

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**CARACTERIZACION DE LA MUTANTE DE
CORONINA EN EL HONGO FILAMENTOSO**
Neurospora crassa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

RAMÓN OSVALDO ECHAURI ESPINOSA

Ensenada, Baja California, Septiembre 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**CARACTERIZACION DE LA MUTANTE DE
CORONINA EN EL HONGO FILAMENTOSO**
Neurospora crassa

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

QUE PRESENTA

RAMÓN OSVALDO ECHAURI ESPINOSA

APROBADO POR:

DRA. ROSA REINA MOURIÑO PÉREZ
Presidente del Jurado

DR. CARLOS MARQUEZ BECERRA

DRA. AMELIA PORTILLO LOPEZ

Ensenada, Baja California, Septiembre 2008

Agradecimientos

Al **C**entro de **I**nvestigación **C**ientífica y **E**ducación **S**uperior de **E**nsenada y a la **U**niversidad **A**utónoma de **B**aja **C**alifornia, especialmente la **F**acultad de **C**iencias por facilitarme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo de tesis.

A la **D**ra. **R**osa **M**ouriño por el esfuerzo de aguantarme, alentarme y apoyarme paciente...muy pacientemente!

Al **D**r. **S**tephano por haberme educado, instruido y enseñado tanto dentro del laboratorio. Al **D**r. **C**arlos **M**árquez por sus consejos y el apoyo brindado durante toda la carrera.

A las **A**rdillas del laboratorio.

A mis **P**adres...por todo, todo, todo, todo, todo, todo, todo..... su apoyo incondicional.

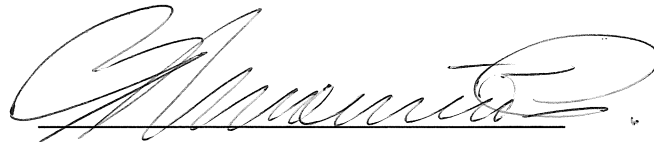
A mi novia **Y**amilé...creo que ella aguanto mas que todos...

Dedicatoria

A mis padres...Gracias!

Resumen de la tesis de Ramón Osvaldo Echauri Espinosa presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2008.

Resumen aprobado por:



DRA. ROSA REINA MOURINO PÉREZ
Director de Tesis

Resumen:

Existe una gran cantidad de proteínas que interactúan con el citoesqueleto de actina, las cuales son responsables de regular el ensamblaje, organización y función que este desempeñara.

La coronina es una proteína asociada a actina. Pertenece a la familia WD (Tryptofano-Aspartato) repetitiva y juega un papel importante en varios procesos de regulación de actina. Es encontrada en organismos que van desde las levaduras hasta los humanos. Esta proteína se encarga de unir filamentos de actina y de la regulación negativa del complejo Arp2/3 y de muchos procesos fisiológicos dependientes de actina.

El citoesqueleto de actina provee de un marco estructural que da forma a la célula y define la polaridad así como también juega un rol importante en procesos tales como la endocitosis, exocitosis y la remodelación de la pared celular. Estos procesos son sumamente importantes en el crecimiento polarizado característico de hongos filamentosos.

Este trabajo es el primer reporte del papel que desempeña la proteína coronina en hongos filamentosos. Se encontró que la mutación de *cor1* provocó alteraciones en la morfología de la colonia y de las hifas, en el proceso de ramificación, el índice de conidiación así como también tuvo fuertes efectos en la polaridad y dirección del crecimiento. También afectó varios procesos regulados por actina como el transporte de organelos y la endocitosis tanto en hifas maduras como en germínulas.

Palabras claves: coronina, actina, crecimiento polarizado, Spitzenkörper, endocitosis, exocitosis, *Neurospora crassa*.

Índice

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
3. Problema	11
4. Objetivos	12
4.1 Objetivos generales	12
4.2 Objetivos particulares	12
5. Metodología	13
5.1 Organismos y medios de cultivo	13
5.2 Cruza de cepas	13
5.3 Imágenes de morfología macroscópica	14
5.4 Índice de ramificación	15
5.5 Medición de Biomasa	15
5.6 Conidiación	
5.7 Tasa de crecimiento	16
5.8 Transformación de <i>N. crassa</i> mutante de <i>cor1</i> con fimbrina-sGFP	17
5.9 Microscopia	18
5.9.1 Microscopía de contraste de fases	18
5.9.2 Microscopía de epifluorecencia	18
5.9.3 Microscopía confocal	19

5.9.4 Microscopía de electrónica de barrido	20
6. Resultados	21
6.1 Morfología de la mutante <i>cor1</i> de <i>N. crassa</i> .	21
6.2 Cinética de crecimiento	24
6.3 Características del Spk	29
6.4 Distribución de organelos	32
6.5 Germinación	35
6.6 Endocitosis	38
6.7 Fim-sGFP en mutante de <i>cor1</i>	40
6.8 Modelos del crecimiento polarizado, endocitosis y exocitosis en hifas maduras y germínulas en la mutante de <i>cor1</i> .	43
7. Discusiones	46
8. Conclusiones	52
9. Referencias	53
10. Apéndices	62

Lista de figuras

	Pagina
Figura 1 Dominios estructurales de los sitios de unión a F-actina de coronina. (a) Estructura de la coronina 1A. (b) Dominios estructurales, los colores corresponden a los de (a) y las líneas rojas a los sitios de unión a F-actina. Imagen de Uetrecht y Bear, (2006)	5
Figura 2 Morfología macroscópica de la colonia de la cepa mutante de <i>cor1</i> (A-C) y de la cepa silvestre (D- F).	22
Figura 3 Imagen a 25X del margen de la colonia de <i>N. crassa</i> de la cepa mutante de <i>cor1</i> (A) y de la cepa silvestre (B). Escala = 2 mm.	22
Figura 4 Serie de tiempo del crecimiento de <i>N. crassa</i> mutante de <i>cor1</i> (A-D) y silvestre (E-H) obtenida por microscopia de contraste de fases. Tiempos en min:ss Escala= 10 μ m.	23
Figura 5 Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de la cepa mutante de <i>cor1</i> . Escala = 20 μ m	24
Figura 6 Tasa de elongación micelial (cm día ⁻¹) de la mutante de <i>cor1</i> de <i>N. crassa</i> ■ y la cepa silvestre ■.	25
Figura 7 Índice de ramificación cada 100 μ m. de la mutante de <i>cor1</i> de <i>N. crassa</i> ■ y la cepa silvestre ■.	26
Figura 8 Producción de Biomasa (mg día ⁻¹) de la mutante de <i>cor1</i> de <i>N. crassa</i> ■ y la cepa silvestre ■.	26
Figura 9 Producción de conidias (mg d ⁻¹). ■ <i>N. crassa</i> silvestre, ■ <i>N. crassa</i>	27

■ y la cepa silvestre■.

- Figura 9** Producción de conidias (mg d^{-1}). ■ *N. crassa* silvestre, *N. crassa* mutante ■. 27
- Figura 10** Distribución de los septos en *N. crassa* mutante de *cor1* (A) y silvestre (B) teñidas con calcofluor. Escala 20 μm . 28
- Figura 11** Morfología y distribución del Spitzenkörper de *N. crassa* silvestre (A-C), y *N. crassa* mutante *cor1* (D-F). Los paneles (A y D) muestran el Spitzenkörper teñido con FM4-64 (5 μM). Los paneles (B y E) las imágenes por contraste de fases, y (C y F) son las composiciones de las imágenes del canal fluorescente y de contraste de fases. Las flechas señalan el Spitzenkörper. Escala 10 μm . 30
- Figura 12** Localización, distribución y dinámica del Spk en el crecimiento polarizado de *N. crassa* mutante de *cor1* (A-J) y *N. crassa* silvestre (K-T). Los paneles (A-E y K-O) muestran la tinción con FM4-64 (5 μM). Los paneles (F-J y P-T) las imágenes por contraste de fases. Tiempos en min:ss. Escala 10 μm . 31
- Figura 13** Trayectoria del Spitzenkörper de la mutante de *cor1* (A) y de la cepa silvestre (B). La línea punteada en rojo representa un eje horizontal en línea recta, los cuadros la trayectoria del Spk y los asteriscos la ausencia del Spk. 32
- Figura 14** Morfología y distribución de las mitocondrias de *N. crassa* 33

silvestre (**A-C**) y *N. crassa* mutante de *cor1* (**D-F**). Los paneles (**A y D**) muestran las mitocondrias teñidas con MitofluorRed® (5 µM), los paneles (**B y E**) las imágenes por contraste de fases. (**C y F**) son la composición de las imágenes del canal fluorescente y de contraste de fases. Las flechas blancas señalan la morfología de las mitocondrias. Escala = 10µm

- Figura 15** Imagen de la distribución nuclear en la cepa mutante de *cor1* (**A-C**) y en la cepa Silvestre (**D-F**). Marcaje realizado con FM4-64. Escala = 10µm **34**
- Figura 16** Serie de tiempo de la germinación en la mutante de *cor1* (**F-O**) y la cepa silvestre (**A-E**). Tiempos en h: min. Escala = 5 µm **36**
- Figura 17** Germínulas de la mutante de *cor1* (**A y B**) y de la cepa silvestre (**C y D**). En (**A y C**) se muestran las germínulas teñidas con calcofluor. En (**B y D**) se muestra la imagen por contraste de fases. **37**
- Figura 18** Tinción de germínulas con FM4-64 después de 4 h de incubación de la mutante *cor1* (**A**) y de la cepa silvestre (**B**). Los paneles (**B y E**) muestran la imagen por contraste de fases y (**C y F**) muestran la composición del canal de fluorescencia y el de contraste de fases. Las flechas señalan parches y las cabezas de flecha el Spk. Escala = 10µm **38**
- Figura 19** Internalización del colorante FM4-64 en la mutante de *cor1* (**A-D**) y en la cepa silvestre (**E-H**). Tiempos en min:ss. **39**

- Figura 20** Serie de tiempo de la localización de Fim-sGFP en la mutante de *cor1*. Los paneles **(A y D)** muestran Fim-sGFP. **(B y E)** son la imagen por contraste de fases y **(C y F)** la composición del canal de fluorescencia con el de contraste de fases. Tiempo en min:ss Escala = 10 μ m **41**
- Figura 21** Serie de tiempo de la distribución y localización del Spk y la proteína fimbrina marcada con sGFP en la mutante de *cor1*. Los paneles **(A-D)** muestran la colocalización de Fim-sGFP y el colorante FM4-64. Los paneles **(E-H)** muestran el canal de fluorescencia de la proteína Fim-sGFP y los paneles **(I-L)** muestran la tinción con FM4-64. Tiempo en min:ss. Escala = 10 μ m. **42**
- Figura 22** Modelo del crecimiento polarizado, dinámica de los parches de Fim-sGFP y dirección de la exocitosis en la mutante de *cor1* **(A)** y en la cepa silvestre **(B)**. Los puntos rojos muestran la presencia del Spitzenkörper, los puntos verdes los parches de fimbrina, las flechas color rojo la expansión de la membrana durante el crecimiento isotropico y las líneas punteadas color negro las ramificaciones. **44**
- Figura 23** Modelo del desarrollo del tubo germinativo en la mutante de *cor1* **(a)** y en la cepa silvestre **(b)**. Las líneas punteadas indican el desarrollo de un nuevo tubo germinativo **45**

Introducción:

El crecimiento vegetativo en hongos filamentosos ocurre principalmente a través de la elongación de las hifas desde el ápice. Un hongo filamentoso se compone de un gran número de hifas, las cuales tienen la característica de crecer de manera polarizada. Esta forma de crecimiento permite a la célula expandirse polarmente en una sola dirección, formando células con forma cilíndrica donde se establece un solo sitio de crecimiento el cual se mantendrá siempre constante. Este tipo de crecimiento polarizado toma lugar en la mayoría de los filos de células eucariotas (Taheri-Talesh *et al.*, 2008), y es de principal importancia en el crecimiento neuronal, del crecimiento del tubo germinativo del polen de plantas vasculares, de hifas en hongos superiores y de extensiones celulares en células de mamíferos (Momany, 2002). Este tipo de crecimiento, es llevado a cabo en hongos mediante la adición de pared celular al ápice de la hifa el cual se caracteriza por presentar un acumulo de vesículas (Bartnicki-García *et al.*, 1995). Estas vesículas acarrean los componentes necesarios para la síntesis de la membrana y de la pared celular. Por lo tanto, la formación de pared celular es el resultado de un proceso de secreción, el cual básicamente depende de la polarización del aparato secretor de la célula (Bartnicki-García, 2002). A este aparato secretor de la célula se le denomina Spitzenkörper (Spk), también conocido como centro de suministro de

vesículas (VSC)*, el cual es una estructura compleja encontrada en el ápice de las hifas en crecimiento de hongos superiores. En general, el Spk consiste en tres partes fundamentales: un núcleo central de composición variable, un acúmulo de microvesículas que rodean al núcleo, y una nube de macrovesículas que se encuentra rodeando estas dos partes anteriores (Reynaga-Peña *et al.*, 1997). El acarreamiento de vesículas hacia la hifa y en el Spk es mediado por el citoesqueleto de actina (Bartnicki-García, 2002)

El citoesqueleto de actina provee de un marco estructural, el cual da forma a la célula y define la polaridad (Drubin *et al.*, 1996). Sus propiedades dinámicas proveen la fuerza básica para la división celular y la locomoción (Satterwhite *et al.*, 1992; Stossel., 1993; Mitchison *et al.*, 1996). Además, esta involucrado en el movimiento de membrana, incluyendo endocitosis y exocitosis (Chimini *et al.*, 2000).

El citoesqueleto de actina cambia constante y rápidamente en respuesta a estímulos extracelulares, siendo un componente estructural altamente dinámico (Lodish *et al.*, 2004; Walker, 2005; Uetrecht *et al.*, 2006). La actina es una proteína globular de 42 kDa que se puede encontrar en dos estados diferentes, globular (G-actina) y formando microfilamentos (F-actina). Los microfilamentos de actina se ensamblan desde su terminal negativa hacia la positiva. El ensamblaje de actina globular en microfilamentos requiere de un paso inicial de nucleación (los monómeros de actina se comienzan a asociar en

* VSC por sus siglas en ingles, (Vesicle Suply Center)

dimeros, trimeros etc.), partiendo de este paso, el filamento comienza a ensamblarse de forma tal que los monómeros se van adhiriendo al extremo positivo (en este extremo sucede la polimerización) (Lodish *et al.*, 2004).

Los microfilamentos de actina se pueden anclar a un número muy diverso de proteínas asociadas a actina, formando así, estructuras muy dinámicas como unidades contráctiles, el citoesqueleto ó redes en la periferia de la célula (Sheterline, 1998). Los microfilamentos de actina son ensamblados de dos formas generales: en parches y en cables.

Esta propiedad dinámica del citoesqueleto de actina es regulada por múltiples proteínas de anclaje a actina las cuales expanden, contraen, estabilizan, unen o cortan los microfilamentos de actina (Asano *et al.*, 2001).

Las proteínas de anclaje a actina regirán la organización de cada estructura (parches y microfilamentos) ya que estas son las encargadas de la polimerización de los microfilamentos de actina. Los microfilamentos de actina son unidos de manera que estos queden de forma paralela unos a otros por acción de las proteínas de unión a actina dando lugar a cables. Estos cables de actina juegan un papel muy importante en muchos procesos celulares tales como la división celular (citoquinesis) y el movimiento celular (Pollard y Borisy., 2003).

