

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



LOCALIZACIÓN DE LA PERMEASA GENERAL DE
AMINOÁCIDOS EN *Neurospora crassa*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JOVANI CATALÁN DIBENE

Ensenada, B.C.

Agosto de 2009

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACIÓN DE LA PERMEASA GENERAL DE AMINOÁCIDOS
EN *Neurospora crassa*

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

JOVANI CATALÁN DIBENE

APROBADO POR:



DRA. MERITXELL RIQUELME PÉREZ
Presidente del Jurado



DRA. AMELIA PORTILLO LÓPEZ
SECRETARIO



DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
1ER. VOCAL

Agradecimientos

Al pueblo mexicano.

A mí familia mi motor, mi principal motivación. Por creer en mí y siempre esperar lo mejor. Agradezco de por vida a mis padres César y Virgen por haberme apoyado siempre, SIEMPRE. Padre gracias por imbuir el gusto por la biología en mí, gracias por sus pláticas, sus explicaciones, su conocimiento, sus abrazos, sus consejos y sus regaños. Mamá gracias por las tortillas de harina, los chanclazos, por sus besos y por haberme enseñado a ser fuerte como usted. A mis hermanos Gioberti y Ernani por que sin ellos simplemente no sería quien soy. Pepi gracias por defenderme de los bulllys, se que serás un gran ecónomo, se que puedes ser lo que tú quieras. Enano gracias por cuidar a mis papas y al Gioberti mientras no estoy en casa, espero regresar pronto. A mi tío Pachy y a mi tía Rosy por ser como mis segundos padres, preocuparse por mí y estar siempre ahí para mí. A mi abuelo Toño, a mi abuela Lupe y a mi abuelita Chuy, te extraño abuela. A mis tíos (Los Catalanes) y a mis tías Dora, Nena y mi tío Luis. A TODOS LOS AMO

GRACIAS Dra. Meritxell por creer en mí, por su inagotable comprensión y por siempre alentarme hasta la conclusión de este trabajo, sin su ayuda y guía yo nunca hubiera terminado, de nuevo ¡GRACIAS!

Adriana gracias por aguantarme por quererme por estar conmigo durante todo este tiempo. Eres otra de las de las razones por las que pude terminar este trabajo. Estoy ahí para ti por siempre.

Le doy las gracias a Jorge y a Alex por haber contestado mis preguntas y dejar de hacer sus cosas por enseñarme y corregirme en el laboratorio, ¡sin ustedes me hubiera tomado más tiempo!

A la Dra. Rosa por su tiempo, a mis compañeros del laboratorio Ariana Román, Alex, Diego, Ramón, Rosa, Rosa, Rosa, Plata, Cynthia, por hacer soportables las horas sin viento fresco ahí adentro.

A mis amigos, por que los pollos asados y los juegos de Metal Gear en la madrugada también ayudaron.

Por último a Raúl por invitarme a trabajar con él y por ser uno de los culpables de que yo hiciera este trabajo. Y al Dr. Mario Vargas, por haberme recomendado e invitado al laboratorio, gracias a usted tengo nuevos amigos y he conocido personas fascinantes.

¡A TODOS MUCHAS GRACIAS!

Dedicatoria

Para el Enano y el Pepi,

“Quien no conoce nada,

no ama nada.

— Quien no puede hacer nada,

no comprende nada.

Quien nada comprende,

nada vale...”

Resumen de la tesis de Jovani Catalán Dibene presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2009.

Localización de la permeasa general de aminoácidos en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Los hongos son capaces de concentrar solutos del exterior al interior de la célula. Estos solutos son introducidos por permeasas y canales que se encuentran en la membrana plasmática de la célula. El transporte de aminoácidos en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* ocurre a través de dos tipos de sistemas: los específicos, que son capaces de introducir aminoácidos químicamente relacionados y los generales con gran afinidad por la mayoría de los aminoácidos. Así en *N. crassa* se presentan 5 sistemas de los cuales en solo 3 se ha identificado el locus correspondiente y están nombrados con números romanos: el I o también llamado Neutral (N), representado por el gen *mtr*, es el encargado de transportar aminoácidos aromáticos alifáticos neutrales; el II o General (G), expresado por el gen *pmg*, acarrea todos los aminoácidos (a excepción de la proílina que no posee grupo amino alfa) y el III o Básico (B), figurado por el gen *pmb*, transporta aminoácidos catiónicos.

En este trabajo se estudió el sistema II de aminoácidos en *N. crassa* encargado de la obtención de una amplia variedad de aminoácidos para su uso como fuente de nitrógeno, cuya localización y distribución no ha sido descrita. En *Saccharomyces cerevisiae* la permeasa general de aminoácidos está codificada por el gen GAP1 y su marcaje a permitido observar que esta proteína se localiza en vacuolas o en la membrana plasmática dependiendo de la fuente de nitrógeno en el medio. El análisis bioinformático del genoma de *N. crassa* permitió la identificación de varios genes con alta homología al GAP1 de *S. cerevisiae*. Se seleccionó la secuencia con mayor homología y se fusionó el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) para analizar la distribución de la permeasa general en hifas de *N. crassa* creciendo en distintas fuentes de nitrógeno. El gen seleccionado fue el gen con número de acceso NCU10262.3 el cual se denominó **neurospora general amino acid permease-1like (ngap-1l)**. Para fusionar el gen a la proteína verde fluorescente este fue amplificado y clonado en un vector de expresión que contiene la secuencia de la *gfp*. El vector fue utilizado para la transformación de conidias de *N. crassa*. Las colonias transformadas fueron seleccionadas y analizadas por microscopía

confocal de escaneo con láser. Los resultados obtenidos indican que *ngap-1* a pesar de ser el gen más parecido al gen descrito en levaduras, no codifica para la permeasa general de aminoácidos, ya que no se observa en membrana plásmatica. Sin embargo, la proteína NGAP-1 presenta respuesta al cambio de fuente de nitrógeno, mostrando diferente patrón e intensidad de marcaje en urea, una fuente pobre de nitrógeno. Es necesario hacer estudios bioquímicos para determinar si NGAP-1 es una permeasa vacuolar.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los hongos estructura celular	1
1.2 Transporte de solutos	5
1.3 Transporte de aminoácidos	6
1.4 <i>Neurospora crassa</i> como modelos de estudio	9
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivos generales	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Cepas, medios y condiciones de cultivos	21
6.2 Extracción de ADN	23
6.3 Identificación del gen <i>ngap-1</i> y diseño de oligonucleotidos	23
6.4 Amplificaciones de ADN	26
6.5 Construcción de la fusión <i>ngap-1::gfp</i>	29
6.6 Secuenciación del plásmido	31
6.7 Transformaciones en <i>Neurospora crassa</i>	31
6.8 Microscopía Confocal	33

6.9 Regiones de la hifa	34
6.10 Análisis de crecimiento	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Análisis in silico	36
7.2 Obtención del plásmido recombinante	38
7.3 Transformaciones en <i>N. crassa</i> y selección de transformantes	45
7.4 Localización de la proteína NGAP-1L-GFP en distintos medios de cultivo	45
7.5 Comprobación de la integración	51
7.6 Crecimiento de la cepa tJCD-1 en las distintas fuentes de nitrógeno	53
8.DISCUSIONES	56
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	63
11. REFERENCIAS	65
12. Apéndice	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pie de figura	Página
Figura 1	Esquema modelo de la organización celular en una hifa vegetativa con crecimiento polarizado como es el caso de <i>N. crassa</i> . Se observan: las vesículas secretoras (MV, mv) que contienen los materiales para la formación de la pared celular y se originan en la región subápical, los microtúbulos (MTs) por los cuales viajan las vesículas secretoras hasta el Spitzenkörper (Spk) donde se acumulan a lo largo de los cables de actina (A) para después fusionarse con la membrana plasmática (MP), vesículas de endocitosis (VE) que brotan de la MP que migran hacia el endosoma (E) el cual distribuye las partículas endocitadas, vacuolas (V), Aparato de Golgi (G), retículo endoplasmático (RE) y núcleo (N). Modificado de Riquelme y Bartnicki-García, 2008.	3
Figura 2	Modelo esquemático de la regulación de Gap1p en el MVE, endosoma multivacuolar (por sus siglas en inglés) de <i>S. cerevisiae</i> . Modificado de Rubio-Teixeira y Kaiser, 2006.	9
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i> . En el ciclo interno asexual se esquematiza la formación de macroconidias a partir de hifas aéreas y su germinación para formar un nuevo micelio. El ciclo externo muestra la fase sexual de <i>N. crassa</i> , la cual se inicia con el protoperitecio y su fertilización vía tricogina por un conidio de tipo de apareamiento distinto al de la colonia formadora del protoperitecio. Esto conlleva a la formación de ascas conteniendo ascosporas (modificado de Deacon, 2000).	11
Figura 4	Sistemas sensores de aminoácidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Los niveles de la proteína Gcn4p dentro de la célula se controlan de diferentes formas dependiendo de la cantidad de aminoácidos disponibles en el medio. El sistema SPS es un sensor de proteínas, Gcn2p se encuentra unido al ribosoma y monitorea la cantidad de ARNts cargados con aminoácidos, Pcl5p y TOR monitorean la disponibilidad de nutrientes. Todos los sistemas están conectados a rutas de trasducción de señales que al final determinan la cantidad de Gcn4p en la célula. SPS y TOR determinan si es Gap1p la que internalizará aminoácidos o serán otros transportadores específicos (ST) los que se distribuirán a las membranas. Modificada de Braus <i>et al.</i> 2004.	17

Figura 5	Mapa del plásmido pMF272. (A) construcción del plásmido: el plásmido contiene el gen de la proteína fluorescente <i>sgfp</i> , la cual se encuentra regulada por el promotor de <i>N. crassa ccg-1</i> , las secuencias 5' his-3 y 3' his-3 flanco son para dirigir el plásmido y recuperar la función del locus <i>his-3</i> de <i>N. crassa</i> . Así mismo porta el gen de la β -lactamasa (<i>bla</i>) que confiere resistencia a ampicilina en bacterias. (B) Sitio de clonación múltiple del plásmido. Se observan los sitios de corte para varias enzimas de restricción que pueden ser utilizadas (B modificado de Freitag, <i>et al.</i> 2005).	24
Figura 6	Esquema de la regionalización de la hifa según McDaniel y Roberson (2000).	35
Figura 7	Alineamiento de los primeros tres hits resultantes del BLAST y la proteína depositada como NAAP-1 (<i>gap</i>).	37
Figura 8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico <i>N. crassa</i> teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), que es ADN de fago lambda digerido con <i>EcoR I</i> y <i>Hind III</i> . En el segundo carril se observa el ADN genómico obtenido de la cepa silvestre de <i>N. crassa</i> N1.	40
Figura 9	Electroforesis en agarosa al 1% del amplicón correspondiente al gen <i>ngap-1l</i> , teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM). En el segundo carril se observa el control negativo (se utilizo agua) (-) y en el tercer carril el amplicón correspondiente al gen <i>ngap-1l</i> .	41
Figura 10	Electroforesis en agarosa al 1% de las digestiones de <i>ngap-1l</i> y el plásmido pMF272, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), los carriles marcados como <i>ngap-1l</i> y pMF272 son sin digerir.	42
Figura 11	Electroforesis en agarosa al 1% de las PCR de las colonias de bacterias transformantes, ADN teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM). Las colonias fueron numeradas del 1 al 14 (C1-C14).	43
Figura 12	Electroforesis en agarosa al 1% de la digestión del plásmido pJCD-1, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), en el segundo se observa que el plásmido ha liberado una banda correspondiente al gen <i>ngap-1l</i> (2,075 pb) resultado de la	44

digestión, comprobando así la integración.

Figura 13	Hifa creciendo en MMV (NH_4NO_3) observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa (a-c). (d) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (d) y (e).	47
Figura 14	Hifa creciendo en MMV con urea como fuente de nitrógeno observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa. (d) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (d) y (e).	48
Figura 15	Hifas creciendo en urea observadas por microscopía confocal de escaneo láser. Se observa la cercanía del marcaje al ápice de la hifa así como la intensidad del marcaje. a) canal de fluorescencia, b) Contraste de fase, c) superposición de a) y b).	49
Figura 16	Hifa creciendo en MMV con KNO_3 como fuente de nitrógeno observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa. (d) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (d) y (e).	50
Figura 17	Esquema de comprobación de la integración por medio de los oligonucleótidos pMR10, 11, 12 y 13.	52
Figura 18	PCR comprobatoria. Se observan los amplicones resultantes de los oligonucleótidos pMR10-pMR11 y pMR12-pMR13.	53
Figura 19	Morfología colonial de la cepa FGSC #9718 (a) y la cepa transformante tJCD-1 (b), tomadas a las 32 horas.	54

INDICE DE TABLAS

	Leyenda	Página
Tabla I	Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.	28
Tabla II	Resultado del BLAST contra la proteína Gap1p de <i>S. cerevisiae</i> .	38
Tabla III	Localización de la proteína NGAP-1L en los distintos medios de cultivo.	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los Hongos: Estructura celular

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, multicelulares, formadores de esporas y con reproducción sexual y asexual. Están comúnmente formados por estructuras filamentosas ramificadas o hifas, rodeadas por paredes celulares formadas por quitina y glucanos, entre otras moléculas orgánicas (Alexopoulos *et al.* 1996). Al conjunto de hifas se le llama micelio, que se extiende por crecimiento apical de las hifas, las cuales presentan diámetros que van de 1 μm a 30 μm y ramifican en cualquier dirección (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 1997). Como unidades somáticas, las hifas, salvo algunas excepciones, exhiben diferenciación parcial o muestran muy pobre división de trabajo. Sin embargo, la mayor parte de las estructuras son capaces de generar un nuevo individuo si son fragmentadas (Alexopoulos *et al.* 1996).

Internamente, el citoplasma en las hifas puede estar interrumpido por extensiones transversales de la pared celular llamadas septos. Los septos dividen al organismo en compartimentos y varían en complejidad, los septos típicos de los ascomicetos presentan poros o perforaciones que comunican los compartimentos, por los cuales fluyen protoplasma, membranas, organelos, mitocondrias e incluso, núcleos. Sin embargo, en hongos filamentosos menos evolucionados se presentan septos confinados a ciertas regiones, mientras el

resto de la hifa es aseptada o cenocítica (Gow y Gadd, 1995; Alexopoulos *et al.* 1996). Los núcleos son numerosos, pequeños (1-3 μm de diámetro) y adquieren formas globulares o elongadas. Su estructura es similar a la de otros eucariotas (Somers *et al.* 1960; Namboodiry y Lowry, 1967; Gow y Gadd, 1995; Alexopoulos *et al.* 1996). Los hongos cuentan con los organelos y estructuras que se encuentran comúnmente en todos los eucariotas (Alexopoulos *et al.* 1996). La estructura del Aparato de Golgi en los hongos es diferente a la de otros organismos eucariotas. Se observan como cisternas redondeadas, en lugar de sacos apilados (Sewall *et al.* 1989; Alexopoulos *et al.* 1996). Las mitocondrias de los hongos son particularmente alargadas, tienen crestas tipo plato y se alinean paralelamente al eje longitudinal de la hifa (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 1997). En el ápice de la célula se encuentra una estructura densa, formada de vesículas, y que rige el crecimiento apical de la hifa, conocida, como Spitzenkörper (del alemán cuerpo apical) (**Figura 1**). Estas vesículas contienen enzimas y moléculas preformadas que son responsables de la síntesis de la pared celular (Brunswik, 1924; Girbardt, 1957; Bartnicki-García, 1989, 1990).

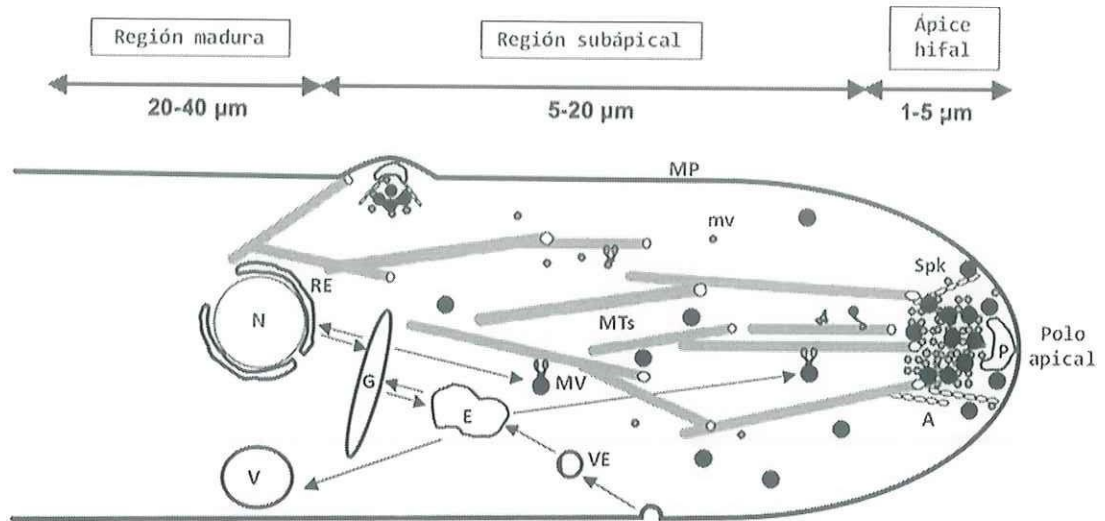


Figura 1. Esquema modelo de la organización celular en una hifa vegetativa con crecimiento polarizado como es el caso de *N. crassa*. Se observan: las vesículas secretoras (**MV, mv**) que contienen los materiales para la formación de la pared celular y se originan en la región subápical, los microtúbulos (**MTs**) por los cuales viajan las vesículas secretoras hasta el Spitzkörper (**Spk**) donde se acumulan a lo largo de los cables de actina (**A**) para después fusionarse con la membrana plasmática (**MP**), vesículas de endocitosis (**VE**) que brotan de la MP que migran hacia el endosoma (**E**) el cual distribuye las partículas endocitadas, vacuolas (**V**), Aparato de Golgi (**G**), retículo endoplasmático (**RE**) y núcleo (**N**). Modificado de Riquelme y Bartnicki-García, 2008.

