

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y  
MICROSCÓPICA DE LA MUTANTE DE *Neurospora*  
*crassa sec5*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

ALEJANDRO BELTRÁN AGUILAR

Ensenada, B. C.

Agosto de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y  
MICROSCÓPICA DE LA MUTANTE DE *Neurospora*  
*crassa sec5*

T E S I S   P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA

ALEJANDRO BELTRÁN AGUILAR

APROBADO POR:

DRA. MERITXELL RIQUELME PÉREZ  
PRESIDENTE

DRA. NAHARA ERNESTINA AYALA SÁNCHEZ  
SECRETARIO

DR. MARIO ALBERTO VARGAS OLVERA  
IER. VOCAL

Ensenada, B. C.

Agosto de 2006

Agradecimientos:

A la Facultad de Ciencias de la UABC, por haberme dado un lugar y las herramientas tan necesarias para poder aprender, no solo de la teoría sino también de la práctica. A los maestros por involucrarnos en las diferentes ramas de las ciencias biológicas, así como a su trato personal.

Al CICESE y muy en especial al Departamento de Microbiología y a la Dra. Meritxell Riquelme Pérez por su amable disponibilidad, visión, trabajo y apoyo en todo momento, tanto en el ámbito profesional como en el personal. A las Dras. Rosa Reyna Mouriño Pérez y Ernestina Castro Longoria por su ayuda tan valiosa. Al Dr. Salomón Bartnicki García por motivarnos con su ejemplo y dedicación. A mis compañeros del laboratorio: Alma Aurora Arreola Cruz, Raúl C. Baptista Rosas, Cynthia L. Araujo Palomares, Silvia Lucrecia Ramos García y Eddy Francisco Sánchez León-Hing, por hacer del laboratorio un bello lugar de trabajo.

A mis padres y hermanos por su gran apoyo

Francisco Beltrán Cortez  
Ana Maribel Aguilar Peraza  
Francisco Beltrán Aguilar  
Ericka Maribel Beltrán Aguilar  
Ariel Fernando Beltrán Aguilar

A mis compañeros de carrera que juntos compartimos la aventura de aprender en clase, en el campo, en el laboratorio y en lo personal: Alejandro González Bernal, Carlos Flores López, Gonzalo De León Girón (Chalo), Iván A. Peraza Perales (Ñangas), Tanya A. Camacho Villegas, Dinora Acosta, Monserrat Torres Medina, Leopoldo Ávila Velasco (Polo), Sarhuén Ávila Moreno, Marlenne Rodríguez Malagón, Carolina Álvarez Delgado, Amanda Dávila Lezama, Ricardo Valencia Yañez (Vale), Ricardo Cruz López (Richie), Manuel A. Favela, Manuel Maldonado (Barbas), Anny Peralta, Hernán Rodríguez, Ricardo Guzmán Olachea (Güero), Josué Díaz Vázquez (Chido), Daniel Vázquez (Negro).

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS ..... i, ii

RESUMEN ..... iii

	Páginas
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Los Hongos: las Hifas y el Micelio .....	1
1.2 El Spitzenkörper: Secreción y Formación de Pared .....	3
1.3 Polarización de la Ruta Secretora .....	3
1.4 <i>Neurospora crassa</i> : Modelo de Estudio .....	6
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1 La Ruta Secretora: El Exocisto .....	9
2.2 Mutantes Morfológicas .....	11
2.3 Inhibidores de la Ruta de Secreción .....	13
2.4 Marcaje de Proteínas con GFP .....	15
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
5.1 Organismos y Cepas .....	19
5.2 Cultivos .....	19
5.3 Microscopía y Análisis de Imágenes .....	20
5.4 Medición del Crecimiento .....	21
5.5 Desajuste al Modelo Hifoide .....	22
5.6 Observación de Germínulas .....	22
5.7 Brefeldina A (BFA) .....	23
5.8 Construcción de Plásmidos y Técnicas Moleculares .....	23
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
6.1 Morfología de <i>N. crassa sec5</i> .....	25
6.2 Organización Intracelular de <i>N. crassa sec5</i> .....	27
6.3 Ramificación .....	29
6.4 Germinación .....	30
6.5 Tamaño y Tasa de Crecimiento .....	32
6.6 Tratamiento con BFA .....	34

6.7	Clonación y Expresión de <i>sec5::gfp</i> .....	37
6.8	Localización de Sec5::GFP en <i>N. crassa</i> .....	40
7.	DISCUSIÓN .....	42
7.1	Morfología .....	42
7.2	Tasa de Crecimiento .....	43
7.3	Ramificación .....	44
7.4	Germínulas .....	44
7.5	Tratamiento con BFA .....	45
7.6	Sec5::GFP .....	45
8.	CONCLUSIONES .....	47
9.	PERSPECTIVAS .....	49
9.1	Secuenciación del Gen <i>sec5</i> .....	49
9.2	Cruzas para la Obtención de Monocariontes .....	49
9.3	Clonación y Expresión de <i>sec5::gfp</i> con el Promotor Endógeno .....	50
9.4	Clonación y Expresión de Fusiones de Otros Componentes del Exocisto .....	50
10.	REFERENCIAS .....	51
11.	APÉNDICES .....	66

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN.

- Figura 1. Diagrama del Exocisto..... 5
- Figura 2. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*..... 7

### MATERIALES Y MÉTODOS.

- Figura 3. Hifa modelo..... 22

### RESULTADOS.

- Figura 4. Representación esquemática del plásmido pMF272..... 24
- Figura 5. Morfología colonial de *N. crassa sec5*..... 25
- Figura 6. Micrografía de *N. crassa sec5*..... 26
- Figura 7. Ajuste de hifas a la curva hifoide..... 27
- Figura 8. Organización celular ..... 28
- Figura 9. Gráfica del tamaño de los diámetros..... 29
- Figura 10. Comparación de hifas maduras..... 30
- Figura 11. Comparación de germínulas..... 31
- Figura 12. Reconstrucción bidimensional de germínulas..... 32
- Figura 13. Comparación de tasas de crecimiento..... 33
- Figura 14. Imagen de micelio afectado por BFA..... 35
- Figura 15. Hiperramificación provocada por BFA..... 36
- Figura 16. Morfología celular causada por BFA..... 37
- Figura 17. Comprobación de amplificación del gen *sec5*..... 38
- Figura 18. Amplificación de *sec5* en *E. coli*..... 39
- Figura 19. Análisis de sitios de restricción..... 40

**Figura 20. Distribución celular de la fusión proteica SEC5::GFP.... 41**

Resumen de la Tesis de Caracterización macroscópica y microscópica de la mutante de *Neurospora crassa sec5* presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California México, fecha.

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Nombre del (la) Director (a) o Coordinador (a)

Las hifas son las unidades básicas de crecimiento de los hongos filamentosos. Su modo de extensión es mediante crecimiento apical, el cual implica la secreción polarizada de vesículas formadoras de la pared celular. El crecimiento polarizado, así como la maquinaria para la secreción, dependen de mecanismos muy conservados desde el punto de vista filogenético y sus componentes comparten una enorme similitud en organismos muy diferentes desde las levaduras hasta las neuronas de los mamíferos. La exocitosis es un evento en la última etapa de la secreción donde las vesículas secretoras se fusionan con la membrana plasmática mediante el reconocimiento de marcadores específicos (v-SNARES de vesículas y t-SNARES de la membrana plasmática). El exocisto es un complejo proteico octamérico (Exo70p, Exo84p, Sec3, -5, -6, -8, -10 y -15p) (743 kDa) entre cuyas funciones está la de mediar la interacción de las vesículas secretoras con los sitios de anclaje en la membrana plasmática para que proceda la exocitosis. El Spitzenkörper es una estructura que se forma en la región apical de las hifas en crecimiento a la cual se ha atribuido la función de centro suministrador vesículas (CSV). El uso de mutantes morfológicas ha permitido el estudio del papel de ciertos genes implicados en el crecimiento apical y la morfología de las hifas. En el presente trabajo se analizó la morfología colonial y celular, y el crecimiento de la cepa mutante de *Neurospora crassa sec-5*, mutada por exposición a radiación ultravioleta. A bajo aumento, *N. crassa sec-5* muestra una morfología colonial alterada, presentando hifas altamente distorsionadas y con muchas ramificaciones. La tasa de crecimiento de la cepa mutante es de 21.73  $\mu\text{m/hr}$ , (2.03% de la tasa de crecimiento de la cepa silvestre). A alto aumento la composición intracelular de las hifas de *N. crassa sec-5* también se ve afectada. Una de las diferencias más drásticas con respecto a la cepa silvestre, es que en la cepa mutada no se observa Spitzenkörper en el ápice por microscopía de contraste de fases. Los resultados preliminares sugieren que *sec-5*, un componente del exocisto de 107 kDa, juega un papel imprescindible en la formación del Spitzenkörper y también en el mantenimiento de la distribución espacial y morfológica intracelular de las hifas. Se realizó una fusión *sec5::gfp* y al expresarse en hifas de *N. crassa* WT se observó que SEC5::GFP no colocaliza con el Spitzenkörper, sino más bien con la red endomembranal del RE y Golgi. Este estudio establece la base para llevar a cabo futuros análisis encaminados a elucidar el papel que juegan las proteínas homólogas del exocisto en el crecimiento apical de los hongos filamentosos.

## INTRODUCCIÓN

### **Los Hongos: las Hifas y el Micelio**

Los hongos son organismos descomponedores heterótrofos, que necesitan nutrientes solubles tales como minerales y fuentes de carbón preformadas; además dependen de la secreción de proteínas líticas al exterior para digerir el alimento. Los hongos no poseen pigmentos como la clorofila y la mayoría son multicelulares, por lo tanto pueden ser vistos con relativa facilidad, aunque para su identificación y análisis celular sea necesario el empleo de la microscopía (Deacon, 1997; Gow y Gadd, 1995). En la mayor parte de su ciclo celular, casi todos los hongos están constituidos por células con forma tubular llamadas hifas, las cuales se alargan por crecimiento apical polarizado y constituyen las unidades de crecimiento de los hongos filamentosos (Deacon, 1997; Seiler y Plamann, 2003). Se pueden encontrar hifas de diferentes medidas, cuyos diámetros van desde  $1\mu\text{m}$  hasta los  $30\mu\text{m}$ , aunque generalmente oscilen en un rango de  $5\text{-}10\mu\text{m}$  (Deacon, 1997). La hifa ramifica dependiendo de la relación entre la absorción de nutrientes y la capacidad de los puntos existentes para secreción o consumo. Las ramas pueden crecer y ramificar generando una red de hifas o filamentos hasta establecer una colonia o micelio cuya forma tiende a ser radial (Gow y Gadd, 1995).

En cuanto a su constitución celular, las hifas pueden ser cenocíticas (cuando las hifas son aseptadas), y septadas (con uno o varios núcleos en cada compartimento). Los compartimentos de las hifas septadas se comunicadas a

través de poros, por los cuales pueden correr desde agua, iones y nutrientes hasta vesículas, mitocondrias y otros organelos incluyendo núcleos. Los núcleos de los hongos filamentosos comúnmente son pequeños (1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro) comparados con los de la mayoría de los eucariotas (3-10  $\mu\text{m}$  de diámetro); su flexibilidad morfológica les permite ser desde globulares hasta altamente elongados (Somers *et al.*, 1960; Namboodiri y Lowry, 1967; Gow y Gadd, 1995; Alexopoulos *et al.*, 1996). En la mayoría de los eucariotas el aparato de Golgi consiste en una serie de lamelas apiladas asociadas al tráfico citoplásmico de vesículas; los hongos filamentosos poseen equivalentes al aparato de Golgi que en lugar de presentarse como una serie de cisternas se exhiben de forma redondeada (Sewall *et al.*, 1989). Las mitocondrias son parecidas a las de la mayoría de los animales por tener las crestas con forma aplanada o de plato, solo que estas crestas se encuentran distribuidas a lo largo del eje longitudinal de la hifa; en algunas especies son mucho más alargadas que las de otros eucariotas ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ) (Beckett *et al.*, 1974; Gow y Gadd, 1995). Además las hifas tienen una estructura, llamada Spitzenkörper (traducido del alemán al español como cuerpo apical) definida como cuerpo de fase oscura que se encuentra en la puntas de las hifas en crecimiento y que consiste en una organización de vesículas secretoras en la zona apical de las hifas que dirige el crecimiento de las hifas y varía de forma de acuerdo a la especie y otros factores (Brunswick, 1924; Girbardt, 1957; 1969; López-Franco, 1992; Riquelme *et al.*, 1998; Gierz y Bartnicki-García, 2001).

## **El Spitzenkörper: Secreción y Formación de Pared**

Las hifas de los basidiomicetos y los ascomicetos tienen una pared celular constituida en su mayor parte por glucanos con enlaces  $\beta$ -1,3 y ramificaciones  $\beta$ -1,6;  $\alpha$ -quitina que consiste en subunidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con enlaces  $\beta$ -1,4, formada a partir de glucosa-6-fosfato por varias adiciones de un grupo amino y un grupo acetil de la acetil-coenzima A (acetil-CoA). Después, la GlcNAc reacciona con el trifosfato de uridina (UTP) para formar UDP-GlcNAc más un fosfato libre, y ésta molécula se añade a la cadena en elongación (Deacon, 1997). La pared celular de la hifa juega un papel muy importante en el desarrollo y la forma del hongo y es en la zona apical, donde se encuentra el Spitzenkörper, donde sucede la mayor adición de membrana y pared celular (Alexopoulos *et al.*, 1996; Deacon, 1997; Davis, 2000; Tórtora *et al.*, 2004). Al Spitzenkörper se le ha atribuido la función de centro suministrador de vesículas (CSV) (Bartnicki-García *et al.*, 1989; 1995; Gierz y Bartnicki-García, 2001). Es de gran importancia el estudio del Spitzenkörper a fin de saber la dinámica de las proteínas implicadas en la secreción y determinación de la morfología fúngica, así como el crecimiento.

## **Polarización de la Ruta Secretora**

Pocos genes han sido identificados relacionados con el crecimiento y la morfología de las hifas. La polaridad de cada célula es una propiedad fundamental para mantener la forma y el desarrollo de cualquier organismo (Seiler y Plamann, 2003). El crecimiento polarizado posee mecanismos muy conservados en diversos

grupos taxonómicos, tal es el caso de la maquinaria para la secreción, cuyos componentes comparten una enorme similitud en organismos tan diferentes que van desde las levaduras hasta las neuronas de los mamíferos (Bennett y Scheller, 1993). La exocitosis es uno de los últimos pasos de la ruta secretora donde las vesículas secretoras se fusionan con la membrana citoplasmática. Mediante la exocitosis las proteínas, los lípidos y otros compuestos de las vesículas pueden ser incorporados a la membrana, así como secretados, ambos mediante la ayuda, entre otros, de complejos proteicos asociados a la misma como es el caso del exocisto (Fig. 1) en levaduras: complejo protéico octamérico (SEC3, -5, -6, -8, -10, -15p, Exo70p y Exo84p) de 743 kDa, cuya función es interactuar con las vesículas secretoras y servir como sitio de anclaje para la parte final de la exocitosis (Guo *et al.*, 1999a). El exocisto está periféricamente asociado a la membrana plasmática (Bowser *et al.*, 1992) y altamente concentrado en las regiones de crecimiento apical (TerBush y Novick, 1995; Finger y Novick, 1998). El mecanismo por medio del cuál el exocisto promueve el anclaje de alta fidelidad de vesículas secretoras no ha sido determinado y se cree que es necesario previo al ensamblaje de los SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor fusion attachment protein receptors). En el cuello madre-hija de levaduras, sitio de exocitosis activa, es donde se ha logrado observar una acumulación de las proteínas del exocisto (Guo *et al.*, 1999a). Murthy *et al.* (2003), encontraron la proteína SEC5 en la membrana apical de células polares de ovario de *Drosophila melanogaster*.

