

Possible function of the subunit G alpha (Gpa3) in the differentiation of the dimorphic *Mucor circinelloides*

Margarita Alonso-López¹, Irvin Eduardo Jácome-Galarza², Marco Iván Valle-Maldonado³, Martha Isela Ramirez-Díaz³, Rafael Ortiz-Alvarado⁴, Georgina Reyna-Lopez¹, José Arnau⁵, Guadalupe Martínez-Cadena¹ y Víctor Meza-Carmen³

¹Depto. Biología, Div. Cs. Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, U. Guanajuato, México; ²Lab. Estatal Salud Pública. Edo. Michoacán, México; ³Lab. Biotecnología Microbiana. IIQB, UMSNH, Morelia, Mich., México; ⁴Fac. Químico Farmacobiología. UMSNH, Morelia, Mich., México; ⁵Strain Approval Support Dept. Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark.

Resumen

El gen *gpa3* de *Mucor circinelloides* codifica para una proteína hipotética de 356 aminoácidos, la cual es una subunidad G alfa perteneciente a las proteínas G heterotriméricas, las cuales unen GTP, estas proteínas se encuentran en todos los sistemas eucariontes. La función biológica de *gpa3* durante la diferenciación de *M. circinelloides* fue evaluada usando una construcción antisentido insertada en el plásmido de replicación autónoma pEUKA7. La construcción, denominada pGMC-12, la cual porta el cDNA antisentido de *gpa3* está bajo control transcripcional del promotor homólogo *gpd1*. Esta construcción condujo a un decremento significativo de los niveles de RNAm de *gpa3*. Las cepas transformadas con pGMC-12, denominadas cepas TRA, mostraron un aumento en la esporulación. Adicionalmente, la cepa transformada con el gen *gpa3* en antisentido mostró una

disminución en la tasa de germinación durante el crecimiento en condiciones aeróbicas tanto en medio mínimo como en medio rico. Sin embargo, este efecto no se observó durante la germinación bajo condiciones de anaerobiosis, lo que sugiere que la disminución en la expresión del gen *gpa3* alteró principalmente la germinación aeróbica de las esporas de *M. circinelloides*. Los resultados de las transiciones micelio-levadura y levadura-micelio sugieren que el producto del gen *gpa3* se requiere durante la transición micelio-levadura, no así en el crecimiento levadura-micelio. Estos resultados sugieren que *gpa3* podría afectar diferentes etapas del desarrollo en la diferenciación de *M. circinelloides*.

Palabras clave: *Mucor*, esporulación fúngica, subunidad G α , diferenciación

Abstract

Mucor circinelloides gpa3 encodes a putative protein of 356 amino acids, which is closely related to known GTP-binding proteins from diverse fungi. The biological role of *gpa3* during the differentiation of *Mucor circinelloides* was assessed using an antisense construct inserted into the autonomously replicating plasmid pEUKA7. The construct, termed pGMC-12, contained *M. circinelloides gpa3* cDNA in antisense under the control of the homologous *gpd1* promoter, which led to a significant decrease in *gpa3* mRNA levels. The pGMC-12 transformed strains, termed TRA strains, showed an increased sporulation when grown in culture media supplemented with 0.1% Triton X-100. On the other hand, a decrease in the germination rate of the transformed strain, as compared with the wild-type R7B strain, was observed under aerobic growth conditions in either minimal or complex media. However, this effect was not observed during germination under anaerobic conditions, suggesting that the reduced expression of *gpa3* altered aerobic spore germination in *M. circinelloides*. Meanwhile, the results of mycelia-yeast and yeast-mycelia transition experiments suggest that the *gpa3* product is required during mycelia-yeast growth but not for yeast-mycelial growth. Taken together, these results suggest that *gpa3* may affect different developmental stages in *Mucor* differentiation.

Keywords: *Mucor*, fungal sporulation, G α subunit, differentiation.

Introducción

Los receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs, por sus siglas en inglés), representan la familia más abundante de receptores transmembranales en células de mamíferos, son responsables de transmitir señales extracelulares que inducen respuestas intracelulares en células blanco (Maller, 2003; Xue et al., 2008). Estos receptores se encuentran como proteínas integrales en la membrana plasmática y están acoplados a las proteínas G heterotriméricas compuestas por las subunidades α , β y γ (Neves et al., 2008). De esta forma, cuando se da la unión del ligando con el receptor, el trímero se separa en la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$. La subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ transducen, cada uno de manera independiente, la señal hacia proteínas efectoras específicas, por ejemplo la adenilato ciclasa, los canales iónicos y la fosfolipasa C, entre otros efectores. Esto genera cambios bioquímicos que conducen a cambios en la proliferación celular, respuesta a luz, diferenciación celular, entre otros procesos biológicos (Neves et al., 2008).

