

TESIS DEFENDIDA POR
Eddy Francisco Sánchez León-Hing
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité

Dr. Gilberto Gaxiola Castro
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del Programa de
Posgrado en Ciencias*

Dr. Edgar Gerardo Pavía López
Director de Estudios de Posgrado

31 de Agosto de 2007

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**LOCALIZACIÓN DE LA QUITINA SINTETASA 1 "CHS-1" EN HIFAS EN
CRECIMIENTO DE *Neurospora crassa***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

EDDY FRANCISCO SÁNCHEZ LEÓN-HING

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2007.

RESUMEN de la tesis de **Eddy Francisco Sánchez León-Hing**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México. Agosto 2007.

LOCALIZACIÓN DE LA QUITINA SINTETASA 1 “CHS-1” EN HIFAS EN CRECIMIENTO DE *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director de Tesis

La quitina es el principal componente estructural de la pared celular de los hongos filamentosos, y está formada por un homopolímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con enlaces β -1,4. La biosíntesis de este polímero se lleva a cabo por medio de la acción catalizadora de la enzima quitina sintetasa (CHS). Aunque se conoce la participación de las quitinas sintetetasas en el proceso de formación de la pared celular, un proceso altamente polarizado, se desconocen las rutas de tráfico de dichas enzimas desde los puntos de síntesis hasta los lugares de crecimiento activo en la pared celular, es decir los ápices de las hifas. Actualmente se conocen para *Neurospora crassa* siete genes de quitina sintetetasas: *chs1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *chs5*, *chs6* y *chs7*. En este trabajo se realizó una fusión para marcar la CHS-1 con la proteína verde fluorescente (GFP) y poder observar y analizar por medio de microscopía confocal de alta resolución el tráfico de vesículas en hifas en crecimiento de *N. crassa*. Se expresaron las fusiones a partir del promotor nativo o un promotor fuerte. Las fusiones correspondientes se utilizaron para transformar las cepas mutantes de *N. crassa* FGSC#9717 (*delta mus-51::bar+; his-3*) y *N. crassa* FGSC#9718 (*delta mus-51::bar+*) las cuales poseen una mutación que impide la integración ectópica de los casetes de inserción en el genoma de *N. crassa* durante la transformación. Las observaciones de las cepas transformantes seleccionadas mediante microscopía confocal de escaneo con láser permitieron el análisis de la localización y trayectoria de estas enzimas marcadas con GFP a niveles cercanos a los propios de las proteínas en cuestión. En el estudio se incluyeron ensayos con la sonda fluorescente (FM4-64) y el inhibidor de la ruta retículo endoplasmático-Golgi (Brefeldina A, BFA) con la finalidad de definir la localización y ruta de secreción de CHS-1-GFP.

Palabras clave: Quitina sintetasa, GFP, Pared celular, *Neurospora crassa*

ABSTRACT of the thesis presented by **Eddy Francisco Sánchez León-Hing**, as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. August 2007.

CHITIN SYNTHASE 1 “CHS-1” LOCALIZATION IN *Neurospora crassa* GROWING HYPHAE

Chitin is the major structural constituent of the cell wall of filamentous fungi, and is composed of N-acetylglucosamine β -1,4-linked monomers. Chitin biosynthesis is accomplished through the catalyzing action of a group of enzymes named Chitin Synthases (CHS). Despite the accepted role of Chitin Synthases in cell wall assembly, a highly polarized process, it is not well understood how these enzymes are transported from their sites of synthesis en route to the highly active hyphal apex. At present about seven CHS genes have been reported in the filamentous fungus *Neurospora crassa*: *chs1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *chs5*, *chs6* and *chs7*. In this research we fused the green fluorescent protein (*gfp*) with a class III CHS gene, *chs1*, attempting to visualize and analyze vesicles containing CHS-1-GFP in *Neurospora* growing hyphae. The gene fusions were expressed under the control of the native *chs1* promoter or a strong promoter (*ccg1*). *N. crassa* strains FGSC#9717 (*delta mus-51::bar+; his-3*) and *N. crassa* FGSC#9718 (*delta mus-51::bar+*) deficient in NHEJ (non-homologous end joining) were used as host strains for transformation given their high frequency of homologous recombination when exogenous DNA is introduced. Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) observations of transformed selected strains allowed the analysis of the cellular localization and tracking the traffic of fluorescent particles labeled with GFP, at their native protein expression level. An endocytic fluorescent probe (FM4-64) and an inhibitor that interferes with ER-Golgi vesicle traffic (Brefeldin A, BFA) were utilized to investigate the secretory route of CHS-1-GFP.

Keywords: Chitin synthase, GFP, Cell wall, *Neurospora crassa*.

A mis hijos, Isaac y Samantha...

Agradecimientos

La culminación de este proyecto de dos años no fue solamente el esfuerzo en las largas horas en tiempo de estudio y trabajo de laboratorio, sino también el sacrificio de tiempo con mi esposa, mis hijos, hermanos, padres y amigos. Asimismo detrás de este proyecto estuvo el esfuerzo y sacrificio económico de familiares, amigos e instituciones quienes tuvieron la fe de invertir en un sueño quizás ajeno. Es difícil escalar, luchar por alcanzar una meta, y mantenerse con perseverancia cuando se está completamente sólo. Pero cuando detrás y a lado de ti están siempre las personas idoneas, alcanzar tus sueños se vuelve una aventura divertida, agradable y excitante a pesar de que siempre existan en el camino obstáculos, fracasos y problemas. Por eso deseo agradecer a Mavi, mi compañera, amiga y esposa por su apoyo, palabras de aliento y ánimo que me ayudaron a culminar con éxito este proyecto. También a mis pequeños, Isaac y Samantha, por su paciencia al tener poco tiempo con papá para jugar. De igual forma agradezco a mis padres, compañeros claves e incansables, de quienes siempre recibí palabras de aliento y de victoria y cuyo apoyo emocional y económico fueron piezas fundamentales para empezar y acabar este sueño. Agradezco a mi amigos quienes siempre estuvieron a mi lado dándome su apoyo y palabras de ánimo para seguir con denuedo mi carrera. Agradezco a mis hermanos, Danny y Santi, por estar siempre a mi lado para ofrecerme su apoyo incondicional. De igual forma agradezco a mis suegros y mi cuñado quienes me apoyaron sin interés alguno. Agradezco también a mi mentora y directora de tesis, la Dra. Meritxell Riquelme por su sabia dirección, su apoyo intelectual y económico en este proyecto, pero sobre todo por haber tenido fe en mí para involucrarme en sus proyectos de investigación en la fascinante línea de la Biología Celular de los hongos filamentosos. Agradezco también a mi comité de tesis que con paciencia y dedicación orientaron mi trabajo para llevarlo a la excelencia. Agradezco al CICESE y CONACYT, por su arduo trabajo y ahínco como instituciones dedicadas a promover la investigación científica y desarrollar elementos valiosos para la sociedad. Agradezco a México por abrirme sus puertas y permitirme vivir en él y gozar de sus beneficios y bondades a pesar de ser extranjero. Finalmente y de manera muy especial quiero agradecer a mi Señor y Salvador Jesucristo quien ha puesto delante de mí todo lo necesario para triunfar en lo profesional, personal y espiritual. A Él doy la honra y la gloria por haber derramado su gracia sobre mi vida y haberla levantado para cosas mucho mejores que yo ni siquiera había pensado ni imaginado. Gracias, por siempre gracias a Él.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
<i>I.1. La Pared Celular Fúngica</i>	1
I.1.1. Características y Composición	1
I.1.2. La Quitina	2
<i>I.2. Biosíntesis de la Pared Celular</i>	3
I.2.1. Crecimiento Apical y el Spitzenkörper	3
<i>I.3. Quitina Sintetasas</i>	5
I.3.1. Características generales	5
I.3.2. Estructura Molecular de Quitina Sintetasas	7
I.3.3. Las Familias de Quitina Sintetasas	8
I.3.4. Localización Subcelular de Quitina Sintetasas	9
I.3.5. Ruta de Secreción de Quitina Sintetasas	10
II. ANTECEDENTES	12
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. IMPACTO	17
V. Hipótesis	18
<i>V. 1. Objetivo general</i>	18
<i>V. 2. Objetivos específicos</i>	18
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	19
<i>VII. 1. Cepas, Medios y Condiciones de Cultivo</i>	19
<i>VII. 2. Clonación y Construcción de Plásmidos</i>	21
VII. 2. 1. Extracción de ADN	21
VII. 2. 2. Diseño de Oligonucleótidos	22
VII. 2. 3. Amplificación de Fragmentos de ADN	25
VII. 2. 4. Construcción del Plásmido pESL01-1	26
VII. 2. 5. Construcción del Plásmido pES061-1	29
VII. 2. 6. Construcción del Plásmido pESL02-3	30
<i>VII. 3. Secuenciación en Vector Recombinante pESL01-1</i>	31
<i>VII. 4. Transformación y Selección de Transformantes</i>	32
VII. 4. 1. Preparación de Conidias	32
VII. 4. 2. Digestiones y Electroporación	33

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII. 4. 3. Selección de Transformantes	34
VII. 4. 4. Obtención de Cepas Monocariontes	35
VII. 4. 5. Mediciones de Crecimiento	36
<i>VII. 5. Microscopía Confocal y Procesamiento de Imágenes</i>	37
VII. 5. 1. Ensayos con Sonda Fluorescente	37
VII. 5. 2. Ensayos con Inhibidor	38
<i>VII. 6. Análisis de Integraciones</i>	39
VII. 6. 1. Comprobación de Integración por PCR	39
VII. 6. 2. Southern Blot	39
VIII. RESULTADOS	44
<i>VIII. 1. Obtención de Vectores Recombinantes</i>	44
VIII. 1. 1. pESL01-1: <i>Pccg1-chs1-sgfp</i>	44
VIII. 1. 2. pESL02-3: <i>chs1-sgfp-hph-3'flan chs1</i>	46
<i>VIII. 2. Obtención y Selección de Transformantes</i>	49
VIII. 2. 1. Transformantes con el Vector Recombinante pESL01-1	49
VIII. 2. 2. Transformantes con el Vector Recombinante pESL02-3	50
<i>VIII. 3. Comprobación de Integraciones</i>	51
VIII. 3. 1. Determinación de Integraciones por PCR en TES1-15	51
VIII. 3. 2. Determinación de Integraciones por Southern blot	52
<i>VIII. 4. Crecimiento de Transformantes</i>	55
VIII. 4. 1. Crecimiento Radial de Colonia	55
VIII. 4. 2. Crecimiento Hifal de Transformantes	57
<i>VIII. 5. Microscopía de Transformantes</i>	58
VIII. 5. 1. Localización de CHS-1-GFP en el Spk	58
VIII. 5. 2. Diámetro y Área del Spk	62
VIII. 5. 3. Localización de CHS-1-GFP en la Hifa	64
VIII. 5. 4. Localización de CHS-1-GFP en Septos	70
VIII. 5. 5. Marcaje de Transformantes con FM4-64	72
VIII. 5. 6. Efecto de BFA en Transformantes	76
IX. DISCUSIÓN	80
X. CONCLUSIONES	87
XI. LITERATURA CITADA	88

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Plásmido pMF272: En el diagrama: 3'flan región his-3 (región 3'flanqueante del locus his-3), prom ccg-1 (Promotor fuerte), SGFP (gen variante Proteína Verde Fluorescente), 5'trunc his (región de complementación de mutación en his-3) (Modificado de Freitag et al., 2004)	29
2	Plásmido pMF357: En el diagrama: Pccg-1 (Promotor fuerte), H1 (gen de la histona H1), egfp (variante Proteína Verde Fluorescente), hph (gen de resistencia a la higromicina), Amp-R (gen de resistencia a la ampicilina)	31
3	Plataforma de Transferencia de ADN del gel a la membrana.	43
4	Diagrama de componentes involucrados en la inmuno y quimiodetección, para identificar bandas de ADN en la membrana en la prueba de Southern blot.	43
5	Electroforesis en gel de agarosa con las bandas correspondientes al gen <i>chs1</i> en cada carril, amplificado con la polimerasa de alta fidelidad Platinum® HIFI ADN Polimerasa (Invitrogen®) (A). Fragmento correspondiente al vector pMF272 digerido con las enzimas de restricción <i>Xba</i> I y <i>Pac</i> I (B). Bandas del gen <i>chs1</i> en dos cepas de <i>E. coli</i> obtenidas por PCR de colonia (C). Imagen de bandas de ADN del marcador Lambda digerido con las enzimas <i>EcoR</i> I y <i>Hind</i> III indicando su tamaño en bp (D). Diagrama del vector diseñado pESL01-1 con la fusión <i>Pccg1-chs1-gfp</i> (E).	45
6	Electroforesis en gel de agarosa con la banda (carril 1) correspondiente al fragmento 3'flanqueante del gen <i>chs1</i> , amplificado con la polimerasa de alta fidelidad Platinum® HIFI ADN Polimerasa (Invitrogen®) (A). Bandas de cada carril (1 y 2) fueron obtenidas del producto de digestión del vector pMF357 con las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Pst</i> I (B).	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
7	Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonia de 20 cepas de <i>E. coli</i> transformadas con el vector pES061-1 [Cada banda 1-4 corresponde al resultado de 5 colonias] (A). Bandas obtenidas del producto de la digestión del vector pESL01-1 con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Pac</i> I (B). Bandas obtenidas del producto de la digestión del vector pES061-1 con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Pac</i> I (C). Diagrama del vector pES061-1 con la región 3'flanqueante de <i>chs1</i> (D). Diagrama del vector diseñado pESL02-3 con la fusión: <i>chs1-gfp-hph-región flanq. 3'</i> (E).	48
8	Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonia de 20 cepas de <i>E. coli</i> transformadas con el vector pESL02-3 [Cada banda 1-4 corresponde al resultado de 5 colonias] (A). Bandas en carril 3 obtenidas del producto de la digestión del vector pESL02-3 con las enzimas <i>Kpn</i> I (B).	49
9	Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pESL01-1 linearizado con <i>Ssp</i> I [Bandas 1 y 2] (A). Conidias de la cepa TES1-15 transformadas por electroporación con el vector pESL01-1. Esta imagen se obtuvo con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META y lente objetivo Neofluar 100X, N.A. 1.3 (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany) (B) Escala: 10µm.	50
10	Imágenes de conidias transformadas con el vector pESL02-3. Esta imagen se obtuvo con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META y lente objetivo Neofluar 100X, N.A. 1.3 (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany). Escala: 10µm.	51
11	Diagrama de los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos en el ADN de la cepa TES1-15 (A). Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de ADN de la cepa transformante TES1-15, utilizando los oligonucleótidos Mrp10-Mrp11 [carril 1] y Mrp12-Mrp13 [carril 2] (B).	52
12	Diagrama de los sitios de corte de la enzima <i>Bam</i> H I en el locus del gen <i>chs1</i> en las cepas transformantes y control de <i>N. crassa</i> . Los fragmentos esperados para cada cepa corresponden a los respectivos diagramas: NES1-15 (A y B), <i>N. crassa</i> FGSC#9717 (A), NES2-11 (C) <i>N. crassa</i> FGSC#9718 (A).	54

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Placa fotográfica con las bandas obtenidas por Southern Blot correspondiente a los fragmentos liberados por digestión con la enzima <i>BamH</i> I a partir de ADN genómico de cada una de las cepas. Los resultados del carril 0 pertenecen a la cepa NES1-15, carril 1 a la cepa <i>N. crassa</i> FGSC#9717, carril 2 a la cepa NES2-11 y carril 3 a la cepa <i>N. crassa</i> FGSC#9718.	55
14	Crecimiento radial de colonia en caja petri de las distintas cepas transformadas y control. Las mediciones se realizaron utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).	56
15	Crecimiento individual de las hifas de las cepas transformadas y cepas control. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).	58
16	Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15, NES1-15, TES2-11 y NES2-11. Todas las imágenes muestran partículas fluorescentes de distintos tamaños en la región subapical (flechas blancas) y muy concentradas en el Spk (flechas rojas). La figura 16F demuestra la co-localización del Spk a través del traslape de la imagen de contraste de fases y la imagen confocal fluorescente. La fluorescencia muy cercana a la membrana plasmática se indica con la flecha amarilla. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5µm.	60-61
17	Diámetro del área correspondiente al marcaje con la proteína CHS-1-GFP. En la región correspondiente al Spk de las cepas transformantes. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza (I).	63

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
18	Área correspondiente al marcaje con la proteína CHS-1-GFP en la región correspondiente al Spk de las cepas transformantes. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza (I).	64
19	Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15 (A) y NES1-15 (B). Las hifas de ambas imágenes muestran partículas fluorescentes de variado tamaño en las regiones subapicales de las hifas. Nótese la mayor abundancia de partículas en la transformante NES1-15. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5µm.	66
20	Imágenes confocales en serie de tiempo de una hifa de la cepa transformante TES1-15 mostrando una partícula o grupo de partículas fluorescentes (flecha blanca) muy cercano a los núcleos (flecha roja) en una misma hifa [Figura A: 6.04seg; B:12.1seg; C: 60.4seg; D:66.5seg]. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5µm.	67
21	Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15 y TES2-11. Se puede apreciar en ambas transformantes fluorescencia (flechas blancas) alrededor de los núcleos (espacios en negro) de manera discontinua. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5µm.	68
22	Imágenes confocales de las cepas transformantes TES2-11 (A) y TES1-15 (B). En la imagen 17A se puede apreciar en la cepa transformante TES2-11 la presencia de fluorescencia en estructuras alargadas a lo largo de la hifa. En la imagen 17B se puede ver además de septos marcados, cuerpos esféricos tipo vacuolas en las hifas. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5µm	69

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23	Imágenes confocales de la cepa transformante TES1-15. La imagen 23A corresponde a una región de formación de septos. Nótese la gran acumulación de fluorescencia (flechas blancas) en la zona donde se dará lugar a la formación del septo. La imagen 23B corresponde a una imagen en 3D formada con 10 rebanadas ópticas de 1.01 μ m. Nótese la fluorescencia muy marcada en septos recién formados. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m	71
24	Imágenes confocales en serie de tiempo de la cepa transformante TES2-11. Las imágenes fueron tomadas en una región no muy lejos del ápice de la hifa, donde ocurre normalmente la formación de septos. Nótese la gran acumulación de partículas fluorescentes en la zona de iniciación del septo y cómo esta concentración de proteínas sigue un curso uniforme en dirección y forma. Tiempo aproximado de formación del septo en esta hifa fue de 6.5 minutos. [Tiempo, Figura A: 0seg; B: 97seg; C: 207seg; D: 268seg; E: 305seg; F: 390seg]. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m.	72
25	Área correspondiente a las vesículas marcadas con la proteína CHS-1-GFP en la región del Spk de las cepas transformantes comparada con el área marcada en el Spk con la sonda fluorescente FM4-64 (25 μ M). Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza al 95%(I).	74
26	Imágenes confocales con la cepa transformante TES1-15 tratadas con la sonda fluorescente FM4-64 (25 μ M). Nótese la co-localización de la CHS-1-GFP con FM4-64 en el Spk (A), en septos previamente formados (B-D) y en septos en formación (E-G). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m	75

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
27	<p>Todas las imágenes muestran el efecto del inhibidor BFA (100µg/ml) sobre las hifas de las cepas transformantes. Nótese en las imágenes la acumulación excesiva de fluorescencia (A-C). Observe el efecto de la BFA en el incremento de tamaño del Spk (B). En la cepa TES2-11 se puede observar CHS-1-GFP dispersa y distribuida en parches de gran tamaño. El inhibidor fue aplicado sobre la zona de extensión del micelio de forma directa. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: A,D: 5µm; B: 2µm</p>	77
28	<p>Imágenes en bajo aumento de la cepa transformante TES1-15 antes (A) y después (B) del tratamiento con el inhibidor (BFA, 100µg/ml). Nótese la diferencia en la morfología de las regiones apicales entre las dos imágenes. En el recuadro de la imagen B se puede observar un aumento donde la hifa principal se ha ramificado en hifas más cortas. Las imágenes fueron obtenidas con el estereoscopio SZX12 (Olympus®).</p>	78
29	<p>Área del Spk de cepas transformantes tratadas con BFA (100µg/ml). Las mediciones se realizaron sobre imágenes obtenidas en el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).</p>	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Cepas de <i>Neurospora crassa</i> usadas en este estudio	19
II	Oligonucleótidos usados en este estudio	24
III	Estadísticos De La Tasa De Crecimiento Radial De Colonia	56
IV	Estadísticos de la tasa de crecimiento de hifas individuales	58
V	Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes	62
VI	Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes	74
VII	Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes.	79

I. Introducción

I.1. La Pared Celular Fúngica

I.1.1. Características y Composición

Una de las características particulares de los hongos filamentosos es la capacidad de formar células tubulares o hifas que se extienden mediante crecimiento apical altamente polarizado. Las hifas están en contacto con el medio externo que los rodea mediante una estructura que los envuelve llamada pared celular. Esta estructura confiere características físicas únicas a los hongos como una gran presión de turgencia, crucial en la supervivencia y desarrollo de estos organismos, cuya nutrición depende de la absorción de materia orgánica externa. La fortaleza mecánica de la pared celular es otra particularidad que permite a los hongos adoptar una gran variedad de formas para adaptarse a diversos espacios ecológicos, además de otorgarle el poder de penetración y diseminación del micelio capaz de explotar las formas más recalcitrantes de materia orgánica (Bartnicki-Garcia 1987). Las características químicas de la pared fúngica también proveen de protección a las células contra la radiación ultravioleta, lisis enzimática, solventes orgánicos, sustancias tóxicas y la desecación (Gooday 1995). De manera general la pared celular de los hongos químicamente contiene entre 80 a 90% de polisacáridos, siendo el resto de su composición proteínas y lípidos (Bartnicki-Garcia 1968). El contenido y la proporción de los principales polímeros de la pared celular es variable según el grupo taxonómico de los organismos. Esta característica fue temporalmente utilizada para distinguir entre diferentes grupos de hongos (Bartnicki-Garcia 1968; Gooday 1995). No obstante entre los principales y de mayor abundancia están: la quitina, glucanos con enlace β -(1-3) y β -(1-6), quitosano, celulosa, xilomanoproteínas, galactomanoproteínas, ácido

poliglucurónico, glucuromanoproteínas y polifosfato (Bartnicki-Garcia 1968; Gooday 1995). La quitina en la pared celular fúngica prevalece como una estructura de microfibrillas entreteljadas, embebidas en una matriz amorfa compuesta principalmente de glucanos, mananos, galactanos y heteropolisacáridos (Bartnicki-Garcia 1968). Se han sugerido Distintos modelos respecto a la organización estructural de los diferentes polisacáridos en la pared celular de los hongos, siendo la quitina un componente importante que se encuentra formando enlaces con ella misma y con otros polímeros (Cabib *et al.*, 2001; Fontaine *et al.*, 2000; Hunsley y Burnett 1970). Algunos estudios han estimado que la proporción aproximada de quitina de la pared celular en *S. cerevisiae* es del 1-2% mientras que en hongos filamentosos representa entre el 7 al 20% (Bartnicki-Garcia 1968; Bulawa 1993; Bull 1970; Ruiz-Herrera 1992; Schoffemeer *et al.*, 1999).

I.1.2. La Quitina

La quitina es el segundo biopolímero más diseminado en la naturaleza después de la celulosa y se encuentra en una gran diversidad de invertebrados y hongos. La quitina por sus características químicas y físicas, es un polímero fibroso muy versátil fundamentalmente por su gran estabilidad y fortaleza. Actualmente se conoce que este polisacárido es uno de los principales componentes estructurales de la pared celular de los hongos filamentosos, cutícula del exoesqueleto de artrópodos marinos y terrestres, además forma parte de los tejidos intestinales de algunos insectos (Bartnicki-Garcia 1968; Merzendorfer y Zimoch 2003; Nelson y Cox 2005; Tellam *et al.*, 2000). Químicamente la quitina es un homopolímero lineal compuesto por residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4). La configuración beta (β) de enlace de

los monómeros, le otorga propiedades físicas y estructurales distintas a otros polisacáridos que se encuentran en la naturaleza como el almidón, glucógeno, y dextrano. Al igual que la celulosa, a la quitina por sus características de ensamble, no es posible atribuirle un peso molecular específico. La única diferencia química de la quitina con la celulosa es que la primera posee un grupo amino acetilado en vez de un grupo hidroxilo en el carbono 2 (Nelson y Cox 2005). Los polímeros de quitina tienden a formar microfibrillas extendidas entre 1-3nm de diámetro que son estabilizados por enlaces de hidrógeno formados entre los grupos amino y grupos carbonilos (Bracker *et al.*, 1976; Merzendorfer y Zimoch 2003). En la naturaleza la quitina puede ocurrir en tres diferentes modificaciones cristalinas, llamadas α , β , y γ quitina; que difieren principalmente en el grado de hidratación, en el tamaño y en el número de cadenas de quitina por unidad celular (Kramer y Koga 1986; Rudall y Kenchington 1973). Se conoce también la presencia de estados transitorios no cristalinos de la quitina en sistemas fúngicos (Vermeulen y Wessels 1986). Es posible que la configuración cristalina “ α ” de la quitina sea la que se encuentre en la pared celular de los hongos, debido a que ésta forma enlaces de hidrógeno entre las cadenas antiparalelas de los monómeros de GlcNAc incluyendo los grupos amino, incrementando su capacidad hidrofóbica y previniendo la disolución de cristales de quitina (Blackwell 1982; Lipke y Ovalle 1998).

I. 2. Biosíntesis de la Pared Celular

I.2.1 Crecimiento Apical y El Spitzenkörper

Las células fúngicas para desarrollar un crecimiento altamente polarizado requieren mantener un crecimiento apical a través del suministro finamente orquestado en tiempo,

espacio y cantidad de material orgánico necesario para el crecimiento de la membrana plasmática y la pared celular con todos sus componentes (Gooday 1995). Así pues, para entender como ocurre este proceso es necesario entender como los hongos desarrollan la capacidad de crecimiento apical.

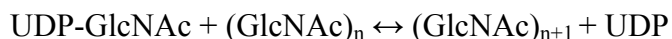
Las hifas poseen un mecanismo de secreción que les permite crear un gradiente polarizado en sus ápices para la formación de la pared celular. La habilidad de organizar espacialmente todos los componentes necesarios para el crecimiento polarizado sugiere que un mecanismo complejo de biosíntesis y transporte se lleva a cabo desde las regiones más distales de la hifa hasta el ápice (Bartnicki-Garcia 2002). Uno de los elementos clave para descifrar el mecanismo del crecimiento hifal es el Spitzenkörper (Spk), un complejo multivesicular que por su posición, composición y comportamiento se cree que funciona como un centro suministrador de vesículas (VSC) para la elongación de la hifa (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989). El Spk o cuerpo apical, fue visualizado por primera vez mediante el uso de Microscopía de Contraste de Fases como una estructura que se localizaba en los ápices de las hifas en crecimiento (Girbardt 1957). Unas de las características que acompañaban la presencia de este cuerpo apical en algunos hongos fueron: 1) la presencia únicamente en ápices de hifas en crecimiento, 2) su formación en sitios de germinación de esporas y formación de ramificaciones, y 3) su localización correlacionaba con su posición y la dirección del crecimiento. Con estas observaciones Girbardt fue el primero en encontrar una relación entre el comportamiento del Spk con la morfogénesis de las hifas. Observaciones posteriores usando Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) caracterizaron la morfología variable del Spk así como la organización ultraestructural en los ápices de las hifas de varias especies fúngicas (Grove y Bracker 1970). Ahora se conoce

que el Spk es un complejo estructural multicomponente dominado por vesículas que se encuentran alrededor de una región central compuesta por una densa red de microfilamentos mas ribosomas (Bourett y Howard 1991; Howard 1981; Roberson y Vargas 1994).