Los parches de actina son un componente crucial de la base del citoesqueleto de actina los cuales llevan a cabo la redistribución de actina durante el establecimiento de la polaridad de la célula (Smith *et al.*, 2001). Así

como también se encargan del proceso de endocitosis (Moseley y Goode., 2006)

Dentro de las proteínas de unión a actina que poseen una función muy importante en la regulación de la formación de estructuras del citoesqueleto de actina, se encuentra la coronina, encontrado en organismos que van desde la levadura hasta los humanos (Uetrecht y Bear., 2006).

La coronina es una proteína de unión a actina originalmente aislada de *Dictyostelium discoideum* (de Hostos *et al.*, 1991). Pertenece a la familia Triptofano-Aspartato-repetitiva (WD)* y juega un papel importante en varios procesos de regulación de actina (de Hostos, 1999; Uetrecht y Bear, 2006). La coronina posee 5 dominios, los cuales consisten en una extensión N-terminal (NE), un dominio de 7 hojas β el cual posee unión a actina, una extensión C-terminal (CE) un dominio llamado región única (U) la cual se desconoce su función y varía entre las coroninas de distintos organismos, así como también posee un dominio con forma de espiral “coiled-coil” (CC) el cual posee unión a actina (Figura 1) (Uetrecht y Bear., 2006)

* Triptófano (Trp, W) Acido aspártico (Asp, D)

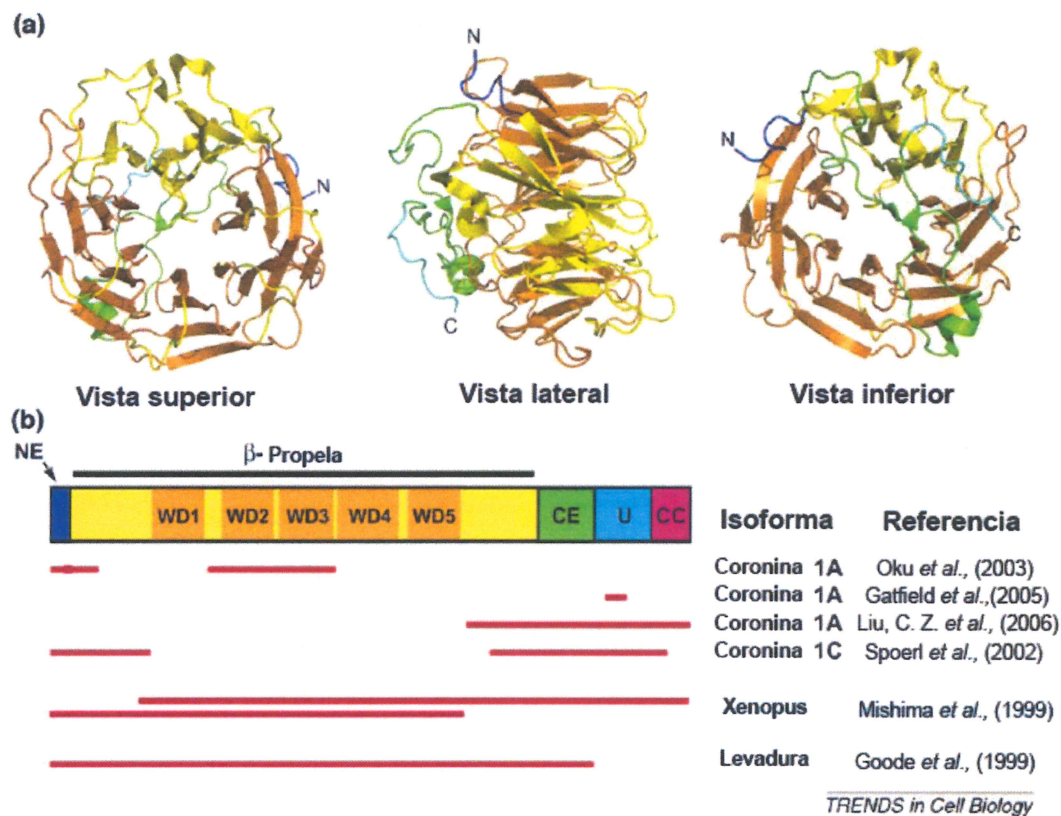


Figura 1.- Dominios estructurales de los sitios de unión a F-actina de coronina. (a) Estructura de la coronina 1A. (b) Dominios estructurales, los colores corresponden a los de (a) y las líneas rojas a los sitios de unión a F-actina. Imagen de Uetrecht y Bear, (2006)

La coronina tiene la función de unir microfilamentos de actina, regular al complejo Arp2/3 (Arp2 y Arp3)* mediante la inhibición de su actividad de nucleación (Moseley y Goode, 2006) y de unir microfilamentos de actina a microtubulos (Goode *et al.*, 1999). Asimismo se cree que la coronina también esta involucrada en la modulación dinámica de actina.

* Arp por sus siglas en ingles (Actin related proteins)

La regulación del papel que desempeña el complejo Arp2/3 resulta sumamente importante ya que este complejo es crucial en la regulación de la polimerización de actina. Este complejo actúa asociándose a un lado del microfilamento creciente de actina, donde comienza a oligomerizar una especie de ramificación, formando un ángulo característico de 70° con respecto al filamento líder (Utrecht *et al.*, 2006). Este complejo, también tiene la característica de servir como nucleador para la polimerización de microfilamentos de actina de novo, pero solo lo puede hacer para la formación de parches (Moseley y Goode *et al.*, 2006)

La actina tiene una organización apical importante en *Neurospora crassa*, acumulándose en la punta. La coronina es una proteína que se encuentra asociada a F-actina y al complejo Arp2/3, los cuales poseen una gran importancia en el desenvolvimiento de actina en la célula (Virag *et al.*, 2004). La caracterización de la función y dinámica de la coronina en *Neurospora crassa* ayudaría a entender el rol que la coronina cumple dentro del papel que desempeña el Spk en el crecimiento polarizado, así como el papel que juega la actina en la zona apical de la hifa.

Antecedentes:

La purificación de la coronina (*crn1*) en *Saccharomyces cerevisiae*, demostró que ésta se ancla desde su dominio CC a la actina y entrelaza filamentos de actina ya sea en arreglos “sueltos”, en forma de filamentos pequeños sobrepuestos ó en forma de paquetes o parches sencillos de filamentos largos (Goode *et al.*, 1999). La sobreexpresión de *crn1* en levadura, causa un arresto de la célula durante su crecimiento, evitando que ésta continúe su desarrollo sin embargo, este efecto puede ser revertido ya sea suprimiendo el dominio de unión a actina (ABD)* o el dominio CC. La localización de *crn1* en los parches de actina dependerá también de estos dos dominios (Humphries *et al.*, 2002). La delección del gen de la coronina en levadura no causa efecto aparente ya sea en el crecimiento celular, la morfología o la organización de la actina, lo que sugiere que las funciones que ésta lleva a cabo son redundantes con algún otro factor celular (Moseley y Goode *et al.*, 2006). Sin embargo, *crn1* muestra defectos sinérgicos en el crecimiento celular y la organización de actina con mutaciones en la actina *act1-59* y *cof1-22* (Oku, T. *et al.*, 2003). Lo que sugiere que *crn1* puede promover el desensamblaje de actina en lugar de estabilizar los filamentos de actina (Goode *et al.*, 1999).

En levaduras, la coronina se localiza en la corteza cortical, se ancla a microfilamentos de actina con gran afinidad y promueve el rápido ensamblado

* ABD por sus siglas en ingles, Acting Binding Domain

y unión de estos. Los dominios que regulan esta actividad de la coronina son altamente conservados (Goode *et al.*, 1999).

Las células que poseen un fenotipo mutado de la coronina, muestran defectos en locomoción, tasa de crecimiento y presentan una desorganización del citoesqueleto de actina (Uetrecht *et al.*, 2006).

La coronina parece estar asociada a casi todas las estructuras que contienen F-actina. Por lo que no es sorprendente observar que mutaciones en coronina, afectan todos aquellos procesos mediados por la actina (citoquinesis, movilidad celular, fagocitosis, endocitosis, exocitosis, micropinocitosis) (Maniak *et al.*, 1995; Fukui *et al.*, 1999).

Los mecanismos que son causantes de la activación del complejo de proteínas asociadas a actina (Arp 2/3) ha sido el enfoque de muchos estudios. La primer evidencia de interacción entre la coronina y el complejo Arp2/3 provino de la purificación del complejo de lisados de neutrofilos. La coronina 1A en humano fue identificada como una proteína co-purificada en esta preparación (Machesky *et al.*, 1997). Esta observación fue confirmada y extendida en estudios en levaduras (Humphries *et al.*, 2002).

Mas evidencias de la interacción del complejo Arp2/3 con la coronina provienen de estudios con la Coronina 1B (Cai *et al.*, 2005). Coronina endógena 1B puede ser co-inmunoprecipitada con el complejo Arp2/3 proveniente de una gran variedad de tipos celulares (Cai *et al.*, 2005). Interesantemente, la interacción entre la Coronina 1B y el complejo Arp2/3 es

regulada por la fosforilación de serina 2 de la Coronina 1B por medio de la proteína quinasa C (PKC)* (Uetrecht *et al.*, 2006).

La presencia constante de actina en los sitios de crecimiento polarizado de la hifa, dicta su incorporación dentro de modelos de crecimiento desde el ápice de la hifa. De acuerdo con el modelo hifoide, las vesículas se acumulan en lo que es un centro de suministro de vesículas (VSC) antes de ser distribuidas a su destino final en la punta de la hifa (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1990; Gierz *et al.*, 2001). En este modelo, la actina es propuesta como responsable del desplazamiento crucial de vesículas desde el VSC hasta la membrana plasmática. Otro modelo propuesto para el crecimiento polarizado de la hifa, menciona que la actina regula la extensibilidad de la punta por medio del reforzamiento de la membrana plasmática ó, impulsando la punta hacia adelante a través del arreglo de la F-actina citoplasmática (Heath, 1995). Para poder reforzar la región apical de la membrana plasmática, la actina tendría que estar anclada en la punta de la hifa.

La presencia de microfilamentos de actina en el Spitzenkörper ha sido observada a nivel ultraestructural en algunos hongos como *Fusarium acuminatim* (Howard, 1981). En *N. crassa*, la acumulación del Spitzenkörper y actina apical coincide con el VSC (Virag *et al.*, 2004). Esto sugiere que la acumulación apical de actina es la base o el esqueleto del VSC. En mutantes de actina *act1*, la acumulación apical de actina se observa completamente

* PKC por sus siglas en ingles de Protein Kinase C

deslocalizada o en una posición sub-apical o se divide en dos partes severamente desiguales (Virag *et al.*, 2004).

Aunque, la distribución de actina en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* no ha sido completamente conocida, se ha demostrado que es muy importante para el crecimiento polarizado apoyando al Spitzenkörper en el tráfico de vesículas a la membrana plasmática. (Bartnicki-García *et al.*, 1990). Los microfilamentos de actina se localizan en la región apical y subapical (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw., 2008) donde se lleva a cabo crecimiento polarizado.

Hipótesis

La mutación de la coronina afectará la formación y características dinámicas del Spk y del crecimiento polarizado que este regula en *N. crassa*

Objetivos Generales:

- Caracterizar a la cepa mutante del gen (*cor1*) que codifica para la proteína coronina en *Neurospora crassa*

Objetivos Particulares:

- Identificar el papel de la coronina en el crecimiento polarizado.
- Describir la organización y dinámica del Spitzenkörper en la mutante *cor1*
- Identificar el papel de la coronina en la cinética celular y de algunos componentes como mitocondrias y núcleos

Materiales y Métodos

Organismos y medios de cultivo

Se utilizaron la cepa con la mutación por silenciamiento del gen de la proteína coronina (*cor1*) de *Neurospora crassa* con tipo de apareamiento mat A y mat a.

Para realizar las transformaciones, se utilizó la cepa mutante de *Neurospora crassa* His⁻³ (His⁻³ N9716) mat a. A manera de control se usó la cepa *Neurospora crassa* silvestre mat a.

Los cultivos se mantuvieron en Medio Completo de Vogel (MCV) con agar 1.5%. Durante los experimentos se utilizó Medio Mínimo de Vogel (MMV) agar 1.5%. Para la inducción de la fase sexual se usó Medio Sintético de Cruzas (MSC) con agar, asimismo para crecer His⁻³ se utilizó MMV agar 1.5% con histidina a una concentración de 25 µg ml⁻¹ en *cajas* Petri. También se utilizó medio FIGS para la recuperación de las cepas transformantes. Los cultivos se incubaron a 28 °C (Los medios de cultivo se encuentran en el apéndice I)

Cruza de cepas

Se indujo el ciclo sexual de *N. crassa*, cruzando la cepa mutante de *cor1* mat A con la cepa His⁻³ mat a (*cor1* A X His⁻³a) para así obtener una cepa con doble mutación *cor1* His⁻³ la cual fue utilizada para realizar la transformación con fimbrina marcada con GFP (Fim-sGFP). También se realizó una cruce de

la mutante de *cor1* mat A con la cepa silvestre *N. crassa* mat a con el objetivo de observar si existía alguna alteración en el ciclo sexual de la cepa mutante de *cor1*.

Se sembró la mutante de coronina mat A en cajas de Petri con MSC. Se incubaron durante 5 días a 28° C. Posteriormente se reinoculó por separado con la cepa silvestre de tipo de apareamiento complementario y la cepa *His*⁻³. Se incubaron durante 7 días a 25° C en oscuridad total.

Las estructuras sexuales que se obtienen se denominan peritecios, los cuales contienen las ascosporas que una vez maduras son expulsadas. Estas se recolectaron con agua destilada estéril y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Las ascosporas se espatularon en cajas de Petri con MMV agar 1.5% y se les dio un shock térmico a 60 °C durante 3 h y se incubaron a 28° C durante 12 h. Se recuperaron colonias y se transfirieron a tubos de 5 ml con MMV agar 1.5% inclinado y se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Imágenes de morfología macroscópica

Las observaciones de la morfología de la colonia de la mutante de *cor1* se llevaron a cabo mediante la utilización de una cámara digital Nikon y al mismo tiempo se hicieron comparaciones con la cepa silvestre. Para esto, se inocularon cajas de Petri con medio MMV agar 1.5% con esporas (1.5×10^5

esp ml⁻¹) y se incubaron a 28° C. Se tomaron fotografías con una cámara nikon al tiempo 0, a las 12 h y después se tomo una fotografía cada 6h.

Índice de ramificación

Para obtener el índice de ramificación de la mutante de *cor1* y la cepa silvestre se utilizó un estereoscopio SZXILLB2-100 marca Olympus. La captura de imágenes se realizo con un CCD marca Olympus modelo DP70. Se inoculó cada sepa por separado en cajas de Petri con MMV agar 1.5% a una concentración 1.5×10^5 esp ml⁻¹ y se incubó a 28 °C durante 24 h. Se tomaron imágenes del margen de la colonia a 25X directamente de la placa de agar.

El índice de ramificaciones se obtuvo calculando el promedio de formación de ramas cada 100 µm, considerando desde la punta hasta la región basal.

