

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**LOCALIZACIÓN DE LA γ -TUBULINA EN EL
HONGO FILAMENTOSO *Neurospora crassa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ROSA MARÍA RAMÍREZ COTA

Ensenada, Baja California

septiembre del 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**LOCALIZACIÓN DE LA γ -TUBULINA EN EL HONGO
FILAMENTOSO *Neurospora crassa***

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

QUE PRESENTA

ROSA MARÍA RAMÍREZ COTA

Aprobado por:

DRA. ROSA REINA MOURIÑO PÉREZ
DIRECTORA DE TESIS

DR. JOSÉ L. STEPHANO HORNEADO
SECRETARIO

M.C. MIGUEL H. CARRILLO MENDÍVIL
PRIMER VOCAL

Esenada, Baja California

septiembre del 2008

Agradecimientos

A la **Facultad de Ciencias de la UABC** por formarme como profesionista y por brindarme un ambiente idóneo de comunicación con maestros, técnicos y administrativos. En especial gracias a los grandes maestros que con sus brillantes enseñanzas me inspiraron a continuar en esta carrera.

Al maestro **José Luis Stephano Hornedo** por su dedicación en la formación de profesionistas. Por creer siempre en sus alumnos, por confiarnos el equipo, pero sobre todo por enseñarnos a crear.

Al maestro **Miguel Humberto Carrillo Mendivil** por su disponibilidad y por el apoyo brindado.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** por abrirme las puertas y permitirme continuar en el camino del aprendizaje.

Al **Departamento de Microbiología** y al cuerpo académico que lo conforma por la calidez y profesionalismo que los caracteriza.

A la **Dra. Rosa Mouriño Pérez** por su paciencia, dedicación, trabajo y apoyo tanto en el ámbito profesional como en el personal.

Al **Dr. Salomón Bartnicki García** porque sin su visión la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Al **Dr. Robert W. Roberson** por sus valiosas aportaciones.

A mis amigos por acompañarme en los momentos difíciles y por alentarme a seguir adelante. A **Michelle, Caro, Edna y Cristina** por todas las aventuras que vivimos juntas, por compartir conmigo penas y alegrías; A **Olga, Ariana, Aurora, Diego y Ramón** por su amistad y confianza. A todos los compañeros del laboratorio con los que he pasado momentos muy agradables; A **Kathy, Zayra, Mely y Magali**, porque a pesar del tiempo seguimos juntas, gracias por su paciencia y por quererme como soy; A **Carmen y Marina** por el cariño que siempre me han mostrado y por hacerme sentir parte de la familia. A **Julio** por ser mi amigo, mi consejero, pero sobre todo por ser mi gran amor.

A mi familia por creer en mí. A mi **Abuela** por sus dulces consejos; **Magali** por ser más que una amiga una hermana; **Rocío** por ser una hermana dulce, alegre, y una madre admirable; A mis sobrinos **David** y **Julián** que son la luz de mi vida. A mi hermana **Gisela** por su valentía, coraje, perseverancia y vulnerabilidad. Por ultimo y principalmente a **mi madre** por su gran amor y paciencia, por su sacrificio y entrega, por inspirarme a seguir adelante, por estar siempre conmigo y por su amor único.

Dedicatoria

A los amores de mi vida

Abstract

γ -tubulin is known as the major microtubule (Mt) nucleator. This protein is associated with the gamma ring proteins (GRIPs) forming a cap in the Mts minus end. In fungal cells, γ -tubulin has been shown associated to the spindle pole bodies (SPB), nevertheless in *Allomyces macrogynus* this protein was found accumulated also in the Spitzenkörper (Spk). In order to determine the localization of γ -tubulin, the protein was tagged with the green fluorescent protein (GFP). By laser scanning confocal microscopy (LSCM) we observed that γ -tubulin is mainly accumulated in the spindle pole bodies. Almost all nuclei showed one SPB, although in basal regions, were nuclei under go to mitosis some of them exhibited two bright fluorescent spots. Free γ -tubulin was also observed in the cytoplasm. The γ -tubulin is associated to the nuclear SPB and contrary to our expectation we found that γ -tubulin is not localized in the Spk in *N. crassa*, as has been described in *Allomyces macrogynus* Spk.

Key words: *Neurospora crassa*, *Allomyces macrogynus*, γ -tubulina, microtubule, spindle pole bodies, Spitzenkörper.

Tabla de contenidos

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1 Citoesqueleto	4
2.2 Microtúbulos	4
2.3 Polimerización de Microtúbulos	6
2.4 γ -tubulina	8
2.5 Localización celular de la γ -tubulina y los MTOCs	11
3. Problema	13
4. Objetivos	13
5. Materiales y Métodos	
6.1 Diseño experimental	14
6.2 Organismos y medios de cultivo	14
6.3 Oligonucleótidos	15
6.4 Plásmidos	16
6.5 Construcción del plásmido pRM01RR	17
6.5.1 Extracción de DNA de <i>Neurospora crassa</i>	17
6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen <i>tbg</i>	17
6.5.3 Ligación del plásmido pMF272 y el gen <i>tbg</i>	18
6.5.4 Transformación de células competentes	20
6.5.5 Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina	21
6.5.6 Corroboración de la ligación pMF272 + <i>tbg</i>	22
6.6 Construcción de la cepa <i>N. crassa tbg mat A (TRM01RR)</i>	23
6.6.1 Transformación de <i>N. crassa</i>	23
6.6.2 Cruzas de <i>N. crassa</i>	24
6.7 Tratamiento con Benomilo	25
6.8 Tinción con FM4-64	25
6.9 Marcaje con brefeldina A conjugado con BODIPY® 558/568	25
6.10 Fusión de cepas de <i>N. crassa</i>	26
6.11 Microscopía confocal	26

7. Resultados

7.1	Construcción del plásmido pRM01RR	28
7.2	Localización de la γ -tubulina en <i>N. crassa</i>	31
7.3	Co-localización de γ -tubulina en la corteza celular y septos	34
7.4	Asociación de la γ -tubulina con el retículo endoplasmático	34
7.5	Dinámica de la γ -tubulina durante la interfase y mitosis	37
7.6	Integridad del citoesqueleto microtúbular y la distribución de la γ -tubulina	42
8. Discusión		43
9. Conclusiones		47
10. Referencias		48
11. Apéndices		61

Lista de figuras

Figura	Página
1 Conformación del microtúbulo. El microtúbulo es una estructura tubular con 24 nm de diámetro, compuesta por 9-16 protofilamentos, formados de heterodímeros de α y β -tubulina (Adaptado de Lodish, 2001).	5
2 Mecanismos propuestos para la nucleación de los Mts. (a) El modelo del templete propone que las moléculas de γ -tubulina están asociadas lateralmente formando un complejo en forma de anillo (γ -TuRC), y los heterodímeros de α/β -tubulina se unen longitudinalmente a este complejo para iniciar la polimerización de los Mts. (b) En el modelo del protofilamento los heterodímeros de α/β -tubulina se unen lateral y longitudinalmente al γ -TuRC hasta polimerizar el microtúbulo. (Imagen adaptada de Raynaud-Messina y Merdes, 2007).	7
3 Comparación de las secuencias de la γ -tubulina de organismos eucariotas representativos de diferentes reinos. Imagen tomada de Oakley y Akkari, 1999.	9
4 Representación esquemática del complejo pequeño de la γ -tubulina (γ -TuSC) y el complejo en anillo de la γ -tubulina (γ -TuRC). El γ -TuSC está formado por dos moléculas de γ -tubulina, asociadas con una molécula GCP2 y una GCP3 (Proteínas del Complejo de la γ -tubulina). El γ -TuRC está conformado por múltiples copias de la γ -tubulina asociada a las GCP2, GCP3, GCP4, GCP5 y GCP6. Este complejo tiene una estructura en anillo con un diámetro de 25 nm. Recientemente se han descrito nuevos componentes del γ -TuRC llamada Dgp71WD en <i>Drosophila</i> , o GCP-WD o NEDD1 en mamíferos (Imagen adaptada de Raynaud-Messina y Merdes, 2007).	11
5 Mapa del plásmido pMF272. El plásmido se caracteriza por la presencia del gen <i>sgfp</i> (5013-5732), cuya expresión está regulada por el promotor de <i>N. crassa ccg-1</i> (4060-4979). Las secuencias 5' his-3 (6350-8460) y 3' his-3 (4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen his-3 de <i>N. crassa</i> . El gen β -lactamasa (468-1328) confiere resistencia a ampicilina a las células de <i>E. coli</i> que lo contienen.	19
6 Método del bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un fragmento del agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos.	27
7 Construcción del plásmido pRM01RR. (a) Electroforesis del gen <i>tbg</i> amplificado por PCR, (b) electroforesis del pMF272 (8,479 pb) y del gen <i>tbg</i> (1,601 pb) digeridos con Xba I y Pac I para su posterior ligación. Gel de agarosa al 1%, λ H/E = marcador de peso molecular.	29

- 8 Corroboración de la construcción del pRM01RR. (a) PCR de 29
colonias transformantes de *E. coli*, las colonias 6-10 son
positivas para el *tbg*, (b) digestión con Not I de las colonias 6-
10, y del pMF272, (c) digestión enzimática con Xba I y Pac I
del DNA plasmídico de la colonia # 8, se obtienen 2 fragmentos
uno de 1,601 pb correspondiente al gen *tbg* y otro de 8,479
correspondiente al plásmido pMF272. Gel de agarosa al 1%, λ
H/E = marcador de peso molecular.
- 9 Comparación de la secuencia nucleotídica del gen *tbg* 30
contenido en el pRM01RR con la secuencia del gen *tbg*
(NCU03954). La secuencia del gen *tbg* del pRM01RR conserva
el codón de inicio ATG, no contiene el primer intron ni el codón
de paro, el resto de la secuencia esta conservada. La
secuenciación de *tbg* contenido en el pRM01RR fue realizada
por Eton Bioscience. La comparación de las secuencias se
realizó utilizando el programa ApE, A plasmid Editor versión
1.11.0.0. (Copyright © 2003-2007, M. Wayne Davis).
- 10 Mapa del plásmido pRM01RR. El plásmido se caracteriza por la 30
presencia del gen *tbg* seguido por la *gfp* (4987-7333), cuya
expresión está regulada por el promotor de *N. crassa* *cgg-1*
(4060-4979). Las secuencias 5' his-3 (10061-7951) y 3' his-3
(4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen his-
3 de *N. crassa*. El gen β -lactamasa (468-1328) confiere
resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* que lo
contienen.
- 11 Imagen de 2D de una conidia de la XRM01RR que muestra la 31
distribución de γ -tubulina asociada a los núcleos. (a) Canal de
fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición
de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μ m. Escala= 5 μ m.
- 12 Imagen en 2D de una germínula con 6 horas de crecimiento de 32
la cepa XRM01RR. Los puntos brillantes de γ -tubulina se
distribuyen desde la esfera germinal hasta una zona muy
cercana al ápice. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de
contraste de fases y (c) Composición de (a) y (b). Escala= 10
 μ m.
- 13 Reconstrucción en 2D de una hifa de la cepa XRM01RR. La γ - 33
tubulina está distribuida a lo largo de la hifa asociada a los
núcleos. (a, d y f) canal de fluorescencia, γ -tubulina en verde y
FM4-64 en rojo. (b y e) canal de contraste de fases. El
asterisco señala al Spk y las flechas señalan a los septos.
Escala= 5 μ m.
- 14 Distribución de la γ -tubulina-sGFP en diferentes regiones de 35
hifas maduras en relación a la formación de septos, (a) y (e)
muestran la γ -tubulina-sGFP, (b) y (f) tinción de membranas
con FM4-64, (c) composición de (a) y (b), (g) composición de
(e) y (f), y (d) y (h) imágenes por contraste de fases. Las

- flechas señalan los septos y las cabezas de flecha al Spk. El tiempo esta en min s^{-1} . Escala = 20 μm .
- 15 Asociación de la γ -tubulina al Retículo Endoplasmático (R. E.). 36
 La γ -tubulina se localiza en la región citoplásmica del núcleo anclada fuera del R. E. (a) imagen del la γ -tubulina-sGFP. (b) R. E. marcado con bodipy (c) composición de a y b, la γ -tubulina en verde y el R. E. en rojo. La cabezas de flecha señala al R. E. (d) imagen en contraste de fases. Escala=5 μm .
 - 16 Germínula de la fusión vegetativa de la cepa XRM01RR con la 37
 cepa con la dRFP-H1. (a) canal de fluorescencia para la γ -tubulina-sGFP, (b) canal de fluorescencia para dRFP-H1 y (c) Composición de (a) y (b). Escala = 5 μm .
 - 17 Hifa madura con la fusión vegetativa de la cepa con los núcleos 38
 marcados con H1::dRFP y otra con la γ -tubulina::sGFP. (a) distribución de la γ -tubulina::GFP. (b) núcleos marcados con H1::dRFP, (c) composición de (a) y (b), (d) imagen en contraste de γ -tubulina::GFP y H1::dRFP. Las flechas señalan los núcleos con movimiento anterógrado y las cabezas de flechas a los núcleos con movimiento retrógrado. Escala= 5 μm .
 - 18 Serie de tiempo de una hifa madura con la fusión vegetativa de 39
 la hifa con los núcleos marcados con dRFP-H1 y otra con la γ -tubulina-sGFP. (a, c y e) distribución de la γ -tubulina::GFP, en verde, asociada a los núcleos marcados con dRFP-H1, en rojo. (b, d y f) Contraste de fases. Las flechas muestran los núcleos con dos SPBs. Escala= 5 μm
 - 19 Serie de tiempo de un núcleo en mitosis. (a) núcleo con los 40
 SPBs en extremos opuestos en el tiempo. (c-m) alargamiento del núcleo e invaginación de la membrana nuclear, (m) separación de los núcleos. (o) desplazamiento de núcleos en direcciones opuestas. Tiempo min s^{-1} . Escala= 5 μm .
 - 20 Imagen en 2D de la fusión de la cepa con la dRFP-H1 y la 41
 cepa con la γ -tubulina-sGFP en donde se muestran un par de Mts citoplasmáticos, en verde, asociados al SPB de un núcleo, en rojo. Escala=2 μm .
 - 21 Imagen de hifas de la cepa XRM01RR expuestas a benomilo. 42
 (a) Canal fluorescente, (b) canal de contraste de fases. Escala = 5 μm .

Tablas

Tabla	Página
I Organismos en estudio.	14
II Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>tbg</i> de <i>N. crassa</i>	15
III Plásmidos utilizados para el marcaje molecular de la γ -tubulina en <i>N. crassa</i> .	16
IV Descripción del genotipo de las sepas de <i>N. crassa</i> utilizadas en este trabajo.	65

Introducción

Las células de los hongos filamentosos son llamadas hifas, que tienen forma tubular porque su crecimiento es polarizado. El principal punto de crecimiento se encuentra en el ápice de las hifas y ocurre por la secreción de materiales como enzimas, precursores de membrana y pared celular (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Trinci, 1978; Harold, 1990, 1997; Riquelme et al., 2000; Bartnicki-García, 2002). En hongos deuteromicetos, basidiomicetos y ascomicetos el crecimiento apical está asociado a un cuerpo apical o Spitzenkörper (Spk) que parece ser el director del crecimiento polarizado (Girbardt, 1979; Bartnicki-García y Lippman, 1969; Grove y Bracker, 1970; Howard y Aist, 1977; Trinci, 1978; Howard, 1981; Harold, 1990, 1997; Riquelme et al., 2000; Bartnicki-García, 2002). Se ha establecido que el transporte de materiales hacia el Spk está regulado por el citoesqueleto celular (Heath et al., 1982; Heath y Kaminskyi, 1989; Bartnicki-García, 2002).

