



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias

Caracterización de la mutante de fimbrina en el
hongo filamentoso *Neurospora crassa*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

Luis Angel Bojórquez Vázquez

Ensenada, Baja California, Mayo 2015.



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Caracterización de la mutante de fimbrina en el hongo
filamentoso *Neurospora crassa*

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA

LUIS ANGEL BOJÓRQUEZ VÁZQUEZ

APROBADO POR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rosa Reyna Mourino Pérez".

DRA. ROSA REYNA MOURIÑO PÉREZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Viana Castrillon".

DRA. MARIA TERESA VIANA CASTRILLON

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Faustino Camarena Rosales".

DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la carrera de biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California por formarme como profesionista en el área de las ciencias biológicas.

A mis compañeros de generación por su amistad y apoyo brindados en los últimos 4 años.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por tener vías para vincular estudiantes de licenciatura con el desarrollo científico y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo con la beca para la realización de esta tesis.

A la Dra. Rosa Mouriño por abrirme las puertas del laboratorio del Departamento de Microbiología y apoyarme con lo necesario para la realización de este trabajo.

A la Dra. Olga Callejas por haberme compartido sus conocimientos a lo largo del desarrollo mi estancia en el laboratorio.

A Adriana Echeagaray por apoyarme moralmente y creer en mí como científico, tu compañía me da fuerzas para seguir adelante en esta área.

A mis padres les agradezco el cariño, educación y apoyo incondicional que me han brindado durante mi vida. Gracias a ustedes soy quien soy.

DEDICATORIA

A mis padres.

Resumen de la tesis de Luis Angel Bojórquez Vázquez presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México, Mayo 2015.

**Caracterización de la mutante de fimbrina en el hongo filamentoso
*Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

DRA. ROSA REYNA MOURIÑO PÉREZ
Director de tesis

RESUMEN

El crecimiento polarizado es un fenómeno de gran interés en el estudio de los hongos filamentosos, un componente importante que participa en este proceso es el citoesqueleto de actina. Para que la actina realice sus funciones correctamente requiere de la asociación con proteínas llamadas “Actin Binding Proteins” (ABPs). Una de estas proteínas es la fimbrina, la cual forma enlaces cruzados entre los filamentos paralelos de actina a través de dos sitios de unión formados por dos dominios calponina en cada uno. En hongos filamentosos son muy pocos los estudios que se han realizado con el fin de conocer la importancia de la fimbrina en este proceso. Para determinar si la ausencia de esta proteína causa un efecto sobre la morfogénesis y el crecimiento polarizado en el hongo *Neurospora crassa*, se realizó la caracterización de la cepa mutante de fimbrina (Δfim). Los resultados obtenidos muestran que las hifas de la cepa Δfim crecen en forma polarizada, sin embargo su morfología es aberrante mostrando un crecimiento meándrico, con protuberancias a lo largo de las hifas. La tasa de crecimiento en la cepa Δfim es 77.8% menor con respecto a la que presenta la cepa tipo silvestre (WT). La producción de biomasa es 96.6% menor en la cepa Δfim en comparación con la cepa WT. Para el caso de la tasa de conidiación, la cepa Δfim presenta 71.6% menor producción de conidias. La tasa de ramificación es más alta en la cepa Δfim , siendo 32.3% mayor. Además la cepa Δfim se ve afectada en la formación de septos, presentando una tasa de septación mayor, incluyendo defectos en la germinación de conidias teniendo un retraso en la generación del tubo germinativo. Así mismo el Spk presenta una morfología atípica, siendo más pequeño y difuso. Por otra parte, la tasa de endocitosis se ve disminuida en ausencia de la fimbrina. Estos resultados revelan que la ausencia de la fimbrina no es letal en *N. crassa* y no afecta el crecimiento polarizado, pero afecta fuertemente la endocitosis, la morfogénesis y la tasa de crecimiento.

Palabras clave: Fimbrina, actina, crecimiento polarizado, endocitosis, *Neurospora crassa*.

ABSTRACT

The polarized growth is a phenomenon of great interest in the study of filamentous fungi, an important component that participates in this process is the actin cytoskeleton. To perform its functions properly, the actin requires an association with proteins called Actin Binding Proteins (ABPs). One of these proteins is the fimbrin, that crosslinks between actin filaments, parallel through its two binding sites each one composed of two calponin domains. There are very few studies on filamentous fungi conducted to know the importance of fimbrin in this process. To determine whether the absence of this protein has an effect on the morphogenesis and polarized growth in the fungus *Neurospora crassa*; the characterization of the fimbrin mutant strain (Δfim) was performed. The results here obtain shows a polarize growth on the hyphae of Δfim strain. However, its morphology is aberrant showing an abnormal meandering growth with perturbations along the hyphae. The growth rate in the Δfim strain is 77.8% lower than that shown in the wild type strain (WT). The Biomass production is 96.6% lower in the Δfim strain compared to the WT strain. In the case of conidiation rate, the Δfim strain presents 71.6% lower conidia production. The branching rate is higher in the Δfim strain, being 32.3% higher. Besides, the Δfim strain is affected in the septa formation, presenting a higher rate of septation, including an aberrant conidia germination showing a delay in the germ tube generation. Also the Spk presents an atypical morphology, being smaller and diffuse. The rate of endocytosis is diminished in the absence of fimbrin. These results reveal that the absence of fimbrin is not lethal in *N. crassa* and does not affect the polarized growth, but strongly affects the endocytosis, morphogenesis and growth rate.

Key words: Fimbrin, actin, polarized growth, endocytosis, *Neurospora crassa*.

ÍNDICE DEL TRABAJO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	4
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
METODOLOGÍA.....	17
Cepas y medios de cultivo	17
Obtención de la cepa <i>N. crassa</i> mutante de fimbrina homocarion (Δfim) por cruza.....	18
Comprobación de la mutación de Δfim en homocariones	19
Stock de esporas.....	20
Comprobación del tipo de apareamiento de la mutante Δfim	21
Imágenes macroscópicas de la colonia.....	21

Microscopía de las hifas.....	21
Tasa de crecimiento.....	22
Producción de biomasa.....	22
Tasa de ramificación.....	22
Tasa de conidiación.....	23
Formación de septos.....	23
Germinación de conidias.....	24
Visualización de la internalización del colorante lipofílico FM4-64.....	24
Análisis estadístico de datos.....	25
RESULTADOS.....	26
Obtención de cepa <i>N. crassa</i> mutante Δfim homocarión.....	26
Características morfológicas de la mutante Δfim	26
Análisis morfométrico de la mutante Δfim	31
Formación de septos.....	34
Fimbrina durante la germinación.....	37
Caracterización del Spk.....	39
Internalización del colorante lipofílico FM4-64.....	41
DISCUSIÓN.....	44
Crecimiento y morfología.....	44

Condición	45
Formación de Septos	46
Germinación	46
Organización del Spk	47
Endocitosis	48
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS	51
APÉNDICE	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la fimbrina. Se muestran los cuatro dominios CH (CH1, CH2, CH3 y CH4) y las 6 helices alfa que los conforman a cada uno (α A, α B, α C, α D, α E, α F y α D) (Klein et al., 2004).	11
Figura 2	Esquema de la fimbrina y sus dominios CH de union a actina.	11
Figura 3	Geles de agarosa de la electroforesis de productos de PCR. (A) Amplificación de gen <i>fim</i> en la cepa WT y en la mutante Δ <i>fim</i> . (B) Amplificación del gen de resistencia a la higromicina <i>hph</i> en la cepa WT y en la mutante Δ <i>fim</i> .	26
Figura 4	Morfología de la colonia. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δ <i>fim</i> .	28
Figura 5	Margen de la colonia. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δ <i>fim</i> . Escala= 10 μ m.	29
Figura 6	Serie de tiempo del crecimiento de hifas maduras. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δ <i>fim</i> . Imágenes tomadas por DIC. Tiempo en min:seg. Escala= 10 μ m.	30
Figura 7	Tasa de crecimiento de la colonia de la cepa WT y de la mutante Δ <i>fim</i> .	31
Figura 8	Producción de biomasa de la cepa WT y de la mutante Δ <i>fim</i> .	32
Figura 9	Tasa de ramificación de la cepa WT y de la mutante Δ <i>fim</i> .	33
Figura 10	Producción de conidias en la cepa WT y en la mutante Δ <i>fim</i> .	34
Figura 11	Tinción con el marcado de pared celular blanco de "calcofluor". Distribución de los septos en la cepa WT (A) y en la mutante Δ <i>fim</i> (B). Escala= 50 μ m.	35
Figura 12	Tasa de septación de la cepa WT y en la mutante Δ <i>fim</i> .	36

Figura 13	Distancia interseptal en la cepa WT y en la mutante Δfim .	36
Figura 14	Tiempo de septación de la cepa WT y de la mutante Δfim .	37
Figura 15	Serie de tiempos de germinación de espora. (A) Cepa WT (B) Mutante Δfim . Tiempos en h:min. Escala 10 μm .	38
Figura 16	Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Morfología y distribución del Spk en la cepa WT (A-C) y en la mutante Δfim (D-F). A y D muestran el canal fluorescente, B y E el canal de contraste de fases y C y F la combinación de los dos canales. Las flechas señalan el Spk. Escala= 10 μm .	40
Figura 17	Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Distribución y dinámica del Spk durante la elongación de las hifas de la cepa WT (A) y la mutante Δfim (B) tras 20 min de contacto con el marcador. Tiempos en min:seg. Escala= 10 μm .	40
Figura 18	Intensidad promedio de fluorescencia en la región citoplasmática subapical en la cepa WT y en la mutante Δfim .	42
Figura 19	Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Serie de tiempo de crecimiento e internalización del FM4-64 en la cepa WT (A) y la mutante Δfim (B). Tiempos en min:seg. Escala= 10 μm .	43
Figura 20	Perfil de intensidad de fluorescencia a lo largo de 50 μm desde el ápice de la hifa de la cepa WT y de la mutante Δfim . La fecha señala la posición del Spk y la cabeza de flecha señala la posición del anillo endocítico subapical.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Cepas utilizadas en este estudio.	17
Tabla II	Medios de cultivo utilizados en este estudio.	17
Tabla III	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen <i>fim</i> .	19
Tabla IV	Condiciones de amplificación del gen <i>fim</i> .	19
Tabla V	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen <i>hph</i> .	20
Tabla VI	Condiciones de amplificación del gen <i>hph</i> .	20

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos están formados por un conjunto de hifas cilíndricas que crecen en forma polarizada (Trinci, 1969; Bartnicki-Garcia, 2002). Este crecimiento no es exclusivo del reino Mycota, también está presente en tubos polínicos y neuronas (Palanivelu et al., 2000; Feijó et al., 2004; Ischebeck et al., 2004).

En hongos filamentosos, este proceso de crecimiento es mediado por una estructura llamada Spitzenkörper (Spk), la cual funciona como un centro suministrador de vesículas (VSC por sus siglas en inglés) (Bartnicki-Garcia et al., 1989; 2002) que envía vesículas exocíticas a la membrana plasmática secretando enzimas para la síntesis de la pared celular (quitina sintasa y glucano sintasa) (Bartnicki-Garcia, 2002; Harris et al., 2005; Sánchez et al., 2011). El Spk está conformado por un cúmulo de microvesículas (capa interna) y macrovesículas (capa externa) que se encuentran en el ápice de la hifa (Howard, 1981; López-Franco et al., 1996; Riquelme et al., 2014^a; 2014^b; Sánchez et al., 2015). Estas vesículas son transportadas desde el equivalente de Golgi hacia el Spk, a través de microtúbulos y filamentos de actina por acción de las proteínas motoras (Harris et al., 2010).

Los filamentos de actina son un componente del citoesqueleto celular, conformando una red compleja, altamente dinámica que participa en el

transporte de vesículas, endocitosis, exocitosis, citocinesis, septación y polaridad de las hifas (Heath; 1990; Puius et al., 1998; Walther et al., 2003; Moseley et al., 2006; Walker et al., 2006; Blanchoin et al., 2013). La actina es una proteína con una estructura primaria altamente conservada y es la más abundante en células eucariotas (Höfer *et al.*, 1997). Esta se encuentra en dos formas moleculares; monomérica (G-actina) o polimerizada formando filamentos (F-actina) (Pollard, 1990; Puius et al., 1998; Dos Remedios et al., 2003).

Los microfilamentos pueden ser ensamblados en parches o cables, conformación que depende de la interacción con proteínas de unión a actina (ABPs por sus siglas en inglés) y que tienen la capacidad de expandir, contraer, estabilizar, unir o cortar los microfilamentos (Pollard, 1990; Stossel, 1993; Welch et al., 1997). La especificidad de los microfilamentos para realizar una función en la célula depende de la conformación que adquieran (Drubin et al., 1988; Höfer et al., 1997; Dos Remedios et al., 2003).

Existen diversas familias de ABPs que desempeñan diferentes funciones en interacción con los microfilamentos. Una de estas familias está formada por proteínas que cuentan con la secuencia de homología a calponina (CH), y dentro de esta familia se encuentra la fimbrina.

La fimbrina es una proteína altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Adams et al., 1991), característicamente se encuentra en estructuras de soporte o de extensión citoplasmática tales como microvellosidades

intestinales, filopodios y esteriocilios (Bretscher, 1981). La función que desempeña la fimbrina es hacer enlaces cruzados con microfilamentos paralelos a través de sus dominios CH (Bretscher, 1981; Klein et al., 2004; Volkmann et al., 2001).

La función regulatoria de la fimbrina sobre los microfilamentos resulta crucial para el correcto funcionamiento de los procesos en los que participa la actina. Sin embargo, los estudios realizados acerca de esta proteína se han llevado a cabo principalmente en hongos levaduriformes (Brower et al., 1995; Adams et al., 1995; Karpova et al., 1995; Cheng et al., 1999; Sandrock et al., 1998). Son pocos los trabajos que han estudiado a la fimbrina en hongos filamentosos (Delgado- Álvarez et al., 2008; Upadhyay *et al.*, 2008). En este trabajo se realizó la caracterización de la cepa mutante del gen de la fimbrina en *N. crassa* para entender el papel de la fimbrina en la endocitosis, morfogénesis de las hifas, crecimiento polarizado, morfología del Spk, septación y germinación.

ANTECEDENTES

Un tema de sumo interés para la biología celular y molecular es el crecimiento polarizado. Este tipo de crecimiento está presente en células fúngicas, vegetales y animales. El crecimiento polarizado es el resultado de un complejo mecanismo que mantiene sus funciones en el citoplasma, la membrana plasmática y la pared celular (si es que está presente), disponiendo de un conjunto de componentes que participan en procesos tan diversos como el transporte vectorial de vesículas, crecimiento de membrana y la direccionalidad de las células (Drubin et al., 1996). La neuronas, los tubos polínicos y las hifas son consideradas las formas de crecimiento polarizado más notables conocidas hasta la actualidad (Riquelme et al., 2011).

El estudio de este tipo de crecimiento se ha centrado especialmente en los hongos filamentosos por estar formados por hifas que crecen con una tendencia a mantener un crecimiento direccional (Riquelme et al., 1998).

En hongos filamentosos, el modelo de crecimiento está basado en la existencia de un VSC que es representado por el Spk, en donde se concentran vesículas exocíticas que viajan desde el equivalente de Golgi hacia el ápice de la hifa (Bartnicki-Garcia et al., 1989). Es ahí en donde son incorporadas a la membrana plasmática secretando enzimas para la síntesis de pared celular tales

como glucano sintasa y quitina sintasa (Bartnicki-Garcia, 2002; Harris et al., 2005; Sánchez et al., 2011).