I. 3. Quitina Sintetasas

I. 3. 1. Características Generales

El crecimiento y desarrollo de los hongos filamentosos involucra el proceso de síntesis de pared celular, y en particular del esqueleto microfibrilar compuesto principalmente de quitina. Aunque la quitina es un biopolímero muy importante en la naturaleza el conocimiento acerca de su biosíntesis no está del todo resuelto (Merzendorfer y Zimoch 2003). Actualmente se sabe que la síntesis de quitina es catalizada por medio de enzimas, altamente conservadas, llamadas quitina sintetasas (UDP-*N*-acetil-D-glucosamina: quitina 4- β -*N*-acetilglucosaminiltransferasa), las cuales utilizan UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) como sustrato, adicionando en particular monómeros de GlcNAc a la cadena del polímero (Glaser y Brown 1957). La reacción que catalizan se puede describir de este modo:



Estudios en fracciones microsomales en insectos y crustáceos establecieron la posibilidad de la transferencia de GlcNAc a un lípido como intermediario o aceptor durante el ensamble de quitina, aunque no hay aún suficiente evidencia que sostenga esa afirmación (Merzendorfer y Zimoch 2003). No obstante, en hongos se sabe que no se requiere otro aceptor además del UDP-GlcNAc para iniciar la polimerización de la quitina (McMurrough

y Bartnicki-Garcia 1971). Una de las características comunes de las quitina sintetasas es que su actividad es dependiente de la presencia de los cationes divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+} y es incrementada por proteólisis, lo que sugiere la existencia de formas zimogénicas (Duran *et al.*, 1975; Leal-Morales *et al.*, 1988; Ruiz Herrera *et al.*, 1975). Hasta ahora se sabe que la biosíntesis de fibrillas de quitina la realizan un grupo o familia de isoenzimas que poseen la misma actividad pero que catalizan la formación de quitina probablemente en distintos lugares de la célula y en diferentes tiempos durante el ciclo celular de los hongos. Por esta razón es muy posible encontrar varios genes que codifican para las quitina sintetasas en un mismo organismo (Choquer *et al.*, 2004; Ichinomiya *et al.*, 2005; Roncero 2002; Weber *et al.*, 2006).

Inicialmente el estudio y descripción de las quitina sintetasas comenzó con la levadura *S. cerevisiae* donde se describió por primera vez a mediados de los años 80 el gen *Chs1* (Cabib *et al.*, 1996). Posteriormente se logró identificar un segundo gen, *Chs2*, que codificaba para una proteína con actividad quitina sintetasa en una mutante nula para el gen *Chs1* (Silverman *et al.*, 1988). Aunque ambas enzimas comparten gran homología en la secuencia de aminoácidos, no así en función que varía según el proceso de formación de estructuras de división celular (Roncero 2002). A la proteína *ScChs1p* se le atribuye actividad quitina sintetasa durante la reparación de la pared celular durante la citocinesis (Cabib *et al.*, 1989), mientras que la *ScChs2p* está involucrada en la síntesis de quitina para la formación del septo primario (Silverman *et al.*, 1988). Finalmente estudios con mutantes resistentes a “calcofluor white”, una sonda fluorescente para marcar quitina en las células, y con mutantes deficientes en la síntesis de quitina en vivo permitieron identificar una

proteína adicional con actividad quitina sintetasa, pero de baja homología respecto a las otras dos quitinas sintetasas descritas (Roncero 2002). Esta última quitina sintetasa, la *ScChs3p*, es responsable de la síntesis del 90% de la quitina celular (Valdivieso *et al.*, 1991), y se caracteriza por depositar quitina a manera de anillo en la base de la yema emergente, que finalmente es retenida por la célula parental después de la citocinesis. Aunque se sabe también que deposita quitina en menor proporción alrededor de la pared celular (Shaw *et al.*, 1991).

I. 3. 2 Estructura Molecular de Quitina Sintetasas

Alineamientos para elucidar relaciones filogenéticas entre las quitina sintetasas fúngicas demuestran que existen hasta ahora reportadas 7 clases de quitina sintetasas, todas con el sub-dominio catalítico conservado 2 (pfam03142) (Mandel *et al.*, 2006). A partir de la homología de esta región se genera una divergencia en la homología de las secuencias generando de esta forma dos familias o divisiones: la división 1 se caracteriza por poseer un carboxilo terminal hidrofóbico y el sub-dominio catalítico conservado 1 (pfam01644) rodeado de una región amino terminal hidrofílica, mientras que la división 2 posee un dominio catalítico precedido por un dominio de unión tipo citocromo-b5 (pfam00173). Dentro de la división 1 encontramos las clases I, II y III. En la división 2 encontramos las clases IV, V y VII. Las dos últimas clases mantienen una región conservada del tipo miosina motora en su extremo amino terminal (Fujiwara *et al.*, 1997). Las quitina sintetasas de clase VI no mantienen ninguna homología con las divisiones mencionadas anteriormente (Choquer *et al.*, 2004; Mandel *et al.*, 2006). Algunos autores han sugerido que las relaciones entre las diferentes clases de quitina sintetasas y sus dominios estructurales

podrían ser útiles como referencia para la caracterización funcional de las quitina sintetasas (Mandel *et al.*, 2006).

I. 3. 3. Las Familias de Quitina Sintetasas

Diversos estudios han reportado la identificación de genes de diferentes clases de quitina sintetasas en algunas especies de hongos filamentosos como: *Aspergillus fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005), *A. nidulans* (Fujiwara *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1994; Takeshita *et al.*, 2006; Yanai *et al.*, 1994), *Botrytis cinerea* (Choquer *et al.*, 2004), *Candida albicans* (Au-Young y Robbins 1990; Chen-Wu *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1998; Sudoh *et al.*, 1993), *Coccidioides posadasii* (Mandel *et al.*, 2006), *Fusarium oxysporum* (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Udíroz *et al.*, 2004), *S. cerevisiae* (Bulawa 1992; Bulawa *et al.*, 1986; Silverman 1989), *Ustilago maydis* (Kamper *et al.*, 2006; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997), *Wangiella dermatitidis* (Liu *et al.*, 2004; Wang y Szaniszló 2000; Wang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2006). En *N. crassa* se han identificado 7 genes que codifican para las proteínas encargadas de la síntesis de quitina (Galagan *et al.*, 2003) y sólo algunas de ellas han sido caracterizadas funcionalmente (Yarden y Yanofsky 1991). Mediante técnicas de biología molecular se ha logrado obtener mutaciones de un gen específico o controlar la expresión de proteínas por medio del uso de promotores inducibles para observar las distintas características fenotípicas y deducir de esta manera la función de cada proteína o su interacción con otras quitina sintetasas (Horiuchi *et al.*, 1999; Ichinomiya *et al.*, 2005; Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Motoyama *et al.*, 1997; Yarden y Yanofsky 1991). La diversidad de quitina sintetasas en un solo organismo sugiere la importancia fisiológica de estas proteínas durante la

formación de pared celular, siendo muchas de ellas esenciales para la supervivencia (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). La diversidad también sugiere la posibilidad de encontrar distintas formas de regulación para cada una de las enzimas variando no sólo la localización de su actividad sino la expresión en etapas específicas del ciclo de vida o ciclo celular. Es interesante que las quitina sintetasas de clase III tienen la particularidad de encontrarse únicamente en hongos filamentosos mas no en levaduras como lo hacen algunas otras clases de estas isoenzimas (Roncero 2002). Estudios anteriores revelan que la interrupción de la expresión del gen *chsI* (Clase III) en *N. crassa* provoca aberraciones morfológicas como crecimiento radial lento, ramificaciones abundantes y cortas, y alteraciones en la dirección del crecimiento aunque se consideró como no esencial para el organismo (Yarden y Yanofsky 1991). En el fitopatógeno *U. maydis* la mutación de la quitina sintetasa de clase III, no provocó ningún efecto fenotípico apreciable (Weber *et al.*, 2006). Mientras que en estudios con *A. nidulans* la proteína homóloga a éstas, la *ChsB* tiene participación en el crecimiento normal de la hifa y posee interacciones importantes con la *ChsD* de clase (IV) (Ichinomiya *et al.*, 2002). Aunque las proteínas de clase III presentan gran homología en sus secuencias de aminoácidos, no es posible realizar un consenso sobre su funcionalidad total en las distintas especies de hongos filamentosos.

I. 3. 4. Localización Subcelular de Quitina Sintetasas

Actualmente numerosas investigaciones han reportado la existencia de dos poblaciones vesiculares en el Spk, una de vesículas de mayor tamaño llamadas vesículas apicales y una población de vesículas de menor tamaño llamadas microvesículas. Con el objetivo de identificar la localización de las quitina sintetasas en hongos filamentosos, se

logró demostrar la presencia de partículas o gránulos (<100 nm de diámetro) obtenidos de homogenizados de *Mucor rouxii*, que expuestos a un activador y un sustrato formaban de una a dos microfibrillas de quitina *in vitro* (Bracker *et al.*, 1976). Posteriormente los mismos autores lograron caracterizar e identificar por microscopía electrónica estas partículas acuñándoles el nombre de “quitosomas”. Morfológicamente las partículas se describieron como diminutos organelos membranosos esféricos (de 40 a 70nm de diámetro) de estructura compleja y apariencia variable durante el proceso de síntesis de fibrillas de quitina (fibrilogénesis) *in vitro* (Bracker *et al.*, 1976). A finales de 1980 aplicando técnicas de sedimentación por velocidad y por gradientes de densidad se logró aislar de extractos de homogenizado celular de *S. cerevisiae* de manera refinada organelos membranosos con actividad quitina sintetasa. La quitina sintetasa zimogénica se aisló en la primera sedimentación isopícnica a 265,000 x g por 21 horas con rotores de alta eficiencia, en dos fracciones. En la primera se aislaron microvesículas de un promedio de 61nm de diámetro y densidad de 1.15g/cm³ correspondiente a los quitosomas, mientras que en la otra fracción se obtuvieron vesículas de promedio de 252nm de diámetro y densidad de 1.22g/cm³ que correspondían a la membrana plasmática (Leal-Morales *et al.*, 1988). Además, un estudio de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales de quitina sintetasa en el hongo filamentoso *N. crassa* reveló por MET que las microvesículas membranosas observadas en el Spk correspondían a los quitosomas (Sietsma *et al.*, 1996). Los quitosomas del Spk se organizan en una región central abundante en microfilamentos de actina cuya formación parece estar regulada por el complejo multiprotéico descrito en levaduras denominado polarisoma (Harris y Momany 2004; Knechtle *et al.*, 2003; Sagot *et al.*, 2002; Sharpless y Harris 2002). Por las características ya mencionadas, algunos autores

sostienen de manera convincente que los quitosomas son los contenedores para el transporte de las enzimas quitina sintetasas hacia la superficie celular para la formación de pared celular de los hongos filamentosos (Bracker *et al.*, 1976).

I. 3. 5. Ruta de Secreción de Quitina Sintetasas

La formación de la pared celular de los hongos filamentosos es el resultado de un proceso de secreción polarizado que ocurre durante el crecimiento apical de las hifas (Bartnicki-Garcia 2002). La biosíntesis de esta ocurre principalmente en tres sitios: el citoplasma, la membrana plasmática y la pared misma. Los polímeros estructurales como la quitina y los β -(1-3) y β -(1-6) glucanos son sintetizados vectorialmente en la membrana plasmática, por sintetasas transmembranales, mientras que los componentes de la matriz amorfa de la pared son sintetizados en el citosol (Gooday 1995). El ensamble de la pared involucra actividades de enlace entre los polímeros y modificaciones de deacetilación de la quitina (Bulawa 1993).

Para poder entender como los hongos establecen el gradiente polarizado de formación de pared en el ápice de las hifas, es necesario saber cómo y dónde los quitosomas o microvesículas (transportadores de las enzimas formadores de la quitina) son llevadas desde los lugares de síntesis hasta los sitios de crecimiento activo de la pared de los hongos. Hasta ahora la evidencia estructural y bioquímica ha demostrado: 1) La estructura membranosa de los quitosomas observadas en *M. rouxii* es más delgada que la membrana plasmática (Leal-Morales *et al.*, 1988); 2) La naturaleza zimogénica casi total de los quitosomas de cinco géneros de hongos (McMurrough y Bartnicki-Garcia 1971); 3) El requerimiento constante de quitina sintetasas en los ápices de hifas en crecimiento (Bulawa

1993); 4) Además se ha observado la capacidad de autoensamble de subunidades 16S, las cuales se han reportado como las estructuras membranosas vesiculares más pequeñas (7-12nm de diámetro, ~500kDa) con actividad quitina sintetasa (De Lucca y Walsh 1999; Letscher-Bru y Herbrecht 2003; Odds *et al.*, 2003). Todo ello hace que algunos autores sugieran que las quitinas sintetasa siguen una ruta de secreción distinta a la de retículo endoplasmático-Golgi-vesículas. Las células eucarióticas poseen un sistema membranal interno que les permite regular y surtir proteínas recién sintetizadas hacia distintos destinos dentro de la célula. La ruta convencional de secreción utiliza este sistema endomembranal donde proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático son transportadas por medio de vesículas hacia el aparato de Golgi, donde sufren cambios para finalmente ser transportadas nuevamente por vesículas hacia la membrana plasmática o al exterior de la célula (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2003). No obstante, se sabe que existen formas de secreción de proteínas distintas a la ruta de secreción convencional, las cuales no requieren pasar por el sistema endomembranal retículo endoplasmático-Golgi (Nickel 2005).

II. Antecedentes

Uno de los marcadores moleculares más usados en la actualidad para el seguimiento y análisis de proteínas en organismos vivos ha sido la proteína verde fluorescente (GFP). El éxito notable alcanzado por esta molécula reportera se atribuye a su pequeño tamaño de 238 amino ácidos (27-kDa) y a su capacidad de excitación cuando es irradiada con luz UV y 475nm, emitiendo fluorescencia a una longitud de onda de 508nm. Se ha observado que la GFP es resistente a proteasas, posee una fluorescencia óptima a pH 7.2-8 (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998), y se puede cuantificar por fluorimetría (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998;

Freitag *et al.*, 2004; Lorang *et al.*, 2001; Suelmann *et al.*, 1997). Otros factores que han llevado al uso frecuente de la GFP para analizar la localización de proteínas han sido las complicaciones causadas cuando se usa otro tipo de técnicas que provocan la destrucción de material celular durante la preparación y fijación de muestras, permeabilización celular por sustratos, y muerte celular. La GFP es extremadamente estable en estudios *in vivo* y puede fusionarse tanto en el extremo carboxilo terminal como en el amino terminal sin que la proteína en estudio pierda su actividad. Por lo tanto el marcaje de proteínas con la GFP es útil no sólo para el análisis de la regulación de genes, localización de proteínas o marcaje de organelos específicos sino en el importante estudio de la dinámica celular en organismos eucariotas (Spellig *et al.*, 1996). El primer estudio reportado con fusiones de proteínas con GFP se realizó con el hongo filamentoso *U. maydis* (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998; Suelmann *et al.*, 1997), seguido por *A. nidulans* (Vanden Wymelenberg *et al.*, 1997) y *Aureobasidium pullulans* (Lorang *et al.*, 2001). Actualmente hay reportes de estudios que han usado GFP en más de 16 especies fúngicas (Prasher 1992).

Originalmente la GFP se obtuvo de la cepa silvestre de la medusa *Aequorea victoria*, siendo Prasher (Lugones *et al.*, 1999) quien clonó el gen por primera vez. No obstante, para el desarrollo de estudios con otras especies se encontró la necesidad de crear variantes de la GFP por problemas en la eficiencia de traducción proteica. A partir de la GFP de *A. victoria* se obtuvieron las variantes SGFP, YEGFP y EGFP1, las cuales contienen una substitución de la treonina 65 por una serina, confiriendo mayor fluorescencia, solubilidad, reducción en el fotoblanqueado y un cambio en la excitación de la molécula de 395nm y 470nm a 488nm. SGFP es la variante de GFP más usada para transformaciones de hongos filamentosos. Sin embargo, la variante EGFP1 se ha utilizado

con éxito en *A. flavus*, *A. pullulans*, *Magnaporthe grisea* y *Podospora anserina* (Cormack *et al.*, 1997). La eficiencia en el uso de YEGFP se ha demostrado en estudios realizados en el hongo dimórfico *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997). En *N. crassa*, en cambio se ha logrado usar exitosamente la variante SGFP para analizar la dinámica, función y organización, de núcleos y microtúbulos (Freitag *et al.*, 2004). Todos estos estudios demuestran la utilidad y eficacia del uso de la GFP como una herramienta molecular para visualizar, en tiempo real o *in vivo*, estructuras subcelulares y organelos.

Recientemente se ha reportado la localización por primera ocasión de dos quitina sintetasas fusionadas con SGFP en el Spk, la *chs3* (Clase I) y *chs6* (Clase VI) en hifas en crecimiento de *N. crassa* (Riquelme Pérez *et al.*, 2007). En *A. nidulans* la quitina sintetasa CsmA (Clase V), por medio de inmunofluorescencia indirecta, se ha observado cerca de estructuras de actina, específicamente en la superficie citosólica de la membrana plasmática en los ápices de las hifas (Takeshita *et al.*, 2005). También se detectó que la misma proteína localizaba en sitios de septación. Una de las desventajas de las técnicas de inmunofluorescencia es la muerte celular causada por la fijación de la muestra y por consecuencia los resultados obtenidos son de localizaciones puntuales de la proteína impidiendo realizar observaciones *in vivo* del tráfico o dinámica de las vesículas que contienen dicha proteína. Mediante el uso de la proteína SGFP para analizar el modo de expresión de la quitina sintetasa *ChsE* (Clase IV) de *A. nidulans* se demostró que esta proteína se expresa considerablemente durante las etapas tardías del crecimiento vegetativo y durante el proceso de diferenciación asexual, lo cual contribuye con la formación de la pared celular de micelio vegetativo, conidióforos y conidias (Lee *et al.*, 2005). Hasta el

momento, sólo los estudios realizados por Riquelme et al. (2007) han presentado evidencia con resultados *in vivo* de la localización de dos quitina sintetetasas fusionadas con SGFP en *N. crassa*, CHS-3-GFP y CHS-6-GFP. Sin embargo estas fusiones se expresan bajo el control del promotor fuerte *ccg1*, en cepas de *N. crassa* que tienen el gen nativo intacto. Algunas investigaciones se han llevado a cabo para dilucidar el rol y la localización celular de las quitinas sintetetasas de clase III en varias especies de hongos (Ichinomiya *et al.*, 2002; Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Mellado *et al.*, 1996; Yarden y Yanofsky 1991). En *N. crassa*, por ejemplo, la inactivación del gen *chs1*, provocó defectos morfológicos y un patrón de crecimiento anormal. Evidencia de conidiación escasa, micelio poco abundante, ápices deteriorados, hifas con secciones hinchadas, crecimiento lento, y reducción de la actividad quitina sintetasa, fueron rasgos comunes en las cepas con la mutación del gen *chs1* (Yarden y Yanofsky 1991). La relevancia funcional de *chsB* de clase III, en el crecimiento de las hifas de *A. nidulans* se demostró por las anomalías que se presentaron en mutantes nulas para esta proteína (Yanai *et al.*, 1994). De igual modo, la cepa mutante simple *chsG* y doble *chsC chsG* ambas quitina sintetetasas de clase III en el hongo patógeno de humanos *A. fumigatus*, manifestaron defectos fenotípicos en el crecimiento, ramificación y en la densidad de conidióforos (Mellado *et al.*, 1996). No obstante, ninguno de los estudios anteriormente realizados describe la localización a nivel intracelular de esta clase de proteínas. Hasta ahora no han sido exitosos los intentos para visualizar la localización intracelular de la proteína de clase III por reemplazamiento endógeno del gen *Umchs1* con la fusión *chs1-gfp* en el hongo dimórfico fitopatógeno *U. maydis*, debido a los bajos niveles de expresión génica (Weber *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo de investigación fue caracterizar la localización subcelular in vivo de la proteína CHS-1 (Clase III) de *N. crassa* por medio del uso de técnicas de biología molecular y microscopía confocal de barrido de láser. Hasta ahora no existe un estudio reportado sobre la localización celular in vivo de esta proteína en esta especie fúngica. Además se registra por primera vez en esta especie fúngica la expresión de una fusión con GFP por medio de la estrategia denominada “knock in” que provoca el reemplazamiento por recombinación homóloga del gen nativo con la fusión, bajo el control del promotor nativo.

III. Justificación

La importancia de este trabajo de investigación es incrementar el conocimiento a nivel celular de una de las etapas del proceso de formación del esqueleto microfibrilar de quitina, una de las estructuras de la pared celular más importantes en los hongos filamentosos. Debido a la presencia de varias isoenzimas “quitina sintetasas” que participan en la síntesis de quitina dentro de un mismo organismo en los hongos filamentosos, es importante conocer la expresión espacio-temporal de cada una de ellas, información clave para la caracterización funcional de las quitina sintetasas y el entendimiento del rol de cada una ellas en la morfogénesis fúngica. Otro aspecto importante de este trabajo sería la elucidación de nuevos mecanismos de secreción celular incrementando el conocimiento general en la biología celular de los hongos. Dentro de los hongos filamentosos están representados los organismos patógenos más devastadores y perjudiciales de cultivos agrícolas (Agrios 1997), además representan una amenaza para la vida de pacientes inmunocomprometidos (Walsh *et al.*, 2004). La importancia en el

conocimiento de la biología celular de hongos filamentosos no sólo se enfoca al área de fitopatología o biomédica, sino al área industrial donde estos organismos generan billones de dólares en productos biotecnológicos (Wainright 1992).

IV. Impacto

Desde los años 1970s se ha estado incrementado la investigación dirigida al descubrimiento de antifúngicos noveles debido al gran número de casos de enfermedades causadas por hongos asociados con el SIDA y la alta frecuencia de micosis fatales causadas por el uso intenso de medicamentos y terapias inmunosupresoras, trasplante de órganos, y nuevas tecnologías en cirugía. A pesar de que se han descubierto algunos nuevos compuestos, el desarrollo y descubrimiento de compuestos antifúngicos ha sido muy lento. Por ejemplo seis de los agentes descubiertos recientemente, que pertenecen al grupo de los triazoles y de las equinocandinas, iniciaron su desarrollo desde los 1980s. Debido a que la lista de especies consideradas como patógenos de humanos y de aquellas que generan resistencia se suma a medida que pasa el tiempo, es importante el desarrollo de nuevos agentes fúngicos de amplio espectro y que no afecten de ninguna forma a células de mamíferos. Para ello es necesario entender muy bien los mecanismos de acción de blancos específicos para el desarrollo efectivo de fármacos noveles. Por ejemplo la síntesis de quitina hasta ahora ha evadido la explotación química, enfatizando la gran distancia que hay entre el descubrimiento de blancos específicos y la creación de nuevas drogas (Odds *et al.*, 2003). La importancia de este trabajo es incrementar el conocimiento respecto al mecanismo de formación de la pared celular de los hongos, información que será útil para el descubrimiento de nuevos blancos para el desarrollo de productos antifúngicos noveles.

V. Hipótesis

- Las quitinas sintetasas de clase III que están involucradas en el proceso de formación de pared celular se localizan en el Spitzenkörper de las hifas de *Neurospora crassa*.

V. 1. Objetivo General

- Determinar la localización celular de la quitina sintetasa de Clase III (CHS1) en hifas maduras en crecimiento de *Neurospora crassa*

V. 2. Objetivos Específicos

- Obtener transformantes de *Neurospora crassa* que expresen el gen que codifica para la quitina sintetasa de clase III fusionado con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de un promotor fuerte.
- Obtener transformantes de *Neurospora crassa* utilizando la estrategia de *knock in* para efectuar el reemplazamiento del gen *chs1* endógeno por una fusión *chs1-gfp* bajo el control de un promotor nativo.
- Analizar comparativamente por medio de Microscopía Confocal de Escaneo con Láser la localización celular estática y dinámica de la proteína en los dos tipos de transformantes.
- Analizar las características de marcaje de la proteína con sondas fluorescentes e inhibidores que afectan el funcionamiento de organelos involucrados en la secreción.

VII. Materiales y Métodos

VII. 1. Cepas, Medios y Condiciones de Cultivo

Las cepas de *Neurospora crassa* que se usaron en este estudio se encuentran en la Tabla I. Todas las cepas de trabajo fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (VMM) (Vogel 1956) solidificado con agar (DIFCO) al 1.5% para mantener la cepa auxótrofa de *N. crassa* FGSC#9717 (Δ *mus-51::bar*⁺; *his-3*; *mat A*), después de esterilizado se adicionó al medio, el aminoácido básico L-histidina a una concentración final de 0.5mg/ml (esterilizado por filtración). Para la selección y conservación de cepas de *N. crassa* FGSC#9718 (Δ *mus-51::bar*⁺; *mat a*) resistentes a la higromicina, se añadió al medio higromicina B (Calbiochem®) a una concentración final de 200µg/ml. Para mantenimiento de cepas a largo plazo se introdujeron en tubos con glicerol estéril al 15% bloques de agar conteniendo micelio y se conservaron a -86°C en un ultracongelador Ultra Low Freezer (Nuair®).

Tabla I. Cepas de *Neurospora crassa* usadas en este estudio

Nombre de Cepa	Genotipo	#FGSC*
Mus51	Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺ ; <i>his-3</i> ; <i>mat A</i>	9717
Mus51	Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺ ; <i>mat a</i>	9718
N1 (74-OR8-1)	<i>mat a</i>	988
N150 (74-OR23-IV)	<i>mat A</i>	9013

* #FGSC: Número de cepa en el Fungal Genetics Stock Center

Para la selección de cepas transformadas de *N. crassa* se utilizó medio VMM-FGS (2% Sales de Vogel, 1% agar, 10% aditivo FGS). El aditivo FGS se preparó con 20% de sorbosa, 0.5% de fructosa y 0.5% de glucosa (todos esterilizados por filtración). Se usó el medio sintético básico de cruzamiento (SCM) bajo en nitrógeno (Westergaard y Mitchell 1942) para inducir la reproducción sexual y aislar ascosporas para obtener monocariontes de las cepas transformadas de *N. crassa*. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos en una autoclave (VWR® Accu Sterilizer AS12).