Las células contienen en su interior una red de macromoléculas muy importante que permite coordinar los movimientos en su interior; desde la organización citoplasmática hasta el crecimiento celular (Barja et al., 1992; McDaniel y Roberson, 2000; Riquelme et al., 2002). Los microtúbulos (Mts) y los microfilamentos de actina (AF) son los elementos más importantes del citoesqueleto, aunque se ha encontrado un tercer tipo que son los filamentos intermedios (IF) de los que se desconoce su importancia (Geitmann y Emons, 2000).

Los Mts son considerados como los principales responsables del transporte de vesículas secretoras al Spk a largas distancias, mientras que los filamentos de actina están involucrados principalmente en el transporte a cortas distancias del Spk a la membrana, así como en el mantenimiento y control de la organización y dinámica de las vesículas dentro de este (Howard y Aist, 1977, 1980; Howard, 1981; Gooday, 1983; McDaniel y Roberson, 1998; Roberson y Fuller, 1988; Gow, 1989; Hasek y Bartnicki-García, 1994; Harris et al., 2005; Mouriño-Pérez et al., 2006). Los Mts se presentan en cantidad variable a lo largo de las hifas e intervienen en el posicionamiento de diversos organelos así como en la regulación de los movimientos intracelulares (Howard y Aist, 1977; Howard y Aist, 1980; Roberson y Vargas, 1994).

En hongos, los Mts son organizados por los cuerpos polares de los núcleos (SPB- por sus siglas en inglés Spindle Pole Body), dichas estructuras han sido ampliamente descritas como Centros Organizadores de Microtúbulos (MTOCs- por sus siglas en inglés Microtubule Organization Centers) (Oakley y Oakley, 1989). La γ -tubulina es el componente principal de los MTOCs sin embargo existe la posibilidad de que su localización no sea exclusivamente en los SPBs tal como lo demostraron McDaniel y Roberson (1988) cuando localizaron γ -tubulina en el apice de las células de *Allomyces macrogynus* (Emers y Willson, 1954). Esta localización de los MTOCs en los hongos filamentosos resulta lógica debido a que debe existir un regulador de la orientación y dinámica del citoesqueleto microtubular en el ápice con la finalidad de dirigir las vesículas

secretoras hacia el Spk. En base a esto, nos preguntamos si existen MTOCs extranucleares en *Neurospora crassa*, y si el Spk puede cumplir con esa función.

Por lo anterior se realizó un estudio para marcar molecularmente a la γ -tubulina con la proteína verde fluorescente y describir su localización en germínulas e hifas maduras de *N. crassa*.

Se eligió al hongo filamentoso *N. crassa* como organismo modelo porque es haploide, lo que favorece su utilización en el campo de la genética, al poseer solo un gen para cada proteína (Beadle y Tatum, 1941). Además este hongo tiene una tasa de crecimiento rápida, alrededor de 10 cm por día (Griffiths, A. J. F. y McCluster, K., 2007), sus requerimientos nutricionales son pocos, es fácil de manipular y su genoma ha sido totalmente secuenciado (Galagan et al., 2003).

Antecedentes

Citoesqueleto

El citoesqueleto es la red de macromoléculas más importante de las células eucariotas ya que permite llevar a cabo una gran cantidad de movimientos coordinados y dirigidos, entre los cuales puede mencionarse el crecimiento y desarrollo de células de hongos. Además, se considera la plataforma que mantiene la organización citoplásmica así como el control del movimiento y el posicionamiento de los organelos (Barja et al., 1992; McDaniel y Roberson, 2000; Riquelme et al., 2002).

Los elementos más importantes del citoesqueleto son los Mts y los filamentos de actina los cuales tienen una función fundamental en los hongos durante el crecimiento celular y la diferenciación de las hifas (Getmann y Emmons, 2000).

Microtúbulos

Los Mts son polímeros cilíndricos polares de 25 nm de diámetro, con 5 nm de grueso aproximadamente. Se encuentran regularmente paralelos al eje longitudinal de las células, pero perpendiculares a las mitocondrias (Derksen y Emons, 1990; Roberson y Vargas, 1994, Caudron et al., 2002, Mouriño-Pérez et al., 2006).

Los Mts están integrados por monómeros de α - y β -tubulina ensamblados alternadamente. Cada monómero contienen tres dominios

principales; el dominio de unión a GTP en la región N-terminal de la proteína, el dominio de unión a taxol en una región intermedia y el dominio de unión a proteínas motoras en la región C-terminal (Nogales et al., 1998). Los monómeros interactúan longitudinalmente por la región N-terminal de la α -tubulina, formando un cilindro de 9 a 16 polímeros lineales llamados protofilamentos (Figura 1) (Haimo, 1997; Erickson, 2000). Los Mts tiene una terminal positiva donde la polimerización es más activa, y una negativa, desde donde se inicia (Oakley y Morris; 1980; Oakley y Rinehart, 1985; Derksen y Emons, 1990; Thompson-Coffe y Zicker, 1992; Steinberg y Schiliwa, 1993; Haimo, 1997; Lowry et al., 1998; Lodish et al., 2001; Bartnicki-García, 2002; Caudron et al., 2002).

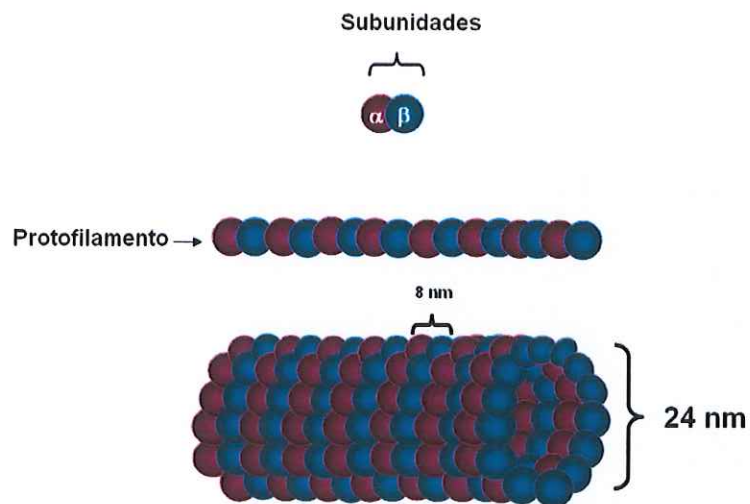


Figura 1. Conformación del microtúbulo. El microtúbulo es una estructura tubular con 24 nm de diámetro, compuesta por 9-16 protofilamentos, formados de heterodímeros de α y β -tubulina (Adaptado de Lodish, 2001).

En los hongos, poseen varias funciones entre las que se encuentran: el movimiento y distribución de los organelos hacia la terminal positiva o negativa, endocitosis y exocitosis, movimientos celulares, posicionamiento nuclear y dirección y estabilidad del Spk (Oakley y Morris, 1980; Derksen y Emons, 1990; Haimo, 1997; Lowry et al., 1998; Bartnicki-García, 2002; Riquelme et al., 2003).

En el interior de las células existe un gran nivel de organización en el movimiento de diversos organelos. La mayor parte de este ordenamiento es debido a la organización de los Mts que usualmente provienen de los SPBs y se reúnen en arreglos durante la interfase o en los usos acromáticos durante la mitosis. Los arreglos microtubulares son los encargados de la organización de los organelos incluyendo, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los endosomas, los peroxisomas y los cromosomas, entre otros (Radinov y Borisy, 1997).

Polimerización de los microtúbulos

La polimerización de los Mts sucede en dos fases: nucleación y elongación. La nucleación de los Mts es la formación de novo a partir de subunidades de α - y β - tubulina. *In vivo* la nucleación de los Mts es iniciada en sitios definidos como: centrosomas, cuerpos basales, SPBs y el cinetocoro dependiendo del tipo de célula que se trate (Kimble y Kuriyama, 1992; Pereira y Schuehek, 1997; Erickson, 2000; Moritz y Agard, 2001).

Se han propuesto dos modelos para la nucleación de los Mts: el modelo del molde donde el complejo de γ -tubulina provee la forma tubular

en el polo negativo de los Mts uniendo alrededor de 13 protofilamentos alternando α - y β - tubulina longitudinalmente; mientras que en el modelo de protofilamento, la γ -tubulina provee un segmento corto de protofilamento al que se le unen dímeros de α - y β - tubulina hasta formar el cilindro (Figura 2) (Erickson, 2000, Keating y Borisy, 2000; Moritz y Agard, 2001; Caudron et al, 2002).

La elongación es la polimerización de los Mts en el polo positivo dado por la unión de dímeros de α - y β - tubulina.

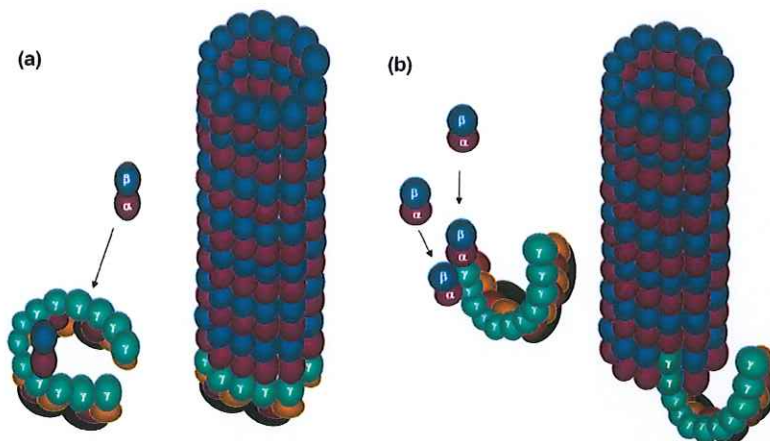


Figura 2. Mecanismos propuestos para la nucleación de los Mts. (a) El modelo del template propone que las moléculas de γ -tubulina están asociadas lateralmente formando un complejo en forma de anillo (γ -TuRC), y los heterodímeros de α/β -tubulina se unen longitudinalmente a este complejo para iniciar la polimerización de los Mts. (b) En el modelo del protofilamento los heterodímeros de α/β -tubulina se unen lateral y longitudinalmente al γ -TuRC hasta polimerizar el microtúbulo. (Imagen adaptada de Raynaud-Messina y Merdes, 2007).

Los Mts requieren sitios específicos donde nuclearse que se encargan del arreglo temporal y espacial de los mismos (Brinkley, 1985; Mazia, 1987; Kimble y Kuriyama, 1992; Pereira y Shiebel, 1997; Erickson, 2000; Moritz y Agard; 2001). Estos sitios se conocen como MTOCs, que controlan el crecimiento, la posición y la estabilidad de los Mts (Pickett-Heaps, 1969; Derksen y Emons, 1990; Haimo, 1997). En células vegetales los MTOCs se encuentran asociados a la membrana nuclear, membrana plasmática y a ciertas vesículas (Wick, 1985). En la mayoría de los hongos los MTOCs se encuentran en los SPBs que son análogos a los centrosomas en células animales (Heath, 1981). Aunque estructural y químicamente los SPBs y los centriolos no tienen mucha similitud, ambos cumplen con la misma función en la organización de los Mts durante la interfase y la mitosis.

Existen evidencias que muestran que los MTOCs requieren de una unidad fundamental constituida por la γ -tubulina (Oakley y Oakley, 1989; Oakley et al., 1990; Horio et al., 1991; Zheng et al., 1991; Raff et al., 1993; Liu et al., 1994; López et al., 1995; Sobel y Snyder, 1995; Zheng et al., 1995; Marschall et al., 1996).

γ -tubulina

La γ -tubulina se descubrió en 1989 por C. E. Oakley y Berl R. Oakley en *Aspergillus nidulans* localizada en los SPBs (Oakley et al., 1990), pertenece a la super-familia de las tubulinas conservando un 33.3 % de

identidad con la β -tubulina y entre el 28.9 – 31.7 % de identidad con la α -tubulina, siendo los sitios de unión a GTP los más conservados entre las tubulinas (Oakley y B. Oakley, 1989). La γ -tubulina es una proteína altamente conservada en células eucariotas (B. Oakley et al., 1990; Horio et al., 1991; Stearns et al., 1991). Por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la γ -tubulina de *A. nidulans* y de humanos comparten un 67.4% de identidad (Zheng et al., 1991), la de humanos y *Xenopus laevis* un 98% de identidad (Oakley, B., 1992). El grado de identidad de la proteína es consistente con la relación filogenético de los organismos (Figura 3).

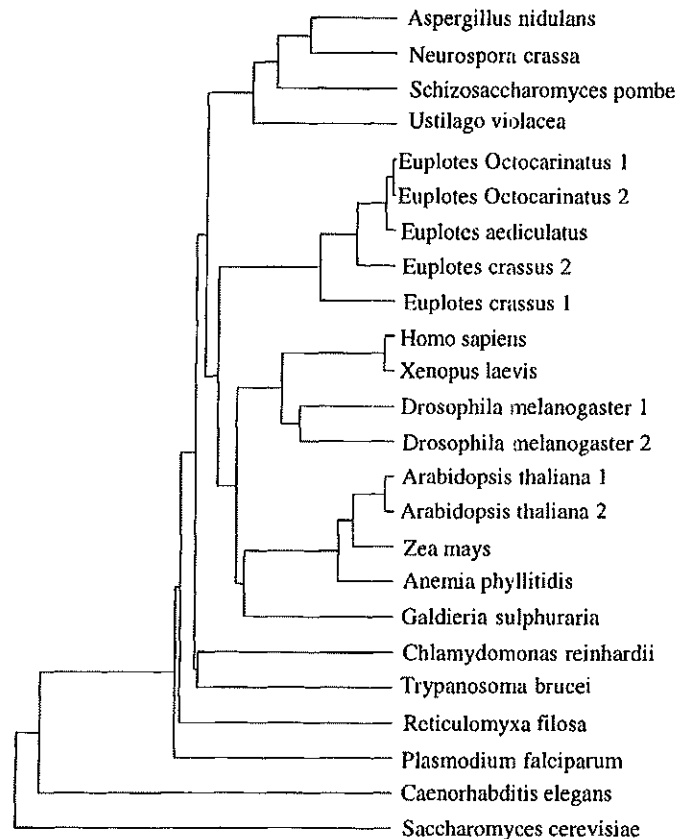


Figura 3. Comparación de las secuencias de la γ -tubulina de organismos eucariotas representativos de diferentes reinos. Imagen tomada de Oakley y Akkari, 1999.

La γ -tubulina no forma parte del filamento del Mt, pero es un componente importante para la formación y la dinámica del mismo. Se encuentra localizada en la región negativa del Mt confiriéndole una mayor estabilidad. Es esencial para que ocurra la formación *de novo* de los Mts, la cual inicia en el extremo negativo del Mt. Constituye el núcleo de la polimerización de los mismos.