El Spk, el cual fue descrito por primera vez en 1924 por Brunswik, fue catalogado como un cuerpo de tamaño variable situado en la zona apical de las hifas. Estudios posteriores tras realizar observaciones microscópicas por contraste de fases y comprobar que el comportamiento que seguía el Spk en la punta de la hifa repercutía en la morfogénesis demostraron que esta estructura está asociada al crecimiento polarizado (Girbardt, 1957).

Actualmente se sabe que el Spk es una estructura conformada por un cúmulo de vesículas y componentes celulares más pequeños. Está asociado a la exocitosis de vesículas y sus funciones tienen un papel sumamente importante en el crecimiento y morfogénesis de las hifas (Howard, 1981; Bartnicki-Garcia et al., 1995; Lopez et al., 1996, Riquelme et al., 2014^b). Observaciones realizadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM) han mostrado que las vesículas que conforman el Spk están agrupadas en dos regiones, una interna formada por vesículas más pequeñas y una externa formada por vesículas de mayor tamaño (Howard, 1981; Lopez et al., 1996; Hohmann et al., 2006; Virag et al., 2006). Estudios realizados en *N. crassa* muestran que la proteína CG-1 (encargada de la síntesis de β -1,3-glucan) se encuentra localizada en la zona macrovesicular del Spk y la proteína CHS-1 (encargada de la síntesis de polímeros de quitina) se encuentra localizada en la zona microvesicular, lo cual

sugiere una distinción en funciones de síntesis de pared al ser excitadas (Verdin et al., 2009; Sánchez et al., 2011; Riquelme et al., 2014^a; 2014^b).

Diversos estudios han demostrado que el transporte de vesículas desde el equivalente de Golgi hasta el Spk es llevado a cabo por los microtúbulos y los filamentos de actina (Horio et al., 2005, Harris et al., 2010) que son componentes del citoesqueleto.

El citoesqueleto es un conjunto de redes dinámicas formadas por unidades proteicas que tienen la capacidad de ensamblarse y desensamblarse rápidamente. El citoesqueleto está compuesto por tres estructuras filamentosas; microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, siendo estos últimos exclusivos del reino animal (Karp, 2009). En hongos, se ha demostrado que el citoesqueleto es de suma importancia en el crecimiento y morfogénesis de las hifas (Bartnicki-Garcia, 2002; Takeshita et al., 2014).

El citoesqueleto de microtúbulos está compuesto por unidades tubulares formadas por α -tubulina y β -tubulina (Weingarten et al., 1975; Desai et al., 1997). En hongos filamentosos esta estructura es considerada como la responsable del transporte a grandes distancia de las vesículas secretoras hasta el Spk. Estudios han demostrado que la adición de drogas con capacidad de despolimerizar microtúbulos causa la desorganización de núcleos, mitocondrias y vesículas durante el crecimiento de las hifas (Steinberg et al., 1993; Plamann et al., 1994; Xiang et al., 1994).

En *N. crassa*, utilizando marcaje por fluorescencia, se ha observado que los microtúbulos tienen una organización longitudinal llegando hasta el Spk, rodeando su contorno e incluso atravesándolo, lo que sugiere su asociación estrecha. Además, los núcleos se desplazan junto con los microtúbulos al ritmo de la elongación de la hifa (Mouriño et al., 2006), aspecto que también ha sido observado en *Allomyces macrogynus* (McDaniel et al., 1998).

Estudios realizados en mutantes por delección de proteínas motoras de microtúbulos en *N. crassa*, han demostrado que la delección de la cinesina causa una desorganización del Spk. En contraste, la delección de la dineina no tiene efecto sobre el Spk, aunque si causa defectos en la formación de vacuolas, lo cual sugiere que el transporte anterógrado de vesículas desde zonas basales hasta el Spk es llevado a cabo por cinesinas. Por otro lado la dineina está encargada de llevar precursores de vacuolas en dirección retrograda (Seiler et al., 1999). Sin embargo, un nuevo estudio demostró que la delección de la dineina si causa defectos en la integridad del Spk (Riquelme et al., 2000). Positivamente, estudios recientes con marcajes por fluorescencia muestran un vínculo directo entre microtúbulos y cinesinas en el transporte anterógrado de endosomas en *N. crassa* (Seidel et al., 2015) y *Aspergillus nidulans* (Zekert et al., 2009). A causa de que no se tiene claro cuáles son las zonas de polimerización de microtúbulos en *N. crassa*, algo que ya se sabe en *A. nidulans* (Oakley et al., 1990; Veith et al., 2005; Zekert et al., 2009), no es posible afirmar que el movimiento de las proteínas motoras de microtúbulos sea en una sola dirección.

A pesar de los estudios que muestran una convergencia de los microtúbulos con el Spk y la localización de la actina en el ápice de la hifa (McDaniel *et al.*, 2001; Riquelme *et al.*, 2002; Mouriño *et al.*, 2006), se desconoce el mecanismo por el cual las vesículas se incorporan al Spk para luego ser transportadas a la membrana plasmática.

El citoesqueleto de actina está formado por una proteína globular de 42 kDa de masa molecular altamente conservada llamada G-actina (Höfer *et al.*, 1997). Estos monómeros de actina tienen la capacidad de unirse por sus extremos en dirección C-terminal-N-terminal formando filamentos (F-actina o microfilamentos), siendo un proceso ATP-dependiente que tiene afinidad con el extremo C-terminal (Pollard, 1990; Puius *et al.*, 1998; Dos Remedios *et al.*, 2003). La G-actina está formada por un dominio grande (conformado por el subdominio III y el subdominio IV) y un dominio pequeño (conformado por el subdominio I y el subdominio II) separados por una hendidura que corresponde al sitio de unión con el ATP (Dos Remedios *et al.*, 2003).

En *N. crassa* la actina se encuentra distribuida en la zona subapical formando parches, en la punta en forma de cables colocalizando con el Spk y en el anillo contráctil en la formación de los septos (Berepiki *et al.*, 2010; Delgado- Álvarez *et al.*, 2010). En el caso de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* la actina se encuentra localizada en la región del septo durante la citocinesis y en zonas corticales formando parches (Arai *et al.*, 1998). En cambio, en

Saccharomyces cerevisiae la actina está distribuida en parches en zonas corticales, y también está presente en el anillo contractil durante la citocinesis, proceso en el que se asocia formando cables (Welch et al., 1997; Pruyne et al., 2000; Moseley et al., 2006).

Diversos estudios muestran que la actina es una proteína altamente dinámica, que tiene participación en el transporte de vesículas, endocitosis, exocitosis, citocinesis, septación y polaridad de las hifas (Heath; 1990; Puius et al., 1998; Torralba et al, 1998; Walther et al., 2003; Moseley et al., 2006; Walker et al., 2006; Blanchoin et al., 2013). Las funciones que desempeña la actina están mediadas por las ABPs, las cuales tienen la capacidad de expandir, contraer, estabilizar, unir o cortar los microfilamentos (Pollard, 1990; Stossel, 1993; Welch et al., 1997). La especificidad de los microfilamentos para realizar una función en la célula depende de la conformación que adquieran (Höfer et al., 1997; Drubin et al., 1998; Dos Remedios *et al.*, 2003).

Dentro del conjunto de ABPs, existe un grupo de proteínas motoras conocido como miosinas, las cuales han sido poco estudiadas en hongos filamentosos. Estas proteínas participan en conjunto con los microfilamentos en el transporte de vesículas del Spk hacia la membrana plasmática. Las miosinas de clase V acarrean las vesículas utilizando a los cables de actina como vías de transporte (Bretscher, 2003; Taheri et al., 2012; Ramírez, 2014), siendo este proceso de suma importancia para el crecimiento polarizado. A demás de las miosinas, en

hongos se han descrito otras ABPs tales como la profilina, la cual propicia la unión de G-actina a F-actina ya existentes (Staiger et al., 1993), la cofilina, que participa en la despolimerización de la F-actina en dirección C-terminal (Nishida et al., 1987), la tropomiosina, que estabiliza a F-actina evitando que se despolimerice (Greenberg et al., 2008), el complejo Arp2/3, el cual propicia la nucleación de nueva F-actina formando ramificaciones (Humphries et al., 2002) y la fimbrina, que tiene la función de formar haces paralelos de F-actina.

La fimbrina forma parte de una familia de proteínas que cuentan con la secuencia de homología a CH, proteína que se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Adams et al., 1991). La fimbrina fue aislada por primera vez de células intestinales de gallina (*Gallus gallus*) y descrita por primera vez como una proteína estructural de las microvellosidades del epitelio intestinal, logrando tener las primeras imágenes microscópicas de su arreglo en fibroblastos de ratones por medio de inmunofluorescencia (Bretscher, 1980).

La fimbrina tiene la capacidad de unir paralelamente a la F-actina por medio de un enlace cruzado a través de sus dominios CH, siendo reportada por primera vez como ABP (Bretscher, 1981).

Esta proteína está formada por 649 aa (Galagan et al., 2003), contiene dos subunidades formadas por dos dominios CH cada una (CH1 y CH2 para la subunidad próximo al extremo N-terminal y CH3 y CH4 para la subunidad próximo al extremo C-terminal), los cuales tienen un peso molecular de 27 kDa y

están compuestos por 110 aminoácidos con un arreglo de 6 hélices alfa. Además, contiene una cabeza formada por dos segmentos de tipo hélice-bucle-hélice homólogos a mano-EF situada en el extremo N-terminal que tienen la función de unirse a iones calcio (Klein et al., 2004).

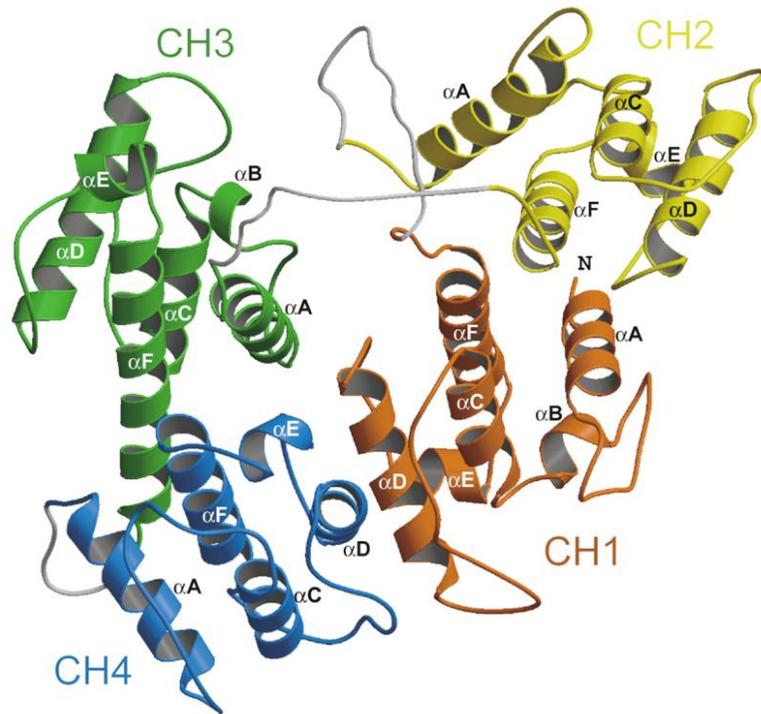


Figura 1.- Estructura de la fimbrina. Se muestran los cuatro dominios CH (CH1, CH2, CH3 y CH4) y las 6 helices alfa que los conforman a cada uno (αA , αB , αC , αD , αE , αF y αD) (Klein et al., 2004).

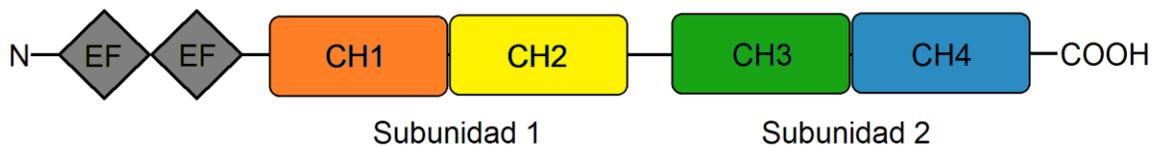


Figura 2.- Esquema de la fimbrina y sus dominios CH de union a actina.

A la fimbrina se le encuentra característicamente en estructuras de soporte o de extensión citoplasmática tales como microvellosidades intestinales, filopodios, esteriocilios o fibroblastos (Bretscher, 1981).

Tras estudios realizados *in vitro* se ha comprobado que la fimbrina, además de formar haces de F-actina a través de la unión por enlaces cruzados, también le confiere rigidez y estructura a los haces de actina (Bretscher, 1981; Adams et al., 1991; Cheng et al., 1999). Información que ha sido corroborada en estudios posteriores en donde han incorporado tecnología apropiada para un mejor estudio de las estructuras (Volkman et al, 2001).

En humanos se han encontrado tres isoformas de plastina (Homóloga a la fimbrina en hongos); T-plastina, I-plastina y L-plastina. La T-plastina está asociada a tejidos que requieren de rigidez, reportándose su presencia en fibroblastos y neuronas, la I-plastina, en cambio, está restringida su expresión en hígado y riñón y para el caso de la L-plastina se ha reportado su presencia en células hematopoyéticas, además de descubrir que es sobreexpresada por un gran número de tipos de células cancerígenas, por lo que se está empleando como un marcador para el diagnóstico de cáncer (Shinomiya, 2012).

En plantas el estudio de esta proteína ha centrado su atención en el marcaje indirecto de la actina. Se han realizado trabajos en los cuales han marcado la AtFIM1 en *Arabidopsis thaliana* teniendo un marcaje indirecto de las estructuras que conforman la actina (Sheahan et al., 2004).

En hongos, la interacción de la fimbrina con actina ha sido estudiada *in vivo* por medio de marcajes con proteínas fluorescentes y desarrollo de mutantes por delección.

El estudio de la fimbrina resulta de sumo interés ya que está asociada a parches endocíticos que tienen la función de llevar a cabo la endocitosis (Toret, et al., 2006), ya que existe evidencia que propone a la endocitosis como un componente importante en el crecimiento polarizado y la morfogénesis de los hongos (Atkinson et al., 2002; Shaw et al., 2011). Sin embargo, son pocos los estudios que sustentan el modelo de reciclamiento apical.

Para el caso de los hongos filamentosos, se ha reportado en *N. crassa* la presencia de la fimbrina en el anillo endocítico subapical conformando parches en conjunto con la actina. También se encuentra de manera más esporádica formando parches en zonas basales del citoplasma y más abundante en los septos formando un doble anillo que flanquea el anillo contráctil de actomiosina, en donde la fimbrina está presente en una zona adyacente a la formación del septo (Delgado-Álvarez et al., 2010), lo que implica una participación importante en la endocitosis, crecimiento y morfogénesis.

En *A. nidulans*, otro hongo filamentosos, se ha reportado que la fimbrina está presente en parches característicamente situados en la zona subapical de la hifa y en septos. Además, se demostró que la delección de la expresión del gen de la fimbrina tiene un efecto dilatador de la polarización de las esporas, que afecta

directamente la morfogénesis de las hifas presentando un fenotipo aberrante y una disminución considerable en la tasa de endocitosis (Upadhyay et al., 2008). Peculiarmente, la delección de la fimbrina en *Ashbya gossypii* tiene un fenotipo similar, convergiendo en defectos en la endocitosis y germinación de esporas (Jorde et al., 2011).