Para el crecimiento en medio líquido o sólido (1.5% agar bacteriológico Becton Dickinson, Co.) de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen®) se utilizó el medio Luria-Bertani (LB, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% de cloruro de sodio). La obtención de células competentes se realizó a partir de colonias crecidas en una de caja Petri con medio LB sólido. Una colonia aislada se inoculó en un tubo de ensayo con medio LB líquido estéril y se incubó a 37°C con agitación a 250rpm durante 12 a 16 horas en una incubadora con plataforma rotatoria (Environ Shaker, Lab-Line®). El volumen total del cultivo se agregó a un matraz con 250ml de medio LB incubando a 37°C y 250rpm hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.2 (aproximadamente de 2 a 3 horas). El cultivo se centrifugó a 5000rpm en una centrifuga Multifuge 1S-R (Kendro®), usando tubos de polipropileno

estéril de 50ml. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 125ml de CaCl₂ estéril (50mM) a 4°C. La solución se mantuvo en hielo por 20 minutos y se centrifugó como en el paso anterior. El sobrenadante se desechó y el resto se resuspendió con 20ml de CaCl₂ estéril (50mM). Las células se mantuvieron en hielo por 4 horas, para finalmente agregarles 7ml de glicerol estéril al 50% para conservar alícuotas de 300µl en tubos estériles de 1.5ml previamente enfriados. Las células competentes de *E. coli* se almacenaron a -86°C.

VII. 2. Clonación y Construcción de Plásmidos

VII. 2. 1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de las cepas silvestres y transformantes de *N. crassa* se sembraron conidias en un matraz de 125ml conteniendo 30ml de VMM y se incubaron en oscuridad, sin agitación y a una temperatura de 30°C durante 4 a 5 días. El micelio se colectó usando papel filtro Whatman® estéril de 125mm de diámetro. El micelio se secó, se enrolló y se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5ml con tapa perforada el cual se sumergió en nitrógeno líquido de 30 a 45 segundos y luego se conservaron a -86°C hasta llevarlas al liofilizador. La muestra se liofilizó alrededor de 24 horas (a -40°C y 0.02mbar). El micelio liofilizado se molió en un mortero estéril y el pulverizado resultante se conservó

a -20°C hasta iniciar el proceso de extracción con el kit de extracción de ADN DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) según el protocolo del fabricante.

VII. 2. 2. Diseño de Oligonucleótidos

En la tabla II se muestra una lista de todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para este estudio. Inicialmente se hizo una búsqueda de la secuencia del gen que codifica para la quitina sintetasa 1 (*chs1*) de *N. crassa*, su secuencia promotora y la región río abajo del gen. Las secuencias fueron obtenidas en el sitio <http://www.broad.mti.edu>. Los oligonucleótidos para *chs1* fueron diseñados con las secuencias de restricción de la enzima *XbaI* (TCTAGA) para las secuencias sentido (incluyendo el codón de inicio ATG del gen), mientras que la secuencia antisentido contenía el sitio de restricción para la enzima *PacI* (TTAATTAA) sin el codón de paro TAA del gen. También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región flanqueante río abajo del gen *chs1* de 967 pares de bases. El oligonucleótido sentido fue diseñado con el sitio de restricción para la enzima *Kpn I* (GGTACC), mientras que el oligonucleótido antisentido se diseñó con el sitio de restricción para la enzima *Pst I* (CTGCAG). Antes de enviar a sintetizar los oligonucleótidos se realizó un análisis de las secuencias con el programa FastPCR® versión 3.8.30 para identificar la posible formación

de estructuras secundarias o dímeros. Esto último es importante para establecer condiciones de reacción óptimas, y para incrementar las probabilidades de obtener un resultado positivo en la amplificación. Además de esto, se analizó mediante el Software DNASTAR® versión 32.3.97 que la secuencia insertada dentro del sitio de clonación múltiple se encuentre en marco con la secuencia del vector de clonación pMF272, con el objetivo de evitar problemas durante la transcripción donde se pueden crear codones de paro o codones que no forman parte de la secuencia de la proteína. Los oligonucleótidos pMF272F y pMF272-R-2 se utilizaron para realizar las PCR de colonia como se describirá más adelante. Los oligonucleótidos MRp10, MRp11, MRp12 y MRp13 se utilizaron para comprobar la integración de fragmentos en el locus de la Histidina-3. Los oligonucleótidos Sec22-Xba1-F y Sec22-Pac1-R se utilizaron únicamente al principio de la experimentación para llevar un control de la calidad de los reactivos de PCR y comprobar que el ADN genómico no estuviera degradado.

Tabla II. Oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Ta (°C)	Amplicon (Kb)	Referencia
Chs1-Xba1-F-N	GTCTCTAGAATGGCGTACCACGGTC	62.1	58	2.886	Este estudio
Chs1-Pac1-R-N	GCGTTAATTAAGCGACGGGCAAAGCA	62.1			Este estudio
Chs1-3'flank-F	ACTGGGTACCGCTAGGCAAACCCAAAAACAG	66.5	61	0.967	Este estudio
Chs1-3'flank-R	TACGCTGCAGAACCCGTCACGTCAGCAAAC	66.7			Este estudio
pMF272F	CAAATCAACACAACACTCAAACCA	54.5	55		(Freitag <i>et al.</i> , 2004)
pMF272-R-2	AGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG	62			(Riquelme Pérez <i>et al.</i> , 2007)
MRp10	AGAGACAAGAAAATTACCCCTTCTT	62	55	3.2	(Riquelme Pérez <i>et al.</i> , 2007)
MRp11	AACTACAACAGCCACAACGTCTATATC	61			(Riquelme Pérez <i>et al.</i> , 2007)
MRp12	ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAAG	61	55	2.1	(Riquelme Pérez <i>et al.</i> , 2007)
MRp13	ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAG	60			(Riquelme Pérez <i>et al.</i> , 2007)
Sec22-Xba1-F	CTAGTCTAGAATGATCCGCTCAA	58.3	54	0.622	Este estudio
Sec22-Pac1-R	GGCCCTTAATTA AAAAGAAGAATCTC	58.8			Este estudio

Nota: Tm: temperatura en grados centígrados de desnaturalización calculada por el fabricante. Ta: temperatura de alineamiento utilizada en este estudio para cada reacción. Kb: kilobases.

VII. 2. 3. Amplificación de Fragmentos de ADN

Para las amplificaciones de los fragmentos *chs1* y *chs1-3' flaq* se usó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con un termociclador iCycler (BioRad®). Las condiciones de temperaturas utilizadas en cada reacción de PCR fue de: un ciclo de 95°C por 2 minutos para la desnaturalización, de 25 a 30 ciclos para la amplificación, siendo cada ciclo de 95°C por 30 segundos para la desnaturalización, las temperaturas de alineamiento en función de cada par de oligonucleótidos (Ver Tabla II) por 30 segundos y para la extensión 72°C con un tiempo determinado en función del número de pares de bases de los fragmentos a amplificar y el tipo de ADN Polimerasa utilizada. Finalmente se usó un ciclo de 72°C de 5 minutos para la extensión final. Para las reacciones de PCR con un volumen de 50µl se usó lo siguiente: 1µl de ADN genómico de *N. crassa* (~100ng/µl), 1µl del oligonucleótido sentido y 1µl del antisentido (10µM), 2µl de una mezcla de deoxinucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina, 2.5M), 5µl de MgCl₂ (25mM), 5µl solución amortiguadora (10X) de la enzima, 0.5µl de *Taq* ADN polimerasa (Promega®, 5U/µl), 34.5µl de agua desionizada estéril. Cuando se usó la enzima Platinum *Taq Hi-Fi* ADN Polimerasa (Invitrogen®) se utilizó 1.5µl de MgSO₄ (50mM) en reemplazo de MgCl₂, ajustando el volumen a 50µl con agua desionizada estéril. La mezcla de todos los reactivos se realizó en hielo. La *Taq* ADN Polimerasa (Promega®) se usó solamente para establecer las condiciones de temperatura óptimas de reacción. Sin embargo, para obtener los fragmentos requeridos para la clonación se usó la enzima de alta fidelidad Platinum® HIFI ADN Polimerasa (Invitrogen®). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) (grado analítico, Promega ®) y bromuro de etidio (0.1µg/ml, Invitrogen®) comparándolas con el marcador molecular Lambda ADN *EcoR* I

+ *Hind* III (Promega®). El gel se sumergió en una solución de TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) dentro de una celda de electroforesis Mini Sub Cell GT (Biorad®). Los productos de PCR se cargaron en el gel de electroforesis, mezclándolos con solución amortiguadora de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) a razón de 6:1. El voltaje utilizado en la mayoría de las pruebas de electroforesis fue de 7.5 V/cm usando la unidad de carga PowerPac BASIC (Biorad®). La detección de las bandas amplificadas de ADN en el gel se desarrolló mediante luz ultravioleta con el equipo Molecular Imager Gel Doc XR System (Biorad®). Las bandas de ADN de tamaño esperado, cuando se requería, fueron escindidas del gel y purificadas usando el kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen). La elución final se realizó con 30µl de agua solución de elución del kit.

VII. 2. 4. Construcción del Plásmido pESL01-1

Para crear la fusión *chs1::gfp* los fragmentos amplificados por PCR y aislados en el paso anterior fueron ligados al vector de clonación pMF272 (Fig. 1), ambos previamente digeridos con las enzimas de restricción *Xba* I y *Pac* I. En las digestiones para un volumen total de reacción de 20µl se mezcló: 0.5µl de *Xba* I (20U/µl) y *Pac* I (10U/µl) ambas de la marca New England Biolabs (NEB), 2µl de solución amortiguadora #2® 10X (NEB), 2µl de suero de albúmina bovina 10X (NEB) y de 3-15 µl del fragmento de ADN obtenido mediante la purificación de producto de PCR ó del vector de clonación. La mezcla de los reactivos se realizó en hielo, se incubó a 37°C de 3 horas y se inactivó la reacción llevándola a 65°C por 20 minutos. Para evitar la religación de los extremos digeridos parcialmente se añadió 1µl de fosfatasa alcalina de camarón (1U/µl, Promega®), incubando a 37°C de 30 minutos a 1 hora y se inactivó con 1µl de EDTA (0.5M, pH 8). Las

digestiones se realizaron con el fin de crear los extremos cohesivos tanto de los fragmentos de ADN amplificados por PCR como de los vectores para realizar el proceso posterior de ligación. La purificación de los productos de digestión se realizó utilizando el kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen), para luego concentrar la muestra por medio de precipitación con etanol. Este último consistió en añadir al volumen total de la digestión 10% de acetato de sodio (pH 5.2) y 200% del volumen final de etanol (96%) a -20°C, enfriando por 30 minutos a -86°C. Luego se centrifugó por 15 minutos y se desechó el sobrenadante, evitando tocar la pastilla o el fondo del tubo. Se lavó el ADN añadiendo 200µl de etanol 70% a -20°C, para luego centrifugar por 5 minutos, desechando el sobrenadante y dejando secar la muestra incubándola a 37°C. Finalmente se resuspendió con 12µl de agua desionizada estéril. Para la purificación del vector digerido se analizó en gel de electroforesis el producto de la digestión, realizando la escisión de la banda de tamaño esperado y utilizando el kit mencionado anteriormente. La concentración final de los productos de digestión se midieron corriendo 3µl de cada muestra en gel de electroforesis. Todas las ligaciones se realizaron añadiendo cantidades del vector y el inserto a una razón molar aproximada de 1:3. Las reacciones llevaron además 10% de solución amortiguadora® de T4 ligasa (Promega), y 1µl de T4 ligasa (3U/µl, Promega) y se aforó con agua desionizada estéril para mantener la concentración molar. Las reacciones se incubaron a 16°C por una hora y luego se dejaron por 24 a 48 horas a 4°C.

El producto de cada ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α® (Invitrogen) por choque térmico. Este proceso se llevó a cabo para obtener grandes cantidades de cada una de las construcciones. Las células competentes *E. coli* DH5α®

(Invitrogen) conservadas a -86°C se descongelaron en hielo y se tomaron alícuotas de $50\mu\text{l}$ para mezclar con 5 a $15\mu\text{l}$ del vector recombinante (producto de la ligación) en un tubo estéril de 1.5ml . La solución se mezcló suavemente sin pipetear y se mantuvo en hielo por 30 minutos. Luego se introdujo el tubo en un bloque térmico Standard Heatblock (VWR®) por 2 minutos a una temperatura de 42°C . Se introdujo el tubo nuevamente en hielo por 2 minutos y se añadió $950\mu\text{l}$ de medio LB precalentado a 37°C y se incubó por 1 hora a la misma temperatura y 225rpm . El cultivo fue sembrado en una placa con LB sólido con ampicilina ($100\mu\text{g/ml}$), y se incubó de 10 a 16 horas a 37°C hasta observar colonias en la placa. Es importante mencionar que los plásmidos pMF272 y pMF357 contienen en su secuencia el gen que codifica para la β -lactamasa, proteína que confiere resistencia a la ampicilina. De esta manera se seleccionaron solamente las colonias resistentes a la ampicilina para realizar las pruebas de PCR de colonia. Esta última prueba se usó para verificar que las cepas de *E. coli* DH5 α contenían el plásmido recombinante. Para ello se tomaron muestras de las colonias que crecieron en el medio selectivo, cada una con la punta de una micropipeta y se sembraron en otra placa con medio selectivo, marcando el sitio de cada colonia para su posterior identificación. El remanente de bacterias que quedó en la punta se introdujo en un tubo de 0.2ml con los reactivos necesarios para desarrollar la PCR, con los oligonucleótidos pMF272-F y pMF272-R-2 (Tabla II). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: Un ciclo de 95°C por 5 minutos para la desnaturalización, de 25 ciclos para la amplificación, siendo cada ciclo de 95°C por 30 segundos para la desnaturalización, 55°C por 30 segundos como temperatura de alineamiento y para la extensión 72°C por 2 minutos. La temperatura de extensión final fue de 72°C por 10 minutos. Las reacciones de PCR con las bandas de tamaño esperado se seleccionaron como

positivas para luego realizar la extracción de ADN plasmídico de una de las colonias a partir de un cultivo bacteriano líquido usando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen).

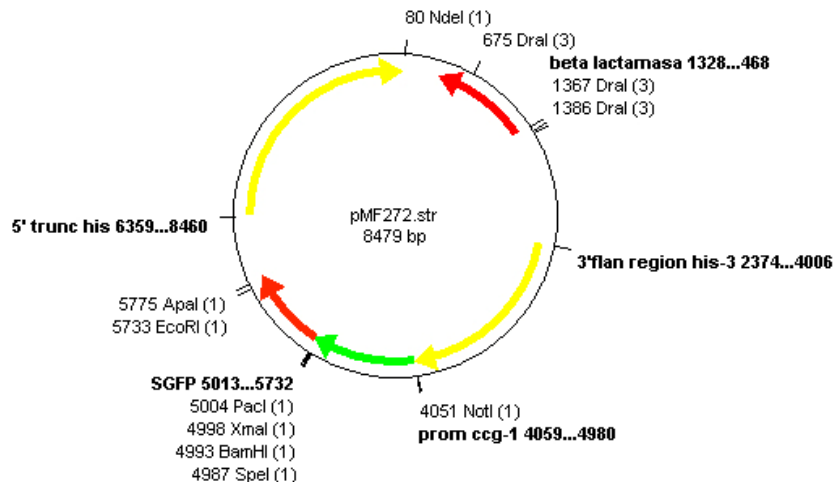


Figura 1. Plásmido pMF272: En el diagrama: 3'flan región his-3 (región 3'flanqueante del locus his-3), prom ccg-1 (Promotor fuerte), SGFP (gen variante Proteína Verde Fluorescente), 5'trunc his (región de complementación de mutación en his-3) (Modificado de Freitag et al., 2004)

VII. 2. 5. Construcción del Plásmido pES061-1

Para marcar en condiciones nativas el gen *chs1* con *gfp* se utilizó la estrategia de recombinación denominada *knock in*. Para ello se utilizó una modificación del vector de clonación pMF357 (Fig. 2), para provocar el reemplazamiento del gen endógeno por una copia de ese gen fusionado al gen de la *gfp*, manteniendo el promotor nativo. Inicialmente se realizó la digestión enzimática por separado de 3µl (10µg) del vector pMF357 y 10 µl del fragmento 3' flanqueante de *chs1* amplificado y purificado. Para cada reacción de digestión de 20µl se utilizó: 0.5µl de la enzima de restricción *Pst* I (10U/µl) y 0.5 µl de *Kpn* I (10U/µl), 2µl de solución amortiguadora REact 4® (Invitrogen), 2µl de BSA 10X y agua desionizada estéril. Las reacciones se incubaron por 3 horas a 37°C. El proceso de

purificación, ligación, transformación en *E. coli* DH5 α , PCR de colonia y extracción de ADN plasmídico se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente. Para los PCR de colonia se usaron los oligonucleótidos Chs1-3'flank-F y Chs1-3'flank-R. Se seleccionó finalmente un vector pES061-1 que contenía la región flanqueante 3' de *chs1*.

VII. 2. 6. Construcción del Plásmido pESL02-3

Para la construcción del plásmido pESL02-3 se realizó una subclonación del plásmido pES061-1. Se realizó la digestión enzimática de los plásmidos pESL01-1 y pES061-1 con las enzimas de restricción *Xba* I y *Pac* I. Los productos de digestión se analizaron en gel de electroforesis y se purificaron las bandas correspondientes al gen *chs1* del vector pESL01-1 (2.886kb) y la banda correspondiente al fragmento de pES061-1 (7.305kb) sin el gen de la Histona 1 (*h1*) usando kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen). El proceso de purificación, ligación, transformación en *E. coli* DH5 α , PCR de colonia y extracción de ADN plasmídico se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente. Para los PCR de colonia se usaron los oligonucleótidos Chs1-*Xba*1-F-N y Chs1-*Pac*1-R-N. Para verificar que el tamaño del plásmido fuera el correcto, se realizó la digestión enzimática del vector con la enzima de restricción *Kpn* I, para obtener bandas de tamaño específico (6.3, 2.7, 0.7, 0.5 kb) y poder comparar con las estimaciones realizadas *in silico*. Finalmente se obtuvo el vector pESL02-3, modificación de pES061-1 con el gen *chs1* fusionado a *gfp*, seguido del gen de resistencia a la higromicina (*Hyg*' y la región 3'flanqueante de *chs1*. Este plásmido una vez linearizado, se usó para realizar la transformación de conidias de *N. crassa* FGSC#9718.

VII. 3. Secuenciación en Vector Recombinante pESL01-1

La secuenciación fue necesaria para verificar que no haya ocurrido ninguna mutación en la secuencia del gen, especialmente flanqueando la fusión entre el gen de la *gfp* y el gen *chs1*. Esta se llevó a cabo en el Core Instrumentation Facility del Instituto para Biología Genómica Integral de la Universidad de California en Riverside-Estados Unidos. Para ello se enviaron dos muestras, cada una de ellas contenía 1,100ng de ADN plasmídico, 10pmoles del oligonucleótido (pMF272-F ó pMF272-R-2) (Tabla II), y llevados a 12µl con agua desionizada estéril. La amplificación se efectuó desde las áreas flanqueantes de la región de fusión entre el vector de clonación pMF272 y el gen *chs1*. Para el análisis de la secuencias se utilizó el software FinchTV Versión 1.4.0 (Geospiza Inc.) y ApE- A Plasmid Editor v1.10.4.

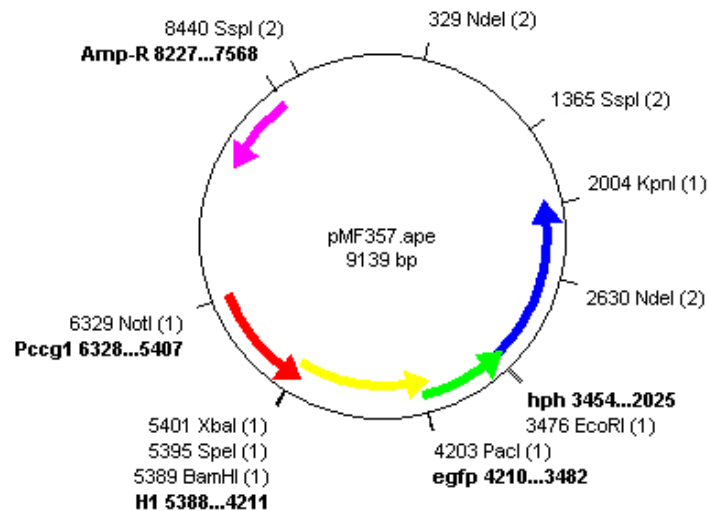


Figura 2. Plásmido pMF357: En el diagrama: Pccg-1 (Promotor fuerte), H1 (gen de la histona H1), egfp (variante Proteína Verde Fluorescente), hph (gen de resistencia a la higromicina), Amp-R (gen de resistencia a la ampicilina)

VII. 4. Transformación y Selección de Transformantes

VII. 4. 1. Preparación de conidias

Las conidias para la transformación se obtuvieron de las cepas de *N. crassa* FGSC#9717 y *N. crassa* FGSC#9718 (ver Tabla I). La característica de ambas cepas es que tienen deletado el gen *mus-51*, gen homólogo al gen humano *ku70* responsable del NHEJ (“nonhomologous end-joining”), fenómeno que ocurre con frecuencia en *N. crassa* donde ADN exógeno se integra en sitios no homólogos en el genoma. La mutación en *mus-51* impide casi por completo la integración ectópica de los casetes de inserción en el genoma de *N. crassa* durante la recombinación que se efectúa después de la transformación cuando se utiliza 1kb de ADN flanqueante (Ninomiya *et al.*, 2004). Las conidias de cada una de las cepas se sembraron en un matraz con 100ml de VMM sólido, suplementado con L-histidina (0.5mg/ml) para la cepa *N. crassa* FGSC#9717. Los cultivos fueron incubados a 30°C hasta observar micelio abundante sobre el medio y paredes del matraz. Para inducir a la conidiación se expusieron los cultivos a la luz. Una vez que se observaron grandes cantidades de conidias se adicionaron 50ml de agua no ionizada estéril fría al matraz, agitando circularmente con una pipeta estéril para desprender las conidias del micelio y paredes del matraz hasta obtener la mayor cantidad de esporas en el medio acuoso. Se vertió la suspensión de conidias filtrándola con una gasa estéril en un tubo desechable estéril de polipropileno de 50ml hasta obtener un volumen final aproximado de 35ml. Para el lavado de las conidias se centrifugó la suspensión a 5,000 rpm por 5 minutos a 4°C en una centrífuga Multifuge 1S-R (Kendro®), desechando el sobrenadante (con cuidado de no desprender la pastilla), resuspendiendo la pastilla suavemente con 30ml de sorbitol estéril (1M). El lavado se repitió dos veces más para cada una de las cepas y después del tercer

centrifugado la pastilla fue resuspendida en sorbitol (1M) hasta obtener una concentración de conidias de 2.0×10^9 por ml. Ajustada la concentración se prepararon alícuotas en tubos de 0.2ml y se conservaron a -86°C .

VII. 4. 2. Digestiones y Electroporación

Las transformaciones de *N. crassa* fueron realizadas por electroporación. Inicialmente para mejorar la eficiencia de la doble recombinación homóloga el plásmido pESL01-1 se linearizó por digestión enzimática durante 3 horas a 37°C en una reacción de $20\mu\text{L}$ de volumen total que contenía: $10\mu\text{L}$ del plásmido pESL01-1, $2\mu\text{L}$ de solución amortiguadora REact #6® 10X, $1\mu\text{L}$ de enzima *Nde* I ($5\text{U}/\mu\text{L}$) y $14\mu\text{L}$ de agua desionizada estéril. La inactivación de las enzimas, desfosforilación 5' y precipitación con etanol se realizó de forma idéntica a lo descrito anteriormente. Una vez seca la pastilla se resuspendió en $15\mu\text{L}$ con solución amortiguadora de elución y se comprobó su tamaño y concentración en gel de electroforesis. El tamaño de la banda se comparó con el marcador Lambda ADN Marker *Eco*R I + *Hind* III ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) (Promega®, Fig. 5D). Una vez confirmada la digestión se mezclaron en frío $60\mu\text{L}$ de conidias en un tubo estéril de 1.5ml de la cepa *N. crassa* FGSC#9717 ó *N. crassa* FGSC#9718 con $5\text{-}10\mu\text{L}$ ($1\mu\text{g}$) del plásmido linearizado, y se transfirieron en una cubeta estéril de electroporación de 0.2cm (Precision Electroporation Cuvettes, Daigger®) y se mantuvo en hielo por 5-10 minutos. La electroporación se realizó en un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad®) usando el siguiente protocolo: 600 Ohms, $25\mu\text{FD}$ y 1.5 kV para obtener un tiempo constante entre 12 y 14 milisegundos. Después del pulso se añadió inmediatamente 1ml de sorbitol (1M) y se transfirieron las conidias con una pipeta pasteur estéril a un tubo cónico de polipropileno de 15ml al que se

añadió 1ml de solución de recuperación. Las muestras se incubaron a 30°C con agitación muy lenta (20rpm) durante 4 horas. Las conidias fueron sembradas en 6 placas petri con medio FGS, aproximadamente 350µl de la solución con conidias por placa. Este medio permitiría facilitar la selección de las conidias reduciendo la capacidad de crecimiento y por consecuencia la mezcla de unas colonias con otras dentro de la misma placa. Las placas se incubaron a 30°C por 5 días hasta observar colonias. El plásmido pESL02-3 para la estrategia de *knock in* se linearizó por digestión enzimática durante 3 horas a 37°C en una reacción de 20µL de volumen total que contenía: 10µl del plásmido pESL02-3, 2µl de solución amortiguadora *SspI* 10X, 1µl de enzima *SspI* (5U/µl) y 14µl de agua desionizada estéril. El proceso de obtención del plásmido linearizado y la transformación se siguió de manera idéntica a lo descrito anteriormente, con la única diferencia que para la electroporación se utilizaron conidias de la cepa *N. crassa* FGSC#9718.

