

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TÍTULO:

**“Caracterización de la expresión génica en respuesta a estrés alcalino en *U. maydis*
mediada por el factor de transcripción Rim101/PacC”**

POR:

M.C. EDUARDO FRANCO FRÍAS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Julio 2014.



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TITULO:

**“Caracterización de la expresión génica en respuesta a estrés alcalino en *U. maydis*
mediada por el factor de transcripción Rim101”**

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Directora Interna


Dr. José Ruiz Herrera
Director Externo

Dra. Yolanda Gutiérrez Puente
Secretaria

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Vocal 1

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal 2

Ciudad Universitaria, Julio 2014.

El presente trabajo fue financiado por CONACYT México, por el Proyecto de Genómica funcional del Sistema de Regulación de la Expresión celular por pH ambiental en *U. maydis*, Convenio CB-2008-01, No. de proyecto 106319.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se pudo llevar a cabo sin el apoyo de muchas personas, las cuales en este periodo me mostraron nuevas perspectivas de vida, me enseñaron a ser mejor persona.

Gracias a mi familia, mi papá, mamá, hermana, hermano y mi cuñada, así como mi sobrino, por su apoyo, amor, comprensión.

Gracias Diana por mostrarme otro lado de la vida, uno más feliz y pleno, esos momentos felices, viajes, anécdotas, por tu apoyo, comprensión y amor.

Gracias a mis maestros, tantos como para poder mencionar, gracias al M.C. Juan Manuel Adame, Dra. Elva Teresa Aréchiga, Dr. Juan Manuel Alcocer, Dr. Santos García, Dra. Yolanda Gutiérrez, Dr. José Ruiz Herrera y demás maestros que con sus comentarios, coscorriones y paciencia me han mostrado cual es el verdadero camino de la ciencia.

A mis amigos y compañeros, por todos esos momentos, experiencias, amistades, sugerencias, apoyo cuando lo necesitaba.

“Nunca rendirse, nunca retroceder”

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	XII
2. ABSTRACT.....	XIII
3. INTRODUCCIÓN.....	1
4. DEFINICIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
5. HIPÓTESIS.....	5
6. OBJETIVOS.....	6
6.1 Objetivo General.....	6
6.2 Objetivos Específicos.....	6
7. ANTECEDENTES.....	7
7.1 Adaptación al medio ambiente.....	7
7.2 Respuesta a variaciones en el pH del medio.....	8
7.3 Sistema Pal/ Rim.....	9
7.4 Funcionamiento del sistema Pal/PacC.....	11
7.5 Descripción de mecanismos de adaptación a pH, regulados por Rim101.....	15
7.6 Generalidades de <i>Ustilago maydis</i>	19
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
8.1 Cepas de microorganismos.....	22
8.2 Medios de crecimiento de <i>U. maydis</i>	22
8.2.1 Solución de sales de <i>U. maydis</i>	22
8.2.2 Medio Mínimo pH3.....	23

8.2.3	Preparación de Medio Mínimo pH 7 y pH 9.....	23
8.2.4	Medio Mínimo con amortiguador pH 3, 7 y 9.....	24
8.2.5	Medio completo /MC/.....	24
8.3	Método de inducción de la miceliación de <i>U. maydis</i>	25
8.4	Determinación de la Curva de Crecimiento.....	26
8.5	Obtención de Materia Genético.....	27
8.5.1	Extracción de ADN.....	27
8.5.2	Extracción de ARN.....	28
8.5.2.1	Preparación de Agua DEPC.....	28
8.5.2.2	Preparación antes de la extracción de ARN.....	28
8.5.2.3	Extracción de ARN modificado de Jones <i>et al.</i>	29
8.6	Digestión con DNAsa.....	30
8.7	Gel de electroforesis desnaturalizante.....	31
8.8	Gradiente de temperaturas de alineamiento para eficientar el PCR.....	32
8.9	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.....	33
8.9.1	Reacción en cadena de la polimerasa Cuantitativa con transcriptasa inversa.....	35
8.10	Micromatrices y análisis bioinformáticos.....	36
8.11	Método de Delecion de genes (DELSGATE).....	38
8.11.1	Transformación de <i>Escherichia coli</i> cepa DH5 α	38
8.11.2	Método de lisis alcalina.....	39

8.11.3 Corroboración de construcciones.....	40
9. RESULTADOS.....	41
9.1 Selección de Fuente de Nitrógeno, Diseño de Amortiguador y Curva de Crecimiento.....	41
9.2 Curva de Crecimiento.....	44
9.3 Calidad del ARN extraído a diferentes tiempos.....	44
9.4 Resultados del análisis de la expresión de genes mediante el uso de Micromatrices.....	47
9.4.1 Análisis de las Micromatrices.....	47
9.4.2 Análisis de la regulación de la expresión génica a pH 9.....	48
9.5 Respuesta Genómica.....	50
9.5.1 Efectos fisiológicos de respuesta a pH alcalino.....	50
9.5.1.1 Regulación de mecanismos Transporte.....	52
9.5.1.2 Transportadores a través de membrana.....	54
9.5.1.3 Membrana y Pared Celular.....	59
9.5.1.4 Desarrollo, diferenciación, citoesqueleto y ciclo celular.....	64
9.5.1.5 Factores transcripcionales.....	71
9.5.1.6 Funciones Diversas.....	74
9.6 Validación de las micromatrices por qRT-PCR.....	80
9.7 Análisis de de la expresión de Genes.....	81
9.7.1 Análisis de Micromatrices.....	52
9.7.2 Análisis de expresión a pH 9.....	52
10. DISCUSIÓN.....	86
10.1 Transporte de Iones y Nutrientes.....	86

10.2 Pared Celular	88
10.3 Transporte intracelular de proteínas a vesículas y vacuolas, y su secreción	89
10.4 Factores Transcripcionales, Desarrollo celular, ciclo de vida	90
11. CONCLUSIÓN	92
12. PERSPECTIVAS	95
13. BIBLIOGRAFÍA	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes regulados por Rim101 conocidos hasta el momento.....	18
Tabla 2. Temperatura de alineamiento de oligonucleótidos utilizados.....	34
Tabla 3. Programas Bio-informáticos.....	37
Tabla 4. Especificaciones para el diseño de oligonucleótidos.....	37
Tabla 5. Genes Totales regulados por Rim101p, en distintos pH's.....	47
Tabla 6. Regulación del transporte celular.....	52
Tabla 7. Regulación del Transporte.....	53
Tabla 8. Transportadores.....	55
Tabla 9. Transportadores.....	57
Tabla 10. Permeasas.....	58
Tabla 11. Otros transportadores.....	59
Tabla 12. Membrana y Pared Celular.....	60
Tabla 13. Desarrollo, cinasas y remodelaje de la cromatina.....	62
Tabla 14. Pared celular.....	63
Tabla 15. Desarrollo y diferenciación celular, Destino y Ciclo Celular.....	66
Tabla 16. Desarrollo y diferenciación celular.....	68
Tabla 17. Señalización, proteasas y mitocondria.....	70
Tabla 18. Factores Transcripcionales.....	72
Tabla 19. Factores Transcripcionales.....	73
Tabla 20. Policetido y Proteínas de Membrana.....	75
Tabla 21. Enzimas.....	76
Tabla 22. Lista de genes con funciones desconocidas.....	79

Tabla 23. pH de expresión de Genes seleccionados	82
Tabla 24. Plásmidos para deletar genes.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía de activación de Rim101 en <i>Aspergillus nidulans</i>	14
Figura 2. Generalidades de <i>U. maydis</i>	20
Figura 3. Selección de fuente de nitrógeno y prueba de amortiguador.....	42
Figura 4. Estabilidad del pH durante el crecimiento de las cepas FB2 y BMA2 de <i>Ustilago maydis</i>	43
Figura 5. Crecimiento de cepas silvestre y mutante en diferentes valores de pH....	44
Figura 6. Calidad y concentración del RNA extraído.....	45
Figura 7. Control de amplificación.....	45
Figura 8. Morfología y deposición de quitina en células de las cepas silvestre y mutante $\Delta rim101$ de <i>U. maydis</i>	49
Figura 9. Clasificación Funcional de genes regulados diferencialmente.....	51
Figura 10. Nivel de expresión obtenidos de valores CT obtenidos de los análisis de qRT-PCR, se utilizo el gen um03049 como gen de referencia.....	80
Figura 11. Grafica de Expresión de genes selectos.....	83
Figura 12. Análisis de expresión.....	84
Figura 13. Corroboración de presencia de insertos en los plásmidos.....	85

NOMENCLATURA

M: Molaridad

mM: miliMolar

MM: Medio Mínimo

MC: Medio Completo

UV: Ultravioleta

°C: Grados Centígrados

ATP: Adenosin Trifosfato

AMP: Adenosin Monofosfato

ADN: Acido Desoxirribonucleico

ARN: Acido Ribonucleico

L: Litros

Mg: miligramos

G gramos

ml: Mililitros

v/v: volumen/volumen

min: minutos

rpm: revoluciones por minuto

h: horas

cel/ml: células/mililitro

μl: microlitro

vol: Volumen

U: Unidades

ng: nanogramo

1. RESUMEN

El pH alcalino activa un mecanismo de adaptación en los hongos, mediado por un factor transcripcional de dedos de zinc llamado Rim101/PacCp, perteneciente a la ruta de señalización denominada Pal/Rim. Para identificar los genes bajo su control en *U. maydis* se llevó a cabo un estudio transcriptómico por medio de micromatrices (“microarrays”) comparando la expresión de genes entre la cepa silvestre contra una mutante *rim101/pacC*. En este estudio obtuvimos evidencia de un gran número de genes regulados directamente, o regulados indirectamente (probablemente mediante la regulación de otros factores transcripcionales) por Rim101/PacCp, que codifican proteínas involucradas en un gran número de actividades fisiológicas del hongo. Nuestros análisis muestran la expresión diferencial de un total de 2705 genes, encontrándose expresión diferencial de 708 de ellos a pH ácido, 572 a pH neutro y 1425 a pH alcalino. Se observó que la respuesta en condiciones alcalinas bajo el control de la ruta Pal/Rim involucra cambios en la pared celular y la membrana plasmática, a través de alteraciones en su composición lipídica, de proteínas y polisacáridos; cambios en la polaridad celular, la organización del citoesqueleto de actina y los patrones de gemación. A su vez se demostró que ésta vía está involucrada en la regulación de genes con funciones meióticas, transporte de hierro y nutrientes, funciones vacuolares, y la expresión de una diversidad de factores transcripcionales involucrados en la adaptación de la membrana plasmática, el transporte de nutrientes y iones. Estos resultados demuestran que esta ruta está involucrada en la adaptación del organismo a un amplio rango de valores de pH, y los mecanismos de adaptación celulares que están involucrados en la supervivencia ante estos cambios.

2. ABSTRACT

Alkaline pH triggers an adaptation mechanism in fungi that is mediated by Rim101/PacCp, a zinc finger transcription factor belonging to the so-called Pal/Rim pathway. To identify the genes under its control in *Ustilago maydis*, we performed a transcriptomic analysis by use of microarrays comparing gene expression in a wild type strain vs a *rim101/pacC* mutant of the fungus. In this study, we obtained evidence of the large number of genes regulated mostly directly, but also indirectly (probably through regulation of other transcription factors), by Rim101/PacCp, that encode proteins involved in a large number of physiological activities of the fungus. Our analyses showed the differential expression of 2705 genes, 708 regulated at acid pH, 572 at neutral pH and 1425 at alkaline pH. The response to alkaline conditions under the control of the Pal/Rim pathway involves changes in the cell wall and plasma membrane through alterations in their lipid, protein, and polysaccharide composition, changes in cell polarity, in actin cytoskeleton organization, and in budding patterns. Also, as expected, adaptation involved regulation by Rim101/PacC of genes involved in meiotic functions, nutrient and iron transport, vacuolar functions, and the regulation of a diversity of transcriptional factors involved in membrane adaptation, nutrient and ion transport. Our data demonstrate the involvement of this pathway in the adaptation of the fungus to a wide pH range, and the mechanisms for cellular adaptation involved in its survival to these changes.

3. INTRODUCCIÓN

El medio ambiente presenta retos para la adaptación de todos los seres vivos, incluyendo a los hongos que los obligan a desarrollar mecanismos de adaptación para permitir su supervivencia. Uno de los factores variables en el medio ambiente es el pH que sienta constante en la célula, es variable en el ambiente, siendo una señal para que se produzcan alteraciones en su fisiología. Entre ellos podemos citar el caso de los hongos patógenos de animales que deben, o para hongos micorrízicos que deben adaptarse al medio existente en sus huéspedes. Estos mecanismos de adaptación han permitido que los hongos puedan crecer en un amplio rango de pH de 2 a 10 (Caddick *et al.*, 1986; Arts *et al.*, 1994). Los cambios en el pH de neutro a alcalino, activan un complejo mecanismo regulatorio que involucra la represión y activación de una variedad de genes involucrados en diferentes procesos. En la mayoría de los hongos, esta regulación involucra una vía de regulación cuyo factor transcripcional de dedos de zinc fue originalmente descrito como Pal/Pac involucrado en la regulación de la expresión de fosfatasas en *Aspergillus nidulans* (Caddick *et al.*, 1986), y como un regulador positivo, llamado Rim101, de la expresión de genes meióticos y de esporulación en *Saccharomyces cerevisiae* (Su y Mitchell, 1993). Otros mecanismos involucrados en la adaptación a pH son la ruta de la calcineurina en *Candida albicans* y proteínas similares a las arrestinas en *A. nidulans* (Kullas *et al.*, 2007, Herranz *et al.*, 2005). Por facilidad a esta vía la hemos denominado Pal/Rim.

Los homólogos de PacC/Rim101 han sido encontrados en especies pertenecientes a hongos de distintos phyla, indicando su conservación y la necesidad de regular sus respuestas al pH ambiental. Los datos obtenidos de distintos Ascomycota muestran una

amplia variedad de funciones reguladas por Rim101/PacC, como en *S. cerevisiae* donde controla la tolerancia a estrés iónico, diferenciación celular y esporulación, entre otras (Lamb *et al.*, 2001; Lamb y Mitchell, 2003; Barrales *et al.*, 2008; Amich *et al.*, 2010). En especies como *A. niger*, *A. nidulans* y *Colletotricum acutatum*, mutantes en este gen están afectadas en la conidiación, intensidad del pigmento conidial, son hipersensibles a pH alcalino y muestran reducción en su virulencia (Tilburn *et al.*, 1995; MacCabe *et al.*, 1996; You y Chung, 2007). En *C. acutatum*, *Trichophyton rubrum* y *Monacrosporium megalosporum* la ausencia de *Rim101* afecta su tolerancia a estrés osmótico, virulencia y secreción de proteasas y otras enzimas. (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; You y Chung, 2007; Villar *et al.*, 2007; Kanda *et al.*, 2008; Cordoba y Roncero, 2008). En *C. albicans*, PacCp/Rim101 permite la adaptación a pH alcalino o ácido, regula la formación de hifas, está involucrado en el proceso de infección y estimula la respuesta del daño celular al huésped (Davis *et al.*, 2000; Barkani *et al.*, 2000; Lotz *et al.*, 2004; Nobile *et al.*, 2008). Rim101/PacC está también involucrado en la virulencia de otros hongos patógenos, posiblemente mediante la regulación de diferentes tipos de bombas membranales de iones y secreción de proteasas y otras enzimas.

En los basidiomycota, específicamente *U. maydis*, Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera (2005) encontraron que Rim101p regula funciones similares a las de los Ascomycota, como la susceptibilidad a estrés iónico, deposición de septos y secreción de proteasas.

En el presente estudio nos enfocamos a la identificación, en *U. maydis*, de los genes regulados por Rim101p/PacC creciendo bajo pH alcalino. Cuando la mutante $\Delta rim101$ crecía a pH alcalino, exhibió alteraciones en la morfología celular y crecimiento lento con respecto a la silvestre. Al comparar los patrones de expresión génica entre la cepa

silvestre y la mutante $\Delta rim101$ encontramos genes que describen los mecanismos de la regulación génica para la adaptación del hongo a un distinto valor de a pH, su interacción con la cascada de las MAPK y a diferencia de los patógenos donde el pH influencia su virulencia, ésta no se vió afectada, sugiriendo que en *U. maydis* la vía parece funcionar como un regulador de rutas y sistemas involucrados en su supervivencia adaptando la arquitectura de la pared celular, contenido de lípidos de la membrana, la síntesis de proteínas, y regulando diversos sistemas de captación de energía y adaptando procesos relacionados con la reparación, síntesis y transcripción del ADN, así como en la regulación de las fases del ciclo celular.

4. DEFINICIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

U. maydis es uno de los hongos modelo de estudio de las interacciones planta–patógeno más analizados. Se cuenta además con la secuencia de su genoma, lo que permite el uso de herramientas bio-informáticas para describir los diversos mecanismos moleculares que afectan su fisiología. Su adaptación a cambios de pH, está regulada por el factor transcripcional Rim101/PacC, siendo usado en la ruta Pal/Rim. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio que permita elucidar detalladamente sobre qué genes recae la regulación de Rim101/PacC en los Ascomycota o Basidiomycota y cuál es su probable funcionamiento. Por ello creemos que este hongo es un modelo adecuado para contestar las preguntas que existen al respecto, y hemos partido de dichas bases para la realización de este estudio.

5. HIPÓTESIS

Ustilago maydis se adapta a los cambios en el pH del medio cambiando los patrones de expresión de genes involucrados en funciones celulares como: ciclo celular, respuesta a estrés iónico y transporte de nutrientes que son regulados directa y/o indirectamente por Rim010/PacC.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular la respuesta de la adaptación celular de *Ustilago maydis* a variaciones en el pH del medio.

6.2 Objetivos Específicos

- Analizar la expresión diferencial de genes de *Ustilago maydis* durante el cambio de pH comparativamente entre una cepa silvestre y una cepa mutante en el gen que codifica a PacC/Rim101, mediante el uso de micromatrices
- Caracterizar *in silico* la función de los genes regulados por PacC/Rim101 en esas condiciones
- Identificar, a través de los genes identificados, las rutas metabólicas reguladas por la vía Pal/Rim y su comparación funcional con homólogos presentes en especies de Ascomycota

7. ANTECEDENTES

7.1 Adaptación al medio ambiente.

La supervivencia de los hongos, al igual que la de todos los seres vivos, requiere de mecanismos que regulen la síntesis de moléculas funcionales que se adapten a las condiciones presentes en su medio ambiente. Algunos hongos como *Hortaea werneckii* se pueden adaptar a altas concentraciones de sal y desecación, mientras que los líquenes *Fulgensia bracteata* y *Xanthoria elegans* toleran altas dosis de rayos UV, gracias a la melanina presente en su pared celular (Butler y Day, 1998; De Vera *et al.*, 2003; Kogej *et al.*, 2007) En general podemos decir que la adaptación al medio requiere de la activación o represión de genes que permitan la correcta función de las rutas metabólicas. Cuando *Cryptococcus neoformans* crece a temperaturas bajas se incrementa la transcripción de los genes de histonas, lo que sugiere que la temperatura modifica la estructura de la cromatina, y a 37°C se elevan los niveles de transcripción de genes de proteínas de choque térmico y maquinaria de traducción (Steen *et al.*, 2002). A bajas temperaturas, algunos hongos secretan sustancias poliméricas extracelulares que rodean la hifa, como es el caso del hongo antártico *Phoma herbarum*, protegiéndolo de la congelación (Selbmann *et al.*, 2002; Onofri *et al.*, 2007).

Los organismos siempre se deberán adaptar a la disposición de nutrientes de los cuales depende su crecimiento. La glucosa es el nutriente de *S. cerevisiae* que funciona como señal de disposición de nutrientes en el medio. En caso de escasez, los organismos encienden una respuesta de cambio celular (Thevelein, 1994; Gancedo, 1998). La ausencia

de glucosa ocasiona una completa inhibición de la traducción, ya que las concentraciones intracelulares de ATP decrecen drásticamente (Ashe *et al.*, 2000). Esta ausencia de la síntesis de proteínas, facilita la reprogramación eficiente de la expresión génica, por medio del recambio proteico, pero esta inhibición no disminuye la presencia de ARN mensajero total, y como se observó en *Lactococcus lactis*, puede incrementar la estabilidad del mismo (Ashe *et al.*, 2000; Redon *et al.*, 2005). Una de las rutas de respuesta a estrés mejor estudiadas es la de la cinasa Sfn1p identificada en *S. cerevisiae*. (Jiang y Carlson, 1996). Esta cinasa está involucrada en controlar la respuesta al estrés celular, y respuesta a represión por glucosa, requerida para la adaptación al estrés metabólico y energía de la homeostasis. Se activa cuando se elevan los niveles de AMP lo que inhibe el funcionamiento de la mayoría de las rutas biosintéticas (Johnston y Carlson 1992; Aguan *et al.*, 1994; Carling *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1995; Momcilovic *et al.*, 2008).

7.2 Respuesta a variaciones en el pH del medio

La adaptación al pH del medio es de especial interés, ya que los organismos capaces de adaptarse a las variaciones de pH, poseen la capacidad de producir proteínas extracelulares cuya actividad no se afecte negativamente por las condiciones de pH extremos o por sus variaciones. Diversos estudios han identificado genes clave en la adaptación a pH que codifican proteínas transmembranales reguladoras de las concentraciones de iones. En *Anabaena sp.* el operon *mrp* induce un incremento en las concentraciones externas de Na⁺ a pH alcalino, y su ausencia disminuye su capacidad de crecimiento en condiciones de pH alcalino. (Blanco-Rivero *et al.*, 2005). En *Rhizobium*

meliloti, los genes *PHA* codifican un sistema de flujo de K⁺, involucrado en la adaptación a pH, requerido para la adaptación al ambiente dentro de la planta (Putnoky et al., 1998).

La vía de respuesta a pH mejor conocida en los hongos actúa a través del factor transcripcional de dedos de zinc Rim101/PacC descrito inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*. *A. nidulans* puede crecer en un rango de pH que va desde 2.5 hasta 9.0 (Caddick et al., 1986). Este hongo posee un sistema de regulación de la expresión génica en respuesta al pH, permitiéndole secretar proteínas citoplásmicas en respuesta al pH del medio. La vía de transducción de señales que regula su expresión (denominado Pal/ Rim101) consta, en *A. nidulans*, de los productos de alrededor de siete genes (Denison, 2000; Peñalva y Arst, 2002; 2004; Peñalva et al., 2008). Su funcionamiento involucra varias proteínas que se denominan Pal (o Rim) y como ya se indicó antes, un factor de transcripción que contiene tres dominios de unión a DNA del tipo dedos de Zinc (C2H2) y que se denomina Rim101/PacCp. Esta proteína fue la primera identificada a través de análisis en mutantes como un regulador positivo de la expresión de genes meióticos y la esporulación, Se activa a pH neutro o alcalino e induce la expresión de diversos genes, además que es capaz de regular la expresión de genes a pH ácido (Su y Mitchell, 1993).

7.3 Sistema Pal/Rim101

En el primer intento por caracterizar los mecanismos de regulación de la expresión de genes por el pH, se aislaron mutantes de *A. nidulans* afectadas en su capacidad de secretar la fosfatasa alcalina, comportándose como si estuvieran en ambientes ácidos, las cuales se denominaron *Pal* (de sus siglas en inglés **Phosphatase Alkaline**). Además se identificaron

mutantes incapaces de sintetizar fosfatasa acida, las cuales se denominaron mutantes *Pac* (De sus siglas en inglés **Phosphatase Acid**; Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994), las que posteriormente se demostró que estaban afectados en un factor de transcripción (PacC).

La vía de traducción de señales Pal/Pac regula la modificación de PacC por medio de un procesamiento proteolítico (Orejas *et al.*, 1995). El análisis de complementación de las mutantes *Pal* demostró la existencia de seis diferentes grupos de complementación que correspondían a los genes denominados *PalA*, *PalB*, *PalC*, *PalF*, *PalH* y *Pall*. Para la activación de PacC es necesaria la unión de PalAp a los dos motivos YPXL/I, localizados a los lados del consenso de proteólisis de la proteína (Vincent *et al.*, 2003). En un medio alcalino, se altera la superficie del endosoma, favoreciendo la interacción palA-Snf7 (Snf7 es una proteína de superficie) y la unión a Rim101 (Boysen *et al.*, 2006). El producto PalBp es una cisteína-proteasa de la familia de las calpaínas, la cual puede ser la proteasa de señalización usada en esa vía (Denison *et al.*, 1995; Sorimachi y Suzuki, 2001; Rodríguez-Galán *et al.* 2009). PalB es reclutada por ESCRT-III debido a una interacción específica con Vps24 a las membranas endosomales, activando esta proteasa y permitiendo la segunda proteólisi inespecífica de PacC (Rodríguez-Galan *et al.*, 2009; Subramanian, *et al.*, 2012).

El ortólogo de PalC en *Y. lipolytica* (YIRim23p) es necesario para la respuesta a pH alcalino siendo esencial su región carboxilo terminal (Negrete-Urtasun, 1999; Blanchin-Roland *et al.*, 2005). Esta proteína posee regiones conservadas con similitudes a los dominios Bro1, presentes en la vía de los cuerpos multivesiculares (MVB). La proteína Bro1/VPS31 y la proteína PalA interactúan con los componentes de MVB (interactúan con proteínas de la ruta ESCRT-III), reflejando una unión entre la respuesta a pH y la endocitosis (Tilburn *et al.*, 2005).

El producto del gen *PalF*, miembro de la familia de las arrestinas, se une a la proteína palHp, que regula la señalización de pH (Herranz *et al.*, 2005; Maccheroni *et al.*, 1997). La función de PalF (Rim8) es la de activar a Rim101/PacCp y su ubiquitinación es el indicador más confiable de cambio de pH. Esto sucede al unirse a la cola citosólica de PalH (Davis *et al.*, 2000; Herranz *et al.*, 2005). La proteína PalH es un receptor que unido a la proteína G actúa como un sensor ambiental de pH. La interacción entre PalH y PalF regula la señalización de pH (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007; Herranz *et al.*, 2005; Obara *et al.*, 2012), provocando una despolarización de la membrana plasmática, que actúa como una señal de activación de la ruta Pal/Rim (Obara *et al.*, 2012).

PalI se localiza en la membrana plasmática, no es esencial para la conversión proteolítica de PacC, pero su ausencia reduce marcadamente la acumulación de PacC procesado inmediatamente después de que las células se cambian a pH alcalino (Denison *et al.*, 1998; Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007). Esto se puede reflejar en el hecho de que en *Y. lipolytica* PalI (YIRIM9) no se encuentra involucrada en la transición dimórfica dependiente de pH (González-López *et al.*, 2012), y lo mismo ocurre en *U. maydis* (CITA).

7.4 Funcionamiento del sistema Pal/Pac

Las proteínas Pal existen en 2 complejos separados espacialmente, uno ubicado en la membrana que contiene a PalH, PalI y PalF, y otro endosomal que contiene a PalA y PalB, al cual PacC es reclutado para su activación proteolítica (Figura 1; Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007). A pH alcalino, los productos de los genes *Pal* inducen la proteólisis en una región localizada entre las regiones ricas en prolinas y glicinas de

PacC. La remoción proteolítica del extremo carboxilo terminal convierten a PacC a su forma funcional (Orejas *et al.*, 1995).