En contraste, estudios realizados en *S. cerevisiae*, han reportado que Sac6p, el homólogo de la fimbrina en *N. crassa*, se localizada en los parches y cables de actina. Sin embargo, se reconoce su importancia en el desarrollo y mantención de la polaridad, lo que afecta directamente la morfogénesis (Adams, et al., 1991). Adicionalmente, la delección del gen que codifica para Sac6p (*SAC6*) causa un fenotipo con crecimiento sensible a la temperatura, además de defectos en la morfología de las células (Adams, et al., 1995). Estudios realizados con α -factor en mutantes de la fimbrina han demostrado que la endocitosis de esta hormona se ve afectada (Kübler et al., 1993).

En *S. pombe*, la Sac6p no está localizada en los cables de actina, pero si en los parches y en el anillo contráctil, teniendo al parecer, un papel importante en la citocinesis de esta levadura de fisión y en la polaridad celular (Nakano et al., 2001; Skau et al., 2011). La sobreexpresión de la fimbrina en esta levadura, afecta letalmente al organismo debido a defectos en la citocinesis causados por un arreglo aberrante del anillo de actomiosina (Wu et al., 2001).

HIPÓTESIS

La delección del gen de la fimbrina afectará la organización de citoesqueleto de actina por lo que presentará modificaciones en la morfología, la endocitosis, la distribución de los parches endocíticos y la formación de septos en *N. crassa*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar a la cepa mutante del gen de la fimbrina (*fim*) en *Neurospora crassa*.

Objetivos particulares

- Describir las características fenotípicas de la mutante por delección de la fimbrina.
- Evaluar el efecto de la falta de fimbrina en la endocitosis.
- Identificar el efecto de la ausencia de fimbrina en la morfogénesis, germinación y septación de *N. crassa*.

METODOLOGÍA

Cepas y medios de cultivo

Las cepas y medios de cultivo utilizados en este trabajo se enlistan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla I.- Cepas utilizadas en este estudio.

Nombre	Genotipo	Referencia
<i>N. crassa</i> tipo silvestre (Control)	<i>mat A</i>	FGSC* #4200
<i>N. crassa</i> Δ <i>fim</i> heterocarion	<i>mat a</i> Δ <i>fim::hph</i> ⁺	FGSC #21842
<i>N. crassa</i> Δ <i>fim</i> homocarion	<i>mat A</i> Δ <i>fim::hph</i> ⁺	Generada, no publicada aun.
<i>N. crassa</i> <i>Fluffy A</i>	<i>mat a</i>	FGSC #4317
<i>N. crassa</i> <i>Fluffy a</i>	<i>mat A</i>	FGSC #4347

*FGSC, Fungal Genetic Stock Center

Tabla II.- Medios de cultivo utilizados en este estudio.

Nombre	Características
MSC-agar	Medio sintético de cruzas agar 2%.
MMV-agar	Medio mínimo de Vogel agar 1.5%.
MMV-liq	Medio mínimo de Vogel líquido (sin agar).
MMV-higr	Medio mínimo de Vogel agar 1.5% + higromicina 25 mg/ml (3 μ l de higromicina/1 ml de medio).

Obtención de la cepa *N. crassa* mutante de *fimbrina homocarion* (Δfim) por cruza

Esporas de la cepa *N. crassa* heterocarion mutante del gen *fim* fueron recuperadas con un palillo estéril, se sembraron en cajas de Petri con MSC-agar y se incubaron por 7 d a 28°C envueltas en papel aluminio para que crecieran en obscuridad total. Posteriormente, las cajas se reinocularon con esporas de la cepa *N. crassa* tipo silvestre (WT) del tipo de apareamiento “complementario y se incubaron bajo las mismas condiciones. Después de 15 días (d) se observaron las cajas con un microscopio estereoscópico Olympus SZXILLB2-100[®], corroborando la presencia de peritecios.

Una vez que los peritecios maduraron y expulsaron las ascosporas, se recuperaron las que estaban adheridas a la tapa de la caja de Petri con 1 ml de agua destilada estéril y se almacenaron en tubos de 1.5 ml. Para concentrar las ascosporas, se centrifugaron los tubos a 4,000 rpm por 5 min en una centrifuga VWR 18R micro[®], se extrajeron 900 μ l de cada uno y se colocaron todas las ascosporas en un solo tubo. Se sembraron 10 μ l de la suspensión de ascosporas en MMV-higr, siendo la higromicina el marcador de selección. Las ascosporas se sometieron a un choque térmico de 60°C por 1 h y posteriormente se incubaron a 30°C por 12 h.

Aquellas colonias que crecieron se resembraron en tubos de cultivo con MMV-agar inclinado y se incubaron a 30°C hasta que se observó la presencia de esporas.

Comprobación de la mutación de Δfim en homocariotes

Un cultivo se realizó de las cepas resistentes a higromicina que potencialmente tuvieran la mutación Δfim y de la cepa WT en matraz Erlenmeyer con 100 ml de MMV-liq. Se sembraron esporas por medio de palillo estéril y se incubaron a 30°C por 10 d. Posteriormente se recuperó el micelio por filtración, se maceró en nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ADN total con el kit de QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit[®] de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Con el fin de corroborar la ausencia del gen *fim* se realizó un PCR del ADN genómico de las cepas aisladas, así como de la cepa WT como control, en un termociclador Bio-Rad C1000 Touch[®] utilizando la polimerasa Invitrogen Platinum PCR SuperMix[®] y los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *fim* (Tabla III) bajo las condiciones señaladas en la tabla IV.

Tabla III.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *fim*.

Nombre	Secuencia
Sentido <i>Fimbrin Forward</i>	5' GCT CTA GAA TGA TCC TCA AGA TCC AG 3'
Antisentido <i>Fimbrin Reverse</i>	5' CCT TAA TTA ACT GCA TCT TGT CAT AGG TAG CCA T 3'

Tabla IV.- Condiciones de amplificación del gen *fim*.

1 ciclo	Desnaturalización inicial	94° C	2 min
30 ciclos	Desnaturalización	94° C	30 s
	Alineamiento	55° C	30 s
	Extensión	68° C	2 min 30 s
1 ciclo	Extensión final	68 °C	7 min

Al producto de la PCR se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observó con un fotodocumentador Bio-Rad Chemi XRS®.

Además se realizó la amplificación del gen *hph* (Provee resistencia a higromicina) utilizando los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de este gen (Tabla V) bajo las condiciones señaladas en la tabla VI.

Tabla V.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *hph*.

Nombre	Secuencia
Sentido <i>Hph-FW</i>	5' GTC GGA GAC AGA AGATGA TAT TGA A 3'
Antisentido <i>Hph-R</i>	5' GTT GGA GAT TTC AGT AAC GTT AAG TGC 3'

Tabla VI.- Condiciones de amplificación del gen *hph*.

1 ciclo	Desnaturalización inicial	94° C	2 min
30 ciclos	Desnaturalización	94° C	30 s
	Alineamiento	55° C	30 s
	Extensión	68° C	1 min 40 s
1 ciclo	Extensión final	68 °C	7 min

Stock de esporas

Las cepas Δfim y WT se cultivaron en matraces Erlenmeyer sembrando esporas por medio de un palillo estéril en 50 ml de MMV-agar y se incubaron a 30°C por 7 d en oscuridad y 4 d en iluminación. Las esporas se recuperaron por medio de filtración y se lavaron con sorbitol 1 M y agua destilada estéril. Las esporas fueron almacenadas en tubos de 1.5 ml. El conteo de esporas se

realizó por medio de un hematocitómetro utilizando un microscopio compuesto Olympus CX21LED[®]. La suspensión de esporas de ambas cepas fue llevada una concentración de 1.26×10^8 esporas/ml para ser utilizadas en experimentos posteriores.

Comprobación del tipo de apareamiento de la mutante Δfim

Para establecer el tipo de apareamiento de la cepa mutante Δfim aislada, se realizó una cruce entre la cepa que se corroboró como mutante y la cepa *Fluffy* con tipo de apareamiento “*mat a*” y “*mat A*”, por triplicado cada una. Después de 20 d se observó la presencia de peritecios. Las fotografías de los cultivos se tomaron con una cámara NIKON D3100[®].

Imágenes macroscópicas de la colonia

Para obtener imágenes de la morfología de la colonia, se realizó un cultivo de la mutante Δfim y la cepa WT en cajas de Petri con MMV-agar, sembrando 10 μ l de la suspensión de esporas y se incubaron a 30°C por 48h. Las fotografías de las colonias se tomaron cada 12 h con una cámara NIKON D3100[®].

Microscopia de las hifas

Para hacer un análisis más detallado de la colonia, se tomaron imágenes del margen de la colonia utilizando un estereoscopio Olympus SZXILLB2-100[®] con la cámara Olympus DP70[®]. Con el fin de hacer una visualización de la morfología de las hifas y se empleó el método de agar invertido descrito por Hickey et al., en 2004. Las imágenes en contraste de fases de las hifas se

tomaron con Microscopio Confocal LSM 510 META[®] Carl Zeiss utilizando un objetivo de inmersión de aceite de 100x con 1.4 de A.N.

Tasa de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento vegetativo del micelio de la mutante Δfim y la cepa WT, se realizó por triplicado un cultivo en MMV-agar, sembrando 10 μ l de esporas en el margen de la caja de Petri, incubándolo a 30°C. Se registró el contorno de la colonia se marcó cada 2 h por 36 h, posteriormente se hicieron diez transectos desde el sitio de inoculación y se midió el crecimiento radial en cada uno para cada uno de los tiempos.

Producción de biomasa

Un cultivo por triplicado se realizó de la mutante Δfim y la cepa WT en matraces Erlenmeyer con 100 ml de MMV-liq para evaluar la producción de biomasa. Se sembraron esporas a la concentración establecida en cada uno y se incubaron a 30°C por 4 d en oscuridad, se recuperó el micelio de las dos cepas por medio de filtración, se liofilizó por 24 h con el liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5[®] y se pesó con una balanza analítica Santorius 1712 MP8[®].

Tasa de ramificación

Para el caso de la tasa de ramificación, se sembraron 10 μ l de la suspensión de esporas de la mutante Δfim y la cepa WT y se incubaron a 30°C por 18 h. Las imágenes del margen de la colonia se tomaron con un aumento de 25x utilizando un estereoscopio Olympus SZXILLB2-100[®] con la cámara Olympus

DP70[®]. Para establecer la tasa de ramificación se contó el número de ramificaciones en 500 μm de 30 hifas principales de las dos cepas. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ[®].

Tasa de conidiación

Para obtener la tasa de conidiación, fue realizado un cultivo por triplicado de la mutante Δfim y la cepa WT en matraces Erlenmeyer con 50 ml de MMV-liq y se incubaron a 30°C por 7 d en oscuridad y 4 d en iluminación. Las esporas se recuperaron por filtración y se lavaron con sorbitol 1M y agua destilada estéril. El conteo de esporas se realizó con un hematocitómetro utilizando un microscopio compuesto Olympus CX21LED[®].

Formación de septos

Para hacer un análisis de la tasa de septación y de la distancia interseptal, se realizó un cultivo de la mutante Δfim y la cepa WT en MMV-agar. El método que se utilizó fue de agar invertido, al cual se le agregaron antes $\sim 20 \mu\text{l}$ de “*calcofluor*” 1 mM, se dejó en reposo por 5 min, posteriormente se lavó con agua destilada. Las hifas se visualizaron y se tomaron imágenes con un microscopio invertido ZEISS Axiovert200[®] con una cámara AxioCaM HRc[®] utilizando el objetivo 40x con 0.1 de A.N. y el filtro azul de 388 nm como fuente de excitación para el “*calcofluor*”. El número de septos se contó en 500 μm de 30 hifas principales de las dos cepas. Para el caso de la distancia interseptal, se midió la distancia entre los septos de los tres primeros septos de 30 hifas principales de

las dos cepas. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ[®]. Adicionalmente, para definir el tiempo de septación, se realizó la tinción con solofenil flavin al 0.1% y se tomaron imágenes de las hifas cada 10 s con un microscopio confocal Olympus FB1000[®] utilizando el objetivo 40x con 1.3 de A.N., y el filtro de 488 nm de longitud de onda como fuente de excitación para el solofenil flavin.

Germinación de conidias

Para conocer si había una afectación en la germinación de las conidias en la mutante Δfim , se esparcieron esporas en cajas de Petri con MMV-agar y se incubaron a 30°C por 2 h. El método de agar invertido se usó para observar las células. Una serie de tiempo de la germinación se realizó tomando imágenes cada 30 min con un Microscopio Confocal LSM 510 META[®] Carl Zeiss utilizando el objetivo 100x con 1.3 de A.N de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Visualización de la internalización del colorante lipofílico FM4-64

Para establecer si había alteraciones en la endocitosis y la dinámica y organización del Spk, se observó la internalización del colorante de membranas FM4-64. Para esto, se realizó un cultivo de la mutante Δfim y la cepa WT en MMV-agar, que se incubó a 30°C por 24 h. Con una jeringa de 0.5 ml se agregaron 10 μ l de FM4-64 5 mM a través del agar, una vez que la muestra se había colocado sobre el cubreobjetos. La microscopia confocal se utilizó como se describió anteriormente para las observaciones.

Para el caso del análisis de endocitosis, se cortó un cuadro de agar que contenía parte del margen de la colonia y se puso sobre un cubreobjetos, posteriormente se le agregó 10 μ l de FM4-64 5 mM y de inmediato se midió cada 2 min la intensidad de los pixeles en una línea recta de 5 μ m posteriores a 10 μ m desde el ápice de la hifa. Acción que se llevó a cabo en 30 hifas de las dos cepas, además se realizó un perfil de internalización a lo largo de 50 μ m desde el ápice de las hifas de las dos cepas tras 10 min de estar en contacto con el FM4-64. Las hifas fueron observadas con el microscopio confocal Olympus FB1000[®] utilizando el objetivo 60x con 1.42 de A. N., y el filtro de 543 nm de longitud de onda como fuente de excitación para el FM4-64. El análisis de las imágenes se realizó con el software FV10-ASW 4.0[®].

Análisis estadístico de datos

Los resultados cuantitativos obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba t de Student de dos colas para muestras independientes y $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

Obtención de cepa *N. crassa* mutante Δfim homocarion

A través de una cruce entre la cepa *N. crassa* mutante de fimbrina heterocarion con tipo de apareamiento “*mat a*” y la cepa *N. crassa* WT con tipo de apareamiento “*mat A*”, se obtuvo la cepa homocarion mutante Δfim . La ausencia del gen *fim* se comprobó en la cepa obtenida a través de la amplificación del marco abierto de lectura del gen *fim* y del gen de resistencia a la higromicina *hph* en la cepa WT y la candidata mutante Δfim (Figura 3).

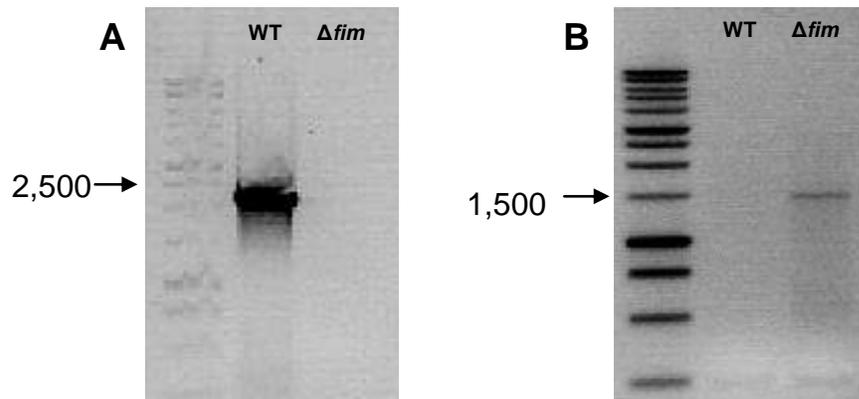


Figura 3.- Geles de agarosa de la electroforesis de productos de PCR. (A) Amplificación de gen *fim* en la cepa WT y en la mutante Δfim . (B) Amplificación del gen de resistencia a la higromicina *hph* en la cepa WT y en la mutante Δfim .

