar.

Por último agradezco a Raquel por dejarme compartir esta maravillosa vida contigo y por enseñarme cuáles son las cosas verdaderamente importantes.

## Índice general

|   |    |
|---|----|
| Índice general.....   | i  |
| Índice de tablas.....   | iv |
| Índice de figuras.....  | v  |
| RESUMEN.....  | 1  |
| ABSTRACT.....   | 3  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 5  |
| El pH y mecanismos adaptativos a cambios en este factor .....                                 | 5  |
| Mecanismos de repuesta de a cambios de pH en hongos.....                                      | 6  |
| Componentes de la vía Pal/Rim.....  | 7  |
| Procesos biológicos controlados por la vía Pal/Rim en Ascomycota y Basidiomycota.....         | 10 |
| <i>Ustilago maydis</i> .....  | 11 |
| Generalidades y ciclo de vida.....  | 11 |
| Dimorfismo y su importancia.....  | 13 |
| Factores que inducen el dimorfismo en <i>U. maydis</i> .....                                  | 13 |
| Vías de transducción de señales involucradas en el dimorfismo de <i>Ustilago maydis</i> ..... | 14 |
| JUSTIFICACIÓN.....  | 16 |
| HIPÓTESIS.....  | 16 |
| OBJETIVO GENERAL.....   | 17 |

|  |    |
|--|----|
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....   | 17 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 18 |
| Cepas fúngicas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....                | 18 |
| Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc e hibridación.....                      | 19 |
| Diseño, normalización y análisis de los microarreglos.....                         | 19 |
| Búsquedas bioinformáticas y análisis de dominios protéicos.....                    | 20 |
| Análisis de PCR en Tiempo Real (RT-PCR).....                                       | 20 |
| Generación de las mutantes de <i>U. maydis</i> .....                               | 21 |
| Análisis fenotípico de las mutantes de <i>U. maydis</i> .....                      | 23 |
| Efecto del pH sobre el crecimiento en medio mínimo líquido y sólido.....           | 23 |
| Estrés salino (Li <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> ).....           | 23 |
| Estrés osmótico.....   | 23 |
| Estrés oxidativo .....   | 24 |
| Capacidad de secreción de proteasas al medio.....                                  | 24 |
| Inducción de dimorfismo por pH y por ácidos grasos.....                            | 25 |
| Capacidad de apareamiento.....   | 25 |
| Microscopía.....   | 26 |
| Obtención de extractos libres de células.....                                      | 26 |
| Análisis tipo Western Blot.....  | 26 |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | 28 |
| Identificación de los genes de <i>U. maydis</i> que responden a cambios de pH..... | 28 |

|   |    |
|---|----|
| Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente.....  | 31 |
| Identificación de genes regulados diferencialmente por ambos cambios de pH...   | 35 |
| Identificación de posibles candidatos que podrían participar como sensores en el mecanismo de transmisión de la señal de pH | 36 |
| Mutación de los genes <i>pRho1</i> y <i>um00031</i> de <i>U. maydis</i> .....   | 38 |
| Análisis fenotípico de las mutantes $\Delta pRho1$ , $\Delta um00031$ y de las mutantes de proteína $G\alpha$               | 39 |
| Efecto del pH del medio de cultivo.....   | 40 |
| Efecto de iones monovalentes.....   | 43 |
| Efecto del estrés osmótico.....   | 46 |
| Efecto del estrés oxidativo.....  | 47 |
| Secreción de proteasas el medio de cultivo.....   | 48 |
| Detección del factor de transcripción PacC/Rim 101.....   | 50 |
| Dimorfismo inducido por pH.....   | 52 |
| Dimorfismo inducido por el uso de ácidos grasos como fuente de carbono.....   | 54 |
| Determinación de la capacidad de apareamiento de las mutantes.....  | 55 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 56 |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....   | 58 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 59 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla I.</b> Cepas de <i>U. maydis</i> utilizadas en este trabajo.   | 18 |
| <b>Tabla II.</b> Oligonucleótidos utilizados en los análisis en Tiempo Real   | 21 |
| <b>Tabla III.</b> Oligonucleótidos utilizados para las construcciones de las mutantes de <i>U. maydis</i> obtenidas en este trabajo.  | 22 |
| <b>Tabla IV.</b> Condiciones experimentales de crecimiento de <i>U. maydis</i> con cambio de pH como factor común   | 28 |
| <b>Tabla V.</b> Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente a pH 3.   | 31 |
| <b>Tabla VI.</b> Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente a pH 9.  | 32 |
| <b>Tabla VII.</b> Comparación entre niveles de expresión transcripcional de genes seleccionados determinados por medio de microarreglos y pCR en tiempo real usando la cepa silvestre de <i>U. maydis</i> . | 32 |
| <b>Tabla VIII.</b> Subclasificación de genes diferencialmente regulados a pH 3 y pH 9 pertenecientes a la categoría de metabolismo.   | 33 |
| <b>Tabla IX.</b> Genes compartidos en ambos cambios de pH   | 35 |
| <b>Tabla X.</b> Genes diferencialmente expresados a pH 3 y pH 9 clasificados en la categoría de comunicación celular y transducción de señales  | 37 |
| <b>Tabla XI.</b> Efecto del estrés oxidativo en el crecimiento de las mutantes de <i>U. maydis</i> .  | 47 |
| <b>Tabla XII.</b> Porcentaje de formación de micelio de las cepas mutantes de <i>U. maydis</i>  | 54 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Modelo general de la regulación de la vía Pal o Rim por pH en hongos  | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Activación por pH de la vía Pal/Rim en Ascomycota   | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Representación esquemática del ciclo de vida de <i>U. maydis</i>  | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Identificación de genes expresados diferencialmente en valores de pH extremos                                       | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama para la mutación del gen $\Delta pRho1$ de <i>U. maydis</i>  | 38 |
| <b>Figura 6.</b> Diagrama para la mutación del gen $\Delta um00031$ de <i>U. maydis</i>  | 39 |
| <b>Figura 7.</b> Efecto del pH sobre el crecimiento en placa de las mutantes $\Delta pRho1$ y $\Delta um00031$ de <i>U. maydis</i> . | 40 |
| <b>Figura 8.</b> Efecto del pH sobre el crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes $G\alpha$ de <i>U. maydis</i> .           | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Efecto del pH sobre el crecimiento en placa de las mutantes $\Delta pRho1$ y $\Delta um00031$ de <i>U. maydis</i>   | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Efecto del pH sobre el crecimiento en placa de las mutantes $G\alpha$ de <i>U. maydis</i> .                        | 42 |
| <b>Figura 11.</b> Efecto del LiCl sobre el crecimiento de las mutantes de <i>U. maydis</i> .   | 44 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto del KCl sobre el crecimiento de las mutantes de <i>U. maydis</i> .  | 45 |
| <b>Figura 13.</b> Efecto del NaCl sobre el crecimiento de las mutantes de <i>U. maydis</i> .   | 45 |
| <b>Figura 14.</b> Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de las mutantes de <i>U. maydis</i> .                              | 46 |
| <b>Figura 15.</b> Secreción de proteasas al medio de cultivo de las mutantes $\Delta pRho1$ y $\Delta um00031$ de <i>U. maydis</i> . | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Secreción de proteasas al medio de cultivo de las mutantes $G\alpha$ de <i>U. maydis</i> .                         | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Detección del factor de transcripción PacC/Rim101 de <i>U. maydis</i> por medio de western blot                    | 51 |

**Figura 18.** Dimorfismo inducido por pH en las cepas mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  de *U. maydis*. 53

**Figura 19.** Prueba de apareamiento de las cepas mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  de *U. maydis*. 55

## RESUMEN

Todos los organismos se encuentran expuestos a diferentes factores químicos, físico y fisicoquímicos que afectan su crecimiento y desarrollo. Por ejemplo, diferentes compuestos, nutrientes o inhibidores, temperatura, presión y pH. En consecuencia, su supervivencia dependerá directamente de su capacidad de adaptación a cambios en estos factores. Así, es bien conocido que los hongos poseen un mecanismo ampliamente distribuido relacionado con su adaptación a cambios del pH, la vía Pal/Rim.

A fin de entender el mecanismo que el hongo fitopatógeno Basidiomycota *Ustilago maydis* tiene para su adaptación a cambios de pH, y los genes involucrados en este proceso, analizamos su transcriptoma durante su adaptación a cambios de pH cuando fue transferido de un pH neutro a un pH ácido, o a un pH alcalino. De esta manera, identificamos un total de 301 genes específicamente regulados por el cambio a pH 3, 162 inducidos y 139 reprimidos. La caracterización funcional de estos genes mostró que las categorías de metabolismo, transporte, defensa celular e interacción con el medio ambiente fueron las que presentaron el mayor número de genes. Por otro lado, 797 genes fueron específicamente regulados por el cambio a pH 9. De estos, 335 genes aparecen inducidos y 462 reprimidos. En este caso, las categorías con el mayor número de genes fueron, metabolismo, transcripción, transporte, proteínas con función de unión y rescate celular. Interesantemente, la mayoría de estos genes no fueron regulados por la vía Pal/Rim.

De estos genes se eligieron aquellos que podían estar relacionados con la transmisión de la señal de cambio de pH, o que por su estructura podían estar asociados con el plasmalema y servir como receptores de la señal de cambio de pH. Finalmente se eligieron dos de los más promisorios para llevar a cabo su mutación. Para ello se procedió a mutar los genes *pRho1* (GTPasa monomérica) y um00031 (proteína sin clasificar). El gen *pRho1* apareció inducido 3.8 veces a pH ácido de 3, mientras que el gen um00031 aparece también inducido 2.6 veces a pH alcalino de 9. Al realizar el análisis fenotípico de estas mutantes, se observó que ambas presentaban algunas de las características típicas de las mutantes de la vía Pal/Rim. Sin embargo, solo el gen *pRho1* parece ser el único directamente involucrado con esta importante vía, esto debido a que aparentemente juega un papel en el primer corte proteolítico dependiente de pH para la activación del factor de transcripción PacC/Rim101

y es necesario para responder a diferentes tipos de estrés como son: pH alcalino, estrés osmótico, oxidativo y el causado por iones monovalentes, además de la incapacidad de secretar proteasas al medio de cultivo.

Estos resultados indican que *U. maydis* (y posiblemente otros hongos) llevan a cabo una modificación más drástica en su programa transcripcional para adaptarse a condiciones alcalinas en comparación con condiciones ácidas. Además que la adaptación a pH alcalino probablemente involucra otro(s) mecanismo(s), aparte de la vía Pal/Rim.

## ABSTRACT

All organisms are exposed in the environment to different chemical, physical and physicochemical factors that may affect their growth and development. For example, different compounds, nutritious or inhibitors, temperature, pressure, and pH. Accordingly, their survival will depend directly on their capacity of adaptation to changes in these factors. Thus, it is known that fungi possess a widely distributed mechanism involved in their adaptation to an alkaline pH change, the Pal/Rim pathway.

In order to understand the mechanisms that the phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis* possesses for adaptation to changes in the external pH, and the genes involved in the process, we analyzed its transcriptome during its adaptation to changes of pH when transferred from a neutral to an acidic, or to an alkaline pH. This way, we identified a total of 301 specifically regulated by the change to pH 3, 162 up-regulated and 139 down-regulated. Functional categorization of the genes showed that metabolism, transport, cellular defense and environment interaction categories were the ones with the greater number of genes. On the other side, 797 genes were specifically regulated by the change to pH 9. Of these, 335 genes were up-regulated, and 462 genes were down-regulated. In this case, the categories with the higher number of genes were metabolism, transcription, transport, proteins with binding function or cofactor requirement, and cell rescue. Interestingly, many of these genes were not regulated by the Pal/Rim pathway.

Mutations of the genes *pRho1* (monomeric GTPase) and um00031 (unclassified) were made. Gene *pRho1* appeared as up-regulated (3.8 fold-change) at acidic pH of 3, and gene *um00031* was also up-regulated (2.6 fold-change) at alkaline pH of 9. When performing the phenotypic analysis of these mutants, it was observed that both of them presented typical characteristics of the Pal/Rim mutants. Nevertheless, only the *pRho1* gene seemed to be directly related with this important pathway, due to it apparently plays a role in the first pH-dependent proteolytic cleavage for the activation of the transcription factor PacC/Rim101.

These results indicate that *U. maydis* (and possibly other fungi) underwent a more drastic modification on its transcriptional program in order to adapt to alkaline conditions, compared to its adaptation to acid pH. In addition, they also demonstrated that adaptation to

an acid pH does not involve the Pall/Rim pathway, and that adaptation to alkaline pH probably involves other mechanism(s), besides the Pal/Rim pathway.

## INTRODUCCIÓN

### *El pH y los mecanismos adaptativos a cambios en este factor*

El pH es uno de los factores fisicoquímicos más importantes que afectan el desarrollo y el crecimiento celular. Los organismos vivos han desarrollado mecanismos específicos para adaptarse al medio ambiente con valores variables de este factor. En el caso de organismos multicelulares, que tienen la facilidad de regular su ambiente interno y cuyas células se encuentran bajo condiciones estables de crecimiento, se ha demostrado que la acidificación del citoplasma y del ambiente extracelular está asociada con muchos cambios fisiológicos y patológicos como ejercicio intenso, hipoxia y tumorigénesis (Balgi *et al.*, 2011), incluyendo procesos celulares importantes como la síntesis de proteínas, el crecimiento y la proliferación celular, los cuales pueden ser impactados negativamente incluso por una acidificación leve (Pouyssegur *et al.*, 1985; Bravo y Macdonald-Bravo, 1986; Chambard y Pouyssegur, 1986; Musgrove *et al.*, 1987; Chiche *et al.*, 2009). Esta alteración refleja una incapacidad de las células de funcionar normalmente en un pH subóptimo.

Se sabe que la proteína cinasa reguladora maestra mTorC1 responde a cambios del pH extracelular y citoplásmico. Esta proteína es el regulador maestro del metabolismo, crecimiento, supervivencia y proliferación celular y es activa cuando existen condiciones propicias para el crecimiento (Rubinsztein *et al.*, 2007) La conformación de mTor está dada por los complejos multiproteicos funcional y estructuralmente diferentes, mTorC1 y mTorC2 (Hall, 2008). Se ha demostrado que mTorC1 está negativamente regulado por el complejo Tsc1/Tsc2 el cual es controlado a su vez por varias de las principales señales reguladoras río arriba como son factores de crecimiento, baja energía (ATP) y el agotamiento del oxígeno (Inoki *et al.*, 2005; Huang y Manning, 2008). Balgi y colaboradores (2011) concluyeron que el complejo TSC1/TSC2 en conjunto con mTorC1 juegan un papel importante en el sensado de variaciones de pH en el ambiente y que al igual que una baja perfusión en los tejidos, baja disponibilidad de glucosa y alto gasto de energía, un pH ácido puede servir como señal para mTorC1 provocando una disminución

del consumo de energía en procesos anabólicos como síntesis de proteínas en respuesta adaptativa a condiciones metabólicamente estresantes.

Más compleja es la situación de los organismos unicelulares que viven en medios diversos. Para sobrevivir bajo condiciones variables de pH, estos organismos han desarrollado mecanismos que miden el pH externo y responden regulando la entrada y salida de diferentes iones.

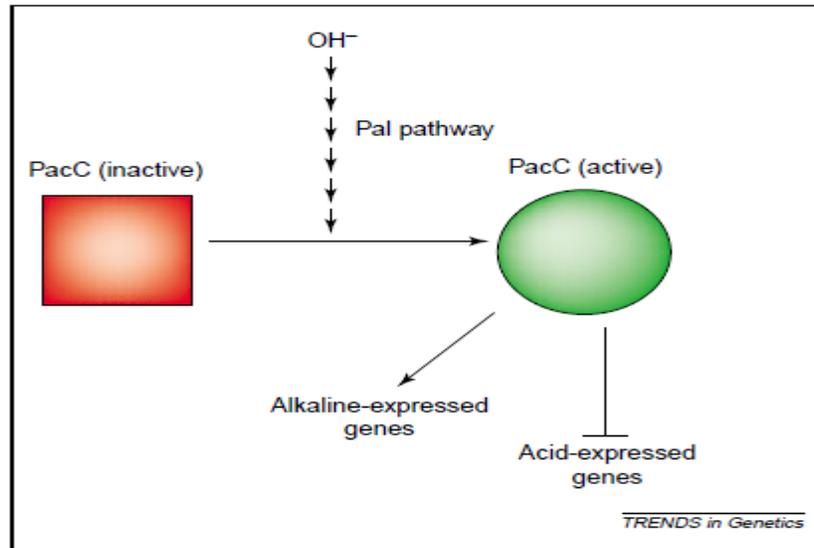
En las bacterias el pH externo parcialmente determina el pH citoplasmático o intracelular, el cual afecta la actividad enzimática y tasas de reacción, estabilidad de proteínas, estructura de ácidos nucleicos y de muchas otras moléculas biológicas. Además se han descrito diferentes mecanismos para el control de la homeostasis del pH intracelular; estos mecanismos van desde el amortiguamiento del pH citoplásmico, adaptaciones de la estructura de la membrana, y transporte activo de iones, hasta el consumo metabólico de ácidos y bases (Slonczewski *et al.*, 2009).

### ***Mecanismos de repuesta de a cambios de pH en los hongos***

Muchos hongos crecen en un amplio rango de pH y su expresión génica está adaptada para responder a cambios de pH del medio. Para esta adaptación los hongos cuentan con un sistema que les permite mantener un estado homeostático de pH interno y que asegura que las moléculas directamente expuestas al ambiente como permeasas, enzimas de secreción y metabolitos de exportación, sean sintetizados solo bajo valores de pH en las que puedan funcionar (Peñalva *et al.*, 2008).

El mecanismo más ampliamente distribuido, con algunas variantes, es la vía de transducción de señales designada Rim o Pal para levaduras u hongos filamentosos respectivamente (Davis *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2001; Peñalva y Arst, 2002; Caracuel *et al.*, 2003; Rollins, 2003; You y Chung, 2007) y que ha sido neutralmente designada Pal/Rim (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005; Cervantes-Chávez *et al.*, 2010; Fonseca-García *et al.*, 2012).

Esta vía es la encargada de regular diferentes procesos metabólicos en respuesta a cambios de pH del medio y así poder mantener un pH intracelular constante. La vía de señalización Pal/Rim depende de la activación proteolítica de un factor de transcripción llamado PacC/Rim101 (Davis *et al.*, 2000; Peñalva y Arst, 2002). Este factor activa la transcripción de algunos genes a pH alcalino y reprime otros a pH ácido (Su y Mitchell, 1993; Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995). ( La **Fig 1** muestra un modelo de su funcionamiento).