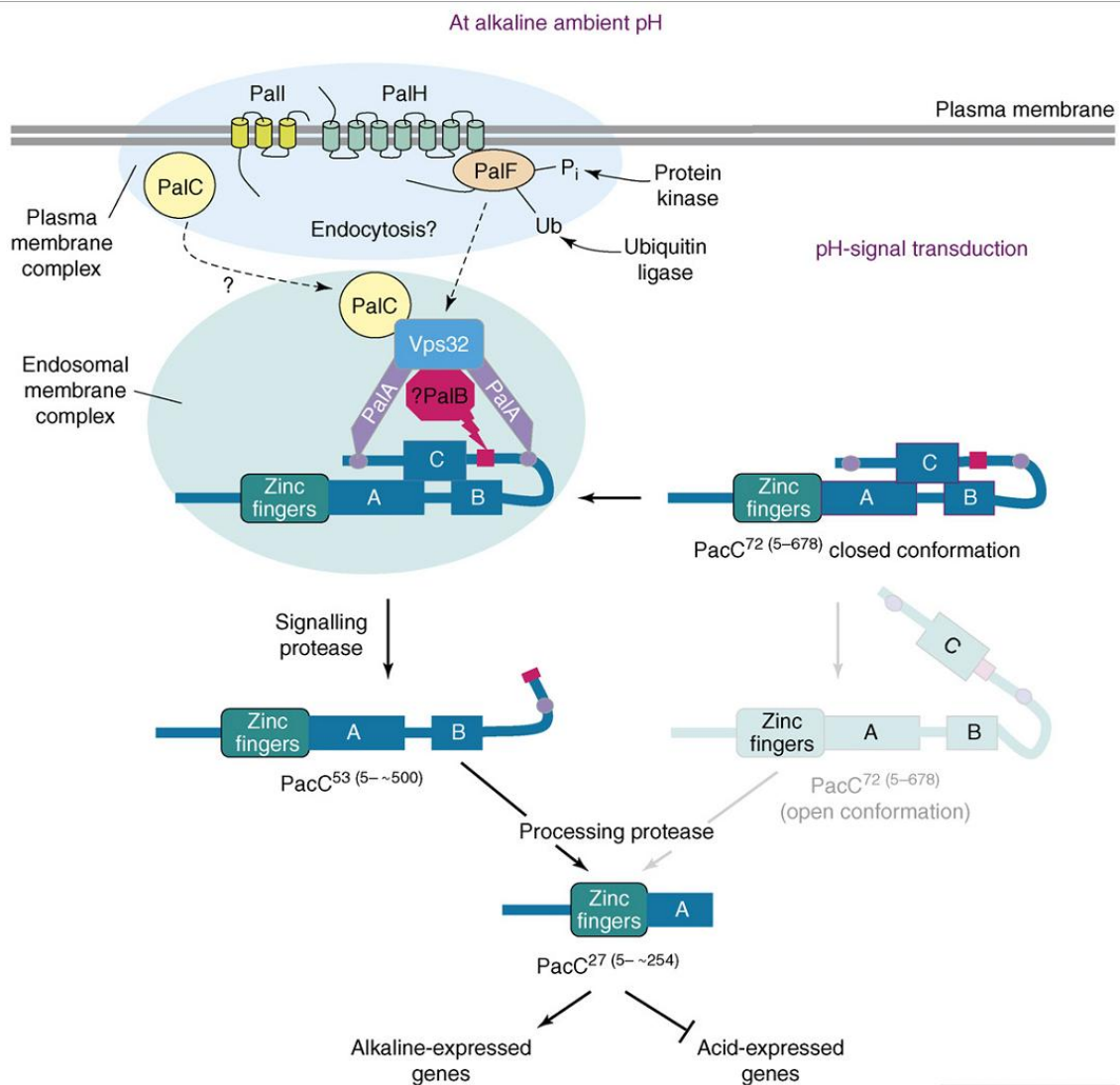
La expresión de *PacC/PacC* está sujeta al pH y es en el rango de pH neutro-alcalino que la proteína sufre dos pasos de proteólisis que conducen a su activación. Se ha demostrado que existe una señal de localización nuclear (NLS) separable, pero que se traslapa con el tercer dedo de zinc de la proteína (Fernandez-Martinez *et al.*, 2003; Mingot *et al.*, 2001). A pH alcalino, Rim101/PacC activa la transcripción de genes, incluyéndose, y reprime la transcripción de genes expresados a pH ácido, aunque se han encontrado formas procesadas a pH ácido, lo cual indica que Rim101p en *C. albicans*, *Penicillium digitatum*, pudiese tener funciones independientes de su función a pH alcalino (Tilburn *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Rim101/PacCp es un factor de transcripción de 674 aminoácidos con un peso molecular de 72 kDa, el cual posee tres dominios de unión a ADN con dedos de zinc del tipo Cis2His2 y tres regiones (dominios) de interacción que previenen su procesamiento proteolítico de forma mecánica. Se sabe que en ausencia de una señalización ambiental de pH alcalino, el extremo carboxilo terminal regula negativamente la función de Rim101/PacCp y previene el procesamiento. En la ausencia de una señal ambiental de pH, el dominio C-terminal previene una localización nuclear de la versión completa de Rim101/PacCp. Por el contrario, la forma procesada es casi exclusivamente nuclear. Al aumentar el pH, se promueve la eliminación proteolítica del extremo C-terminal y se incrementa la proporción de proteínas en su conformación abierta (Mingot *et al.*, 2001). La proteólisis de PacCp es sensible al pH, es esencial para la regulación de la expresión de genes y, como ya se mencionó, es dependiente de los genes *Pal*. En su primer corte proteolítico se eliminan 180 residuos de aminoácidos del carboxilo terminal, dando lugar a una

proteína intermediaria de 53 KDa (PacC⁵³; Diez *et al.*, 2002). El segundo corte proteolítico es realizado por el proteosoma, eliminando 245 residuos del carboxilo terminal de PacC, dando lugar a su forma activa: PacC²⁷ de 250 aa (Orejas *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999; Espeso y Arst. 2000; Diez *et al.*, 2002; Hervás-Aguilar *et al.*, 2007). Este procesamiento es necesario para realizar su actividad como factor de transcripción, como represor y para regular procesos fisiológicos y de desarrollo, y para la patogénesis en algunos hongos (Figura 1; Lamb y Mitchell, 2003; You y Chung, 2007). Otra ruta de la cual también depende Rim101p, es la vía ESCRT, a excepción de Vps37, para su procesamiento en *Saccharomyces cerevisiae*, así como en otros hongos (Rothfels *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2010 Zhao *et al.*, 2013).

Al realizar mutaciones de *Rim101/PacC* que afectan la región susceptible a proteólisis, se observó que presentan dos fenotipos diferentes: uno de comportamiento a pH ácido, aún cuando crezcan en medios alcalinos, los cuales se denominan Rim101/PacCp; y el otro en que expresan la fosfatasa alcalina (y otras proteínas de expresión susceptible al pH) de forma constitutiva. Esto ocurre cuando las mutaciones dan como resultado una proteína trunca, que ya no posee su dominio regulatorio, éstas mutantes se denominan *pacC^C* (Espeso y Arst, 2000).

La proteína PacC es capaz de unirse a través de su segundo y tercer dedos de Zinc a una secuencia consenso 5'-TGCCARG-3' del DNA, encontrada en regiones promotoras, la cual fue identificada por primera vez en el promotor del gen de la sintasa de la N-isopenicilina (*IpnA*) de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1997). Se ha reportado que para una represión directa son necesarios al menos 3 sitios de unión de Rim101/PacCp en la región promotora (Lamb y Mitchell, 2003; Espeso y Peñalva, 1996).

Hervás-Aguilar *et al.* (2007) encontraron en *A. nidulans* que el tiempo de exposición a pH alcalino de PacC⁵³ (forma procesada con el primer corte proteolítico) incrementaba la fosforilación de PacC⁵³, aumentando la vida activa del factor transcripcional.



TRENDS in Microbiology

Figura 1. Vía de activación de Rim101 en *Aspergillus nidulans*. A pH ácido Rim101/PacC se encuentra cerrado, inaccesible para proteólisis. Su activación ocurre a pH alcalino, siendo transmitida la señal del complejo de la membrana plasmática, involucrando a palH, pali, palF y palC, ocasionando el corte proteolítico en Rim101, por parte del complejo de proteínas, entre las cuales está PalA, que realiza el corte proteolítico, liberando una señal de proteólisis para el segundo corte proteolítico activando Rim101 y ocasionando la represión o estimulación de diversos tipos de genes (Peñalva *et al.*, 2008)

7.5 Descripción de mecanismos de adaptación a pH regulados por Rim101

Existe evidencia de conservación de la ruta Pal/Rim en los hongos, principalmente en Ascomycota y Basidiomycota, y se ha demostrado que PacC/Rim101 en su versión procesada estimula la expresión de genes a pH alcalino, como *IpnA*, y reprime la transcripción de genes que se expresan a pH ácido. (Espeso y Peñalva 1996; Denison, 2000). En *S. cerevisiae* se logró demostrar que Rim101/PacC funciona como un regulador de diferentes vías, las cuales controlan la tolerancia a iones y diferenciación celular, siendo un regulador negativo de *Smp1p*, regulando crecimiento invasivo haploide, morfología colonial rugosa y esporulación, y es un regulador positivo del gen activador de la meiosis *Ime1* o de *Vma4*, pero los genes inducidos por pH no siempre tienen sitios de reconocimiento de PacC en sus promotores, sugiriendo que estos son posiblemente objetivos indirectos (Lamb *et al.*, 2001; Lamb y Mitchell, 2003). En *S. cerevisiae*, donde la pérdida de Rim101/PacC resultó en una reducción de los niveles de expresión de *Flo11F* (Barrales *et al.*, 2008) y otros como el que codifica la reductasa férrica *frp1*, cuya expresión está influenciada por pH y diferentes concentraciones de hierro (Liang *et al.*, 2009).

Rim101/PacC es necesario para una máxima tolerancia al estrés inducido por cambios en el pH, se requiere para contrarrestar la acidificación citosólica inducida por el ácido propiónico y ácidos débiles, para la apropiada acidificación vacuolar y la estructura de la pared celular en *Candida albicans*, regulando 2 glicosidasas de la pared celular, *PHR1* y *PHR2* (Davis *et al.*, 2000), la concentración de los polisacáridos de pared, que constituyen cambios importantes para la adaptación del hongo a hábitats de pH neutro o ácido en el humano (Lotz *et al.*, 2004; Mira *et al.*, 2009). Rim101/PacC

afecta el desarrollo de las hifas en *C. albicans*, activando genes como *Hwp1*, *Rbt1*, *Als1* y *Als5*, reprime genes potenciales involucrados en la organización de la pared celular como son *Rbr1*, *Rbr2* y *Rbr3*, cuyas funciones están siendo investigadas (Barkani *et al* 2000; Lotz *et al.*, 2004). En general, las proteínas reguladas por PacC/Rim101p, se han clasificado en cinco categorías (revisado por Peñalva y Arst, 2004): a) Proteínas secretadas (principalmente enzimas), b) Permeasas, c) Enzimas intracelulares involucradas en la síntesis de metabolitos de exportación, d) Enzimas involucradas en modificaciones post-traduccionales de enzimas secretadas y e) Enzimas que catalizan reacciones exergónicas.

Se observó que en *Aspergillus* y en *Colletotricum* las mutantes en este gen, además de no producir la fosfatasa acida, estaban afectadas entre otras funciones, en su conidiación, intensidad de su pigmento conidial, rendimiento a pH ácido, hipersensibilidad al pH alcalino, alteración en la producción de apresorios y germinación de las esporas, reducción de la virulencia, producción de proteasas, incremento en las actividades pectinolíticas y actividades lipolíticas (Tilburn *et al.*, 1995; MacCabe *et al.*, 1996; You y Chung, 2007). Estos datos muestran que PacC/Rim101 regula la expresión de una gran variedad de genes (Tabla 1) desde proteasas, hasta factores de transcripción. En *Colletotrichum acutatum*, la regulación mediada por KLAP2p (homólogo de PacC) es esencial para controlar la tolerancia a sal, la virulencia, e integridad de la pared celular y las membranas. Al controlar la producción de enzimas hidrolíticas, controla la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (You y Chung, 2007). En *Trichophyton rubrum*, la ausencia de PacCp disminuye la secreción de proteasas queratinolíticas y la habilidad de crecer en fragmentos de uñas humanas como una única fuente de nutrientes (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

La Tabla 1, muestra una recopilación bibliográfica de los genes que se sabe que son regulados directamente por Rim101, a excepción de *Ena1* que es regulado por un factor de transcripción, llamado Nrg1p, el cual es regulado por Rim101. Los estudios antes mencionados han sido realizados en hongos tanto Ascomycota, como Basidiomycota. Los estudios en *U. maydis* y *Cryptococcus neoformans*, corroboran algunas características descritas en Ascomycota, como la regulación de Nrg1p mediante Rim101/PacCp y el involucramiento de algunos miembros de la ruta ESCRT (O'Meara et al., 2010, 2013; Hu et al., 2013). Ambas características se encuentran involucradas en la formación de la capsula de polisacárido en *C. neoformans* (O'Meara et al., 2010, 2013; Hu et al., 2013). La secreción de este polisacárido parece ser una característica compartida entre los Basidiomycota con mutación en Rim101, aunque su mutación puede tener resultados opuestos en *U. maydis* y *C. neoformans*, ya que en *U. maydis* las mutantes en esta ruta inducen la secreción de un polisacárido: β -1,3-glucana, debido a su vez a afectaciones en la pared celular (Arechiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005; Fonseca-García et al., 2012).

Tabla 1. Genes regulados por Rim101 conocidos hasta el momento

Organismo	pH de expresión	Gen regulado	Proteína	Cita
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Alcalino	<i>Xpr2</i>	Proteasa	Madzak <i>et al.</i> , 1999
	Ácido	<i>Axp</i>	Proteasa	Young <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus nidulans</i>	Alcalino	<i>Ipna, Sida, MirA, Y Mirb</i>	Permeasa, genes involucrados en la toma de sideróforos, isopenicilina N sintasa	Eisendle <i>et al.</i> , 2004
	Ácido	<i>Gaba,</i>		Espeso y Arst, 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Alcalino	<i>Msta</i>	Permeasa	VanKuyk <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alcalino	<i>Yjr061w, Smp1, Nrg1, Prb1, Ssn6-Tup1, Vía ESCRT</i>	Trasferasas, factor de transcripción, proteasa, adhesinas, endosomas.	Lamb y Mitchell. 2003.
<i>Candida albicans</i>	Alcalino	<i>Phr1, Ena1, Pga7/Rbt6, Skn1, Zrt1, Cht2, Als3, Genes Sap: Sap4, Saps Y Sap6, Fre2 Y Frp1, Pra1, Aro9, Aro10, Ker1</i>	Glicosiltransferasas, quitinasa, glicoproteínas, reductasas férricas, proteasas, factor transcripcional, transportadores, biosíntesis de esfingolípidos, producción de alcoholes aromáticos	Baek, 2006
				Davis <i>et al.</i> , 2000
				Lamb y Mitchell, 2003.
				Nobile <i>et al.</i> 2008
				Galan <i>et al.</i> , 2004
	Ghosh <i>et al.</i> , 2008			
Acido	<i>Phr2</i>	Baek <i>et al.</i> , 2008,		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ácido	<i>Acp1</i>	Proteasa	Poussereau <i>et al.</i> , 2001
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	Alcalino	<i>Spr1</i>	Proteasa de serina	Kanda <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium oxysporum</i>	Alalino	<i>Ena1</i>	ATPasa	Caracuel <i>et al.</i> , 2003
		<i>Lcc3 Y Lcc5</i>	Inhibición y sobreexpresión respectivamente	Cordoba y Roncero, 2008
<i>Trichoderma harzianum</i>	Alcalino	<i>Chit42, Papa, Gtt1, Qid74</i>	Quitinasa, proteasa, permeasa , proteína de pared celular	Moreno-Mateos <i>et al.</i> , 2007
<i>Colletotrichum. acutatum</i>	Alcalino	<i>Pg, Pla, Cut1, Chit, Xyn, Lip, Cat,</i>	Quitina, celulosa, cutinasa, xilanasa, actividades de catalasa, reprime actividades pecteolíticas y lipolíticas	

7.6 Generalidades de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis, es un basidiomycota clasificado en el orden de los *Ustilaginales* de la clase de los *Teliomicetos*, responsable de la enfermedad denominada carbón común o huitlacoche del maíz (*Zea mays*) y el teozintle (*Z. mays* Subs. *parviglumis* y Subs. *mexicana*; Fig. 2). El uso de *U. maydis* como modelo de estudio se ha incrementado debido a la secuenciación de su genoma (www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago_maydis/), lo cual permite el surgimiento de nuevas aplicaciones, la identificación de elementos involucrados en las interacciones planta-hongo, dimorfismo, y patogenicidad (Pérez-Martin *et al.*, 2006).

Lo anterior se refleja con el conocimiento que se presenta sobre la cercana interacción planta-hongo. *U. maydis* requiere del huésped para completar su fase sexual, aunque no es un parasito obligado. Es dimórfico, la forma de levadura es saprofitica y la hifa dicariótica es patógena (Bolker, 2001). La interacción es cercana, a tal punto que *U. maydis* regula la expresión de su genoma, dependiendo del órgano en el que se localice la hifa, reprogramando la diferenciación de las células, siendo esta función esencial en la formación de tumores (Skibbe *et al.*, 2010; Vollmeister *et al.*, 2012).

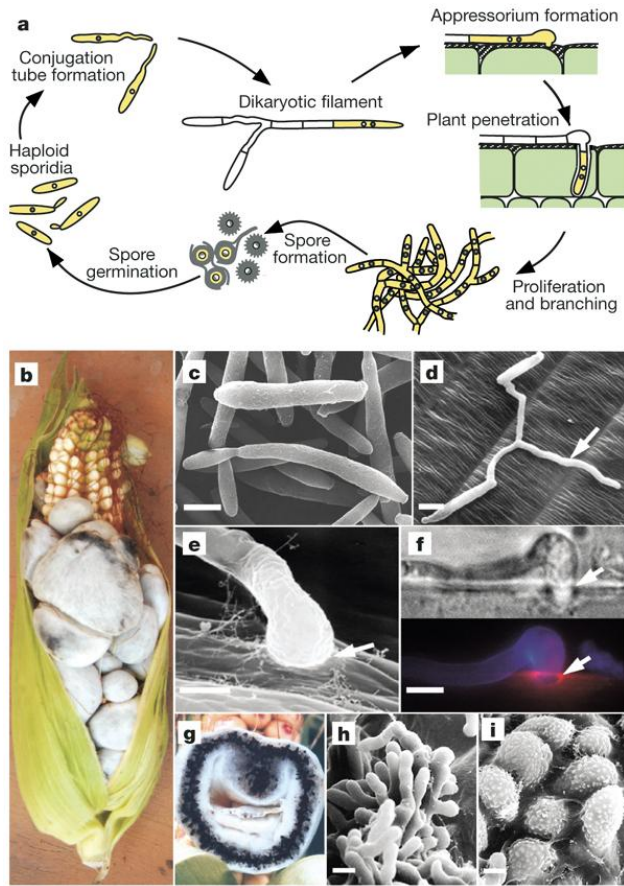


Figura 2. Generalidades de *U. maydis*. **a**, Etapas de desarrollo en el ciclo de vida. **b**, Formación del tumor en el maíz. **c**, Microscopía electrónica (SEM) del esporidio haploide. **d**, SEM del esporidio apareado, la flecha indica el filamento dicariontico. **e**, SEM del apresorio, la imagen indica el punto de entrada. **f**, Arriba, imagen de contraste del apresorio; abajo, imagen de epifluorescencia de la pared celular del hongo teñida con calcofluor (Azul) y las vesículas endociticas teñidas con FM4-64 (Rojo). Las flechas indican el punto de penetración. **g**, Teliosporas negras visibles en una sección del tumor. **h**, SEM de las hifas esporogeneas y etapa temprana del desarrollo de la espora. **i**, SEM de las teliosporas hornamentadas. Escala de las barras, 5 μ m (Kampr *et al.*, 2006).

Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera (2005), usaron a *U. maydis* como modelo para estudiar la función de Rim101 en Basidiomycota, mediante la mutación del gen que lo codifica, y observaron que las mutantes mostraban diferentes alteraciones fenotípicas, entre ellas, alteraciones en la deposición de los septos tanto a pH ácido como alcalino, aumento en la susceptibilidad a estrés iónico, secreción de un polisacárido a pH alcalino. Estudios posteriores (Franco, Tesis de Maestría) indican la regulación de la expresión de bombas de sodio y factores transcripcionales involucrados en la respuesta al estrés oxidativo cuando el pH del medio es ácido. En diversos hongos se ha identificado la función regulatoria de Rim101/PacC, y se ha demostrado que en algunos está involucrado en su patogénesis (Martinez-Rossi *et al.*, 2012), cosa qque no ocurre en *U. maydis*, ya que las mutantes en el gen PacC/Rim101 (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005), o en otros genes de la vía Pal/Rim (Cervantes-Chavez et al. 2010), son igualmente virulentas que las silvestres. Estos resultados indican que algunas de las funciones de Rim101 en los Ascomycota pueden ser diferentes a las a las que ocurren en los Basidiomycota. Es aquí donde radica parte de la importancia de identificar los genes regulados por este factor transcripcional, y analizar su conservación en ambos phyla.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Cepas de microorganismos

La cepa mutante nula $\Delta rim101$ de *U. maydis* BMA2, (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005) y la cepa silvestre de *U. maydis* FB2 (Bannuet y Herskowitz, 1989) se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una mezcla de glicerol y medio de cultivo al 50% v/v. Se reactivaron transfiriéndolas a 15 ml de medio completo (MC; ver sección medios de cultivo) y se incubaron en agitación constante durante 48-72h. Estos cultivos se utilizaron como pre-inoculo en los experimentos posteriores. La propagación de las cepas, tanto en forma de levadura como de micelio para *U. maydis*, se realizaron en medio mínimo (MM), mencionado más adelante.

8.2 Medios de crecimiento de *U. maydis*:

8.2.1 Solución de sales de *U. maydis* (Holliday, 1961):

Se pesaron 16 g de KH_2PO_4 , 4 g de NaSO_4 , 8 g de KCl , 2 g de MgSO_4 , 1g de CaCl_2 y 8 ml de elementos traza*. Se disolvieron en 1L de agua destilada y se esterilizó en autoclave.

* Elementos traza: Se pesaron 60 mg de H_3BO_3 , 140 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$, 400 mg de ZnCl_2 , 40 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$, 100 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$, 400 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$. Se disolvieron en 1L de agua destilada y se esterilizó en autoclave.

8.2.2 Medio Mínimo pH3 (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995):

- Se pesaron 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de amonio, se añadieron 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis* (sección 8.2.1).
- Se mezclaron las sales y el nitrato de amonio en un poco de agua destilada y se llevó a pH 3 con HCl concentrado.
- Se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- La glucosa se disolvió con agua destilada, y se llevó a un volumen de 500 ml.
- Se esterilizó en autoclave.
- Las soluciones de sales y glucosa se mezclaron 1:1 v/v al momento de utilizarse.

8.2.3 Medio Mínimo pH 7 y pH 9 (Holliday, 1961):

- Se preparó con 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de potasio. 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*.
- Se mezclaron las sales y el nitrato de potasio en 100ml de agua destilada y se llevó el pH con NaOH 2N a un valor de pH 7 o 9.
- Se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- La glucosa se disolvió con agua destilada y se llevó a un volumen de 500 ml
- Se esterilizó en una autoclave.
- Las soluciones de sales y glucosa se mezclaron 1:1 v/v al momento de utilizarse.

8.2.4 Medio Mínimo con amortiguador pH 3, 7 y 9 (Modificado de Holliday, 1961):

- Se preparó el medio mínimo según Holliday, 1961, para los 3 pH's.
- Para preparar Medio Mínimo pH 3 y pH7 se agregó ácido fosfórico 100mM, llevando al pH deseado con TRIS.
- Para el Medio Mínimo pH 9 se agrego TRIS 50mM y se llevó al pH deseado con ácido fosfórico al 85%
 - Otros Amortiguadores utilizados:
 - Amortiguador Carmody (Ac. bórico 0.2 M Ac. cítrico 0.05 M y fosfato trisodico 0.1 M)
 - Amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM)

8.2.5 Medio completo /MC/ (Holliday, 1961):

Se preparó con 2.5 g de caseína hidrolizada, 10 g de extracto de levadura, 1.5 g de nitrato de amonio, 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*, se llevó el pH a 7 y se llevó a un volumen total de 500 ml con agua destilada. En 500 ml de agua destilada se pesaron 10g de glucosa. Se esterilizaron ambas soluciones por separado en la autoclave y se mezcló volumen 1 a 1 al utilizarse.

8.3 Método de inducción de la miceliación de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995):

1. Se preparó un pre-inoculo de *U. maydis* en 15 ml de MC a 28°C en agitación constante durante 48h.
2. Se centrifugó este medio a 3000 rpm durante 5 min.
3. Se usaron estas células como inoculó para sembrar 250 ml de MC fresco, que se incubó a 28°C durante 18-20 h.
4. Se cosecharon las células y se lavaron por centrifugación a 3000 rpm dos veces con agua destilada estéril.
5. Se re-suspendieron en agua des-ionizada estéril al volumen original (250 ml) del inoculo e incubó a 28 °C en agitación por un tiempo mínimo de 2 h y máximo de 4h (estrés nutritivo).
6. Se centrifugaron las células a 3000 rpm durante 5 min, y se lavaron dos veces con agua des-ionizada estéril.
7. Se resuspendieron en agua des-ionizada estéril a un 10% de su volumen original (inoculo).
8. Se colocaron en baño de hielo por 15-30 min antes de su uso. Si no se utilizan en el momento se conservan hasta 48 h a 4 °C.
9. Los medios de cultivo para la inducción de la miceliación, MM pH3, MM pH 7 y MM pH 9, preparados como se mencionó anteriormente, se mantuvieron a 37 °C para dar un choque térmico a las levaduras.
10. Se inocularon aproximadamente 10^6 células por ml de medio de inducción. El cultivo se mantuvo en agitación a 28°C durante 14 h y 22h. Pasado el tiempo se centrifugó el

medio a 3000 rpm durante 5 min. y se guardó el sedimento celular a -80°C hasta realizar la extracción de ARN.

8.4 Determinación de la Curva de Crecimiento

- Se cultivó un pre-inoculo de *U. maydis*, tanto la cepa silvestre (FB2) como la mutante nula $\Delta Rim101$ (BMA) en 15 ml de MC a 28°C en agitación constante durante 48h.
- Pasadas las 48h se centrifugó a 3000 rpm durante 5min.
- Se desechó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 250ml de MC fresco y se incubaron a 28°C durante 24 h.
- Se realizó el método de inducción de la miceliación de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995) antes mencionado.
- Se inocularon 1000 cel/ml en Medio Mínimo a pH3, pH7, pH9, dependiendo del pH al cual se determinó la curva de crecimiento, y del amortiguadora utilizar, y se incubaron a 28°C. A partir de la hora 0 y a intervalos de tiempo se hizo el conteo celular.
- El conteo celular se realizó usando una cámara de Neubauer:
- Se tomaron 10 μ l del medio de cultivo y se realizo la lectura directamente, se aplicaron diluciones seriadas cuando el conteo celular supero las 300 células.
- Una vez determinada la curva de crecimiento se procedió a seleccionar la hora en la cual la concentración celular fuera mayor a 10^7 cel/ml. Esto se realizó tanto para la cepa FB2 como para la cepa BMA, a los cuatro pH's.

8.5 Obtención de Materia Genético

8.5.1 Extracción de ADN

El ADN fue obtenido usando un protocolo modificado de Barth y Gallardin (1996), que se describe a continuación:

1. Se inocularon 15 ml de medio MC y se incubó durante dos días, posteriormente se recuperaron las células centrifugando a 4,000 rpm durante 10 min.
2. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml. de agua bidestilada estéril, para re-suspender las células.
3. Se transfirieron a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min.
4. Se desechó el sobrenadante, se agregaron 500µl de amortiguador NTES (NaCl 0.1M, Tris·HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, SDS 1%) y se re-suspendieron las células.
5. Se incubó durante 5 min en baño de hielo.
6. Se agregó aproximadamente un volumen de 100µl de perlas de vidrio y se agitó vigorosamente durante 7 min.
7. Se agregaron 200 µl de amortiguador TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.5mM pH 8) pH 7.5.
8. Se centrifugó a 14,000rpm durante 10min a 4°C.
9. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 600µl de fenol: cloroformo, agitándose vigorosamente durante 1 min.
10. Se dejó reposar en hielo durante 1 min.
11. Se centrifugó a 14,000rpm durante 10min a 4°C.
12. Se recuperó la fase acuosa superior y se agregaron 2 vol. de isopropanol al 100%, incubándose por 30 min. a -20°C.

13. Se centrifugó a 14,000rpm durante 10min a 4°C.
14. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 vol. de etanol al 100%, centrifugándose a 14,000rpm durante 2min a 4°C.
15. Se agregaron 100µl etanol 70% y se centrifugó a 14,000rpm durante 2min. a 4°C.
16. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar, agregándose 40µl de amortiguador TE1X.

8.5.2 Extracción de ARN

El método de extracción de ARNm usado fue una modificación al método de Jones *et al.*, (1985), y se describe a continuación:

8.5.2.1 Preparación de Agua DEPC.

- 1.- Se incubó 1 L de agua MiliQ o bidestilada, con Dietilpirocarbonato (SIGMA, No. de catalogo D5758-25ML) a 37°C durante 24h.
- 2.- Se esterilizó a 121°C durante 15 min en un autovlave.

8.5.2.2 Preparación antes de la extracción de ARN:

Se realizó el método de inducción de la miceliación.

1. Se inocularon 250ml de M. Mínimo pH3, pH 7 o pH 9, y se incubó durante 16 y 22 h.
2. Pasado el tiempo, se cosecharon las levaduras, centrifugando el medio de cultivo a 3000 rpm durante 8 min.

8.5.2.3 Extracción de ARN modificado de Jones *et al.*, (1985):

1. Se congelaron las células con nitrógeno líquido y se trituró en un mortero hasta tener un polvo fino.
2. Se colocó el polvo en un tubo de 50 ml y se agregó 1 vol. de amortiguador NTES (NaCl 0.1M, Tris·HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, SDS 1%) y 1 vol. de fenol pH 8 (Sigma No. Catalogo P9346).
3. Se agitó vigorosamente e incubó por 5 min en hielo, posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm por 5 min. a 4°C
4. Se transfirió 1ml del sobrenadante a tubos de 1.5ml y se dejó incubar otros 5 min en hielo.
5. Se agregaron 200µl de cloroformo por cada ml de sobrenadante.
6. Se incubó 2 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C
7. Se recuperó la fase acuosa superior y se agregaron 1 vol. de isopropanol y 1 vol. de una solución de cloruro de sodio 0.8 M, citrato de sodio 1.2M, vol. 1/1, y se incubó 1 h a -20°C.
9. Se centrifugó a 10,000 rpm 10 min. y se desechó el sobrenadante dejándose secar el sedimento.
10. Se re-suspendió en 100µl de H₂O-DEPC
11. Se agregaron 50µl de acetato de litio 8M, incubándose a 4°C de 2 h a toda la noche.
12. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. a 4°C.
13. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente.
14. Se re-suspendió el sedimento en 100µl de H₂O-DEPC
15. Se agregaron 10µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µl de etanol absoluto frío.
16. Se incubó a -20°C de 30 min. a 1 h y se centrifugó a 14,000 rpm, 15 min. a 4°C.

17. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó 2 veces con 500 μ l de etanol 70%, agitándose vigorosamente y centrifugándose a 14,000 rpm por 15 min a 4°C.

