

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**Localización y dinámica de los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5 en
*Neurospora crassa***

TESIS

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

Presenta:

ALEJANDRO BELTRÁN AGUILAR

Ensenada, Baja California, México, marzo de 2009.

RESUMEN de la tesis de **Alejandro Beltrán Aguilar**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California. Marzo de 2009.

LOCALIZACIÓN Y DINÁMICA DE LOS COMPONENTES DEL EXOCISTO SEC-15 Y SEC-5 EN *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Meritxell Riquelme Pérez
Director de Tesis

El crecimiento polarizado requiere de una maquinaria excelsa y precisa de secreción. La secreción es definida como el proceso biológico por medio del cual es enviado al espacio extracelular material funcional orgánico o inorgánico. En eucariotas existen varias rutas de secreción, las clásicas y las no-clásicas. En las rutas secretoras no-clásicas las cadenas polipeptídicas evitan el paso por compartimentos celulares en su camino hacia la membrana plasmática. La ruta convencional o clásica consiste en el paso de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas o en síntesis por retículo endoplasmático (RE), después por vesículas secretoras a Golgi, red *trans*-Golgi y membrana plasmática. La exocitosis es el último paso de la secreción y en este paso las vesículas provenientes de la red *trans*-Golgi se encuentran fielmente con la membrana plasmática y se fusionan incrementando la superficie celular, integrando proteínas y lípidos, y expulsando el contenido al exterior de la célula. El exocisto es un complejo proteico octamérico (SEC-3, -5, -6, -8, -10, -15, EXO-70 y -84), descrito por primera vez *Saccharomyces cerevisiae* y que ayuda a que las vesículas secretoras sean atadas a la membrana plasmática de manera específica, previo al ensamblaje de las SNAREs. En *S. cerevisiae* se ha observado que el componente SEC-15 interacciona con la GTPasa de vesículas secretoras SEC-4 y el componente SEC-5 junto con el componente EXO-84 compiten por la GTPasa RAL-1. En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* se localizó la proteína SECC (SEC-3) en los ápices de las hifas en crecimiento. Los componentes SEC-3, SEC-5 y EXO-70 han sido localizados en el Spitzenkörper (SPK) y en la membrana plasmática de *Ashbya gossypii* dependiendo de su velocidad de crecimiento. En este trabajo se expresaron las quimeras SEC-15-GFP y SEC-5-GFP en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* y se analizaron células en crecimiento por microscopía confocal de barrido con Láser. Se encontró que los componentes SEC-15 y SEC-5 se concentran en la membrana apical de hifas en crecimiento y en el área externa del SPK. En hifas tratadas con BFA-Bodipy 558/568 fue posible observar a los 5 min. de exposición una colocalización de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP con R.E., equivalentes de Golgi y la red *trans*-Golgi; una disminución de la fluorescencia en la membrana apical y la interrupción del crecimiento apical. En los sitios de anastomosis se observó una alta concentración de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP, así como en los septos de más de 20 min. de formación.

Palabras Clave: Secreción, Exocitosis, Exocisto, Spitzenkörper, Anastomosis, Septo, *Neurospora*

ABSTRACT of the thesis presented by **Alejandro Beltrán Aguilar** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in Microbiology. Ensenada, Baja California, México, March, 2009.

“LOCALIZATION AND DYNAMICS OF THE EXOCYST COMPONENTS SEC-15 AND SEC-5 IN *Neurospora crassa*”

Polarized growth requires an excellent and precise secretory machinery. Secretion is defined as the biological process that involves the release of functional organic or inorganic material to the extracellular space. There are different secretory routes in eukaryotes, mostly called classical and non-classical. In non-classical routes newly synthesized polypeptidic chains avoid cell compartments such as endoplasmic reticulum (ER), Golgi (G) and *trans*-Golgi network (TGN) on their way to the plasma membrane (PM). Conventional or classical secretion routes comprehend the direction of newly synthesized or even polypeptidic chains in synthesis to ER, then in secretory vesicles to G, TGN and finally to the PM where they fuse increasing cell surface, integrating lipids and proteins, and expelling the intravesicular content to the cell exterior. The exocyst is an octameric protein complex (SEC-3, -5, -6, -8, -10, -15, EXO-70 and -84) first described in *Saccharomyces cerevisiae* that tethers secretory vesicles to the PM with high fidelity, previous to the SNAREs assembly. In *S. cerevisiae* it has been observed that Sec-15p interacts with the Sec-4p GTPase and that Sec-5p competes with Exo84p for Ral1 GTPase. In the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* SECC (SEC-3) has been localized in the apices of growing hyphae. The localization of the SEC-3, SEC-5 and EXO-70 components at the Sptzenkörper (SPK) and at the apical PM of *Ashbya gossypii* has been correlated to the elongation rate. In this work the SEC-15-GFP and SEC-5-GFP chimeras have been expressed in the filamentous fungus *Neurospora crassa* and growing cells have been analyzed by Laser scanning confocal microscopy. The components SEC-15 and SEC-5 accumulate at the apical PM of growing hyphae and in the external area of the SPK. After 5 min of exposure to BFA-Bodipy 558/568 SEC-15-GFP and SEC-5-GFP colocalized with ER, G equivalents and the TGN. In addition we observed a reduction of the fluorescence signal in the apical PM and an interruption of apical growth. In sites of anastomosis and in septa with more than 20 min of synthesis, it has been observed a high concentration of SEC-15-GFP and SEC-5-GFP.

Dedicatorias

A la memoria de:

Rosa Martha Aguilar Peraza

Felipe Eduardo Castro Aguilar

Agradecimientos.

Quiero darle las gracias en primer lugar al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por darnos un lugar a todos Aquellos que nos mueve la búsqueda del conocimiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyar la investigación científica y a los estudiantes de posgrado a través de becas.

Le doy gracias a la Dra. Meritxell Riquelme Pérez por compartir sus conocimientos, tiempo y energías apoyando este proyecto en todo momento y de la manera más atenta. Su entusiasmo y dedicación son motivo de inspiración para propios y extraños.

Le agradezco al Dr. Salomón Bartnicki García por sembrar y cuidar de la semilla de la investigación referente a los hongos en CICESE. Gracias por sus críticas y comentarios para enriquecer el proyecto.

A mis padres Francisco y Ana Maribel que han trabajado tanto por ayudarnos a mis hermanos y a mí para que sigamos con nuestros estudios.

A mis hermanos Francisco, Ericka Maribel y Ariel Fernando por ser los mejores hermanos del mundo.

Gracias a las Dras. Castro Longoria Ernestina, Hernández Martínez Rufina y Mouriño Pérez Rosa Reyna del Depto. de Microbiología por su valiosa ayuda, no solo en lo académico sino también en lo personal. Les deseo de corazón sigan en el camino del éxito.

Gracias a la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por brindar ayuda en el momento necesario y por compartir con entusiasmo sus logros.

Gracias al Dr. Jorge Verdín Ramos por haber sido un excelente compañero en el lab. del equipo Riquelme. Gracias por exponer tu punto de vista en cada revisión de artículos y en cada seminario.

A Amanda, Caroline, Cristina, Gretel, Haydeé, Silvia y muy en especial a Abelardo, Abigail y Melina por su gran amistad y cachete power.

Le agradezco a mi compañera de generación en la orientación: Aurora el brindarme su compañía, apoyo, crítica, comentarios, consejos, sonrisas, así como compartir tiempos de estrés, tiempos de no tanto estrés, tiempos de hacer tarea, tiempos de estudiar, y más.

Gracias a todos los compañeros que hacen del laboratorio de Microbiología nuestra segunda casa: Bernardo, Daniel, Diego, J. Alejandro, Jovani, Lisandro, Luis, Mario, Naidi, Ofelia, Ramón, Rosa María (no L.F. sino R.C.), Rosa Angelina y Rouxi.

CONTENIDO

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	xiv
Capítulo I. Introducción	1
<i>I.1 Importancia de los hongos</i>	1
<i>I.2 Las hifas y el micelio</i>	2
<i>I.3 El Spitzenkörper</i>	2
<i>I.4 Modelos de crecimiento</i>	3
<i>I.5 Secreción</i>	5
<i>I.6 Exocitosis</i>	7
<i>I.7 El exocisto</i>	8
<i>I.8 Las proteínas SNAREs</i>	11
<i>I.9 GTPasas tipo Ras</i>	12
<i>I.10 Pared celular</i>	15
<i>I.11 Septos</i>	18
<i>I.12 Anastomosis</i>	20
<i>I.13 Etiquetado de proteínas</i>	21
Capítulo II. Antecedentes.....	22
<i>II.1 Ruta de secreción</i>	22
<i>II.2 Las SNAREs en hongos filamentosos</i>	25
<i>II.3 El exocisto</i>	26
<i>II.4 Fusión hifal vegetativa</i>	27
<i>II.5 Septos</i>	29
<i>II.6 GFP</i>	31
Capítulo III. Hipótesis y objetivos.....	33
<i>III.1 Hipótesis</i>	35
<i>III.2 Objetivo general</i>	35
<i>III.3 Objetivos específicos</i>	35
<i>III.3.1 diseño de oligonucleótidos</i>	35

CONTENIDO (continuación)

	Página
<i>III.3.2 Construcción de vectores</i>	33
<i>III.3.3 Obtención de transformantes de <u>E. coli</u> y <u>N. crassa</u>.</i>	33
<i>III.3.4 Comprobar la integración de las fusiones <u>sec-15-gfp</u> y <u>sec-5-gfp</u> en el genoma de <u>N. crassa</u>.</i>	33
<i>III.3.5 Analizar por microscopía confocal la localización de la fluorescencia de las quimeras <u>SEC-15-GFP</u> y <u>SEC-5-GFP</u>, colocalización y reacción con fluorocromos, en células vivas de <u>N. crassa</u>.</i>	33
Capítulo IV. Metodología científica	34
<i>IV.1 Cepas</i>	34
<i>IV.2 Medios de cultivo</i>	34
<i>IV.3 Medición de crecimiento</i>	35
<i>IV.4 Técnicas de biología celular y molecular</i>	37
<i>IV.5 Microscopía y análisis de imágenes</i>	44
Capítulo V. Resultados	46
<i>V.1 Técnicas de biología celular y molecular</i>	46
<i>V.2 Microscopía confocal de barrido con Láser y de contraste de fases</i>	51
<i>V.2.1 Localización celular de <u>SEC-15-GFP</u> y <u>SEC-5-GFP</u></i>	51
<i>V.2.2 Tinción vital con el fluorocromo <u>FM4-64</u></i>	57
<i>V.2.3 Inhibición con <u>BFA-Bodipy 558/568</u></i>	63
<i>V.2.4 Septos</i>	66
<i>V.2.5 Anastomosis</i>	69
<i>V.2.6 Germínulas</i>	69
<i>V.2.7 Cruzas</i>	71
Capítulo VI. Discusión	75
<i>VI.1 Crecimiento apical</i>	74
<i>VI.2 Inhibición con <u>BFA-Bodipy 558/568</u></i>	77
<i>VI.3 Septos</i>	77
<i>VI.4 Anastomosis</i>	78
Referencias	80

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	Página
1 Representación esquemática de la exocitosis desde el <i>trans</i> -Golgi hasta la membrana plasmática en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . En Golgi las vesículas secretoras (VS) son marcadas con Sec4p unido a GTP en presencia de Sec2p y viajan a través de cables de actina hasta la membrana plasmática donde se encuentran con el exocisto (los numerales; a todos les corresponde el prefijo Sec a excepción del 70 y el 84 que llevan el prefijo Exo) (Adaptado de Sudbery, 2008).....	6
2 Representación esquemática del reconocimiento de la vesícula secretora y la membrana plasmática. El exocisto se encuentra delimitado por la línea azul; todos los números representan proteínas y llevan el prefijo SEC, excepto 70 y 84 que llevan el prefijo EXO (Adaptado de: Sutton <i>et al.</i> , 1998; Guo <i>et al.</i> , 1999b; Bonifacino <i>et al.</i> , 2004).....	11
3 Imagen de los tubos de cultivo para medición de crecimiento (<i>Race-Tube</i>). Las flechas rojas (a) indican los tapones de algodón protegidos con papel aluminio. En “b” las flechas naranja indican las líneas donde se colocaron los fragmentos de VMM (Agar 1.5%) con micelio. Las marcas de color púrpura denotan la distancia inicial.....	36
4 Imagen que muestra el “método de bloque de Agar invertido” (modificado de Hickey <i>et al.</i> , 2004 en Beltrán-Aguilar, 2006).	37
5 Diagrama del vector de expresión pMF272 de 8479 pb (código de acceso del GeneBank: AY598428) (Freitag <i>et al.</i> , 2004). El vector de expresión contiene de 5’ a 3’: el sitio de restricción para la enzima <i>Nde</i> I a partir de la base 80 (80 pb); el sitio de restricción para la enzima <i>Ssp</i> I (448 pb); el gen <i>bla</i> que codifica para una β -lactamasa (468-1328 pb); la secuencia complementaria del flanco 3’ que no se traduce de la enzima HIS-3 (2374-4006 pb); el promotor <i>cgg-1</i> (4059-4980 pb); el sitio de clonación múltiple pBluescript KS+ (4981-5012 pb); la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) mejorada <i>sgfp</i> (5013-5732 pb); la secuencia complementaria trunca del gen <i>his-3</i> (8460-6359 pb).....	39
6 Diagrama del vector pAB005, derivado del plásmido pMF272 (los diagramas no están a escala) (modificado de: Beltrán-Aguilar,	40

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
6	2006).....	40
7	Imagen del gel de agarosa (1.8%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) donde se muestra el amplicón <i>sec-15</i> (carriles 2 y 3). Referencia (carril 1): genoma del fago λ digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> (carril 1).....	46
8	Figura que muestra imágenes de los geles de agarosa (1.8%) con el amplicón <i>sec-15</i> (a, b) y el plásmido pMF272 digeridos (c, d). En “a” y “c” los carriles 2 corresponden a las digestiones con la enzima <i>BamHI</i> y en “b” y “d” a las digestiones con la enzima <i>PacI</i> . Los carriles 1 (a,b,c,d) corresponden a la secuencia del fago λ digerida con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	48
9	Gel de electroforesis con las bandas (~2914 pb) correspondientes a los amplicones del gen <i>sec-15</i> (carriles 2 y 3) a partir de una PCR de colonias transformantes de <i>E. coli</i> . Referencia: genoma del fago λ digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> (carril 1).....	48
10	Gel de agarosa para comprobar la presencia del inserto en el vector pAB015. En el carril 1 se muestra el genoma del fago Lambda digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> a manera de referencia; en el carril 2 se encuentra la banda correspondiente al vector pAB015 (~11,391 pb) linearizado con la enzima <i>BamHI</i> ; en el tercer carril se encuentran la banda correspondiente al vector pMF272 (~8,474 pb) y a la secuencia del gen <i>sec-15</i> (~2914 pb) después de la restricción de pAB015 con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>PacI</i>	49
11	Diagrama del vector pAB015 derivado del vector de expresión pMF272.	49
12	Imágenes para confirmar las integraciones de las fusiones <i>sec-15-gfp</i> (a carril 2 y b carril 2) y <i>sec-5-gfp</i> (a carril 3 y b carril 3). El primer carril en ambos geles muestra el genoma del fago lambda digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i>	51
13	Imagen de la cepa <i>N. crassa</i> TAB-15-3 por microscopía confocal de barrido con Láser. “a” Es un corte óptico longitudinal donde se muestra la distribución de la fluorescencia de SEC-15-GFP. La flecha indica la acumulación de la fluorescencia en el borde del	53

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<i>Figura</i>		Página
13	ápice; la línea blanca muestra una marcada disminución de la fluorescencia en el área donde se encuentra el Spitzenkörper (a) visto por contraste de fases (b). La línea roja muestra una zona translúcida en la cara retrógrada del Spitzenkörper (b). La imagen “c” es la superposición de “a” y “b”. Barra = 5 μm	53
14	Imagen donde se muestra una hifa en crecimiento de la cepa <i>N. crassa</i> TAB-5-2 por microscopía confocal de barrido con láser. “a” Es un corte óptico longitudinal donde se muestra la distribución de la fluorescencia de SEC-5-GFP. La flecha indica la acumulación de la fluorescencia en el borde del ápice; la línea blanca muestra una marcada disminución de la fluorescencia en el área donde se encuentra el Spitzenkörper (a) visto por contraste de fases (b). La línea roja muestra una zona translúcida en la cara retrógrada del Spitzenkörper (b). La imagen “c” es la superposición de “a” y “b”. Barra = 5 μm	55
15	Ampliación digital de los ápices de las hifas de <i>N. crassa</i> TAB-15-3 (a y b) y TAB-5-2 (c y b) donde se muestra la distribución de la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP (a) y SEC-5-GFP (c) en el domo apical de hifas en crecimiento. La imagen “a” muestra una acumulación de fluorescencia (SEC-15-GFP) en el margen apical de la hifa (flecha) cubriendo una mayor superficie ($\sim 140^\circ$) que en “c” (SEC-5-GFP) (flecha). Las puntas de flecha muestran la marcada disminución de la fluorescencia en el centro del Spitzenkörper (a y c). “b” y “d” Son imágenes por microscopía de contraste de fases. Spitzenkörper (*); Barra = 2 μm	57
16	Imagen de una hifa en crecimiento de <i>N. crassa</i> TAB-15-3 obtenida por microscopía confocal. En “a” se muestra la distribución de la fusión SEC-15-GFP, la flecha indica una acumulación en el borde apical de la hifa y la línea la tinción negativa del Spk; en “b” se muestra la distribución del fluorocromo FM4-64, la línea marca la acumulación en el Spk; “c” es la superposición de “a” y “b” “N” la tinción negativa de los núcleos; “d” es la imagen por microscopía de contraste de fases, la línea blanca indica el Spk y la punta roja el centro del spk; y “e” es la superposición de “a”, “b” y “d”. Barra = 5 μm	58

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
17	Imagen de una hifa en crecimiento de <i>N. crassa</i> TAB-5-2 obtenida por microscopía confocal. En “a” se muestra la distribución de la fusión SEC-5-GFP, la flecha indica una acumulación en el borde apical de la hifa y la línea la tinción negativa del Spk; en “b” se muestra la distribución del fluorocromo FM4-64, la línea marca la acumulación en el Spk y la flecha la acumulación en la membrana plasmática; “c” es la superposición de “a” y “b”, la flecha amarilla indica la colocalización de SEC-5-GFP y el FM4-64 en el borde apical de la hifa, la flecha verde indica acumulaciones intermitentes del marcaje en membrana apical detrás de la punta, la flecha roja apunta la membrana plasmática teñida con FM4-64 y “N” la tinción negativa de los núcleos; “d” es la imagen por microscopía de contraste de fases, la línea blanca indica el Spk y la punta roja el centro del spk; y “e” es la superposición de “a”, “b” y “d”. Barra = 5 μ m.....	59
18	Gráficas de crecimiento. En “a” se encuentra graficada la cinética de crecimiento de las colonias de <i>N. crassa</i> : Silvestre (\diamond), TAB-15-3 (\square), Δ sec-15 (Δ), TAB-5-2 (\times) y Δ sec-5 ($*$) en <i>Race Tube</i> . El promedio de crecimiento de las cepas TAB-15-3 y TAB-5-2 se muestra en “b” (“Bloque de Agar Invertido”); TAB-15-3 (0.179 μ m/seg, 646.203 μ m/hr, desviación estándar: 0.051) y TAB-5-2 (0.221 μ m/seg, 797.1135 μ m/min, desviación estándar: 0.031) (n = 10).....	60
19	Imagen que muestra el perfil de la intensidad de la fluorescencia de SEC-15-GFP (verde) (a), SEC-5-GFP (verde) (b) y el fluorocromo FM4-64 (rojo) (a,b) revelada por transectos (flechas). Los planos cartesianos ilustran la longitud (μ m) de los transectos (flechas) en los ejes de las abscisas y en los ejes de las ordenadas se encuentran las intensidades de la fluorescencia de cada pixel, cero para la ausencia de verde (GFP) o rojo (FM4-64) y 256 para el tono más alto de cada color. Los extremos ordenadas se encuentran las intensidades de la fluorescencia de cada pixel, cero para la ausencia de verde (GFP) o rojo (FM4-64) y 256 para el tono más alto de cada color. Los extremos como de las flechas representan los orígenes.....	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
20	<p>Serie de imágenes de una hifa de <i>N. crassa</i> TAB-15-3 tratada con BFA-Bodipy 558/568 (tiempo = min:seg). El retículo endoplasmático (flechas en “g”, “n” y “t”, RE) se observa marcado alrededor de los núcleos (“N”), la fluorescencia de BFA-Bodipy 558/568 se restringe paulatinamente a unos cúmulos, posiblemente endosomas (E) y/o equivalentes de Golgi (EG) (“a”-“g”). En “d”, “k”, y “q” las flechas indican túbulos de fluorescencia. De “h” a “n” se exhibe la fluorescencia de SEC-15-GFP y su acumulación progresiva hacia RE, E y/o (EG). De “ñ” a “t” se muestra como el BFA-Bodipy 558/568 (rojo) y SEC-15-GFP colocalizan gradualmente después de la exposición a BFA-Bodipy 558/568, produciendo colores cercanos al naranja y amarillo. De “h” a “n” se puede observar como la fluorescencia de SEC-15-GFP disminuye gradualmente en la punta (flecha en “h”). De “u” a “a”, se observan las imágenes de contraste de fases correspondientes. Barra = 5 μm. En “c” se ha repositionado la platina ya que al crecer la hifa ha salido del plano del objetivo.....</p>	64
21	<p>Serie de imágenes de una hifa de <i>N. crassa</i> TAB-5-3 tratada con BFA-Bodipy 558/568 (tiempo = min:seg). El retículo endoplasmático (flechas en “e”, “l” y “r”, RE) se observa marcado alrededor de los núcleos (“N”), la fluorescencia de BFA-Bodipy 558/568 se restringe paulatinamente a unos cúmulos, posiblemente endosomas (E) y/o equivalentes de Golgi (EG) (“a”-“g”). En “d”, “k”, y “q” las flechas indican túbulos de fluorescencia. De “h” a “n” se exhibe la fluorescencia de SEC-5-GFP y su acumulación progresiva hacia RE, E y/o (EG). De “ñ” a “t” se muestra como el BFA-Bodipy 558/568 (rojo) y SEC-5-GFP colocalizan gradualmente después de la exposición a BFA-Bodipy 558/568, produciendo colores cercanos al naranja y amarillo. De “h” a “n” se puede observar como la fluorescencia de SEC-5-GFP disminuye gradualmente en la punta (flecha en “h”). De “u” a “a”, se observan las imágenes de contraste de fases correspondientes. Barra = 5 μm.....</p>	65

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
22	Reconstrucción tridimensional de un septo de más de 1 hr de formación en hifas de <i>N. crassa</i> TAB-15-3 (a) y TAB-5-2 (b). La figura “a” representa la fluorescencia de la fusión SEC-15-GFP y la figura “b” la fusión SEC-5-GFP. Barra = 2 μm	67
23	Figura 23. Imágenes de reconstrucciones tridimensionales de septos de hifas vivas de las transformantes TAB-15-3 (a, c, e) y TAB-5-2 (b, d, f). Las flechas verdes indican la localización de la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP cerca del poro del septo (a y b). En “c” y “d” las flechas indican la fluorescencia del FM4-64 en el septo. “e” Es una superposición de “a” (SEC-15-GFP) y “c” (FM4-64). “f” Es una superposición de “b” (SEC-5-GFP) y “d” (FM4-64). Barras = 2 μm	68
24	Imágenes de fusiones vegetativas de hifas de las transformantes TAB-15-GFP (a-c) y TAB-5-GFP. Localización de SEC-15-GFP (a, b) y SEC-5-GFP (d, e). Colocalización de SEC-15-GFP (a) y SEC-5-GFP (d) respectivamente con el colorante FM4-64; “c” y “f” son imágenes correspondientes al FM4-64. Barra = 2 μm	69
25	Imagen confocal de germínulas de la transformante TAB-5-2-1 de 3 (a-c),4 (d-f) y 5 hrs. (g-i). En “a”, “d” y “g” se muestra la señal de canal de fluorescencia; en “b”, “e” y “h” la señal del canal de contraste de fases; y en “c”, “f” e “i” se muestran las superposiciones de las señales de los canales de fluorescencia y de contraste de fases de cada germínula. Las flechas rojas indican aculaciones de la fluorescencia de SEC-15-GFP en el citoplasma y las verdes cerca de la membrana; “N” los núcleos. Barra = 2 μm en “c” y “g”, y 5 μm en “j”.....	70
26	Imagen confocal de germínulas de la transformante TAB-15-3 de 3 (a-c),4 (d-f) y 5 hrs. (g-i). En “a”, “d” y “g” se muestra la señal de canal de fluorescencia; en “b”, “e” y “h” la señal del canal de contraste de fases; y en “c”, “f” e “i” se muestran las superposiciones de las señales de los canales de fluorescencia y de contraste de fases de cada germínula. Las flechas rojas indican aculaciones de la fluorescencia de SEC-15-GFP en el citoplasma y las verdes cerca de la membrana; “N” los núcleos. Barra = 5 μm	71

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
27	Reconstrucciones tridimensionales de los protoperitecios de las transformantes TAB-15 (a,c) y TAB-5 (b,d) teñidos con FM4-64 y antes de esparcir conidios del tipo de apareamiento complementario. El color verde representa la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP (a,c) y SEC-5-GFP (b,d), el rojo la fluorescencia del fluorocromo FM4-64 y el amarillo los sitios donde convergen el FM4-64 y la GFP. Barra = 5 μ m.....	72
28	Imágenes de los peritecios resultantes de las cruces de las cepas transformantes TAB-5 (a-c) y TAB-15 (d-f) con las cepas: tipo silvestre (a,d), Δ sec-5 (b,e) Δ sec-15 (c,f). Barra = 100 μ m.....	73

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		Página
I	Materiales biológicos y cebadores usados en este estudio.....	41
II	Resultados de las cruzas (peritecios/ascosporas) para la obtención de cepas homocariontes, cepas con recuperación del fenotipo silvestre y cepas con fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP con un fondo mutante.....	73

Capítulo I

Introducción

I.1 Importancia de los Hongos

De las más de 100,000 especies conocidas de hongos, unas 50 causan enfermedades en humanos, y más de 10,000 causan enfermedades en plantas (Agrios, 1997). Los hongos año con año son causantes de la mayor pérdida económica en el campo (7-10%), muy por encima de las pérdidas causadas por bacterias, nemátodos e insectos, entre otros. Un solo cultivo de tomate puede ser atacado por 80 especies de hongos, 11 de bacterias, 16 de virus, varios nemátodos, y/o más organismos patógenos (Agrios, 1985). En nuestros días la investigación científica todavía sigue una intensa búsqueda para combatir las enfermedades causadas a las cosechas de la manera menos nociva para el ambiente y sin efectos secundarios para las especies fumigadas y consumidores. Las micosis en humanos son combatidas generalmente con potentes antibióticos que en dosis altas y/o prolongadas pueden ocasionar daños en órganos importantes como los riñones y el hígado. La investigación para combatir a los hongos patógenos de humanos va encaminada a la búsqueda de nuevos fármacos y particularidades celulares y moleculares de los hongos diferentes a la de eucariotas superiores.