Medición de Biomasa

Para obtener la biomasa total, las cepas con la mutación de *cor1* y silvestre se inocularon en cajas de Petri con MMV agar 1.5% sobre una membrana de diálisis. Las membranas de diálisis se cortaron al diámetro de la caja. Una ves cortadas se lavaron con agua destilada desionizada (H₂O_{dd}) y se esterilizaron en autoclave. Ya estériles se secaron a 60 °C y se pesaron. Las membranas se colocaron sobre el medio y se inoculó esporas de cada cepa por separado a una concentración de 1.5×10^5 esp ml⁻¹. Se incubaron a 28°C

durante 48 h y se desprendieron las membranas con el micelio secándose nuevamente a 60 °C. Las membranas de diálisis se pesaron y la diferencia entre el peso inicial y el peso final se considero la producción de biomasa que se reportó en $\mu\text{g d}^{-1}$.

Conidiación

Para cuantificar la cantidad de conidias producidas por la mutante de *cor1* en comparación con la cepa silvestre, se inocularon por separado en cajas de Petri con MMV agar 1.5% y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se recuperaron las conidias en Sorbitol 1 M. Se cuantificó el número de conidias por mililitro utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio compuesto convencional marca Olympus® a un aumento de 40X

Tasa de crecimiento

Para calcular la tasa de crecimiento de la de la mutante de *cor1* y la cepa silvestre se inocularon en cajas Petri de 15 cm de diámetro con MMV agar 1.5% con las dos cepas por separado a una concentración de 1.5×10^5 esporas ml^{-1} y se incubaron a 28 °C por 48 h. Se midió el crecimiento desde el origen hasta el margen de la colonia a las 12 h de incubación y posteriormente cada 6 h.

Transformación de *N. crassa* mutante de *cor1* con fimbrina-sGFP

Para la transformación de *N. crassa* mutante de *cor1* fue necesario obtener una doble mutante *cor1 His⁻³*. La mutación en el sitio de la histidina en la cepa mutante *His⁻³* permite la selección de una cepa transformada eficazmente mediante el crecimiento de esta en MMV agar 1.5% sin histidina, de esta forma, solo aquellas que integraron el ADN plasmídico en su ADN genómico contendrán la copia del gen para la histidina así como la copia para codificar la proteína marcada fluorescentemente. Se realizó una transformación con el plásmido pDD06 (Delgado-Álvarez, 2008) en el cual se tiene el gen de la proteína fimbrina marcada con GFP.

Para llevar a cabo la transformación se inocularon esporas de la doble mutante *cor1 His⁻³* y se dejó en incubación a 28° C durante una semana.

Las esporas se recuperaron con sorbitol 1M (estéril). Posteriormente la solución de esporas se filtró para eliminar el micelio y los restos de agar. Se recuperaron conidias y se lavaron en sorbitol 1M.

Se tomaron 90 µl de esporas y se les adicionó 10 µl de plásmido para transformar. Se dejaron en hielo por 15 min y se pasó la solución a celdas de electroporación previamente esterilizadas. Se ajustaron los parámetros del electroporador a 1.5kV, 25 µF y 600Ω. Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadieron 900 µl de sorbitol 1M estéril, se mezcló y se añadió 4 ml de medio de recuperación y se incubó en oscuridad a 28° C durante 3 h. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se

resuspendieron las esporas en el volumen restante para espatularlas en cajas de Petri con medio FIGS (ver apendice). Se incubaron a 28° C durante 5 días. Posteriormente se recuperaron las colonias en MMV agar 1.5% y estas se analizaron en un microscopio confocal para seleccionar aquellas positivas.

Microscopia

A) Microscopía de contraste de fases

Mediante el uso de un microscopio invertido Axiovert200® (Carl Zeiss) se realizaron observaciones por contraste de fases de hifas maduras y germínulas, para observar la dinámica interna y de crecimiento de la célula. Se tomaron series de tiempo de las dos cepas en ambos estadio. Las imágenes se grabaron con un intervalo de 4 s utilizando el software Axiovision® Rel. 4.6.3 (Carl Zeiss). Para su análisis los archivos se convirtieron a formato AVI. Las cepas se inocularon en MMV agar 1.5% y se incubaron a 28 °C durante 12 h y posteriormente se observaron al microscopio utilizando la técnica de bloque invertido descrita por Hickey *et al.*, (2002).

B) Microscopía de epifluorecencia

Para la microscopia de epifluorecencia se utilizó un microscopio invertido Axiovert200® (Carl Zeiss). Se llevaron a cabo observaciones de la pared celular en hifas maduras y conidias utilizando Calcofluor (0.01%). Este colorante tiñe la quitina de la pared. Como longitud de onda de excitación se

utilizó luz UV, la longitud de onda de emisión es azul entre los 315-400 nm (Kilbey, 1977).

Para la observación de hifas maduras, las cepas se inocularon por separado en cajas Petri con MMV agar 1.5% y se incubaron a 28 °C durante 16 h. Para las conidias se espatularon esporas en MMV agar 1.5%. Las conidias se mantuvieron a 4 °C durante 1 h para sincronizar la germinación, posteriormente se incubaron a 28 °C. Se realizaron observaciones al tiempo 0 y subsecuentemente cada hora. Tanto para hifas maduras como para las conidias se utilizó la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2002) poniendo sobre el cubre objetos 5ul de calcofluor (0.01%). Se utilizó un objetivo de 100X; 1.3 A. N. Plan-Neofluar. Las imágenes fueron capturadas con el software Axiovision® Rel. 4.6.3 (Carl Zeiss) y se convirtieron a formato TIF para su análisis con el software Photoshop® 9.0.

C) Microscopía confocal

La visualización de mitocondrias y organelos membranosos se llevó a cabo en un microscopio confocal LSM Meta 510 (Carl Zeiss) con un objetivo de 100X; 1.3 A. N. Plan-Neofluar de inmersión en aceite. Se tiñeron las mitocondrias con 10 µl de MitofluorRed (Invitrogen®) a una concentración de 5 µM y los organelos membranosos con 10 µl de FM4-64 (Invitrogen®) a una concentración de 5 µM utilizando la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2002).

D) Microscopía de electrónica de barrido

Para obtener imágenes por microscopía electrónica de barrido, se inoculó la cepa mutante *cor1* en cajas de Petri con MMV AGAR 1.5% sobre una membrana de diálisis. Las membranas fueron cortadas, lavadas y esterilizadas por autoclave previamente. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 12 h y se fijaron con formaldehído al 4% en buffer PIPES* (50mM, pH 6.8, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂) Después de 2 h se lavaron con PBS (NaCl = 4 g·l⁻¹; KCl = 0.1 g·l⁻¹; KH₂PO₄ = 0.06 g·l⁻¹; Na₂HPO₄ = 0.455 g·l⁻¹) una vez y posteriormente con agua destilada y desionizada estéril, se cortaron fragmentos de 1 cm² aproximadamente y se montaron en portaobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se metalizaron con oro.

* Piperazine-N-N'-bis(s-ethane sulfonic acid) FM = 302.4

Resultados

Morfología de la mutante *cor1* de *N. crassa*.

Se llevaron a cabo observaciones macroscópicas del crecimiento colonial de la mutante de *cor1* de *N. crassa* y se compararon con la cepa silvestre. La morfología de la colonia de la mutante de *cor1* a las primera 12 h era circular con bordes irregulares, mostrando abultamientos en varias regiones a diferencia de la cepa silvestre que tuvo una distribución mas homogénea. También esta mutante mostró gran cantidad de hifas aéreas al contrario de la silvestre. La cepa silvestre creció llenando la caja de Petri de 10 cm de diámetro en las primeras 24 h, sin embargo la mutante ni siquiera llegó al margen de la caja a las 48 h (Figuras 2C, E)

En las imágenes obtenidas por microscopia estereoscópica a un aumento de 25X, se observó que la cepa mutante de *cor1* produce un mayor número de ramificaciones, dando lugar a una colonia mas compacta que la cepa silvestre (Figura 3).

Para obtener información mas detallada sobre la mutante de *cor1*, se realizaron observaciones con alto aumento (2,500X) siguiendo el desarrollo hifal, se observó que la mutante de *cor1* se elongaba de forma mas retardada, además de perder por momentos la dirección y la polarización del crecimiento, presentando abultamientos en el ápice como si creciera en ciertos puntos de manera isotrópica, lo que no se observó en la cepa silvestre (Figura 4).

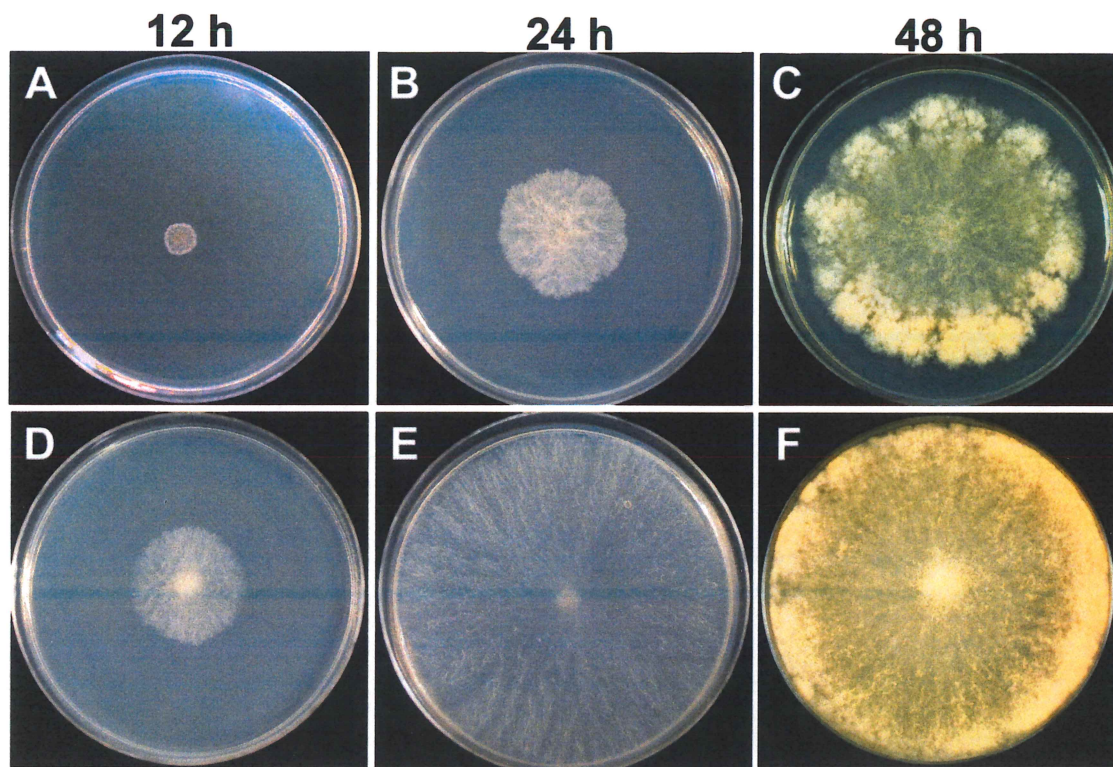


Figura 2. Morfología macroscópica de la colonia de la cepa mutante de *cor1* (A-C) y de la cepa silvestre (D- F).

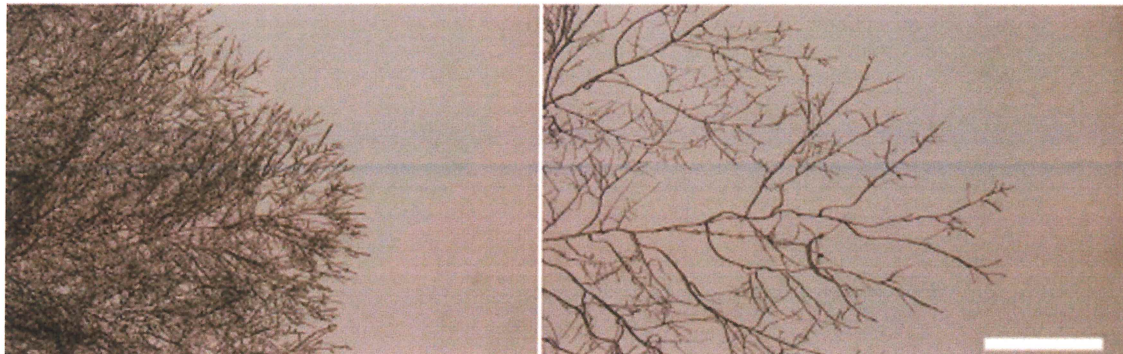


Figura 3. Imagen a 25X del margen de la colonia de *N. crassa* de la cepa mutante de *cor1* (A) y de la cepa silvestre (B). Escala = 2 mm.

La presentación del abultamiento de las hifas estaba asociada a una previa disminución o interrupción del crecimiento, mientras que la cepa silvestre presentó un crecimiento continuo. La pérdida de la polaridad y de dirección transitoria en las hifas de la mutante de *cor1* produjeron un crecimiento en zig-zag que puede ser observado claramente en las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido (Figura 5)

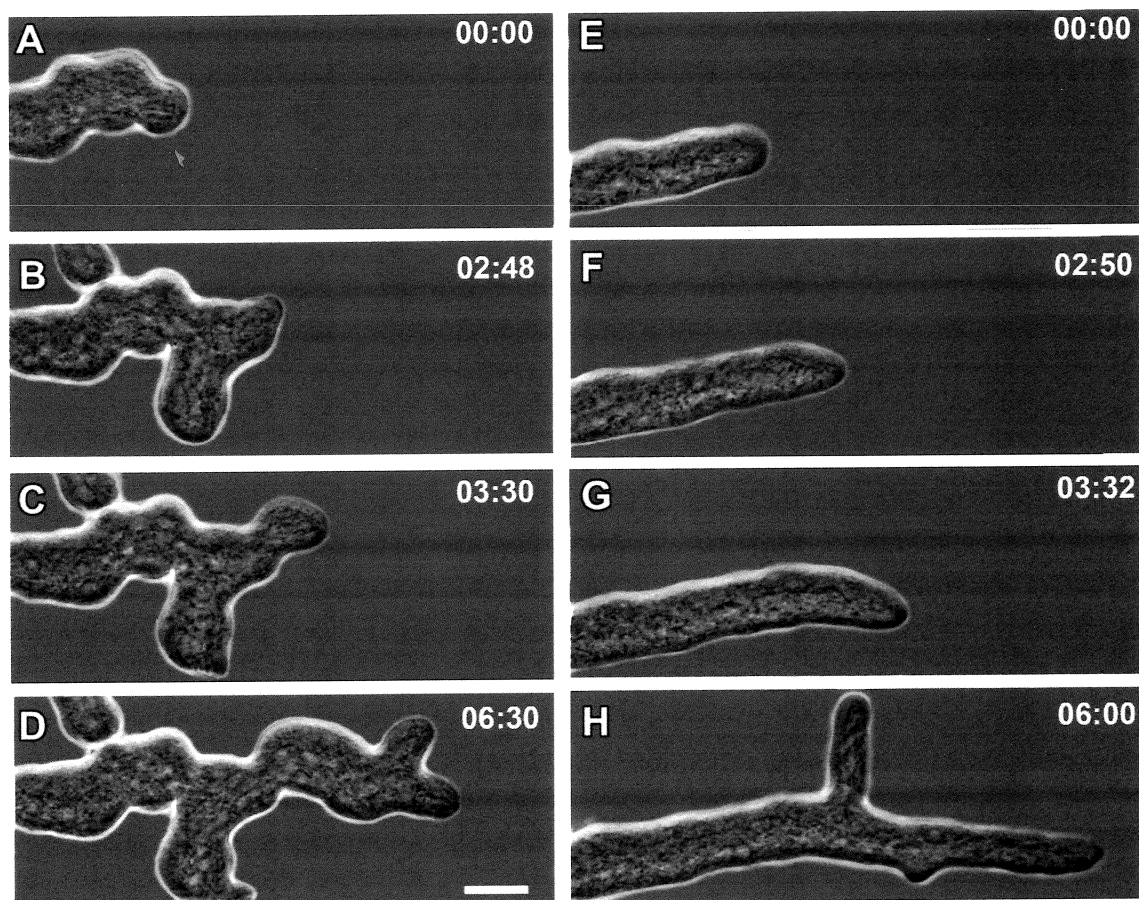


Figura 4. Serie de tiempo del crecimiento de *N. crassa* mutante de *cor1* (A-D) y silvestre (E-H) obtenida por microscopia de contraste de fases. Tiempos en min:ss Escala= 10 μ m.