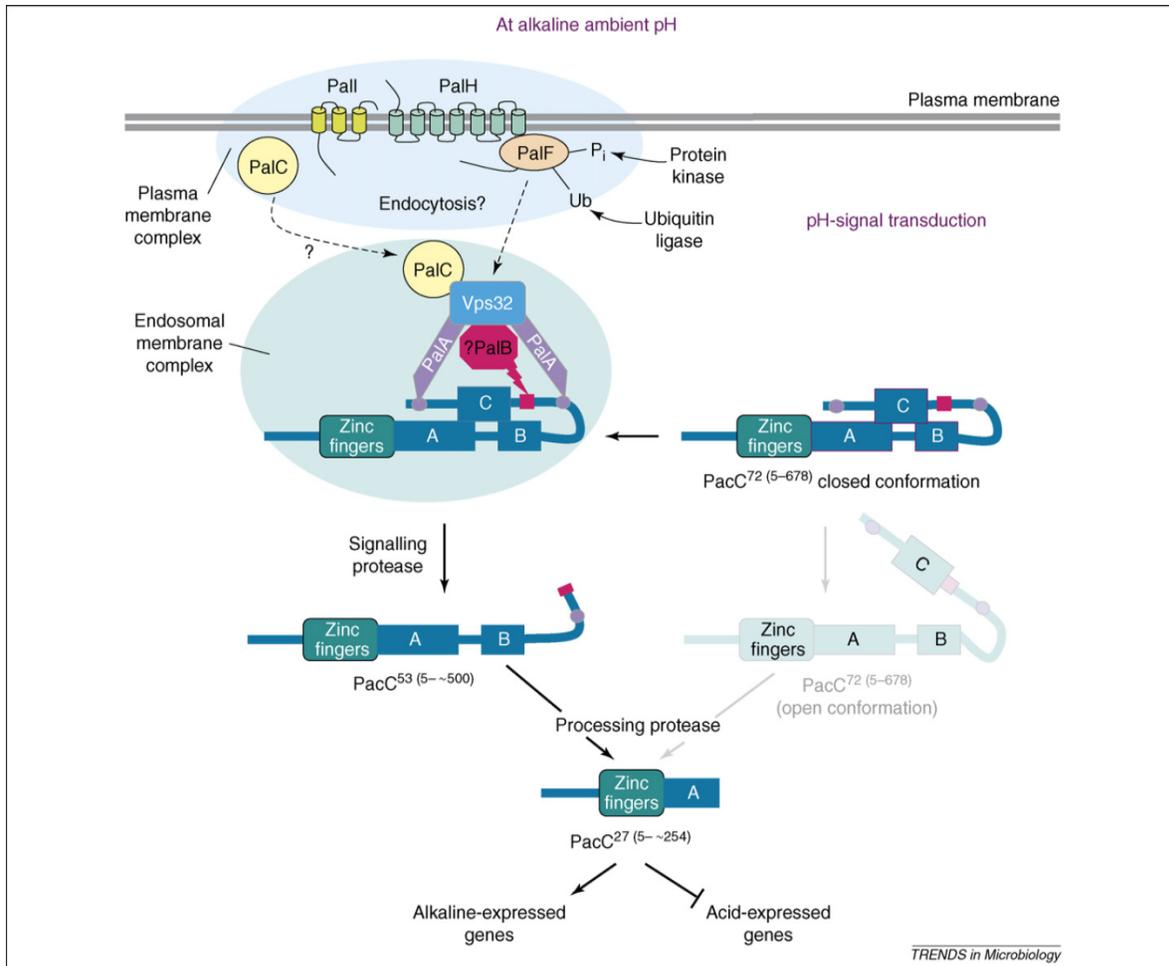


**Figura 1.** Modelo general de la regulación de la vía Pal o Rim por pH en hongos (Arst y Peñalva, 2003).

### ***Componentes de la vía Pal/Rim***

En especies de Ascomycota, en las cuales la regulación génica por pH del ambiente ha sido más extensamente investigada, la activación de PacC/Rim101 depende de la acción de cinco o seis proteínas dependiendo de la especie: PalH/Rim21, PalF/Rim8, PalI/Rim9, PalA/Rim20, PalC/Rim23 y PalB/Rim13 en combinación con algunos de los componentes de la maquinaria del sistema endocítico organizados en dos complejos: uno involucrado en la percepción del estímulo de pH localizado en la membrana plasmática y otro responsable del mecanismo de activación final asociado a las membranas endocíticas (Peñalva y Arst, 2002, 2004; Xu *et al.*, 2004; Blanchin-Roland *et al.*, 2005, 2008; Cornet *et al.*, 2005; Peñalva *et al.*, 2008).

La forma en que se realiza la transferencia de la señal se muestra en la **Fig 2**: bajo condiciones ácidas predomina la forma PacC<sup>72</sup> (72-kD y 674 aa de longitud) que se encuentra en una conformación cerrada inaccesible al proceso de proteólisis. Pero bajo condiciones alcalinas la señal de pH es transmitida desde el complejo de la membrana plasmática por medio de un proceso que probablemente involucra la endocitosis de PalH y/o PalF y la participación de PalC, hasta el complejo de la membrana endosomal sobre la superficie del endosoma. En este punto, PacC, unido a PalA a través de motivos YXPL/I, sufre la primera proteólisis que es dependiente de pH, la cual ocurre sobre el motivo de señalización de proteólisis (marcado en rojo). Esta proteólisis es mediada por la proteasa PalB, la cual elimina parte del extremo C-terminal, aproximadamente 180 residuos de aa, para formar PacC<sup>53</sup>. PacC<sup>53</sup> adquiere entonces una conformación abierta accesible al proceso de proteólisis por el proteosoma, el cual remueve aproximadamente 245 aa, nuevamente del extremo C-terminal (segunda proteólisis que es independiente de pH) para formar PacC<sup>27</sup>, el cual actúa como activador de la expresión de genes bajo pH alcalino y represor de genes expresados bajo condiciones ácidas.



**Figura 2.** Activación por pH de la vía Pal/Rim en Ascomycota (Peñas *et al.*, 2007; Peñalva *et al.*, 2008).

También se sabe que la vía Pal/Rim está presente en Basidiomycota, ya que en *U. maydis* se han identificado por homología, aislado y mutado los genes que codifican cinco de los siete componentes encontrados en especies de Ascomycota: PacC/Rim101, PalA/Rim20, PalB/Rim13, y PalC/Rim23, los cuales constituyen el complejo presente en la membrana endosomal y Pall/Rim9 del complejo de la membrana plasmática, aunque sin actividad detectable en la transducción de la señal (Cervantes-Chávez *et al.*, 2010).

### ***Procesos biológicos controlados por la vía Pal/Rim en Ascomycota y Basidiomycota***

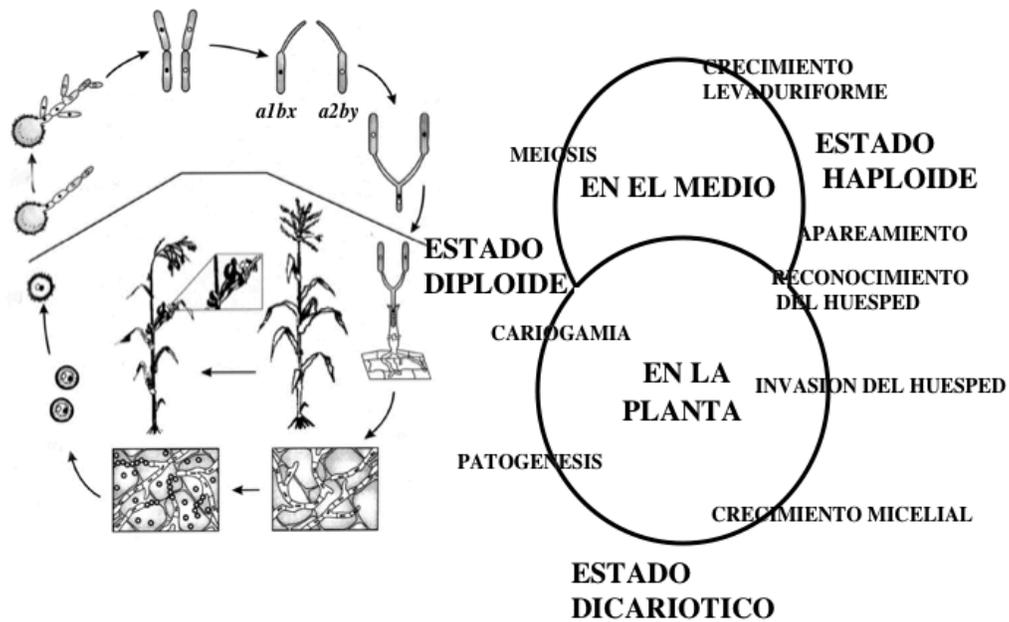
Las mutantes de la vía Pal/Rim presentan un fenotipo pleiotrópico, en el caso de los Ascomycota se ven afectados el apareamiento y la esporulación, el crecimiento a pH neutro y alcalino, sensibilidad aumentada al estrés osmótico y iónico, debilitamiento y falla en la síntesis de la pared celular, y secreción de proteína al medio de cultivo (Lambert *et al.*, 1997; Peñalva y Arst, 2002, 2004; Lamb y Mitchell, 2003; Rollins, 2003; Bensen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Cornet *et al.*, 2005; González-López *et al.*, 2006; Castrejon *et al.*, 2006; Kullas *et al.*, 2007; Blanchind-Roland *et al.*, 2008; Mira *et al.*, 2009).

Por otro lado en el caso de los Basidiomycota, por ejemplo *U. maydis*, procesos como el debilitamiento y falla en la síntesis de la pared celular, secreción de proteína al medio de cultivo (lipasa y proteasas), mayor sensibilidad a estrés oxidativo y iónico (cationes monovalentes) y mantenimiento del pH celular interno se ven comprometidos (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005; Cervantes-Chávez *et al.*, 2010; Fonseca-García *et al.*, 2012). En el caso de otro Basidiomycota de interés como el patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, la vía Pal/Rim controla la síntesis del polisacárido que conforma la cápsula y participa en respuesta a otras condiciones de estrés como una baja disponibilidad de  $Fe^{+2}$ , concentraciones elevadas de sal y un pH alcalino (O'Meara, *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2010). Además, la vía Pal/Rim está involucrada en ciertas modificaciones de la pared celular del hongo que le permiten enmascarar su presencia para evadir al sistema inmunológico del huésped (O'Meara, *et al.*, 2013). Con la información anterior, se puede concluir que la vía Pal/Rim participa en diferentes procesos importantes para la célula, siendo uno de ellos la adaptación a pH alcalino. Sin embargo debemos recalcar que el sensor de pH a nivel de membrana en los Basidiomycota aún no se conoce.

## *Ustilago maydis*

### *Generalidades y ciclo de vida*

*Ustilago maydis* (DC.) Corda, es un Basidiomycota fitopatógeno perteneciente al grupo de los Ustilaginales y agente causal de la enfermedad llamada carbón común o “huitlacoche” en el maíz (*Zea mays*) y en su probable antecesor, el teozintle (*Zea mays ssp parviglumis*). En la naturaleza este hongo presenta un ciclo de vida complejo que involucra dos diferentes estadios (**Fig 3**): una fase saprofitica que ocurre en el medio ambiente, donde *U. maydis* crece en forma de levaduras haploides que se reproducen por gemación; y una segunda fase virulenta, que se inicia por la fusión de dos células levaduriformes haploides sexualmente compatibles, para formar una hifa dicariótica (Kronstad y Leong, 1989; 1990; Schulz *et al.*, 1990). Este dicarion invade la planta huésped y crece en forma de filamentos septados para después formar teliosporas diploides dentro de los tumores característicos de la enfermedad. Las teliosporas germinan fuera de la planta con la posterior formación de basidiosporas haploides que reinician el ciclo de vida (Banuett y Herskowitz, 1996; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa 1998; Ruiz-Herrera *et al.*, 2000; Bölker, 2001; Banuett, 2002; Ruiz-Herrera y León Ramírez, 2012).



**Figura 3.** Representación esquemática del ciclo de vida de *U. maydis* (Ruiz-Herrera, 2008).

De esta información es evidente que el comportamiento patogénico del hongo está estrictamente asociado con su ciclo sexual, y con las alteraciones morfológicas que se llevan a cabo durante dicho proceso. El proceso de apareamiento, y consecuentemente el establecimiento del desarrollo patogénico, es controlado por dos *loci* de apareamiento independientes: *a* y *b*. El *locus a* codifica feromonas y receptores los cuales sensan la presencia de feromonas del sexo complementario y controla la fusión celular, mientras que el *locus b* controla el crecimiento micelial y la patogénesis (Kronstad y Leong 1989, 1990; Schulz *et al.* 1990; Bölker, 2001). Un segundo ciclo de vida ocurre *in vitro*, el cual involucra la formación de basidiocarpos y fue descrito por recientemente por nuestro grupo de trabajo (Cabrera-Ponce *et al.*, 2012).

### ***Dimorfismo y su importancia***

Como se indicó, *U. maydis* sufre un proceso dimórfico durante su ciclo de vida, alternando una fase levauriforme y otra micelial. Este proceso diferenciativo es de importancia, no solo en este hongo, sino en todo el Reino Fungi. El dimorfismo es la capacidad que tienen diferentes hongos de crecer en forma de levadura o de micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Este fenómeno no está restringido a un grupo especial de hongos, por el contrario, especies dimórficas se encuentran en los diferentes grupos taxonómicos del reino Fungi.

Entre las condiciones que inducen la transición dimórfica, levadura-micelio o viceversa, se encuentran factores como el pH, la atmósfera gaseosa de crecimiento o la presencia de compuestos específicos en el medio de cultivo (Szanişzlo, 1985; Vanden Bossche *et al.*, 1993; Ruiz-Herrera y León-Ramírez, 2012 ).

El interés sobre el dimorfismo radica en que muchos hongos dimórficos son responsables de la mayoría de las infecciones fúngicas en humanos y otros mamíferos, e incluso en algunas plantas y además representa un excelente modelo para el análisis de los fenómenos diferenciativos en eucariotes.

### ***Factores que inducen el dimorfismo en U. maydis***

Varias condiciones ambientales pueden inducir la transición de levadura a micelio en *U. maydis* independientemente del apareamiento. Es así que se ha demostrado que cepas haploides crecen en forma filamentosa en medio ácido, con un valor óptimo de 3, y en forma de levadura a pH neutro; un comportamiento que es independiente del *locus b* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Martínez-Espinosa *et al.* 2004). Así mismo, se ha observado que en cepas diploides el desarrollo de hifas puede ser estimulado por condiciones de limitación de nitrógeno en cepas diploides (Banuett y Herkowitz, 1994); y por otro lado que, el

cambio a crecimiento filamentosos puede ser inducido por la adición de lípidos como fuente de carbono al medio de cultivo (Klose *et al.*, 2004).

Las poliaminas, al igual que en otros hongos, están involucradas en la transición dimórfica de *U. maydis*, ya que mutantes nulas en el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (Odc), por lo cuales son auxótrofas poliaminas, pueden crecer en presencia de bajos niveles de poliaminas (0.5 mM), pero son incapaces de llevar a cabo la transición a la forma micelial. Este fenotipo es revertido solo cuando se aumentan las concentraciones de poliaminas en el medio de cultivo (Ruiz-Herrera, 1994; Guevara-Olvera *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que cepas haploides crecen en forma filamentosas en medio ácido, con un valor óptimo de 3, un comportamiento que es independiente del *locus b* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Martínez-Espinosa *et al.* 2004).

Debido a que el dicarion es un parásito obligado capaz de crecer solamente en la planta de maíz, el desarrollo micelial inducido *in vitro* por señales ambientales, como lo es el pH, ha sido usado para entender los mecanismos que gobiernan este proceso diferenciativo.

### ***Vías de transducción de señales involucradas en el dimorfismo de Ustilago maydis***

Se ha demostrado que *U. maydis* posee la vía de transducción de señales PKA, dependientes de AMPc y tres vías de MAP cinasas (MAPK). Gold y colaboradores (1994) aislaron una cepa mutante afectada en la adenilato ciclasa (*uac1*) que solo crecía en forma micelial. Esto condujo a pensar que la vía PKA estaba involucrada en el crecimiento levaduriforme. Con el objeto de identificar a los elementos involucrados en el crecimiento micelial, se procedió a identificar supresores del fenotipo debido a la mutación en el gen *uac1*, es decir, mutantes que crecieran en forma de levaduras. De esta manera se identificó una serie de genes que fueron denominados *Ubc* (“Ustilago Bypass of Cyclase”). Entre los genes identificados se encontró el que codifica la subunidad reguladora de la PKA (*ubc1*). Pero interesantemente, el resto de los genes codificaban miembros de un módulo MAPK, sugiriendo que mientras la vía PKA está involucrada en el crecimiento levaduriforme, la vía MAPK lo está en el crecimiento micelial (Martínez-Espinosa *et*

*al.*, 2002). Posteriormente se demostró que la adición de AMPc inhibía el crecimiento micelial a pH ácido y que las mutantes afectadas en cualquiera de los genes *Ubc* eran incapaces de crecer en forma micelial (Martínez-Espinoza *et al.*, 2004). Estos resultados demostraron que las vías de transducción de señales PKA y MAPK son antagónicas en *U. maydis*; mientras la primera favorece el crecimiento levaduriforme, la segunda favorece el crecimiento micelial.

## **JUSTIFICACIÓN**

El interés sobre el estudio de la transmisión de la señal de pH en los hongos radica en que muchos de ellos poseen una gran capacidad de adaptación a cambios en este factor, lo cual les facilita la colonización de diferentes ambientes; ésto está íntimamente relacionado con los procesos de patogénesis y virulencia. Sin embargo, el entendimiento de como la señal de alteración en el pH extremo es transmitida al interior de la célula es limitado. Por ello es importante conocer el mecanismo por medio del cual se sensa y transfiere esa señal y la relación que guarda con la capacidad de adaptación de *U. maydis* a medios con diferentes valores de pH.

## **HIPÓTESIS**

Existen receptores de la señal de pH que la captan y transmiten al interior de la célula, mismos que guardan relación con las vías Pal/Rim, MAPK y PKA en *U. maydis*

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el mecanismo de adaptación de *U. maydis* a cambios extremos de pH y la transmisión de esta señal hacia el interior de la célula.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar y agrupar funcionalmente los genes diferencialmente expresados por cambio de pH neutro a ácido en *U. maydis*.
- Identificar y agrupar funcionalmente los genes diferencialmente expresados por cambio de pH neutro a alcalino en *U. maydis*
- Analizar la regulación de genes que codifican posibles candidatos a servir como sensores del pH externo, o involucrados en la transmisión de la señal de pH al interior de la célula y su relación con el dimorfismo.
- Obtener mutantes de algunos de los genes identificados con características atractivas que sugieran un papel importante en el dimorfismo.
- Realizar un análisis fenotípico de las mutantes obtenidas, con énfasis en el proceso adaptativo a cambios de pH del medio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas fúngicas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento*

Las cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo se muestran en la **Tabla I**. Todas ellas fueron mantenidas en glicerol al 50% a -70 °C, y cuando fue necesario fueron crecidas en medio completo (MC) hasta alcanzar una D.O. a 600 nm = 0.8, y transferidas a medio mínimo líquido (MM, Holiday, 1974) a pH 3, pH 7 o pH 9 bajo el protocolo previamente descrito (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Las placas de MM utilizadas se prepararon de acuerdo a lo descrito por Holliday (1974) ajustándose el pH del medio conforme a la prueba realizada. La fuente de carbono para las pruebas de inducción de dimorfismo por ácidos grasos fué el ácido palmítico al 1% en forma de Tween 40.