Mucor circinelloides es un hongo zigomiceto que presenta eventos de diferenciación en respuesta a diferentes condiciones de crecimiento; las esporangiosporas (denominadas comúnmente como esporas) de *Mucor* en presencia de una alta concentración de glucosa y bajos niveles de oxígeno se diferencian hacia levaduras, pero en presencia de oxígeno o la presencia de fuentes de carbono no fermentables, la diferenciación es dirigida hacia micelio. En el caso *Neurospora crassa* los procesos que conducen a la producción de carotenogénesis y la esporulación están asociadas a NOP-1, el cual es un receptor acoplado a proteínas G (Bieszke et al., 2002).

Aunque los mecanismos moleculares no han sido completamente elucidados, se ha reportado que las proteínas que unen GTP, la proteína cinasa A (PKA) y el sistema de ubiquitinación parecen cumplir funciones importantes en la diferenciación de *M. circinelloides*. Las proteínas G monoméricas Ras denominadas *Mras1* y *Mras3* participan en el incremento de la tasa de crecimiento durante la germinación de las esporangiosporas y reducen la viabilidad de las esporangiosporas en un 40% (Casale et al., 1990). Además, la sobreexpresión del gen *pkaR*, que codifica para una subunidad regulatoria de la proteína cinasa A, produce una mayor ramificación en las puntas de la hifas, sugiriendo una posible función en la filamentación y ramificación (Wolff et al., 2002). Las mutantes nulas de *pkaR* en *M. circinelloides* mostraron tasas de germinación más rápidas en cultivos líquidos, y menor producción de esporas y crecimiento radial más lento (Ocampo et al., 2009). También ha sido reportado que la carencia del gen *crgA* que codifica a una

E3-ubiquitina ligasa del tipo RING-finger, la cual participa en procesos regulados por luz en *M. circinelloides*, genera una cantidad menor de esporangiosporas, acompañada de un incremento de los niveles de β -carotenos (Lorca-Pascual et al., 2004).

La secuenciación de diversos genomas fúngicos ha revelado la presencia de múltiples subunidades G α (Bölker, 1998; Li et al., 2007; Valle-Maldonado et al., 2015). *Saccharomyces cerevisiae* expresa dos proteínas G α , Gpa1 y Gpa2, las cuales participan en la reproducción y la diferenciación en respuesta al crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno, respectivamente (Bardwell, 2005). Los genomas de hongos filamentosos también contienen múltiples subunidades G α . Por ejemplo, *Neurospora crassa* contiene GNA1, GNA2 y GNA3 (Turner y Borkovich, 1993; Ivery et al., 2002) y *Aspergillus nidulans* contiene a FadA, GanA y GanB (Lengeler et al., 2000). Se han reportado múltiples subunidades G α (Gpa1 a Gpa12) en *M. circinelloides* (Meza-Carmen et al., 2006; Valle-Maldonado et al., 2015). De estas subunidades, el transcrito del gen *gpa3* se expresa durante el dimorfismo tanto en el crecimiento micelial y levaduriforme. Además el producto del gen *gpa3* es sustrato para la toxina del cólera pero no para la toxina pertusis, esto fue predicho por la secuencia primaria de Gpa3 (Meza-Carmen et al., 2006), de igual manera se ha observado que los niveles del transcrito son modulados por la presencia de glucosa más que por la fuente de nitrógeno (Valle-Maldonado, 2013).

En este trabajo, se demostró que el gen *gpa3* afecta múltiples pasos en la diferenciación de *M. circinelloides*, incluyendo la esporulación, la germinación de esporas y las transiciones morfológicas levadura-micelio.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de cultivo

La cepa R7B (leuA-) fue empleada como la cepa silvestre. Las cepas TRA de *M. circinelloides* se obtuvieron por transformación de la cepa R7B con el plásmido recombinante pGMC-12, en el cual el cDNA del gen *gpa3* se expresó en antisentido bajo el control del promotor del gen de la gliceraldehído deshidrogenasa (*gpd1*) de *M. circinelloides* (ver más adelante). La cepa R7B se transformó de igual manera con el vector pEUKA7 (vector vacío) como control. Los medios de cultivo usados fueron medio YPG (Extracto de levadura, peptona y glucosa) y medio mínimo (YNB, Yeast Nitrogen Base, DIFCO) con o sin 20 mg/ml de L-leucina (Sigma). La transformación de *M. circinelloides* se realizó como se describió previamente (Wolff

y Arnau, 2002), además, se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α en todos los experimentos de clonación. Todos los medios de cultivo fueron adquiridos en Difco™.