La pared celular en los hongos es una estructura compleja y dinámica. Tiene una estructura básica microfibrilar que se encuentra embebida en una matriz amorfa que se extiende hasta el exterior (Alexopoulos, *et al.* 1996). Los componentes estructurales de la pared celular son materiales cristalinos e hidrofílicos, como los β -glucanos (con enlaces β -1,3 y β -1,6) y la quitina. Por otra parte la matriz está conformada por polisacáridos hidrofílicos, además de α -glucanos y glucoproteínas. Sin embargo la composición puede variar y ésta

puede presentar otros compuestos como lípidos y melaninas, entre otros (Alexopoulos, *et al* 1996; Deacon, 1997; Davis, 2000). La pared celular juega un papel importante en el crecimiento de la hifa, ya que le confiere soporte para mantener su estructura mientras crece. Como se mencionó anteriormente las hifas crecen solo en la región apical; este tema ha sido ampliamente estudiado por diversos autores y por lo tanto existen tres teorías que describen el crecimiento apical de las células fúngicas. La primera apoyada por Wessel (1988) es conocida como la teoría del “estado estacionario”; esta teoría propone que la pared celular es sintetizada sobre una base rígida y cilíndrica de pared celular. La pared recién añadida es plástica debido a que no existen enlaces entre el β -1,3-glucano con la quitina y con el tiempo esta va ganando rigidez conforme se van dando enlaces covalentes entre el β -1,3-glucano y la quitina. La segunda teoría (Heath, 1994) supone que la hifa crece como un protozoario con una coraza cilíndrica, y que la forma de la hifa está dada por el citoesqueleto de F-actina en conjunto con moléculas parecidas a espectrinas e integrinas. Estos tres se encuentran asociados en un complejo esquelético que se encuentra muy concentrado en la punta de la hifa. Y por último se encuentra la teoría del centro suministrador de vesículas o VSC por sus siglas en inglés, propuesta por Bartnicki-García y colaboradores en 1989. Esta teoría postula que el crecimiento y la forma de la hifa están determinados por la distribución polarizada de las vesículas que se encargan de la síntesis de la pared celular. Este modelo asume que hay un equilibrio entre los procesos de síntesis y

deposición de la pared celular, el aflojamiento de la pared por actividad enzimática y la presión de turgor.

En cuanto a su ecología y nutrición, como ya se mencionó anteriormente, los hongos son heterótrofos y, para poder alimentarse, liberan enzimas al medio para digerir su alimento, una vez digerido, es introducido al citoplasma (Alexopoulos *et al.* 1996). Así mismo, una gran cantidad de hongos son saprobios y tienen la capacidad de obtener carbono de diversos tipos de moléculas (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 1997). Estas dos características les permiten degradar la materia orgánica, integrándola a la cadena alimentaria, ocupando así un nicho muy importante para cualquier ecosistema. Otro gran número de ellos viven como parásitos, ya sea de plantas, animales u otros hongos. Sin embargo la mayor parte de éstos son facultativos (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 1997). Existen también interesantes relaciones bióticas positivas con animales y plantas, como ejemplos se pueden mencionar las micorrizas, en el caso de las plantas, y las hormigas cultivadoras, en los animales (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 1997).

1.2 Transporte de solutos

Los hongos son capaces de concentrar solutos del exterior de la célula en su interior a través de transporte activo. La forma en la que estos solutos ingresan activamente a la célula es a través de los canales y permeasas transportadoras; éstos pueden pertenecer a dos tipos de sistemas: los de alta afinidad y los de

baja afinidad (Gow y Gadd, 1995). Los de alta afinidad facilitan la introducción de nutrientes abundantes en el medio a un bajo costo energético, pero en menores cantidades; mientras que los de baja afinidad concentran los solutos dentro de la célula con costos energéticos más elevados, cuando la concentración de los solutos en el medio es baja (Gow y Gadd, 1995; Sanders, 1988). La presencia de dos sistemas para un solo nutriente confiere al organismo capacidad adaptativa. Los sistemas de transporte le permiten a la célula aprovechar cationes, aniones, azúcares y aminoácidos (Gow y Gadd, 1995; Garrill *et al.* 1994; Bowman *et al.* 1983; Lagunas, 1993; Bisson *et al.* 1993; Sanders, 1988; Horak 1986).

1.3 Transporte de aminoácidos

Según Pall (1969), el grupo de compuestos orgánicos que más se transportan activamente mediante permeasas son los aminoácidos. El transporte de aminoácidos en los hongos se da por dos tipos de sistemas: los específicos, que interactúan con aminoácidos bioquímicamente relacionados; o por sistemas generales, que tienen afinidad por todos los aminoácidos (Gow y Gadd, 1995; Horak, 1986). El número de permeasas presentes en los hongos varía según la especie. En el caso de *Neurospora crassa*, un hongo modelo altamente estudiado, se presentan 5 sistemas identificados con números romanos I, II, III, IV y V, de éstos se han identificado al menos 3 genes asociados a los sistemas: el I o también llamado Neutral (N), representado por

el gen *mtr*, es el encargado de transportar aminoácidos aromáticos alifáticos neutrales; el II o General (G), expresado por el gen *pmg*, acarrea todos los aminoácidos (a excepción de la prolina que no posee grupo amino alfa) y el III o Básico (B), figurado por el gen *pmb*, transporta aminoácidos catiónicos. Cabe mencionar que Horak (1986), señala como el sistema II a B y al G como III (Gow y Gadd, 1995; DeBusk y DeBusk 1980; Pall, 1968). Los sistemas N, B y G son constitutivos y de éstos, B y G se observan activos sólo en condiciones de escasez de azufre y nitrógeno (Gow y Gadd, 1995). Por otra parte en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se reportan dos clases de permeasas de aminoácidos, una encargada de importar aminoácidos específicos o aminoácidos relacionados químicamente y otra clase de permeasas, que importan aminoácidos como fuente de nitrógeno. De esta última clase, Rubio-Teixeira y Kaiser (2006) reportan que la más importante es la permeasa general de aminoácidos Gap1p, que al igual que el sistema II de *N. crassa* no es capaz de transportar prolina, pero si los demás aminoácidos, la otra es Put4p, que es específica para prolina. Existen varios estudios que indican que la Gap1p juega un papel importante en el metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*. Se sabe también que Gap1p sufre regulación postraduccional, ya que ésta sólo se localiza en membrana plasmática cuando las células son cultivadas en urea o glutamato (Grenson, *et al.* 1970; Vandebol, *et al.* 1989; Jauniaux y Grenson, 1990; Magasanik, 1992 ; Stanbrough Magasanik, 1995; Rubio-Teixeira y Kaiser, 2006).

Rubio-Teixeira y Kaiser (2006) proponen un modelo de la regulación postraduccional de la proteína Gap1p en *S. cerevisiae*, orquestada por varios genes. Inicia en el aparato de Golgi (trans Golgi), donde dependiendo de la cantidad de aminoácidos en el medio Gap1p será enviado a la membrana plasmática o a la vacuola para su degradación o posible uso inmediato, si la cantidad de aminoácidos en el medio es mayor que la del interior de la célula Gap1p es enviada a la membrana plasmática, pero si no, es ubiquitinada por el complejo de ubiquitinación Rsp5/Bul1p/Bul2p, después pasa al compartimento prevacuolar, donde una vez más pueden ocurrir dos cosas, entrar al endosoma multivesicular (MVE por sus siglas en inglés) o ser reciclado y enviado a la membrana plasmática por la acción de las proteínas Lst4p y Lst7p. Sin embargo, se desconoce si el reciclaje se da por medio del *trans* Golgi o es una ruta directa desde el MVE a la membrana, la proteína Doa, es la encargada de la deubiquitinación de Gap1p antes de entrar al lumen del MVE; eventualmente el MVE se fusiona con una vacuola liberando a Gap1p para su degradación (**Figura 2**). Es también importante señalar que los experimentos realizados localizan la permeasa Gap1p etiquetada con proteína verde fluorescente en la membrana en fuentes pobres de nitrógeno como urea (GFP por sus siglas en inglés) en transformantes de *S. cerevisiae*.

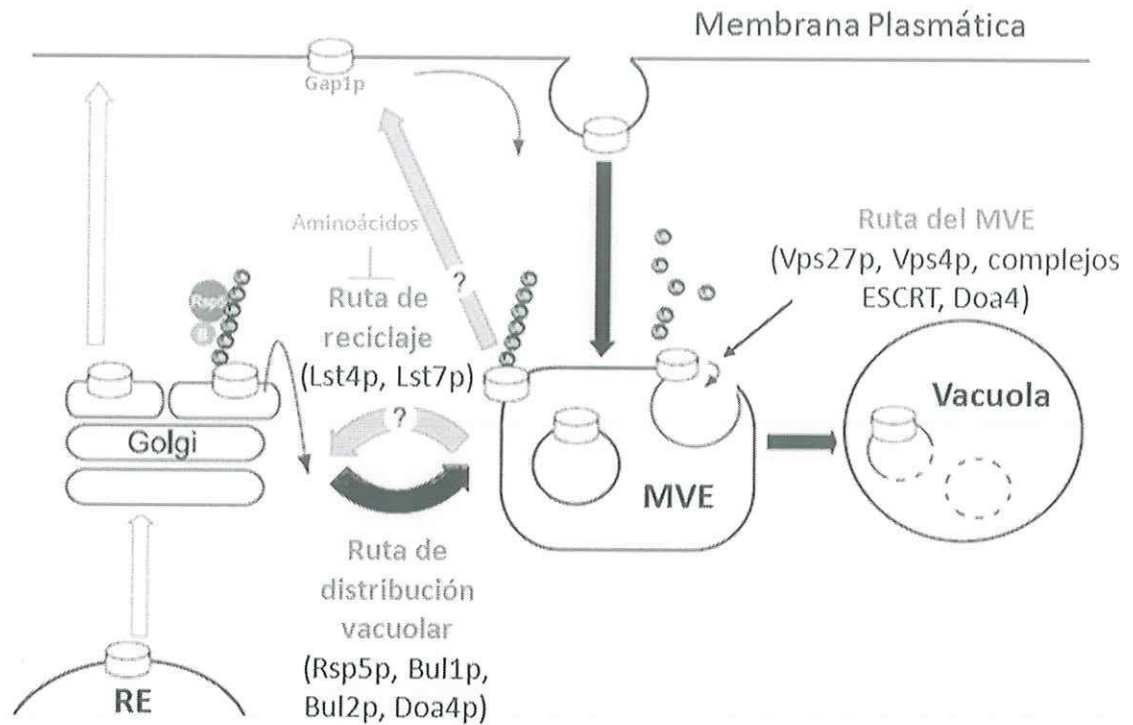


Figura 2. Modelo esquemático de la regulación de Gap1p en el MVE, endosoma multivacuolar (por sus siglas en inglés) de *S. cerevisiae*. Modificado de Rubio-Teixeira y Kaiser, 2006.

1.4 *Neurospora crassa* como modelo de estudio

Los organismos modelo, representan solo una ínfima parte de los organismos presentes dentro de sus reinos y su representatividad va aumentando conforme se va bajando en la jerarquía taxonómica. Sin embargo aunque estadísticamente estos representen solo una pequeña proporción de los organismos de la tierra, muchos de los procesos como los genéticos y fisiológicos, son esencialmente los mismos en una amplia gama de organismos y por lo tanto, los estudios realizados en ellos son la base del conocimiento sobre el funcionamiento y el entendimiento de la vida. En tiempos recientes la

definición de “organismo modelo” se limitaba a organismos como *Drosophila* o el ratón, que se caracterizan por su tamaño reducido y su ciclo de vida de periodos breves. Sin embargo con los proyectos de secuenciación de genomas, se han ido agregando otros organismos de los cuales se ha secuenciado su genoma y cuyo ciclo de vida es aún más corto. Dentro de los hongos existen cuatro especies que se han destacado por sus aportes a la genética, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *N. crassa* y *Aspergillus nidulans* (Hedges, 2002).

Shear y Dodge (1927) y Dodge (1927) en diversos experimentos demostraron que *N. crassa* es un buen modelo eucariota por ser haploide, susceptible a mutagénesis y fácil de cultivar. Además sus estructuras asexuadas y sexuadas son fácilmente reconocibles. Por su susceptibilidad a la mutagénesis existen disponibles un gran número de mutantes (por ejemplo en el Fungal Genetics Stock Center), que permiten el estudio de ciertos genes o incluso de algunas rutas metabólicas. El ciclo de vida de *N. crassa* (**Figura 3**) es relativamente corto; le toma 10 días completarlo y produce millones de esporas ya sea por reproducción sexual o asexual; las ascas contienen una carga genética haploide, lo que permite relacionar directamente el fenotipo con el genotipo. Otra de las ventajas de *N. crassa* es que su genoma ha sido secuenciado y se sabe que tiene entre 10,000 y 13,000 genes (Galagan, *et al.* 2003). *Neurospora* tiene requerimientos nutricionales simples, los requerimientos nutricionales son tan simples que solo necesita una fuente de

carbono como sacarosa o glucosa, una fuente de nitrógeno (se han utilizado amonio o sales de nitrato, e incluso ambas), sales de fosfato, sulfato, potasio, magnesio, calcio, algunos elementos traza como zinc y una pequeña cantidad de biotina (Davis, 2000).

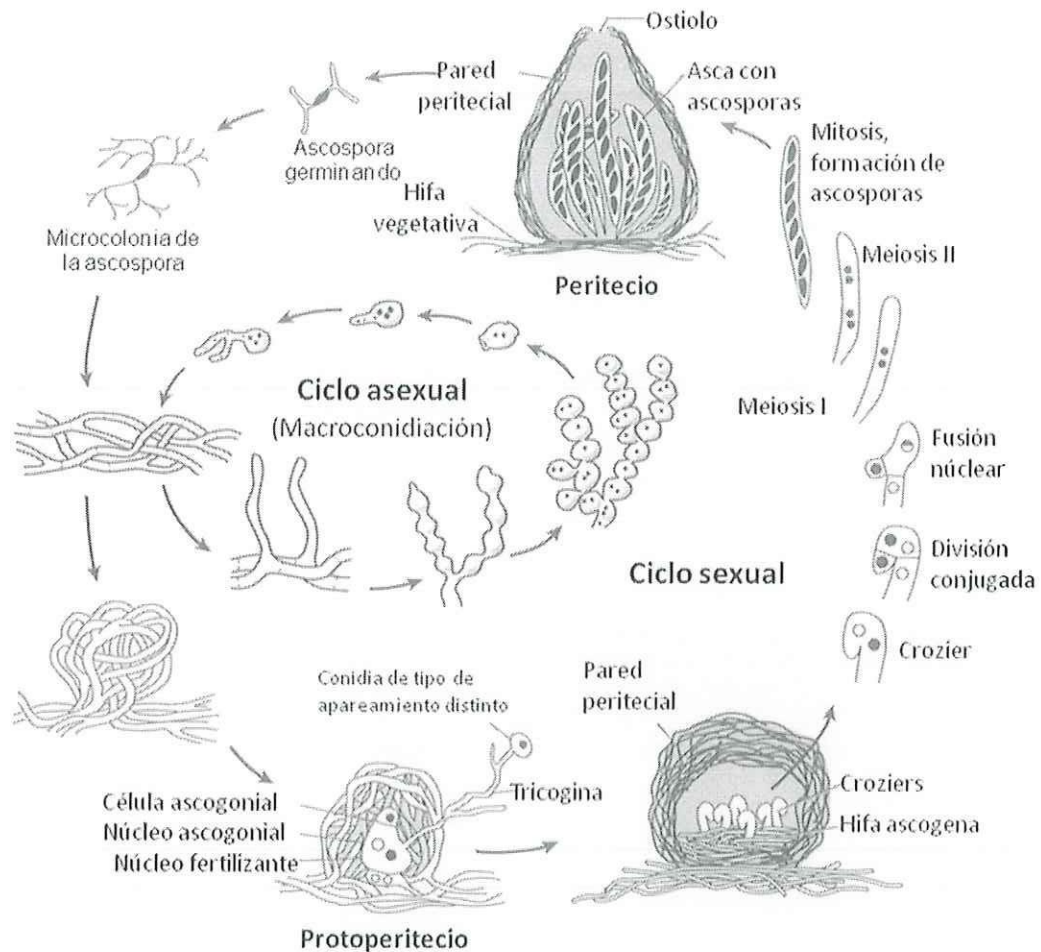


Figura 3. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. En el ciclo interno asexual se esquematiza la formación de macroconidias a partir de hifas aéreas y su germinación para formar un nuevo micelio. El ciclo externo muestra la fase sexual de *N. crassa*, la cual se inicia con el protoperitecio y su fertilización vía tricogina por un conidio de tipo de apareamiento distinto al de la colonia formadora del protoperitecio. Esto conlleva a la formación de ascas conteniendo ascosporas (modificado de Deacon, 2000).

2. ANTECEDENTES

La mayor parte de los organismos se encuentran limitados por la concentración de nitrógeno disponible en el medio. Este se encuentra en una gran cantidad de compuestos simples y en casi todos los compuestos orgánicos complejos; por esta razón la presión evolutiva para desarrollar sistemas de obtención de nitrógeno ha sido fuerte y los ha llevado a utilizar gran parte de los recursos de la célula para la obtención de este elemento. *N. crassa* no es la excepción (Horak, 1986; Davis, 2000).

Se han realizado diversos trabajos sobre permeasas de aminoácidos en las últimas décadas pero no fue hasta 1968 que la permeasa general de aminoácidos fue descrita tanto en *N. crassa* como en *S. cerevisiae* por Pall, Grenson y colaboradores, respectivamente. Estos estudios se basan en la cinética de toma de aminoácidos en el medio así como el uso de homólogos tóxicos de estos aminoácidos. Los homólogos permitieron la descripción de permeasas específicas y sistemas de permeasas para aminoácidos químicamente relacionados. Pall (1968 y 1970) reporta que la toma de aminoácidos por los distintos sistemas de transporte en *N. crassa* están sujetos a inhibición competitiva por otros aminoácidos a los cuales las permeasas son más afines. El mismo autor reporta que la función del sistema II es la de remover trazas de aminoácidos del medio y tiene una gran afinidad tanto para α como β aminoácidos así como L y D-aminoácidos. Posteriormente Sánchez y

colaboradores (1972) reportan la posible dependencia del sistema II a la fuente de nitrógeno. Grenson y colaboradores (1970), por otra parte reportan una permeasa general de aminoácidos y la llaman *gap* (permeasa general de aminoácidos por sus siglas en inglés) en la levadura *S. cerevisiae*. Describe que la actividad de esta permeasa depende de la cantidad de iones de amonio en el medio. En este trabajo también comparan una mutante *gap* con una mutante llamada *aap* (permeasa de aminoácidos por su siglas en inglés). Esta mutante es insensible a los homólogos tóxicos de arginina, lisina y metionina, la canavanina, tiosina y etionina. Sin embargo la mutante de *gap* sola no confiere resistencia a estos compuestos, resaltando así la presencia de permeasas específicas.