**Tabla I.** Cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo.

| <b>Nombre de la cepa</b> | <b>Fondo genético y mutación</b> | <b>Referencia</b>                            |
|--------------------------|----------------------------------|--|
| FB2                      | <i>a2b2</i> (silvestre)          | Banuett y Herskowitz, 1989                   |
| CL211                    | <i>a2b2Δubc2</i>                 | Martínez-Espinoza <i>et al.</i> , 1997; 2004 |
| GP25                     | <i>a2b2Δgcn5::hyg</i>            | González-Prieto <i>et al.</i> , 2014         |
| BMA2                     | <i>a2b2ΔRim101/PacC::hyg</i>     | Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005       |
| AC401                    | <i>a2b2ΔRim13/PalB::cbx</i>      | Cervantes-Chávez <i>et al.</i> , 2010        |
| <i>Δum00031</i>          | <i>a2b2Δum00031::hyg</i>         | Este trabajo                                 |
| <i>ΔpRho1</i>            | <i>a2b2ΔpRho1::hyg</i>           | Este trabajo                                 |
| <i>Δgpa1</i>             | <i>a2b2Δgpa1::hyg</i>            | Regenfelder <i>et al.</i> , 1997             |
| <i>Δgpa2</i>             | <i>a2b2Δgpa2::hyg</i>            | Regenfelder <i>et al.</i> , 1997             |
| <i>Δgpa3</i>             | <i>a2b2Δgpa3::hyg</i>            | Regenfelder <i>et al.</i> , 1997             |
| <i>Δgpa4</i>             | <i>a2b2Δgpa4::hyg</i>            | Regenfelder <i>et al.</i> , 1997             |

### ***Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc e hibridación***

Se recuperaron por centrifugación células de *U. maydis* de las cepas FB2 (*a2b2*), CL211 (*a2b2Δubc2*) y (*a2b2Δgcn5::hyg*) crecidas en MM de pH 7 por toda la noche y fueron inoculadas ( $10^6$  células mL<sup>-1</sup>) en matraces conteniendo 500 mL de MM pH 7, pH 3 o pH 9 (Holliday, 1974) y se incubaron a 28°C por 16 h en condiciones de agitación a 150 rpm. Las células fueron recuperadas por centrifugación y el ARN total fue aislado de tres cultivos celulares independientes (replicas biológicas). Se realizó la purificación del ARN total obtenido con el RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) y se midió la concentración del mismo utilizando un aparato Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 260 nm. La integridad del ARN se comprobó por medio de una electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

La síntesis, marcaje del ADNc y la hibridación con los microarreglos fueron hechas por la compañía Roche NimbleGen Inc. (Reykjavík, Iceland).

### ***Diseño, normalización y análisis de los microarreglos***

El tipo de microarreglos utilizado ha sido previamente descrito (Martínez-Soto y Ruiz-Herrera, 2013; Franco-Frías *et al.*, 2014;). Estos son microarreglos de NimbleGen, de alta densidad de un solo canal diseñados por el Dr. Scott Gold (Universidad de Georgia, USA). El diseño tiene cinco diferentes oligonucleótidos de 60 pb de longitud por duplicado, representando cada uno de los 6883 genes del genoma de *U. maydis*. Por lo tanto, los valores de expresión de cada gen representan diez determinaciones. El scan GenePix 4000B y el software asociado fueron usados para el análisis de los microarreglos. Se utilizó el software Roche NimbleScan para la importación de las imágenes analizadas y la extracción de los datos crudos.

La normalización de los datos fue hecha con el software NimbleScan usando el método de cuantiles (Bolstad *et al.*, 2003) y el algoritmo RMA (Robust Multiarray Analysis; Irizarry *et al.*, 2003). El análisis de los microarreglos se hizo con el software ArrayStar version 11.2 de DNASTar. Los valores de P obtenidos fueron ajustados por del método FDR (False Discovery Rate) (Benjamini y Hochberg, 1995). Genes con valor de expresión de P de

menos de 0.05 fueron considerados diferencialmente expresados. Un mínimo de tasa de cambio de 2 fue el límite de corte que se tomó para considerar si un gen estaba positivamente o negativamente regulado. Los genes diferencialmente regulados por comparaciones independientes fueron integrados en diagramas de Venn (Edwards y Edwards, 1992) lo que permitió la identificación de aquellos genes diferencialmente regulados por el cambio de pH *in vitro* (de pH neutro a pH ácido de 3 y de pH neutro a pH alcalino de 9). Con estos datos se llevó a cabo una categorización funcional para cada grupo de genes haciendo uso de la base de datos FunCat (Functional Catalogue) (Ruepp *et al.*, 2004). El número de acceso de la base de datos GSE para el microarreglo de *U. maydis* usado en este trabajo es GSE75053.

### ***Búsquedas bioinformáticas y análisis de dominios proteicos***

La búsqueda de posibles dominios en las proteínas codificadas por los genes agrupados en la categoría de "sin clasificar" fue realizada por medio de análisis *in silico* usando las bases de datos SMART (Letunic *et al.*, 2012), Pfam (Punta *et al.*, 2012), SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### ***Análisis de PCR en Tiempo Real (RT-PCR)***

Las condiciones de crecimiento usadas fueron las mismas descritas anteriormente. Células crecidas en MM a pH 7, pH 3 o pH 9 fueron tomadas para la extracción de ARN total de tres cultivos celulares independientes. La síntesis de primera cadena de ADNc fue hecha con el Kit SuperScript<sup>TM</sup> First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) usando 1 µg de ARN total de cada una de las muestras obtenidas. EL ADNc fue cuantificado usando un espectrofotómetro GeneQuant II (Amersham Biosciences) verificando que todas las muestras usadas posteriormente tuvieran la misma cantidad. Utilizando 1µg de primera cadena, se hicieron reacciones de PCR por triplicado haciendo uso de SYBR GreenER<sup>TM</sup> qPCR SuperMix (Invitrogen) y del equipo CFX96 Real-Time System (BioRad). Para ello se usaron los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla II**. La cuantificación se realizó usando el software One-Step Real-Time PCR system.

**Tabla II.** Oligonucleótidos utilizados en los análisis en Tiempo Real.

| Nombre del Gen                    | Tamaño del fragmento | Tm (°C) | Orientación | Secuencia 5'-3'          |
|-----------------------------------|----------------------|---------|-------------|--------------------------|
| Um10663<br>( <i>pRho1</i> )       | 200 pb               | 66°     | F           | CCGGACGGCCTATGATCGAT     |
|                                   |                      |         | R           | CTGCCCTGCTGTATCCCAGA     |
| Um04171<br>( <i>ROT1</i> )        | 195 pb               | 66°     | F           | GCAGGGCAGTCGTACAGCTT     |
|                                   |                      |         | R           | CCGATCCGATACCTGCTGAC     |
| Um03847<br>( <i>Nar1</i> )        | 200 pb               | 66°     | F           | CGCGAGAGCCAGCATCATCT     |
|                                   |                      |         | R           | TGCGGACTGGACGTAGATGG     |
| Um00031<br>(Sin clasificar)       | 210 pb               | 66°     | F           | AGGCAGACGGCGATGACTCT     |
|                                   |                      |         | R           | AAGGATGGCTGCGCTCTTGC     |
| Glucana Sintasa<br>( <i>GLS</i> ) | 427 pb               | 66°     | F           | GCCGAGGTCATCTTCCCCATCTGC |
|                                   |                      |         | R           | AAGCGCGGTTTGTCTCGTCGT    |
| eIFB2                             | 200 pb               | 66°     | F           |                          |
|                                   |                      |         | R           |                          |

### ***Generación de mutantes de U. maydis***

Se usó la técnica de unión por doble PCR (Yu *et al.*, 2007), usando la resistencia a higromicina (hygB- hygromycin B phosphotransferase) de *Escherichia coli*, como factor de selección. Los oligonucleótidos usados para las construcciones se muestran en la **Tabla III**. El proceso de transformación se realizó por fusión de protoplastos (Tsukuda *et al.*, 1988) y la comprobación de las mutantes generadas se llevó a cabo por medio de PCR.

**Tabla III.** Oligonucleótidos utilizados para la obtención de mutantes de *U. maydis*.

| <b>Oligonucleótido</b> | <b>Tm<br/>(°C)</b> | <b>Orientación</b> | <b>Secuencia 5'-3'</b> |
|------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| HygBCass-F2            | 64°                | F                  | GTCGTGTGCTACAAAACGTGA  |
| HygBCass-R2            |                    | R                  | ATGCGGCCGCACAGCTTCGC   |
| pRho1 TCassHygBF       | 64°                | F                  | GCGAAGCTGTGCGGCCGCA    |
|                        |                    |                    | TCCATTGTTGCCCTTACACGTT |
| pRho1 TCassHygBR       |                    | R                  | TCACGTTTTGTAGCACACGAC  |
|                        |                    |                    | CAAGGCGGGAACGATCAAGGC  |
| pRho1FC-F2             | 66°                | F                  | CAATCCGCTTCCTCCATCTCA  |
| pRho1FC-R2             |                    | R                  | GTTCAAAGCGGTTGGACCCTC  |
| PpRho1-F2              | 66°                | F                  | GAACCTCCTTCGACCGCG GGA |
| TpRho1-R2              |                    | R                  | GTTCTGCGTGGTCTGTGCGTC  |
| pRho1N-F2              | 66°                | F                  | TGCGAGGTGAGAGAGAGCAA   |
| pRho1N-R2              |                    | R                  | CCGCTTCTTCGTGGTTATCC   |
| um00031FC-F            | 68°                | F                  | GAGAGAGTCACGAGTATAACC  |
| um00031FC-R            |                    | R                  | GATGATGGAGTAGCGTGACA   |
| Pum00031-F             | 66°                | F                  | GCTGTTCCACTCAAATCACG   |
| Tum00031-R             |                    | R                  | CTGCATGATCTCTTCCTGC    |
| um00031N-F             | 66°                | F                  | GTGTTACGTGTTACAGGGTT   |
| um00031N-R             |                    | R                  | AGAATCCCCCTCATCGTAGT   |
| Um00031Q-F             |                    | F                  | TCACGTTTTGTAGCACACG    |
|                        |                    |                    | ACAGTCACGATGGAGCCTGCCA |
| Um00031Q-R             |                    | R                  | GCGAAGCTGTGCGGCCGCATG  |
|                        |                    |                    | ATACAGGACGTTGCTTTTG    |

### ***Análisis fenotípico de las mutantes de *U. maydis****

El análisis fenotípico incluyó las siguientes pruebas descritas en estudios anteriores:

#### ***Efecto del pH sobre el crecimiento en medio mínimo líquido y sólido***

Se utilizó MM líquido y sólido ajustado a pH 3, 7, 9 o 10. En el caso de MM líquido se inocularon  $10^6$  cel/mL en 50 mL de medio, se incubaron a 28° C por 24 h y con agitación de 150 rpm. Para el caso de medio sólido se prepararon cajas y se inocularon con diluciones seriadas desde  $10^7$  hasta  $10^4$  células inoculando las placas con un volumen de 10  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se incubaron a 28° C por 72 h, al cabo de las cuales se observaron y fotografiaron las placas. Todos los experimentos se realizaon por triplicado.

#### ***Estrés salino ( $Li^+$ , $K^+$ o $Na^+$ )***

Para medir el efecto del estrés salino se usaron placas de MM mínimo ajustado a pH 7 o pH 9, que tuvieran una concentración final de LiCl 5 mM, KCl 1.2 M o NaCl 0.5 M. Se usaron de igual manera diluciones seriadas desde  $10^7$  hasta  $10^4$  células , inoculándose como se indica en el inciso anterior, y se incubaron a 28° C por 72 h, procediendo a fotografiar las placas. Todos los experimentos se realizaon por triplicado.

#### ***Estrés osmótico***

El efecto del estrés osmótico se analizó por medio del uso de placas de MM mínimo ajustado a pH 7 o pH 9, que tuvieran una concentración final de sorbitol de 2 M. Se usaron diluciones seriadas desde  $10^7$  hasta  $10^4$  células y se inocularon como se indicó

anteriormente, y se incubaron a 28° C por 72 h, procediendo a fotografiar las placas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***Estrés oxidativo***

El efecto del estrés oxidativo se midió haciendo uso de placas de MM mínimo ajustado a pH 7 o pH 9. Se inocularon  $10^7$  cel /mL esparciéndolas por toda la placa y dejándolas secar por al menos 5 min. Posteriormente se colocaron sobre las placas tres círculos pequeños de papel filtro estéril de manera equidistante y se impregnaron dos de ellos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% y el tercer papel filtro con agua destilada estéril. Se incubaron a 28°C por 72 h y al término de este tiempo se midieron los halos de inhibición alrededor de los trozos de papel filtro. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***Capacidad de secreción de proteasas al medio***

La capacidad de secreción de proteasas al medio de cultivo se midió haciendo uso de placas conteniendo MM de pH 7 o pH 9 sin fuente de N pero conteniendo proteína de suero de leche descremada al 1%. Se inocularon con gotas separadas que contenían aproximadamente  $10^7$  células y se colocaron en incubación a 28° C por 120 h, y se observó el halo de hidrólisis de la proteína. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***Inducción de dimorfismo por pH y por ácidos grasos***

Para la inducción del dimorfismo por pH se utilizó la técnica descrita anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), y para la transición dimórfica con ácidos grasos se usó la técnica descrita por Klose *et al.*, 2004.

### ***Capacidad de apareamiento***

La capacidad de apareamiento se midió con la reacción denominada Fuz y descrita por Banuette (1995). Esta prueba de compatibilidad sexual entre dos cepas de *U. maydis* está basada en la morfología colonial como resultado de la inoculación de dos cepas en una misma área de cultivo sólido. La morfología colonial FUZ positiva es aquella que tiene la formación de micelio aéreo, en cambio en una prueba negativa solo se aprecia una colonia lisa.

La prueba consistió en inocular dos gotas (una sobre la otra) conteniendo  $10^6$  células de cada una de las cepas de *U. maydis* sobre placas conteniendo 1/5 de MM a pH de 7 con 1% de carbón activado. Se incubaron las placas selladas por 16-48 h a 25°C y se observó la morfología colonial.

### ***Microscopía***

Las imágenes de microscopía fueron tomadas con un microscopio Leica DM RE, utilizando técnicas de campo claro y contraste de fases.

### ***Obtención de extractos libres de células***

Las cepas se inocularon en 50 mL de MM a pH 9.5 o 6.0, según fuese necesario y se incubaron por 16 h a 28°C con agitación a 150 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación y lavaron tres veces por centrifugación con agua destilada estéril. Se retiró todo el sobrenadante y se rompieron las células con perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (1:1 vol/vol) con ciclos de agitación por 1 min en Vortex y 1 min en hielo durante 10 min. Las células rotas se resuspendieron en Tris-HCl 0.1 M pH 7.6 y la suspensión se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se utilizó para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976). Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron en hielo.

### ***Análisis tipo Western Blot***

Se llevó a cabo una electroforesis tipo Schagger (Schagger y Von Jagow, 1987), en condiciones desnaturalizantes usando 20 µg de proteína total de cada muestra. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas en condiciones semisecas del gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (por sus siglas en inglés, PVDF, BIORad) usando el equipo Trans-Blot SD Cell de BioRad por un tiempo de 45 min a 20 V. A continuación se revelaron las bandas por medio de un ensayo tipo western blot general (Mahmood y Yang, 2012), en donde se usaron diluciones de 1:5000 del anticuerpo primario y 1:2000 del anticuerpo secundario. Se reveló con el kit de quimioluminiscencia Lumi-light Western Blotting substrate de Roche de acuerdo a las especificaciones de fabricante.

El anticuerpo para el reconocimiento del factor de transcripción PaC/Rim101 se mandó sintetizar a la empresa GenScript USA. Se usó un anticuerpo policlonal anti-PaC de *U. maydis* utilizando la secuencia peptídica GKTFKRPQDLKKHERC para la síntesis. Esta secuencia se localiza dentro de los 250 aminoácidos que conforman la versión activa

putativa de este factor de transcripción, y este número de aminoácidos se tomó usando como referencia de otro al hongo modelo *A. nidulans* (Arst y Peñalva, 2003).

El anticuerpo secundario utilizado fué un anticuerpo monoclonal anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (horse radish), el cual funciona para ser revelado por bioluminiscencia (Anti-Rabbit IgG Monoclonal Secondary Antibody, HRP conjugate de GenScript USA)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

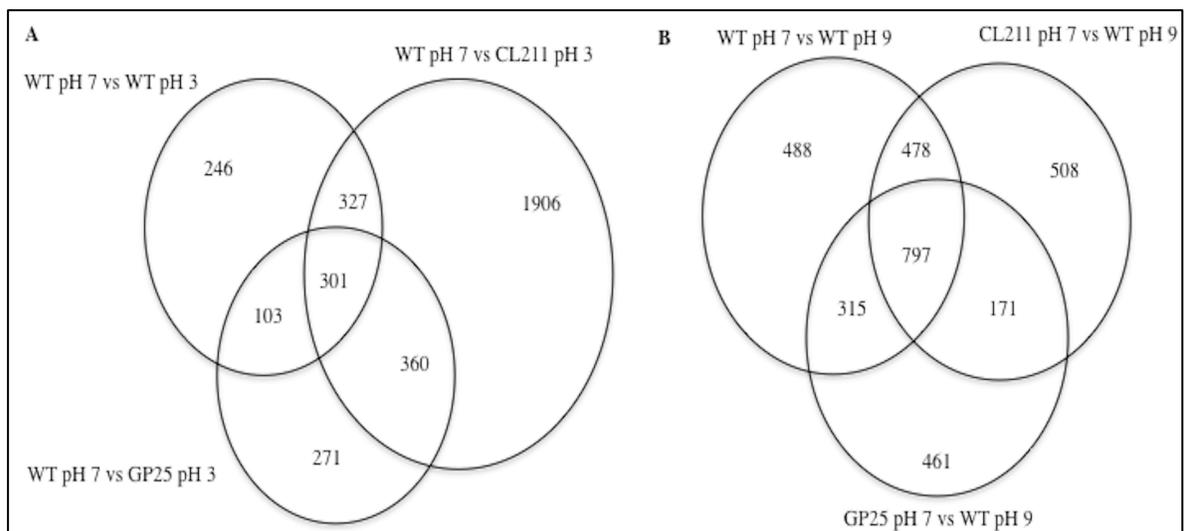
### *Identificación de los genes de U. maydis regulados por cambios de pH*

Con el objetivo de identificar los genes que se regulaban específicamente por cambios de pH, las cepas utilizadas en este trabajo fueron crecidas en MM pH 7, MM pH 3 o MM pH 9 de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Para estos estudios se usaron la cepa silvestre de *U. maydis* FB2 (*a2b2*) y como controles las cepas mutantes monomórficas, CL211 (*a2b2 ubc2*) y GP25 (*a2b2 Gcn5::hyg*) que son levadura constitutiva y micelio constitutiva respectivamente (**Tabla I**). CL211 tiene una mutación en el gen *ubc2* involucrado en la vía de señalización de MAP cinasa de respuesta a feromonas. En contraste, la GP25 presenta una mutación en el gen *gcn5*, el cual codifica una histona acetiltransferasa, la cual está involucrada en dimorfismo y virulencia. Incluimos estas mutantes para diferenciar la respuesta transcripcional por pH de la causada por el dimorfismo. Las comparaciones utilizadas para identificar los genes que responden a un pH ácido de 3 y a un pH alcalino de 9 se muestran en la **Tabla IV**.