Detección de los genes que codifican para subunidades G α en *M. circinelloides*

Los genes homólogos a las subunidades G α de *S. cerevisiae* (GPA1 y GPA2) se encontraron en la base de datos del genoma de *M. circinelloides* <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html> con los números de ID para *gpa1* (45435); *gpa2* (142505); *gpa3* (40656); *gpa4* (138841); *gpa5* (109555); *gpa6* (151649); *gpa7* (137808); *gpa8* (32511); *gpa9* (152023); *gpa10* (139892); *gpa11* (139870) y *gpa12* (86422). Los criterios para la identificación de las subunidades G α de proteínas G heterotriméricas de *M. circinelloides* incluyeron la evaluación de porcentajes de identidad, presencia de dominios conservados, los alineamientos se realizaron en ClustalW2 estos datos de secuencia de DNA se generaron por el Departamento de Energía del Instituto del Genoma Conjunto de los Estados Unidos de América (<http://www.jgi.doe.gov/>) en colaboración con la comunidad de usuarios.

Se aisló el DNA genómico de *M. circinelloides* y se empleó como templado en los ensayos de PCR con oligonucleótidos para amplificar específicamente cada subunidad G α de *M. circinelloides*. Los oligonucleótidos se diseñaron usando el software LASERGENE 8.0 con el objetivo de amplificar específicamente cada gen *gpa* de *M. circinelloides*.

La mezcla de Taq Polimerasa para PCR (PROMEGA) y el DNA genómico (50 ng por cada reacción) de la cepa R7B de *M. circinelloides* usado como templado, se utilizaron para las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler, por 35 ciclos a 95°C por 45 segundos; 50°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos.

Generación de protoplastos

Se inocularon 10⁸ esporas de la cepa receptora en 20ml de medio YPG, pH 4,5 suplementado con leucina y uracilo, el cual se mantuvo al menos durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se transfirió el matraz a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación fuerte (250 r.p.m.) durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las esporas se precipitaron durante 5 minutos

a 2000 r.p.m. en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en buffer fosfato-sorbitol (Sorbitol 0,5 M, fosfato sódico pH 6,5 10 mM), para resuspenderse finalmente en este mismo buffer a razón de 5 mL por cada 10^7 esporas. Para la digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/ml de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0,15 mg/ml de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals). Las germínulas se incubaron a 30°C con agitación suave (60 r.p.m.) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de la envoltura refringente. Para parar la digestión se añadieron 5 ml de sorbitol 0,5 M, se centrifugó durante 5 minutos a 900 r.p.m., resuspendiendo nuevamente en 5 ml de sorbitol 0,5 M y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de sorbitol 0,5 M.

Condiciones de transformación y del vector antisentido *gpa3*

El cDNA completo del gen *gpa3* de *M. circinelloides* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos *gpa3-F-SmaI* (5'-CCCCGGGATGGGTTGTTGTGCTTCAGT TGAGGAAAGTG-3') y *gpa3-R-NotI* (5'-CGCGGCCGCAGATCAAACCAACATCTC GAAG-3'), con los sitios de restricción *SmaI* y *NotI* subrayados que fueron añadidos, respectivamente. El cDNA del gen *gpa3* se clonó en antisentido bajo el control del promotor *gpd1* en el vector pEUKA7. El vector pEUKA7 se digirió usando *XhoI* y tratado con el fragmento Klenow. Después de que se removió la enzima, se procedió a realizar una segunda digestión usando *NotI*. A continuación, se realizó la ligación del cDNA del gen *gpa3* y del vector pEUKA7, generando el plásmido recombinante pGMC-12. Se realizó la secuenciación completa del DNA del plásmido recombinante para confirmar la construcción.

Propagación de esporas

Se inocularon 500 esporas de *M. circinelloides* en placas de agar YNB, mantenidas a 28°C de 4 a 5 días. Las esporas se colectaron añadiendo 5 ml de H₂O destilada estéril a cada placa, seguido de un raspado suave con un asa de cristal y las esporas se colectaron y transfirieron a un tubo cónico de 50 ml. Las esporas se concentraron por centrifugación (5,000 x g por 10 min a temperatura ambiente). La pastilla de esporas fue resuspendida en 10 ml de H₂O destilada estéril. La pastilla de esporas se almacenó y se usó en un periodo de tiempo no mayor a 15 días posterior a la colección.

