

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



Dinámica de la proteína MTB-3 en *Neurospora crassa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ARIANA IVEETT ROMÁN GAVILANES

Ensenada, Baja California

Diciembre del 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



Dinámica de la proteína MTB-3 en *Neurospora crassa*

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

QUE PRESENTA

ARIANA IVEETT ROMÁN GAVILANES

APROBADO POR:

DRA. ROSA REYNA MOURIÑO PÉREZ
PRESIDENTE DEL JURADO

DR. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO
SECRETARIO

DRA. AMELIA PORTILLO LÓPEZ
1ER. VOCAL

Resumen de la Tesis de ARIANA IVEETT ROMÁN GAVILANES presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México.

Diciembre del 2008.

“Dinámica de la proteína MTB-3 en *Neurospora Crassa*”

Resumen aprobado por:



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Las proteínas relacionadas con el extremo positivo (TIPs+) de los microtúbulos (mts) son un grupo de factores dinámicos que promueven el ensamblaje y desensamblaje de estos en su extremo más dinámico. Una de las familias más conservadas de TIPs+ incluye la EB1 (*End Binding 1*) y sus homólogos presentes en mamíferos, plantas y hongos. La EB1 actúa como marcador de la dinámica del extremo inestable de los mts. El gen homólogo de EB1 en *Neurospora crassa* fue identificado y llamado *mtb-3*; su marcaje se realizó mediante fusión con la Proteína Verde Fluorescente (MTB-3::sGFP) y se llevó a cabo el *knockout* del gen nativo. Se estudió mediante microscopía confocal y de campo evanescente la dinámica de MTB-3 en *N. crassa*. Se observaron abundantes y pequeños fragmentos fluorescentes de aproximadamente $1.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ de longitud en forma de cometas que se distribuyen a lo largo de la hifa, desplazándose mayormente hacia el ápice con una velocidad aproximada de $0.5 \mu\text{m s}^{-1}$, 2.5 veces más rápido que la velocidad de crecimiento hifal ($0.2 \mu\text{m s}^{-1}$); aunque también fueron vistos algunos cometas que se mueven en forma retrógrada. La MTB-3 también se observó como parte del huso mitótico. No se encontró asociada a las mitocondrias ni a vesículas, así como tampoco al citoesqueleto de actina ni con las proteínas motoras dinactina y cinesina. Se observó una relación de la MTB-3 con el citoesqueleto microtubular.

Palabras claves: TIPs+, *Neurospora crassa*, EB1, microscopía confocal y microscopía de campo evanescente.

Agradecimientos

A la UABC, UNAM, CICESE, CONACYT, ASU y OSU.

A todo el departamento de microbiología del CICESE, **especialmente a la Dra. Mouriño**, a la Dra. Hernández, al Dr. Bartnicki, a la Dra. Riquelme, a las ardillas y a Ruth.

A nuestros colaboradores: al Dr. Robert Roberson y al Dr. Michael Freitag por sus importantes contribuciones.

A mis sinodales: a la Dra. Amelia Portillo y al Dr. José Luis Stephano por sus valiosas aportaciones.

A todos mis maestros y compañeros de la universidad.

A mis amigas y amigos.

A mis padres, hermanas, primas, tíos y sobrinos.

Gracias a todos!

ÍNDICE

Contenido

Capítulo		Página
I	Introducción	1
II	Antecedentes	3
III	Problema	10
IV	Hipótesis	10
V	Objetivos	11
IV.1	Objetivo general	11
IV.2	Objetivos particulares	11
VI	Metodología	12
VI.1	Diseño metodológico	12
VI.2	Organismos y medios de cultivo	13
VI.3	Cruzas XRM-01-AR, XRM-02-AR y XRM-03-AR	14
VI.4	Transformantes TRM-01-AR y TRM-02-AR	16
VI.4.1	Construcción del cassette <i>mtb-3::cherryFP</i>	16
VI.4.2	Protocolo de transformación	18
VI.5	Obtención de imágenes con microscopio confocal	19
VI.6	Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento.	20
VI.7	Microscopía de campo evanescente	20
VI.8	Cinética de la célula y de la MTB-3::sGFP	21

VI.8.1	Tasa de crecimiento	21
VI.8.2	Medición del movimiento y del tamaño de las agregaciones de MTB-3::sGFP	22
VI.9	Tinción de membranas y mitocondrias	22
VI.9.1	Tinción con FM4-64	22
VI.9.2	Tinción con MitoFluor Red	23
VI.10	Despolimerización del citoesqueleto de actina y microtúbulos	23
VI.10.1	Tratamiento con Benomilo	23
VI.10.2	Tratamiento con Citocalasina A	24
VI.11	Caracterización del <i>knockout mtb-3</i>	24
VI.11.1	Morfología colonial	24
VII	Resultados	25
VII.1	Localización y dinámica de MTB-3::sGFP	25
VII.2	Dinámica de MBT-3::sGFP en la membrana celular	31
VII.3	Relación de la MBT-3::sGFP con organélos y vesículas	32
VII.4	Efecto de la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos de actina en la dinámica de MTB-3.	34
VII.5	Efecto de la mutación de la subunidad p150glued de la dinactina y la cinesina convencional en la distribución y dinámica de MTB-3::sGFP	34
VII.6	FRAP de MTB-3::sGFP	37
VII.7	Marcaje molecular de MTB-3 con la Proteína Fluorescente Cherry	39
VII.8	Caracterización de la cepa mutante por <i>knockout</i> de <i>mtb-3</i>	39
VII.8.1	Características morfológicas	30
VII.8.2	Morfología de las hifas	41

VII.9	Características del citoesqueleto microtubular en la mutante MTB-3	42
VII.10	Distribución de los núcleos en la mutante de <i>mtb-3</i>	44
VII	Discusiones	45
VIII	Conclusiones	52
X	Referencias	53
XI	Anexos	67

Lista de figuras

Figura		Página
1	Interacción de EB1 y sus homólogos con diversas TIPs+. Las proteínas asociadas a Mts se muestran en los cuadros azules, mientras que las proteínas que no se unen directamente a Mts se muestran en los cuadros verdes. Dd, <i>Dictyostelium discoideum</i> ; Dm, <i>Drosophila melanogaster</i> ; mam., mamíferos; Sc, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; Sp, <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . Modificado de Lansbergen y Akhmanova, 2006.	6
2	Serie de tiempo de imágenes mediante microscopía confocal de MBT-3::sGFP (A-D) y de la combinación con la tinción de membranas con FM4-64 (5 μ M) (E-H) en hifas maduras de <i>N. crassa</i> , para observar su asociación con las vesículas y el Spk. La flecha señala el Spk. El tiempo está en min:s. Escala = 10 μ m.	26
3	Región basal de una hifa madura de <i>N. crassa</i> que expresa MBT-3::sGFP (A) con las membranas teñidas con FM4-64, (C) la composición de (A) y (B), y la imagen por contraste de fases (D). La flecha señala la acumulación de fluorescencia en un núcleo. Escala = 5 μ m.	27
4	Imágenes de microscopía confocal de un septo formado. (A) MTB-3::sGFP. (B) Membranas teñidas con FM4-64. (C) Composición de (A) y (B), y (D) contraste de fases. La flecha señala la MTB-3::sGFP en el poro septal cuando este se ha formado. Escala=5 μ m.	28
5	Serie de tiempo tomada por microscopía confocal. Se muestra una composición de imágenes de MTB-3::sGFP y de la tinción de membranas con FM4-64 (5 μ M). Las flechas señalan un núcleo durante la mitosis y la concentración de MTB-3::sGFP en un huso acromático. Las cabezas de flechas muestran la presencia de MTB-3::sGFP en los Mts astrales. El tiempo está en min:s. Escala = 5 μ m.	29
6	Serie de tiempo obtenida mediante microscopía confocal, de la dinámica de la proteína MTB-3::sGFP en germínulas de <i>N. crassa</i> . Las flechas rojas señalan un cometa en sentido retrógrado en la esfera germinal y las blancas un cometa que	30

7	se dobla en el ápice. El tiempo está en s:cs. Escala = 5 μ m. Distribución de MTB-3::sGFP en conidias, observadas bajo microscopía confocal. Escala = 5 μ m.	31
8	Series de tiempo obtenida mediante microscopía de campo evanescente (TIRFM), de la dinámica de la proteína MTB-3::sGFP en la proximidad de la corteza citoplasmática en hifas maduras de <i>N. crassa</i> . Los paneles (A-C) muestran cometas de MTB-3::sGFP que se mueven en sentido anterógrado en la región subapical (flechas rojas) y retrógrado (flechas negras). Los paneles D-G muestran dos cometas (flechas negras y rojas) en sentido retrógrado desde el ápice. El tiempo está en min:s.	32
9	Distribución de las mitocondrias. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de la cepa MTB-3::sGFP teñida con MitoFluor red, a una concentración de 2.5 μ M; (A) canal rojo; (B) canal verde; (C) traslape de canal rojo y verde y (D) contraste de fases. La flecha blanca señala mitocondrias y la amarilla los cometas de MTB-3::sGFP Escala = 5 μ m.	33
10	Imágenes por microscopía confocal de una hifa de MTB-3::sGFP tratada (A) con benomilo (5.0 μ g ml ⁻¹), las flechas blancas muestran acumulaciones desorganizadas de MTB-3::sGFP y la flecha roja como se acumulan puntos fluorescentes alrededor del núcleo y (B) con citocalasina A (1 μ g ml ⁻¹), la flecha amarilla muestra los pequeños filamentos fluorescentes. Escala = 10 μ m.	35
11	Imágenes confocales de <i>N. crassa</i> con MTB-3::sGFP tipo silvestre (A), mutante de <i>ro-3</i> (B) y mutante de <i>nkin</i> (C). Escala = 10 μ m.	36
12	Imágenes de microscopía confocal de la mutante de <i>ro-3</i> de <i>N. crassa</i> con la proteína MTB-3 marcada con GFP, en un núcleo en división. El tiempo está en min:s. Escala = 3 μ m.	37
13	Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento en <i>N. crassa</i> marcada con MTB-3::sGFP. (A) imagen preblanqueamiento, el rectángulo muestra la región blanqueada, (B) y (C) imágenes postblanqueamiento. El recuadro indica el área que será blanqueada. Escala = 10 μ m.	38

14	<i>N. crassa</i> marcada con MTB-3::cherryFP. Escala = 10 μ m.	39
15	Morfología colonial de (A) cepa tipo silvestre y (B) mutante de <i>mtb-3</i> después de 12 h de incubación a 28° C.	40
16	Tasa de crecimiento colonial de la cepa mutante de <i>mtb-3</i> y la cepa silvestre de <i>N. crassa</i> .	40
17	Morfología de hifas de <i>N. crassa</i> mutante de <i>mtb-3</i> (A) y silvestre (B). Escala = 10 μ m.	41
18	Imágenes por microscopía confocal de <i>N. crassa</i> con β -tub::sGFP de tipo silvestre (A), y (B) la mutante de <i>mtb-3</i> . Escala = 10 μ m.	42
19	Husos acromáticos de núcleos en división en <i>N. crassa</i> con la β -tubulina marcada con GFP (A) tipo silvestre y (B) mutante de <i>mtb-3</i> .	43
20	Imágenes por microscopía de campo evanescente de <i>N. crassa</i> con β -tub::sGFP (A) mutante de <i>mtb-3</i> y (B) silvestre (Uchida <i>et al.</i> , 2008) .Escala = 10 μ m.	43
21	Imagen compuesta de contraste de fases y de fluorescencia de <i>N. crassa</i> con los núcleos marcados con H1::sGFP. (A) Mutante de <i>mtb-3</i> y (B) cepa silvestre. Escala = 10 μ m.	44

Tablas

Tabla		Página
I	Homólogos de la proteína EB1.	6
II	Cepas de <i>N. crassa</i> y <i>E. coli</i> utilizadas.	13
III	Cepas de <i>N. crassa</i> utilizadas en las cruces realizadas y nombre de las cepas originadas.	15

I. Introducción

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas cuyas células tubulares características son conocidas como hifas, estas presentan un crecimiento apical que conduce a una expansión polarizada. En este proceso de crecimiento son indispensables los componentes del citoesqueleto: microfilamentos de actina y microtúbulos (Mts).

Los Mts son heteropolímeros cilíndricos altamente dinámicos, que crecen por adición de dímeros de α y β -tubulina. Su polaridad está dada por un extremo (+) de crecimiento rápido y un extremo (-) de crecimiento lento (Desai y Mitchison, 1997). El arreglo y disposición de los Mts es esencial para la progresión del ciclo celular y la morfogénesis.

Un amplio número de proteínas relacionadas con el extremo positivo de los Mts (TIPs+) promueven el ensamblaje y desensamblaje de las subunidades de tubulina en el extremo dinámico de los Mts (Schuyler y Pellman, 2001; Schroer, 2001; Akhmanova y Hoogenraad, 2005), en un proceso conocido como inestabilidad dinámica.

Una de las familias más conservadas de TIPs+ incluye a la EB1 (*End Binding 1*) y sus homólogos presentes en mamíferos, plantas y hongos. El gen

homólogo de EB1 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* fue identificado para este estudio y denominado *mtb-3* (*Microtubule Binding 3*)

En el presente trabajo se estudió la dinámica de la proteína MTB-3 en una cepa de *N. crassa* que expresa la fusión de este gen con la proteína verde fluorescente (GFP*), mediante la obtención de imágenes y series de tiempo tomadas *in vivo*, utilizando microscopía confocal y microscopía de campo evanescente (ó TIRFM*). De manera similar se estudió la relación de MTB-3 con organélos membranosos: núcleos, vesículas y mitocondrias, las proteínas motoras: cinesina y dinactina y la interacción con el citoesqueleto microtubular y de microfilamentos de actina. Con la finalidad de conocer la distribución, dinámica y posible función de la proteína MTB-3, y describir la orientación de los Mts en la región subapical y apical de *N. crassa*.

*Por sus siglas en inglés.

II. Antecedentes

En células eucariotas el citoesqueleto está conformado principalmente por microfilamentos de actina y Mts. Específicamente en hongos filamentosos, participan en procesos tan importantes como el crecimiento polarizado y la morfogénesis celular (Heath *et al.*, 1982; Kaminskyj *et al.*, 1989; Bartnicki-García, 2002).

Los Mts son heteropolímeros altamente dinámicos que constan de subunidades globulares de α y β -tubulina, cuyos dímeros se ensamblan para constituir protofilamentos que se agrupan formando un tubo cilíndrico de aproximadamente 25 nm de diámetro. Poseen polaridad intrínseca, dada por un extremo (+) que experimenta un crecimiento rápido y un extremo (-) de crecimiento lento ó nulo (Desai y Mitchison, 1997; Nogales *et al.*, 1999). La nucleación de los Mts, se lleva a cabo por el centro organizador de Mts (en hongos llamado cuerpo polar de los núcleos), desde donde emanan y se extienden en tres dimensiones (Oakley y Oakley, 1989; Horio y Oakley, 2005; Steinberg, 2006). En hongos filamentosos, los Mts se encuentran paralelos con respecto a la dirección de crecimiento y se distribuyen en todo el citoplasma, incluyendo la zona apical, usualmente con su extremo (+) dirigiéndose hacia el ápice (Howard, 1981; Vargas *et al.*, 1993) aunque también se ha propuesto que tienen diversa polaridad (Straube *et al.*, 2002; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006).