VII. 4. 3. Selección de Transformantes

Entre 20 y 30 de las colonias que crecieron en las placas FGS fueron transferidas a tubos de borosilicato de 4ml con 1.5ml de VMM ó VMM más higromicina B (200µg/ml). Una vez que las cepas produjeron grandes cantidades de conidias se utilizó un estereoscopio con fluorescencia SZX12 (Olympus®) con un set de filtros para GFP (460-490nm de excitación, espejos dicroicos de 505nm y filtros de emisión de 510-550nm), para observar la presencia de fluorescencia en las transformantes. Al mismo tiempo se realizaron observaciones de conidias de las transformantes en un microscopio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss®) utilizando una lámpara de mercurio para irradiar las muestras y observar fluorescencia. De las 20 transformantes de *N. crassa* FGSC#9717 con pESL01-1, 13

mostraron fluorescencia y se seleccionaron 5 para ser observadas por microscopía confocal. De igual manera, de las 16 transformantes de *N. crassa* FGSC#9718 con pESL02-3, 12 mostraron fluorescencia y se seleccionaron 5 para ser observadas por microscopía confocal. Para ello se sembraron conidias en placas con VMM y se incubaron a 25°C por 16-20 horas. La técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2005) fue utilizada para realizar el montaje del micelio y realizar las observaciones con la configuración específica. La cepa heterocarionte seleccionada obtenida con la cepa *N. crassa* FGSC#9717 transformada con el vector recombinante pESL01-1 se le denominó TES1-15, mientras que la transformante heterocarionte seleccionada obtenida con la cepa *N. crassa* FGSC#9718 transformada con el vector recombinante pESL02-3 se le denominó TES2-11.

VII. 4. 4. Obtención de Cepas Monocariontes

Para obtener cepas transformantes monocariontes se realizó el cruzamiento de *N. crassa* FGSC#988 (*mat a*) con la transformante TES1-15 (*mat A*) y *N. crassa* FGSC#9013 (*mat A*) con la transformante TES2-11 (*mat a*). Inicialmente conidias de las cepas de tipo *mat a* se colectaron con agua desionizada estéril y se lavaron con sorbitol (1M). Luego se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm en una centrífuga Multifuge 1S-R (Kendro®), para luego desechar el sobrenadante y resuspenderlas en 1ml de VMM. Las conidias fueron esparcidas sobre micelio de las cepas de tipo *mat A*, crecidas previamente en medio SCM. Las cruces se realizaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 días, hasta ver peritecios en las placas. Mediante un estereoscopio SZX12 (Olympus®) se confirmó la presencia de ascosporas que se encontraban suspendidas en agua en la superficie de la tapa de la caja petri. Las ascosporas colectadas en agua fueron sometidas a choque térmico de

60°C durante 1 hora y se sembraron en 5 placas con VMM sólido, incubándolas a 28°C por 12 horas hasta observar ascosporas germinadas. Mediante una pipeta pasteur se tomaron de 15-30 colonias, cada una originada de una ascospora germinada, y se sembraron nuevamente en tubos de borosilicato con 1.5 ml de VMM para su posterior selección. En el caso de las ascosporas obtenidas con TES2-11, las ascosporas después del choque térmico fueron sembradas en placas de VMM con higromicina B (200µg/ml). Para seleccionar las cepas homocariontes se consideró las características de crecimiento y conidiación en tubo de cultivo, además de la expresión de fluorescencia al observarlas bajo el microscopio confocal. En el caso específico de las transformantes TES2-11 se consideró además, para la selección, la resistencia al antibiótico. La cepa homocariote seleccionada resultado del cruzamiento con la transformante TES1-15 se le denominó NES1-15, mientras que la homocariote seleccionada resultado del cruzamiento con la transformante TES2-11 se le denominó NES2-11.

VII. 4. 5. Mediciones de Crecimiento

Para el análisis del crecimiento radial de colonia de las cepas transformantes y control, se sembró micelio en una caja petri con VMM en una orilla de la caja. Las muestras se incubaron a 30°C durante todo el tiempo de medición. En cada una de las placas se marcó el margen de la colonia a medida que iba avanzando. La mediciones se hicieron usando el estereoscopio SZX12 (Olympus®).

Las mediciones de crecimiento de las hifas se realizaron en imágenes en series de tiempo de muestras que se observaban en el microscopio confocal. Usando el software

LSM 510 Image Examiner (versión 3.2, Carl Zeiss®) se trazó una línea central sobre el eje de crecimiento de la hifa para marcar y luego medir los incrementos en longitud de la misma.

VII. 5. Microscopía Confocal y Procesamiento de Imágenes

Para la observación y el análisis de las transformantes obtenidas se utilizó microscopía confocal de barrido con láser. Se sembraron las muestras en VMM sólido y se incubaron a 28°C. Las muestras se prepararon según el método de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2005).

Se usó el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®) y usando aceite de inmersión Immersol 518 (Carl Zeiss®). Se usó el láser Ión Argón de la línea 488nm con el filtro bandpass de emisión de (505-530nm). Se utilizó el software LSM 510 (versión 3.2, Carl Zeiss®) para capturar imágenes y para evaluarlas se utilizó el LSM 510 Image Examiner (versión 3.2, Carl Zeiss®). Para el procesamiento de las imágenes se usó el software Image Pro® (versión 6.0) y Adobe Photoshop® (versión 7.0).

VII. 5. 1. Ensayos con Sonda Fluorescente

Para el análisis de co-localización de la proteína CHS-1-GFP con distintos organelos intracelulares en las cepas transformadas se usó la sonda fluorescente FM4-64 (Invitrogen®) [*N*- (3- triethylammoniumpropyl)-4- (6- (4- (diethylamino) phenyl) hexatrieny) pyridinium dibromide. Para ello antes de montar la muestra se añadió de 10 a

20 μ L de la sonda sobre el cubre objeto para montar luego el bloque cuidadosamente sobre el marcador. La solución stock se preparó a una concentración de 0.25mM en dimetilsulfóxido (DMSO) 100% y la solución de trabajo se preparó a una concentración de 25 μ M en medio mínimo de Vogel. FM4-64 se caracteriza por marcar la membrana plasmática y membranas endocíticas (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Freitag *et al.*, 2004) en células eucariotas, y sus moléculas son excitadas a 514nm y emiten a 670nm, usando un láser Argon/2.

VII. 5. 2. Ensayos con Inhibidor

Se realizó un ensayo con un inhibidor para interrumpir pasos específicos en la ruta de secreción convencional de proteínas. Para ello se utilizó la Brefeldina A que es una lactona macrocíclica producto del metabolismo de hongo *Penicilium brefeldianum*, la cual afecta en células animales, plantas y hongos, en la secreción de proteínas a nivel de Retículo Endoplasmático-Golgi (Cole *et al.*, 2000; Nebenfuhr *et al.*, 2002). La solución stock de BFA se preparó con DMSO 100%, a una concentración final de 10mg/ml. La solución de trabajo fue preparada con medio mínimo de Vogel, a partir de la solución stock. Los ensayos para las observaciones microscópicas consistieron en la aplicación de la suspensión del inhibidor BFA (100 μ g/ml, 10 μ l) sobre el micelio en una región muy cercana al borde de la colonia (5-10mm). Mientras que para las observaciones macroscópicas se aplicó el inhibidor (100 μ g/ml, 20 μ l) sobre un disco de papel filtro estéril 0.50cm de diámetro. Las observaciones se realizaron por microscopía confocal de escaneo con láser y estereoscopio, respectivamente.

VII. 6. Análisis de Integraciones

VII. 6. 1. Comprobación de Integración por PCR

Inicialmente para cada una de las transformantes se extrajo el ADN genómico para realizar la confirmación por PCR. Para determinar la integración correcta en el ADN genómico de *N. crassa* de la transformante auxótrofa para la histidina. Se verificaron la presencia de 1 par de fragmentos amplificados por PCR utilizando dos pares de oligonucleótidos MRp10-MRp11 y MRp12-MRp13 (Tabla II, Riquelme et al., 2007). Los fragmentos amplificados corresponden a la región flanqueante río abajo (*His-3/ccg1*) y río arriba (*sgfp/His-3*), donde se realizó la integración por recombinación homóloga. Las condiciones de reacción se realizaron usando el mismo procedimiento descrito anteriormente para la técnica de PCR.

VII. 6. 2. Southern Blot

Para determinar el número de copias y localización del gen *chs1* en el genoma de las transformantes, se utilizó la técnica de Southern Blot en las siguientes cepas: NES1-15, NES2-11, *N. crassa* FGSC#9717 y FGSC#9718. Inicialmente se realizó *in silico* una búsqueda de los sitios de restricción de la enzima *BamH I* en la secuencia del gen *chs1* y sus regiones flanqueantes, así como de las regiones flanqueantes del gen *his-3*, con el objetivo de estimar el tamaño de las bandas que se hibridarían con la sonda.

Se extrajo el ADN genómico de las cepas mencionadas y de cada uno se realizó la digestión enzimática de 12µg de ADN con la enzima *BamH I* (10U/µl, Invitrogen®) a 37°C por 24 hrs. También se obtuvo el gen *chs1* por PCR a partir de ADN genómico de *N.*

crassa N1 utilizando los oligonucleótidos Chs1-Xba-F-N y Chs1-Pac-R-N (Tabla II). Las condiciones de reacción y purificación fueron similares a lo descrito anteriormente. La verificación del ADN genómico digerido y de *chs1* se realizó por electroforesis en gel de agarosa 0.7% con bromuro de etidio a 75V con 2 μ l del producto de la digestión y 5 μ l del gen purificado. Una vez observada la digestión completa en todas las muestras, se procedió a correr las muestras por electroforesis (35V) en gel de agarosa (6.2 x 10.2 cm) al 0.7% durante 3.5 horas. Luego se tomaron imágenes del ADN digerido en el transiluminador con una regla.

El gel fue sumergido en una solución amortiguadora de depurinación (0.25M HCl) por 10 minutos, con agitación lenta y se lavó con agua desionizada estéril. Luego se sumergió en una solución básica de Cloruro de Sodio (1.5 M) e Hidróxido de Sodio (0.5 M) por 20 minutos, con agitación lenta y se lavó con agua destilada. Se realizó lo mismo pero ahora con una solución neutralizante básica de NaCl (1.5 M), Tris-HCl (0.5M) pH 7.2 y EDTA (0.001M) por 20 minutos, con agitación lenta, repitiendo el proceso dos veces. En una bandeja de vidrio se realizó la transferencia de ADN a la membrana, colocando desde el fondo de la bandeja hacia arriba los siguientes componentes: Plataforma de plástico, papel filtro de cromatografía grande (3MM CHR, Whatman®), 3 piezas papel filtro de cromatografía (3MM CHR, Whatman®), gel invertido (con los pozos hacia abajo), membrana de Nylon (Hybond™-N+, Amersham Bioscience), 3 piezas de papel filtro de cromatografía (3MM CHR, Whatman®), torre de papel absorbente, placa de vidrio y contrapeso (Fig. 3). Durante el montaje se empaparon todos los filtros Whatman incluyendo la membrana de Nylon con SSC (10X), eliminando por completo la presencia

de burbujas entre ellos. La transferencia se realizó por 24 hrs. a temperatura ambiente. Después de esto se retiró la membrana de Nylon (con ADN) junto al gel para marcar los pocillos con lápiz sobre la membrana. Luego se revisó el gel en el transiluminador para observar que todo el ADN hubiera sido transferido y la membrana se remojó en SSC (5X) por 5 minutos. Confirmado esto la membrana de Nylon se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel filtro Whatman 3MM de 10-20 minutos para luego irradiar con luz UV en un HL-2000 HybriLinker (UVP®) a $120,000\mu\text{J}/\text{cm}^2$ por ambos lados, para fijar el ADN a la membrana antes de proceder a la hibridación. Para marcar la sonda se usó el kit no radiactivo DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II® (Roche). Una vez fijado el ADN en la membrana se realizó una prehibridación para evitar inespecificidades de la sonda con la membrana. Para ello se aplicó 7ml del reactivo DIG Easy Hyb a la membrana en tubos de hibridación y se incubó a 42°C por 45 minutos. Para la hibridación se desechó la solución de prehibridación, se añadió nuevamente 7ml de DIG Easy Hyb con 4µl de la sonda desnaturalizada y se incubó toda la noche a 42°C. Para preparar la sonda marcada con digoxigenina-dUTP se utilizó 1µg del gen *chs1* y se llevó a 16µl con agua desionizada estéril. El ADN se desnaturalizó en un baño con agua hirviendo por 10 minutos, evitando su renaturalización enfriando inmediatamente en hielo, para luego añadir 4µl del reactivo DIG-High Prime e incubar a 37°C toda la noche. La reacción de polimerización se paró añadiendo 1µl de EDTA (0.5M). Luego de la hibridación, la membrana fue sometida a lavados de astringencia. Se lavó dos veces con una solución de 2X SSC y 0.1% SDS a temperatura ambiente 15-25°C. Luego se lavó dos veces con una solución de 0.5X SSC y 0.1% SDS a 68°C con agitación lenta.

Para el desarrollo de la detección (Fig. 4) se lavó con 50ml de la solución amortiguadora de lavado (750µl Tween 20, 249.25ml ácido Maléico amortiguador) con agitación lenta por 5 min. Luego se añadió 100ml de la solución de bloqueo 1X por 30-45 minutos en agitación lenta. Desechando la solución de bloqueo se añadió 25ml de la solución anticuerpo (1:10,000; 25ml blocking working solution 1X, 2.5µl anti DIG-AP-conjugada) con agitación lenta por 30 minutos. Se desechó la solución de anticuerpo y se lavó dos veces la membrana con 100ml con la solución amortiguadora de lavado con agitación lenta por 15 minutos. Se desechó esta última solución y se añadió 25ml de la solución amortiguadora de detección por 3-5 minutos. Luego se colocó la membrana sobre una lámina de acetato y se le añadió 1ml del sustrato CSPD ready-to-use. Evitando la formación de burbujas se colocó otra lámina sobre la membrana para evitar el secado. Finalmente se utilizó esta membrana entre láminas de acetato para la detección de la reacción quimioluminiscente. Para ello en completa oscuridad se expuso una placa fotográfica quimioluminiscente de alto rendimiento (Hyperfilm™ ECL, Amersham Bioscience) sobre la membrana en una cámara a diferentes tiempos de exposición. Después de cada exposición las placas se lavaron por 30 segundos en la solución de revelado, 30 segundos en agua desionizada, 1 minuto en solución de fijación y 30 segundos en agua desionizada. Las placas fotográficas se dejaron secar para luego observar las bandas.

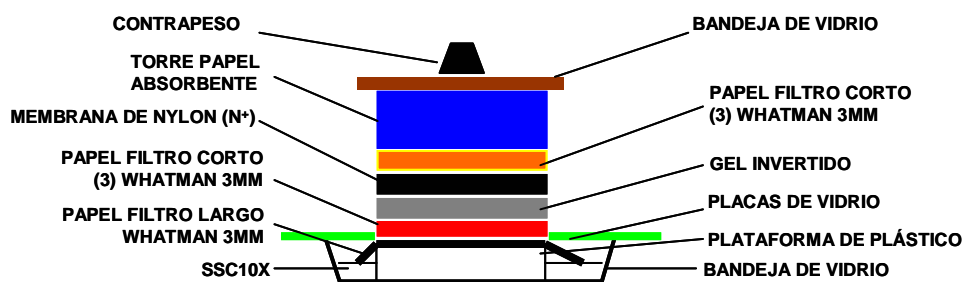


Figura 3. Plataforma de Transferencia de ADN del gel a la membrana.

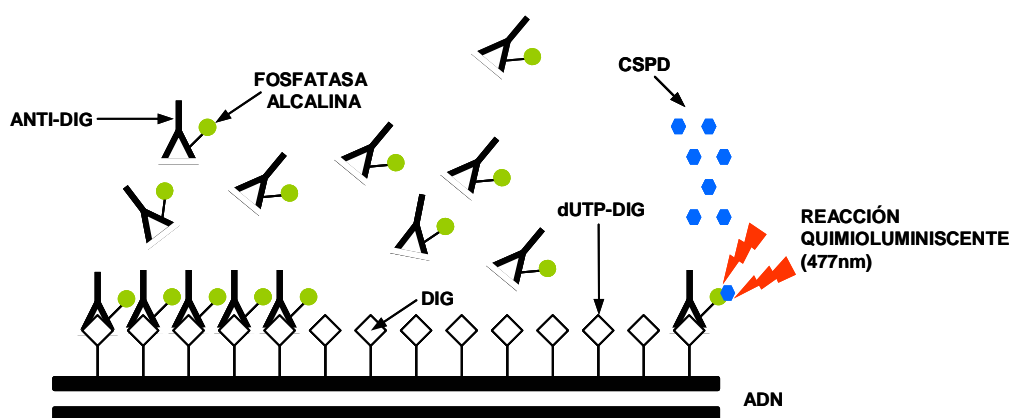


Figura 4. Diagrama de componentes involucrados en la inmuno y quimiodetección, para identificar bandas de ADN en la membrana en la prueba de Southern blot.

VIII. Resultados

VIII. 1. Obtención de Vectores Recombinantes

VIII. 1. 1. pESL01-1: *Pccg1-chs1-sgfp*

Utilizando los oligonucleótidos CHS1-Xba1-F-N, CHS1-Pac1-R-N y ADN genómico de *N. crassa* se logró amplificar por PCR una banda de 2.886 kb correspondiente a *chs1* (Fig. 5A). La construcción del vector recombinante pESL01-1 se desarrolló insertando el amplicon del gen digerido con las enzimas de restricción *Xba* I y *Pac* I en el sitio de clonación múltiple del vector de clonación pMF272 (Freitag et al., 2004), digerido igualmente con las mismas enzimas (Fig. 5B). La clonación correcta de pESL01-1 (Fig. 5E) se confirmó por PCR de colonia de dos de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas (Fig. 5C).

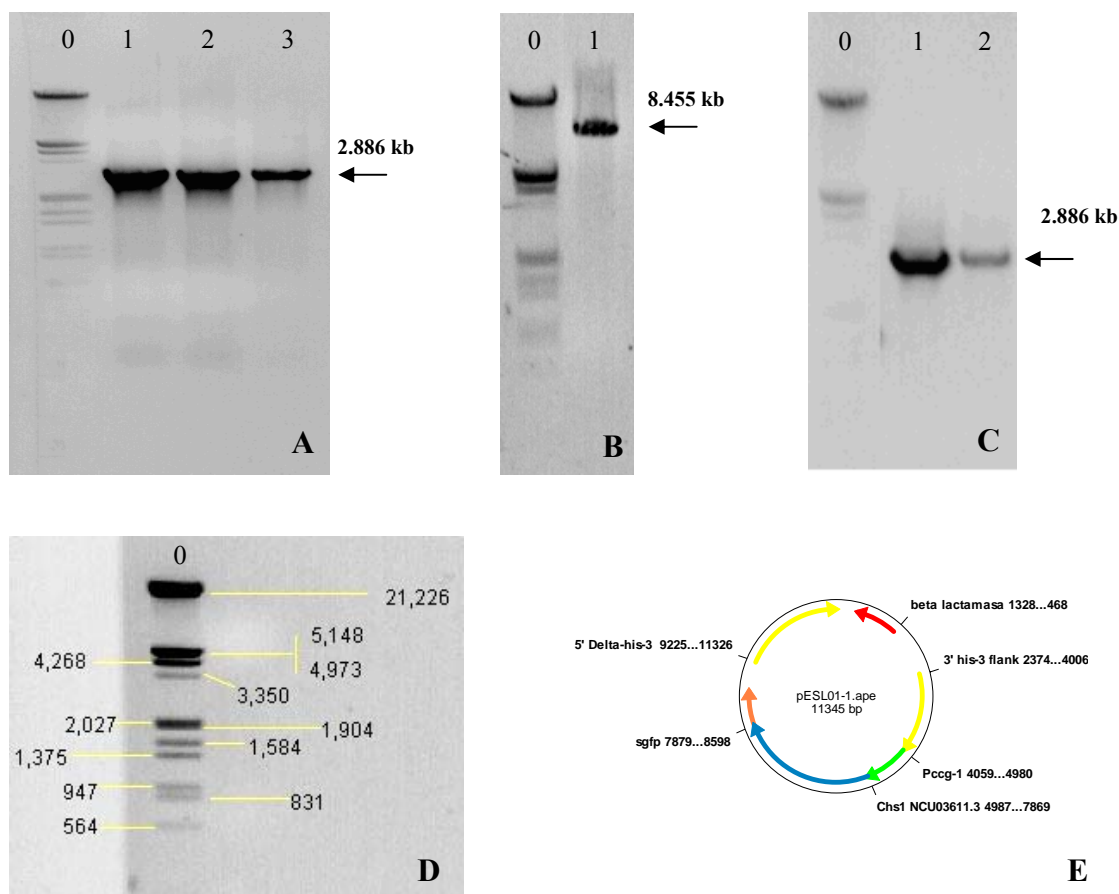


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa con las bandas correspondientes al gen *chs1* en cada carril, amplificado con la polimerasa de alta fidelidad Platinum® HIFI ADN Polimerasa (Invitrogen®) (A). Fragmento correspondiente al vector pMF272 digerido con las enzimas de restricción *Xba* I y *Pac* I (B). Bandas del gen *chs1* en dos cepas de *E. coli* obtenidas por PCR de colonia (C). Imagen de bandas de ADN del marcador Lambda digerido con las enzimas *EcoR* I y *Hind* III indicando su tamaño en bp (D). Diagrama del vector diseñado pESL01-1 con la fusión *Pccg1-chs1-gfp* (E).

Mediante técnicas de secuenciación se comprobó la inexistencia de errores en el vector recombinante pELS01-1, en los sitios de fusión del gen *chs1* y el vector pMF272. El análisis de las secuencias se realizó en 1,092 bases en el extremo 5' de la fusión mientras que en el extremo 3' de la fusión se analizaron 1,152 bases. No se detectaron mutaciones en

las bases del vector pESL01-1 cuando se realizó la comparación con la secuencia del vector pESL01 *in silico*. Lo cual confirmó la ausencia de errores en la construcción de pESL01-1.

VIII. 1. 2. pESL02-3: *chs1-sgfp-hph-3'flan chs1*

Para la construcción del vector pESL02-3 se amplificó por PCR ADN de la región flanqueante río abajo del gen *chs1* de *N. crassa* usando los oligonucleótidos Chs1-3'flank-F y Chs1-3'flank-R dando como resultado un amplicón de 967 bases (Fig. 6A). Este fragmento de ADN fue insertado entre los sitios de restricción *Pst* I y *Kpn* I del vector pMF357 (Fig. 6C), después de haber escindido la región propia del plásmido comprendida entre estos dos sitios de restricción. Luego de la digestión los fragmentos liberados fueron de 1.615 kb y 7.524 kb (Fig. 6B).

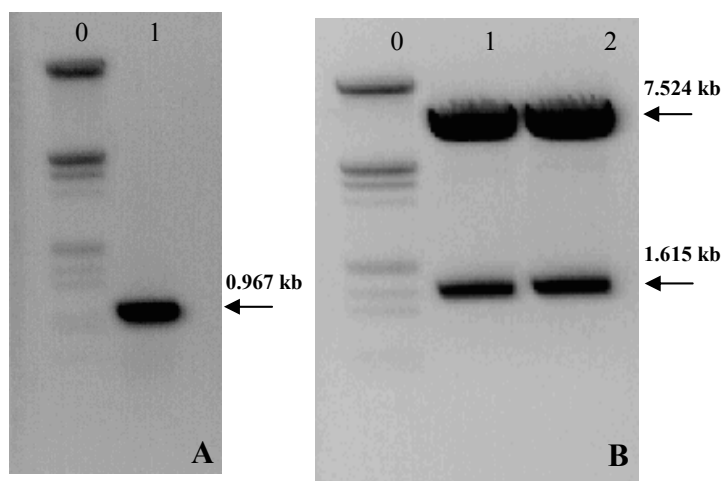


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa con la banda (carril 1) correspondiente al fragmento 3'flanqueante del gen *chs1*, amplificado con la polimerasa de alta fidelidad Platinum® HIFI ADN Polimerasa (Invitrogen®) (A). Bandas de cada carril (1 y 2) fueron obtenidas del producto de digestión del vector pMF357 con las enzimas *Kpn* I y *Pst* I (B).

El fragmento de 7.524 kb fue unido al fragmento de 967 bases para dar lugar al vector pES061-1 (Fig. 7D), el cual fue clonado en *E. coli* DH5 α . La clonación correcta de pESL02-3 se confirmó por PCR de colonia en 20 colonias de *E. coli* DH5 α transformadas (Fig. 7A), de las cuales se seleccionaron solo 3 de las colonias positivas para aislar el plásmido. Para el proceso final de construcción del plásmido pESL02-3 (Fig. 7E), el gen *chs1* se subclonó del vector recombinante pESL01-1 y unió al fragmento de 7.305 kb obtenido del vector pES061-1 al ser digerido enzimáticamente entre los sitios de restricción *Xba* 1 y *Pac* 1 (Fig. 7C).

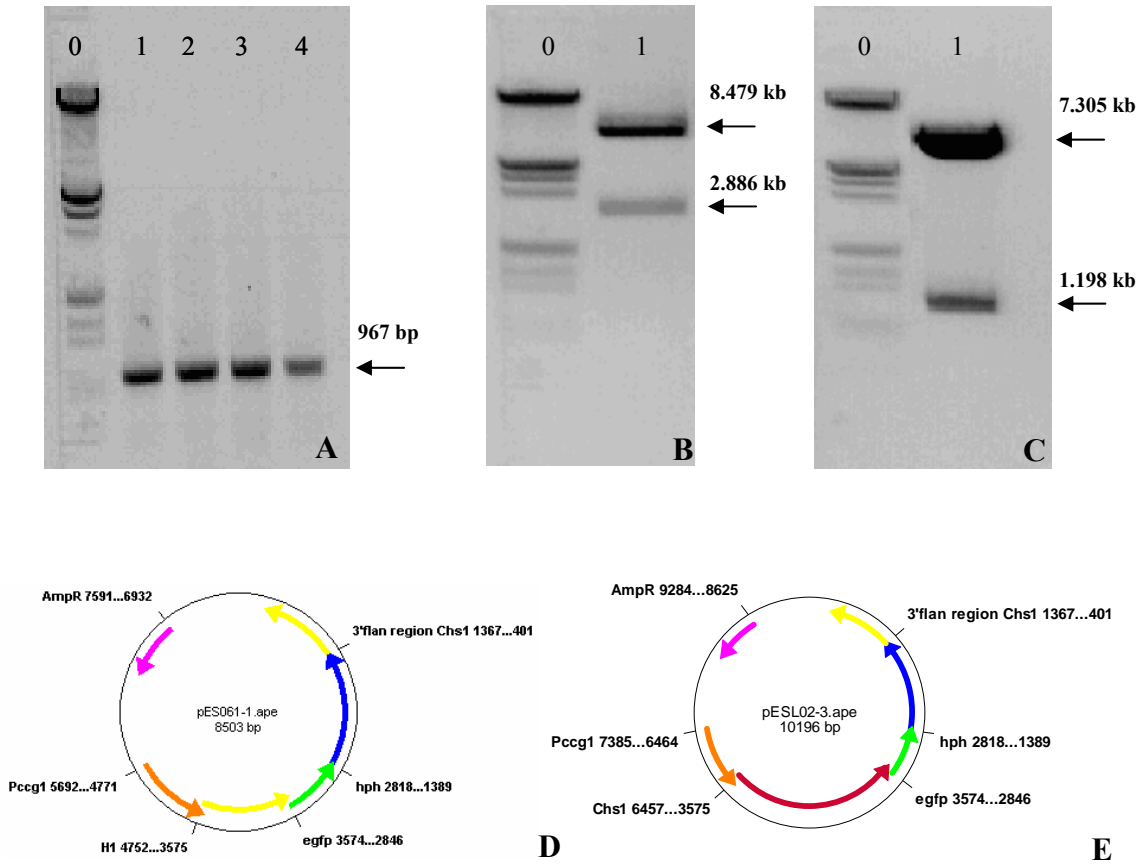


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonia de 20 cepas de *E. coli* transformadas con el vector pES061-1 [Cada banda 1-4 corresponde al resultado de 5 colonias] (A). Bandas obtenidas del producto de la digestión del vector pESL01-1 con las enzimas *Xba* I y *Pac* I (B). Bandas obtenidas del producto de la digestión del vector pES061-1 con las enzimas *Xba* I y *Pac* I (C). Diagrama del vector pES061-1 con la región 3'flanqueante de *chs1* (D). Diagrama del vector diseñado pESL02-3 con la fusión: *chs1-egfp-hph-región flanq. 3'* (E).