En *N. crassa* el sistema general de transporte de aminoácidos se hizo evidente durante el estudio de la doble mutante $Pm^- AB$, la cual era deficiente en los sistemas Neutral (*pma*) y Básico (*pmb*). En este estudio se observó que a pesar de la transinhibición de los sistemas Neutral y Básico, existía transporte de aminoácidos tanto básicos como neutrales (Wolfenbarger y DeBusk, 1971). Gracias al trabajo de Rao y colaboradores (1975) el funcionamiento del sistema general en *N. crassa* fue caracterizado mediante el análisis de la triple mutante *pm-nbg* (deficiente en los tres sistemas, con resistencia a la *p*-fluorofenilalanina, en medio mínimo de Vogel deficiente en amonio. Al mismo tiempo se comprobó que su regulación genética era mediada por un solo locus con la obtención de una mutante deficiente solo en el sistema general (*pm-g*). Estos

descubrimientos confirmaron las sospechas de que el sistema general tiene un papel importante en la obtención de nitrógeno; esto debido al hecho de que la V_{\max} del sistema general es muy alta en medios con fuentes de nitrógeno pobres como el KNO_3 y se suprime en presencia de fuentes como el glutamato, la glutamina y el amonio que son los principales donadores de nitrógeno en *N. crassa*. De igual manera esta información confirma las sospechas de que el sistema general tiene función homologa a la de la permeasa general de aminoácidos (Gap1p) de *S. cerevisiae* (Pall, 1970^a; Grenson, *et al.* 1970; Wolfinbarger y DeBusk, 1971; Sanchez, *et al.* 1972; Grenson y Hou, 1972; Rao, *et al.* 1975; Roon, *et al.* 1975; DeBusk y DeBusk 1980; Courchesne y Magasanik, 1983; Grenson, 1983^a; Grenson 1983^b; Davis, 2000; Magasanik y Kaiser, 2002). Además la capacidad del sistema general de transportar todos los aminoácidos biológicamente activos e incluso D-aminoácidos a una baja velocidad en condiciones de inanición de nitrógeno, indica que este sistema no contribuye significativamente en el transporte de aminoácidos para la célula y por lo tanto no juega un papel en la regulación de la concentración de aminoácidos (DeBusk y DeBusk, 1980).

Se sabe que el sistema II en *N. crassa* es constitutivo sin embargo, se conoce poco acerca de su regulación postraducciona l y sobre su biología molecular. Esto se debe a que hay muy pocos trabajos que han tratado de secuenciar el locus *pmg*, el cual es responsable de la regulación de dicho sistema (Pall, 1970^a; Rao, *et al.* 1972). En el 2001 Margolis-Clark y

colaboradores lograron identificar un gen (denominado *gap*) con alto grado de similitud con el gen *GAP1* de *S. cerevisiae* (41% de identidad). Además el gen *gap* codifica para una proteína con 12 regiones de acoplamiento, lo cual es característico de la superfamilia de permeasas, así mismo la mutante desarrollada denominada GAP^{RIP} se comporta de manera similar a la mutante *pm-g*.

En *S. cerevisiae* se han realizado gran cantidad de estudios sobre la regulación y control de la concentración de nitrógeno y por lo tanto existen más trabajos enfocados en el funcionamiento de la *gap*. La regulación de la fuente de nitrógeno en los hongos está controlada por la ruta de discriminación de nitrógeno (NDP por sus siglas en inglés). En la NDP participan factores de transcripción GATA como Gln3p (codificado por el gen *GLN3*) en levaduras y el gen *nit-2* en *N. crassa* y otros factores no GATA como el factor Ure2p (en levaduras) que es un inhibidor de Gln3p (Braus, *et al.* 2004). Sin embargo la activación de la ruta NDP (también llamada represión de catabólitos de nitrógeno o NCR en inglés) necesita de sensores que sean capaces de percibir la calidad y concentración de las fuentes de nitrógeno disponibles dentro y fuera de la célula. Estos sensores están conectados a los distintos sistemas de permeasas responsables del transporte de aminoácidos. Uno de estos sistemas es el sensor SPS de *S. cerevisiae* el cual recibe su nombre de las tres proteínas que lo componen: *Ssy1p*, *Ptr3p*, *Ssy5p*. Este sensor es el encargado de la modulación de la expresión del gen *GAP1*. Internamente existe otro sensor

importante a nivel ribosomal, es el caso de la proteína Gcn2p en levaduras y el homólogo de esta proteína en *N. crassa* la proteína CPC-3 se encarga de monitorear la cantidad de ARNt cargados con aminoácidos. Otro de los reguladores importantes es el sistema Diana de Rapamicina (TOR por sus siglas en inglés), compuesto principalmente por estas cinasas que se encargan de la regulación de la proliferación celular, la traducción de ARNm, al igual que la nutrición, entre otras. Alguna mutación en el sistema TOR deriva en un comportamiento de inanición. Estos tres sistemas descritos (SPS, Gcn2p y TOR) están ligados armoniosamente y se encargan de la compleja regulación de los distintos transportadores de aminoácidos, en la **Figura 4** se muestra un modelo esquemático de la regulación de nitrógeno en levaduras (Jørgensen, et al. 1997; Cardenas, *et al.* 1998; Sattlegger, *et al.* 1998; Klasson, *et al.* 1999; Forsberg y Ljungdahl, 2001; Forsberg, *et al.* 2001, Braus, *et al.* 2004).

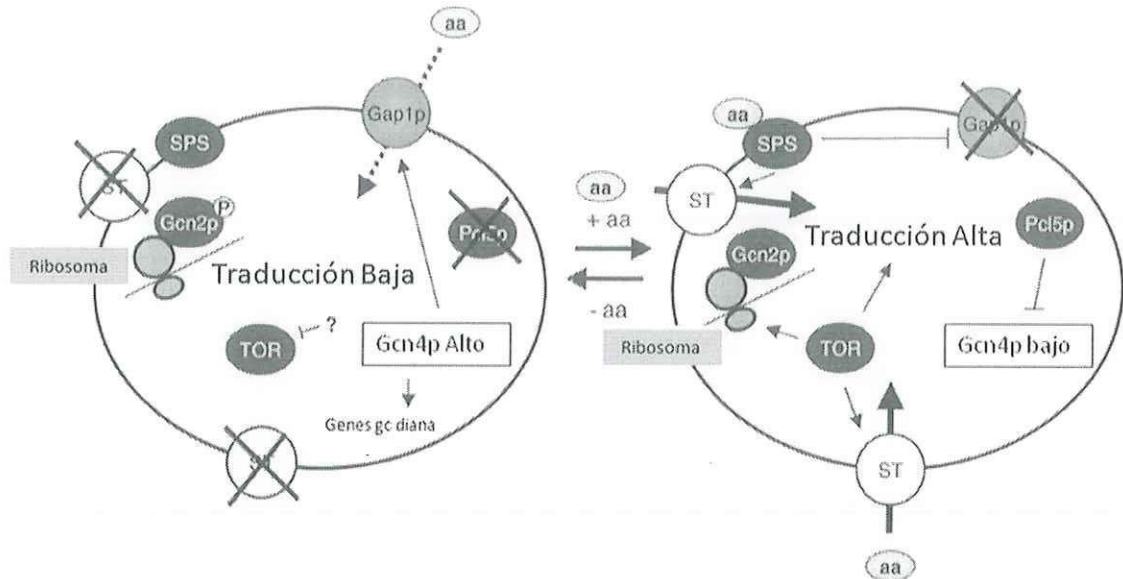


Figura 4. Sistemas sensores de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*. Los niveles de la proteína Gcn4p dentro de la célula se controlan de diferentes formas dependiendo de la cantidad de aminoácidos disponibles en el medio. El sistema SPS es un sensor de proteínas, Gcn2p se encuentra unido al ribosoma y monitorea la cantidad de ARNts cargados con aminoácidos, Pcl5p y TOR monitorean la disponibilidad de nutrientes. Todos los sistemas están conectados a rutas de trasducción de señales que al final determinan la cantidad de Gcn4p en la célula. SPS y TOR determinan si es Gap1p la que internalizará aminoácidos o serán otros transportadores específicos (ST) los que se distribuirán a las membranas. Modificada de Braus *et al.* 2004.

3. JUSTIFICACIÓN

Muchos de los avances en el conocimiento del funcionamiento del cuerpo humano, e incluso en el entendimiento de la vida, se han derivado a partir del estudio de organismos modelo como es el caso de *N. crassa* y *Drosophila* (Hedges, 2002). Además entender los procesos celulares en estos organismos no es solo de importancia para entender el fenómeno de la vida, también es un campo de importante valor en la sociedad, ya que comprender algunos de estos procesos puede traducirse en mejorías económicas y sociales, como es el caso de la biotecnología y la medicina. Los aminoácidos son los precursores de las proteínas y de otros compuestos precursores de sustancias como los antibióticos con anillos β -lactámicos (Braus *et al.* 2004). El estudio del transporte de aminoácidos a través de la membrana fúngica ha permitido descubrir sistemas de proteínas sensores que están involucradas en la regulación de permeasas y proteínas encargadas de la obtención de nutrientes y por lo tanto de la regulación del metabolismo celular (Fosberg *et al.* 2001).

Las permeasas de aminoácidos se han utilizado desde hace algunos años como medios para estudiar el movimiento de moléculas a través de la membrana eucariota, por su capacidad de ser reguladas fisiológica y genéticamente (DeBusk y DeBusk, 1980). Este tipo de estudios permiten entender la fisiología de organismos eucariotas. En el caso de *N. crassa* la importancia de estudiar sus procesos fisiológicos estriba en su estatus de

modelo científico y para el entendimiento de la fisiología de los hongos filamentosos. Ya que en estos últimos han resurgido brotes de organismos patógenos de plantas de importancia económica y en humanos, de los cuales algunos son hongos filamentosos (Agrios, 1997; Walsh, *et al.* 2004).

En los hongos filamentosos no se sabe si el transporte de aminoácidos se da exclusivamente en el ápice o a largo de toda la membrana plasmática. A su vez también se desconoce si la integración de la permeasa a la membrana plasmática es a través del Spitzenkörper. Para responder esto se marcó GAP-1 con GFP en *N.crassa* y se analizó su regulación postraduccional en distintas fuentes de nitrógeno.

4. HIPOTÉISIS

El homólogo de la permeasa general de aminoácidos de *S. cerevisiae* *GAP1*, se localiza en vacuolas o membrana plasmática de las hifas de *Neurospora crassa* dependiendo de la fuente de nitrógeno.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Marcar con GFP y localizar GAP-1 en la cepa 9717 de *N. crassa*.

5.2 Objetivos específicos

1. Análisis *in silico* de ortólogos de *GAP1* en *N. crassa*.
2. Obtener un vector que contenga el gen *gap-1* fusionado en fase con el gen de la GFP.
3. Obtener transformantes que *contengan la construcción* pMF272-GAP-1 integrada correctamente.
4. Analizar la localización de GAP-1::GFP mediante microscopía confocal de escaneo con laser en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Para las transformaciones se utilizó la cepa de *N. crassa* SMRP24 (FGSC #9717, con el genotipo $\Delta mus-51::bar+; his-3$) y como control negativo la cepa SMRP25 (FGSC #9718 con el genotipo delta $mus-51::bar+$). La cepa SMRP24 (FGSC #9717) además de tener mutado el gen *his-3*, tiene escindido el *mus-51*, el cual es homólogo al gen *ku70* el cual es responsable de la unión terminal no-homóloga en mamíferos (NHEJ por sus siglas en inglés), este fenómeno permite que el ADN exógeno se inserte en regiones no homólogas. La remoción del gen *mus-51* evita este fenómeno y por lo tanto asegura la integración del gen en el sitio diana (Ninomiya, *et al.* 2004). En este trabajo se utilizó medio mínimo de Vogel (MMV) líquido y solidificado con 1.5% de agar (AGARMEX) (Vogel, 1956). Para los experimentos de distribución de GAP-1 se modificó la fuente de nitrógeno en el MMV (NH_4NO_3), por cantidades equimolares (en función del NH_4NO_3) de NH_4Cl y de KNO_3 por separado, esto para variar la calidad de la fuente de nitrógeno del medio (siendo el NH_4Cl la mejor fuente de nitrógeno para *N. crassa*) (Horak, 1986) y así poder inducir a la proteína GAP-1 a expresarse en la membrana o en vacuolas.

Para mantener las transformantes de 9717 se agregaron 300 $\mu g/ml$ de L-histidina esterilizados por filtración al medio. Para la selección de las transformantes de *N. crassa* se utilizó MMV-FGS (2% sales de Vogel, 10%

FGS, 1% agar). El FGS se prepara mezclando 20% de sorbosa, 0.5% de fructosa y 0.5% de glucosa esterilizados por filtración.

Para el crecimiento de las bacterias electro competentes de *Escherichia coli* (DH5 α) se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) que está compuesto por 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio. Para seleccionar la células de *E. coli* transformadas se añadió 100 μ g/ml de ampicilina a las placas con medio LB. Las células electro competentes se prepararon, primero estriando células de la cepa DH5 α en una caja con medio LB y se incubó a 37°C toda la noche. Se tomó después una colonia aislada del cultivo y se inoculó en 10 ml de LB líquido. Éste se incubó a 37°C con agitación de 250 RPM, toda la noche. Los 10 ml se usaron de inóculo para un cultivo de 1L de LB precalentado a 37°C y éste se incubó a 37°C con agitación de 250 RPM, hasta obtener un Densidad Óptica (OD₆₀₀) de entre 0.4 y 0.6 (2-3 horas). Una vez obtenida la densidad óptica requerida se pasó el cultivo a matraces estériles y se enfriaron en hielo por 30 minutos. Se centrifugaron en tubos de polipropileno de 45 ml a 6000 RPM a 4°C, durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente las células (pastilla) se resuspendieron en glicerol al 10% frío y esterilizado. Se centrifugaron a 6000 RPM a 4°C por 10 minutos y se desechó el sobrenadante y se repitió este paso. Las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol, al 10% frío y estéril. Se hicieron alícuotas de 20 μ l y se congelaron en un baño de hielo seco y etanol. Estas se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

6.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de la cepa silvestre N1 (FGSC #988) que sirvió para amplificar el gen *gap-1* y también de la cepa transformante tJCD-1 para comprobar la integración. El ADN se extrajo inoculando conidias de dichas cepas en 100 ml de MMV líquido en matraces de 250 ml. Estos se incubaron cubiertos para no permitir el paso de la luz, a una temperatura de 30°C de 4 a 5 días. Después los micelios se recuperaron en papel filtro Whatman® estéril de 125 mm de diámetro por filtración y haciendo vacío. Una vez recolectado el micelio se secó a presión con otro papel filtro estéril. El micelio se enrolló y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se perforó la tapa y se sumergió en nitrógeno líquido durante 45 segundos. La muestra se liofilizó 24 horas a -40°C a una presión de 0.02 mbar. El liofilizado fue molido con palillos de madera estériles y después colocados en un mortero esterilizado y se pulverizó. El pulverizado se recolectó en un eppendorf nuevo de 1.5 ml. La extracción se realizó con el kit de extracción de ADN DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN®.

6.3 Identificación del gen *gap-1* y diseño de oligonucleótidos

Los genes ortólogos de *GAP1* en *N. crassa* se identificaron realizando un alineamiento local básico (BLAST) de la secuencia de *GAP1* descrita por Jauniaux y Grenson (1990) en *S. cerevesiae* (YKR039W en el SGD) contra el genoma de *N. crassa* en el portal <http://www.broad.mit.edu>. Se seleccionó la

secuencia con más puntaje de las arrojadas por el BLAST cuyo número de acceso en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) es NCU10262.3.

Una vez definido el gen con el que se trabajaría se diseñaron los oligonucleótidos para la reacción de PCR tomando en cuenta el sitio de clonación múltiple del plásmido pMF272 (**Figura 5**). Para el oligonucleótido sentido se agregó la secuencia de restricción de la enzima *Xba*I (T/CTAGA) antes del codón de inicio, tomando en cuenta los requerimientos de corte para la enzima, indicados por la compañía New England Biolabs. Para el oligonucleótido antisentido se utilizó la secuencia de corte de la enzima *Pac*I (TTAAT/TAA), sin tomar el codón de paro (TGA) del gen, tomando en cuenta los requerimientos de corte para la enzima, indicados por New England Biolabs. Se utilizó el programa FastPCR® versión 3.8.3.0 para analizar la calidad de los oligonucleótidos antes de ser pedidos. Además se analizaron las secuencias con el software Vector NTI 10.1.1, para evitar cortes intermedios en el gen con las enzimas de restricción seleccionadas y para asegurar que la secuencia insertada se encuentre dentro del sitio de clonación del plásmido pMF272 y mantener el marco de lectura abierto. También se utilizaron los oligonucleótidos pMF272F y pMF272-R2 para las PCR de colonia. Además se utilizaron los oligonucleótidos MRp10, MRp11, MRp12 y MRp13 para comprobar la integración del gen en el locus de la Histidina-3 de la cepa 9717 de *N. crassa*.