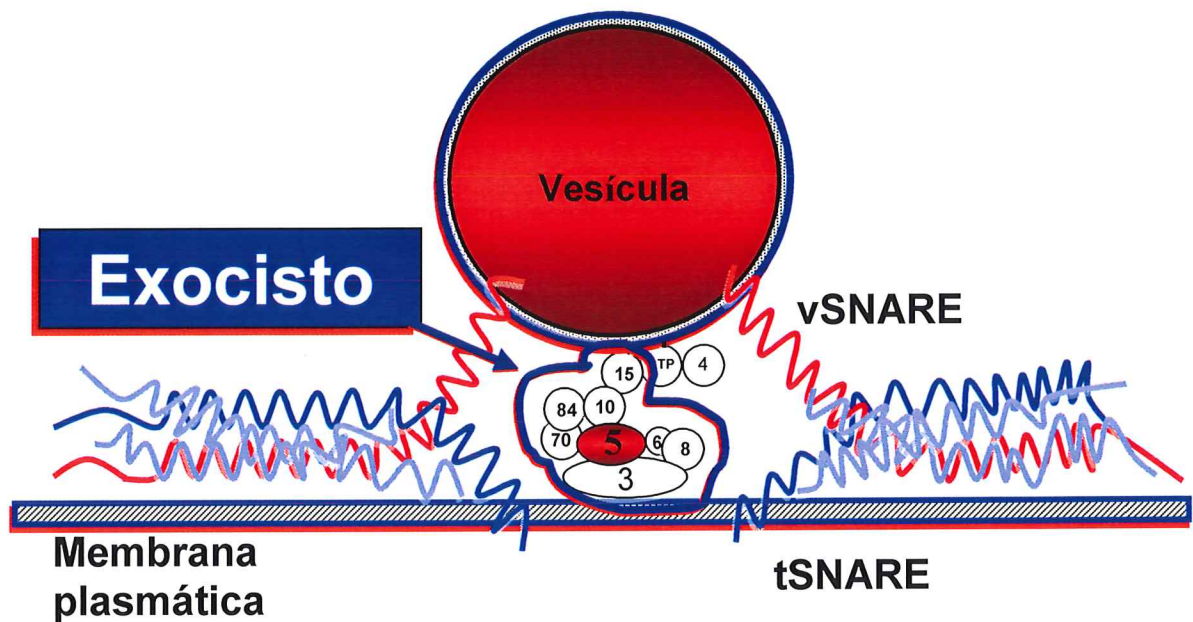


Figura 1. Diagrama mostrando el exocisto con sus 8 componentes (SEC3, -5, -6, -8, -10, -15p, Exo70p y Exo84p) y otros constituyentes (v-SNAREs, t-SNAREs, entre otros) relacionados con el proceso de exocitosis (modificado de Guo *et al.*, 1999a; Guo *et al.*, 1999b; Moskalenko *et al.*, 2003; Boyd *et al.*, 2004, Bonifacino y Glick, 2004).

El crecimiento apical es la característica más distintiva de los hongos y es desde hace tres décadas uno de los temas de investigación más activos en el campo de la biología celular de hongos (Deacon, 1997). El análisis del transporte de vesículas secretoras es lo que sin duda resolverá muchas preguntas acerca del crecimiento apical en células polarizadas (Davis, 2000).

En campos de estudio como la fitopatología, la biotecnología, la medicina y otros, sería de gran utilidad para tener un mejor entendimiento del proceso de secreción y el crecimiento celular polarizado, poder inducir o inhibir el crecimiento de hongos beneficiosos o perjudiciales, respectivamente.

### ***Neurospora crassa*: Modelo de Estudio**

Durante varias décadas se ha utilizado el hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Shear y Dodge, 1927) por poseer atributos que le hacen ser un excelente modelo de estudio en el laboratorio como lo son su bioquímica, citología y genética que han sido ampliamente estudiadas. Otras de sus cualidades son la producción de estructuras diferenciadas que pueden ser analizadas bioquímicamente y la existencia de innumerables cepas mutantes con alguna falla en uno o varios estadios del desarrollo morfológico. *N. crassa* posee una maquinaria cuya cinética le permite crecer a velocidades  $\geq 1 \mu\text{m/s}$  (Seiler y Plamann, 2003). El ciclo de vida de *N. crassa* es de sólo 10 días (Fig. 2) y el motivo por el que ha sido un microorganismo muy empleado en estudios de genética es que se pueden obtener millones de esporas por reproducción sexual y asexual con carga genética  $n$ , por lo tanto los genes recesivos no pueden ser “enmascarados”.

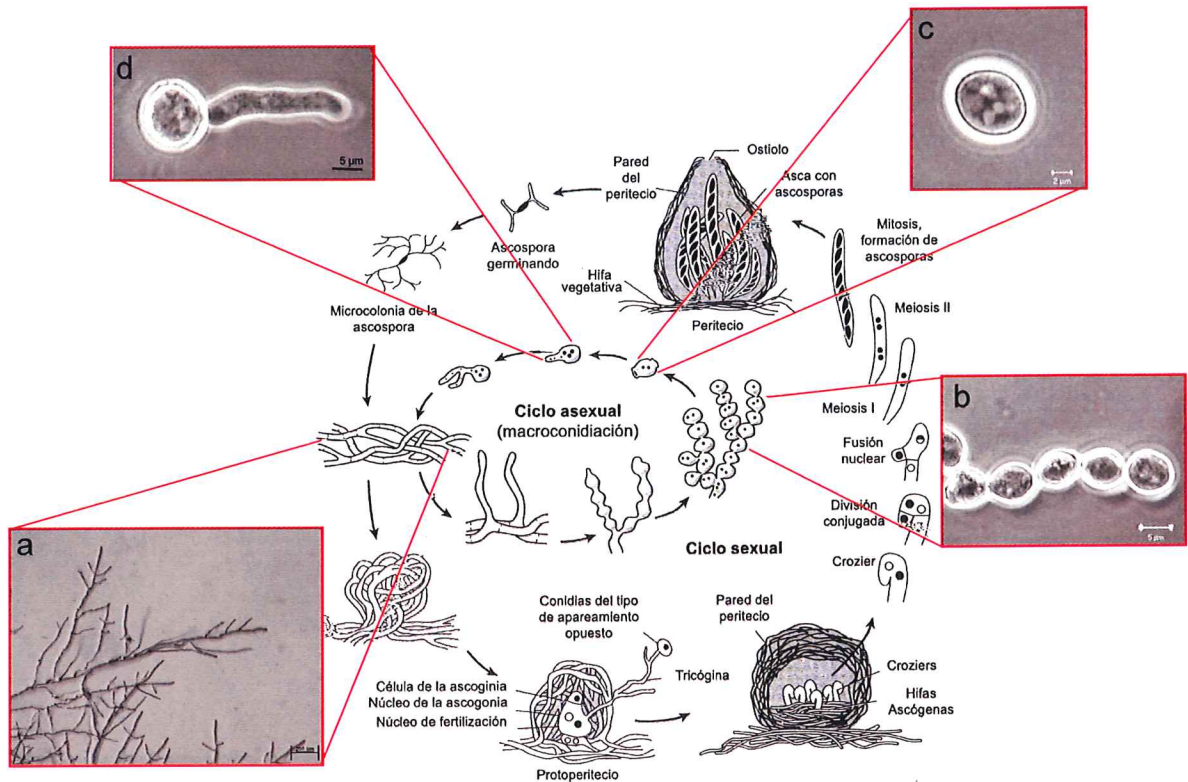


Figura 2. Ciclo de vida de *Neurospora crassa* con sus estructuras más representativas observadas en contraste de fases (b,c,d) y campo claro (a): micelio/hifas (a), cadena de premacroconidioesporas (b), macroconidioespora (c), germínula (d) (Adaptado de Davis, 2000).

El genoma de *N. crassa* ha sido secuenciado y se cree que debe comprender entre 10,000 y 13,000 genes, aproximadamente el doble que la mayoría de las levaduras y más de la mitad que *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (con  $\approx 14,000$  y  $\approx 19,000$  respectivamente) (Galagan, 2003; Borkovich, *et al.*, 2004; Seiler y Plamann, 2003). Se han identificado muchos genes de *N. crassa* involucrados en procesos secretorios pero todavía falta desenmascarar la función de estos genes (Seiler y Plamann, 2003). *N. crassa* crece en medios de composición definida que contienen nitrato, biotina, fosfato,

sulfato, otras sustancias inorgánicas y azúcar, siendo el MMV uno de los más empleados, tanto para crecimiento vegetativo, como para mantenimiento en cepario (Davis, 2000).

## ANTECEDENTES

### La Ruta Secretora: El Exocisto

No se sabe mucho sobre los componentes y el funcionamiento de la ruta de secreción en los hongos filamentosos. En la mayoría de células eucariotas, el primer paso en la ruta de secreción implica la síntesis de proteínas secretadas y proteínas de membrana en el retículo endoplasmático. Las vesículas conteniendo estas proteínas se transfieren a las cisternas de Golgi, donde se incorporan en vesículas secretoras que se distribuirán a la membrana plasmática. Las vesículas muestran en su superficie marcadores (v-SNARES), y las membranas aceptoras muestran receptores complementarios (t-SNARES). El exocisto fue descrito por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E. C. Hansen, 1883) en 1996 por TerBush *et al.*, solo que las proteínas que ellos describen como componentes del complejo son sólo 7 (SEC3, -5, -6, -8, -10, -15p y Exo70p). En 1999 Guo *et al.* (1999b), reportan otro componente adicional, Exo84p, se encuentra en zonas de exocitosis activa igual que otros componentes del exocisto, sugiriendo que interactúa con otros componentes del exocisto y en levaduras con *sec5* mutado, la Exo84p pierde localización normal. Lo anterior fue la base para clasificar a Exo84p como el componente número 8 del exocisto. Este componente es reclutado por una Rab GTPasa, y actúa atrayendo dos membranas lo suficientemente cerca para permitir el apareamiento de los SNAREs. El exocisto es un complejo conservado evolutivamente hablando y se predice que dirige la fusión de vesículas a lugares de exocitosis especializados en las células eucariotas (Bennett y Scheller, 1993).

Una proteína implicada directamente en la secreción, la syntaxina SEC1p, fue descubierta por Novick y Shekman (1979) en mutantes de *S. cerevisiae*. Durante la exocitosis SEC1p interactúa con otras proteínas en la membrana plasmática (Salminen y Novick, 1987; Goud *et al.*, 1988). SEC4p forma parte del grupo de las GTPasas; SEC2p sirve como factor de cambio del nucleótido guanina, para SEC4p; SEC9p es parte de la familia SNAP-25; SEC17 de  $\alpha$ SNAP; SEC18p del grupo del NSF y las restantes son parte de procesos tempranos de la secreción (SEC7, -11, -12, -13, -14, -16, -19, -20, -21, -22, -23p) (Brenwald *et al.*, 1994).

Las proteínas SEC3, -5, -6, -8, -10p, -15p, Exo70 y Exo84p junto con SEC1p y SEC2p participan en la etapa post-golgi de la secreción en levaduras (TerBush y Novick, 1995; TerBush *et al.*, 1996, Guo *et al.*, 1999b). SEC3, -5, 6, -8, -10 y 15p, como se comentó anteriormente son parte del complejo de multisubunidades que especifican dominios para la distribución de vesículas exocitóticas llamado exocisto (TerBush *et al.*, 1996). También en levaduras se ha visto que el complejo es localizado en la región donde emerge la punta (región célula madre-célula hija) y sucede una activa exocitosis. Como la localización de SEC3p es independiente de la ruta secretora y del citoesqueleto de actina, Finger y Novick (1998) sugieren que provee espacio especial para el anclaje de vesículas a la membrana plasmática. El análisis de la compartimentalización y de las interacciones de SEC10, -15p y Exo84p sugieren que se pueden asociar a las vesículas secretoras e interactuar con la SEC4p (una Rab GTPasa) (Novick y Guo, 2002), así como el control del ensamblaje por medio de Ral GTPasas,

aportando un sitio específico para la exocitosis en la membrana plasmática (Moskalenko, *et al.*, 2003). El exocisto demuestra tener un papel clave en el anclaje de vesículas secretoras y en el acoplamiento e interacción con GTPasas para la fusión de la maquinaria secretora (Guo *et al.*, 1999a; Guo *et al.*, 1999b). Guo *et al.* (1999b) encontraron que Exo84p, otra proteína involucrada en la secreción sin la cual no sobreviven las levaduras (Guo *et al.*, 1999b), interactúa de manera muy directa con SEC5 y SEC10 de tal manera que cuando existe una sobreexpresión de Exo84p, SEC5p se ve suprimida en la sensibilidad con respecto a la temperatura. Guo *et al.* (1999b) también comentan que es posible que Exo84p se una directamente con SEC5p y SEC10p y por lo tanto un defecto en cualquiera de los componentes conduce a una ineficiente incorporación del exocisto. Para analizar la función de los componentes del exocisto, se pueden estudiar mutantes morfológicas y el papel de inhibidores específicos, así como evaluar la localización y tráfico de proteínas marcadas con proteínas fluorescentes.

### **Mutantes Morfológicas**

En algunos hongos filamentosos se han inducido muchas mutaciones con el fin de bloquear rutas metabólicas, tal es el caso de la exocitosis, aunque aún no se han descrito completamente los genes que codifican para las proteínas involucradas en la ruta secretora y es el estudio de las mismas lo que sin duda proporcionará el conocimiento de muchos procesos celulares. Básicamente hay tres tipos de mutaciones: las sustituciones, las deleciones y las inserciones.

Algunas de las mutaciones son provocadas por agentes químicos como: el etilmetanosulfonato (EMS), el ácido nítrico (NA) y la hidroxilamina provocan sustitución de bases y el ICR-170 por su parte, mutaciones del tipo indel (Inserción-delección) lo que puede resultar en cambios en los marcos de lectura abierta de algunos genes (Davis y de Serres, 1970). Otras mutaciones pueden ser provocadas por radiaciones como los rayos X, que pueden ser un agente mutagénico efectivo en caso de buscar mutaciones al azar; o la luz UV, que produce mutaciones por provocar la formación de dímeros de piridimas (T-T, T-C y C-C) de una manera muy práctica y sencilla, ya que a comparación de los rayos X es menos riesgosa para el hombre y tampoco deja residuos como los agentes mutágenos químicos (Davis y de Serres, 1970; Karp, 2005).