El reino de los hongos también ayuda al mantenimiento de la vida en el planeta por reciclar materia orgánica y poseer importantes simbiosis con plantas (micorrizas) y algas (líquenes). El reino de los hongos también es responsable de grandes ganancias en la economía mundial gracias a la producción de antibióticos tales como la penicilina. Vitaminas, agentes químicos como el ácido cítrico, enzimas importantes en la industria textil y la producción de alcohol para bebidas o como combustible biológico son sin lugar a dudas beneficios intrínsecos del reino de los hongos. La manera natural de los hongos de

verter enzimas y otras sustancias al medio para digerir su alimento, es resultado de una maquinaria excelsa y precisa de secreción regulada por la polarización celular que a su vez dirige el crecimiento. Esta maquinaria ubicuitaria en la mayoría de los eucariotas presenta variantes incluso a niveles de subphyla, que le dan a algunos hongos la capacidad de ejercer una gran variedad de roles tanto en el ecosistema como en la industria. El progreso de la genética molecular en los géneros *Ashbya*, *Aspergillus*, *Neurospora*, y *Trichoderma*, ha hecho que los hongos filamentosos sean atractivos para la expresión homóloga y heteróloga de proteínas.

I.2 Las hifas y el micelio

Los hongos filamentosos poseen células alargadas de forma tubular llamadas hifas, con diámetros alrededor de 3-30 μm . Las levaduras en cambio son células semiesféricas con diámetros que oscilan entre los 5 y 10 μm . Las hifas regularmente muestran ramificaciones y se fusionan con otras para constituir un micelio. Es en la punta de las hifas donde se da una actividad en extremo notoria de formación de pared celular y membrana plasmática lo cual contribuye al crecimiento en el diámetro de la colonia fúngica. La pared celular de la mayoría de los hongos está constituida por glucanos, quitina, proteínas y lípidos que son polimerizados en las zonas apicales de las hifas (Bartnicki-García, 1968).

I.3 El Spitzenkörper

El Spitzenkörper es una estructura de fase oscura bajo microscopía de contraste de fases, observada primero por Brunswick (1924) y después por Girbardt (1957) en los ápices de las hifas y se le asocia con la expansión apical polarizada. Al Spitzenkörper se le han atribuido al menos 2 funciones: (1) la recolección de vesículas con los componentes formadores de pared provenientes de las regiones subapicales y (2) ser el punto de partida de estas vesículas hacia la membrana apical para formar membrana y pared celular (Bartnicki-García, 1990; Riquelme *et al.*, 1998). Howard (1981) también menciona que la geometría del proceso de crecimiento hifal apical requiere al menos del acarreo a larga

distancia de precursores de la pared, así como enzimas, un control preciso de algunos componentes del citoplasma y la membrana plasmática. Se ha observado bajo microscopía electrónica de transmisión que en el área del Spitzenkörper existen vesículas apicales con diámetros entre 79 y 90 nm así como microvesículas con diámetros de entre 30 y 40 nm, algunos microtúbulos, filamentos de actina (F-actina) y ribosomas, entre otros (Girbardt, 1969; Grove y Bracker, 1970; Grove *et al.*, 1970; Bracker *et al.*, 1976; Howard y Aist, 1980; Howard, 1981). Las sintetasas de quitina 3 (*CHS-3 por sus siglas en inglés: chitin synthase 3*) y 6 (*CHS-6*), componentes de los quitosomas (microvesículas secretoras de 30-40 nm que contienen sintetasas de quitina), han sido localizadas en la punta de la hifas vivas de *Neurospora crassa* justo en el lugar donde se han observado las microvesículas por microscopía electrónica de transmisión (Riquelme *et al.*, 2007). En *Mucor rouxii*, empleando trifosfato de uridina-N-acetilglucosamina radioactiva, se ha comprobado que la síntesis de quitina sucede en el ápice (Bartnicki-García y Lippman, 1969). Las macrovesículas han sido referidas como las contenedoras de los componentes de la fase amorfa de la pared celular de hongos, glucanas y se cree que son las vesículas secretadas convencionalmente (Holcomb *et al.*, 1988; Riquelme *et al.*, 2007; Bartnicki-García, 2006). Collinge y Trinci (1974) publicaron que para satisfacer el área de la hifa en crecimiento se necesita en promedio la exocitosis de 38,000 vesículas secretoras por minuto.

I.4 Modelos de crecimiento

La formación de membrana citoplasmática y pared celular en el ápice de la hifa es un proceso que requiere de una alta coordinación celular que involucra el movimiento de organelos, proteínas y reacciones bioquímicas en sitios precisos. Para tratar de explicar la formación de pared Wessels propuso un modelo fúngico de crecimiento polarizado llamado “estado constante” (*del inglés: steady-state*). En este modelo se describe a la punta de la hifa como una región inmadura en su conformación, y que prescinde de algunos enlaces como los del β -1,3-glucano. Se intuye que los enlaces entre β -1,3-glucanos aun no se ha formado proveyendo a la pared de cierta flexibilidad, que se pierde conforme se forman los enlaces entre β -1,3-glucanos. Vermeulen y Wessels (1984; 1986) demostraron cómo la pared recién formada carece de quitina fibrilar haciéndola más susceptible a

quitinasas y como en las regiones más viejas de las hifas las subunidades de quitina y los β -1,3-glucanos formaban enlaces covalentes brindando a la pared de rigidez extra. Sin embargo el modelo no explica como se genera la forma de la hifa.

Bartnicki-García y cols. propusieron otro modelo de crecimiento en el que la pared es lisada y sintetizada en un equilibrio tal que es posible insertar polímeros (glucanos, difosfato de uridina-N-acetilglucosamina) y proteínas para formar más pared celular. En 1989 Bartnicki y cols., proponen al Spitzenkörper como centro suministrador de vesículas (CSV) secretoras involucradas en el crecimiento polarizado apoyado con un novedoso modelo matemático, aunque no se hace distinción entre macro y microvesículas. Se ha hecho la derivación matemática apoyada en experimentos para representar el crecimiento de una hifa ideal en dos y tres dimensiones (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al.*, 2000; Gierz y Bartnicki-García, 2001; Bartnicki-García, 2002). El modelo matemático bidimensional ha sido simulado por computadora y está basado en pixeles que representan vesículas que viajan desde el CSV hasta insertarse en la curva hifoide incrementando el área de la curva (Bartnicki-García *et al.*, 1995). La curva hifoide ha sido definida por la ecuación: $y = x \cot(xV/N)$; donde V representa la velocidad del CSV (origen de los pixeles), N el número de vesículas por unidad de tiempo, por último x y y son las coordenadas cartesianas de la curva hifoide creciendo sobre el eje de las ordenadas (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al.*, 1995; Bartnicki-García, 2002). El modelo permitió intuir que las vesículas secretoras provenientes de las regiones subapicales viajan a través de los microtúbulos y en el Spitzenkörper cambian a filamentos de actina para llegar hasta la membrana plasmática (Grove y Bracker, 1970; Grove *et al.*, 1970; Bartnicki-García, 1973; Bartnicki-García, 1990; Heath, 1994; Harris *et al.*, 2005). Araujo-Palomares (2007) mostró la proteína SPA-2, componente del polarisoma, marcada con GFP y observada por microscopía confocal en hifas vivas de *N. crassa*. SPA-2-GFP exhibió una distribución en forma de abanico de mano con un punto en la base del mango, donde la fluorescencia fue más intensa en relación a la fluorescencia del abanico y coincidió con la cara posterior del Spitzenkörper. El arco del abanico coincide con la punta de la hifa y esto sugiere que la proteína SPA-2 marca el camino de las vesículas desde el núcleo del Spitzenkörper hasta la membrana plasmática.

Virag y Harris (2006) citan a la guanosina trifosfatasa (*GTPase*, por sus siglas en inglés: *guanosine triphosphatase*) Cdc42p (por sus siglas en inglés: *cell división cycle 42 protein*) como responsable de la polaridad, por el hecho de que en *Saccharomyces cerevisiae* se le ha atribuido el reclutamiento de proteínas pertenecientes a los siguientes complejos: el exocisto, el polarisoma y el complejo Arp 2/3 (Chant, 1999; Fujita *et al.*, 2004; Lord *et al.*, 2002; Pruyne y Bretscher, 2000; Virag y Harris 2006). Sin embargo la forma en que estos componentes actúan no ha sido elucidada. Es necesario un análisis holístico en el que se incluyan todos los procesos celulares implicados en el mantenimiento del crecimiento polarizado (Bartnicki-García, 2002). Entre las rutas más importantes para el crecimiento polarizado se encuentran la secreción (convencional y no convencional) y la endocitosis.

I.5 Secreción

La correcta distribución de proteínas y lípidos depende de mecanismos que pueden llevar a los productos del sitio de síntesis (citoplasma o retículo endoplasmático) al lugar de la célula donde desempeñarán su función, ya sea un organelo, la membrana plasmática o bien hacia el espacio extracelular. La secreción es definida como el proceso por medio del cual es enviado al exterior de la célula material orgánico o inorgánico que tendrá una o varias funciones. En los procariotas existen al menos seis tipos diferentes de secreción (I-VI) y en los eucariotas existen al menos las denominadas clásicas y no-clásicas o no-convencionales (*traducido del inglés: non-classical secretion*). Entre los tipos de secreción clásica de los eucariotas se pueden mencionar la secreción regulada y la secreción constitutiva. Ambos tipos de secreción clásica involucran la dirección de las sustancias (por ejemplo: lípidos y proteínas), hacia retículo endoplasmático (RE). En RE las proteínas se pueden modificar de diferentes maneras: la N-glucosilación, la O-glucosilación y la formación de los enlaces disulfuro. Los productos generados en RE se empaquetan en vesículas que pueden ser recubiertas con complejos como el COPII y dirigirse hacia Golgi. En Golgi los péptidos pueden tener alguna modificación por glucosil transferasas. Después de Golgi se encuentra la red *trans*-Golgi (*traducida del inglés: trans-Golgi network*) (ver Fig.1). De la red *trans*-Golgi pueden emerger vesículas que se dirijan hacia la membrana

plasmática fusionarse y verter su contenido al medio extracelular en el último paso de la secreción llamado exocitosis. Otras vesículas que provengan de la red *trans*-Golgi pueden acumularse en el citoplasma y permanecer en espera de algún estímulo para dirigirse hacia la membrana plasmática y liberar al medio extracelular su contenido. Algunas vesículas provenientes de la red *trans*-Golgi pueden ser llevadas al lisosoma, pasando por otro organelo, el endosoma tardío. El endosoma tardío también puede sortear elementos que vienen del exterior por endocitosis hacia Golgi (Lodish *et al.*, 2008).

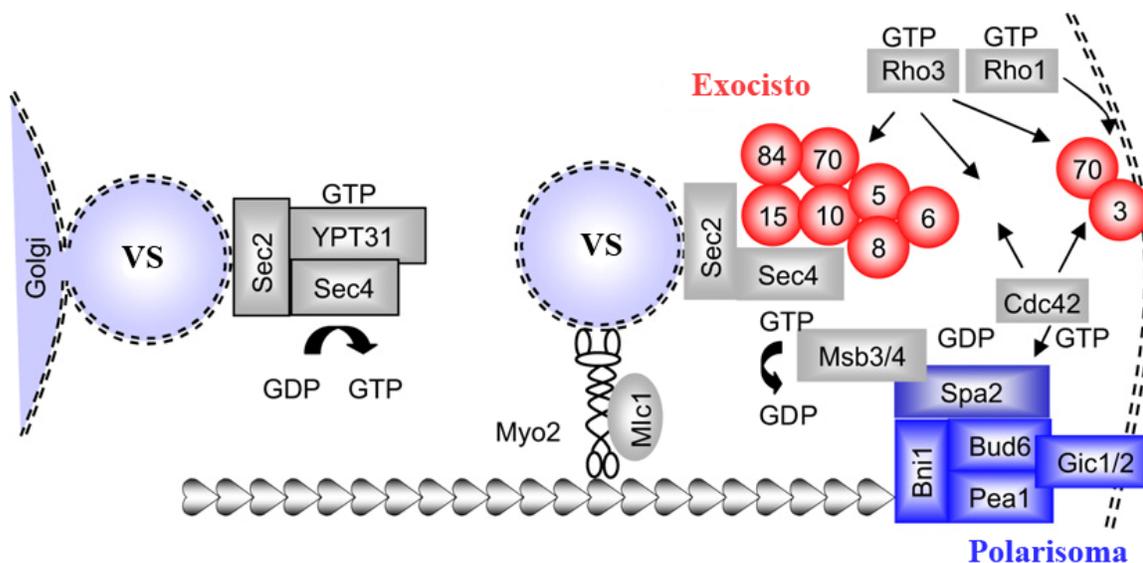


Figura 1. Representación esquemática de la exocitosis desde el *trans*-Golgi hasta la membrana plasmática en la levadura *S. cerevisiae*. En Golgi las vesículas secretoras (VS) son marcadas con Sec4p unido a GTP en presencia de Sec2p y viajan a través de cables de actina hasta la membrana plasmática donde se encuentran con el exocisto (los numerales; a todos les corresponde el prefijo Sec a excepción del 70 y el 84 que llevan el prefijo Exo) (Adaptado de Sudbery, 2008).

La secreción no-clásica de proteínas hidrosolubles, sin secuencia señal aparente, con modificaciones independientes del sistema RE-Golgi y resistentes al tratamiento clásico de Brefeldina A (BFA), inhibidor de la ruta clásica RE-Golgi, fue vista primero en células del sistema inmune de mamíferos (Rubartelli *et al.*, 1990; Cooper y Barondes, 1990). Nickel (2003) menciona que día a día crece la lista de las proteínas que no coinciden con la ruta clásica de secreción. Esta forma de secreción en eucariotas involucra al menos 4 mecanismos diferentes: (1) el reciclaje endosómico, (2) el “cambio abrupto en la membrana” (*traducido del inglés: membrane flip-flop*), (3) la formación de exosomas o también conocida como vesiculación de la membrana plasmática (*del inglés: membrane blebbing*) y (4) el empleo de transportadores en la membrana (Nickel, 2003).

La BFA es una lactona macrocíclica sintetizada a partir del palmitato (C₁₆) por varios hongos (Harris *et al.*, 1963). Al principio la BFA fue empleada como antiviral, sin embargo ha sido una herramienta muy valiosa para los biólogos celulares por bloquear la ruta de secreción de proteínas en una etapa muy temprana (Tamura *et al.*, 1968; Oda *et al.*, 1987; Takatsuki y Tamura, 1985; Misumi *et al.*, 1986). Las células tratadas con BFA retienen proteínas en una etapa pre-Golgi, como fue comprobado por inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (Fujiwara *et al.*, 1988; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Yamashina *et al.*, 1990). La droga BFA tiene la peculiaridad de interferir en la interacción entre Sec7 y su GEF, excluyendo rápidamente al sistema COPI (*por sus siglas en inglés: coat protein I*) en Golgi (Donaldson y Klausner, 1994)

La forma en que interactúan cada uno de los componentes de la ruta de secreción en la célula varía en espacio y tiempo dependiendo de la secuencia de aminoácidos de las proteínas implicadas, su conformación tridimensional, las condiciones del medio y el ciclo celular, entre otros (Palade, 1975; Bonifacino y Glick, 2004). Por lo tanto un entendimiento de la ruta secretora desde cada uno de sus componentes podría ayudar a elucidar que es lo que regula el crecimiento polarizado, ya sea para incrementarlo al máximo y obtener ganancias en la industria química, farmacéutica, alimentaria y otros; o bien disminuirlo al mínimo en el caso de los hongos patógenos de humanos, plantas, peces, entre otros. El hongo más estudiado hoy por hoy es la levadura del pan *S. cerevisiae*. El crecimiento polarizado ocurre en este hongo solo en etapas celulares cortas tales como la gemación que es seguida de otro tipo de crecimiento el isotrópico. Pero en los hongos filamentosos la secreción polarizada para el mantenimiento de la elongación de las hifas podría ser hasta cierto punto infinito si las condiciones ambientales son las adecuadas.

I.6 Exocitosis

La exocitosis polarizada comprende el acarreo de vesículas secretoras de la red *trans*-Golgi mediante el citoesqueleto; la fusión no espontánea de las membranas de las vesículas secretoras con la membrana plasmática; la subsecuente incorporación de las proteínas de la membrana de la vesícula a la membrana plasmática; y el vertido del contenido interno de la vesícula (Pickett y Edwarson, 2006). Los pasos de la exocitosis son

5: (1) el tráfico vesicular de la red *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática por difusión o a través de microtúbulos y filamentos de actina por medio de proteínas motoras acopladas a las vesículas; (2) el atado o enlace (*del inglés: tether*) de la vesícula a unos 25 nm de la membrana plasmática; (3) atracado (*del inglés: docking*) de las vesículas (distancia membrana-membrana <10 nm); (4) el disparo (*del inglés: priming*) es citado en células nerviosas como el rearrreglo proteico-lipídico dependiente de ATP previo al último paso; y por último, (5) la fusión (Cai *et al.*, 2007). La exocitosis de algunas vesículas sinápticas puede ser un proceso muy rápido que puede llegar a darse en unos cuantos microsegundos (Sabatini y Regehr, 1999). Collinge y Trinci (1974) calcularon una exocitosis de al menos ~38,000 vesículas secretoras por minuto para mantener el promedio de extensión de las hifas de *N. crassa*. Existen mayoritariamente dos tipos de exocitosis: (1) la exocitosis constitutiva y (2) la exocitosis regulada. La exocitosis constitutiva incluye la fusión de vesículas provenientes de la red *trans*-Golgi con la membrana plasmática. La exocitosis es esencial para la incorporación de nuevos lípidos y proteínas recién sintetizadas en la membrana (Salaün *et al.*, 2003). Las células polarizadas poseen mecanismos especializados para la correcta distribución de las vesículas provenientes de la red *trans*-Golgi (Mostov *et al.*, 2000; Salaün *et al.*, 2003). Salaün y cols. (2003) comentan que en todas las células se da un reciclaje de membrana vía endocitosis hacia el endosoma, para después dirigir el material de reciclaje a la membrana plasmática. La exocitosis regulada es referida regularmente a células nerviosas en las que se necesita la liberación de algún neurotransmisor embebido en vesículas sinápticas, como resultado de la excitación mediada por Ca⁺⁺ (Salaün *et al.*, 2003; Gerber y Sudhof, 2002).

La exocitosis del tipo beso y huida (*del inglés: Kiss and Run*), es un tipo de exocitosis especializada en la que se puede enviar al medio extracelular una porción del contenido de una vesícula a través de un poro efímero que comparten la vesícula y la membrana plasmática (Richmond y Brodie, 2002; Salaün *et al.*, 2003).

I.7 El exocisto

La función del exocisto es el atado (*del inglés: tether*) de las vesículas secretoras a la membrana plasmática y su intervención en la exocitosis es previa al ensamblaje de las

proteínas SNAREs (*por sus siglas en inglés: soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptors*). El exocisto es un complejo de 8 proteínas (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15, Exo70p y Exo84p) descrito por primera vez en *S. cerevisiae* con técnicas de inmunoprecipitación, inmunolocalización, y etiquetado con GFP, entre otras (TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999a). El exocisto no se encuentra restringido a la levadura del pan, sino que es altamente conservado en todas las células eucariotas incluyendo las de los mamíferos (Vega y Hsu, 2001). En neuritas el exocisto se asocia a la tubulina (Vega y Hsu, 2001). Las ocho proteínas del exocisto son hidrofílicas y tienden a formar dominios conocidos como bobina embobinada (*del inglés: coiled-coil*). El exocisto es efector de las Rab GTPasas Sec4, Rho1, Rho3, Cdc42 y Ra1A (Lipschutz *et al.*, 2000; Novick y Guo, 2002). Exo70p posee aminoácidos cargados positivamente (arginina y lisina) que en su arreglo tridimensional forman un área que le permite interactuar con las membranas que contienen PI (4,5) P₂ (*por sus siglas en inglés: phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate*) (He *et al.*, 2007). También la proteína Exo70 interactúa con el complejo ARP2/3 y con la proteína Rho3p, GTPasa reguladora de la exocitosis y la organización de la actina en *S. cerevisiae* (Adamo *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999; Zuo *et al.*, 2006). La proteína Sec6p de *S. cerevisiae* forma un dímero y se une directamente con las proteínas Exo70p, Sec10p y Sec8p (Guo *et al.*, 1999a;b; Vega y Hsu, 2001; Matern *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2005; Sivaram *et al.*, 2006). En células NRK (*por sus siglas en inglés: normal rat kidney*) y MDCK I (*por sus siglas en inglés: Marbin-Darbi canine kidney I*) Sec10p interacciona con el factor de ribosilación de ADP 6 (*ARF6 por sus siglas en inglés: ADP rybosylation factor 6*) para el reciclaje de los componentes del exocisto (Prigent *et al.*, 2003). El componente Exo84p también forma un dímero y junto con el componente Sec5p compiten por actuar bajo el mando de la GTPasa RalA (Moskalenko *et al.*, 2002; Sugihara *et al.*, 2002; Moskalenko *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005). Sec3p en levaduras ha sido definido como una de las principales marcas de exocitosis en la membrana plasmática por no formar parte de vesículas secretoras, al igual que Exo70p (Finger y Novick P., 1998; Boyd *et al.*, 2004). Sec3p interacciona con la proteína Bud4p y la localización celular de la proteína Sec3p es dependiente del PI (4,5) P₂ en la membrana y las GTPasas Rho1p y Cdc42p; sin embargo su localización se considera independiente del citoesqueleto de actina (Finger *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). La

proteína Sec15p tiene contacto directo con la GTPasa de vesículas Sec4p y ayuda a la rápida hidrólisis de GTP a GDP (Salminen y Novick, 1989; Newman y Magee, 1993; Guo *et al.*, 1999a). En *Drosophila melanogaster* se ha observado que la diferenciación celular en el órgano precursor sensorial necesita la proteína Sec15 y se ha sugerido que la proteína Sec15, es necesaria para una alta especificidad en el tráfico de vesículas intracelulares que asegura el linaje celular en el órgano maduro (Jafar-Nejad *et al.*, 2005). El factor de intercambio de guanosina (*GEF por sus siglas en inglés: guanosine exchange factor*) Sec2p de *S. cerevisiae* se asocia a las vesículas *trans*-Golgi (Medkova *et al.*, 2006). En mamíferos la proteína Rabin8 es homóloga de Sec2p y es necesaria para una correcta distribución celular de las vesículas que tienen unida la GTPasa Rab8, homóloga de Sec4p (Guo *et al.*, 1999a; Hattula *et al.*, 2002).

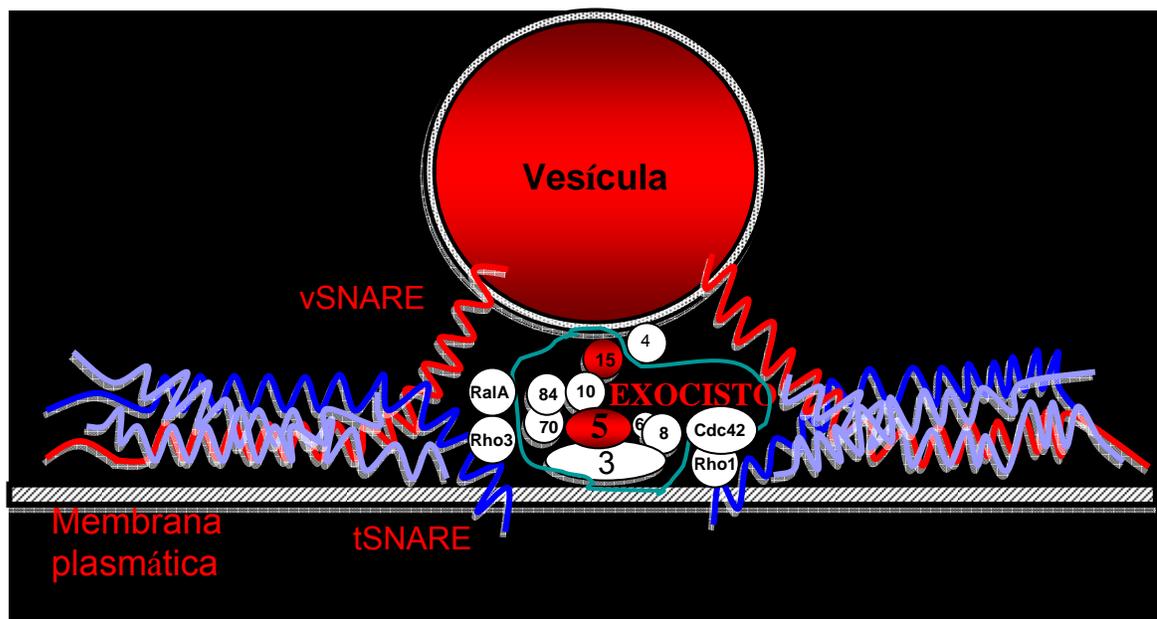


Figura 2. Representación esquemática del reconocimiento de la vesícula secretora y la membrana plasmática. El exocisto se encuentra delimitado por la línea azul; todos los números representan proteínas y llevan el prefijo SEC, excepto 70 y 84 que llevan el prefijo EXO (Adaptado de: Sutton *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999b; Bonifacino *et al.*, 2004).