En la **Tabla I** se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

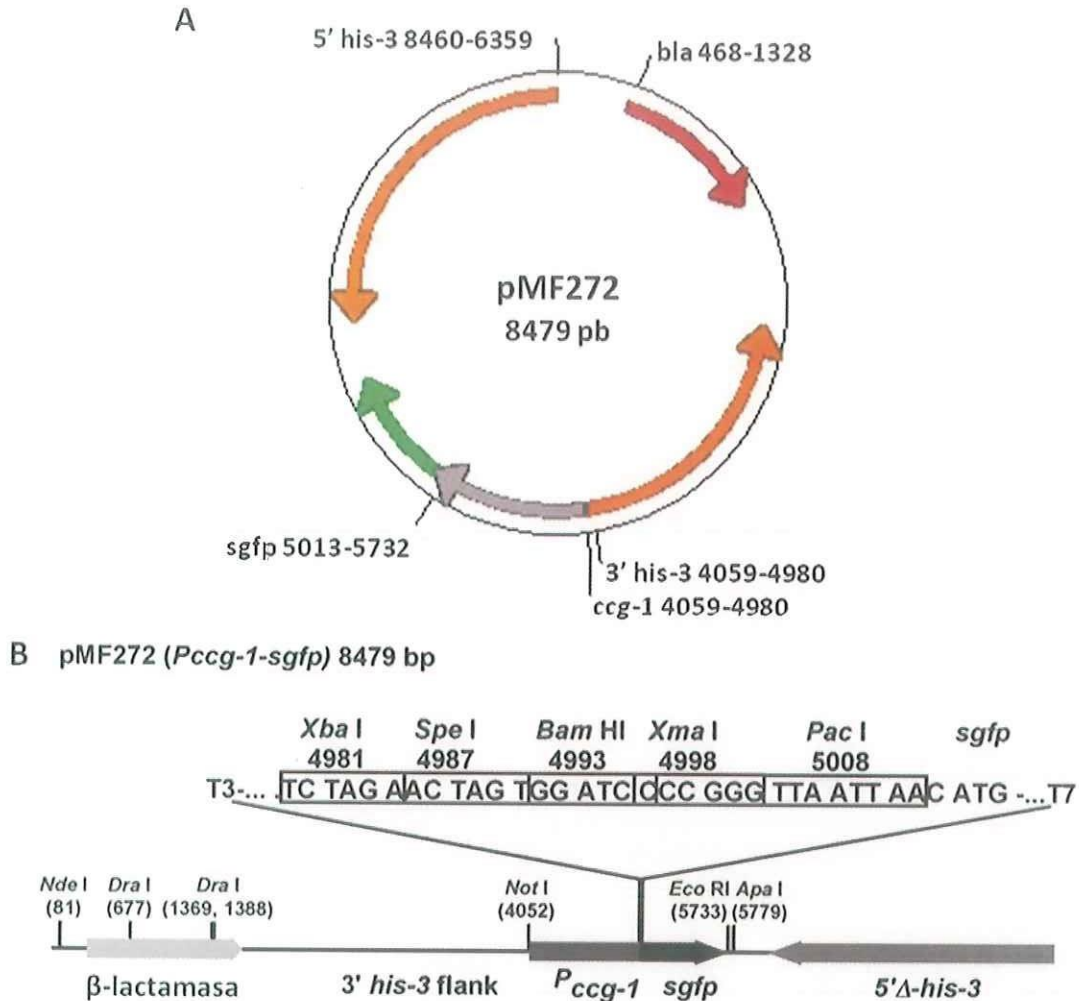


Figura 5. Mapa del plásmido pMF272. **(A)** construcción del plásmido: el plásmido contiene el gen de la proteína fluorescente *sgfp*, la cual se encuentra regulada por el promotor de *N. crassa* *ccg-1*, las secuencias 5' his-3 y 3' his-3 flanco son para dirigir el plásmido y recuperar la función del locus *his-3* de *N. crassa*. Así mismo porta el gen de la β-lactamasa (*bla*) que confiere resistencia a ampicilina en bacterias. **(B)** Sitio de clonación múltiple del plásmido. Se observan los sitios de corte para varias enzimas de restricción que pueden ser utilizadas (**B** modificado de Freitag, *et al.* 2005).

Tabla I. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Tamaño del fragmento (Kb)	Referencia
Gap1-F	GCT CTA GAA TGG CCG CTT ACG GC	62.2	2.1	Este estudio
Gap1-R	CTT AAT TAA ACA AAA AAA CCG ATA AAC C	52.6		Este estudio
pMF272F	CAA ATC AAC ACA ACA CTC AAA CCA	54.5	Dependiente del inserto	Freitag <i>et al</i> , 2002
pMF272-R-2	AGA TGA ACT TCA GGG TCA GCT TG	62		Riquelme <i>et al</i> 2007
MRp10	AGA GAC AAG AAA ATT ACC CCC TTC TT	62	3.2	Riquelme <i>et al</i> 2007
MRp11	AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC	62		Riquelme <i>et al</i> 2007
MRp12	ATA ATG AAC GGA AGG TAG TTG TAG AAA G	61	2.1	Riquelme <i>et al</i> 2007
MRp13	ATG GAT ATA ATG TGG CTG TTG AAA G	61		Riquelme <i>et al</i> 2007

6.4 Amplificaciones de ADN

El gen *gap-1* se amplificó del ADN genómico de la cepa silvestre de *N. crassa* N1 previamente extraído. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 50 μ l conteniendo: 1 μ l de ADN (100 ng/ μ l), 1 μ l de oligonucleótido sentido y 1 μ l de oligonucleótido antisentido (10 μ M), 5 μ l de una mezcla de los deoxinucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina a una concentración de 2.5 M), 2 μ l de sulfato de magnesio (50 mM) y 0.2 μ l (1 unidad) de Platinum® High Fidelity Taq polimerasa (Invitrogen®) de alta fidelidad, y 5 μ l de solución buffer Platinum® HiFi 10x y después se completaron los 50 μ l con agua desionizada estéril. Las reacciones se colocaron en un termociclador Nyx Technik modelo ATC 401 con el siguiente programa: el primer paso de 94 °C por 2 minutos para desnaturalizar el ADN, el segundo paso de 94 °C por 30 segundos, tercer paso de 55 °C (esta temperatura depende de los oligonucleótidos, ver **Tabla 1**), un cuarto paso de 68°C por 2 minutos (el tiempo del ciclo depende del tamaño del amplicón), se repiten los pasos 2, 3 y 4, 30 veces y por último 5 minutos a 68°C. Las comprobaciones se realizaron con otra polimerasa, la GoTaq®. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l en el cual se añadieron: 0.3 μ l de ADN (50-100 ng/ μ l) o células en caso de PCR en colonias, 3.0 μ l de solución amortiguadora GoTaq 5x [incluye , 1.5 μ l de cloruro de magnesio (25 mM)], 0.6 μ l de una mezcla de deoxinucleótidos (2.5 mM), 0.3 μ l de cada oligonucleótido, 0.2 μ l de GoTaq polimerasa (5U/ μ l) (Promega®). El programa es el previamente mencionado

solo con diferencias en el paso 4 donde la temperatura de extensión se cambió a 72°C y el tiempo cambia dependiendo del tamaño del amplicón, y en el paso 6 la temperatura cambió a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (grado analítico, Promega®) con 0.1 µg/ml de bromuro de etidio (Invitrogen®). Se utilizó como marcador de peso molecular ADN del fago Lambda digerido por *EcoRI* + *HindIII* (Promega®). El gel fue colocado en una celda de electroforesis modelo Mini Sub Cell GT (Biorad®). Los productos de PCR y el marcador de peso molecular fueron mezclados individualmente (5:1) con amortiguador de carga Gel Pilot 5x (QIAGEN®) y después depositados en los pozos del gel con una micropipeta. Se corrió la electroforesis a un voltaje de 70 V/cm, utilizando la fuente de poder Molecular Imager Gel Doc XR System (Biorad®). Cuando fue necesario purificar el ADN, las bandas fueron cortadas del gel y purificadas utilizando el kit Qiaquick Gel extraction kit® (Qiagen®). Las eluciones finales se realizaron en 30 µl de solución de elución para aumentar la concentración de ADN.

6.5 Construcción de la fusión *gap-1::gfp*

En este estudio se utilizó el plásmido pMF272 (**Figura 5-A**) de 8,479 pares de bases (Freitag, *et al* 2002). Este plásmido tiene el promotor *ccg-1* de *N. crassa* (McNally y Free, 1988). Este plásmido permite la recuperación del locus *his-3* en la cepa Mus 51 #9717 por recombinación homóloga. Además contiene el gen que codifica para la β -lactamasa que confiere resistencia contra la ampicilina.

Tomando en cuenta la secuencia de nucleótidos en el sitio de clonación múltiple del plásmido pMF272 (**Figura 5-B**) se diseñaron los oligonucleótidos Gap1-F y Gap1-R para la obtención del plásmido recombinante. En la **Tabla 1** se muestra la secuencia de los oligonucleótidos resultantes, los cuales contienen la secuencia de corte de las enzimas *Xba* I y *Pac* I.

Para la fusión de *gap-1::gfp* los amplicones de *gap-1* que fueron aislados anteriormente se ligaron al vector pMF272. Para esto se digirieron el vector y el gen amplificado con *Xba*I y *Pac*I, para crear extremos cohesivos para ligar el gen al vector. Para la reacción de digestión se mezcló en hielo: 1 μ l de *Pac*I (10 U/ μ l) y 1 μ l de *Xba*I (20 U/ μ l) (New England Biolabs®), 2 μ l de solución de amortiguación #2® (10x, New England Biolabs), 2 μ l de suero bovino de albúmina a una concentración de 10x (New England Biolabs) y de 3-13 μ l de ADN (14 en caso de ser el amplicón de *gap-1*, y 3 en caso de ser el vector pMF272). La mezcla de 20 μ l con el vector y el inserto se incubaron a 37°C por

la noche (overnight). Para evitar posteriormente la ligación de los fragmentos se añadió a la mezcla 1 μ l de fosfatasa alcalina de camarón (1 U/ μ l, Promega®) y se incubó a 37°C por 1 hora. Después se añadió EDTA (0.5 M, pH 8) para desactivar la fosfatasa. Los productos de la digestión se corrieron en un gel y se purificaron utilizando el kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN) y fueron recuperados en 30 μ l de solución de elución. Después de ser purificados, el vector y el inserto se mezclaron a una razón 1:3 y se añadió 1 μ l de ligasa T4 (3 U/ μ l, Promega) más 3 μ l de solución amortiguadora T4® (5x, Promega). Se incubó la reacción a 16°C por una hora y después a 4°C por 24 horas.

El producto de la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* electrocompetentes por electroporación y aumentar la concentración de las construcciones. Para esto, células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se descongelaron (se mantienen a -86°C) en hielo. Un volumen de 20 μ l de células se mezcló con 1 μ l del producto de la ligación. Posteriormente se vertió en una cubeta de electroporación (de 2mm) previamente enfriada en hielo y se le dió un pulso con el programa predeterminado para *E. coli* en el electroporador Gene Pulser Xcell, Biorad® (1.8 kV, 25 μ F, 200 Ω , 14 milisegundos). Inmediatamente después se agregó 1 ml de medio LB y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se incubó con agitación (225 rpm) a 37°C por una hora. El cultivo fue esparcido en un placa con medio LB sólido con 100 μ g/ml de ampicilina. Varias de las colonias que crecieron, por haber ganado resistencia a la ampicilina, fueron tomadas para comprobar que el plásmido había sido internalizado por la

célula. Las colonias fueron tomadas con una punta de micropipeta y se sembraron (presionando la punta en el agar levemente) en una placa cuadrada y numerada para conservar las colonias transformadas, el resto de las células fueron mezcladas con los oligonucleótidos pMF272-F y pMF272-R-2 (**Tabla I**) reactivos necesarios en tubos de 0.2 µl para realizar una PCR de colonia. Se programó el termociclador para correr un ciclo de 95°C por 5 minutos, un segundo ciclo de 95°C por 30 segundos, otro tercer ciclo de 55°C por 30 segundos, otro más de 72°C por 2 minutos y un último ciclo de extensión de 10 minutos. Las colonias que resultaron portadoras del vector portando el inserto (10,639 pb), fueron sometidas al proceso de extracción de ADN con el kit QIAprep spin Miniprep Kit® de Quiagen a partir de cultivos con medio LB líquido.

6.6 Secuenciación del plásmido

El plásmido purificado fue enviado a Eton Bioscience Inc. para la secuenciación terminal de las fusiones. Esto permitió asegurar que la construcción *gap-1::gfp* no haya sufrido mutaciones. Para esto se preparó una reacción de 8 µl (según las indicaciones de la página <http://www.etonbio.com/faq.php#eton>), con 250 ng/µl de ADN y 1 µl (2.5 µM) de primer (una reacción con pMF272-F y otra con pMF272-R-2, **Tabla I**) y se llevó a 8 µl con agua destilada estéril. Para el análisis de la secuencia se utilizó el

programa FinchTV, Versión 1.4.0 (Geospiza Inc.) y el programa ApE (A plasmid Editor por M. Wayne Davis) versión 1.1.0.4.

6.7 Transformaciones en *Neurospora crassa*

Las macroconidias de la cepa SMRP24 se sembraron en 100 ml de MMV sólido con 0.5 mg/ml de L-histidina y se incubaron a 30°C. Una vez se observó micelio abundante, este se colocó en la luz para inducir la conidiación. Cuando la colonia se tornó de color anaranjado fuerte, se vertieron 50 ml de agua deionizada estéril en condiciones estériles y se agitó el matraz para despegar las conidias, concentrándolas en el agua. Una vez desprendidas las macroconidias, éstas se vertieron en un tubo estéril de polipropileno de 50 ml hasta obtener alrededor de 35 ml. Se lavaron 3 veces por centrifugación a 5,000 rpm por 5 minutos a 4°C (centrífuga, modelo Multifuge 1 S-R, Heraeus). En ambos lavados se desechó el sobrenadante y se resuspendió en sorbitol estéril (1M). Posteriormente se resuspendió la pastilla en sorbitol y se guardó a -20°C.

Las macroconidias cosechadas se utilizaron para el proceso de electroporación. Antes de esto el vector con el gen insertado se linearizó para mejorar la eficiencia de la transformación. Para esto se preparó una reacción de 20 µl de volumen final, con 3 µl de plásmido, 1 µl de enzima *Ssp I* a 5 U/µl (New England Biolabs), 2 µl de NEBuffer 4® (5x, New England Biolabs) y 14 µl de agua desionizada estéril. La enzima fue desactivada de la forma ya descrita y fue purificada en gel por el kit ya mencionado. Una vez comprobado el tamaño

del vector linearizado y su concentración en gel de agarosa al 1%, el vector linearizado (1 µg) se mezcló con 40 µl de suspensión de conidias. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación estéril de 2 mm enfriada en hielo (Daigger®) y se mantuvo en incubación a 4°C por 10 minutos. La celda se colocó en el electroporador (Gene Pulser Xcell, Biorad®) y se programó un protocolo de 600 Ohms, 25 µFD y 1.5 kV para obtener un tiempo constante de 12-14 milisegundos. Inmediatamente después se añadió 1 ml de sorbitol (1M), y las conidias se transfirieron a un tubo de polipropileno de 15 ml y se añadió 1 ml de solución de recuperación [Sales de Vogel (50x) 12 ml, 12 gr de extracto de levadura en 600 ml de agua y 1.2 ml de L-histidina (500x)]. El tubo con las conidias se incubó en agitación a 30°C y 250 rpm por 4 horas. Posteriormente las macroconidias transformadas se sembraron en 6 cajas petri con medio MMV-FGS (este medio limita el crecimiento de las colonias). La solución de conidias se dividió en volúmenes iguales para la siembra. Estas cajas se incubaron a 30°C hasta que se observaron colonias (2-3 días).

Las colonias se transfirieron a tubos de vidrio con agar inclinado y se incubaron por 2 días a 30°C. Una vez crecieron lo suficiente se sacaron y se dejaron varios días en la luz para inducir la conidiación. Una vez que las cepas conidieron se guardaron en el refrigerador para su conservación.

6.8 Microscopía Confocal

Para observar y analizar las células las muestras se sembraron en cajas petri con MMV o MMV sin NH_4NO_3 y diferentes fuentes de nitrógeno, después se incubaron a 25 o 30°C de 6-12 horas y se prepararon conforme al método de bloque invertido de Hickey y colaboradores (2002).

Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio confocal de banda con láser invertido modelo Zeiss LSM-510 META de la marca Carl Zeiss® en el cual se usó el objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 de Carl Zeiss®) y aceite de inmersión, Immersol 518 (Carl Zeiss®). Se utilizó el laser de Ión Argón de la línea 480 con el filtro d bandpass de emisión de (505-530). Para ver y capturar las imágenes se usó el programa LSM 520 image examiner (Version 3.2, Carl Zeiss®).

6.9 Regiones de la hifa

En este estudio se utilizará la definición de las regiones de la hifa descritas por McDaniel y Roberson (2000) que consiste en tres regiones: La región I, que son los primeros 2 a 5 μm del ápice de la hifa, donde se encuentra el Spitzenkörper; La región II, también llamada subapical, que inicia en donde termina el Spitzenkörper y termina donde comienzan los núcleos; y La región III, inicia donde termina la distribución de los núcleos, hasta el resto de la hifa (Figura 6).

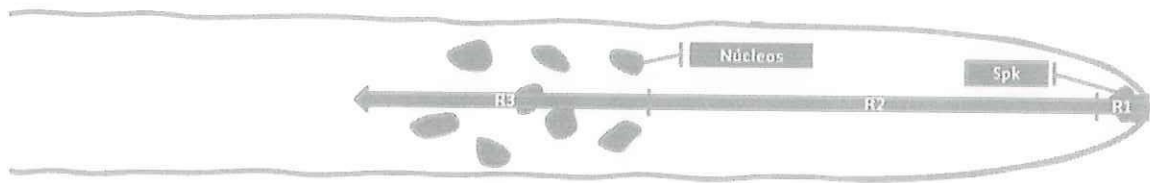


Figura 6. Esquema de la regionalización de la hifa según McDaniel y Roberson (2000).