El arreglo de los Mts es esencial para la progresión del ciclo celular. Durante la división nuclear, los Mts forman el huso mitótico, participan en la segregación de cromosomas y orientan el plano de división (Oakley y Morris, 1980; Hyman y Karsenti, 1996; Desai y Mitchison, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Horio, 2007). Por otra parte, los Mts citoplasmáticos sirven como pistas en el transporte de vesículas secretoras (McDaniel y Roberson, 2000) que al fusionarse con la membrana plasmática provocan el crecimiento apical en hongos filamentosos (Howard y Aist, 1977, 1980; Howard, 1981; Gooday, 1983; Gow, 1989; McKerracher y Heath, 1987; Steinberg y Schliwa, 1993; Hasek y Bartnicki-García, 1994; Heath, 1994; Seiler *et al.*, 1997, 1999; Geitmann y Emons, 2000). Los Mts participan en la migración nuclear (Xiang y Fischer, 2004) y mantienen una adecuada distribución del citoplasma (Gooday, 1983; Gow, 1989), orgánulos y macromoléculas (Heggeness *et al.*, 1978; Oakley y Morris, 1980; Heath y Kaminskyj, 1989; Hermann y Shaw, 1998; Fuchs *et al.*, 2002; Slep y Vale, 2007) contribuyendo así a la organización espacial en eucariotas.

Todas las funciones que se les atribuye a los, son dependientes de las propiedades dinámicas que experimentan. Los Mts tienen periodos alternados de crecimiento y acortamiento, debido a la adición de subunidades de tubulina y su hidrólisis respectivamente. La combinación entre los estados de

polimerización y despolimerización y la rápida transición entre los dos estados, es conocido como inestabilidad dinámica (Mitchison y Kirschner, 1984).

Un amplio número de factores moleculares como las proteínas asociadas a Mts (MAPs*) interactúan con estos para regular este proceso y la organización del citoesqueleto microtubular (Maccioni y Cambiazo, 1995). Las MAPs se distribuyen de forma diversa a lo largo de los Mts. Sin embargo, un grupo de MAPs asociadas específicamente al extremo (+) son conocidas como TIPs+ (Pérez *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999; Hoogeraad *et al.*, 2000; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a, 200b; Akhmanova *et al.*, 2001; Coquelle *et al.*, 2002; Lansbergen y Akhmanova, 2006) y son responsables principalmente de controlar la estabilización, del extremo dinámico de los Mts.

La proteína EB1 (*End Binding 1*) es una de las familias más conservadas de TIPs+ y tiene homólogos en mamíferos como EB1, EB2 y EB3, en plantas como AtEB1a en *Arabidopsis thaliana* y en hongos como *Peb1* en *Ustilago maydis* (Tirnauer y Bierer, 2000) (Tabla I). Se ha demostrado que EB1 interactúa con diversas proteínas. Estas interrelaciones se muestran en la figura 1.

*Por sus siglas en inglés.

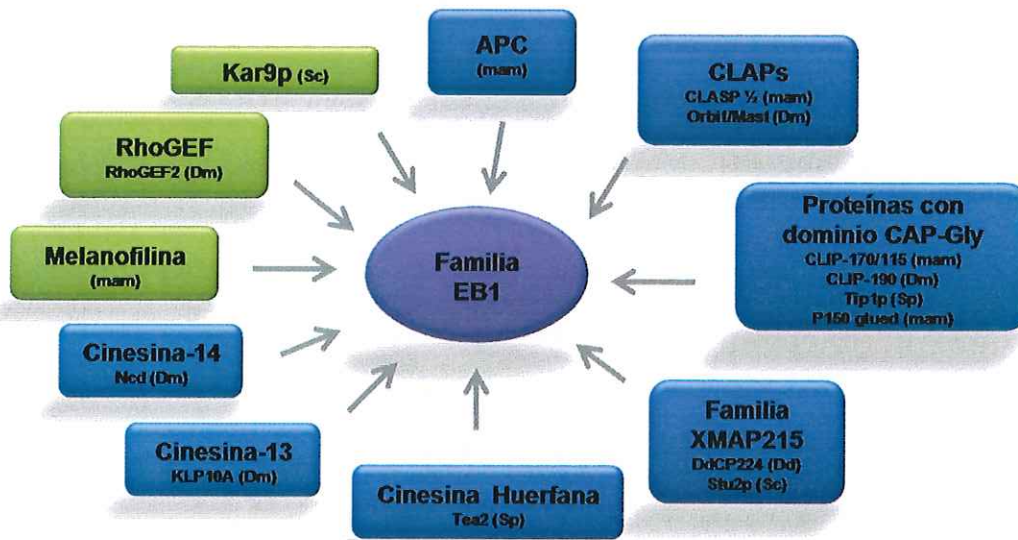


Figura 1. Interacción de EB1 y sus homólogos con diversas TIPs+. Las proteínas asociadas a Mts se muestran en los cuadros azules, mientras que las proteínas que no se unen directamente a Mts se muestran en los cuadros verdes. Dd, *Dictyostelium discoideum*; Dm, *Drosophila melanogaster*; mam., mamíferos; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*. Modificado de Lansbergen y Akhmanova, 2006.

Tabla I. Homólogos de la proteína EB1.

Proteína	Organismo
EB1	Vertebrados
BIM1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MAL3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
AtEB1a	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DdEB1	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DmEB1	<i>Drosophila melanogaster</i>
PEB1	<i>Ustilago maydis</i>
MTB3	<i>Neurospora crassa</i>

EB1 fue originalmente identificada interactuando con el supresor de tumores APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) en su Carboxilo-terminal en células cancerígenas de colon (Su *et al.*, 1995). Se ha visto que este dominio sirve como sitio de anclaje para otras TIPs+ (Honnappa *et al.*, 2005). Mientras que en el amino terminal de EB1 consta de un dominio homólogo a Calponina (CH) (Hayashi e Ikura, 2003) encontrado en muchas de las proteínas de unión a actina y es mediante este dominio, que EB1 se une con los Mts. En niveles endógenos preferentemente se asocia a los extremos distales de los Mts por lo que se le considera un marcador del extremo (+). EB1 es una proteína pequeña de 35 kDa (Berrueta *et al.*, 1998).

El gen *mal-3* es un homólogo de EB1 en *S. pombe*, estudios realizados en este organismo, demostraron que *mal-3* juega un papel importante en la regulación de la integridad de los Mts, posiblemente influenciando su estabilidad (Beinhauer *et al.*, 1997). Las levaduras que carecen del homólogo de EB1 son viables pero muestran Mts cortos y parámetros anormales de inestabilidad dinámica (Tirnauer *et al.*, 2002); de igual manera causa alteraciones en la segregación de minicromosomas no esenciales (Fleig *et al.*, 1996).

Se ha observado que EB1 actúa como un factor anticatástrofe de los Mts (Rogers *et al.*, 2002; Tirnauer *et al.*, 2004), además de promover su anclaje a diversos blancos subcelulares (Korinek *et al.*, 2000). Aunque EB1 muestra una especificidad a las terminales (+), ha sido también localizada en centrosomas y husos polares (Bu y Su, 2001; Morrison y Askham, 2001; Askham *et al.*, 2002; Rehberg y Gräf, 2002; Rogers *et al.*, 2002; Tirnauer *et al.*, 2002, 2004; Louie *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2003, 2005).

Las MAPs con función motora son el complejo dineína-dinactina y la familia de las cinesinas (Vallee y Shpetner, 1990; Walker y Sheetz, 1993; Vallee y Sheetz, 1996). Los dos grupos de proteínas están involucrados en la movilidad intracelular; se ha observado que las cinesinas se desplazan hacia el extremo (+) de los Mts, mientras que el complejo dineína-dinactina se mueve hacia el extremo (-), ambas proteínas motoras influyen la inestabilidad dinámica de los Mts (Hunter y Wordeman, 2000; Uchida *et al.*, 2008).

EB1 ha sido coprecipitada con p150^{glued}, una subunidad de la dinactina, también se ha encontrado asociado con la cadena intermedia de la dineína (DIC) y con la dinamitina (p50), pero no se asocia con la cadena pesada de la dineína. La interacción entre EB1 y p150^{glued} es requerida para la formación y mantenimiento de la disposición radial y anclaje de los Mts en los centrosomas de células animales. (Berrueta *et al.*, 1999; Askham *et al.*, 2002).

En el extremo (+) de los Mts se da la interacción entre la EB1 y la subunidad p150^{glued} de la dinactina en su dominio de unión a Mts (Berrueta *et al.*, 1999; Askham *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2005), ésta asociación es esencial para la dinámica de los Mts sin embargo, la delección de EB1 ha resultado en la pérdida de p150^{glued} pero no afecta el tráfico de organélos (Watson y Stephen, 2006).

III. Problema

La distribución de la polaridad de los microtúbulos en la región apical y subapical en el hongo filamentoso *N. crassa* se desconoce hasta el momento, la proteína homóloga de EB1 (MTB-3) se ha utilizado en otros organismos como un marcador de la terminal positiva de los Mts, por lo que se propone estudiar la distribución, dinámica y posible función de esta proteína en particular en este hongo, para dilucidar el efecto sobre los Mts y su dinámica.

IV. Hipótesis

Mediante la fusión con las proteínas fluorescentes, la proteína MBT-3 podrá observarse en el extremo + de los Mts, lo que permitirá conocer la orientación de los Mts, en el hongo filamentoso *N. crassa*.

V. Objetivos

V.1 Objetivo General

- Describir la localización y dinámica de la proteína MTB-3 en el hongo filamentoso *N. crassa*.

V.2 Objetivos particulares

- Describir la distribución de MTB-3::sGFP en hifas maduras, esporas y germínulas de *N. crassa*.
- Identificar la distribución de MTB-3::sGFP en presencia de un inhibidor de Mts (benomilo) y de los microfilamentos de actina (citocalasina A).
- Describir la dinámica de los Mts en ausencia de la proteína MTB-3 en hifas maduras.
- Conocer la dinámica de MTB-3 en mutantes de las proteínas motoras cinesina y dinactina.

VI. Metodología

VI.1 Diseño metodológico

Se estudió la localización y dinámica de la MTB-3 mediante microscopía confocal y de campo evanescente en el hongo filamentoso *N. crassa*. Se estudió una cepa con el gen *mtb-3* fusionado a la GFP (MTB-3::sGFP), insertada por doble recombinación homóloga en el sitio de la histidina, en la mutante auxotrófica *his-3* (FGSC 6103). Esta cepa fue generada para este estudio por el Dr. Freitag de la Universidad Estatal de Oregón.

La cepa MTB-3::sGFP fue teñida con colorantes específicos para conocer si la MTB-3 está relacionada con organélos membranosos como mitocondrias o vesículas. Así mismo, las células fueron tratadas con drogas inhibitoras del citoesqueleto microtubular (benomilo) y de microfilamentos de actina (citocasina A), para conocer la distribución de MTB-3::sGFP en ausencia de la integridad de estos elementos celulares.

Se identificó el papel de las proteínas motoras cinesina y dinactina en la dinámica de la proteína estudiada.

Mediante la obtención de cruza se evaluaron los efectos en la dinámica de los Mts y en la distribución nuclear, en ausencia de la proteína MTB-3.

Por último la morfología colonial y la tasa de crecimiento de la cepa *knockout mtb-3* fueron comparadas con una cepa tipo silvestre.

VI.2 Organismos y medios de cultivo

En la tabla II se describen las cepas de *N. crassa* y *E. coli* que se utilizaron para la realización de este trabajo.

Tabla II. Cepas de *N. crassa* y *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Fuente
XTL2-1	<i>Mat A his⁻³⁺::Pccg-1-mtb-3⁺-sgfp⁺</i>	Lew, para este estudio
XTL2-2	<i>Mat a his⁻³⁺::Pccg-1-mtb-3⁺-sgfp⁺</i>	Lew, para este estudio
MF11851	<i>Mat a mtb-3⁻</i>	Freitag <i>et al.</i> , para este estudio
MF11852	<i>Mat A mtb-3⁻</i>	Freitag <i>et al.</i> , para este estudio
N2524	<i>Mat a rid^{RIP1} his⁻³⁺::Pccg-1-Bml⁺-sgfp⁺</i>	Freitag <i>et al.</i> , (2004).
N9717	<i>Mat A Δ mus-51::bar+his⁻³</i>	FGSC*
NC 4200	<i>Mat a tipo silvestre.</i>	FGSC
FGSC 43	<i>Mat a ro-3⁻</i>	FGSC
NMF138	<i>Mat A his⁻³⁺::Pccg-1-hH1⁺-drfp⁺</i>	Freitag <i>et al.</i> , (2004).
XRM-10-OC	<i>Mat a Δnkin his⁻³</i>	Callejas-Negrete (No publicado).
N2281-3A	<i>Mat A his⁻³⁺::Pccg-1-hH1⁺-sgfp⁺</i>	Freitag <i>et al.</i> , (2004).
XRM-01-AR	<i>komtb3⁻ his⁻³⁺::Pccg-1-Bml⁺sgfp⁺</i>	Este estudio
XRM-02-AR	<i>komtb3⁻ his⁻³⁺::Pccg-1-hH1⁺-sgfp⁺</i>	Este estudio
XRM-03-AR	<i>ro3 his⁻³⁺::Pccg-1- mtb3⁺-sgfp</i>	Este estudio
TRM-01-AR	<i>Δnkin/MTB-3::sgfp</i>	Este estudio
TRM-43-AR-9	<i>Mat A his⁻³⁺::Pccg-1-mtb3⁺-cherry⁺</i>	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α	φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)	Promega®

*Fungal Genetic Stock Center.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo (la composición y protocolos de preparación de estos se encuentra en el anexo I):

- **Medio Mínimo de Vogel (MMV).** Se utilizó para crecer las cepas y hacer las observaciones por microscopía. La mutante auxótrofica (*his⁻³*) FGSC N9717 se creció en MMV enriquecido con histidina a una concentración de 25 μg ml⁻¹.

- **Medio Sintético de Cruzas (MSC).** Este medio fue utilizado para inducir el ciclo sexual de *N. crassa* en las cruzas que se llevaron a cabo.
- **Medio de regeneración.** Se usó este medio una vez que las conidias fueron sometidas a electroporación.
- **FIGs agar.** Luego de la transformación mediante electroporación, se sembró en placas de Petri de FIGs agar.
- **Medio Luria-Bertani (LB).** *E. coli* se cultivó en este medio, líquido ó LB-agar y se adicionó ampicilina a una concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, según fue necesario.

VI.3 Cruzas XRM-01-AR, XRM-02-AR y XRM-03-AR

Se realizaron diversas cruzas de la mutante de *mtb-3* para observar la dinámica de algunas estructuras y organelos en ausencia de MTB-3. Para observar la dinámica de los Mts, se cruzó con la cepa con los Mts marcados con GFP (XRM-01-AR), para conocer la distribución y morfología de los núcleos se cruzó con la cepa con la Histona1 marcada con GFP (XRM-02-AR). Asimismo la cepa con la MTB-3 fusionada a la GFP se cruzó con la mutante de la subunidad p150^{glued} de la dinactina (*ro-3*) (XRM-03-AR), para saber si ésta proteína motora influencia la distribución de MTB-3.