Para verificar el tamaño correcto y la presencia de todos los fragmentos insertados de pESL02-3 se realizó la digestión enzimática con la enzima *Kpn* I, la cual mostró un patrón esperado de 4 bandas (Fig. 8B). Las colonias transformadas (20) de *E. coli* DH5 α con el plásmido recombinante pESL02-3 se analizaron por PCR de colonia con los oligonucleótidos CHS1-*Xba*1-F-N y CHS1-*Pac*1-R-N (Fig. 8A).

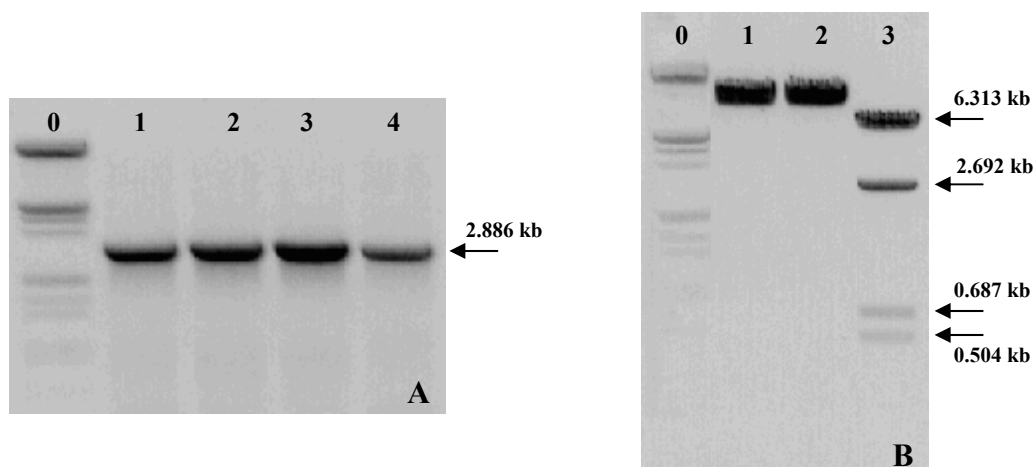


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonia de 20 cepas de *E. coli* transformadas con el vector pESL02-3 [Cada banda 1-4 corresponde al resultado de 5 colonias] (A). Bandas en carril 3 obtenidas del producto de la digestión del vector pESL02-3 con las enzimas *Kpn* I (B).

VIII. 2. Obtención y Selección de Transformantes

VIII. 2. 1. Transformantes con el Vector Recombinante pESL01-1

El vector recombinante pESL01-1 linearizado (0.5-1.0 μ g) con la enzima de restricción *Ssp* I se utilizó para transformar por electroporación conidias de *N. crassa* FGSC#9717 *mus51 his-3⁻* (Fig. 9A). La electroporación de modo exponencial dio como resultado un tiempo constante de 12.4 milisegundos, de la cual se obtuvo 134 transformantes capaces de crecer en medio sin histidina. Para confirmar la expresión de fluorescencia se revisaron 20 cepas en el microscopio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss®) para una preselección. Todas las cepas transformantes mostraron fluorescencia durante las observaciones tanto en el microscopio invertido, así como por microscopía confocal. Finalmente se seleccionó la cepa transformante heterocarionte TES1-15 (Fig. 9B) por su

estabilidad en la expresión de fluorescencia y por sus características morfológicas normales.

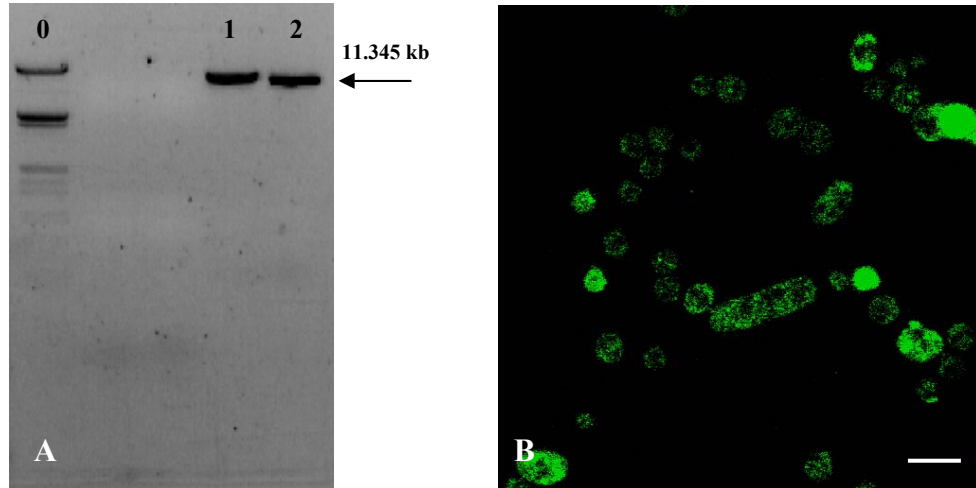


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pESL01-1 linearizado con *Ssp I* [Bandas 1 y 2] (A). Conidias de la cepa TES1-15 transformadas por electroporación con el vector pESL01-1. Esta imagen se obtuvo con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META y lente objetivo Neofluar 100X, N.A. 1.3 (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany) (B) Escala: 10 μ m.

VIII. 2. 2. Transformantes con el Vector Recombinante pESL02-3

El vector recombinante pESL02-3 linearizado (0.5-1.0 μ g) con la enzima de restricción *Ssp I* se utilizó para transformar por electroporación conidias de *N. crassa* FGSC#9718 *mus51*. La electroporación de modo exponencial dio como resultado un tiempo constante de 14 milisegundos, de la cual se obtuvo 90 transformantes resistentes a higromicina B, de las cuales se revisaron 20 cepas en el microscopio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss®) para una preselección. Todas las cepas preseleccionadas (TES2-5, TES2-9, TES2-11, TES2-14, TES2-15, TES2-16) mostraron fluorescencia durante las observaciones tanto en el microscopio invertido, así como por microscopía confocal (Fig.

10). Finalmente se seleccionó la cepa transformante heterocariote TES2-11 por su estabilidad en la expresión de fluorescencia y por sus características morfológicas indistinguibles de la cepa silvestre.

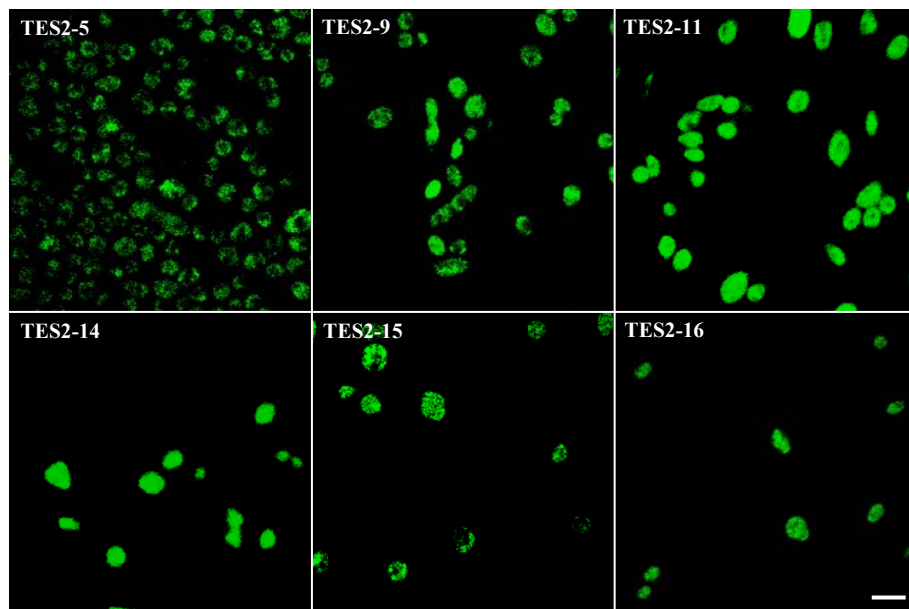


Figura 10. Imágenes de conidias transformadas con el vector pESL02-3. Esta imagen se obtuvo con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META y lente objetivo Neofluar 100X, N.A. 1.3 (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany). Escala: 10µm

VIII. 3. Comprobación de Integraciones

VIII. 3. 1. Determinación de Integraciones por PCR en TES1-15

Por medio de PCR usando los oligonucleótidos Mrp10-Mrp11 y Mrp12-Mrp13 (Tabla II), se comprobó que la inserción dirigida se realizó en el locus del gen de la proteína histidina trifuncional (*his-3*, Fig. 11A). Utilizando el primer par de

oligonucleótidos se obtuvo una banda de 3.2kb, que corresponde al fragmento amplificado del gen de la histidina con la mutación restaurada y parte del gen *sgfp*. Mientras que con el segundo par de oligonucleótidos se obtuvo una banda de 2.1kb correspondiente al fragmento obtenido del promotor *Pccg1* y parte de la región 3' flanqueante del gen *his-3* (Fig. 11B).

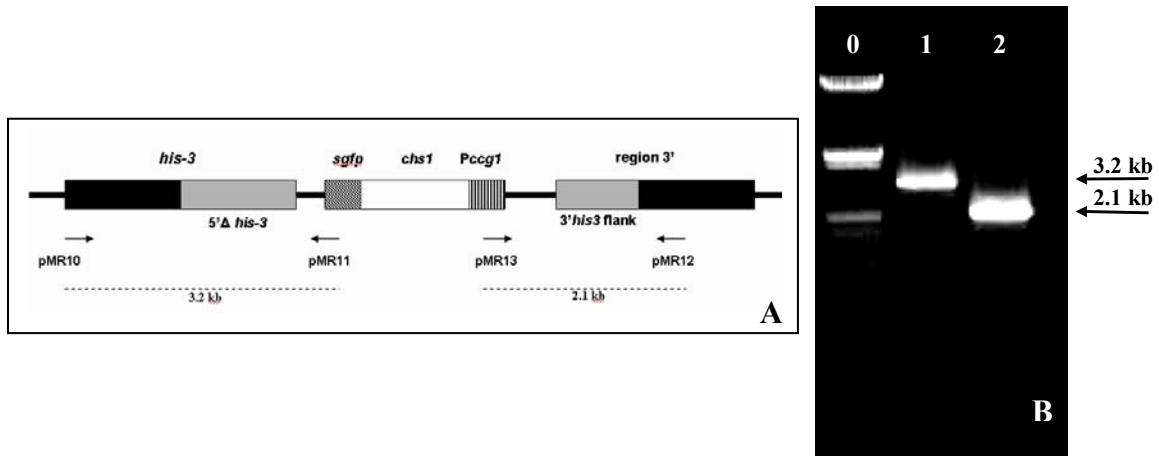


Figura 11. Diagrama de los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos en el ADN de la cepa TES1-15 (A). Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de ADN de la cepa transformante TES1-15, utilizando los oligonucleótidos Mrp10-Mrp11 [carril 1] y Mrp12-Mrp13 [carril 2] (B).

VIII. 3. 2. Determinación de Integraciones por Southern Blot

Se identificó el gen *chs1* digerido con la enzima *BamH I* a partir de ADN genómico de NES1-15, NES2-11, *N. crassa* FGSC#9717 y *N. crassa* FGSC#9718, usando oligonucleótidos aleatorios marcados con digoxigenina-dUTP que al hibridar con el anticuerpo anti-digoxigenina asociada a fosfatasa alcalina permitieron detectar una reacción quimioluminiscente al aplicarle el sustrato CSPD. En la transformante NES1-15 se identificaron 2 bandas (Figs. 12A,B y 13), una de 14,903bp y otra de 4,144bp. La banda de 3,018bp se identificó en otra placa fotográfica obtenida con tiempo de exposición mayor a

5 minutos. Esta última banda se observó con dificultad debido a que la región de inmunodetección correspondiente al gen de *chs1* fue de sólo 405bp. En la cepa control *N. crassa* FGSC#9717 se identificó correctamente una sola banda de 4,144bp correspondiente al fragmento con el gen *chs1* endógeno (Fig. 12A). En el caso de la transformante NES2-11 se detectó sólo una banda de 6,347bp correspondiente al fragmento con el gen *chs1*, no observándose el fragmento de 4,144bp, que se detectó en las cepas no transformadas. La evidencia de las bandas de tamaño correcto indican el éxito en el reemplazamiento endógeno de *chs1* por la estrategia de *knock in* (Fig. 12C). En el ADN genómico de la cepa control *N. crassa* FGSC#9718 se obtuvo una única banda de 4,144bp correspondiente al gen *chs1* (Fig. 12A). Los fragmentos de 706bp no fueron visibles probablemente por el exceso de distancia recorrida por el ADN genómico en el gel de electroforesis de 10cm de longitud y/o por el tamaño del fragmento *chs1* para la inmunodetección. Es importante notar que la ausencia de bandas extras muestran la eficacia de las cepas de *N. crassa* FGSC# 9718 y *N. crassa* FGSC# 9717 para evitar integraciones ectópicas.

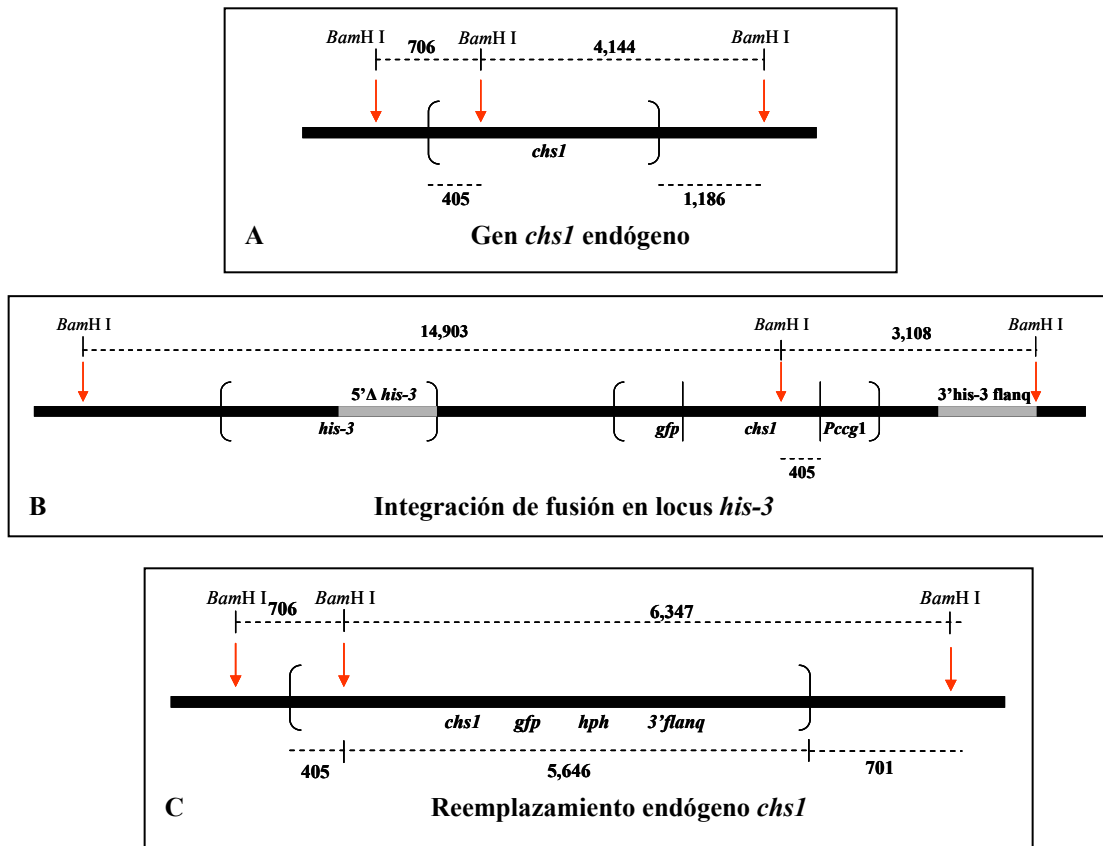


Figura 12. Diagrama de los sitios de corte de la enzima *Bam*H I en el locus del gen *chs1* en las cepas transformantes y control de *N. crassa*. Los fragmentos esperados para cada cepa corresponden a los respectivos diagramas: NES1-15 (A y B), *N. crassa* FGSC# 9717 (A), NES2-11 (C) *N. crassa* FGSC#9718 (A).

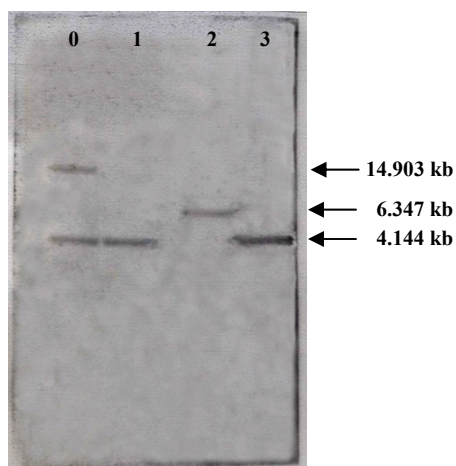


Figura 13. Placa fotográfica con las bandas obtenidas por Southern Blot correspondiente a los fragmentos liberados por digestión con la enzima *Bam*HI a partir de ADN genómico de cada una de las cepas. Los resultados del carril 0 pertenecen a la cepa NES1-15, carril 1 a la cepa *N. crassa* FGSC#9717, carril 2 a la cepa NES2-11 y carril 3 a la cepa *N. crassa* FGSC#9718.

VIII. 4. Crecimiento de Transformantes

VIII. 4. 1. Crecimiento Radial de Colonia

Todas las cepas transformantes mostraron un crecimiento radial de colonia muy similar. El promedio estuvo comprendido entre 36.5 y 45.64 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Tabla III). Aunque se observó variabilidad en el crecimiento radial de las cepas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, según la gráfica de cajas (Fig. 14). La variabilidad en el crecimiento en el hongo filamentoso *N. crassa* es normal, causado probablemente por las variaciones en las condiciones de cultivo o por razones intrínsecas del organismo. No obstante, los valores de crecimiento obtenidos en este estudio se asemejan a los obtenidos en otros estudios con *N. crassa* (Read y Hickey 2001). Es importante enfatizar que las

mediciones se realizaron por estereoscopia, factor probablemente importante para la precisión y exactitud de los datos.

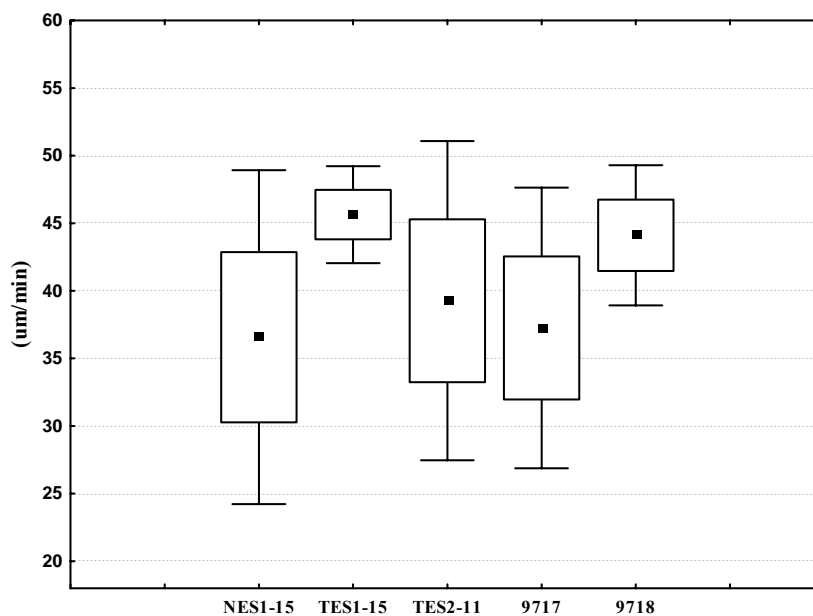


Figura 14. Crecimiento radial de colonia en caja petri de las distintas cepas transformadas y control. Las mediciones se realizaron utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12. Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).

Tabla III. Estadísticos De La Tasa De Crecimiento Radial De Colonia

<i>Cepa</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Desv.</i>
NES1-15	15	36.57	25.14	49.04	6.30
TES1-15	7	45.64	43.90	48.27	1.83
TES2-11	5	39.27	30.92	44.89	6.02
9717	8	37.25	30.93	45.87	5.30
9718	8	44.11	40.80	47.90	2.64

VIII. 4. 2. Crecimiento Hifal de Transformantes

La tasa de elongación de las hifas de las cepas transformantes fue medida a nivel microscópico mediante el uso de microscopía confocal de barrido de láser (Tabla IV). La tasa promedio más alta de crecimiento hifal la presentaron las hifas de la cepa heterocarionte TES2-11, mientras que las cepas NES1-15, TES1-15 y *N. crassa* FGSC#9718 mostraron tasas de crecimiento muy similares. La cepa *N. crassa* FGSC#9717 mostró la segunda tasa de crecimiento más alta. Es interesante notar que los valores promedios en las tasas de crecimiento hifal entre las transformantes mantienen cierto grado de variabilidad sin embargo estadísticamente no existen diferencias significativas entre ellas (Fig. 15). Es importante mencionar que las observaciones en el microscopio se realizaron por el método de bloque invertido, lo cual puede interferir con la tasa de crecimiento normal.

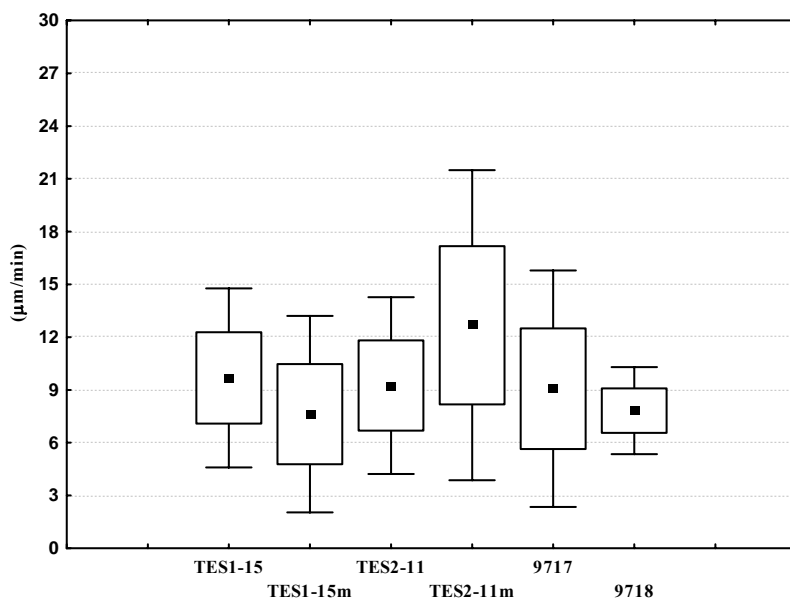


Figura 15. Crecimiento individual de las hifas de las cepas transformadas y cepas control. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).

Tabla IV. Estadísticos de la tasa de crecimiento de hifas individuales.