**Tabla IV.** Condiciones experimentales del crecimiento de *U. maydis* que tienen como factor común un cambio en el pH.

| Cepa                | pH           | vs | Cepa  | pH           | Variables           |
|---------------------|--------------|----|-------|--------------|---------------------|
| FB2                 | 7 (Levadura) |    | FB2   | 3 (Micelio)  | pH y dimorfismo     |
| FB2                 | 7 (Levadura) |    | CL211 | 3 (Levadura) | pH y mutación       |
| FB2                 | 3 (Micelio)  |    | GP25  | 7 (Micelio)  | pH y mutación       |
| FB2                 | 7 (Levadura) |    | FB2   | 9 (Levadura) | pH                  |
| CL211               | 7 (Levadura) |    | FB2   | 9 (Levadura) | pH y mutación       |
| GP25                | 7 (Micelio)  |    | FB2   | 9 (Levadura) | pH y mutación       |
| <b>Factor común</b> |              |    |       |              | <b>Cambio de pH</b> |

Como se puede observar en esta Tabla, todas las comparaciones tienen como factor común el cambio de pH. Posterior a estas comparaciones se integró toda la información en dos diagramas de Venn independientes (**Figs 4A y Fig 4B**), uno correspondiente al cambio a pH ácido y otro al cambio a pH alcalino. Estos análisis permitieron excluir los genes diferencialmente expresados por efecto de las mutaciones y/o el dimorfismo, e identificar aquellos regulados únicamente durante la respuesta al cambio a un ambiente ácido o alcalino.



**Figura 4.** Identificación de genes expresados diferencialmente durante el cambio de pH neutro a valores de pH extremo: **(A)** cambio de pH neutro a pH 3, **(B)** cambio de pH neutro a pH 9. Los diagramas de Venn muestran los tres grupos de genes diferenciales que tiene en común el resultado del cambio de pH en cada caso. (WT, silvestre)

Se identificaron un total de 301 genes expresados diferencialmente cuando *U. maydis* fue transferido de un pH neutro a uno ácido, de los cuales 162 fueron inducidos, y 139 reprimidos (**Tabla V**); y 797 genes que fueron expresados diferencialmente cuando el hongo fue transferido de un medio neutro a uno alcalino de pH 9, de los cuales 335 aparecen como inducidos y 462 genes como reprimidos (**Tabla VI**). Estos valores representan 4.4 y 11.5% del genoma total del hongo respectivamente, lo que sugiere que las

condiciones alcalinas representan un factor de estrés mayor que las condiciones ácidas. Este punto fue verificado por medio de experimentos de crecimiento, en donde la cepa silvestre fue cultivada en medio mínimo de pH 3, 7 o 9 por un tiempo de 16 h, a una temperatura de 28°C y agitación de 150 rpm. Como resultado obtuvimos un crecimiento promedio [expresado como densidad óptica (OD<sub>600</sub>)] de 1.45± 0.09, 1.77±0.03, y 0.69±0.18, respectivamente (ANOVA  $\alpha < 0.05$ ; n.3). Este dato arrojó una reducción del crecimiento del 71% de *U. maydis* cuando se creció en MM pH 9 y una reducción del 18% cuando se creció en MM pH 3 ambos comparados con el crecimiento a pH neutro, confirmando que un pH alcalino produce un estrés mayor que uno ácido sobre *U. maydis*.

Es conocido que el mecanismo mas importante de respuesta para la adaptación a pH alcalino extremo en los hongos es la vía Pal/Rim (Tilburn *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2001; Caracuel *et al.*, 2003; Rollins *et al.*, 2003; Bendtsen *et al.*, 2004; You *et al.*, 2007). Esta vía regula diferentes procesos celulares que conducen a su adaptación a cambios de pH, siendo el proceso más importante el mantenimiento del pH intracelular (Peñalva *et al.*, 2002; Aréchiga Carvajal *et al.*, 2005; Cervantes Chávez *et al.*, 2010) como lo demostraron experimentalmente Fonseca García *et al.* (2012). De todos los miembros de la vía Pal/Rim en *U. maydis*, solamente el factor de transcripción PacC/Rim101 (um10426) se encontró reprimido 9.2 veces a pH de 3. Esto coincide con un informe previo donde se observó una baja expresión del gen a este mismo pH (Aréchiga Carvajal *et al.*, 2005). Previamente, Franco Frías *et al.* (2014) describieron que 1425 genes eran regulados diferencialmente por PacC/Rim101 en *U. maydis*. Una comparación de estos resultados con los nuestros reveló que 292 de los 797 genes identificados en este trabajo a pH 9 eran compartidos con los encontrados en ese trabajo, lo que representa 36.6% del total. De estos, 160 aparecen como inducidos y 132 como reprimidos. Estos resultados sugieren que la adaptación de *U. maydis* a condiciones de pH alcalino involucra otros mecanismos independientes de la vía Pal/Rim.

Por último, con el objetivo de validar los niveles de expresión obtenidos durante el análisis con microarreglos realizamos reacciones de PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la **Tabla VII**, donde seleccionamos 4 genes, 2 de ellos expresados diferencialmente a pH 3 y 2 genes expresados diferencialmente a pH 9. En general

obtuvimos una buena correlación entre ambos tipos de análisis, lo que hace válidos nuestros resultados del microarreglo.

### *Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente*

Los resultados de la categorización funcional de los genes expresados diferencialmente que responden a cambios de pH se muestra en la **Tabla VI** y **Tabla VII**. Durante el cambio a pH 3, el número mayor de genes diferenciales estuvo representado en las categorías de proteínas sin clasificar (116) y metabolismo (62). Resultados similares se observaron durante el cambio a pH 9, donde las mismas categorías de proteínas sin clasificar (267) y metabolismo (232) mostraron el mayor número de genes diferenciales.

**Tabla V.** Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente a pH 3.

| Categoría                                      | # de genes por categoría | Inducidos  | Reprimidos |
|--|--------------------------|------------|------------|
| Metabolismo                                    | 62                       | 41         | 21         |
| Ciclo celular y procesamiento del ADN          | 9                        | 3          | 6          |
| Transcripción                                  | 8                        | 1          | 7          |
| Transporte                                     | 44                       | 20         | 24         |
| Rescate celular rescue, defensa y virulencia   | 19                       | 12         | 7          |
| Interacción con el ambiente                    | 11                       | 4          | 7          |
| Energía  | 3                        | 2          | 1          |
| Biogénesis de componentes celulares            | 9                        | 6          | 3          |
| Proteínas con función de unión                 | 6                        | 3          | 3          |
| Destino de proteínas                           | 3                        | 3          | 0          |
| Diferenciación celular                         | 5                        | 2          | 3          |
| Síntesis de proteínas                          | 2                        | 0          | 2          |
| Comunicación celular y transducción de señales | 4                        | 3          | 1          |
| Proteínas sin clasificar                       | 116                      | 62         | 54         |
| <b>Total</b>                                   | <b>301</b>               | <b>162</b> | <b>139</b> |

**Tabla VI.** Categorización funcional de los genes expresados diferencialmente a pH 9.

| Categoría                                      | # de genes<br>por<br>categoría | Inducidos  | Reprimidos |
|--|--------------------------------|------------|------------|
| Metabolismo                                    | 232                            | 163        | 69         |
| Ciclo celular y procesamiento del ADN          | 12                             | 6          | 6          |
| Transcripción                                  | 71                             | 11         | 60         |
| Transporte                                     | 72                             | 33         | 39         |
| Rescate celular, defensa y virulencia          | 20                             | 10         | 10         |
| Interacción con el ambiente                    | 16                             | 8          | 8          |
| Energía  | 4                              | 2          | 2          |
| Biogénesis de componentes celulares            | 15                             | 7          | 8          |
| Proteínas con función de unión                 | 60                             | 20         | 40         |
| Destino de proteínas                           | 7                              | 4          | 3          |
| Diferenciación celular                         | 5                              | 3          | 2          |
| Síntesis de proteínas                          | 9                              | 3          | 6          |
| Comunicación celular y transducción de señales | 3                              | 1          | 2          |
| Destino celular                                | 4                              | 0          | 4          |
| Proteínas sin clasificar                       | 267                            | 64         | 203        |
| <b>Total</b>                                   | <b>797</b>                     | <b>335</b> | <b>462</b> |

**Tabla VII.** Comparación entre niveles de expresión transcripcional de genes seleccionados determinados por medio de microarreglos y pCR en tiempo real usando la cepa silvestre de *U. maydis*

| Gen     | Descripción                            | Cambio de expresión en<br>el microarreglo<br>pH 3 | Cambio de<br>expresión por RT-<br>PCR<br>pH 3 |
|---------|--|---|---|
| Um10663 | Probable Rho1, proteína de unión a GTP | 3.8 inducido                                      | 5.2 inducido                                  |
| Um04171 | Relacionado a ROT1                     | 6.5 inducido                                      | 8.8 inducido                                  |
| Gen     | Descripción                            | Cambio de expresión del<br>microarreglo<br>pH 9   | Cambio de<br>expresión RT-PCR<br>pH 9         |
| Um03847 | Nar1 – Nitrato reductasa               | 5.7 inducido                                      | 6.9 inducido                                  |
| Um00031 | Proteína sin clasificar                | 2.6 inducido                                      | 3.9 inducido                                  |

Considerando que la categoría de metabolismo ocupó el segundo lugar con el mayor número de genes diferenciales, realizamos un análisis mas profundo. A pH 3 la categoría de metabolismo mostró 4 subclasificaciones y a pH 9 las dividimos en 7 subclasificaciones que se muestran en la **Tabla VIII**.

**Tabla VIII.** Subclasificación de genes diferencialmente regulados a pH 3 y pH 9 pertenecientes a la categoría de metabolismo.

| Descripción   | No. genes  | Inducidos  | Reprimidos |
|---|------------|------------|------------|
| <b>pH 3</b>   |            |            |            |
| Metabolismo de carbohidratos y otros compuestos hidrocarbonados | 18         | 14         | 4          |
| Metabolismo de N, aminoácidos y amonio                          | 23         | 10         | 13         |
| Metabolismo de ácidos grasos, lípidos e isoprenoides            | 18         | 14         | 4          |
| Metabolismo de vitaminas, cofactores y grupos prostéticos       | 3          | 3          | 0          |
| <b>Total</b>  | <b>62</b>  | <b>41</b>  | <b>21</b>  |
| <b>pH 9</b>   |            |            |            |
| Metabolismo de carbohidratos y otros compuestos hidrocarbonados | 69         | 41         | 28         |
| Metabolismo de N, aminoácidos y amonio                          | 108        | 80         | 28         |
| Metabolismo de ácidos grasos, lípidos e isoprenoides            | 22         | 16         | 6          |
| Metabolismo de vitaminas, cofactores y grupos prostéticos       | 10         | 6          | 4          |
| Metabolismo de compuestos aromáticos                            | 15         | 13         | 2          |
| Metabolismo del fosfato   | 4          | 1          | 3          |
| Metabolismo del sulfato   | 4          | 4          | 0          |
| <b>Total</b>  | <b>232</b> | <b>161</b> | <b>71</b>  |

Estos resultados claramente muestra que *U. maydis* requiere un grupo mas grande de genes relacionados con el metabolismo para adaptarse a condiciones alcalinas, en comparación con su adaptación con un medio ácido: 232 genes a pH 9 vs 62 genes a pH 3. Esta diferencia fue particularmente evidente en las categorías de metabolismo de carbohidratos y otros compuestos hidrocarbonados (69 a pH 9, y 18 a pH 3), y metabolismo de compuestos de N (108 a pH 9, y 23 a pH 3). En relación con este aspecto, se observó que los genes que codifican las nitrato y nitrito reductasas (um03847 y um11104, respectivamente) aparecen

como inducidos a pH 9 y reprimidos a pH 3. El mismo comportamiento ocurrió con el gen um11105, el cual codifica un posible transportador de nitrato. Esto puede ser explicado por el hecho de que el proceso de asimilación de N involucra la reducción del nitrato a iones de amonio a pH alcalino, un proceso que requiere un sustancial gasto energético. Esta observación ha sido descrita en el propio *U. maydis* (Banks *et al.*, 1993) y en otras especies de hongos como *Aspergillus nidulans* (Scazzocchio *et al.*, 1989) *Neurospora crassa* (Marzluf *et al.*, 1989).

Interesantemente, de todas las subcategorías de metabolismo, se identificaron más genes inducidos que reprimidos a pH 3 y pH 9. Por ejemplo, a pH 3, el gen um11922 (relacionado a una quitina desacetilasa) se mostró como el gen más inducido con valor de cambio de 38.9, mientras que el gen um01432 (Fer5, relacionado a una N6-hidroxilisina acetiltransferasa) fue el más reprimido con un valor de cambio de -195.2. Este gen está involucrado en la acilación de residuos de N5-hydroxy-L-ornitina del ferricromo A en *U. maydis* (Eichhorn *et al.*, 2006). En contraste, los valores de cambio a pH 9 no fueron tan drásticos; por ejemplo, el gen más inducido fue el um05361 (relacionado con un precursor de la lacasa I) con un valor de cambio de solo 16.7, y el gen más reprimido fue el um03386 (proteína sin clasificar) con un valor de cambio de 34.3.

Aparentemente, la adaptación a valores de pH extremos no solo involucra cambios metabólicos, sino un incremento en la tasa de recambio de las proteínas, ya que el gen um00711 que codifica una subunidad del complejo activador del proteosoma, se mostró como inducido a pH 3 y pH 9 (2.4 y 4.3 valores de cambio respectivamente) y lo mismo ocurrió con el gen um10493 que codifica una aminopeptidasa con valores de cambio de 2.1 y 2.0 respectivamente.

Por otro lado, las categorías con menor número de genes expresado diferencialmente fueron: síntesis de proteínas (dos genes), destino de proteínas (tres genes), y diferenciación celular (cinco genes) a pH 3 (**Tabla V**). A pH 9, las categorías con menor número de genes regulados fueron las de comunicación celular y transducción de señales (tres genes), destino celular y energía (cuatro genes), diferenciación celular (cinco genes) a pH 9 (**Tabla VI**).

### *Identificación de genes regulados diferencialmente en común por ambos cambios de pH*

Identificamos 69 genes que fueron regulados diferencialmente tanto a pH 3 como a pH 9. Consistente con nuestros anteriores resultados, las categorías de proteínas sin clasificar (33 genes) y metabolismo (13 genes) fueron las que mostraron el mayor número de genes diferenciales, seguidas por la categoría de transporte (11 genes). Del total de genes, 10 aparecen inducidos a pH 3 y reprimidos a pH 9; 12 genes fueron reprimidos a pH 3 e inducidos a pH 9, y el resto fueron inducidos o reprimidos en respuesta a ambos cambios de pH (**Tabla IX**). Estos resultados indican que este último grupo de genes diferenciales está relacionado con la respuesta a cambios de pH en general, independiente de si se trata de un pH ácido o alcalino.

**Tabla IX.** Genes compartidos en ambos cambios de pH

| <b>Categoría</b>                         | <b>No. de genes</b> |
|--|---------------------|
| Metabolismo y regulación del metabolismo | 13                  |
| Ciclo celular y procesamiento del ADN    | 1                   |
| Transcripción                            | 2                   |
| Transporte                               | 11                  |
| Rescate celular, defensa y virulencia    | 3                   |
| Interacción con el medio ambiente        | 1                   |
| Biogénesis de componentes celulares      | 2                   |
| Proteínas con función de unión           | 2                   |
| Destino de proteínas                     | 1                   |
| Proteínas sin clasificar                 | 33                  |
| <b>Total</b>                             | <b>69</b>           |

### ***Identificación de posibles candidatos que podrían participar como sensores en el mecanismo de transmisión de la señal de pH***

Consideramos de importancia analizar el mecanismo involucrado en la recepción de la señal de cambio de pH que conlleva a los cambios metabólicos en la célula para su adaptación. Aunque es muy bien conocido que la vía más importante de adaptación a pH alcalino en los hongos es la vía Pal/Rim, aún se desconocen puntos muy relevantes: *i)* el papel que juega esta vía para la adaptación a pH ácido, *ii)* cuál es y como está conformado el sistema que sensa la señal de pH en Basidiomycota, y *iii)* cuál es y cómo opera la vía que induce el dimorfismo de *U. maydis* a pH ácido.

En este sentido, y relacionado con las dos primeras preguntas, analizamos con mayor detalle la categoría de comunicación celular y transducción de señales, y proteínas sin clasificar que codifican posibles receptores de membrana. Como resultado, encontramos al gen um04474, que codifica la subunidad  $\alpha$  de una proteína G heterotrimérica Gpa3 que está involucrado en la transmisión de la señal de la feromona y que es requerida para el desarrollo patogénico (Regenfelder *et al.*, 1997), y al gen um10663 que codifica una proteína G monomérica de unión a GTP pRho1, los cuales se encontraban inducidos a pH 3, 2.5 y 3.8 veces respectivamente. También encontramos que el gen Don1 (um10152, que codifica un factor intercambiador de nucleótidos de guanina-GEF) y que participa en el control de la separación de las células hijas en *U. maydis* (Weinzierl *et al.*, 2002) y el gen um02104 que codifica un regulador putativo de proteínas G de señalización (RGS) aparecen como reprimidos a pH 9 con cambios de expresión de 5.3 y 4.6 veces comparado con pH 7 respectivamente (**ver Tabla X**). Se dió el énfasis a este tipo de proteínas ya que está ampliamente documentado que diferentes subunidades de proteínas G y receptores acoplados a proteínas G (G-Protein Coupled Receptors) están involucrados en el sensado de nutrientes, respuesta a feromonas, apareamiento y patogénesis en otras especies de hongos (Li *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2008). Esto sugería su posible participación en el proceso de adaptación a cambios de pH y/o en la transferencia de la señal hacia el interior de la célula.

Por el lado de los genes que pertenecen a la categoría de proteínas sin clasificar, y que pudieran codificar posibles proteínas de membrana que sirvieran como sensores de la señal de pH, realizamos una búsqueda en la secuencia de aminoácidos de estos genes, seleccionando aquellos que presentaron características propias de GPCR's como son: una firma estructural común de varios dominios transmembranales hidrofóbicos (TMD's – Trans-membrane domains) con un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular además de la presencia de un péptido señal (Kobilka, 2007)

Como resultado de esta búsqueda encontramos que a pH 3 los genes um02804 (inducido 44.8 veces) y con 7 TMD's, y um06335, (inducido 85.8 veces) y con 9 TMD's, y a pH 9 los genes um02877 (inducido 20.6 veces) y con 11 TMD's, y el um00031 (inducido 2.6 veces) y con 7 TMD's eran excelentes candidatos para analizar su participación como posibles receptores de la señal de pH.