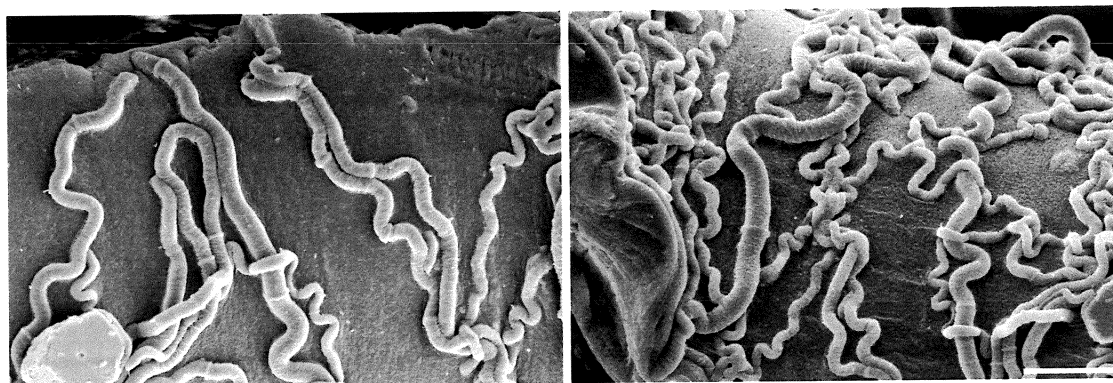


Figura 5. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de la cepa mutante de *cor1*. Escala = 20 μm

Cinética de crecimiento

Para establecer cuantitativamente las diferencias de crecimiento entre la cepa mutante de *cor1* y la silvestre, se midió la tasa de elongación micelial (Figura 6). La tasa de elongación promedio de la colonia para la mutante *cor1* fue de $3.1 \pm 0.2 \mu\text{m min}^{-1}$, esta mutante creció en promedio 4.3 veces menos que la silvestre que tuvo una tasa de $13.5 \pm 0.6 \mu\text{m min}^{-1}$. Para corroborar este resultado, se midió la velocidad de crecimiento en hifas maduras ($n=30$) utilizando mediciones a alto aumento en series de tiempo realizadas por microscopía de contraste de fases, la velocidad de crecimiento de las hifas para la mutante de *cor1* fue de $3.2 \pm 0.6 \mu\text{m min}^{-1}$ y de $14.2 \pm 1.8 \mu\text{m min}^{-1}$ para la cepa silvestre.

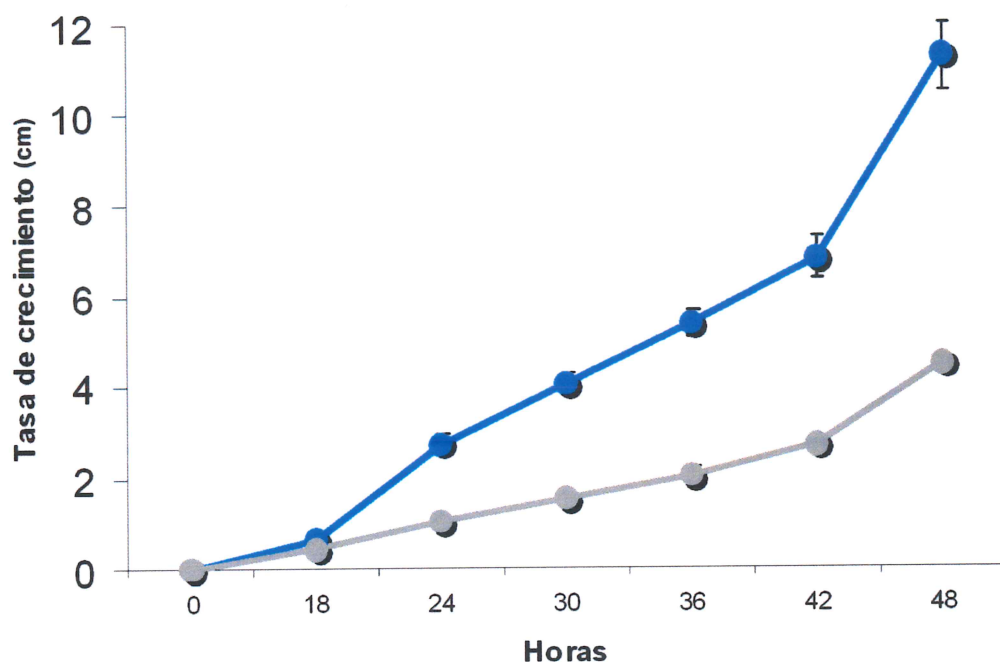


Figura 6. Tasa de elongación micelial (cm día^{-1}) de la mutante de *cor1* de *N. crassa* ■ y la cepa silvestre ■.

En las observaciones sobre la morfología de la colonia y de sus márgenes, se observó un incremento en la frecuencia de ramificaciones, esta variable fue cuantificada, encontrando una tasa de ramificación para la mutante de *cor1* ($n=30$) de 1.5 ± 0.1 ramas cada 100 μm y para la silvestre ($n=30$) de 0.3 ± 0.03 ramas cada 100 μm (Figura 7). Esto significa que la mutante de *cor1* ramifica 5 veces más que la cepa control.

Otro aspecto de la cinética de crecimiento que se consideró, fue la producción de biomasa en 48 h de crecimiento. La biomasa producida por la

mutante *cor1* fue de $28.0 \pm 4 \text{ mg día}^{-1}$, mientras que la cepa silvestre produjo aproximadamente el doble en el mismo tiempo ($48.5 \pm 10 \text{ mg día}^{-1}$) (Figura 8).

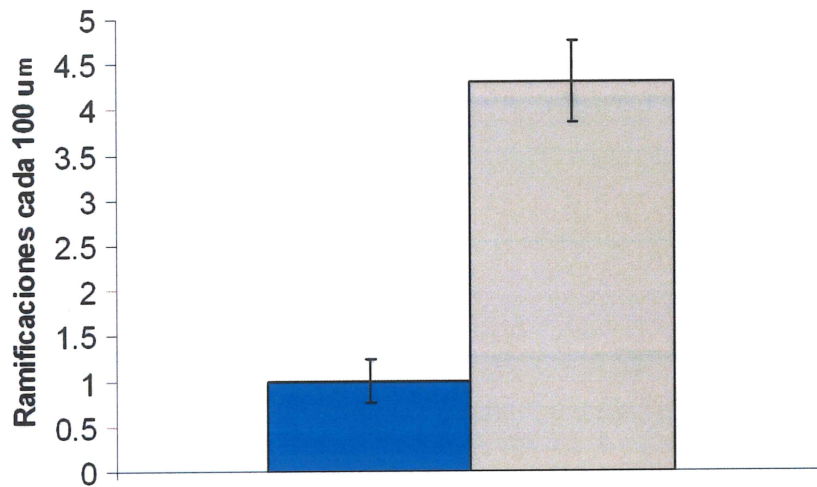


Figura 7.- Índice de ramificación cada 100 μm. de la mutante de *cor1* de *N. crassa* y la cepa silvestre.

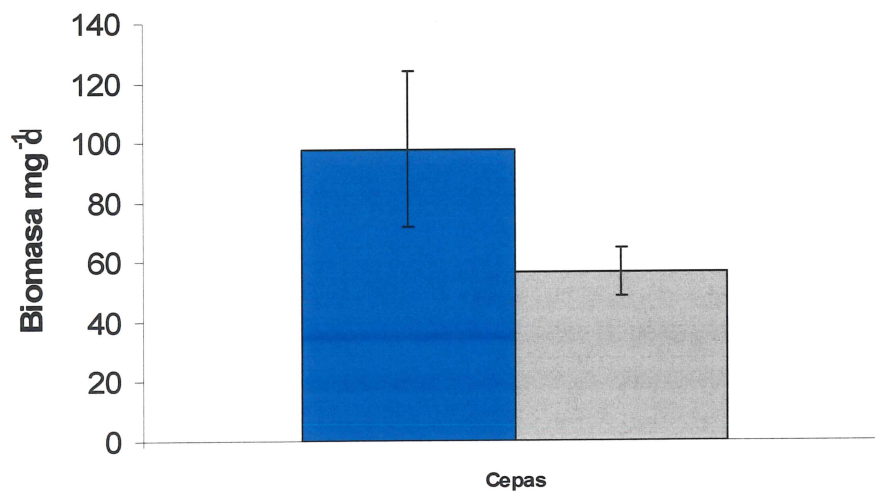


Figura 8.- Producción de Biomasa (mg día^{-1}) de la mutante de *cor1* de *N. crassa* y la cepa silvestre.

La conidiación fue otro evento evaluado. Así que después de incubar las cepas por 48 h a 28° C, se obtuvo para la mutante una producción de 0.6×10^5 conidias ml^{-1} y de 1.5×10^5 conidias ml^{-1} para la cepa silvestre, con una relación de 1:2 de producción de conidias sobre la cepa mutante de *cor1* (Figura 9).

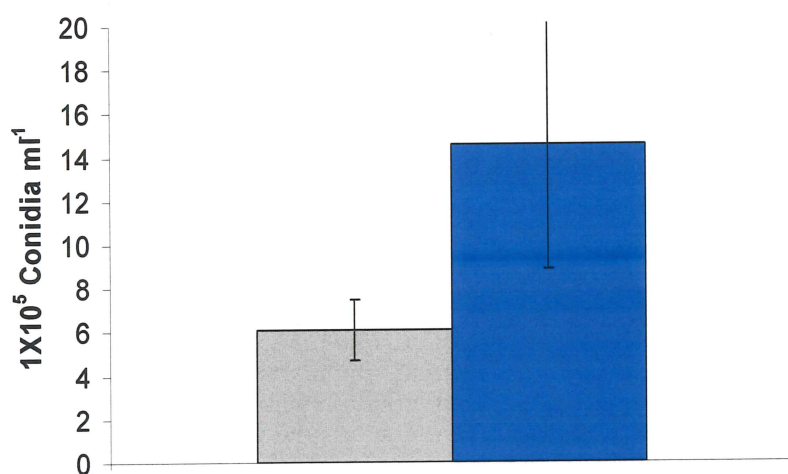


Figura 9.- Producción de conidias (mg d^{-1}). ■ *N. crassa* silvestre, ■ *N. crassa* mutante.

Las observaciones por contraste de fases de hifas maduras, revelaron que la cepa mutante de *cor1* producía una mayor cantidad de septos. Para observar con mayor detalle la distribución de los septos se tiñó la pared con Calcofluor (Figura 10). En la cepa mutante de *cor1* se observó una mayor frecuencia de formación de septos, formando compartimentos mas pequeños, esto en comparación con la cepa silvestre (Figura 10 A).

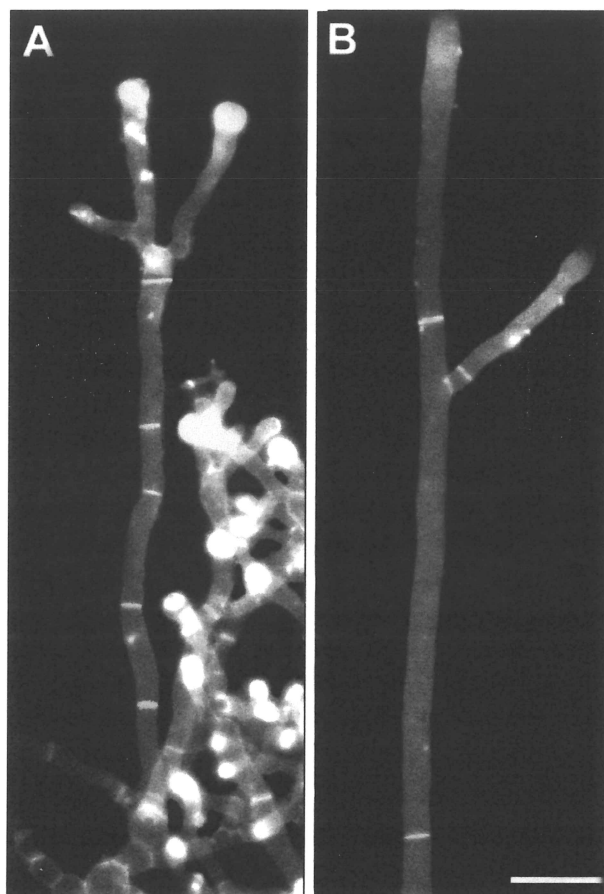


Figura 10.- Distribución de los septos en *N. crassa* mutante de *cor1* (A) y silvestre (B) teñidas con calcofluor. Escala 20 μm .