Características morfológicas de la mutante Δfim

Las observaciones macroscópicas de la colonia de la mutante Δfim se realizaron y se compararon con la cepa WT. Durante la incubación de las colonias, se observó una notoria diferencia del diámetro entre la mutante Δfim y

la cepa WT (Figura 4). La colonia de la mutante Δfim presentó un crecimiento más lento e irregular, no creció en forma circular como la cepa WT. Al ser puestas bajo la luz por 12 h, se observó que la cepa WT presentó una coloración amarilla-naranja, producto de la producción de carotenos, tras la generación de esporas. Por otro lado, la mutante Δfim no presentó ningún cambio en la coloración de la colonia (Figura 4).

Al observar el margen de la colonia a mayor aumento con el esteromicroscopio, se encontró que en la mutante Δfim , las hifas eran más delgadas y menos densas en comparación de la cepa WT (Figura 5).

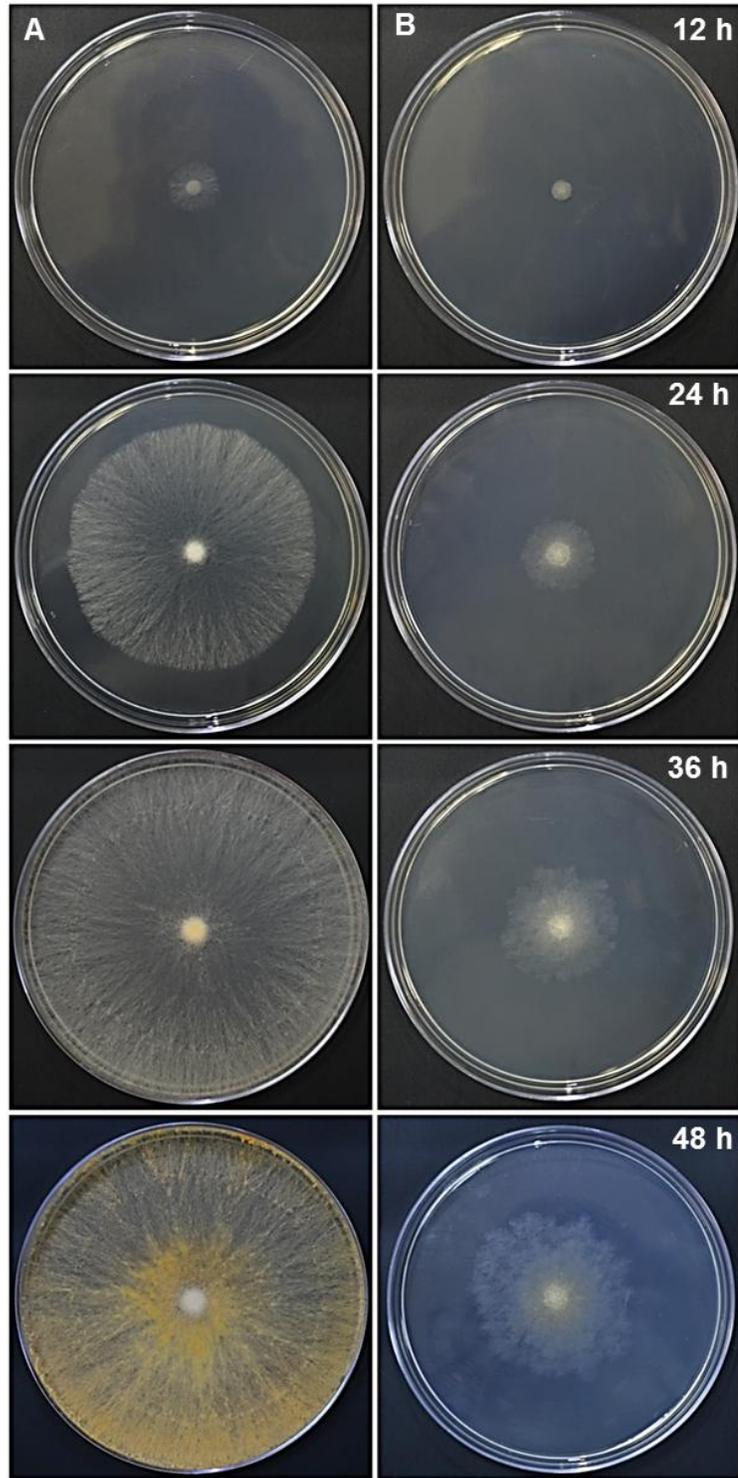


Figura 4.- Morfología de la colonia. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δfim .

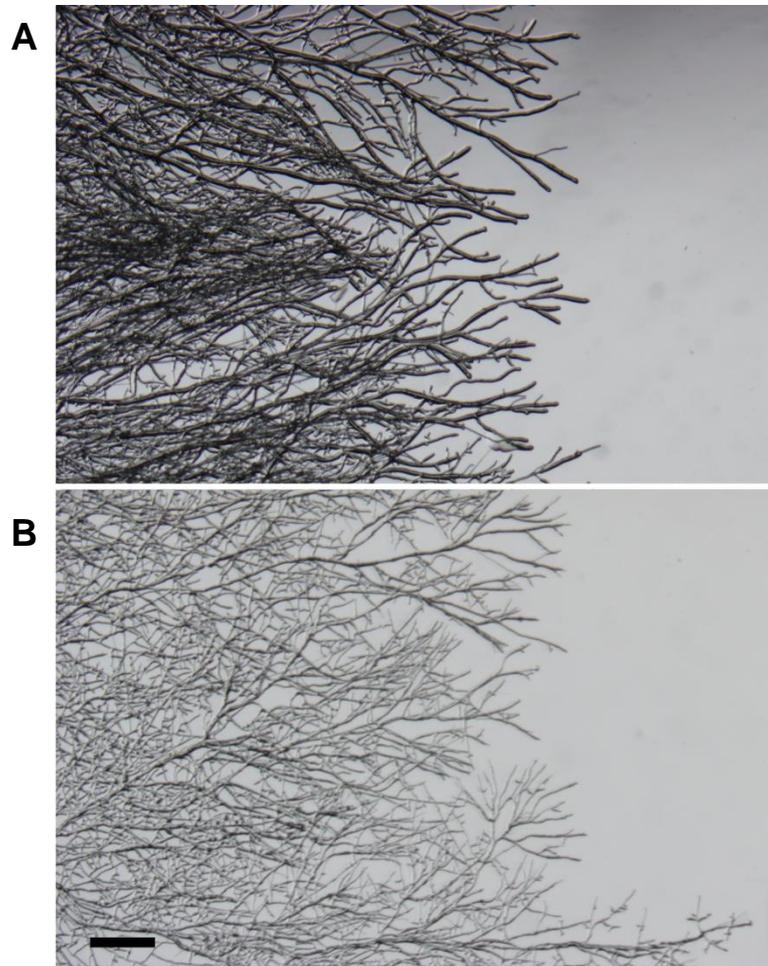


Figura 5.- Margen de la colonia. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δfim . Escala= 10 μm .

Mediante microscopia confocal se realizó un seguimiento del crecimiento de hifas maduras, se logró observar que el tamaño de las hifas de la mutante Δfim es claramente menor y presentan un crecimiento más lento en comparación a la cepa WT. Además, la dirección de crecimiento de las hifas de la mutante Δfim presenta pequeñas desviaciones que se ven reflejadas en la morfología de la

hifa la cual presenta ondulaciones, mientras que las hifas de la cepa WT crecen de manera uniforme manteniendo una misma dirección de elongación (Figura 6).

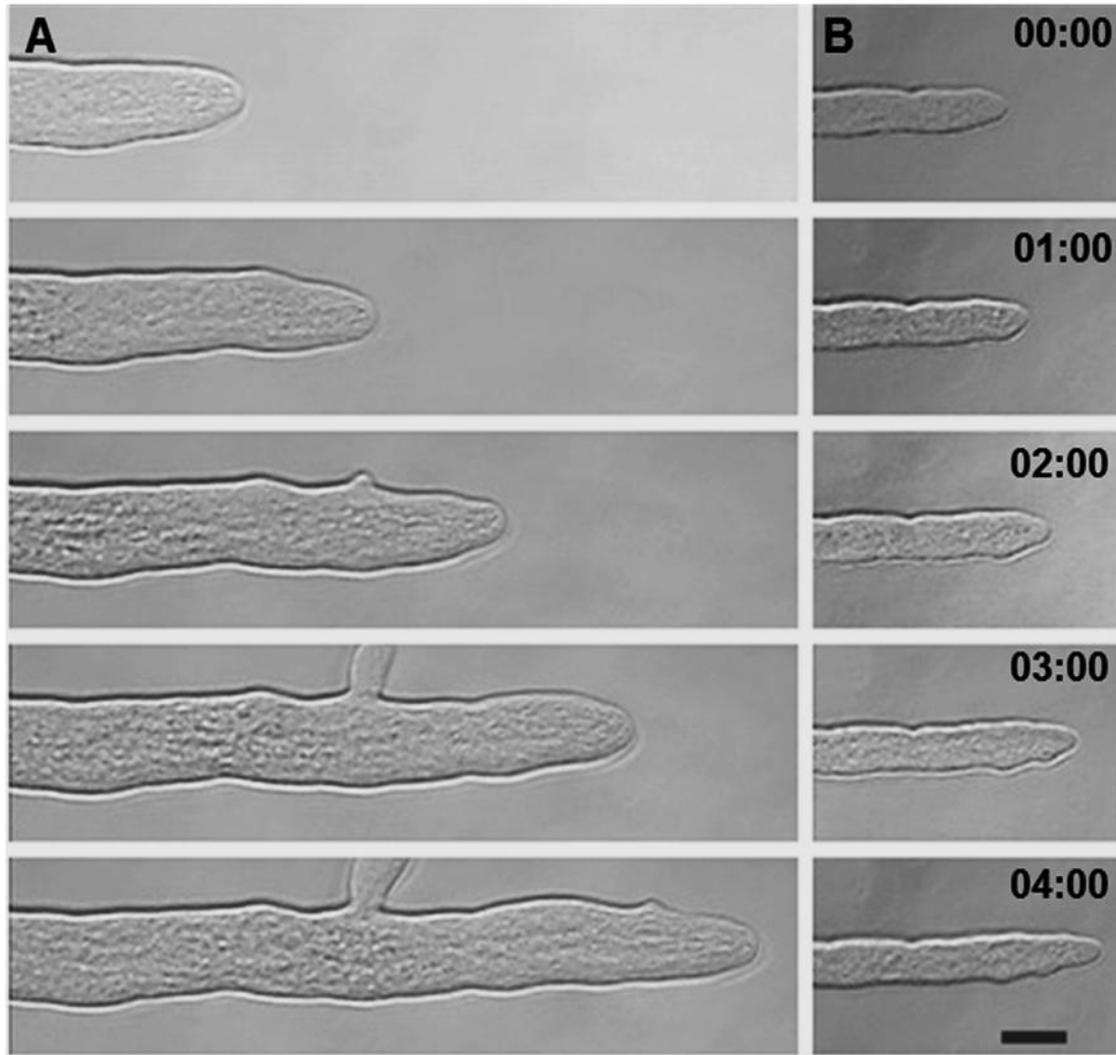


Figura 6.- Serie de tiempo del crecimiento de hifas maduras. (A) Cepa WT. (B) Mutante Δfim . Imágenes tomadas por DIC. Tiempo en min:seg. Escala= 10 μ m.

Análisis morfométrico de la mutante Δfim

Una medición se realizó para la tasa de crecimiento, producción de biomasa, tasa de ramificación y producción de conidias en la mutante Δfim y se comparó con la cepa WT con la finalidad de establecer cuantitativamente diferencias entre estas dos cepas.

La tasa de crecimiento promedio de la mutante Δfim fue de $3.8 \mu\text{m}/\text{min}$ siendo un 89.9% menor a la tasa de crecimiento promedio de la cepa WT que fue de $37.8 \mu\text{m}/\text{min}$ (Figura 7).

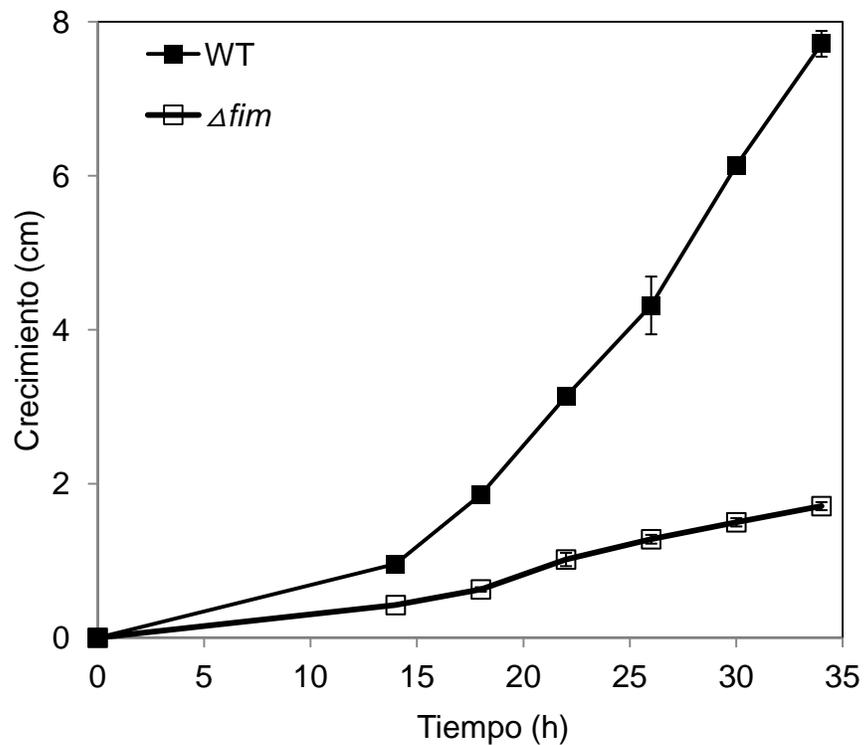


Figura 7.- Tasa de crecimiento de la colonia de la cepa WT y de la mutante Δfim .

Para el caso de la producción promedio de biomasa, la mutante Δfim obtuvo una producción de 23.2 mg/dl siendo esto 5.75 mg por día. En cambio, la cepa WT produjo en promedio 662.85 mg/dl lo que significa 165.71 mg por día. Hubo una disminución del 96.5% en la producción de biomasa en la mutante Δfim ($P < 0.05$) (Figura 8).