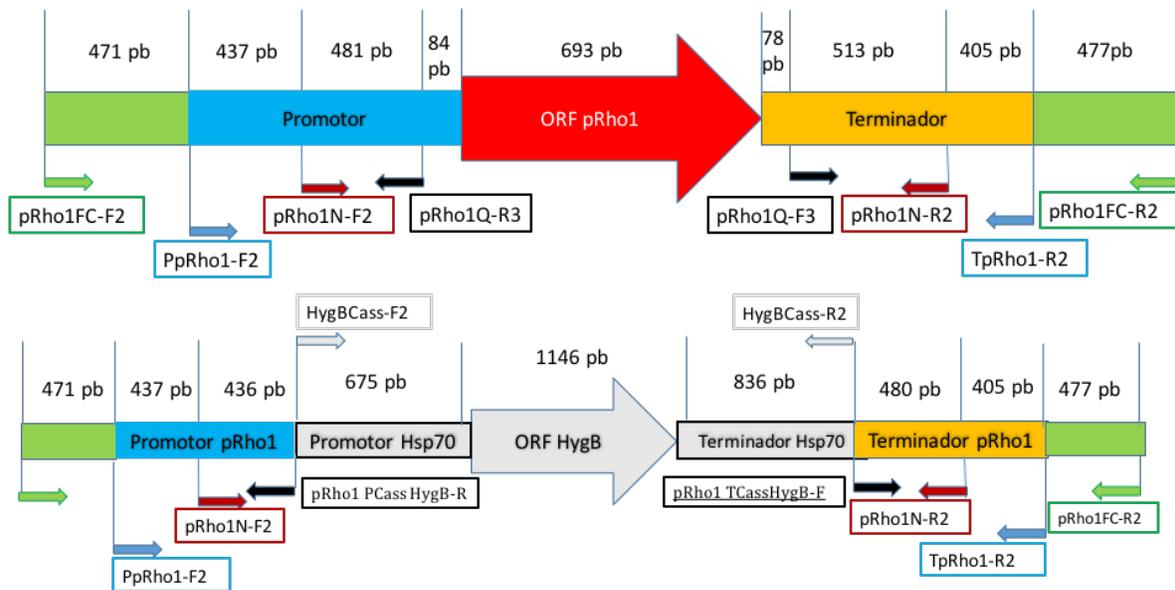
**Tabla X.** Genes diferencialmente expresados a pH 3 y pH 9 clasificados en la categoría de comunicación celular y transducción de señales.

| Gen      | Descripción  | Valor de cambio<br>pH 3 |
|----------|--|-------------------------|
| um04779  | Proteína sin clasificar  | 2.2 reprimido           |
| um10119  | probable IPL1 - ser/thr proteína cinasa                                | 3.0 inducido            |
| um04474  | Gpa3 – proteína de unión a nucleótido de guanina $\alpha$ -subunidad 3 | 2.5 unducido            |
| um10663  | probable Rho1 – proteína de unión a GTP- proteína de la subfamilia Rho | 3.8 inducido            |
| Gen      | Descripción  | Valor de cambio<br>pH 9 |
| um050039 | Relacionado a proteína activadora de GTPasa                            | 3.0 reprimido           |
| um10534  | Relacionado a una proteína-tirosina fosfatasa, receptor tipo 1         | 3.9 reprimido           |
| um10632  | Precursor de antígeno regulado por pH Pra1                             | 147.5 inducido          |

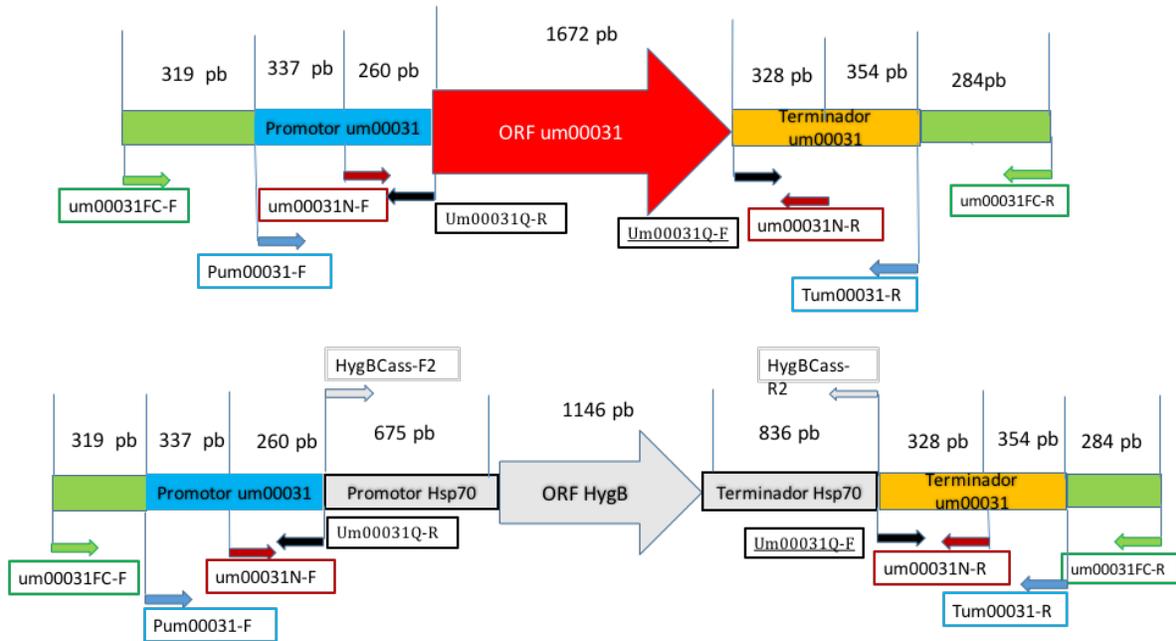
## Mutación de los genes *pRho1* y *um00031* de *U. maydis*

Una vez que se identificaron genes candidatos a fungir como involucrados en, o a ser receptores membranales de la señal de cambio de pH, se decidió realizar la mutación de dos de ellos para comprobar esta hipótesis. Se seleccionaron los genes *pRho1* (um10663- probable Rho1-proteína de unión a GTP- proteína de la subfamilia Rho) y *um00031* (proteína sin clasificar) descritos anteriormente.

Se llevo a cabo el protocolo para la obtención de las construcciones y transformación de protoplastos de *U. maydis* que nos permitieron hacer la deleción de los genes mencionados tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los esquemas para la realización de la mutación de los genes *pRho1* y *um00031* se muestra en la **Fig 5 y Fig 6**. Este esquema sirvió para posteriormente comprobar la integración del "cassete" de resistencia a higromicina y su correcta localización dentro del genoma de *U. maydis*.



**Figura 5.** Diagrama para la mutación del gen *pRho1* de *U. maydis*.



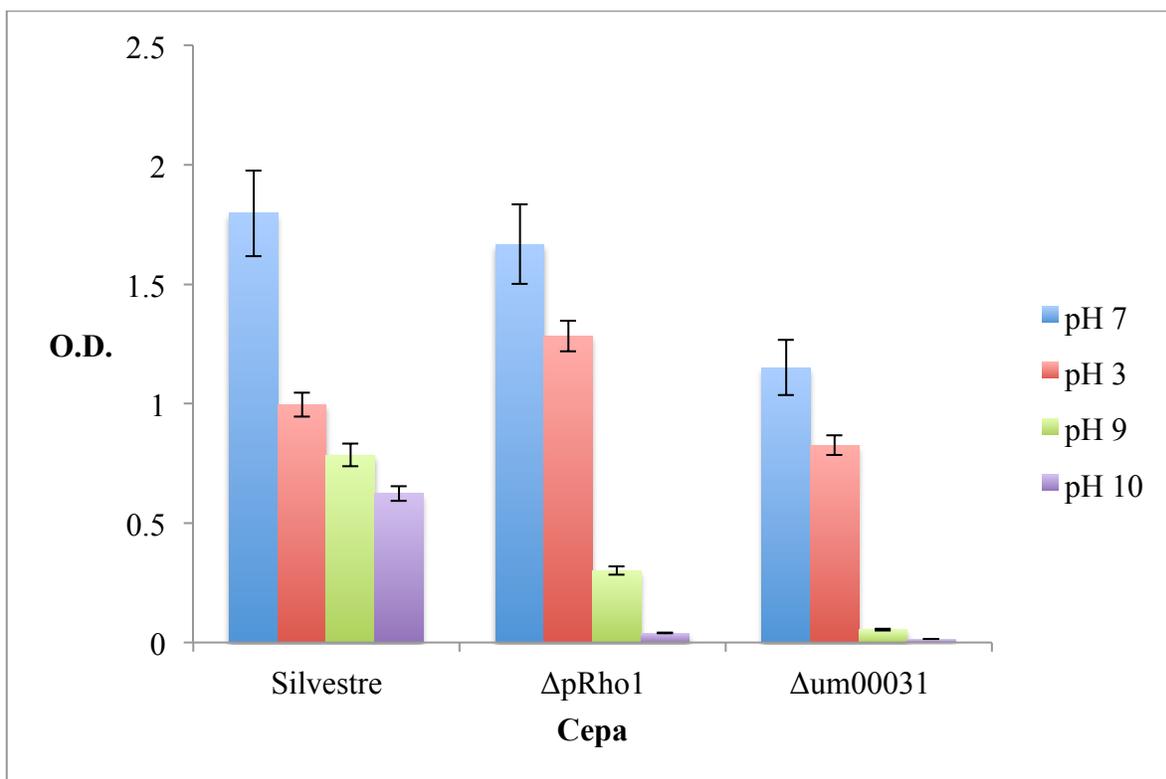
**Figura 6.** Diagrama para la mutación del gen *um00031* de *U. maydis*.

***Análisis fenotípico de las mutantes  $\Delta pRho1$ ,  $\Delta um00031$  y de las mutantes de los genes que codifican proteínas  $G\alpha$ .***

Con el propósito de conocer si los genes seleccionados *pRho1* y *um00031* se encontraban involucrados en la transferencia de la señal de pH, se realizaron pruebas fenotípicas a las mutantes de estos genes. Además se incluyeron en estos análisis fenotípicos todas las mutantes de los genes que codifican las proteínas  $G\alpha$  monómericas descritas previamente por Regenfelder *et al.* (1997) y que fueron cordialmente donadas para este estudio por la Dra. Regine Kahmann, ya que como se mencionó anteriormente, el gen *um04474* que codifica una proteína  $G\alpha$  subunidad 3 y se encontró como inducida a pH de 3.

### ***Efecto del pH del medio de cultivo***

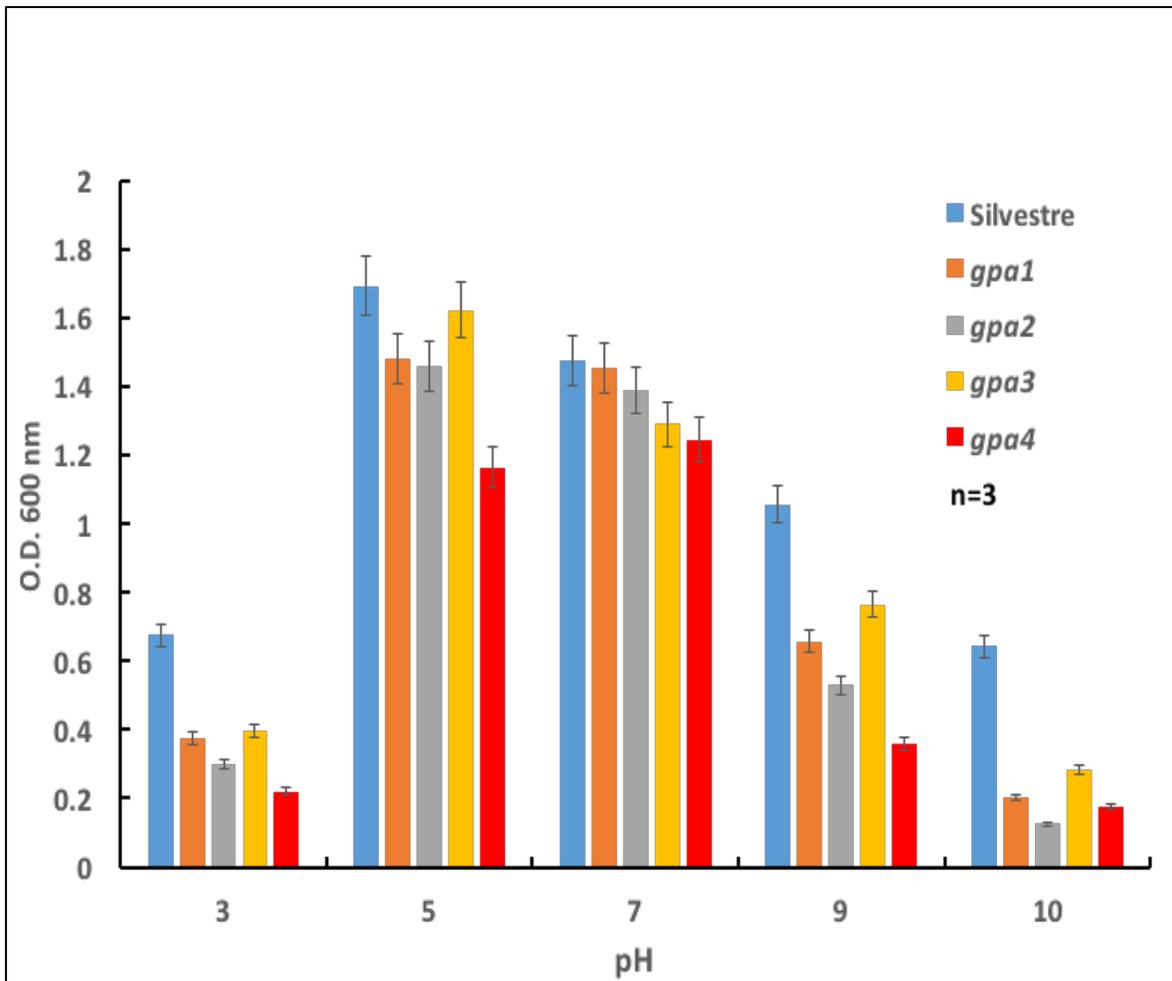
El primer análisis consistió en medir el efecto del pH sobre el crecimiento de estas cepas. Para ello se realizaron cultivos en MM líquido ajustado a diferentes valores de pH desde 3 hasta 10 como se muestra en las **Figs 7 y 8**. Se inocularon  $10^6$  cel/mL de cada una de las cepas y se incubaron por 24 h a 180 rpm a una temperatura de 28 °C, y se midió el crecimiento por su Densidad Óptica a 600 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



**Figura 7.** Efecto del pH sobre el crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes de *U. maydis*.

Como se puede muestra en la figura anterior, las mutantes en los genes *pRho1* y *um00031* fueron significativamente más sensibles cuando se cultivaron a valores de pH alcalino de 9 o 10, ya que mostraron una gran reducción en su crecimiento comparadas con la cepa

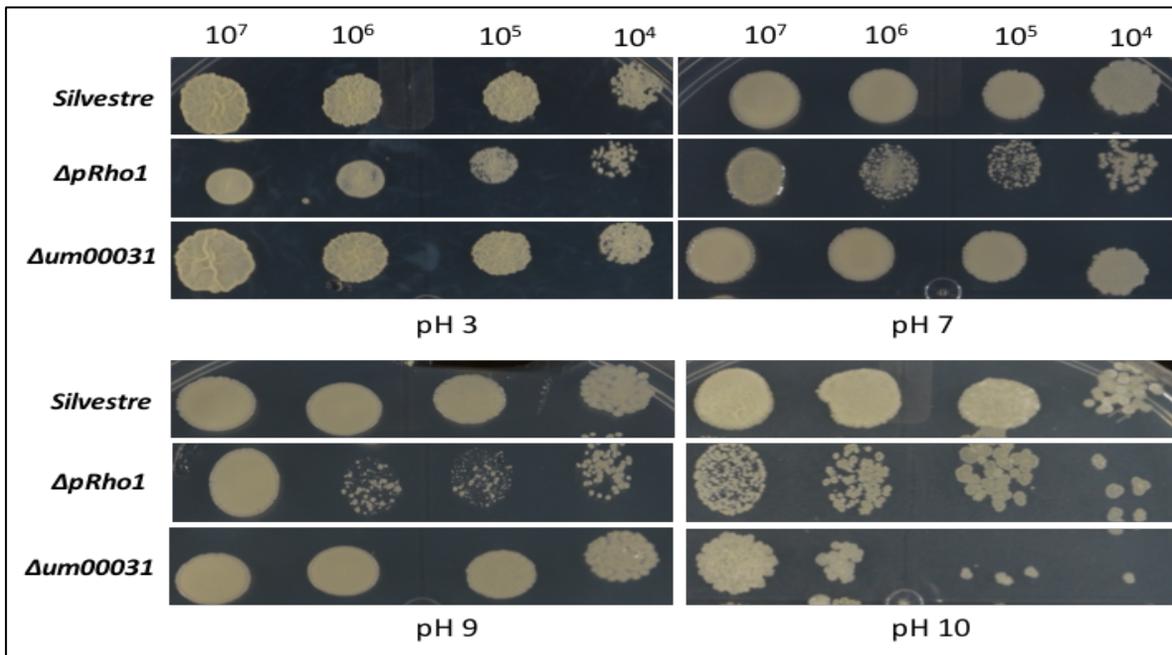
silvestre. La reducción de crecimiento a pH neutro y ácido con valor de 3 no fue tan marcada, e incluso la mutante  $\Delta pRho1$  creció mejor que la silvestre a pH 9.



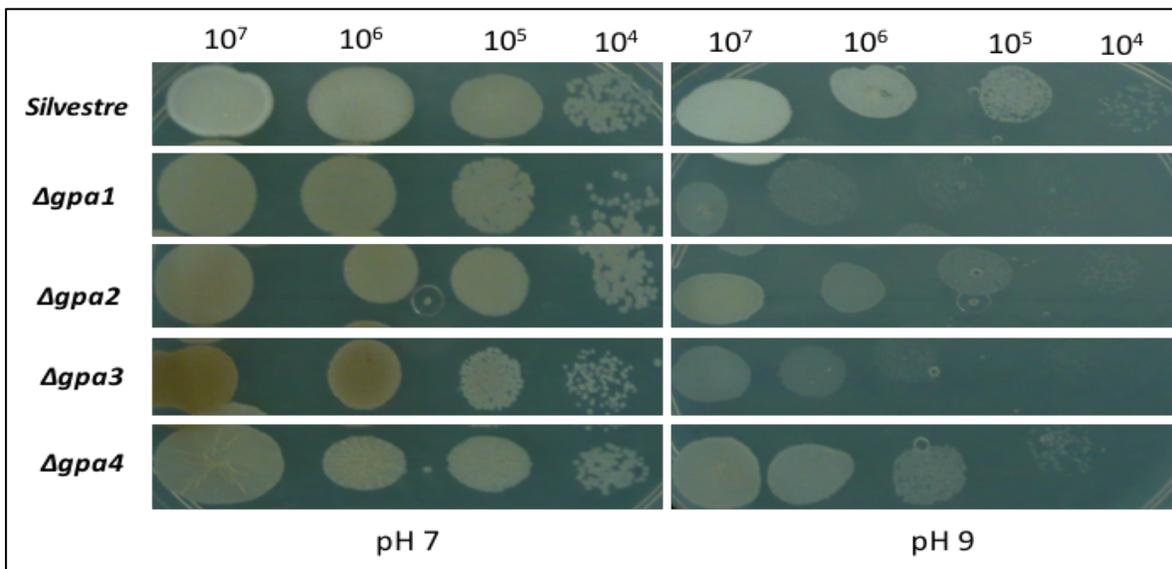
**Figura 8.** Efecto del pH sobre el crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes  $G\alpha$  de *U. maydis*.