En 1980 y 1981 Novick *et al.* utilizaron EMS o NA para producir mutaciones al azar en genes de *Saccharomyces cerevisiae* que fueron seleccionadas bajo las siguientes condiciones:

- (a) Incremento de la densidad celular debido a la producción de proteínas y lípidos en ausencia de división celular o crecimiento.
- (b) Un bloqueo en la exocitosis de invertasa y de ácido fosfatasa mientras que los niveles de síntesis proteica se mantenían a nivel normal.
- (c) Acumulación de vesículas.

Los resultados de las mutaciones mostraron la identificación de muchos genes (*sec*) que codifican para proteínas involucradas en la secreción (Wu *et al.*, 1999).

Garnjobst y Tatum (1967) clasificaron colonias de *N. crassa* mutadas por exposición a luz ultravioleta en seis clases. Seiler y Plamann (2003) aislaron y clasificaron mutantes de *N. crassa* producidas con radiación UV en cinco clases y múltiples subclases. Sólo seleccionaron mutantes con los siguientes fenotipos: *clase IA*, defectos generales de polaridad; *clase IB*, defectos generales de polaridad sólo en las regiones distales de la punta; *clase IC*, defectos de polaridad restringido a la punta de las hifas; *clase IIA*, mutantes con varios defectos en el establecimiento y mantenimiento de ramas y puntas hifales; y *clase IIB*, mutantes que están defectuosas en la direccionalidad del crecimiento. También aislaron alrededor de más de 100 genes de aproximadamente 950 mutantes y sólo encontraron cerca del 5% de mutaciones completamente dominantes. Los genes mutados secuenciados fueron comparados con sus homólogos más cercanos pertenecientes a animales (humano, ratón y *Drosophila sp.*) y hongos (*S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Lindner, 1893)). Las cepas que adquirieron un mayor interés en el trabajo de Seiler y Plamann (2003), fueron las que desarrollaron un marcado defecto en el crecimiento polarizado, entre ellas *N. crassa sec5*. Estos autores recalcan el hecho de que la colección de mutantes descritas en su trabajo es un recurso valioso para la elucidación de la morfogénesis en el hongo filamentoso *N. crassa*.

### **Inhibidores de la ruta de secreción**

El uso de sustancias químicas que afectan el proceso secretorio puede ayudar a la comprensión del mecanismo a nivel molecular (Misumi *et al.*, 1986).

Klausner *et al.* (1992) estudiaron la inhibición de la secreción causada por uno de los metabolitos del hongo *Eupenicillium brefeldianum* (Dodge, 1933), la Brefeldina A (BFA). La BFA inhibe la secreción en un punto muy temprano del proceso, deteniendo el transporte de proteínas involucradas en el desarrollo de la secreción no permite la exportación membranal del R. E. (Oda *et al.*, 1987; Takatsuki y Tamura, 1985; Misumi *et al.*, 1986). La BFA actúa directamente con el factor de ribosilación de ADP (ADP-Ribosylation Factor o ARF por sus siglas en inglés) que provee la energía necesaria para suministrar COPI a las membranas (Donaldson *et al.*, 1992; Orci *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1993; Rothman y Wieland, 1996). Donaldson y Klausner (1994), descubrieron que cuando no hay suministro de COPI a las membranas de Golgi, se produce una tubulación; Golgi se alarga tanto que se fusiona con el R. E. y desaparece al ser absorbido por éste último (Sciaky *et al.*, 1997). Con el empleo de inmunofluorescencia se ha demostrado que las proteínas membranales y las proteínas secretoras son bloqueadas en un compartimiento previo al aparato de Golgi en células tratadas con BFA (Fujiwara *et al.*, 1988; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989).

La BFA es una lactona macrocíclica sintetizada a partir del palmitato (C<sub>16</sub>) y fue aislada por primera vez en 1968 por Tamura *et al.* para emplearla como antiviral. Su fórmula química es C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> (PM 280.37) y causa la redistribución de la manosidasa II, una proteína normalmente presente en el aparato de Golgi, hacia el retículo endoplasmático (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989). Randazzo *et al.* (1993) indican que la BFA tal vez actúa interfiriendo con proteínas de activación

del factor de la ADP-ribosilación (AAPs), previniendo la asociación de proteínas que forman una capa en la membrana del aparato de Golgi.

La presente investigación se concentra en el análisis de la morfología micelial y celular de *N. crassa* con funciones secretoras afectadas, lo que dará pie a estudios posteriores sobre la dinámica del proceso de secreción. La inhibición de la secreción con sustancias químicas puede esclarecer varias dudas con respecto a la exocitosis y el complejo de proteínas llamado exocisto. El objetivo principal de este proyecto es la comparación del crecimiento de una cepa silvestre de *N. crassa* y una cepa de *N. crassa* con mutación (con luz UV) en *sec5*, con la finalidad de obtener un mejor entendimiento sobre el mecanismo de la secreción en hongos filamentosos.

### **Marcaje de Proteínas con GFP**

La proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) ha tenido un gran éxito en el marcaje de proteínas y esto debido a características tales como: su tamaño (238 aa o 27 kDa) (Lorang *et al.*, 2001); la longitud de onda a la que absorbe mayor cantidad de luz (488 nm), así como su longitud de onda de emisión máxima (~508 nm); y solo requiere de luz ultravioleta o luz azul y oxígeno para la emisión de luz. Otras de las ventajas de usar GFP es su estabilidad *in vivo*, ya sea que se fusione al extremo carboxilo o amino de la proteína a marcar. Además funciona en un rango muy amplio de pH (5-11 en SDS al 1% o cloruro de

guanidinio 6 M) y aún en tejidos fijados con formaldehído, metanol o glutaraldehído. Una de las desventajas es la interferencia que causa la autofluorescencia de grupos aldehído, o algún otro compuesto autofluorescente que emita luz en la misma longitud de onda. Otra desventaja, que es común entre los fluoróforos, es la pérdida de fluorescencia por exposición a la luz o fotoblanqueo. Para poder incrementar el tiempo de exposición a la luz y evitar al máximo el fotoblanqueo, así como también obtener una mejor expresión en el organismo transformado, se ha modificado la secuencia génica de la GFP (Cormack et al., 1997; Fernández-Ábalos *et al.*, 1998; Maor *et al.*, 1998; Spellig *et al.*, 1996; Crameri *et al.*, 1996; Cubitt *et al.*, 1995; Siemering *et al.*, 1996).

En 2001 Freitag y compañía, lograron clonar el gen de la GFP por vez primera en *N. crassa*. Ellos utilizaron un promotor heterólogo (*toxA*) de *Pyrenophora tritici-repentis* (Dreschler, 1927). Después en 2004 (Freitag *et al.*) el gen (*h1*) fue fusionado al gen de la *gfp* bajo el control de un promotor fuerte (*ccg1*). La cepa transformante dejaba ver la fluorescencia de la fusión H1::GFP localizada en los núcleos cuando se le exponía a una radiación de  $\lambda = 488$  nm. Más adelante han surgido otras transformantes de *N. crassa* con variantes de GFP fusionadas a proteínas involucradas en procesos celulares muy variados.

## HIPÓTESIS

Las hipótesis que se plantean en este proyecto son:

1. La mutación de *sec5* tiene efectos drásticos en el crecimiento, la morfología y la organización intracelular de las hifas de *N. crassa sec5*.
2. Las hifas en crecimiento de *N. crassa sec5* no forman un Spitzenkörper visible bajo microscopía de contraste de fases.
3. La brefeldina A produce efectos semejantes a los que ocasiona la mutación de *sec5* en la morfología, citología y crecimiento de las hifas de *N. crassa* tipo silvestre.
4. La fusión proteica SEC5::GFP localiza en los ápices de las hifas de *N. crassa* tipo silvestre con crecimiento activo.

## OBJETIVOS

1. Caracterizar morfológicamente la mutante de *N. crassa sec5* a nivel miceliar (macroscópicamente) e hifal (microscópicamente).
2. Analizar detalladamente con videomicroscopía de contraste de fases de alta resolución, la organización y tráfico intracelular de los organelos y la presencia/ausencia del Spitzenkörper en la cepa tipo silvestre de *N. crassa* y la mutante de *N. crassa sec5*.
3. Analizar el efecto tóxico de la BFA en *N. crassa* tipo silvestre.
4. Amplificar por PCR el gen *sec5*, fusionarlo al gen de la GFP y transformar conidias de *N. crassa* tipo silvestre y visualizar la distribución intracelular de la proteína SEC5 marcada con GFP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismo y Cepas

Las cepas utilizadas fueron *Neurospora crassa* WT *mat a* N1 FGSC # 988 a manera de control, *N. crassa* 7-9 *sec5* (Seiler y Plamann, 2003) y *N. crassa* WT *his3<sup>-</sup> mat A* N623 FGSC # 6103 para las transformaciones.

### Cultivos

Se cortó una sección de micelio para ambos casos mutante y silvestre, contenido en un tubo de ensayo con Medio Mínimo de Vogel (MMV) (1956) y se sembró por duplicado en cajas de Petri de 8.9 y 15 cm con MMV. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 28 °C por una semana para obtener esporas. Las esporas se recolectaron con agua destilada por filtración con el empleo de gasa estéril y se sembraron en placas de Petri de 8.9 y 15 cm con MMV. Se incubaron toda la noche a 28 °C y después se midió el diámetro de las colonias a cada hora con la ayuda de un Vernier (calibrador analógico de plástico 0.1 mm de precisión).

Para que fuese plausible la microscopía con el objetivo 100X de inmersión en aceite, se hicieron los cultivos en cámaras (López-Franco, 1992) modificadas elaboradas sobre portaobjetos de 33 x 59 mm (Carolina Biological Supply Co.) y MMV con gelatina al 16% (Difco Laboratories).

## **Microscopía y Análisis de Imágenes**

A bajo aumento (10 - 90X) las colonias se observaron en un estereoscopio SZXILLB2-100 de la marca Olympus, y las imágenes se capturaron con una cámara digital Olympus DP70. El procesado de las imágenes, se llevó a cabo con el paquete de cómputo de operación de la cámara Olympus DP70 (DP Controller 1.1.1.85).

Para microscopía de alto aumento las muestras se observaron con un microscopio Vanox-S (Olympus), un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) y un microscopio confocal de barrido con láser Axiovert 200M (Zeiss LSM 510 Meta). En el microscopio Olympus Vanox-S se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 100X (n.a. 1.25) y un ocular WF de 25X (American Optical). Las imágenes se capturaron con una cámara Hamamatsu C2400-07 conectada a un procesador de imágenes Argus-10 (Hamamatsu Photonic Systems Corp., Bridgewater, NJ). La imagen *in vivo* se visualizó en un monitor blanco y negro (Sony modelo PVM-122) y se grabó en una videgrabadora de S-VHS Panasonic AG6440. Las micrografías y películas capturadas en videocasete fueron digitalizadas en una computadora con el paquete de análisis y edición de imágenes Image-Pro Plus versión 4.1 y un reproductor de videocintas JVC BR-S525U profesional S. A las imágenes congeladas digitalizadas se les asignó el formato JPEG (Joint Photographic Experts Group) y después se editaron con el uso del programa de cómputo Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc. 2002). También utilizando la versión 4.1 del Image Pro Plus se digitalizaron vídeos alta resolución de hifas en

crecimiento de *N. crassa* WT y *sec5* asignándoles el formato AVI (Audio/Video Interleave).

Para observar el destino de la proteína SEC5 marcada con GFP en hifas vivas de las transformantes seleccionadas, se utilizó el microscopio confocal de escaneo con láser (CLSM) (Zeiss LSM 510 META) equipado, entre otros aditamentos, con un objetivo de inmersión en aceite para contraste de fases de 100X (N.A. 1.3) (Plan-Neofluar, Carl Zeiss ®) y un láser de argón. Se empleó del 6 al 25 % del láser de argón para excitar la proteína verde fluorescente a una longitud de onda de 488 nanómetros ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), un filtro dicroico principal HFT 488 (Carl Zeiss ®) como fragmentador del rayo que va de la fibra óptica hacia la muestra. También se utilizaron dos espejos dicroicos fragmentadores (DBS1 y DBS2). La apertura del *pinhole* fue de aproximadamente  $\sim 710 \text{ nm}$  (ver apéndice).

### **Medición del Crecimiento**

Se realizaron las mediciones del diámetro de las colonias cada hora con el empleo del paquete de cómputo para procesamiento de imágenes Image Pro Plus® (versión 4.1). Los datos obtenidos fueron recopilados y procesados con el auxilio del paquete de cómputo Excel (Microsoft ®), Statistica 6, Sigma Plot 9.0 en la obtención de promedios y el cálculo de medidas de dispersión como la desviación estándar, así como para la proyección de gráficas.

Los diámetros (Fig. 3) que se midieron fueron los correspondientes al límite entre las regiones I y II (diámetro I), definidas por Riquelme *et al.*, (2002) y el límite

entre las regiones II y III (diámetro II). Todas las mediciones se realizaron con Image-Pro Plus y/o el programa Zeiss LSM Image Examiner versión 3.2.0.115.

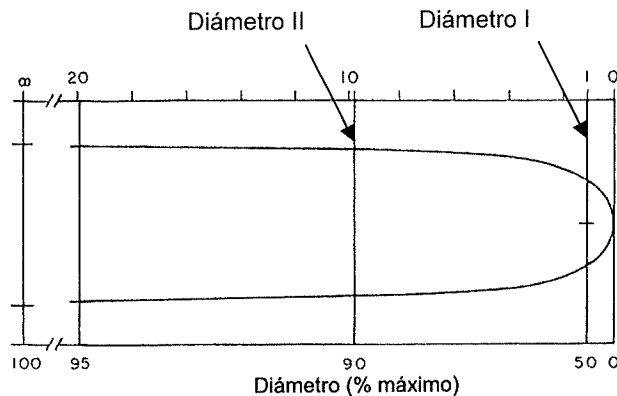


Figura 3. Diámetros de una hifa modelo (*hifoide*) en función de la distancia con respecto a la punta. Distancia relativa calculada en unidades de  $d$ . Adaptado de Bartnicki-García *et al.* (1990) y Riquelme *et al.* (2002).

### Desajuste al Modelo Hifoide

Se tomaron imágenes de las puntas de las hifas de *N. crassa* WT y *sec5* con microscopía de contraste de fases en un microscopio Zeiss LSM 510 Meta y también en un microscopio Olympus Vanox-S (los dos citados anteriormente), para después superponer la curva hifoide al contorno apical de las hifas. Se observó el desajuste de la mutante de *N. crassa sec5* a la curva hifoide y se contrastó con hifas de *N. crassa* WT.

### Observación de Germínulas

Se sembraron conidiosporas de *N. crassa* WT y *N. crassa sec5*, para ser observadas a las cinco horas de haber sido inoculadas en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro y con MMV solidificado con 1.5 % de agar y con 1.5 % de sacarosa. Las

observaciones se realizaron con un microscopio Zeiss LSM 510 Meta y objetivo de 100x de inmersión en aceite para contraste de fases. Las conidias fueron recolectadas de una colonia previamente crecida durante 1 semana a 28 °C en placas con MMV. Se hizo un homogeneizado de conidias suspendidas en agua destilada y esterilizada, para después ser filtrado con gasa estéril, evitando así el paso de hifas maduras. De la suspensión de esporas se tomaron 10 µL cada vez que se necesitó sembrar.