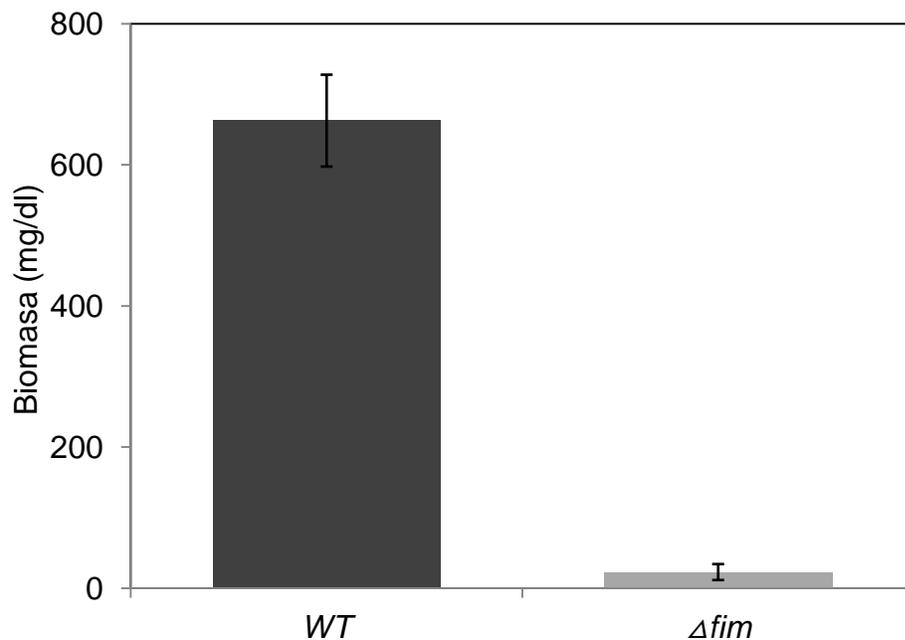


Figura 8.- Producción de biomasa de la cepa WT y de la mutante Δfim .

Tras analizar la tasa promedio de ramificación de las cepas, la mutante Δfim presentó una frecuencia de ramificación de 2.2 ramas cada 500 μm y la cepa WT presentó una frecuencia de 1.66 ramas cada 500 μm ($P > 0.05$) (Figura 9), lo

cual corrobora las primeras observaciones realizadas del margen de la colonia (Figura 4).

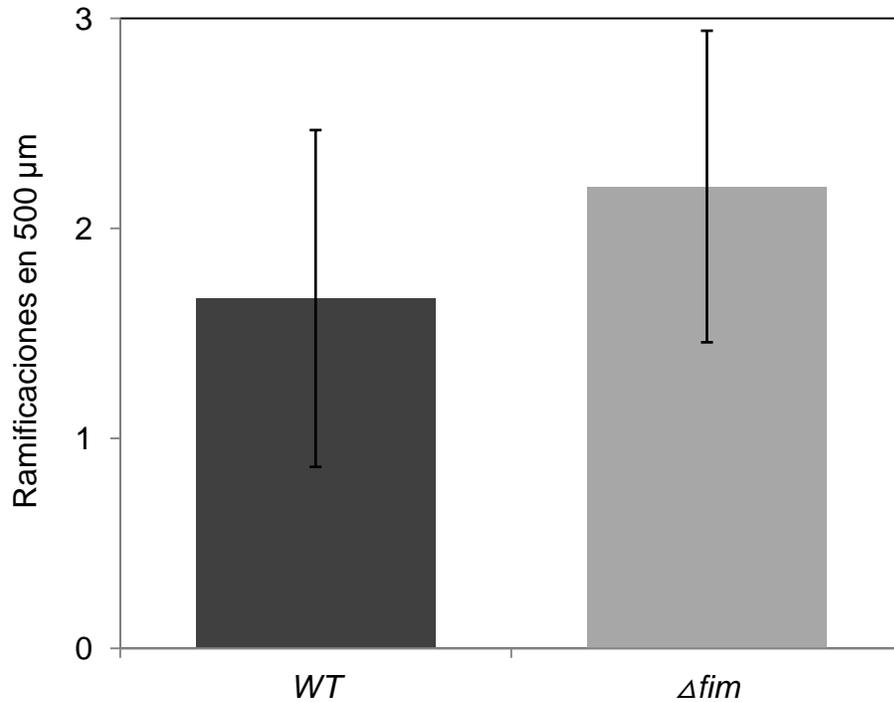


Figura 9.- Tasa de ramificación de la cepa WT y de la mutante Δfim .

Al evaluar la producción de conidias de las cepas, se observó que la mutante Δfim produjo 1.53×10^7 conidias/ml, lo que refleja un 70.6% menos conidias que la cepa WT, la cual tuvo una producción de 5.22×10^7 conidias/ml ($P < 0.05$) (Figura 10).

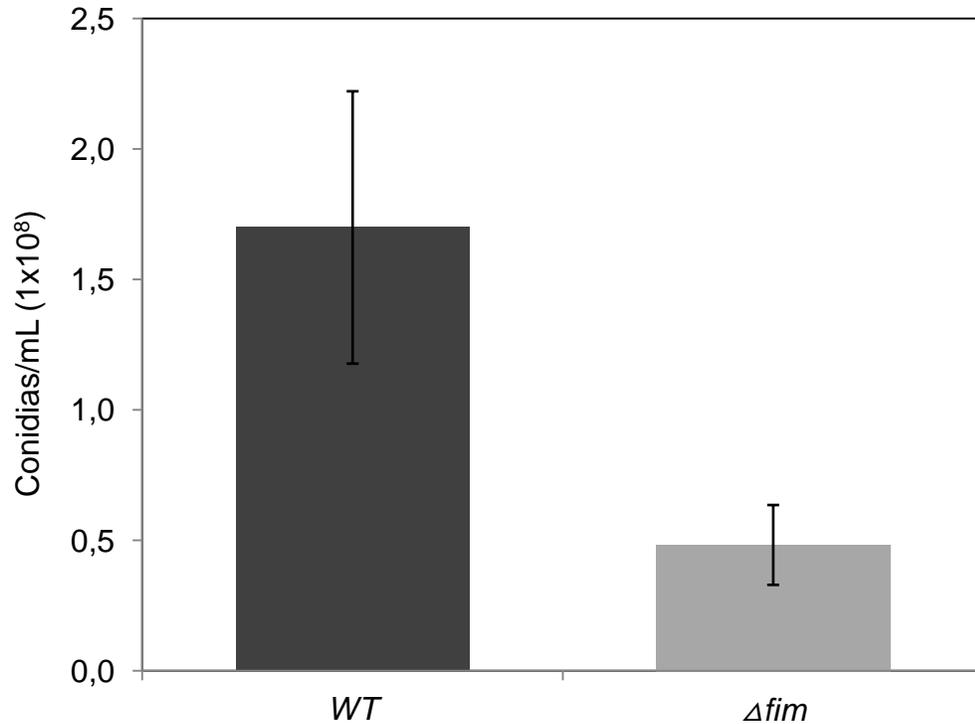


Figura 10.- Producción de conidias en la cepa WT y en la mutante Δfim .

Formación de septos

La tinción con “*calcofluor*” permitió el análisis de los septos en las hifas de las dos cepas. Los septos de la mutante Δfim se encuentran en una frecuencia mayor que en la cepa WT (Figura 11). Al hacer una evaluación de la tasa de septación en las dos cepas, se obtuvo que la mutante Δfim tiene un número promedio mayor de septos (5.7 septos por cada 500 μm) en cambio la cepa WT tuvo una tasa menor (2.6 septos por cada 500 μm) ($P < 0.05$) (Figura 12). Al analizar la distancia interseptal se observó que en la mutante Δfim hay un septo cada 69.4 μm , en cambio en la cepa WT presenta un septo cada 119.1 μm ($P < 0.05$) (Figura 13).

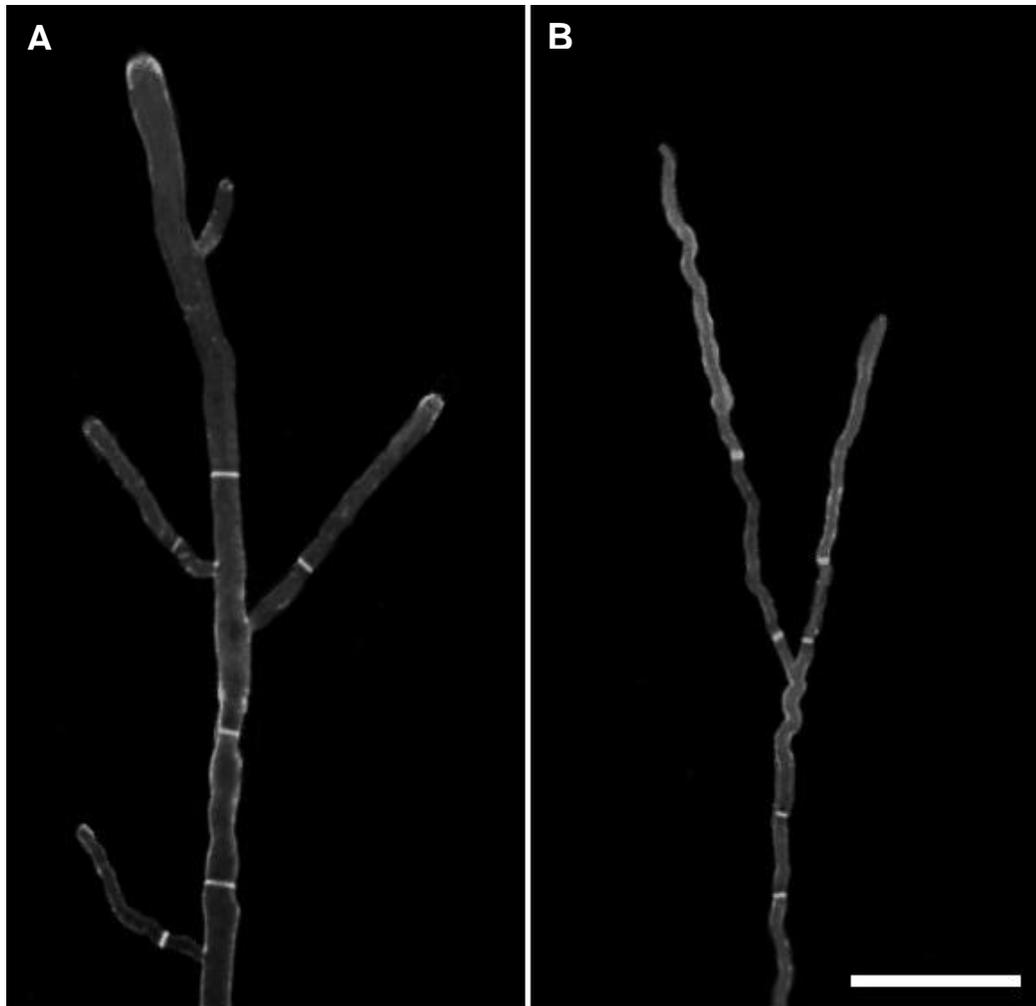


Figura 11.- Tinción con el marcador de pared celular blanco de “*calcofluor*”. Distribución de los septos en la cepa WT (A) y en la mutante Δfim (B). Escala= 50 μm .

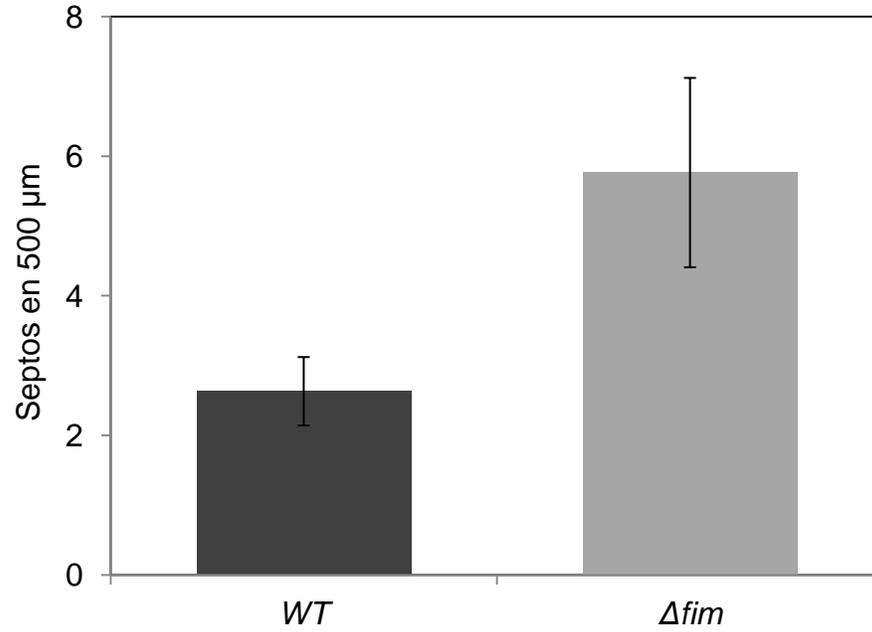


Figura 12.- Tasa de septación de la cepa WT y en la mutante Δfim .

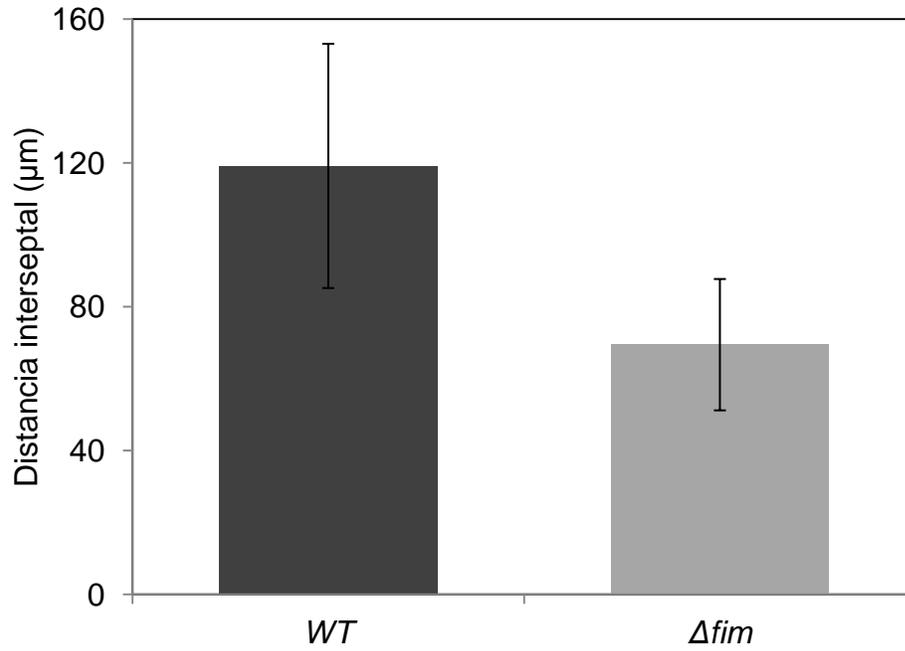


Figura 13.- Distancia interseptal en la cepa WT y en la mutante Δfim .

En cuanto al tiempo de septación de las dos cepas, se encontró que a la sepa mutante Δfim le toma 18.7 min en promedio formar un sepo, en cambio la cepa WT tiene tiempo promedio de septación de 11.4 min ($P < 0.05$) (Figura 14).