I.8 Las proteínas SNAREs

Los SNAREs son proteínas necesarias para la fusión de vesículas a membranas de diferentes compartimentos celulares, tales como RE, Golgi y membrana plasmática (Söllner *et al.*, 1993b). Se han descrito unos 60 SNAREs entre mamíferos y hongos, todos los SNAREs tienen uno o más dominios de alrededor de 65 amino ácidos que forma una bobina embobinada cerca de su punto de anclaje a la membrana (Weimbs *et al.*, 1997). Cada dominio de v-SNARE (*del inglés: vesicle-SNARE*) forma un complejo con su t-SNARE (*del inglés: target-SNARE*) correspondiente y el SNAP, permitiendo a las dos membranas un acercamiento suficiente para la fusión de las membranas en la exocitosis (Sutton *et al.*, 1998). Se cree que las interacciones de los SNAREs están reguladas por proteínas como la sinaptogamina, la sinaptofisina, el NSF, el α -SNAP y el SNARE tipo SNAP-25 (Sec9p en hongos) (Woodbury *et al.*, 2000). Al calcio se le asocia en el proceso de exocitosis por sus probables interacciones con las proteínas sinaptogamina, las rafilinas

y/o directamente con el complejo de las SNAREs (Fykse *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999). El desensamblaje de las SNAREs requiere de ATP para que el factor sensible a N-etilmaleimida (*NSF por sus siglas en inglés: N-ethylmaleimide sensitive factor*) actúe y las SNAREs se puedan volver a ser utilizados en otra fusión (Söllner *et al.*, 1993b). Las SNAREs tienen relación con el crecimiento polarizado y es posible que intervengan en la defensa de las células de plantas ante la invasión de plantas por hongos, por ejemplo el mohor polvoriento *Blumeria graminis* (Schulze-Lefert, 2004). La forma para clasificar a los SNAREs requiere de las comparaciones entre los dominios formadores de complejos, o bien si en el centro de los dominios se encuentra una glutamina (Q) o una arginina (R) (Weimbs *et al.*, 1997; Fasshauer *et al.*, 1998). Las clases de SNAREs, basándose en observaciones experimentales son cuatro: (1) Qa-SNAREs (syntaxinas tipo SSO1/2), (2) Qb-SNAREs (syntaxinas tipo Bet1), (3) Qc-SNAREs (syntaxinas tipo Bos1) y (4) R-SNAREs (synaptobrevinas tipo SNC1/2) (Pelham, 2001; Gupta y Heath, 2002). En *N. crassa* Gupta y Heath (2000), inmunolocalizaron e inmunoprecipitaron el SNARE Sso2p homólogo de *S. cerevisiae*. Se han predicho al menos 20 hélices SNAREs compartidas entre hongos, de las cuales 6 son Qa-SNAREs, 5 Qb-SNAREs, 5 Qc-SNAREs y 4 R-SNAREs (Gupta y Heath, 2002). Las proteínas Rab junto con las proteínas SNAREs han sido propuestas como las responsables de la fusión de vesículas y membranas de manera específica (Botstein *et al.*, 1988; Rothman y Warren, 1994). Sin embargo Grote y Novick (1999) encontraron que las SNAREs tienen una promiscuidad alta con respecto a las Rab GTPasas, de tal manera que se les excluye de la posible fusión de alta fidelidad y se le otorga más mérito a complejos proteicos exclusivos de cada etapa. El exocisto se ha propuesto como el complejo proteico que asegura la fusión de las vesículas provenientes de la red *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática y solo hacia la membrana plasmática (Grote y Novick, 1999).

I.9 GTPasas tipo Ras

Las proteínas Ras (*por sus siglas en inglés: rat sarcoma*) GTPasas son importantes blancos de estudio por representar del 10 al 20% de las causas de los tumores en humanos. Las Ras GTPasas funcionan como interruptores moleculares en muchos procesos celulares

(Bogusky y McCormick, 1993). El modo en que actúan las Ras GTPasas depende del estado en que se encuentren, por ejemplo si se mantiene unida al GTP se dice que esta se encuentra activa (*on* o *Switch I*) y cuando el GTP es hidrolizado a GDP se dice que esta se encuentra en la forma inactiva (*off* o *Switch II*) (Stroupe y Brunger, 2000). Todas las Ras GTPasas comparten los mismos motivos estructurales en el extremo amino: (1) G1 (GXXXXGKS/T); (2) G2 T; (3) G3 (DXXGQ/H/T); G4 (T-NKXD); G5 (C/SAK/L/T) (Bourne *et al.*, 1991).

La rama más grande de la superfamilia de GTPasas Ras es la de las Rab (*por sus siglas en inglés: Ras in brain*). Las Rab GTPasas juegan un papel primordial en la secreción por asociarse a las vesículas secretoras (Punt *et al.*, 2001; TerBush y Novick observación no publicada). Todos los miembros de la familia de las Rab GTPasas tienen uno o dos residuos de cisteína en o cerca del carboxi-terminal (dominios CC, CXC, CCX, CCXX o CCXXX) que son modificados con farnesil (15 C) o geranilgeranil (20 C) por la farnesiltransferasa (EC 2.5.1.58) o geranilgeraniltransferasa II (EC 2.5.1.60) respectivamente, y esa modificación les brinda unión a las membranas (Cox y Deer, 2002; Wennerberg *et al.*, 2005). La Rab GTPasa Sec4p en *S. cerevisiae* se asocia a la membrana de las vesículas secretoras por medio de los residuos modificados con grupos geranilgeranil de cisteína cerca de su extremo carboxilo. Msb3p y Msb4p son proteínas GAP (*por sus siglas en inglés: GTPase activating protein*) y su función es elicitar a Sec4p para la hidrólisis del GTP a GDP (Gao *et al.*, 2003; Tcheperegine *et al.*, 2005). Las levaduras que carecen de actividad de las proteínas Msb3p y Msb4p acumulan vesículas con diámetros entre 80 y 100 nm (Gao *et al.*, 2003). Se cree que la regulación de Sec4p por la proteína cinasa Cbk1p es a través de la fosforilación y unión del GEF (*por sus siglas en inglés: guanine exchange factor*) Sec2p (Kurischko *et al.*, 2008). Cbk1p interactúa con Sec2p cerca de la membrana plasmática, regula la distribución de la glucosil transferasa Och1p en Golgi, y la regula Ace2p dentro del complejo RAM (*por sus siglas en inglés: regulation of Ace2 and morphogenesis*) para la transcripción de genes (Kurischko *et al.*, 2008). Sec4p necesita de la proteína Sec15p para una rápida hidrólisis de GTP a GDP (Newman y Magee, 1993). Cuando Sec4p se encuentra en su forma activa (unida a GTP) dirige a las vesículas secretoras de la etapa *post*-Golgi hacia la membrana plasmática. El tiempo que provee Sec4p es suficiente para que se forme el complejo conocido como Exocisto y este a

su vez dará la pauta para que se cree otro complejo: el de los SNAREs y suceda la fusión de la membrana de la vesícula y la membrana plasmática en el proceso conocido como exocitosis.

La Rho1p GTPasa está involucrada en la progresión del ciclo celular, regula el citoesqueleto de actina y la construcción de pared celular por su relación con el complejo de la glucano-sintetasa (FKS-1) (Drgonová *et al.*, 1996; Mazur y Baginski, 1996; Qadota *et al.*, 1996; Drgonová *et al.*, 1999). Rho1p ligada a GTP interactúa, entre otras (ej. actina, β -1,3-glucano sintetasa), con la proteína Sec3p, componente del exocisto catalogado como punto de referencia para la exocitosis (Guo *et al.*, 2001). La Rho GTPasa Cdc42p es miembro de la superfamilia de las Ras GTPasas y juega un importante papel en la proliferación y diferenciación celular en todos los eucariotas, se ha visto que en hongos principalmente en *S. cerevisiae* que la intervención de la Cdc42p es trascendental en la regulación del crecimiento polarizado, crecimiento filamentoso, apareamiento vegetativo, división celular, entre otros (Johnson, 1999; Mösch *et al.*, 2001; Etienne-Manneville, 2004). Cdc42p dispara el ensamblaje localizado de los cables de actina alterando la conformación de las proteínas andamio WASP, así como el de las forminas Bni1p y Bnr1p cuando Cdc42p toma el lugar de Rho3p y Rho4p (Matsui y Toh-e, 1992; Evangelista *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2003). Las forminas y la profilina son importantes para la formación de cables de actina y lo pueden realizar de manera independiente al complejo Arp 2/3 para establecer la polarización celular en *S. cerevisiae* (Evangelista *et al.*, 2004). La Rho GTPasa Cdc42^{L61} aumenta considerablemente la exocitosis en células neuroendócrinas, Cdc42p es capaz de activar el complejo N-WASP-WIP para la polimerización de la actina dependiendo, entre otros factores como la presencia de PI (4,5) P₂, de la curvatura de las membranas en la endocitosis y (Gasman *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2008). Las GTPasas tipo ARF son reguladoras de la actina y la vesiculación en membranas donadoras interactuando con las proteínas AP-1, AP-2, AP-4 (*por sus siglas en inglés: adaptor protein #*) y GGA1-3 (*por sus siglas en inglés: Golgi associated/ γ -adaptin ear homology/ARF binding proteins 1-3*) (Rothman y Warren, 1994; Hirst y Robinson, 1998; Springer *et al.*, 1999; Boehm y Bonifacino, 2001; Mullins y Bonifacino, 2001; Robinson y Bonifacino, 2001; Dell'Angelica, 2001; Bonifacino y Lippincott-Schwartz, 2003; Bonifacino, 2004; Randazzo *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008). La enzima N-miristol

transferasa (EC 2.3.1.97) añade cadenas de ácido mirístico a partir del miristol-coenzima A [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-COO-CoA}$] al dominio amino GXXX(S/T) de las ARFs para asociarlas a las membranas donadoras (Boutin, 1997; Bhatnagar y Gordon, 1997; Bhatnagar *et al.*, 1999).

I.10 Pared celular

La pared celular de los hongos contiene en su mayoría polisacáridos como la quitina y los glucanos (entre el 80 y 90 %), y en menor proporción proteínas y lípidos (Bartnicki-García, 1968). Entre las funciones de la pared celular de los hongos se encuentra la de barrera ante la deshidratación, ósmosis lítica, los rayos UV (cuando posee melanina), agentes químicos antibióticos, la expansión desmesurada de la hifa por presión interna (turgor), e interacción entre huésped y alimento por medio de proteínas ancladas a la pared por enlaces covalentes al β -1,3- o β -1,6-glucano (Chaffin *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha hecho un intenso trabajo para saber como se regula la síntesis de pared celular. Es importante el conocimiento que engloba desde la transcripción de los genes hasta las modificaciones post-traduccionales y localización espacio tiempo de las proteínas formadoras de quitina y β -glucanos. En el caso de la formación del polímero conocido como quitina, la enzima sintetasa de quitina es la responsable (uridil difosfato acetilaminodeoxiglucosiltransferasa, EC 2.4.1.16) y es altamente activada en presencia de N-acetilglucosamina (McMurrough *et al.*, 1971; McMurrough y Bartnicki-García, 1971). Se ha descubierto que las proteínas Wsc1p y Mid2p interactúan con el factor de intercambio de nucleótido Rom2p, para facilitar el intercambio de GDP por GTP en la proteína Rho1p (Bickle *et al.*, 1998; Phipil y Levin, 2001). La proteína Rho1p es reclutada a la membrana plasmática y activa a la cinasa Pkc1p, de esta manera se inicia la cascada MAPK (*por sus siglas en inglés: mitogen activated protein kinase*) que regula una variedad de respuestas celulares (Kamada *et al.*, 1996). La cascada de MAPK involucra a la MAPK Erk (MEK), la cinasa Bck1, las MEKs Mkk1p y Mkk2p y a las MAPK Slt2p/Mpk1p (Heinisch *et al.*, 1999). Por último Slt2p/Mpk1p regulan la actividad de los factores de transcripción y las proteínas que se unen a la cromatina y de esta manera se regula la transcripción de los genes implicados en la síntesis de pared celular (Jung y Levin, 1999).

El estrés en la pared celular puede incrementar los niveles celulares de β -glucanos y quitina mediado por la expresión dependiente de Slt2p que codifican para β -1,3-glucano sintetasas (Fks1p y Fks2p) y al decremento de quitina sintetasa III (Chs3p) (Jung y Levin, 1999; Kamada *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998). Como Rho1p es un activador alostérico de Fks1p y el estrés de la pared celular conduce a la deslocalización de Fks1p de los sitios de crecimiento, se cree que la deslocalización es para reparar los daños en la pared celular (Qadota *et al.*, 1996; Delley y Hall 1999). La regulación de la Chs3p es de manera similar, ya que se requiere de la chaperona Chs7p para permitir la salida de R.E., Chs5p, Chs6p para la salida de la red *trans*-Golgi y Chs4p para la actividad enzimática (Trilla *et al.*, 1999; Santos y Snyder, 1997; Ziman *et al.*, 1998; Trilla *et al.*, 1997). Bajo condiciones de estrés la proteína Chs3p es liberada de los diferentes compartimentos celulares por la activación de la GTPasa Rho1p y de la Pkc1p y no por los factores río abajo de la cascada de las MAPK dependientes de Bck1p (Valdivia y Schekman, 2003). En levaduras la falta de las chaperonas chs5p y chs6p provoca la acumulación de Chs3p en la red *trans*-Golgi y el endosoma, de tal manera que no pueden llegar a la membrana plasmática (Santos y Snyder, 1997, Santos *et al.*, 1997; Ziman *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 2002). Cuando se muta el gen que codifica para el componente Sec6p del exocisto en levaduras la Chs3p se acumula en vesículas post red *trans*-Golgi (Valdivia *et al.*, 2002).

La β -1,3-glucan sintetasa (EC 2.4.1.34) en *N. crassa* es parte integral de la membrana citoplasmática y cataliza la reacción de la glucosa-UDP y $[\beta$ -(1,3)-D-glucosil]_n que da lugar a UDP + $[\beta$ -(1,3)-D-glucosil]_{n+1}. La β -1,3-glucan sintetasa es capaz de catalizar la reacción de polimerización *in-vitro* y se ha reportado a la sorbosa como inhibidor de la reacción (Jabri *et al.*, 1989). Se cree que los enlaces β -1,6-glucanos se forman después de que se han formado los β -1,3-glucanos en la punta y se duda que se formen antes de la exocitosis de las vesículas que contienen polímeros (Wessels, 1993). El gen *gs-1* complementa la mutación de la cepa de *N. crassa gs-1* que carece de actividad β -1,3-glucano sintetasa. Algo muy interesante es que la secuencia no tiene péptido señal aparente ni regiones transmembranales como se esperaba para una proteína residente de membrana, entonces se cree que el gen *gs-1* es un factor de transcripción por su homología con algunos factores de transcripción de *S. cerevisiae* como el Knr4/Smi1 (Phelps *et al.*, 1990; Enderlin y Selitrennikoff, 1994; Davis, 2000). Sin embargo la localización

mayoritaria de la quimera GS-1-GFP en *N. crassa* es la capa externa del Spitzenkörper (Verdín-Ramos *et al.*, 2008). Para que la polimerización de β -(1,3)-glucanos se lleve a cabo de manera normal, se necesita que se forme un complejo de al menos tres productos proteicos, GS-1, GLS-1 (FKS-1) y RHO-1 (Schimoler-O'rourke *et al.*, 2003; Verdín-Ramos *et al.*, 2008). Para que exista actividad de la β -1,3-glucano sintetasa *in-vitro* es necesario que la GTPasa Rho1 esté presente (Mazur y Baginski, 1996). La proteína Rho1 se une a la membrana plasmática cuando se encuentra prenilada y se cree que el cambio de la forma activada (unida a GTP) a la inactivada (unida a GDP) abre un espacio hacia el sitio catalítico de la β -1,3-glucano sintetasa (FKS-1) de los monómeros de uridina-glucosadifosfato (Shematek *et al.*, 1980; Yamochi *et al.*, 1994; Drgonová *et al.*, 1996). Como se vió anteriormente las proteínas tipo Rho son reguladoras del citoesqueleto de actina en células animales, sin embargo se cree que en hongos levaduriformes la Rho1p depende de la actina y no al contrario (Drgonová *et al.*, 1996). Se ha propuesto que sucede algo similar para las sintetasas de quitina (Cabib *et al.*, 1983; Drgonová *et al.*, 1996).

Los hongos generalmente tienen en su genoma codificadas entre 10 y 25 enzimas que degradan quitina (quitinasas) y aún no se sabe la razón (Seidl, 2008). Se cree que tienen roles fisiológicos y ecológicos como: (1) la degradación de quitina presente en insectos, en hifas ajenas o en hifas muertas para obtener moléculas energéticas o estructurales; (2) remodelación de las paredes durante el crecimiento, la ramificación, autólisis e incluso la fusión hifal (Gooday, 1990; Cohen-Kupiec, 1998; Jolles y Muzarelli, 1999; Adams, 2004; Yang *et al.*, 2007; Siedl, 2008). Existen endoquitinasas, exoquitinasas y β -N-acetilglucosaminidasas. Las endoquitinasas y exoquitinasas hidrolizan el enlace β -(1,4) de las cadenas de N-acetil- β -D-glucosamina. Las endoquitinasas pueden hidrolizar en cualquier sitio de la cadena y producir fragmentos de diferentes tamaños, en cambio las exoquitinasas solo pueden hidrolizar desde el extremo no reductor de la cadena. Las β -N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.52) catalizan la reacción de la hidrólisis de los residuos no reductores de N-acetil-D-hexosamina en las cadenas de N-acetil- β -D-hexosaminidos. Existen confusiones de acuerdo al nombre que se le otorga a las β -N-acetilglucosaminidasas, ya que algunos autores las catalogan como exoquitinasas, sin embargo son muy diferentes desde el punto de vista estructural y funcional.

Entre las glucanasas las endo- y exo-1,3- β -glucanasas (EC 3.2.1.6) tienen codificado en el genoma de las levaduras alrededor de 15 genes (Baladrón *et al.*, 2002). Las exo- β -(1,3)-glucanasas son las moléculas más activas e hidrolizan el enlace β -O-glucosídico en las terminales no reductoras de las cadenas de β -(1,3)-glucanos con ramificaciones β -(1,6) (Baladrón *et al.*, 2002). Las endo β -(1,3)-glucanasas hidrolizan los enlaces en puntos intermedios de las cadenas liberando una cantidad mínima de glucosa y a una velocidad menor que la de las exo-1,3- β -glucanasas (Baladrón *et al.*, 2002).

I.11 Septos

Las hifas de los Basidiomicetos, Ascomicetos y hongos mitospóricos poseen paredes transversales llamadas septos a diferencia de las hifas de los Zygomycetos y Quitridos. El septo es una estructura de pared celular que otorga rigidez a las hifas e importante en la diferenciación celular (Gull, 1978). Los septos en *N. crassa* suelen presentarse en forma anular cada 55 μm y de 100 a 180 μm de las puntas en crecimiento (Hunsley y Gooday, 1974). En *N. crassa* los poros de los septos generalmente miden de 350 nm a 500 nm (Hunsley y Gooday, 1974). Se cree que en la región del septo no ocurre una gran actividad si se compara con la punta de las hifas en crecimiento (Gow y Gadd, 1995). La formación del septo requiere inserción de membrana, la formación de pared celular la constricción de un anillo de actomiosina y la formación de parches de actina de cada lado del septo (Jochová *et al.*, 1991). Algunas sintetasas de quitina se localizan en las zonas de crecimiento apical y en los septos (Hunsley y Gooday, 1974; Horiuchi *et al.*, 1999; Ichinomiya *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006; Riquelme *et al.*, 2007) En levaduras se ha encontrado por inmunolocalización a las proteínas Rho1p y Fks1p que forman parte del complejo polimerizador de β -1,3-glucanos, en el sitio de crecimiento de la gema, así como en el cuello de la célula madre-hija (Yamochi *et al.*, 1994; Qadota *et al.*, 1996). El septo contiene un poro en el centro y se encuentra rodeado por una membrana (parentosoma) derivada del RE. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se divide solo por formación de un septo. La formación del septo se da en el sitio donde las dos células hijas pueden tener aproximadamente la misma longitud y se vuelven a dividir cuando alcanzan la longitud cercana a los 14 μm (Carlile, 2001). La fisión celular en *S. pombe* sucede por

la acción controlada de la enzima endo- β -1,3-glucanasa (*Eng1* por sus siglas en inglés: *endo glucanase1*) y la endo- α -1,3-glucanasa (*Agn1*) que son transportadas al septo y se distribuyen en el en forma de anillo (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Dekker *et al.*, 2004; Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008). La correcta localización requiere un exocisto funcional, septinas y las anillinas *Mid1* y *Mid2* (por sus siglas en inglés: *division in the middle2*). Se ha reportado que en *S. pombe* las proteínas *Sec6p*, *Sec8p*, *Sec10p* y *Exo70* se localizan en los sitios de exocitosis activa incluyendo el sitio de división (Wang *et al.*, 2002). Se cree que el anillo contractil de F-actina (actina filamentosa) es una marca espacial que sirve de guía para la formación del exocisto en los septos (Wang *et al.*, 2002). Se ha visto que la cinasa dependiente de ciclinas *Cdc15p* implicada en eventos de mitosis es necesaria para localización del exocisto en los sitios de división (Fankhauser *et al.*, 1995; Lippincott y Li, 1998). La droga BFA no limita la formación del exocisto cerca del anillo de actomiosina y se especula que su localización en el septo es independiente a la secreción (Wang *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* la mutación de alguno de los componentes del exocisto implica la acumulación de vesículas post-Golgi (TerBush y Novick, 1995; TerBush *et al.*, 1996; Finger y Novick, 1997; Roth *et al.*, 1998). Contrario a lo que sucede en *S. cerevisiae* en *S. pombe* las mutantes de los componentes del exocisto son capaces de mantener un crecimiento polarizado y el establecimiento del septo aunque de manera irregular (Wang *et al.*, 2002). Las mutantes del exocisto en *S. pombe* son defectuosas en la separación de las células madre-hija, que sucede por rompimiento controlado del septo por las enzimas *Eng1p* y *Agn1p* (Wang *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Dekker *et al.*, 2004; Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008). La formación de septos, el origen de las esporas y la citocinesis en hongos representan eventos que comparten muchos procesos, entre ellos, la formación de una pared entre dos compartimentos, la remodelación o ruptura para separar una célula de otra con quitinasas y glucanasas (Gull *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Dekker *et al.*, 2004; Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008; Seidl *et al.*, 2008). En hongos filamentosos como *A. nidulans*, *A. gossypii* y *N. crassa* se han caracterizado mutantes que forman septos de manera irregular y otras que no forman septos, estas características aunadas a otras más, hacen de los hongos filamentosos un excelente modelo de estudio para estudiar la formación de los

septos (Ayad-Durieux, *et al.*, 2000; Baladrón *et al.*, 2002; Wendland y Philippsen, 2002; Rasmussen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

I.12 Anastomosis

La anastomosis es un proceso de gran significancia en hongos filamentosos por ser necesario para el mantenimiento de la red tridimensional de hifas por medio de la transferencia de nutrientes y organelos, entre ellos núcleos. Este tipo de fusión es comparable al que sucede en ejemplos tales como la diferenciación muscular, fusión osteoclástica en la formación del hueso, en la formación de la placenta, entre otros (Dworak y Sink, 2002; Cross *et al.*, 1994). Se han descrito incompatibilidades de fusiones celulares asexuales mediadas por loci como el *S*, en plantas, y el MHC I y receptor “T” en mamíferos (Nashrallah, 2000; Jones *et al.*, 1998). En hongos la fusión vegetativa o somática de las hifas es generalmente llamada anastomosis y le brinda al micelio una gran capacidad para sortear núcleos (entre otros organelos) y nutrientes del citoplasma en la colonia de manera tridimensional (Carlile *et al.*, 2001). En los ascomicetos el desconocimiento vegetativo de cepas de la misma especie loci *het* diferente es llamado incompatibilidad vegetativa o del heterocarionte (Glass *et al.*, 2000; Saupe, 2000; Sarkar *et al.*, 2002). El proceso de anastomosis se da generalmente detrás del margen de la colonia y la mutación de los loci *het* previenen la formación de heterocariones desencadenando la compartimentalización de las hifas y/o la lisis celular por muerte celular programada (Caten y Jinks, 1966; Mylyk, 1976; Pandit y Maheswari, 1996; Puhalla y Speith, 1995, Glass *et al.*, 2000, Biella *et al.*, 2002). Hacen falta estudios sobre la anastomosis, tanto de manera fisiológica como genética y molecular (Glass *et al.*, 2000; Hickey *et al.*, 2002). Solo hasta tiempos recientes se ha dado un estudio sistemático para describir el proceso de anastomosis y la mayor parte del trabajo, que es poco, se ha realizado en *N. crassa* (Glass *et al.*, 2000). Hay que tener en cuenta que en *N. crassa* aún no existen estudios completos sobre las moléculas quimiotrópicas, ni de sus receptores, tampoco se han definido las rutas metabólicas implicadas en las fusiones hifales (Glass *et al.*, 2004).