18. Se dejó secar el sedimento y se re-suspendió en 50 μ l de H₂O-DEPC.

8.6 Digestión con DNAsa:

Para eliminar cualquier posible contaminación de nuestro ARN con ADN, se procedió a realizar una Digestión con DNAsa I (Marca UsBiological, No. de Catálogo D3200-02):

1. Se añadieron los siguientes reactivos:

- 10 μ l de amortiguador DNAsa I 10X (Tris-Cloro 10mM, MgCl₂ 0.625mM, CaCl₂ 0.025mM).
- 75 μ l de Agua sin nucleasas (ajustable a la concentración de ARN).
- 20 μ g de ARN (20 μ g) (Volumen variable)
- 5 μ l de DNAsa I (2U μ l)

2. Se incubó a 37°C durante 30min.

6. Se calentó la muestra a 70°C por 5 min.

7. Se dejó enfriar en hielo (Choque frío) y se guardó a -80°C.

8.7 Gel de electroforesis desnaturalizante:

1. Se pesaron 1.5 g de agarosa y se disolvieron en 80ml de agua DEPC, se agregaron 10 ml de amortiguador MOPS (Acido 3-(N-morfolino) propano sulfonico) 10X (Mops 400mM, acetato de sodio 100mM y EDTA pH8 10mM) y formaldehido al 1%.
2. Se vació en el molde y se dejo enfriar.
3. Se preparó la muestra de la siguiente forma:

Reactivo	Volumen
Formamida desionizada	7.5 µl
MOPS 10X	1.5 µl
Formaldehido	2.4 µl
Agua DEPC*	3.6 µl
ARN (3µg)	15 µl
Volumen Final	30 µl

*Volumen ajustable a la concentración d el RNA

4. Se incubó durante 5 min. a 65°C y se dejo enfriar en hielo.
5. Se agregaron 5µl de amortiguador de carga (6X) y 1µl de bromuro de etidio (10mg/ml) y se aplico una corriente de 70 Volts durante 40 min.

8.8 Gradiente de temperaturas de alineamiento para eficientar el PCR

Se realizó la siguiente mezcla de PCR:

Reactivo	Volumen
Amortiguador de PCR 10X	2.5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Oligonucleótido Sentido (200ng/µl)	0.5 µl
Oligonucleótido Anti-Sentido (200ng/µl)	0.5 µl
Polimerasa 5U/µl	0.5 µl
ADN (200ng)	2 µl
Agua	16 µl
Volumen Final	25 µl

Se utilizó el siguiente programa de PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	1 min	30
*	1 min	
72°C	1 min	
72°C	4 min	1

*Ver tabla para la temperatura de cada oligonucleótido

Se añadieron las muestras a un gel de agarosa al 2%, se sometió durante 40 min a una corriente de 80 Volts.

8.9 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Para analizar micromatrices se requiere un ARN de alta calidad para la síntesis y marcaje del ADNc, por lo que se realizó una reacción de RT-PCR usando el kit I-script One-Step RT-PCR kit (No. De Catalogo: 170-8894).

Reactivo	Volumen
RT-PCR amortiguador 2X	25 µl
Oligonucleótido Sentido	1 µl
Oligonucleótido Anti-Sentido	1 µl
Agua Libre de Nucleasas	17ul
ARN (1µg) *	5ul
Transcriptasa reversa iScript	1 µl
Volumen final	50 µl

Se utilizó el siguiente programa:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1.-Síntesis de ADNc	50°C	10 min	1
2.-Inactivación de la Transcriptasa reversa	95°C	5 min	1
3.-Desnaturalización	95°C	1 min	30
4.-Alineamiento	50°C*	1 min	
5.- Extensión	72°C	1 min	
6.- Extensión final	72°C	4min	1

*Varía dependiendo de la temperatura media del oligonucleótido,

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados y su temperatura de alineamiento.

Id	Sentido (5' – 3')	Antisentido (5' – 3')	Tamaño	Tm°C
um03347	TGCCAAGAAGGACGACACCG	CGACACGAGTTGCTTTGGGC	131	55.4
um03366	GGTTGGCAGATTGAAGAGGG	GTAGTGCTTACGGATGAGCG	186	54.9
um04335	CTGCGTCTGTGGGAGAAAGG	TTGAGCGGCAGACCAAATGG	173	57.6
um04187	TTATGAAGACTTGCCCCGCC	GTAGACTTCCACGCCCAACG	194	56.3
um02416	AGCGTCACAGGCACAAGGAG	GGGCTGGGAGATGTTATGGGC	101	54.7
um11438	GCGTCTGACGATGGGCACCC	CGCTCCGCTGCTTGCTAG	154	55.3
um03412	ACAATTCATCCACCCAGCGGG	ACCGAACTCTTCCCTGTGC	198	53.9
um10215	GCGGAGATTCTCACATGGGGG	GCACGCTGGTAGTTGATCCG	108	55.2
um01742	AGAATGGTACTGGGCGAAAC	CCATACTCATCCCTTACACT	107	51.4
um06255	GGGTTCGGGTGTGCCAACG	ACCGCAGCATCACCAACC	210	61.4
um10690	AGCCTCGGAGCTTGACTTTC	GACTGCCTGGTCGATCTCAC	109	53.9
um01165	GGCTATTGGTCCGCAGGTCC	CGTTGAGACCCGAGTGAGCC	190	52.2
um02175	TTCGTCGAGCCGTATGTGCG	GCGGGAGGTAGTGATGACGC	128	53.5
um05781	AGGGGCGAACGTGAATCAGC	TGTTGGAACGGGGCAAGTGG	109	56.6
um10529	GCGAGCAGCAGGACCGATTC	GGGTGCCACTCGACGTTGTTG	135	62.2
um11028	GCAAGCCC GCCAGGAAGTGC	GCCCAAACCTCGTACCTTCTGCCC	169	56.3
um05167	CTCTTCCTGCTGCCGTTCCCC	AGGTGATGTGCTGACGAGGC	129	55.5
um00119	CCCAGAGATCGGCAAGGC	GCAGCACCCAGTCTGTGACC	120	55.1
um03917	GACGAACCAGTTGGCGAGCGG	TCCCTTGCTGATGCGGATTCCACG	137	57.3
um00620	CAACGACCGTCGGCAATGGG	GCAAACCTTCGAGTTCGGC	151	53.5
um04372	ATTCGACGCTGAGGCTGC	TGCCACCGTACACGCTCTGC	138	64
um04658	GGCACCTTGATGGAACCCCC	ACCAAGCCACCTGTGCGACC	192	60.8
um03167	CATCGGCGTGAGGCAGTCC	CGGCGGGATGTGTAGGTGCG	153	65.2
um04835	TCTGCCAGCAACGCCTCG	AGCTGAGACGAATGCCGCCG	227	56.4
Oligonucleotidos para PCR tiempo Real				
um00119-Q	CTAATCTACTTCATCGCTGGGTC	TCGCCGTAGAACAATAGTGC	77	55.1
um11028-Q	TTGCTCAAGACAGGCATCAC	ATGTTGTGCATCATGCTCGT	119	60
um11927-Q	TGCTCGATCCGTGCGGTGC	TGTTGGGTGGGCGATTTCTGAGC	195	60.1
um05068-Q	CGGGTTTTTCATACGGCTTCGGC	CCCTTGATATGCTGGCACACGC	125	60
um05167-Q	CTCTTCCTGCTGCCGTTCCCC	AGGTGATGTGCTGACGAGGC	129	60
um04352-Q	TCAAGTCGATTCTCAGAAGGC	TGAAGAGCAAAAAGTGACGG	126	60
um03917-Q	GACGAACCAGTTGGCGAGCGG	TCCCTTGCTGATGCGGATTCCACG	137	60
um10690-Q	AGCCTCGGAGCTTGACTTTC	GACTGCCTGGTCGATCTCAC	109	60
um04047-Q	CGACGACGCAAGCAACCGC	TCGCCACGTTTCGAGCCACG	244	60
um06470-Q	GGCAACTCGTTCTCGCTTAC	AAAGATCCGTGGTGAAGGTG	187	60
um11588-Q	TGCTTCTCGCCATGTAATTC	CTGAGCCAGTGTAGATTGATCC	164	60
um04625-Q	CATGAGGACAAGAGCTAGGAAG	GACACAGTAGAACAGACCGAG	136	60

Oligonucleotidos para realizar mutaciones

um01165-P	TAGGGATAACAGGGTAATT CTTGTTTGAAGCCAGATCG	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATATTGACGATGAAGGGAATGC	1000	60
um01165-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTAATTTGGCAATCGAATCAACG	ATTACCCTGTTATCCCTATG CTAAGACGACAGCACTGG	1000	60
um01742-P	TAGGGATAACAGGGTAATCT TTGCCTTTGTCCATTTGC	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATACCTTGATCGTGTTTCCTTCG	1000	60
um01742-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTAGTGACGATCACGAGAACTGG	ATTACCCTGTTATCCCTATATG GTGGTCAGCTCAGTGG	1000	60
um02175-P	TAGGGATAACAGGGTAATAC GAGCACCAAGAGTGAAGC	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATGCGTTACTAGTGGCAATTTGG	1000	60
um02175-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTATTGTTGCCCTCCCTACAAGC	ATTACCCTGTTATCCCTAG GTTGTCGATGTTCTTGTGC	1000	60
um11028-P	TAGGGATAACAGGGTAAT G GACAGCTCGTCAAGGTACG	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATTTCATCCATCATAGCGAGTGC	1000	60
um11028-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTATCGTTATTCTGACGCTTTTCG	ATTACCCTGTTATCCCTAT CTGTGCCCTTCTTTCCACC	1000	60
um06255-P	TAGGGATAACAGGGTAATAC GATGTGGGATTGTCTTCG	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATTGTGGTGAAGAAAGGGAAGC	1000	60
um06255-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTATGCCATTTGTGAAAACAAGC	ATTACCCTGTTATCCCTAC CTTCGTTCTCCTCTTCTGC	1000	60
um03347-P	TAGGGATAACAGGGTAATG CTGCTTGCGCAAGTGTATT	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATTATCGTATCGAATGCGGACA	1000	60
um03347-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTATGCAAGTGCAAAGCAAATC	ATTACCCTGTTATCCCTAAG ATTTCGCAAAGCTCGAAAG	1000	60
um03996-P	TAGGGATAACAGGGTAATTG GACTGGAGAACGATTTGC	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTATGGAAAGGTGGTAGGATGTGG	1000	60
um03996-T	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTACACACCACAACATTCCAAGC	ATTACCCTGTTATCCCTATG GACGACTGATTGGTTACG	1000	60

8.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa

(RT-PCR en tiempo real).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el ARN, usando la técnica qRT-PCR, y se utilizó el equipo Bio-Rad y el qRT-PCR Master Mix SYBR Green kit (Agilent Cat. No. 00886). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes (Ver Tabla 2, sección Oligonucleotidos para qRT-PCR), cuyas secuencias nucleotidicas se obtuvieron de aquellas depositadas en la Base de datos de MUMDB (Ver más adelante).

Se utilizó un volumen de muestra de 25µl, conteniendo lo siguiente: Master Mix PCR SYBR Green a una concentración de 1X, 200 ng de cada oligonucleótido específico, 100 ng de ARN total (templado), 1 µl de DTT 100mM, y 1 µl de enzima (RT/RNase Block). Se

analizaron las muestras por triplicado. Todos los ensayos utilizaron el siguiente programa: 95°C por 10 min, 94°por 15 seg, temperatura específica de alineamiento por 50 seg por 40 ciclos. La cuantificación relativa se realizo mediante el método de ΔC_T usando el gen UM03049 como el gen de referencia, cuya expresión fue constante en nuestras condiciones.

8.10 Micromatrices y análisis bio-informáticos

Se usó el servicio externo de “Nimblegene Technologies” de Roche, para obtener y marcar con una sonda fluorescente el ADNc a partir del ARN obtenido en las condiciones descritas que se usaron para su hibridación contra una micromatriz diseñada por el Prof. Scott Gold (University of Georgia). La compañía posee un sistema llamado 4-plex que consta de una micromatriz con 4 módulos conteniendo cada una, sondas de oligonucleótidos de 24 pb de todos los genes de *Ustilago maydis*, asegurando que cada gen se encuentre cubierto por 5 sondas nucleotídicas a lo largo de su secuencia. Esto garantiza que se produzcan al menos 10 diferentes datos independientes de concentración de ARNm. Los datos enviados por la compañía Nimblegen, fueron analizados usando el programa Arraystar V. 5 (Compañía DNASTAR). Los parámetros usados para filtrar los genes identificados en el presente trabajo fueron: 1) Un aumento del doble de la expresión relativa del gen entre las cepas silvestre/mutante. 2) Un Z-score superior a 1.5, usando una T-student <0.05 como límite.

Para corroborar la calidad del ARN, así como para realizar posteriores análisis, se diseñaron oligonucleótidos contra el gen de actina, como control de expresión contante, y contra genes cuya expresión variaba en los análisis bio-informáticos de las Micromatrices. Se obtuvo la secuencia nucleotídica de NCBI o de MUMDB; posteriormente se utilizó el

programa “Primer 3 Plus” para seleccionar oligonucleótidos, y el programa “Oligo Analyzer” para analizar los parámetros de ΔG y formación de horquillas. El programa Primer-Blast del NCBI se utilizó para analizar probables amplificaciones inespecíficas en el genoma o transcriptoma de *U. maydis*.

Tabla 3. Programas Bio-informáticos.

Base de datos	Liga	Descripción
Base de datos de <i>U. maydis</i> de Munich MUMDB	http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago	Obtener secuencias aminoácidas y nucleotídicas,
Blast del NCBI	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/	Asignar funciones a los genes
pFam	http://pfam.sanger.ac.uk/	
UNIPROT	http://www.uniprot.org/	
Interpro	http://www.ebi.ac.uk/interpro/	
FUNCATDB del MUMDB	http://mips.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/proj/funcatDB/search_advanced.pl?gene=2	Correlacionar genes a rutas metabólicas
Yeastrack	http://www.yeasttract.com	Análisis de promotor
IDT oligoanalyzer	https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/	Análisis de ΔG
PrimerBlast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Alineamientos múltiples contra el genoma o transcriptoma del organismo
Primer3 Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/	Análisis de Temperatura media y diseño de oligonucleótidos.

Tabla 4. Especificaciones para el diseño de oligonucleótidos

Parámetro	Especificación
Tamaño	17 a 25 pb
% GC	40 a un 60%
ΔG	Homodimerización Min: -6 Heterodimerización Min: -6
Temperatura de Formación de Horquillas	Igual o menor a 40°C
Tamaño del amplicon	150 a 250pb

8.11 Método de Deleción de Genes (DELSGATE; García-Pedrajasa et al., 2007)

Se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 2, para amplificar la región promotora y terminadora de los genes seleccionaes, los cuales amplifican 1000pb. Los fragmentos amplificados se combinaron, y se purificaron usando el kit de Qiagen.

La reacción de recombinación homologa se realizo de la siguiente manera:

- Amplicones purificados (15-250ng) 1 – 7 μ l*
- Vector pDONRHyg (100 ng/ μ l) 1 μ l
- Amortiguador TE pH 8.0 (Tris 10 mM-EDTA 1mM) llevar a 8 μ l
- Clonase II 2 μ l

*El incremento en los amplicones generalmente resulta en una mayo cantidad de colonias, no exceder mas de 300ng por cada 10 μ l.

Incubar toda la noche a 25°C (Puede ser reducido a 1 h)

Para finalizar la reacción añadir 1 μ l de proteinasa K, incubar 10 min a 37°C.

8.11.1 Transformación de Escherichia coli cepa DH5 α .

- Tomar 5 μ l de la reacción de recombinación y añadir a 50 μ l de células competentes DH5 α , incubar por 30 min en hielo
- Someter por 1 min a 42°C, posteriormente enfriar en hielo y añadir 500 μ l de Cultivo LB, incubando por 1 hora a 37°C.
- Transferir todo el volumen a placas LB, con ampicilina (100ng/ μ l), incubar toda la noche a 37°C.

- Seleccionar colonias, e inocularlas en 5 ml de medio LB, cultivadas por 16 h de incubación a 37°C.

8.11.2 Método de lisis alcalina (Sambroock *et al.*, 1982).

- Se centrifugaron 3 ml de cultivo de bacterias en LB.
- Se resuspendieron las células en 200 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris·HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM), se agitó brevemente.
- Se agregaron 400 µl de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min.
- Se agregaron 300 µl de solución III (acetato de potasio 5M, ácido acético 11% , pH 4.8), se agitó vigorosamente.
- Se incubó en hielo por 15 min.
- Se centrifugaron por 10 min a 4 °C DNA, el sobrenadante se recuperó, y se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se colocaron a -20 °C durante 15 min.
- Se centrifugaron a 15,000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se resuspendió el precipitado en 40 µl de agua estéril o regulador TE.

8.11.3 Corroboración de construcciones

Se corroboraron mediante un análisis de PCR, amplificando los insertos de la región 5' y 3', /yo mediante un análisis de restricción, descrito a continuación:

Realizar la siguiente mezcla:

- Plasmido 5µl
- Buffer de la enzima 10X 2 µl
- Enzima Pst1 (15U/µl) 1 µl
- Agua MiliQ 12 µl

Incubar durante 1 hora a 37°C y se colocaron las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, se aplicó corriente de 80 V durante 40 min.

9. RESULTADOS

9.1 Estandarización de métodos experimentales: Selección de Fuente de Nitrógeno, Diseño de Amortiguador y Curva de Crecimiento

Los análisis de expresión génica nos permiten analizar los genes involucrados en la adaptación a una condición dada; en el presente proyecto nos enfocamos a analizar los mecanismos de adaptación del crecimiento a pH alcalino o a pH extremo, que están bajo el control de la vía Pal/Rim. Para determinar las condiciones más adecuadas para este fin, y los cambios en el crecimiento de las cepas silvestre y mutante dependiendo del pH del medio de cultivo, se usó el Medio Mínimo, variando el pH. Referente a la fuente de nitrógeno, ya que se utilizó nitrato de amonio a pH ácido o nitrato de potasio a pH neutro, se procedió a analizar como el cambio en la fuente de nitrógeno afectaba el pH del medio de cultivo, probando 4 fuentes de nitrógeno: nitrato de potasio, urea, sulfato de amonio y nitrato de amonio. Se analizó la capacidad de las dos cepas para crecer con estas fuentes de nitrógeno y la estabilidad del pH del medio en un periodo de 24 h (Figura 3). De las 4 fuentes de nitrógeno, se optó por utilizar el nitrato de potasio, debido a su capacidad por mantener el pH 7 hasta las 24 h de crecimiento. La selección de un medio de cultivo único nos llevó a diseñar un amortiguador con capacidad de amortiguar cambios de pH con valores de 3, 7 y 9

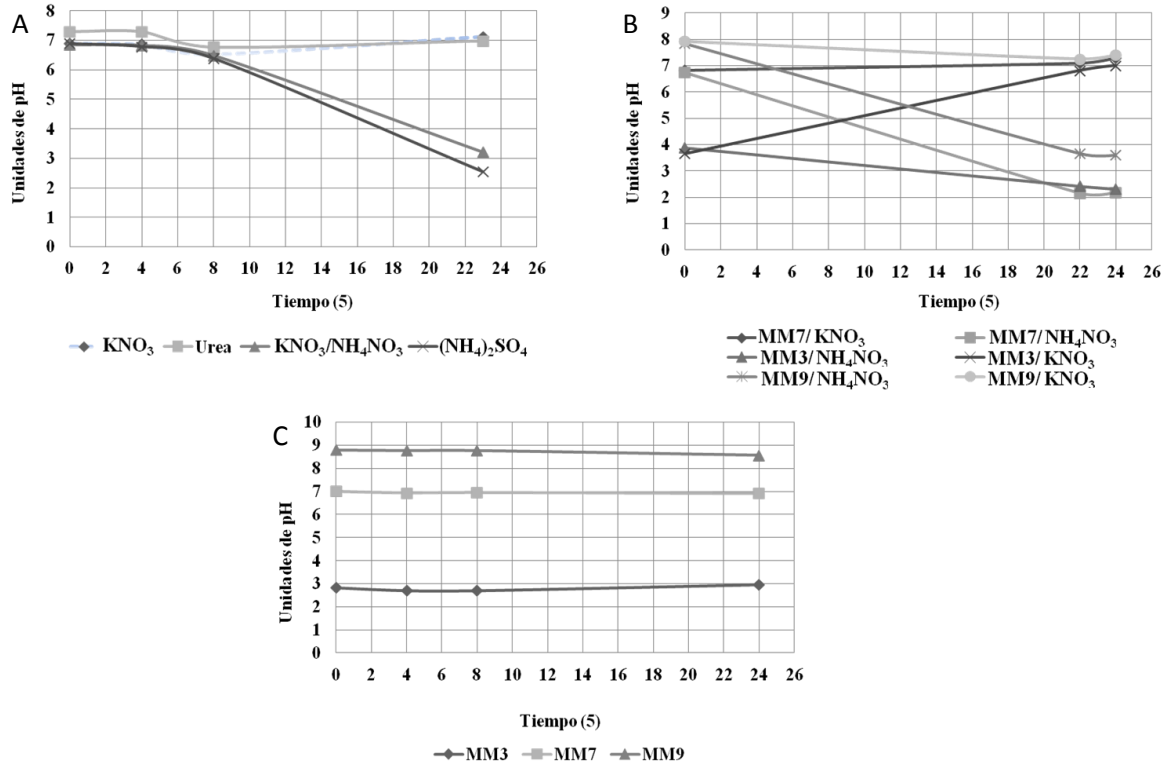


Figura 3. Selección de fuente de nitrógeno y prueba de amortiguador. A) Variabilidad del pH en el medio de crecimiento utilizando distintas fuentes de nitrógeno. B) Nitrato de amonio y nitrato de potasio. C) Prueba de estabilidad del amortiguador Carmody a los 3 pH's seleccionados con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno.

Analizamos diferentes tipos de amortiguadores: amortiguador Carmody, Ac. cítrico/H₃PO₄, Tris/H₃PO₄, amortiguador de citrato (Ac. cítrico/fosfato de sodio) y amortiguador PBS. Analizamos la capacidad de la célula para metabolizar los componentes del amortiguador, determinando la poca capacidad del amortiguador de citrato de amortiguar a pH 9. El amortiguador PBS que fue utilizado por *U. maydis* como fuente de nitrógeno, mostro capacidad para usar al ácido cítrico del amortiguador como fuente de carbono mientras que en el medio de cultivo con amortiguador Carmody, no fue así. Se selecciono el uso de H₃PO₄, ya que presenta valores de pKa de 2.12, 7.21 y 12.67, esto quiere decir que amortigua a pH 3, y 7 mientras que el Tris presenta actividad

amortiguadora a pH 9, con un pKa de 8.06 (Figura 4). Los pKa's antes mencionados proporcionan la ventaja de amortiguar el pH en los valores 3, 7 y 9. A una concentración de H₃PO₄ de a 200mM y Tris a 50mM el pH se mantuvo estable durante 24 horas hasta alcanzar una concentración celular de 10⁸ cel/ml a pH 9.

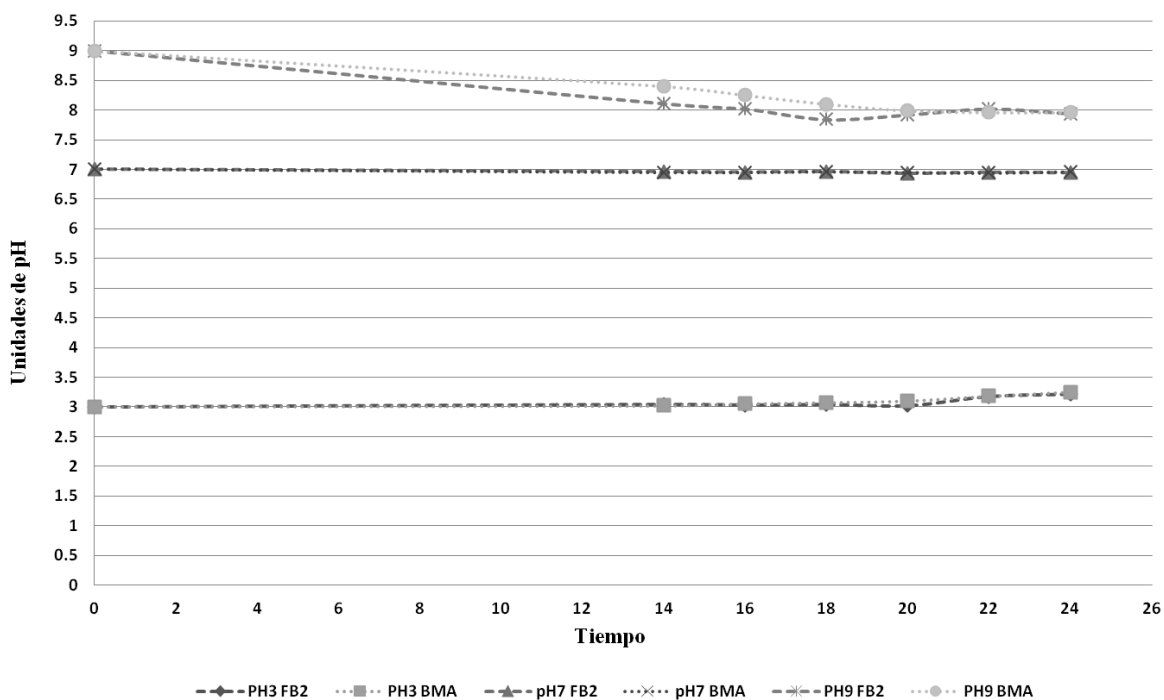


Figura 4. Estabilidad del pH durante el crecimiento de las cepas FB2 y BMA2 de *Ustilago maydis*. Registro de la variación del pH del medio utilizando el amortiguador Tris/H₃PO₄.

9.2 Curva de crecimiento

Una vez seleccionadas las características del medio de cultivo y amortiguador, se determinó el crecimiento de las cepas a pH 3, pH 7 y pH 9 (Figura 5), permitiéndonos localizar los tiempos en los cuales el nivel de crecimiento entre las cepas en las 3 condiciones eran similares, seleccionando dos puntos, uno en la fase logarítmica y otro cuando se encontraba saliendo de la fase exponencial a las 14 h con una concentración celular de 3×10^7 cel/ml y 22 h, con una concentración celular de 10^8 .

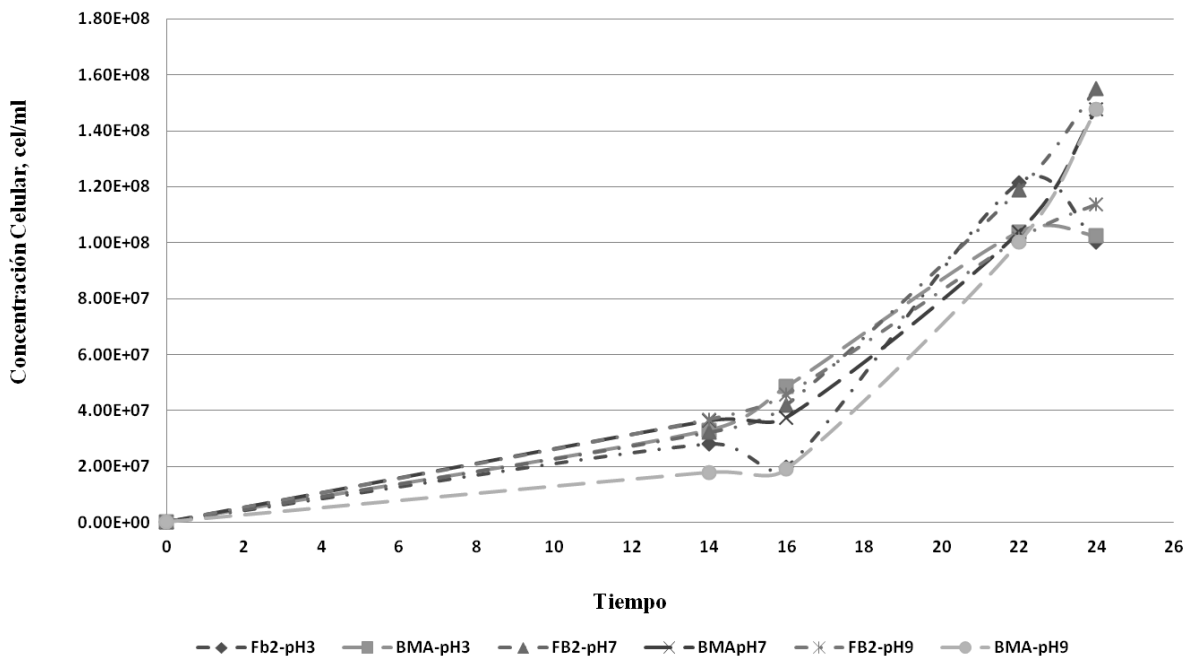
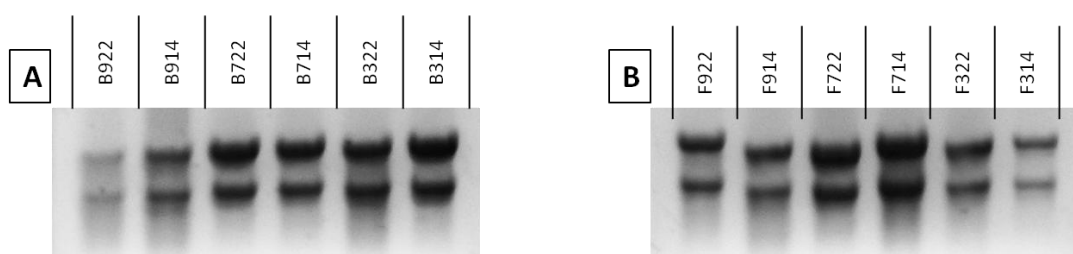


Figura 5. Crecimiento de cepas silvestre y mutante en diferentes valores de pH. Curva de crecimiento final, se analizaron las horas 14, 16, 22 y 24, derivado de curvas de crecimiento anteriores. La concentración celular se encuentra en cel/ml, el tiempo es medido en horas.