Cuantificación de la esporulación

Para cuantificar la producción de esporas, 25 esporas de las cepas control y TRA fueron dispersadas sobre medio YNB sólido, pH 3.0 conteniendo 0.1% Triton X-100. Las colonias individuales fueron incubadas por 4 días a 28°C. Posterior a la incubación, se colectaron las esporas, y se contaron usando cámara Hematocitométrica. Los datos se expresaron como número total de esporas divididas entre el número total de colonias observadas en las placas.

Northern Blotting

Se aisló RNA total y se realizó una hibridación tipo Northern usando protocolos ya estandarizados (Sambrook et al., 1989). La secuencia completa del cDNA de *gpa3* fue marcado con dCTP α -³²P usando el kit Rediprime II (GE Healthcare, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Germinación aeróbica de las esporas

Esporas (5×10^5 por ml) de *M. circinelloides* se incubaron en 250 ml de medios YPG o mínimo líquidos y mantenidas a 28°C bajo agitación constante (200 rpm). Las muestras se tomaron a diferentes tiempos de incubación y se cuantificó la germinación de las esporas contando directamente al menos 200 células bajo observación del microscopio a 40X.

Germinación anaeróbica de las esporas

Las levaduras de *M. circinelloides* se obtuvieron al inocular 1×10^6 esporas/ ml en 250 ml de medio YNB líquido suplementado con (10 mg/L) de tiamina y (10 mg/L) de ácido nicotínico empleando el método de "auto-anaerobiosis" (Salcedo-Hernández y Ruiz-Herrera, 1993). Las muestras se tomaron a diferentes tiempos de incubación y la germinación de esporas se cuantificó al contar directamente al menos 200 células en un microscopio convencional de luz blanca.

Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura

Las levaduras y germínulas obtenidos de las germinaciones de esporas anaeróbica y aeróbica, respectivamente se emplearon para realizar los experimentos de transición, como ha sido descrito previamente (De la Cruz et al., 2007). Se describen

brevemente a continuación, para la transición Levadura-Micelio, las esporas fueron germinadas en condiciones auto anaeróbicas en medio YPG y se mantuvieron por 10 horas en dichas condiciones para su posterior filtración y estas fueron depositadas en medio de cultivo fresco e incubadas en condiciones de crecimiento aeróbicas de 3 a 6 horas. Por otra parte, en la transición Micelio-Levadura las esporas fueron germinadas en condiciones aeróbicas en medio YPG por 5 horas antes de ser filtradas, cambiadas a medio fresco y posterior crecimiento en anaerobiosis por 3 a 6 horas.

Análisis estadístico

En el programa STATISTICA7 se realizó un análisis de varianza, ANOVA de una vía, y la prueba de Tukey, a fin de determinar las diferencias estadísticamente significativas en las figuras 3, 4 y 5.

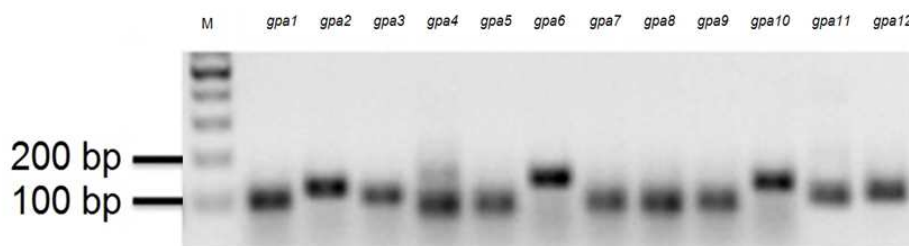


Figura 1. Amplificación de los genes *gpa* en *M. circinelloides*. Mediante amplificación por PCR se obtuvieron productos específicos correspondientes a los genes *gpa1* a *gpa12* empleando como templado el DNA genómico de la cepa R7B. Los tamaños de los amplicones de los genes *gpa1-12* fueron 95, 119, 101, 76, 78, 136, 79, 77, 83, 128, 99 y 109 pares de bases respectivamente. Las bandas de DNA fueron separadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Resultados y Discusión

El análisis reportado por Valle-Maldonado et al. 2015, en la base de datos del genoma de *M. circinelloides* se logró identificar a 12 marcos de lectura abiertos que codifican para subunidades $G\alpha$ hipotéticas. Las proteínas $G\alpha$ identificadas en *M. circinelloides* presentaron todas las características de las proteínas $G\alpha$ (Sprang, 1997). Todas las subunidades $G\alpha$ de *Mucor* mostraron los residuos RSRVK que constituyen el sitio canónico susceptible para ADP-ribosilación por la toxina del cólera (Van Dop et al., 1984), pero ninguna de las secuencias predichas de las proteínas Gpa mostró el sitio para ser ADP-ribosiladas por la toxina pertusis (CAAX) en el extremo carboxilo terminal (West et al., 1985).