### **Brefeldina A (BFA)**

Se determinó la concentración suficiente de BFA para inhibir el crecimiento de *N. crassa* tipo silvestre. Se añadieron gotas de 10 µL en la superficie del MMV solidificado con agar al 1.5% en caja Petri a una distancia de 4, 5 y 10 mm (distancia medida con una regla métrica) con una pipeta de 2-20 µL automática. El efecto de BFA en el crecimiento de *N. crassa* tipo silvestre se analizó con el empleo de un microscopio Zeiss Axiovert 200, un microscopio Olympus Vanox-S, microscopio estereoscópico Olympus SZXILLB2-100 (en otras se usó un microscopio Zeiss Axiovert M LSM meta). Una vez estresadas las hifas se utilizó el método del bloque de agar invertido (Hickey y Read, 2004) Para captura y análisis de imágenes se utilizaron las cámaras Hitachi KP-D50 y Olympus DP70, así como el paquete de cómputo Image-Pro Plus ®.

## Construcción de plásmidos y técnicas moleculares

Para la fusión de *sec5* con *gfp* se utilizó el plásmido pMF272 (Fig. 4) (Freitag *et al.*, 2004). Se extrajo ADN genómico de micelio de *N. crassa* WT y se utilizó como template para amplificar el gen *sec5* de *N. crassa* WT de 3,225 pb (número de acceso NCBI XM\_328403) por PCR utilizando como oligo sentido 5'-ATT TAT CTA GAA TGG CGG CCG ACA CAG A -3' y antisentido 5'-AGC TGT TAA TTA ACC TCT CGC TCC CCG TA -3' (*sec5*-PacI-R). Se digirieron paralelamente el gen *sec5* amplificado y el plásmido pMF272 con las enzimas de restricción XbaI y PacI y después se ligaron y se hizo la transformación de células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α (Invitrogen). Se llevó a cabo PCR de las colonias resistentes a ampicilina para identificar aquellas que contuvieran el plásmido recombinante. Conidias de *N. crassa* N623 (FGSC#6103) se transformaron por electroporación (1500 V/15mseg) con el plásmido conteniendo la fusión.

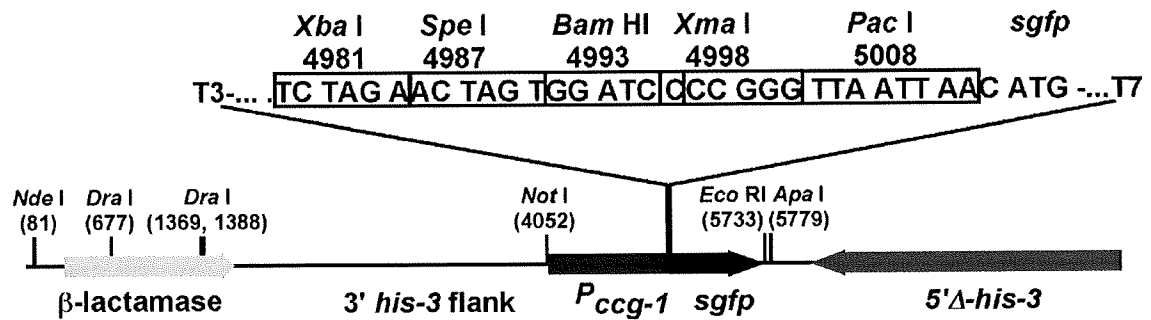


Figura 4. Representación esquemática del plásmido pMF272 de 8,479 pb (Freitag, *et al.*, 2004) donde se muestra la ubicación del gen que codifica para β-lactamasa, el promotor *ccg-1*, el sitio de clonación múltiple, el gen de la proteína verde fluorescente *sgfp* y el gen que codifica para la proteína His-3.

## RESULTADOS

### Morfología de *N. crassa sec5*

A nivel macroscópico, tras 7 días de incubación la colonia de *N. crassa sec5* mostró un micelio denso con una distribución radial compacta a manera de botón, mientras que *N. crassa* WT en un periodo no mayor a 3 días llegó a cubrir toda la superficie de la placa de Petri (Fig. 5). Además el fenotipo mutante pudo observarse a 28 °C a pesar de que inicialmente ésta mutante se aisló por selección de termosensibilidad (Seiler y Plaman, 2003).

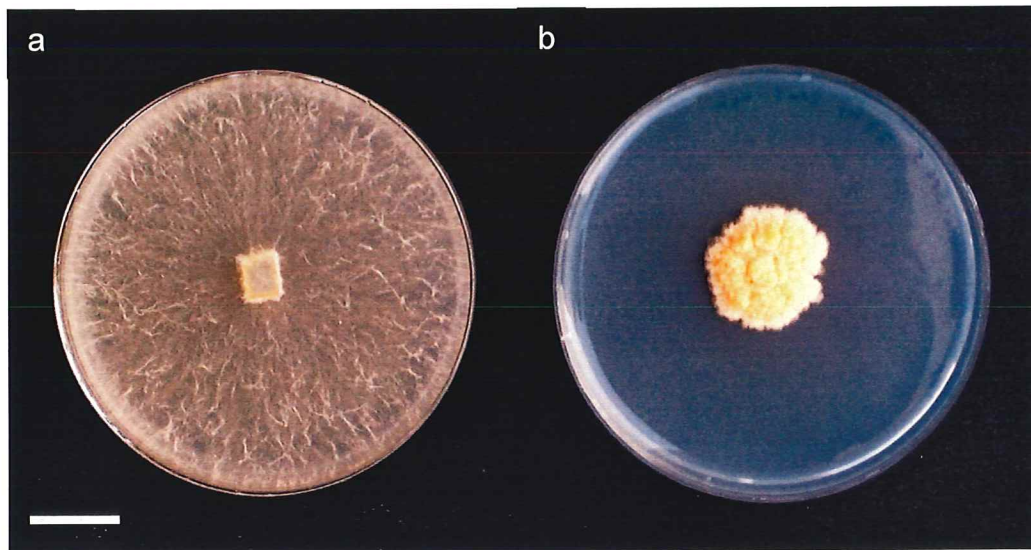


Figura 5. Comparación de la morfología colonial de *N. crassa* WT (a) y *sec5* (b). Barra 2 cm.

Microscópicamente a bajo aumento (100 y 250X), la morfología hifal de *sec5* se notó muy alterada, presentando hifas altamente distorsionadas e hiperramificadas, así como la región próxima al ápice abombada (Fig. 6).

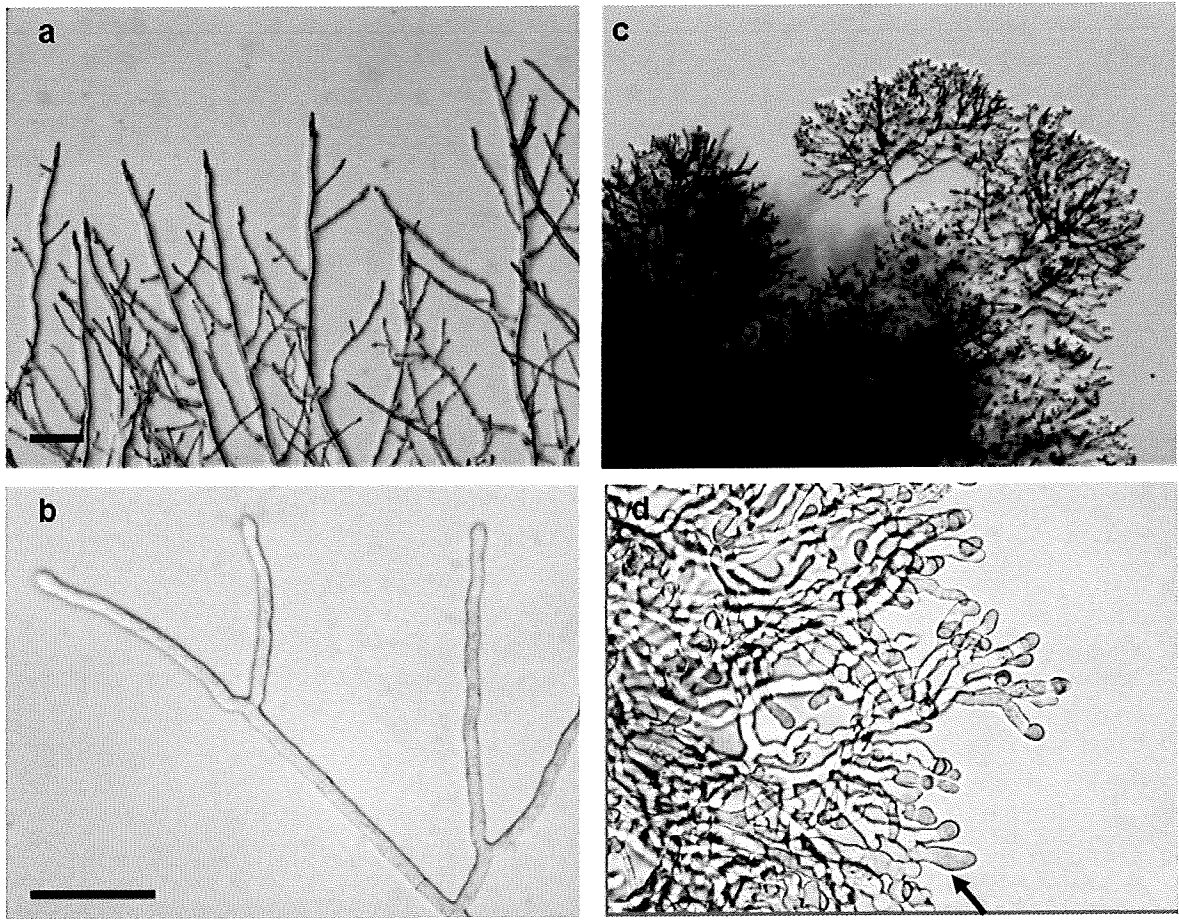


Figura 6. A bajo aumento, *N. crassa sec-5* (c,d) muestra una morfología micelial alterada, presentando hifas altamente distorsionadas y con muchas ramificaciones en comparación a WT (a,b). Las hifas de *sec5* se encuentran abombadas en la región subapical próxima (flecha). Barra superior = 200  $\mu\text{m}$ ; barra inferior = 100  $\mu\text{m}$ .

Otra de las características de esta mutante es la morfología apical de la hifa, la cuál tiende a ser mucho más ondulada que la cepa silvestre que sigue una forma hifoide (Fig. 7).



Figura 7. En la imagen se muestra el desajuste o ajuste de las hifas de *N. crassa sec5* (a) y WT (b) a la curva hifoide descrita por Bartnicki-García *et al.* (1989). Barra = 5  $\mu$ m.

### Organización intracelular de *N. crassa sec5*

Mediante microscopía de contraste de fases a alto aumento (2,500X), la distribución intracelular de los organelos en la mutante se observó afectada. Una de las diferencias más drásticas observadas en la mutante *sec5* respecto a la silvestre fue la ausencia de un Spitzenkörper en el ápice. En *N. crassa sec5* las mitocondrias se observaron redondeadas, a diferencia de la cepa silvestre en la

que regularmente se les ve extendidas dispuestas paralelamente en relación al eje longitudinal de la hifa en crecimiento (Fig. 8).

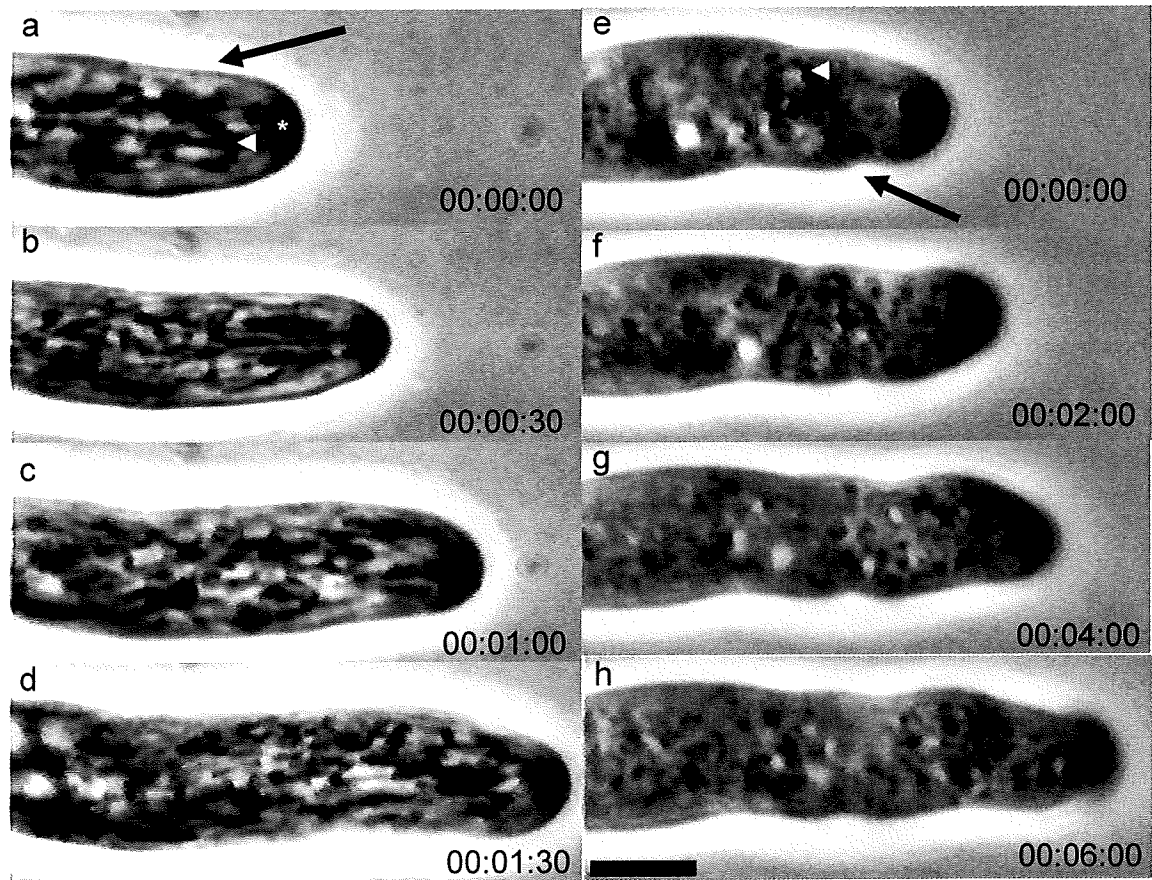


Figura 8. Comparación de la morfología y organización intracelular de una hifa de *N. crassa* WT (a-d) y *sec5* (e-h). Los triángulos blancos muestran las mitocondrias, las flechas la pared celular de la hifa y el asterisco el Spitzenkörper. La barra mide 5  $\mu\text{m}$ . El tiempo en la base de cada panel corresponde a hr : min : seg.

Se midieron los diámetros I y II de hifas maduras de *N. crassa* WT y *sec5* (fig. 9). Se observó que la mayoría de las hifas de *N. crassa* WT son mayores en ambos diámetros (I = 7.89  $\mu\text{m}$  y II = 8.15  $\mu\text{m}$ ). Las longitudes de los diámetros I y II de *N. crassa sec5* fueron 4.22 y 5.79  $\mu\text{m}$  respectivamente. La variación en la longitud de los diámetros de hifas de *sec5* fue mayor que WT.