Características del Spk

La observación de la morfología de la colonia y de hifas individuales mostró, que la dirección y polarización del crecimiento en comparación con la cepa silvestre se veía afectada, al igual que la morfología y el crecimiento polarizado. La tinción con FM4-64 reveló que el Spk en la mutante de *cor1* era notablemente más pequeño en comparación con el de la cepa silvestre y no presentaba la morfología típica encontrada en esta (Figuras 11 A y D). De igual forma, el Spk de la mutante mostraba muy poca estabilidad para mantenerse en la punta de la hifa, esta inestabilidad ocasionaba que en ciertos momentos el Spk desapareciera por completo y la hifa comenzaba a hincharse isotropicamente perdiendo la polarización y la dirección de crecimiento. Posteriormente el Spk reaparecía y con ello se reanudando el crecimiento en forma de tubo (Figuras 12 A-E). Esta pérdida repetida de dirección y polaridad provocó que la hifa creciera con abultamientos y en forma de zig-zag (Figuras 5, 12). Los periodos intercalados de crecimiento isotrópico y polarizado determinaron que el diámetro de las hifas disminuyera o aumentara en forma intermitente (Figuras 4, 11 y 12). De igual forma, la trayectoria del Spk de la mutante de *cor1* comparada con la de la cepa silvestre durante el crecimiento, resultó afectada y no mantenía un recorrido en línea recta como el Spk de la cepa silvestre (Figura 13)

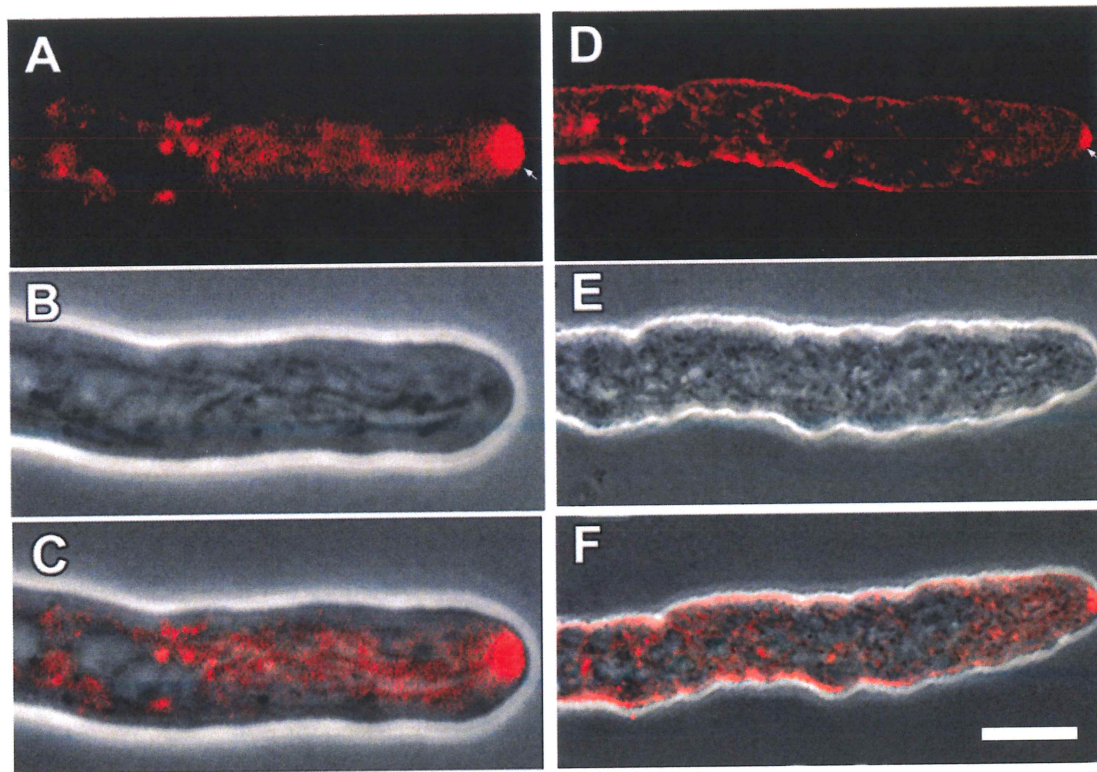


Figura 11.- Morfología y distribución del Spitzenkörper de *N. crassa* silvestre (A-C), y *N. crassa* mutante *cor1* (D-F). Los paneles (A y D) muestran el Spitzenkörper teñido con FM4-64 (5 μ M). Los paneles (B y E) las imágenes por contraste de fases, y (C y F) son las composiciones de las imágenes del canal fluorescente y de contraste de fases. Las flechas señalan el Spitzenkörper. Escala 10 μ m.

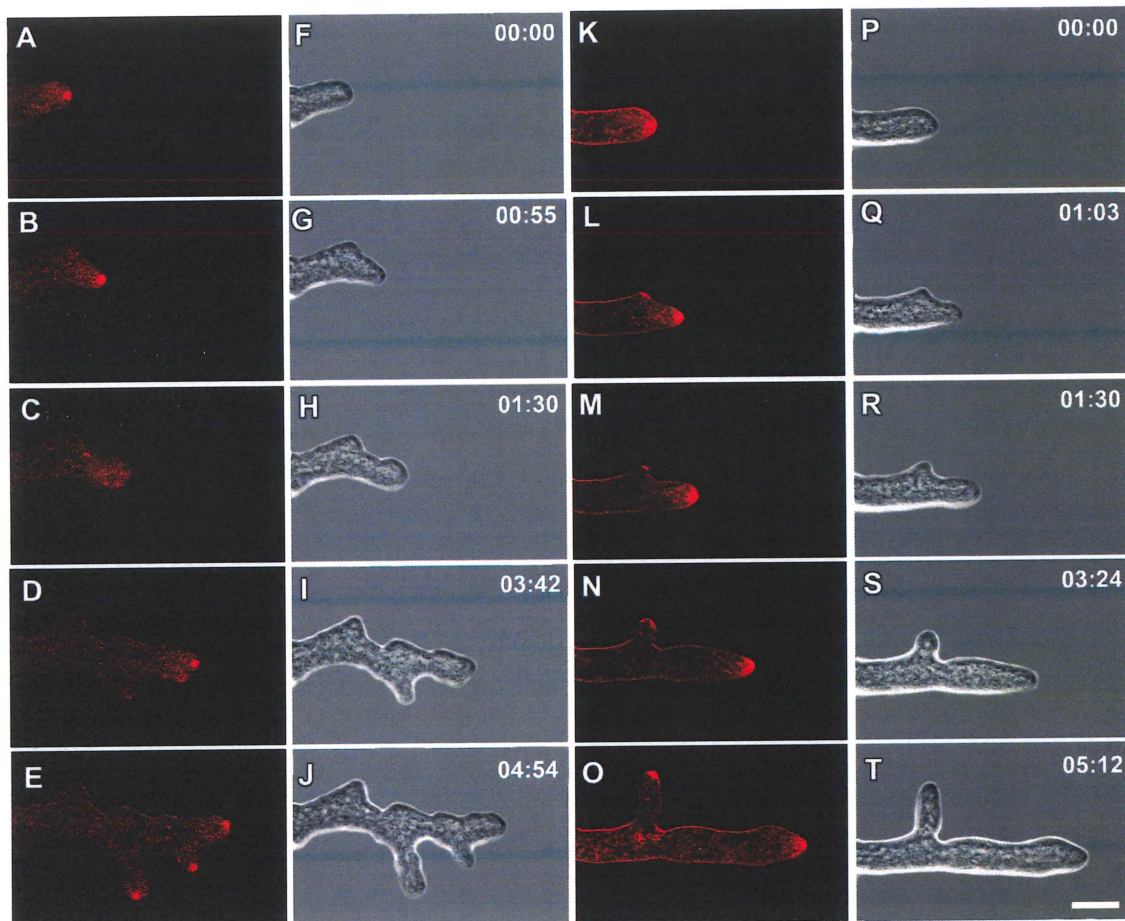


Figura 12.- Localización, distribución y dinámica del Spk en el crecimiento polarizado de *N. crassa* mutante de *cor1* (A-J) y *N. crassa silvestre* (K-T). Los paneles (A-E y K-O) muestran la tinción con FM4-64 (5 μ M). Los paneles (F-J y P-T) las imágenes por contraste de fases. Tiempos en min:ss. Escala 10 μ m.

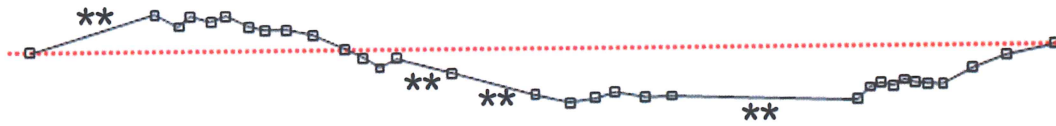
A**B**

Figura 13.- Trayectoria del Spitzenkörper de la mutante de *cor1* (**A**) y de la cepa silvestre (**B**). La línea punteada en rojo representa un eje horizontal en línea recta, los cuadros la trayectoria del Spk y los asteriscos la ausencia del Spk.

Distribución de organelos

Se comparo la dinámica y morfología de las mitocondrias y los núcleos en la cepa mutante de *cor1* con la cepa silvestre. Se realizaron observaciones de mitocondrias y núcleos. Las mitocondrias de la cepa mutante de *cor1* se desplazaban hacia el apice de la hifa quedándose aglomeradas y limitando su movimiento a la región apical y subapical adyacente, en cambio en la cepa silvestre las mitocondrias se encontraban a lo largo de toda la región subapical y se movían en dirección anterograda y retrograda. En la mutante de *cor1* las mitocondrias tenían una forma esférica al contrario de las mitocondrias alargadas de la cepa silvestre. Las mitocondrias de la mutante *cor1* exhibían una morfología esférica al contrario de las mitocondrias alargadas de la cepa silvestre. (Figura 14).

Mediante una tinción negativa con el colorante FM4-64, se observó la distribución de los núcleos. En la mutante de *cor1* los núcleos se observaron mas cercanos al ápice y presentaron una forma esférica así como un menor tamaño que la cepa silvestre (Figura 15)

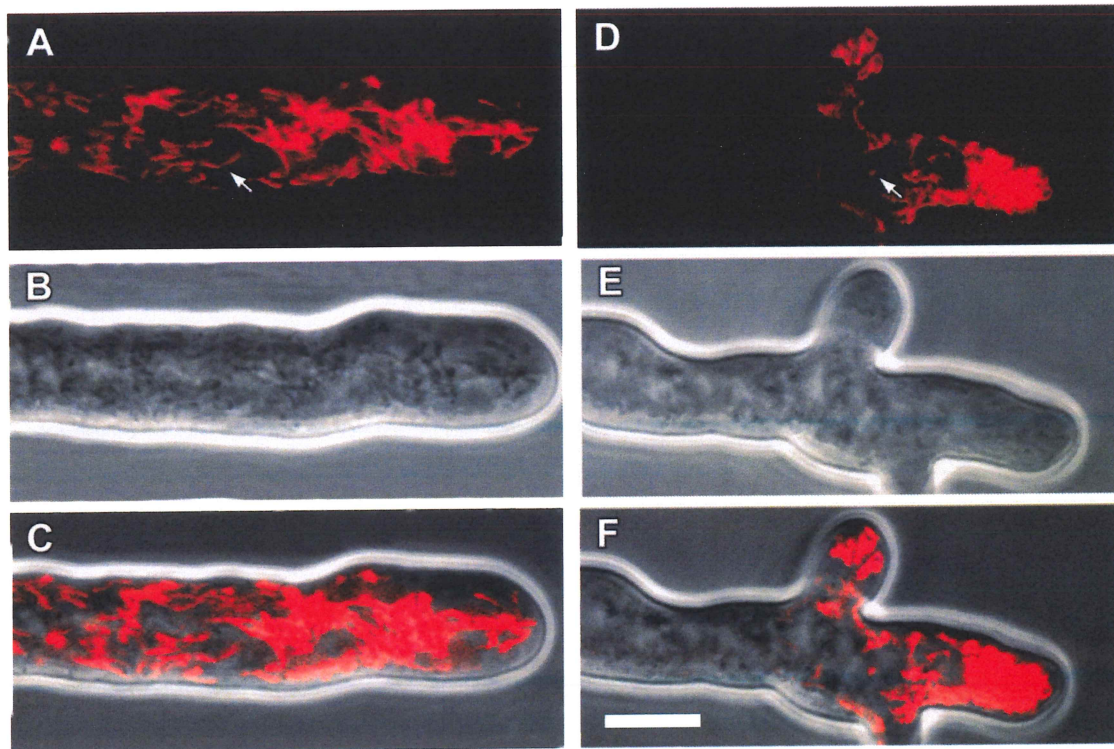


Figura 14.- Morfología y distribución de las mitocondrias de *N. crassa* silvestre (A-C) y *N. crassa* mutante de *cor1* (D-F). Los paneles (A y D) muestran las mitocondrias teñidas con MitofluorRed® (5 μM), los paneles (B y E) las imágenes por contraste de fases. (C y F) son la composición de las imágenes del canal fluorescente y de contraste de fases. Las flechas blancas señalan la morfología de las mitocondrias. Escala = 10μm.

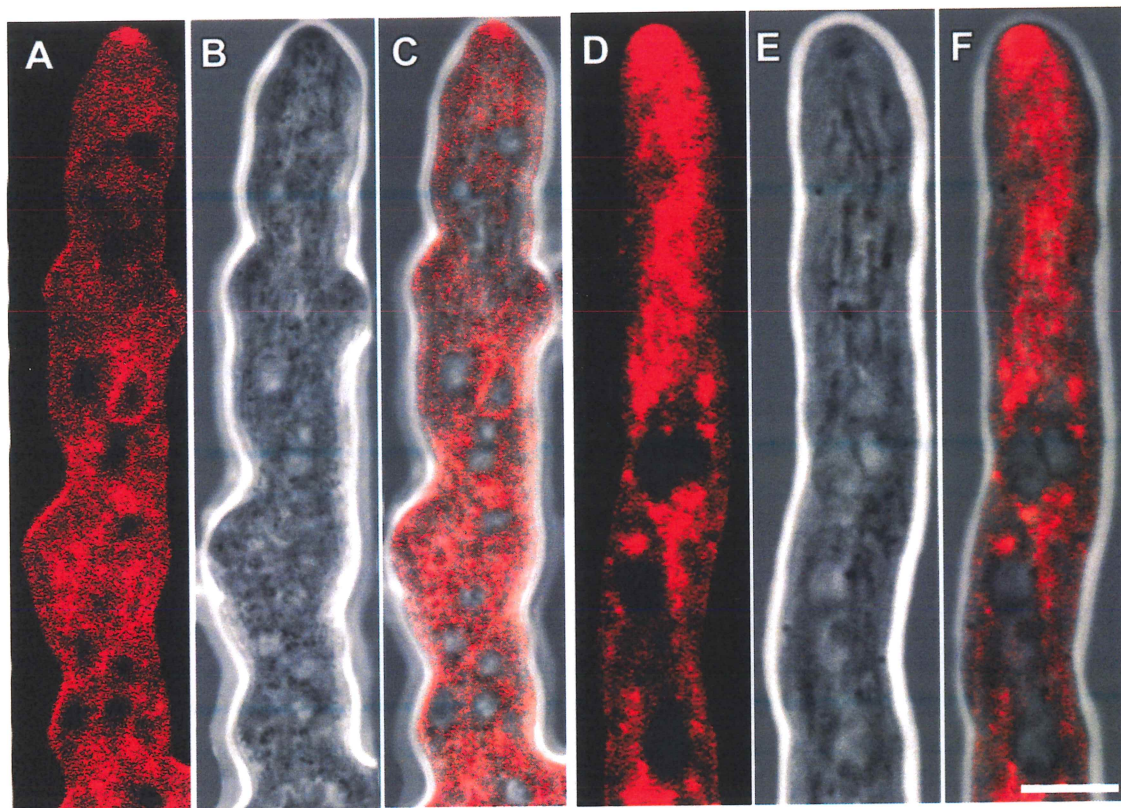


Figura 15.- Imagen de la distribución nuclear en la cepa mutante de *cor1* (A-C) y en la cepa Silvestre (D-F). Marcaje realizado con FM4-64. Escala = 10μm

Germinación

Para poder establecer desde que punto la mutante de *cor1* comenzaba a mostrar defectos en la polaridad y dirección del crecimiento, se observó la germinación de conidias y se compararon con la cepa silvestre. Se observó que la conidiación fue otro evento que era afectado. Las observaciones realizadas con conidias teñidas con Calcofluor, revelaron defectos en el establecimiento temprano de un centro de crecimiento polarizado, donde una vez que estas rompían la dormancia, comenzaban a hincharse isotropicamente llegando a tener un tamaño mucho mayor a las germinulas de la cepa silvestre (Figura 16 y 17 K-O). Posterior a la elongación del tubo germinativo la célula comenzaba a perder la polaridad y dirección del crecimiento, provocando que la célula presentara abultamientos en la superficie durante las primeras horas de crecimiento (Figura 16 y 17 F-J). En las series de tiempo llevadas a cabo bajo microscopia de contraste de fases, durante las primeras horas de germinación, era mas evidente la perdida de la polaridad y dirección del crecimiento (Figura 17). De igual forma se observó un retraso significativo en la velocidad de crecimiento del tubo germinativo a diferencia de la cepa silvestre (Figura 17).