Debido a que la secuencia del genoma de *M. circinelloides* aunque está liberada, esta no se encuentra aún editada completamente, se procedió a amplificar los 12 genes *gpa* identificados en *M. circinelloides* mediante PCR (Figura 1), confirmando la presencia de dichos genes en el genoma de este hongo. Este hallazgo es contrastante con el análisis en otros hongos, los cuales usualmente contienen no más de cuatro genes (Li et al., 2007).

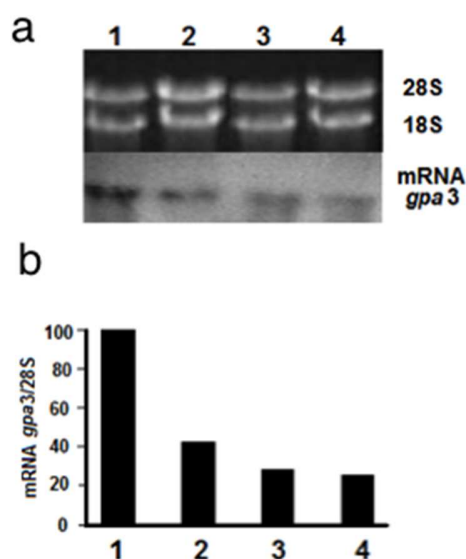


Figura 2. Niveles del RNA mensajero del gen *gpa3* en las transformantes con el antisentido en el gen *gpa3* de *M. circinelloides*. a. Análisis tipo Northern Blot del transcrito del gen *gpa3* de *M. circinelloides* crecido en medio YNB. 80 µg de RNA total fue cargado para cada muestra. El DNA complementario del gen *gpa3* fue usado para la hibridación. b. Valores densitométricos para la expresión de *gpa3* se expresan de manera relativa a la subunidad 28S ribosomal en la misma muestra. Línea 1, cepa control con vector vacío; líneas 2-4, tres cepas transformadas independientes obtenidas con el *gpa3* en antisentido. Línea 2, TRA1; línea 3, TRA12; línea 4, TRA20. Todos los valores se normalizaron en función del valor de la cepa control R7B, el cual fue considerado como el 100%.

Para determinar el papel de la proteína Gpa3 durante la diferenciación de *M. circinelloides*, el plásmido recombinante pGMC-12 que contiene el cDNA del gen *gpa3* fue transferido a la cepa R7B. Las transformantes TRA1, TRA2 y TRA20 que expresaron *gpa3* en antisentido mostraron una disminución significativa de los niveles de RNAm de *gpa3* en comparación con la cepa control R7B que contiene el vector vacío pEUKA7 (Figura 2).

Cuando la transformante TRA12 fue cultivada en medio suplementado con 0.1% de Tritón X-100, se observó un incremento en la esporulación, comparada con la cepa control R7B (Figura 3). Este resultado es similar a lo observando por la pérdida de Gna3, una subunidad alfa en *A. nidulans* (Kays et al., 2000). La pérdida de función de otras subunidades G α fúngicas también conducen a una esporulación inapropiada y conidiación densa en medios de cultivo sólidos. Similarmente, en el hongo *Trichoderma atroviridae*, la carencia de Tga1 contribuyó a un incremento en la esporulación (Rocha-Ramírez et al., 2002). Un incremento en la esporulación parece estar regulado por cambios en los niveles intracelulares de cAMP, el cual está implicado en varios estadios de diferenciación fúngica (Kays et al., 2000).