Se inocularon cajas de Petri con MSC por separado con conidias de las cepas de los Mts marcados con GFP (N2524 *mat a*), de los núcleos fusionados con GFP (N2281-3A *mat A*) y de la mutante *ro-3* (FGSC43 *mat a*), incubándose

a 25 °C durante 5 días en oscuridad total, posteriormente los 2 primeros cultivos fueron fertilizados con conidias de las cepas *knockout* de MTB-3 *mat A* y *mat a*, respectivamente, mientras que el cultivo de *ro-3*, se reinoculó con la cepa MTB-3::sGFP *mat A*. Después de 14 días de incubación a 25 °C en oscuridad, se recolectaron las ascosporas y fueron espatuladas en MMV (adicionado con 1% de higromicina en los casos donde se cruzó cepas *knockout*) se incubó inicialmente a 60 °C durante 2 h como choque térmico y luego a 28 °C por 12 h. Cada colonia desarrollada se transfirió a tubos de cultivo con MMV y se incubó por 24 h a 28 °C. Finalmente las colonias fueron seleccionadas de acuerdo al fenotipo y a la emisión de fluorescencia de la GFP utilizando el microscopio confocal.

Tabla III. Cepas de *N. crassa* utilizadas en las cruces realizadas y nombre de las cepas originadas.

Primer inóculo	Segundo inóculo	Cepa originada	Descripción
Mts::sgfp <i>mat a</i>	KO- <i>mtb-3 mat A</i>	XRM-01-AR	Mts GFP sin el gen <i>mtb-3</i>
H1::sgfp <i>mat A</i>	KO- <i>mtb-3 mat a</i>	XRM-02-AR	Núcleos GFP sin el gen <i>mtb-3</i>
<i>ro-3 mat a</i>	MTB-3::sGFP <i>mat A</i>	XRM-03-AR	MTB-3 GFP sin la subunidad p150 ^{glued}

VI.4 Transformantes TRM-01-AR y TRM-02-AR

Mediante transformación se logró obtener una cepa carente de la proteína motora cinesina (*nkin*) que expresa la MTB-3::sGFP (TRM-01-AR), así mismo, se obtuvo la transformante MTB-3::cherryFP (TRM-02-AR).

VI.4.1 Construcción del cassette *mtb-3::cherryFP*

Para la construcción de la cepa TRM-02-AR, inicialmente se llevó a cabo la digestión enzimática con las enzimas de restricción Xba1 (T[^]CTAGA) y Pac1 (TTAAT[^]TAA) de los plásmidos pJV15-2 y pMFmtb-3, esto para linearizar el plásmido con la proteína fluorescente cherry (*cherryPF*) y por otro lado para obtener el gen *mtb-3*. La mezcla de reacción consistió en 20 µl del DNA de plásmido, 1 µl de Xba1 (20 U µl⁻¹), 1 µl de Pac1 (10 U µl⁻¹) (ambas enzimas de New England Biolabs®), 5 µl de BSA 10X, 5 µl NEB4, 18 µl de agua destilada, para un volumen final de 50 µl. Las reacciones se incubaron por 4 h a 37 °C (a las 3 h de incubación se le añadió 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón (Promega®) solo a la reacción del plásmido pJV15-2). Se corroboraron las digestiones con una electroforesis en gel de agarosa al 1% con el volumen total de las reacciones, se usó el marcador de bajo peso molecular λ (Promega®), se corrió por 45 min a 75 volts. Posteriormente cortó el fragmento visualizado bajo una lámpara de luz UV para después ser purificado con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen®).

Estos fragmentos fueron posteriormente ligados con 1.5 μ l de T4 DNA ligasa (Promega®) y 1.5 μ l de buffer, usando 3 μ l del vector (pJV15-2) y 9 μ l del inserto *mtb*-3, para un volumen final de 15 μ l, las reacciones se incubaron a 25 °C por 12 h.

Con 5 μ l del gen clonado, se transformaron 50 μ l de células químicamente competentes de *E. coli* DH5- α . La mezcla se incubó en hielo por 30 min y luego se sometió a 42 °C por 2 min a manera de choque térmico, se pasó nuevamente a hielo 2 min, se adicionaron 0.9 ml del medio LB líquido y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 hr, se centrifugó 1 min a 18 000 x g y se removieron 850 μ l de sobrenadante para resuspender el botón en el medio restante, con lo cual se espatuló una caja de Petri con LB agar ampicilina (100 μ g ml⁻¹).

Luego de incubar 12 h a 37 °C, se obtuvieron 10 clonas a las cuales se les extrajo el DNA mediante lisis alcalina, para esto se cultivaron las colonias en 5 ml de LB líquido con ampicilina (100 μ g ml⁻¹) incubándose 12 h a 37 °C en agitación a 200 rpm. Se utilizó la microcentrífuga Micro 18R (VWR®) para centrifugar a 18 000 x g y el precipitado se resuspendió en la solución P1 (Tris-HCl pH 8, 50 mM, EDTA 10 mM y RNAasa 0.1 mg ml⁻¹), se agregaron 150 μ l de la solución P2 (NaOH 200 mM y SDS 1%) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, para posteriormente añadir 200 μ l de solución P3 (acetato de Potasio 3 M pH 5.5). Se centrifugó a 18 000 x g 5 min y se recuperó el sobrenadante tomando nota del volumen, para después agregar dos

volúmenes de etanol absoluto e incubarse a -20 °C por 30 min y se procedió a centrifugar a 18 000 x g 5 min. Se removió el sobrenadante y el botón de DNA se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 18 000 x g por 5 min más. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se secó a temperatura ambiente por 10 min.

Para corroborar que estuvieran el cassette *mtb-3::cherryFP* deseado, se realizó una digestión enzimática con las enzimas XbaI y PaeI, para cada una de las 10 reacciones, se mezcló 1 µl de BSA 10X, 1 µl de NEB4, 1 µl de XbaI, 1 µl de PaeI, 2 µl del DNA plasmídico y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua destilada. Se incubaron las 10 reacciones a 37 °C por 3-4 h y se observó el producto de la digestión por medio de una electroforesis en gel de agarosa igual que en el punto VI.4.1.

VI.4.2 Protocolo de transformación

Para obtener las transformantes TRM-01-AR y TRM-02-AR se utilizaron esporas frescas de la cepa doble mutante XRM-000-OA y N9717 (FGSC), respectivamente. Las esporas fueron resuspendidas en 80 µl de sorbitol 1M. Se depositaron en una cubeta estéril de electroporación de 0.2 mm, se mezclaron con 2µl del ADN plasmídico pMFmtb-3 para la transformante 01 y el pRM-42-AR para la 02, ambos a una concentración de 100 ng/µl⁻¹ (Freitag *et al.*, 2007) y se colocaron en hielo durante 15 min.

Las transformaciones se realizaron en el electroporador Gene Pulser Electroporator (Biorad®) a 600 OHMS, 25 μ FD, 1.5 KV, por 12-14 milisegundos. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregaron 900 μ l de sorbitol 1M frío, ésta mezcla se traspasó a un tubo de centrifuga de 25 ml estéril en donde se mezcló con 4 ml de medio de recuperación y se incubó durante 2 h a 30 °C en oscuridad y en agitación a 200 rpm. Después de la incubación se utilizó la centrifuga Multifuge® EASYset 1S-R (Heraeus®) para centrifugar a 8 300 x g durante 5 min y se desechó 4.8 ml de sobrenadante. Las conidias se resuspendieron en el volumen restante, se espatularon en 4 cajas de medio FIGs agar y fueron incubadas a 28 °C.

Las colonias fueron aisladas y transferidas a tubos con MMV e incubadas a 28 °C. Las colonias se seleccionaron de acuerdo al fenotipo esperado (esto en caso de la transformante 01) y a la emisión de fluorescencia utilizando microscopía confocal.

VI.5 Obtención de imágenes con microscopio confocal

Para la obtención de imágenes *in vivo*, se utilizó la técnica del cubo de agar invertido (Hickey *et al.*, 2002), con cultivos de 12 h de incubación a 28 °C, en cajas de Petri con MMV.

Las observaciones se realizaron con el microscopio confocal LSM-Meta-510 (Carl Zeiss®, Göttingen, Alemania) con iluminación, con un láser de argón a 1.5% de intensidad con una longitud de onda de 488 nm para la excitación

de la GFP, con un filtro de emisión de 505 a 530 nm. Simultáneamente a las imágenes de fluorescencia se tomaron imágenes de luz transmitida por contraste de fases a través de un fotomultiplicador específico para tal fin. Se utilizó un objetivo plan-apocromático PH3 100X/1.3 A. N. de inmersión en aceite. El pinhole se mantuvo a una unidad de Airy que equivale a una rebanada óptica de 0.9 μm . Se grabaron imágenes en 2 y 3 dimensiones en ambos canales y también series de tiempo capturadas a intervalos de 3 s en promedio.

VI.6 Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP*)

Se utilizó FRAP* a través del microscopio confocal para analizar la dinámica de MTB-3::sGFP, tras el fotoblanqueamiento. Para ello se seleccionó un área rectangular de una hifa en la región apical y/o subapical y se iluminó con una longitud de onda de 488 nm con un láser de Argón a 20% de intensidad durante 30 s. Antes y después del fotoblanqueamiento, se capturaron imágenes cada 3.5 s por 3 min. El pinhole se ajustó para obtener una rebanada óptica de 3.0 μm . (Mouriño-Pérez *et al.*, 2006).

VI.7 Microscopía de campo evanescente

La técnica microscópica de campo evanescente ó TIRFM* cuyo fundamento básico consiste en excitar los fluoróforos que se encuentran en los primeros 200 nm del espécimen, se utilizó para analizar el comportamiento de

MTB-3 en la corteza celular, de hifas maduras de la cepa MTB-3::sGFP, de igual manera se estudió la dinámica del citoesqueleto microtubular en ausencia de MTB-3, esto en la cruza XRM-01-AR. Haciendo uso del método del cubo de agar invertido (Hickey *et al.*, 2002), se tomaron imágenes *in vivo*, con cultivos de 12 horas de incubación a 28 °C, en placas de Petri con MMV.

Se utilizó un microscopio IX-70 invertido, con un objetivo de 60X/1.45 A. N. apocromático, (Olympus® America Inc., Center Valley, PA, EU) y un laser de Kriptón/Argón a 488 nm. La captura de imágenes se realizó con la cámara Cascade 512B EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ, EU) con una frecuencia de captura de 50-200 ms y una resolución de 512X512. El procesamiento de imágenes fue llevado a cabo con el programa MetaMorph 6.1 (Universal Imaging, Downintong, PA) (Uchida *et al.*, 2008).

VI.8 Cinética de la célula y de la MTB-3::sGFP

VI.8.1 Tasa de crecimiento

Se comparó la tasa de crecimiento de las cepas *knockout* de MTB-3 y la cepa silvestre NC 4200 de *N. crassa*. Para esto se inocularon las cepas por separado a una concentración de 1.5×10^5 conidias ml^{-1} en caja de Petri de 15 cm de diámetro con MMV. Se incubó a 28 °C y se midió el crecimiento a partir de las 12 h. de incubación y se siguió tomando medidas cada 12 h. Las observaciones se realizaron por triplicado.

VI.8.2 Medición del movimiento y tamaño de las agregaciones de MTB-3

A través del software LSM 510 Image Examiner Zeiss® (versión 3.2) se midieron 200 cometas de extremo a extremo. Los datos se vaciaron en una hoja de Excel para el cálculo de la media y desviación estándar.

De la misma manera, se midió la tasa de desplazamiento cuadro por cuadro de los fragmentos fluorescentes a partir de las series de tiempo grabadas con microscopía confocal realizando el mismo procesamiento de los datos.

VI.9 Tinción de membranas y mitocondrias

VI.9.1 Tinción con FM4-64

La asociación de MTB-3 con vesículas y organélos membranosos se estudió mediante la tinción de las células con el colorante lipofílico FM4-64 (Molecular Probes®) el cual se internaliza por acción endocítica.

La cepa transformante de MTB-3::sGFP se creció en una caja de Petri en MMV, se tomó un cubo de agar que incluía las puntas de las hifas en crecimiento y se colocó en el centro de un cubre objetos en donde previamente se depositaron 30 μm del colorante a una concentración de 5 μM . Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 15 min y se analizó por microscopía confocal utilizando un laser de argón a 488 nm de excitación y se captó la emisión a 583 nm de longitud de onda.

VI.9.2 Tinción con MitoFluor Red

Para descartar la interacción de la proteína con mitocondrias, se utilizó el colorante MitoFluor red (Molecular probes®) para este colorante se usó una longitud onda de excitación/emisión de 543 nm y 622 nm respectivamente.

La cepa MTB-3::sGFP se creció en una caja de Petri con MMV, se tomó un cubo de agar que incluía el margen de la colonia y se colocó en el centro de un porta objetos en donde previamente se depositaron 30 μ l del colorante MitoFluor Red a una concentración de 2.5 μ M. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 15 min y se analizó por microscopía confocal utilizando un laser de HeNe de 543 nm de excitación.

VI.10 Despolimerización del citoesqueleto de actina y microtúbulos

VI.10.1 Tratamiento con benomilo

Las células fueron expuestas a Carbamato de metilo 1-[butilaminocarbonil] 2-benzimidazol (benomilo) (Sigma®) un fungi-tóxico sistemático usado comúnmente para el control de hongos patógenos de plantas. Inhibe la mitosis y el transporte intracelular por unirse a la tubulina en su estado dimérico (Wilson, 1975a; Howard y Aist, 1977, 1980), con la finalidad de observar los cambios en la dinámica de la MTB-3::sGFP cuando el citoesqueleto microtubular no está integro.

Se inoculó una caja de Petri con MMV con benomilo a una concentración de 5 μ g ml⁻¹ (Ramos-García, 2006) con la cepa MTB-3::sGFP y

se incubó a 28 °C por 24 h, posteriormente se observó la muestra bajo microscopía confocal de acuerdo a lo descrito en ese apartado.

VI.10.2 Tratamiento con citocalasina A

El comportamiento de la MTB-3::sGFP fue analizado tratando células con citocalasina A (Sigma®), una droga que se caracteriza por inhibir la polimerización de actina (Torralba *et al.*, 1998).

En una caja de Petri con MMV con 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de citocalasina A (Ramos-García, 2006), se inoculó la cepa MTB-3::sGFP y se incubó a 28 °C por 12 h posteriormente se observó la muestra bajo microscopía confocal de acuerdo a lo descrito en ese apartado.

VI.11 Caracterización del *knockout mtb-3*

VI.11.1 Morfología colonial

La morfología colonial de la cepa MF11851 (Freitag *et al.*, 2007) *knockout* de *mtb-3*, se comparó con la cepa silvestre NC 4200 (FGSC), mediante la obtención de fotografías con la cámara digital Nikon®, que fueron capturadas al tiempo 0, a las 12 h. y posteriormente cada 6 h. Para esto, se inocularon las cepas por separado en una caja de Petri con MMV con conidias resuspendidas en agua estéril a una concentración de 1.5×10^5 conidias ml^{-1} y se incubaron a 28 °C.

VII. Resultados

VII.1 Localización y dinámica de MTB-3::sGFP

Con microscopía confocal se estudió la localización y la dinámica de la proteína MTB-3 de *N. crassa* que fue marcado con GFP en hifas maduras, germínulas y esporas.