6.10 Análisis de crecimiento

Para saber si los efectos de la fuente de nitrógeno utilizada en los medios de cultivo afectaban específicamente a la cepa transformante tJCD-1, se crecieron simultáneamente conidias de la sepa tJCD-1 y la cepa FGSC #9718 como control por triplicado en MMV, MMV con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y MMV con urea como fuente de nitrógeno. En las cajas se trazaron 8 líneas partiendo del punto de inoculación y el crecimiento de las hifas se marco siguiendo el contorno de la colonia después de 4 horas de crecimiento y posteriormente cada 2 horas por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas se midió el crecimiento en milímetros desde el punto de partida hasta cada una de las líneas de crecimiento marcadas. Estos datos se graficaron y se calcularon los intervalos de confianza con un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico*

El BLAST se hizo comparando la secuencia de aminoácidos predicha para el gen *GAP1* de *S. cerevisiae* contra la base de datos de genes de *N. crassa* del instituto Broad, esto para buscar homología en función. Se obtuvieron 13 genes de los cuales se seleccionó el que tenía el puntaje más alto y un valor de expectativa (valor-E) de 0.0: El gen con el número de acceso NCU10262.3, el cual está marcado como una permeasa de aminoácidos y como miembro de la familia de permeasas, por sus características (**Tabla II**). Posteriormente la proteína Gap1p (teórica) de *S. cerevisiae* se alineó con las primeras 3 secuencias de aminoácidos arrojados con el BLAST y una más correspondiente a la proteína NAAP-1 descrita por Margolis-Clark y colaboradores (2001) y que reportan como la permeasa general de aminoácidos en *N. crassa* que fue encontrada buscando literatura después de haber realizado el marcaje de la proteína NCU10262.3. El alineamiento mostro los mismos resultados que el BLAST la secuencia más parecida a Gap1p fue la proteína codificada por el gen NCU10262.3, sin embargo se encontró que la proteína depositada como NAAP-1 (*gap*) es la misma que el tercer hit del blast (**Figura 7**).

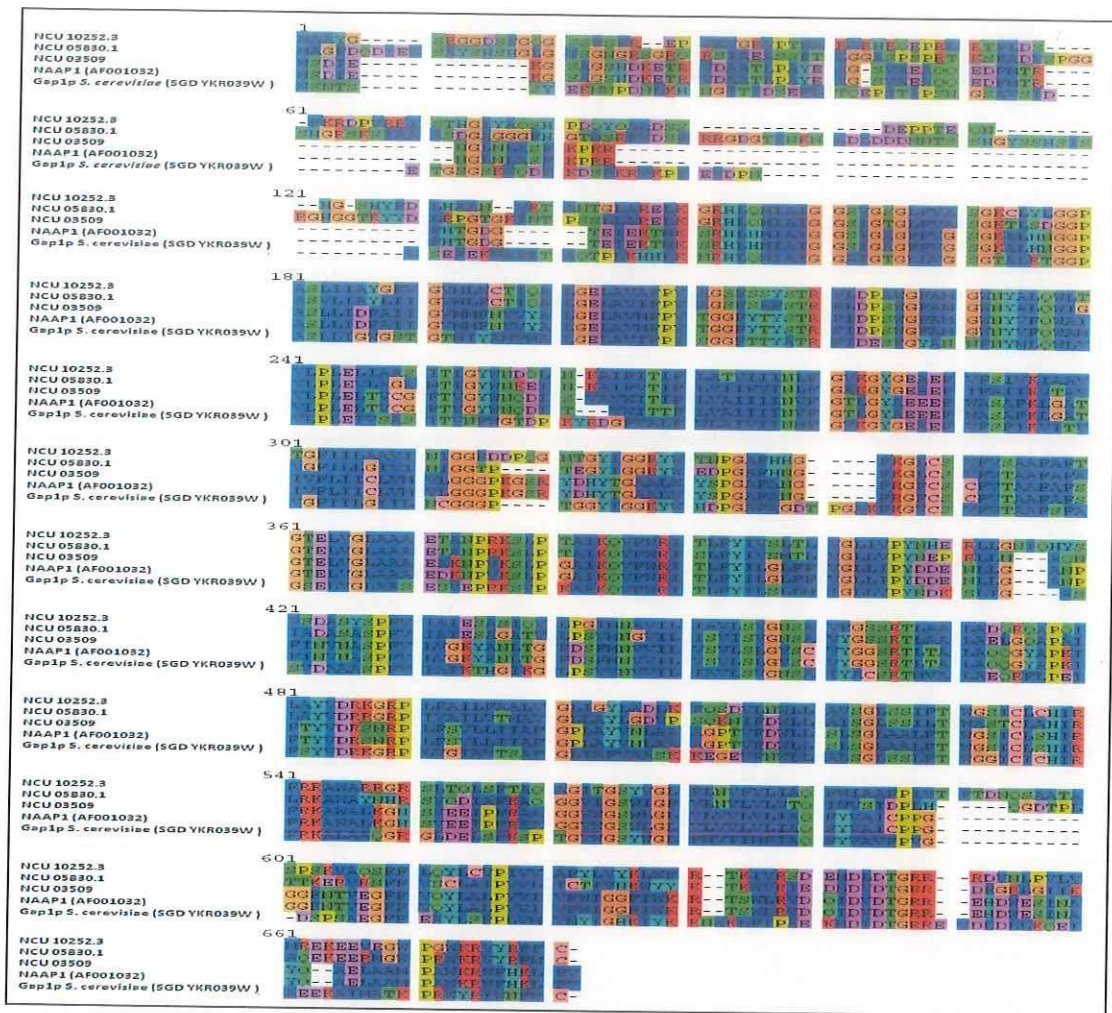


Figura 7. Alineamiento de los primeros tres hits resultantes del BLAST y la proteína depositada como NAAP-1 (*gap*).

Tabla II. Resultado del BLAST contra la proteína Gap1p de *S. cerevisiae*.

Gen	Puntaje (Bits)	Valor E	Tamaño de alineamiento
NCU10262.3	489.574	0	543
NCU05830.3	462.225	0	534
NCU03509.3	445.662	0	518
NCU05168.3	359.762	0	526
NCU07129.3	308.961	0	499
NCU04435.3	280.411	0	532
NCU00721.3	274.633	0	499
NCU10276.3	262.307	0	497
NCU05198.3	243.432	0	490
NCU04468.3	192.2	0	364
NCU02195.3	40.817	9.88423×10^{-4}	260

7.2 Obtención del plásmido recombinante

Una vez realizada la miniprep para la obtención de ADN genómico (**Figura 8**), se tomó 1 μ l de ADN genómico y se realizó una PCR para obtener el gen llamamos *ngap-1l*. Se obtuvo una banda de aproximadamente 2.1 kb. El tamaño esperado del amplicón que incluye el marco de lectura abierto NCU10262.3 y los sitios de corte de las enzimas de restricción es de 2,083 pb (**Figura 9**). Después de purificarlo, el amplicón se sometió a digestión con las enzimas *Xba I* y *Pac I* y simultáneamente se digirió el plásmido pMF272. La

electroforesis mostró una banda de un tamaño de 2075 pb y el plásmido linearizado (**Figura 10**). Tras ligar y transformar se obtuvieron 19 colonias de *E. coli* que resistieron la ampicilina, y de éstas se encontraron 8 colonias que contenían una banda del tamaño esperado para el gen *gap-1* (**Figura 11**). El ADN plasmídico obtenido por Minipreps se sometió nuevamente a una digestión para comprobar la integración del gen en el sitio de clonación múltiple del plásmido, con las enzimas de restricción ya mencionadas y se observó una banda correspondiente al tamaño del gen *gap-1* (**Figura 12**). Se seleccionó uno de los clones y el plasmido resultante pJCD-1 fue secuenciado. Se verificó que el gen *ngap-1* se encuentra en la posición esperada y sin mutaciones dentro del plásmido.

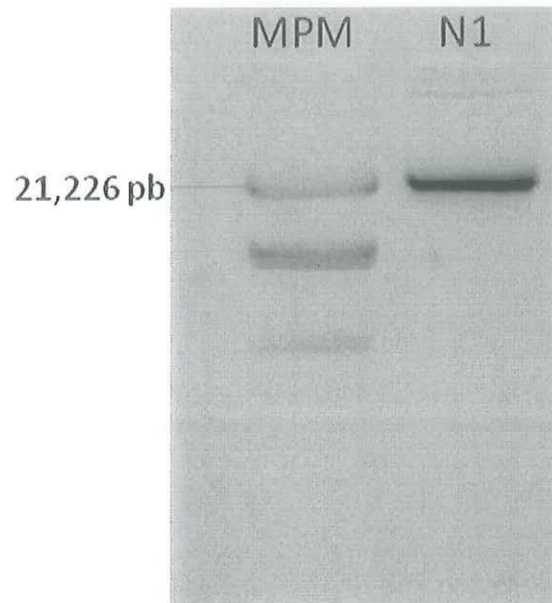


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico *N. crassa* teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), que es ADN de fago lambda digerido con *EcoR I* y *Hind III*. En el segundo carril se observa el ADN genómico obtenido de la cepa silvestre de *N. crassa* N1.

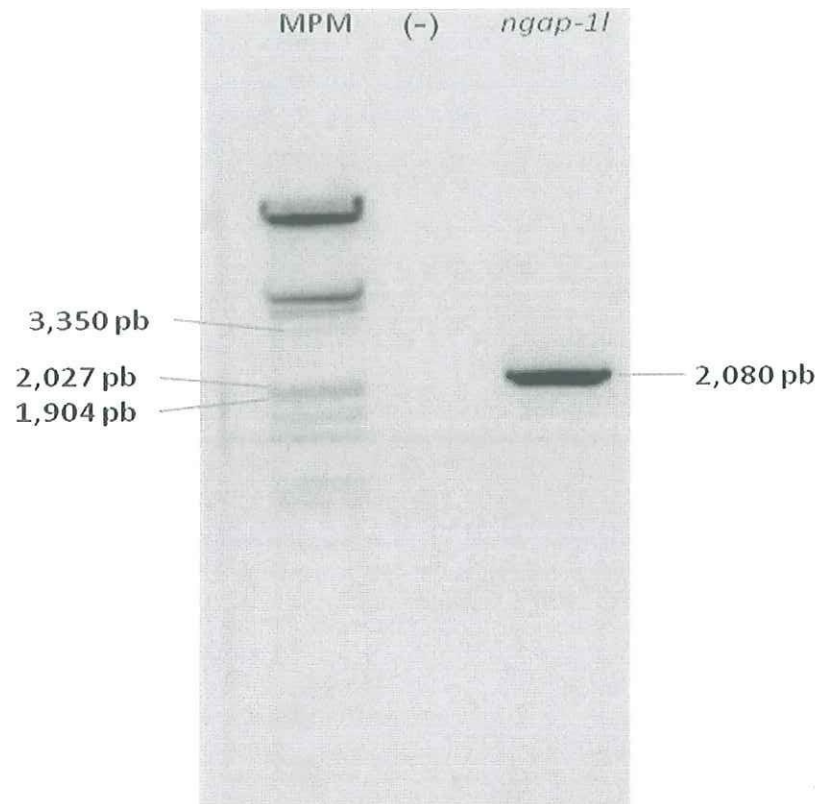


Figura 9. Electroforesis en agarosa al 1% del amplicón correspondiente al gen *ngap-1l*, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), En el segundo carril se observa el control negativo (se utilizo agua) (-) y en el tercer carril el amplicón correspondiente al gen *ngap-1l*.

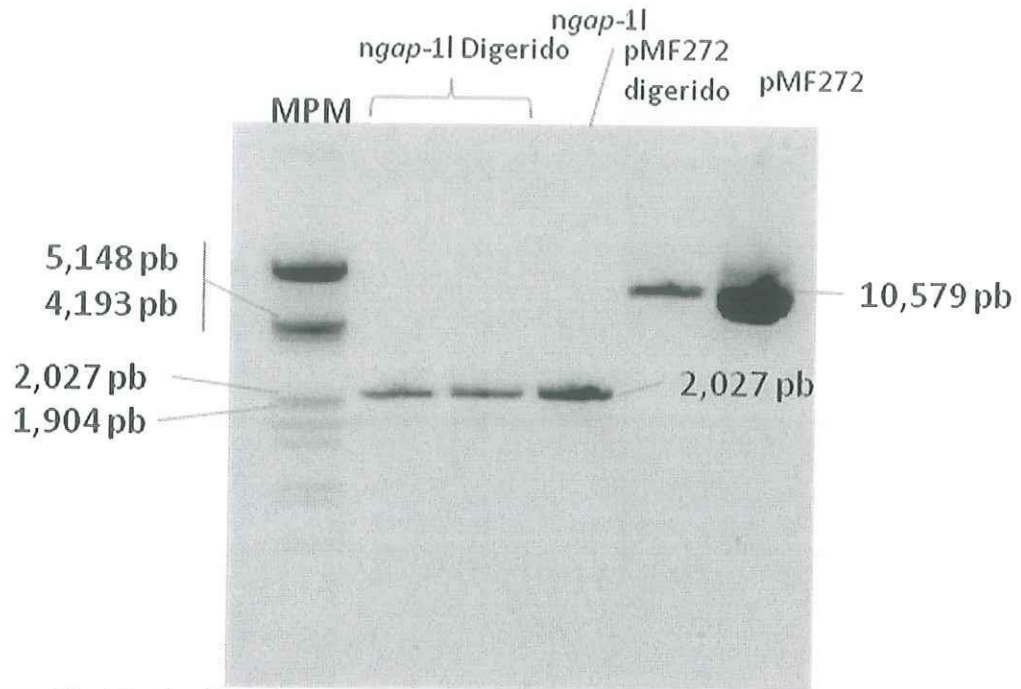


Figura 10. Electroforesis en agarosa al 1% de las digestiones para la ligación de *ngap-1* y el plásmido pMF272, teñido con bromuro de etidio (Digeridos con *Xba I* y *Pac I*). En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), los carriles marcados como *ngap-1* y pMF272 son sin digerir.

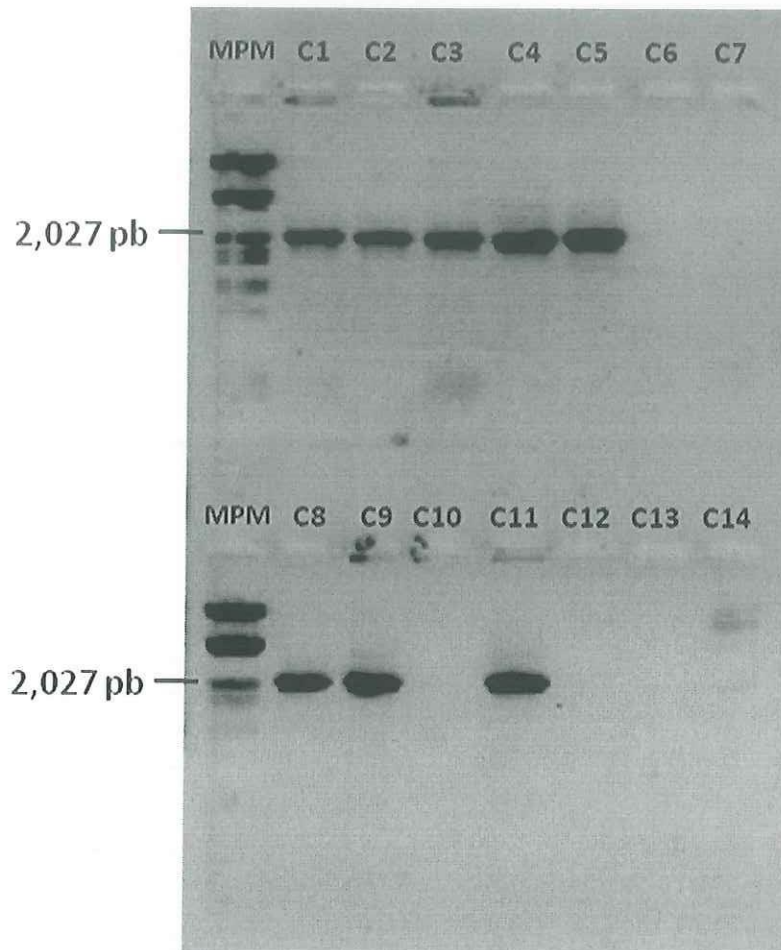


Figura 11. Electroforesis en agarosa al 1% que muestran el producto de la PCR de las clonas positivas que contienen el gen (*ngap-1l*), ADN teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM). Las colonias fueron numeradas del 1 al 14 (C1-C14).

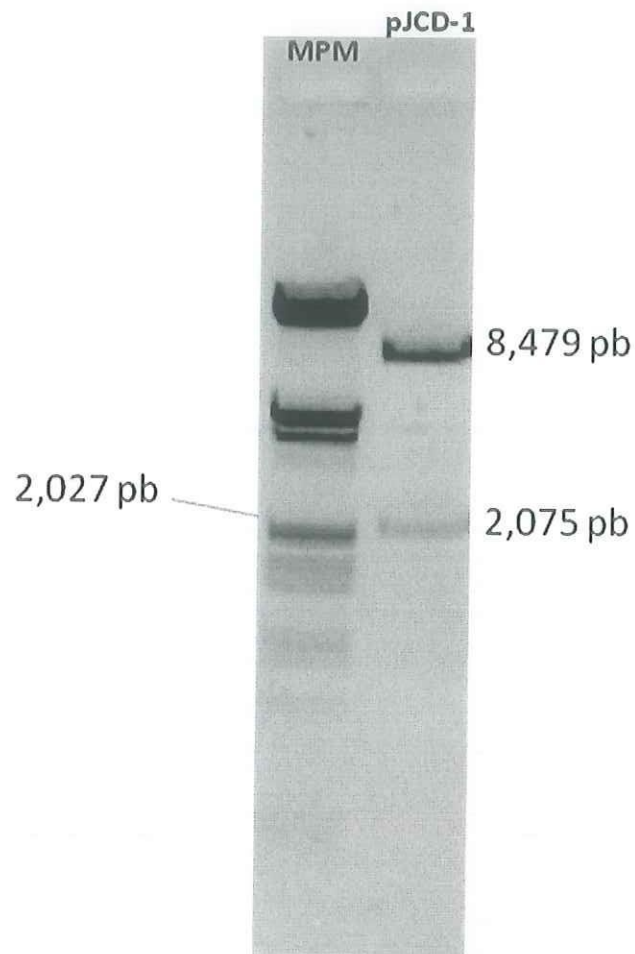


Figura 12. Electroforesis en agarosa al 1% de la digestión del plásmido pJCD-1, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM), en el segundo se observa que el plásmido ha liberado una banda correspondiente al gen *ngap-1I* (2,075 pb) resultado de la digestión, comprobando así la integración.

7.3 Transformaciones en *N. crassa* y selección de transformantes

En la Figura 10 se observa el plásmido pMF272 linearizado para la transformación en *N. crassa*. Este fue utilizado para la transformación por electroporación de macroconidias de las cepa SMRP24, en donde se obtuvieron 14 transformantes. Todas mostraron fluorescencia, sin embargo, la transformante llamada tJCD-1 fue seleccionada por ser la que más mostraba fluorescencia.