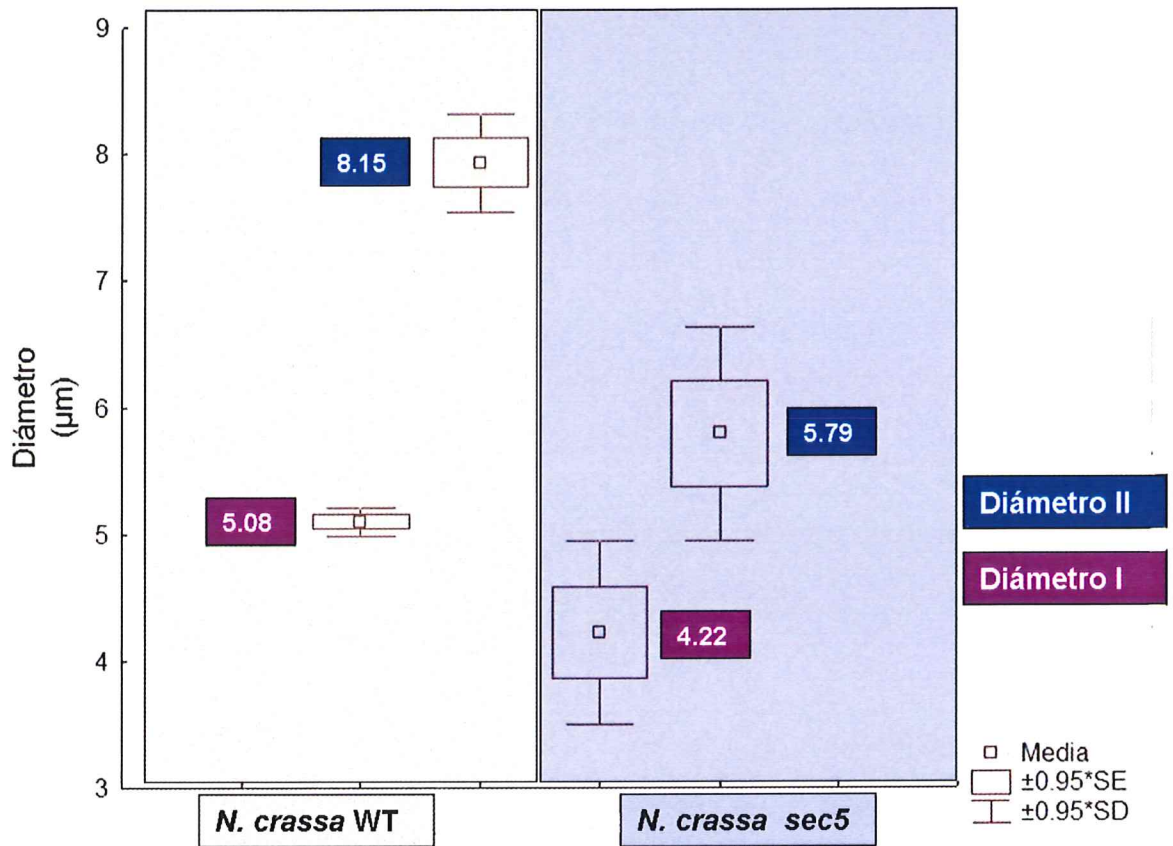


Figura 9. Comparación de los diámetros de la región I y II de *N. crassa* WT y *sec5*. Las medidas de ambos diámetros son menores en la mutante *sec5*. Las hifas de *sec5* tienen una mayor variación dimensional.

### Ramificación

El tipo de ramificación manifestado por la mutante *N. crassa sec5* en su mayoría fue apical o subapical, muy cercano a la punta. En contraste con lo que regularmente se observa en las hifas de *N. crassa* WT, donde las ramificaciones son mayoritariamente laterales y a una distancia del ápice mayor que en la mutante *sec5* (Fig. 10).

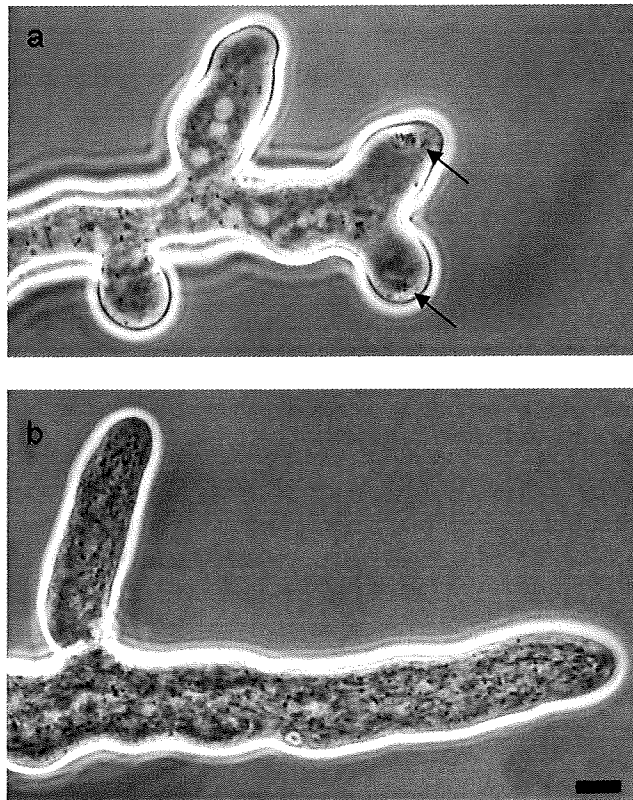


Figura 10. Ilustración de la diferencia entre *N. crassa sec5* (a) y *N. crassa* WT (b) al ramificar. Las flechas muestran los cúmulos de mitocondrias redondeadas. Barra = 5  $\mu$ m.

### Germinación

Se observaron germínulas de conidioesporas de *N. crassa* WT y *sec5* a las 5 y 13 hrs. de incubación. La morfología celular de las germínulas de WT y de *sec5* sorprendentemente no difiere en gran manera, mostrando tubos germinativos y organización intracelular, mitocondrias y núcleos, similar (Figs. 11, 12).

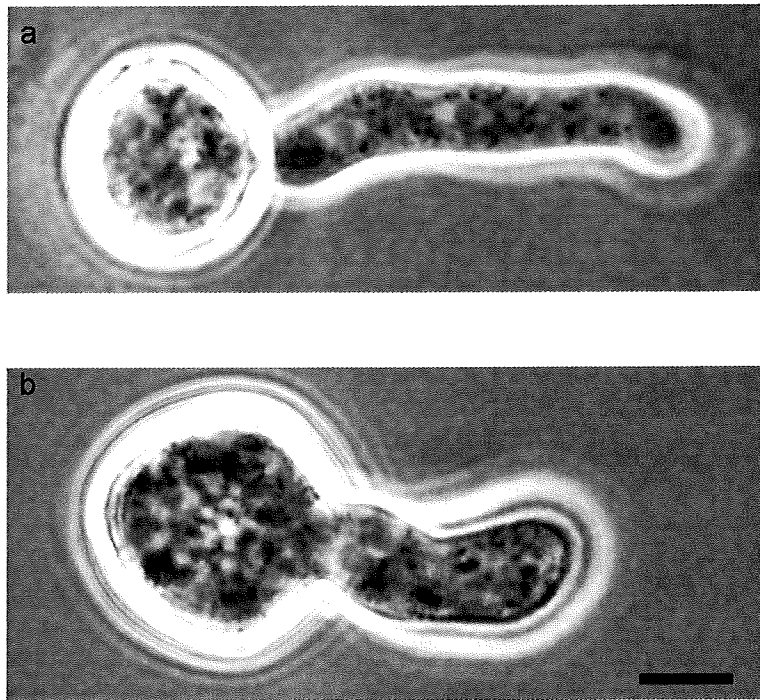


Figura 11. Germínula de *N. crassa sec5* (b) y WT (a) a las 5 hrs. de incubación a 28 °C en VMM. Barra = 5  $\mu$ m

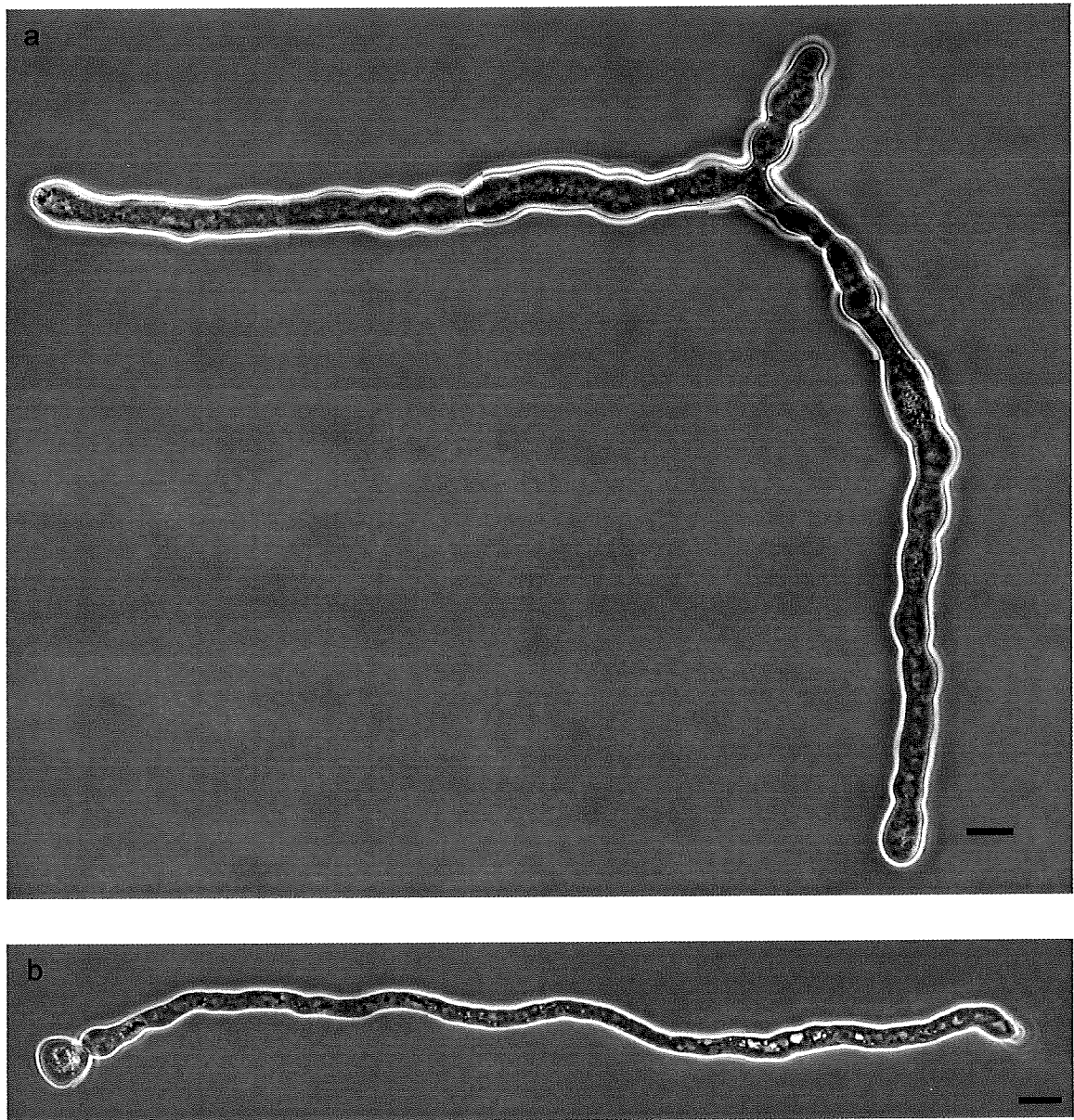


Figura 12. Reconstrucción bidimensional de una germínula de *N. crassa sec5* (a) y otra *N. crassa* WT (b) (13 hrs.). Barra = 10  $\mu$ m.

### Tamaño y Tasa de Crecimiento

La tasa de crecimiento que presentó *N. crassa sec5* en placa de Petri con MMV (agar 1.5%) y cubreobjetos (33 x 59 mm) fue de 21.73  $\mu$ m/hr en promedio (n = 42 hifas), con una desviación estándar de 8.46, mientras que el promedio de la

tasa de crecimiento de *N. crassa* WT fue de 1072.59  $\mu\text{m/hr}$  (5 hifas) y una desviación estándar de 371.623 (Fig. 13).

En cámaras de MMV (gelatina al 16%) con cubreobjetos las tasas de crecimiento para 6 hifas de *N. crassa sec5* y 4 de *N. crassa* WT fueron de 39.32  $\mu\text{m/hr}$  (desv. est. de 15.66) y 468.33  $\mu\text{m/hr}$  (desv. est. de 128.64) respectivamente (Fig. 13). El promedio de crecimiento registrado de *N. crassa sec5* con respecto a *N. crassa* WT es de 2.03% en placa con MMV (gelatina al 16%) y de 8.45 % en portaobjetos con MMV (agar al 1.5%).

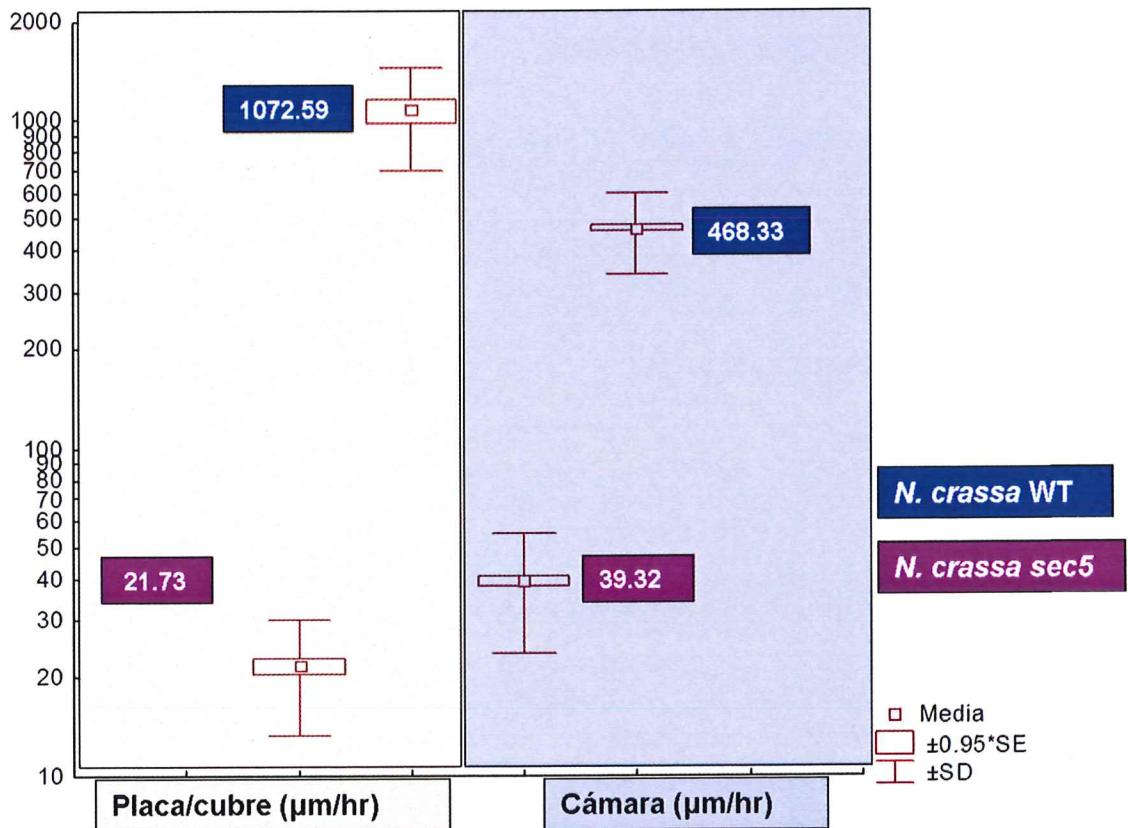


Figura 13. Comparación de Tasas de Crecimiento en Portaobjetos con MMV y Gelatina al 16% Comparación de la tasa de crecimiento en placa MMV con agar al 1.5%

## Tratamiento con BFA

La droga Brefeldina A (BFA) fue añadida en diferentes concentraciones directamente a la superficie del MMV solidificado con agar (1.5%) a una distancia de 5 y 10 mm del margen de la colonia. La droga se difundió de manera pasiva por la superficie del medio. La respuesta de *N. crassa* WT a BFA se vio clara en las concentraciones de 100 y de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las gotas de BFA a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  afectaron la morfología radial típica de la colonia del hongo, dejándose ver un halo de inhibición (Fig. 14). Es en esa zona donde las hifas disminuyen su ritmo de crecimiento y comienzan a hiperramificar. Las ramas comienzan a extenderse a partir de las hifas en crecimiento principales, muy cerca de las zonas apicales. La pared de las hifas de *N. crassa* WT expuesta a BFA, se muestra un tanto sinuosa, tal vez no como en la cepa mutante (*N. crassa sec5*), pero si se puede ver como resultado de un cambio en la direccionalidad de las hifas. Fue posible observar un Spitzenkörper en algunas de las hifas expuestas a BFA, pero no tan prominente como en el caso de las hifas no alteradas (Fig. 15). El Spitzenkörper manifestó un comportamiento un tanto extraño al dejarse ver en ocasiones retirarse del borde apical de la hifa varias veces (Fig. 16). Algo muy notorio fue que los núcleos se observaron cerca del ápice y algunas mitocondrias redondeadas.