9.3 Calidad del ARN extraído a diferentes tiempos

A fin de comprobar la calidad y concentración del ARNm, se determinaron la movilidad en electroforesis, y los valores de pureza mediante el cociente de absorción de luz a 260/280 y 260/230, obteniendo los resultados presentados en la Figura 6. Se observan las bandas 18s y 26S del ARN ribosomal, con valores superiores a 1ug/ul. La Tabla de la figura 6 muestra los datos de los cocientes de absorción 260/280 y 260/230. Estos datos indican un ARN de alta calidad, bajo en sales y proteínas contaminantes.



Muestra	Concentración	Cantidad Aproximada Cargada	Calidad	
			260/230	260/280
F922	1 µg/µl	10µg	2.06	2.58
F914	1 µg/µl	10µg	2.18	2.35
F722	1 µg/µl	10µg	2.13	2.21
F714	1 µg/µl	10µg	2.13	2.16
F322	1 µg/µl	10µg	2.1	1.98
F314	1 µg/µl	10µg	2.15	2.39
B922	1 µg/µl	10µg	2.12	2.28
B914	1 µg/µl	10µg	2.12	2.53
B722	1 µg/µl	10µg	2.07	2.53
B714	1 µg/µl	10µg	2.12	2.14
B322	1 µg/µl	10µg	2.02	2.13
B314	1 µg/µl	10µg	2.17	2.48

Figura 6. Calidad y concentración del RNA extraído. A) Gel desnaturalizante usando amortiguador MOPS y TAE de muestras de ARN de la mutante Δ rim101. B) Gel desnaturalizante usando amortiguador MOPS y TAE de muestras de ARN de la cepa silvestre de *U. maydis*. La Tabla muestra los datos de concentración de cada ARN de cada muestra, y los parámetros de pureza y concentración aproximada de cada muestra en cada carril. Las claves significan: La letra F corresponde a la cepa, FB2 y la B a la cepa BMA, el segundo número es el pH, y los últimos dos números es la hora a la cual se obtuvo el cultivo.

Para confirmar la integridad y pureza del ARN, se realizaron reacciones de RT-PCR de un solo paso (ver Material y Métodos) para el gen de actina. La Figura 7 muestra una banda de aproximadamente 230pb, en aquellas muestras tratadas con DNAsa, corroborando que se encuentra libre de ADN.

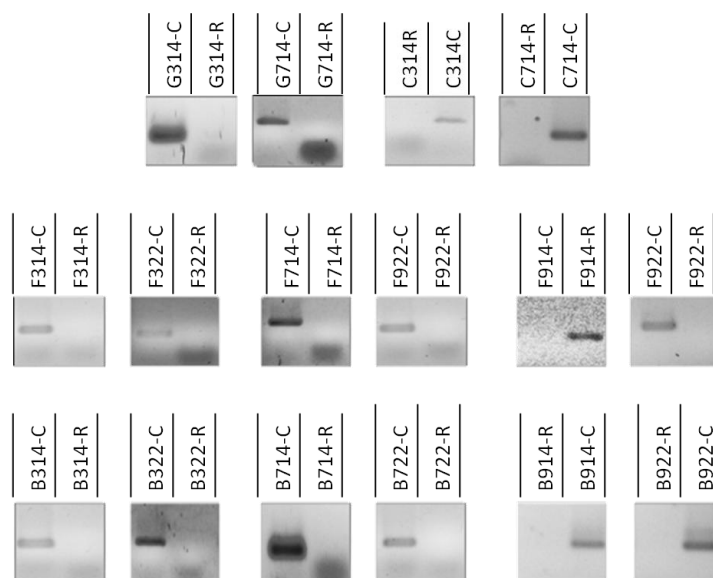


Figura 7. Control de amplificación. Retro amplificación de una porción de 230 pb del transcrito de actina, mostrando la ausencia de ADN en las muestras de ARN. La letra C al final de cada muestra indica que solo el ADNc se está usando como molde para nuestra reacción de PCR, la letra R indica que ARN se está usando como molde para nuestra reacción de PCR.

9.4 Resultados del análisis de la expresión de genes mediante el uso de Micromatrices

9.4.1 Análisis de las Micromatrices

Analizamos los patrones de expresión diferencial de genes con el fin de analizar los mecanismos de adaptación a los pH's correspondientes. Estos análisis permitieron identificar los genes expresados diferencialmente en cada pH, mostrando niveles de regulación en los 3 pH's siendo sobre-regulados o reprimidos en base a la cepa silvestre (Tabla 5). Se observa una variación aparente en la actividad regulatoria, siendo a pH 3 una actividad, aparentemente represora, sobre-regulando 262, mientras se reprimen 446, a pH 7 actividad regulatoria, debido a que el número de genes sobre-regulados y reprimidos es similar, y a pH 9 una actividad de sobre-regulación.

Tabla 5. Genes Totales regulados por Rim101p, en distintos pH's

	Sobre-regulados	Reprimidos
pH3	262	446
PH7	275	297
pH9	788	637

Nos enfocamos a analizar el papel de la vía Pal/Pac en la expresión génica a un pH alcalino (pH 9), debido al poco conocimiento de los genes que son regulados directamente por Rim101/PacC a este pH. Para ello basándonos en descripciones previas sobre diversos hongos, nos enfocamos a analizar aquellos involucrados en las rutas de secreción de proteasas y polisacáridos, resistencia al estrés iónico, sistemas vacuolares y de endosomas, estabilidad de la membrana y la pared celular, así como los mecanismos de regulación, como factores transcripcionales, y cinasas.

9.4.2 Análisis de la regulación de la expresión génica a pH 9

Para identificar los genes regulados por el factor transcripcional Rim101/PacC en las *U. maydis*, se procedió a determinar la diferencia en la expresión de genes entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta rim101$. Para ello, se cultivaron ambas en medio con amortiguador a pH 9 por 14 h. Se observó, que tal y como fue descrito previamente (Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005), las células de la mutante presentaron deformidades en la deposición de los septos, en la deposición de quitina, anomalías celulares e incremento en el tamaño celular (ver Figura 8). La de crecimiento a pH 9 demostró que la cepa silvestre tenía una mayor tasa de crecimiento, comparada con la cepa mutante (ver Figura 5).

Los análisis de los datos de los microarreglos obtenidos (ver Materiales y Métodos) permitió la identificación de 1,425 genes expresados diferencialmente (GED's) entre la silvestre y la mutante. De ellos, 637 fueron regulados negativamente, y 788 lo fueron positivamente en la cepa silvestre. Consideramos, según se señala en la sección de Materiales y Métodos, que los genes regulados positivamente en la cepa silvestre, son genes que están regulados positivamente por el factor de transcripción Rim101/PacC, y que aquellos regulados negativamente, están bajo una regulación negativa por Rim101/PacC.

Debido a la cantidad de GED's identificados, seleccionamos genes representativos cuyas funciones explicasen la adaptación del hongo a un pH alcalino mediante la función de la vía Pal/Rim, basándonos en publicaciones previas sobre las alteraciones fenotípicas observadas en las mutantes $\Delta rim101/pacC$ de diversas especies de hongos, incluyendo a *U. maydis*. De acuerdo con este concepto, nos enfocamos en rutas celulares que pudiesen explicar dichas alteraciones fenotípicas. Para distinguir aquellos genes que fuesen

regulados directamente por Rim101/PacC, se determinó la presencia del probable sitio de unión de Rim101 en su región reguladora (ver Material y Métodos).

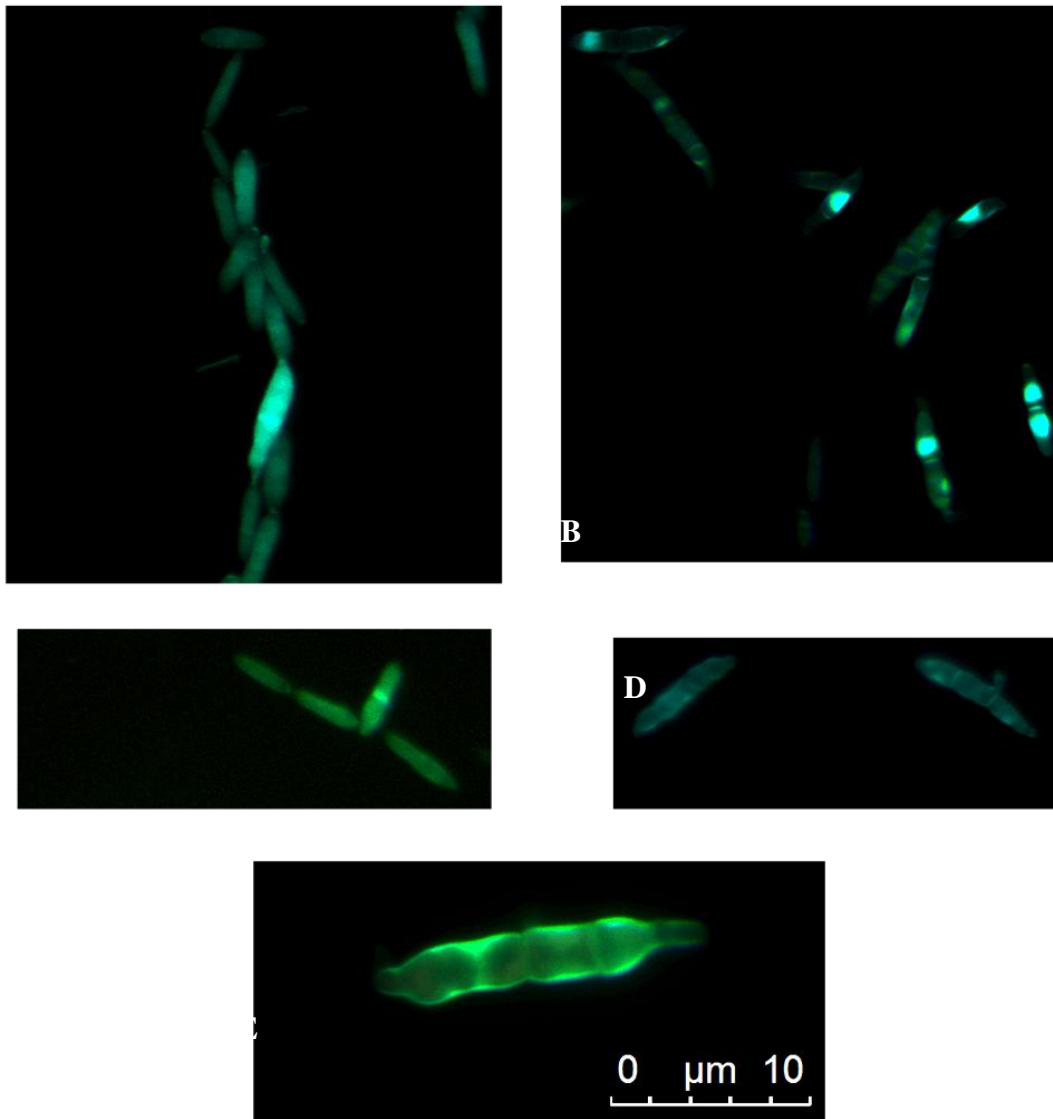


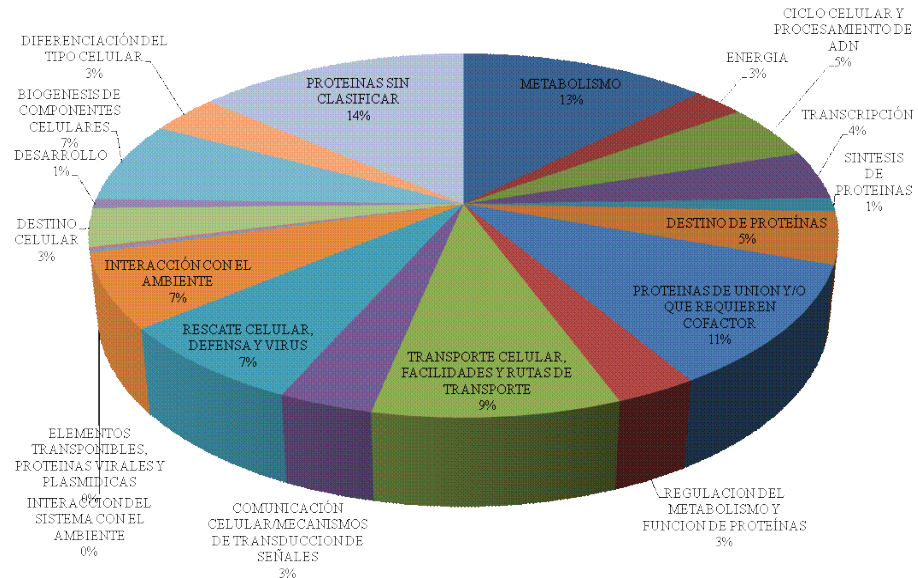
Figura 8. Morfología y deposición de quitina en células de las cepas silvestre y mutante $\Delta rim101$ de *U. maydis*. Las células fueron crecidas a pH 9 por 14h. A-D, 40X; E, 100X. A, C, cepa silvestre; B, D, E, cepa mutante nula $\Delta rim101$.

9.5 Respuesta Genómica.

9.5.1 Efectos fisiológicos de respuesta a pH alcalino.

La respuesta fisiológica de *U. maydis* al pH alcalino se muestra de manera global en la Figura 13. En ella se muestra la clasificación funcional de los genes regulados diferencialmente por la vía Pal/Rim, clasificación según MIPS FunCat de MUMDB (Ver Material y Métodos). De acuerdo con estos datos, se puede sugerir que Rim101/PacCp regula una respuesta metabólica general a nivel celular.

A



B

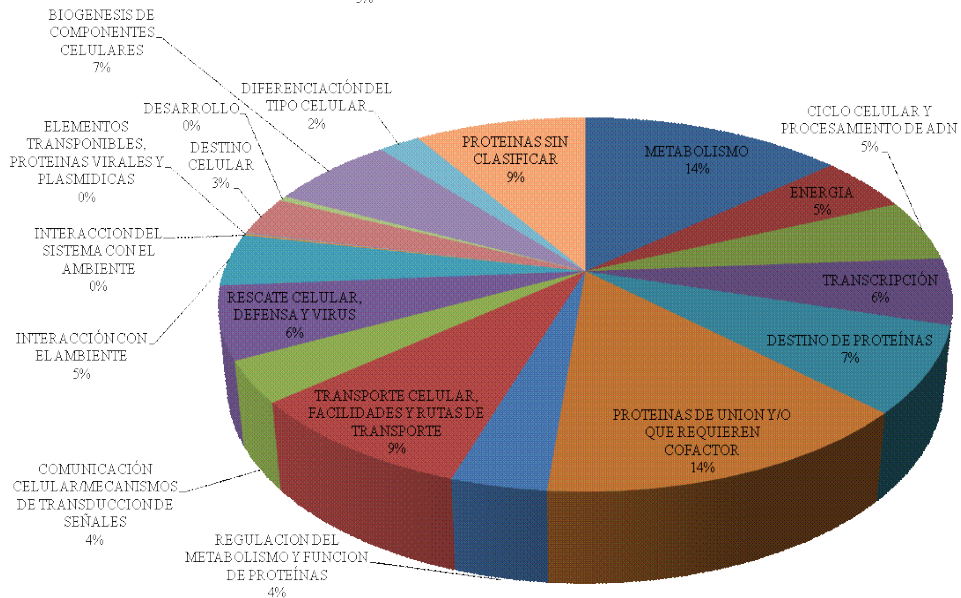


Figura 9. Clasificación funcional de genes regulados diferencialmente por Rim101/Pc A) Rutas generales reguladas positivamente por Rim101p, B) Rutas generales reguladas negativamente por Rim101p al crecer en MM a pH 9.

9.5.1.1 Regulación de mecanismos Transporte.

Una de las reacciones de la célula al enfrentarse a un pH alcalino debe ser el ajustar una parte del sistema de transporte de proteínas a través de del sistema de flujo membranal, como se deduce de la existencia de genes regulados negativamente como *SEC3* y genes involucrados en la exocitosis como um11485 y um11219 (Tabla 6). También nuestros análisis revelaron la regulación positiva de genes involucrados en el transporte celular interno, y genes involucrados en el sistema de transporte de Golgi a vacuolas o vesículas. Estos resultados se muestran en las Tablas 6 y 7, y proporcionan indicios sobre las relaciones de los complejos de reacomodo del endosoma requeridos para el transporte, específicamente la ruta ESCRT, debido a la regulación negativa de genes homólogos a Bro1p de *S. cerevisiae* (Tabla 6; Tilburn *et al.*, 2005) y del probable homólogo del gen PalCp (um04392), miembro de la ruta Pal/Rim (Tabla 6).

Tabla 6. Regulación del transporte celular.

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um03468	Probable función en endocitosis, Familia Sur7/PalI	3.0	1
um00505	<i>BRO1</i> – Proteína vacuolar citoplásmica clase E	-2.2	6
um04392	<i>PALC</i> – regulador de respuesta a pH	-4.2	3
um02077	<i>SNF7</i> - Vacuola/Lisosoma	-3.1	2
um02974	<i>AUT4</i> - Lisis de vesículas autofágicas dentro de vacuolas	6.9	4
um01058	<i>APS3</i> - Involucrado en la clasificación vacuolar de proteína	2.9	4
um10316	<i>VAM6/VPS39</i> -Involucrado en la morfogénesis vacuolar	-2.9	0
um02021	<i>RTM1</i> - Familia exportadora translocadora de lípidos	4.3	5
um00082	<i>SEC3</i> - Marcador de lugar para secreción	-24.0	1
um04173	<i>COPI</i> - Cadena alfa del complejo de recubrimiento	-2.5	2
um11219	<i>TLG2</i> – Miembro de la familia syntaxina de las t-snares	-2.1	0
um02476	Subunidad Delta de Recubrimiento	-2.8	3
um10102	<i>SLY1</i> - Trafico vesicular entre RE y Golgi.	-2.6	5
um10449	<i>STF2</i> - Proteína transportadora de vesícula de RE a Golgi	3.0	2
um11485	Proteína SNARE del compartimiento de Golgi	-2.5	3

Tabla 7. Regulación del Transporte

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Regulación del transporte		
um05684	Cistinosina	2.7
um11433	Transportador de equilibrio de nucleótidos 1	2.6
um01628	<i>BET1</i> - Transporte vesicular entre ER y Golgi	2.5
um03580	Anexina XIV	2.5
um11937	<i>APSI</i> - Involucrado en la clasificación del TGN ^{\$}	2.4
um02483	Proteína de membrana reconociendo el objetivo en el trafico Vesicular	2.2
um04896	Transportador Vesicular entre RE y Golgi	2.2
um11312	Subunidad del complejo TRAPP, acoplamiento y fusión vesicular entre ER y Golgi	2.1
um12184	Proteína Vacuolar de membrana. Dominio Fasciclina	2
um03655	<i>VTC1</i> - Involved in membrane trafficking	2
um10988	<i>AP17</i> - Clatrina, Proteína de recubrimiento de ensamblaje	2
um12318	Glicoproteína de envoltura	-2
um04959	<i>BCH1</i> – Involucrada en el transporte de trans-Golgi	-2
um02378	<i>SEC24C</i> – Transportador de Proteínas	-2.1
um04225	Componente 4 del complejo Conservado oligomérico de Golgi	-2.1
um05404	Componente 3 del complejo Conservado oligomérico de Golgi	-2.1
um01405	Regulación de la endocitosis	-2.1
um05471	<i>ISA2</i> – Clúster de ensamblaje de Hierro-Sulfuro	-2.1
um04668	<i>NBP35</i> - Clúster de unión de Hierro-Sulfuro	-2.1
um03147	Subunidad de adaptación relacionada con el complejo 3, delta 1	-2.1
um11327	<i>SEC27</i> – Subunidad del complejo Coatomer beta	-2.1
um02245	<i>SEC13</i> – Proteína transportadora	-2.1
um03921	<i>CHC1</i> – Cadena Pesada de Clatrina	-2.2
um01439	<i>FRE1</i> – Reduce la unión del sideroforo al hierro, antes de la toma	-2.2
um05158	<i>NUP189</i> - Nucleoporina (SonB)	-2.2
um04658	<i>CIAO1</i> – Ensamblaje de proteínas hierro-azufre de núcleo y citoplasma	-2.3
um11646	<i>VAC8</i> – requerido para dirigir la vacuola al citoplasma	-2.3
um11325	<i>VPS17</i> – Proteína Vacuolar asociada a la clasificación	-2.4
um03209	<i>SEC24</i> – Componente vesicular de recubrimiento COPII	-2.4
um04413	<i>USO1</i> – Proteína de transporte	-2.4
um11636	Proteína Vacuolar de Clasificación 16	-2.5
um01503	Proteína con dominios Vps51/Vps67	-2.5
um10812	<i>VSP</i> [*] - Involucrado en la localización de actina y quitina	-2.5
um11680	<i>SEC39</i> – Ruta de secreción	-3.2
um04880	<i>APG7</i> – Componente del sistema autofagico	-3.6
Segunda Sección: Resistencia a drogas y Metales		
um03384	<i>YHK8</i> - Mediador del flujo de drogas	4.3
um01051	<i>MFS</i> - Resistencia a Multidroga	3.6
um01758	<i>YCF1</i> - Transportar Bilirubina sin conjugar, selendiglutation y glutatión oxidado	3.5
um05414	<i>AFLT</i> – flujo de aflaxotina	3.4
um00815	Resistencia a Multidroga	3.3
um11777	<i>QDRI</i> - Resistencia a quinidina, ketoconazol, fluconazol, barban.	2.4
um06371	<i>SNGI</i> - Resistencia a nitrosoguanidina y 6-azauracil	2.2

Transport protein particle (TRAPP), %VTC: vacuolar transporter chaperone, +GARP: Golgi-associated retrograde protein, -VSP: Vacuolar sorting protein, \$TGN: Trans-Golgi Network

9.5.1.2 Transportadores a través de membrana.

La alcalinidad en el medio puede modificar la solubilidad de algunos de los iones disueltos en el medio exterior pudiendo ser que algunos de ellos alcancen niveles tóxicos. En este modelo experimental se observó que la incubación a pH alcalino modificó la expresión de los genes que codifican 63 diferentes transportadores, 41 fueron regulados positivamente y 22 negativamente por Rim101/PacC. Estos sistemas se encuentran involucrados en el transporte de sodio, cromato, zinc, potasio, protones, cobre, magnesio, calcio, otros están involucrados en la producción de amonio y hay otro tipo diferente de transportadores como ABC (Tabla 8). De particular interés es gen que codifica el transportador de Zinc, um03110, debido a su alto nivel de expresión es la alta de represión (290.6 veces), y la alta expresión del gen que codifica un sistema intercambiador de protones/calcio (um05132), así como genes con similitud a *ENA2*, una ATPasa de la membrana plasmática y el gen codificante de un transportador de cobre (um11588) al RE y otras endomembranas, relacionadas con la sensibilidad a estrés por sodio en *U. maydis* (Begoña *et al.*, 2009).

Tabla 8. Transportadores

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um11588	Proteína transportadora de cobre	28.3/8.3 ⁺	1
um10210	Proteína Transportadora de cobre	9.9	3
um01020	<i>CCC2</i> - ATPasa tipo P, asociada a resistencia a cobre	4.2	7
um00455	<i>MIR1</i> - Transportador de fosfato (MCF)	2.3	0
um03475	<i>PHO89</i> - Co-transportador de fosfato/Na ⁺	-331.9	15
um05132	<i>VCX1</i> - Intercambiador vacuolar de Ca ⁺⁺ /H ⁺	20.1	1
um11372	<i>ENA2</i> - ATPasa de la membrana plasmática	6.6	0
um10866	Transportador ABC	5.5	5
um01431	<i>FER6</i> - Transportador ABC	3.9	5
um00712	<i>YORI</i> - Transportador ABC	3.2	1
um10432	Transportador ABC, sub-familia G	2.9	9
um05642	<i>SNQ2</i> - Transportador ABC, resistencia a multidrogas	2.5	6
um03148	Transportador ABC	-2.9	2
um05951	Transportador ABC, ATPasa mitocondrial	-4.2	5
um00450	<i>VMR1</i> - Resistencia a múltiples drogas y sensibilidad a metales	4.3	0
um00842	Bomba de flujo de aflatoxina AFLT	3.8	5
um02818	Proteína asociada a resistencia a multidrogas	-2.4	2
um03115	<i>SGE1</i> - Proteína de resistencia a drogas	-2.0	3
um06371	Proteína relacionada a drogas	-2.2	2
um00696	Proteína de resistencia a Bicicomicina (MFS)	-2.9	1
um05602	Transportador de azúcar	14.4	1
um11514	Transportador de alta afinidad a glucosa	9.5	4
um05783	Transportador de UDP-galactosa	2.1	8
um01476	Facilitador de baja afinidad de Hexosa	-2.0	0
um06093	Transportador de UDP-galactosa	-2.1	1
um05033	Transportador de glucosa/galactosa	-2.5	4
um03034	Transportador de azúcar (y otros)	-2.6	6
um05079	<i>CTP1</i> - Transportador mitocondrial de citrato	-3.2	1
um11057	<i>OPT1</i> - Transportador de alta afinidad de glutatión	339.7	0
um05122	<i>JEN1</i> - Proteína transportadora de ácido carboxílico	81	1
um06076	Transportador de quinato	11.9	1
um01868	<i>GIT1</i> - Transportador de glicerofosfoinositol	7.7	3
um00196	<i>FUN34</i> - Proteína transmembranal, producción de amonio	4.0	7
um01862	<i>ARR3</i> - Transportador de arsenito	4.4	5
um05546	Transportador de la membrana interna, biosíntesis de glutamato y metabolismo de oleato	2.0	5
um00477	Transportador de monocarboxilato 1	-15.2	4
um04347	<i>ISP4</i> - Transportador de oligopeptidos	60.8	3
um05038	<i>ACU2</i> - ATPasa tipo K,P	4.3	3
um11229	ATPasa 1 transportadora de fosfolípidos 1	-3.4	5
um10856	<i>YHC3</i> - Involucrado en el transporte vacuolar de arginina	2.8	2
um00204	ATPasa transportadora de Ca ²⁺	-7.2	7
um05503	ATP sintasa Vacuolar, subunidad H	-2.5	2
um05981	<i>TPO1</i> - Antiportador poliamina-H ⁺ vacuolar	4.8	2
um03908	<i>TPO1</i> - Antiportador Poliamina-H ⁺ Vacuolar	-12.1	9
um04771	<i>kha1</i> - Antiportador K ⁺ /H ⁺	2.98	6
um02723	<i>MFS</i> -Transportador de resistencia a multidrogas	30.1	5
um03888	Transportador de resistencia a multidrogas	24.0	4
um03619	Transportador de resistencia a multidrogas	8.1	5
um06391	Transportador de resistencia a multidrogas	5.2	3
um00034	<i>MFS</i> - Transportador de resistencia a multidrogas	-3.3	4

Tabla 8. Transportadores, continuación

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um01360	<i>ALR1</i> - Transportador de Mg ⁺⁺ de membrana plasmática	3.7	5
um03110	<i>ZRT2</i> - Transportador de zinc II	-290.6	8
um00012	<i>ZIM17</i> - Motivo de dedos de zinc, mitocondrial	-3.3	4
um11176	<i>FUN34</i> -proteína transmembranal involucrada en la producción de aminio?	-5.1	5
um06085	GPR1/FUN34/yaaH family (MFS)	42.1	4
um01855	Autotransportador de membrana	38.8	1
um02629	<i>YRO2</i> - Proteína de membrana regulada por Haa1p	30.1	2
um03310	Familia GPR1/FUN34/yaaH	23.2	2
um00840	Transportador MFS	16.1	4
um03507	Transportador MFS	5.3	6
um02504	Transportador MFS	5.1	5
um02008	Transportador MFS	4.4	4
um01136	Transportador MFS	3.9	7
um05346	Transportador MFS	-3.6	1

* Rim101/PacC sites found in the promoter region

†Fold change obtained by qRT-PCR

Se observó que la mayoría de los genes que codifican los sistemas que regulan los transportadores de aniones estaban regulados positivamente por Rim101/PacC, por ejemplo aquellos involucrados en la toma de fosfatos orgánicos e inorgánicos (Tabla 9), probablemente debido a su diferente solubilidad a pH alcalino, y a la misma composición del amortiguador utilizado. Otro grupo de genes regulados positivamente por Rim101p fueron aquellos categorizados por su similitud con los transportadores de la Superfamilia de Facilitadores Mayores, abreviado MFS (Tabla 9), cuyos productos son transportadores no identificados, así como proteínas de multiresistencia a drogas y metales (Tablas 9). Su regulación contrarresta la formación de compuestos tóxicos bajo condiciones de estrés.