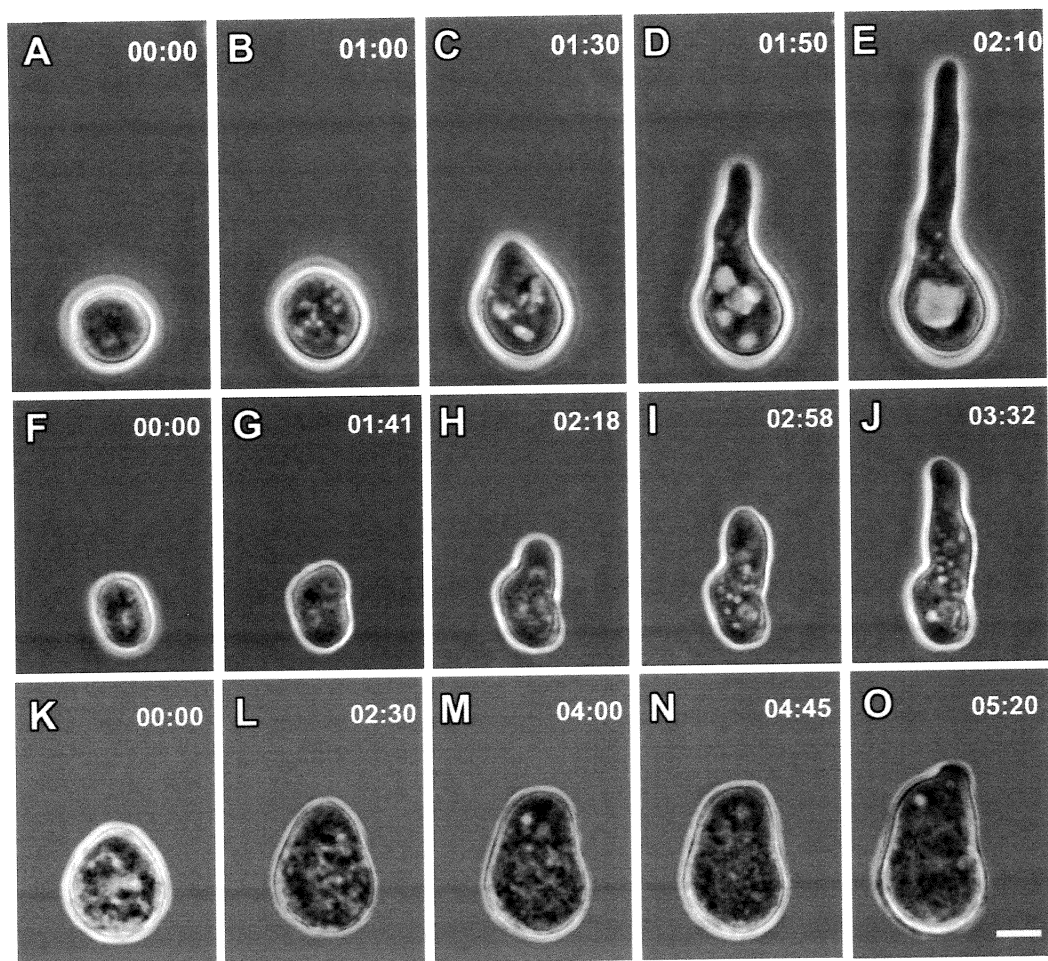


Figura 16.- Serie de tiempo de la germinación en la mutante de *cor1* (F-O) y la cepa silvestre (A-E). Tiempos en h: min. Escala = 5 μm

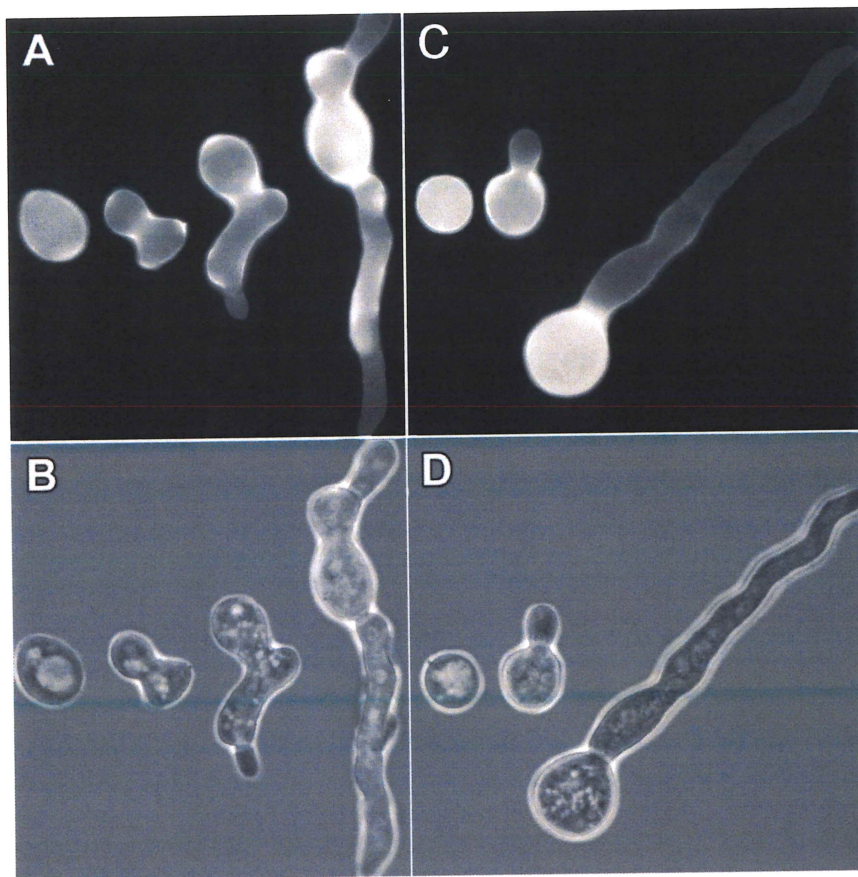


Figura 17.- Germínulas de la mutante de *cor1* (A y B) y de la cepa silvestre (C y D). En (A y C) se muestran las germínulas teñidas con calcofluor. En (B y D) se muestra la imagen por contraste de fases.

También se realizaron tinciones con Fm4-64 en germínulas para conocer la Internalización de este colorante durante el proceso del desarrollo del tubo germinativo. Se observó la presencia del Spk en la mutante de *cor1* así como también en la cepa silvestre (Figura 18 A y D). De igual forma se visualizaron parches (Figura 18 A y D). En la mutante de *cor1* los parches se observaron en áreas donde la célula estaba

creciendo isotropicamente (Figura 18 A) y no de manera polarizada como en la cepa silvestre, donde los parches se observaron en el área subapical adyacentes al Spk (Figura 18 D).

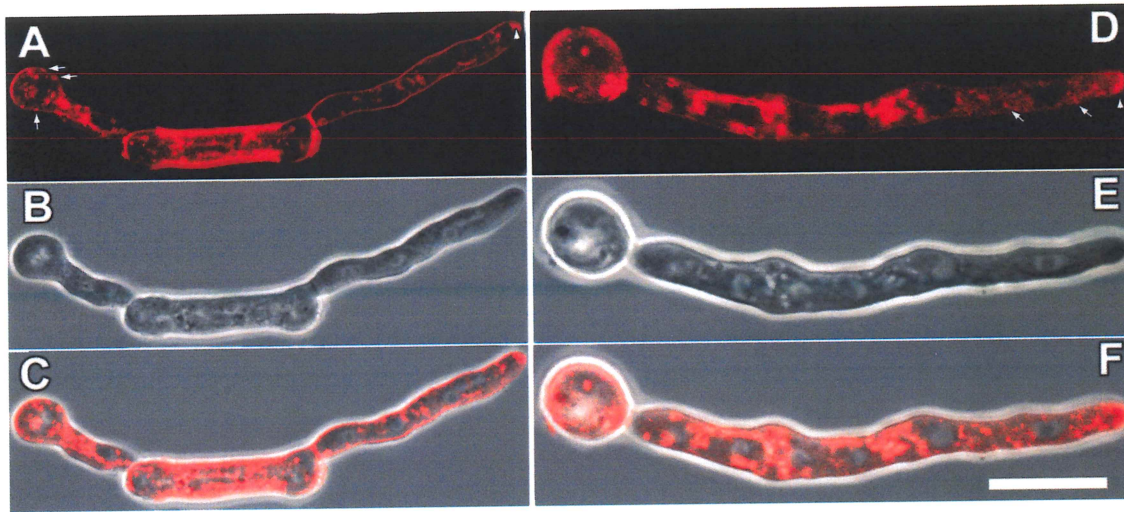


Figura 18.- Tinción de germinulas con FM4-64 después de 4 h de incubación de la mutante *cor1* (A) y de la cepa silvestre (B). Los paneles (B y E) muestran la imagen por contraste de fases y (C y F) muestran la composición del canal de fluorescencia y el de contraste de fases. Las flechas señalan parches y las cabezas de flecha el Spk. Escala = 10µm

Endocitosis

Se observó que la mutante de *cor1* presentó un retraso en el proceso de endocitosis. Para poder observar este fenómeno se realizó un seguimiento de la internalización del colorante FM4-64 (Figura 19). Inmediatamente después de añadir el colorante se observó que este solamente marcaba la membrana cortical de la célula por lo que solo se puede observar el contorno de la hifa (Figura 19 A, E). A los dos minutos se observaron en la mutante de *cor1* unos

pequeños puntos corticales dentro de la hifa, sin embargo, la cepa silvestre para este tiempo ya presentaba una internalización casi completa del colorante (Figura 19 B, F). A los 4 min, la cepa silvestre ya presentaba una tinción del Spk, mientras que la cepa mutante de *cor1* simplemente presentaba una mayor cantidad de puntos fluorescentes (Figura 19 C, G). A los 6 min (Figura 19 D), se pudo observar en la mutante de *cor1* una mayor cantidad de puntos en el ápice, presentando una distribución muy similar que la observada en la Figura 12 C. Para este tiempo ya se podían observar los núcleos teñidos negativamente en la cepa silvestre (Figura 19 H).

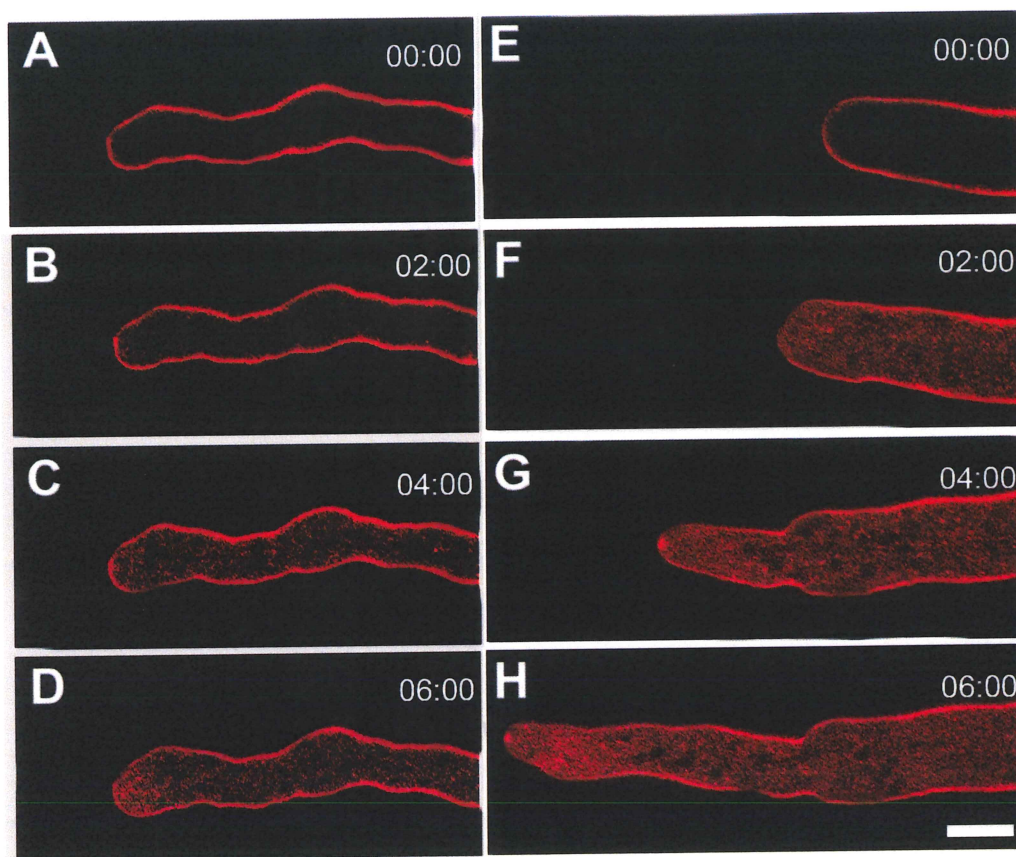


Figura 19.- Internalización del colorante FM4-64 en la mutante de *cor1* (A-D) y en la cepa silvestre (E-H). Tiempos en min:ss. Escala = 10 μ m

Fim-sGFP en mutante de *cor1*

Se observó el comportamiento de la proteína fimbrina marcada con sGFP en la mutante de *cor1*. En las primeras observaciones, Fim-sGFP se visualizó en forma de parches a lo largo de la hifa, principalmente acumulados en la región subapical, observándose justo detrás del área que ocupa el Spk (Figura 20 D-F). Sin embargo, cuando la hifa comenzaba a detener su crecimiento polarizado y crecía isotropicamente, los parches comenzaban a acumularse justo en el ápice de la hifa, donde debería de estar localizado el Spk. (Figura 20 A-C). Para observar la dinámica de los parches de fimbrina marcada con GFP y el Spk, se realizó una tinción con el colorante FM4-64 (Figura 21). Esta tinción reveló que los parches de fimbrina se localizaban en la región subapical cuando el Spk estaba presente (Figura 21 D, H, L) y, cuando la hifa comenzaba a crecer isotropicamente, el Spk desaparecía y los parches comenzaban situarse justo en el ápice (Figura 21 A, E, I, C, G, K). También se observó como el Spk se desplazaba hacia la región subapical y posteriormente desaparecía, provocando que la hifa comenzara a crecer isotropicamente y que los parches se desplazaran hacia la región apical (Figura 21 B, F, J).