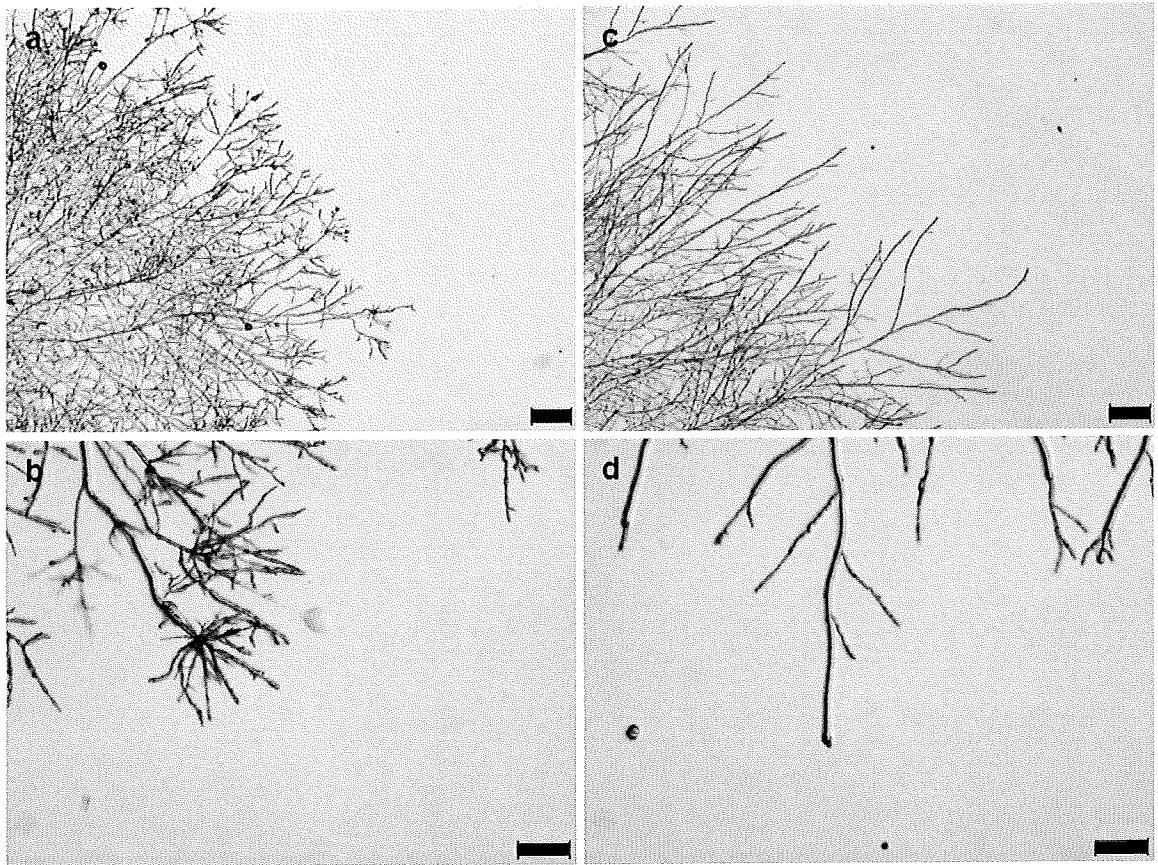


Figura 14. Las imágenes a y b muestran una colonia de *N. crassa* WT incubada ON a 28 Celsius y después de 1 hr de haber sido tratada con 20 µL BFA 100µg/mL a temperatura ambiente (~25 Celsius). Las imágenes c y d muestran una colonia de *N. crassa* WT incubada ON a 28 Celsius (control). Barras a y c = 500 µm; b y d = 200 µm.

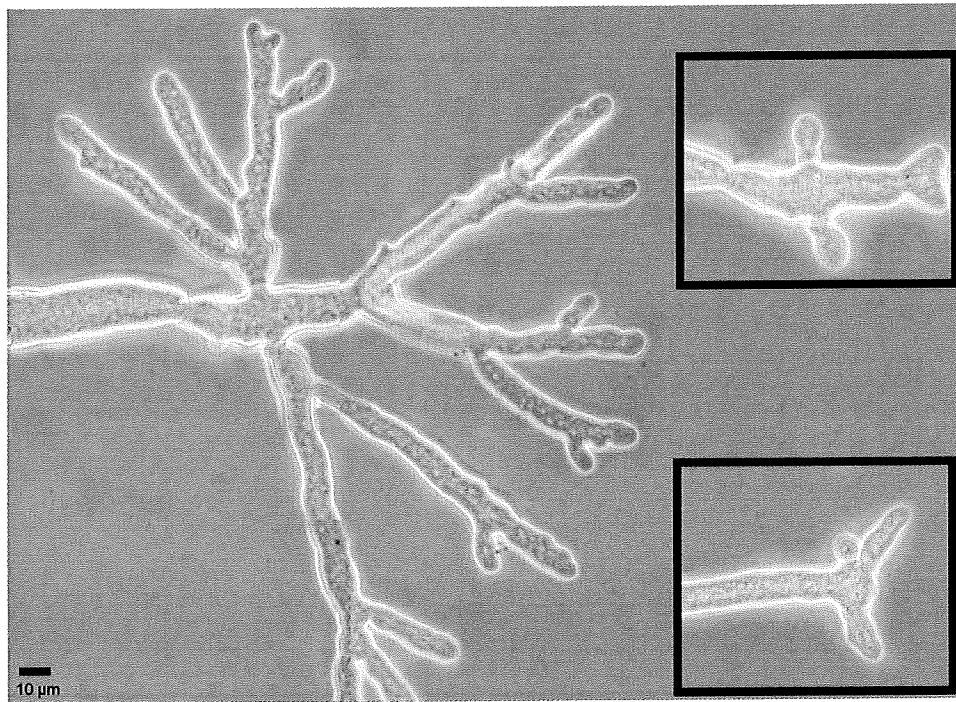


Figura 15. Imagen donde se muestra el efecto en *N. crassa* WT de 10  $\mu$ L de BFA [10  $\mu$ g/mL] después de 1 hr. de su aplicación en una porción del perímetro de la colonia.

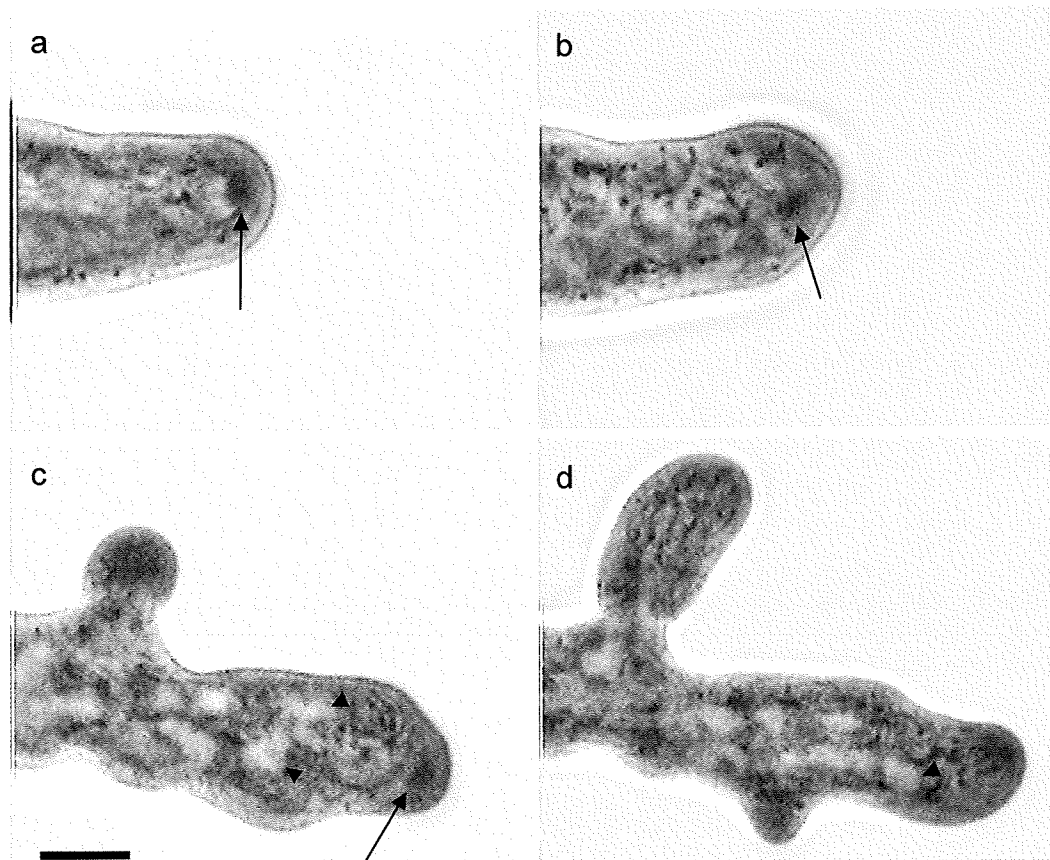


Figura 16. La imagen muestra el efecto causado por la exposición a BFA [100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Las flechas marcan el Spitzenkörper retraído (a,b,c,) y las puntas de flecha los núcleos cercanos al ápice (c,d). Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

### Clonación y expresión de *sec5::gfp*

Se comprobó la amplificación del gen *sec5* de 3,225 kb por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 17). El resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las colonias resistentes a ampicilina con los cebadores para amplificar el gen *sec5* se muestra en la figura 18, donde 4 y 10 son las colonias que han integrado el plásmido con el inserto. Se hicieron minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias positivas y se cortó el plásmido recombinante resultante (pAB0010) con *Xba*I y *Pac*I para comprobar que no se hubieran

dañado los sitios de restricción durante la clonación. El producto de la digestión se corrió en un gel de electroforesis para corroborar que el sitio de restricción del plásmido había sido clonado en pMF272. En la figura 21 se observan las bandas correspondientes al plásmido pMF272 y al gen *sec5*.

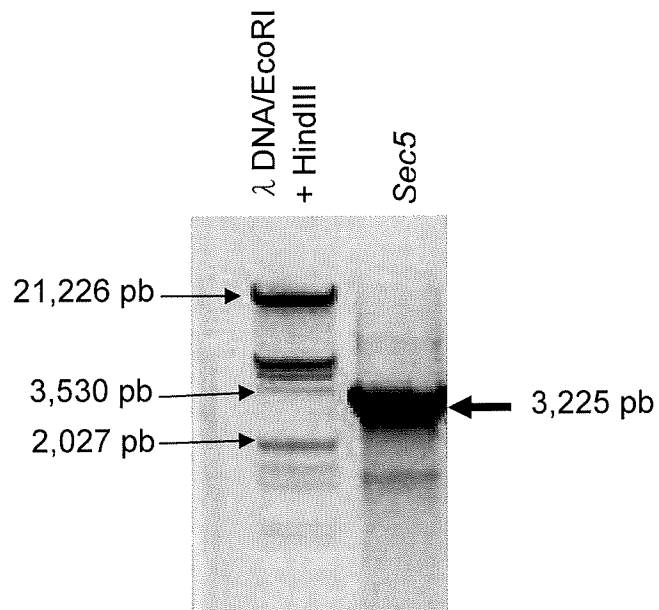


Figura 17. Imagen del gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio donde se muestra la banda que corresponde al gen *sec5* de *N. crassa* WT amplificado por PCR.

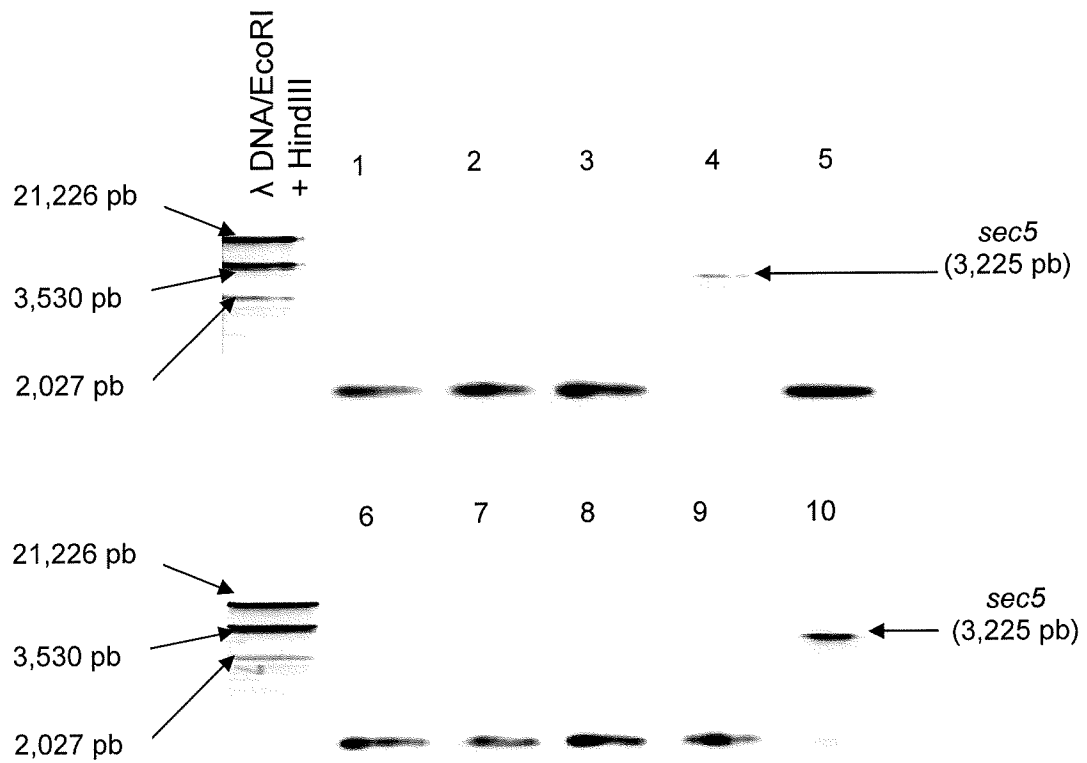


Figura 18. Gel de electroforesis después de teñir con EtBr con los productos de las colonias. La imagen muestra que dos de las colonias (4,10) transformadas de *E. coli* poseen el gen *sec5*.