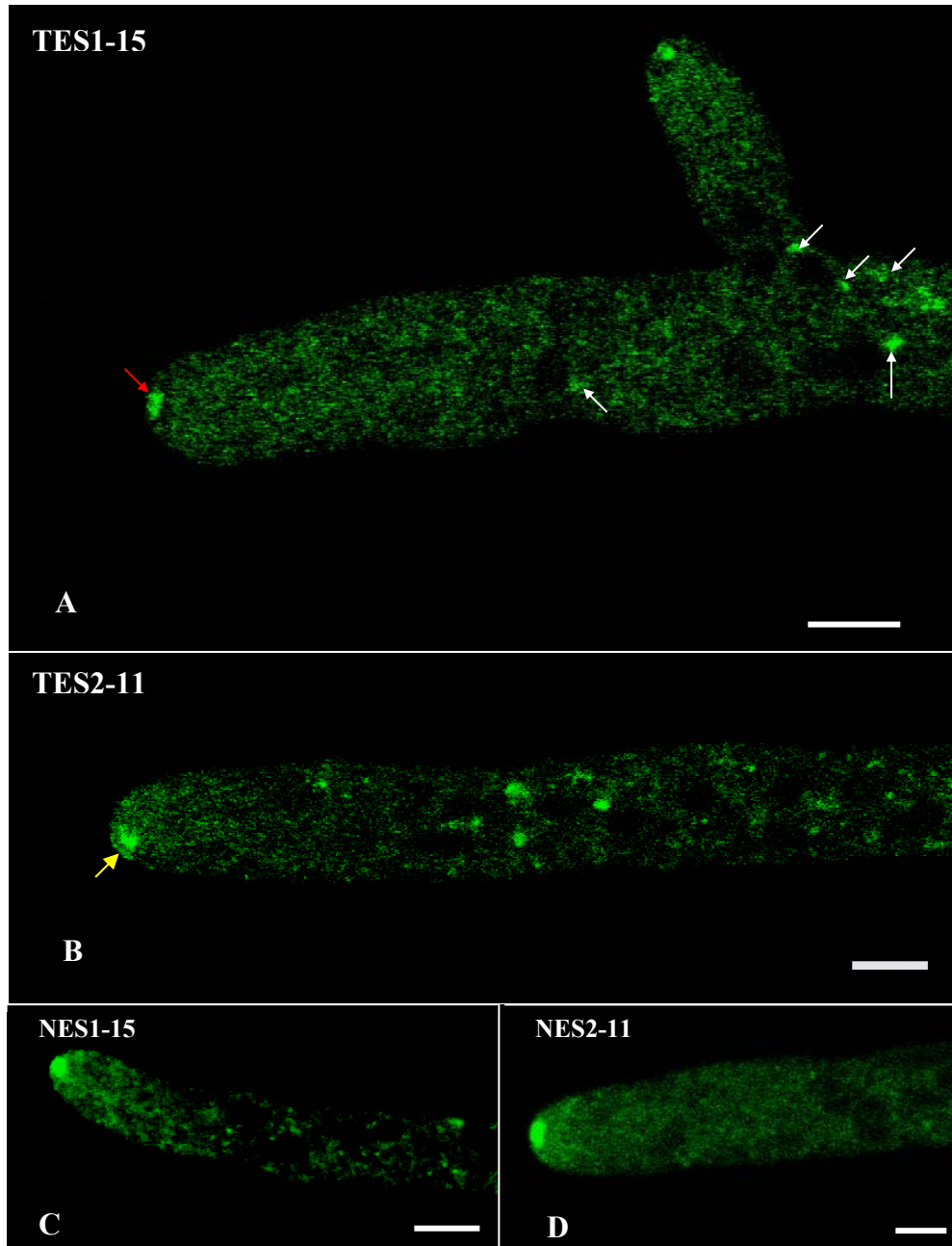
<i>Cepa</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Desv.</i>
NES1-15	346	7.62	1.76	21.33	2.85
TES1-15	217	9.68	3.30	15.51	2.59
NES2-11	57	12.68	7.88	24.14	4.50
TES2-11	152	9.25	3.78	16.88	2.56
9718	52	7.82	5.60	10.55	1.26
9717	62	9.10	2.00	15.82	3.43

VIII. 5. Microscopía de Transformantes

VIII. 5. 1. Localización de CHS-1-GFP en el Spk

Observaciones realizadas por Microscopía Confocal de Barrido con Láser en las transformantes mostraron un gran cúmulo de fluorescencia en el ápice de las hifas tanto de las transformantes *N. crassa* TES1-15 como las TES2-11 (Figs. 16A-E). No fue posible la

visualización definida de microvesículas con dimensiones tan pequeñas como los quitosomas, que fluctúan entre los 40 y 70nm de diámetro (Bracker *et al.*, 1976). Sin embargo, la posición y la morfología de la acumulación de las partículas fluorescentes en el ápice de las hifas coinciden con la localización y la forma del Spk, particularidad claramente visible cuando se compararon y se traslaparon las imágenes de contraste de fases y las imágenes fluorescentes (Figs. 16C-E). Esta estructura mostró por lo general una forma redondeada muy próxima a la punta de la hifa, rodeada de un gradiente de fluorescencia en la zona subapical. Aunque con baja frecuencia, CHS-1-GFP se logró observar también asociada o muy cercana a la membrana plasmática del domo apical de la hifa (Fig. 16B). Todas las hifas observadas revelaron de forma estable la fluorescencia en el Spk durante el crecimiento, y esto no sólo de las hifas principales sino también de las ramas laterales (Fig. 16A). Aunque en estas últimas el tamaño del Spk fue menor durante el periodo de emergencia de las ramas. A simple vista no existieron diferencias cualitativa en el marcaje fluorescente en el Spk entre la cepas transformantes con la copia de *chs1-gfp* ectópica (NES1-15 y TES1-15) y las cepas transformantes con el reemplazamiento del gen *chs1* endógeno (NES2-11 y TES2-11) fusionado a *gfp* (Figs. 16A-D). Las cepas de *N. crassa* NES tienen la característica de poseer únicamente núcleos transformantes, es decir, el ADN genómico de todos los núcleos conservan el fragmento insertado. En nuestro caso el fragmento correspondería a la fusión de CHS-1-GFP. Mientras que las cepas de *N. crassa* TES contienen núcleos transformados y no transformados, estos últimos poseen ADN sin el inserto integrado.



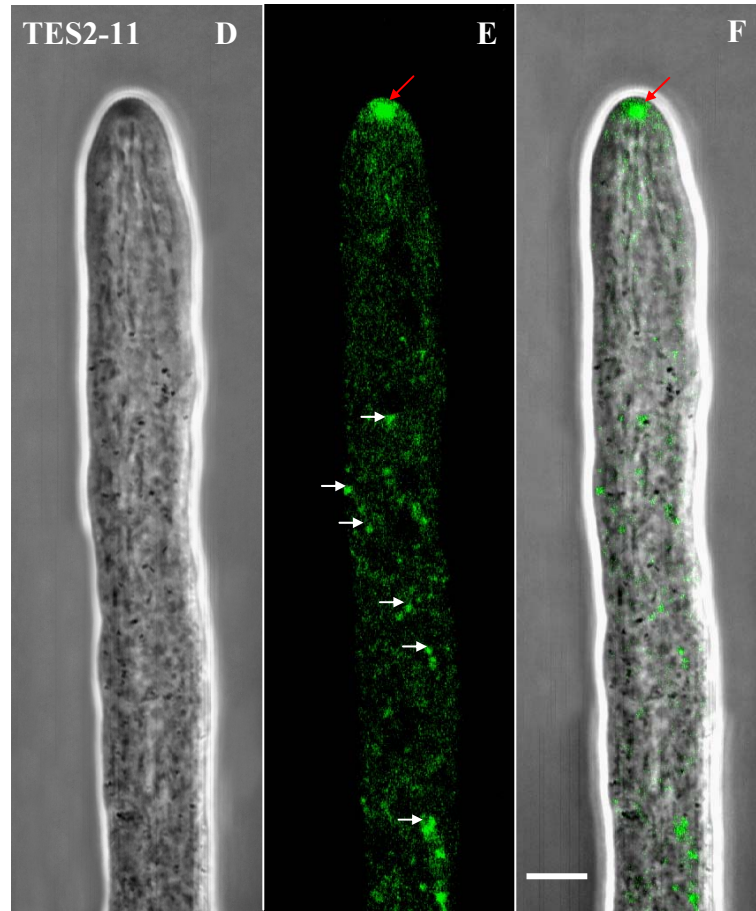


Figura 16. Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15, NES1-15, TES2-11 y NES2-11. Todas las imágenes muestran partículas fluorescentes de distintos tamaños en la región subapical (flechas blancas) y muy concentradas en el Spk (flechas rojas). La figura 16F demuestra la co-localización del Spk a través del traslape de la imagen de contraste de fases y la imagen confocal fluorescente. La fluorescencia muy cercana a la membrana plasmática se indica con la flecha amarilla en la figura 16B. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m

VIII. 5. 2. Diámetro y Área del Spk

Comparaciones en el diámetro promedio del Spk en las imágenes de microscopía confocal, revelaron una gran similitud entre las cepas transformantes NES1-15, TES1-15 y TES2-11 (Tabla V). El promedio del diámetro mayor entre todas las cepas tuvo un rango de 1.13 a 1.25 μm , con un valor máximo de 2.50 μm y uno mínimo de 0.60 μm . Los análisis estadísticos al 95% de intervalo de confianza de todas las mediciones mostraron que no hubo diferencias significativas en el tamaño del diámetro del Spk entre las diferentes cepas (Fig. 17). Valores similares a los obtenidos se han encontrado en otros estudios de crecimiento con cepas silvestres de *N. crassa* (Riquelme Pérez *et al.*, 2000). Del mismo modo se midió el área circunscrita a la fluorescencia en el Spk, donde los valores promedios estuvieron entre 0.85 y 1.15 μm^2 . El área más grande obtenida fue de 2.01 μm^2 , mientras que la menor área obtenida fue de 0.27 μm^2 . Aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los distintos datos, la gráfica de cajas muestran gran variabilidad en las áreas obtenidas entre diferentes hifas de la misma cepa (Fig. 18).

Tabla V. Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes.

	NES1-15	TES1-15	TES2-11	NES1-15	TES1-15	TES2-11
	Diámetro (μm)			Área (μm^2)		
Media	1.25	1.36	1.13	1.15	0.85	1.00
Desv.	0.27	0.34	0.26	0.42	0.20	0.42
Max	1.66	2.50	1.64	1.78	1.10	2.01
Min	0.70	0.79	0.60	0.36	0.46	0.27
n	11	38	28	11	9	28

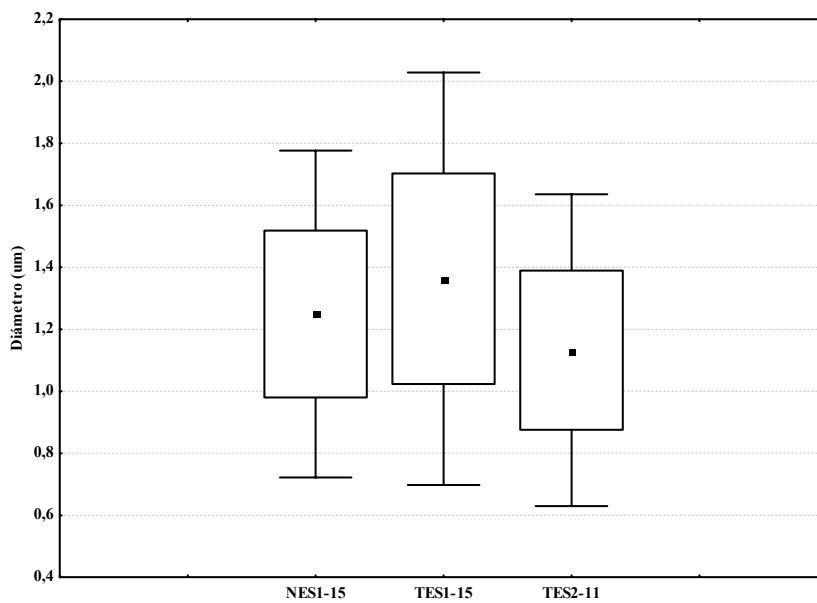


Figura 17. Diámetro del área correspondiente al marcaje con la proteína CHS-1-GFP. En la región correspondiente al Spk de las cepas transformantes. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza (I).

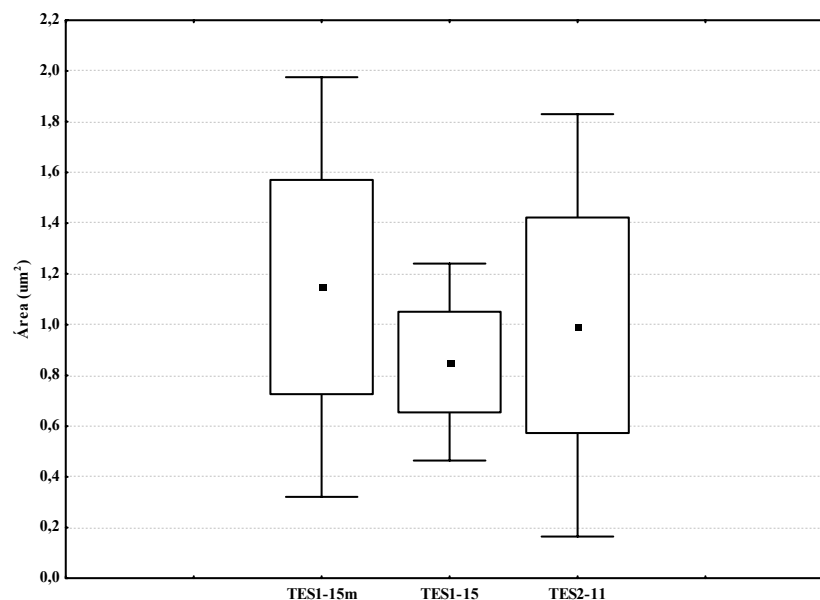


Figura 18. Área correspondiente al marcaje con la proteína CHS-1-GFP en la región correspondiente al Spk de las cepas transformantes. Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza (I).

VIII. 5. 3. Localización de CHS-1-GFP en la Hifa

Aunque no fue posible la visualización de quitosomas, observaciones realizadas en las cepas transformantes obtenidas en este estudio mostraron varias partículas (parches) fluorescentes correspondientes a CHS-1-GFP. En regiones subapicales se logró apreciar partículas fluorescentes dinámicas de tamaño variable que se encontraron distribuidas con un patrón no uniforme a lo largo de la hifa. Las partículas fluorescentes presentaron un diámetro de $0.48 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ($n=32$). No obstante la abundancia relativa de las partículas fluorescentes en la región subapical fue ligeramente distinta entre la cepa TES1-15 (heterocarionte) y NES1-15, siendo más abundantes en esta última cepa (Fig. 19). En cambio para las transformantes con reemplazamiento endógeno se apreciaron más

partículas en la cepa TES2-11 que en la cepa NES2-11. Lo mismo ocurrió para las transformantes TES2-11 y NES2-11 pero de modo inverso, es decir, en NES2-11 se apreciaron menos partículas. La mayoría de las partículas fluorescentes se encontraron no asociadas a los núcleos. Pero cercano a la envoltura de los núcleos, en la región subapical fue posible observar partículas fluorescentes que se movían juntamente con ellos (Fig. 20). Debido a la velocidad del movimiento de las partículas y la salida del plano focal de los núcleos durante las observaciones no fue posible precisar por cuanto tiempo las partículas permanecían asociadas a los núcleos. La fluorescencia que se presentó de manera discontinua y concentrada alrededor de los núcleos fue otra de las características comunes entre las transformantes TES1-15 y TES2-11 (Fig. 21). No obstante, esta característica no se observó en todos los núcleos. También fue posible examinar una reducción gradual en la intensidad de fluorescencia de zonas subapicales respecto a la zona de extensión, específicamente alrededor del Spk, siendo mayor en esta zona que en cualquier otro lugar de la hifa.

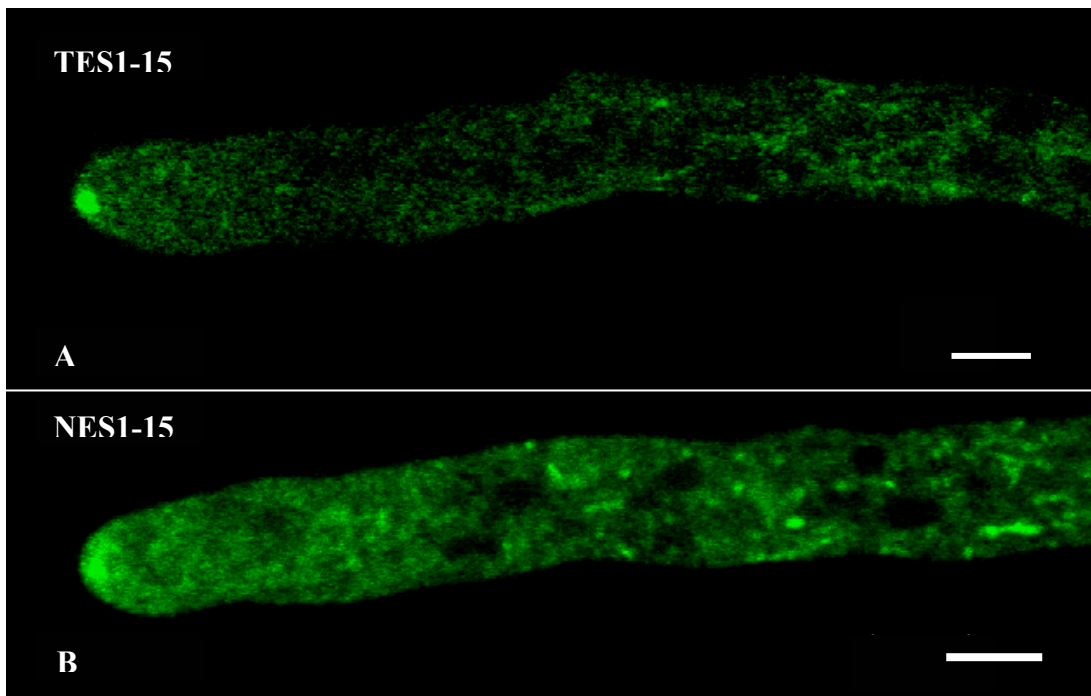


Figura 19. Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15 (A) y NES1-15 (B). Las hifas de ambas imágenes muestran partículas fluorescentes de variado tamaño en las regiones subapicales de las hifas. Nótese la mayor abundancia de partículas en la transformante NES1-15. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m.

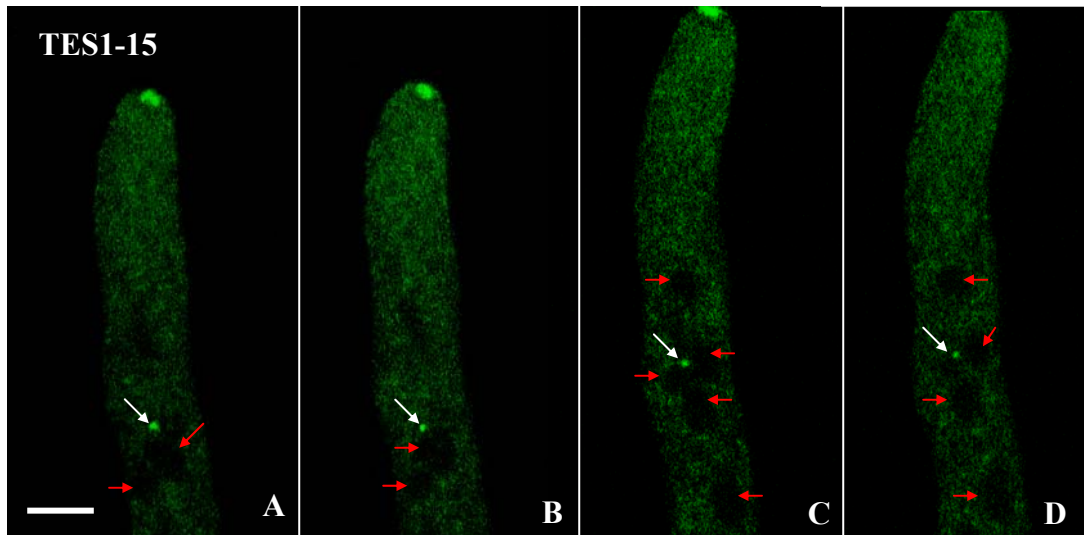


Figura 20. Imágenes confocales en serie de tiempo de una hifa de la cepa transformante TES1-15 mostrando una partícula o grupo de partículas fluorescentes (flecha blanca) muy cercano a los núcleos (flecha roja) en una misma hifa [Figura A: 6.04seg; B:12.1seg; C: 60.4seg; D:66.5seg]. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m.

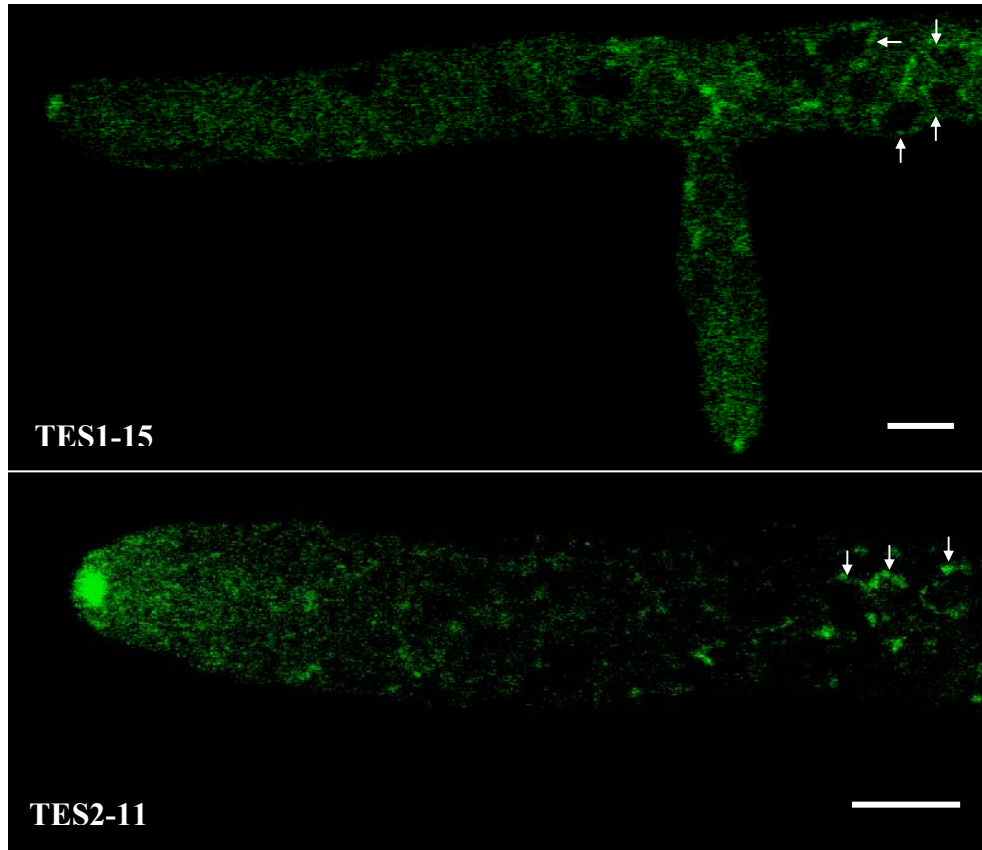


Figura 21. Imágenes confocales de las cepas transformantes TES1-15 y TES2-11. Se puede apreciar en ambas transformantes fluorescencia (flechas blancas) alrededor de los núcleos (espacios en negro) de manera discontinua. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m.

En regiones más distales de las hifas fue posible observar un patrón de marcaje tubular y alargado en la zona citoplasmática (Fig. 22A). Las estructuras tubulares, posiblemente vacuolares, podían distinguirse por la continuidad que existía entre algunas de ellas. También fue posible observar en estas regiones gran concentración de fluorescencia contenida en cuerpos vacuolares esféricos de gran tamaño que en imágenes en serie de tiempo se observaron atravesando los poros del septo, y continuar su migración respecto al flujo citoplasmático (Fig. 22B). Los cuerpos esféricos de gran tamaño pasaban

por el poro septal debido a la flexibilidad de estos. En algunas ocasiones fue posible observar como se fragmentaban en cuerpos más pequeños o como aumentaban de tamaño por fusión de varios cuerpos esféricos más pequeños, durante el paso de un compartimento a otro.

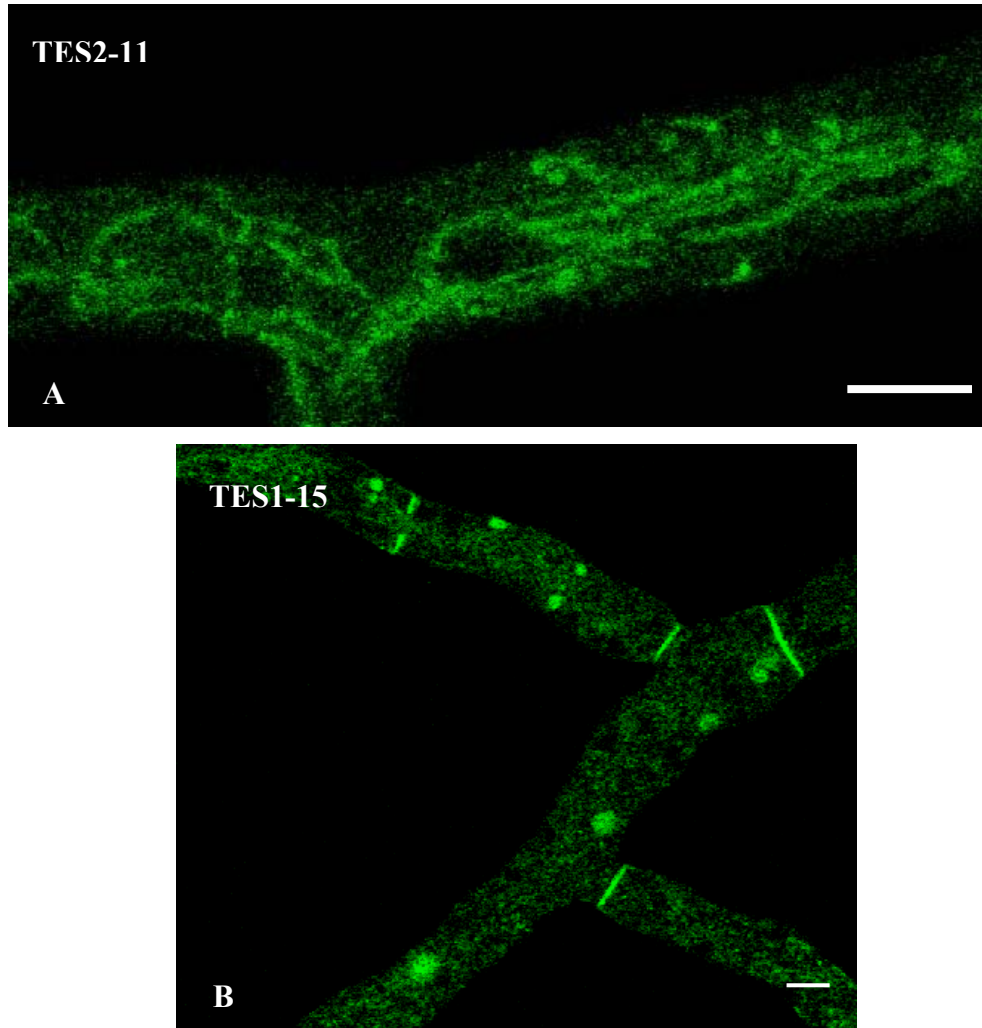


Figura 22. Imágenes confocales de las cepas transformantes TES2-11 (A) y TES1-15 (B). Se puede apreciar en la cepa transformante TES2-11 la presencia de fluorescencia en estructuras alargadas a lo largo de la hifa (A). se puede ver además de septos marcados, cuerpos esféricos tipo vacuolas en las hifas (B). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m

VIII. 5. 4. Localización de CHS-1-GFP en Septos

Previo a la formación del septo de las cepas transformantes, la presencia de CHS-1-GFP se hizo evidente inicialmente por la fluorescencia acumulada temporalmente en las paredes laterales (Fig. 23A), y luego de manera gradual esta se desplazaba perpendicularmente hacia el centro de la hifa donde se formaría el poro simple, proceso que llevó 6.5 ± 2.0 minutos ($n=5$). Las imágenes confocales en serie de tiempo revelan en la hifa únicamente la rebanada óptica durante la septación. Sin embargo, se obtuvo una reconstrucción de 10 rebanadas ópticas y se logró obtener una imagen en 3D donde fue posible apreciar la presencia casi total de CHS-1-GFP en el septo, excepto en el poro (Fig. 23B). Aproximadamente el septo se formó entre los 5.2 y 9.4 minutos dependiendo del diámetro de la hifa. Considerando un tamaño promedio del poro del septo simple de *N. crassa* de $0.5 \mu\text{m}$ de diámetro (Hunsley y Gooday 1974), la velocidad de formación del septo en área fue de $6.04 \mu\text{m}^2/\text{min}$ ($n=5$). La permanencia temporal de la proteína CHS-1-GFP en el septo, fue más extensa que el tiempo necesario para que esta llegue hasta el poro septal (Fig. 24). En septos maduros o formados completamente no se observó marcaje fluorescente (Fig. 26B, C).