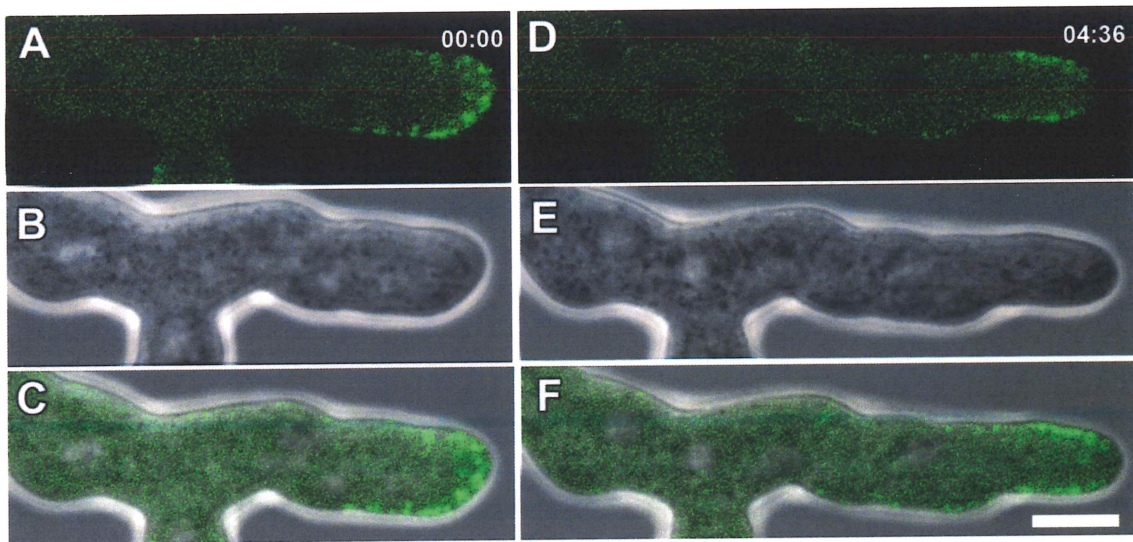


Figura 20.- Serie de tiempo de la localización de Fim-sGFP en la mutante de *cor1*. Los paneles (A y D) muestran Fim-sGFP. (B y E) son la imagen por contraste de fases y (C y F) la composición del canal de fluorescencia con el de contraste de fases. Tiempo en min:ss Escala = 10 μ m

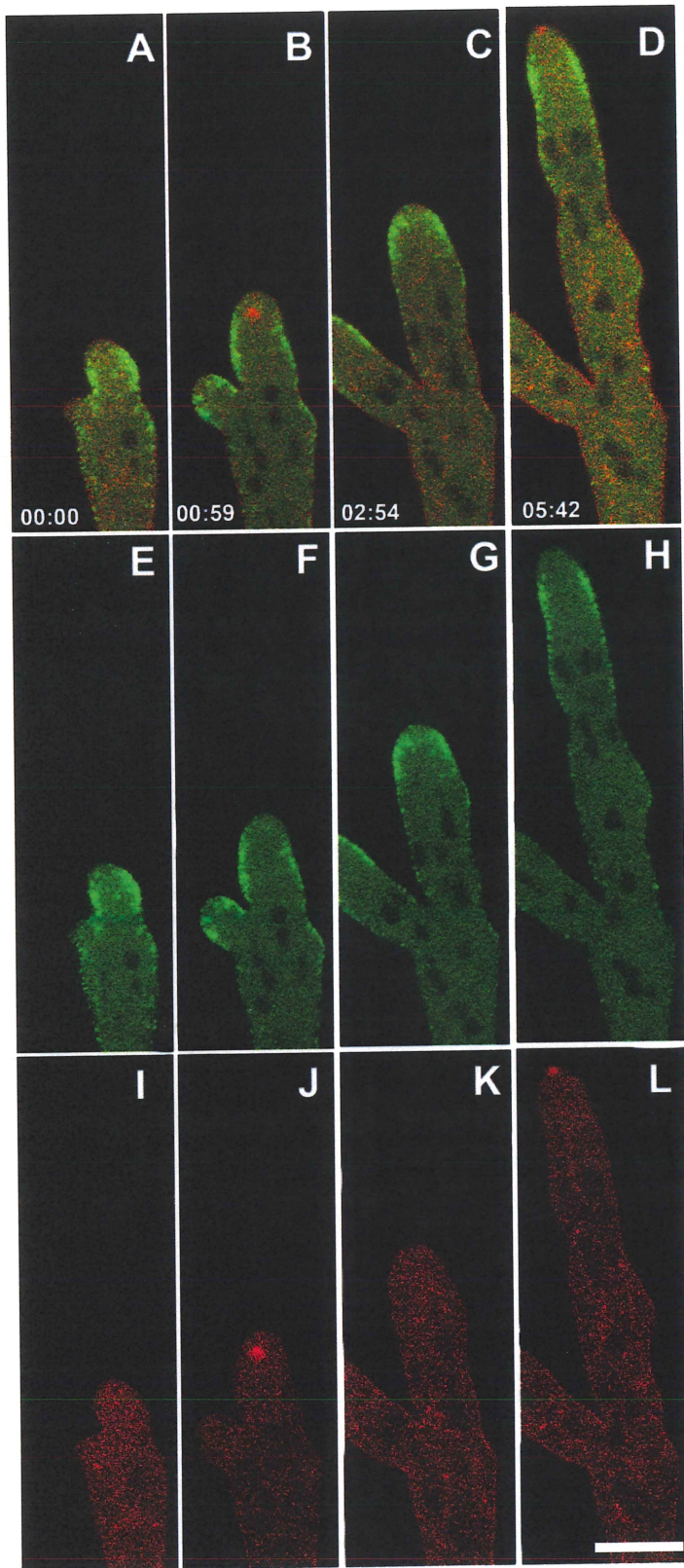


Figura 21.- Serie de tiempo de la distribución y localización del Spk y la proteína fimbrina marcada con sGFP en la mutante de *cor1*. Los paneles (A-D) muestran la colocación de Fim-sGFP y el colorante FM4-64. Los paneles (E-H) muestran el canal de fluorescencia de la proteína Fim-sGFP y los paneles (I-L) muestran la tinción con FM4-64. Tiempo en min:ss. Escala = 10 μ m

Modelos del crecimiento polarizado, endocitosis y exocitosis en hifas maduras y germínulas en la mutante de *cor1*.

Las observaciones realizadas en hifas maduras, reveló que la mutante de *cor1* presenta defectos en el crecimiento polarizado, endocitosis y exocitosis. En base a estos resultados se propone un modelo de los efectos que ocasiona la mutación de *cor1* comparada con la sepa silvestre (Figura 22). De igual forma se propone un modelo del crecimiento durante la formación del tubo germinativo en germínulas (Figura 23).

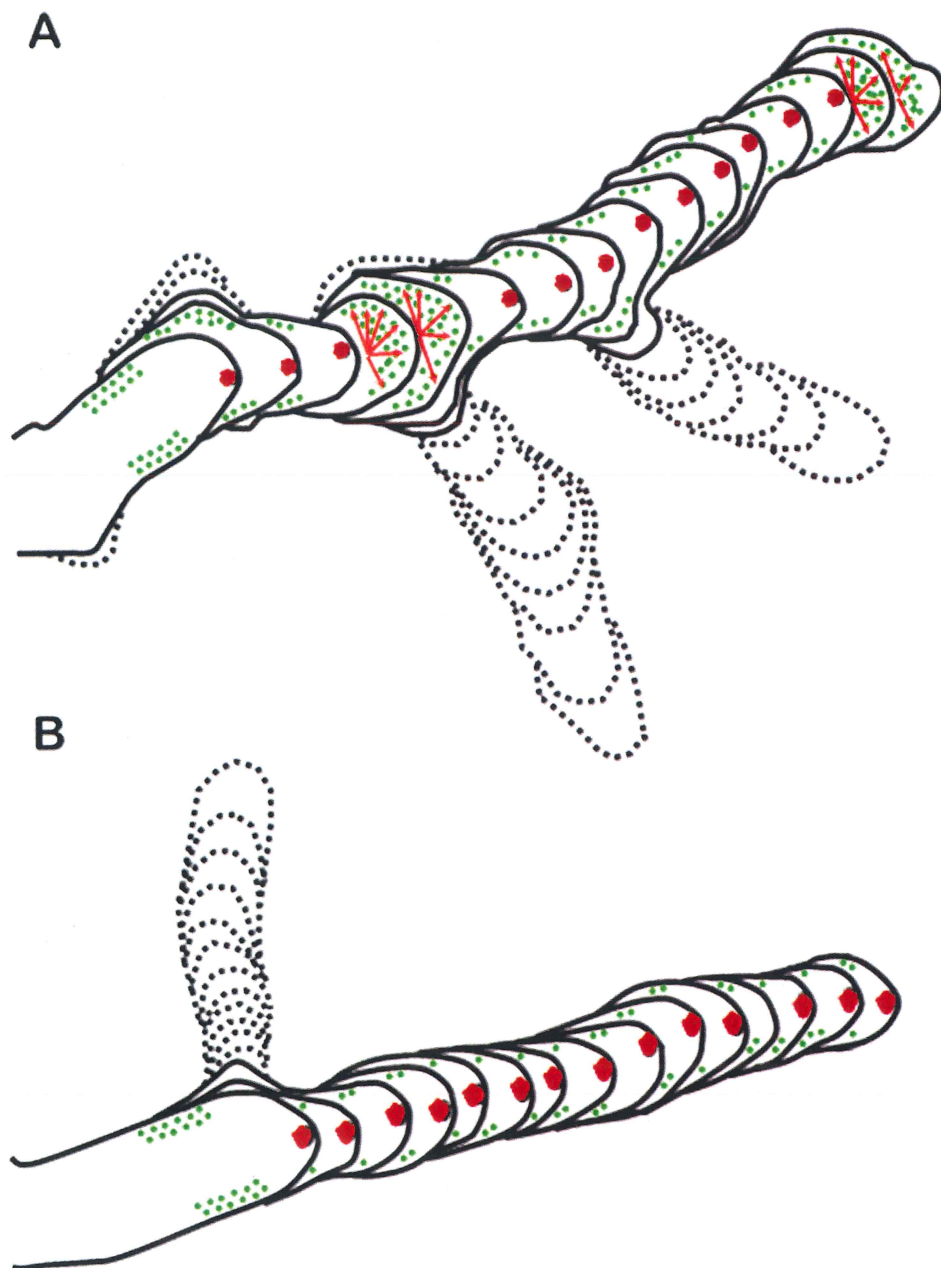


Figura 22.- Modelo del crecimiento polarizado, dinámica de los parches de Fim-sGFP y dirección de la exocitosis en la mutante de *cor1* (A) y en la cepa silvestre (B). Los puntos rojos muestran la presencia del Spitzenkörper, los puntos verdes los parches de fimbrina, las flechas color rojo la expansión de la membrana durante el crecimiento isotropico y las líneas punteadas color negro las ramificaciones.

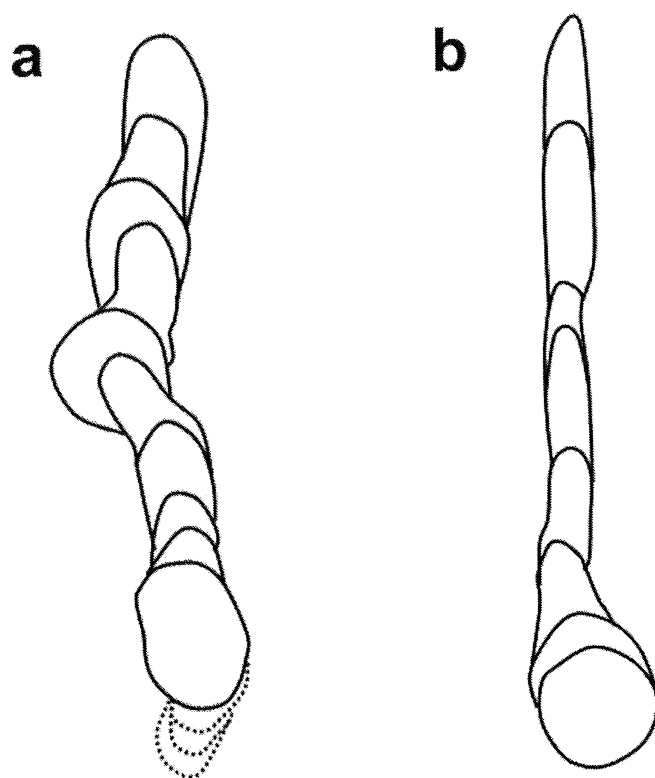


Figura 23.- Modelo del desarrollo del tubo germinativo en la mutante de *cor1* (**a**) y en la cepa silvestre (**b**). Las líneas punteadas indican el desarrollo de un nuevo tubo germinativo.

Discusiones

El crecimiento polarizado en hongos filamentosos es un proceso altamente regulado por varios mecanismos, los cuales están íntimamente relacionados con la regulación dinámica del citoesqueleto de actina. La proteína coronina ha sido descrita como un componente crucial en la regulación de procesos como la polimerización de microfilamentos de actina involucrados en el crecimiento polarizado y la endocitosis (Sheterline *et al.*, 1998; Torralba *et al.*, 1998; Moseley y Goode, 2006)

La morfogénesis de hongos filamentosos es dirigida por el Spk, el cual es la fuente de vesículas secretoras junto con los componentes que darán lugar a la expansión de la pared celular (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989, Bartnicki-Garcia *et al.*, 1990). La dirección del crecimiento, es determinada por la trayectoria del Spk así como también la forma y apariencia de la hifa (Bartnicki-García *et al.*, 1996; Riquelme *et al.*, 1998). El Spk en la mutante de *cor1* presentó diversas alteraciones similares a las descritas en la mutante *act1* (Virag y Griffiths, 2004), sugiriendo la existencia de actina en el Spitzenkörper.

Se cree, que el movimiento de vesículas necesario para el crecimiento polarizado, depende de los microtúbulos para el transporte a larga distancia y del citoesqueleto de actina para el transporte desde el Spk hasta la membrana citoplasmática en el ápice de la hifa (Bartnicki-García *et al.*, 1995, Horio y Oakley, 2005). Es por esto que al estar desorganizada la actina en el Spk como sería el caso de la mutante de *cor1*, el crecimiento y la morfología se ven

afectados, siguiendo un patrón de periodos con crecimiento en forma polarizada y crecimientos de forma isotropica (Figura 22).

La actina y algunas de sus proteínas asociadas, son la estructura de soporte y regulación del flujo de vesículas en el apice de la hifa (Virag y Griffiths, 2004, Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Por ejemplo, la tropomiosina es una proteína de unión a actina (Lodish *et al.*, 2004) la cual a sido descrita en levaduras como una proteína que estabiliza microfilamentos de actina para dar lugar a la formación de cables (Moseley y Goode, 2006). El marcaje de la proteína tropomiosina con GFP realizado por Taheri-Talesh *et al.*, (2008) y en *N. crassa* por Delgado-Álvarez (2008), revela claramente la existencia de actina en el Spk. En este trabajo se observó que el Spk de la mutante de *cor1* no se mantenía por periodos prolongados en el ápice de la hifa, provocando un crecimiento isotrópico, lo que se puede interpretar como una falta de estabilidad del citoesqueleto de actina, que regula la integridad del Spk y en consecuencia el flujo de vesículas (Figura 22).

La exocitosis y la endocitosis son esenciales para el crecimiento polarizado (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al* 1990; Gires y Bartnicki-García, 2001). Se ha indicado que estos dos procesos deben de estar en un balance tal que permitan la elongación de la hifa, sugiriendo un reciclamiento de la membrana plasmática, donde la exocitosis necesaria para el crecimiento polarizado, sea equivalente al proceso de endocitosis necesario para la incorporación de nutrientes (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Steinberg,

2007). El Spk es considerado como un componente esencial para la exocitosis, el cual sirve como centro suministrador de vesículas importante para la extensión de la hifa (Bartnicki-García *et al* 1990; Reynaga-Peña *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2005). La interrupción del crecimiento polarizado y el crecimiento de la célula de manera isotropica, sugieren que de alguna manera la célula esta adhiriendo más membrana (exocitosis) a la corteza de la célula de la que se requiere para poder continuar de manera normal el crecimiento polarizado (Figura 22).