I.13 Etiquetado de proteínas

Existen diferentes maneras de estudiar la ruta secretora. Una de las formas más efectivas es el seguimiento de proteínas y lípidos involucrados en el empaquetamiento, transporte y arribo de material para exocitosis. Las proteínas pueden ser marcadas de diferentes formas. El etiquetamiento con aminoácidos radiactivos le permitió a Palade y Jamieson el descubrimiento de la ruta secretora clásica en células fijadas a diferentes tiempos de exposición a aminoácidos con isótopos radiactivos (Jamieson y Palade, 1966; Jamieson y Palade, 1967a;b). En fechas recientes y con la finalidad de observar los sitios funcionales, así como de síntesis de las proteínas en células vivas se han realizado fusiones genéticas entre la secuencia de ADN que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP* por sus siglas en inglés: *green fluorescent protein*) y secuencias que codifican para promotores o proteínas (Prasher *et al.*, 1985; Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994; Presley *et al.*, 1997; Lippincott-Schwartz, 2001). Las características de la GFP, como lo son el poco cambio conformacional y funcional bajo cambios altos en pH (5-11 en SDS o cloruro de guanidino 6 M), y fijaciones con paraformaldehído, metanol o glutaraldehído, le han permitido ser empleada en una gran gama de experimentos. El constante estudio de los efectos de la proteína sobre las células transformantes, así como la generación de diferentes secuencias de la proteína involucrando mutaciones en su cadena polipeptídica que le confieren excitaciones y emisiones a diferentes longitudes de onda, entre otras características, hacen de la GFP un marcaje de proteínas *in vivo* muy confiable. Existen muchas variantes de la proteína GFP, en este estudio se escogió la secuencia *sgfp* que posee una mutación en el sitio 65 donde hay un cambio de una serina por una treonina, cambio que le ha dotado de un mejor rendimiento haciéndola más brillante y menos proclive al fotoblanqueo (Tsien, 1998).

Capítulo II

Antecedentes

II.1 Ruta de secreción

Mutantes de secreción de *S. cerevisiae* obtenidas por exposición a la radiación ultravioleta, trajeron a luz varios genes (Novick *et al.*, 1979; Novick *et al.*, 1980; Schekman y Novick, 2004). *SECI* fué el primero de los genes identificados en mutantes de secreción sensibles a temperatura. Tales mutantes de *S. cerevisiae* se sometieron a una temperatura restrictiva de 37 °C y se observaron bajo microscopía electrónica de transmisión. Entre sus características más notables fueron la interrupción en la secreción proteica y la acumulación de vesículas conteniendo proteínas secretables, así como compuestos formadores de membrana y pared celular (Novick *et al.*, 1979; Schekman y Novick, 2004). En 1980 Novick *et al.*, analizaron 200 mutantes cuya secreción de una invertasa y una ácido fosfatasa se veía interrumpida a la temperatura restrictiva y se reestablecía de manera reversible al bajar la temperatura. De igual manera al incrementar la temperatura, un acúmulo de vesículas se hacía evidente y al bajar la temperatura estas vesículas disminuían en número. Las 200 mutantes se subdividieron en 23 grupos complementables. Carr *et al.* (1999) encontraron que el gen *SECI* codifica para una proteína que ayuda a la fusión de las vesículas secretoras de 100 nm a la membrana plasmática. Dicha proteína es llamada receptor y ligador del factor de fusión sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE), acrónimo que hace alusión a su estructura secundaria formada por hélices alfa alargadas que son semejantes a las cuerdas de una trampa y de un tambor (Fig. 2) (Sutton *et al.*, 1998). La proteína Sec2p funciona como GEF de Sec4p y es regulada y fosforilada por la proteína Cbk1p (Walch-Solimena, *et al.*, 1997; Kurischko *et*

al., 2008). La proteína Sec2p en *S. cerevisiae* tiene una secuencia de 167 aa (84 kDa) y su estructura es de la forma bobina-embobinada (*traducido del inglés: coil-coiled*) con el extremo amino esencial y el carboxilo indispensable (Nair *et al.*, 1990). La proteína Sec4p ha sido propuesta como controladora de varios eventos en la etapa post-Golgi (Salminen y Novick, 1987; Walch-Solimena, 1997; Guo *et al.*, 1999a). Mutaciones del gen *SEC4* en la levadura *S. cerevisiae* provoca la acumulación de invertasas y de vesículas secretoras post-Golgi de aprox. 100 nm (Novick *et al.*, 1980; Salminen y Novick, 1987; Walch-Solimena, *et al.*, 1997). La secuencia de que codifica para la proteína Sec4p (#M16507) comparte 32% de identidad con la proteína Ras (*por sus siglas en inglés: rat sarcoma*) p21 (*homo sapiens*), Ypt1p (*S. cerevisiae*), RHY2 (*S. pombe*), SAS1 y SAS2 (*Dictyostelium discoideum*). En *S. cerevisiae* la proteína Sec4p se localiza en sitios de crecimiento polarizado sin embargo, no se sabe exactamente qué proteína la recluta. En mutantes de la proteína del polarisoma Spa2p (*S. crevisiae* Δ spa2) se encontró que si bien Sec4p se localiza en las zonas de emergencia de la gema es difícil que colocalice en los sitios de emergencia de la gema con la activadora de Rab GTPasas Gyl1p (*por sus siglas en inglés: gyp (GAP for Ytp proteins) like1 protein*). Para que el RNAm SEC4 y Sro7p sean transportados y acumulados en la zona de emergencia de la gema (durante G1) y en la gema (durante G2/M) de *S. cerevisiae* es de gran importancia que los genes acarreadores de RNAm: *ASH1*, *SHE2*, *SHE3*, *SHE4* y *SHE5*, así como el de la miosina 2 (*MYO2*) sean funcionales (Aronov *et al.*, 2007). La proteína tipo SNARE Sro7p necesita de los genes *SHE* funcionales para ubicarse en los sitios de emergencia de la gema (G1) y en la gema (G2/M), contrario a lo anterior, la proteína Sec4p no necesita de los genes *SHE* para la correcta ubicación en el sitio de emergencia de la gema (G1) y en la gema (G2/M) celular en levaduras (Aronov *et al.*, 2007). Se especula que los RNAm de factores de la polarización como algunas GTPasas, SNAREs miosinas y los componentes del exocisto son transportados por las proteínas SHE y la Myo2p a los sitios de polarización (Aronov *et al.*, 2007). La Rab GTPasa (*por sus siglas en inglés* Guanosine Triphosphatase) *AgSec4p* ha sido fusionada genéticamente con la GFP y la fusión proteica ha sido observada en *Ashbya gossypii* por microscopía de epifluorescencia en las puntas de las hifas en crecimiento (Schmitz *et al.*, 2006). La fusión GFP-*AgSec4p* en *A. gossypii* regularmente se acumula en el domo apical, sin embargo en la mutante de la formina *AgBNI1 Δ D*

distribución de la proteína GFP-AgSec4p es dispersa (Schmitz *et al.*, 2006). Lo interesante es que la proteína AgSpa2p se sigue acumulando en las zonas adyacentes a la membrana plasmática y no se sabe si las forminas AgBnr1p y AgBnr2p son las responsables de esta polarización de AgSpa2p-GFP (Schmitz *et al.*, 2006). Lo que si es seguro es que la formina AgBni1p es indispensable para el crecimiento hifal (Schmitz *et al.*, 2006).

En levaduras el componente Sec15p es el que interacciona de manera más cercana con la GTPasa Sec4p para la unión de la vesícula a su sitio de exocitosis (Guo *et al.*, 1999b; Grindstaff *et al.*, 1998). La localización de la proteína Sec15p en células levaduriformes es en el sitio de emergencia de la gema (G1), en la punta apical de la gema (G2/M) y en el cuello entre las células madre-hija (G2/M) (Salminen y Novick, 1989; TerBush *et al.*, 1996). En levaduras el reciclaje de la Proteína Sec15p a través del endosoma depende de las Rab GTPasas Pik1 (*por sus siglas en inglés: phosphatidylinositol 4-kinase I*) y Ypt31/32 (en *S. cerevisiae*, Ypt3p en *S. pombe*), así como de las translocasas de lípidos, entre otras (Guo *et al.*, 1999a). La elucidación del ensamblaje y desensamblaje del exocisto es un gran reto, considerando su intervención en el crecimiento polarizado (Munson *et al.*, 2006). Es importante también la forma en que el exocisto interactúa con proteínas como los SNAREs (*por sus siglas en inglés Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptors*) y GTPasas.

La proteína Sec3p actúa como marca del sitio de exocitosis en *S. cerevisiae*, ayudando a la unión de la vesícula secretora con la membrana plasmática y forma parte del complejo proteico octamérico conocido como exocisto (Haarer *et al.*, 1996; TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999a; Guo *et al.*, 1999b). El exocisto en mamíferos fue aislado en células del cerebro de rata (Hsu *et al.*, 1996). Hazuka y cols. (1999) inmunolocalizaron al complejo en las áreas de crecimiento de neuritas y en los sitios de ensamblaje sináptico axonal. La proteína SECC-GFP (homólogo de Sec3p) fusionada a GFP localiza en los ápices de las hifas de *A. nidulans* (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). La proteína SNARE GFP-SYNA fué insensible al tratamiento con citocalasina A (Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

Una de las proteínas responsables en el marcaje de vesículas para su exportación de Retículo endoplasmático a Golgi, así como el transporte a través de Golgi es Sec7p (Achstetter *et al.*, 1988; Franzusoff y Schekman, 1989; Franzusoff *et al.*, 1991; Franzusoff *et al.*, 1992). Sec7p. Tiene la capacidad de unirse al GTP y al GDP, pero su importancia

radica en la conformación estructural que adquiere al estar unida a GTP o a GDP. Siendo Sec7 un factor de ribosilación de ADP (*por sus siglas en inglés: adenine diphosphate (ADP) rybosylation factor*) y teniendo la capacidad para romper el GTP necesita de factores de intercambio de guanosina (GEF *por sus siglas en inglés: guanosine triphosphate exchange factor*) para la rápida remoción de GDP (Camus *et al.*, 1994; Dascher y Balch 1994). La droga Brefeldina A (BFA) tiene la peculiaridad de interferir en la interacción entre Sec7 y su GEF, excluyendo rápidamente al sistema COPI (*por sus siglas en inglés: coat protein I*) en Golgi (Donaldson y Klausner, 1994). El resultado en células animales es una tubulación de las membranas de Golgi hacia retículo endoplasmático (R.E.) y por último una absorción de Golgi por el R.E. (Sciacky *et al.*, 1997). Se cree que la BFA impide el reciclaje de membrana entre ellos los del exocisto (Xu *et al.*, 2005).

II.2 Las SNAREs en hongos filamentosos

De los genes de SNAREs que se comparten en la ruta secretora de hongos se han encontrado los siguientes: 4 Qa-SNAREs (Syntaxinas), Ufe (RE), Sed5 (RE, Golgi), Sso1 (membrana plasmática (MP)), membrana de la proespora (MPS)), Sso2 (PM, MPS); 4 Qb-SNAREs, Sec20 (RE, Golgi), Bos1 (RE, Golgi), Gos1 (RE, Golgi), Sec9N (MP, MPS); Qc-SNAREs, Bet1 (RE, Golgi), Sft1 (Golgi), Sec9C (MP, MPS), Syn10 (?); R-SNAREs, Sec22 (RE, Golgi), Snc1 (MP, Endosoma (E), Golgi, MPS), Snc2 (MP, E, Golgi, MPS) (Gupta y Heath, 2002). En la ruta endosómica Gupta y Heath (2002) mencionan que los Qa-SNAREs Tlg2 (Golgi, E), Pep12 (E, Golgi, Vacuola (V)); el Qb-SNARE Vti (E, V, Golgi); los Qc-SNAREs Tlg1 (E, Golgi), Vam7 (V, E); y el R-SNARE Ykt6 (V, ER, Golgi) son conservados en hongos. De otras rutas celulares Gupta y Heath (2002) reportaron los siguientes SNAREs conservados: el Qb-SNARE Spo20N (MPS), el Qc-SNARE Spo20C (MPS) y el R-SNARE Nyv1 (V) que pertenecen a otras rutas.

La Qa (*target*)-SNARE SSOA (Syntaxina) fue marcado con GFP en *A. nidulans*, su localización fue en la membrana plasmática a manera de parches y en la punta de la hifa, donde exhibió su mayor fluorescencia (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). El SNARE SYNA (Synaptobrevin) se localiza en el citoplasma, el Spitzenkörper y la membrana apical

(Taheri-Talesh *et al.*, 2008). En *N. crassa* el SNARE homólogo Sso2p de *S. cerevisiae* ha sido inmunolocalizado en la membrana plasmática y se ha observado un marcaje más fuerte en la membrana de la región apical de las hifas vegetativas fijadas con formaldehído y glutaraldehído (Gupta y Heath, 2000). También se ha observado un gradiente en el citoplasma de las regiones apicales donde la concentración de anti-Sso2p desciende desde la zona cercana a la membrana plasmática del ápice hasta los 10 μm aproximadamente, así como en las ramas incipientes (Gupta y Heath, 2000).

II.3 El exocisto

Se cree que el crecimiento apical en hongos filamentosos comprende la incorporación de los componentes formadores de pared y membrana celular en vesículas, que estas viajan a la punta sobre microtúbulos y en área del Spitzenkörper cambian a vías de filamentos de actina, hasta que estas vesículas se fusionan con la membrana apical (Girbardt, 1957; Grove y Bracker, 1970; Horio y Oakley, 2005; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Como la hifa es una célula con una pared relativamente firme, es de vital importancia que la dirección de vesículas secretoras formadoras de pared sea con precisión (Girbardt, 1957; Bartnicki-García *et al.*, 1989; Riquelme *et al.*, 1998). Se piensa que los responsables del crecimiento polarizado son el polarisoma, el complejo ARP2/3, y el exocisto. Pero existen muchas proteínas más implicadas, tales como las SNAREs, las GAPs, los GEFs, las proteínas relacionadas a la señalización por calcio, las miosinas, las forminas, las proteínas acarreadoras de RNA mensajero (RNAm), las GTPasas, entre otros. El exocisto ha sido catalogado como uno de los principales marcadores de los sitios de exocitosis y se ha localizado en los sitios de crecimiento de muchas células eucariotas. En el hongo filamentosos *A. nidulans* se ha observado la distribución de la quimera SECC-GFP (SEC-3-GFP), en la membrana apical de las hifas en crecimiento. Se cree que el aparato responsable de la dirección de las vesículas secretoras y las que provienen de endocitosis para reciclaje contiene proteínas de unión a actina, SNAREs, GTPasas, GAPs, GEFs y el Exocisto (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Es muy interesante el hecho de que la ausencia del gen *sec3* en el hongo dimórfico *Candida albicans* (patógeno facultativo de humanos) impide la filamentación de las células (Li *et al.*, 2007). A diferencia de otros hongos que

pueden atacar tejidos humanos, se cree que *C. albicans* necesita de la fase filamentosa para causar enfermedades en humanos. Por microscopía de epifluorescencia se observó en *Ashbya gossypii* que Sec3, Sec5 y Exo70 colocalizan con el Spitzenkörper en hifas con crecimiento $\geq 1 \mu\text{m}/\text{min}$ y en hifas con crecimiento $\leq 1 \mu\text{m}$ se observó solo una fluorescencia cortical (Köhli *et al.*, 2008).

II.4 Fusión hifal vegetativa

El tipo de crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos consiste en el crecimiento apical de las hifas, su ramificación y la fusión hifal vegetativa o somática (Hickey *et al.*, 2002). Para los hongos filamentosos la fusión vegetativa de las hifas es importante para mantener la tridimensionalidad de la colonia y el transporte de nutrientes y organelos, entre ellos núcleos para mantener la heterocariosis (núcleos con diferente carga alélica) (Carlile y Gooday, 1978). Las hifas en la periferia de la colonia evitan generalmente el acercarse unas con otras e incluso fusionarse también es evitado (Hickey *et al.*, 2002). Sin embargo en las regiones sub-periféricas las hifas muestran atracciones quimiótropas que culminan con la fusión vegetativa (Hickey *et al.*, 2002). Las atracciones quimiótropas por hifas del mismo tipo de apareamiento pueden ser conocidas también simplemente como autotropismo positivo, recepción remota (*del inglés: remote sensing*), autopersecución hifal (*del inglés: hyphal homing*) (Hickey *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* los mecanismos que controlan la polarización del citoesqueleto y la fusión guiados por feromonas ha sido ampliamente estudiado (Kurjan, 1992; Herskowitz *et al.*, 1995; Banuett, 1998). La maquinaria de la fusión hifal tanto sexual como vegetativa es conservada (Galagan *et al.*, 2003). Los genes *C* y *D* con sus alelos *c* y *d* fueron referidos como responsables del control del heterocarión, es decir la continuación del heterocarión o la desencadenación de la muerte celular programada (Garnjobst y Wilson, 1956; Biella *et al.*, 2002). Más adelante se definieron como genes *het-C*, *het-D*, y se descubrieron otros más a los que se denominaron como *het-E*, *het-5*, *het-6*, *het-7*, *het-8*, *het-9*, *het-10* (Mylyk, 1975; 1976). En total son 11 los loci que controlan la compatibilidad de fusiones de hifas (*mat* y *het*) y cabe hacer la aclaración de que ninguna de las mutaciones en los genes *het* afectan la fusión sexual controlada por los genes *mat* en *N. crassa* (Leslie y Yamashiro, 1997). Se

creo que la incompatibilidad en la fusión de las hifas mediada por los loci *het* es para prevenir la contaminación con núcleos explotadores, transposones, mitocondrias defectuosas, entre otras cuestiones (Hart *et al.*, 1975; Leslie, 1993; Leslie y Klein, 1996; Debets y Griffiths, 1998). En *N. crassa* el gen *het-c* ha sido el más estudiado y codifica para una proteína de 966 aminoácidos y parece tener un dominio de bobina embobinada y regiones ricas en glicina cerca de los extremos amino y carboxilo (Saupe *et al.*, 1996; Saupe y Glass, 1997). La manera en que actúa el gen *het-c* ha sido equiparada evolutivamente con los loci del MHC, los loci *S* de plantas y el locus del tipo de apareamiento B de *Coprinus cinereus* (Klein *et al.*, 1998; May *et al.*, 1999). Existen 3 alelos del gen *het-c* aislados de la naturaleza (*het-c^{OR}*, *het-c^{PA}* y *het-c^{GR}*), y se cree que se forma un heterocomplejo de péptidos HET-C en la membrana plasmática para regular la fusión vegetativa de las hifas (Sarkar *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la incompatibilidad de estos complejos generan una rápida compartimentalización por formación de septos y la muerte en un proceso conocido como HCD (*por sus siglas en inglés: hyphal compartmentation and death*) (Garnjobst y Wilson, 1956; Jacobson *et al.*, 1998; Wu y Glass, 2001; Sarkar y Glass, 2002). El gen *ham-2* (*del inglés: hyphal anastomosis-2*) fue de los primeros genes identificados en mutantes carentes de anastomosis hifal y parece ser conservado en eucariotas (Xiang *et al.*, 2002). Con el análisis de hifas vivas se ha visto que el Spitzenkörper, protagonista del creimiento polarizado en la punta de las hifas principales así como de las ramas, también juega un papel muy importante en la fusión hifal (Girbardt, 1957; López-Franco y Bracker, 1996; Riquelme *et al.*, 1998; Hickey *et al.*, 2001; 2002). El autotropismo entre hifas del mismo micelio pone en evidencia un Spitzenkörper teñido con FM4-64, cuando ambas hifas entran en contacto la extensión hifal cesa, y el Spitzenkörper de cada hifa se involucra en la adhesión y la degradación de las paredes celulares (Hickey *et al.*, 2002). Los genes de *S. cerevisiae* identificados como específicos de fusiones celulares son: los *FUS* (*por sus siglas en inglés: PMR* (*por sus siglas en inglés: STE* (*del inglés: steril*)), entre otros, se ha observado que los genes del polarisoma (*PEA2*, *BUD6*, *SPA2*, *BNI1*) se encuentran involucrados en la fusión de las hifas (Glass *et al.*, 2004). El gen de *Fusarium graminearum* *MGVI* que codifica para una MAPK posee funciones relacionadas a la fusión sexual y asexual (Hou *et al.*, 2002). La escisión del gen *so* en *N. crassa* ocasiona la falta de anastomosis, la baja producción de hifas aéreas, un patrón de

conidiación alterado, entre otros (Fleissner *et al.*, 2005). La función molecular de la proteína SO es desconocida, pero se ha predicho un dominio WW que es útil en la formación de complejos proteicos con uniones muy específicas con motivos de prolina (Macías *et al.*, 1996; Ingham *et al.*, 2005; Fleissner *et al.*, 2005; 2007). La proteína NRC-1 es requerida para la fosforilación de la MAPK MAK-2 y STE-12 es una proteína que se asume se encuentra río abajo en la cascada de señalización para regular la fusión hifal en *N. crassa* (Pandey *et al.*, 2004; Read y Roca, 2006). En total no se sabe cuántas rutas regulan la fusión de las hifas en *N. crassa* sin embargo se han propuesto que: (1) NRC-1, NCU04612.1, MAK-2, STE-12 forman parte de una cascada, pero aún no se ha descubierto el receptor en la membrana; (2) HAM-2 es un receptor en la membrana pero no se sabe mucho de sus efectores; (3) SO es citoplasmática y se localiza también en los septos pero no se sabe quien la recluta ni su función molecular, *lot* y *vib-1* parecen ser factores de transcripción involucrados en las rutas de los genes *het* (Saupe, 2000; Xiang, 2002; Glass y Kaneko, 2003; Fleissner *et al.*, 2005; 2007)

El crecimiento micelial requiere la secreción polarizada de material para constituir la pared celular, así como la secreción de enzimas y otras proteínas hacia la punta. Es probable que algunos componentes de la maquinaria de apareamiento, la polarización del citoesqueleto y la secreción sean conservados en los hongos filamentosos y mantengan un rol en la fusión vegetativa y la formación y control de los septos (Glass *et al.*, 2000; Rasmussen y Glass, 2007).

II.5 Septos

La proteína hipotética Fuz1 de *U. maydis* tiene dominio de dedo de Zinc tipo MYND, dos dominios ricos en histidina y uno rico en glutamina, así como varios sitios de cinasa y de miristilación (Chew *et al.*, 2008). En *A. nidulans* la proteína hipotética de *U. maydis* Fuz1 es llamada SamB (*por sus siglas en inglés: suppressor of anucleate metulae B*) y se ha observado que el extremo amino de ambas es muy similar a la Mub1p de *S. cerevisiae* (Krüger y Fischer, 1998; Aweiss *et al.*, 2008). En *U. maydis* las mutantes *fuz1* fallan en la fusión celular para formar el dicarion, no desarrollan crecimiento filamentoso, los septos sufren deslocalización y no se observa la constricción de los mismos (Banuett y

Herskowitz, 1996; Aweiss *et al.*, 2008). En *Aspergillus. nidulans* la falta de SamB funcional ocasiona la ramificación hifal prematura y la localización errante de los septos (Krüger y Fischer, 1998). La secreción de glucoamilasa A (GlsA) de *A. niger* fue observada indirectamente en los ápices de las hifas (Wösten *et al.*, 1991). Las fusiones de GlsA con GFP muestran en hifas vivas que la GlsA se localiza en las zonas de mayor secreción: los ápices de las hifas y los septos (Gordon *et al.*, 2000). La sintetasa de quitina de clase VI CsmB de *A. nidulans* localiza en las puntas de las hifas en crecimiento y en los septos (Takeshita *et al.*, 2006). La formina SEPA en *A. nidulans* se localiza en las puntas de las hifas y en los septos (Sharpless y Harris 2002). Se cree que SEPA contribuye al crecimiento polarizado en las puntas de las hifas y en el desarrollo del anillo de actomiosina ligado a la formación de los septos (Sharpless y Harris, 2002).

En *S. pombe* se ha que la proteína Rho4p se localiza en los septos e interviene en la distribución celular de las glucanasas Eng1p y Agn1p, así como también es reguladora negativa de actividad glucanasa *in vitro* (Santos *et al.*, 2005). La mutante *rho-4* de *N. crassa* no presenta septos, crece lentamente, no forma conidios (Rasmussen y Glass, 2005). La proteína LRG-1, GAP de RHO-1, ha sido observada adyacente a la membrana en los ápices de las hifas de *N. crassa* (Vogt y Seiler, 2008) La proteína GS-1, componente del complejo sintetizador de beta glucanos, ha sido localizada en los ápices de las hifas de *N. crassa* pero aún no se ha observado si se relaciona con los septos (Verdín-Ramos *et al.*, 2008). En *N. crassa* ausencia del gen *cor-1* (homólogo de ABP, *por sus siglas en inglés: actin binding protein*) ocasiona una hiperramificación de las hifas (5 veces), hifas en forma de meandro y defectos en la construcción de los septos (Echauri-Espinosa *et al.*, 2008). En *N. crassa* las proteínas COR-1, FIM (*del inglés: fimbrin*) y ABD2 (*por sus siglas en inglés: FIM actin binding domain 2*) se localizan en las regiones apicales de las hifas y en los septos (Delgado-Álvarez *et al.*, 2008; Echauri-Espinosa, com. pers.). La dRFP-TPM-1 se ubica en el Spitzenkörper y en los septos cuando se están formando (Delgado-Álvarez *et al.*, 2008). La FIM-GFP se localiza en los septos formando un doble anillo concéntrico, y cerca del domo apical a manera de un anillo intermitente cercano a la membrana plasmática, dejando libre al domo apical de parches fluorescentes (Delgado-Álvarez *et al.*, 2008). La proteína homóloga de EB1 y Mal3p, MTB en *N. crassa* se asocia a los extremos positivos de los microtúbulos, que generalmente se orientan hacia el ápice celular; también

ha sido observada cerca de los poros de los septos (Román-Gavilanes, 2008). La dinámica que muestran las proteínas que aparecen en zonas de crecimiento polarizado como los ápices de las hifas y los septos, es muy importante para la elucidación del crecimiento polarizado.