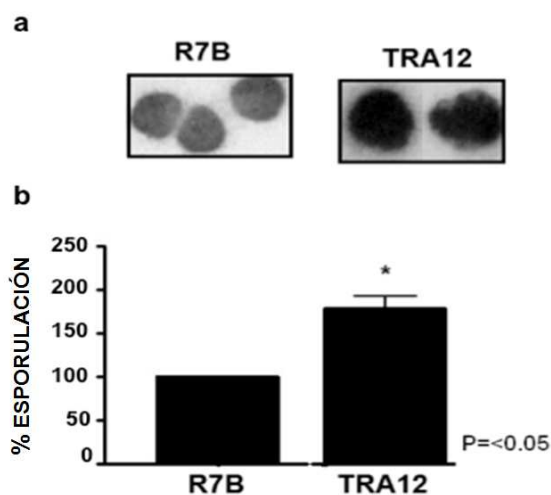


Figura 3. Efecto del gen *gpa3* en la esporulación de *M. circinelloides*. a. Las cepas se crecieron en medio sólido YNB suplementado con glucosa 4% y Tritón X-100 1%. b. Generación de esporas en la superficie del micelio fue observada en las cepas control y TRA12. Tres experimentos independientes fueron realizados, y se determinó la significancia estadística mediante un análisis de varianza, ANOVA de una vía, el asterisco denota diferencia estadística entre las cepas control y TRA12 (Tukey, $p \leq 0.05$). Todos los datos fueron similares en las tres diferentes cepas transformadas con el antisentido en *gpa3*.

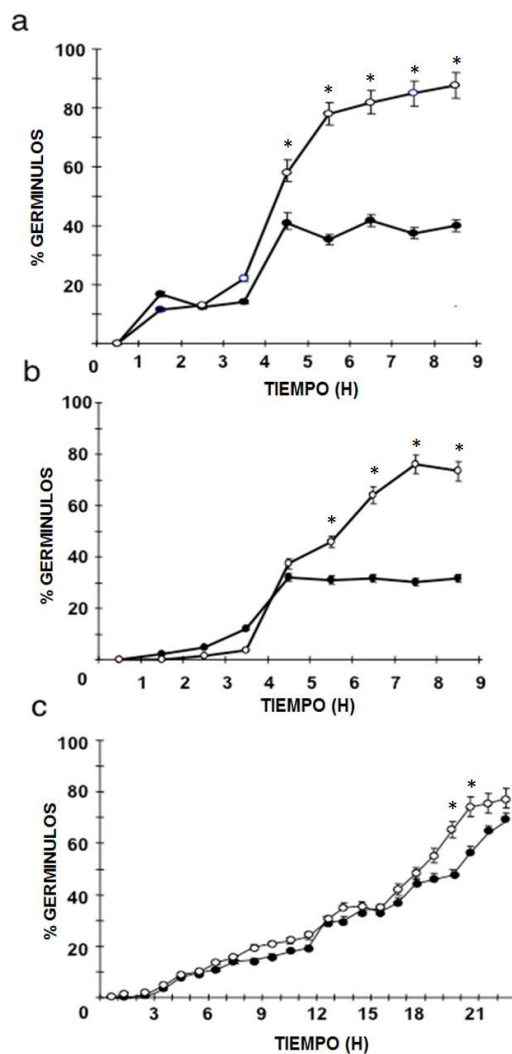


Figura 4. Efecto de los niveles de *gpa3* en la germinación en aerobiosis de esporas en *M. circinelloides*. **a** y **b** cultivos incubados bajo condiciones aeróbicas. Esporas de la cepa control (O) y TRA12 (●) fueron crecidas en medio líquido para determinar la tasa de germinación. **a.** Medio mínimo. **b.** Medio YPG. **c.** Cultivos fueron incubados en condiciones anaeróbicas, esporas fueron crecidas en medio YNB. Los datos fueron obtenidos de tres experimentos diferentes. Todos los datos fueron similares en las tres diferentes cepas transformantes evaluadas. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas control y TRA12 (Tukey, $p \leq 0.05$).