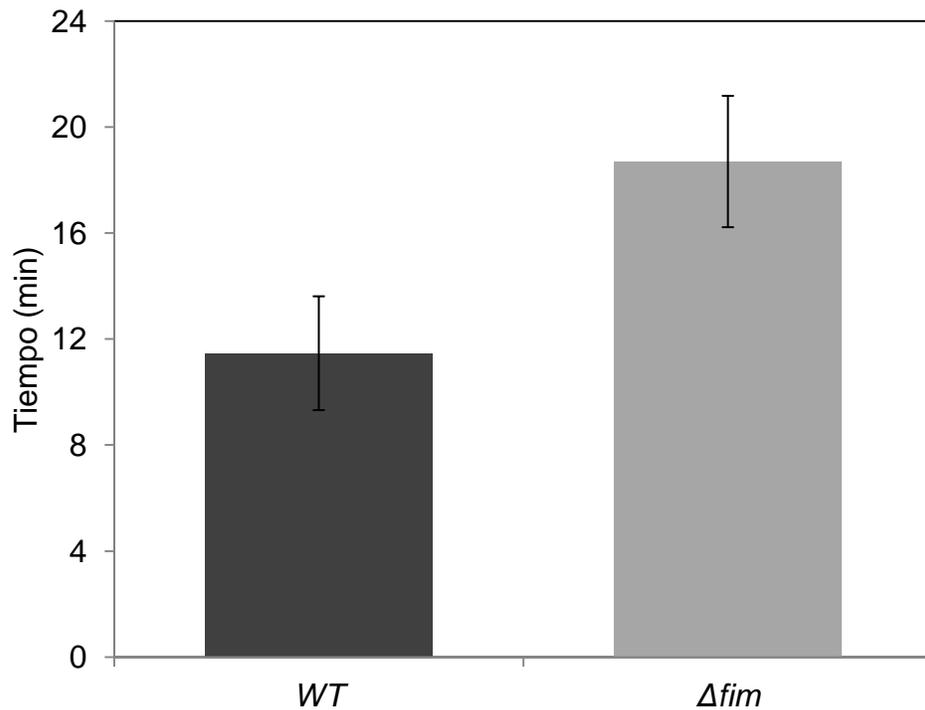


Figura 14.- Tiempo de septación de la cepa WT y de la mutante Δfim .

Fimbrina durante la germinación

Con el fin de establecer si la mutante Δfim mostraba defectos en la germinación y mantenimiento de la polaridad desde este estadio temprano de desarrollo, se siguió la germinación de conidias de la mutante Δfim y se comparó con la cepa WT. En las conidias de la mutante Δfim , se observó que después de

pasar 2 h en incubación, presentan un aumento de tamaño paulatino de tipo isotrópico, hasta formar el tubo germinativo, pero el tamaño que presentan es menor en comparación con las conidias de la cepa WT. Además, la mutante Δfim tiene un retraso en el tiempo de formación del tubo germinativo tardando el doble de tiempo que la cepa WT (Figura 15).

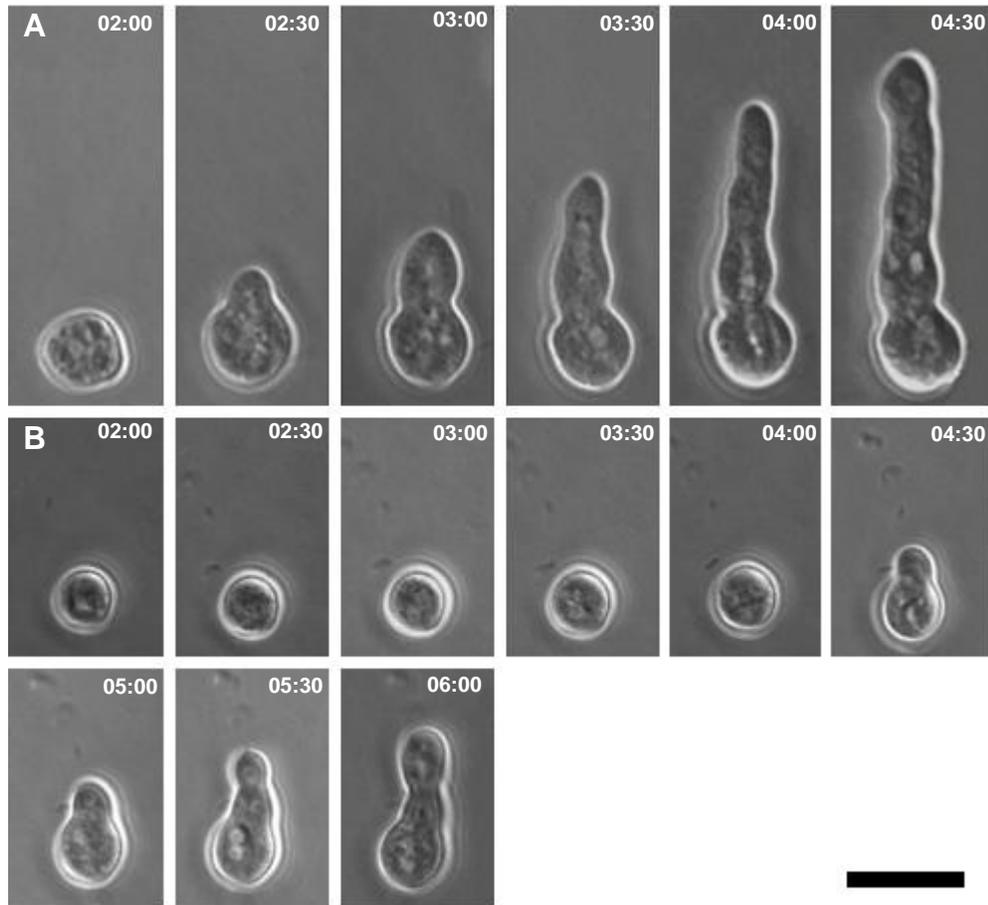


Figura 15.- Serie de tiempos de germinación de espóra. (A) Cepa WT (B) Mutante Δfim . Tiempos en h:min. Escala 10 μm .

Caracterización del Spk

Tras realizar una tinción de las hifas con FM4-64, a través de microscopia confocal, se logró observar estructuras membranosas de las hifas, tales como la membrana plasmática, el Spk, endosomas, núcleos, entre otras.

El Spk en la mutante Δfim se observó que es más pequeño y presenta una nube a su alrededor que se atenúa en zonas más alejadas al ápice de la hifa, lo que aparenta un Spk con una mayor desorganización, algo que no fue observado en la cepa WT la cual presentó un Spk de mayor tamaño y visualmente más compacto y robusto (Figura 16). Otro aspecto a señalar es que en la mutante Δfim el Spk estaba más desorganizado y desaparecía intermitentemente. Además de que la trayectoria seguida por el Spk no presentó un patrón uniforme, mostrando desviaciones de la dirección durante el crecimiento de las hifas, lo cual se vio reflejado en el perfil ondulado. En comparación, la cepa WT presentó un Spk más organizado situado en el ápice de la hifa, manteniendo su estructura durante el crecimiento de las hifas y siguiendo una trayectoria uniforme (Figura 17).

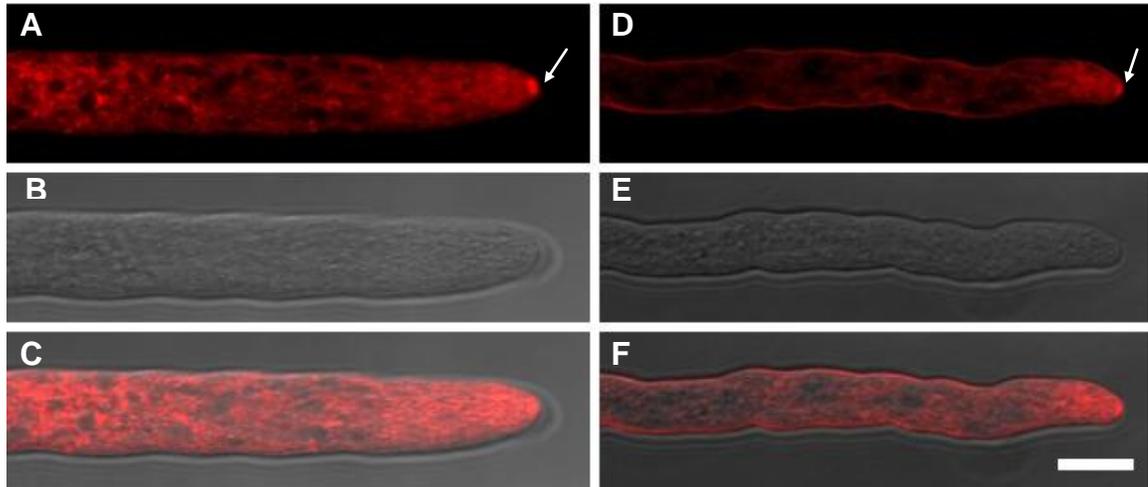


Figura 16.- Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Morfología y distribución del Spk en la cepa WT (A-C) y en la mutante Δfim (D-F). A y D muestran el canal fluorescente, B y E el canal de contraste de fases y C y F la combinación de los dos canales. Las flechas señalan el Spk. Escala= 10 μm .

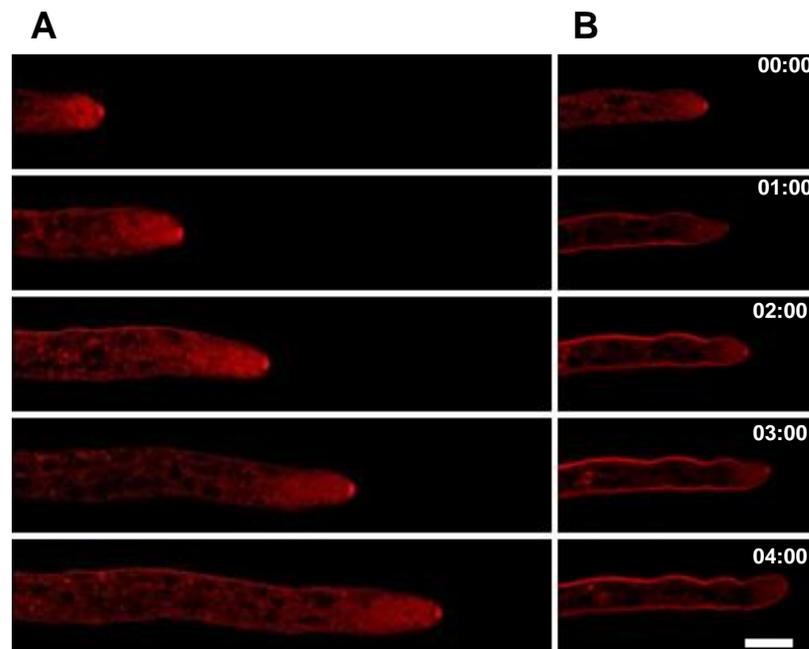


Figura 17.- Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Distribución y dinámica del Spk durante la elongación de las hifas de la cepa WT (A) y la mutante Δfim (B) tras 20 min de contacto con el marcador. Tiempos en min:seg. Escala= 10 μm .

Internalización del colorante lipofílico FM4-64

Para determinar si la delección de *fim* afecta la endocitosis en *N. crassa*, se realizó un análisis cuantitativo de la internalización del FM4-64 en hifas de la mutante Δfim y se comparó con la cepa WT. La mutante Δfim presentó una marcada disminución del rango de internalización del FM4-64 la cual obtuvo un promedio de intensidad de fluorescencia de 218.64 (Unidades arbitrarias) tras 10 min en contacto con el marcador. En cambio, la cepa WT obtuvo un promedio de intensidad de fluorescencia de 754.84 (Unidades arbitrarias), lo cual denota una reducción del 71% en la mutante Δfim (Figura 18).

Tras poner en contacto el FM4-64 con las hifas de la mutante Δfim su membrana plasmática rápidamente fue teñida al igual que con las hifas de la cepa WT. Al transcurrir 3 minutos desde el inicio del contacto del marcador con las hifas de la cepa WT el Spk pudo ser visualizado con facilidad manteniéndose a lo largo del transcurso del experimento. En cambio, en la mutante Δfim en ninguno de los 10 min de análisis de internalización del marcador se observó la presencia del Spk. Al transcurrir 2 min de experimentación la cepa WT presentó un 62% más de intensidad de fluorescencia que la mutante Δfim (Figura 19).

Para corroborar este resultado se realizó un perfil de intensidad de fluorescencia en hifas de las dos cepas, en cual se obtuvo que la mutante Δfim no presentó diferencias notorias en la intensidad de fluorescencia a lo largo de la distancia analizada. En cambio, la cepa WT muestra claramente un aumento de

la intensidad en la zona que corresponde al Spk y la zona del anillo endocítico subapical (Figura 20).

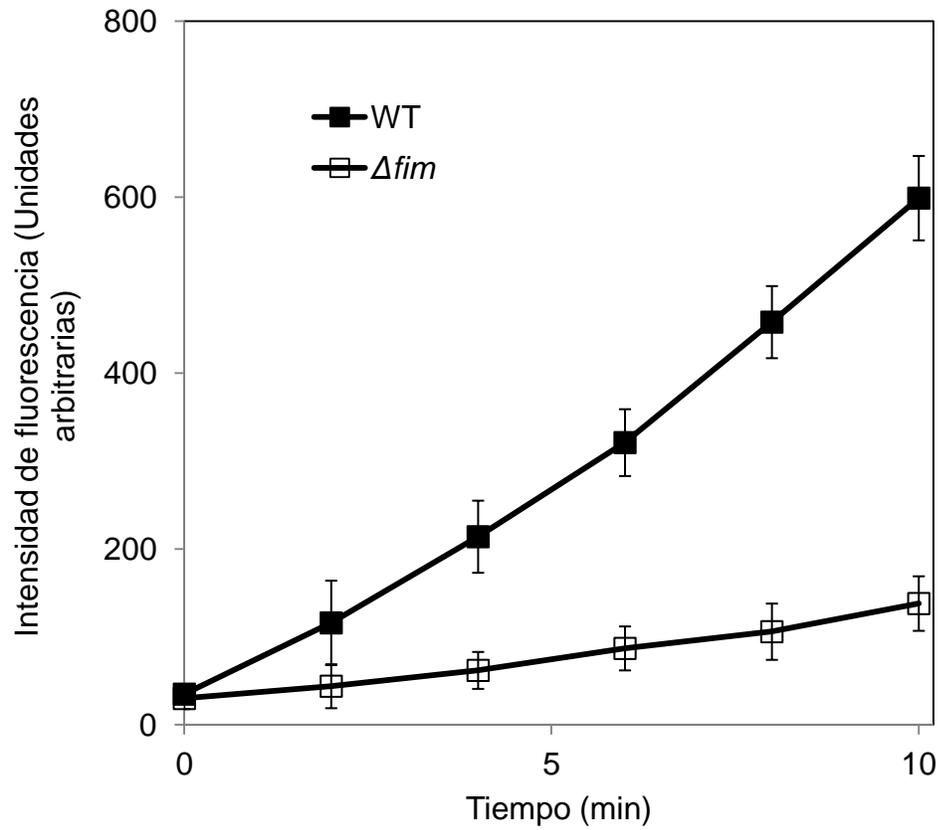


Figura 18.- Intensidad promedio de fluorescencia en la región citoplasmática subapical en la cepa WT y en la mutante Δfim .