II.6 GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) fue descubierta por Shimomura y cols. (1962) como compañera de la proteína Aequorina en la medusa *Aequorea victoria*. Su secuencia (720 pb, 238 aa y 27 kDa) y conformación tridimensional (por cristalografía) son conocidas (Prasher *et al.*, 1992; Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). La proteína consta de un barril de 11 hojas beta que contienen entre 9 y 13 residuos. El barril forma un cilindro casi perfecto de aproximadamente 42 Å de largo y 24 Å de diámetro. Las primeras tres hojas β son antiparalelas, seguidas de la hélice central y otras tres hojas β antiparalelas seguidos de una columna que cruza uno de los extremos para formar la otra parte del barril en un motivo de 5 hojas β a manera de llave griega. Los puentes de hidrógeno de las conexiones de una hoja β con la siguiente le dan una estabilidad extraordinaria. Tal vez la rigidez del encapsulamiento del fluoróforo dentro del barril le otorgue el bajo cambio de Stokes (Ormö *et al.*, 1996).

Existen al menos 7 clases de variantes de la proteína GFP, basadas en la composición de sus fluoróforos: la clase 1 es una mezcla de la tipo silvestre, fenol neural y fenolato aniónico (ejemplo: 395-397/504; absorción/emisión; $\lambda =$ nm/nm); la clase 2, fenolato aniónico (ejemplo 488/507-509); la clase 3 fenol neutral (ejemplo: 399/511); la clase 4, fenolato aniónico con empaquetado con un sistema llamado π -electrón (ejemplo: 512/522); la clase 5, índole (ejemplo: 436/485); la clase 6, imidazole (ejemplo: 384/448); la clase 7, fenil (ejemplo: 360/442).

En este estudio se utilizó la proteína de clase 2 que tiene una mutación de una serina por una treonina en el sitio 65 (S65T; *sgfp*), así como un cambio en el tipo de codones más familiares con *N. crassa* (Heim *et al.*, 1995; Galagan *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004; Freitag *et al.*, 2004). La *sgfp* tiene una absorción máxima de luz de $\lambda = 488$ nm y emisión máxima alrededor de los 508 nm de λ . Con esta variante de GFP se han hecho

quimeras como β y γ -TUBULINA-GFP, H1-GFP, PMA-1-GFP, RHO-4-GFP CHS-3-GFP, CHS-6-GFP, SPANc-GFP, CHS-1-GFP, GS-1-GFP, PAC-1A-GFP, FIM-GFP, COR-GFP, MAL-3-GFP expresadas en *N. crassa* con excelentes resultados (Freitag *et al.*, 2004; Riquelme *et al.*, 2005; Rasmussen y Glass, 2005; Riquelme *et al.*, 2007, Araujo-Palomares *et al.*, 2008; Sánchez-León-Hing *et al.*, 2008; Verdín-Ramos *et al.*, 2008; Callejas-Negrete *et al.*, 2008; Álvarez-Delgado *et al.*, 2008; Cota-Ramírez *et al.*, 2008; Echauri-Espinoza *et al.*, 2008; Román-Gavilanes *et al.*, 2008). Estas características hacen de la GFP un excelente candidato para la fusión génica y seguimiento a través de microscopía confocal de barrido con láser de células vivas.

El plásmido pMF272 (Número de acceso del Gene-Bank: AY598428 (Fig. 5) contiene la secuencia de un promotor fuerte, el *ccg1* y también la secuencia de la proteína verde fluorescente (*sgfp*) en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple. También contiene la secuencia del gen que codifica para la proteína HIS3 (EC 4.2.1.19) útil en la selección de transformantes por complementar la auxotrofia para histidina.

El FM4-64 (N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamonofenil) hexatrienil) piridinio dibromuro)) (Molecular Probes, #T3166), es un colorante vital fluorescente que en hongos filamentosos marca la zona apical de las hifas, específicamente las membranas de las vesículas que rodean al Spitzenkörper (Hickey *et al.*, 2005). La naturaleza hidrofóbica de la tinta estéril anfifílica y su capacidad de fluorescer solo cuando se encuentra en el ambiente hidrofóbico, como en una membrana, le brindan una gran ventaja sobre otros colorantes ya que no es requerido un lavado de la muestra después de la exposición. Este fluorocromo también puede tener un alto cambio de Stokes que facilita la separación de la luz reflejada y la luz emitida. La excitación máxima se da con exposiciones de $\lambda = 514$ nm y su emisión máxima se da a una $\lambda = 670$ nm.

Capítulo III

Hipótesis y objetivos

III.1 Hipótesis

Los homólogos SEC-15 y SEC-5 de *S. cerevisiae* en *N. crassa* se localizan en la membrana apical de las hifas en crecimiento y en los septos en formación.

III.2 Objetivo general

Determinar la localización y dinámica celular de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP en el hongo filamentoso *N. crassa*.

III.3 Objetivos específicos

III.3.1 Diseño de oligonucleótidos.

III.3.2 Construcción de vectores.

III.3.3 Obtención de transformantes de *E. coli* y *N. crassa*.

III.3.4 Comprobar la integración de las fusiones *sec-15-gfp* y *sec-5-gfp* en el genoma de *N. crassa*.

III.3.5 Analizar por microscopía confocal la localización de la fluorescencia de las quimeras SEC-15-GFP y SEC-5-GFP, colocalización y reacción con fluorocromos, en células vivas de *N. crassa*.

Capítulo IV

Metodología científica

IV.1 Cepas

Como control se utilizó la cepa tipo silvestre *N. crassa* N1 FGSC #988 (Ver Tabla I). Para las transformaciones se empleó la cepa *N. crassa*⁻ FGSC #9717 ($\Delta mus-51::bar+$; $his-3^-$; mat A (♀) auxótrofa para la histidina. Para la obtención de cepas homocariones por cruza se utilizó la cepa *N. crassa* N150 mat a (♂) (FGSC #9013) y para comprobar el tipo de apareamiento se utilizaron las cepas *N. crassa fl* mat a (FGSC #4347), *fl* mat A (FGSC #4317) (Lindgren, 1933) y *N. crassa* N150 (FGSC #9013). En la complementación por cruza de las mutaciones $\Delta sec-15$ (cepa *N. crassa* FGSC #11507) y $\Delta sec-5$ (cepa *N. crassa* FGSC #11509), se utilizaron las transformantes *N. crassa* TAB-15-3-4 (*ccg-1-sec-15-gfp*) y *N. crassa* TAB-5-2-1 (*ccg-1-sec-5-gfp*). Para la amplificación de vectores se utilizó la cepa *Escherichia. coli* DH5 α (Invitrogen ® #18265-017).

IV.2 Medios de cultivo

Para la extracción de ADN genómico se sembraron las cepas: *N. crassa* N1 (FGSC #988), *N. crassa* TAB-15-3-4 y TAB-5-2-1 en 50 mL de medio mínimo de Vogel (MMV) (1956) con sacarosa al 1.5% en matraces Erlen Meyer de 250 mL y se incubaron a 28 °C en obscuridad y sin agitación de 2-4 días. En el caso de la obtención de macroconidias para transformación por electroporación se cultivó *N. crassa* FGSC #9717 en matraces Erlen Meyer de 250 mL con MMV suplementado con sacarosa al 1.5%, solidificado Agar al 1.5 % y con histidina (0.25 mg/mL) como complemento. El cultivo se mantuvo 4 días a 28 °C y tres más a temperatura ambiente bajo blanca. Se recolectaron macroconidias con agua

destilada y se precipitaron en tubos tipo “Falcon” de 50 mL (VWR # 21008-951). La precipitación se realizó a 2,500 RPM (RCF = 880 X g) por 2 minutos, en una centrífuga Multifuge 1 S-R (Heraeus®) y rotor Sorvall® de 12.6 cm de diámetro (Heraeus #75002006). Se hicieron tres precipitaciones y 2 resuspensiones con agua destilada (y autoclaveada), la tercera resuspensión fue con sorbitol (D-glucitol). Después las conidias se llevaron a una concentración de 2.5×10^9 en sorbitol 1M (Abs ($\lambda=600\text{nm}$)= 0.100).

El crecimiento vegetativo de *N. crassa*, previo a la observación por medio de microscopía confocal de barrido con láser, fue en MMV con sacarosa al 1.5% y solidificado con Agar al 1.5% a 28 °C toda la noche. Se utilizaron placas de Petri 55 mm de diámetro para la búsqueda de transformantes de *N. crassa* y placas Petri de 85 mm de diámetro para los análisis de las transformantes seleccionadas.

Después de la electroporación de las macroconidias de *N. crassa* se recuperaron las transformantes en MMV+FGS (fructosa (0.05%) glucosa (0.05%) sorbosa (2%)) (ver #2) adicionado con Agar al 1.5% en placas de Petri de 85 mm de diámetro. Para las cruzas se utilizó medio sintético de cruzas (SCM *por sus siglas en inglés: Synthetic Crossing Medium*) bajo en nitrógeno (Westergaard y Mitchel, 1947). Para la germinación de ascosporas (producto de cruzas) se utilizó MMV. El medio utilizado para el crecimiento y selección de transformantes de *E. coli* fué el LB (*por sus siglas en inglés: Luria-Bertani*) (Bertani, 1951) en su fase líquida o solidificado con Agar al 1.5% y conteniendo 50 µg/mL de ampicilina.

IV.3 Medición de crecimiento

Método Race-Tube

Se sembró micelio de las cepas transformantes, mutantes y silvestres en tubos de vidrio tipo *Race-Tube* (Ryan *et al.*, 1943) de ~30 cm de largo por 1.3 cm de diámetro interno con 10 mL de MMV con Agar (1.5%) (Fig. 3). Los tubos se incubaron a 28 °C por 24 hrs. Las mediciones se realizaron de las 12 a las 24 hrs cada 2 horas.

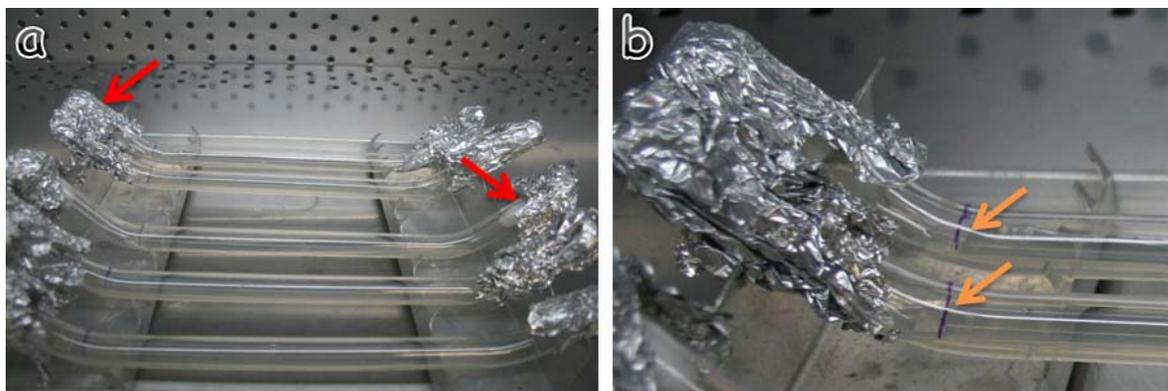


Figura 3. Imagen de los tubos de cultivo para medición de crecimiento (*Race-Tube*). Las flechas rojas (a) indican los taponos de algodón protegidos con papel aluminio. En “b” las flechas naranja indican las líneas donde se colocaron los fragmentos de VMM (Agar 1.5%) con micelio. Las marcas de color púrpura denotan la distancia inicial.

Método de bloque de Agar invertido

Para medir el crecimiento de hifas individuales se utilizó el “método bloque de Agar invertido” (Hickey *et al.*, 2004) en el microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta) bajo un objetivo de 100x de inmersión en aceite. El “método de bloque de Agar invertido” descrito por Hickey y cols. (2004) comprende el corte de un trozo de Agar de aproximadamente 2 x 2 cm. que contiene células en la superficie y se coloca sobre un cubreobjetos en un microscopio invertido (Fig. 4). Cuando se requiere el uso de algún fluorocromo e/o inhibidor este(os) puede(n) colocarse sobre el cubreobjetos de tal manera que al unir del bloque y el vidrio las células entren en contacto con el(los) reactivo(s). Los cubreobjetos utilizados en las observaciones fueron de 24 x 60 x 0.13-0.17 mm y super-resbaladizos (VWR #48404-454).

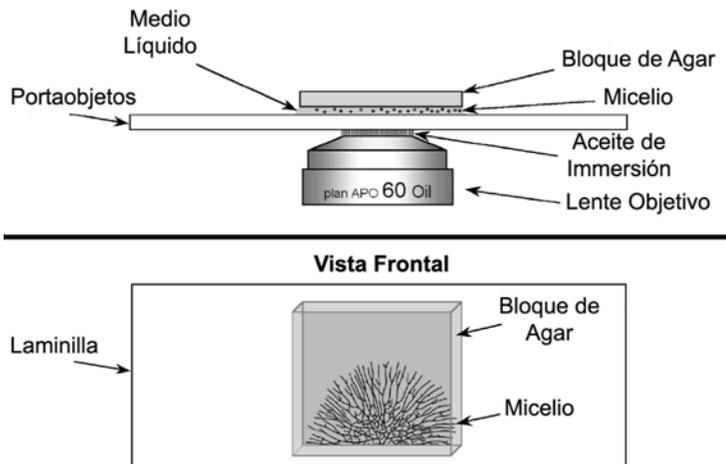


Figura 4. Imagen que muestra el “método de bloque de Agar invertido” (modificado de Hickey *et al.*, 2004 en Beltrán-Aguilar, 2006).

IV.4 Técnicas de Biología Celular y Molecular

Bioinformática

Las secuencias del genoma de *N. crassa* se encuentran desplegadas en la página de Internet de libre acceso: <http://broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/>. En el diseño de los oligonucleótidos y vectores se utilizó el *software* gratuito Ape-A plasmid Editor v1.12 (© M. Wayne Davis, 2003-2005) y el *software* Fast PCR versión de evaluación y prueba: 5.3.5 (© Ruslan Kalendar, 1999-2008; © 2006-2008 “Primer Digital Ltd”). Una vez obtenida la secuencia del gen *sec-15* (NCU00117.3) y la secuencia de su región río abajo (1000 pb) se procedió al diseño de oligonucleótidos para amplificar las dos secuencias. El oligonucleótido sentido para amplificar *sec-15* (*Bam*HI-*sec-15*-*fwd*) se diseñó iniciando con la secuencia que reconoce la enzima *Bam*HI (5' ATTTAT▼CTAG▼A 3') seguido del codón de inicio (ATG) y 14 nucleótidos más (ver tabla O). El oligonucleótido antisentido para amplificar la secuencia *sec-15* (*Pac*I-*sec-15*-*rev*) contiene la secuencia de restricción para la enzima *Pac*I (5' CCTTA▼AT▼TAA) seguido de 22 nucleótidos sin incluir su codón de término (TGA) (ver tabla I). Para amplificar la secuencia río abajo del gen *sec-15* se diseñó el oligonucleótido sentido *Kpn*I-*sec-15*-3'-*fwd* con la secuencia que codifica para el sitio de restricción de la enzima *Kpn*I (GGG▼GTAC▼C) y 22 nucleótidos más (ver tabla I). El oligonucleótido antisentido para amplificar la región río abajo del gen *sec-15* se diseñó con la secuencia que es reconocida

por la enzima de restricción *Pst*I (5' CC▼TGCA▼ 3') y 25 nucleótidos más (ver tabla I). Todos los oligonucleótidos se mandaron sintetizar a la compañía Integrated DNA Technologies, Inc.

Construcciones genéticas.

Las transformaciones genéticas fueron realizadas empleando métodos convencionales de clonación (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó el plásmido pMF272, código de acceso del GeneBank AY598428 (Fig. 5) (provisto generosamente por Michael Freitag, Universidad de Oregon), que contiene de la base 1 a la 17 (en el sentido 5' a 3') la secuencia del promotor *sp6*, proveniente del fago homónimo; el gen *bla* (468..1328) que codifica para una β -lactamasa y confiere resistencia a ampicilina; el promotor del fago T7 (2345..2365); la región 3' flanqueante del gen que codifica para la proteína HIS-3 (EC 4.2.1.19) (4008..4058); el promotor *ccg-1* del gen *ccg-1* o *grg* (gen de respuesta ante la inanición por glucosa) (4059..4980); el sitio de clonación múltiple del vector pBluescript KS+ (I.M.A.G.E. Consortium) (4981..5008); la secuencia de la proteína verde fluorescente (*sgfp*) (5013..5732); el promotor del fago T3 (5733..5817); la secuencia 5' truncada que codifica para la proteína trifuncional HIS-3 (fosforribosil-AMP ciclohidrolasa, Fosforribosil-ATP ciclohidrolasa e histidinol deshidrogenasa) (6359..8460); por último el sitio de clonación múltiple del plásmido pSP72 (Promega #P2191) (8461..8476) (Folco *et al.*, 2002; Freitag *et al.*, 2004).

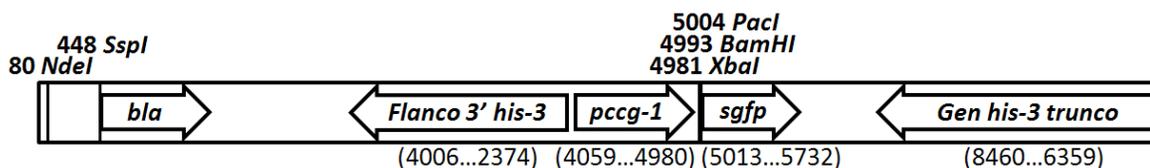


Figura 5. Diagrama del vector de expresión pMF272 de 8479 pb (código de acceso del GeneBank: AY598428) (Freitag *et al.*, 2004). El vector de expresión contiene de 5' a 3': el sitio de restricción para la enzima *NdeI* a partir de la base 80 (80 pb); el sitio de restricción para la enzima *SspI* (448 pb); el gen *bla* que codifica para una β -lactamasa (468-1328 pb); la secuencia complementaria del flanco 3' que no se traduce de la enzima HIS-3 (2374-4006 pb); el promotor *ccg-1* (4059-4980 pb); el sitio de clonación múltiple pBluescript KS+ (4981-5012 pb); la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) mejorada *sgfp* (5013-5732 pb); la secuencia complementaria trunca del gen *his-3* (8460-6359 pb) (el diagrama no está a escala). Para más detalles ver el texto.

Las extracciones de ADN genómico de *N. crassa* se realizaron con el equipo de extracción de ADN de plantas DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen ® #69104). Para la amplificación del gen *sec-15* (2917 pb) se tomó 1 μ L (250 ng) de ADN genómico de *N. crassa* N1 para ser utilizado como ADN template en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*). Se utilizó la enzima GO-Taq (Promega#) para amplificar la secuencia *sec-15* en una PCR de prueba. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 μ L de una solución con deoxinucleótidos trifosfatados (DNTPs por sus siglas en inglés: *Deoxynucleotides Triphosphates* (dATPs, dCTPs, dGTPs y dTTPs, a una concentración de 10 mM cada uno de ellos). 1 μ L de cebador *fwd* [10 mM], 1 μ L de cebador *rev* [10 mM], 1 μ L (250 ng) de ADN genómico de *N. crassa* N1 (FGSC #988), 3 μ L de $MgCl_2$ [25 mM], 0.2 μ L de polimerasa GO-Taq® Flexi [5 u/ μ L] (Promega #M829B), 10 μ L de amortiguador Green GO-Taq® Flexi (Promega #M891A) y se aforo a 50 μ L con agua destilada y autoclaveada. Se programó un termociclador Labnet Multi Gene II (Labnet International, Inc.) para 30 ciclos que constaron de una desnaturalización de ADN a 94 °C por 30 seg., alineamiento de 56 °C por 30 seg., extensión a 72 °C por 6 min. Previo al comienzo de los 30 ciclos se realizó una desnaturalización a 94 °C por 2 min y después de los 30 ciclos se hizo una extensión a 72 °C por 12 min. En la amplificación de alta fidelidad la enzima empleada fue la Platinum® Taq Hi-Fi (Invitrogen #11304-011). Se repitieron las concentraciones de los cebadores, los DNTPs y el ADN genómico, sin embargo la polimerasa de ADN Platinum® tiene un mejor desempeño cuando se utiliza $MgSO_4$ (Invitrogen #P/N52044). También la polimerasa Platinum® necesita su propio

amortiguador, el 10x High Fidelity PCR (Invitrogen #P/N52045). Las temperaturas y los tiempos fueron los mismos en la reacción de alta fidelidad que en la de prueba.

Los geles electroforéticos se emplearon a la concentración de 1.8 % en amortiguador TAE (*por sus siglas en inglés tris acetic glacial acid EDTA*) y 0.1 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt). El gen *sec-15* se insertó en el sitio de clonación múltiple pBluescript KS+, entre los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI (Invitrogen #15201-031; [1000 unidades/mL]) y *Pac*I (NEB # R0547S), para dar lugar al vector pAB015 (Fig. 6, a). Las restricciones dobles, tanto del vector pMF272 como del amplicón *sec-15*, fueron realizadas en dos tiempos. Primero se hicieron las restricciones con la enzima *Bam*HI y amortiguador REact 4 (Invitrogen #16304-016). Después de haber sido desnaturalizada la enzima, se recuperaron 15 µL de cada reacción y se mezclaron con 2 µL de BSA [1 mg/mL], 2 µL de amortiguador NEBuffer 1 (NEB #B7001S) y 1 µL de enzima *Pac*I [10,000 unidades/mL]. Una vez digeridos la secuencia *sec-15* y el vector se ligaron en un volumen total de 10 µL donde 6 µL fueron de la secuencia *sec-15*, 3 µL del vector pMF272 previamente digeridos 1 µL del amortiguador de ligasa de fago T4 (NEB #B0202S) y 1 µL de ligasa T4 (NEB #M0202S). Una vez ligados el vector y la secuencia *sec-15* se clonó en *E. coli DH5α*. Después se realizó un PCR de colonia para confirmar que las cepas transformantes contienen la secuencia *sec-15* cultivó la cepa transformante en medio LB por toda la noche y se hizo una extracción para recuperar el plásmido con el paquete MiniPrep de Qiagen® (#catálogo). El plásmido fue expuesto a una reacción de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Pac*I para comprobar que los sitios de restricción no se dañaran. Se utilizó el vector pAB005 que contiene la fusión *ccg-1::sec-5::sgfp::his-3⁺* para su clonación en *N. crassa* SMRP24 (FGSC #9717) (Fig. 6) (Beltrán-Aguilar, 2006).

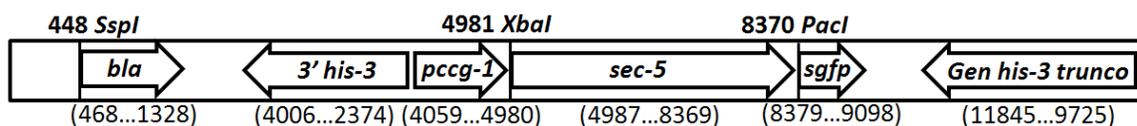


Figura 6. Diagrama del vector pAB005, derivado del plásmido pMF272 (los diagramas no están a escala) (modificado de: Beltrán-Aguilar, 2006).

Transformaciones de macroconidias

Para la transformación de cepas de *N. crassa* se linearizaron los plásmidos pAB015 (pMF272::*sec-5*), pAB005 (pMF272::*sec-15*) con las enzimas de restricción *NdeI* (Invitrogen #15426-018) y *SspI* (NEB #R0132S) respectivamente. La enzima fosfatasa alcalina de camarón fue empleada en la defosforilación de los extremos 5' de los vectores pAB015 y pAB005 para prevenir la probable circularización del vector. Se introdujeron 40 μL de las suspensiones de macroconidias de la cepas de *N. crassa* FGSC #9717 y FGSC #9718 a una concentración de 2.5×10^9 conidias/mL (sorbitol 1M) en cubetas de electroporación de 2 mm de ancho. Después se agregaron de 0.5 a 1 μg del DNA plasmídico y se produjo una descarga de 1500 V (600Ω y $25\mu\text{F}$) por 14 ms en un electroporador (BioRad Gene Pulser Xcell). Inmediatamente después de la electroporación se añadieron 1000 μL de sorbitol (1M) a cada cubeta y se incubaron a 30 °C en agitación (300 RPM) por 4 hrs. Se tomaron de 100-200 μL de la mezcla para esparcir en placas Petri con medio FGS y Agar con extracto de levadura histidina (pMF272) o higromicina (pMF357) según el vector.

Comprobación de la integración de los genes por PCR

Se cultivaron las transformantes por 1 semana en VMM líquido a 28 °C sin agitación y se filtró el micelio con el empleo de un matraz Kitasato, un embudo y una bomba para generar vacío. El micelio obtenido se fijó con nitrógeno líquido y se liofilizó en un liofilizador automático (Labconco ®). Con un equipo de extracción de ADN para plantas (DNeasy Plant Extraction Kit Qiagen®) se purificó ADN genómico de las transformantes. La integración del gen *sec-5* y *sec-15* se verificó por PCR con los cebadores *MRp10-gfp*, *MRp11-gfp*, *MRp12* y *MRp13p* (ver Tabla I).

Tabla I. Materiales biológicos y cebadores usados en este estudio.

Nombre	Especificaciones	T _r °C	Origen
Cepas			
<i>Neurospora crassa</i>			
N1	mat a		FGSC # 988

Continúa sig. pág.