La transformante tJCD-1 en MMV tiene la misma morfología y tasa de crecimiento que la cepa silvestre N1, sin embargo, se encontró que ésta, al igual que la mayoría de las transformantes analizadas tiende a formar gran cantidad de micelio aéreo.

7.4 Localización de la proteína GAP-1 en distintos medios de cultivo

En MMV (NH_4NO_3) la proteína marcada se observó en vacuolas tubulares y en vacuolas de gran tamaño en regiones a inicios y lejanas al ápice de la región III respectivamente (**Figura 13**). Al ser sembrada en MMV con urea [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] se observó fluorescencia en regiones más cercanas al ápice localizadas en vacuolas tubulares en la región II y de la III rodeando a los núcleos, pero nunca en la punta. En este medio de cultivo se observó que las colonias tienen mayor expresión de la GFP y por lo tanto se observó un color más intenso en las vacuolas marcadas. (**Figura 14, 15**). En el caso de los cultivos en MMV con nitrato de potasio (KNO_3) como fuente de nitrógeno al igual

que en el MMV y MMV con urea, la proteína se localizó principalmente en la región III sin embargo, la fluorescencia era más intensa que en el caso del MMV, pero menos que en MMV con urea (**Figura 16**). Asimismo en MMV con KNO_3 la fluorescencia no es perdurable, esta parecía perderse en todas las hifas después de unos minutos de ser observada en comparación con las colonias observadas en MMV con urea. En la **Tabla III** se muestran los resultados de la microscopía.

Tabla III. Localización de la proteína GAP-1 en los distintos medios de cultivo.

Fuente de N / Localización	NH_4NO_3	KNO_3	Urea
Membrana	-	-	-
Vacuolas globulares	+++	+	+
Vacuolas tubulares	+	++	+++

La cantidad de símbolos + indica la cantidad de estructuras observadas y así como la intensidad de la fluorescencia.

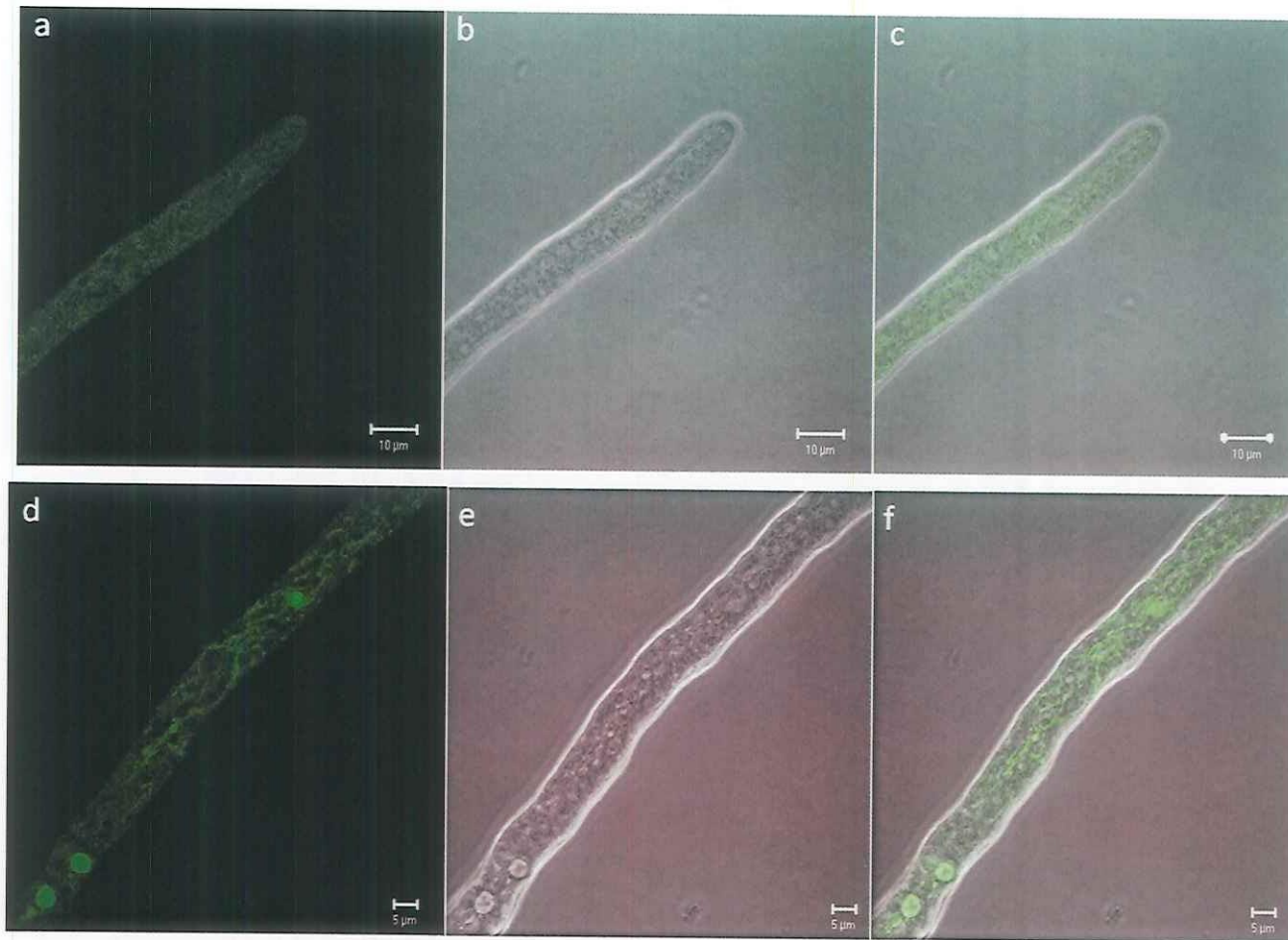


Figura 13. Hifa creciendo en MMV (NH_4NO_3) observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa (a-c). (d) Canal de fluorescencia, (e) contraste de fases y (f) superposición de (d) y (e).

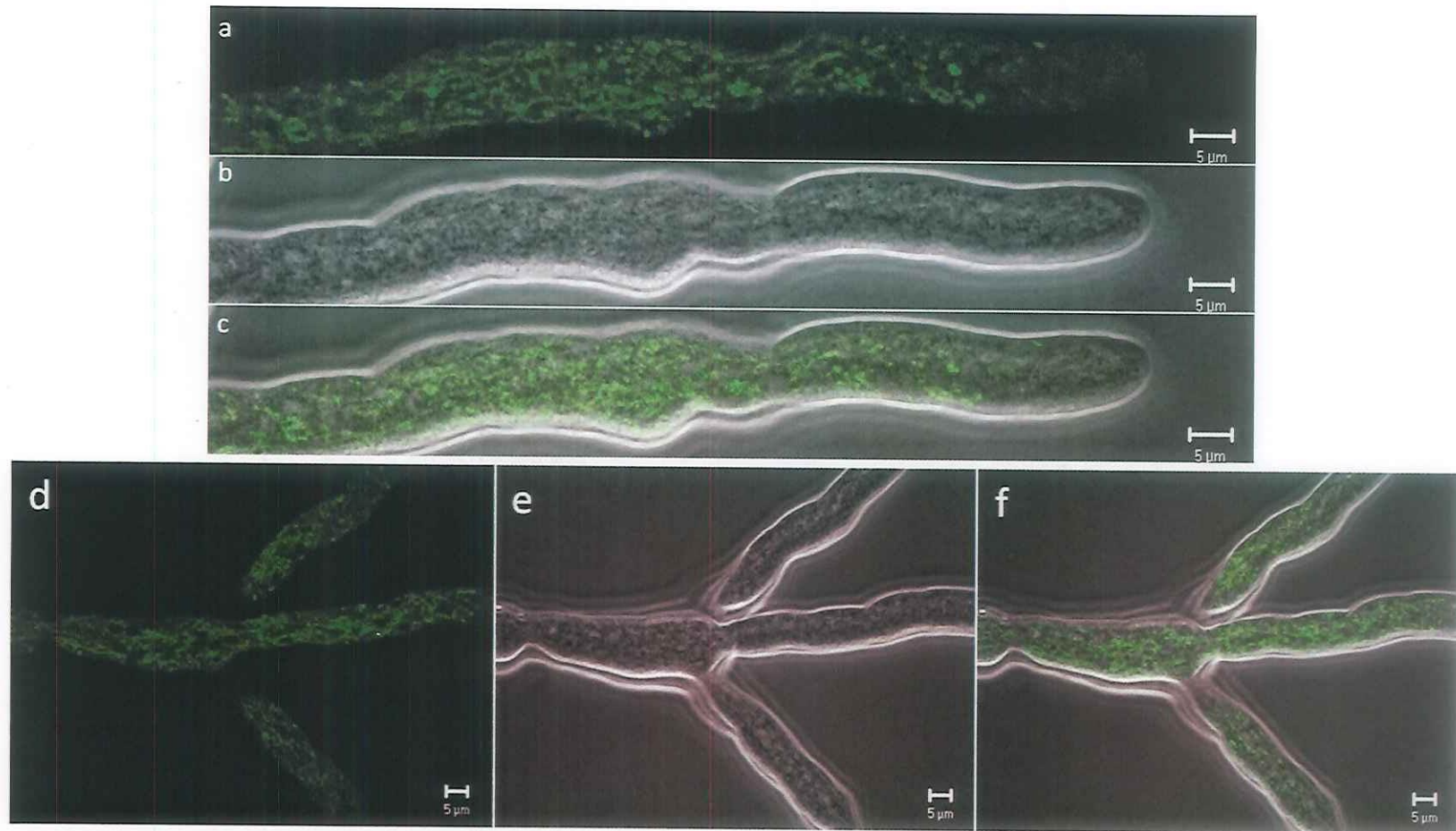


Figura 14. Hifa creciendo en MMV con urea como fuente de nitrógeno observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa. (d) Canal de fluorescencia, (e) contraste de fases y (f) superposición de (d) y (e).

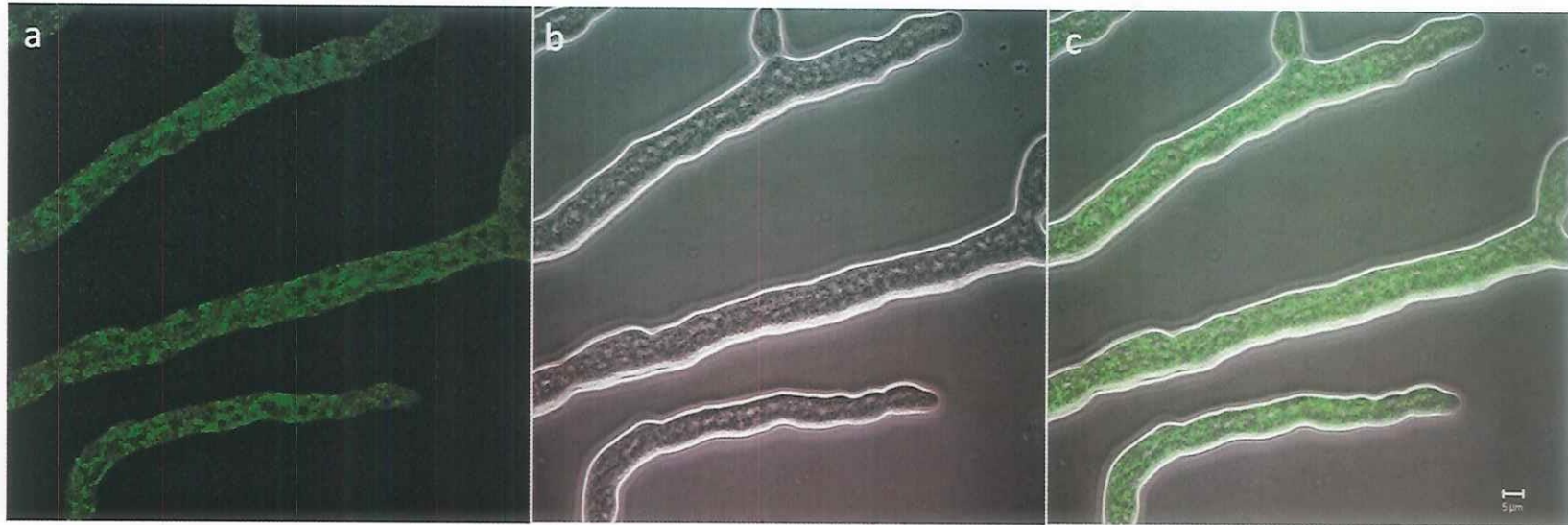


Figura 15. Hifas creciendo en urea observada por microscopía confocal de escaneo láser. Se observa la cercanía del marcaje al ápice de la hifa así como la intensidad del marcaje. a) canal de fluorescencia, b) Contraste de fase, c) superposición de a) y b).

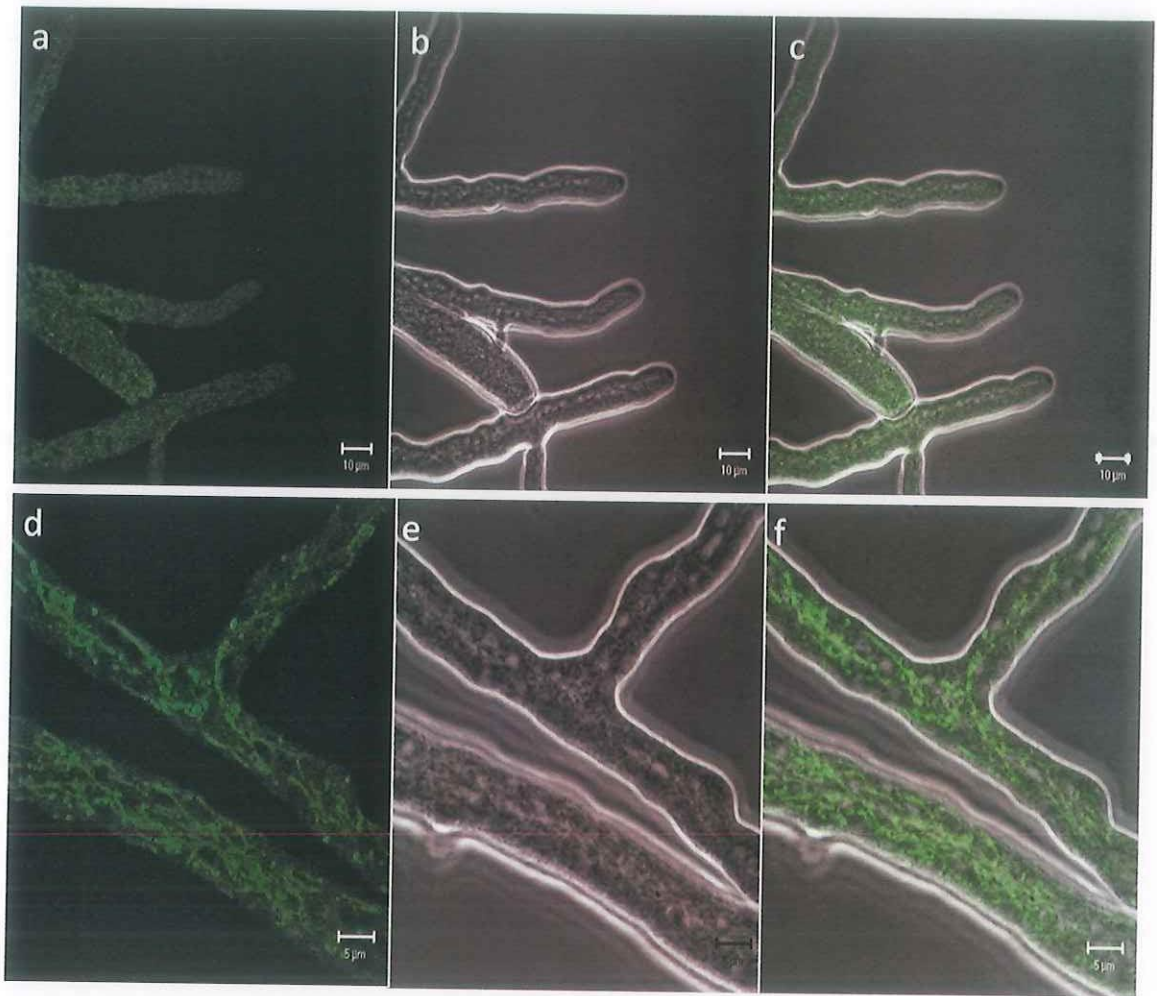


Figura 16. Hifa creciendo en MMV con KNO_3 como fuente de nitrógeno observada por microscopía confocal de escaneo láser. (a-c) corresponden a las regiones I y II de la hifa. (a) Canal de fluorescencia, (b) contraste de fases y (c) superposición de (a) y (b). (d-f) corresponden a la región III de la misma hifa. (d) Canal de fluorescencia, (e) contraste de fases y (f) superposición de (d) y (e).

7.5 Comprobación de la integración

Para comprobar si el cassette de *gfp*, *gap-1* y el promotor *ccg-1* se integraron en el sitio correcto del genoma se utilizaron los Oligonucleotidos pMR10, pMR11, pMR12 y pMR13. Los oligonucleotidos pMR10 y 11 amplifican una región de 3.2 kb que comprende desde el gen *His-3⁺* hasta el inicio de la GFP. Los oligonucleotidos pMR12 y 13 amplifican una región de 2.1 kb y abarca desde la región flanqueante 3' del gen *His-3⁺* hasta el final del promotor *ccg-1* (**Figura 17**). Los amplicones obtenidos por medio de PCR utilizando estos oligonucleotidos fueron del tamaño esperado de 3.2 kb y 2.1 kb (**Figura 18**).