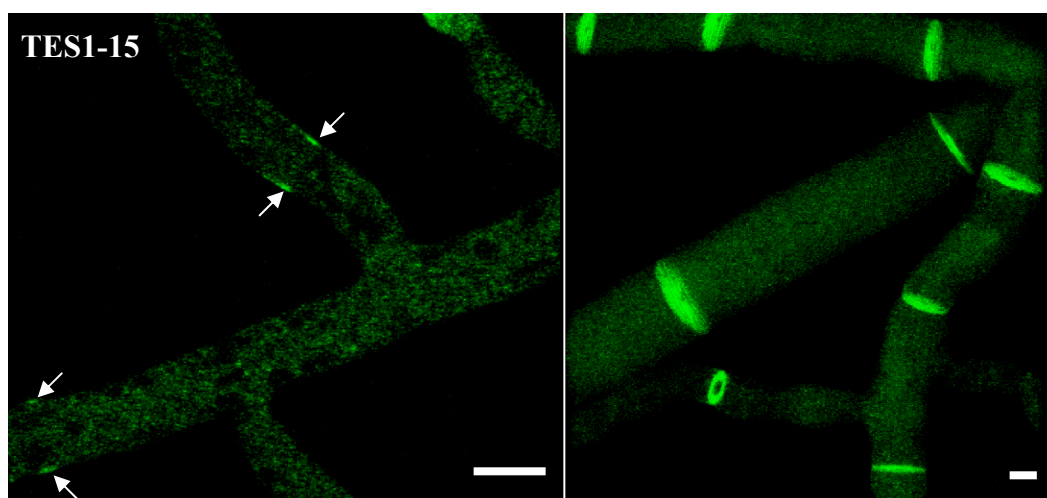


Figura 23. Imágenes confocales de la cepa transformante TES1-15. La imagen 23A corresponde a una región de formación de septos. Nótese la gran acumulación de fluorescencia (flechas blancas) en la zona donde se dará lugar a la formación del septo. La imagen 23B corresponde a una imagen en 3D formada con 10 rebanadas ópticas de $1.01\mu\text{m}$. Nótese la fluorescencia muy marcada en septos recién formados. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: $5\mu\text{m}$

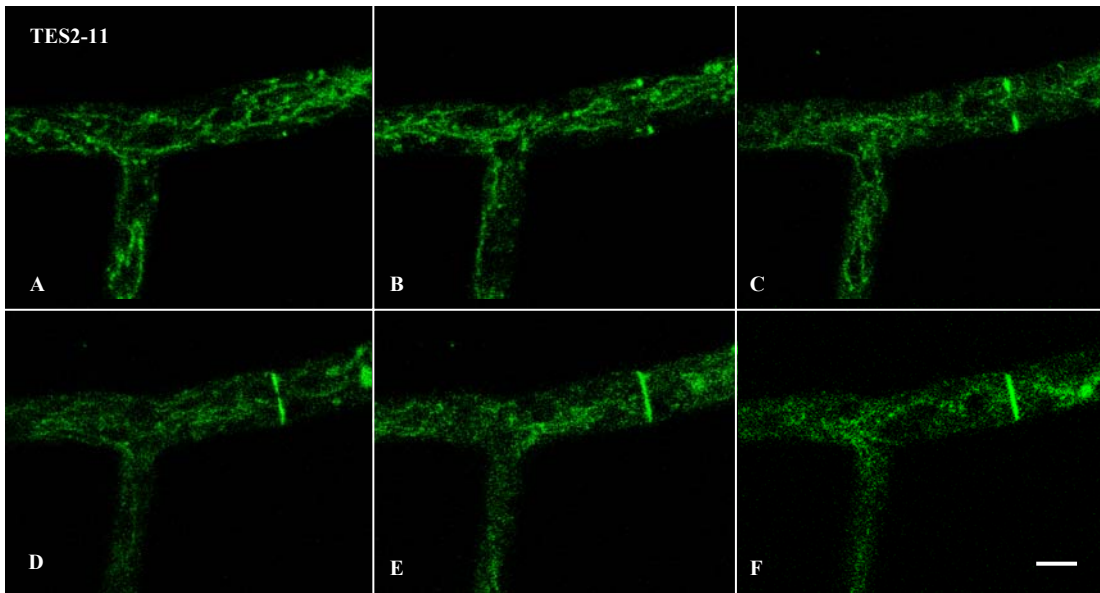


Figura 24. Imágenes confocales en serie de tiempo de la cepa transformante TES2-11. Las imágenes fueron tomadas en una región no muy lejos del ápice de la hifa, donde ocurre normalmente la formación de septos. Nótese la gran acumulación de partículas fluorescentes en la zona de iniciación del septo y cómo esta concentración de proteínas sigue un curso uniforme en dirección y forma. Tiempo aproximado de formación del septo en esta hifa fue de 6.5 minutos. [Tiempo, Figura A: 0seg; B: 97seg; C: 207seg; D: 268seg; E: 305seg; F: 390seg]. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 5 μ m

VIII. 5. 5. Marcaje de Transformantes con FM4-64

Imágenes por microscopía confocal de barrido de láser permitieron revelar la localización celular de este marcador en las hifas de los organismos transformantes. La sonda fluorescente FM4-64 se pudo detectar en el Spk, membrana plasmática, septos, vacuolas y en parches a lo largo de las hifas examinadas. En el Spk fue muy evidente la colocalización del marcador FM4-64 con la expresión de fluorescencia debido a CHS-1-GFP (Fig. 26A). Las imágenes de colocalización mostraron que la zona o el área de

marcaje de CHS-1-GFP en el Spk estaba restringida a una zona central menos extensa que la fluorescencia obtenida con el marcador FM4-64. Mediciones del área debido a los dos marcadores mostraron que FM4-64 abarca una mayor área en la región del Spk (Tabla VI). Sin embargo estas diferencias no fueron significativas (Fig. 25). La sonda fluorescente FM4-64 también se detectó en la membrana plasmática de las células tratadas, no obstante el marcaje fue más evidente en la región subapical distal que en la zona apical y subapical proximal. No se apreció la colocación de FM4-64 en partículas fluorescentes en el interior de la hifa. Durante la formación de los septos se pudo distinguir que la colocación de CHS-1-GFP con el FM4-64, ocurre de manera temporal. Por ejemplo, el marcaje de FM4-64 en septos previamente formados se mantuvo durante las observaciones mientras que la fluorescencia debida a CHS-1-GFP fue nula en estas estructuras (Figs. 26B-D). No obstante, en hifas con septos en desarrollo la colocación de FM4-64 y CHS-1-GFP fue notoria (Figs. 26E-G). En cuerpos vacuolares esféricos la fluorescencia correspondiente a FM4-64 fue circunscrita únicamente a la membrana mientras que en su interior se observó exclusivamente fluorescencia debida a CHS-1-GFP (Figs. 26B-G). La presencia de vacuolas fluorescentes se apreció únicamente en regiones distales de la hifa, y por lo regular el flujo de estas estructuras siempre fue en dirección al ápice. En las regiones subapicales de las hifas fue notable la presencia de parches fluorescentes de morfología variable que no colocaban con partículas que expresaban CHS-1-GFP (Fig. 22B).

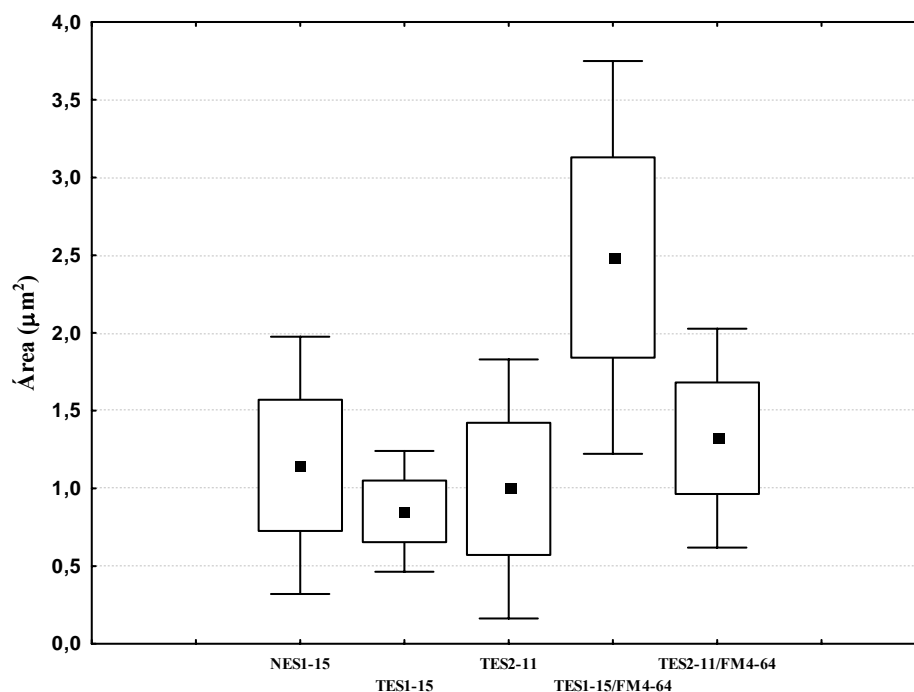


Figura 25. Área correspondiente a las vesículas marcadas con la proteína CHS-1-GFP en la región del Spk de las cepas transformantes comparada con el área marcada en el Spk con la sonda fluorescente FM4-64 (25uM). Las mediciones se realizaron bajo el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza al 95%(I).

Tabla VI. Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes.

Cepas	n	Media (µm ²)	Min	Max	Desv.ST
NES1-15	11	1.15	0.36	1.78	0.42
TES1-15	9	0.85	0.46	1.10	0.20
TES2-11	28	1.00	0.27	2.01	0.42
TES1-15FM4-64	9	2.49	1.43	3.43	0.64
TES2-11 FM4-64	10	1.32	0.74	1.83	0.36

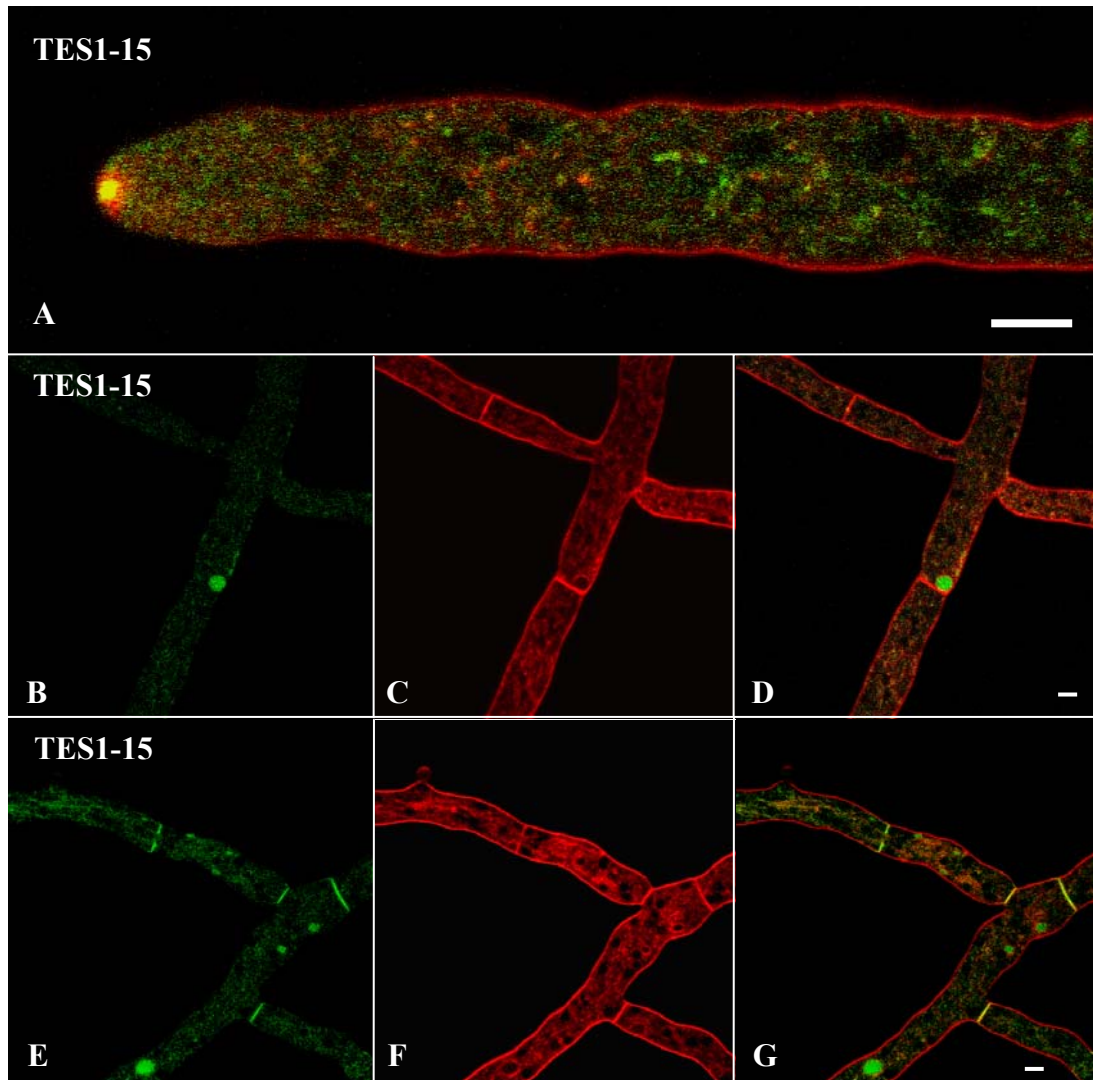


Figura 26. Imágenes confocales con la cepa transformante TES1-15 tratadas con la sonda fluorescente FM4-64 ($25\mu\text{M}$). Nótese la colocalización de la CHS-1-GFP con FM4-64 en el Spk (A), en septos previamente formados (B-D) y en septos en formación (E-G). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: $5\mu\text{m}$

VIII. 5. 6. Efecto de BFA en Transformantes

Las observaciones se hicieron después de 5 minutos de haber aplicado el inhibidor de manera directa sobre el micelio de los organismos transformantes. El efecto de la BFA sobre las transformantes fue notable por las diferencias en las características morfológicas de las hifas, como también por la distribución característica en el marcaje de la CHS-1-GFP en la región apical. Durante el inicio de las observaciones, en las hifas tratadas con el inhibidor, fue posible observar la presencia del Spk, aunque el área de marcaje correspondiente a CHS-1-GFP se vio incrementada (Figs. 27A-C). Esto posiblemente sugiere que el tráfico de vesículas con CHS-1-GFP no fue interrumpido por el efecto de BFA. Se ha demostrado que BFA altera los procesos de secreción de proteínas perturbando el tráfico de vesículas entre el retículo endoplasmático y Golgi, y el transporte post-Golgi (Cole *et al.*, 2000). El área promedio de marcaje en el Spk de las células no tratadas estuvo comprendido entre 0.85 y $1.15\mu\text{m}^2$, mientras que en las células tratadas el área fue mayor a $2\mu\text{m}^2$ (Tabla VII, Fig. 29). Otro efecto apreciable en la exposición prolongada de las células con BFA fue la dispersión de la fluorescencia en el ápice de las hifas (Figs. 27A, C), causando algunas veces la disrupción del Spk. El marcaje de CHS-1-GFP en este último caso se presentó no delimitado al lugar donde se encuentra el Spk, mostrándose parches y cúmulos cerca de la región apical (Fig. 27C). En regiones subapicales no se apreciaron cúmulos de fluorescencia en el citoplasma o alrededor de los núcleos (Fig. 27A). Se observó que el inhibidor también provocaba el desarrollo morfológico anormal de las hifas tales como ramificación dicotómica abundante (Fig. 28), reducción del diámetro celular y muchas veces muerte celular.

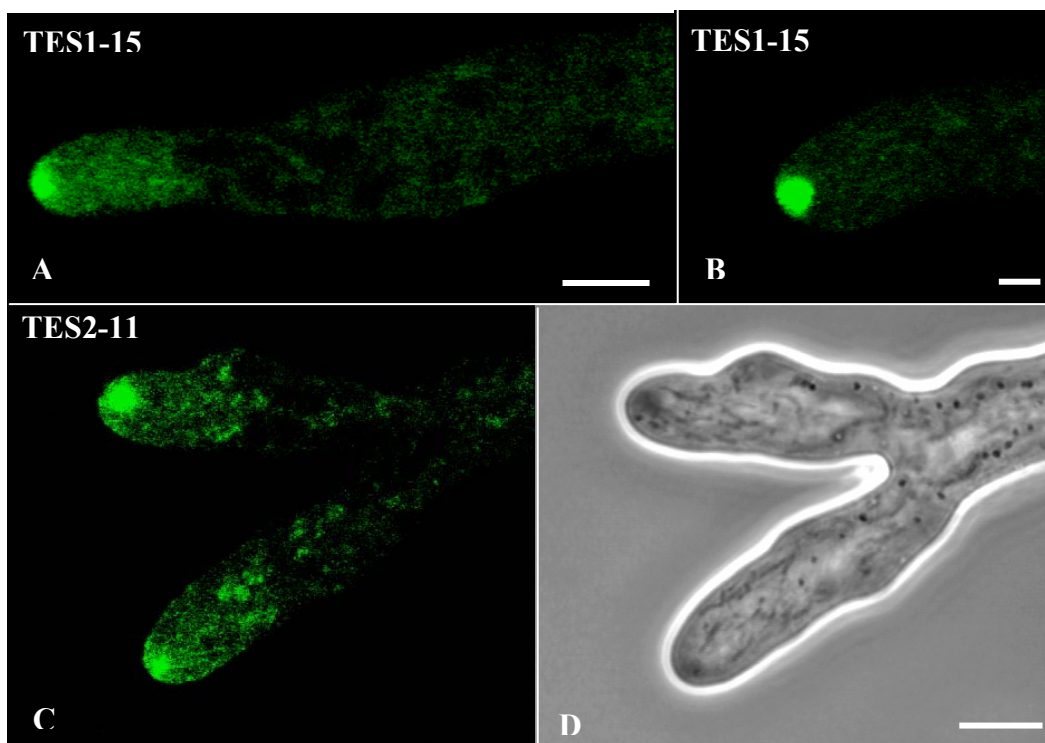


Figura 27. Todas las imágenes muestran el efecto del inhibidor BFA (100 μ g/ml) sobre las hifas de las cepas transformantes. Nótese en las imágenes la acumulación excesiva de fluorescencia (A-C). Observe el efecto de la BFA en el incremento de tamaño del Spk (B). En la cepa TES2-11 se puede observar CHS-1-GFP dispersa y distribuida en parches de gran tamaño. El inhibidor fue aplicado sobre la zona de extensión del micelio de forma directa. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con los lentes objetivos Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: A,D: 5 μ m; B: 2 μ m

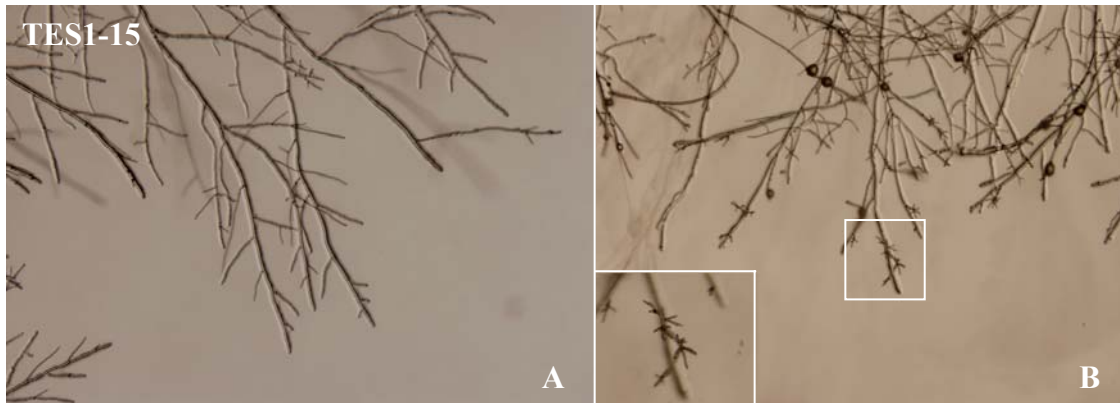


Figura 28. Imágenes en bajo aumento de la cepa transformante TESI-15 antes (A) y después (B) del tratamiento con el inhibidor (BFA, 100 μ g/ml). Nótese la diferencia en la morfología de las regiones apicales entre las dos imágenes. En el recuadro de la imagen B se puede observar un aumento donde la hifa principal se ha ramificado en hifas más cortas. Las imágenes fueron obtenidas con el estereoscopio SZX12 (Olympus®).

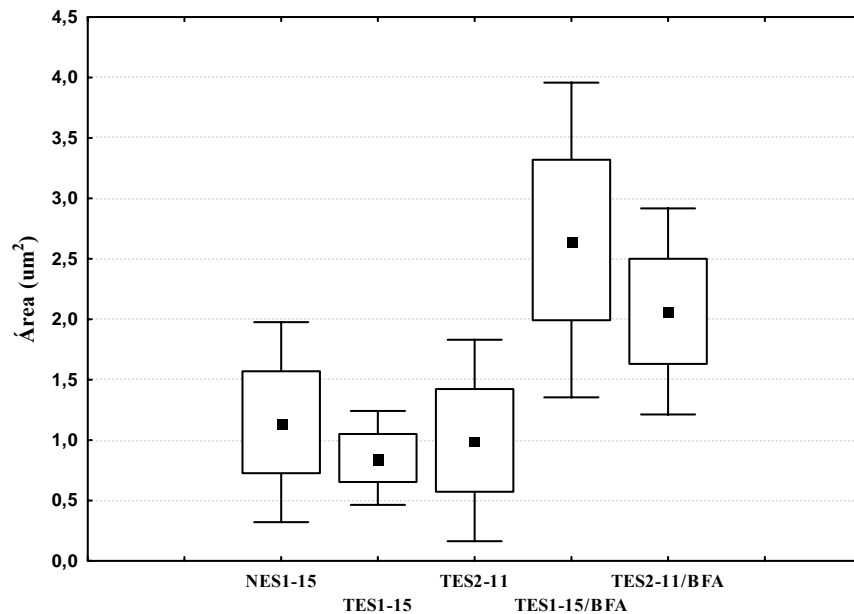


Figura 29. Área del Spk de cepas transformantes tratadas con BFA (100 μ g/ml). Las mediciones se realizaron sobre imágenes obtenidas en el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META. Media (■), Desviación Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I).

Tabla VII. Estadísticos del diámetro y área de marcaje de la CHS-1-GFP en el Spk de transformantes.

<i>Cepa</i>	<i>n</i>	<i>Media (μm^2)</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Desv.ST</i>
NES1-15	11	1.15	0.36	1.78	0.42
TES1-15	9	0.85	0.46	1.10	0.20
TES2-11	28	1.00	0.27	2.01	0.42
TES1-15/BFA	5	2.66	1.58	3.26	0.66
TES2-11/BFA	8	2.07	1.40	2.63	0.43

IX. Discusión

En este estudio se localizó por primera vez la CHS-1 marcada con GFP en hifas en crecimiento del hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Estructuras fluorescentes correspondientes a CHS-1-GFP fueron localizadas en: a) la región apical en un área que coincide con la posición del Spk de hifas maduras en crecimiento y ramificaciones, b) partículas dispersas en el ápice de las hifas alrededor del Spk y en la membrana plasmática, c) pequeñas estructuras de variado tamaño en la región subapical de la hifa, d) estructuras vacuolares esféricas y cilíndricas en zonas distales de la hifa y en e) sitios de formación del septo.

Para la obtención de las cepas transformantes de *N. crassa* que se lograron en este estudio, se utilizaron dos tipos de vectores recombinantes con el propósito de efectuar la integración de la fusión *chs1-gfp* tanto de manera ectópica como por reemplazamiento del gen endógeno (*knock in*) en el genoma de cepas de *N. crassa*. La ausencia de defectos morfológicos o de crecimiento en la cepa transformante que se reemplazó el gen endógeno con la fusión *chs1-gfp*, confirma la viabilidad de las fusiones en la estrategia de *knock in* en *N. crassa* en este trabajo, debido a que estudios anteriores han demostrado que defectos funcionales en CHS-1 provocan la aparición de rasgos anormales en la morfología de las hifas como densidad de hifas dispersa, ausencia de conidiación y reducción del crecimiento en un 80% (Yarden y Yanofsky 1991). La inexistencia de diferencias marcadas en la fluorescencia expresada entre las cepas TES1-15 y TES2-11 sugieren que el promotor endógeno de *chs1* es igual y suficientemente fuerte, como el promotor *cgg-1* (Freitag *et al.*, 2004), para hacer visible a CHS-1-GFP. Independientemente del promotor la CHS-1 se

traduce a niveles similares y cuenta con la información básica para ser transportada hacia el ápice celular. Esta característica también sugiere que *chs1* se está expresando de manera constitutiva en la célula, aunque es necesario realizar un “Northern blot” para confirmarlo. En este estudio se logró por primera vez en el hongo filamentoso *N. crassa* el reemplazamiento de un gen endógeno por una fusión del mismo gen con la GFP y un marcador de selección, estrategia denominada *knock in* que se ha utilizado en estudios moleculares en otros hongos (Colot *et al.*, 2006; Ninomiya *et al.*, 2004). Esta novedosa estrategia facilitaría los estudios a nivel microscópico de proteínas en *N. crassa*, evitando realizar transformaciones con integraciones ectópicas, que tiene la desventaja de: a) causar probables mutaciones por RIP (Repeat-Induced Point Mutation, Mutaciones Inducidas Puntuales y Repetidas) (Cambareri *et al.*, 1991), b) provocar una sobre expresión del gen y c) causar posibles defectos en estudios de localización celular.

Los resultados de las observaciones con microscopía confocal de este estudio demuestran que CHS-1-GFP en ápices de hifas en crecimiento se concentran en una región circular conspicua que concuerda con la posición del Spk. La colocalización observada en el Spk durante el análisis de las hifas con la sonda fluorescente FM4-64 demuestran que CHS-1-GFP se limita al núcleo o región central del Spk. Sin embargo, alrededor del Spk en la región apical se observó una nube de partículas fluorescentes en casi todas las hifas, creando un gradiente de fluorescencia respecto a la zona subapical. Es importante mencionar que la fluorescencia debida a CHS-1-GFP en el Spk fue limitada únicamente a hifas en crecimiento. Esta evidencia probablemente sugiere que la quitina sintetasa de clase III de *N. crassa* cumple un rol importante en el crecimiento polarizado de las hifas en

crecimiento. En este caso en específico en la formación de la pared celular de los ápices. Esto coincide con algunas de las conclusiones de estudios efectuados anteriormente sobre la participación de las quitina sintetasas de clase III en el crecimiento de hongos filamentosos (Mellado *et al.*, 1996; Yanai *et al.*, 1994; Yarden y Yanofsky 1991). Aunque hay evidencia que la disrupción de la expresión de algunas proteínas de clase III en *A. fumigatus* y *U. maydis* no provocan ningún efecto fenotípico apreciable (Mellado *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2006).