(continuación de

Tabla I)

N39	<i>fl</i> mat A	FGSC #4317
N40	<i>fl</i> mat a	FGSC #4347
N150	tipo Silvestre mat a	FGSC #9013
SMRP62	<i>Δsec-15</i>	FGSC #11509
SMRP57	<i>Δsec-5</i>	FGSC #11507
SMRP24	<i>Δmus-51::bar⁺;his-3</i> mat A	FGSC #9717
SMRP25	<i>Δmus-51::bar⁺</i> mat a	FGSC #9718
TAB-5-2-1	<i>ccg-1-sec-5-gfp his-3⁺ Δmus-51::bar⁺</i> mat A	Este estudio
TAB-15-3-4	<i>ccg-1-sec-15-gfp his-3⁺ Δmus-51::bar⁺</i> mat A	Este estudio
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rn^k, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	Invitrogen ® #18265-017
Plásmidos		
pMF272	<i>Neurospora crassa his-3, ccg-1; gfp</i> carboxi-terminus; <i>amp^R</i>	Freitag <i>et al.</i> (2004)
pMF357	<i>gfp</i> carboxi-terminus; <i>hph</i> ; <i>amp^R</i>	M. Freitag ¹
pAB015	<i>Neurospora crassa his-3, ccg-1::sec-15::gfp; amp^R</i>	Este estudio
pAB015-3'	<i>Neurospora crassa sec-15::gfp::hph::sec-15-3'</i> ; <i>amp^R</i>	Este estudio
pAB005	<i>Neurospora crassa his-3, ccg-1:: sec-5::gfp; amp^R</i>	Este estudio
Cebadores		
<i>XbaI-sec-5-fwd</i>	5' <u>ATTTAT</u> ▼ <u>CTAG</u> ▼ <u>AATGGCGGCCGACACAGA</u> 3'	60.8 (Beltrán-Aguilar, 2006)
<i>PacI-sec-5-rev</i>	5' <u>AGCTGTTA</u> ▼ <u>AT</u> ▼ <u>TAACCTCTCGCTCCCCGTA</u> 3'	61.8 (Beltrán-Aguilar, 2006)
<i>BamHI-sec-15-fwd</i>	5' <u>CGG</u> ▼ <u>GATC</u> ▼ <u>CATGCCCAGAAAAGTGCAAACG</u> 3'	66.8 Este estudio
<i>PacI-sec-15-rev</i>	5' <u>CCTTA</u> ▼ <u>AT</u> ▼ <u>TAAGCGAAACCGAAGCGGATCCG</u> 3'	66.0 Este estudio
<i>KpnI-sec-15-3'-fwd</i>	5' <u>GGG</u> ▼ <u>GTAC</u> ▼ <u>CTGTCTCGGTCGAGAATTAATAG</u> 3'	51.6 Este estudio
<i>PstI-sec-15-3'-rev</i>	5' <u>CC</u> ▼ <u>TGCA</u> ▼ <u>GGGAGCAGGAGTAATGAACTTATGG</u> 3'	57.0 Este estudio
<i>MRp10</i>	5' AGAGACAAGAAAATTACCCCTTCT 3'	54.0 Riquelme <i>et al.</i> (2007)

Continúa sig. pág.

(continuación de

Tabla I)

<i>MRp11</i>	5' AACTACAACAGCCACAACGTCTATATC 3'	54.0	Riquelme <i>et al.</i> (2007)
<i>MRp12</i>	5' ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAAG 3'	56.0	Riquelme <i>et al.</i> (2007)
<i>MRp13</i>	5' ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAAG 3'	56.0	Riquelme <i>et al.</i> (2007)
<i>pMF272 fwd ccg-1</i>	5' CAAATCAACACAACACTCAAACCA 3'		Freitag <i>et al.</i> (2004)
<i>pMF272 rev2 gfp</i>	5' AGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG 3'		Riquelme <i>et al.</i> (2007)

¹Michael Freitag, Oregon State University; FGSC (*por sus siglas en inglés: Fungal Genetics Stock Center*)

Cruzas

En un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Obj. 100X de inmersión en aceite A.N.= 1.3) se seleccionaron las cepas transformantes de acuerdo a su fluorescencia y a la localización de las proteínas marcadas. Como las macroconidias utilizadas en las transformaciones genéticas pueden poseer más de un núcleo, cabe la posibilidad de que el micelio vegetativo sea heterocarión, es decir presente una mezcla de núcleos transformados y núcleos no transformados en su citoplasma. Por lo tanto se cruzaron las transformantes *N. crassa ccg1::sec-15::sgfp::his-3⁺* (mat A) y *N. crassa ccg1::sec-5::sgfp::his-3⁺* (mat A) con y *N. crassa* N150 (mat a) respectivamente. Para la complementación de las mutaciones $\Delta sec-15$ y $\Delta sec-5$ y el análisis de la distribución de las fusiones proteicas en el contexto mutante $\Delta sec-15$ y $\Delta sec-5$ se cruzaron las cepas transformantes (mat A) con las cepas *N. crassa* $\Delta sec-15$ (mat a, FGSC # 11509) y *N. crassa* $\Delta sec-5$ (mat a, FGSC # 11507). En total fueron seis cruzas. El método consistió en recolectar macroconidias de cultivos de 1 semana de edad de transformantes de *N. crassa* (mat A) en cajas de Petri (de 85 mm de diámetro) con MMV. Se usaron embudos con tela autoclaveada para filtrar las macroconidias recolectadas con 10 mL de agua destilada y autoclaveada y se esparcieron en cajas de Petri con medio sintético de cruza (SCM) bajo en nitrógeno (Westergaard y Mitchel, 1947). A los 7 días de incubación a 25 °C y completa oscuridad, se observaron protoperitecios y se tiñeron con FM4-64 para observar la localización la fluorescencia de

las fusiones SEC-15-GFP, SEC-5-GFP y el fluorocromo vital FM4-64 bajo el microscopio confocal (LSM 510 Meta) con un objetivo de 63X (A.N. = 1.4). Después se esparcieron macroconidias de las cepas *N. crassa* N150 (mat a), *N. crassa* Δ sec-15 (mat a), *N. crassa* Δ sec-5 (mat a). El paso siguiente fue un choque térmico de 1 h a 60 °C. Después del choque térmico se esparcieron las ascosporas en MMV con Agar y sacarosa al 1.5% y se incubaron toda la noche a 28 °C. Las ascosporas que germinaron se recuperaron del medio con una pequeña espátula y se sembraron en tubos de borosilicato con MMV autoclaveado. Las ascosporas que germinaron y que su material biológico provenía de una sola ascospora fueron aisladas con una espátula bajo un estereoscopio de la marca Olympus ® modelo SZXILLB2-100. Los tubos con germínulas de ascosporas se mantuvieron en incubación a 28 °C de 3-5 hrs. para después ser cultivados en cajas petri con MMV y observarse en el microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta) para seleccionar aquellas conidias con la fluorescencia más robusta. Para saber el tipo de apareamiento de las cepas obtenidas por cruces se sembraron las cepas *N. crassa fl* (mat a, FGSC #4347) y *N. crassa fl* (mat A, FGSC #4317) y se expusieron a macroconidias de cada cepa por separado.

IV.5 Microscopía y análisis de imágenes

Microscopía de epifluorescencia

Las cepas transformantes se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200 (Carl Zeiss®) equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 100x (A.N. 1.3) y una cámara con CCD (*por sus siglas en inglés Charge Coupled Device*) AxioCam HRc (Carl Zeiss®) para digitalización de imágenes. La fuente de excitación fue una lámpara de mercurio con capacidad de emitir desde luz ultravioleta hasta infrarrojo. Se usó un espejo dicróico para reflejar solo la $\lambda=488$ nm y dejar pasar la $\lambda=514$ nm.

Microscopía confocal de barrido con láser.

La microscopía confocal de barrido con Láser se realizó con un microscopio confocal de la marca Zeiss LSM 510 Meta; provisto de tres Láseres (uno de Ar: 458, 477, 488, 514 nm; y dos de He-Ne: 543 y 633 nm); un obj. de inmersión en aceite de 100x A.N. de 1.3, un obj. de inmersión en aceite de 63X; un canal para luz transmitida y dos para

fluorescencia, uno sencillo y otro Meta (Carl Zeiss®) para adquisición de hasta 8 fluorocromos de manera simultánea. Se aplicó la técnica “método de bloque de Agar invertido” para montar sobre un cubreobjetos la muestra (Hickey *et al.*, 2004).

Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas se analizaron con el *software* Image Examiner versión 3.2.0.70 (Carl Zeiss ®) y el *software* Image Pro Plus versión 6.1. Las imágenes capturadas también se trataron con el *software* Adobe Photoshop CS2 versión 9.0.

Capítulo V

Resultados

V.1 Técnicas de biología celular y molecular

Análisis *in silico* y construcción de vectores

Se identificó el marco de lectura abierto para *sec-15* (NCU00117.3) en la secuencia genómica de *N. crassa* del instituto filantrópico Broad (<http://broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/>) y se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido para su amplificación a partir de ADN template de *N. crassa*. La amplificación del gen con la enzima polimerasa de ADN Platinum® HiFi *Taq* y se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % (Fig. 7).

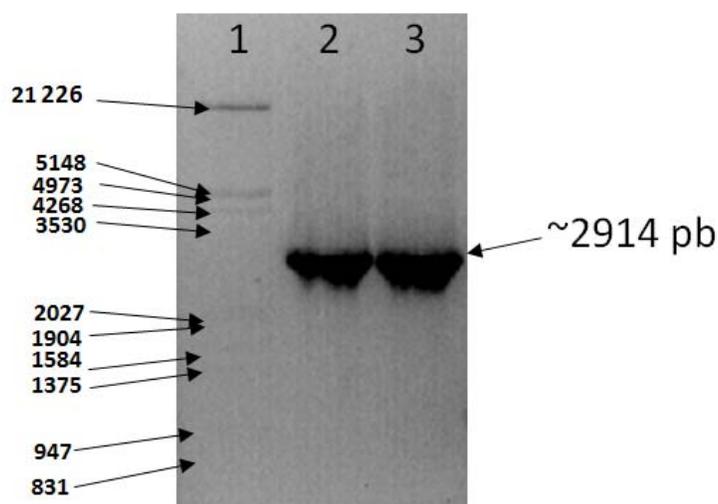


Figura 7. Imagen del gel de agarosa (1.8%) teñido con bromuro de etidio (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) donde se muestra el amplicón *sec-15* (carriles 2 y 3). Referencia (carril 1): genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII* (carril 1).

Las digestiones del vector pMF272 y el amplicón *sec-15* con la enzima *Bam*HI se corrieron en un gel de agarosa (Fig. 8 a,c). Después, el ADN recuperado de la restricción con *Bam*HI del vector y del gen se digirió con la enzima *Pac*I y se hizo migrar a través de un gel de agarosa (Fig. 8 b,d). Se obtuvo el vector pAB015 derivado de la ligación del gen *sec-15* y el vector, ambos digeridos con *Bam*HI-*Pac*I, y se clonó en *E. coli* (Fig. 11).

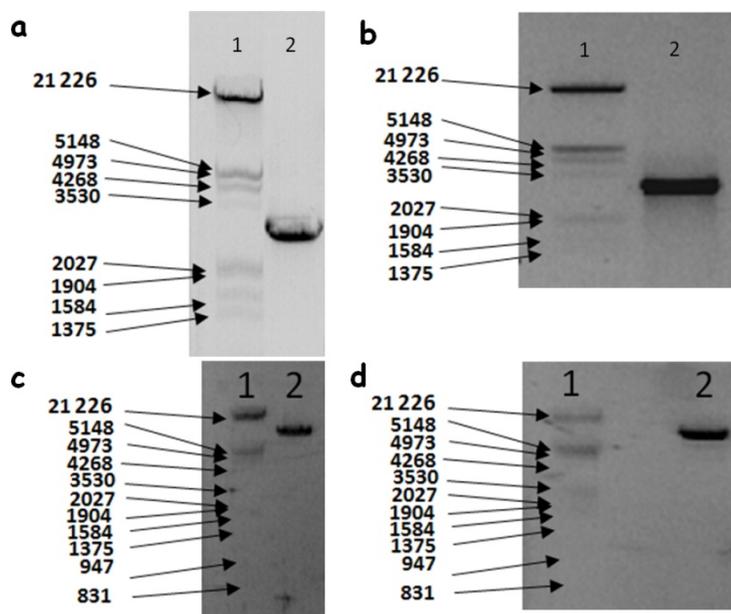


Figura 8. Figura que muestra imágenes de los geles de agarosa (1.8%) con el amplicón *sec-15* (a, b) y el plásmido pMF272 digeridos (c, d). En “a” y “c” los carriles 2 corresponden a las digestiones con la enzima *Bam*HI y en “b” y “d” a las digestiones con la enzima *Pac*I. Los carriles 1 (a,b,c,d) corresponden a la secuencia del fago λ digerida con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III.

La clonación fue comprobada por resistencia a ampicilina y PCR de colonia (Fig. 9).

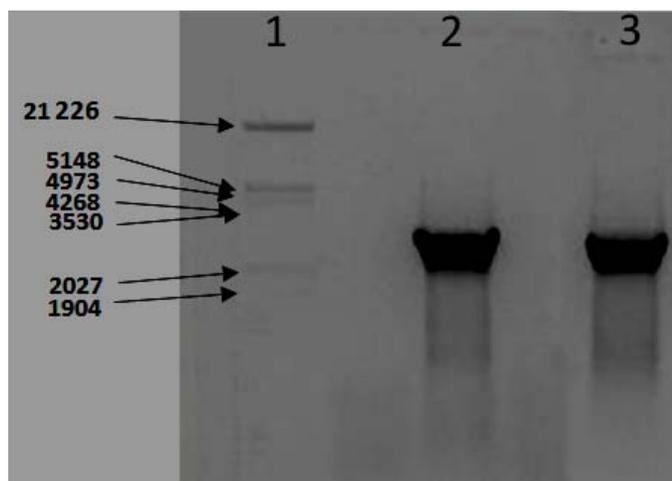


Figura 9. Gel de electroforesis con las bandas (~2914 pb) correspondientes a los amplicones del gen *sec-15* (carriles 2 y 3) a partir de una PCR de colonias transformantes de *E. coli*. Referencia: genoma del fago λ digerido con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III (carril 1).

El vector pAB015, recuperado por minipreparación de ADN plasmídico, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Pac*I y se corrió en un gel de agarosa para comprobar que los sitios de clonación no acumularon mutaciones y que el inserto correspondía al tamaño esperado (~2914 pb) (Figs. 10 y 11).

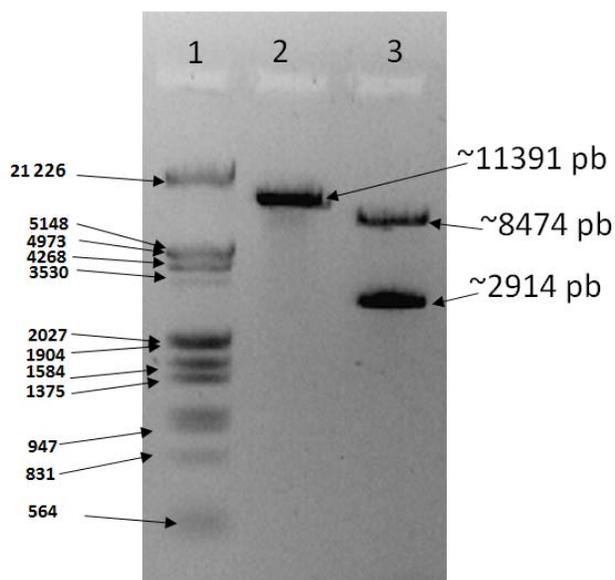


Figura 10. Gel de agarosa para comprobar la presencia del inserto en el vector pAB015. En el carril 1 se muestra el genoma del fago Lambda digerido con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III a manera de referencia; en el carril 2 se encuentra la banda correspondiente al vector pAB015 (~11,391 pb) linealizado con la enzima *Bam*HI; en el tercer carril se encuentran la banda correspondiente al vector pMF272 (~8,474 pb) y a la secuencia del gen *sec-15* (~2914 pb) después de la restricción de pAB015 con las enzimas *Bam*HI y *Pac*I.

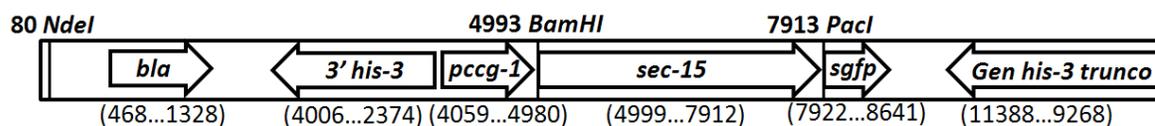


Figura 11. Diagrama del vector pAB015 derivado del vector de expresión pMF272.

Transformaciones de *N. crassa*

Se recuperaron 43 colonias transformantes con el vector pAB015 (*sec-15::gfp*). Después de haber sido incubadas toda la noche a 28 °C se analizaron bajo microscopía confocal de barrido con láser para ser seleccionadas las cepas *N. crassa* TAB-15-3 (Fig. 13), por haber exhibido mayor fluorescencia. Se hicieron réplicas de las transformantes en tubos de borosilicato (11 x 75mm) con MMV (sacarosa y Agar al 1.5 %) y se mantuvieron a -20 °C.

Para la transformación de *N. crassa* 9717 se usó el vector pAB005 (Beltrán-Aguilar, 2006) que contiene la fusión genética *sec-5::gfp* linearizado con la enzima *NdeI* (Invitrogen #15426-018). De esta transformación se obtuvieron 27 colonias y se seleccionó la cepa *N. crassa* TAB-5-2 (Fig. 14).

Las integraciones de las fusiones genéticas en el genoma de *N. crassa* fueron comprobadas por PCR usando los oligonucleótidos: pMR10, -11, -12, y -13 (Fig. 11 y Tabla I) (Riquelme *et al.*, 2007).

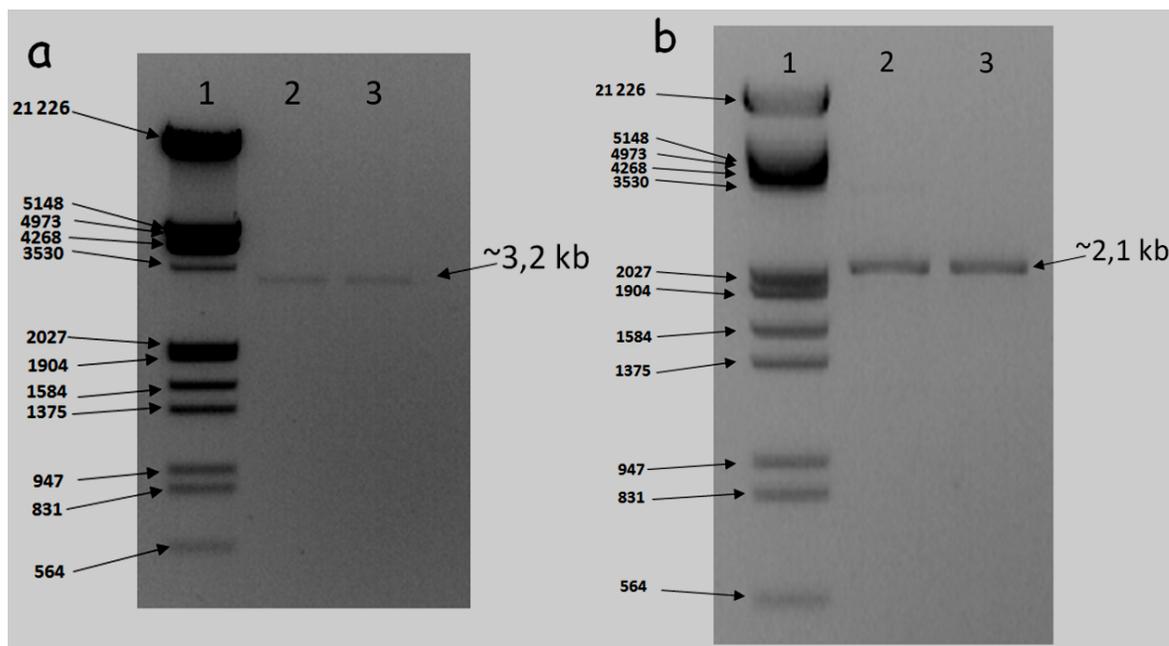


Figura 12. Imágenes para confirmar las integraciones de las fusiones *sec-15-gfp* (a carril 2 y b carril 2) y *sec-5-gfp* (a carril 3 y b carril 3). El primer carril en ambos geles muestra el genoma del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

VI.2 Microscopía confocal de barrido con Láser y de contraste de fases

VI.2.1 Localización celular de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP

Las cepas *N. crassa* TAB-15-3 y TAB-5-2 se observaron en diferentes estadios de sus ciclos sexual y asexual, así como de formas celulares que incluyeron: conidiospora, germínula (3,4 y 5 hrs.), hifa vegetativa adulta (ciclo asexual); himenio, peritecio, ascosporas (ciclo sexual).

Las hifas vegetativas de TAB-15-3 y TAB-5-2 se analizaron por microscopía de barrido con láser, después de haber sido inoculadas en cajas de Petri con MMV (sacarosa y Agar al 1.5 %) e incubadas a 28 °C toda la noche. La fusión proteica SEC-15-GFP (cepa TAB-15-3) mostró una distribución aleatoria en el citoplasma de hifas en crecimiento de *N. crassa*, aunque con una exclusión parcial de la fluorescencia en las áreas que corresponden a los núcleos y el Spitzenkörper. Algo muy notable fue la acumulación de puntos

fluorescentes en el ápice de las hifas, en la región adyacente a la membrana plasmática anterior al Spitzenkörper formando una especie de capucha cortical (Fig. 13). Se localizaron puntos fluorescentes en el citoplasma, aunque de manera más dispersa que en el domo apical.

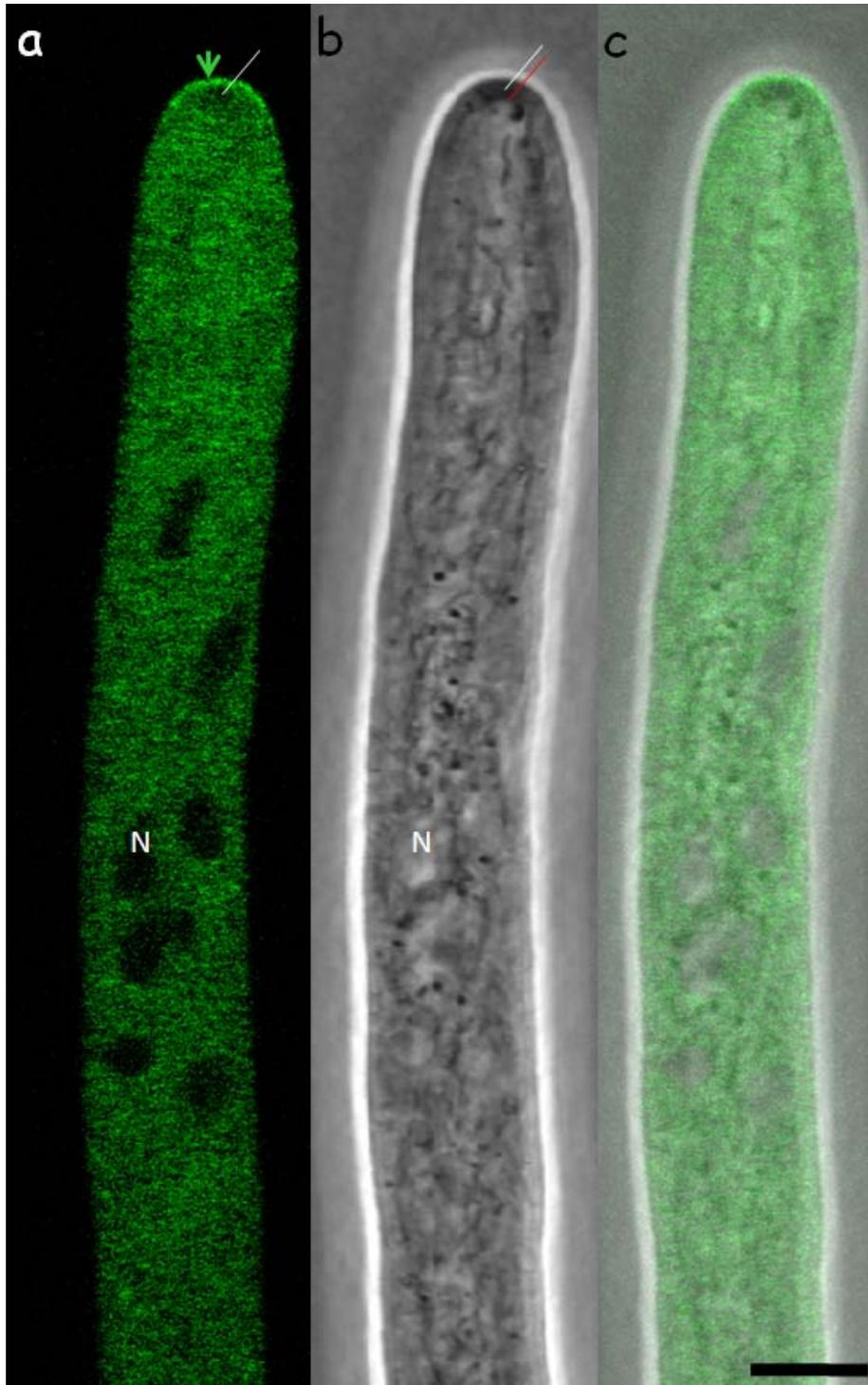


Figura 13. Imagen de la cepa *N. crassa* TAB-15-3 por microscopía confocal de barrido con láser. “a” Es una micrografía donde se muestra la distribución de la fluorescencia de SEC-15-GFP. La flecha indica la acumulación de la fluorescencia en el borde del ápice a manera de una capucha cortical; la línea blanca muestra una marcada disminución de la fluorescencia en el área donde se encuentra el Spitzkörper (a) visto por contraste de fases (b). La línea roja muestra una zona traslúcida en la cara posterior del Spitzkörper (b). La imagen “c” es la superposición de “a” y “b”. Barra = 5 μ m.