Tabla 9. Transportadores

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Cationes		
um10866	Transportador ABC	5.5
um05038	<i>ACU2</i> - ATPasa tipo K,P	4.3
um05038	<i>ACU2</i> - ATPasa tipo K,P	4.3
um11838	<i>ZIP</i> – Familia transportadora de Zinc	2.8
um04923	Intercambiador de sodio/calcio	2.8
um11407	<i>RSN1</i> - Sobre-expresión reprime sensibilidad a NaCl	2.7
um06461	<i>ATRI</i> - Transportador ABC	2.7
um00824	ABC transporter sub-family C member 9	2.6
um02203	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	2.6
um05925	<i>TOK1</i> – Canal rectificador exterior de K ⁺	2.3
um02213	Transportador de Cromato	2.3
um02465	<i>EHS1</i> – Promover la afluencia de Calcio	2.2
um12056	<i>ENA2</i> –ATPasa de la membrana plasmática	2.2
um05238	Intercambiador de sodio/calcio	2.1
um02360	Subunidad H del complejo ATP sintasa	-2
um10822	<i>ATP12</i> – complejo de ensamblaje F1F0-ATPasa	-2
um01103	Precursor de la cadena Delta de la ATP sintasa mitocondrial	-2.1
um02585	<i>TPO1</i> – Antiportador vacuolar poli amine-H ⁺	-2.2
um10798	<i>CCC2</i> – ATPasa tipo P, asociado a Resistencia a cobre	-2.4
um03148	Transportador ABC	-2.9
Segunda Sección: Aniones		
um00800	<i>PHO84</i> - Permeasa de fosfato inorgánico	3.1
um05260	Transportador inorgánico de fosfato	2.4
Tercera Sección: Superfamilia de Facilitadores Mayores		
um02504	Transportador MFS	5.1
um02008	Transportador MFS	4.4
um01136	Transportador MFS	3.9
um05346	MFS	3.6
um04841	Transportador MFS	3
um05396	Transportador de Membrana	2.9

El pH alcalino extreme afecta la disposición de diversos nutrientes (aminoácidos, carbohidratos, otros.) Este efecto negativo es contrarrestado por Rim101/PacC, al regular positivamente 14 genes y negativamente 3 que codifican para transportadores (“permeasas”) de metabolitos, en conjunto modulando la penetración de carbohidratos, oligopéptidos, amino ácidos, y otros metabolitos como nitrato, tartrato, quinato y aniones orgánicos. La fuerte regulación positiva de genes que codifican para permeasas de azúcares,

glutación, y aminoácidos neutros, y la represión de genes que codifican permeasas de algunos aminoácidos, es de destacarse (Tabla 8 y 10).

Tabla 10. Permeasas

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um05958	<i>MALP</i> - Permeasa de maltosa	32.6	1
um05972	Permeasa de maltosa	3.1	6
um05411	Permeasa de quitinato	2.7	5
um10608	Permeasa de quitinato	7.3	6
um03663	Permeasa de uracilo	4.7	5
um03049	Permeasa de aminoácidos neutros	131.1	2
um11954	Permeasa de aminoácidos neutros	29.5	1
um10378	<i>DIP5</i> - Permeasa de glutamato y aspartato	3.1	3
um03325	Permeasa General de aminoácidos	2.7	3
um03691	Permeasa específica de lisina	2.2	4
um02459	Permeasa Neutra de aminoácidos	-6.7	3
um06138	<i>PTR2</i> - Di- and tripeptide permeasa	-7.3	7
um06012	Permeasa general de aminoácidos	-70.0	3
um06490	<i>PHO84</i> - Permeasa de fosfato inorgánico	8.9	3
um00800	<i>PHO84</i> - Permeasa de fosfato inorgánico	3.1	2
um05421	Transportador de resistencia a multidrogas, permeasa de hierro	3.1	2
Segunda Sección: Transporte de Metabolitos			
um04304	Permeasa de alantoato	11.9	-
um00076	Permeasa de purina	5.6	-
um10365	<i>YBT1</i> – Transportador Vacuolar ABC de ácido bilico	5.6	-
um02704	Permeasa de alantoato	4.3	-
um01138	Transportador de flujo de Arsenito	4.2	-
um05442	Transportador de monocarboxilato 2	3.6	-
um00116	Permeasa de nicotinamida mononucleótido	3.4	-
um00222	Transportador de monocarboxilato	3.1	-
um10946	<i>TNAI</i> - Permeasa de alta afinidad de ácido nicotínico	3.1	-
um03474	<i>TNAI</i> - Permeasa de alta afinidad de ácido nicotínico de la membrana plasmática	2.5	-
um03522	<i>UGA4</i> – Permeasa de GABA, transporte de delta-aminolevulinato	2.2	-
um11773	Transportador de Tartarato	2.2	-
um11105	Transportador de Nitrato	2.1	-
um11279	Involucrado en la toma y distribución de esteroles en la membrana plasmática	2.1	-

Otros genes que parecen importantes para la adaptación a condiciones alcalinas son aquellos que codifican acuaporinas (um02169 y um01508), y el gen repelente *REPI*, (um03924; Tablas 11), regulados positivamente. También la regulación positiva de

translocadores de fosfato y la regulación negativa de genes que codifican proteínas sideróforas y peroxisomales, puede ser importante para esta adaptación (ver Tabla 8 Discusión;).

Tabla 11. Otros transportadores

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um01434	<i>FER3</i> - Biosíntesis de ferricromo A	6.2	2
um11339	<i>FER7</i> - Transportador de hierro a sideróforo 3	-3.6	3
um11244	<i>FRE4</i> - Reductasa férrica	-63.9	2
um10400	Triosa fosfato/3-fosfoglicerato	3.5	3
um05954	<i>SLY41</i> - Transportador de triosa fosfato	2.8	1
um01508	Acuaporina 3	2.8	4
um02169	Acuaporina 3	2.4	4
um03924	<i>REPI</i> – Precursor 1, proteína repelente	2.2	7
um03524	Oxidasa amino peroxisomal	5.7	2
um11079	<i>PEX30</i> - Proteína peroxisomal integral de membrana	-7.5	1
um03177	Proteína de membrana peroxisomal 20	-4.0	4
um02323	<i>PEX14</i> - Proteína peroxisomal involucrada en la importación de proteínas	-2.1	4

9.5.1.3 Membrana y Pared Celular.

La célula interactúa con el medio ambiente mediante la pared celular y la membrana plasmática. Estas estructuras son adaptables, de tal manera que permiten la supervivencia celular bajo condiciones de estrés, como aquellas impuestas por un pH alcalino. Como se muestra en la Tabla 12, a pH 9 ocurre la regulación de algunos genes involucrados en la síntesis de componentes de la pared celular y la membrana. En este sentido es interesante señalar la regulación opuesta de dos genes (um11017 y um02819), involucrados en la formación de una capsula de polisacárido, la regulación positiva de una glicosiltransferasa, así como la regulación de genes involucrados en la síntesis de β -1,6 glucanas y la regulación positiva de tres clases de quitina sintasas, de un precursor de una quitina deacetilasa y de dos quitinasas (Tabla 12). Por otro lado, se pueden mencionar la

regulación negativa de genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de policétidos, proteínas de anclaje GPI, y proteínas de anclaje a la pared celular. Se puede concluir que en conjunto estos cambios están involucrados en la adaptación del hongo al pH alcalino.

Tabla 12. Membrana y Pared Celular

Genes regulados por Rim101/ PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
Membrana, Pared celular y cápsula			
um04171	La mutación suprime la mutación en Tor2	184.1	8
um10691	Ligasa de ácidos grasos-CoA de cadena larga	4.8	6
um11017	<i>CAP9</i> – Formación de cápsula de polisacárido	4.2	5
um11927	Proteína involucrada en el funcionamiento de la pared celular	2.8/2.8 ⁺	4
um00760	Fosfomevalonato cinasa	2.2	0
um03513	Fosfolípido metiltransferasa	2.1	5
um02819	<i>CAP9</i> – Formación de cápsula de polisacárido	-2.1	2
um10015	Metabolismo de fosfolípidos	-2.2	3
um11808	Cadena larga base de esfingolípidos	-2.3	1
um01958	Manoproteína de pared celular, expresada en condiciones anaeróbicas	-2.6	4
um10804	Componente de dihidrolipoil transuccinilasa	-2.8	2
um00789	Precursor de carnitina O-acetiltransferasa	-2.96	2
um05450	Ligasa de ácidos grasos de cadena larga –CoA 6	-3.0	2
um05495	Rara lipoproteína A	-3.5	4
um02793	Proteína relacionada con el metabolismo de lípidos	-10.8	5
Metabolismo de Glucanas			
um11836	<i>SKNI</i> - Biosíntesis de esfingolípidos	98.9	1
um05704	Núcleo catalítico de glicosil hidrolasa	56.8	0
um05809	<i>KRE6</i> - glucana sintasa	24.5	1
um00167	Glicosil transferasas grupo 1	7.9	2
um06078	Glucano 1,3 β-glucosidasa	6.3	1
um02804	<i>NCPI</i> - Glicosiltransferasas, biogénesis de la envoltura celular	5.3	0
um00102	Glicosil hidrolasa	-12.6	4
um01757	Biosíntesis de β-glucanas de pared celular y respuesta a estrés	-2.1	4
um10211	<i>EXGI</i> - exo-beta-1,3-glucanase (VII)	-2.0	11
um01774	Alfa-1,2-manosidasa.	-4.4	3
um05807	<i>KRE6</i> - glucana sintasa	-10.3	1
Quitina			
um11922	Quitina deacetilasa	48.4	1
um06190	Quitinasa	7.0	4
um02758	Precursor de quitinasa A	3.3	7
um00638	<i>CDA2</i> –Quitina deacetilasa específica de esporulación	3.7	1
um11089	<i>CHS7</i> - Exportada del RE, similar a quitina sintasa III	3.2	0
um10367	<i>CHS6</i> - quitina sintasa 6	2.6	4
um10120	<i>CHS3</i> - quitina sintasa 3	2.2	4

Tabla 12. Membrana y Pared Celular continuación.

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
β oxidación			
um03204	<i>CHS8</i> - quitina sintasa 8	3.4	4
um11651	Betaina lípido sintasa	81.9	3
um10865	Elongasa de ácidos grasos	21.2	3
um05068	Arilsulfatasa	14.5/2.1 ⁺	6
um10640	Rara lipoproteína A (RlpA)	9.3	2
um05070	Hidroxilasa de ácidos grasos	5.7	3
um03523	aldehido dehidrogenasa	5.7	3
um01432	<i>FER5</i> - N6-hidroxilisina acetil transferasa	5.5	6
um04481	<i>ADH2</i> - Alcohol dehidrogenasa II	4.0	5
um06174	<i>YEHI</i> - Esteril éster hidrolasa	3.0	4
um12014	Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa	2.9	1
um01793	<i>AAD14</i> - Probable aril-alcohol reductasa	2.2	4
um00694	Acil-CoA dehidrogenasa	2.1	3
um06460	Sintasa de ácidos grasos.	-2.2	4
um10038	Proteína multifuncional de beta-oxidacion	-2.3	2
um01911	Alcohol deshidrogenasa	-4.5	1
um11556	Precursor de enoil-CoA hidratasa mitocondrial	-4.9	4
um01966	Acil-coenzima A oxidase	-5.5	3

A su vez observamos la regulación positiva de diversas cinasas involucradas en la integridad, biogénesis y biosíntesis de la pared celular, esporulación, patrones de gemación y regulación de la ramificación de hifas (Tabla 12 y 13), indicando la importancia de la pared celular en la resistencia a la adaptación al pH alcalino extremo. Por otro lado, también notamos la regulación positiva de genes involucrados en el transporte de acetil-CoA a la mitocondria y la modulación de la β -oxidación de los ácidos grasos (Tabla 12 y 14), pudiendo esto estar relacionado a alteraciones en la síntesis y degradación de lípidos membranales, o a que el estrés ocasionado, aumente la respiración celular.

Tabla 13. Desarrollo, cinasas y remodelaje de la cromatina.

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Desarrollo y Diferenciación		
um00353	Dominio JmjC, superfamilia Cupin	-2.4
um10087	Dominio Homeobox	-2.4
Segunda Sección: Cinasas		
um02152	Cinasa Serina/treonina	3.6
um02190	<i>PRP4</i> - Cinasa Serina/treonina	3.4
um03413	Cinasa Acetato	2
um04550	Cinasa Serina/treonina. Canal Iónico Mecanosensitivo	2
um01491	Cinasa Serina/treonina	-2.4
Tercera Sección: Remodelaje de la Cromatina		
um02162	GCN5-related N-acetiltransferasa	8.7
um10864	<i>GNA1</i> - acetiltransferasa	4
um02198	Acetiltransferasa similar a GCN5	2.6
um03543	<i>YNG2</i> – Subunidad de nua4p, complejo de histona acetiltransferasa	2.4
um01788	Desacetilasa	2.2
um11391	Acetiltransferasa similar a GCN5	-2
um01788	Desacetilasa	-2.2
um11681	<i>EAF1</i> – Plataforma de ensamblaje, inicio de la replicación pre-meiótica, expresión de <i>IME1</i> .	-2.5
um12243	Relacionado a SWI/SNF asociado a matriz dependiente de actina, subunidad C, miembro 1	-2.7
um12008	<i>tra1</i> – Componente del complejo regulatorio transcripcional ADA-SPT	-2.8
um01533	N-Acetiltransferasa	-2.8

Tabla 14. Pared celular.

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Membrana, capsula y pared celular		
um10691	Ligasa de Ácidos grasos-CoA de cadena larga	4.8
um01850	<i>SCP-2</i> – Proteína de unión a esterol.	4.2
um02224	Añade un grupo palmitoil para anclaje a membrana celular	2.73
um10940	<i>ROT1</i> – Chaperona del retículo endoplasmico	2.7
um01784	<i>GPX2</i> – Fosfolipido hidroxiperoxido glutatión peroxidasa	2.6
um00760	Fosfomevalonato Cinasa	2.2
um11660	<i>CAT2</i> - Carnitina O-acetiltransferasa	-2.1
um02819	<i>CAP9</i> – Formación de Capsula de polisacárido	-2.1
um01115	<i>OSH3</i> - Miembro de la familia de unión a oxiesterol	-2.1
um10015	Metabolismo de fosfolipido	-2.2
um11808	Cadena de Cadena larga base de esfingolipido	-2.3
um05725	<i>OPI3</i> –Fosfolipido-acido-graso-metileno sintasa	-2.3
um04046	Aldehído deshidrogenasa	-2.5
um02657	<i>NMT1</i> - N-ministril transferasa	-2.5
um10804	Componente de dihidrolipoil transsuccinilasa	-2.8
um00789	Precursor de Carnitina O-acetiltransferasa	-2.96
um05495	Rara lipoproteína A	-3.5
Segunda Sección: Metabolismo de Glucanos		
um00167	Glicosil transferasas grupo 1	7.9
um00235	<i>EXG1</i> - Exo-beta-1,3-glucanasa (I/II), isoforma mayor	4.6
um00655	Familia 9 glicosil hidrolasa	3.1
um00891	<i>UTR2</i> - Transfiere quitina al beta(1-6) y beta(1-3) glucanos en la pared celular	3.1
um11414	Endo-1,3,1,4-beta-D-glucanasa	3
um03569	<i>KRE6</i> - Beta-1,6-glucano sintetiza	2.8
um00446	Beta-glucosidasa	2.7
um02769	<i>FKS1</i> – Subunidad catalítica del 1,3-beta-D-glucano sintasa,	2.7
um05811	<i>KRE6</i> - Beta-1,6-glucano sintetiza	2.5
um02259	Cadena A Endo-1,3(4)-Beta-Glucanasa	2.2
um02803	Proteína de Unión a beta-1,3-glucano	2
um06120	Familia 115 glucósido hidrolasa	2
um01757	Biosíntesis de la β -glucano de pared celular en respuesta a estrés	-2.1
um12171	<i>TRS65</i> - Alfa-1,3-mannosiltransferasa	-3
um01774	Alfa-1,2-manosidasa	-4.4
Tercera Sección: Metabolismo de Quitina		
um06190	Quitinasa	7
um00638	<i>CDA2</i> – Quitina desacetilasa específica de la esporulación	3.7
um02758	Precursor de Quitina A	3.3
Cuarta Sección: Beta oxidación		
um05070	Superfamilia de hidroxilasa de ácidos grasos	5.7
um03523	Aldehído deshidrogenasa	5.7
um03524	Oxidasa amino peroxisomal	5.7
um03523	Aldehído deshidrogenasa	5.7
um10596	Aldehído deshidrogenasa	5.3
um06366	Aglutinina Plus	4.2
um03177	Proteína de membrana peroxisomal 20	4
um05495	Rara lipoproteína A	3.5
um03688	Acido graso oxidasa	3.5
um01984	<i>ADH1</i> - alcohol deshidrogenase I	3.4
um02321	Lecitina: colesterol aciltransferasa	3.3
um10605	<i>ADH3</i> - alcohol deshidrogenasa III	3.1

Tabla 14. Pared celular. Continuación

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um01937	Esfingomielinasa ácida	3
um06119	Pectinacetil esterasa	3
um12014	Glicerofosfodiester Fosfodiesterasa	2.9
um01793	<i>AAD14</i> - Probable aril-alcohol reductasa	2.2
um00694	Acil-CoA deshidrogenasa	2.1
um05619	Superfamilia de ácido graso hidroxilasa	2.1
um00749	Lipasa	2
um11659	<i>PCS60</i> – Proteína de unión a AMP, perioxosomal	-2
um10665	Acil-CoA deshidrogenasa	-2.1
um01099	3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	-2.1
um06185	Acil-CoA deshidrogenasa	-2.2
um01171	4-Coumarato-CoA ligasa	-2.2
um06460	Sintasa de ácido graso, cadenas beta y alfa	-2.2
um02715	<i>POT1</i> - Acetil-CoA C-aciltransferasa, perioxosomal	-2.3
um10038	Proteína Multifuncional beta-oxidación	-2.3
um01941	Acil-CoA oxidasa	-2.5
um10183	<i>SPS19</i> - Peroxisomal 2,4-dienoil-CoA reductasa	-2.5
um10088	Acetoacetil-CoA sintetiza	-2.6
um12337	Acil-CoA tioester hidrolasa	-2.7
um03298	<i>ERG10</i> - Acetil-CoA C-acetiltransferasa, citosolica	-2.8
um02028	Acil-CoA oxidasa 1, perioxosomal	-2.9
um02887	<i>PEX17</i> - Proteína perioxosomal de membrana	-3.1
um01911	alcohol deshidrogenasa	-4.5
um01966	Acil-CoA oxidasa	-5.5

9.5.1.4 Desarrollo, diferenciación, citoesqueleto y ciclo celular.

Se ha descrito que Rim101/PacC tiene un papel en la regulación de la meiosis en *S. cerevisiae* (Lamb y Mitchell, 2003). Aparentemente éste también es el caso en *U. maydis*. Se observó que bajo condiciones alcalinas, Rim101/PacCp reprime la expresión de *WHI3*, un gen cuyo homólogo está involucrado en el destino celular, la citocinesis, el ciclo celular y el tamaño celular en *S. cerevisiae*, y genes involucrados en la segregación meiótica, recombinación y fidelidad de la replicación (Tabla 15). Por otra parte, Rim101/PacC regula positivamente genes involucrados en la citocinesis y la separación celular, terminación de la fase M, e incluso la regulación negativa de la expresión del gene que codifica la ciclina G11, *WHI2* (Tabla 15).

Un fenotipo observado en la cepa $\Delta rim101$ es el incremento en la formación y deposición de los septos, una característica que puede estar ligada a alteraciones en la organización del citoesqueleto (Tabla 16). En este sentido es interesante señalar que Rim101/PacCp regula positivamente genes que codifican proteínas involucradas en la formación del anillo de actomiosina involucrado en la citocinesis (Mendes-Pinto *et al.*, 2012) y la re-organización del citoesqueleto de actina, entre otras proteínas relacionadas (Tabla 16). Una función importante de la vía Pal/Rim es la regulación positiva de los genes que codifican a las GTPasas de la subfamilia de Rho/Ras, cuya función involucra el establecimiento de la polaridad celular, debido a los patrones de gemación y al control de la síntesis de la pared celular, en respuesta a la organización del citoesqueleto de actina (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Desarrollo y diferenciación celular, Destino y Ciclo Celular

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
Ciclo Celular			
um02137	<i>Eff1-2</i> -Proteína de la familia efectora	6.5	5
um10529	<i>PCL12</i> - Ciclo celular y control transcripcional	5.9	1
um11028	<i>WHI2</i> - Regulador negativo de la expresión de la ciclina G	5.2/3.9 ⁺	4
um04352	<i>MOB1</i> - Citocinesis y separación celular, salida de mitosis	3.4/2.4 ⁺	4
um11050	<i>TEM1</i> - Controla dinámicas de septina y actomiosina durante la citocinesis.	3.1	2
um04203	Factor Velvet	2.7	2
um03917	<i>CRUI</i> – Proteína regulatorio del ciclo celular ^{Uma}	2.1/4.1 ⁺	-
um10690	<i>FTSY</i> –Proteína de división celular	-2.1/-1.1 ⁺	1
um11403	Recombinación mitótica	-2.2	2
um06348	<i>SCP160</i> -Controla la transmisión del cromosoma mitótica	-2.5	2
um04835	<i>WHI3</i> - Regulación del tamaño celular	-2.9	3
um04187	Segregación cromosómica mitótica	-3.9	4
Rho GTP			
um11909	<i>RSR1</i> - Proteína de unión a GTP	4.6	2
um02902	<i>BAG7</i> - Organización del citoesqueleto de actina, síntesis de la pared celular	2.4	1
um04070	<i>RHO3</i> - Establecer la polaridad celular	2.3	6
um01161	<i>BEM2</i> - Organización del citoesqueleto, morfogénesis celular.	2.2	2
um02494	<i>RHO2</i> –Proteína de unión a GTP	2.0	3
um05445	Proteína de unión a GTP 2	-2.2	3
um10913	<i>RGD2</i> - Proteína activadora GTPasa para Cdc42p y Rho5p	-2.4	1
Muerte Celular			
um11487	Proteína de muerte celular programada	2.2	1
um01313	<i>CID2</i> – muerte inducida por cafeína.	-2.4	4
Desarrollo y Diferenciación			
um04625	Selección del sitio de gemación	3.2/2.3 ⁺	3
um12220	<i>PRM1</i> - Proteína de membrana multilugar regulada por feromonas	2.8	4
um03253	Proteína de respuesta a estrógenos	2.1	2
um00353	Dominio JmjC, Superfamilia de las cupinas	-2.4	4
um06053	<i>TAP42</i> - Componente de la ruta de señalización de Tor	-2.9	5
um11815	Proteína NOTCH2, dominio EGF	-3.1	2
um05218	Relacionado con la morfogénesis celular	-3.9	3
um12288	Involucrado en la biogénesis del ribosoma, metaloproteasa	-6.3	3
Punto Control			
um01968	Alfa arrestina, controla nutrientes, endocitosis de proteínas.	2.2	10
um04047	<i>MAD2</i> - Ensamblaje del huso, regular actividad APC/C durante la prometáfase y metafase	2.1/1.8 ⁺	2
um05240	<i>ESA1</i> - Progresión del ciclo celular, silenciamiento del locus ADN _r	2.1	2
um05151	Ciclina H	-2.3	3
um02741	<i>CBK1</i> - Cinasa involucrada en la biosíntesis de la pared celular	4.2	2
um02331	<i>KSS1</i> - Controla crecimiento filamentoso y respuesta a feromona	4.1	5
um10107	<i>MPKA</i> –Señalización de integridad de pared celular	2.9	4
um11828	<i>HOS2</i> - Parte del complejo Set3, represor de la esporulación.	2.5	2
um00119	Involucrada en la ramificación de las hifas	2.3/2.5 ⁺	6

Tabla 15. Desarrollo y diferenciación celular, Destino y Ciclo Celular
continuación

Genes regulados por Rim101/PacC en la cepa Silvestre de <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
Cinasas			
um05720	<i>PSR1</i> - Fosfatasa de membrana, requerida para respuesta a estrés por sodio	2.2	3
um00956	<i>RAX1</i> - Involucrada en determinar los patrones de gemación	2.2	1
um10320	<i>CWH43</i> - Sensor/transportador involucrada en la biogénesis de pared celular	2.0	5
um00691	<i>HRK1</i> - Homeostasis iónica	-2.1	2
um03081	<i>ARK1</i> - Cinasas reguladora de actina	-2.4	1
um06226	Calcineurina tipo fosfoesterasa	-2.7	3
um00560	Cinasas 3 alfa glicogeno sintasa	-2.8	0
um01079	Cinasas Ser/Tre	-4.5	3

A su vez, relacionado con la reparación de DNA, transcripción, y progresión del ciclo celular (Tabla 15 y 16) está el hecho de regular negativamente al gen que codifica la ciclina H (um05151), así como en la señalización y desarrollo (Tabla 15 y 17). También se debe mencionar la regulación positiva de la detención del ciclo celular, así como la re-selección de sitios de gemación y muerte celular, e interesantemente, la posible regulación de los genes involucrados en la acetilación y desacetilación de proteínas, regulando negativamente los complejos ADA/SAGA (Tabla 16). Todo esto sugiere que el destino celular se ve afectado debido al estrés, y que la detención del ciclo por el sistema Pal/RIM permite al organismo adaptarse al estrés, evitando que sea llevado a la muerte celular.

Tabla 16. Desarrollo y diferenciación celular

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Ciclo Celular		
um10529	<i>PCL12</i> - Funciona en ciclo celular y control transcripcional	5.9
um04203	Factor Velvet	2.7
um11403	Proteína Relacionada con la recombinación Meiótica	-2.2
um04187	Segregación meiótica cromosomal	-3.9
Segunda Sección: Relacionado con Citoesqueleto y Actina		
um02865	Dominio Fasciclin	11.9
um05543	<i>DON3</i> - Establece donde se formara el anillo de actomiosina dependiente de Cdc42	3
um04671	Dominio cinasa, asociado al cinetocoro central	2.9
um00144	Dominio Fasciclina	2.5
um01663	Dominio LIM, involucrado en la organización del citoesqueleto	2.5
um05340	Drebrina F. Adaptador de unión a Actina	2.3
um03985	<i>SIW14</i> – Organización del filamento de Actina	2.2
um04224	<i>NUF2</i> – Proteína parecida a Miosina	2.2
um10676	Dominio Fasciclina/beta-Ig-H3	2.1
um04598	Intermediario de la cadena 1 de Dineina, citosolica	-2
um01578	Cactina.	-2.1
um11816	Componente 2 del complejo Gamma-tubulina	-2.2
um00347	Cofactor D del plegamiento de la Tubulina	-2.2
um04372	<i>DYN2</i> – Cadena pesada 2 de la dineina citoplasmica	-2.3
um03459	Intermediario de la cadena ligera de dineina	-2.5
um01671	<i>YSC84</i> - Organización del citoesqueleto de actina	-2.5
um00163	Chaperona B especifica de la tubulina	-2.6
um06061	Organización del citoesqueleto de actina	-2.7
um03274	Precursor de la cadena de Colágeno alfa-1	-2.8
um02416	<i>BZZ1</i> – Intermediario en la regulación de la polimerización de actina	-2.9
um00494	Probablemente involucrada en el ensamblaje de los parches de actina	-3
um00423	<i>CAP1</i> – Subunidad alfa de la proteína de tapado de actina	-3.3
um02753	Proteína relacionada con la Caleosina	-4.8
Tercera sección: Rho GTP		
um05366	Proteína de anclaje a GPI	3.8
um06073	<i>DCWI</i> - Manosidasa, Proteína de anclaje a GPI	3.1
um05445	Proteína de unión a GTP 2	-2.2
Cuarta Sección: Desarrollo y Diferenciación		
um12220	<i>PRM1</i> - Proteína de membrana multilugar, regulada por feromona	2.8
um00353	Dominio JmjC, pertenece a la superfamilia de Cupina	-2.4
um11815	Proteína NOTCH2, Dominio tipo EGF	-3.1
Quinta sección: Inicio de la transcripción, elongación y cosas del RNA		
um02903	<i>RPC25</i> – ARN polimerasa III	3.1
um10858	<i>RPA12</i> – Subunidad de la ARN polimerasa I	3
um10150	ARNt dihidouridina sintasa	2.7
um00869	3'-5' exonucleasa, hidrolisis de nucleótidos erróneos	2.7
um02059	<i>RPC31</i> – RNA polimerasa III	2.6
um11853	Dominio CS, modulo de unión para HSP90	2.6
um02609	Factor 3b del espliceosoma, Motivo de reconocimiento de ARN	2.5
um00968	Retrotransposon gag	2.5
um05138	Dominio: helicasa	2.3
um04485	<i>CUT9</i> – Proteína de interacción con scn1	2.3

Tabla 16. Desarrollo y diferenciación celular

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um03351	<i>RLII</i> – Promueve el ensamblaje del complejo de pre-iniciación	2.2
um04731	Transcriptasa reversa	2.2
um11592	Dominio FHA: motivo fosfopeptido de unión	2.1
um01164	Pre-ARNm- Factor 38B de espliceosoma (IPR005037)	2.1
um00684	Familia Endonucleasa/Exonucleasa/fosfatasa	2.1
um04848	<i>THS1</i> - Treonil ARNt sintetiza, citosolica	-2.1
um12019	<i>RLR1</i> - Subunidad del complejo THO (C-terminal)	-2.1
um10922	Proteína de reparación de ADN	-2.1
um06259	Ciclofilina asociada a U-snRNP	-2.1
um11119	<i>TELI</i> – Cinasa de control de la longitud del telomero	-2.2
um04443	Activador de traducción <i>gcn1</i>	-2.2
um02777	Complejo THO subunidad 3	-2.2
um11580	Retrotransposon HobS <i>hobase</i> (N-terminal)	-2.2
um04091	RVT_1 Transcriptasa Reversa	-2.4
um00164	Proteína que contiene región de unión a ARN	-2.6
um03013	<i>CLU1</i> – Factor de inicio de la traducción.	-2.6
um10243	Proteína inducible 2 por daño a ADN	-3.5
um04093	<i>DBP2</i> – ARN helicasa dependiente de ATP, media el decaimiento no sentido del ARNm y el procesamiento del ARNr	-3.9
um01330	<i>PAN2</i> – Subunidad del complejo poliA-ribonucleasa Pan2p-Pan3p.	-5.4
Sexta Sección: Reparación, extensión, corte y empalme		
um03381	Familia Endonucleasa/Exonucleasa/fosfatasa	30.7
um00527	Subunidad delta 4 de la ADN polimerasa	2.7
um04698	<i>TAF1</i> – Factor de inicio de la transcripción, TFIID subunidad 1	2.1
um04630	<i>MUS81</i> - Involucrada en la reparación de ADN y estabilidad del anillo replicativo	2
um02220	<i>MUS-42</i> – Reparación de ADN.	2
um02220	<i>MUS-42</i> – reparación de ADN	-2
um11042	<i>PBP2</i> – Regula la posición y longitud del telomero	-2.1
um11009	<i>MSH6</i> – Reparación de los desajustes del ADN	-2.3
um03852	<i>PR12</i> – ADN polimerasa alfa (primasa)	-2.3
um04332	ADNJ, similar a Psi	-2.6
um10239	Transformer-2	-2.8