En las células eucariotas la γ -tubulina se encuentra asociada a otras proteínas formando dos complejos que constituyen el núcleo de los Mts durante la polimerización de los mismos: el complejo pequeño de γ -tubulina (γ -TuSC), que está formado de dos subunidades de γ -tubulina; y el complejo grande en anillo de γ -tubulina (γ -TuRC) formado de 12 a 14 subunidades de γ -tubulina unidas a las proteínas del anillo de γ -tubulina (grups- por sus siglas en inglés gamma-ring proteins), también llamadas proteínas del complejo de la γ -tubulina (GCPs- por sus siglas en inglés Gamma Complex proteins) ensambladas en espiral con un diámetro de 25 nm aproximadamente (Figura 4) (Zheng et al., 1995; Erickson, 2000).

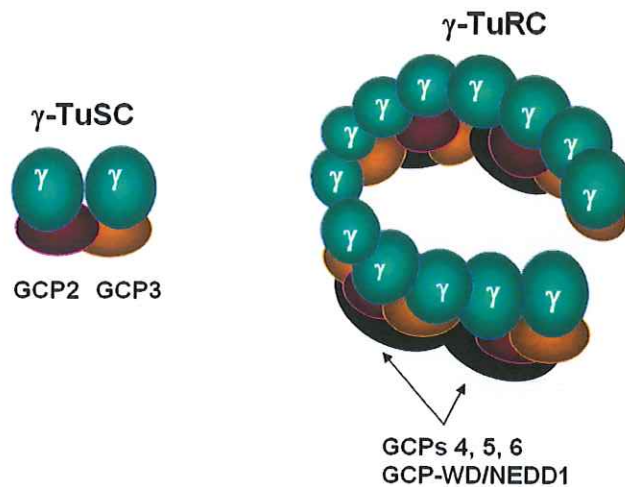


Figura 4. Representación esquemática del complejo pequeño de la γ -tubulina (γ -TuSC) y el complejo en anillo de la γ -tubulina (γ -TuRC). El γ -TuSC está formado por dos moléculas de γ -tubulina, asociadas con una molécula GCP2 y una GCP3 (Proteínas del Complejo de la γ -tubulina). El γ -TuRC está conformado por múltiples copias de la γ -tubulina asociada a las GCP2, GCP3, GCP4, GCP5 y GCP6. Este complejo tiene una estructura en anillo con un diámetro de 25 nm. Recientemente se han descrito nuevos componentes del γ -TuRC llamada Dgp71WD en *Drosophila*, o GCP-WD o NEDD1 en mamíferos (Imagen adaptada de Raynaud-Messina y Merdes, 2007).

Localización de la γ -tubulina

Estudios en diversos organismos demostraron que la γ -tubulina está localizada en los MTOCs, y en la mayoría de las células eucariota los centrosomas cumple con este papel (Moritiz et al., 1998; Moritiz y Agard, 2001). La evidencia sugiere que durante la interfase, en ciertos hongos, los Mts son polimerizados y organizados por MTOCs no convencionales y que pueden o no estar asociados con los núcleos. En *Uromyces phaseoli* se sugiere que los MTOCs se encuentran en el ápice de la hifa, puesto que la

repolimerización de los microtúbulos ocurre principalmente en esta región y no en los SPBs (Hoch y Staples 1985). En *A. macrogynus*, se han mostrado sitios extranucleares de polimerización de microtúbulos debido a la presencia de γ -tubulina asociada al Spk en el ápice de la célula (McDaniel y Roberson, 1998). Otra evidencia que sugiere que los MTOCs se encuentran en el ápice de las hifas es el estudio de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) de microtúbulos marcados con GFP (β -tubulin::sGFP) en *N. crassa*, éste estudio demuestra que la polimerización de los Mts ocurre a partir de la punta de las ramificaciones de las hifas (Mouriño-Pérez et al., 2006).

Problema

La distribución de la γ -tubulina es un tema de discusión en hongos filamentosos. Aunque es comúnmente aceptado que la γ -tubulina se localiza en los SPBs, se ha reportado que algunas especies de hongos también poseen γ -tubulina en el Spk. McDaniel y Roberson (1998) inmunolocalizaron γ -tubulina en el Spk del quitridiomyceto *A. macrogynus*, sin embargo no se ha logrado localizar γ -tubulina en el apice *N. crassa* y de otros hongos filamentosos.

Objetivos

Objetivo general

- Establecer la localización y dinámica de la proteína γ -tubulina en el hongo filamentoso *N. crassa*.

Objetivos específicos

- Describir la localización de la γ -tubulina marcada con sGFP en germínulas e hifas maduras de *N. crassa*.
- Identificar la asociación de la proteína γ -tubulina marcada con sGFP con las diferentes estructuras celulares.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Con la finalidad de determinar la distribución y dinámica de la γ -tubulina en *N. crassa* se realizó el marcaje molecular de ésta proteína con la proteína verde fluorescente (sGFP) y se analizó por microscopía confocal.

Organismos y medios de cultivo

Los organismos utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla I.

Tabla I. Organismos en estudio.

ORGANISMO	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5- α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> argF)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> <i>thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> λ -	Promega ®
<i>N. crassa</i>	<i>mat a</i>	FGSC # 4200
<i>N. crassa</i>	74-OR23-1VA <i>mt A</i>	FGSC # 2489
<i>N. crassa</i> Δ <i>mus-51::his-3</i>	<i>delta mus-51::bart</i> ⁺ ; <i>his-3</i> <i>mat A</i>	FGSC # 9717
<i>N. crassa</i> NMF138	<i>H1::drfp</i> <i>mat A</i>	Michael Freitag
<i>N. crassa</i> NMF 160	<i>Sad-2</i> ; <i>hph</i> ⁺ <i>mat a</i>	Michael Freitag
<i>N. crassa</i> N2525	<i>rid</i> ^{RIP4} <i>his</i> ³ ⁺ :: <i>Pccg-1-Bml::sgfp</i> ⁺ <i>mat a</i>	Michael Freitag
<i>N. crassa</i> TRM01RR	<i>tbg::sgfp</i> <i>mat A</i>	Este trabajo

Las células competentes de *Escherichia coli* DH5- α (Promega ®) se mantuvieron en medio Luria Bertani (LB) y en LB con ampicilina (100 μ g ml⁻¹). Las cepas *N. crassa* se mantuvieron y cultivaron en medio mínimo de Vogel (VMM- por sus siglas en inglés Vogel Minimal Medium) con sacarosa al 1.5 % y agar al 1.5%, y en medio completo de Vogel (VCM- por sus siglas

en inglés Vogel Complet Medium) con levadura al 0.05%, sacarosa al 1.5 % y agar al 1.5% a una temperatura de 28 °C. Para la producción de la TRM01RR, las conidias recién transformadas fueron incubadas en medio de recuperación a 30 °C, posteriormente se espatuláron en medio FIGS con agar al 1 % a una temperatura de 28 °C, hasta que aparecieron las primeras colonias. El monocarión de la TRM01RR se obtuvo por la cruce de esta cepa con la cepa *N. crassa* NMF 160, para la cruce las cepas se crecieron en medio sintético de cruces con agar al 1% a una temperatura de 25 °C, hasta la maduración de las ascosporas.

Oligonucleotidos

Los oligonucleótidos se diseñaron del marco de lectura abierto del gen *tbg* (NCU03954) de 1,601 pb (Tabla II). Al oligonucleótido sentido se le agregaron en el extremo 5' la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xba I (TCTAGA) más cuatro nucleótidos al azar (CAAT). Al oligonucleótido antisentido se le agregaron en el extremo 5' la secuencia de reconocimiento de la enzima Pac I (TTAATTAA) más la secuencia (GCTA).

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *tbg* de *N. crassa*.

OLIGO	SECUENCIA 5'-3'
ORM01 sentido	CAA TTC TAG AAT GCC CAG AGA AAT AAT AAC
ORM02 antisentido	GCT ATT AAT TAA AGC CAT TCT CTT GTC CG

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo, se describen en la Tabla III.

Tabla III. Plásmidos utilizados para el marcaje molecular de la γ -tubulina en *N. crassa*.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pGEM®-T easy	Plásmido de 3,015 pb. Permite clonar genes delimitados por sitios de restricción Apa I, AatI I, Sph I, BstZ I, Nco I, Not I, SacI I, EcoR I, Spe I, Pst I, Sal I, Nde I, Sac I, BstX I, NsiI I en sus extremos 5' y 3'. Contiene el gen β -galactosidasa.	PROMEGA®
pMF272	Plásmido integrativo de 8,479 pb. El sitio de clonación múltiple para Xba I, Spe I, Bam HI, Xma I y Pac I, para la clonación del extremo carboxi-terminal de la proteína verde fluorescente (sGFP). Contiene el promotor fuerte Pccg-1 de <i>N. crassa</i> . Como marcador de selección contiene la secuencia truncada secuencia del gen his-3. Contiene el gen de β -lactamasa.	Michael Freitag, 2004
pRR01	Plásmido de 4,616 pb, clonación del gen <i>tbg</i> en el pGEM®-T.	Este trabajo
pRM01RR	Plásmido de 10,080 pb, generado a partir pMF272, y contiene el gen <i>tbg::sgfp</i> , cuya expresión es regulada por el promotor Pccg-1 fuerte de <i>N. crassa</i> .	Este trabajo

Construcción del plásmido pRM01RR

Extracción de DNA de *N. crassa*

Se extrajo DNA de *N. crassa* de tipo silvestre para ser utilizado como molde en la amplificación del gen de la γ -tubulina (*tbg*). El DNA de la cepa silvestre de *N. crassa mat A* (FGSC # 2489) se extrajo cultivando el micelio de este hongo en MMV (1.5 % sacarosa) líquido a 30°C por 7 d. El micelio se filtró y se enjuagó con agua desionizada-estéril. Se dejó secar, se transfirió a tubos de 1.5 ml y se incubó a -80°C por 48 horas. Posteriormente se transfirió a un mortero frío y estéril, donde se agregó nitrógeno líquido y se maceró hasta tener un polvo fino. El polvo se procesó con el Kit DNeasy® plant (QUIAGEN, Cat. No. 69104) siguiendo el protocolo del fabricante.

Reacción en cadena de la polimeriza (PCR) para amplificar el gen *tbg*

El marco de lectura abierto del gen *tbg* (1,601 pb) se amplificó con la enzima Taq Polimerasa (High® Fidelity Invitrogen ®). La mezcla de reacción contenía 2.5 μ l de oligonucleótido ORM01 sentido (10 nM), 2.5 μ l de oligonucleótido ORM02 antisentido (10 nM), 2 μ l de DNA genómico de *N. crassa* silvestre, 5 μ l de buffer High fidelity 10X, 5 μ l de mezcla de nucleótidos (1 mM), 2.5 μ l de MgSO₄ (50 mM), 0.2 μ l de Taq Polimerasa High Fidelity (5 U), en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se introdujo en un termociclador BIORAD modelo (iCycler™ Sealing Ring for iCycler 96

Well Reaction Module 170-8731) con el siguiente ciclo: 2 min a 95°C más 30 ciclos de 30 s a 95°C de desnaturalización, 30 s a 52°C de alineamiento y 2 min a 68°C de extensión, terminando con un ciclo de 10 min a 68 °C de extensión final.

El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sambroock y Russell, 2001) en tampón TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM; pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 75 V en una cámara especial para tal fin.

Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con el marcador de peso molecular λ (DNA del fago λ cortado con EcoRI y Hind III). Una vez identificada la banda del gen *tbg*, el fragmento de DNA se purificó siguiendo el protocolo del kit de purificación Promega® (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Cat. #A9281). Para conservar el gen *tbg* amplificado por PCR se ligó al pGEM-TR utilizando el sistema PGEM-T de Promega® siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Ligación del plásmido pMF272 y el gen *tbg*

Para la clonación del gen *tbg* en el plásmido integrativo pMF272 (Figura 5) fueron digeridos el gen y el plásmido con las enzimas Pac I (TTAAT[^]TAA) y Xba I (T[^]CTAGA). La mezcla de reacción para la digestión del gen contenía 20 μ l de *tbg*, 5 μ l NE Buffer 4, 5 μ l de BSA 10 X, 1.5 μ l de Xba I (20 U μ l⁻¹) y 1.5 μ l de Pac I (10 U μ l⁻¹), en un volumen final de 50 μ l,

ambas enzimas de New England Biolabs ®. La mezcla de reacción se incubó durante 3 h a 37 °C. Después de 2 horas de incubación se adicionó al plásmido 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón (Promega ®).

A ambas digestiones se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior purificación con el kit Promega ® (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Cat. #A9281).

El pMF272 y el gen *tbg* se ligaron a una proporción de 1 µl:5 µl de 50 ml purificados de gel, utilizando la enzima T4 DNA ligasa Promega®. La mezcla se dejó incubando una hora a temperatura ambiente y después a 4 °C durante toda la noche. Esta mezcla se utilizó en la transformación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5-α.

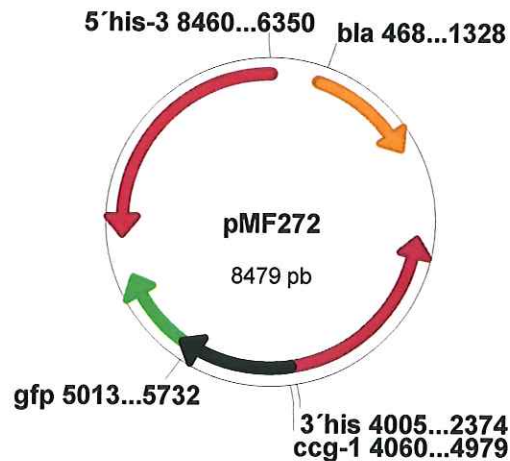


Figura 5. Mapa del plásmido pMF272. El plásmido se caracteriza por la presencia del gen *sgfp* (5013-5732), cuya expresión está regulada por el promotor de *N. crassa ccg-1* (4060-4979). Las secuencias 5' his-3 (6350-8460) y 3' his-3 (4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen his-3 de *N. crassa*. El gen β -lactamasa (468-1328) confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* que lo contienen.

Transformación de células competentes

Para la transformación de células competentes se adicionaron 10 μl de la mezcla de ligación pMF272 + *tbg* a 50 μl de células de *E. coli* DH5- α . La mezcla se incubó 30 min en hielo, posteriormente se le dió un shock térmico a 42 °C durante 2 min, y finalmente se mantuvo 2 min en hielo.

Se agregaron 900 μl de LB y se incubó a 37 °C durante una hora en agitación a 200 rpm, se centrifugó un minuto a 13,000 rpm y se eliminaron 850 μl del sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en el volumen restante y se sembró en placas de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) incubandose a 37 °C toda la noche.

Para corroborar el éxito de la clonación, se seleccionaron diez colonias de *E. coli* transformadas con el la mezcla de ligación y fueron analizadas por PCR para detectar la presencia del gen *tbg* en el plásmido. La mezcla de reacción utilizada para cada colonia contenía; 15.2 μl de H₂O HPLC, 2 μl de buffer 10X, 1 μl de MgCl 25 Mm, 0.3 μl de dNTPs 10 nM, 0.75 μl de oligo ORM01 sentido, 0.75 μl de oligo ORM02 antisentido, y 0.02 μl de la enzima Taq-polimerasa Promega®, en un volumen final de 20 μl . Para la PCR se utilizó el ciclo descrito anteriormente para la amplificación del gen *tbg*. El DNA de colonia amplificado de cada colonia se separo por electroforesis en agarosa al 1% y se determinó el tamaño de las bandas por comparación con el marcador de peso molecular (Promega®). Las colonias positivas se sembraron en 5 ml de LB-ampicilina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) líquido y se

incubaron 37 °C en agitación a 250 rpm durante toda la noche, para recuperar el DNA plasmídico.

Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de las colonias transformantes de *E. coli* positivas por PCR se purificó por el método de lisis alcalina. Las colonias cultivadas en medio líquido LB-ampicilina (100 µg ml⁻¹) fueron transferidas a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron durante un minuto a 13,000 rpm. El sobrenadante se desechó, y la pastilla celular se resuspendió en 100 µl de la solución P1 (Tris-Hcl pH 8 50 mM, EDTA 10 mM, RNASA 0.1 mg ml⁻¹). Después se agregó 150 µl de la solución P2 (NaOH, 200 mM, SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión (7 tiempos), se incubó 5 min en hielo. Pasada la incubación se agregaron 200 µl de la solución P3 (Acetato de Potasio 1M pH 5.5) y se mezcló por inversión (7 tiempos), se incubó 10 min en hielo, y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml. El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 96 % y se mantuvo en el congelador durante 30 min, se mezcló por inversión varias veces, y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó y el DNA se lavó, invirtiendo varias veces el tubo, con 500 µl de etanol al 70 %, después se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando a temperatura ambiente. El DNA plasmídico se resuspendió en 80 µl de agua HPLC libre de nucleasas.

Corroboración de la ligación pMF272 + *tbg*

El DNA plasmídico recuperado por lisis alcalina fue digerido con las enzimas Not I y EcoR V de Invitrogen®, para corroborar que el gen *tbg* se hubiera ligado correctamente al plásmido pMF272. La mezcla de reacción contenía 2 µl de DNA plasmídico (100 ng µl⁻¹), 0.25 µl de Not I (10 U) y 0.35 µl de EcoR I (15 U), 2 µl Buffer React 3 10 X, 2 µl de BSA 10 X y 13.4 µl de agua HPLC. La mezcla se incubó a 37 °C durante 4.5 h. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en agarosa al 1 % y el tamaño de las bandas se determinó por comparación con marcadores de peso molecular (Promega®). Una vez determinado el patrón de bandas se seleccionó una colonia para continuar con el análisis. Al plásmido obtenido se le nombró pRM01RR.

Adicionalmente, para corroborar la integridad del marco de lectura abierto del gen *tbg*, se digirió el pRM01RR con las enzimas Xba I y Pac I para liberar el fragmento de 1,601 pb. Para esto se utilizaron 2 µl de plásmido (100 ng µl⁻¹), 0.25 µl de Xba I (20 U), 0.5 µl de Pac I (10 U), 2 µl de buffer NEB #2 10X, 2 µl de BSA 10X y 13.25 µl de agua HPLC, la mezcla se incubó 2.5 h a 37 °C. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La colonia de *E. coli* seleccionada se sembró en 5 ml de LB-ampicilina (100 µg ml⁻¹) durante toda la noche a 37 °C a 200 rpm y se extrajo el DNA plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones del fabricante y se envió a secuenciar a Eton Bioscience Inc, San Diego, CA.

Construcción de la cepa de *N. crassa* TRM01RR

Transformación de *N. crassa*

La cepa de *N. crassa* delta mus-51::bar⁺; his-3 (FGSC # 9717) se sembró en un matraz de 500 ml con 100 ml MCV y se incubó a 28 °C durante una semana, y se expuso a luz solar a temperatura ambiente por 3 d. Las conidias maduras se extrajeron agregando agua estéril, agitando vigorosamente el matraz hasta desprender las conidias. El sobrenadante se filtró con una gasa estéril en un tubo de 50 ml. Este procedimiento se repitió en varias ocasiones. El total del sobrenadante filtrado se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm y se desechó el líquido. La pastilla de conidias se lavó 3 veces con sorbitol 1 M estéril. Finalmente se resuspendieron en 80 µl de sorbitol 1 M.

En una cubeta de electroporación estéril de 0.2 mm se mezclaron 80 µl de conidias con 20 µl del plásmido pRM01RR (100 ng µl⁻¹) y se incubó 15 min en hielo. El ensayo de transformación genética se hizo en el electroporador Biorad Gene Pulser Electroporator a 600 OHMS, 25 µF, 1.5 KV por 12-14 milisegundos. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregaron 900 µl de sorbitol frío. Esta mezcla se transfirió a un tubo de 25 ml estéril y se mezcló con 4 ml de medio de recuperación y se incubó durante 2 h a 30 °C en oscuridad. Después de la incubación se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min y se desecharon 4.8 ml de sobrenadante. Las conidias se resuspendieron en el volumen restante y se espatularon en 4 placas de medio FIGS agar, y se incubación a 28 °C hasta que aparecieron

las primeras colonias. Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero no se agregó ningún plásmido a las conidias.

La recuperación de las colonias transformantes TRM01RR se realizó transfiriéndolas individualmente en tubos de 5 ml con MMV inclinado (1.5 % de agarosa y 1.5 % de glucosa) incubándolas a 28 °C. Las colonias que expresaban la sGFP se seleccionaron de acuerdo a la emisión de fluorescencia observada con el microscopio confocal LSM Meta 510 (Carl Zeiss) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de entre 505-530 nm.

Cruzas de *N. crassa*

La TRM01RR se cruzó con la cepa de *N. crassa* Sad-2; hph⁺ mat a para obtener una cepa monocarión de la transformante. Primero se inoculó micelo de la TRM01RR en SCM y se incubó a 25 °C durante 5 d. Posteriormente se reinoculó el cultivo con micelio de la otra cepa continuándose la incubación a 25 °C en oscuridad total hasta la aparición y maduración de peritecios que son estructuras de la reproducción sexual de *N. crassa*. De los peritecios se recuperaron ascosporas con agua desionizada estéril, que se espatularon en placas de MMV dándoles un shock térmico por 2 h a 60 °C para activarlas. Posteriormente se incubaron a 28 °C toda la noche. Las colonias individuales se aislaron en tubos de 5 ml con MMV agar inclinado. Nuevamente se observaron bajo microscopía de fluorescencia para seleccionar aquellas que expresaran la sGFP. Las colonias seleccionadas fueron nombradas XRM01RR.

Tratamiento con Benomilo

Para determinar la asociación de la γ -tubulina con los microtúbulos se realizó el tratamiento con Benomilo de cepa XRM01RR. Primero se sembró la cepa en placas de MMV agar con benomilo ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Ramos García, 2007) y se incubó a 28°C durante 12 h. El efecto del benomilo sobre la distribución de la fluorescencia se observó por microscopía confocal de acuerdo a lo descrito en ese apartado.

Tinción con FM4-64

El FM4-64 (Molecular Probes®) es un colorante endocítico específico de membranas. Se añadió $10 \mu\text{l}$ ($2.5 \mu\text{M}$) del colorante a un cubreobjetos y se depositó un trozo de agar invertido con la XRM01RR (Hickey et al., 2005). Después de una hora se observó por microscopía confocal de acuerdo a la metodología descrita.

Marcaje con brefeldina A conjugado con BODIPY® 558/568

El colorante vital brefeldina A conjugado con BODIPY® 558/568 (Invitrogen ®) tiene alta afinidad por el retículo endoplasmático y por el aparato de Golgi, mostrando un color rojo cuando es excitado a 558 nm. La exposición de las células a este colorante inhibe la ruta secretora de vesículas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, impidiendo la formación de la cubierta proteica llamada COPI. La actividad normal de la célula se reestablece con el lavado del colorante. Para determinar la

asociación de la γ -tubulin acon el retículo endoplasmático se tiñeron hifas maduras de la cepa XRM01RR con 10 μ l del colorante, utilizando el método de agar invertido (Hickey et al., 2005) y se hicieron observaciones por microscopía confocal de acuerdo a la metodología descrita.

Fusión de cepas de *N. crassa*

Para obtener un doble marcaje con los núcleos en rojo, con la histona 1 unida a la proteína dimérica roja fluorescente en la región amino terminal (*drfp::h1*), y la γ -tubulina (*tbg::sgfp*) en verde, se espatularon esporas de ambas transformantes del mismo tipo de apareamiento en placas con MMV agar y se incubaron por 6 h a 28 °C, hasta que los tubos germinales emergieron y se fusionaron. De estas placas se seleccionaron fragmentos hasta obtener una colonia heterocarión con las dos características. Las células se observaron por microscopía confocal. El doble marcaje de los núcleos en rojo y los microtúbulos en verde (*Bml::sgfp*) se realizó de la misma forma.

Microscopía confocal

Para determinar la localización y dinámica de la γ -tubulina en *N. crassa*, se observaron conidias e hifas maduras de la cepa XRM01RR por microscopía confocal, utilizando el método de agar invertido (Figura 6) (Hickey et al., 2005).

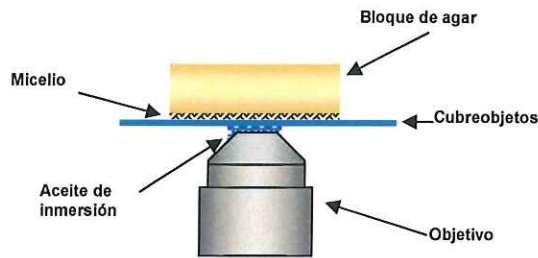


Figura 6. Método del bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un fragmento del agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos.

Las cepas fueron observadas a alto aumento con un objetivo de 100 X; 1.3 A. N. plan-apocromático de inmersión en aceite, utilizando un microscopio confocal LSM Meta 510 Carl Zeiss (Göttingen, Alemania). Se tomaron simultáneamente imágenes en dos canales: uno de luz fluorescente, utilizando un láser de Argón para la excitación de la sGFP (488 nm) y otro de luz transmitida para la obtención de imágenes en contraste de fases. Para la observación de la cepa que expresa dRFP ligada a H1 se utilizó un láser de HeNe a una longitud de onda de excitación de 543 nm. Se grabaron imágenes en dos dimensiones y series de tiempo con el software LSM 510 versión 3.2 y se analizaron con el software LSM examiner versión 3.2.

Resultados

Utilizando técnicas de marcaje molecular se logró obtener una cepa transformante del hongo filamentoso *N. crassa* con la γ -tubulina fusionada a la sGFP.

Construcción del plásmido pRM01RR

La figura 7a muestra la banda de amplificación del gen *tbg* que fue digerido junto con el pMF272 y en la figura 7b se muestran el gen (1,601 pb) y el plásmido (8,479 pb) digeridos con la enzima Xba I y Pac I para su posterior ligación. Las clonas de *E. coli* obtenidas de la transformación con el pRM01RR que se analizaron por PCR de colonia se muestran en la figura 8-a. Cinco clonas fueron negativas y cinco positivas. La figura 8-b muestra el patron de 3 bandas (2, 168 pb, 3,286 pb y 4, 623 pb) esperado de la digestión con Not I del plásmido ligado con el gen. El plásmido seleccionado para continuar con la transformación fue el de la colonia No. 8 (pRM01RR), por digestión enzimática con Xba I y Pac I se obtuvieron dos bandas una de menor tamaño correspondiente al gen (1, 601 pb) y la otra corresponde al pMF272 (8,479 pb) (Figura 8-c). Así mismo la secuenciación del pRM01RR demostró que la secuencia codificante para la γ -tubulina de este plásmido estaba integra (Figura 9). El mapa del plásmido obtenido (pRM01RR) se muestra en la figura 10.

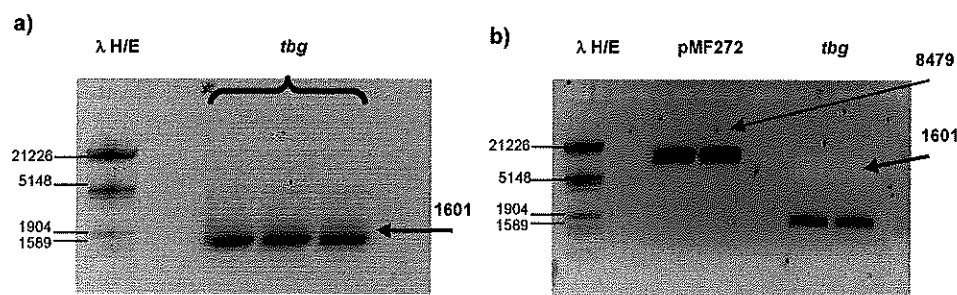


Figura 7. Construcción del plásmido pRM01RR. (a) Electroforesis del gen *tbg* amplificado por PCR, (b) electroforesis del pMF272 (8,479 pb) y del gen *tbg* (1,601 pb) digeridos con Xba I y Pac I para su posterior ligación. Gel de agarosa al 1%, λ H/E = marcador de peso molecular.

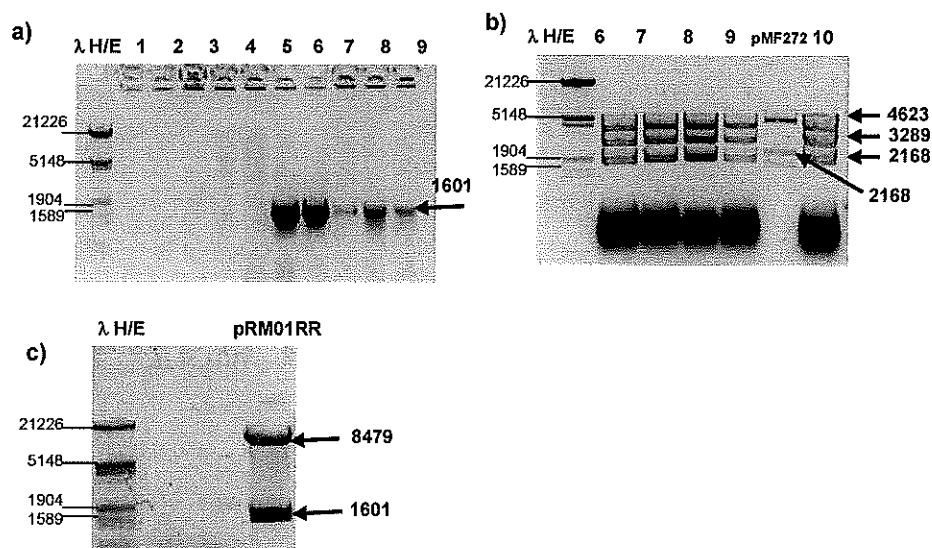


Figura 8. Corroboración de la construcción del pRM01RR. (a) PCR de colonias transformantes de *E. coli*, las colonias 6-10 son positivas para el *tbg*, (b) digestión con Not I de las colonias 6-10, y del pMF272, (c) digestión enzimática con Xba I y Pac I del DNA plasmídico de la colonia # 8, se obtienen 2 fragmentos uno de 1,601 pb correspondiente al gen *tbg* y otro de 8,479 correspondiente al plásmido pMF272. Gel de agarosa al 1%, λ H/E = marcador de peso molecular.

Figura 10. Mapa del plásmido pRM01RR. El plásmido se caracteriza por la presencia del gen *tbg* seguido por la *gfp* (4987-7333), cuya expresión está regulada por el promotor de *N. crassa* *cgg-1* (4060-4979). Las secuencias 5' *his-3* (10061-7951) y 3' *his-3* (4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen *his-3* de *N. crassa*. El gen β -lactamasa (468-1328) confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* que lo contienen.