En hifas maduras, se observaron abundantes fragmentos fluorescentes en forma de cometas, de $1.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (media $\pm$ desviación estándar) de longitud, que se distribuían a lo largo de la hifa de manera homogénea. Dichos cometas se desplazaban en sentido paralelo al eje de crecimiento, mayormente hacia el ápice con una velocidad de $0.5 \mu\text{m s}^{-1}$, 2.5 veces más rápido que la velocidad de crecimiento hifal ($0.2 \mu\text{m s}^{-1}$). Se observaron algunos cometas desplazándose en dirección retrógrada desde el ápice (Fig. 2).

En la región basal de hifas maduras, los cometas también estaban presentes de manera abundante. El tráfico de los fragmentos fluorescentes era bidireccional, algunos núcleos estaban asociados a mayores acumulaciones de fluorescencia (Fig. 3).

Al formarse los septos, los Mts son atrapados en el poro septal y los cometas de MTB-3 se acumulan alrededor de este, donde permanecieron por un largo periodo, hasta que migran hacia otras regiones de la célula. (Fig. 4).

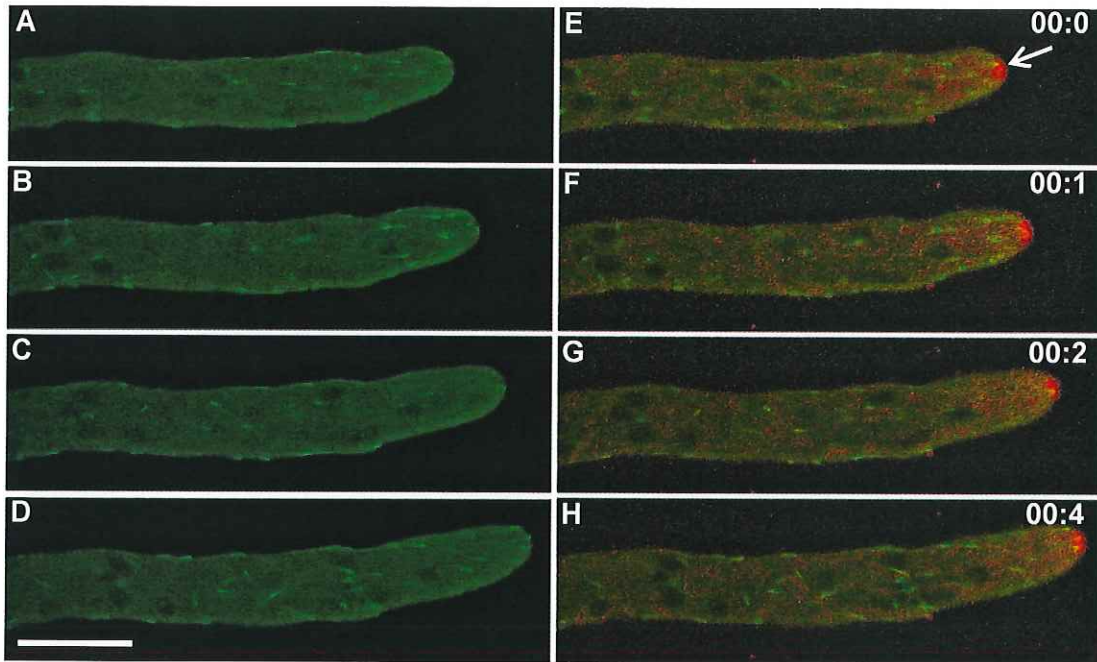


Figura 2. Serie de tiempo de imágenes mediante microscopía confocal de MBT-3::sGFP (**A-D**) y de la combinación con la tinción de membranas con FM4-64 (5 μ M) (**E-H**) en hifas maduras de *N. crassa*, para observar su asociación con las vesículas y el Spk. La flecha señala el Spk. El tiempo está en min:s. Escala = 10 μ m.

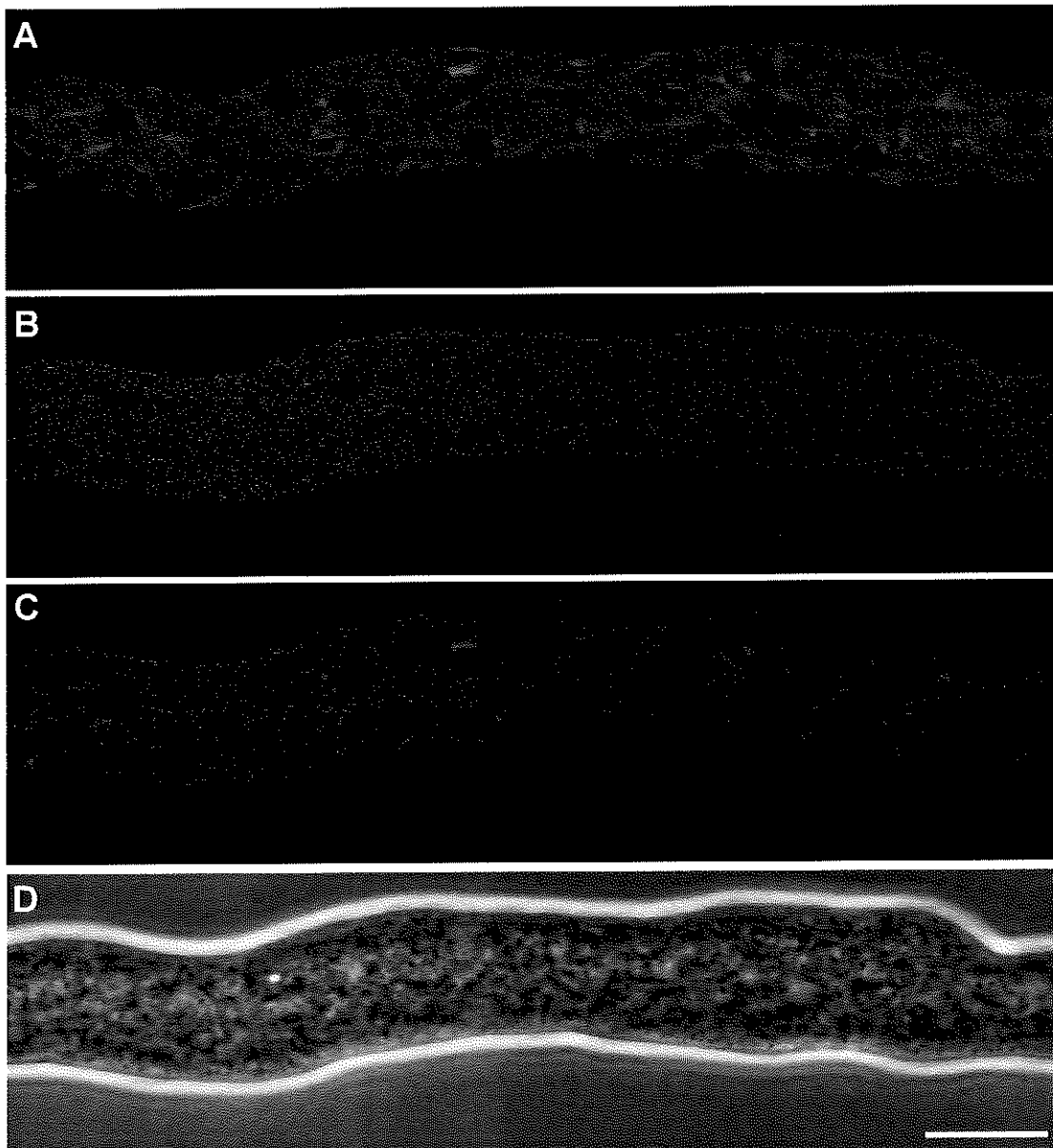


Figura 3. Región basal de una hifa madura de *N. crassa* que expresa MBT-3::sGFP (A) con las membranas teñidas con FM4-64, (C) la composición de (A) y (B), y la imagen por contraste de fases (D). La flecha señala la acumulación de fluorescencia en un núcleo. Escala = 5 μ m.

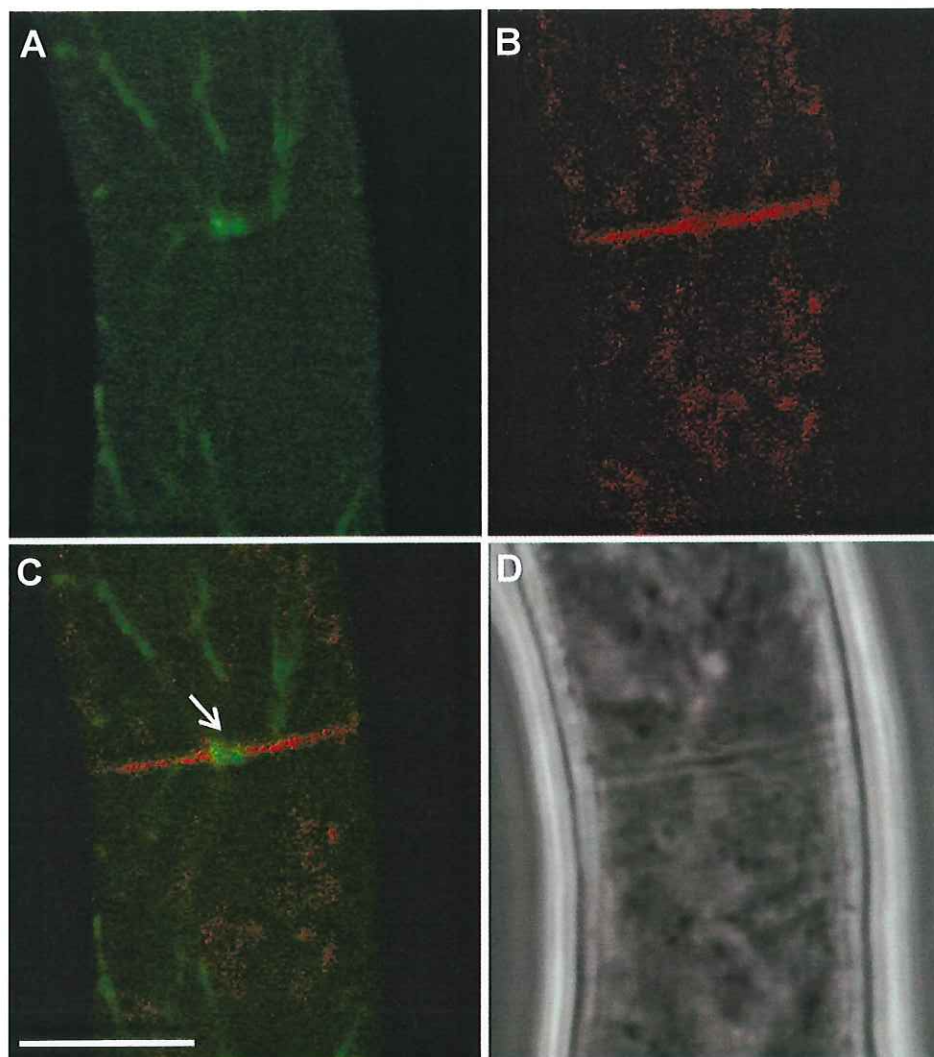


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de un septo formado. **(A)** MTB-3::sGFP. **(B)** Membranas teñidas con FM4-64. **(C)** Composición de **(A)** y **(B)**, y **(D)** contraste de fases. La flecha señala la MTB-3::sGFP en el poro septal cuando este se ha formado. Escala=5 μ m.

La MTB-3 fue observada asociada a los núcleos durante la mitosis como parte del huso mitótico, incluyendo los Mts astrales. (Fig. 5).

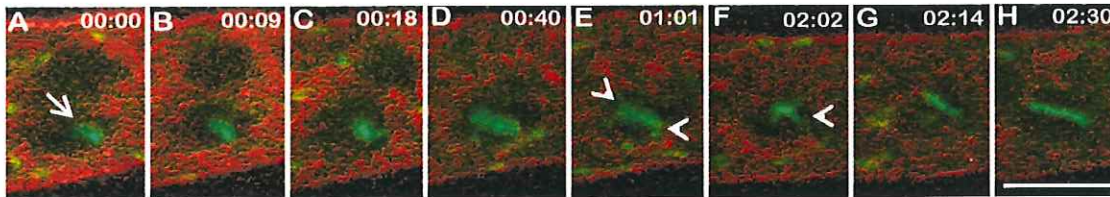


Figura 5. Serie de tiempo tomada por microscopía confocal. Se muestra una composición de imágenes de MTB-3::sGFP y de la tinción de membranas con FM4-64 (5 μ M). Las flechas señalan un núcleo durante la mitosis y la concentración de MTB-3::sGFP en un huso acromático. Las cabezas de flechas muestran la presencia de MTB-3::sGFP en los Mts astrales. El tiempo está en min:s. Escala = 5 μ m.

En germínulas, los cometas son vistos en menor cantidad. El movimiento de éstos también es en ambas direcciones, tanto en la esfera como en el tubo germinal. En el ápice se observan algunos cometas que se doblan y regresan hacia la región basal. (Fig. 6.).

En las esporas se detectó fluorescencia, sin embargo no presenta el patrón de cometas que se observa en germínulas e hifas maduras, solo son filamentos fluorescentes cortos que no tienen movimiento. (Fig. 7).

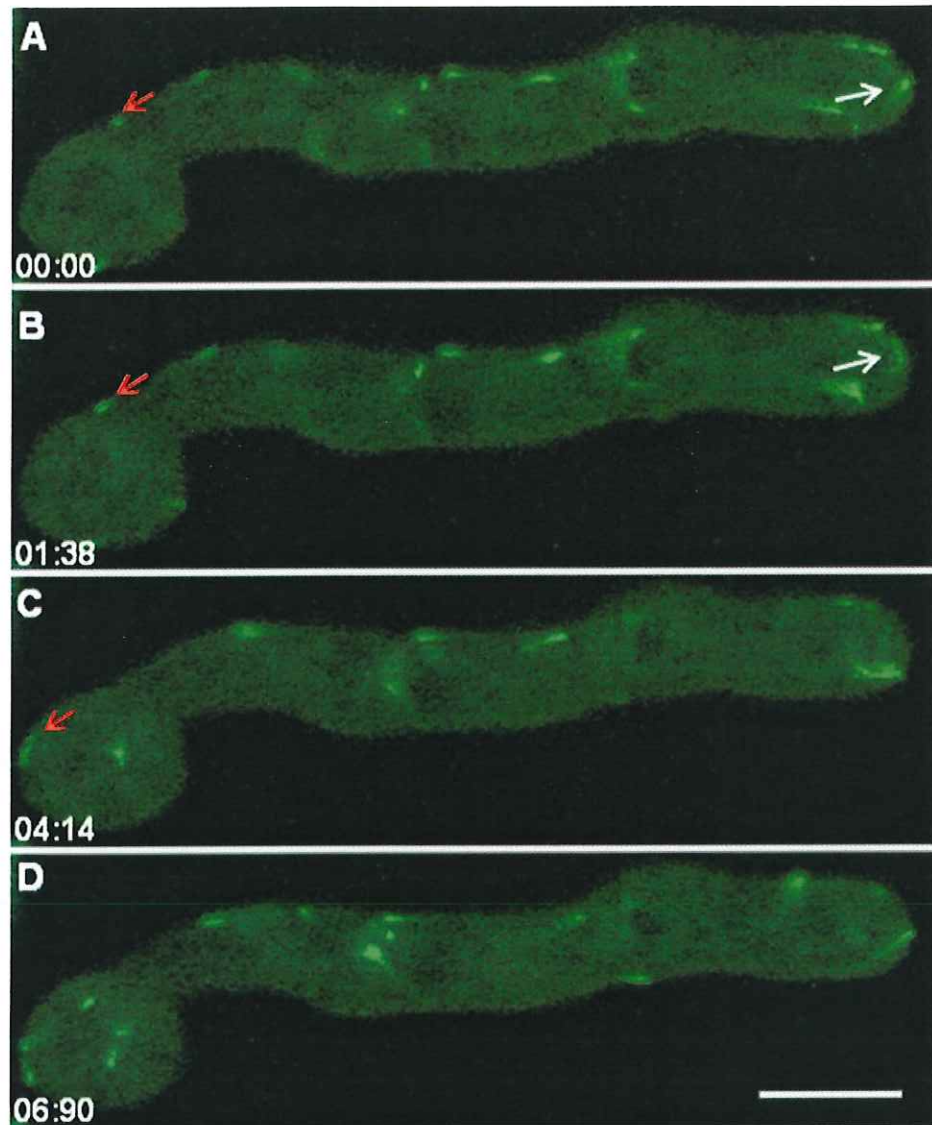


Figura 6. Serie de tiempo obtenida mediante microscopía confocal, de la dinámica de la proteína MTB-3::sGFP en germínulas de *N. crassa*. Las flechas rojas señalan un cometa en sentido retrógrado en la esfera germinal y las blancas un cometa que se dobla en el ápice. El tiempo está en s:cs. Escala = 5 μm .