De la misma manera la cepa TAB-5-2 exhibió un hacinamiento de puntos fluorescentes, correspondientes a la fusión SEC-5-GFP, en los ápices de las hifas en crecimiento de *N. crassa*. El patrón de distribución de la fluorescencia de SEC-5-GFP fue muy similar al patrón de distribución de SEC-15-GFP. También es relevante que el citoplasma se observó con un fondo de puntos fluorescentes dispersos y que se ausentan en el área central del Spitzenkörper. Se observó que la fluorescencia es excluida en los núcleos, es decir resaltan negativamente (Fig. 14).

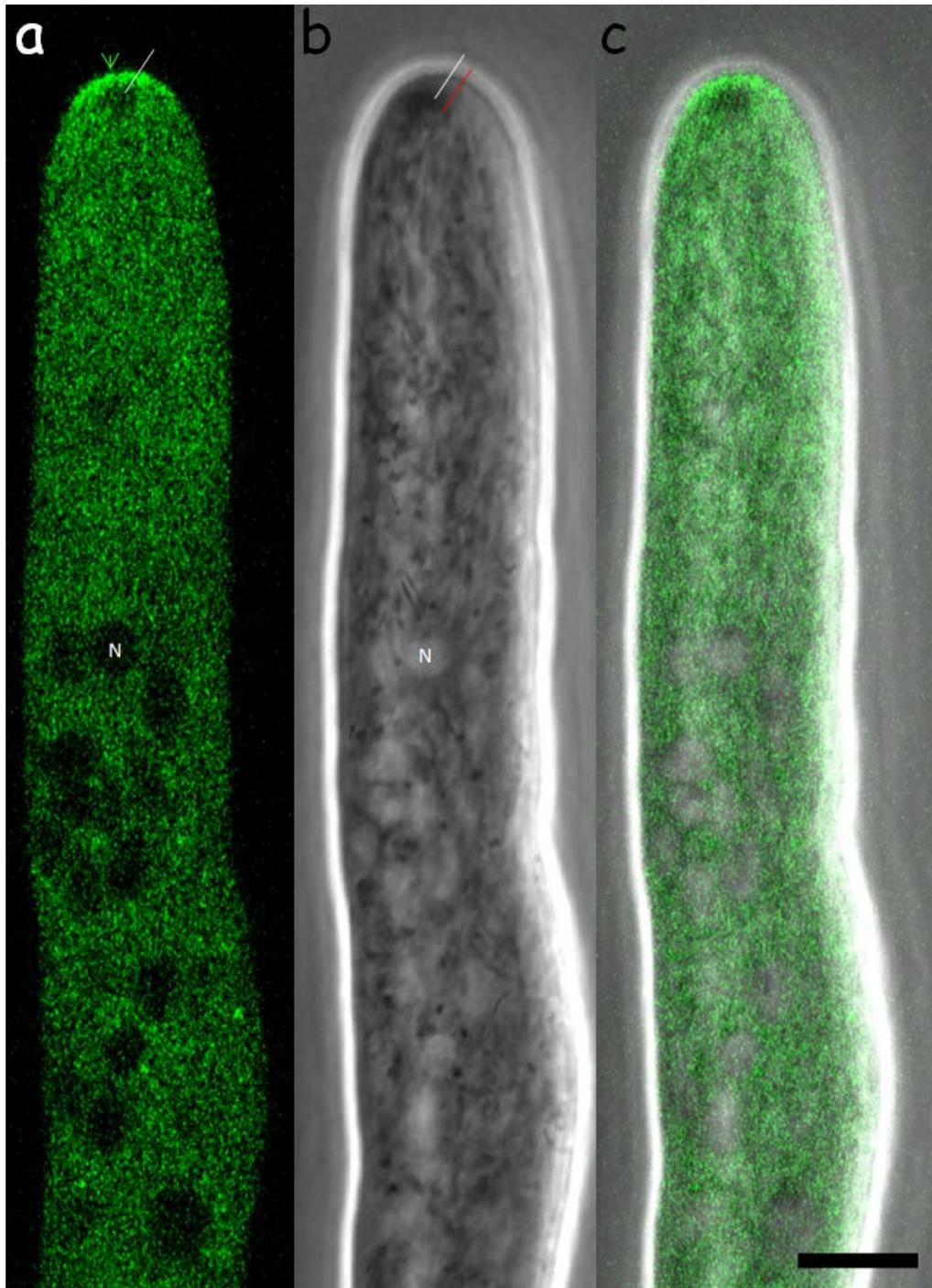


Figura 14. Imagen donde se muestra una hifa en crecimiento de la cepa *N. crassa* TAB-5-2 por microscopía confocal de barrido con láser. “a” Es un corte óptico longitudinal donde se muestra la distribución de la fluorescencia de SEC-5-GFP. La flecha indica la acumulación de la fluorescencia en el borde del ápice a manera de capucha cortical; la línea blanca muestra una marcada disminución de la fluorescencia en el área donde se encuentra el Spitzenkörper (a) visto por contraste de fases (b). La línea roja muestra una zona translúcida en la cara retrógrada del Spitzenkörper (b). La imagen “c” es la superposición de “a” y “b”. Barra = 5 μ m.

Para el análisis exclusivo de la distribución de la fluorescencia en el área apical se utilizó el *software* LSM 510 Meta para realizar las ampliaciones de las puntas de las hifas de *N. crassa* TAB-15-3 y TAB-5-2. La fluorescencia en el domo apical de la hifa puede presentar discontinuidades y los dominios fluorescentes que por lo regular son altamente dinámicos (Fig. 15). En *N. crassa* TAB-15-3 y TAB-5-2 se puede apreciar una exclusión parcial de la fluorescencia en el área del Spitzenkörper (Fig. 15).

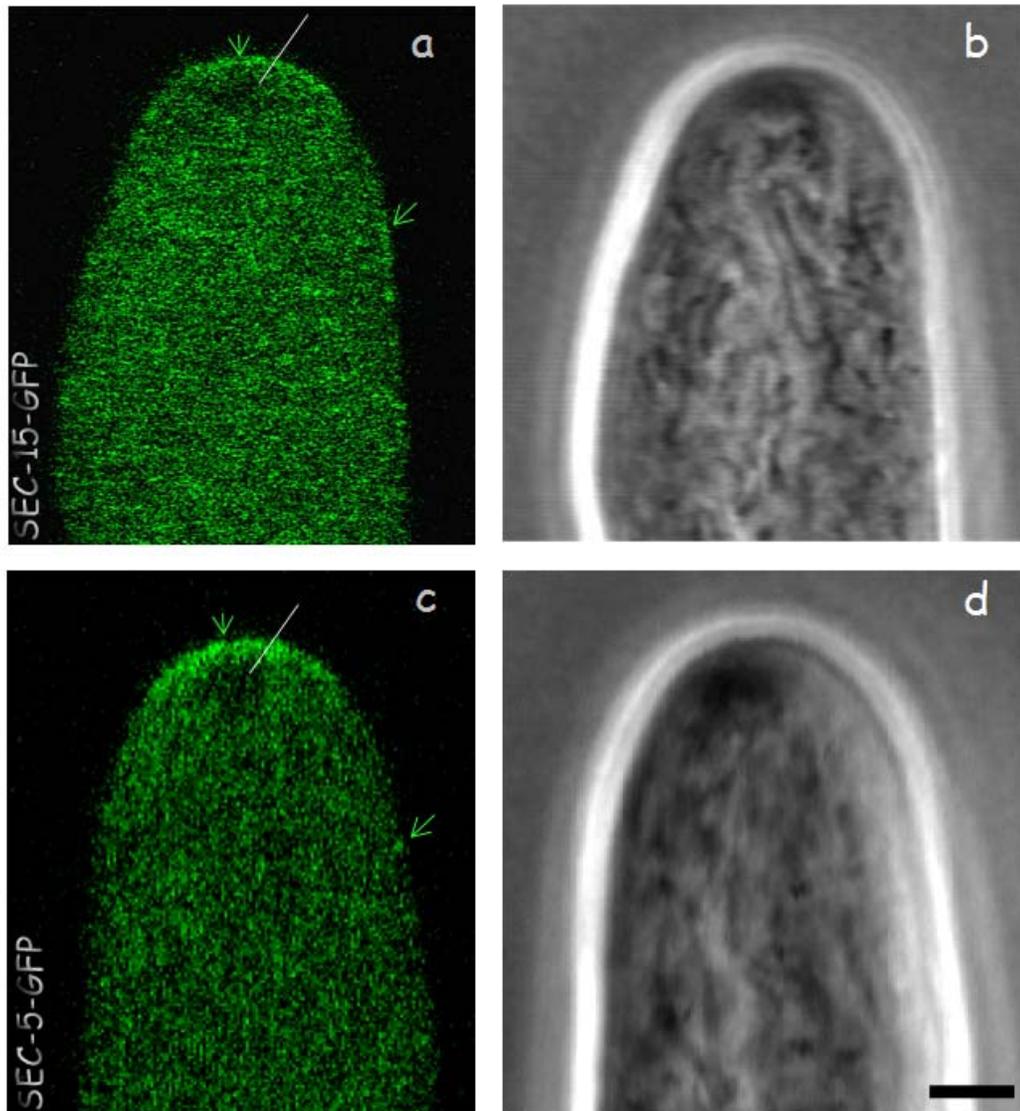


Figura 15. Ampliación digital de los ápices de las hifas de *N. crassa* TAB-15-3 (a y b) y TAB-5-2 (c y b) donde se muestra la distribución de la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP (a) y SEC-5-GFP (c) en el domo apical de hifas en crecimiento. Las puntas de flecha muestran la marcada disminución de la fluorescencia en el centro del Spitzenkörper (a y c). “b” y “d” Son imágenes por microscopía de contraste de fases. Barra = 2 μ m.

V.2.2 Tinción vital con el fluorocromo FM4-64

Se obtuvieron imágenes de hifas en crecimiento de *N. crassa* TAB-15-3 y TAB-5-2 teñidas con el fluorocromo FM4-64 (Figs. 16 y 17). La acumulación de la fluorescencia de

las fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP se observó delante del Spitzenkörper teñido con FM4-64.

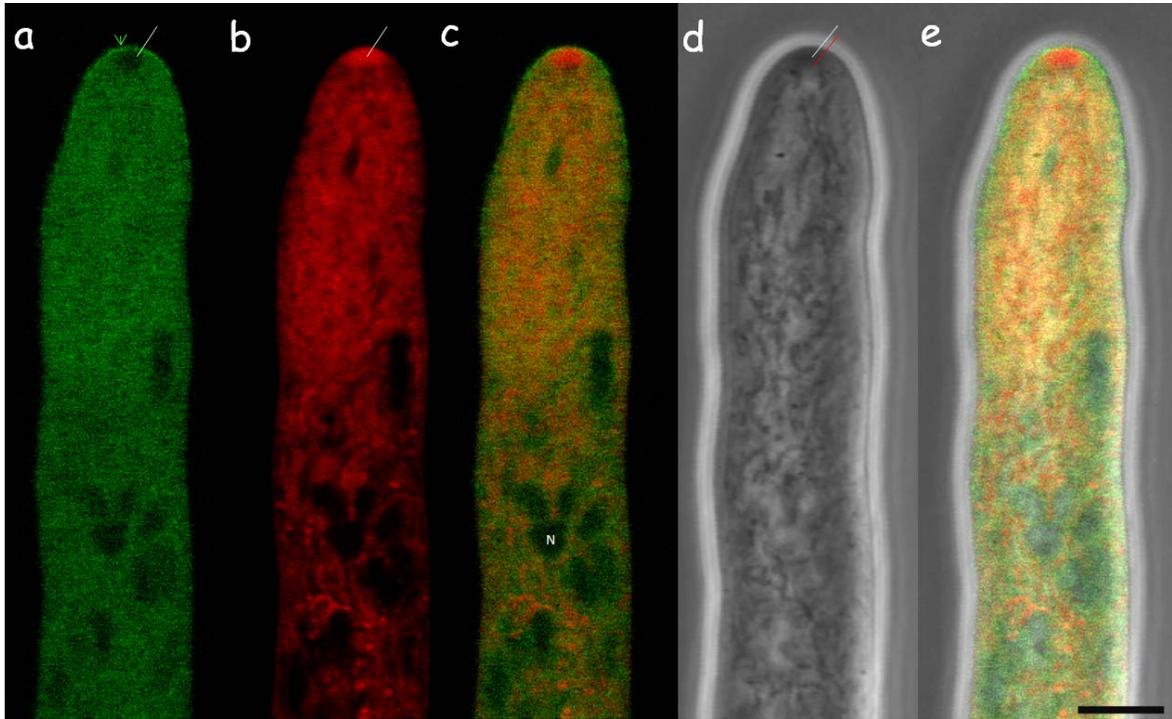


Figura 16. Imagen de una hifa en crecimiento de *N. crassa* TAB-15-3 obtenida por microscopía confocal. En “a” se muestra la distribución de la fusión SEC-15-GFP, la flecha indica una acumulación en el borde apical de la hifa y la línea la tinción negativa del Spk; en “b” se muestra la distribución del fluorocromo FM4-64, la línea marca la acumulación en el Spk; “c” es la superposición de “a” y “b” “N” la tinción negativa de los núcleos; “d” es la imagen por microscopía de contraste de fases, la línea blanca indica el Spk y la punta roja el centro del spk; y “e” es la superposición de “a”, “b” y “d”. Barra = 5 µm.

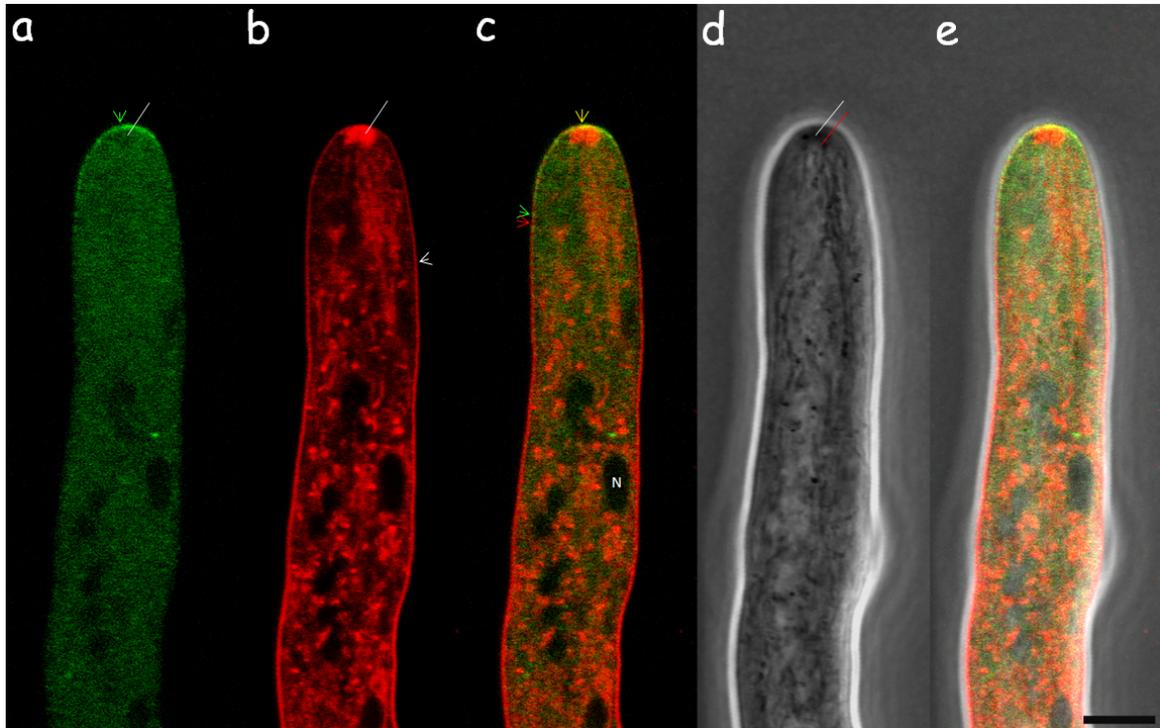


Figura 17. Imagen de una hifa en crecimiento de *N. crassa* TAB-5-2 obtenida por microscopía confocal. En “a” se muestra la distribución de la fusión SEC-5-GFP, la flecha indica una acumulación en el borde apical de la hifa y la línea la tinción negativa del Spk; en “b” se muestra la distribución del fluorocromo FM4-64, la línea marca la acumulación en el Spk y la flecha la acumulación en la membrana plasmática; “c” es la superposición de “a” y “b”, la flecha amarilla indica la colocalización de SEC-5-GFP y el FM4-64 en el borde apical de la hifa, la flecha verde indica acumulaciones intermitentes del marcaje en membrana apical detrás de la punta, la flecha roja apunta la membrana plasmática teñida con FM4-64 y “N” la tinción negativa de los núcleos; “d” es la imagen por microscopía de contraste de fases, la línea blanca indica el Spk y la punta roja el centro del spk; y “e” es la superposición de “a”, “b” y “d”. Barra = 5 μ m.

Se midieron las tasas de elongación de las transformantes TAB-15-3 y TAB-5-2 con la técnica *Race-Tube* y con la técnica del Bloque de Agar Invertido bajo el microscopio confocal de barrido con láser (Hickey *et al.*, 2005) (Fig. 18). Las cepas transformantes TAB-15-3 t TAB-5-2 mostraron un crecimiento similar al de la cepa silvestre, y las cepas Δ *sec-15* y Δ *sec-5* mostraron un crecimiento menor al de la cepa silvestre.

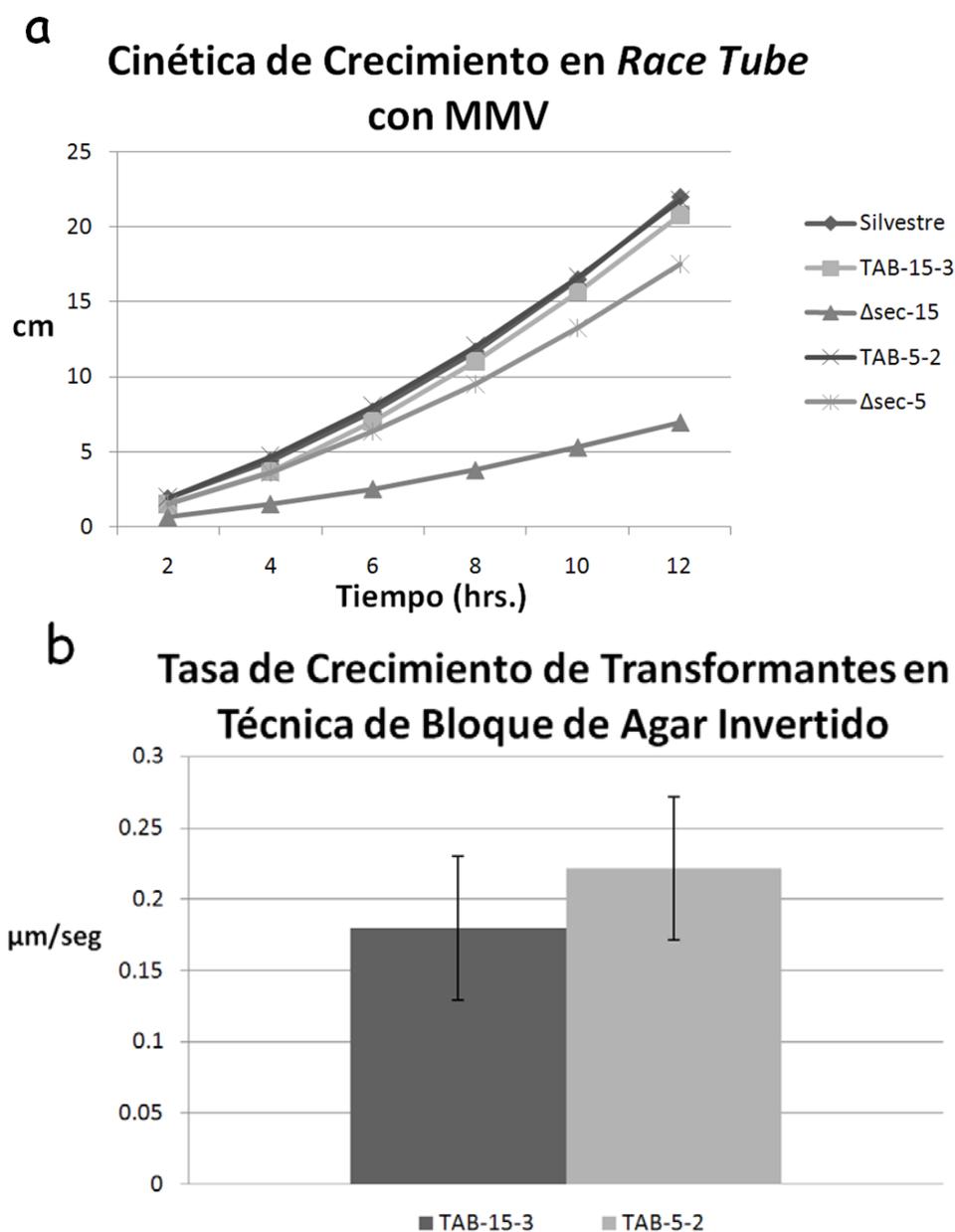


Figura 18. Gráficas de crecimiento. En “a” se encuentra graficada la cinética de crecimiento de las colonias de *N. crassa*: Silvestre (\diamond), TAB-15-3 (\square), Δ sec-15 (Δ), TAB-5-2 (\times) y Δ sec-5 ($*$) en *Race Tube*. El promedio de crecimiento de las cepas TAB-15-3 y TAB-5-2 se muestra en “b” (“Bloque de Agar Invertido”); TAB-15-3 (646.203 $\mu\text{m/hr}$, desviación estándar: 0.051) y TAB-5-2 (797.1135 $\mu\text{m/hr}$, desviación estándar: 0.031) ($n = 10$).

También se generó un perfil de las hifas donde se analiza la intensidad de la fluorescencia, tanto de GFP como de FM4-64 (Fig. 19). Los vectores o transectos midieron aproximadamente 7 μm de longitud y 100 nm de ancho y en los planos cartesianos corresponden al eje de las abscisas. El índice de intensidad de la fluorescencia fue arbitrario

y en los planos cartesianos corresponde al eje de las ordenadas. Se observó la más alta intensidad de la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP desde la punta de la hifa hasta los 300 nanómetros aproximadamente. Alrededor de los 1 μm de la punta de la hifa la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP disminuyó, justo en el área del centro del Spitzenkörper. A 2 μm de la punta aproximadamente, cerca del límite retrógrado del Spitzenkörper, se observó un incremento en la fluorescencia pero con menor intensidad. La mayor intensidad de la fluorescencia del fluorocromo FM4-64 fue desde la punta de la hifa hasta aproximadamente los 1.5 y 2 μm .

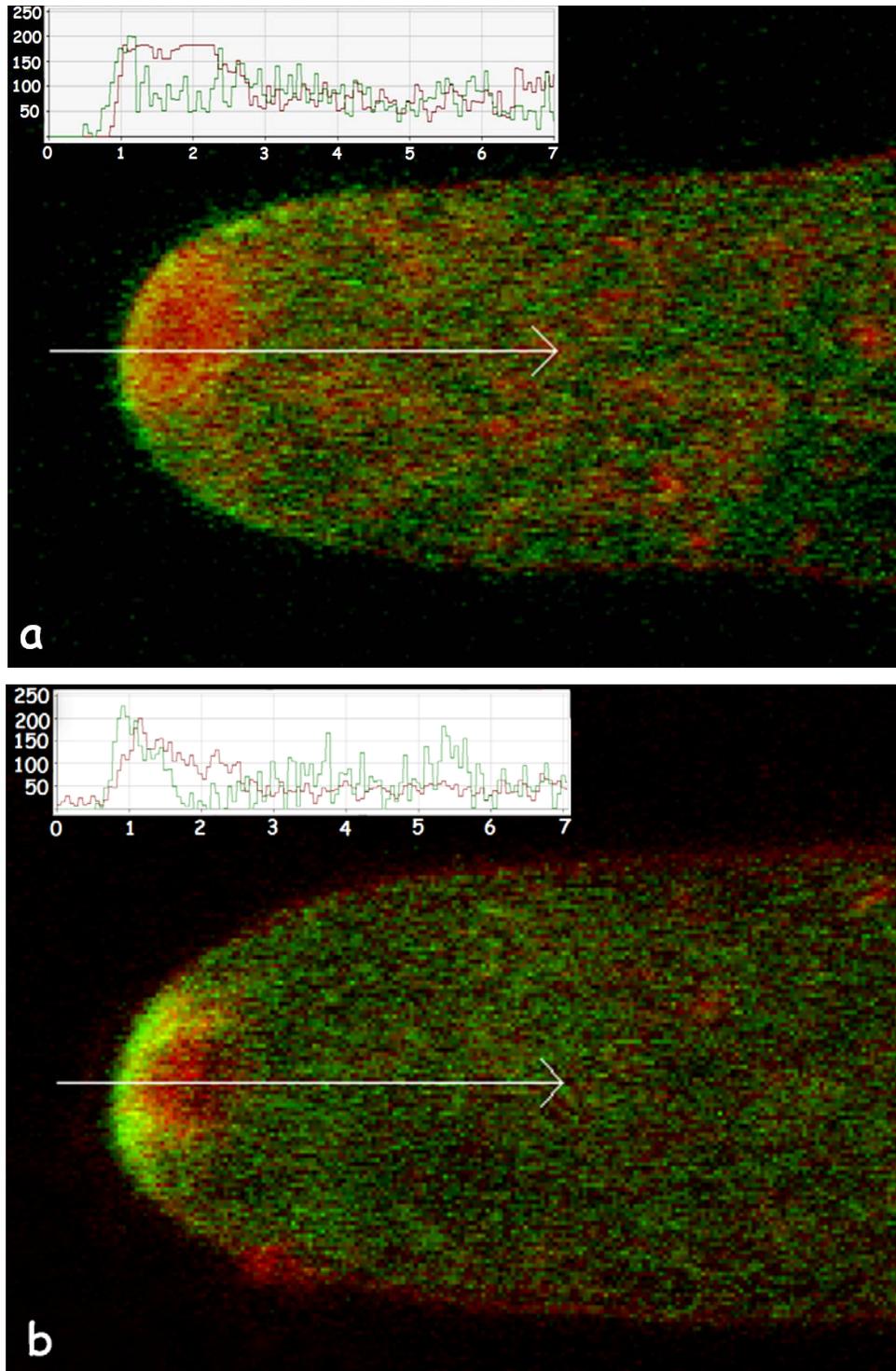


Figura 19. Imagen que muestra el perfil de la intensidad de la fluorescencia de SEC-15-GFP (verde) (a), SEC-5-GFP (verde) (b) y el fluorocromo FM4-64 (rojo) (a,b) revelada por transectos (flechas). Los planos cartesianos ilustran la longitud (μm) de los transectos (flechas) en los ejes de las abscisas y en los ejes de las ordenadas se encuentran las intensidades de la fluorescencia de cada pixel, cero para la ausencia de verde (GFP) o rojo (FM4-64) y 256 para el tono más alto de cada color. Los extremos romo de las flechas representan los orígenes.