En el caso de las mutantes en la proteína  $G\alpha$ , se observó que todas ellas estaban afectadas a pH ácido y aún más a pH alcalino, siendo en el pH de 10 en donde se puede apreciar una disminución más significativa de crecimiento de todas ellas comparadas con la silvestre. También debemos señalar que la reducción de crecimiento a pH de 5 y pH neutro no fue tan marcada. (Fig. 8)

También probamos el mismo efecto del pH, pero utilizando MM sólido. Los resultados fueron similares que los obtenidos en MM líquido como se muestra en la **Fig 9 y 10**.



**Figura 9.** Efecto del pH sobre el crecimiento en placa de las mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  de *U. maydis*.

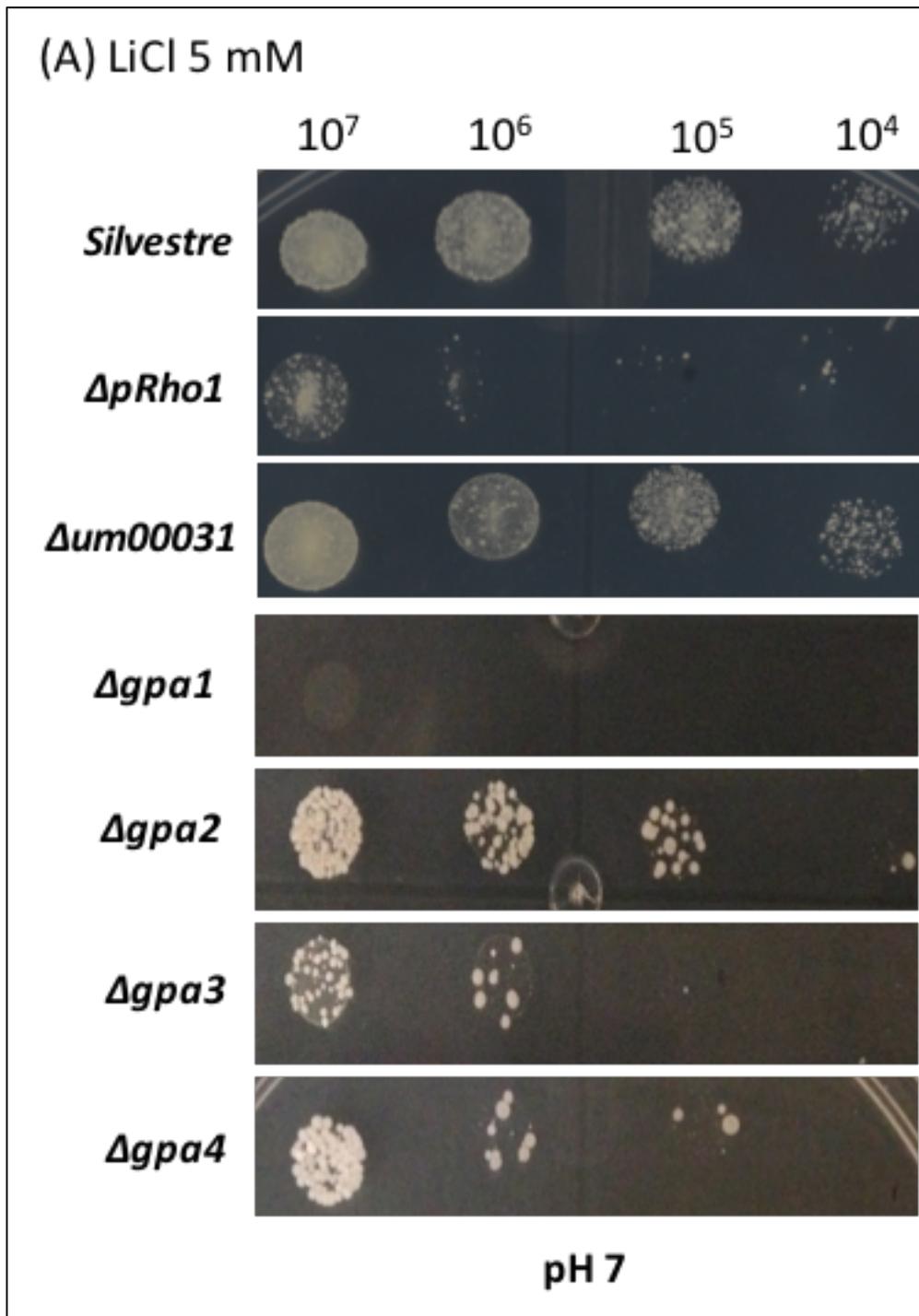


**Figura 10.** Efecto del pH sobre el crecimiento en placa de las mutantes  $G\alpha$  de *U. maydis*.

Ambos resultados nos indicaron que posiblemente la función de estos genes estaba relacionada con la adaptación de *U. maydis* a ambientes alcalinos. Partiendo de este resultado, nos enfocamos a probar el fenotipo de estas mutantes en pruebas relacionadas con la vía Pal/Rim, ya que como se mencionó con anterioridad esta vía de señalización está ampliamente distribuida y es la más importante vía de adaptación a pH alcalino en hongos. Los procesos controlados por esta vía son: síntesis y estructura de la pared celular, secreción de proteínas al medio de cultivo (proteasas y lipasas), resistencia a estrés iónico (cationes monovalentes) y oxidativo, mantenimiento del pH intracelular, crecimiento a pH alcalino, resistencia al calor y resistencia a la lisis enzimática de la pared celular (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005; Cervantes-Chávez *et al.*, 2010; Fonseca-García *et al.*, 2011).

### ***Efecto de iones monovalentes***

Se probó el efecto sobre el crecimiento de las cepas mutantes de los iones  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  utilizando placas de MM de pH 7 y pH 9. Se usaron diluciones seriadas y se incubaron por 72 h a 28°C. Los resultados se muestran en la **Fig 11, 12 y 13**.



**Figura 11.** Efecto del LiCl sobre sobre el crecimiento de las mutantes de *U. maydis*.

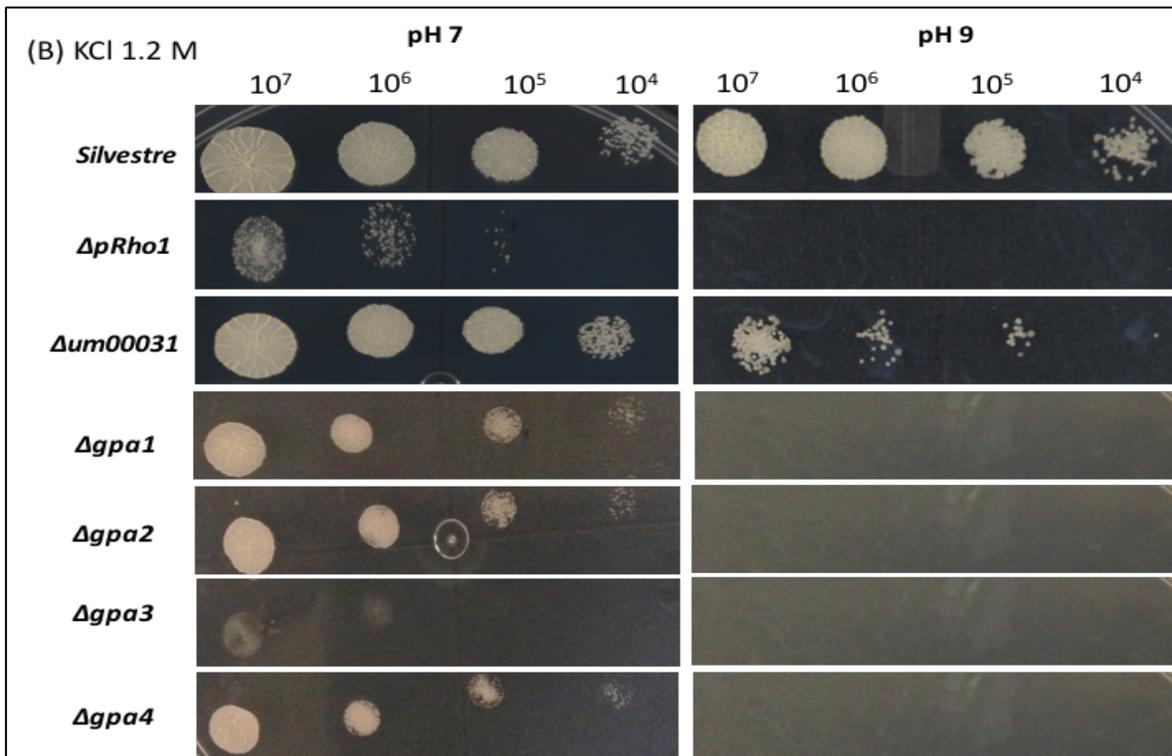


Figura 12. Efecto del KCl sobre el crecimiento de las mutantes de *U. maydis*.

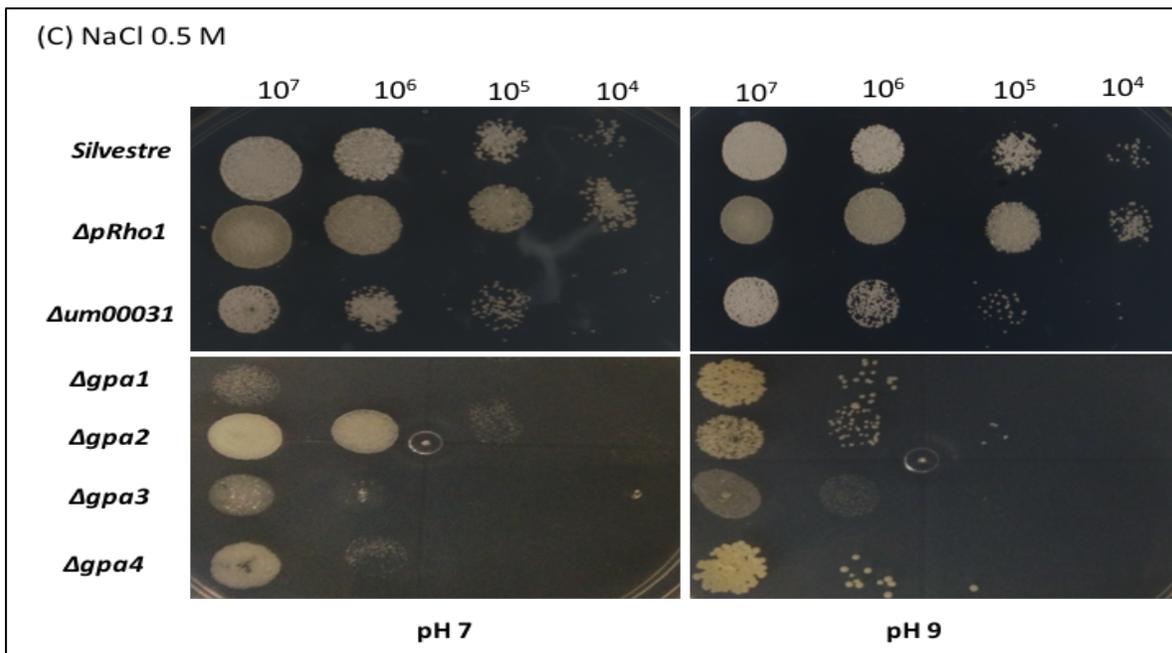
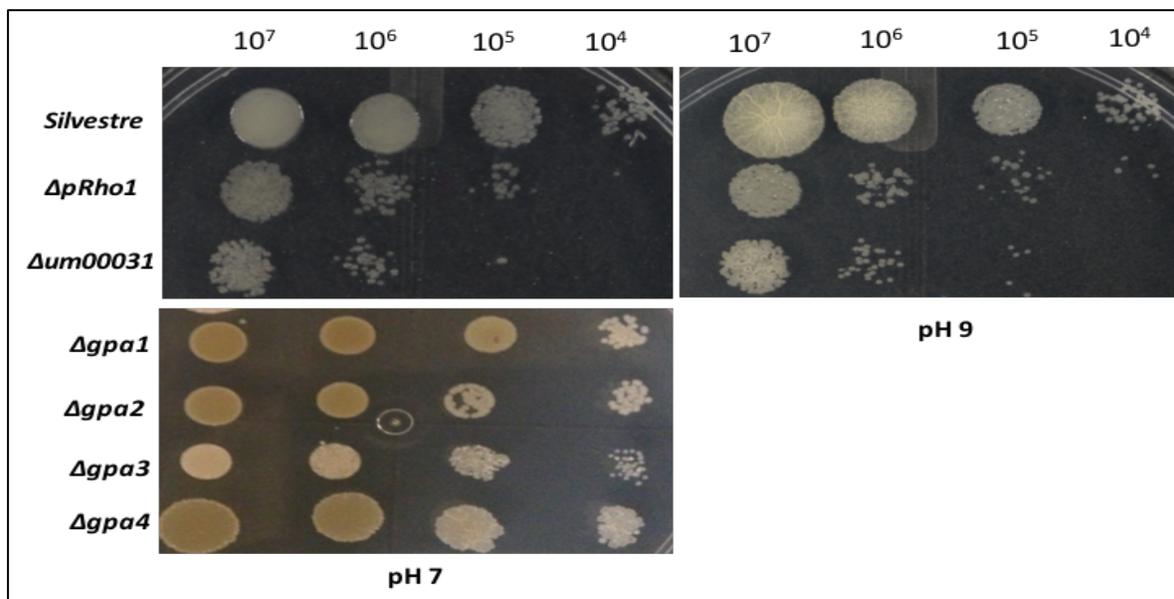


Figura 13. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de las mutantes de *U. maydis*.

Observamos que las mutantes *ΔpRho1*, *Δgpa1*, *Δgpa3* y *Δgpa4* mostraron ser más sensibles que la silvestre a pH neutro al utilizar  $\text{Li}^+$ . Al utilizar  $\text{K}^+$  las más afectadas fueron las mutantes *ΔpRho1* y *Δgpa3* a pH neutro; y a pH de 9, las mutantes *ΔpRho1*, *Δum0003* junto con todas las mutantes *Δgpa1-Δgpa4* ya que no se observó crecimiento. Al hacer uso del  $\text{Na}^+$  la mutante *Δum00031* junto con todas las mutantes *Δgpa1-Δgpa4* fueron las más afectadas más sensible a pH neutro y aún más sensibles a pH alcalino que la silvestre. Lo anterior concuerda con lo descrito en el sentido de que las mutantes de los componentes de la vía Pal/Rim son incapaces de crecer en presencia de estos iones o al menos su crecimiento se observa disminuido.

### *Efecto del estrés osmótico*

Otra prueba que realizamos fue medir el efecto del estrés osmótico usando sorbitol 2M sobre el crecimiento de las mutantes de *U. maydis* en placas de MM de pH 7 y pH 9. De la misma manera que la prueba anterior, se usaron diluciones seriadas y se incubaron por 72 h a 28°C.



**Figura 14.** Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de las mutantes de *U. maydis*.

En la **Fig 14** se observa que las mutantes *ΔpRho1* y *Δum00031* mostraron una clara disminución del crecimiento en comparación con la silvestre tanto a pH neutro como alcalino, y que las mutantes *Δgpa1-Δgpa4* no se vieron afectadas bajo este tipo de estrés a pH neutro.

### ***Efecto del estrés oxidativo***

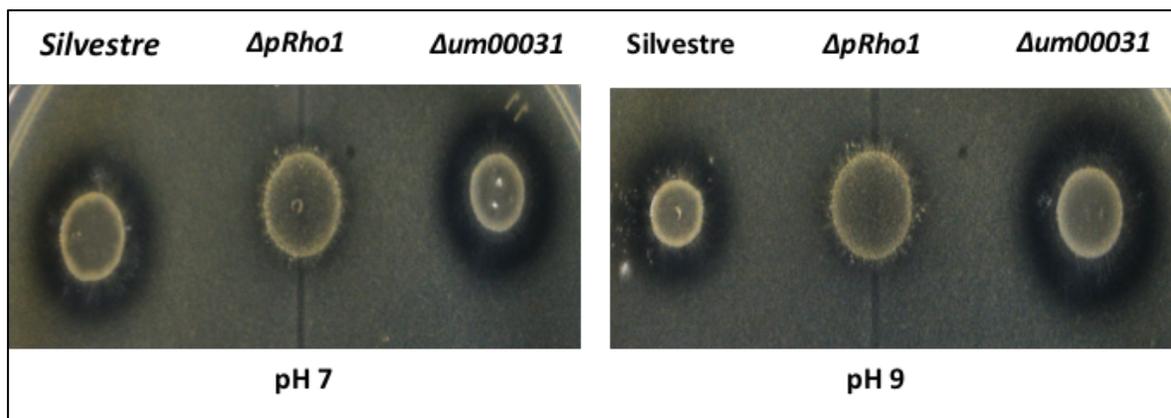
El estrés oxidativo se determinó por medio de la medición del halo de inhibición del crecimiento en placas de MM pH 7 utilizando círculos de papel filtro impregnados con 10 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%. Cada una de las cepas (10<sup>6</sup> cel/mL) fue inoculada en placas individuales por triplicado y se incubaron por 72 h a 28°C. Las mediciones el halo de inhibición se usaron para una prueba estadística de Dunnett tomando un valor de α = 0.01 y n= 3. El resultado de la prueba se muestra en la **Tabla XI**, en donde solamente en las mediciones obtenidas de la cepa *Δgpa3*, (\*) existió diferencia significativa comparada contra la silvestre. Por lo que se concluye que aparentemente solo esta cepa está afectada en la respuesta a este tipo de estrés.