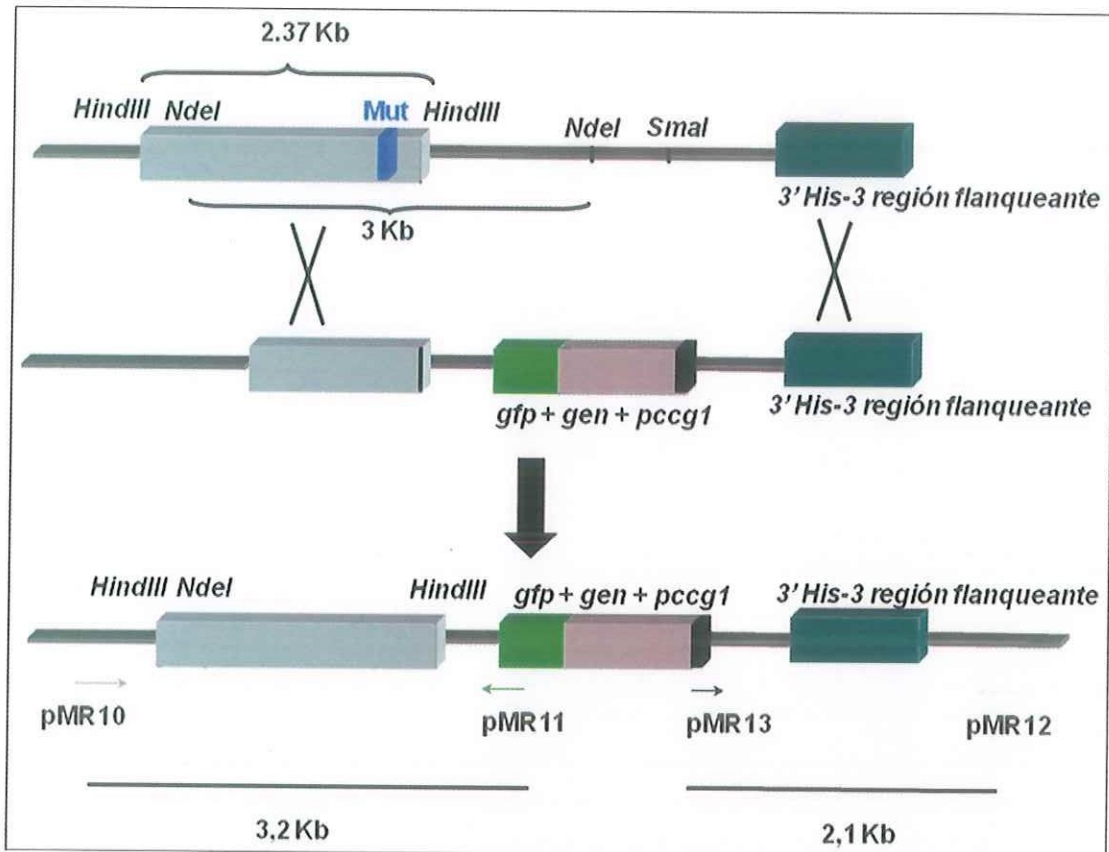


Figura 17. Esquema de comprobación de la integración por medio de los oligonucleótidos pMR10, 11, 12 y 13.

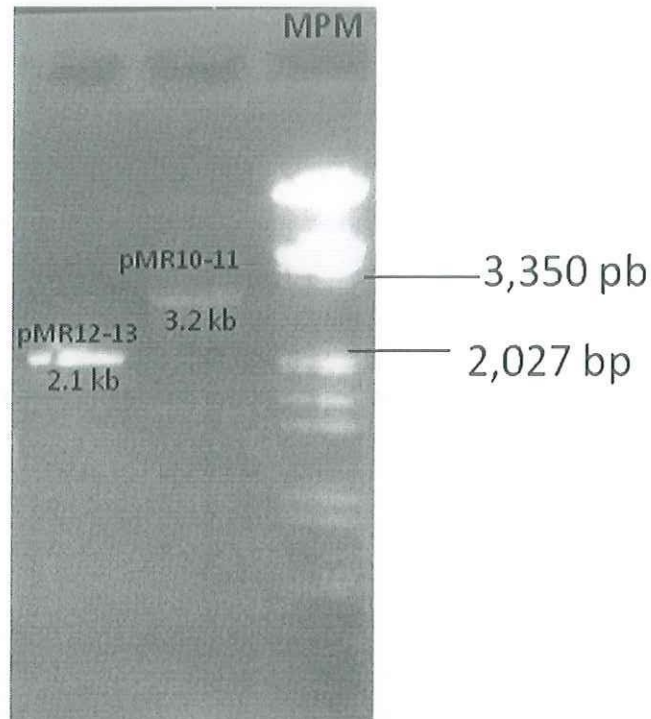


Figura 18. PCR comprobatoria. Se observan los amplicones resultantes con los oligonúcleotidos pMR10-pMR11 y pMR12-pMR13.

7.6 Crecimiento de la cepa tJCD-1 en las distintas fuentes de nitrógeno

Antes de iniciar con el análisis de crecimiento se crecieron conidias de la cepa tJCD-1 y 9718 para observar si el crecimiento de la cepa transformante no se vio afectado por la integración de la construcción. En la **Figura 19** se observa que la morfología colonial es similar y que la cepa transformante no se vio afectada en el proceso de transformación.

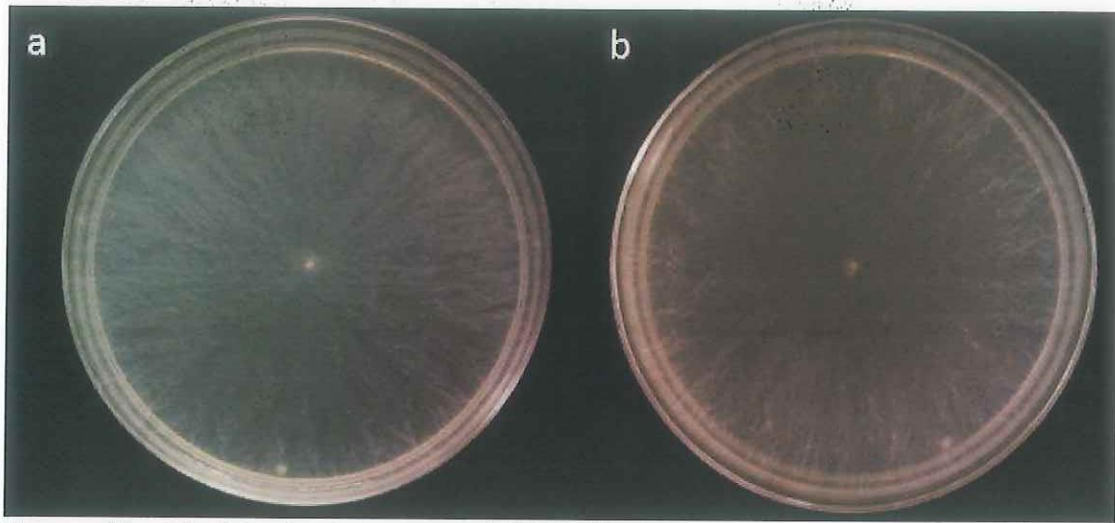
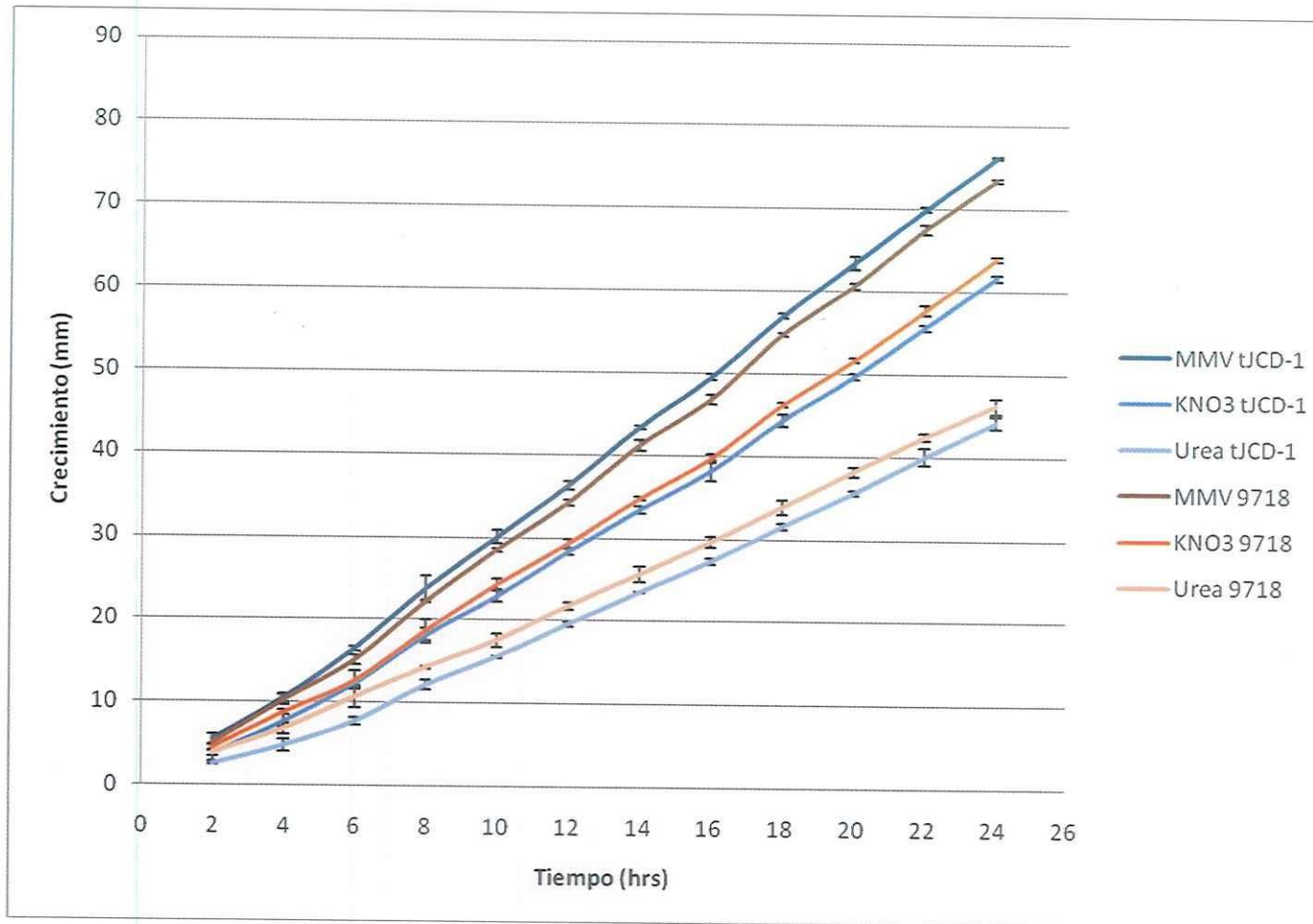


Figura 19. Morfología de la cepa FGSC #9718 (a) y la cepa transformante tJCD-1 (b), tomadas a las 32 horas.

En la **Gráfica 1** se muestra el crecimiento de las colonias en MMV con distintas fuentes de nitrógeno. Se observó que ambas cepas se comportaron de manera similar en cada uno de los medios, indicando que la cepa transformante no fue afectada por la transformación. Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que indican que el amonio es la fuente preferida por *N. crassa* el cual se encuentra en el MMV en forma de nitrato de amonio. En este medio se encontró que la colonia creció 1.2 veces más que en el medio con nitrato de potasio y 1.6 veces más que en el medio con urea, siendo esta última la fuente de nitrógeno más difícil de metabolizar.



Gráfica 1. Crecimiento total de las colonias tJCD-1 (tonos azules) y la cepa FGSC #9718 (tonos marrones) crecidas en Medio Mínimo de Vogel (MMV, nitrato de amonio como fuente de nitrógeno), MMV con nitrato de potasio (KNO3) y MMV con urea.

8. DISCUSIONES

Margolis-Clark y colaboradores en el 2002 describieron el gen denominado *gap* en *N. crassa*, que según los análisis realizados se trata del gen que codifica para la permeasa del sistema general (II) del locus *pmg* en *N. crassa*. Esta proteína fue encontrada accidentalmente mientras se buscaba una proteína vacuolar. Los autores realizaron estudios bioquímicos, utilizando fluorofenilalanina (FPA) como agente selector, que es un homólogo tóxico de la fenilalanina y compararon una cepa mutante por inducción repetida de mutaciones puntuales (RIP). En contra de una triple mutante deficiente en los tres sistemas de transporte de aminoácidos en *N. crassa* (*pma⁻pmb⁻pmg⁻*), en esta última se transformó con una copia del gen denominado *gap* y se observó que la cepa se hacía sensible a la FPA en el medio. Este estudio fue encontrado en una etapa avanzada del trabajo por lo que no se tomó en cuenta este gen para el marcaje, sin embargo, la secuencia del gen *gap* depositada como NAAP1 en el GeneBank fue utilizada para realizar un BLAST de la proteína hipotética contra el genoma de *N. crassa* para conocer si la secuencia de *gap* era similar o se esta relacionada con los datos del primer BLAST hecho del genoma contra Gap1p de levaduras. Encontramos que el gen *ngap-11* marcado por nosotros es muy parecido a la proteína *gap*. En consecuencia se alinearon las primeras tres secuencias obtenidas en el primer realizado BLAST (**Tabla 2**) y se encontró que el gen *gap* fue el tercer hit, solo que con el numero

de acceso NCU03509.3. Los dos genes (*ngap-1l* y *gap*) están designados como *gap-1*. Esto también influyó en la selección del gen, ya que hay más de una proteína anotada como *gap-1* en la base de datos del BROAD Institute. Las características genómicas del gen *gap* y el gen *ngap-1l* son similares, ambos son del mismo grupo de unión (linkage group II), tienen 12 regiones de acoplamiento a membrana y tienen un alto grado de similitud con la proteína Gap1p de *S. cerevisiae*.

Mediante la bioinformática se puede analizar la conservación de las secuencias de diferentes organismos. Esto permite agrupar a las proteínas en familias que comparten dominios que permanecen conservados de taxón a taxón. Estos dominios están relacionados con la estructura tridimensional de las proteínas. Los dominios conservados a nivel de estructuras primarias dan como resultado similitudes en estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, y por lo tanto en función (Hegyí y Gerstein, 2002; Lodish *et al.* 2007). Se ha encontrado similitud entre las permeasas generales de aminoácidos de organismos como *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *N. crassa*, *Amanita muscaria* e incluso en plantas como *Arabidopsis thaliana*. Además se ha encontrado que el parecido no es solo entre los sistemas generales de aminoácidos, sino que se ha reportado que existen similitudes significativas (30-60%) entre la mayoría de los transportadores de organismos eucarióticos inferiores y algunas bacterias, también se ha encontrado que las superfamilias que usan sistemas acoplados de H⁺ como es el caso de las

permeasas generales se encuentran conservados en *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y *Homo sapiens* (Horak, 1986; Frommer *et al.* 1993; Sophianopoulou y Diallinas, 1994; Fischer *et al.* 1998; Nehls *et al.* 1999; Margolis-Clark *et al.* 2001; Wipf *et al.* 2002; Biswas *et al.* 2003; Rubio-Teixeira y Kaiser, 2006). Basados en estos estudios se decidió utilizar el gen codificante de la proteína más parecida a la del gen *GAP1* de *S. cerevisiae* en *N. crassa*.

El estudio de localización y transporte *in vivo* se hizo posible con el descubrimiento de la GFP. Esta proteína proviene de la medusa *Aequorea victoria* y no necesita de substratos ni cofactores para emitir fluorescencia (Chalfie *et al.* 1994). En los estudios realizados por Rubio-Teixeira y Kaiser (2006) en *S. cerevisiae* mencionados previamente se describe el patrón de distribución de Gap1p, la cual es dependiente de la fuente de nitrógeno utilizando una cepa que portaba el gen *GAP1* marcado con *gfp*. En este estudio tomando en cuenta los patrones de distribución para Gap1p y las descripciones hechas previamente para el sistema II de *N. crassa* se utilizaron medios de cultivo con fuentes de nitrógeno preferidas y supeditadas para observar la distribución de la proteína putativa codificada por el gen NCU10262.3 marcada con GFP. Los resultados obtenidos mediante microscopía indican que a pesar de la similitud del gen NCU10262.3 con el gen *GAP1*, éstos no son ortólogos. Ninguna de las fuentes de nitrógeno provocó que la proteína se localizara en la membrana plasmática como se esperaba que ocurriera al crecer *N. crassa* en MMV con fuentes pobres de nitrógeno. A pesar de esto se observó

fluorescencia en vacuolas tubulares cercanas al ápice de la célula, pero sólo en los medios de cultivo con fuentes de nitrógeno relegadas por *N. crassa* como la urea y en nitrato de potasio. Sorprendentemente en el medio de cultivo con urea como única fuente de nitrógeno la fluorescencia en las vacuolas tubulares fue más marcada y perdurable, además de observarse en vacuolas tubulares muy cercanas al ápice. Estos hallazgos no concuerdan con el patrón de distribución para la Gap1p en levaduras, donde es enviada a la membrana plasmática para cumplir con su función en condiciones con fuentes pobres de nitrógeno (como la urea o amonio) o inanición del mismo. No obstante, se encontró diferencia en la expresión dependiendo de las fuentes de nitrógeno utilizadas, indicando que es probable que la proteína marcada tenga relación con el metabolismo del nitrógeno y/o el metabolismo de aminoácidos.

Las vacuolas están asociadas al transporte y almacenamiento de nutrientes y otros compuestos. Esto ha hecho necesario para la célula desarrollar sistemas necesarios para la introducción y expulsión de estos compuestos. Por lo tanto la célula debe ser capaz de controlar estos dos procesos para mantener un equilibrio metabólico entre lo que está siendo utilizado y lo que será almacenado. Uno de los nutrientes almacenados en vacuolas más estudiados son los aminoácidos por su importancia metabólica. Se sabe que existen dos poblaciones de aminoácidos en los hongos: una está en el citoplasma siendo activamente utilizada para la síntesis de proteínas o en el metabolismo del nitrógeno; mantiene una concentración pequeña constante y otra en las

vacuolas donde se mantiene la mayor concentración de aminoácidos dentro de la célula (Wiemken y Dürr, 1974 ; Wiemken y Nurse, 1973; Huber-Wälchli y Wiemken, 1979). Se ha encontrado también que existen diversos sistemas de transporte vacuolares en *S. cerevisiae* que funcionan como transportadores de aminoácidos. Algunos de estos transportadores son antiporters H⁺/aminoácidos, sin embargo no hay registros de algún transportador general en la vacuola. En el caso de *N. crassa* y *S. cerevisiae* el transporte de arginina es de los más estudiados debido a que es el aminoácido con mayor cantidad de nitrógeno y constituye del 25-60% de los aminoácidos básicos almacenados en la vacuola. En el caso de *S. cerevisiae* existen tres sistemas para la acumulación de este en la vacuola. Esto indica que las reservas de aminoácidos son importantes para la célula como fuente de nitrógeno. Esto ha quedado comprobado por experimentos donde se ha demostrado que las reservas de arginina y otros aminoácidos básicos se vuelcan al citoplasma al inducir a las células a un estado de inanición de nitrógeno y glutamato, pero no puede ser inducido por inanición de algunos aminoácidos como la prolina (Dürr, *et al.* 1979; Huber-Wälchli y Wiemken, 1979; Legerton y Weiss, 1979; Cramer y Davis, 1983; Legerton y Weiss 1984; Okorokov, *et al.* 1985; Zerez, *et al.* 1985; Kitamoto, *et al.* 1987; Paek y Weiss 1988; Klionsky, *et al.* 1990). Estos datos sugieren que la proteína codificada por el gen NCU10262.3 podría ser un transportador de aminoácidos vacuolar relacionado con el metabolismo del nitrógeno al igual que los transportadores de arginina, sin embargo se necesitan estudios adicionales

de índole bioquímico para determinar qué tipo de transportador puede ser, tomando en cuenta que los análisis bioinformáticos realizados predicen que la proteína funciona como una permeasa de aminoácidos.