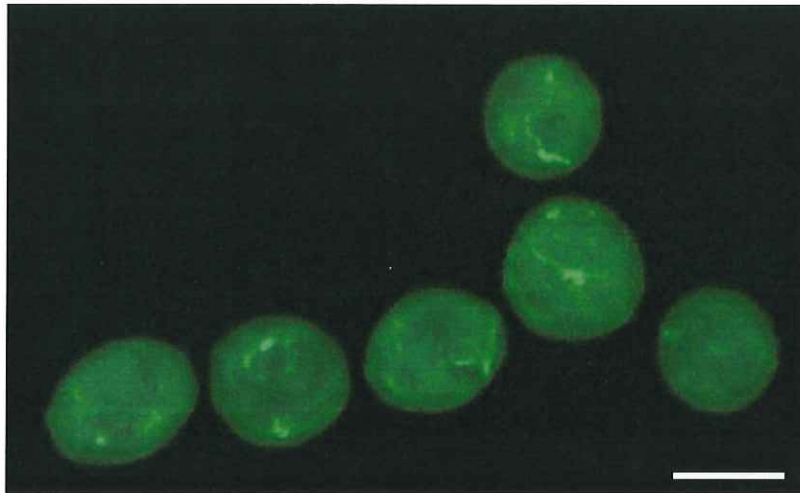


Figura 7. Distribución de MTB-3::sGFP en conidias, observadas bajo microscopía confocal. Escala = 5 μ m.

VII.2 Dinámica de MTB-3::sGFP en la membrana celular

Con la finalidad de conocer la dinámica de la proteína MTB-3::sGFP en la membrana plasmática, se realizaron observaciones mediante TIRFM. Los cometas se observaron en la región apical y subapical desplazándose rápidamente en dirección anterógrada y retrógrada longitudinalmente al eje de crecimiento de la hifa. En algunos casos fue posible observar cometas que se movían desde el ápice hacia la región basal (Fig. 8).

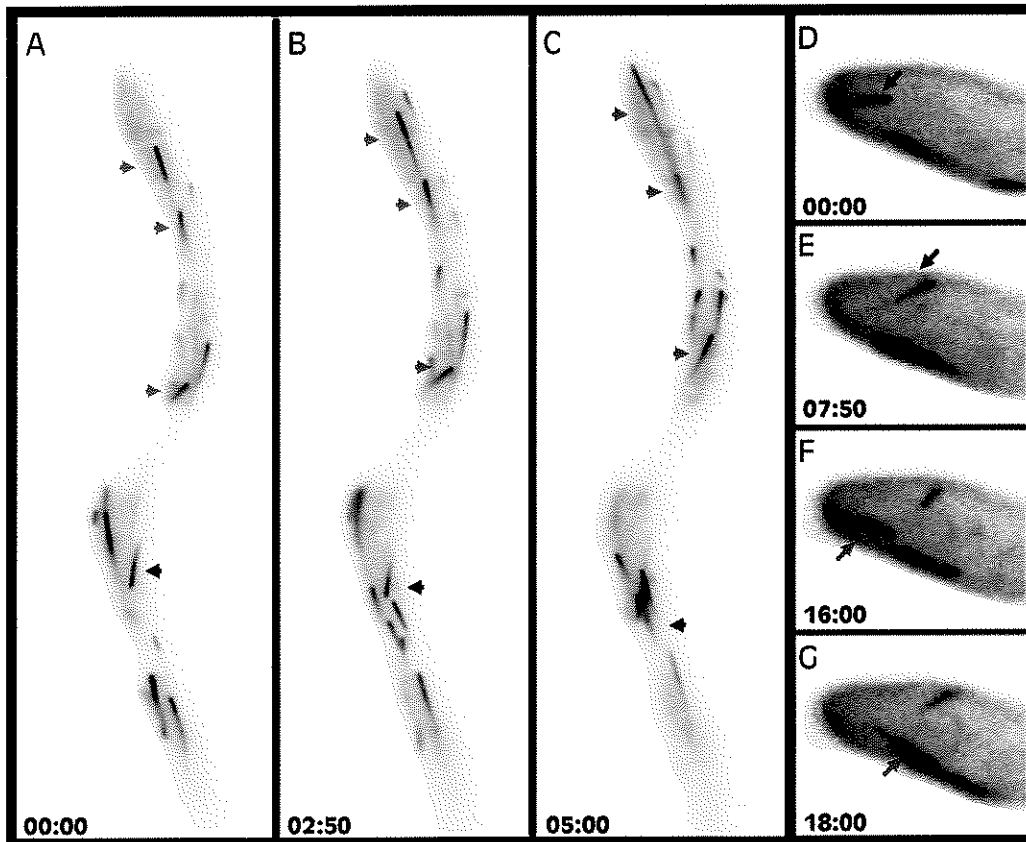


Figura 8. Series de tiempo obtenida mediante microscopía de campo evanescente (TIRFM), de la dinámica de la proteína MTB-3::sGFP en la proximidad de la corteza citoplasmática en hifas maduras de *N. crassa*. Los paneles **A-C** muestran cometas de MTB-3::sGFP que se mueven en sentido anterógrado en la región subapical (flechas rojas) y retrógrado (flechas negras). Los paneles **D-G** muestran dos cometas (flechas negras y rojas) en sentido retrógrado desde el ápice. El tiempo está en min:s.

VII.3 Relación de la MTB-3::sGFP con organélos y vesículas

Mediante la tinción de hifas maduras con FM4-64 se observó que los cometas que forma la MTB-3::sGFP en la región apical no están asociados con el Spitzenkörper (Spk), aunque muchos lo alcanzan e incluso da la impresión

de que lo cruzan y regresan en sentido contrario. Tampoco las vesículas teñidas con FM4-64 mostraron asociación espacial con los cometas de MTB-3::sGFP (Fig. 2).

Las mitocondrias teñidas con MitoFluor red tampoco colocalizaron con la MTB-3::sGFP (Fig. 9).

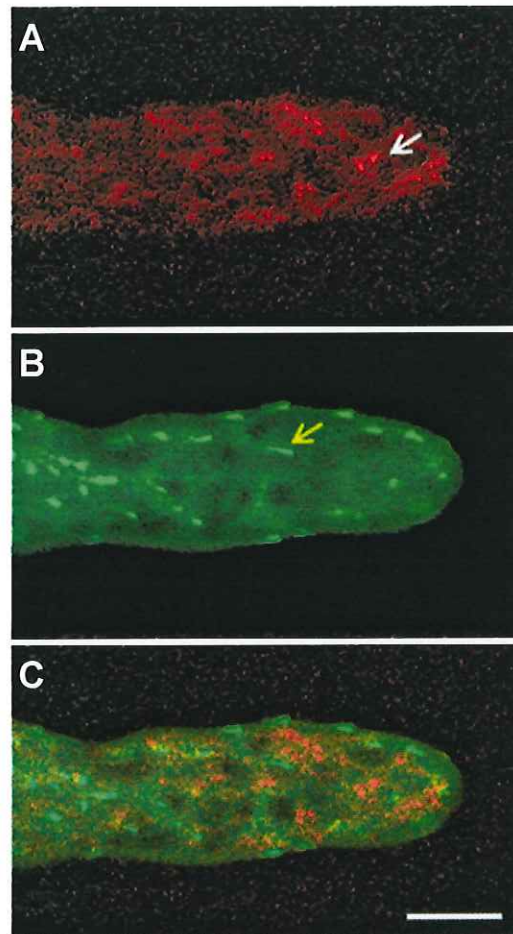


Figura 9. Distribución de las mitocondrias. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de la cepa MTB-3::sGFP teñida con MitoFluor red, a una concentración de 2.5 μ M; (A) canal rojo; (B) canal verde; (C) traslape de canal rojo y verde y (D) contraste de fases. La flecha blanca señala mitocondrias y la amarilla los cometas de MTB-3::sGFP. Escala = 5 μ m.

VII.4 Efecto de la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos de actina en la dinámica de MTB-3::sGFP

Los Mts se despolimerizaron con benomilo para analizar su asociación con MBT-3. En las células tratadas con esta droga, los cometas desaparecieron por completo y solo se encontraron puntos fluorescentes desorganizados en la región apical y subapical, algunos de estos puntos se concentraron alrededor de los núcleos (Fig. 10A).

En hifas maduras tratadas con citocalasina A se observaron los cometas pero más pequeños, menos abundantes y distribuidos de manera desorganizada que la cepa silvestre (Fig. 10B).

VII.5 Efecto de la mutación de la subunidad p150^{glued} de la dinactina y la cinesina convencional en la distribución y dinámica de MTB-3::sGFP.

Para determinar la influencia de las proteínas motoras en el comportamiento de MTB-3::sGFP se analizaron la transformante TRM-01-AR y la cruce XRM-03-AR, que expresan la MTB-3 fusionada con GFP en la cepas mutantes de la cinesina convencional (*nkin*) y de la subunidad p150^{glued} (*ro-3*) de la dinactina respectivamente.

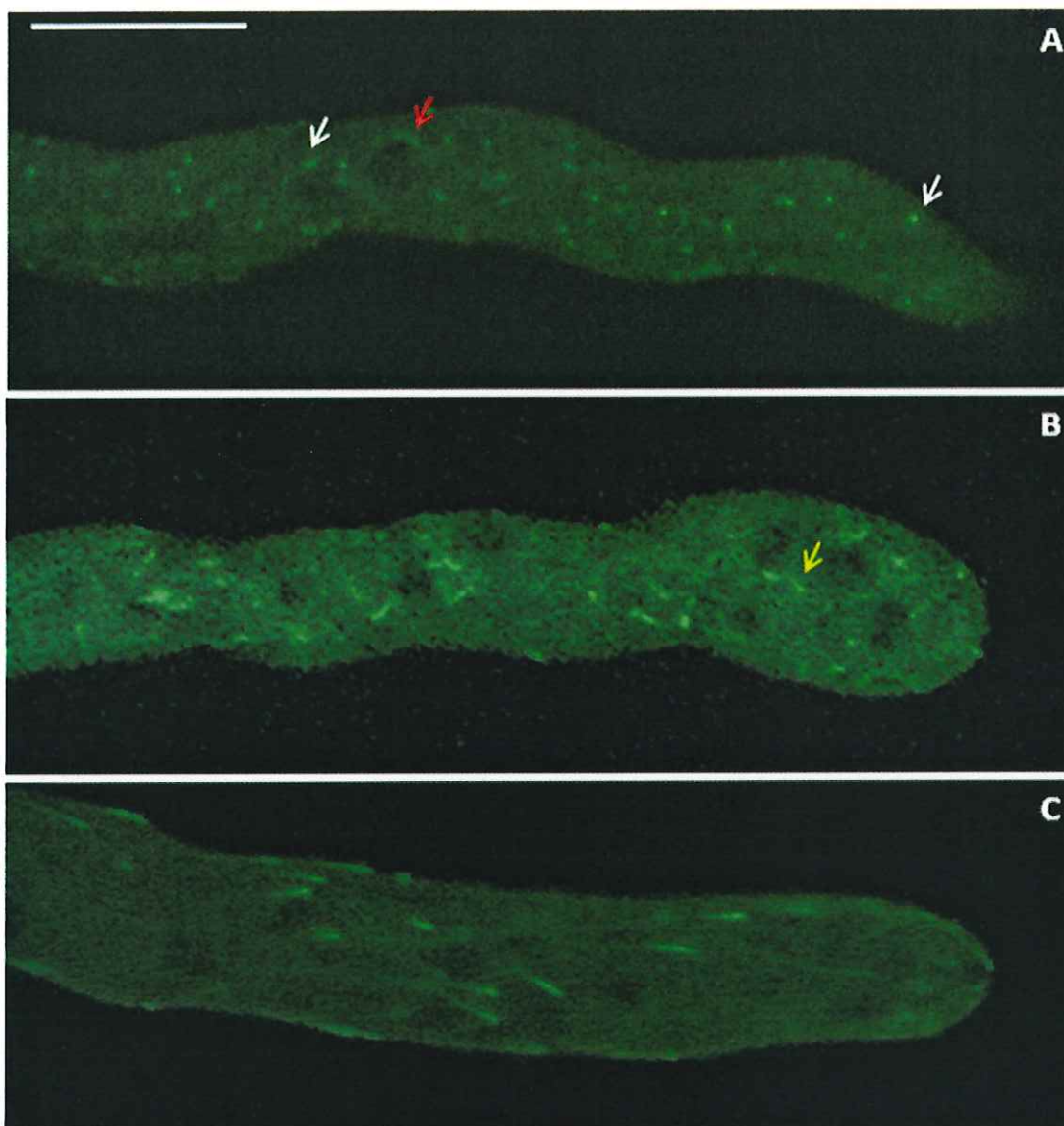


Figura 10. Imágenes por microscopía confocal de una hifa de MTB-3::sGFP tratada **(A)** con benomilo ($5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), las flechas blancas muestran acumulaciones desorganizadas de MTB-3::sGFP y la flecha roja como se acumulan puntos fluorescentes alrededor del núcleo y **(B)** con citocalasina A ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), la flecha amarilla muestra los pequeños filamentos fluorescentes. Escala = $10 \mu\text{m}$.

Tanto en la mutante de *nkin* (cinesina convencional) como *ro-3* (la subunidad p150^{glued}), se observó la presencia de los cometas, el tamaño fue irregular y estaban distribuidos en forma desorganizada. La velocidad de desplazamiento de la MTB-3 también estaba afectada, en ambas mutantes se desplazaban más lentamente, siendo más evidente en la mutante de *ro-3* (Fig. 11).