Se ha demostrado que la internalización del colorante FM4-64 en hongos filamentosos (Peñalva., 2005; Read y Kalkman, 2003) es dependiente de actina y que este proceso es llevado a cabo a través de la endocitosis. Asimismo, se ha demostrado que la internalización de este colorante ocurre en el Spk (Harris, 2006), sugiriendo la presencia de vesículas endocíticas en el ápice de la hifa. La coronina ha sido descrita como parte de la maquinaria endocítica asociada a actina (Rodal *et al.*, 2005; Moselye y Goode *et al.*, 2006). En este trabajo se observó que la cepa silvestre internaliza este colorante principalmente alrededor de la zona apical y luego a lo largo de toda la hifa. Al igual, en germínulas se observó que este colorante es internalizado en el área donde el crecimiento polarizado se lleva a cabo. Sin embargo, en la mutante de *cor1* se observó un retraso en la internalización del FM4-64 en hifas maduras y germínulas. El retraso en la internalización de este marcador lipofílico en la mutante de *cor1*, indica que existe un defecto en el proceso de

endocitosis mediado por actina. Más evidencia que corroboran estas observaciones provienen de la dinámica de fimbrina-sGFP observada en la mutante de *cor1*, que al igual que Upadhyay y Shaw (2008) demuestran que esta proteína es indispensable para la endocitosis y que se localiza en la zona subapical de la hifa, justo debajo del Spk. La mutante de fimbrina, también mostro defectos en la internalización de FM4-64 (Upadhyay y Shaw., 2008).

Se puede suponer que en la mutante de *cor1*, los procesos de endocitosis y exocitosis están afectados, y que la inestabilidad del Spk provoca que las vesículas exocíticas sean dirigidas a puntos diferentes alrededor del apice y no en forma polarizada. Así mismo, la endocitosis, como se pudo ver en la distribución de parches corticales de fimbrina sGFP, puede que sea llevada a cabo no solamente en la región subapical, si no también en la región apical, además de estar retrasada. Entonces, una vez que el Spk se desestabiliza, la exocitosis pierde la polaridad y el proceso normal de la endocitosis es alterado disminuyendo o deteniéndose, el equilibrio entre la endocitosis y la exocitosis se rompe, y la membrana así como la morfología de la célula se altera (Figura 22). Con estas evidencias, se podría asumir que la coronina está involucrada tanto en parches como en cables o puede ser la interfase entre estos dos tipos de configuración de la actina.

Otro efecto derivado de las mismas alteraciones de endocitosis y exocitosis en la mutación de *cor1* en *N. crassa* fue la germinación alterada. Se observó una pérdida en la polaridad y en la dirección del crecimiento, estos

resultados también son similares a los de la mutante de fimbrina reportados por Upadhyay y Shaw, (2008), que observaron germínulas con pérdida de la polaridad e hinchamiento isotrópico. Estos fenotipos sugieren que la actina así como *cor1* están involucradas en el mantenimiento de la polaridad durante y en el desarrollo del tubo germinativo, siguiendo patrones de crecimiento similares a los reportados para hifas maduras.

El transporte de organelos es un proceso activo que requiere del citoesqueleto y de proteínas motoras. Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos los cuales se mueven a lo largo del citoesqueleto, cambiando de forma constantemente. Los mecanismos responsables del transporte mitocondrial en células eucariotas es ampliamente diverso (Prokisch *et al.*, 2000; Boldogh *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2005). En levaduras, se reportó que las mitocondrias colocalizan con microfilamentos de actina (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994) y que tratamientos con latrunculina A, afecta el transporte y la morfología de estas (Boldogh *et al.*, 2001-b). De igual forma, se encontró que el complejo Arp2/3 está involucrado en la nucleación y polimerización de filamentos de actina responsables del movimiento mitocondrial en levaduras (Boldogh *et al.*, 2001-a). En *A. nidulans* se demostró que el transporte de mitocondrias es mediado por actina (Suelmann y Fischer, 2000). En la mutante de *cor1* se observó que las mitocondrias viajaban de manera anterógrada y su movimiento se limitaba solo hacia la punta de la hifa y no se desplazaban de forma dinámica a lo largo de la esta como en la cepa

silvestre. Suelmann y Fischer (2000) demostraron mediante el uso de citocalasina A que la morfología mitocondrial está dada por su relación con el citoesqueleto de actina, observando mitocondrias con forma esférica al igual que las observadas para la mutante de *cor1*. Sin embargo, en *N. crassa*, se ha encontrado que el transporte mitocondrial es dependiente de microtúbulos y de dos miembros de la familia de las cinecinas (UNC104/Kif-1) (Fuchs *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2005). Goode *et al.*, (1999) reportaron que la coronina une microfilamentos de actina a microtúbulos. Los resultados obtenidos de la mutante de *cor1* sugieren una interacción del citoesqueleto de actina con el de microtúbulos partiendo desde la zona subapical hasta la apical, justo donde las mitocondrias se observan acumuladas y con una morfología esférica. Una evidencia que apoya esta conclusión es la mostrada, al tratar hifas de *N. crassa* con citocalasina A donde se observó una desorganización completa de los microtúbulos (Mourino-Perez, 2008-comunicación personal).

Al igual que en el caso de las mitocondrias, la distribución nuclear está asociada al citoesqueleto microtubular en *N. crassa* (Ramos-García, 2006), por lo que al afectar a los microtúbulos de forma indirecta afectando el citoesqueleto de actina, se encuentra una distribución nuclear tal como la observada en la mutante de *cor1*. Esto se refuerza por la similitud con la distribución de los núcleos encontrada en la mutante *act1* (Virag y Griffith 2004). En todos estos casos la zona de exclusión de los núcleos desapareció, permitiendo que estos llegaran hasta el ápice.

Conclusiones:

- La mutación de *cor1* en *N. crassa* no es letal, pero influye negativamente en muchas funciones celulares involucradas en el crecimiento hifal como la endocitosis, la exocitosis y la organización citoplasmática.
- La mutación de *cor1* reduce de forma significativa la tasa de crecimiento, incrementa la frecuencia de ramificación y afecta la construcción de septos, así como la producción de conidias.
- *cor1* es importante para el mantenimiento de la polaridad y la dirección del crecimiento.
- *cor1* es necesaria para la estabilidad y dinámica del Spitzenkörper.
- El movimiento de organelos tales como mitocondrias y núcleos esta afectado por la ausencia de coronina.
- La endocitosis es un proceso dependiente de actina y requiere de la proteína coronina para su regulación.

Bibliografía:

- Asano S., Mishima, M. y Nishida E. 2001. Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery. *Genes Cells*; 6: 225-35.
- Brent A. A., Ping Wu, y Wiesmann C. 2005. The crystal structure of murine Coronin-1: A regulator of actin cytoskeletal dynamics in lymphocytes, *Structure*. Elsevier 14: 87-96,
- Bartnicki-Garcia, Hergert, F., Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma* 153: 46-57.
- Bartnicki-García, S., Hegert, F., Gierz, G., 1990. A novel computer model for generating cell shape: application to fungal morphogenesis. *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Springer, Berlin, 43-60.
- Bartnicki-Garcia S., Bartnicki D.D., Gierz G., López-Franco R. y Bracker C.E. 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model *Exp Mycol* 19: p 153-159.
- Bartnicki-Garcia S. 2002. Hyphal tip growth: outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker: New York p 29-58.
- Boldogh, I. R., Yang H. C., Nowakowski, W. D., Karmon, S. L., Hays, L. G., Yates, J. R., y Pon, L. A. 2001-a. Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: p 3162-3167.

- Boldogh, I. R., Yang H. C, y Pon L. A. 2001-b. Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic* 2: p 368–374.
- Cai, L., Holoweckyj, N. y Schaller, M.D. 2005. Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J Biol Chem*; 280: 31913-23.
- Chimini, G. y Chavrier. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nature Cell Biol.* 2: 191-196.
- de Hostos, E.L., 1999. The coronin family of actin-associated proteins. *Trends in Cell Biology* 9: p 345–350.
- Degous, N., Gupta, G.D., Lew, R.R. y Heath, I.B., 2000. A putative spectrin-containing membrane skeleton in hyphal tips of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 30: 33–44.
- Delgado-Álvarez, D. 2008. Tesis de Licenciatura. Organización y dinámica del citoesqueleto de F-actina en *Neurospora crassa*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias. 70pp.
- Drubin, D.G. y Nelson, W.J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell* 84: 335-344.
- Fukui Y, Engler S, Inoue S. y de Hostos E.L. 1999: Architectural dynamics and gene replacement of coronin suggest its role in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 42: 204-217.
- Fuchs, F., y Westermann, B., 2005. Role of Unc104/KIF1-related motor proteins in mitochondrial transport in *Neurospora crassa*, *Mol. Biol. Cell* 16: 153–161.

- Fuchs F., Prokisch H., Neupert W. y Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*, J. Cell Sci. 115: p 1931–1937.
- Fischer-Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A., and Read, N.D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. J Microsc 198: 246–259.
- Gatfield, J. Imke Albrecht, Bettina Zanolari, Michel O. Steinmetz, y Jean Pieters, 2005. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. Mol. Biol. Cell 16: p 2786–2798
- Goode BL, Wong JJ. y Butty A.C. 1999. Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. J. Cell Biol. 144: p 83–98
- Gerisch, G., Albrecht, R., Heizer, C., Hodgkinson, S. y Maniak, M., 1995. Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. Current Biology 5: 1280–1285.
- Gierz, G., Bartnicki-García, S., 2001. A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. J. Theor. Biol. 208: 151–164.

- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., y Momany, M. 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* 4: 225–229.
- Harris, S.D. 2006. Cell polarity in filamentous fungi: zapping the mold. *Int Rev Cytol* 251: 41–77.
- Humphries, C.L., Balcer, H.I. y D'Agostino, J.L. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol*; 159: 993-1004.
- Heath, I.B., 1995. Integration and regulation of hyphal tip growth. *Can. J. Bot.* 73: 131–139.
- Howard, R.J., 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Sci.* 48: 89–103.
- Horio, T., y Oakley, B.R. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 16: 918–926.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Böhm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., y Sigler, P.B. 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379: 311–319.
- Lazzarino, D.A., Boldogh I., Smith M.G, Rosand J. y Pon L.A., 1994. Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity, *Mol. Biol. Cell* 5 807–818.

- Liu, C.Z., Yong Chen y Sen Fang Sui 2006. The identification of a new actin-binding region in p57. *Cell Res.* 16: p 106–112
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell. 2004. *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. W. H. Freeman, E. U. A. 700-787 pp.
- Maniak, M, Rauchenberger, R, y Albrecht, R. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*; 83: 915-24.
- Machesky, L.M., Reeves E. y Wientjes F. 1997. Mammalian actin related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J.* 328:105-12.
- Mishima, M. y Nishida, E. 1999. Coronin localizes to leading edges and is involved in cell spreading and lamellipodium extension in vertebrate cells. *J. Cell Sci.* 112: p 2833–2842
- Mitchison, T.J. y Cramer, L.P. 1996 Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379.
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 580–585.
- Moseley J. B. y Goode B. I. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism”, *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 70: 605–645

- Oku, T., Itoh, S., Okano, M., Suzuki, A., Suzuki, K., Nakajin, S., Tsuji, T., Nauseef, W.M. y Toyoshima, S., 2003. Two regions responsible for the actin binding of p57, a mammalian coronin family actin-binding protein. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 409–416.
- Peñalva, M.A. 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* 42: 963–975.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Prokisch, H., Neupert, W., Westermann, B., 2000. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 11: 2961–2971.
- Ramos-García, L. 2006. Papel del flujo citoplasmático y las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos en el desplazamiento nuclear en hongos filamentosos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 62 pp.
- Read, N. D. y Kalkman, E. R. 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology* 39; p 199–203.
- Reynaga-Pena, C.G. y Bartnicki-Garcia, S. 1997, Apical branching in a temperature sensitive mutant of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology* 22: 153–167
- Riquelme, M., Gires, G., y Bartnicki-García, S. 2000. Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and

- distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology UK* 146: 1743-1752,
- Riquelme, M., Reynaga-Peña C.G., Gires, G. y Bartnicki-García S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 24: 101-109,
- Rodal, A. A., L. Kozubowski, B. L. Goode, D. G. Drubin, y J. H. Hartwig. 2005. Actin and septin ultra-structures at the budding yeast cell cortex. *Mol. Biol. Cell* 16: 372–384.
- Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., y Goode, B.L. 2005. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 26–31.
- Satterwhite, L.L. y Pollard, T.D. 1992, Cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 43-52.
- Sheterline, P., Clayton J. y Sparrow J. C. 1998. *Actin: Protein Profile*, 4th edition. Oxford University Press Inc., New Cork
- Smith, M.G., Swamy, S.R., y Pon, L.A. 2001. The life cycle of actin patches in mating yeast. *J Cell Sci* 114: 1505–1513.
- Spoerl, Z. Stumpf M., Noegel A. A., y Hasse, A. 2002. Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 277: 48858–48867

- Steinberg, G. 2007. On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 5: 309–316.
- Stossel, T.P., 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260: p 1086 -1094.
- Suelmann, R. y Fischer, R., 2000. Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45: 42–50.
- Taheri-Talesh, N., Tetsuya Horio, Araujo-Bazan, L., Xiaowei Dou, Espeso, E. A., Peñalva M. A., Osmani, S. A., y Oakley B. R., 2008. The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*, *Molecular Biology of the Cell* Vol. 19: 1439–1449
- Torralba, S., Raudaskoski, M, Pedregosa, A. y Laborda, F., 1998, Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology UK* 144: 45-53,
- Uetrecht, A. C. y. Bear J. E. 2006. Coronins: the return of the crown. *Trends in Cell Biology*.16: 421-6.
- Upadhyay S. y Shaw B. D. 2008. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 68 (3): 690-92
- Virag, A. y Griffith A.F. 2004. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching, *Fungal Genetics and Biology* 41: 213–225

Welch, M.D. y Mullins, R.D. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu.*

Rev. Cell Dev. Biol. 18: 247–288

Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman,

A.G., y Sprang, S.R., 1995. The structure of the G protein heterotrimer.

Cell 83: 1047–1058.

Walker, S. A. y Garrill, A. 2006. Actin microfilaments in fungi. *Mycologist* 20: 26-

31

Apéndice

Sales de Vogel 50 x (1 L)

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

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

Almacenar a 4 °C.

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

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

Medio Mínimo de Vogel-Agar 1.5 %(1 L)

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

Medio Mínimo de Vogel líquido (1 L)

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

Medio Sintético de Cruzas (1 L)

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
Elementos traza	50 µl
Biotina	50 µl
Agar	10 g
Agua destilada	Aforar a 500 ml
Esterilizar por autoclave	

Solución de elementos traza (100 ml)

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

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

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

L-histidina (25 mg ml⁻¹)

L-histidina	1.25 g
Agua destilada	50 ml
Esterilizar por filtración (0.25 µg)	

Solución FIGS 10 x (1 L)

Sorbosa	200g
Fructosa	5 g
Glucosa	5 g
Inositol	2 g

Agua destilada Aforar a 1 L
Esterilizar por filtración (0.22 µm)

Medio FIGS-Agar 1 % (1 L)

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

Medio de regeneración (1 L)

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

Medio LB-Agar 1.5 % (1 L)

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

Esterilizar por autoclave

Medio LB líquido (1 L)

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

Esterilizar por autoclave