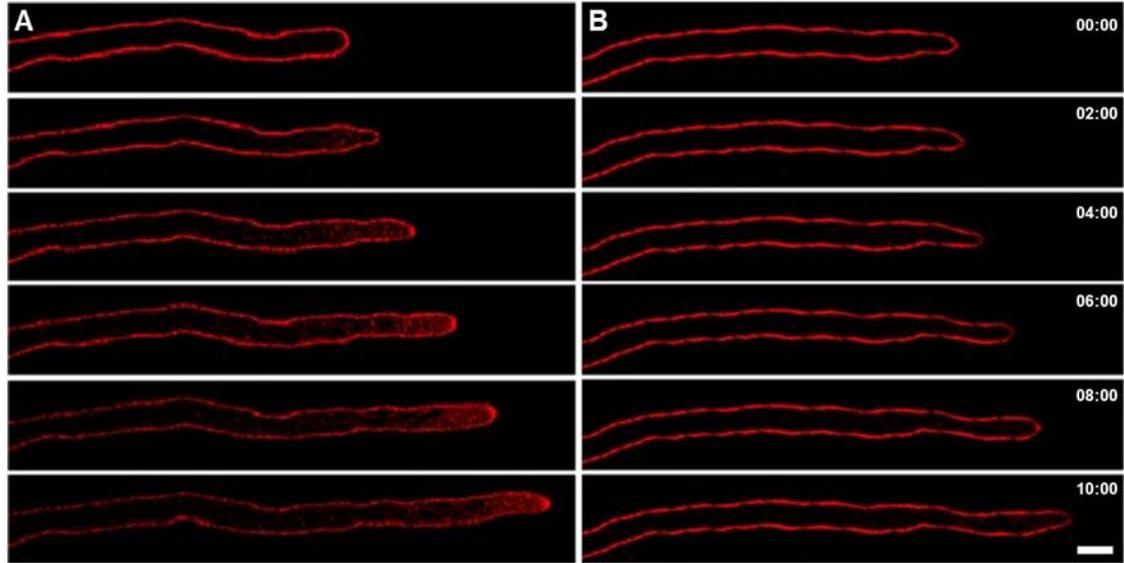


Figura 19.- Tinción con el marcador de membrana FM4-64. Serie de tiempo de crecimiento e internalización del FM4-64 en la cepa WT (A) y la mutante Δfim (B). Tiempos en min:seg. Escala= 10 μm .

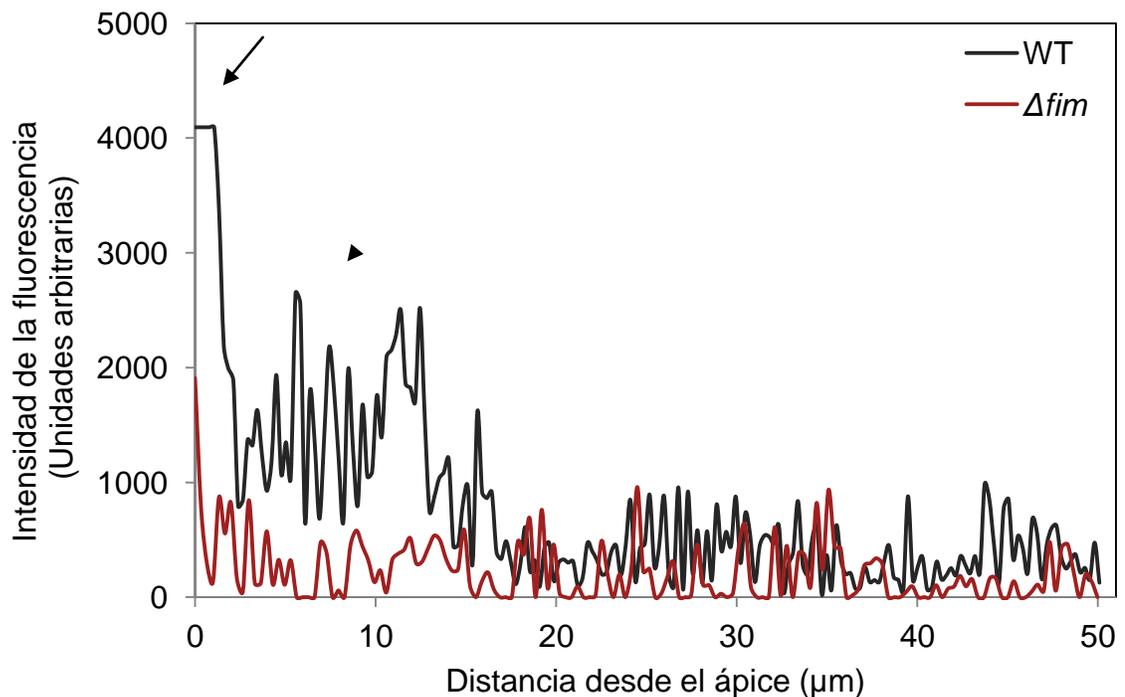


Figura 20.- Perfil de intensidad de fluorescencia a lo largo de 50 μm desde el ápice de la hifa de la cepa WT y de la mutante Δfim . La flecha señala la posición del Spk y la cabeza de flecha señala la posición del anillo endocítico subapical.

DISCUSIÓN

En hongos filamentosos se ha demostrado que el crecimiento polarizado es un proceso regulado por diversos mecanismos y componentes que trabajan en conjunto para la formación de membrana plasmática y la síntesis de la pared celular en el ápice de las hifas. Uno de los componentes más importantes dentro de este proceso es el citoesqueleto de actina, el cual es regulado por las ABPs para realizar sus funciones (Pollard, 1990; Stossel, 1993; Welch et al., 1997). A causa de que la evidencia experimental existente no ha demostrado el papel que desempeña la fimbrina, siendo esta una proteína asociada a la actina en procesos de endocitosis y septación (Toret et al., 2006; Delgado-Álvarez et al., 2010) y que se desconoce cuál es la importancia de la endocitosis en el crecimiento y morfogénesis de las hifas, se llevó a cabo este estudio en hongos filamentosos en una mutante por delección del gen *fim*.

Crecimiento y morfología

La mutante por delección del gen *fim* resultó estar fuertemente afectada en el crecimiento. Los resultados muestran que la colonia presenta una elongación radial significativamente menor, a pesar de presentar una tasa de ramificación parcialmente más alta, además de presentar hifas con un diámetro menor con una tendencia ondulatoria durante el crecimiento. Estas características concuerdan de igual manera a las observadas en la mutante del gen *fimA* en *A. nidulans*, correspondiendo al único estudio de la fimbrina en hongos

filamentosos (Upadhyay et al., 2008). Esta morfología aberrante sugiere que la morfogénesis de las hifas se ve afectada al no estar presente la fimbrina para proporcionar orden y estructura a los microfilamentos en los parches endocíticos. Diversos estudios han demostrado que la actina es responsable de una gran diversidad de procesos tales como la polaridad de las hifas y la endocitosis, además de darles soporte y estructura (Heath; 1990; Puius et al., 1998; Walther et al., 2003; Moseley et al., 2006; Walker et al., 2006; Blanchoin et al., 2013), lo cual sugiere que su afectación repercute en estos procesos.

Condición

Los análisis realizados en la mutante Δfim revelan que la producción de conidias se ve seriamente afectada, disminuyendo en un 70%, a pesar no haber realizado observaciones de los conidióforos. Es evidente en los ensayos de crecimiento de las colonias que la producción de hifas aéreas es mucho menor. Estos resultados son similares a los reportados en la mutante de *A. nidulans*, en donde demostraron que la producción de conidias se ve afectada, obteniendo un número significativamente menor de conidias por conidióforo. Además, en el mismo trabajo, se observaron a los conidióforos con una morfología atípica, y demostraron con marcaje por fluorescencia que la fimbrina presente en los conidióforos se encuentra en las zonas contiguas a la separación entre cada conidio (Upadhyay et al., 2008).

Formación de Septos

A causa de los estudios realizados en cepas de la fimbrina marcada, las cuales demostraron su presencia en los septos (Delgado-Álvarez et al., 2010), se optó por estudiar el efecto de la ausencia de esta proteína sobre los septos y la morfología de la pared celular. Los estudios aquí presentados muestran que el número de septos es mayor por unidad de distancia presentado además una distancia interseptal menor. Observaciones que fueron corroboradas al analizar el tiempo en el cual la cepa produce un septo, siendo ésta mayor a la de la cepa WT. Lo anterior sugiere que la falta de la fimbrina afecta la formación de los septos, teniendo una producción mayor de éstos. Además, la disposición a lo largo de las hifas presenta zonas con mayor intensidad de fluorescencia lo cual alude a que los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la síntesis de pared celular no están funcionando de manera correcta. A pesar de haber obtenido resultados similares a los encontrados en la mutante de *A. nidulans*; estos no son tan evidentes como los observados en este hongo, ya que claramente fue demostrado por medio de microscopía que la producción de pared celular se encuentra fuertemente afectada, presentando zonas con acumulaciones de pared celular anormales.

Germinación

Las observaciones realizadas en germínulas mostraron que los conidios son de menor tamaño, aunque presentan un crecimiento isotrópico similar al de la cepa WT la formación del tubo germinativo se inicia 4 h después de haber sido

incubada (WT tarda 2 h). Este retraso en la formación de un tubo germinativo también fue observado en la mutante de *A. nidulans* (Upadhyay et al., 2008), sin embargo esta mutante presentó una gran cantidad de tubos germinativos emergentes, además de un crecimiento isotrópico descontrolado. Características que no se observaron en la mutante de *N. crassa*, ya que a pesar de presentar un crecimiento isotrópico por mayor tiempo, el tamaño que alcanzaba el conidio era menor o similar al de la cepa WT previo a la formación del tubo germinativo, además de solo generar de 1 a 2 tubos germinativos por conidio, similar a la cepa WT.

Organización del Spk

El Spk es considerado la estructura que media la dirección de exocitosis de vesículas que contienen los componentes necesarios para la formación de pared celular, siendo de suma importancia para el crecimiento y morfogénesis de las hifas (Howard, 1981; Bartnicki-Garcia et al., 1989; Bartnicki-Garcia et al., 1995; López et al., 1996, Riquelme et al., 2014^a; 2014^b). Las observaciones realizadas en la cepa mutante de fimbrina muestran que el Spk presenta un menor tamaño. Este se encuentra más difuso y presenta una nube alargada de vesículas dispersas alrededor. Además presenta lapsos de tiempo cortos donde desaparece durante el crecimiento de la hifa. Comportamiento que repercute directamente sobre la morfología de las hifas teniendo un arreglo curvado en diversas zonas, lo cual sugiere que la ausencia de la fimbrina afecta la morfología del Spk y la correcta elongación de las hifas.

Endocitosis

Uno de los procesos que han sido estudiados en hongos como un componente importante para el crecimiento polarizado es la endocitosis. Diversos estudios, utilizando marcadores de membrana, han demostrado que los productos endocitados viajan hasta la zona del ápice de la hifa, donde aparentemente son reciclados (Harris, 2005; Peñalva, 2005). La actina, presente en parches en el anillo endocítico subapical junto con otras proteínas ABPs como la fimbrina, participan en el proceso de endocitosis (Toret, et al., 2006; Upadhyay et al., 2008; Shaw et al., 2011). La experimentación realizada en este trabajo demuestra que la ausencia de la fimbrina tiene un efecto negativo sobre la endocitosis, lo cual sugiere que los parches endocíticos, estructurados por la actina, no están realizando sus funciones eficientemente. Estas observaciones son similares a las reportadas en las mutantes de *A. nidulans* (Upadhyay et al., 2008), *A. gossypii* (Jorde et al., 2011) y en *S. cerevisiae* (Kübler et al., 1993), incluyendo el de la mutante de *cor1* en *N. crassa* la cual se localiza de igual manera en el anillo endocítico subapical (Echauri-Espinosa et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la evidencia que le da soporte al modelo de reciclamiento apical, el cual se basa en la idea de la presencia de un marcador de polaridad (hipotético, aún desconocido). Este marcador está anclado a la membrana y propicia un punto de polaridad de las hifas, el Spk dirige las vesículas hacia esta zona para que sean incorporadas a la membrana. Conforme se da la elongación de las hifas el marcador de

polaridad paulatinamente se aleja del ápice de la hifa por efecto de la adición de membrana. En este punto, los parches endocíticos se encargan de reciclar la membrana junto con el marcador y lo redirigen hacia el ápice para volver a ser incorporados en el ápice (Upadhyay et al., 2008; Shaw et al., 2011).

CONCLUSIONES

- La delección del gen *fim* en *N. crassa* no es letal pero afecta la morfogénesis y el crecimiento de las hifas.
- La formación de septos se ve afectada en ausencia de la fimbrina.
- La producción de conidias se ve disminuida en ausencia del gen de la fimbrina al igual que presentan un retraso en la germinación.
- La ausencia de la fimbrina afecta la distribución y morfología del Spk.
- La fimbrina es un componente importante en el proceso de endocitosis.

REFERENCIAS

- Adams, A., Botstein, D. y Drubin D. 1991. Requirement of Yeast Fimbrin for Actin Organization and Morphogenesis *In Vivo*. *Nature* 354: 404-408.
- Adams, A., Shen, W., Lin, C., Leavitt, J. y Matsudaira, P. 1995. Isoform-Specific Complementation of the Yeast *sac6* Null Mutation by Human Fimbrin. *Molecular and Cellular Biology* 15 (1): 69-75.
- Arai, R., Nakano, K. y Mabuchi, I. 1998. Subcellular Localization and Possible Function of Actin, Tropomyosin and Actin-related Protein 3 (Arp3) in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Cell Biology* 76: 288-295.
- Atkinson, H., Daniels, A. y Read, N. 2002. Live-cell Imaging of Endocytosis During Conidial Germination in the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 37 (3): 233-244.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F. y Gierz, G. 1989. Computer Simulation of Fungal Morphogenesis and the Mathematical Basis for Hyphal (tip) Growth. *Protoplasma* 153: 46-57.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D., Giers, G., Lopez, F. y Bracker, E. 1995. Evidence that Spitzenkörper Behavior Determines the Shape of a Fungal Hypha: A Test of the Hiphoid Model. *Experimental Micology* 19: 153-159.

- Bartnicki-Garcia, S. 2002. Hyphal Tip Growth: Outstanding Question. *Molecular Biology of Fungal Development*. Markel Dekker. New York. 29-58 pp.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J., Tilsner, J. y Read, N. 2010. F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 9 (4): 547-557.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. y Plastino, J. 2013. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews* 94 (1): 235-263.
- Bretscher, A., y Weber, K. 1980. Fimbrin, a New Microfilament-associated Protein Present in Microvilli and Other Cell Surface Structures. *The Journal of Cell Biology* 86: 335-340.
- Bretscher, A. 1981. Fimbrin is a Cytoskeletal Protein that Crosslinks F-actin *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (11): 6849-6853.
- Bretscher, A. 2003. Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast: The Tracks, Motors, and Receptors. *The Journal of Cell Biology* 160 (6): 811-816.
- Brower, S., Honts, J. y Adams, A. 1995. Genetic Analysis of the Fimbrin-actin Binding Interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 140 (1): 91-101.
- Brunswik, H. 1924. Untersuchungen tiber Geschlechts und Kernverhfiltnisse bei der Hymenomyzetengattung Coprinus. *Botanische Abhandlung*. Goebel, K, Fischer, Jena, Germany. 1-152 pp.

- Cheng, D., Marner, J. y Rubenstein, P. 1999. Interaction *In Vivo* and *In Vitro* between the Yeast Fimbrin, SAC6P, and a Polymerization-defective Yeast Actin (V266G and L267G). *The Journal of Biological Chemistry* 274 (50): 35873-35880.
- Delgado-Álvarez, D., Callejas, O., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R., Smith, L. y Mouriño, R. 2010. Visualization of F-actin Localization and Dynamics with Live Cell Markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 573-586.
- Desai, A. y Mitchison, T. (1997). Microtubule Polymerization Dynamics. *Cell and Developmental Biology* 13: 83-117.
- Dos remedios, C., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I., Tsubakihara, M., Berry, D. y Nosworthy, N. 2003. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiology Review* 83: 433-473.
- Drubin, D., Miller, K. y Botstein, D. 1988. Yeast Actin-binding Proteins: Evidence for a Role in Morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 84: 335-344.
- Drubin, D. y Nelson, W. 1996. Origins of Cell Polarity. *Cell* 84: 335-344.
- Echauri-Espinosa, R., Callejas-Negrete, O., Roberson, R., Bartnicki-Garcia, S. y Mouriño-Pérez, R. 2012. Coronin Is a Component of the Endocytic Collar of Hyphae of *Neurospora crassa* and Is Necessary for Normal Growth and Morphogenesis. *Plos One* 7 (5): 1-13.