La naturaleza dinámica y variabilidad morfológica de estructuras marcadas con CHS-1-GFP sugiere la existencia de un sistema de distribución y/o almacenamiento específico de las microvesículas (quitosomas) contenedoras de CHS-1-GFP. La morfología, concentración y presencia continua del marcaje fluorescente de posibles quitosomas con CHS-1-GFP en el Spk durante el crecimiento de las hifas revelan no sólo la importancia en el desarrollo estructural de la pared celular fúngica, sino que confirma la integración de los quitosomas en el conjunto de vesículas que forman parte del complejo multivesicular. El límite de resolución de la microscopía confocal no es suficiente para observar microvesículas menores a 100nm bien definidas. No obstante, para confirmar que CHS-1-GFP forma parte de la composición de los quitosomas, es necesario aislar las microvesículas por ultracentrifugación y detectar la fusión por Western blot. Recientemente, estudios efectuados en *N. crassa* con las fusiones CHS-3-GFP y CHS-6-GFP revelaron que ambas localizan en la región del Spk (Riquelme Pérez *et al.*, 2007), además se lograron aislar quitosomas e identificaron por Western blot bandas de mayor peso molecular respecto a la GFP (Verdín *et al.*, sin publicar). Asimismo se lograron

observar la presencia de partículas vesiculoides y cuerpos globulares en sectores subápicales, mientras que en zonas distales el marcaje fluorescente fue observado en una red de compartimentos tubulares de forma irregular y en vesículas esféricas (Riquelme Pérez *et al.*, 2007). Los resultados de este último estudio demuestran un patrón no muy distinto de localización de CHS-1-GFP respecto a las observaciones realizadas por Riquelme y colaboradores, excepto la presencia de CHS-1GFP en la membrana plasmática. Esto sugiere una alta probabilidad de que las quitina sintetasas sean distribuidas en una única población de quitosomas. Sin embargo, es preciso identificar la composición molecular de los quitosomas. Para ello se necesitaría realizar estudios de microscopía inmunoelectrónica con anticuerpos monoclonales para cada quitina sintetasa. Contrario a lo mencionado por Sietsma y colaboradores (1996), que probablemente las isoenzimas formadoras de quitina provengan de distintas poblaciones de quitosomas. Lo anterior fue una hipótesis abierta en estudios de inmunolocalización con anticuerpos policlonales obtenidos a partir de Chs2p de *S. cerevisiae*, que permitieron marcar vesículas en los ápices de hifas de *N. crassa* y que por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) revelaron que sólo un 10% de la población de microvesículas fueron detectadas con el anticuerpo (Sietsma *et al.*, 1996).

La presencia condensada, temporal y gradual de CHS-1-GFP durante el desarrollo del septo demuestra que la proteína está involucrada de manera directa en la formación de pared celular de esta estructura celular. Imágenes confocales en series de tiempo durante la septación, mostraron que el desarrollo del septo ocurre desde el perímetro interno de la hifa hacia el interior, hasta llegar al poro septal. Estos resultados aluden a la existencia de un

mecanismo de regulación muy bien orquestado de las proteínas encargadas de la formación de pared celular en el septo, como ocurre en la formación del anillo de quitina y desarrollo del septo primario en la yemación de la levadura *S. cerevisiae* (Cabib *et al.*, 2001). El patrón de marcaje fluorescente en septos incipientes fue similar a lo observado en cepas de *N. crassa* con CHS-3-GFP y CHS-6-GFP (Riquelme Pérez *et al.*, 2007). Esto sugiere la posibilidad que quitina sintetasas de diferentes clases mantengan la misma función de formación de pared celular para dar lugar al septo, como se ha visto en estudios con otras especies de hongos (Amnuaykanjanasin y Epstein 2006; Ichinomiya *et al.*, 2005; Mellado *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2006). Esto explica porque en estudios anteriores la inactivación de *chs1* no provocó ningún efecto anormal en los septos de *N. crassa* (Yarden y Yanofsky 1991). La localización de otras quitina sintetasas en sitios de formación de septos, explica porqué no se observan en estos defectos morfológicos o de frecuencia cuando algún gen *chs* se encuentra inactivado (Din *et al.*, 1996; Yarden y Yanofsky 1991). Es muy probable que varias quitina sintetasas sean las que estén involucradas en la formación de septos en *N. crassa*, como se ha visto en otras especies fúngicas (Amnuaykanjanasin y Epstein 2006; Ichinomiya *et al.*, 2005; Mellado *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2006). La presencia de fluorescencia en la membrana plasmática observada en el inicio de formación de septos en las cepas transformantes con CHS-1-GFP, fue una característica distinta a lo reportado con las cepas de *N. crassa* con CHS-3-GFP y CHS-6-GFP. Esto sugiere la posibilidad de que CHS1 posea funciones adicionales en la formación del septo, distintas a las quitina sintetasas de otras clases. No obstante, aún no se conoce si todas las quitina sintetasas están activas al mismo tiempo durante la septación o si su actividad está controlada por los mismos factores de regulación.

Las características de marcaje fluorescente en las cepas tratadas con el inhibidor demuestran que las microvesículas que transportan a CHS-1-GFP posiblemente no siguen la ruta convencional de secreción, como se ha demostrado en otras proteínas de secreción (Nickel 2005). La presencia continua de vesículas en el Spk de las células tratadas y la ausencia de cúmulos fluorescentes en estructuras tipo retículo endoplasmático o equivalentes de Golgi, revelan que el transporte continuo de quitosomas hacia el ápice no fue alterado por el inhibidor BFA. Aunque después de una exposición prolongada con el inhibidor provocaba una disrupción del Spk; esto probablemente se deba por el efecto de BFA en otros procesos celulares. Riquelme y colaboradores (2007) al estudiar en células de *N. crassa* el efecto de BFA con un marcador fluorescente conjugado (BFA-bodipy 558/568), no encontraron colocalización de los organelos del sistema endomembranal con CHS-3-GFP y CHS-6-GFP. Concluyendo que CHS-3 y CHS-6 no siguen la ruta convencional de secreción Retículo Endoplasmático-Golgi (Riquelme Pérez *et al.*, 2007). Debido a la semejanza en el marcaje de CHS-1-GFP y CHS-3-GFP/CHS-6-GFP, es muy probable que se llegue a una conclusión similar a la obtenida por estos autores. En otros estudios se ha encontrado que la distribución de la fluorescencia de proteínas marcadas con GFP en cepas de *N. crassa* y que residen en el Retículo Endoplasmático, no se parece al patrón de marcaje de ninguna de las cepas obtenidas en este estudio (Bowman *et al.*, 2007). Aunque los efectos de este inhibidor perturban los procesos de secreción en células eucariotas, las respuestas pueden ser diferentes entre células animales, plantas y levaduras, y aún entre hongos filamentosos (Bourett y Howard 1996; Cole *et al.*, 2000; Nebenfuhr *et al.*, 2002; Riquelme Pérez *et al.*, 2007).

La presencia de CHS-1-GFP en el lumen de vacuolas esféricas de las cepas transformantes, y su comportamiento se asemeja a lo observado en los estudios realizados por Riquelme y colaboradores (2007). Los autores sugieren que probablemente estas estructuras actúen como reservorios de CHS, que en su momento descargan su contenido para suplir de estas enzimas hacia los sitios de síntesis activa de pared celular en la zona apical. Aunque no se puede descartar la posibilidad que las vacuolas contengan CHS-1-GFP reciclada. Las características de marcaje de CHS-1-GFP en las diferentes estructuras observadas revelan un sistema de distribución subcelular específico para este tipo de proteínas.

X. Conclusiones

La quitina sintetasa CHS-1 de Clase III en el hongo filamentoso *N. crassa* localiza en el Spk de hifas en crecimiento y ramificaciones, en sitios de formación del septo y en estructuras específicas morfológicamente variables. Además la presencia de CHS-1-GFP en compartimentos vacuolares y tubulares esféricos, y la ausencia de efectos de BFA en la secreción de esta proteína relaciona a CHS-1 en un sistema de secreción distinto al convencional. La estrategia de *knock in* es una excelente alternativa para efectuar reemplazamientos de genes endógenos para estudios moleculares en *N. crassa*.

XI. Literatura Citada

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press. Cuarta Edición. London. 635 p.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, y P. Walter. 2002. Molecular Biology of The Cell. Garland Science. Cuarta Edición. New York. 1423 p.

Amnuaykanjanasin, A. y L. Epstein. 2006. A class Vb chitin synthase in *Colletotrichum graminicola* is localized in the growing tips of multiple cell types, in nascent septa, and during septum conversion to an end wall after hyphal breakage. Protoplasma 227:155-164 p.

Au-Young, J. y P. W. Robbins. 1990. Isolation of a chitin synthase gene (CHS1) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 4:197-207 p.

Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22:87-107 p.

Bartnicki-Garcia, S. 2002. Hyphal tip growth: outstanding questions. En: H. D. Osiewacz, (ed). Molecular Biology of Fungal Development. Marcel Dekker, Inc., New York, 29-58 p.

Bartnicki-Garcia, S. 1987. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. En: A. D. M. Rayner, C. M. Brasier, and D. Moore, (eds). Evolutionary Biology of the Fungi" British Biology of the Fungi. Cambridge University Press, Cambridge, 389-403 p.

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

Blackwell, J. 1982. The macromolecular organization of cellulose and chitin. En: R. M. J. Brown, (ed). Cellulose and other natural polymer systems. Plenum Press, New York, N.Y., 403-428 p.

Bourett, T. M. y R. J. Howard. 1991. Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. Protoplasma 163:199-202 p.

Bourett, T. M. y R. J. Howard. 1996. Brefeldin A-induces structural changes in the endomembrane system of a filamentous fungus, *Magnaporthe grisea*. Protoplasma 190:151-163 p.

Bowman, B., S. Abreu, M. Draskovic, y E. J. Bowman. 2007. Where is calcium in the cell and how does it get there? Fungal Genet. Newsl. 54:55 p.

Bracker, C. E., J. Ruiz-Herrera, y S. Bartnicki-Garcia. 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 73:4570-4574 p.

Bulawa, C. E. 1992. CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. Mol. Cell. Biol. 12:1764-1776 p.

Bulawa, C. E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. Annu. Rev. Microbiol. 47:505-534 p.

Bulawa, C. E., M. Slater, E. Cabib, J. Au-Young, A. Sburlati, W. L. Adair, y P. W. Robbins. 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. Cell 46:213-225 p.

Bull, A. T. 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. J Gen Microbiol 63:75-94 p.

Cabib, E., D.-H. Roh, M. Schmidt, L. B. Crotti, y A. Varma. 2001. The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. J. Biol. Chem. 276:19679-19682 p.

Cabib, E., A. Sburlati, B. Bowers, y S. J. Silverman. 1989. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 108:1665-1672 p.

Cabib, E., J. A. Shaw, P. C. Mol, B. Bowers, y W. J. Choi. 1996. Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. En: R. Brambl, and G. A. Marzluf, (eds). *The Mycota. Biochemistry and Molecular Biology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 243-267 p.

Cambareri, E. B., M. J. Singer, y E. U. Selker. 1991. Recurrence of Repeat-Induced Point Mutation (RIP) in *Neurospora crassa*. Genetics 127:699-710 p.

Chen-Wu, J. L., J. Zwicker, A. R. Bowen, y P. W. Robbins. 1992. Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 6:497-502 p.

Choquer, M., M. Boccara, I. R. Gonçalves, M. Soulié, y A. Vidal-Cros. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. Eur. J. Biochem. 271:2153-2164 p.

Cole, L., D. Davies, G. J. Hyde, y A. E. Ashford. 2000. Brefeldin A affects growth, endoplasmic reticulum, Golgi bodies, tubular vacuole system, and secretory pathway in *Pisolithus tinctorius*. Fungal Genet. Biol. 29:95-106 p.

Colot, H. V., G. Park, G. E. Turner, C. Ringelberg, C. M. Crew, L. Litvinkova, R. L. Weiss, K. A. Borkovich, y J. Dunlap. 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. PNAS 13:10352-10357 p.

Cormack, B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. Gow, S. Falkow, y A. J. Brown. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP), a reporter of gene expression in *Candida albicans*. Microbiology 143:303-311 p.

De Lucca, A. J. y T. J. Walsh. 1999. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43:1-11 p.

Din, A. B., C. A. Specht, P. W. Robbins, y O. Yarden. 1996. *chs4*, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 250:214-222 p.

Duran, A., B. Bowers, y E. Cabib. 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3952-3955 p.

Fernández-Ábalos, J. M., H. Fox, C. Pitt, B. Wells, y J. H. Doonan. 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 27:121-130 p.

Fischer-Parton, S., R. M. Parton, P. C. Hickey, J. Dijksterhuis, H. A. Atkinson, y N. D. Read. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. Journal of Microscopy 198:246-259 p.

Fontaine, T., C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C. E. Vorgias, M. Diaquin, y J.-P. Latge. 2000. Molecular Organization of the Alkali-insoluble Fraction of *Aspergillus fumigatus* Cell Wall. J. Biol. Chem. 275:27594-27607 p.

Freitag, M., P. C. Hickey, N. B. Raju, E. U. Selker, y N. D. Read. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 41:897-910 p.

Fujiwara, M., H. Horiuchi, A. Ohta, y M. Takagi. 1997. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 236:75-78 p.

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

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

Glaser, L. y D. H. Brown. 1957. The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 228:729-742 p.

Gooday, G. W. 1995. Cell Walls. En: N. Gow, and G. M. Gadd, (eds). *The Growing Fungus*. Chapman & Hall, London, 43-59 p.

Grove, S. N. y C. E. Bracker. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. J. Bacteriol. 104:989-1009 p.

Harris, S. D. y M. Momany. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. Fungal Genet. Biol. 41:391-400 p.

Hickey, P. C., S. M. Swift, M. G. Roca, y N. D. Read. 2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes. Methods in Microbiology 34:63-87 p.

Horiuchi, H., M. Fujiwara, S. Yamashita, A. Ohta, y M. Takagi. 1999. Proliferation of Intrahyphal Hyphae Caused by Disruption of *csmA*, Which Encodes a Class V Chitin Synthase with a Myosin Motor-Like Domain in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 181:3721-3729 p.

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 p.

Hunsley, D. y J. H. Burnett. 1970. The Ultrastructural Architecture of the Walls of Some Hyphal Fungi. Journal of General Microbiology 62:203-218 p.

Hunsley, D. y G. W. Gooday. 1974. The Structure and Development of Septa in *Neurospora crassa*. Protoplasma 82:125-146 p.

Ichinomiya, M., T. Motoyama, M. Fujiwara, M. Takagi, H. Horiuchi, y A. Ohta. 2002. Repression of *chsB* expression reveals the functional importance of class IV chitin synthase gene *chsD* in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. Microbiology 148:1335-1347 p.

Ichinomiya, M., E. Yamada, S. Yamashita, A. Ohta, y H. Horiuchi. 2005. Class I and Class II Chitin Synthases Are Involved in Septum Formation in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell 4:1125-1136 p.

Kamper, J., R. Kahmann, M. Bolker, L. J. Ma, T. Brefort, B. J. Saville, F. Banuett, J. W. Kronstad, S. E. Gold, O. Muller, M. H. Perlin, H. A. Wosten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C. G. Reynaga-Pena, K. Snetselaar, M. McCann, J. Perez-Martin, M. Feldbrugge, C. W. Basse, G. Steinberg, J. I. Ibeas, W. Holloman, P. Guzman, M. Farman, J. E. Stajich, R. Sentandreu, J. M. Gonzalez-Prieto, J. C. Kennell, L. Molina, J. Schirawski, A. Mendoza-

Mendoza, D. Greilinger, K. Munch, N. Rossel, M. Scherer, M. Vranes, O. Ladendorf, V. Vincon, U. Fuchs, B. Sandrock, S. Meng, E. C. Ho, M. J. Cahill, K. J. Boyce, J. Klose, S. J. Klosterman, H. J. Deelstra, L. Ortiz-Castellanos, W. Li, P. Sanchez-Alonso, P. H. Schreier, I. Hauser-Hahn, M. Vaupel, E. Koopmann, G. Friedrich, H. Voss, Schluter, T., J. Margolis, D. Platt, C. Swimmer, A. Gnirke, F. Chen, V. Vysotskaia, G. Mannhaupt, U. Guldener, M. Munsterkotter, D. Haase, M. Oesterheld, H. W. Mewes, E. W. Mauceli, D. , D. , C. M. Wade, J. Butler, S. Young, D. B. Jaffe, S. Calvo, C. Nusbaum, J. Galagan, y B. W. Birren. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature 444:97-101 p.

Knechtle, P., F. Dietrich, y P. Philippsen. 2003. Maximal Polar Growth Potential Depends on the Polarisome Component AgSpa2 in the Filamentous Fungus *Ashbya gossypii*. Mol. Biol. Cell 14:4140-4154 p.

Kramer, K. J. y D. Koga. 1986. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. Insect. Biochem. 16:851-877 p.

Leal-Morales, C., C. E. Bracker, y S. Bartnicki-Garcia. 1988. Localization of chitin synthase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: Chitosomes and plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85:8516-8520 p.

Lee, J., Y. Yu, Y. Rho, B. Park, J. Choi, H. Park, y P. Maeng. 2005. Differential expression of the *chsE* gene encoding a chitin synthase of *Aspergillus nidulans* in response to developmental status and growth conditions. FEMS Microbiol. Lett. 249:121-129 p.

Letscher-Bru, V. y R. Herbrecht. 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51:513-521 p.

Lipke, P. N. y R. Ovalle. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. J. Bacteriol. 180:3735-3740 p.

Liu, H., S. Kauffman, J. M. Becker, y P. J. Szaniszlo. 2004. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a Class V Chitin Synthase, Is Essential for Sustained Cell Growth at Temperature of Infection. Eukaryot. Cell 3:40-51 p.

Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, y E. Darnell. 2003. Molecular Cell Biology. W.H. Freeman & Co Ltd. Fifth. p.

Lorang, J. M., R. P. Tuori, J. P. Martinez, T. L. Sawyer, R. S. Redman, J. A. Rollins, T. J. Wolpert, K. B. Johnson, R. J. Rodriguez, M. B. Dickman, y L. M. Ciuffetti. 2001. Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology. Appl. Envir. Microbiol. 67:1987-1994 p.

Lugones, L., K. Scholtmeijer, R. Klootwijk, y J. Wessels. 1999. Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. Mol. Microbiol. 32:681-689 p.

Madrid, M. P., A. Di Pietro, y M. I. Roncero. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. Mol. Microbiol. 47:257-266 p.

Mandel, M. A., J. N. Galgiani, S. Kroken, y M. J. Orbach. 2006. *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. Fungal Genet. Biol. 43:775-788 p.

Martín-Udíroz, M., M. P. Madrid, y M. I. G. Roncero. 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 150:3175-3187 p.

McMurrough, I. y S. Bartnicki-Garcia. 1971. Properties of particulate chitin synthase from *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 246:4008-4016 p.

Mellado, E., A. Aufauvre-Brown, N. Gow, y D. Holden. 1996. The *Aspergillus fumigatus* *chsC* and *ChsG* genes encode Class III chitin synthases with different functions. Mol. Microbiol. 20:667-679 p.

Merzendorfer, H. y L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J. Exp. Biol. 206:4393-4412 p.

Motoyama, T., M. Fujiwara, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta, y M. Takagi. 1997. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation [corrected and republished article originally appeared in Mol Gen Genet 1996 Jun; 251(4):442-50]. Mol. Gen. Genet. 253:520-528 p.

Motoyama, T., N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta, y M. Takagi. 1994. Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. 58:2254-2257 p.

Munro, C. A., D. A. Schofield, G. W. Gooday, y N. A. Gow. 1998. Regulation of chitin synthesis during dimorphic growth of *Candida albicans*. Microbiology 144:391-401 p.

Nebenfuhr, A., C. Ritzenthaler, y D. G. Robinson. 2002. Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. Plant Physiology 130:1102-1108 p.

Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and Company. Cuarta Edición. New York. 1216 p.

Nickel, W. 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. Traffic 6:607-614 p.

Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D. B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulsen, R. Davies, P. S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, N. Fedorova, T. V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J. L. Garcia, M. J. Garcia, A. Goble, G. H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphray, J. Jimenez, N. Keller, H. Khouri, K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafon, A. Lafton, J. P. Latge, W. Li, A. Lord, C. Lu, W. H. Majoros, G. S. May, B. L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O'Neil, I. Paulsen, M. A. Penalva, M. Perte, C. Price, B. L. Pritchard, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, N. Rawlins, M. A. Rajandream, U. Reichard, H. Renault, G. D. Robson, S. Rodriguez de Cord, J. M. Rodriguez-Pena, C. M. Ronning, S. Rutter, S. L. Salzberg, M. Sanchez, J. C. Sanchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekaia, G. Turner, C. R. Vazquez de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J. H. Yu, C. Fraser, J. E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell, y D. W. Denning. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature 438:1151-1156 p.

Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii, y H. Inoue. 2004. From The Cover: Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. PNAS 101:12248-12253 p.

Odds, F. C., A. J. P. Brown, y N. Gow. 2003. Antifungal agents: mechanism of action. TRENDS in Microbiology 11:272-279 p.

Prasher, D. C. 1992. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene 111:229-233 p.

Read, N. D. y P. C. Hickey. 2001. The vesicle trafficking network and tip growth in fungal hyphae. En: A. AGeitmann, M. Cresti, and I. B. Heath, (eds). *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. IOS Press, Amsterdam, 137-146 p.

Riquelme Pérez, M., S. Bartnicki García, J. González Prieto, E. Sánchez León-Hing, J. Verdín Ramos, A. Beltrán Aguilar, y M. Freitag. 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of GFP-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* (en impresión) p.

Riquelme Pérez, M., G. Gierz, y S. Bartnicki-Garcia. 2000. Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa* *Microbiology UK* 146:1743-1752 p.

Roberson, R. W. y M. M. Vargas. 1994. The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 192:19-31 p.

Roncero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41:367-378 p.

Rudall, K. M. y W. Kenchington. 1973. The chitin system *Biol. Rev.* 48:597-636 p.

Ruiz-Herrera, J. 1992. Fungal Cell Wall: Structure. Synthesis and Assembly. En. CRC Press, Boca Raton, Fl., p.

Ruiz Herrera, J., V. O. Sing, W. J. Van Der Woude, y S. Bartnicki García. 1975. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 72:2706-2710 p.

Sagot, I., S. K. Klee, y D. Pellman. 2002. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4:42-50 p.

Schoffemeer, E. A. M., F. M. Klis, J. H. Sietsma, y B. J. C. Cornelissen. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* 27:275-282 p.

Sharpless, K. E. y S. D. Harris. 2002. Functional Characterization and Localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol. Biol. Cell* 13:469-479 p.

Shaw, J. A., P. C. Mol, B. Bowers, S. J. Silverman, M. H. Valdivieso, A. Duran, y E. Cabib. 1991. The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. J. Cell Biol. 14:111-123 p.

Sietsma, J. H., A. Beth Din, V. Ziv, K. A. Sjollem, y O. Yarden. 1996. The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. Microbiology 142:1591-1596 p.

Silverman, S. J. 1989. Similar and different domains of chitin synthases 1 and 2 of *S. cerevisiae*: two isozymes with distinct functions. Yeast 5:459-467 p.

Silverman, S. J., A. Sburlati, M. L. Slater, y E. Cabib. 1988. Chitin Synthase 2 is Essential for Septum Formation and Cell Division in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS 85:4735-4739 p.

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

Sudoh, M., S. Nagahashi, M. Doi, A. Ohta, M. Takagi, y M. Arisawa. 1993. Cloning of the chitin synthase 3 gene from *Candida albicans* and its expression during yeast-hyphal transition. Mol. Gen. Genet. 241:351-358 p.

Suelmann, R., N. Sievers, y R. Fischer. 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 25:757-769 p.

Takeshita, N., A. Ohta, y H. Horiuchi. 2005. CsmA, a Class V Chitin Synthase with a Myosin Motor-like Domain, Is Localized through Direct Interaction with the Actin Cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Mol. Biol. Cell 16:1961-1970 p.

Takeshita, N., S. Yamashita, A. Ohta, y H. Horiuchi. 2006. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. Mol. Microbiol. 59:1380-1394 p.

Tellam, R. L., T. Vuocolo, S. E. Johnson, J. Jarmey, y R. D. Pearson. 2000. Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. Eur. J. Biochem. 267:6025-6043 p.

Valdivieso, M. H., P. C. Mol, J. A. Shaw, E. Cabib, y A. Duran. 1991. *CALI*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 114:101-109 p.

Vanden Wymelenberg, A. J., D. Cullen, R. N. Spear, B. Schoenike, y J. H. Andrews. 1997. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. BioTechniques 23:686-690 p.

Vermeulen, C. A. y J. G. Wessels. 1986. Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. Eur. J. Biochem. 158:411-415 p.

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

Wainright, M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. John Wiley. Chinchester. p.

Walsh, T. J., A. Groll, R. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides, y E. Anaissee. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin. Microbiol. Infect. 10:48-66 p.

Wang, Z. y P. J. Szaniszlo. 2000. WdCHS3, a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. J. Bacteriol. 182:874-881 p.

Wang, Z., L. Zheng, M. Hauser, J. M. Becker, y P. J. Szaniszlo. 1999. WdChs4p, a Homolog of Chitin Synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*, Alone Cannot Support Growth of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* at the Temperature of Infection. Infect. Immun. 67:6619-6630 p.

Wang, Z., L. Zheng, H. Liu, Q. Wang, M. Hauser, S. Kauffman, J. M. Becker, y P. J. Szaniszlo. 2001. WdChs2p, a class I chitin synthase, together with WdChs3p (class III) contributes to virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Infect. Immun. 69:7517-7526 p.

Weber, I., D. Assmann, E. Thines, y G. Steinberg. 2006. Polar Localizing Class V Myosin Chitin Synthases Are Essential during Early Plant Infection in the Plant Pathogenic Fungus *Ustilago maydis*. PLANT CELL 18:225-242 p.

Westergaard, M. y H. K. Mitchell. 1942. *Neurospora*. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Am. J. Bot 14:573-577 p.

Xoconostle-Cazares, B., C. A. Specht, P. W. Robbins, Y. Liu, C. Leon, y J. Ruiz-Herrera. 1997. Umchs5, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol 22:199-208 p.

Yanai, K., N. Kojima, N. Takaya, H. Horiuchi, A. Ohta, y M. Takagi. 1994. Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem 58:1828-1835 p.

Yarden, O. y C. Yanofsky. 1991. Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. Genes & Dev. 5:2420-2430 p.

Zheng, L., L. Mendoza, Z. Wang, H. Liu, C. Park, S. Kauffman, J. M. Becker, y P. J. Szaniszló. 2006. WdChs1p, a class II chitin synthase, is more responsible than WdChs2p (Class I) for normal yeast reproductive growth in the polymorphic, pathogenic fungus *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Arch. Microbiol. 185:316-329 p.