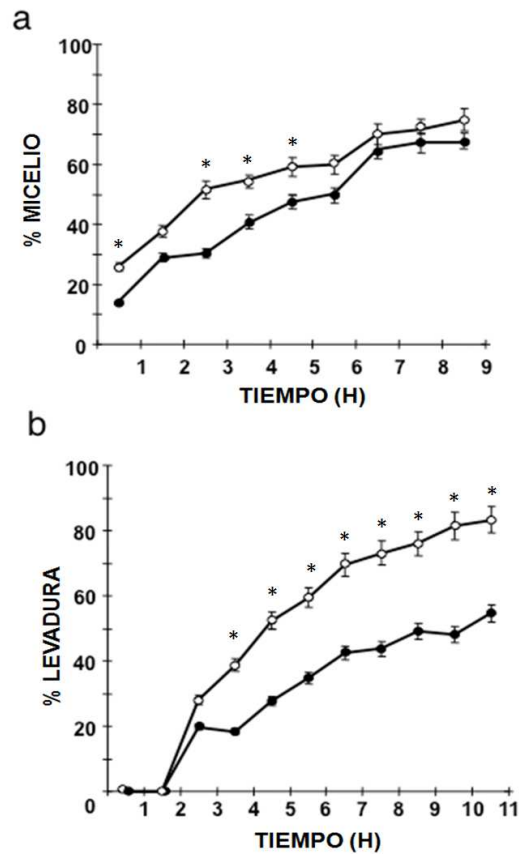


Figura 5. Efecto de los niveles de *gpa3* en las transiciones morfológicas en *M. circinelloides*. **a.** Transición Levadura-Micelio. Noventa por ciento de las levaduras se sometieron a condiciones de crecimiento aeróbicas para generar crecimiento micelial. **b.** Transición Micelio-Levadura. Cuando el 90% de las esporas estaban germinando (germinulas), dichas células se cambiaron a condiciones anaeróbicas para generar levaduras. Los datos se obtuvieron de tres experimentos diferentes usando las cepas Control (○) TRA12 (●). Todos los datos fueron similares en las tres diferentes cepas transformadas con el antisentido en *gpa3*. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas control y TRA12 (Tukey, $p \leq 0.05$).

Dado que el aumento en los niveles de observados en la cepa TRA12, se evaluó la viabilidad de las esporas producidas por esta cepa. Se observó una disminución en la tasa de germinación de la cepa TRA12 comparada con la cepa R7B bajo condiciones aeróbicas tanto en medio mínimo como en medio rico (Figuras 4a y 4b); sin embargo, este efecto no fue observado bajo condiciones anaeróbicas (Figura

4c). Estos resultados sugieren que la expresión reducida de *gpa3* alteró la germinación aeróbica de esporas en *M. circinelloides*. Este fenómeno fue reportado también en *N. crassa*, donde la eliminación de *gpa3* condujo a una reducción severa de la germinación de ascosporas (Kays et al., 2000).

Los experimentos realizados para analizar la transición micelio-levadura y levadura a micelio indicaron que la expresión de *gpa3*, tiene un papel en la transición micelio-levadura y que la transición levadura-micelio no está afectada apreciablemente (Figuras 5a y 5b). Estos datos sugieren que el producto del gen *gpa3* podría ser más relevante durante el crecimiento levaduriforme en el proceso de transición. De la misma manera, se ha comprobado con anterioridad la participación de subunidades G α en procesos de transiciones morfológicas en otros hongos dimórficos, como es el caso del gen *gpa2* de *C. albicans*, el cual codifica para una subunidad G α del grupo III, es indispensable para la transición morfológica levadura-micelio. Cuando el gen *gpa2* fue interrumpido, *C. albicans* no realizó la transición morfológica aún tras someterse a estímulos ambientales que promueven dicho cambio. La expresión del alelo GPA2^{G354V}, el cual es un alelo constitutivamente inactivo, resultó incapaz de separarse del dímero $\beta\gamma$, finalmente esta mutante no forma micelio en las condiciones ensayadas (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2002).

En conclusión, estos resultados sugieren que en *M. circinelloides* *gpa3* tiene una función importante en varios estadios morfológicos, como otras subunidades G α , como el producto de *gna-1* de *N. crassa*, el cual controla múltiples rutas de diferenciación (Ivey et al., 1996); o la participación de *tga1* en la conidiación en *T. atroviridae* (Rocha-Ramírez et al., 2002). Son necesarias más pruebas para clarificar el mecanismo molecular en el funcionamiento del gen *gpa3*, pudiendo existir la participación de segundos mensajeros, como AMPc y Ca²⁺, además de evaluar si el antisentido del gen *gpa3*, pudiese estar afectado la expresión de otros genes homólogos en *M. circinelloides* que pudiesen estar contribuyendo en las diferencias antes observadas.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

Agradecimientos

Parte de este trabajo se realizó con financiamiento de parte de la CIC/UMSNH 2.36 y CONACyT (Ciencia básica, proyecto 167071).