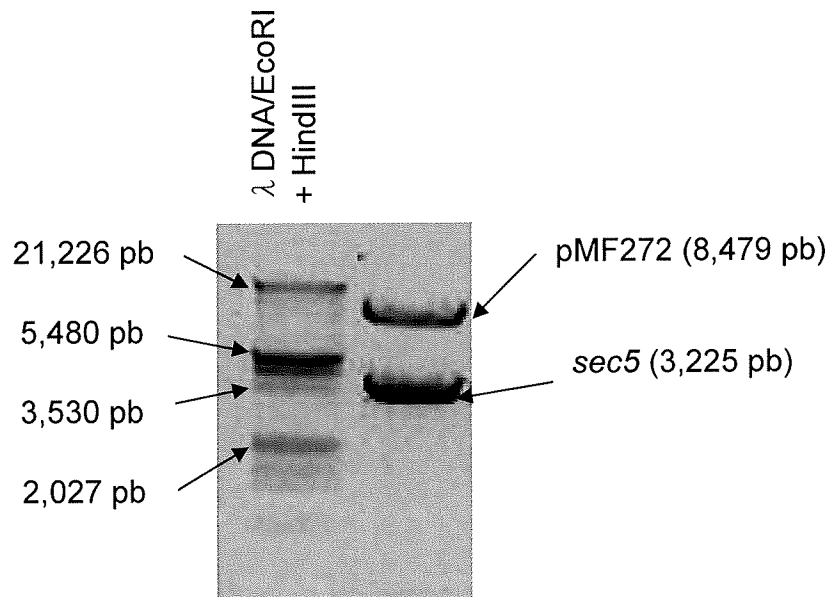


Figura 19. Gel de electroforesis teñido con EtBr donde se muestra que el inserto correspondiente al gen *sec5* se recupera al digerir los plásmidos recombinantes de las clonas 4 y 10 con XbaI y PaeI, lo cual comprueba que los sitios de restricción no han sido dañados durante la clonación.

### Localización de SEC5::GFP en *N. crassa*

La localización de la proteína SEC5::GFP en hifas vivas corresponde con el sistema endomembranal RE-Golgi, así como también, con puntos cercanos a la membrana plasmática (Fig. 20).

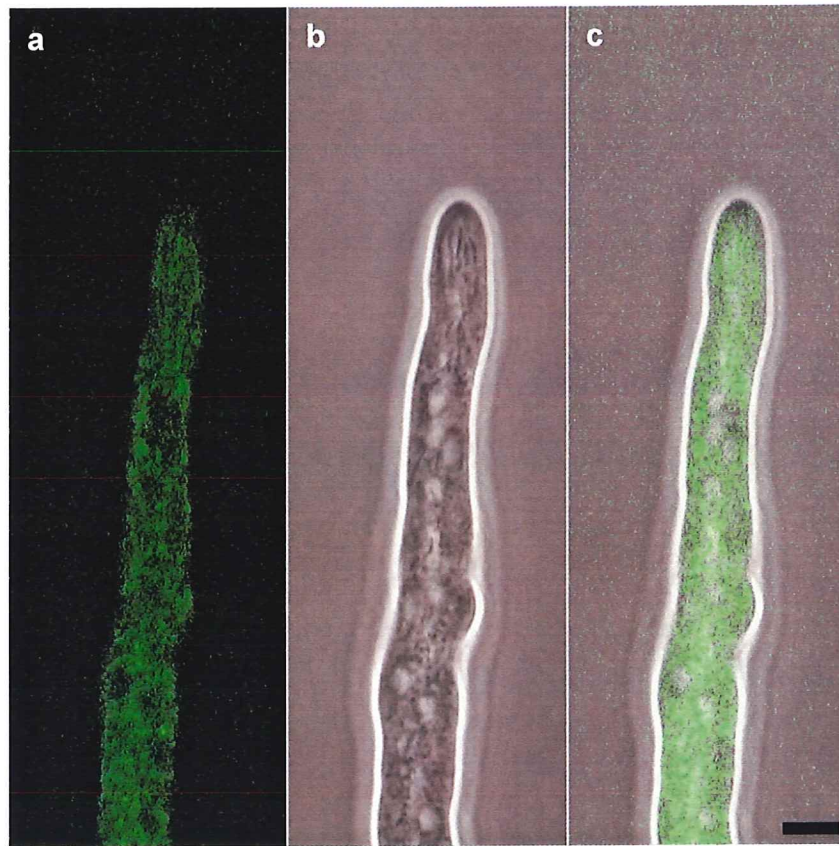


Figura 20. En la imagen "a" la fluorescencia representa la distribución de SEC5::GFP, en "b" componentes celulares por contraste de fase y en "c" la superposición de "a" y "b". Barra = 5  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que *sec5*, componente del exocisto, juega un papel imprescindible en la formación del Spitzenkörper, mantenimiento de la distribución intracelular de los organelos, así como en la morfología y crecimiento de las hifas. Los organelos que se pueden distinguir con microscopía de contraste de fases de alta resolución en las hifas de *N. crassa* son las vacuolas, núcleos, cuerpos de Woronin, las mitocondrias y el Spitzenkörper. Algo imposible de distinguir en las hifas con el mismo tipo de microscopía es el RE y los equivalentes de Golgi.

### Morfología

El uso de mutantes morfológicas ha permitido el estudio del papel de ciertos genes implicados en el crecimiento apical y la morfología de las hifas (Garnjobst y Tatum, 1967; Seiler y Plamann, 2003). El tipo de crecimiento radial colonial es una de las características fúngicas más representativas (Riquelme, *et al.*, 1998). La imagen colonial a nivel macroscópico (Fig. 5), muestra como la mutación de *sec5* en *N. crassa* provoca una disminución en el ritmo de extensión radial del micelio. La imagen (Fig. 5) fue tomada con un desfase de tiempo (*N. crassa* WT crecida 3 días y *N. crassa sec5* crecida 7 días), con la intención de resaltar la capacidad tan baja que tiene *N. crassa sec5* para colonizar la superficie del medio. Una posible alternativa para compensar la disminución del crecimiento radial en la superficie del medio podría ser la hiperramificación de las hifas de *N. crassa sec5* (Fig. 6) y la tendencia a crecer en otro plano (el vertical). Cuando las

hifas poseen muchas ramas saturan los espacios y disminuyen los nutrientes, posiblemente nitrógeno o carbón (Turian y Bianchi, 1972).

La organización intracelular en *sec5* es muy distinta; lo más notable bajo microscopía de contraste fases en hifas maduras, es la forma y posición de las mitocondrias. Las mitocondrias en hifas maduras de la cepa silvestre regularmente se les ve extendidas y en su mayoría paralelas al eje longitudinal de la hifa. En el caso de la mutante, las mitocondrias se encuentran redondeadas y su movimiento es diferente. Mientras las mitocondrias en la cepa silvestre se mueven hacia la punta siguiendo el eje de crecimiento de la hifa, las de *sec5* se mueven erráticamente siguiendo una trayectoria en círculos.

### **Tasa de Crecimiento**

En el caso de *N. crassa* WT fue posible medir el diámetro de la colonia en intervalos de una hora con la ayuda de una regla con escala milimétrica o un vernier. Pero para efectuar la medición del crecimiento de la colonia de *N. crassa sec5* es indispensable el uso de microscopía, y esto debido a su baja tasa de crecimiento. Por lo tanto se procedió a grabar secuencias de cada una de las cepas (*N. crassa* WT y *N. crassa sec5*) a bajo (100X) y alto aumento (2,500X), para después medir con la ayuda del paquete de cómputo *ImagePro* los vídeos digitalizados. Como *N. crassa sec5* tiene una distribución compacta, a bajo aumento fue más factible grabar y medir más hifas por cuadro. En el caso de *N. crassa* WT, tanto a bajo como a alto aumento, solo se pudo incluir en el cuadro de grabación una hifa.

En levaduras la mutación de cualquiera de los miembros del exocisto ocasiona una acumulación de vesículas e impide la emergencia del tubo germinativo (protuberancia o bud) (Novick, *et al.*, 1980; Salminen y Novick, 1989). La mutación del gen *sec5* de *N. crassa* bloquea la formación del Spitzenkörper y por lo tanto interfiere en el crecimiento regular de la hifa, dando como resultado una baja tasa de elongación y morfología atípica (Brunswick, 1924; Girbardt, 1957; López-Franco y Bracker, 1996; Riquelme *et al.*, 1998).

### **Ramificación**

Como se ha visto en *S. cerevisiae* (Sjölander *et al.*, 2002), en *D. melanogaster* (Murthy y Schwarz, 2004; Beronja *et al.*, 2005), neuronas (Clandinin, 2005), las funciones del exocisto son el regular la aglutinación de vesículas secretoras, el establecimiento del crecimiento polarizado, la comunicación celular, entre otros. En lo que se refiere a la polaridad, la cepa *sec5* muestra un crecimiento muy errático y en el caso de la exocitosis en el crecimiento de la membrana plasmática, la proteína SEC5 mutada dificulta la fusión en un sitio específico en la región apical, provocando una hiperramificación sin dirección.

### **Germínulas**

Parece ser que al momento de germinar la macroconidioespora, no existe una maquinaria “completa” que haga que la hifa posea una dirección constante, como en el caso de las hifas maduras de *N. crassa*. En germínulas de *N. crassa* WT con 5 hrs de incubación no se observó Spitzenkörper. Como tampoco existe

aún en ese estadio de madurez un metabolismo tan acelerado que permita una velocidad de crecimiento relativamente alta, y el resultado son germínulas de *N. crassa* WT y *sec5* muy similares.

### **Tratamiento con BFA**

Al tratar con BFA el margen de la colonia, los equivalentes de Golgi (Sewall *et al.*, 1989) cercanos al ápice son desestabilizados y tal vez reabsorbidos por R. E., lo cual interviene en la formación de vesículas secretoras. Cuando no hay una formación suficiente de vesículas secretoras el crecimiento se ve desfavorecido. Si la droga BFA se encuentra inhibiendo solo los organelos de las regiones apicales, y el crecimiento disminuye, entonces debe ser que la mayoría de las vesículas secretoras se forman en las regiones apicales. El efecto de hiperramificación de las hifas tratadas con BFA puede deberse al reacomodo de los organelos apicales, por efecto de la reabsorción de Golgi por R. E.

### **SEC5::GFP**

Con microscopía confocal (de barrido con láser), es posible observar en la transformante TMR10-1 el contorno de lo que parece ser la red endomebranal (RE y Golgi). También la transformante TMR10-1 de *N. crassa* muestra una colocalización de fluorescencia con mitocondrias al traslapar las imágenes de fluorescencia y la de contraste de fases. Lo anterior coincide con el hecho de que las mitocondrias en el caso de la mutante *sec5* suelen presentarse en forma redondeada y parecen tener un movimiento muy errático, contrario a lo que se

observa generalmente en WT. Por lo tanto, es de suma importancia el estudio de la función de la proteína SEC5 aprovechando la fusión SEC5::GFP, ya que la proteína SEC5 podría estar involucrada en el movimiento y posicionamiento de organelos celulares en *N. crassa*. Lo anterior es algo muy distinto a lo que se ha visto en otras células entre ellas fúngicas y animales (Murthy y Schwarz, 2004).

Contrario a lo que se anticipaba, la fusión SEC5::GFP no se acumula en el Spk. Si se observó en el sistema endomembranal RE-Golgi y en puntos de la membrana plasmática. Todos los componentes del exocisto, tanto en mamíferos como en levaduras, han sido encontrados en el citosol o adheridos a membranas (Hsu *et al.*, 1996; TerBush y Novick, 1995).

En neuronas cultivadas de mamíferos, el exocisto se le ha localizado cerca, pero no unido a vesículas sinápticas, más bien se le asocia con la formación de las sinapsis y el crecimiento neural (Hsu, *et al.*, 1996; Kee, *et al.*, 1997; Hazuka, *et al.*, 1999). Murthy y colaboradores (2003), encontraron en neuritas de *Drosophila melanogaster* que existen dos tipos de tráfico de vesículas, uno que se encarga de las vesículas que ayudarán en el crecimiento de la membrana, así como a la adición de proteínas a la misma; y otro en el que solo se secretan los neurotransmisores. En el primero es necesaria la proteína SEC5 y en el segundo no (Murthy, *et al.*, 2003).

## CONCLUSIONES

El fenotipo colonial *N. crassa sec5* es radial, compacto a manera de botón. A nivel microscópico de bajo aumento las hifas de *N. crassa sec5* son altamente distorsionadas, hiperramificadas y con las zonas subapicales inmediatas al ápice abombadas.

Las hifas de *N. crassa sec5* son más delgadas en los diámetros I y II y no muestran Spitzenkörper bajo microscopía de contraste de fases. Los núcleos y las mitocondrias de *N. crassa sec5* presentan una distribución celular alterada, así como una dinámica errante. Los núcleos se encuentran seguidos muy próximos al ápice y a las mitocondrias generalmente se les ve redondeadas y en cúmulos.

La forma de las germinulas de *N. crassa* WT y *sec5* es sorprendentemente similar en comparación con las hifas maduras.

El crecimiento de *sec5* en placa representa el 2.03% de la cepa silvestre y en cámara el 8.4%.

La exposición a BFA provoca una hiperramificación y una redistribución de algunos componentes celulares vistos por contraste de fases como los núcleos y el Spitzenkörper.

Con la fusión SEC5::GFP en *N. crassa* fue posible observar que el patrón de distribución de SEC5 no es tan marcado en las regiones de exocitosis como en las zonas subapicales.

Es de gran importancia el estudio de todos los componentes del exocisto para poder entender la secreción.

## PERSPECTIVAS

### **Secuenciación del gen *sec5***

La estructura tridimensional de la proteína SEC5 mutada en *N. crassa* no ha sido aún definida, pero es posible saber por análisis *in silico* si existe alguna estructura probable afectada. La búsqueda de los cambios producidos en *sec5* por la radiación UV en *N. crassa* podría ser de gran importancia en el entendimiento de las interacciones de la proteína SEC5 con otros componentes del exocisto. También es muy probable que la forma de la proteína mutante afecte su relación con otros componentes moleculares como lo son las proteínas que propician la hidrólisis de ATP, GTP, y/o las vesículas secretoras, la membrana citoplasmática, entre otros. Por lo tanto una secuenciación del gen mutado sería de gran ayuda en la elucidación del proceso secretor en el que se encuentra involucrado el exocisto.