Localización de la γ -tubulina en *N. crassa*

Se observaron conidias, gemínulas e hifas maduras de la cepa XRM01RR utilizando microscopía confocal. En conidias la γ -tubulina se aprecia como acumulaciones pequeñas a manera de puntos brillantes asociados a los núcleos (Fig. 11c). La fluorescencia se aprecia además alrededor del núcleo de manera muy tenue.

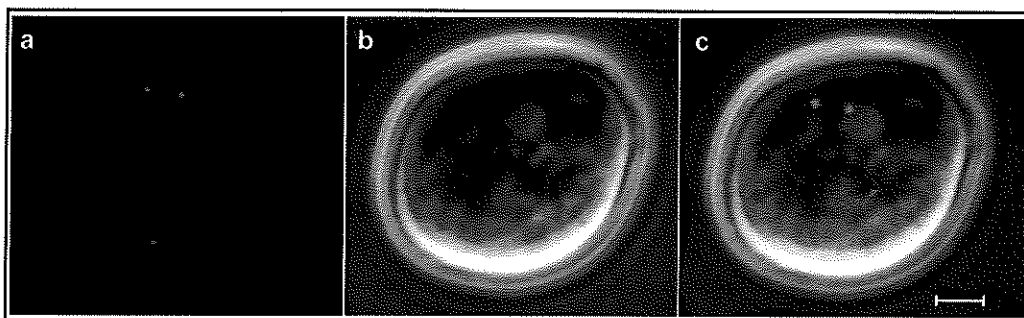


Figura 11. Imagen de 2D de una conidia de la XRM01RR que muestra la distribución de γ -tubulina asociada a los núcleos. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μm . Escala= 5 μm .

La señal de la γ -tubulina en germínulas con 6 horas de crecimiento conserva el mismo patrón que las conidias, la fluorescencia se observa a manera de puntos brillantes en un extremo de los núcleos (Figura 12-a). La cantidad de puntos brillantes observados en una germínula es mayor que en una conidia, porque el número de núcleos se va incrementando.

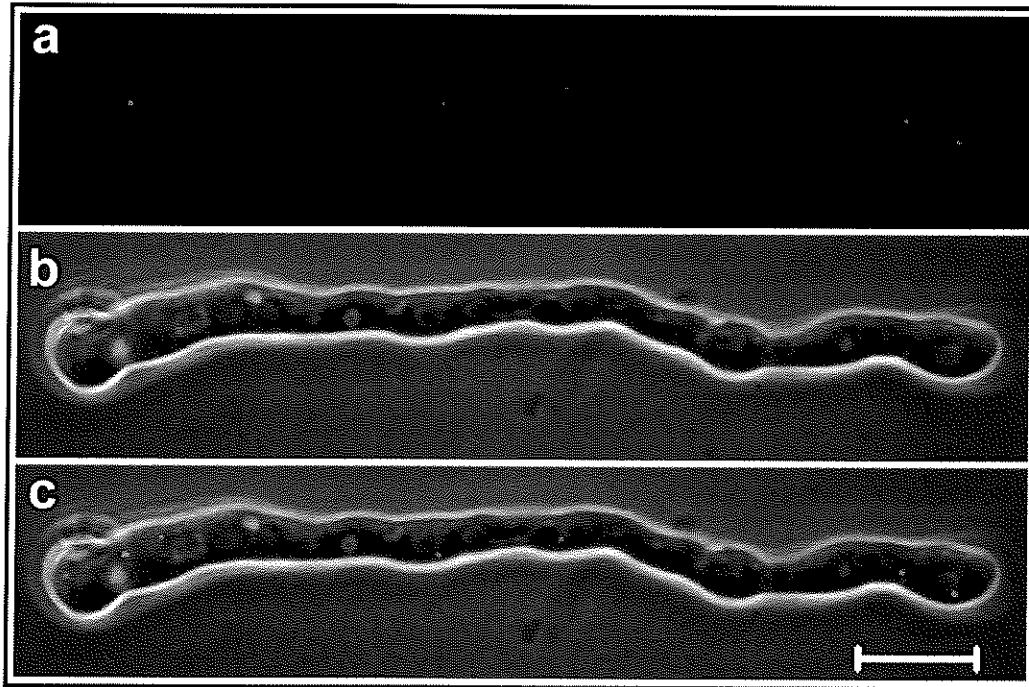


Figura 12. Imagen en 2D de una germínula con 6 horas de crecimiento de la cepa XRM01RR. Los puntos brillantes de γ -tubulina se distribuyen desde la esfera germinal hasta una zona muy cercana al ápice. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases y (c) Composición de (a) y (b). Escala= 10 μ m.

La reconstrucción en 2D de una hifa madura con doble marcaje (membranas teñidas con FM4-64 y γ -tubulina con sGFP) se muestra en la figura 13. A diferencia de la distribución de la γ -tubulina en germínulas, en hifas maduras hay una zona de exclusión de aproximadamente 10 μ m del ápice (Figura 13-a). La γ -tubulina junto con los núcleos se mueve en sentido anterógrado y retrógrado, además la proteína se mueve en el eje Z hacia arriba y hacia abajo, entrando y saliendo del campo focal observado. No hay movimiento de la fluorescencia independiente a los núcleos, aunque se

observa en algunas ocasiones un fondo fluorescente tenue que podría corresponder a moléculas de γ -tubulina libres en el citoplasma.

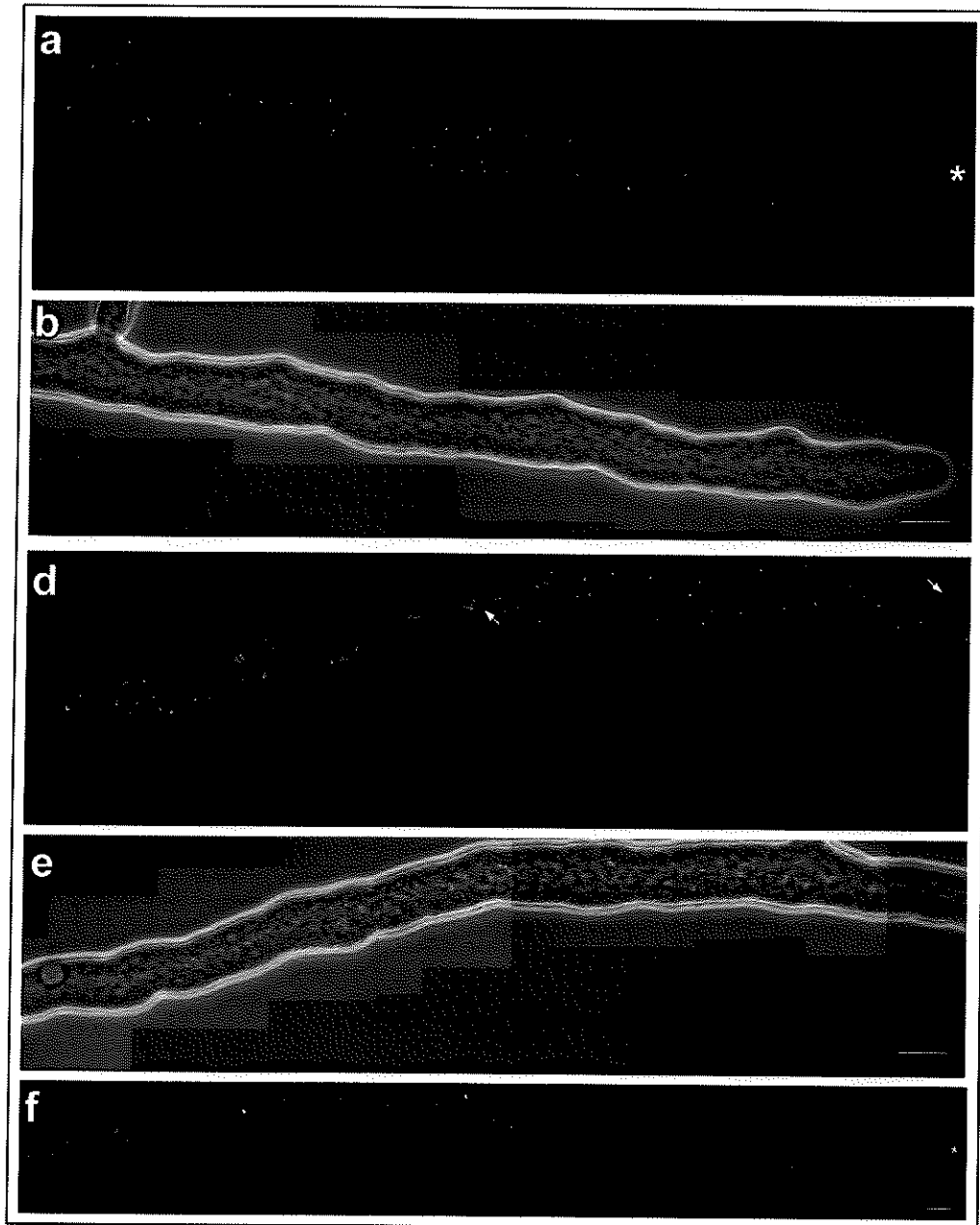


Figura 13. Reconstrucción en 2D de una hifa de la cepa XRM01RR. La γ -tubulina está distribuida a lo largo de la hifa asociada a los núcleos. (a, d y f) canal de fluorescencia, γ -tubulina en verde y FM4-64 en rojo. (b y e) canal de contraste de fases. El asterisco señala al Spk y las flechas señalan a los septos. Escala= 5 μ m.

Co-localización de γ -tubulina en la corteza celular y septos

Las hifas teñidas con FM4-64 de la cepa XRM01RR fueron observadas en series de tiempo para determinar la relación de la localización de la γ -tubulina con la membrana citoplasmática. En todo el seguimiento no se observó co-localización de la γ -tubulina-sGFP con el Spk y la corteza celular. Así como tampoco con los septos (Fig. 14).

Asociación de la γ -tubulina con el Retículo endoplasmático

Para determinar la relación de la γ -tubulina se tiñó con BODIPY. Después de 15 minutos de haber colocado el colorante, se observó una distribución homogénea a lo largo de la hifa, marcándose todo el citoplasma de rojo, excepto los núcleos que se ven rodeado de una región más fluorescente que corresponde al retículo endoplasmático (Fig. 15b). La γ -tubulina se encuentra por fuera del marcaje del retículo, estos no co-localizan (Fig. 15c).

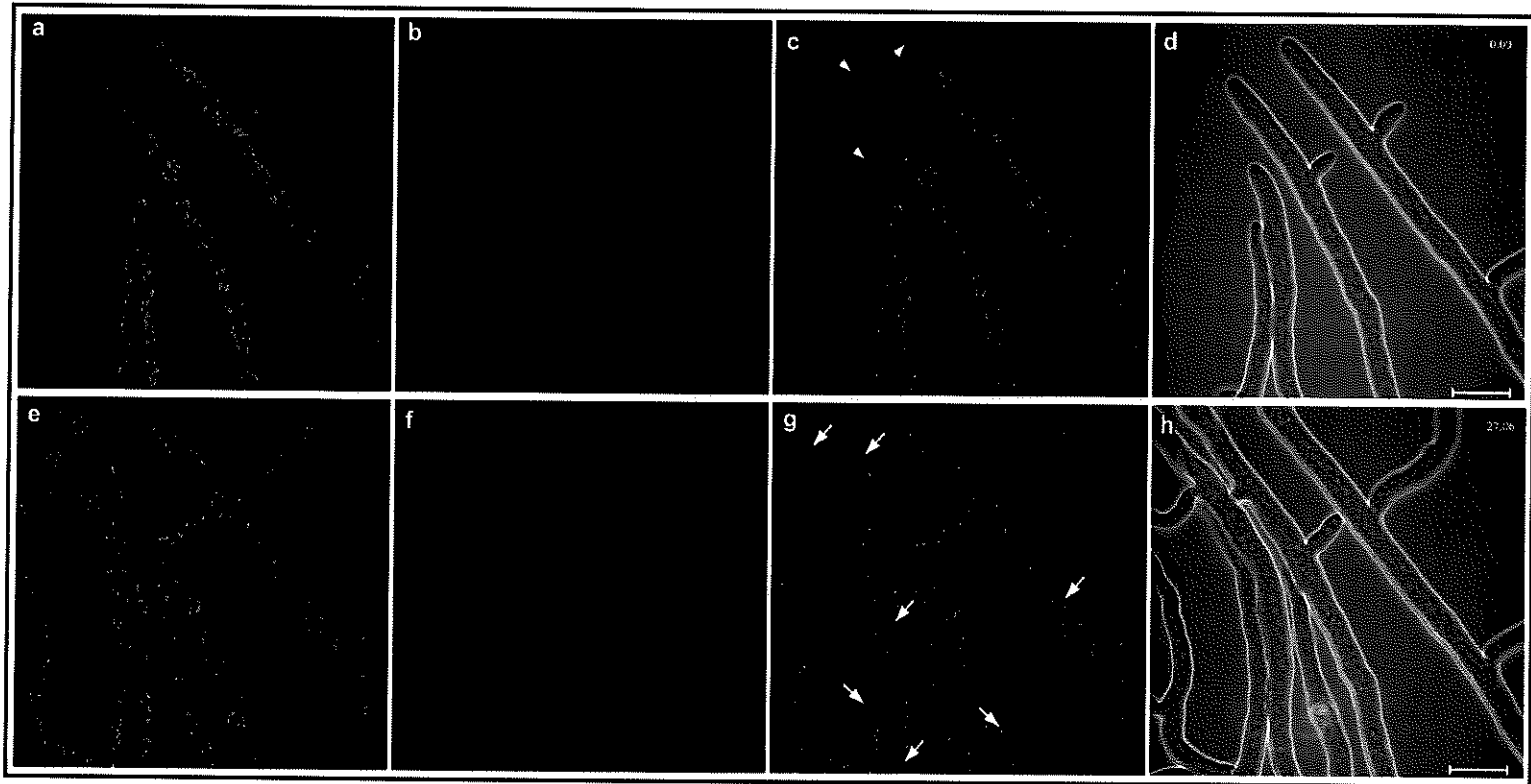


Figura 14. Distribución de la γ -tubulina-sGFP en diferentes regiones de hifas maduras en relación a la formación de septos, (a) y (e) muestran la γ -tubulina-sGFP, (b) y (f) tinción de membranas con FM4-64, (c) composición de (a) y (b), (g) composición de (e) y (f), y (d) y (h) imágenes por contraste de fases. Las flechas señalan los septos y las cabezas de flecha al Spk. El tiempo esta en min s⁻¹. Escala = 20 μ m.