Referencias

1. Bardwell L (2005) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26:339–350.
2. Bieszke JA, Li L, Borkovich KA (2007) The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* 52:149–157.
3. Bölker M (1998) Sex and crime: Heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol* ;25:143–156.
4. Buss JE, Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Sefton BM (1987) Myristoylated α subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* ;84:7493–7497.
5. Casale WL, Mcconnell DG, Wang SY, Lee YJ, Linz JE (1990) Expression of a gene family in the dimorphic fungus *Mucor racemosus* which exhibits striking similarity to human *ras* genes. *Mol Cell Biol* ;10:6654–6663.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (1987) *Anal Biochem* 162:156–159.
7. De la Cruz JO, García-Soto J, Uriostegui C, Carranza L, Novoa G, Reyna G, Martínez-Cadena G (2007) Differential expression of Rho1GTPase and Rho3GTPase during isotropic and polarized growth of *Mucor circinelloides*. *Can J Microbiol* 53:168–176.
8. Gao S y Nuss DL (1998) Mutagenesis of putative acylation sites alters function, localization, and accumulation of a Gi alpha subunit of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1130–135.

9. Ivey FD, Hodge PN, Turner GE, Borkovich KA (1996) The G alpha i homologue *gna-1* controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* 7:1283–1297.
10. Ivey FD, Kays AM, Borkovich KA (2002) Shared and independent roles for Galpha(i) protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 1:634–642.
11. Kays AM, Rowley PS, Baasiri RA, Borkovich KA (2000) Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the Galpha protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 20:7693–7705.
12. Larsen GG, Appel KF, Wolff AM, Nielsen J, Arnau J (2004) Characterisation of the *Mucor circinelloides* regulated promoter *gpd1P*. *Curr Genet* 45:225–234.
13. Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:746–785.
14. Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA (2007) Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 61:423–452.
15. Lorca-Pascual J, Murcia-Flores L, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R (2004) The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Mol Microbiol* 52:1463–1474.
16. Maller JL. Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science*. 2003;300:594–595.
17. Meza-Carmen V, García-Soto J, Ongay-Larios L, Coria R, Pedraza-Reyes M, Arnau J, Reyna-Lopez G, Martínez-Cadena G (2006) Molecular characterization of a G protein alpha-subunit-encoding gene from *Mucor circinelloides*. *Can J Microbiol* 52:627–635.
18. Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296:1636–1639.
19. Ocampo J, Fernandez Nuñez L, Silva F, Pereyra E, Moreno S, Garre V, Rossi S (2009) A subunit of protein kinase a regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryot Cell* 8:933–944.

20. Orlowski M (1991) *Mucor* dimorphism. Microbiol Rev 55:234-258.
21. Rocha-Ramirez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA, Herrera-Estrella A (2002) *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. Eukaryot Cell 1:594-605.
22. Roncero MI, Jepsen LP, Strøman P, van Heeswijck R (1989) Characterization of a leuA gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. Gene 84:335-343.
23. Salcedo-Hernández R y Ruiz-Herrera J (1993) Isolation and characterization of a mycelial cytochrome aa₃-deficient mutant and the role of mitochondria in dimorphism of *Mucor rouxii*. Exp Mycol 17:142-154.
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1626 pp.
25. Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín, J (2002) Gpa2, a G-Protein α Subunit Required for Hyphal Development in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell 1: 865-874.
26. Sprang SR (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. Annu Rev Biochem 66:639-678.
27. Turner GE y Borkovich KA (1993) Identification of a G protein alpha subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the Gi family. J Biol Chem 268:14805-811.
28. Valle-Maldonado, MI (2013) Identificación y expresión de los genes que codifican para proteínas G heterotriméricas en *Mucor circinelloides*. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 121 pp.
29. Valle-Maldonado MI, Jácome-Galarza IE, Díaz-Pérez AL, Martínez-Cadena G, Campos-García J, Ramírez-Díaz MI, Reyes-De la Cruz H, Riveros-Rosas H, Díaz-Pérez C, Meza-Carmen V (2015) Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in the Mucoral *Mucor circinelloides*. Fungal Biol 119:1179-1193.
30. Van Dop C, Tsubokawa M, Bourne H, Ramachandran J (1984) Amino acid sequence of retinal transducin at the site ADP-ribosylated by cholera toxin. J. Biol. Chem 259:696-698.

31. West RE Jr, Moss J, Vaughan M, Liu T (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem* 260:14428–1430.
32. Wolff AM, Appel KF, Petersen JB, Poulsen U, Arnau J (2002) Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (*syn. racemosus*). *FEMS Yeast Res* 2:203-213.
33. Wolff AM y Arnau J (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (*Syn. racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genet Biol* 35:21-29.
34. Xue C, Hsueh YP, Heitman J (2008) Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32:1010-1032.