Feijó, J., Costa, S., Prado, A., Becker, J. y Certal, A. 2004. Signalling by Tips. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 589-598.

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

Girbardt, M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polysticus versicolor*. *Planta* 50: 47-59.

Greenberg, M., Wang, C., Lehman, W. y Moore, R. 2008. Modulation of Actin Mechanics by Caldesmon and Tropomyosin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65 (2): 156-164.

- Harris, D., Read, D., Roberson, W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. y Momany, M. 2005. Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics and Genomic Converge. *Eukaryotic Cell* 4 (2): 225-229.
- Harris, K. y Tepass, U. 2010. Cdc42 and Vesicle Trafficking in Polarized Cells. *Traffic* 11: 1272-1279.
- Heath, B. 1990. The Roles of Actin in Tip Growth of Fungi. *International Review of Cytology* 13: 95-127.
- Hickey, P., Swift, S., Roca, M. y Read, N. 2004. Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. *Methods in microbiology* 34: 63-87.
- Höfer, D., Ness, W. y Drenckhahn, D. 1997. Sorting of Actin Isoforms in Chicken Auditory Hair Cells. *Journal of Cell Science* 110: 765-770
- Hohmann-Marriott, M., Uchida, M., van de Meene, A., Garret, M., Hjelm, B., Kokoori, S., Roberson, R. 2006. Application of Electron Tomography to Fungal Ultrastructure Studies. *New Phytologist* 172: 208-220.
- Horio, T. y Oakley, B. 2005. The Role of Microtubules in Rapid Hyphal Tip Growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* 16: 918-926.
- Howard, R. 1981. Ultrastructural Analysis of Hyphal Tip Cell Growth in Fungi: Spitzenkörper, Cytoskeleton and Endomembranes after Freeze-substitution. *Journal of Cell Science* 48: 89-103.

- Humphries, C., Balcer, H., D'Agostino J., Winsor, B., Drubin, D., Barnes, G., Andrews, B., Goode, B. 2002. Direct Regulation of Arp2/3 Complex Activity and Function by the Actin Binding Protein Coronin. *The Journal of Cell Biology* 159 (6): 993-1004.
- Ischebeck, T., Seiler, S. y Heilmann, I. 2004. At the Poles Across Kingdoms: Phosphoinositides and Polar Tip Growth. *Protoplasma* 240:13-31.
- Jorde, S., Walther, A. y Wendland, J. 2011. The *Ashbya gossypii* fimbrin SAC6 is Required for Fast Polarized Hyphal Tip Growth and Endocytosis. *Microbiological Research* 166: 137-145
- Karp, G. 2009. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, U.S. 318-379 pp.
- Karpova, T., Tatchell, K. y Cooper, J. 1995. Actin Filaments in Yeast Are Unstable in the Absence of Capping Protein or Fimbrin. *The Journal of Cell Biology* 131 (6):1483-1493.
- Klein, M., Shi, W., Ramagopal, U., Tseng, Y., Wirtz, D., Kovar, D., Staiger, C. y Almo, S. 2004. Structure of the Actin Crosslinking Core of Fimbrin. *Structure* 12: 999-1013.
- Kübler, E. y Riezman, H. 1993. Actin and Fimbrin are Required for the Internalization Step of Endocytosis in Yeast. *The EMBO Journal* 12 (7): 2855-2862.

- Lopez-Franco, R. y Bracker, E. 1996. Diversity and Dynamics of the Spitzenkörper in Growing Hyphal Tips of Higher Fungi. *Protoplasma* 195: 90-111.
- McDaniel, D. y Roberson, R. 1998. γ -Tubulin is a Component of the Spitzenkörper and Centrosomes in Hyphal-tip Cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 203: 118-123.
- McDaniel, D. y Roberson, R. 2000. 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.
- Moseley, J. y Goode, B. 2006. The Yeast Actin Cytoskeleton: From Cellular Function to Biochemical Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (3): 605-645.
- Mouriño-Pérez, R. Roberson, R. y Bartnicki-Garcia, S. 2006. Microtubule Dynamics and Organization During Hyphal Growth and Branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 389-400.
- Nakano, K., Satoh, K., Morimatsu, A., Ohnuma, M. y Mabuchi, I. 2001. Interactions among a Fimbrin, a Capping Protein, and an Actin-depolymerizing Factor in Organization of the Fission Yeast Actin Cytoskeleton *Molecular Biology of the Cell* 12: 3515-3526.
- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I. y Sakai, H. 1987. Cofilin is a Component of Intranuclear and Cytoplasmic Actin Rods Induced

- in Cultured Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (15): 5262–5266.
- Oakley, B., Oakley, C., Yoon, Y. y Jung, M. 1990. γ -Tubulin Is a Component of the Spindle Pole Body That Is Essential for Microtubule Function in *Aspergillus nidulans*. Cell 61: 1269-1301.
- Palanivelu, R. y Preuss, D. 2000. Pollen Tube Targeting and Axon Guidance: Parallels in Tip Growth Mechanisms. Trends in Cell Biology 10 (12): 517-524.
- Peñalva, M. 2005. Tracing the Endocytic Pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. Fungal Genetics and Biology 42: 963-975.
- Plamann, M., Minke, P., Tinsley, J. y Bruno, K. 1994. Cytoplasmic Dynein and Actin-related Protein Arp1 are Required for Normal Nuclear Distribution in Filamentous Fungi. The Journal of Cell Biology 127 (1): 139-149.
- Pollard, T. 1990. Actin. Current Opinion in Cell Biology 2: 33-40.
- Pruyne, D. y Bretscher, A. 2000. Polarization of Cell Growth in Yeast II. The Role of the Cortical Actin Cytoskeleton. Journal of Cell Science 113: 571-585.
- Puius, Y., Mahoney, N. y Almo, S. 1998. The Modular Structure of Actin-Regulatory Proteins. Current Opinion in Cell Biology 10: 23-34.
- Ramírez-del Villar. 2014. Tesis de maestría. Caracterización de la miosina de clase V del hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Centro de Investigación

Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 62 p.

Riquelme, M., Reynaga-Peña, C., Gierz, G. y Bartnicki-Garcia, S. 1998. What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genetics and Biology* 24: 101-109.

Riquelme, M., Gierz, G. y Bartnicki-Garcia, S. 2000. Dynein and Dynactin Deficiencies Affect the Formation and Function of the Spitzenkörper and Distort Hyphal Morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 146: 1743-1752.

Riquelme, M., Robert W. Roberson, R., McDaniel, D. y Bartnicki-Garcia, S. 2002. The Effects of *ropy-1* Mutation on Cytoplasmic Organization and Intracellular Motility in Mature Hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 37: 171-179

Riquelme, M., Yarden, O., Barnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R., Mouriño-Pérez, R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R., Sanchez-Leon, E., Seiler, S. y Watters, M. 2011. Architecture and Development of the *Neurospora crassa* Hyphae a Model Cell for Polarized Growth. *Fungal Biology* 115: 446-474.

Riquelme, M., Bredeweg, E., Callejas-Negrete, O., Roberson, R., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P. y Freitag, M. 2014. The *Neurospora*

crassa Exocyst Complex Tethers Spitzenkörper Vesicles to the Apical Plasma Membrane During Polarized Growth. *Molecular Biology of the Cell* 25: 1312-1326.

Riquelme, M. y Sánchez-León, E. 2014. The Spitzenkörper: A Choreographer of Fungal Growth and Morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 20: 27-33.

Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R., Bartnicki-Garcia, S. y Riquelme, M. 2011. Traffic of Chitin Synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and Developing Septa in Hyphae of *Neurospora crassa*: Actin Dependence and Evidence of Distinct Microvesicle Populations. *Eukaryotic Cell* 10 (5): 683-695.

Sánchez-León, E., Bowman, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P. y Riquelme, M. 2015. The Rab GTPase YPT-1 Associates with Golgi Cisternae and Spitzenkörper Microvesicles in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 95 (3): 472-490.

Sandrock, T., Brower, S., Toenjes, K. y Adams, A. 1999. Suppressor Analysis of Fimbrin (Sac6p) Overexpression in Yeast. *Genetics* 151: 1287-1297.

Seidel, C., Moreno-Velásquez, S., Riquelme, M. y Fischer, R. 2015. *Neurospora crassa* NKIN2, a Kinesin-3 Motor, Transports Early Endosomes and Is Required for Polarized Growth. *Eukaryotic Cell* 12 (7): 1020-1032.

- Seiler, S., Plamann, S. y Schliwa, M. 1999. Kinesin and Dynein Mutants Provide Novel Insights Into the Roles of Vesicle Traffic During Cell Morphogenesis in *Neurospora*. *Current Biology* 9:779-785.
- Shaw, B., Chung, D., Wang, C., Quintanilla, L. y Upadhyay, S. 2011. A Role for Endocytic Recycling in Hyphal Growth. *Fungal Biology* 115: 541-546.
- Sheahan, M., Staiger, C., Rose, R. y McCurdy, D. 2004. A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin-Binding Domain 2 of Arabidopsis Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cells. *Plant Physiology* 136: 3968-3978.
- Shinomiya, H. 2012. Plastin Family of Actin-Bundling Proteins: Its Functions in Leukocytes, Neurons, Intestines, and Cancer. *International Journal of Cell Biology* doi:10.1155/2012/213492.
- Skau, C., Courson, D., Bestul, A., Winkelman, J., Rock, R., Sirotkin, V. y Kovar, D. 2011. Actin Filament Bundling by Fimbrin Is Important for Endocytosis, Cytokinesis, and Polarization in Fission Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 286: 26964-26977.
- Staiger, C., Goodbody, K., Hussey, P., Valenta, R., Drøbak, B. y Lloyd, C. 1993. The Profilin Multigene Family of Maize: Differential Expression of Three Isoforms. *The Plant Journal* 4 (4): 631-641.

- Steinberg, G. y Schliwa, M. 1993. Organelle Movements in the Wild Type and Wall-less fz;sg;os-1 Mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *Journal of Cell Science* 106: 555-564.
- Stossel. 1993. On the Crawling of Animal Cells. *Science* 260 (5111): 1086-1094.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. y Oakley, B. 2012. The Functions of Myosin II and Myosin V Homologs in Tip Growth and Septation in *Aspergillus nidulans*. *Plos One* 7 (2): doi:10.1371/journal.pone.0031218
- Takehita, N., Manck, R., Grün, N., Herrero de Vega, S. y Fischer, R. 2014. Interdependence of the Actin and the Microtubule Cytoskeleton During Fungal Growth. *Current Opinion in Microbiology* 20: 34-41.
- Toret, C. y Drubin, D. 2006. The Budding Yeast Endocytic Pathway. *Journal of Cell Science* 119: 4585-4587.
- Torralba, G., Raudaskoski, A. y Laborda, F. 1998. Effect of Cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 144: 45-53.
- Trinci, A. 1969. A Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi. *Journal of General Microbiology* 57: 11-24.
- Upadhyay, S. y Shaw, B. 2008. The Role of Actin, Fimbrin and Endocytosis in Growth of Hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 68(3): 690-705.

- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. y Fischer, R. 2005. Role of the Spindle-pole-Body Protein ApsB and the Cortex Protein ApsA in Microtubule Organization and Nuclear Migration in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science* 118: 3705-3716.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S. y Riquelme, M. 2009. Functional Stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 74(5): 1044-1053 .
- Virag, A. y Harris, S. 2006. The Spitzenkörper: A Molecular Perspective. *Mycological Research* 110: 4-13.
- Volkman, N., DeRosier, D., Matsudaira, P. y Hanein, D. 2001. An Atomic Model of Actin Filaments Cross-linked by Fimbrin and Its Implications for Bundle Assembly and Function. *The Journal of Cell Biology* 153 (5): 947-956.
- Walker, S y Garrill, A. 2006. Actin Microfilaments in Fungi. *Mycologist* 20: 26-31.
- Walther, A. y Wendland, J. 2003. Septation and Cytokinesis in Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 40: 187-196.
- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S. y Kirschner, M. 1975. A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858-1862.
- Welch, M., Mallavarapuf, A., Rosenblattf, J. y Mitchison, T. 1997. Actin Dynamics *In Vivo*. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 54-61.

Wu, J., Bähler, J., y Pringle, J. 2001. Roles of a Fimbrin and an α -Actinin-like Protein in Fission Yeast Cell Polarization and Cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* 12: 1061-1077.

Xiang, X., Beckwith, S. y Morris, R. 1994. Cytoplasmic Dynein is Involved in Nuclear Migration in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 2100-2104.

Zekert, N. y Fischer, R. The *Aspergillus nidulans* Kinesin-3 UncA Motor Moves Vesicles Along a Subpopulation of Microtubules. *Molecular Biology of the Cell* 20: 673-684.

APÉNDICE

Medios de cultivo y soluciones

Medio Sintético de Cruzas (100 ml)

KNO ₃	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.07 g
KH ₂ PO ₄	0.05 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
NaCl	0.01 g
CaCl ₂	0.01 g
Solución de elementos traza	10 µl
Solución de biotina	10 µl
Agar	20 g

Aforar con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Solución de elementos traza (100 ml)

Disolver en 75 ml de agua destilada las siguientes sustancias:

Ácido cítrico · H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25 g
H ₃ BO ₃ anhidro	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.05 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.35 g

Aforar con agua destilada.

Almacenar a 4° C.

Solución de biotina 0.1 M (10 ml)

Biotina	0.25 g
---------	--------

Aforar con agua destilada.

Almacenar a -20°C.

Medio Mínimo de Vogel agar 1.5% (1 l)

Sacarosa	15 g
----------	------

Sales de Vogel	20 ml
----------------	-------

Agar	15 g
------	------

Aforar con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Medio Mínimo de Vogel agar 1.5% + higromicina

MMV	1 ml
-----	------

Higromicina 25 mg/ml	3 µl
----------------------	------

Medio Mínimo de Vogel líquido (1 l)

Sacarosa	15 g
----------	------

Sales de Vogel	20 ml
----------------	-------

Aforar con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Sales de Vogel 50x (1 l)

En 600 ml de agua destilada disolver en orden las siguientes sustancias:

Citrato de sodio	117.5 g
KH ₂ PO ₄	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO · 7H ₂ O	10 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución de biotina	100 ml

Aforar con agua destilada.

Agregar 10 ml de cloroformo como conservador.

Almacenar a temperatura ambiente.

Sorbitol 1 M (1 l)

Sorbitol	182.17 g
----------	----------

Aforar con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Gel electroforesis (100 ml)

Agarosa	1 g
BrEt	5 µl

Aforar con TAE 1x

Calcofluor 1 mM (1 ml)

Calcofluor	1 mg
Agua destilada	1 ml

Solofenil flavin (0.1%)

Solofenil flavin	1 mg
Agua destilada HPLC	1 ml

FM4-64 5 μ M (1 ml)

FM4-64 1.6 mM	3.4 μ l
Agua destilada HPLC	996.6 μ l