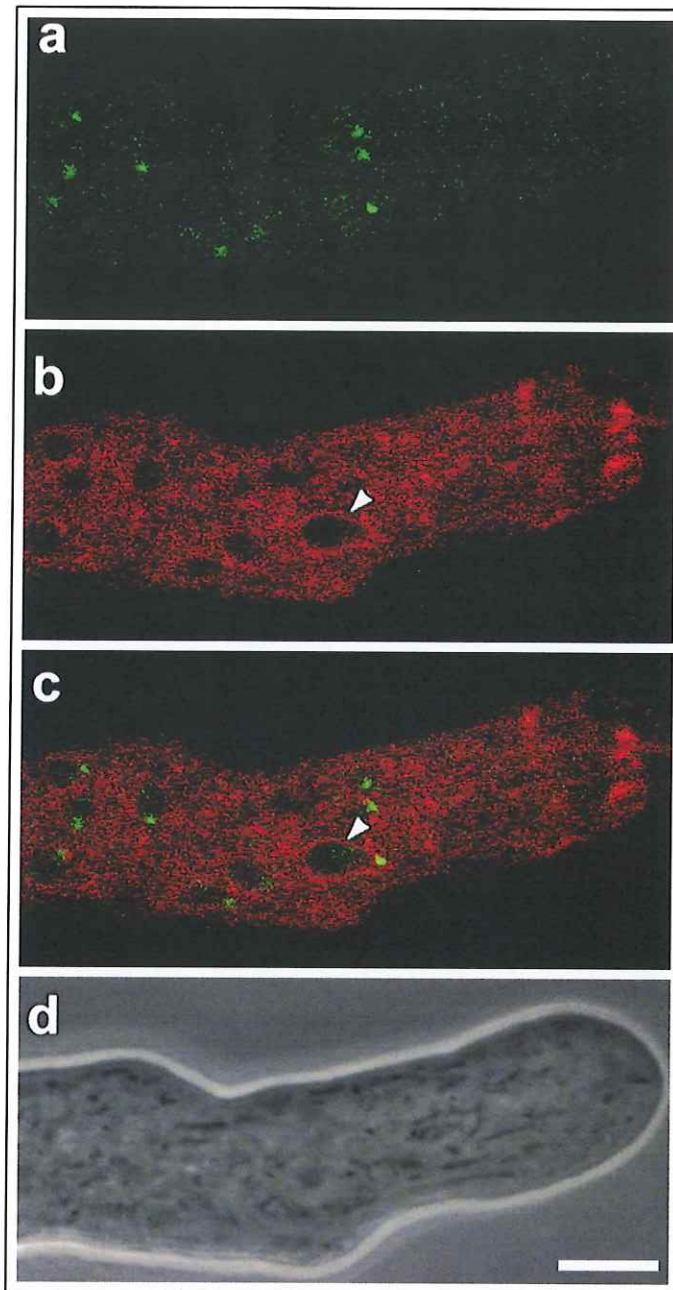


Figura 15. Asociación de la γ -tubulina al Retículo Endoplasmático (R. E.). La γ -tubulina se localiza en la región citoplásmica del núcleo anclada fuera del R. E. (a) imagen del la γ -tubulina-sGFP. (b) R. E. marcado con bodipy (c) composición de a y b, la γ -tubulina en verde y el R. E. en rojo. La cabezas de flecha señala al R. E. (d) imagen en contraste de fases. Escala=5 μ m.

Dinámica de la γ -tubulina durante interfase y mitosis.

Para tener mayor claridad de la ubicación y dinámica de la γ -tubulina en relación a los núcleos se fusionaron las cepas con la γ -tubulina-sGFP y la cepa con la dRFP-H1. Después de 6 horas de incubación, en las hifas con doble marcaje se observaron núcleos en los que el cuerpo polar se encontró marcado con fluorescencia verde (Figura 16).

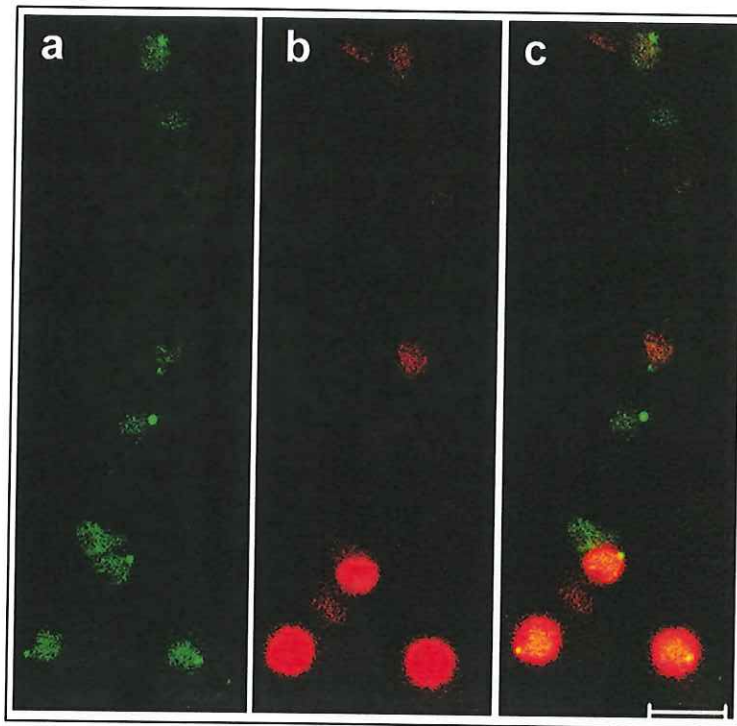


Figura 16. Germínula de la fusión vegetativa de la cepa XRM01RR con la cepa con la dRFP-H1. (a) canal de fluorescencia para la γ -tubulina-sGFP, (b) canal de fluorescencia para dRFP-H1 y (c) Composición de (a) y (b). Escala = 5 μ m.

En hifas maduras todos los núcleos observados muestran la señal de la proteína dRFP unida a la H1. Algunos núcleos presentan forma redondeada y otros tienen forma de pera con una pequeña protuberancia,

que corresponde al cuerpo polar del núcleo (SPB) y que es donde se asocia la γ -tubulina fluorescente (Figura 17).

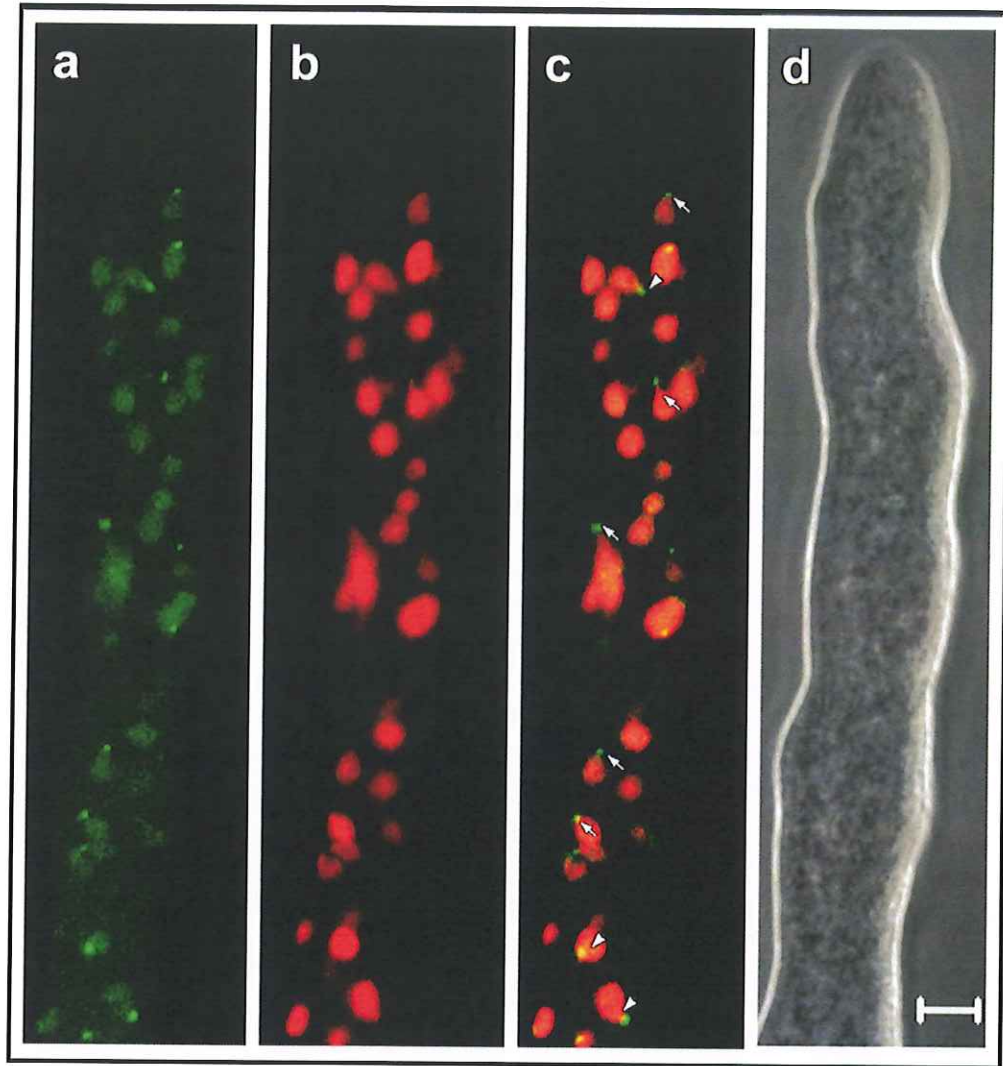


Figura 17. Hifa madura con la fusión vegetativa de la cepa con los núcleos marcados con H1::dRFP y otra con la γ -tubulina::sGFP. (a) distribución de la γ -tubulina::GFP. (b) núcleos marcados con H1::dRFP, (c) composición de (a) y (b), (d) imagen en contraste de γ -tubulina::GFP y H1::dRFP. Las flechas señalan los núcleos con movimiento anterógrado y las cabezas de flechas a los núcleos con movimiento retrógrado. Escala= 5 μ m.

Ocasionalmente se observaron núcleos que en lugar de un punto tenían 2 acumulaciones de γ -tubulina, localizados en polos opuestos, en estos el movimiento era mínimo o lentamente anterógrado (Figura 18). Después de cierto tiempo estos núcleos se dividen por mitosis y los dos núcleos hijos se mueven en direcciones opuestas.

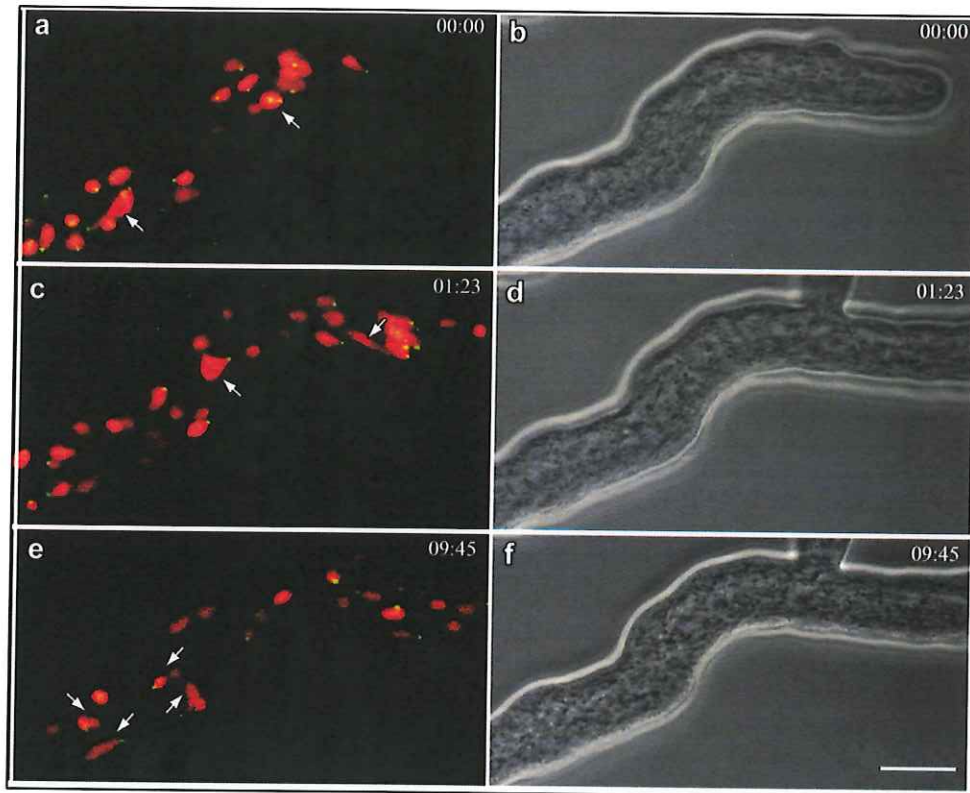


Figura 18. Serie de tiempo de una hifa madura con la fusión vegetativa de la hifa con los núcleos marcados con dRFP-H1 y otra con la γ -tubulina-sGFP. (a, c y e) distribución de la γ -tubulina::GFP, en verde, asociada a los núcleos marcados con dRFP-H1, en rojo. (b, d y f) Contraste de fases. Las flechas muestran los núcleos con dos SPBs. Escala= 5 μ m.

En *N. crassa* la mitosis dura aproximadamente 3 minutos desde el momento en que los SPBs se encuentran en extremos opuestos hasta que ocurre la separación de los núcleos (Figura 19).

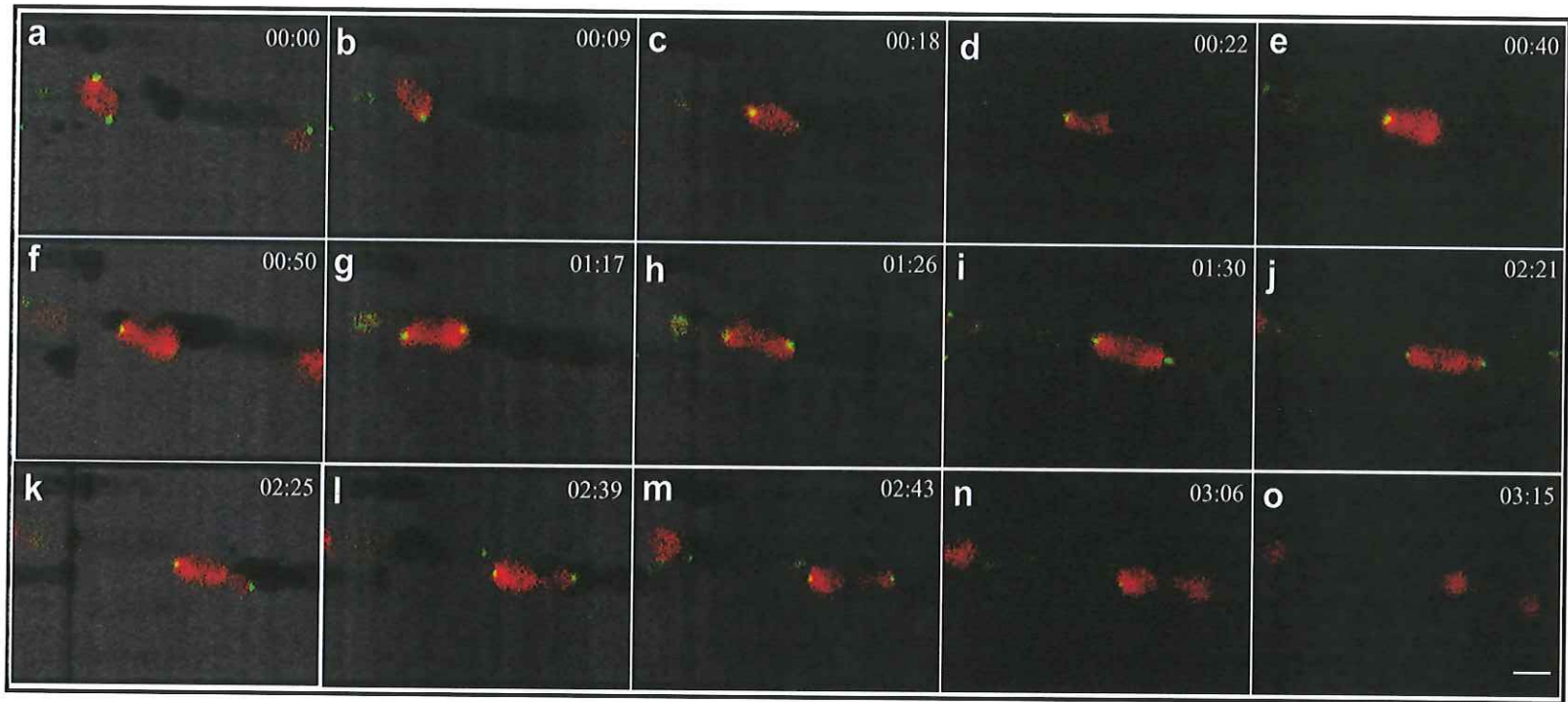


Figura 19. Serie de tiempo de un núcleo en mitosis. (a) núcleo con los SPBs en extremos opuestos en el tiempo. (c-m) alargamiento del núcleo e invaginación de la membrana nuclear, (m) separación de los núcleos. (o) desplazamiento de núcleos en direcciones opuestas. Tiempo min s⁻¹. Escala= 5 μ m.