Tabla 17. Señalización, proteasas y mitocondria

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Rutas de Señalización y chaperonas		
um01696	Proteína con dominio de unión a Calmodulina IQ	13.6
um00466	Receptor acoplado a proteína G, asociado con la clasificación de proteínas	8.7
um00209	<i>EPA4</i> – Dominio PAS, conteniendo una cinasa	3.8
um00188	Sensor de luz azul usando FAD	3.1
um04506	Sensor hibrido PAS/PAC, histidina cinasa	2.5
um03379	Secuencia señal de la ruta Tat	2.2
um02336	Contiene dominio PH	2.1
um11671	Proteína de unión al factor de choque térmico	-2
um11440	Dominio WD40, procesamiento del pre-ARNm y ensamblaje del citoesqueto	-2.1
um03938	<i>SBA1</i> – Co-chaperona asociada al Hsp90	-2.1
um11952	Proteína de choque térmico 80 (C-terminal)	-2.3
um00371	Opsina-1	-2.4
um10696	<i>AHA1</i> – Cochaperona regulada por estrés	-2.6
um05832	Proteína de choque térmico 10 (chaperonina CPN10)	-3
um02057	<i>SBA1</i> – Cochaperona Hsp90 cochaperone	-3.1
um11258	<i>GIS2</i> – Involucrada en la ruta de señalización de RAS/cAMP	-3.2
um12128	Partícula de reconocimiento de señal 68	-3.4
um03881	Proteína de choque térmico Hsp20	-4
um05831	Proteína de choque térmico hsp60	-4.1
um06430	Proteína de choque térmico HSP104	-7.1
Segunda Sección: Proteasoma y enzimas (Proteasas and fosfatasa)		
um05803	Fosfatasa acida	334.2
um02727	Lisosima	127.4
um03382	Precursor de fitasa 3 A	46.3
um00064	Precursor de pepsina (proteasa de aspartato)	24.7
um05995	Precursor de fosfatasa acida	14.7
um01204	<i>PRY1</i> – Similar al PR-1 de plantas, relacionado con patogenicidad	10.5
um10068	Precursor de Fosfatasa Ácida	6.4
um02175	Precursor de fitasa 3 A	5.2
um11015	Peptidasa, Familia Ulp1 proteasa	3.7
um02223	Fosfatasa ácida	3.6
um03372	<i>ULP1</i> - Proteasa	2.9
um06428	Precursor de fosfatasa acida reprimido por Tiamina	2.7
um06165	Peptidasa C11 clostripain	2.3
um02178	Proteasa aspartica	2.2
um11569	<i>MKC7</i> – Proteasa aspartil, del espacio periplasmico	2.2
um10912	<i>UFD2</i> – Factor de ensamblaje de la cadena de Ubiquitina (E4).	2
um00647	<i>SPG20</i> – Proteína asociada a Senescencia	-2.1
um06222	<i>SSM4</i> – Ubiquiina ligasa involucrada con la degradación, asociada al RE	-2.4
um10750	Modificador relacionado con ubiquitina	-2.4
um03630	<i>MEP1</i> - Metaloproteasa	-2.4
um00825	<i>CICI</i> – Sustrato específico del proteosoma	-2.5
um00792	<i>PNO1</i> – Proteína nucleolar esencial, requerida para el procesamiento del pre-18S ARNr	-2.5
um10819	Aminopeptidasa C	-2.6
um04786	<i>RPN2</i> – Subunidad regulatoria del proteosoma 26S	-2.6
um00298	Proteasa específica del procesamiento de la Ubiquitina	-2.9
um05687	<i>PRE5</i> - Subunidad 20S del proteosoma	-3.5
um11015	<i>ULP1</i> - Proteasa	-3.7
um12341	Citocromo P450	7.1
um10835	Citocromo B561	4

Tabla 17. Señalización, proteasas y mitocondria continuación

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Tercera Sección: Relacionado con la mitocondria, respiración celular		
um00005	Benzoato 4-monooxigenasa citocromo P450	3.8
um05664	Citocromo P450	2.9
um02172	Metilglioxal reductasa (NADPH-dependiente)	2.8
um11714	<i>MRPS8</i> – Proteína Mitocondrial ribosomal	2.7
um03517	Rossmann-fold NAD(P)(+)- Proteína de Unión	2.3
um06473	Citocromo P450	2.1
um11977	Portador Mitocondrial	2.1
um05932	Citocromo P450 monooxigenasa	-2
um01935	Metilglutaconil-CoA hidratasa.	-2
um10458	<i>CSF1</i> – Fermentación a baja temperatura, detectada en mitocondria	-2.1
um05894	<i>FMP30</i> – Mantener la morfología mitocondrial y los niveles normales de cariolipina	-2.1
um05472	Cadena alfa del Complejo asociado al polipéptido naciente	-2.2
um11421	Metilmalonato-semialdehido deshidrogenasa.	-2.5
um10688	<i>MIC17</i> - Proteína mitocondrial el espacio intermembranal, consumo normal de oxígeno	-2.7
um01947	Citocromo-C peroxidasa precursor	-3
um00057	<i>AIM31</i> – Se localiza en la mitocondria, interactúa con la cadena respiratoria III y IV	-3.3
um02189	3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa.	-3.9
um01803	<i>NCA2</i> - control de síntesis mitocondrial de Atp6p y Atp8p	-4.3
um03631	<i>MIA40</i> –Importar y ensamblar proteínas del espacio intermembranal	-4.7
um02667	Succinil-CoA: 3-quetoacido-CoA transferasa.	-5.7
um02774	Precursor alternativo de oxidasa mitocondrial	-7.1

9.5.3.7 Factores transcripcionales

Debido a que Rim101/PacC parece regular diversos factores transcripcionales, puede esperarse que algunas de sus efectos no se deban a una regulación directa de Rim101/PacC, si no a la acción de otros factores transcripcionales, regulados por él. En total identificamos 63 factores transcripcionales, 30 regulados positivamente y 33 regulados negativamente por PaC. De esos, 26 proteínas con una función probable se muestran en la Tabla 18 y 19. Los restantes 37 fueron identificados por sus dominios funcionales (e.g. dedos de zinc, bZip básico, Gal4, sitio de unión a promotor) mostrados en la Tabla 18.

Tabla 18. Factores Transcripcionales

Genes regulados por Rim101/PacC en <i>U. maydis</i>			
Id	Descripción	Cambio de expresión	Número de sitios*
um06470	Proteína de dedos de Zinc C2H2	29.9/2 ⁺	4
um05486	Factor transcripcional HLH (GlcD gamma)	11.8	5
um05694	Dominio: Factor transcripcional bZIP	7.9	3
um02757	<i>PRIB</i> - Dominio: GAL4, cluster binuclear fúngico Zn2Cys6	5.9	5
um03620	<i>ALCR</i> - Proteína regulatoria	5.5	6
um03568	<i>ALC^u</i> - Cluster binuclear fúngico Zn2Cys6	4.6	4
um05167	Proteína reprimida en células de <i>BGI001</i> en <i>BC10</i>	3.9/3.9 ⁺	3.9
um04999	<i>RDS2</i> - Regulador de sensibilidad a drogas.	3.3	2
um06231	Promueve el desarrollo terminal en lugar del segmental	3.2	1
um00946	<i>MNLI</i> - Adaptación a estrés por acido débil, activa genes reprimidos por Nrg1p	2.7	3
um01050	<i>URBS1</i> - Regulación de la biosíntesis de sideroforo	2.5	8
um03297	<i>RAD54</i> - Reparación de rupturas de doble hélice, familia SWI/SNF	2.5	9
um10654	<i>TFB5</i> - Componente transcripcional, factor de reparación de ADN TFIIH	2.3	1
um00491	<i>BRF1</i> - Subunidad TFIIB	2.3	1
um01908	<i>AAB-1</i> - Subunidad del factor transcripcional de unión CCAAT- Dominio: CBF/NF-Y	-2.1	4
um02191	<i>YAPI</i> - Dominio de unión de Hap4 para unión a Hap 2/3/5, papel en respiración	-2.1	4
um10570	Familia YTH, remueve transcritos específicos de meiosis expresados en células mitóticas	-2.2	6
um11705	<i>TAF12</i> - Subunidad de los complejos TFIID y SAGA.	-2.5	2
um02808	<i>NIT- 4</i> – Factor transcripcional de asimilación de nitrógeno	-2.7	4
um01523	<i>HCM1</i> - Conlleva a la fase S	-3.5	7
um02994	Proteína similar a ELAV 2	-3.9	5
um05940	Dominio de Anillo de Dedo. Complejo Ubiquitina Ligasa HRD. Componente del Retículo Endoplasmico	-4.0	3
um03477	Proteína 1 Asociada a Cullin, disociada de NEDD8	-4.5	6
um11176	Dominio: bZIP básico	-5.1	5
um06346	Dominio: Zipper Básico de leucina	-5.9	3

Es de hacer notar que detectamos la regulación de diversos factores transcripcionales involucradas en el ciclo celular, transcripción, biosíntesis de sideroforos y sensibilidad a drogas, concordando con las funciones descritas anteriormente. A los factores transcripcionales que no se les logró asignar función alguna, fueron categorizadas por su

homología con dominios funcionales mediante la base de datos de Interpro. Dos de estas proteínas llamaron nuestra atención debido al alto nivel de regulación positiva, um05846 y um06470, con un nivel de regulación de 11.8 y 29.9, respectivamente. Estos datos confirman la regulación por parte de Rim101/PacC de genes mediante dos formas: la regulación directa de la expresión génica al interactuar directamente con los promotores de los genes regulados, y de forma indirecta, mediante la regulación de factores transcripcionales por el mismo mecanismo.

Tabla 19. Factores Transcripcionales

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um02757	<i>PRIB</i> , Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	5.9
um05939	Región de unión a Zinc, Citidina y deoxicitidilato desaminase	4.6
um05940	Dominio: Dedo de Zinc tipo C ₃ HC ₄	4
um05167	<i>BC10</i> – relacionada con cáncer	3.9
um05966	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	3.8
um04688	Dominio: Cluster binuclear Zn2Cys6	2.9
um04688	Dominio: Cluster binuclear Zn2Cys6	2.9
um10143	TBP Factor de Unión a Caja TATA	2.8
um02301	Similar a STE, Dominio: Dedo de Zinc	2.5
um10482	Factor de Inicio de la Transcripción IIA, subunidad 2	2.5
um06278	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	2.2
um01961	Dominio: GAL4, Factor transcripcional fúngico	2.2
um10544	<i>ETA2</i> – unión de ADN	2.1
um00576	Regulador Nuclear	2.1
um02623	N-glicosilasa AND alquibase, dedo de Zinc tipo C ₃ HC ₄	-2.1
um02765	Dominio: GAL4, Factor transcripcional fúngico	-2.2
um10016	Dominio: GAL4, Factor transcripcional fúngico	-2.2
um05773	Dedo de Zinc GATA	-2.2
um10016	Cluster binuclear Zn2Cys6 fúngico	-2.2
um05481	Dominio de dedo de Zinc C ₂ H ₂	-2.2
um05773	Dedo de Zinc GATA	-2.2
um06279	<i>BICP4</i> – Regulador génico positivo y negativo	-2.3
um00058	Probable Factor Transcripcional C6	-2.4
um00467	Dominio: GAL4, Factor transcripcional fúngico	-2.6
um04208	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	-2.6
um00467	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	-2.6
um02247	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	-2.6
um03167	Dominio: Dedo de Zinc, C ₂ H ₂ ¹	-2.7
um03167	Dedo de Zinc endotelial, inducido por el factor de necrosis tumoral alfa	-2.7
um00224	Negative transcriptional regulator family protein	-2.9
um04083	Cluster binuclear Zn2Cys6 fúngico	-2.9
um04083	Dominio: GAL4, Cluster binuclear Zn2Cys6	-2.9
um02497	Factor de transcripción fúngico	-3.3

9.5.3.8 Funciones Diversas

Observamos una diversidad de funciones cuya función aparente no responde de forma inmediata los fenotipos observados en la mutante $\Delta rim101/pacC$, siendo la mayoría genes involucrados en metabolismo secundario, pero estudios posteriores pueden permitir elucidar el involucramiento en la adaptación a pH alcalino. La tabla 20 muestra diversas proteínas de membrana (Tabla 20), así como la regulación de policétidos, involucrado en el metabolismo secundario, que derivan en la producción de penicilina, cefalosporina, ergotrato, y estatinas, entre otros (Pfeifer & Khosla, 2001). Este metabolismo secundario incluye enzimas (Tabla 21), que presentan funciones diversas, sugiriendo la adaptación del metabolismo a la presente condición, mostrando niveles de expresión positivos en la cepa silvestre que varían entre 2 a 7.9, con 14 genes cuyo nivel de expresión varía entre 10.9 a 240.2, así como niveles de expresión negativos entre -2 a -7.3. La tabla 22 muestra identificadores de genes de *Ustilago maydis* a los cuales no se les logró asignar función.

Tabla 20. Policetido y Proteínas de Membrana

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
Primera Sección: Policetido		
um05255	Dominio Barril A/B, respuesta a estrés	4.8
um10781	Glutación S-Transferasa	3.9
um00723	<i>RDSI</i> – Proteína de respuesta estrés	3.4
um01014	Dominio Tioredoxina 5	3.4
um06414	Policetido sintasa	3.1
um04084	Repetido per-hexámero 5	2.7
um00375	<i>SIP1</i> - Raffinosa sintasa	2.1
um03412	policetido ciclasa/dehidrasa	2.1
um02141	<i>EFF1-10</i> - Familia efectora	2.1
um04097	policetido sintasa	-2.1
um02066	Proteína de citoplasma. Dominio GYF	-2.2
um04105	Policetido sintasa	-2.2
um11254	Proteína Transmembranal	-2.3
um02226	Proteína Secretada	-2.4
um11595	Monooxigenasa involucrada en la biosíntesis de antibiótico	-2.6
um02720	GMP sintasa	-2.6
um05798	policetido sintasa	-2.7
um00414	Proteína fúngica de función desconocida	-2.8
um04095	policetido sintasa	-2.8
um10030	<i>FLIK</i> – Movilidad del motor flagelar	-3
um04128	Isopenicilina N epimerasa	-3
um10073	<i>LMBA</i> Proteína condensadora de lincomicina	-3.4
um11338	<i>FER8</i> – Proteína Hipotética	-3.6
Segunda Sección: Proteínas de Membrana		
um04111	Dioxigenasa anclada a GPI	26.5
um02234	Proteína de Membrana	4.6
um04737	<i>PPG4</i> Proteofosfoglicano	4.1
um10525	Proteína de anclaje a pared celular	3.7
um11169	<i>PPG4</i> Proteofosfoglicano	3.2
um11978	Proteína integral de membrana	2.7
um00427	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	2.6
um10475	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	2.4
um03918	Familia HPP	2.3
um02072	Proteína Transmembranal	2.3
um01013	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	-2
um00270	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	-2
um02765	<i>PPG5</i> - Proteofosfoglicano	-2.2
um04526	<i>PPG5</i> - Proteofosfoglicano	-2.3
um10672	Proteína de anclaje a pared celular	-2.5
um12149	<i>PPG5</i> - Proteofosfoglicano	-2.5
um01995	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	-2.5
um11670	<i>PPG4</i> - Proteofosfoglicano	-2.5
um03365	<i>PPG5</i> - Proteofosfoglicano	-5.6
um01077	<i>PPG1</i> - Proteofosfoglicano	-6.2
um00384	<i>PPG3</i> - Proteofosfoglicano	-7.4
um11183	Proteína de anclaje a GPI	-12.9

Tabla 21. Enzimas

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um05802	Ferroxidasa de superficie celular	240.2
um02379	Xilosilfosfotransferasa	101.6
um11244	<i>fre4</i> - Reductasa Férrica	63.9
um04247	Precursor Colinesterasa precursor	43.4
um02157	Dominio de unión a FAD	40.2
um06487	Enzima de unión a AMP	24.2
um02395	Reductasa Férrica	21.6
um12340	C-4 metilsterol oxidase	18.7
um06332	Egl1 - Endoglucanasa 1	17.2
um01433	Fer4 - Enoil-CoA hidratasa	15.9
um06158	Glutaminasa A	15.6
um03023	Ribonuclease Trv	13.8
um06350	precursor Endo-1,4-beta-xilanasas A	11.7
um11763	Aceilxilan esterasa	10.9
um10070	Benzoato 4-monooxigenasa	7.9
um10581	Alcohol deshidrogenasa clase III cadena chi	7.6
um03665	Aldehído deshidrogenasa familia 7 miembro A1	7.4
um03398	Transesterasa	7.3
um05967	Salicilato 1-monooxigenasa	6.2
um01858	Arginasa	6.1
um11604	Precursor I del componente transmembranal de la reductasa férrica	6.1
um00965	Dioxigenasa 1 de unión a carotenoides	5.9
um06079	Deoxiribodipirimidina foto-liasa PHR	5.9
um05960	Oxidoreductasa con el dobles de Rossmann de unión a NAD	5.9
um05979	Reductasa Férrica	5.6
um10444	<i>NIT1</i> - Nitrilasa	5.5
um02753	Dominio Caleosina	4.8
um01465	Xilosilfosfotransferasa	5
um10055	Gamma-glutamyltransferasa	5.1
um02820	Alfa beta hidrolasa	4.9
um03415	Probable Monooxigenasa	4.7
um12007	Celulasa	4.7
um11430	<i>CSRI</i> -Proteína de transferencia de Fosfatidilinositol	4.5
um10188	L-Ornitina N5-oxigenasa	4.4
um01922	2-nitropropano dioxigenase	4.4
um05507	Oxidoreductasa	4.4
um01854	Fosfatasa similar a PhoD	3.9
um04114	<i>PHO8</i> – Fosfatasa alcalina Vacuolar reprehensible	4.3
um12262	4-Coumarato-CoA ligasa	4.3
um05229	Precursor de Beta-manosidasa	4.1
um03997	<i>MET1</i> - Siroheme sintasa	4.1
um03169	<i>CAR2</i> - Ornitine aminotransferasa	3.7
um11172	<i>FEN2</i> - Pantotenato permeasa	3.8
um01847	Histidinolfosfatasa	3.7
um00061	Proteína de transporte de Quinato	3.6
um04358	Aciltransferasa	3.6
um06071	Para-nitrobenzil esterasa	3.6
um12104	Síntesis de Cobalamina	3.5
um01604	Endo-1,4-beta-manosidasa	3.5

Tabla 21. Enzimas continuación

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um06157	Precursor de Esferulina 4	3.2
um05170	Formato deshidrogenasa	3.2
um04348	Fenol 2-monooxigenasa	3
um11879	Amidasa general	2.9
um04309	Precursor de Alfa-L-arabinofuranosidasa	2.8
um04042	Alfa/beta hidrolasa	2.9
um03485	Fenol acida carboxilasa	2.9
um12059	<i>RCLI</i> – Ciclasa fosfatasa terminal de ARN	2.8
um02305	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	2.8
um02185	Peptidilprolil isomerasa (ciclofilina)	2.8
um11513	beta-lactamasa	2.7
um04503	Precursor Alfa-N-acetilgalactosaminidasa	2.7
um10868	Oxidoreductasa	2.7
um06063	<i>GAD1</i> - glutamato descarboxilasa	2.7
um11695	2-epi-5-epi-valiolona sintasa	2.5
um11364	N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa	2.5
um03689	Citosina deaminasa	2.6
um11373	Dominio tioredoxina similar a DSBA	2.5
um06454	Manosa-6-fosfato isomerasa	2.4
um01808	<i>ERV2</i> – Sulfidril oxidasa dependiente de flavina	2.5
um00837	Alfa-L-arabinofuranosidasa I	2.3
um02508	<i>IAD1</i> - indol-3-acetaldehide deshidrogenasa	2.2
um01718	Glucosamina-6-fosfato isomerasa	2.2
um10004	Deshidrogenasa/reductasa	2.2
um05626	2OG-Fe(II) oxigenasa	2.2
um01439	<i>FER9</i> – relacionado a <i>FRE3</i> – Reductasa férrica, reduce la unión de hierro-sideroforo	2.2
um10756	Monooxigenasa	2.1
um03126	Reductasa/Deshidrogenasa	2.1
um00302	N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol de-N-acetilasa	2.1
um04482	Biosíntesis de toxina	2.1
um02942	<i>MET16</i> - 3`-fosfoadenililsulfato reductasa	2
um02580	S-adenosilmetionina dependiente de metiltransferasas	2
um03411	Endo-1,4-beta-xilanasa	2
um04156	<i>LEU4</i> - 2-isopropilmalalato sintasa	-2
um01285	<i>AP6A</i> - diadenosina hexafosfato hidrolasa	-2
um03411	endo-1,4-beta-xilanasa	-2
um02580	S-adenosilmetionina dependiente de metiltransferasas	-2
um04787	<i>GLY1</i> - L-treonina aldolasa, baja especificidad	-2.1
um12198	<i>IPT1</i> - Inositolfosphotransferasa, involucrada en la síntesis de manosa-(inositol-P)2-ceramida (M(IP)2C)	-2.1
um11932	metilcrotonil-CoA carboxilasa, precursor mitocondrial	-2.1
um10735	2-oxoisovalerato dehidrogenasa subunidad alfa, precursor mitocondrial	-2.1
um11400	Tiamina biosintética	-2.1
um12183	Fosfatidilinositol (3)- proteína de unión a fosfato	-2.1
um10248	Aldosa 1-epimerasa	-2.2
um10976	Metiltransferasa (encontrado en plantas)	-2.2
um10967	Sintetasa carbamoil fosfato específica de arginina	-2.2
um11150	Permeasa de Uracilo	-2.2
um04442	DED81 – Asparaginil-ARNt-sintetasa	-2.2
um10385	isoenzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa	-2.3
um11572	Rab geranilgeranil transferasa, subunidad alfa	-2.3
um04578	Tioredoxina	-2.4

Tabla 21. Enzimas continuación.

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>		
Id	Descripción	Cambio de expresión
um04707	Asparaginasa 2	-2.4
um04157	Lisina metiltransferasa	-2.4
um03149	Molibdenum cofactor sulfurasa	-2.4
um00572	<i>SRAP</i> – Adhesina rica en serinas para platelets	-2.5
um03476	<i>MAOC</i> – involucrado en la síntesis de monoamina oxidasa	-2.5
um02010	familia II 2-quetto-3-deoxi-D-arabino-heptuloseonato 7-fosfato sintasa	-2.5
um05671	precursor Acetilornitina aminotransferasa	-2.5
um02864	precursor Acetilcolinesterasa	-2.5
um02792	<i>CYS4</i> - cistationin beta-sintasa	-2.5
um10996	alfa/beta hidrolasa	-2.6
um04873	<i>LYS12</i> - Homo-isocitrato deshidrogenasa	-2.6
um11344	nitrilotriacetato monooxigenasa componente B, flavoproteína oxigenasa	-2.6
um06507	Alfa/beta hidrolasa	-2.6
um02390	alfa,alfa-trehalosa-fosfato sintasa, subunidad 115 KD	-2.7
um05676	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa 1	-2.7
um01829	precursor alfa-L-arabinofuranosidasa I	-2.7
um10002	NADH-dependiente de flavina oxidoreductasa	-2.8
um11449	Fenol 2-monooxigenase	-2.8
um11022	<i>SRY1</i> - 3-hidroxiarspartato deshidratasa	-3
um10104	<i>GCY1</i> –proteína inducida por galactosa, de la familia aldo/quetto reductasa	-3
um11720	Cistationina beta-liasa	-3
um02592	2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa	-3.1
um11649	D-amino acido oxidasa	-3.2
um03011	Familia Amidohidrolasa	-3.2
um05170	Formato deshidrogenasa	-3.2
um05989	3-oxoadipato enol-lactona hidrolasa	-3.3
um05971	Glutamina sintetasa	-3.3
um02811	2,3-diaminopropionato amonio-liasa	-3.4
um00723	<i>RDS1</i> - Proteína de respuesta a estrés	-3.4
um01951	Acetiltransferasa, familia GNAT	-3.6
um11778	Proteína FldA, actúa como isomerasa trans-aconitato a cis-aconitato	-3.7
um10787	<i>FUM1</i> - fumarato hidratasa	-3.8
um00090	Oxidoreductasa	-4
um01992	Amidohidrolasa	-4.4
um01804	Quinurenine/alfa-aminoadipato aminotransferasa precursor mitocondrial	-4.4
um01710	N-carbamoil-L-amino acido hidrolasa	-5.8
um11528	NADH oxidoreductasa similar a amid (respuesta a estrés oxidativo, inducción de apoptosis en <i>S. cerevisiae</i> AIF1)	-5.9
um11940	<i>URA4</i> – Dihidroorotasa, cataliza el tercer paso enzimático en la biosíntesis de novo de pirimidinas	-6
um03728	Indoleamina 2,3-dioxigenasa	-6.8
um03417	<i>AMD1</i> - probable acetamidasa	-7.3
um06084	Proteína transmembranal FUN34	-23.6

Tabla 22. Lista de genes con funciones desconocidas.

Genes expresados en la cepa Silvestre de in <i>U. maydis</i>							
ID	Cambio de expresión	ID	Cambio de expresión	ID	Cambio de expresión	ID	Cambio de expresión
um04248	155.5	um11269	4.8	um03116	2.9	um05596	2.1
um06335	122.4	um12173	4.7	um10789	2.9	um06097	2.1
um00027	61	um10692	4.7	um01114	2.8	um00062	2.1
um01524	49.5	um02132	4.6	um02299	2.8	um00043	2.1
um01823	29	um02117	4.6	um10201	2.8	um04575	2
um02298	26.3	um02701	4.5	um10530	2.7	um04427	2.2
um06084	23.6	um01351	4.5	um04891	2.7	um11843	2.2
um04027	19.9	um05493	4.4	um04525	2.7	um11444	2
um00358	19.4	um05226	4.3	um10416	2.7	um10883	-2
um00831	17.9	um06504	4.3	um00664	2.7	um01841	-2
um03392	16.8	um06359	4.3	um05560	2.7	um11175	-2
um10148	15.3	um05301	4.2	um01052	2.7	um10205	-2
um05976	12.9	um04385	4.2	um06485	2.6	um10566	-2.1
um00970	12.3	um06497	4.1	um03649	2.6	um11573	-2.1
um11654	11.6	um00262	3.8	um05276	2.6	um12275	-2.2
um00063	11.5	um00598	3.7	um12121	2.6	um03473	-2.2
um12316	10.3	um04490	3.7	um12308	2.6	um11458	-2.3
um11984	9.3	um11131	3.7	um11251	2.6	um02687	-2.3
um03585	8.8	um02251	3.5	um03713	2.6	um04832	-2.3
um03294	8.6	um00221	3.5	um02821	2.5	um00628	-2.3
um01985	8.4	um11229	3.4	um00847	2.5	um01389	-2.4
um03664	8	um02844	3.4	um01913	2.5	um02901	-2.4
um11051	7.8	um10218	3.3	um11376	2.5	um01900	-2.5
um11406	7.6	um12315	3.2	um03932	2.5	um00342	-2.5
um02238	7.3	um02080	3.2	um01251	2.5	um03547	-2.6
um05573	7.1	um03196	3.2	um11063	2.4	um00132	-2.6
um00229	7	um11002	3.2	um11306	2.4	um11524	-2.9
um11020	6.6	um02540	3.2	um03909	2.4	um03166	-3.1
um00719	6.3	um00782	3.1	um04528	2.4	um06221	-3.3
um05781	6.3	um02332	3.1	um00927	2.3	um03572	-3.6
um04728	6.1	um01977	3.1	um05583	2.3	um03105	-3.8
um03039	5.9	um04933	3.1	um02529	2.3	um11548	-4
um06077	5.5	um00013	3.1	um12093	2.3	um11933	-5.2
um11116	5.4	um10208	3	um10342	2.3	um04696	-6.3
um06116	5.3	um02983	3	um04992	2.3	um12187	-7.7
um06439	5.2	um01778	3	um03638	2.3	um11080	-9.7
um03397	5.2	um11203	3	um00230	2.2	um02877	-47.2
um05046	5.1	um02416	2.9				

9.6 Validación de las micromatrices por qRT-PCR.

Los análisis de datos de las micromatrices de alta densidad (Un canal) involucran la determinación, de un promedio de 10 replicas por gen. Procedimos a validar nuestros datos mediante qRT-PCR, para eso seleccionamos al azar 13 genes y procedimos a determinar sus valores de transcripción usando primers específicos (ver Material y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10, a su vez en las tablas se compara los niveles de expresión obtenidos, es posible observar una buena correspondencia entre esta técnica y los datos obtenidos por las micromatrices.