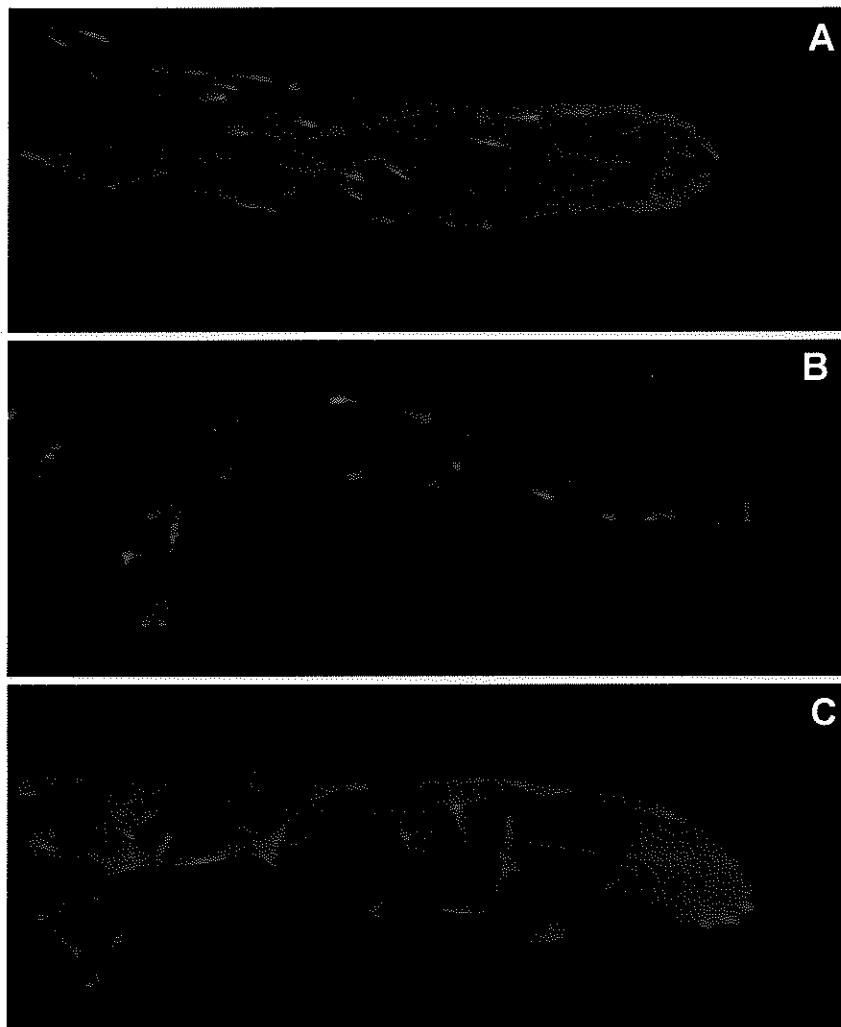


Figura 11. Imágenes confocales de *N. crassa* con MTB-3::sGFP tipo silvestre (A), mutante de *ro-3* (B) y mutante de *nkin* (C). Escala = 10 μ m.

En la mutante de *ro-3* también fue posible observar fragmentos de MTB-3::sGFP en núcleos en división, estos fragmentos fluorescentes se observan incluso cuando ya se han separado los núcleos después de la división nuclear (Fig. 12).



Figura 12. Imágenes de microscopía confocal de la mutante de *ro-3* de *N. crassa* con la proteína MTB-3 marcada con GFP, en un núcleo en división. El tiempo está en min:s. Escala = 3 μ m.

VII.6 FRAP de MTB-3::sGFP

Para establecer si la velocidad de desplazamiento de la *mtb-3* es mayor a la velocidad del flujo citoplasmático, se realizó un experimento de fotoblanqueamiento en el que se blanqueó la región apical y subapical de una cepa con MTB-3::sGFP (Fig. 13 A). A los 10 segundos se observa que solo los primeros micrómetros cercanos al ápice están ligeramente blanqueados (Fig. 13B) y a los 20 segundos está prácticamente recuperada la fluorescencia (Fig. 13C).

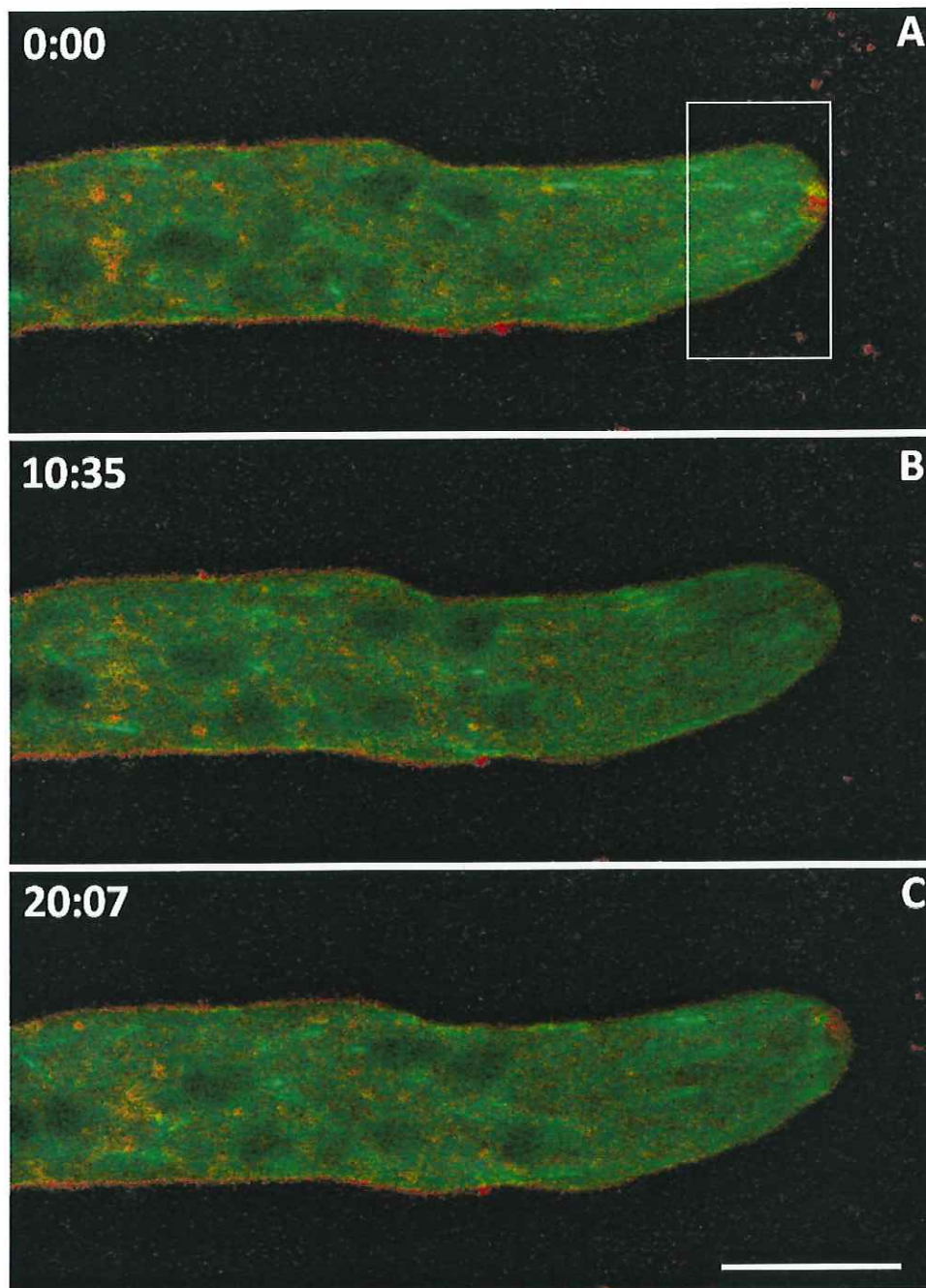


Figura 13. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento en *N. crassa* marcada con MTB-3::sGFP. (A) imagen preblanqueamiento, el rectángulo muestra la región blanqueada, (B) y (C) imágenes postblanqueamiento. Escala = 10 μ m.

VII.7 Marcaje molecular de MTB-3 con la Proteína Fluorescente Cherry

Para tener alternativas de fusión con cepas con otras proteínas de interés marcadas con GFP, se transformó *N. crassa* con el gen *mtb-3* fusionado a la Proteína Fluorescente Cherry (MTB-3::cherryFP), que muestra una distribución y dinámica idéntica a la marcada con GFP (Fig. 14).



Figura 14. *N. crassa* marcada con MTB-3::cherryFP. Escala = 10 μ m.

VII.8 Caracterización de la cepa mutante por *knockout* de *mtb-3*

VII.8.1 Características morfológicas

La mutante por *knockout* de *mtb-3* no presenta cambios importantes en la morfología de la colonia comparada con la cepa tipo silvestre (Fig. 15), sin embargo, hay una reducción en la tasa de crecimiento (Fig.16).

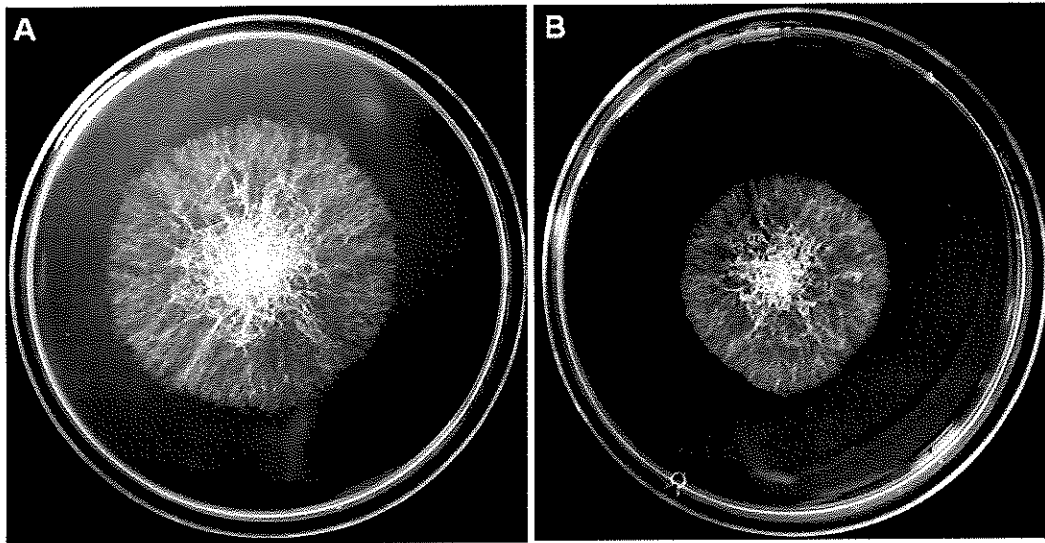


Figura. 15. Morfología colonial de (A) cepa tipo silvestre y (B) mutante de *mtb-3* después de 12 h de incubación a 28° C.

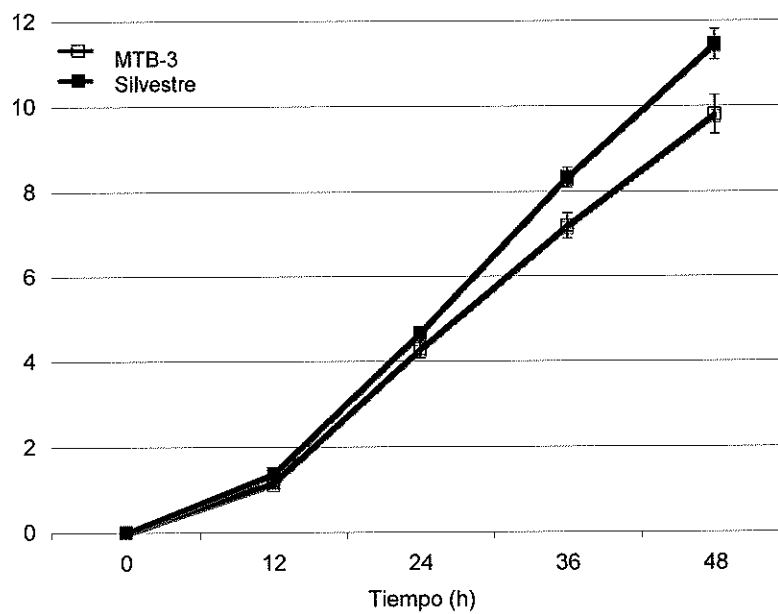


Figura 16. Tasa de crecimiento colonial de la cepa mutante de *mtb-3* y la cepa silvestre de *N. crassa*.

VII.8.2 Morfología de las hifas

Aunque a nivel de la colonia no se identifican cambios aparentes en la mutante de *mtb-3*, la morfología de la hifa se ve moderadamente afectada, no crece de manera tan recta como la cepa silvestre y ay son visiblemente constantes las ramificaciones de ambos lados de la hifa simultáneamente (Fig. 17)

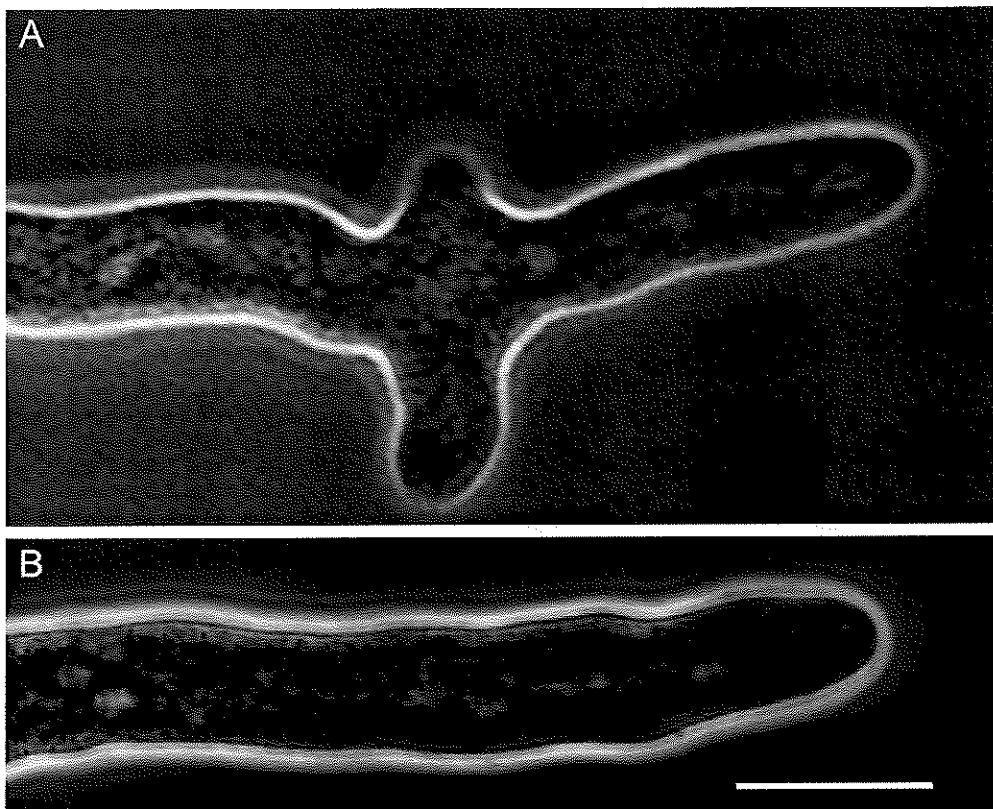


Figura 17. Morfología de hifas de *N. crassa* mutante de *mtb-3* (A) y silvestre (B). Escala = 10 μ m.