La fusión vegetativa de la cepa con la dRFP-H1 y la cepa con la γ -tubulina-sGFP (microtúbulos-sGFP) muestra que durante la interfase de los núcleos los microtúbulos citoplasmáticos están anclados a los SPBs, que es la región en donde la γ -tubulina se localiza (Figura 20).

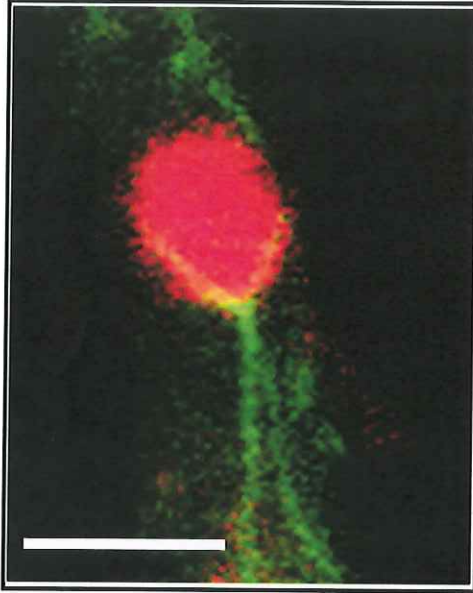


Figura 20. Imagen en 2D de la fusión de la cepa con la dRFP-H1 y la cepa con la γ -tubulina-sGFP en donde se muestran un par de Mts citoplasmáticos, en verde, asociados al SPB de un núcleo, en rojo. Escala=2 μ m.

Integridad del citoesqueleto microtubular y la distribución de la γ -tubulina

Al despolimerizar los microtúbulos (Mts) con benomilo, la distribución de los núcleos fue afectada, pero la γ -tubulina permanece asociada a los núcleos (Fig. 21). Los núcleos se encuentran a una mayor distancia del ápice en comparación con una hifa sin benomilo, además los núcleos se acumulan en una zona basal y su movimiento es nulo.

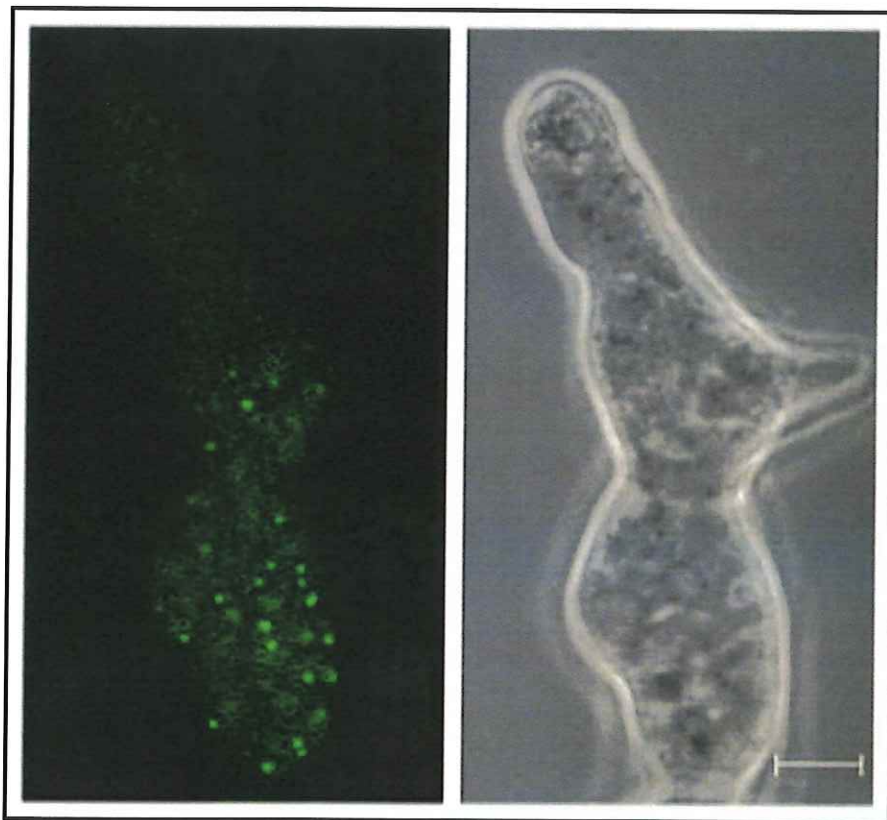


Figura 21. Imagen de hifas de la cepa XRM01RR expuestas a benomilo. (a) Canal fluorescente, (b) canal de contraste de fases. Escala = 5 μ m.

Discusión

El desarrollo de la técnica de marcaje con proteínas fluorescentes ha sido ampliamente utilizado desde su descubrimiento en 1992 (Prasher, 1992). Su empleo en hongos filamentosos ha permitido la observación *in vivo* de *diversas* proteínas y estructuras celulares (Fernandez-Abalos et al., 1998; Freitag et al., 2004; Horio y Oakley, 2005; Sampson y Heath, 2005; Moriño-Pérez et al., 2006). Utilizando ésta técnica se marcó la γ -tubulina en el hongo filamentoso *N. crassa* con la finalidad de resolver la incógnita sobre la localización de esta proteína, en virtud de que en algunos hongos se ha observado exclusivamente asociada a los núcleos y en otros tiene otras localizaciones (Oakley, E. C. y B. R. Oakley, 1990; Horio et al., 1991; Joshi et al., 1992; Félix et al., 1994; McDonald, 1993; Muresan et al., 1993; McDaniel y Roberson, 1998; Chabin-Brion, 2001; Heitz, 2001; Straube, 2003).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la γ -tubulina se encuentra acumulada como puntos brillantes asociados a los núcleos, localizada específicamente en los SPBs. Estos resultados concuerdan con las observaciones iniciales sobre esta proteína (Oakley, B. R. et al., 1990) cuando por inmunolocalización encontraron que la γ -tubulina se encuentra en los SPBs del hongo filamentoso *A. nidulans*. En otros organismos, en células humanas (He-La), en fibroblastos de ratón y, en células de *Drosophila melanogaster*, y en esperma de *Xenopus* la γ -tubulina se

encuentra en la región pericentriolar (Zheng et al., 1991; Joshi et al., 1992; Félix et al., 1994).

Sin embargo existen evidencias en las que se ha demostrado la existencia de MTOCs formados por γ -tubulina fuera del núcleo. Por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* se ha localizado γ -tubulina en los SPBs y en sitios citoplasmáticos (Horio et al., 1991), en *Ustilago maydis* la proteína se distribuye de igual forma (Straube et al., 2003; Fink y Steinberg, 2006), en *Allomyces macrogynus* se encontró γ -tubulina en los SPBs y en el Spk (McDaniel y Roberson, 1998), en plantas se encontró γ -tubulina asociada a membranas (Dryková et al., 2003) y en células hepáticas de ratón se encontró γ -tubulina asociada al aparato de Golgi (Chabin-Brion et al., 2001). Las imágenes de microscopía confocal de la cepa XTRM01RR, obtenidas en este estudio muestran una gran acumulación de γ -tubulina fluorescente en los SPBs, y una señal tenue de la proteína en el citoplasma, que podría corresponder a moléculas de γ -tubulina-sGFP citoplasmática, pero no se observa γ -tubulina asociada a estructuras membranosas como las vesículas del Spk, el aparato de Golgi, ni con el Retículo Endoplasmático. Esto indica que a pesar de que la γ -tubulina está conservada entre los organismos eucariotas (Oakley, B. R. y Y. N. Akkari, 1999), su distribución es variable. En el quitridiomíceto *A. macroginus* se ha propuesto que la γ -tubulina en el Spk constituye un MTOCs regulando la nucleación, polaridad y distribución de los Mts en la punta (McDaniel y Roberson, 1998), sin embargo el ascomiceto *N. crassa* no existe γ -tubulina en el Spk, aunque si hay

del ápice de las ramas de las hifas (Mouriño-Pérez et al., 2006). En *A. nidulans* la mutación del gen de la γ -tubulina anula la formación del huso mitótico, pero no el ensamblaje de los microtúbulos citoplasmáticos (Martin, M. A. et al., 1997). Esto genera la pregunta si en *N. crassa* existen otras proteínas que se encarguen de la nucleación de los Mts además de la γ -tubulina.

En el hongo *U. maydis* y en diversas células animales la γ -tubulina citoplasmática constituye MTOCs citoplasmáticos (Gueth-Hallonet et al., 1993; Yvon y Wadsworth, 1997; Vorobjev et al., 1997; Straube et al., 2003; Fink y Steinberg, 2006), sin embargo, en este trabajo no se tiene evidencia suficiente que indique que en *N. crassa* las moléculas de γ -tubulina citoplasmáticas funcionen como MTOCs extranucleares, pero es posible que la γ -tubulina citoplasmática sea reclutada en el SPBs de los núcleos que entran en mitosis. En *U. maydis* se demostró que durante la profase temprana hay un aumento de la concentración de la proteína en el SPB y al mismo tiempo un decremento de la concentración en el citoplasma (Straube et al., 2003), en células animales también se ha observado el incremento de la concentración de la γ -tubulina en los centrosomas (Khodjakov y Rieder, 1999). Para demostrar esto es necesario realizar la medición de la concentración de la proteína en el citoplasma y en los SPBs.

En el heterocarión obtenido por fusión observamos núcleos rojos (dRFP::H1) con una pequeña acumulación fluorescente verde de γ -tubulina en un extremo, y algunos presentaron dos puntos fluorescentes. Durante la

mitosis los núcleos poseen dos SPBs en polos opuestos, debido al inicio de la mitosis el SPB se divide, y uno migra hacia extremo opuesto del núcleo (Zickler, 1970; Serna y Stadler, 1978; Van Winkle et al., 1971). La asociación de la γ -tubulina a los SPBs en *Schyzosaccharomyces pombe* es mayor durante la mitosis que durante la interfase, lo que sugiere que la acumulación de γ -tubulina en los SPBs está regulada por el ciclo celular (Horio et. al, 1991). De acuerdo a esto y a la evidencia obtenida, se puede decir que los núcleos que presentan una sola señal de γ -tubulina están en interfase y los que tienen dos puntos están en mitosis. Estas acumulaciones de γ -tubulina tienen como función organizar Mts citoplasmáticos en husos mitóticos.

A pesar de que la γ -tubulina es un componente importante de los Mts, la despolimerización de estos últimos con benomilo no afectó su asociación con los SPBs de los núcleos, sin embargo si afectó la distribución de los núcleos (Ramos-García, 2007).

Conclusiones

- La γ -tubulina::sGFP se encuentra asociada a los cuerpos polares de núcleos (SPBs) en el hongo filamentoso *N. crassa*. No existe asociación de la γ -tubulina con el Spk, ni con los septos.
- La despolimerización de los microtúbulos con benomilo no afecta la asociación de la γ -tubulina con los SPBs. Aunque la distribución de los núcleos si es afectada.
- Estas evidencias nos sugieren que a nivel molecular la γ -tubulina esta organizada de manera diferente en el ascomiceto *N. crassa* y en el quitridiomyceto *A. macrogynus*.

Referencias

- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: Outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. pp. 1-25
- Bartnicki-García, S. y E. Lippman. 1969. Fungal morphogenesis: Cell wall reconstruction in *Mucor rouxii*. *Science*. 165: 302-304.
- Beadle, G. W. y E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27: 499-506.
- Barja, F., M. Jaramillo-Maranon, C. Rossier y G. Turian. 1992. Differential effects of griseofulvin and benomyl on morphology and nuclear distribution during the germination of *Neurospora crassa* macroconidia. *Mycological research*. 96: 147-150.
- Brinkley, B. R. 1985. Microtubule organizing centers. *Cell Biology I*: 145-172.
- Buster, D., K. McNally y F. J. McNally. 2001. Katanin inhibition prevents the redistribution of γ -tubulin at mitosis. *Journal of Cell Science*. 115: 1083-1022.
- Caudron, N., I. Arnal, E. Buhler, D. Job y O. Valiron. 2002. Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 50973-50979.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Pérez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, y Poüs. 2001. The Golgi Complex Is a Microtubule-organizing Organelle. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 2047-2060.

- Derksen, J. y A. M. Emons. 1990. Microtubules in tip growth systems. In *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*. Academic Press, pp 147-181.
- Dryková, D., V. Cenklová, S. Vadym, J. Volc, P. Dráber, y P. Binarová. 2003. Plant γ -tubulin interacts with $\alpha\beta$ -tubulin dimmers and forms membrane-associated complexes. *The Plant Cell*. 15:465-480.
- Erickson, H. P. 2000. γ -tubulin nucleation: template or protofilament? *Nature Cell Biology*. 2: E93-E96.
- Félix, M. A., C. Antony, M. Wright, y B. Maro. 1994. Centrosome assembly *in vitro*: Role of γ -tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *The Journal of Cell Biology*. 124:19-31.
- Fernandez-Abalos, J. M., H. Fox, C. Pitt, B. Wells, J. H. Doonan. 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 27: 121-130.
- Fink, G. y G. Steinberg. 2006. Dynein-dependent motility of microtubules and nucleation sites supports polarization of the tubulin array in the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*. 14: 3242-3253.
- Freitag, M., R. L. Williams, G. O. Kothe y E. U. Selker. 2002. A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 99 (13):8802-8807.
- Freitag, M., P. C. Hickey, N. B. Raju, E. U. Selker y N. D. Read. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and

microtubule in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 41:897-910.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, K. A. Borkovich, E. U. Selker, N. D. Read, D. Jaffe, W. FitzHug, L. J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C. B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Lanakiev, D. Bell Pedersen, M. A. Nelson, M. Werner-Washburne, C. P. Selitrennikoff, J. A. Kinsey, E. G. Braun, A. Zelter, U. Schultze, G. O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, S. 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. Metzenberg, D. D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R. J. Pratt, S. A. Osmani, C. P. DeSouza, L. Glass, M. J. Orbach, J. A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamman, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D. O. Natvig, L. A. Alex, G. Manhaupt, 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 fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422 (6934):859-68.

Geitmann, A. y A. M. C. Emons. 2000. The cytoskeleton in plant and fungal cells tip growth. *Journal of Microscopy*. 198: 218-245.

Girbardt, M. 1979. A microfilamentous septal belt (FSB) during induction of cytokinesis in *Trametes versicolor* (L. ex Fr.). *Expl Mycol*. 3, 215-228.