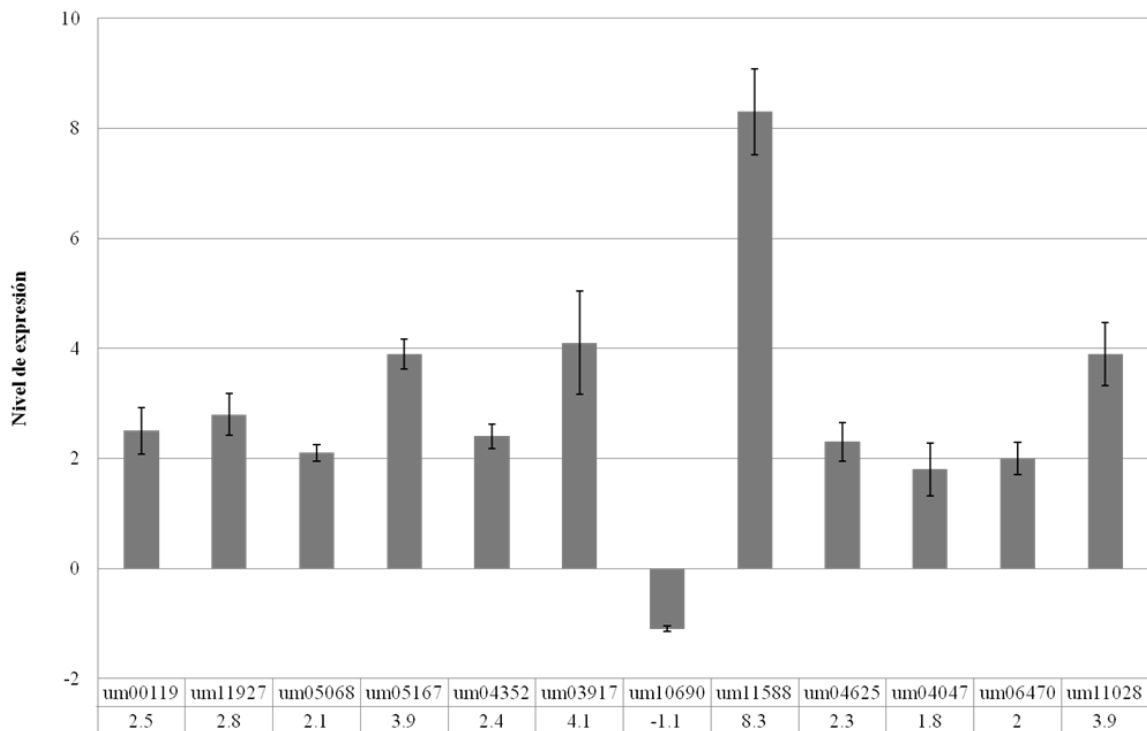


Figura 10. Nivel de expresión obtenida de valores CT obtenidos de los análisis de qRT-PCR, se utilizo el gen um03049 como gen de referencia.

9.7 Análisis de de la expresión de Genes

Posterior a la caracterización *in silico* de los genes expresados diferencialmente en las tres condiciones, se seleccionaron genes cuya expresión diferencial pudiera estar involucrada en el fenotipo ya reportado en investigaciones anteriores, se seleccionaron genes que estuvieran involucrados en la secreción de polisacárido, ciclo celular, diferenciación y desarrollo (Tabla 24). Esto nos llevo a seleccionar 30 genes, basándonos para esta selección en la presencia del transcrito en los 3 diferentes pH's mediante RT-PCR (Figura 13), en conjunto con los patrones de expresión obtenidos de la micromatriz de los genes seleccionados (Tabla 23), y la gráfica de expresión de genes seleccionados (Figura 11), enfocándonos en su expresión diferencial, dependiendo de la presencia o ausencia del factor transcripcional Rim101/PacC y del pH, con patrones de expresión para estos genes pH específico, seleccionando los genes um01165, um01742, um02175, um11028, um06255, um03347 y el um03696.

Tabla 23. pH de expresión de Genes seleccionados

ID	Niveles de expresión	pH de expresión	Gen
um10215	-2.3	pH3	<i>RCCI</i>
um03696	0.5	pH3	<i>SIZ1</i>
um10690	-3.5	pH3	División celular
um02175	4.1	pH3	Fitasa 3 A
um02416	-2.1	pH3	<i>BZZ1</i>
um06255	3.2	pH3	Proteína de pared celular
um11438	-2	pH3	Dedo de Zinc
um03412	-2.2	pH3	Policetido ciclasa
um01742	-2.4	pH3	Ensamblaje del uso mitótico
um01165	-2.5	pH3	Glucano 1-3 β Glucosidasa
um05781	-8.2	pH3	Ciclina
um03366	2.1	pH7	Tubulina-tirosina ligasa
um11713	2.2	pH7	<i>YCS4</i>
um04335	2.2	pH7	Unión a ciclina
um04187	3.0	pH7	Segregación cromosómica
um04352	2.3	pH7	<i>MOB1</i>
um03347	2.0	pH7	<i>NUM1</i>
um01445	2.4	pH7	Replicación del ADN
um04372	2.3	pH9	<i>DYN2</i>
um03167	2.7	pH9	Dedo de zinc endotelial
um04658	2.3	pH9	<i>WD40</i>
um04835	2.9	pH9	<i>WHI3</i>
um11028	5.2	pH9	<i>WHI2</i>
um04047	2.1	pH9	<i>MAD2</i>
um10529	5.9	pH9	<i>PCL12</i>
um00620	2.1	pH9	Subunidad de Dad2
um10442	3.7	pH9	<i>SPC25</i>
um05167	3.9	pH9	Similar a BC10
um00119	2.3	pH9	Proteína FR
um03917	2.1	pH9	<i>CRUI</i>

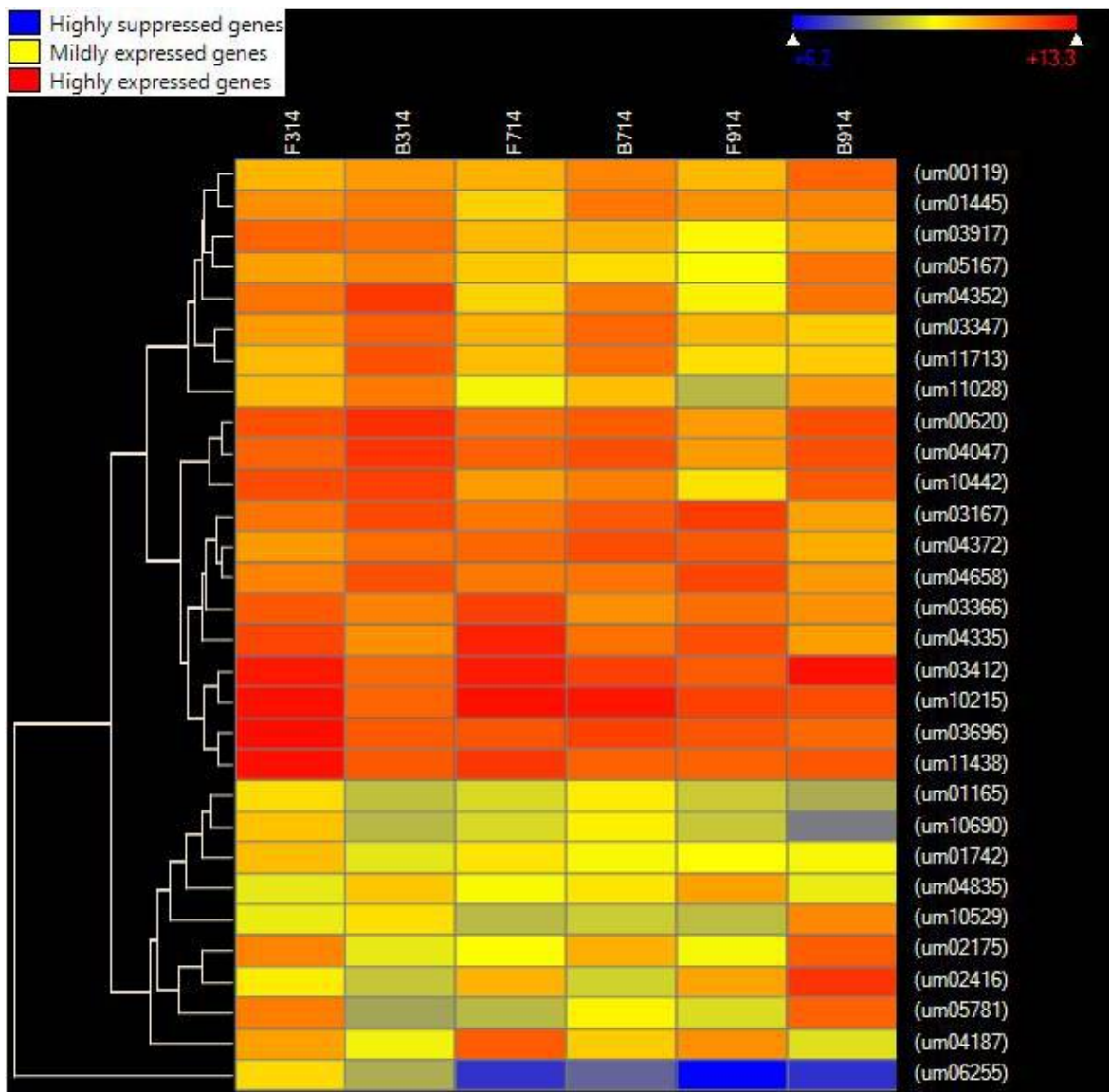


Figura 11. Gráfica de expresión de genes seleccionados. Gráfico indicando los niveles de expresión o represión de los genes seleccionados para análisis mediante RT-PCR. La tonalidad azul indica baja expresión, la tonalidad amarilla expresión intermedia y el rojo alta expresión comparada contra la media de expresión de los 6 conjuntos. La primer línea con los nombres e.g. F314, B314, indica la condición en la cual se analiza el nivel de expresión de la columna, la letra indica la cepa F para la silvestre, B para la mutante, el primer número indica el pH de expresión y los últimos dos, la hora de extracción del ARN después del inóculo. A la izquierda se encuentran los códigos de identificación de los genes y a la derecha se indica la relación en los niveles de expresión.

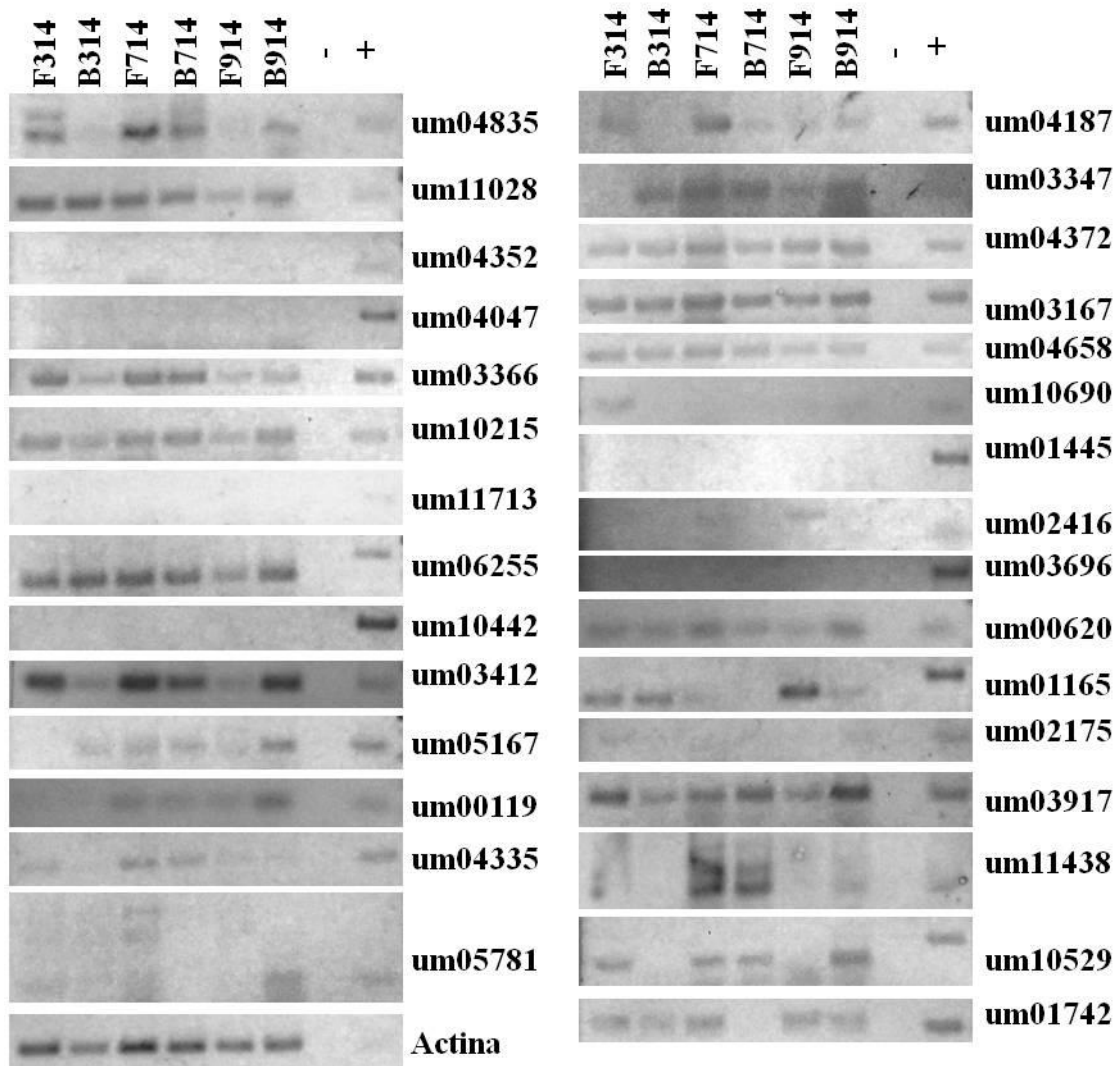


Figura 12. Análisis de expresión. Retro amplificación de un fragmento de un rango de 101pb a 227pb. El control negativo es sin ARN y control positivo es ADN genómico.

De los cuales se realizaron 2 construcciones plásmidicas para realizar mutantes nulas en *Ustilago maydis*, mediante la técnica DelsGate de Invitrogen (ver Material y Métodos), corroboradas utilizando una digestión enzimática con PstI y amplificación de los segmentos del promotor y terminador insertados en el plásmido (Fig 17 C). Se procedió a realizar la transformación de la cepa FB2 de *U. maydis* del gen um03696 (Cantú-Reyes, *et al.*, Datos no publicados; Tabla 24), con lo que se buscara corroborar su involucramiento en la adaptación a pH ácido.

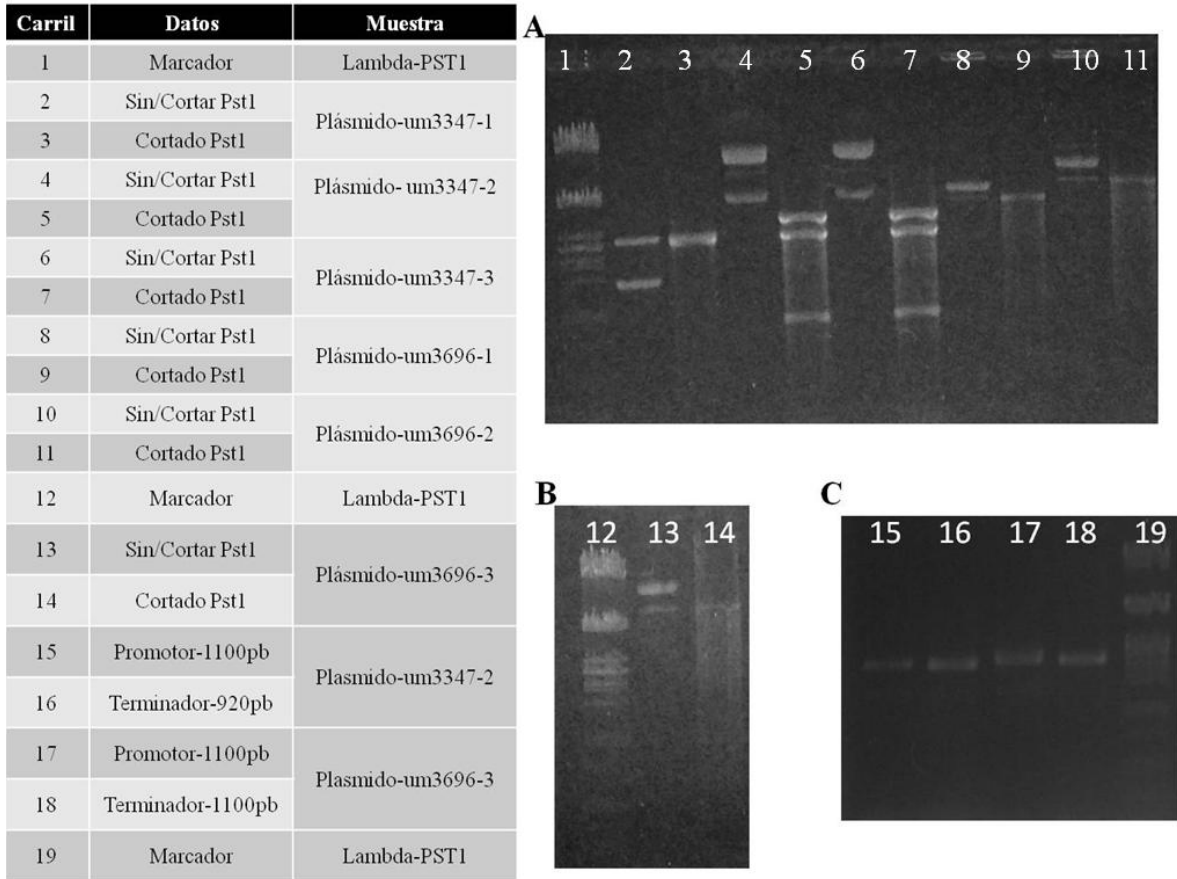


Figura 13. Corroboración de presencia de insertos en los plásmidos. Cortes enzimáticos de los plásmidos um3347-1, 2, 3 y um3696- 1, 2 con la enzima Pst1 (A y B). Amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000pb en los plásmidos respectivos.

Tabla 24. Plásmidos para deletar genes

Gen	Construcción	Corroboración de la construcción	pH/
um01165	En proceso	No	pH 3
um01742	En proceso	No	pH 3
um02175	En proceso	No	pH 7 Fold 2.2
um11028	En proceso	No	pH 7 Fold 2.2, pH 9 Fold 5.2
um06255	En proceso	No	pH 3
um03347	Realizada	PCR-Digestión enzimática	pH 7, Fold 2
um03996	Realizada	PCR-Digestión enzimática	pH 3

10. DISCUSIÓN

Los Basidiomycota no poseen todos los miembros de la vía Pal/Rim descritos en Ascomycota (Cervantes-Chavez *et al.*, 2010; Peñalva *et al.*, 2008), pero éstos regulan diversas funciones compartidas, incluyendo la secreción de proteasas, polisacáridos y resistencia a estrés (You y Chung, 2007; Arechiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005). Nuestro estudio revela una diversidad de genes bajo el control de la vía Pal/Rim involucrados en la adaptación de *U. maydis* a condiciones alcalinas. Nuestros resultados de los análisis de micromatrices nos permiten explicar la función de la vía Pal/Rim involucrada en la adaptación a pH alcalino a nivel molecular.

Estos resultados pueden explicar el fenotipo de la mutante $\Delta rim101$ de *U. maydis* previamente descrito, por lo que proponemos cuatro aspectos de la función celular que son controladas por Rim101/PacCp: 1) Transporte de iones y nutrientes; 2) Síntesis de la pared celular; 3) Operación del sistema endomembranal; 4) Factores Transcripcionales, Desarrollo celular y Ciclo de vida. Estos aspectos son discutidos a continuación.

10.1 Transporte de Iones y Nutrientes

A nivel global los resultados indican la adaptación de transportadores y “permeasas”, regulados por Rim101/PacCp en *U. maydis*, para la toma de diferentes tipos de nutrientes, incluyendo iones, carbohidratos, oligopeptidos, amino ácidos, aniones orgánicos y metabolitos como nitrato, tartrato y el ácido quinaco, también llamado quinato, el cual puede ser utilizado como una fuente de carbono (Wheeler *et al.*, 1996; Gan *et al.*, 2013). Esta es una adaptación que puede reflejar el efecto en el pH externo alcalino en la

disposición de nutrientes, similar a lo descrito en *Fibrobacter succinogenes* y *Lemna gibba*, donde el pH alcalino extracelular afecta la entrada de glucosa (Martin, 1992; Novacky *et al.*, 1980), pero a su vez involucra la activación de proteínas sideróforas y peroxisomales, cuya regulación en su permeabilidad, síntesis y transporte por Rim101/PacCp ha sido previamente descrito en *C. neoformans* y *A. nidulans* (Eisendle *et al.*, 2004; O'meara *et al.*, 2010)

Asímismo detectamos la regulación positiva de un sistema vacuolar intercambiador de protones/calcio y genes con similitud a *Ena2* que media los flujos de Na⁺ y K⁺ en el retículo endoplásmico y otras endomembranas. Este sistema está relacionado a la sensibilidad a estrés por sodio en *U. maydis*, el cual a sido ligado con el estrés osmótico (Ruiz y Ariño, 2007; Begoña *et al.*, 2012). Esto sugiere que el medio alcalino puede ser percibido por el organismo como un estrés osmótico que podría desencadenar una respuesta adaptativa mediante la regulación de los transportadores de drogas y metales. Un mecanismo semejante ha sido descrito en *S. cerevisiae*, donde la mutante $\Delta rim101/pacC$ incrementó la resistencia a níquel y cadmio a pH 7, y la supervivencia a bajas concentraciones de zinc (Ruotolo *et al.*, 2008; Nort *et al.*, 2012).

La vía Pal/Rim regula positivamente los genes que codifican dos acuaporinas 3, similares a las involucradas en la adaptación al pH extracelular y variaciones en las concentraciones iónicas en *Xenopus oocytes* y *Tobacco sp.* (Németh-Cahalan y Hall, 2000; Fischer y Kaldenhoff, 2008), y también al gen *Rep1p*, que reduce la tensión superficial en las hifas de *U. maydis* (Teertstra *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que la regulación positiva de las acuaporinas puede ser en respuesta a la baja disposición de agua libre, como resultado de la alta concentración de osmolitos. Este sistema permitiría la entrada de agua en puntos específicos de la célula, mientras se regulan los transportadores de iones, drogas,

metales, y diferentes compuestos, permitiendo la desintoxicación celular, así como la correcta entrada de estos compuestos, mediante la regulación de transportadores específicos.

10.2 Pared Celular

Una característica de las mutantes $\Delta rim101$ de *U. maydis* y *C. neoformans*, es la secreción de una 1,3- β -glucana lineal, como resultado de las alteraciones en la síntesis de glucanas ramificados; lo que interfiere con la correcta síntesis de la pared celular (O'Meara *et al.*, 2010; Fonseca-García *et al.*, 2011), La regulación positiva de los genes que codifican a las glucana sintasas, las glucanasas, y las enzimas involucradas en la unión de las 1,3 β -glucanas con las 1,6- β -glucanas, apoya esta hipótesis. En *C. neoformans* se ha especulado que la formación de una cápsula de polisacárido puede ser afectada por la regulación del gen *CAP59*, involucrado en su formación que es des-regulada en mutantes que carecen de algún miembro de la ruta Pal/Rim (O'meara *et al.*, 2010). Adicionalmente nosotros encontramos una regulación positiva del gen *HUTI*, involucrado en el transporte de la UDP-galactosa al lumen de Golgi. Este gen es importante en una etapa temprana en la formación de la cápsula de polisacárido de *C. neoformans* (Bose *et al.*, 2003). Todo esto, en conjunto con la regulación de los genes que codifican proteínas de la pared y de la membrana celular, proteínas asociadas a glucanas que pueden poseer un diferente patrón de glicosilación, y los cambios en la regulación de los genes codificantes de las cinasas involucradas en la integridad, y biosíntesis de la pared celular (antes discutidos), dan indicios los mecanismos de cambios en la estructura de la pared celular en respuesta al

cambio de pH. Esta respuesta estaría orquestada por la vía Pal/Rim, mediante la función del gen *Rim101/PacC*.

10.3 Transporte intracelular de proteínas a vesículas y vacuolas, y su secreción

Existen precedentes sobre una cercana interacción de vacuolas y el sistema de endosomas por parte de Rim101. Nuestros resultados muestran la regulación de genes involucrados en el transporte de proteínas hacia el RE, Golgi, vesículas y vacuolas, y su secreción, así como la regulación negativa de los genes que regulan proteínas SNARE (um11219, um11485), receptores de fusión de membrana que juegan un papel en el tráfico vesicular (Ungar y Hughson, 2003). Se sabe que estos procesos son dependientes del pH del lumen (Maeda y Kinoshita, 2010; Hung y Chang, 2011) y por ello son mecanismos probablemente afectados por el cambio en el pH del medio, lo que en parte podría explicar el fenotipo observado de secreción de un polisacárido e inestabilidad de la membrana en las mutantes *rim101/pacC* de *U. maydis* (Arechiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005). Lo anterior se hipotetiza, debido a la alcalinización del citoplasma en 0.4 unidades de pH que ocurre cuando la cepa mutante de $\Delta palB/rim13$ de *U. maydis* es transferida desde un pH ácido a un pH alcalino (Fonseca-García *et al.*, 2012). Esta alcalinización puede deberse a una desregulación de los probables homólogos del gen *VMA3* (V-ATPasa) de *S. cerevisiae* (*Um05503*) y de una isoforma de del intercambiador de Na^+/H^+ (NHE; *Um05132*). Ambos genes se han involucrado en el control de los niveles del pH del Golgi, mediante la regulación de la concentración de cationes en la célula. Se ha descrito que estos genes están involucrados en la alcalinización vacuolar de 6.0 a 6.4 y en una acidificación del pH

del citosol de 6.0 a 5.5, afectando la organización y transporte de proteínas (Nakamura *et al.*, 2005; Martínez-Muñoz y Kane, 2008; Hung y Chang, 2011).

Esta correlación del pH con las funciones vacuolares se ve acentuada por la regulación negativa de *PALC* (Um04392) y *BROI* (um00505) por Rim101p. PalCp es el único miembro de Pal/Rim regulado por Rim101 en esta condición, mientras que Bro1p está involucrado en el agrupamiento de las proteínas, y a su vez en un enlace entre la ruta Pal/Rim y la ruta ESCRT. Se ha descrito que su regulación negativa incrementa la localización endosomal de palAp dependiente de pH alcalino lo que refleja su asociación entre la respuesta a pH y la endocitosis (Tilburn *et al.*, 2005; Blanchin-Roland *et al.*, 2005; Odorizzi *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2010).

10.4 Factores Transcripcionales, Desarrollo celular, ciclo de vida

Los genes que codifican diversos miembros de la ruta de las MAPK son regulados positivamente por Rim101p, incluyendo *CWH43*, *CBK1*, *KSS1*, *BAG7*, *RHO3*, *BEM2*, *MPKA*, *RAX1*, y *TEM1*, junto con el gen de salida de la mitosis *mob1*, involucrado en la integridad, biogénesis y biosíntesis de la pared celular. Estos genes junto con rho4p tienen un papel en la gemación bipolar y dirigen la organización del citoesqueleto de actina (Imai *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2011; Wang & Bretscher, 1995). La pérdida de estas funciones probablemente está relacionada con las alteraciones morfológicas observadas en la mutante de $\Delta rim101/pacC$ de *U. maydis* a pH alcalino, en la que las células no se separan de forma correcta después del proceso de gemación (Aréchiga-Carvaja & Ruiz-Herrera, 2005). Las funciones anteriormente mencionadas han sido ligadas a la vía ESCRT en el establecimiento de los patrones de gemación y formación del

anillo de quitina durante la división celular, la cual junto con Rho3p y Bem2p, Cbk1p regula el crecimiento celular polarizado (Imai et al., 1996; Wang & Bretscher, 1995; Wess et al., 2002; Gomez et al., 2009).

La adaptación del citoesqueleto de actina al pH alcalino, parece ocurrir mediante la interacción de rho4p con bem2p, un mecanismo consistente con la sobre-regulación de sus genes respectivos por Rim101/PacC (Gong et al., 2012). El gen *CWH43*, regulado negativamente en nuestro estudio, codifica una probable cinasa que puede vincularse con la regulación de la síntesis de glucanas; su ausencia causa la secreción de proteínas de la pared celular y de 1,6- β -glucanas en *S. cerevisiae* (Martin-Yken et al., 2001). Este defecto activa kss1p, que está involucrado en el apareamiento y crecimiento filamentoso en *S. cerevisiae* (Yang et al., 2009).

Rim101/pacCp fue identificado como un regulador del gen de meiosis *IME1* en *S. cerevisiae* (Su y Mitchell, 1993) y, como era de esperarse, interacciona con genes que codifican reguladores del ciclo celular como *WHI2* (um11028), *WHI3* (um04835), *MAD2* (um04047), y *ESA1* (um05240). Los genes *WHI2* y *WHI3* son regulados positiva y negativamente, respectivamente; Whi2p reprime a *WHI3*, y junto con mad2p, detienen el ciclo celular (Li y Murray, 1991; Tsuchiya et al., 2011). Whi3p regula la etapa G1 y el crecimiento filamentoso, su sobre-expresión conlleva a la formación de células largas en *S. cerevisiae* (Garí et al., 2001), un fenotipo observado en la mutante de $\Delta rim101$ de *U. maydis* (Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005). Estos datos sugieren que la detención del ciclo celular probablemente permite la adaptación de la célula al cambio de pH, mediante la modulación de los sistemas involucrados en la reparación del probable daño, la elongación e inicio de la traducción. Una vez que el sistema ha sido adaptado al estrés, esa1p permite el re-inicio de la progresión del ciclo celular (Clarke et al., 1999).