**Tabla XI.** Efecto del estrés oxidativo en el crecimiento de las mutantes de *U. maydis*

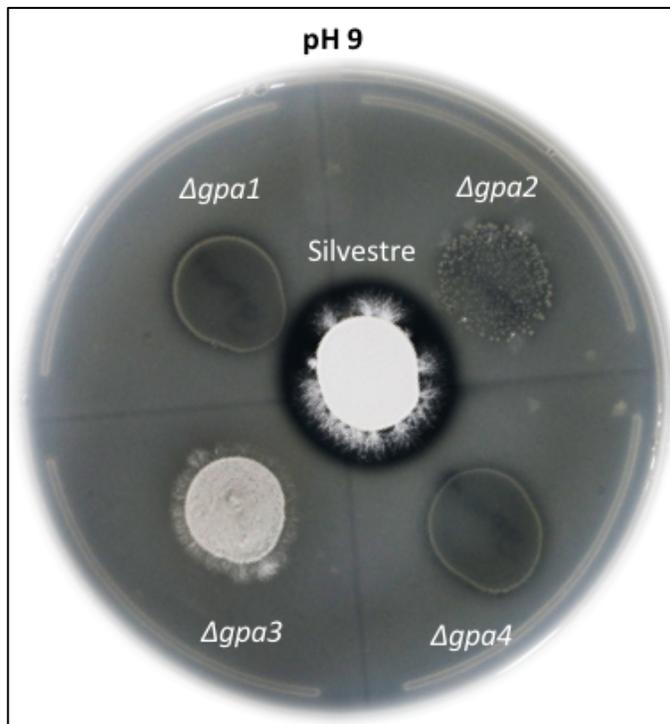
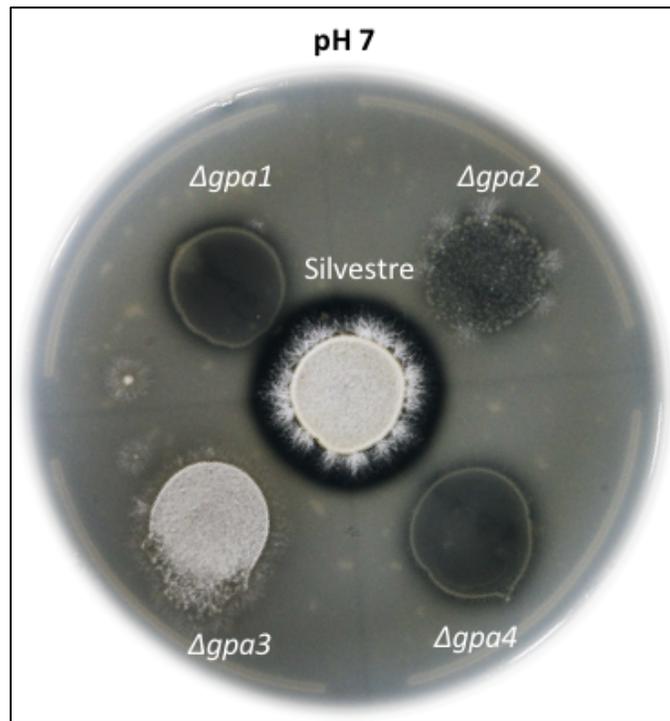
| Diámetro del halo de inhibición |               |
|---------------------------------|---------------|
| Cepa                            | Diámetro (cm) |
| Silvestre                       | 1.84 (±0.27)  |
| <i>ΔpRho1</i>                   | 1.91 (±0.11)  |
| <i>Δum00031</i>                 | 1.57 (±0.07)  |
| <i>Δgpa1</i>                    | 1.41 (±0.31)  |
| <i>Δgpa2</i>                    | 1.60 (±0.09)  |
| <i>Δgpa3</i>                    | 2.11 (±0.18)* |
| <i>Δgpa4</i>                    | 1.75 (±0.20)  |

### *Secreción de proteasas al medio de cultivo*

Se sabe que las mutantes de la vía Pal/Rim se encuentran afectadas en su capacidad de secretar proteínas al medio de cultivo, por ejemplo proteasas. Por lo tanto medimos la capacidad de secreción de proteasas de las mutantes. Esta prueba se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos y descrito previamente (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005; Cervantes-Chávez *et al.*, 2010). En las **Figs. 15 y 16** se puede observar que el halo de hidrólisis de la caseína de leche presente en el medio de cultivo fue mucho menor en la mutante  $\Delta pRho1$  y en todas las mutantes  $\Delta gpa$ , y que el halo de hidrólisis de la mutante  $\Delta um00031$  y de la silvestre son similares. Por la tanto, podemos decir que las mutantes en los genes  $pRho1$  y  $gpa1-gpa4$  se encuentran afectadas en su capacidad de secreción de proteasas al medio de cultivo, no siendo así la mutante del gen  $um00031$ .



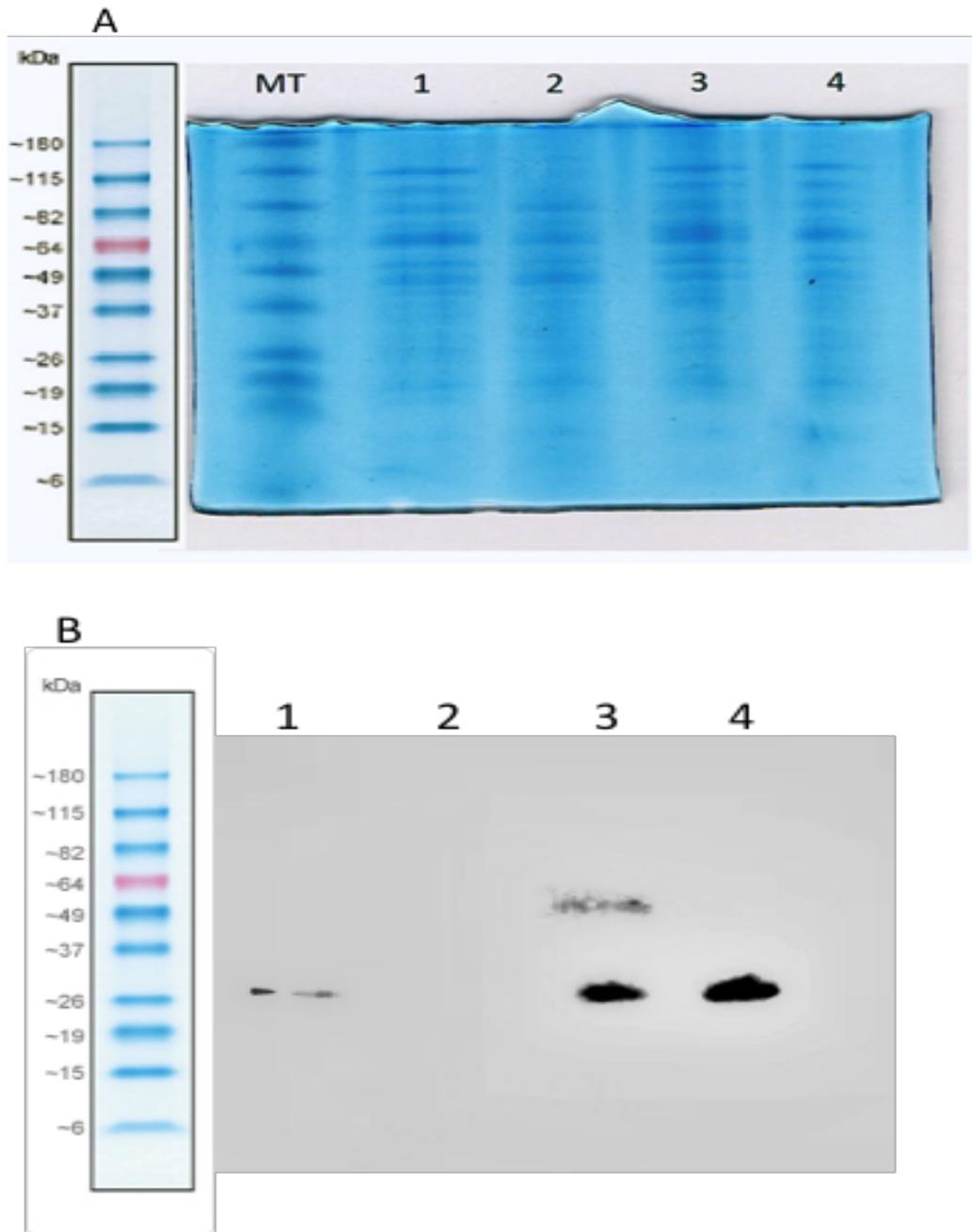
**Figura 15.** Secreción de proteasas al medio de cultivo de las mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  de *U. maydis*.



**Figura 16.** Secreción de proteasas al medio de cultivo de las mutantes  $G\alpha$  de *U. maydis*.

### ***Detección del factor de transcripción PacC/Rim 101***

Todas las pruebas anteriores, en su conjunto, nos sugirieron que posiblemente ambos genes, *pRho1* y *um00031*, podrían estar relacionados con la vía de señalización Pal/Rim. Con el propósito de determinar concluyentemente esta idea, realizamos un análisis tipo Western blot para detectar la forma del producto del gen *PacC/Rim 101* en cada una de las mutantes. Para esta prueba, utilizamos un extracto de células cultivadas en MM pH 9.5 de las cepas mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  y de la cepa silvestre que se usó como control. La razón de usar este pH es que se sabe que el factor de transcripción PacC/Rim101 se encuentra activo a valores de pH alcalino. Además de la cepa silvestre, usamos la cepa afectada en el gen que codifica el factor de transcripción PacC/Rim101 de *U. maydis* (Aréchiga-Carbajal y Ruiz-Herrera, 2005). Esta última se creció en MM pH 6, ya que presenta una total incapacidad de crecer a pH alcalino. Nuestra hipótesis fue, que si alguna de las proteínas codificadas en los genes mutados estaba involucrada directamente con la vía Pal/Rim, observaríamos mas de una banda de diferente peso molecular, correspondientes a alguna(s) de las formas activa o inactiva de PacC/Rim101, ya que se conoce que éste debe de sufrir dos cortes proteolíticos para ser completamente activo (Su y Mitchell, 1993; Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 2000; Peñalva y Arst, 2002; Peñas *et al.*, 2007; Peñalva *et al.*, 2008).



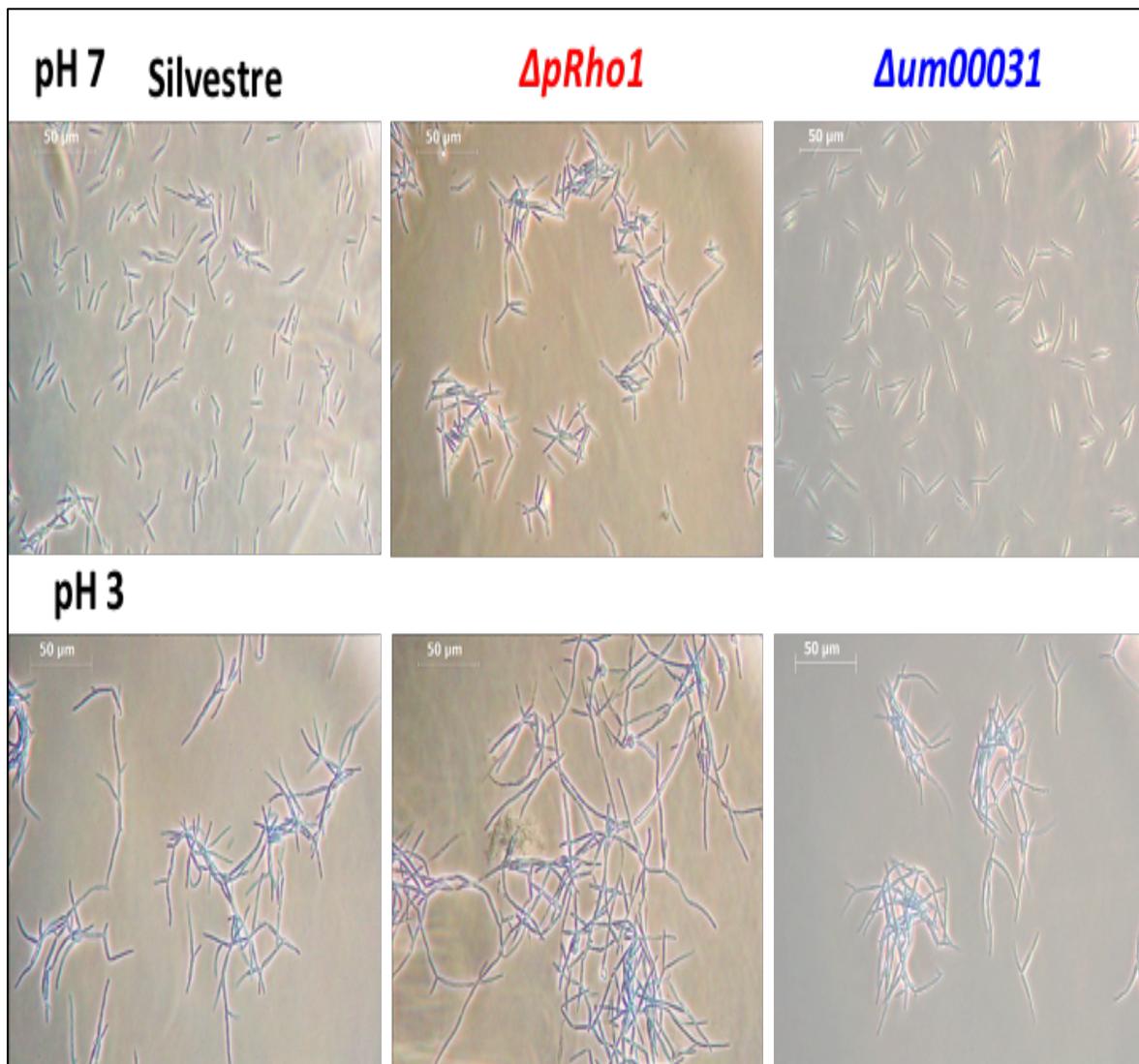
**Figura 17.** Detección del factor de transcripción PacC/Rim101 de *U. maydis* por medio de western blot. (A) Proteínas teñidas con Coomassie Blue. (B) Antígeno PacC/Rim101 revelado por quimioluminiscencia. Carriles: MT, marcador de peso molecular; 1, cepa silvestre; 2, mutante  $\Delta rim101$ ; 3, cepa mutante  $\Delta pRho1$ ; 4, cepa mutante  $\Delta um00031$ .

En la **Fig 17** se observan los resultados obtenidos, los cuales nos indican la presencia de bandas únicas en los carriles correspondientes a las cepas silvestre y  $\Delta um00031$  con un peso de aproximadamente 27-30 kDa; no siendo así para la cepa  $\Delta pRho1$  en donde se observan dos bandas, una de un peso de entre 27-30 kDa y otra de entre 55-60 kDa. Para el control de la mutante  $\Delta rim101$  no se observó alguna señal. Estos resultados indican varios puntos importantes. El primero de ellos fue el conocer el peso molecular de la versión activa del factor de transcripción silvestre PacC/Rim101 en *U. maydis*, el cual observamos que tiene un peso aparente de entre 27-30 kDa; el segundo es que solamente el gen *pRho1* parece estar involucrado directamente con la vía Pal/Rim ya que presentó dos bandas, una correspondiente al factor de transcripción activo (27-30 kDa) y otra de mayor peso molecular (55-60 kDa), siendo esta última una posible forma de un producto intermedio de la proteólisis del factor de transcripción. Por último, este resultado también indica que *U. maydis* posee más de un mecanismo que le permite adaptarse a ambientes alcalinos, dado que no existe participación del producto del gen *um00031* en la vía Pal/Rim y posiblemente se encuentre involucrado con otra vía diferente.

### ***Dimorfismo inducido por pH***

Otro fenómeno relacionado con el pH es el dimorfismo, el cual se define como la capacidad de un hongo de crecer en forma de levadura o micelio dependiendo de las condiciones del ambiente en que se encuentre (Ruiz-Herrera, 2012) y el cual se ha visto que puede ser inducido por la exposición *in vitro* del hongo a un medio con pH ácido de 3 al cual *U. maydis* crece en forma de micelio, en tanto que a pH neutro o cercano a la neutralidad crece en forma de levadura (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Por ello analizamos la morfología que se obtenía a pH 3, para determinar si alguno de los genes mutados tenía relación con las vías de señalización involucradas con el proceso dimórfico en *U. maydis*. Como se indicó previamente éstas son la vía PKA (Proteína cinasa dependiente del AMPc) y MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógeno). Como resultado se observó que ambas cepas mutantes no estaban afectadas en su dimorfismo inducido por pH, ya que ambas crecieron

en forma de micelio al cultivarse en MM de pH 3 y en forma de levadura en MM de pH 7 como se muestra en la **Fig 18**, aunque las levaduras formadas por la cepa  $\Delta pRho1$  crecidas a pH 7, aparecían más largas que la cepa silvestre. Estos resultados nos indicaron que ninguno de los genes deletados ( $pRho1$  o  $um00031$ ) estaban involucrados en la transferencia de la señal de pH para la inducción del dimorfismo. En el caso de las mutantes  $gpa$ , ninguna de ellas pareció estar afectada en su capacidad dimórfica (resultados no mostrados). Cabe resaltar que, por lo tanto, aún permanecen desconocidos los componentes que sensan a nivel de membrana la señal de pH y se comunican con las vías PKA y MAPK.



**Figura 18.** Dimorfismo inducido por pH en las cepas mutantes de *U. maydis*.

### ***Dimorfismo inducido por el uso de ácidos grasos como fuente de carbono***

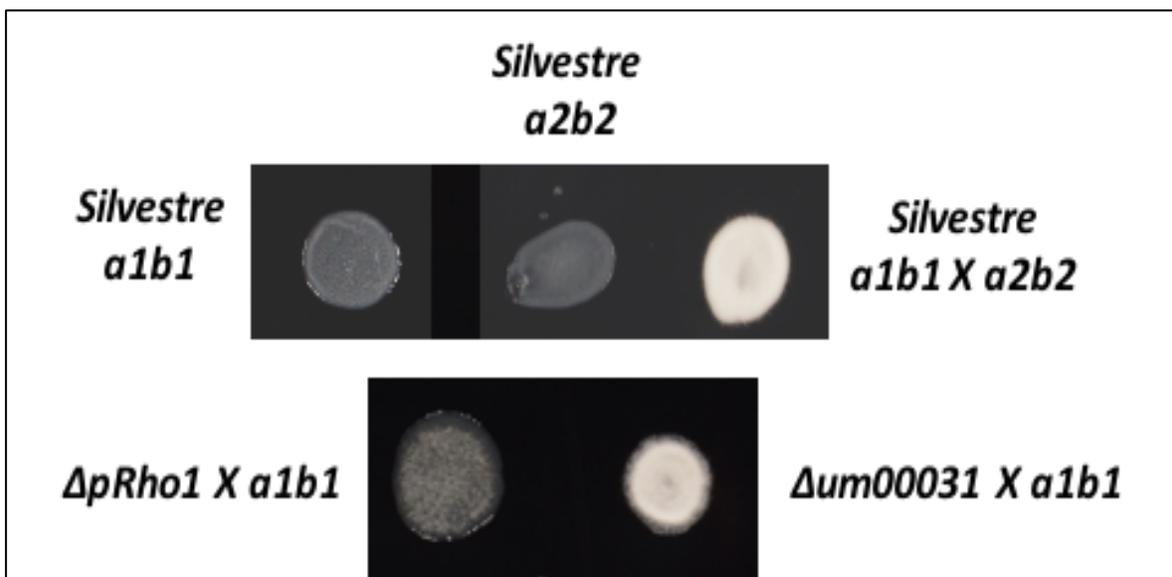
Otro factor que se sabe que induce la transición dimórfica en *U. maydis* es la presencia de ácidos grasos como fuente de carbono en el medio de cultivo (Klose *et al.*, 2004). Para ello se usó el medio de cultivo descrito en la sección de Materiales y Métodos que contiene Tween 40 como fuente del ácido graso. Se inocularon  $10^6$  cél/mL en matraces conteniendo 50 mL de MM con pH de 7 adicionado con Tween 40 al 1% como única fuente de carbono, se colocaron en incubación a 28°C con agitación de 150 rpm por 5 días. Como resultado se observó que las cepas mutantes  $\Delta pRho1$ ,  $\Delta um00031$  y  $\Delta gpa3$  mostraban un porcentaje de formación de micelio muy reducido siendo de 10.1% , 9.2% y 15.4 % respectivamente comparados con la silvestre como se muestra en la **Tabla XII**, por lo tanto este nos sugirió que los tres genes posiblemente participan en la transferencia de la señal de ácidos grasos para el proceso dimórfico. Esto es de gran interés porque hasta la actualidad no se conoce mucha información relacionada con el mecanismo de captación y transferencia de la señal para la inducción de dimorfismo por ácidos grasos, por lo que se necesita un análisis mas a fondo para determinar la participación de estos genes dentro de dicho proceso.