- Glass, N. L., J. Grotelueshen y R. L. Metzenberg. 1990. *Neurospora crassa* A mating-type region. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 87: 4912-4916.
- Gooday, G. W. 1983. The hyphal tip. In: Smith, J. E. (Ed). Fungal Differentiation. Marcel Dekker, New York, pp. 315-356.
- Gow, N. A. R. 1989. Control of the extension of the hyphal apex. Current Topics in Medical Mycology. 3:109-152.
- Griffiths, A. J. F. y K. McCluster. 2007. The Neurospora home page. Fungal Genetics Stock Center.
- Grove, S. N. y C. E. Bracker. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. Journal of Bacteriology. 104: 989-1009.
- Gueth-Hallonet, C., C. Antony, J. Aghion y A. Santa-Maria, I. Lajoie-Mazenc, M. Wright, y B. Maro. 1993. γ -tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. Journal of Cell Science. 105: 157-166.
- Haimo, L. T. 1997. Ordering microtubules. BioEssays. 19:547-550.
- Harold, F. M. 1990. To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews 54: 381-431.
- Harold, F. M. 1997. How hyphae grow: morphogenesis explained?. Protoplasma 197: 137-147.
- Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, y M. Momany. 2005. Polarizome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genome Converge. Eukaryotic Cell. 4.2: 225-229.

- Hasek, J. y S. Bartnicki-Garcia. 1994. The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. Archives of Microbiology. 161: 363-369.
- Heath, I. B. 1981. Nucleus-associated organelles in fungi. Cytology. 69: 191-221.
- Heath, I. B., M. C. Heath y F. Herr. 1982. Motility systems in fungi. Symposia of the Society for Experimental Biology. 35: 563-587.
- Heath, I. B. y S. G. Kaminskyj. 1989. The organization of tip-growth related organelles and microtubules revealed by quantitative analysis of freeze-substituted oomycete hyphae. Journal of Cell Science 93: 41-52.
- Heitz, M. J., J. Petersen, S. Valovin y I. M. Hagan. 2001. MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. Journal of Cell Science. 114: 4521-4532.
- Hickey, P. C., S. R. Swift, M. G. Roca, y N. D. Read. (2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. Methods in Microbiology 34:63-87.
- Hoch, H. C. y R. C. Staples. 1985. The microtubule cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germlings: its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytoskeleton. Protoplasma 124: 112-122.
- Horio, T., S. Uzawa, M. K. Jung, B. R. Oakley, K. Tanaka y M. Yanagida. 1991. The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. Journal of Cell Science. 99: 693-700.
- Horio, T. y B. R. Oakley. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. Molecular Biology of the Cell. 16:918-926.

- Howard, R. J. y J. R. Aist. 1977. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D₂O. *Protoplasma*. 92:195-210.
- Howard, R. J. y J. R. Aist. 1980. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-carbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *Journal of Cell Biology*. 87: 55-64.
- Howard, R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenköper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *Journal of Cell Science* 48: 89-103.
- Joshi, H. C., M. J. Palacios, L. McNamaray y D. W. Cleveland. 1992. γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle dependent microtubule nucleation. *Nature*. 356: 80-83.
- Keating, T. J. y G. G. Borisy. 2000. Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nature Cell Biology*. 2: 352-357..
- Kimble, M. y R. Kuriyama. 1992. Functional components of microtubule-organizing centers. *Cytology*. 136: 1-50.
- Khodjakov, A. y C. L. Rieder. 1999. The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throught the cell cycle, do not require microtubules. *Journal of Cell Biology*. 146: 585-589.
- Legerton, T. L. y C. Yanofsky. 1985. Cloning and characterization of the multifunctional his-3 gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 39:129-140.

- Liu, B., H. C. Joshi, T. J. Wilson, C. D. Silflow, B. A. Palevitz y P. Snustad. 1994. γ -tubulin in Arabidopsis: Gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell*. 6: 303-314.
- Lodish, H, A. Berk, S. L. Ziúrsky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell . 2001. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- López, I., S. Khan, M. Sevlk, W.Z. Cande y P. J. Hussey. 1995. Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays* γ -tubulin. *Plant Physiology*. 107: 309-310.
- Lowry, D. S., K. E. Fisher y R. Roberson. 1998. Establishment and maintenance of nuclear position during zoospore formation in *Allomyces macrogynus*: Roles of the cytoskeleton. *Fungal Genetics Biology*. 24: 34-44.
- Martin, L. Pall - Department of Genetics and Cell Biology and Department of Biochemistry/Biophysics, Washington State University, Pullman. <http://www.fgsc.net/fgn/pall1.html>.
- Martin, M. A., S. A. Ozmani y B. R. Oakley. 1997. The role of γ -tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*. 110:623-633.
- Marschall, L. G., R. L. Jeng, J. Mulholland y T. Stearns. 1996. Analysis of Tub4p, a yeast γ -tubulin-like protein: Implications for microtubule-organizing center function. *Journal of Cell Biology*. 134: 443-454

- Mazia, D. 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Cytology*. 100: 49-92.
- McDaniel, D. P. y R. W. Roberson. 1998. γ -tubulin is a component of the Spitzenkörper and centrosomes in hyphal-tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*. 203: 118-123.
- McDaniel, D. P. y R. W. Roberson. 2000. Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cell of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 233-244.
- McDonald, A. R., B. Liu, H. C. Joshi y B. A. Palevitz. 1993. γ -Tubulin is associated with a cortical microtubule organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L. *Planta*. 191: 357-361.
- McNally, L. T. y S. J. Free. 1988. Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Current Genetics*. 14:545-55.
- Moritz, M., Y. Zheng, B. M. Alberts y K. Oegema. 1998. Recruitment of the γ -tubulin Ring Complex to Drosophila Salt-stripped Centrosome Scaffolds. *Journal of Cell Biology*. 142: 775-786
- Moritz, M. y D. A. Agard. 2001. γ -tubulin complexes and microtubules nucleation. *Structural Biology*. 11:174-181.
- Mouriño-Pérez, R. R., R. W. Roberson, y S. Bartnicki-García. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 43: 389-400.

- Muresan, V., H. C. Joshi, y J. C. Bersharse. 1993. γ -tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epitelia. *Journal of Cell Science*. 104: 1229-1237.
- Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii y H. Inoue. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(33): 12248-12253.
- Oakley, B. R. y N. R. Morris. 1980. Nuclear movement is γ -tubulin - dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 19:255-262.
- Oakley, B. R. y Akkari, Y. N. 1999. γ -Tubulin at ten: progress and prospects. *Cell Structure and Function*. 24:365-372.
- Oakley, B. R. 1992. γ -Tubulin: the microtubule organizer?. *Trends Cell Biology*. 2: 1-5.
- Oakley, B. R. y J. E. Rinehart. 1985. Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. *Journal Cell Biology*. 101: 2392-2397.
- Oakley, C. E. y B. R. Oakley. 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by the *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 338: 662-664.
- Oakley, B. R., C. E. Oackley, Y. Yoon y M. K. Jung. 1990. γ -tubulin is a component of the Spindle Pole Body That is Essential for Microtubule Function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 61:1289-1301.

- motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genetics Biology. 37: 171-179.
- Riquelme, M., R. Fisher y S. Bartnicki-García. 2003. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. Protoplasma. 222: 211-215.
- Roberson, R.W. y M. S. Fuller. 1988. Ultrastructural aspects of the hyphal tip of *Sclerotium rolfii* preserved by freeze substitution. Protoplasma 146: 143-149
- Roberson, R.W. y M. M. Vargas. 1994. The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. Protoplasma. 182: 19-31.
- Rountree, M. R. y E. U., Selker. 1997. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. Genes & Development. 11 (18):2383-2395.
- Sampson, K. y I. B. Heath. 2005. The dynamic behavior of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 151: 1543-1555.
- Staben, C., B. Jensen, M. Singer, J. Pollock, M. Schechtman, J. Kinsey y E. Selker. 1989. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. Fungal Genetics Newsletter. 36:79-81.
- Staben, C. y C. Yanofsky. 1990. *Neurospora crassa* a mating-type region. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 87: 4917-4921.

- Serna, L. y D. Stadler. 1978. Nuclear division cycle in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 136: 341-351.
- Sobel, S. G. y M. Snyder. 1995. A highly divergent γ -tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Cell Biology*. 131: 1775-1788.
- Straube, A., M. Brill, B. R. Oakley, T. Horio, y G. Steinber. 2003. Microtubule organization requires cell cycle dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing center in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*. 14:642-657.
- Steinberg, G. y M. Schliwa. 1993. Organelle movements in the wild type and wall-less fz;sg;os-1 mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *Journal Cell Biology*. 106: 555-564.
- Thompson-Cofee, C. y D. Zickler. 1992. Three microtubule-organizing centers are required for ascus growth and sporulation in the fungus *Sordaria macrospore*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 4: 257-273.
- Trinci, A. P. J. 1978. Wall and hyphal growth. *Science Program of Oxford* 65: 75-99.
- Vorobjev, I. A., T. M. Svitkina y G. G. Borisy. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *Journal of the Cell Science*. 110: 2635-2645.
- Winkle, V., J. J. Bieseley y R. P. Wagner. 1971. The mitotic spindle apparatus of *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*. 13:873-887.

- Wick, S. W. 1985. Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/cytokinetic and interphase microtubule arrays. *Cell Biology Reproduction* 9: 357-371.
- Yvon, A. M. y P. Wadsworth. 1997. Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *Journal of Cell Science*. 110:2391-2401.
- Zheng, Y., k. Jung y B. R. Oakley. 1991. γ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*. 65: 817-823
- Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts y T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378: 578-583.
- Zickler, D. 1970. Division spindle and centrosomal plaques during mitosis and meiosis in some *Ascomycetes*. *Chromosoma*. 30: 287-304.

Apéndice

Recetas para medios de cultivo

Medio FIGS (1 L)	Cantidad
Sales de Vogel 50X	20 ml
Agar	10 g
Agua destilada	880 ml

Después de esterilizar añadir 100 ml de solución FIGS 10 X.

Solucion de FIGS 10 X (1 L)	Cantidad
Sorbosa	200g
Fructosa	5 g
Glucosa	5 g
Inositol	2 g
Agua destilada aforar a	1 L

Llevar el volumen a un litro y esterilizar por filtración (0.22 µm).

Sales de Vogel 50 X :

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

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

El volumen total es de 1 L. Agregar 2 ml de cloroformo como conservador y se almacena a 4 °C.

Medio de recuperación* (1L)	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	6 ml
Sorbitol	54.6 g
Extracto de levadura	6 g
H2O destilada	252 ml

El medio se esteriliza por autoclave y después se agregan 30 ml de la solución de FIGS 10 X.

Medio completo de Vogel* (1 L)	Cantidad
Agua destilada	20 ml
Caseína	20 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agar	15 g
Sacarosa	15 g
Sales de Vogel 50 X	aforar a 1 L

Medio completo de Vogel-liquido * (1 L)	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Extracto de levadura	0.5 g
Caseína	0.5 g
Agua destilada	aforar a 1 L

Medio mínimo de Vogel * (1 L)	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	aforar a 1 L

*Esterilizar por autoclave

Medio minimo de Vogel- Cantidad liquido * (1 L)	
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Agua destilada	aforar a 1 L

Medio agar agua * Cantidad (1 L)	
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Agar	15 g
Agua destilada	aforar a 1 L

Medio minimo de Vogel * Cantidad (1 L)	
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Agua destilada	aforar a 1 L

Medio sintético de cruzas * Cantidad (500 ml)	
KNO ₃	0.50 g
K ₂ HPO ₄	0.35 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
NaCl	0.05 g
CaCl ₂	0.05 g
Elementos traza	50 µl
Biotina	50 µl
Agar	10 g
Agua destilada	aforar a 500 ml

*Esterilizar por autoclave

Para preparar la solución de elementos traza en un volumen de 95 ml de agua destilada, disolver con agitador magnético sucesivamente las siguientes soluciones:

Solución de elementos traza (100 ml)	Cantidad
ácido cítrico, 1 H ₂ O	5.00 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	5.00 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	1.00 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

Agregar 1 ml de cloroformo como conservador, y almacenar a temperatura ambiente.

L-histidina (25 mg ml⁻¹)	Cantidad
L-histidina	1.250 g
Agua destilada	50 ml

Esterilizar por filtración (0.25 µg).

LB* (1 L)	Cantidad
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	aforar a 1 L

LB-líquido* (1 L)	Cantidad
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g
NaCl	10 g
Agua destilada	aforar a 1 L

***Esterilizar por autoclave**

Tabla IV. Descripción del genotipo de las sepas de *N. crassa* utilizadas en este trabajo.

Símbolo	Descripción	Referencia
mat a	Tipo de apareamiento a Región de 3.2 kb. Contiene dos segmentos funcionales, el primer segmento mat a-1 (382 a. a.) responsable de la identidad de apareamiento, de la inducción de peritecios y la incompatibilidad vegetativa. La segunda región no contiene un marco de lectura abierto.	Staben, C. y C. Yanofsky, 1990
mt A	Tipo de apareamiento A Región de 5.1 kb Contiene dos segmentos funcionales, el primer segmento mat A-1 (288 a. a.) responsable de la identidad de apareamiento, de la inducción de peritecios y la incompatibilidad vegetativa.	Glass, N. L, et al., 1990.
74-OR23-1VA	Esta sepa es utilizada como tipo silvestre convencional. Se genero por retro cruza. Fue la sepa utilizada en la secuenciación del genoma de <i>N. crassa</i> (Galagan et al., 2003). Sepa con el fondo genético Oak Ridge 23	Perkins, D. D., 2004
his-3	Proteína trifuncional de biosíntesis de histidina	Legerton y Yanofsky. 1985.
Sad-2	Supresor dominante de ascas-2 La proteína controla la localización perinuclear de SAD-1 (supresor dominante de ascas-1). Ambos genes regulan el silenciamiento genes homólogos impares durante el proceso de la meiosis.	Raju, N. B. et al., 2007.
Δ mus-51	Depleción del gen mutageno sensitivo-51 La proteína está involucrada en la reparación de la recombinación no-homologa de DNA de doble hebra.	Ninomiya, Y. et al., 2004.
bar+	Gen de Basta-resistencia de bacteria. Ha sido utilizado como marcador de selección en hongos (Avalos et al. 1992; Straubinger, et al., 1992). Es un gen de resistencia a bialaphos (péptido derivado de gulfosinato), componente activo del herbicida Basta.	Martin L. Pall
hph+	Gen de resistencia al antibiótico higromicina	Staben, C. et al., 1989
ridRIP4	Gen deficiente de RIP4 Gen de inducción-repetida de mutación puntual (RIP-por sus siglas en inglés Repeated-Induced Point Mutation)	Freitag, M. et al. 2002
Pccg-1	Promotor fuerte constitutivo de <i>N. crassa</i> . Gen reprimible de glucosa	McNally, L. T. y S. J. Free. 1988.
hH1::drfp	Histona 1 (Folco et al., 2003) marcada con la proteína dimerica roja fluorescente	Freitag, M. et al., 2004
Bml::sgfp+	β -tubulina con la proteína verde fluorescente en el carboxi terminal.	Freitag, M. et al., 2004
tbg::sgfp	γ -tubulina con la proteína verde fluorescente en el carboxi Terminal.	Este trabajo