VII.9 Características del citoesqueleto microtubular en la mutante *mtb-3*

A través de microscopía confocal se comparó la organización de los Mts en una cepa silvestre y en la mutante de *mtb-3* que fue cruzada con la cepa que expresa la beta tubulina marcada con GFP (N2524). La organización y orientación de los Mts no se vio afectada pero si se observó una población menor (Fig. 18), además de formar agrupaciones muy cerca del ápice. Así mismo, los Mts que forman los husos acromáticos se observan menos compactos (Fig. 19)

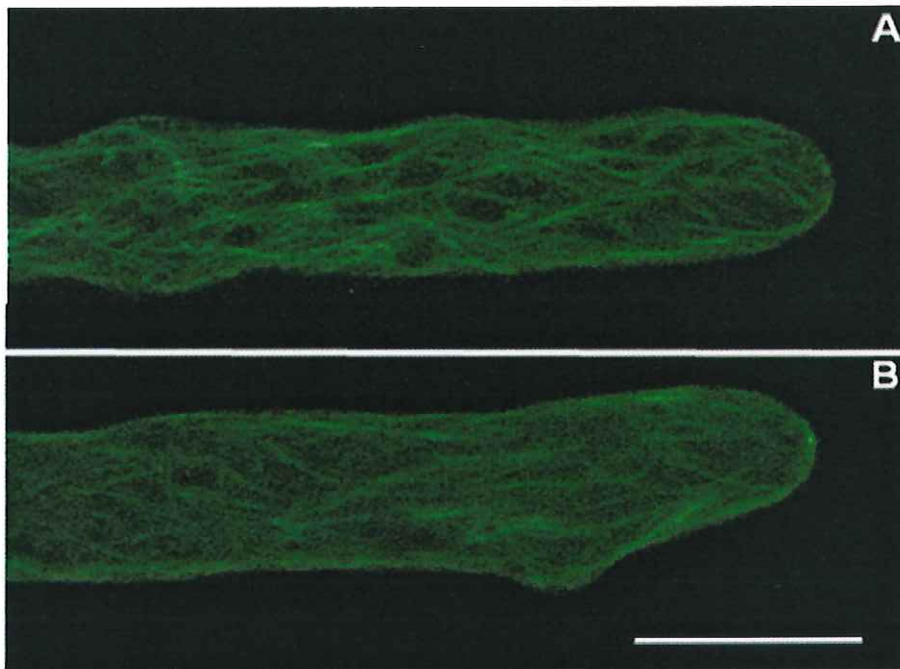


Figura 18. Imágenes por microscopía confocal de *N. crassa* con β -tub::sGFP de tipo silvestre (A), y (B) la mutante de *mtb-3*. Escala = 10 μ m.

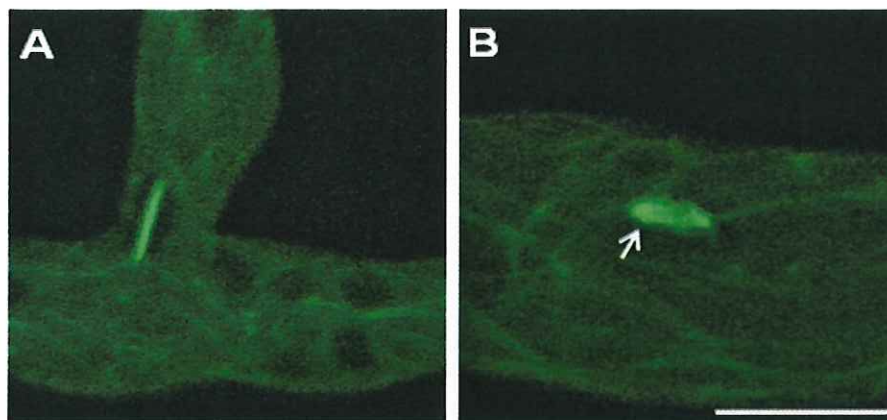


Figura 19. Husos acromáticos de núcleos en división en *N. crassa* con la β -tubulina marcada con GFP (A) tipo silvestre y (B) mutante de *mtb-3*.

Además de la observación de los Mts por microscopía confocal se realizaron series de tiempo por microscopía de campo evanescente. En estas imágenes se observa un menor dinamismo de los Mts que la cepa silvestre, no se observan ejemplos de inestabilidad dinámica. (Fig. 20).



Figura 20. Imágenes por microscopía de campo evanescente de *N. crassa* con β -tub::sGFP (A) mutante de *mtb-3* y (B) silvestre (Uchida *et al.*, 2008). Escala = 10 μ m.

VII.10 Distribución de los núcleos en la mutante de *mtb-3*

Aunque no se observó una desorganización muy evidente en los Mts, se analizó la distribución de los núcleos en la cepa mutante de *mtb-3*, se observó que la zona de exclusión de los núcleos es ligeramente mayor ($13.1 \pm 4.9 \mu\text{m}$) y con una mayor variabilidad. Los núcleos están distribuidos de manera homogénea a lo largo de la hifa pero presentan una forma más esférica y de menor tamaño que en la cepa silvestre (Fig. 21)

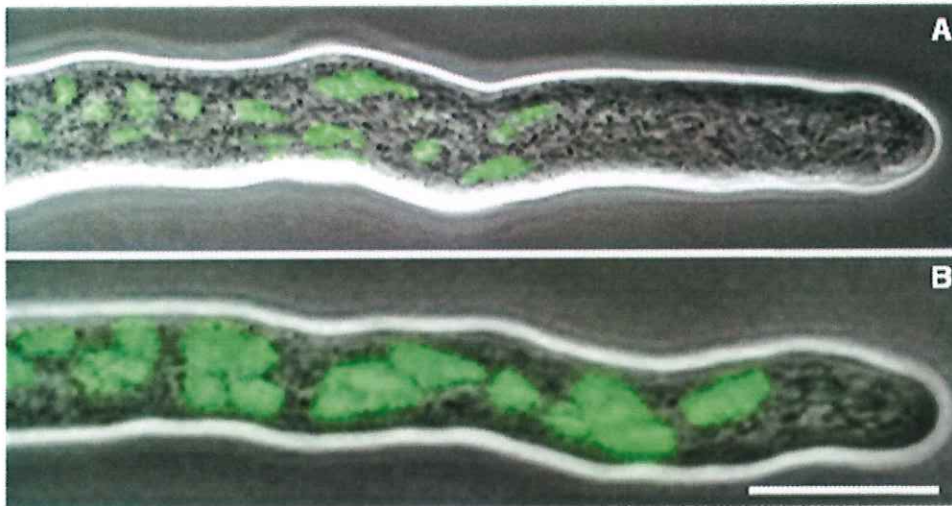


Figura 21. Imagen compuesta de contraste de fases y de fluorescencia de *N. crassa* con los núcleos marcados con H1::sGFP. **(A)** Mutante de *mtb-3* y **(B)** cepa silvestre. Escala = 10 μm .

VIII. Discusión

MTB-3::sGFP en *N. crassa*.

Las Tips+ son proteínas asociadas a la terminal positiva de los microtúbulos que no tienen en común más que su localización, cada familia tiene dominios diferentes y tienen grandes variaciones estructurales y probablemente funcionales. De todas estas proteínas, hay algunas que se encuentran asociadas a la mayor parte de los Mts como es la familia de EB1 y otras que tienen una asociación más específica con ciertos microtúbulos que tienen una conformación particular y cuya función aparentemente está asociada con la Tip+ que la acompaña. El presente trabajo está enfocado al conocimiento de las características dinámicas y funcionales de la MTB-3 que es el homólogo de EB1 en *N. crassa*. En estudios previos en otros organismos se ha demostrado que esta proteína asiste a los Mts durante la inestabilidad dinámica que es el fenómeno que se lleva a cabo en la terminal positiva de estos y que consiste en periodos alternados de polimerización y despolimerización de subunidades de tubulina (Beinhauer *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998 y Tirnauer *et al.*, 1999). Por esta razón se ha utilizado como un indicador de la posición de la terminal positiva de los Mts.

Al igual que en otros organismos, la proteína MTB-3::sGFP en *N. crassa* está distribuida en toda la hifa formando cometas que viajan a una velocidad 2.5 veces superior que el crecimiento hifal. Dirigiéndose principalmente hacia

el margen de la colonia. Sin embargo, en la región apical y subapical se observaron diversos cometas moviéndose hacia la región basal en sentido retrógrado, esto indica que la polaridad de los Mts en esta región que se ha considerado que tiene una sola polaridad hacia el ápice (terminales (+)) es en realidad una mezcla de Mts con polaridad antiparalela, como fue sugerido por Mouriño-Pérez y colaboradores (2006). En el estudio mencionado se observó polimerización microtubular de novo a partir del ápice de la hifa, esto fue confirmado en este trabajo, ya que fue posible observar cometas desplazándose desde la punta de la célula hacia el subápice, esto indica que estos microtúbulos, que están siendo polimerizados tienen un sentido retrógrado (Galjart y Perez, 2003).

En general la tasa de movimiento de los cometas fluorescentes, en ambos sentidos, fue mayor que el flujo citoplasmático y se aproxima a la tasa de polimerización de los microtúbulos descrita para *N. crassa* (Uchida *et al.*, 2008).

La proteína también fue localizada en los núcleos en interfase y durante su división, probablemente en los husos mitóticos. Estos resultados sugieren la asociación de la proteína MTB-3 tanto en Mts citoplasmáticos como mitóticos.

TIRFM vs microscopía confocal

La microscopía TIRF es una técnica poco explotada para estudiar hongos, sin embargo, por la gran cantidad de Mts presentes en *N. crassa*,

TIRF representa una excelente técnica microscópica para el estudio de proteínas y procesos relacionados con los Mts. TIRF se ha utilizado como una herramienta que puede proporcionar información diferente y/o complementaria a la que proporcionan otros tipos de microscopía (Uchida *et al.*, 2008; Delgado-Álvarez 2008).

El hacer uso de microscopía confocal y TIRF para la adquisición de imágenes en el presente trabajo, permitió observar la dinámica de la MTB-3::sGFP tanto en los Mts que se encuentran en la parte media de la hifa, como en los Mts próximos a la corteza citoplasmática, para obtener un estudio más fino sobre la conducta de la proteína en toda la hifa.

Las observaciones con ambas técnicas mostraron un comportamiento similar de los cometas formados por MTB-3, sin embargo la resolución en tiempo de TIRFM permitió hacer observaciones más precisas sobre su dinámica (Uchida *et al.*, 2008).

Efecto del citoesqueleto en la dinámica de MTB-3

La asociación entre MTB-3 y Mts fue corroborada con los experimentos de exposición a benomilo (droga antimicrotúbulos). La forma de puntos fluorescentes que adoptan los cometas luego de la exposición al benomilo, es una clara evidencia de la interacción directa de esta proteína con el citoesqueleto microtubular (Morrison *et al.*, 1998). En el caso de la despolimerización de microfilamentos de actina con citocalasina A, se observó

poco efecto sobre los cometas de MTB-3 y su desplazamiento pero no así en su distribución y organización, estos resultados demuestran que la despolimerización de actina no afecta a esta proteína y que las alteraciones en su distribución pueden ser consecuencia indirecta, debido a que al despolimerizar la actina se ha descrito que los Mts de la región apical y subapical se ven afectados (Ramos-García, 2006). La ausencia de relación entre MTB-3 y actina resulta interesante dado que esta proteína tiene un dominio de calponina similar al que está presente en las diferentes proteínas de unión a actina (Hayashi e Ikura, 2003), por lo que se podría pensar que la posible relación entre estas proteínas sea a través de otras proteínas intermedias y que la MTB-3 es un eslabón entre el complejo proteico que regula la interacción entre Mts y microfilamentos de actina, por lo que valdría la pena analizar en detalle el efecto de la ausencia de MTB-3 en la organización y dinámica de ambos componentes del citoesqueleto.

En este trabajo, no se analizó el efecto de la ausencia de MTB-3 en relación a los microfilamentos de actina, pero si en relación a los Mts, en los que el efecto más evidente es con respecto a la inestabilidad dinámica y la formación de husos acromáticos, esta proteína en *S. pombe* se ha asociado con alteraciones en la segregación de minicromosomas no esenciales (Fleig *et al.*, 1996) que puede ser debido a alteraciones en la relación de los Mts y el cinetocoro al no haber MTB-3 (Beinhauer *et al.*, 1997).

Relación de MTB-3 y organélos y vesículas

Se ha demostrado en hongos que los Mts son requeridos para el movimiento de mitocondrias y para el transporte de vesículas al ápice de la hifa (McDaniel y Roberson, 2002), lo cual sugiere la interacción de la MTB-3 con vesículas y mitocondrias. Sin embargo, al usar colorantes específicos para estos, no se observó relación espacial alguna con la MTB-3::sGFP.

Influencia de las proteínas motoras en la distribución de MTB-3

Estudios previos han sugerido que las proteínas motoras interactúan con TIPS+ como la EB1 para afectar la estabilidad dinámica de los Mts (Lansbergen y Akhmanova, 2006; Uchida *et al.*, 2008).

Berrueta y colaboradores en 1999, mostraron la interacción de EB1 con la subunidad p150^{glued} de la dinactina y se ha sugerido que esta interacción es de gran importancia para regular la polimerización de Mts (del cinetocoro y su anclaje), mientras que por otra parte el desplazamiento de EB1 y sus homólogos se ha vinculado a una cinesina motora (Vaughan, 2005). Sin embargo, en este trabajo no se observó una relación directa entre la ausencia de proteínas motoras (dinactina y cinesina), los cometas estuvieron presentes en ambas pero la tasa de movimiento estaba afectada así como su distribución, eventos que aparentemente son secundarios al efecto que tiene la mutación de estas proteínas sobre los Mts y sobre las tasas de polimerización de estos (Galván-Mendoza, 2006; Uchida *et al.*, 2008).

Mecanismo de acumulación en el extremo + de la MTB-3

Las TIPs+ en general se acumulan en el extremo dinámico mediante tres mecanismos: a) En un fenómeno conocido como Treadmilling, uniéndose a los dímeros de tubulina recién polimerizados y desatándose de los dímeros viejos, simulando un cometa. B) Siendo transportadas por proteína motora que se dirige al extremo + y c) Por el mecanismo conocido como hitchhicking en donde se asocian directamente con otras TIPs+. Los homólogos EB1 en *Xenopus* y ratón atribuyen su localización al extremo + al mecanismo conocido como treadmilling (Carvalho *et al.*, 2003), mientras que para homólogos presentes en otros organismos como *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* aun no ha sido descrito.

La forma de cometa con que se observa la proteína MTB-3 *in vivo*, es dada por la unión de ésta al extremo + de los Mts durante su elongación y no por el efecto activo de una proteína motora; dado que los cometas son observados desplazándose aun en ausencia de proteínas motoras como cinesina y dinactina. La forma de cometas de los fragmentos fluorescentes muestra la una afinidad de MTB-3 con los dímeros de tubulina que aun no han sido desfosforilados concordando con los estudios realizados con anterioridad en otros organismos (Berrueta *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1998; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b; Tirnauer *et al.*, 2002).