**Tabla XII.** Porcentaje de formación de micelio de las cepas mutantes de *U. maydis*

| Cepa             | pH del medio | % de micelio        |
|------------------|--------------|---------------------|
| Silvestre        | 7            | 54.1 ( $\pm 1.72$ ) |
| $\Delta pRho1$   | 7            | 10.1 ( $\pm 1.21$ ) |
| $\Delta um00031$ | 7            | 9.2 ( $\pm 0.56$ )  |
| $\Delta gpa1$    | 7            | 50.5 ( $\pm 0.22$ ) |
| $\Delta gpa2$    | 7            | 53.4 ( $\pm 0.67$ ) |
| $\Delta gpa3$    | 7            | 15.4 ( $\pm 0.89$ ) |
| $\Delta gpa4$    | 7            | 46.4 ( $\pm 0.91$ ) |

### ***Determinación de la capacidad de apareamiento de las mutantes***

Otra prueba fenotípica realizada fue medir la capacidad de apareamiento de las mutantes. Para ello usamos la reacción Fuz, de acuerdo a lo descrito por Banuette (1995), descrita en la sección de Materiales y Métodos. En la **Figura 19** podemos observar que las mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  no tienen afectada su capacidad de apareamiento ya que ambas dieron la reacción Fuz característica (micelio aéreo) al co-inocularse con células de sexo opuesto, aunque la mutante  $\Delta pRho1$  mostró una reacción más débil que la mutante  $\Delta um00031$ . Esto nos indica que estos genes no tienen participación en el proceso de apareamiento del hongo. Por otro lado, de las 4 mutantes de proteínas G solamente la mutante  $\Delta gpa3$  se encuentra afectada en la recepción de la feromona por lo que no puede aparearse, esto de acuerdo a lo señalado por Regenfelder *et al.*, (1997).



**Figura 19.** Prueba de apareamiento de las cepas mutantes  $\Delta pRho1$  y  $\Delta um00031$  de *U. maydis*.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el crecimiento a pH alcalino representa un factor mayor de estrés para *U. maydis* comparado con el crecimiento a pH ácido. Esto se vió reflejado en un mayor número de genes expresados diferencialmente que el hongo necesita para la adaptación a uno u otro ambiente (797 genes a pH 9 vs 301 genes a pH 3). Esta adaptación se dió en su mayoría a nivel metabólico, ya que interesantemente el hongo requiere de un conjunto mas numeroso de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos, y con el metabolismo del nitrógeno para adaptarse a condiciones alcalinas.

Una observación sorpresiva fue que del total de genes regulados a pH 9, solo 36.6% se identificaron como dependientes del control del factor de transcripción PacC/Rim101. Esto sugiere que el resto de ellos, aparentemente están controlados por otros factores de transcripción o por otras vías de señalización diferentes a la vía Pal/Rim, a pesar de que es bien conocido que esta vía se encuentra ampliamente distribuida y es el más importante mecanismo que controla la respuesta a pH alcalino en los hongos.

A partir de éste análisis se identificaron varios genes que codifican proteínas que están involucradas en la transmisión de señales, o que por su estructura podrían estar asociadas al plasmalema e involucradas en la recepción de la señal de alteración del pH del medio. Y a partir de esta información se procedió a seleccionar dos de ellos para ser deletados.

De los resultados obtenidos al analizar fenotípicamente a las mutantes, solo el gen *pRho1* podría estar participando de alguna manera en la transferencia de la señal de alteración del pH hacia la vía Pal/Rim, ya que al parecer afecta el primero de los cortes proteolíticos que el factor de transcripción PacC/Rim101 necesita para ser activo. Además, se demostró su participación junto con el gen *gpa3* sobre la capacidad de adaptación en ambientes con diferentes valores de pH, su papel en diferentes tipos de estrés como estrés iónico y osmótico, y en la capacidad de secreción de proteínas extracelulares.

El gen *um00031* aparentemente participa en la transferencia de la señal de alteración del pH pero hacia una vía alterna de respuesta independiente de la vía Pal/Rim. Esto es sugerido por el hecho que la mutante afectada en el gen correspondiente si realiza la proteólisis normal del factor de transcripción PaC/Rim101. Por lo que se sugiere que puede estar involucrada con en otra vía diferente, por ejemplo con el mecanismo dependiente de calcineurina en respuesta a pH alcalino, descrito en *S. cerevisiae*, en donde participan los genes *CRZI* que codifica un activador de la transcripción conducida por CDRE (Calcineurin-dependent response element) y *ENAI* que codifica una ATPasa dependiente de Na<sup>+</sup> que es inducida por estrés salino (Stathopoulos y Cyert, 1997; Serrano *et al.*, 2002), o el mecanismo dependiente de MDS3 descrito en *C. albicans* en donde se sabe que actúa de manera paralela con la vía Pal/Rim en el control de la tolerancia a pH alcalino (Davis *et al.*, 2002)

También se puede concluir que los genes, *pRho1*, *um00031* y *gpa3* parecen estar ligados de alguna manera con el mecanismo de transferencia de la señal para la inducción del dimorfismo por ácidos grasos.

## PERSPECTIVAS

Como continuación del presente proyecto se sugieren los siguientes aspectos:

- i) Realizar deleciones de algunos otros de los genes expresados diferencialmente identificados en este trabajo que presenten características relevantes que nos indiquen su posible participación como receptores de la señal de pH a nivel de la membrana celular.
- ii) Analizar la posible participación del gen *um00031* dentro de alguno de los mecanismos alternos de adaptación a pH alcalino independientes de la vía Pal/Rim.
- iii) Analizar el papel de los genes *pRho1*, *um00031* y *gpa3* en el proceso dimórfico inducido por ácidos grasos.
- iv) Analizar el papel de los genes seleccionados en la virulencia de *U. maydis*.

## BIBLIOGRAFÍA

Aréchiga-Carvajal E. T. y Ruiz-Herrera J. (2005). The *RIM101/pacC* Homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryotic Cell* 4: 999–1008.

Balgi A. D., Diering G. H., Donohue E., Lam K. K., Fonseca B. D., Zimmerman C., Numata M., Roberge M. (2011). Regulation of mTORC1 signaling by pH. *PLoS ONE* 6(6):e21549. doi: 10.1371/journal.pone.0021549

Banks G. R., Shelton P. A., Kanuga N., Holden D.W., et al., (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* 131:69–78.

Banuett F. y Herskowitz I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Experimental Mycology* 18:247–66.

Banuett F. y Herskowitz I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122:2965–76.

Banuett F. (1998). Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:249-274.

Banuett F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. *In* Molecular Biology of Fungal Development. Osiewacz HD, editor. New York, NY: Marcel Dekker; pp. 349–98.

Blanchin-Roland S., Da Costa G. y Gaillardin C. (2005). ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 151: 3627–3637.

Blanchin-Roland S., Da Costa G. y Gaillardin C. (2008). Ambient pH signalling in the yeast *Yarrowia lipolytica* involves YIRim23p/PalC, which interacts with Snf7p/ Vps32p, but does not require the long C terminus of YIRim9p/PalI. *Microbiology* 154: 1668–1676.

Benjamini Y. y Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistical Society series B*. 57:289–300.

Bensen E. S., Martin S. J., Li M., Berman J., Davis D. A. (2004). Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Molecular Microbiology* 54: 1335–1351.

Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 340:783–795.

Bölker M., Urban M. y Kahnmann R. (1992). The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68(3):441–50.

Bölker M. (2001). *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147:1395–401.

Bolstad B. M., Irizarry R. A., Astrand M., Speed T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185–193.

Bravo R. y Macdonald-Bravo H. (1986). Effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblasts. *FEBS Letters* 195:309–312.

Bradford M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Cabrera-Ponce J. L., León-Ramírez C. G., Verver-Vargas A., Palma-Tirado L., *et al.*,(2012). Metamorphosis of the Basidiomycota *Ustilago maydis*: transformation of yeast-like cells into basidiocarps. *Fungal Genetics and Biology*. 49:765–777.

Castrejon F., Gómez A., Sanz M., Durán, A., Roncero C. (2006). The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryotic Cell* 5: 507–517.

Caracuel Z., Roncero M. I., Espeso E. A., González-Verdejo C. I., García-Maceira F. I., Di Pietro A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 48:65–779.

Cervantes-Chávez A., Ortiz-Castellanos L., Tejeda-Sartorius M., Gold S., Ruiz-Herrera J. (2010). Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 446– 457.

Chambard J.C. y Pouyssegur J. (1986). Intracellular pH controls growth factor induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0-G1 transition of fibroblasts. *Experimental Cell Research* 164:282–294.

Chiche J., Ilc K., Laferriere J., Trottier E., et al., (2009). Hypoxia inducible carbonic anhydrases IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Research* 69:358–368.

Chun C. D. y Madhani H. D. (2010). Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One Public Library of Science* 5(9):e12503.

Cornet M., Bidard F., Schwarz P., Da Costa G., Blanchin-Roland S., Dromer F., Gaillardin C. (2005). Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 73: 7977–7987.

Davis D. A., Edwards J. E. Jr., Mitchell A. P., Ibrahim A. S. (2000). *Candida albicans rim101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infection and Immunity* 68: 5953– 5959.

Edwards A. W. y Edwards J. H. (1992). Metrical Venn diagrams. *Annals of Human Genetics*. 56:71–75.

Eichhorn H., Lessing F., Winterberg B., Schirawski J., et al., (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. 18:3332–3345.

- Fonseca-García C., León-Ramírez C. G. y Ruiz-Herrera J. (2012). The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Research* 12:5 547-556.
- Franco-Frías E., Ruiz-Herrera J. y Aréchiga-Carvajal E. T. (2014). Transcriptomic analysis of the role of Rim101/PacC in the adaptation of *Ustilago maydis* to an alkaline environment. *Microbiology* 160:1985–1998.
- Gold S., Duncan G., Barret, K. y Kronstad J. (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Development* 8:2805-2816.
- González-López C. I., Ortiz-Catellanos L. y Ruiz-Herrera J. (2006). The ambient pH response Rim pathway in *Yarrowia lipolytica*: Identification of *YIRIM9* and characterization of its role in dimorphism. *Current Microbiology* 53: 8–12.
- González-Prieto J. M., Rosas-Quijano R., Domínguez A., Ruiz-Herrera J. (2014). The *UmGcn5* gene encoding histone acetyltransferase from *Ustilago maydis* is involved in dimorphism and virulence. *Fungal Genetics and Biology* 7:86–95.
- Guevara-Olvera L., Xoconostle-Cázares B. y Ruiz-Herrera J. (1997). Cloning and disruption of the ornithine descarboxylase gene of *Ustilago maydis*: Evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology* 143:2237-2245.
- Hall M. N. (2008). mTOR-what does it do? *Transplantation Proceedings* 40: S5–8.
- Holliday R. (1974). *Ustilago maydis*, in: King, R.C. (Ed.), *The Handbook of Genetics*, Plenum Press, New York, 575–595.
- Huang J. y Manning B. D. (2008). The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochemical Journal* 412: 179–190.
- Inoki K., Corradetti M. N. & Guan K. L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature Genetics* 37:19–24.

Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Baclay Y. D., et al., (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264.

Klose J., de Sá M. M. y Kronstad J. W. (2004). Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 52(3):823–35.

Kobilka B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:794–807.

Kronstad J. W. y Leong S. A. (1989). Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 86(3):978–82.

Kronstad J. W. y Leong S. A. (1990). The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes & Development* 4:1384–1395.

Kullas A. L., Martin S. J. y Davis D. (2007). Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Molecular Microbiology* 66: 858–871.

Lamb T. M., Xu W., Diamond A., Mitchell A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 1850–1856.

Lamb T. M. y Mitchell, A. P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 23: 677–686.

Lambert M., Blanchin-Roland S., Le Louedec F., Lepingle A., Gaillardin C. (1997). Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a *RIM101/pacC* homolog. *Molecular Cell Biology* 17: 3966–3976.

Letunic I., Doerks Y. y Bok P. (2012). SMART: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 40:302-305.

- Li L., Wright S. R., Krystofova S., Park P. y Borkovich K. A. (2007). Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* 61:423–425.
- Li M., Martin S. J., Bruno V. M., Mitchell A. P., Davis D. A. (2004). *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryotic Cell* 3: 741–751.
- Mahmood T. y Yang P. C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4:429-434.
- Marzluf G. A. y Fu Y. H. (1989). Genetics regulation and molecular studies of nitrate assimilation in *Neurospora crassa*, in: Wray, J.L., Kinghorn, J.R. (Eds.), Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation, Oxford University Press, Oxford, 314–327.
- Martínez-Espinoza A. D., García-Pedrajas M. D. y Gold S. E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics Biology* 35:1-20.
- Martínez-Espinoza A. D., Ruiz-Herrera J., León-Ramírez C. G. y Gold S. E. (2004). MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Current Microbiology* 49: 274-281.
- Martínez-Soto D. y Ruiz-Herrera J. (2013). Transcriptomic analysis of the dimorphic transition of *Ustilago maydis* induced in vitro by a change in pH. *Fungal Genetics Biology* 58:116–125.
- Mira N. P., Lourenço A. B., Fernandes A. R., Becker J. D., Sá-Correia I. (2009). The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Research* 9: 202–216.
- Musgrove E., Seaman M. y Hedley D. (1987). Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence. *Experimental Cell Research* 172:65–75.

O'Meara T. R., Norton D., Price M.S., Hay C., Clements M.F., Nichols C.B., et al. (2010). Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. *PLoS Pathog. Public Library of Science* 6(2):e1000776.

O'Meara T. R., Holmer S.M., Selvig K., Dietrich F., Alspaugh J. A. (2013). *Cryptococcus neoformans* Rim101 is associated with cell wall remodeling and evasion of the host immune responses. *MBio*. 4(1).

Orejas M., Espeso E. A., Tilburn J., Sarkar S., Arst H. N. Jr., Peñalva M. A. (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Experimental Cell Research* 9: 1622–1632.

Peñalva M. A. y Arst, H. N. Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 426–446.

Peñalva M. A. y Arst, H. N. Jr. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology* 58: 425–451.

Peñalva M. A., Tilburn J., Bignell E., Arst H. N. Jr. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16: 291–300.

Pouyssegur J., Franchi A., L Allemain G. y Paris S. (1985). Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Letters* 190: 115–119.

Punta M., Coggill P. C., Elberhardt R. Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Goran C., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E. L. L., Eddy S. R., Bateman A. y Finn R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40: 290-301.

Regenfelder E., Spelling T., Hartmann A., Lauenstein S., et al. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals. *EMBO Journal* 16:1934–1942.

Roche NimbleGen (2008). NimbleGen gene expression microarrays and services. High density arrays for sensitive and accurate genome-wide gene expression profiling. [www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)

Rollins J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 785–795.

Rubinsztein D. C., Gestwicki J. E., Murphy L. O., Klionsky D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews Drug Discovery* 6:304–31.

Ruepp A., Zollner A., Maier D., Albermann K., et al., (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32:5539–5545.

Ruiz-Herrera J. (1994). Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation. *Critical Reviews in Microbiology* 20:143-150.

Ruiz-Herrera J., León C. G., Guevara-Olvera L., Carabez-Trejo A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141: 695–703.

Ruiz-Herrera J. y Martínez-Espinosa A. D. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *International Journal of Food Microbiology* 1(2):149–58.

Ruiz-Herrera J., León-Ramírez C. G. y Martínez-Espinosa A. D. (2000). Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Research in Developmental Microbiology* 4:585–98.

Ruiz-Herrera J. y León-Ramírez C. G. (2012). Development and Dimorphism of the Phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. In *Dimorphic Fungi: Their Importance as Models for Differentiation and Fungal Pathogenesis*. Ruiz-Herrera J., Ed. Bentham eBooks Science Publishers. pp 105-116.

Ruepp A., Zollner A., Maider D., Albermann K., Hani J., Mokrejs M., Tetko I., Guldener U., Mannhaupt G., Munsterkötter M. y Mewes H. W. (2004). The FunCat, a functional

annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32:5539-5545.

Schulz B., Banuett F., Dahl M., Schlesinger R., Schafer W., Martin T., Herskowitz I. y Kahamann R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis* whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60(2):295–306.

Sánchez-Martínez C. y Pérez-Martín J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Current Opinion in Microbiology* 4:214-221.

Scazzocchio C., y Arst Jr. H. N. (1989). Regulation of nitrate assimilation in *Aspergillus niduans*, in: Wray, J.L., Kinghorn, J.R. (Eds.), *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, Oxford University Press, Oxford, 299–313.

Schagger H. y Von Jagow G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166:368-379.

Serrano R., Ruiz A., Bernal D., Chambers J. R., Ariño J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology*. 46:1319-1333.

Slonczewski J. L., Fujisawa M., Dopson M., Krulwich T. A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Advances in Microbial Physiology* 55: 1-79.

Su S. S. y Mitchell A.P. (1993). Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Research* 21: 3789–3797.

Szanişzlo P. J. (1985). *Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans*. New York: Plenum Press.

Tilburn J., Sarkar S., Widdick D. A., Espeso E. A., Orejas M., Mungroo J., Peñalva M. A., Arst H. N. Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates

regulation of both acid and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* 14: 779–790.

Vanden-Bossche A., Odds F. C. y Kerridge D. (1993). Dimorphic fungi in biology and medicine. New York: Plenum Press ISBN: 978-1-4613-6226-5

Weinzierl G., Leveleki L., Hassel A., Kost G., et al., (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*. 45:219–231.

You B. J. y Chung K. R. (2007). Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiology Letters* 277: 107–114.

Yu J. H., Hamari K. H., Seo J. A., Reyes-Domínguez Y. y Seazzocchio C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulation in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41:973-981.

Xu W., Smith F. J., Jr, Subaran R., Mitchell A. P. (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5528–5537.

Xue C., Hsueh Y. y Heitman J. (2008). Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 32:1010–1032.