Como ya se mencionó, Rim101/pacC regula la expresión un gran número de genes, ya sea directamente, o indirectamente a través de su control regulatorio de otros factores de transcripción. Algunos de ellos pudieron ser identificados por sus dominios funcionales (dedos de zinc, Gal4, sitio de unión a promotor). El resto fue posible dividirlo en tres grupos, basados en sus probables funciones: 1) Regulación de la penetración de nitrato mediante la regulación negativa de um02808 y um01908, probables homologos de NirAp y Aab-1p, en conjunto estas características indican una reducción del α -cetoglutarato y producción de amonio, esto último relacionado con la represión de *NIRA*, permitiendo la penetración de nitrato, realizado por el producto del gen um11105 (Burger *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1998; Frías y Flores, 2010). 2) Regulación transcripcional de diversos componentes de la maquinaria transcripcional. 3) Metabolismo de Carbohidratos mediante la regulación positiva de um04999 (*Rsd2*), que contribuye a la activación de la gluconeogénesis sobre la glicolisis, y um03568 (*AlcR*) que permite el crecimiento en etanol de *S. cerevisiae* y *A. nidulans* (Kumlmberg *et al.*, 1993; Soontorngun *et al.*, 2007). Estos factores pueden estar involucrados en la regulación de los transportadores de carbohidratos y genes relacionados con el metabolismo de glucanas.

11. CONCLUSIÓN

Este trabajo nos permitió identificar el mecanismo por medio del cual la vía Pal/Rim, a través del factor de transcripción Rim101/pacCp regula las funciones celulares necesarias para la adaptación de *Ustilago maydis* a un pH alcalino, usando como estrategia la comparación del transcriptoma de la cepa diploide con el de una mutante $\Delta rim101/pacC$. Los resultados revelan que ésta vía regula un gran número de genes tanto de forma directa como indirecta a través de otros factores de transcripción. y nos proporcionan una nueva perspectiva de las funciones reguladas por Rim101 (PacC).

Entre las funciones reguladas por esta vía, encontramos su involucramiento en la adaptación de una vasta cantidad de transportadores, permeasas y canales iónicos. Esto explica la susceptibilidad a iones mostrada por mutantes en los genes de la vía, incluyendo a $\Delta rim101PacC$, y también sugiere que esta susceptibilidad a iones puede ser también debida a la des-regulación de exportadores de compuestos tóxicos y metales pesados. La regulación de los genes que codifican transportadores de nutrientes sugieren que a su vez el pH alcalino afecta su disposición, siendo regulados positivamente por la vía Pal/Rim para contrarrestar dicho efecto, y además mantener los niveles internos de H_2O , evitando su salida.

Los análisis también muestran la cercana relación de esta ruta Pal/Rim, con la ruta ESCRT, coadyuvando con el transporte vesicular desde y hacia el RE, el aparato de Golgi y vacuolas, así como hacia el exterior de la célula, y como los transportadores de protones mantienen el pH del citoplasma y el lumen del sistema endomembranal.

Anteriormente se han demostrado alteraciones en la pared celular de mutantes nulas de la ruta Pal/Rimst. Esto se debe a que Rim101/PacC regula genes involucrados en la síntesis de componentes de la pared celular y la membrana así como la glicosilación de las proteínas exo-celulares, indicando su importancia en la adaptación de pared y la membrana celular al pH alcalino.

Rim101/PacC regula el ciclo celular en cada una de sus fases, desarrollo fúngico, así como sus procesos de apareamiento, expresando factores de crecimiento y diferenciación (e.g. formación del cuerpo fructífero). También está involucrado en el procesamiento del ADN y ARN, desde la reparación, recombinación y transcripción, estimulando la metilación, restricción del ADN, y procesos involucrados en la terminación de la transcripción, y modificación mientras se reprime la interacción de los potenciadores y silenciadores, procesamientos postranscripcionales y traduccionales, así como regulando una diversidad de factores transcripcionales, lo cual sugiere que Rim101/PacC regula la expresión de genes de dos formas, mediante la regulación directa del gen y de forma indirecta a través de la regulación de factores transcripcionales y cinasas.

12. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados muestran como ocurre la adaptación global de los mecanismos de respuesta celulares al medio circundante, específicamente el cambio de pH, en un organismo modelo, el hongo *Ustilago maydis*, mediante la operación de una vía de transducción de señales denominada Pal/Rim. Futuros estudios se deberán enfocarse en analizar como es que los componentes de la vía perciben los cambios en el pH externo, y cuáles son los componentes que cumplen el papel de transducción de la señal hacia el complejo localizado en los endosomas. Adicionalmente es necesario comprender los mecanismos moleculares mediante los cuales la vía Pal/Rim intercambia información con otras vías de transducción de señales de la célula. Ello nos permitirá, en un futuro cercano, emplear mutantes nulas de genes involucrados en procesos clave regulados por la vía Pal/Rim y determinar su función en la adaptación de la célula a los cambios, no solo de pH, sino también diversas formas de estrés que pueden sufrir los organismos.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguan, K., Cott J., See C.G., y Sarkar, N.** 1994. Characterization and chromosomal localization of the human homologue of a rat AMP-activated protein kinase-encoding gene: A major regulator of lipid metabolism in mammals. *Gene* **149**: 345-350.
2. **Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F., y Calera, J.A.** 2010. *Aspergillus fumigatus* Survival in Alkaline and Extreme Zinc-Limiting Environments Relies on the Induction of a Zinc Homeostasis System Encoded by the *zrfC* and *aspf2* Genes. *Eukaryotic Cell*. **9**(3):424-437
3. **Arst, Jr. H.N., Bignell, E., y Tilburn, J.** 1994. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 787-790.
4. **Arechiga-Carvajal, E.T. y Ruiz-Herrera, J.** 2005. The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell*, **4**(6): 999-1008.
5. **Ashe, M.P., Long, S.K. y Sachs, A.B.** 2000 .Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*; **11**:833-848
6. **Baek, Y.U., Li, M., y Davis, D.A.** 2008. *Candida albicans* Ferric Reductases Are Differentially Regulated in Response to Distinct Forms of Iron Limitation by the Rim101 and CBF Transcription Factors. *Eukaryot. Cell.* **7**: 1168 - 1179
7. **Banuett, F., y Herskowitz, I.** 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5878–5882.
8. **Barkani, A.E., Kurzai, O., Fonzi, W.A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M., y Muhlschlegel, F.** 2000. Dominant Active alleles of Rim101 (PRR2) bypass the pH

- restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*. **20**: 4635-4647.
9. **Barrales, R.R., Jimenez, J., é Ibeas, J.I.** 2008, Identification of novel activation mechanisms for *flo11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **178**: 145–156.
 10. **Barth, G., y Gaillardin C.** 1996. *Yarrowia lipolytica*, p. 313–388. In K. Wolf (ed.), *Non-conventional yeasts in biotechnology. A handbook*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 11. **Pfeifer, B.A., y Khosla, C.** 2001. Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**(1): 106–118 DOI: 10.1128/MMBR.65.1.106–118.2001
 12. **Begoña, B., Garcia de blás, B., Pérez-Martín, J., y Rodríguez-Navarro, A.** 2009. Growth at High pH and Sodium and Potassium Tolerance in Media above the Cytoplasmic pH Depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*. **8**(6): 821–829.
 13. **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
 14. **Blanco-Rivero, A., LeganesF., Fernandez-Valiente E., Calle P. and Fernandez-Piñas F.** 2005. *mrpA*, a gene with roles in resistance to Na⁺ and adaptation to alkaline pH in the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC7120. *Microbiology*. **151**: 1671–1682. DOI 10.1099/mic.0.27848-0
 15. **Bose, I., Reese, A.J., Ory, J.J., Janbon, G., y Doering, T.L.** 2003. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, **2**(4): 655–663.

16. **Boysen, J.H., y Mitchell, A.P.** 2006. Control of Bro1-Domain Protein Rim20 Localization by External pH, ESCRT Machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 Pathway. *Molecular Biology of the Cell*. **17**:1344 –1353.
17. **Butler, M.J., y Day, A.W.** 1998. Fungal melanins. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1115–1136.
18. **Caddick, M.X., Brownlee, A.G. y Arst Jr, H.N.** 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **203**: 346-353.
19. **Calcagno-Pizarelli, A.M, Negrete-Urtasun, S., Denison, S.H., Rudnicka, J.D., Bussink, H.J., Múnera-Huertas, T, Stanton, L., Hervás-Aguilar, A., Espeso, A.E., Tilburn, J, Arst Jr, H.N., y Peñalva, M.A.** 2007. Establishment of the Ambient pH Signaling Complex in *Aspergillus nidulans*: palI assists plasma membrane localization of palH. *Eukaryotic Cell*; **6**:2365-2375.
20. **Caracuel, Z., Casanova, M.I.G., Roncero, A., Pietro, Di y Ramos, J.** 2003. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell*. **2**: 1246–1252.
21. **Carling, D., Aguan K., Woods, A., Verhoeven, A.J.M, Beri, R.K., Brennan, C.H. , Sidebottom, C., Davison, M.D., y Scott, J.** 1994. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* **289**:11442- 11448.
22. **Chen, H., Crabb, J.W., y Kinsey, J.A.** 1998. The *Neurospora aab-1* gene encodes a CCAAT Binding Protein Homologous to Yeast HAP5. *Genetics* **148**: 123–130.
23. **Cervantes-Chávez, J.A., Ortiz-Castellanos, L., Tejeda-Sartorius, M., Gold, S., y Ruiz-Herrera, J.** 2010. Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic Basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* **47**(5): 446-57.

24. **Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J., y Pillus, A.** 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*. **19**(4): 2515-2526.
25. **Cordoba, D.C., y Roncero, M.I.G.** 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*; **98**(5): 509-51.
26. **Denison, S.H.** 2000. Ph regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **29**: 61–71.
27. **Denison, S.H., Orejas, M., y Arst Jr, H.N.** 1995. Signaling of Ambient pH in *Aspergillus* Involves a Cysteine Protease. *J. Biol. Chem.*, **270**: 28519 - 28522.
28. **Denison, S.H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J.M., Tilburn, J., Mayer, W.A., Goel, A., Espeso, E.A., Penalva, M.A., y Arst Jr, HN.** 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol*. **30**(2): 259-64.
29. **Davis, D., Edwards, J.E., Mitchell, A.P., y Ibrahim, A.S.** 2000. *Candida albicans* Rim101 pH response pathway is required for Host-Pathogen interactions. *Infection and Immunity*. **68**: 5953-5959.
30. **De Vera, J.-P., Hornack, G., Rettberg, P., et al.** 2003. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Intern. J. Astrobiol.* **1** (4), 285–293, 2003.
31. **Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst H.N. y Peñalva, M.A.** 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO, J.*, **21**:1350-59.

32. **Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., y Haas, H.** 2004. Biosynthesis and Uptake of Siderophores Is Controlled by the PacC-Mediated Ambient-pH Regulatory System in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. **3**:561-563
33. **Espeso, E.A., y Penalva, M.A.** 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**:28825–28830.
34. **Espeso, E.A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, C.V., Brown, A., Valencia, H.N., Arst, H.N., y Penalva, M.A.** 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**:466–480.
35. **Espeso, E.A., y Arst, H.N.** 2000. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**:3355-3363.
36. **Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Peñalva, M.A., y Espeso, E.A.** 2003. Overlap of nuclear localization signal and specific DNA binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* **334**:667-684.
37. **Ferreira-Nozawa, M.S., Silveira, H.C., Ono, C.J., Fachin, A.L., Rossi, A., y Martinez-Rossi, N.M.** 2006. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol.* **44**: 641-5.
38. **Fischer, M., y Kaldenhoff, R.** 2008. On the pH Regulation of Plant Aquaporins. *Biological Chemistry* **283**(49):33889–33892. DOI 10.1074/jbc.M803865200.
39. **Fonseca-García, C., Lopez, M.G., Arechiga-Carvajal, E.T., y Ruiz-Herrera, J.** 2011. A novel polysaccharide secreted by pal/rim mutants of the phytopathogen fungus *Ustilago maydis*. *Carbohydr Polym* **86**:1646–1650.

40. **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 Res. **12**:547–556. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00805.x
41. **Frias, J.E., y Flores, E.** 2010. Negative Regulation of Expression of the Nitrate Assimilation *nirA* Operon in the Heterocyst-Forming *Cyanobacterium Anabaena* sp. Strain PCC 7120. Journal Of Bacteriology, **J192**(11); 2769–2778.
42. **Fujita, A., Lord, M., Hiroko, T., Hiroko, F., Chen, T., Oka, C., Misumi, Y., y Chant, J.** 2004. Rax1, a protein required for the establishment of the bipolar budding pattern in yeast. Gene **327**: 161–169.
43. **Galán, A., Casanova, M., Murgui, A., Maccallum, D.M., Odds, F.C., Gow, N.A.R., y Martínez, J.P.** 2004. The *Candida albicans* ph-regulated *ker1* gene encodes a lysine/glutamic-acid-rich plasma-membrane protein that is involved in cell aggregation. Microbiology. **150**: 2641-2651.
44. **Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O’Connell, R.J., Narusaka, Y., Takano, Y., Kubo, Y., y Shirasu, K.** 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of Colletotrichum fungi. New Phytologist. **197**: 1236–1249. doi: 10.1111/nph.12085
45. **Gancedo, J.M.** 1998. Yeast carbon catabolite repression. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:334–361.
46. **Gao, G. J., Widmer, D., Stapleton, T., Teh, T., Cox, B., Kemp, y Witters, L.** 1995. Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. Biochim. Biophys. Acta **1266**: 73--82.

47. **Garí, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B., y Aldea, M.** 2001. Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes & Development* **15**:2803–2808.
48. **Ghosh, S., Kebaara, B.W., Atkin, A.L., y Nickerson, K.W.** 2008. Regulation of Aromatic Alcohol Production in *Candida albicans*. *Appl. Envir. Microbiol.* **74**: 7211 - 7218.
49. **Gong, T., Liao, Y., He, F., Yang, Y., Yand, D.D., Chen, X.D., Gao, X.D.** 2012. Control of Polarized Growth by the Rho-family GTPase Rho4 in the Budding Yeast: Requirement of the N-Terminal Extension of Rho4 and the Regulation by the RhoGAP Bem2. *Eukaryotic Cell.* **12**(2):368-77. doi:10.1128/EC.00277-12
50. **González-López, C.I., Ortiz-Castellanos, 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.
51. **Gomez, A., Perez, J., Reyes, A., Duran, A., y Roncero, C.** 2009. Slt2 and Rim101 Contribute Independently to the Correct Assembly of the Chitin Ring at the Budding Yeast Neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell.* **8**(9): 1449–1459.
52. **Herranz, S., Rodríguez, J.M., Bussink, H.J., Sánchez-Ferrero, J.C., Arts, H.N., Peñalva, M.A., y Vincent, O.** 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *PNAs* **102**:12141-14146.
53. **Hervás-Aguilar, A., Rodríguez, J.M., Tilburn, J., Arts, H.N., y Peñalva, M.A.** 2007. Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger Transcription Factor PAcC. *The Journal of Biological Chemistry.* **282**:34735-34747
54. **Holliday, R.** 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res.* **2**:204–230.

55. **Hu, G., Caza, M., Cadieux, B., Chan, V., Liu, V. y Kronstad, J.** 2013. *Cryptococcus neoformans* Requires the ESCRT Protein Vps23 for Iron Acquisition from Heme, for Capsule Formation, and for Virulence- Infection and Immunity. **81(1):292–302.**
56. **Huang, C., y Chang, A.** 2011. pH-dependent Cargo Sorting from the Golgi. *Biological Chemistry.* **286(12): 10058–10065.**
57. **Imai, J., Toh-e, A., y Matsui, Y.** 1996. Genetic Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae RHO3* Gene, Encoding a Rho-Type Small GTPase, Provides Evidence for a Role in Bud Formation. *Genetics* **142:** 359-369.
58. **Jain, R., Valiante, V., Remme, N., Docimo, T., Heinekamp, T., Hertweck, C., Gershenzon, J., Haas, H., y Brakhage, A.A.** 2011. The MAP kinase Mpka controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology.* **82(1): 39–53** doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07778.x.
59. **Johnston, M., y Carlson, M.** 1992. Regulation of carbon and phosphate utilization. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression* (ed. E.W. Jones, J.R. Pringle and J.R. Broach), Vol. **2**, pp. 193-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
60. **Jones JDG, Duinsunin P, and Benbrokk J.** 1985. High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. *Embo J.* **4:**2411-2418
61. **Jiang, R., y Carlson, M.** 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein Kinase complex. *Genes De.;* **10:**3105-3115.
62. **Kanda, S., Aimi, T., Kano, S., Ishihara, S., Kitamoto, Y., y Morinaga, T.** 2008. Ambient ph signaling regulates expression of the serine protease gene (*spr1*) in pine

- wilt nematode-trapping fungus, *Monacrosporium megalosporum*. *Microbiol Res.* **163**(1): 63-72.
63. **Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., et al.** 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature.* **444**(7115): 97–101. doi: 10.1038/nature05248
64. **Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A.A., Galinski, E.A. y Gunde-Cimerman, N.** 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*; **153**:4261-4273
65. **Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J., y Felenbok, B.** 1993. Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology.* **7**(6): 847-857.
66. **Kullas, A.L., Martin, S.J., y Davis, D.** 2007. Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Mol Microbiol.* **66**(4):858-71.
67. **Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. y Mitchell, A. P.** 2001. Alkaline Response Genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 Pathway. *Biological Chemistry.* **276**: 1850–1856.
68. **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*. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 677-686.

69. **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 pH's. *Eukaryotic Cell.* **3**:741-751.
70. **Li, R., y Murray, A.W.** 1991. Feedback Control of Mitosis in Budding Yeast. *Cell.* **66**:519-531.
71. **Liang, Y., Gui, L., Wei, D.S., Zheng, W., Xing, L.J., y Li, M.C.** 2009. *Candida albicans* ferric reductase FRP1 is regulated by direct interaction with Rim101p transcription factor. *FEMS Yeast Res;* **9**(2):270-277.
72. **Lotz, H., Sohn, K., Brunner, H., Muhlschlegel, F.A., y Rupp, S.** 2004. RBR1, a Novel ph-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by Nrg1. *Eukaryotic cell.* **3**: 776-784.
73. **MacCabe, A.P., Van Den Hombergh, P.T.W., Tilburn, J., Arst, H.N., y Visser, J.** 1996. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacc*. A wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.,* **250**: 367-374.
74. **Maccheroni, W., May, G.S., Martinez-Rossi, N.M., y Rossi A.** 1997. The sequence of palF, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gen.,* **194**:163-167.
75. **Madzak, C., Blanchin-Roland, S., Cordero-Otero, R.R. y Gaillardin, C.** 1999. Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiology;* **145**: 75 - 87.
76. **Maeda, Y., y Kinoshita, T.** 2010. The acidic environment of the golgi is critical for glycosylation and transport. *Methods in Enzymology.* **480**:495-510. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)80022-9.

77. **Martin, SA.** 1992. Effects of extracellular pH and phenolic monomers on glucose uptake by *Fibrobacter succinogenes* S85. Letters in Applied Microbiology, **15**: 26–28. doi: 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00715.x
78. **Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., De Groot, P., Ram, A., Klis, F., y François, J.** 2001. *Saccharomyces cerevisiae* YCRO17c/CWH43 encodes a putative sensor/transporter protein upstream of the BCK2 branch of the PKC1-dependent cell wall integrity pathway. Yeast. **18**(9): 827-40.
79. **Martinez-Muñoz, G.A., y Kane, P.** 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. J. Biol. Chem. **18**;283(29):20309-19. doi: 10.1074/jbc.M710470200.
80. **Martinez-Rossi, N.M., Persinoti, G.F., Peres, N.T.A. y Rossi, A.** 2012. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. Mycoses. **55**:381–387
81. **Mendes-Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J.R., y Li, R.** 2012. Actin Depolymerization Drives Actomyosin Ring Contraction during Budding Yeast Cytokinesis. Dev Cell. **22**(6): 1247–1260. doi:10.1016/j.devcel.2012.04.015.
82. **Mingot, J.M., Tilbyrn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, O., Widdick, D.A., Sarkár, S., Brown, C.V., Caddick, M.X., Espeso, E.A., Arst, H.N., y Peñalva, M.A.** 1999. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. Mol. Cell. Biol., **19**:1390-1400.
83. **Mira, N.P., Lourenco, A.B., Fernandes, A.R., Becker, J.D., y Sa-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 Res* **9**: 202–216.
DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00473.x
84. **Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A., y Kemp, B.E.** 1994. Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 2361-2364.
85. **Momcilovic, M., Iram, S.J., Liu, Y. y Carlson, M.** 2008. Roles of the Glycogen-binding Domain and Snf4 in Glucose Inhibition of SNF1 Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*; **283**:19521-19529
86. **Moreno-Mateos, M.A., Delgado-Jarana, J., Codon, A.C., y Benitez, T.** 2007. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol.* **44**: 1355-67
87. **Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., y Kanazawa, H.** 2005. Four Na⁺/H⁺ Exchanger Isoforms are distributed to Golgi and Post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *Biological Chemistry* **280**(2): 1561–1572.
88. **Negrete-Urtasun, S., Denison, S.H., y Arst, H.N.** 1997. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and Identification of possible homologs. *J. Bacteriology.* **179**:1832-1835.
89. **Németh-Cahalan, K.L., y Hall, J.E.** 2000. pH and Calcium Regulate the Water Permeability of Aquaporin. *Biological Chemistry*, **275**(10): 6777–6782.
90. **Nobile, C.J., Solis, N., Myers, C.L., Fay, A.J., Deneault, J.S., Nantel, A., Mitchell, A.P., y Filler, S.G.** 2008. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol.* **10**: 2180-96.

91. **North, M., Steffen, J., Loguinov, A.V., Zimmerman, G.R., Vulpe, C.D., y Eide, D.J.** 2012. Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **8**(6): e1002699.
92. **Novacky, A., Ullrich-Eberius, C.I., y Lütge, U.** 1980. pH and membrane-potential changes during glucose uptake in *Lemna gibba* G1 and their response to light. *Planta.* **149**(4): 321-326.
93. **Obara, K., Yamamoto, H., y Kihara, A.** 2012. Membrane Protein Rim21 Plays a Central Role in Sensing Ambient pH in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem.* **287**(46):38473-81. doi: 10.1074/jbc.M112.394205.
94. **Odorizzi, G., Katzmann, D.J., Babst, M., Audhya, A., y Emr, S.D.** 2003. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **116**: 1893–1903.
95. **O’Meara, T.R., Norton, D., Price, M.S., Hay, C., Clements, M.F., Nichols, C.B., y Alspaugh, J.A.** 2010. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. *Plos Pathog* **6**(2): e1000776. Doi:10.1371/journal.ppat.1000776.
96. **Onofri, S., Selbmann, L., Hoog, G.S., Grube, M., y Barreca, D.** 2007. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in Space research;* **40**:1657-1664
97. **Orejas. M.R., Espeso, E.A., Tilbum, J., Sarkar, S., Arst, H.N., y Peñalva, M.A.** 1995. Activation of the *Aspergillus* pacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes and Dev.,* **9**:1622-1632.
98. **Peñalva, M.A., y Arst H.N.Jr.** 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 426-446

99. **Penalva, M.A., y Arst, H.N. 2004.** Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* **58**:425-51
100. **Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E. y Arts, H.N. 2008.** Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*. **16**: 291-300.
101. **Pérez-Martín, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J., Carbó, N. 2006.** Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Molecular Genetics and Genomics*. **276**(3): 211-229
102. **Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rascle, C., y Fevre, M. 2001.** Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology*. **147**: 717 – 72.
103. **Putnoky, P., Kereszt, A., Nakamura, T., Endre, G., Grosskopf, E., Kiss, P., y Kondorosi, A. 1998.** The pha gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K⁺ efflux system. *Molecular Microbiology*. **28**(6):1091–1101
104. **Redon, E., Loubiere, P. y Cocaign-Bousquet, M. 2005.** Role of mRNA stability during Genome-wide adaptation of *Lactococcus lactis* to Carbon Starvation. *Biological Chemistry*. **280**:3638-36385.
105. **Rodríguez-Galan, O., Galindo, A., Hervas-Aguilar, A., Arts, H.N., y Peñalva, M.A. 2009.** Physiological Involvement in pH Signaling of Vps24-mediated Recruitment of *Aspergillus* PalB Cysteine Protease to ESCRT-III. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:4404-4412.

106. **Rothfels, K., Tanny, J.C., Molnar, E., Friesen, H., Commisso, C., y Segall, J.** 2005. Components of the ESCRT Pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **25**(15): 6772–6788.
107. **Ruiz, A., y Ariño, J.** 2007. Function and Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA Sodium ATPase System. *Eukaryot Cell*. **6**(12): 2175–2183.
108. **Ruiz-Herrera, J., León, C., Guevara-Olvera, L., y Cárabez-Trejo, A.** 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*. **141**: 695–703.
109. **Ruotolo, R., Marchini, G., y Ottonello, S.** 2008. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biology*. **9**: R67. doi:10.1186/gb-2008-9-4-r67.
110. **Selbmann, L., Onofri, S., Fenice, M., et al.** 2002. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Res. Microbiol.* **153**, 585–592, 2002.
111. **Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J. y Walbot, V.** 2010. Maize Tumors Caused by *Ustilago maydis* require Organ-Specific Genes in Host and Pathogen. *Science*. **323**: 8-32. DOI: 10.1126/science.1185775.
112. **Sorimachi, H. y Suzuki K.** 2001. The structure of calpain. *J. Biochem.* **129**:653-664.
113. **Soontorngun N, Laroche M, Drouin S, Robert F, y Turcotte B.** 2007. Regulation of Gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Molecular and cellular biology*. **27** (22): 7895–7905.

114. **Steen, B.R., Lian, T. y Zuyderduyn, S.** 2002. Temperature-Regulated Transcription in the Pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res*; **12**:1386-1400.
115. **Stephanie, S., Pao, Ian, T. Paulsen, Andmilton, H. Saier, Jr.** 1998. Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*. **62**(1): 1–34.
116. **Su, S.S., y Mitchell, A.P.** 1993. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**: 67-77.
117. **Subramanian, S., Woolford, C.A, Desai, J.V., Lanni, F., y Mitchell, A.P.** 2012. Cis- and trans-acting localization determinants of pH-response regulator Rim13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. **11**(10):1201-9.doi:10.1128/EC.00158-12
118. **Teertstra, W.R., Van der Velden, G.J, de Jong, J.F., Kruijtzter, J.A.W., Liskamp, R.M.J., Kroon-Batenburg, J.L.M., Müller, W.H., Gebbink, M.F.B.G., y Wösten, H.A.B.** 2009. The Filament-specific Rep1-1 Repellent of the Phytopathogen *Ustilago maydis* forms Functional Surface-active Amyloid-like Fibrils. *J Biol Chem*. **284**(14): 9153–9159.
119. **Thevelein, J.M.** 1991. Fermentable sugars and intracellular acid-ification as specific activators of the Ras-adenylate cyclase signaling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* **5**, 1301–1307.
120. **Tilburn, J., Sarka, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., y Arst, H.N.** 1995. The *Aspergillus* pacc zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**: 779-790.
121. **Tilburn, J., Sanchez-Ferrero, J.C, Reoyo, E., Arst, H.N. y Peñalva, M.A.** 2005. Mutational Analysis of the pH Signal Transduction Component PalC of *Aspergillus*

- nidulans* Supports Distant Similarity to BRO1 Domain Family Members. *Genetics* **171**: 393–401.
122. **Tsuchiya, D., Gonzalez, C., y Lacefield, S.** 2011. The spindle checkpoint protein Mad2 regulates APC/C activity during prometaphase and metaphase of meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mo. Biol. Cel.* **22**(16): 2848-2861.
123. **Ungar, D., y Hughson, F.M.** 2003. Snare protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 493–517.
124. **Vankuyk, P.A., Diderich, J.A., MacCabe, A.P., Hererro, O., Ruijter, G.J., y Visser, J.** 2004. *Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochem J.*; **379**: 375-83.
125. **Villar, C.C., Kashleva, H., Nobile, C.J., Mitchell, A.P., y Dongari-Bagtzoglou, A.** 2007. Mucosal Tissue Invasion by *Candida albicans* is associated with e-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect. Immun.* **75**: 2126 - 2135.
126. **Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., y Penalva, M.A.** 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1647-1655.
127. **Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., y Feldbrügge, M.** 2012. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev.* **36**(1):59-77. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x.
128. **Wang, T., y Bretscher, A.** 1995. The rho-GAP Encoded by BEM2 regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell.* **6**: 1011-1024.
129. **Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G., y Luca, F.C.** 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes

- polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell Biol.* **158**: 885–900. doi: 10.1083/jcb.200203094.
130. **Wheeler, K.A., Lamb, H.K., and Hawkins, A.R.** 1996. Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* **315**:195-205.
131. **Wolf, J.M., y Davis, D.A.** 2010. Mutational Analysis of *Candida albicans* *SNF7* Reveals Genetically Separable Rim101 and ESCRT Functions and Demonstrates Divergence in bro1-Domain Protein Interactions *Genetics.* **184**: 673 - 694
132. **Yang, H.Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., y Saito, H.** 2009. Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO.* **28**: 1380–1391.
133. **You, B.J. y Chung, K.R.** 2007. Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acuatum* defective in a pacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol.* **277**: 107-114.
134. **Young, T.W., Wadeson, A., Glover, D.J., Quincey, V., Butlin, M.J., y Kamei, E.A.** 1996. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology.* **142**: 2913 – 2921.