Función de la MTB-3

La proteína MTB-3 muestra una gran afinidad por la zona de los Mts donde las subunidades de alfa y beta tubulina no han sido hidrolizadas y está presente en aquellos Mts que están elongándose, por lo que se puede concluir que es una proteína estabilizadora que promueve la polimerización, estabilización y rescate de los Mts durante la inestabilidad dinámica (Tirnauer *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002).

IX. Conclusiones

La proteína MTB-3::sGFP está distribuida en toda la hifa formando cometas en Mts citoplasmáticos y posiblemente en Mts que forman husos acromáticos.

La velocidad de desplazamiento de los cometas es 2.5 veces mayor a la de la tasa de crecimiento hifal.

Los cometas tienen movimiento anterógrado y retrógrado, respecto al flujo citoplasmático.

Los Mts están orientados antiparalelamente en la región apical y subapical en *N. crassa*.

MTB-3::sGFP está asociada a los Mts pero no a microfilamentos de actina.

Las proteínas motoras asociadas a los Mts, dinactina y kinesina convencional, no participan en el transporte de MTB-3.

X. Referencias

Akhmanova A. y C.C. Hoogeraad. (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Cell* 17:47-54.

Akhmanova A., C.C. Hoogeraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld y N. Galjart. (2001). CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104:923-935.

Askham J.M., K.T. Vaughan, H.V. Goodson y E.E. Morrison. (2002). Evidence that an interaction between EB1 and p150 (Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol. Biol. Cell* 13:3627–3645.

Bartnicki-García S. (2002). Hyphal tip growth. Outstanding questions. En: O. H. D. (Ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp. 29- 58.

Beinhauer J.D., I.M. Hagan, J.H. Hegemann y U. Fleig. (1997). Mal3, the Fission Yeast Homologue of the Human APC-interacting Protein EB-1 Is

Required for Microtubule Integrity and the Maintenance of Cell Form. The J. Cell Biol. 139:717-728.

Berrueta L., S.K. Kraeft, J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, L.B. Chen, D.E. Hill, D. Pellman y B.E. Bierer. (1998). The Adenomatous Polyposis Coli-binding Protein EB1 is Associated with Cytoplasmic and Spindle Microtubules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10596-10601.

Berrueta L., J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, D. Pellman y B.E. Bierer. (1999). The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. Curr. Biol. 9:425-428.

Bu W. y L-K. Su. (2001). Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. Nat. 20:3185-3192.

Chan J., G. Calder, J.H. Doonan y C.W. Lloyd. (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. Nat. Cell Biol. 5:967-971.

Chan J., G. Calder, S. Fox y C.W. Lloyd. (2005). Localization of the Microtubule End Binding Protein EB1 Reveals Alternative Pathways of Spindle Development in Arabidopsis Suspension Cells. The Plant Cell 17:1737-1748.

Coquelle F.M., M. Caspi, F.P. Cordelieres, J.P. Dompierre, D.L. Dujardin, C.P. Koifman, P. Martin, C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova, N. Galjart, J.R. De Mey y O. Reiner. (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol. Cell Biol.* 22:3089-3102.

Delgado-Álvarez. D.L. (2008). Organización y dinámica del citoesqueleto de F-actina en *Neurospora Crassa*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Baja California. 66 pp.

Desai A. y T.J. Mitchison. (1997). Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83–117.

Fleig U., M. Sen-Gupta y J.H. Hegemann. (1996). Fission yeast *mal2* is required for chromosome segregation. *Mol. Cell Biol.* 16:6169-6177.

Fuchs F, H. Prokisch, W. Neupert y B. Westermann. (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Cell Sci.* 115:1931-1937.

Galjart N. y Perez F. (2003). N. Galjart y F. Perez, A plus-end raft to control microtubule dynamics and function, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:48–53

Galván-Mendoza I. (2006). Papel de la dineína en la organización del citoesqueleto microtubular de *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 42 pp.

Geitmann A. y A.M. Emons. (2000). The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. J. Microsc. 198:218-245.

Gooday G.W. (1983). The hyphal tip. En: Fungal Differentiation, pp. 315-356. Editado por J. E. Smith. N.Y.: Marcel Dekker.

Gow N.A.R. (1989). Control of the extension of the hyphal apex. Curr. Top Med. Mycol. 3:109-152.

Hasek J. y S. Bartnicki-Garcia. (1994). The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. Arch Microbiol. 161:363-369.

Hayashi I. y M. Ikura. (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). J Biol. Chem. 278:36430-36434

Hayashi I., A. Wilde, T.K. Mal y M. Ikura. (2005). Structural Basis for the Activation of Microtubule Assembly by the EB1 and p150^{Glued} Complex. *Mol. Cell* 19:449-460.

Heath I.B., M.C. Heath y F. Herr. (1982). Motile systems in fungi, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 35:563-587.

Heath I.B. y S.G.W. Kaminskyj. (1989). The organization of tip-growth-related organelles and microtubules revealed by quantitative analysis of freeze-substituted oomycetes hyphae. *J. Cell Sci.* 93:41-52.

Heath I.B. (1994). The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements, and mitosis. En *The Mycota I : Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 43-65.

Heggeness M.H., M. Simon y S.J. Singer. (1978). Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3863-3866.

Hermann G.J. y J.M. Shaw. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:265-303.

Hickey P.C., D. Jacobson, N.D. Read y N.L. Glass. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol.* 37:109-119.

Honnappa S., C.M. Jonh, D. Kostrewa, F.K. Winkler y M.O. Steinmetz. (2005). Structural insights into the EB1-APC interaction. *The EMBO J.* 24:261-269.

Hoogenraad C.C., A. Akhmanova, F. Grosveld, C.I. De Zeeuw y N. Galjart. (2000). Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.* 113:2285-2297.

Horio T. y B.R. Oakley. (2005). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16:918–926.

Horio T. (2007). Role of microtubules in tip growth of fungi. *J. Plant. Res.* 120:53-60.

Howard R. y J.R. Aist. (1977). Effects of MBC on hyphal tip organization, growth and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D₂O. *Prot.* 92:195-210.

Howard R.J. y J.R. Aist. (1980). Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *J. Cell Biol.* 87: 55-64.

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.

Hunter A.W. y L. Wordeman. (2000). How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J. Cell Sci.* 113:4379-4389.

Hyman A.A. y E. Karsenti. (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84:401-410.

Kaminskyj S.G.W., Yoon K.S. e I. B. Heath. (1989). Cytoskeletal interactions with post-mitotic migrating nuclei in the oyster mushroom fungus, *Pleurotus ostreatus*: evidences against a force-generating role of astral microtubules. *J. Cell Sci.* 94:663-674.

Korinek W.S., M.J. Copeland, A. Chaudhuri y J. Chant. (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Sci.* 287:2257-2259.

Lansbergen G. y A. Akhmanova. (2006). Microtubule Plus End: A Hub of Cellular Activities. *Traf.* 7:499-507.

Louie R.K., S. Bahmanyar, K.A. Siemers, V. Votin, P. Chang, T. Stearns, W.J. Nelson y A.I. Barth. (2004). Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *J. Cell Sci.* 117:1117-1128.

Nogales E., M. Whittaker, R.A Milligan y K.H. Downing. (1999). High-resolution model of microtubule. *Cell* 96:79-88.

Maccioni R.B. y V. Cambiazo. (1995). Role of microtubule-associated proteins En: the control of microtubule assembly *Physiological Reviews* 75:835-864.

McDaniel D.P. y R.W. Roberson. (2000). Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Gen. Biol.* 31:233-244.

McKerracher L.J. e I.B. Heath. (1987). Cytoplasmic migration and intracellular organelle movements during tip growth of fungal hyphae. *Exp. Mycol.* 11:79-100.

Mimori-Kiyosue Y., N. Shiina y S. Tsukita. (2000a). Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 148:505-518.

Mimori-Kiyosue Y., N. Shiina y S. Tsukita. (2000b). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* 10:865-868.

Mitchison T. y M. Kirschner. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nat.* 312:237–242.

Morrison E.E., B.N. Wardleworth, J.M. Askham, A.F. Markham y D.M. Meredith. (1998) EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene*, 17, 3471–3477.

Morrison E.E. y J.M. Askham. (2001). EB1 immunofluorescence reveals an increase in growing astral microtubule length and number during anaphase in NRK-52E cells. *Eur. J. Cell Biol.* 80:749-753.

Mouriño-Pérez R.R., R.W. Roberson y S. Bartnicki-García. (2006). Microtubule dynamics and organization during hyphal branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol.* 43:389–400.

Oakley B.R. y N.R. Morris. (1980). Nuclear movement is β -tubulina-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 19:255-262.

Oakley C.E. y Oakley B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *A.nidulans*. Nat. 338:662–64.

Pérez F., S.G. Diamantopoulos, R. Stalder y T.E. Kreis. (1999). CLIP-170 Highlights Growing Microtubule Ends *In Vivo*. Cell 96:517-527.

Piehl M., U.S. Tulu, P. Wadsworth y L. Cassimeris. (2004). Centrosome maturation: Measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:1584-1588.

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.

Rogers S.L., G.C. Rogers, D.J. Sharp y R.D. Vale. (2002). *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. J. Cell Biol. 158:873-884.

Rehberg M. y R. Gräf. (2002). *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. Mol. Biol. Cell 13:2301-2310.

Schroer T. (2001). Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Biol.* 13:92-96.

Schuyler S.C. y D. Pellman. (2001). Microtubule 'plus-end-tracking proteins': The end is just the beginning. *Cell* 105:421-424.

Seiler S., F.E. Nargang, G. Steinberg y M. Schliwa. (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *The EMBO J.* 16:3025-3034.

Seiler S., M. Plamann y M. Schliwa. (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr. Biol.* 9:779-785.

Slep K. y R. Vale. (2007). Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol. Cell* 27:976-991.

Steinberg G. y M. Schliwa. (1993). Organelle movements in the wild-type and wall-less fz;sg;os-1 mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *J. Cell Sci.* 106:555-564.

Steinberg G. (2006). Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. *Trends Microbiol.* 15:14–21.

Straube A., M. Brill, B.R. Oakley, T. Horio y G. Steinberg. (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: Polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* 14:642-657.

Su L-K., M. Burrell, D.E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein y K.W. Kinzler. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 55:2972-2977.

Tirnauer J.S. y B.E. Bierer. (2000). EB1 Proteins Relate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *J. Cell Biol.* 149:761-766.

Tirnauer J.S., S. Grego, E.D. Salmon y T.J. Mitchison. (2002). EB1- microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol. Biol. Cell* 13:3614-3626.

Tirnauer J.S., E.D. Salmon y T.J. Mitchison. (2004). Microtubule plus-end dynamics in *Xenopus* egg extract spindles. *Mol. Biol. Cell* 15:1776-1784.

Torralba S., M. Raudaskoski, A.M. Pedregosa y F Laborda. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. 144:45-53.

Uchida M., R.R. Mouriño-Pérez, M. Freitag, S. Bartnicki-García y R.W. Roberson. (2008). Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. Fungal Gen. Biol. 45:683-692.

Vallee R.B. y H.S. Shpetner. (1990). Motor proteins of cytoplasmic microtubules. Annu. Rev. Biochem. 59:909-932.

Vallee R.B. y M.P. Sheetz. (1996). Targeting of Motor Proteins. Sci. 271:1539-1544.

Vargas M.M., J.M. Aronson y R.W. Roberson. (1993). The cytoplasmic organization of hyphal tip cells in the fungus *Allomyces macrogynus*. Prot. 176:43-52.

Vaughan K.T., S.H. Tynan, N.E. Faulkner, C.J. Echeverri y R.B. Vallee. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. J. Cell Sci. 112:1437-1447.

Vaughan K.T. (2005). TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 171:197-200.

Walker R.A. y M.P. Sheetz. (1993). Cytoplasmic microtubules associated-motors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:429-451.

Watson P. y D.J. Stephens. (2006). Microtubule plus-end loading of p150^{Glued} is mediated by EB1 and CLIP-170 but is not required for intracellular membrane traffic in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 119:2758-2767.

Wilson, L. (1975 a). Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein. En: *The biology of cytoplasmic microtubules*, N.Y. Acad. Sci. Ann. 253:213-231.

Xiang X. y R. Fischer. (2004). Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Gen. Biol.* 41:411-419.

Zhang J., S. Li, R. Fischer y X. Xiang. (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin-dependent. *Mol. Biol. Cell* 14:1479-1488.

XI. Anexos

Preparación de reactivos y medios de cultivos.

Sales de Vogel 50X (1 L) (Vogel, 1964)

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

Reactivo	Cantidad
Citrato Na_2 , 5 $\frac{1}{2}$ H_2O	150 g
KH_2PO_4 anhidrido	250 g
NH_4NO_3 , anhidrido	100 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$	5 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución de biotina	2.5 ml
Cloroformo (conservador)	2 ml

*pH 5.8. Se almacena a 4 °C.

Solución de elementos traza (100 ml)

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

Reactivo	Cantidad
Ácido cítrico $\cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
H_3BO_3 anhidrido	0.05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Cloroformo (conservador)	1 ml

*Se almacena a temperatura ambiente.

Solución Biotina

Reactivo	Cantidad
Biotina (Merck®)	5 mg
dH ₂ O	50 ml

*Se almacena a temperatura ambiente.

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

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g
Agar	15 g
dH ₂ O	Aforar a 1 L
Esterilizar por autoclave	

*Para MMV-líquido se omite el agar.

Medio Sintético de Cruzas (1 L) (MSC)

Reactivo	Cantidad
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
dH ₂ O	Aforar a 500 ml
Esterilizar por autoclave	

L-histidina (25 mg ml⁻¹)

Reactivo	Cantidad
L-histidina	1.25 g
dH ₂ O	50 ml
Esterilizar por filtración (0.25 µm)	

* Se almacena a 4 °C.

Solución FIGs 10X (1 L)

Reactivo	Cantidad
Sorbosa	200g
Fructosa	5 g
Glucosa	5 g
Inositol	2 g
dH ₂ O	Aforar a 1 L
Esterilizar por filtración (0.25 µm)	

Medio FIGs Agar 1 % (1 L)

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50X	20 ml
Agar	10 g
dH ₂ O	880 ml
Solución FIGs 10 X	100 ml después de esterilizar

Medio de regeneración (300 ml)

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	6 ml
Sorbitol	54.6 g
Extracto de levadura	6 g
dH ₂ O	252 ml
Solución de FIGs 10 X	30 ml después de esterilizar

Medio LB-Agar 1.5 % (1 L)

Reactivo	Cantidad
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
dH ₂ O	Aforar a 1 L
Esterilizar por autoclave	

*Para LB-liquido se omite el agar.

Sorbitol 1M (500 ml)

Reactivo	Cantidad
Sorbitol	91.085 g
dH ₂ O	500 ml
Esterilizar por autoclave	

*Se almacena a 4°C.

Ampicilina (1 µg ml⁻¹)

Reactivo	Cantidad
Ampicilina	1 g
dH ₂ O	10 ml

*Se almacena a 20°C.

Higromicina (5 µg ml⁻¹)

Reactivo	Cantidad
Higromicina	25.4 µl
dH ₂ O	4.6 µl