### **Cruzas Para la Obtención de monocariontes**

En este estudio se obtuvieron transformantes de *N. crassa* expresando una fusión *sec5::gfp* por electroporación. Al momento de aplicar una descarga eléctrica que forme poros en las macroconidiesporas y propicie la introducción de material genético a la célula, es muy probable que no todos los núcleos adquieran el ADN transformante. Por lo tanto es de gran utilidad cruzar la transformante con una cepa con un apareamiento complementario y de esta manera obtener ascosporas, que por ser uninucleadas facilitan la selección de individuos con núcleos transformadas de igual carga genética.

### **Clonación y Expresión de *sec5::gfp* con el Promotor Endógeno**

La sobreexpresión de un gen a través del reemplazo del promotor endógeno puede dar resultados no deseados como lo son la acumulación de la fusión en lugares de reciclaje (vacuolas y otros), o el rompimiento del equilibrio homeostático intracelular. Por lo tanto la expresión de *sec5::gfp* con el promotor endógeno, podría tener resultados más confiables en lo que respecta a la cantidad de fluorescencia, localización, metabolismo celular y otros.

### **Clonación y Expresión de Fusiones de Otros Componentes de Exocisto**

De acuerdo con Guo y compañía (1999b) son ocho los componentes del exocisto siete de los cuales coprecipitan con vesículas secretoras, menos SEC3, posible marcador del punto de aglutinación en la membrana citoplasmática, junto con Rho y Exo70, aunque éste último se le puede encontrar asociado a vesículas secretoras previo al ensamblaje exocitótico (Boyd *et al*, 2004). Por lo tanto uno de los candidatos para ser fusionado con GFP podría ser SEC3. Lo más probable sería que la fusión, de ser viable, se encontrara en toda la membrana citoplasmática; aunque también sería altamente probable una acumulación en la zona apical de exocitosis.

## REFERENCIAS

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

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

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

Bartnicki-García, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R. M., 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: 153–159.

Beckett, A., Heath, I. B. y McLaughlin, D. J., 1974. *An atlas of fungal ultrastructure*. Longman Londres.

Bennett, M. K. y Scheller, R. H. 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2559

Beronja, S., Laprise, P., Papoulas, O., Pellika, M., Sisson, J. y Tepass, U., 2005. Essential function of *drosophila* SEC6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells. *Journal of Cell Biology*. 169: 635-646

Bonifacino, J. S. y Glick, B. S., 2004. The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., y Pratt, R., 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 1-108.

Bowser, R., Müller, H., Govindan, B. y Novick, P. J., 1992. SEC8p and SEC15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of SEC4p to control exocytosis. *The Journal of Cell Biology* 118: 1041-1056.

Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M., y Novick, P., 2004. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, SEC3p and Exo70p. *The Journal of Cell Biology* 167: 5.

Brenwald, P., Kearns, B., Champio, K., Keranen, S., Bankaitis, V. y Novick, P. j., 1994. SEC9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be effector of SEC4 function in exocytosis. *Cell* 79: 1209.

Brunswick, H., 1924. Untersuchungen über Geschlechts und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetegegattung *Coprinus*. En: Goebel, K., Fischer, G., *Botanische Abhandlung*. Verlag, Jena, Alemania.

Clandinin, T. R., 2005. Surprising twist to exocyst function. *Neuron* 10.1016: 164-166.

Cormack, B., 1998. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 406-410.

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. y Stemmer, W. P., 1996. Improved green fluorescence protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14:315-319.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. y Tsien, R. Y., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455.

Davis, R. H. y de Serres, F.J. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* 17A: 79–143.

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

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

Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A. y Klausner, R. D., 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer beta-COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:6408-12

Donaldson, J. G. y Klausner, R. D., 1994. ARF: a key regulatory switch in membrana traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 1003-17

Dreschler, C., 1923. Some gramincolous species of *Helminthosporium* I. *J. Agric. Res.* 24:641-740.

Fernández-Ábalos, J. M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B. y Donan, J. H., 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expresión, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 65: 1769-1771.

Finger, F. P. y Novick, P. J., 1998. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *The J. of Cell Biol.* 142: 609-612.

Freitag, M., Ciuffetti, L. M. y Selker, E. U., 2001. Expression and visualization of Green Fluorescent Protein (GFP) in *Neurospora crassa*. Consultado el 7 de junio de 2006 en la red de Internet: <http://www.fgsc.net/fqn48/freitagfinal.pdf>

Freitag, M., Hickey, P. C., Khlafallah, T. K., Read, N. D. y Selker, E. U., 2004. HP1 is essential for Methylation in *Neurospora*. *Molecular Cell.* 13: 427-434.

Fujiwara, T. K., Oda, S., Yokota, A., Takatsuki, A. e Ikehara, Y. 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263:18545–18552.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels,

R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C. y Birren, B., 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422(6934):859-68.

Garnjobst, L. y Tatum, E. L. 1967. A Survey of New Morphological Mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics* 57 : 579-604.

Gierz, G. y Bartnicki-Garcia S., 2001. A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *J. Theoret. Biol.* 208: 151-164.

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

Girbardt, M., 1969. Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhyphen. *Protoplasma* 67: 413–441.

Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. C. y Novick, P. J., 1988. A GTP-binding protein for secretion rapidly associates with secretory vesicle and the plasma membrane in yeast. *Cell* 53: 753.

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

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. y Novick, P. J., 1999a. The exocyst is an effector for SEC4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* 18(4): 1071-1080.

Guo, W., Grant, A. y Novick, P. J., 1999b. Exo84 is an exocyst protein essential for secretion. *The journal of biological chemistry* 274: 23558-23564.

Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Hsu, S. C., Kee, Y., Hopf, F. W., y Scheller, R. H., 1999. The SEC6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J. Neurosci.* 19: 1324-1334.

Hsu, S. C., Ting, A. E., Hazuka, C. D., Davanger, S., Kenny, J. W., Kee, Y., y Scheller, 1996. The mammalian brain rSEC6/8 complex. *Neuron* 19: 1209-1219.

Karp, G., 2005. Cell and molecular biology: concepts and experiments. *John Wiley and Sons, Inc.* N. J. 780p

Kee, Y., Yoo, J. S., Hazuka, C. D., Peterson, K. E., Hsu, S. C., y Scheller, R. H., 1997. Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14438-14443.

Klausner, R.D., Donaldson, G.J. y Lippincott-Schwartz, J. 1992. Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116: 1071-1080.

Lindner P., 1893. *Schizosaccharomyces pombe* n. Sp., ein neuer Gahrungserreger. *Wochenschrift fur Brauerei* 10:1298-1300.

Lippincott-Schwartz, J.L., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., y Klausner, R. D. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum in cells treated with Brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56: 801-813.

López-Franco, R. M., 1992. Organization and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips. Tesis de doctorado. *Purdue University*. 185p.

López-Franco, R. M., Bracker, C. E., 1996. Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma* 195: 90-111.

Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martínez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B. y Ciuffetti, L. M., 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1987-1994.

Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B. A. y Sharon, A., 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* 102: 491-496.

Misumi, Y. Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. e Ikehara, Y. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *The journal of biological chemistry* 261: 11398-11403.

Moskalenko, S., Tong, C., Rose, C., Mirey, G., Formstesch, E., Daviet, L., Camonis, J. y White, M., 2003. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunits interactions. *The journal of biological chemistry* 278: 51743-51748.

Murthy, M., Garza, D., Scheller, R. H. y Schwarz, T. L. 2003. Mutations in the exocyst component SEC5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron* 37, 433-447.

Murthy, M. y Schwarz, T. L., 2004. The exocyst component SEC5 is required for membrane traffic and polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* 131:2 377-378.

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

Novick, P. J. y Shekman, R. 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature sensitive mutant of *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 1858.

Novick, P. J., Field, C. y Schekman R., 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 251: 205–215.

Novick, P. J., Field, C. y Schekman, R. 1981. Order of events in yeast secretory pathway. *Cell* 25: 461-469.

Novick, P. J. y Guo, W., 2002. Ras family therapy: Rab, Ral and Rho talk to the exocyst. *Trends Cell Biology* 12: 247-249.

Oda, K., Hirose, S., Takami, N., Misumi, Y., Takatsuki, A, e Ikehara, Y. 1987. Brefeldin A arrests the intracellular transport of a precursor of complement C3 before its conversion site in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 214(1):135-138.

Orci, L., Perrelet, A., Ravazzola, M., Wieland, F. T., Schekman, R. y Rothman, J. E., 1993. "BFA bodies" : a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Sci. U. S. A.* 90 : 11089-93

Palmer, D. J., Amherdt, M. y Rothman, J. E., 1993. Binding of coatomer to Golgi membranes ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* 268:12083-9

Payen, A. (rapporteur), 1843. Extrait d'un rapport adressé à M. Le Marichal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire du pain de munition. *Ann. Chim. Phys.* 3<sup>e</sup> Ser. 9: 5-2 1 (+ una imagen).

Randazzo, P.A., Yang, Y.C., Rulka, C. y Kahn, R.A. 1993. Activation of ADP-ribosylation factor by Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* 268:9555-9563.

Riquelme, M., Reynaga-Peña C. G., Gierz G. y Bartnicki-García S., 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics & Biology* 24: 101-109.

Riquelme, M., 2000. The role of the Spitzenkörper in fungal growth and morphogenesis. Tesis para obtener el grado de Dr. en Ciencias por la UCR. 175 pp.

Riquelme, M., Roberson, R. W., McDaniel, D. P. y Bartnicki-García, S., 2002. The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics & Biology* 37: 171-179.

Rothman, J. E., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272: 27-34

Salminen, A. y Novick, P. J., 1987. A *ras*-like protein is required for a post-Golgi complex event in yeast secretion. *Cell* 49: 527.

Salminen, A. y Novick, P. J., 1989. The SEC15 protein responds to the function of the GTP binding protein, SEC4, to control vesicular traffic in yeast. *J. Cell Biol.* 109: 1023–1036.

Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K. J. M., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E. y Lippincott-Schwartz, J., 1997. Golgi tubule traffic and the effects of Brefeldin A visualized in living cells. *The Journal of Cell Biology*. 139: 1137-1155.

Seiler, S. y Plamann, M., 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4352-4364.

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

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

Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. y Haseloff, J., 1996. Mutations That suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6:1653-1663.

Sjölinder, M., Uhlman, J. y Ponstingl, H., 2002. DelGEF, a homologue of the Ran guanine nucleotide exchange factor RanGEF, binds to exocyst component SEC5 and modulates secretion. *FEBS* 532: 211-215.

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

Spelling, T., Bottin, A. y Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 252:503-509.

Takatsuki, A., y Tamura, G. 1985. Brefeldin A, a specific inhibitor of intracellular translocation of vesicular stomatitis virus G protein: intracellular accumulation of high-mannose type G protein and inhibition of its cell surface expression. *Agric. Biol. Chem.* 49: 899-902.

TerBush, D. R. y Novick, P. J., 1995. SEC6, SEC8 y SEC15 are components of a multisubunit complex wich localizes to small bud tips in *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130: 299-312.

TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. y Novick, P. J., 1996. The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Sacharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15: 6483.

Tortora, G. J., Case, C. L. y Funke, B. R., 2004. Microbiology: an Introduction. 8<sup>va</sup> ed., *Pearson Benjamin Cummings*, Nueva York, EEUU. 912p.

Turian, G., y Bianchi, D. E., 1972. Conidiation in *Neurospora*. *Bot. Rev.* 38: 119-154.

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

Wu, M. N., Fergestad, T., Lloyd, T. E., He, Y., Broadie, K. y Bellen, H. J. 1999. Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release *in vivo*. *Neuron* 23: 593-605.

## APÉNDICE

### Medios de Cultivo:

#### Medio Mínimo de Vogel (MMV)(Vogel, 1956)

##### Para cultivo en placa:

Agua destilada	490.0 mL
Agar	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Solución de sales 50 X	10.0 mL

##### Para Cultivo en Cámara:

Gelatina	8.0 g
Solución de sales 50 X	1.0 mL
Aforar con H <sub>2</sub> O hasta	50.0 mL

##### Solución de Sales 50 X

Agua destilada	700 mL
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> · 5½ H <sub>2</sub> O	150 g (.2H <sub>2</sub> O, 130 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	250 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> anhidro	100 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5 g
Solución de elementos traza	5 mL
Biotina	25 mg
Cloroformo	2 mL (como conservador)

(el pH será de 5.8 cuando se diluya. No se ajuste el concentrado)  
Depositar en una botella oscura a temperatura normal. Revisar seguido el nivel de cloroformo.

##### Solución de Elementos Traza

Disolver en el orden que aparece en la lista.

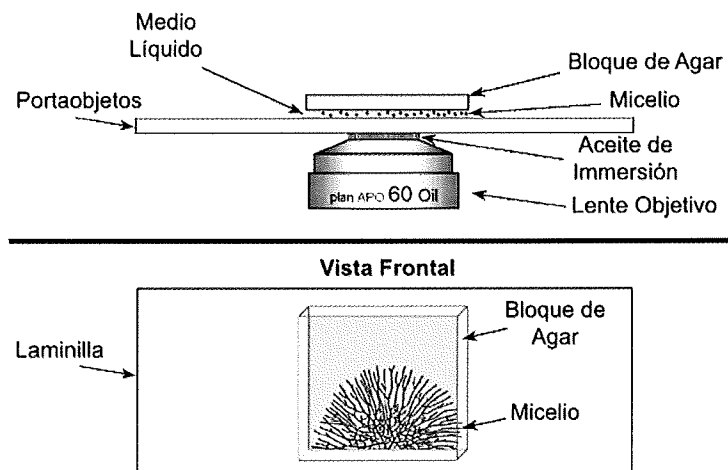
Agua destilada	95 mL
Ácido cítrico	5 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25 g

MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> anhidro	0.05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.05 g
Cloroformo	1 mL

Depositar en una botella oscura y refrigerar.

### Bloque de Agar Invertido (Hickey, *et al.*, 2005)

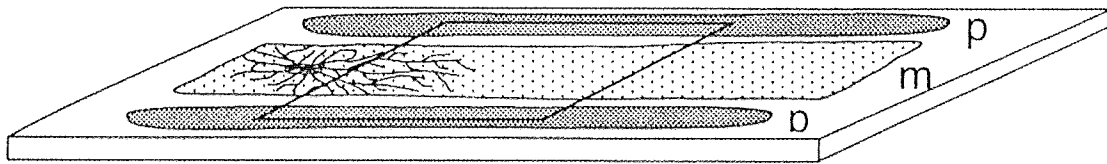
El método consiste en tomar una porción de agar con micelio y colocarlo sobre una laminilla, para observar al microscopio:



**Cámara de Cultivo en Portaobjetos para microscopía (adaptado de López-Franco, 1992 en Riquelme, 2000)**

El portaobjetos debe ser cubierto con pintura para uñas (p) en los extremos longitudinales y en medio con MMV solidificado con gelatina al 16% (m) y mantener en humedad. Vista general (a), vista transversal (b).

(a)



(b)