Otra posible explicación para los resultados obtenidos puede ser que la estructura funcional de la proteína este modificada por la fusión con la GFP y por lo tanto esta sea enviada a la vacuola para su degradación. Sin embargo, el hecho de que la proteína sea expresada de una forma dependiente a la fuentes de nitrógeno y sea localizada en vacuolas tubulares, además de que la secuenciación y la comprobación por PCR indican que es muy probable que la proteína está siendo expresada de manera correcta y el hecho que en algunos de los trabajos realizados en este laboratorio se siguió una estrategia de marcaje similar y no se observó interferencia con la distribución y función de las proteínas se descarta la no funcionalidad de la fusión (Beltrán-Aguilar, 2006; Rubio-Teixeira y Kaiser, 2006; Delgado-Álvarez, 2008; Ramirez-Cota, 2008; Echaury-Ezpinoza, 2008).

9. CONCLUSIONES

- La proteína NCU10262.63 llamada *ngap-1l* no es el ortólogo del sistema general de aminoácidos de levaduras, a pesar de ser la más parecida en estructura a Gap1p.
- La proteína *ngap-1l* es expresada dependiendo de la fuente de nitrógeno en el medio. La expresión es localizada en vacuolas tubulares cercanas a la punta.
- Los estudios realizados indican que es probable que se trate de una permeasa relacionada con el metabolismo del nitrógeno. Para determinar si se trata de una permeasa que se expresa en vacuola, es necesario realizar otro tipo de estudios.
- En el caso de la permeasa general de aminoácidos en organismos de diferentes clases taxonómicas, la similitud en secuencia no es indicador de homología en función, a pesar de ser genes conservados.
- El estudio de la localización de la permeasa general de aminoácidos podría ayudar en el entendimiento de la ruta de secreción en *N. crassa*, gracias a su regulación postraduccional.

10. PERSPECTIVAS

En el proceso de electroporación no todos los núcleos son transformados. La transformante analizada en este trabajo es un organismo heterocarionte, por lo que no todos los núcleos se encuentra la construcción *gap1like::gfp*, por esto, es necesario cruzar esta cepa con otra de tipo de apareamiento complementario para obtener ascosporas uninucleadas y poder así obtener colonias homocariontes, es decir con todos los núcleos transformados con la construcción *gap1like::gfp*. La cruce de la transformante con otras cepas cuyas vacuolas han sido marcadas es otro experimento a realizar. De esta manera se podría saber en qué tipo de vacuola está siendo expresado el gen *gap1like*.

Para comprobar que la proteína *ngap-1l* es una permeasa de aminoácidos es necesario hacer estudios de incorporación de aminoácidos radioactivos, para esto se podría seguir una estrategia similar a la de los estudios realizados por Ohsumi y Anraku en 1981 y Shimazui y colaboradores (2004). Estos estudios serian realizados para afirmar que se trata de una permeasa de aminoácidos y si lo es, cuales son los aminoácidos que son transportados por esta permeasa.

Otra parte del estudio a futuro seria el marcaje con *gfp* de la proteína designada como *gap* por Margolis-Clark y colaboradores en el 2001 (NCU03509) y del gen NCU05830.3 los cuales fueron el tercer y segundo hit en el BLAST respectivamente. Con esto se pretende observar la localización y

distribución del sistema general (Sistema II) en *N. crassa* en las fuentes de nitrógeno utilizadas en este estudio.

11. REFERENCIAS

Alexopoulos, C. J., C.W. Mims, y M. Blackwell. 4ta Edición 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, EUA. 868p.

Bartnicki-García, S. 1990. Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*. Heath IB. Academic Press, San Diego. 211-232.

Bartnicki-García, S., F. Hergert y G. Gierz. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153: 46-57.

Bisson, L.F., D. M. Coons, A.L. Kruckenberg y D.A. Lewis. 1993. Yeast sugar transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 259-308.

Biswas S., M. Roy y A. Datta. 2003. N-Acetylglucosamine-inducible CaGAP1 encodes a general amino acid permease which co-ordinates external nitrogen source response and morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*. 149: 2597-2608.

Bowman, B.J., K.E. Allen, y C.W. Slayman. 1983. Vanadate-resistant mutants of *Neurospora crassa* are deficient in high-affinity phosphate transport system. *Journal of Bacteriology*. 264: 14002-7.

Braus, G.H., R. Pries, K. Düvel y O. Valerius. 2004. Molecular Biology of Fungal Aminoacid Biosynthesis Regulation U. Kück. Berlin, Alemania. pp 239-263.

Brunswick, H., 1924. Untersuchungen über geschlechts and kernverhältnisse bei der hymenomyzetegattung *Coprinus*. En: Goebel, K., Fischer, G., Botanische Abhandlung. Verlang, Jena, Alemania.

Cardenas, M.E., N.S. Cutler, M.C. Lorenz, C.J. Di Como y J. Heitman. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & Development*. 13: 3271-3279.

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward y D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263 (5148): 802-805.

Courchesne, W.E. y B. Magasanik. 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*. 3 (4): 672-683.

Cramer C. y R. Davis. 1984. Polyphosphate-Cation Interaction in the amino acid-containing vacuole of *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 259 (8): 5152-5157.

Davis, R. H. 2000. *Neurospora Contributions of a Model Organism*. 1ra Edición. Oxford University Press, Inc. New York. 333p.

Deacon, J. W. 1997. *Modern Mycology*. Blackwell Science. Edinburg. 303p.

DeBusk R.M., G. DeBusk. 1980. Physiological and regulatory properties of the general amino acid transport system of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 143(1): 188-197.

Dodge B.O. 1927. Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. *Journal of Agricultural Research*. 35: 289-305.

Dürr M., K. Urech, T. Boller, A. Wiemken y M. Nagy. 1979. Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Archives of Microbiology*. 121 (2): 169-175.

Fischer W. N., B. André, D. Rentsch, S. Krolkiewicz, M. Tegeder, K. Bretkreutz y W. B. Frommer. 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science*. 3 (5): 188-195.

Forsberg H., C.F. Gilstring, A. Zargari, P. Martínez y P.O. Ljungdahl. 2001. The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracelular amino acids. *Molecular Microbiology*. 42 (1): 215-228.

Forsberg, H., P.O. Ljungdahl. 2001. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerivisiae*. *Current Genetics*. 40: 91-109.

Frommer W. B., S. Hummel y J. W. Riesmeier. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*. 90: 5944-5948.

Galagan J.E., S.E. Calvo, K.A. Borkovich, E.U. Selker, N.D. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L.J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C.B. Nielsen, J. Buttler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Pedersen, M.A. Nelson, M. Werner-Washburne, C.P. Selitrennikoff, J.A. Kinsey, E.L. Braun, A. Zelter, U. Shulte, G.O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R.L. Metzenberg, D.D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Machino, D. Catcheside, D. Li, R.J. Pratt, S.A. Osmani, C.P. DeSouza, M. J. Orbach, J.A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D.O. Natvig, L.A. Alex, G. Mannhaupt, D.J. Ebbole, M. Freitag, I. Paulsen, M.S. Sachs, E.S. Lander, C. Nusbaum y B. Birren. 2003. The genome sequence of the filamentous fungi *Neurospora crassa*. *Nature*. 422(6934): 859-868.

Garrill, A. y J.M. Davies. 1994. Patch clamping fungal membranes: a new perspective on ion transport. *Mycological Research*. 98: 257-263.

Girbardt, M. 1957. Der spitzenkörper von *Polysticus versicolor* (L.). *Planta* 40: 57-59.

Gow, N. A. R. y G. M. Gadd. 1995. *The Growing Fungus*. Chapman Hall. Londres. 473p.

Grenson M. 1983b. Study of the positive control of the general amino acid permease and other ammonia sensitive uptake systems by the product of the NPR1 gene on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 133: 141-144.

Grenson M. y C. Hou. 1972. Ammonia inhibition of the general amino acid permease and its suppression in NADPH-specific glutamate dehydrogenaseless mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 48 (4): 794-56.

Grenson M., C. Hous y M. Crabeel. 1970. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a General Aminoacid Permease. *Journal of Bacteriology*. 103 (3): 770-777.

Grenson, M. 1983a. Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the east *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 133: 135-139.

Heath, I., B. 1994. The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements, and mitosis. En: Osiewacz, H., D. 2002. *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker, New York, EUA. pp 29-58.

Hedges, S.B. 2002. The Origin and Evolution of Model Organisms. *Nature*. 3: 838-839.

Hegyí, H. y M. Gerstein. 1999. The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *Journal of Molecular Biology*. 1: 147-164.

Hickey, P.C., D.J. Jacobson, N.D. Read y N.G. Glass. 2005. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 37 (2002): 109-119.

Horak, J. 1986. Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 864: 223-256.

Huber-Wälchli V. y A. Wiemken. 1979. Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran. *Archives of Microbiology*. 120 (2): 141-149.

Jauniaux J. y M. Grenson. 1990. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *European Journal of Biochemistry*. 190(1990): 39-44.

Jorgensen M.U., M.B. Bruun, T. Didion, M.C. Kielland-Brandt. 1998. Mutations in five loci affecting GAP1-independent uptake of neutral aminoacids in yeast. *Yeasts*. 14 (2): 103-114.

Kitamoto K., K. Yoshizawa, Y. Ohsumi y Y. Anraku. 1988. Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 170 (6): 2683-2686.

Klasson, H., G.R. Fink, y P.O. Ljungdahl. 1999. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Molecular and Cell Biology*. 19 (9): 5405-5416.

Klionsky D., P. Herman y S. Emr. 1990. The Fungal Vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*. 54 (3): 266-292.

Legerton T. y R. Weiss. 1979. Mobilization of sequestered metabolites into degradative reactions by nutritional stress in *Neurospora*. *Journal of Bacteriology*. 138 (3): 909-914.

Legerton T. y R. Weiss. 1984. Mobilization of vacuolar arginine in *Neurospora crassa* mechanism and role of glutamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 259 (14): 8875-8879.

Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh y P. Matsudaira. *Molecular Cell Biology*. 2007. 6ta Edición. W. H. Freeman and Company. New York. 1150 pp.

McDaniel D. y R. Robertson. 2002. Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 233-244.

Magasanik B. 1992. Regulation of nitrogen utilization, p. 283. En Stanbrough M. y B. Magasanik. 1995. Transcriptional and Posttranslational Regulation of the General Amino Acid Permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 177 (1): 94-102.

Magasanik B. y C.A. Kaiser. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 290 (2002): 1-18.

Margolis-Clark. E., I. Hunt, S. Espinosa y B.J. Bowman. 2001. Identification of the Gene at the *pmg* Locus Encoding System II, the General Amino Acid Transporter in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 33: 127-135.

Namboodiri, A.N. y R.J. Lowry. 1967. Vegetative nuclear division in *Neurospora*. *American Journal of Botany*. 54:735-748.

Nehls U., Kleber R., Wiese J. y R. Hampp. 1999. Isolation and characterization of a general amino acid permease in the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria*. *New Phytology*. 144: 343-349.

Okorokov L., T. Kulakovskaya, L. Lichko y E. Polorotova. 1985. H⁺/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS*. 192 (2): 303-306.

Paek Y. y R. Weiss. 1989. Identification of an arginine carrier in the vacuolar membrane of *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 264 (13): 7285-7290.

Pall M.L. 1968. Amino Acid Transport in *Neurospora crassa* I. Properties of two Amino Acid Transport Systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 173 (1969): 113-127.

Pall M.L. 1970. Amino Acid Transport in *Neurospora crassa* II. Properties of a Basic Amino Acid Transport System. *Biophysica Acta*. 203 (1970): 139-149.

Rao, E.Y.T., T.K. Rao y G. DeBusk. 1975. Isolation and characterization of a mutant of *Neurospora crassa* deficient in general amino acid permease activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 413 (1975): 45-51.

Riquelme, M., S. Bartnicki-Garcia, J.M. González-Prieto, E. Sánchez-León, J.A. Verdín-Ramos, A. Beltrán-Aguilar, y M. Freitag. 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 6: 1853-1864.

Roon, R.J., F. Larimore, y J.S. Levy. 1975. Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 124 (1): 325-331.

Rubio-Teixeira M. y C.A. Kaiser. 2006. Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 17 (2006): 3031-3050.

Sanchez, S., L. Martínez y J. Mora. 1972. Interactions between amino acid transport systems in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 112 (1): 276-284.

Sattlegger, E., A.G. Hinnebusch, e I.B. Barthelmes. 1998. *cpc-3*, the *Neurospora crassa* homologue of yeast GCN2, encodes a polypeptide with juxtaposed eIF2 α kinase and histidyl-tRNA synthetase-related domains required for general amino acid control. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (32): 20404-20416.

Sewall, T. V., R. W. Roberson, y J. C. Pommerville. 1989. Identification and characterization of Golgi equivalents from *Allomyces macrogynus*. *Experimental Mycology* 13 (3): 239-252.

Shear, C.L. y B.O., Dodge. 1927. Life histories and heterothallism of the red bread mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *Journal of Agricultural Research*. 34: 1019-1042.

Somers, E. C., R. P. Wagner, y T. C. Hsu. 1960. Mitosis on vegetative nuclei of *Neurospora crassa*. *Genetics* 45: 801-810

Sophianopoulou, V. y G. Dhallinas. 1994. Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 16 (1): 53-75.

Stanbrough M. y B. Magasanik. 1995. Transcriptional and posttranslational Regulation of the General Amino acid Permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 177 (1): 94-102.

Surdin, Y., W. Sly, J. Sire, A.M. Bordes y H. de Robichon-Szulmajster. 1965. Propriétés et controle génétique de système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*. En Grenson M., C. Hous y M. Crabeel. 1970. Multiplicity of the Amino Acid Permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a General Aminoacid Permease. *Journal of Bacteriology*. 103 (3): 770-777.

Vandebol, M., J.C. Jauniaux, y M. Grenson. 1989. Nucleotide sequence of the *Sacharomyces cerevisiae* PUT4 proline permease encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 y PUT4 permeases. *Gene*. 83 (1): 153-159.

Vogel H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbiol. Gen. Bull.* 13: 42-43.

Wessels J. G. H. 1988. A steady state Model for Apical Wall Growth. *Acta Botanica Neerlandica*. 37: 3-16

Wiemken A. y M. Dürr. 1974. Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*. 101 (1): 45-57.

Wiemken A. y P. Nurse. 1973. Isolation and characterization of the amino-acid pools located within the cytoplasm and vacuoles of *Candida utilis*. *Planta*. 109 (4): 293-306.

Wipf, D., U. Ludewig, M. Tegeder, D. Rentsch, W. Koch y W. B. Frommer. 2002. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences*. 27 (3): 139-147.

Wolfenbarger, L., Jr. y G. DeBusk. 1971. An inducible amino acid transport system in *Neurospora crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 274 (1971): 677-681.

Zeres C., R. Weiss, C. Franklyn y B. Bowman. 1986. The properties of arginine transport in vacuolar membrane vesicles of *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 261 (19): 8877-8882.

12. APENDICE

Sales de Vogel 50 x (1 L)

En 750 ml de agua destilada, agregar en orden y mezclar en a temperatura ambiente:

Na ₂ citrato, 5 ½ H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anhídrido	250 g
NH ₄ NO ₃ , anhídrido	100 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	10 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	5 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución de biotina	2.5 ml

Agregar 2 ml de cloroformo como preservativo
Almacenar a 4 °C.

Medio Completo de Vogel-agar 1.5 % (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	20 g
Agar	15 g
Extracto de levadura	0.5 g
Caseína	0.5 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Medio Completo de Vogel líquido (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	20 g
Extracto de levadura	0.5 g
Caseína	0.5 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Medio Mínimo de Vogel-Agar 1.5 % (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Medio Mínimo de Vogel líquido (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Solución de elementos traza (100 ml)

En 95 ml de agua destilada disolver con agitador magnético sucesivamente las siguientes soluciones:

	5 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	
Ácido cítrico · 1 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ · 6 H ₂ O	0.25 g
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0.05 g
H ₃ BO ₃ anhídrido	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.05 g

Al volumen final de aproximadamente 100 ml, agregar 1 ml de cloroformo como preservativo. Se almacena a temperatura ambiente.

L-histidina (25 mg ml⁻¹)

L-histidina	1.25 g
Agua destilada	50 ml

Esterilizar por filtración (0.25 µg)

Solución FIGS 10 x (1 L)

Sorbosa	200g
Fructosa	5 g
Glucosa	5 g
Inositol	2 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por filtración (0.22 µm)

Medio FIGS-Agar 1 % (1 L)

Sales de Vogel 50X	20 ml
Agar	10 g
Agua destilada	880 ml
Solución FIGS 10 X	100 ml después de esterilizar

Medio de regeneración (1 L)

Sales de Vogel 50 X	6 ml
Sorbitol	54.6 g
Extracto de levadura	6 g
H ₂ O destilada	252 ml
Solución de FIGS 10 X	30 ml después de esterilizar

Medio LB-Agar 1.5 % (1 L)

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	Aforar a 1 L
Esterilizar por autoclave	

Medio LB líquido (1 L)

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Aforar a 1 L
Esterilizar por autoclave	