V.2.3 Inhibición con BFA-Bodipy 558/568

En el tratamiento de las hifas de *N. crassa* TAB-15-3 y TAB-5-2 con BFA conjugado a Bodipy 558/568 se observa una colocación de este fluorocromo con la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP respectivamente (Figs. 20 y 21). Después de aproximadamente 5 minutos de exposición a BFA-Bodipy 558/568 la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP comenzaron a acumularse en RE, equivalentes de Golgi y el Spitzenkörper (incluyendo el centro del Spitzenkörper).

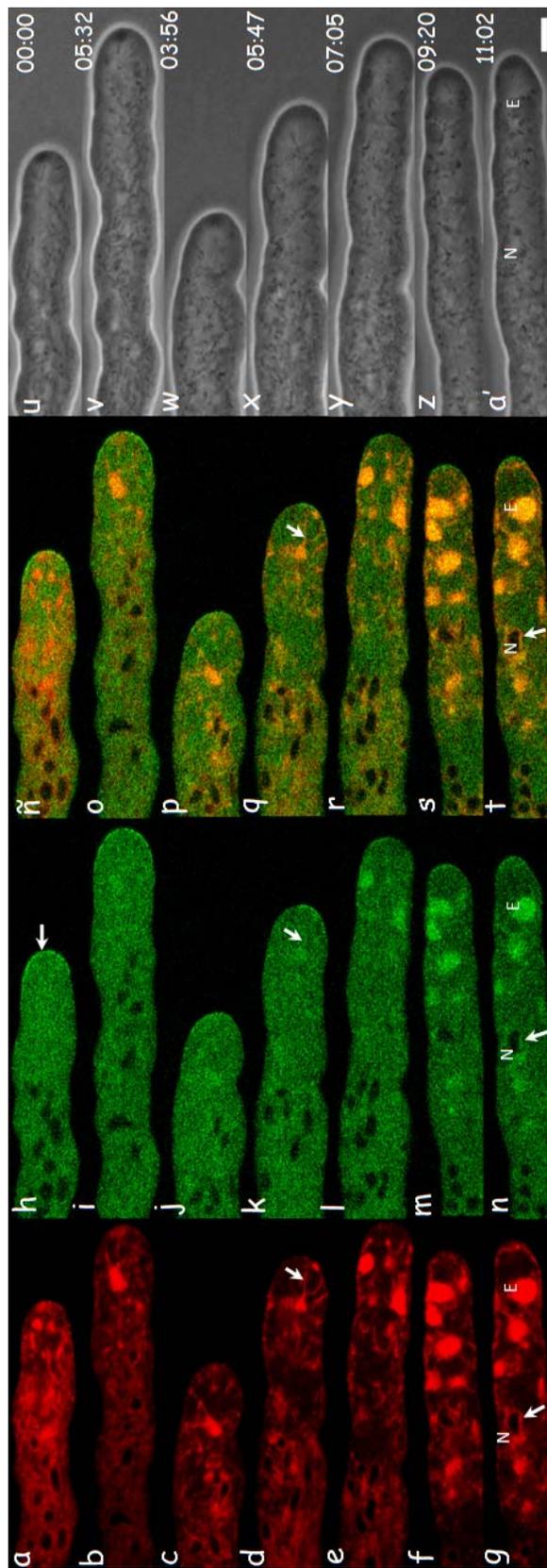


Figura 20. Serie de imágenes de una hifa de *N. crassa* TAB-15-3 tratada con BFA-Bodipy 558/568 (tiempo = min:seg). El retículo endoplasmático (flechas en “g”, “ñ” y “t”, RE) se observa marcado alrededor de los núcleos (“N”), la fluorescencia de BFA-Bodipy 558/568 se restringe paulatinamente a unos cúmulos, posiblemente endosomas (E) y/o equivalentes de Golgi (EG) (“a”-“g”). En “d”, “k”, y “q” las flechas indican túbulos de fluorescencia. De “h” a “n” se exhibe la fluorescencia de SEC-15-GFP y su acumulación progresiva hacia RE, E y/o (EG). De “ñ” a “t” se muestra como el BFA-Bodipy 558/568 (rojo) y SEC-15-GFP colocalizan gradualmente después de la exposición a BFA-Bodipy 558/568, produciendo colores cercanos al naranja y amarillo. De “h” a “n” se puede observar como la fluorescencia de SEC-15-GFP disminuye gradualmente en la punta (flecha en “h”). De “u” a “a”, se observan las imágenes de contraste de fases correspondientes. Barra = 5 μ m. En “c” se ha repositionado la platina ya que al crecer la hifa ha salido del plano del objetivo.

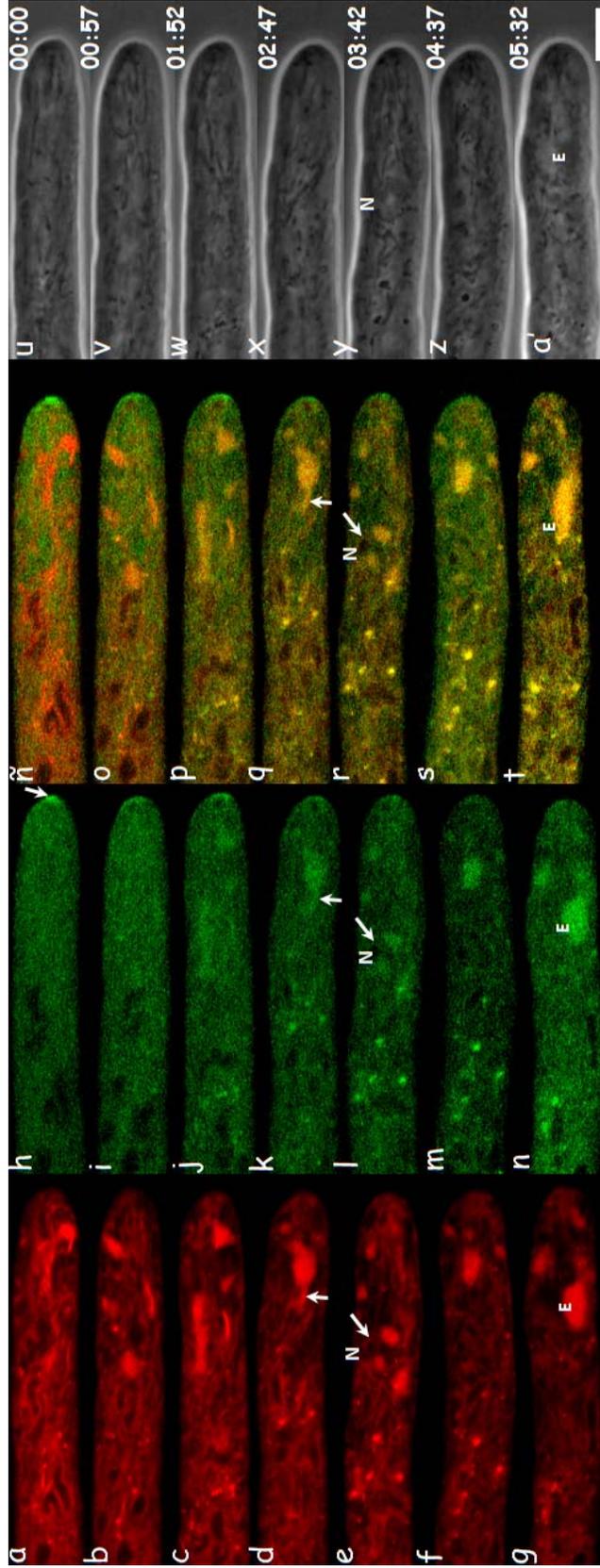


Figura 21. Serie de imágenes de una hifa de *N. crassa* TAB-5-3 tratada con BFA-Bodipy 558/568 (tiempo = min:seg). El retículo endoplasmático (flechas en “e”, “l” y “r”, RE) se observa marcado alrededor de los núcleos (“N”), la fluorescencia de BFA-Bodipy 558/568 se restringe paulatinamente a unos cúmulos, posiblemente endosomas (E) y/o equivalentes de Golgi (EG) (“a”-“g”). En “d”, “k”, y “q” las flechas indican túbulos de fluorescencia. De “h” a “n” se exhibe la fluorescencia de SEC-5-GFP y su acumulación progresiva hacia RE, E y/o (EG). De “ñ” a “t” se muestra como el BFA-Bodipy 558/568 (rojo) y SEC-5-GFP colocalizan gradualmente después de la exposición a BFA-Bodipy 558/568, produciendo colores cercanos al naranja y amarillo. De “u” a “a” se puede observar como la fluorescencia de SEC-5-GFP disminuye gradualmente en la punta (flecha en “h”). De “u” a “a”, se observan las imágenes de contraste de fases correspondientes. Barra = 5 μ m.

V.2.4 Septos

Se observó la formación de los septos en las transformantes TAB-15-3 y TAB-5-2 en un microscopio confocal de barrido con láser Zeiss (LSM 510 Meta). Aunque inicialmente por microscopía confocal bidimensional no se detectó acúmulo de fluorescencia, tras analizar detalladamente se encontró una fluorescencia muy restringida a algunos puntos en el septo. A estos puntos fluorescentes se les pudo observar generalmente en las zonas cercanas a la periferia de la hifa y alrededor del poro del septo. Se pudo observar fluorescencia en los niveles medios del disco que forma el septo. Sin embargo en algunos septos de hifas de más de 1 hora de iniciada su formación se observó una fluorescencia muy brillante que se mantiene más de 30 minutos. Estos septos llegaron a presentar poros con diámetros mayores de 500 nm.

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales de septos a más de 200 μm de distancia con respecto a la punta de las hifas. Se obtuvieron de 30 a 50 cortes ópticos de un espesor entre 0.2 μm y 0.7 μm , dependiendo del ancho de la célula (Fig. 22). Con el empleo del fluorocromo FM4-64 se observó una colocación parcial de la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP (Fig. 23).

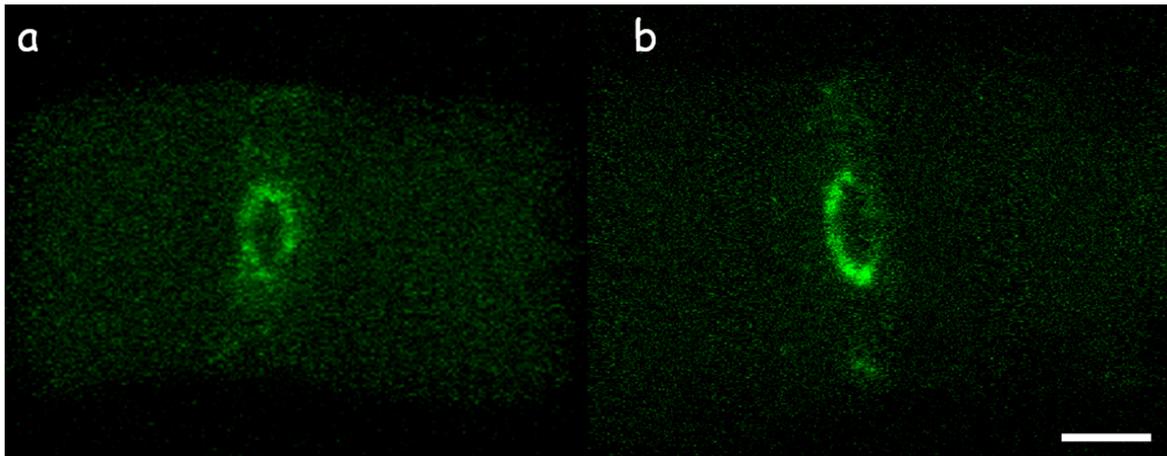


Figura 22. Reconstrucción tridimensional de un septo de más de 1 hr de formación en hifas de *N. crassa* TAB-15-3 (a) y TAB-5-2 (b). La figura “a” representa la fluorescencia de la fusión SEC-15-GFP y la figura “b” la fusión SEC-5-GFP. Barra = 2 μ m.

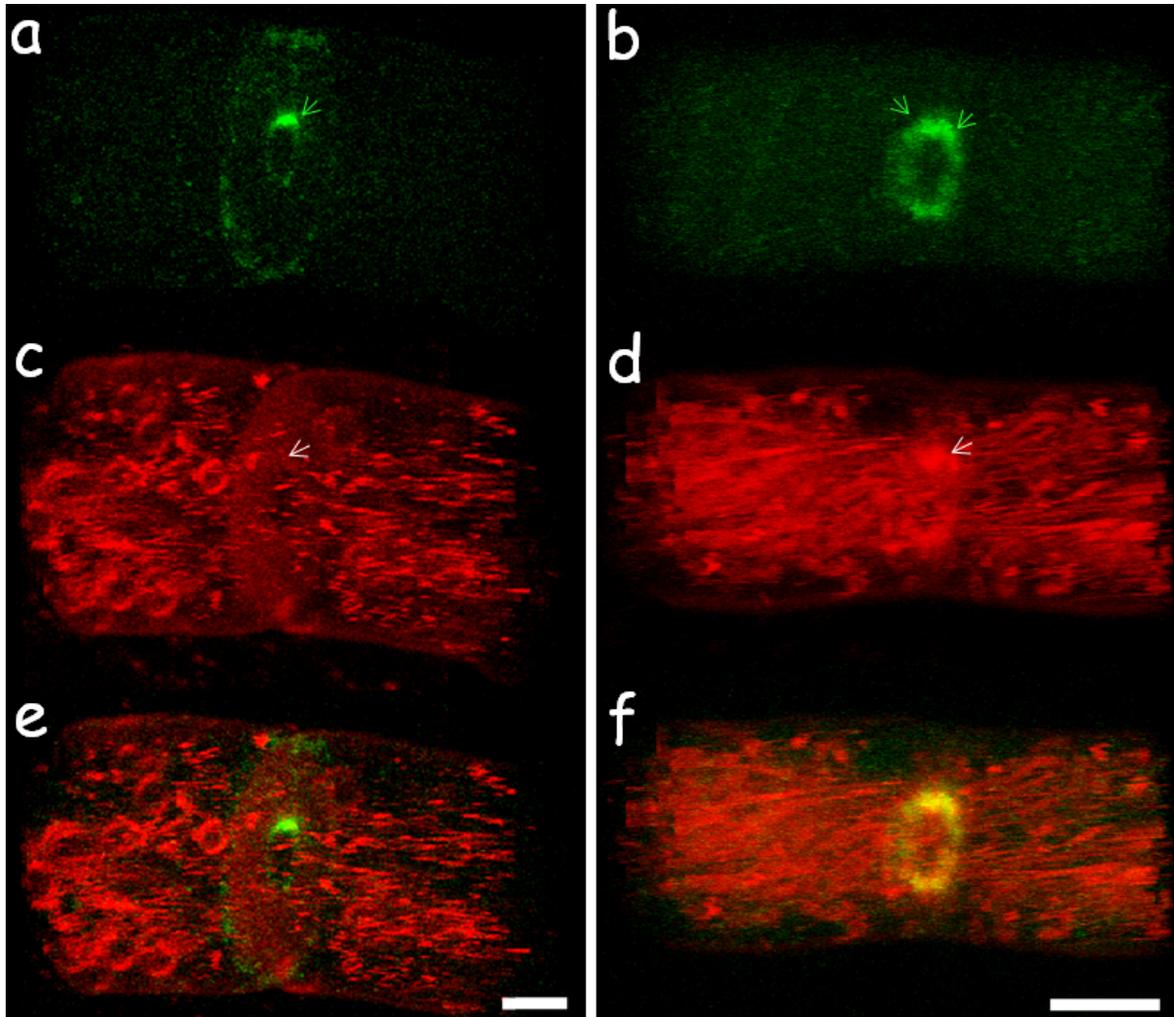


Figura 23. Imágenes de reconstrucciones tridimensionales de septos de hifas vivas de las transformantes TAB-15-3 (a, c, e) y TAB-5-2 (b, d, f). Las flechas verdes indican la localización de la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP cerca del poro del septo (a y b). En “c” y “d” las flechas indican la fluorescencia del FM4-64 en el septo. “e” Es una superposición de “a” (SEC-15-GFP) y “c” (FM4-64). “f” Es una superposición de “b” (SEC-5-GFP) y “d” (FM4-64). Barras = 2 μ m.

V.2.5 Anastomosis

Se encontraron células fusionadas pertenecientes al mismo micelio en las que la fluorescencia de ambos marcajes (SEC-15-GFP y SEC-5-GFP) estuvo presente alrededor del poro respectivamente (Fig. 24). En algunas ocasiones se encontró colocación de FM4-64 con SEC-5-GFP y SEC-15-GFP (Fig. 24).

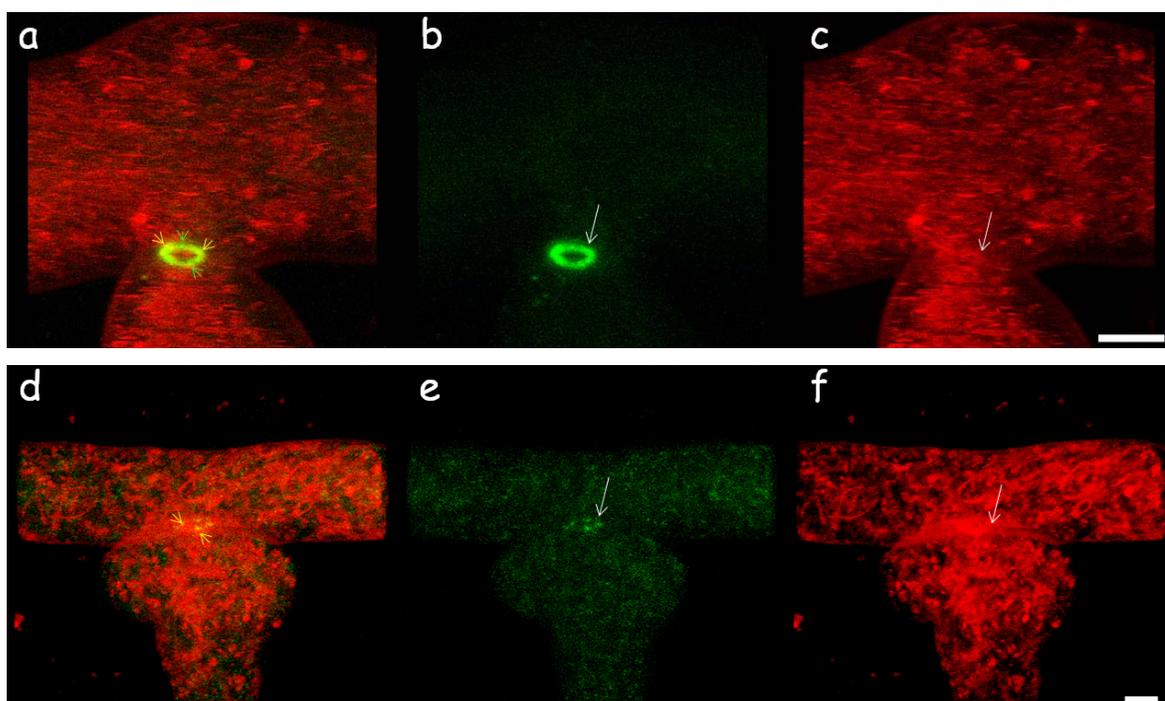


Figura 24. Imágenes de fusiones vegetativas de hifas de las transformantes TAB-15-3 (a-c) y TAB-5-2. Localización de SEC-15-GFP (a, b) y SEC-5-GFP (d, e.). Colocalización de SEC-15-GFP (a) y SEC-5-GFP (d) respectivamente con el colorante FM4-64; “c” y “f” son imágenes correspondientes al FM4-64. Barra = 2 μ m.

V.2.6 Germínulas

Se observaron germínulas a las 3, 4 y 5 hrs. de haberse sembrado macro conidias en cajas Petri con MMV. La fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP se observó de manera dispersa en el citoplasma con algunos cúmulos que convergen con la

membrana plasmática. En el citoplasma fue posible ver la concentración de la fluorescencia en algunos puntos que convergen con marcas oscuras vistas por microscopía de contraste de fases como se muestra en las gemínulas de los tres estadios a las que se hicieron observaciones (Figs. 25, 26).

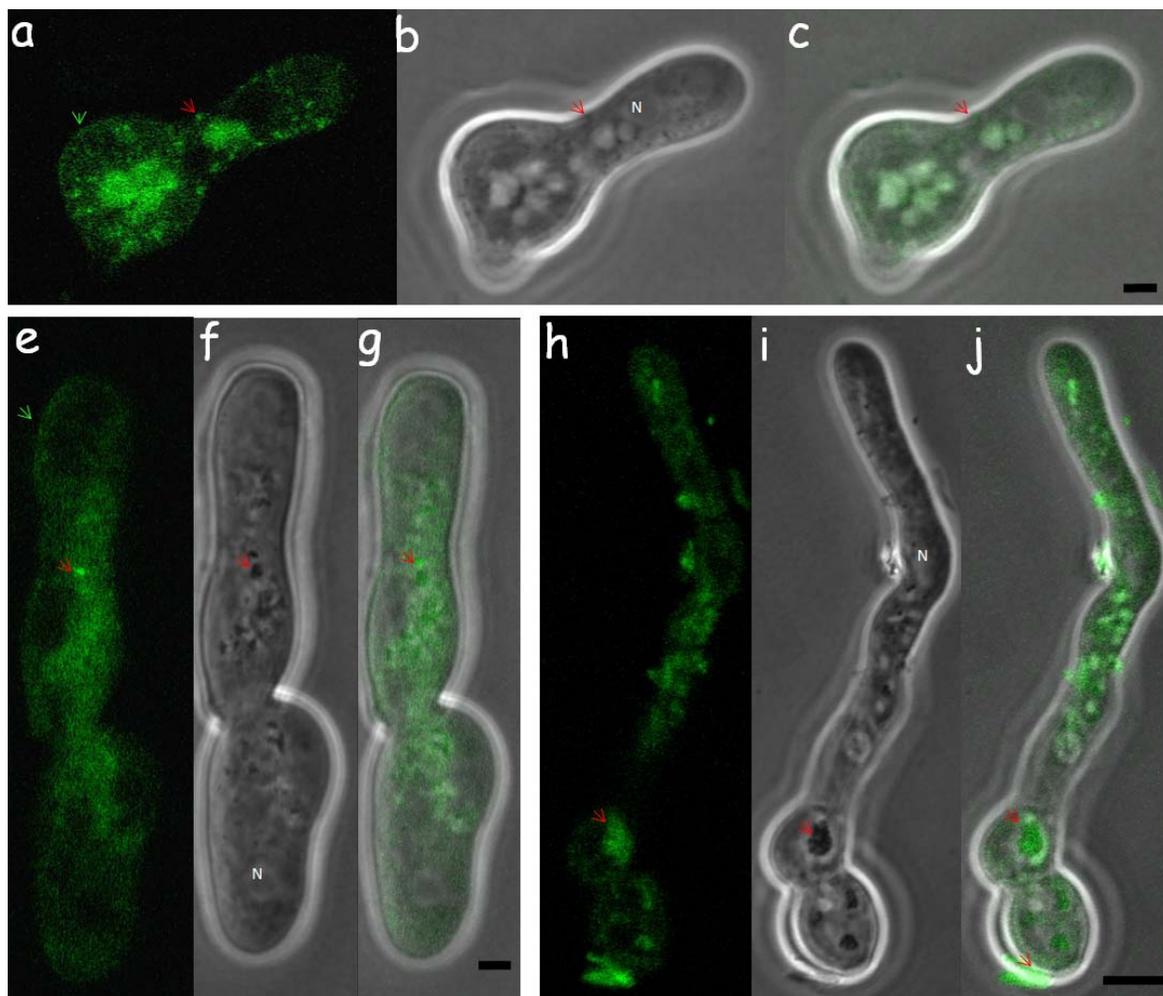


Figura 25. Imagen confocal de germinulas de la transformante TAB-5-2-1 de 3 (a-c), 4 (d-f) y 5 hrs. (g-i). En “a”, “d” y “g” se muestra la señal de canal de fluorescencia; en “b”, “e” y “h” la señal del canal de contraste de fases; y en “c”, “f” e “i” se muestran las superposiciones de las señales de los canales de fluorescencia y de contraste de fases de cada germinula. Las flechas rojas indican acumulaciones de la fluorescencia de SEC-15-GFP en el citoplasma y las verdes cerca de la membrana; “N” los núcleos. Barra = 2 μ m en “c” y “g”, y 5 μ m en “i”.

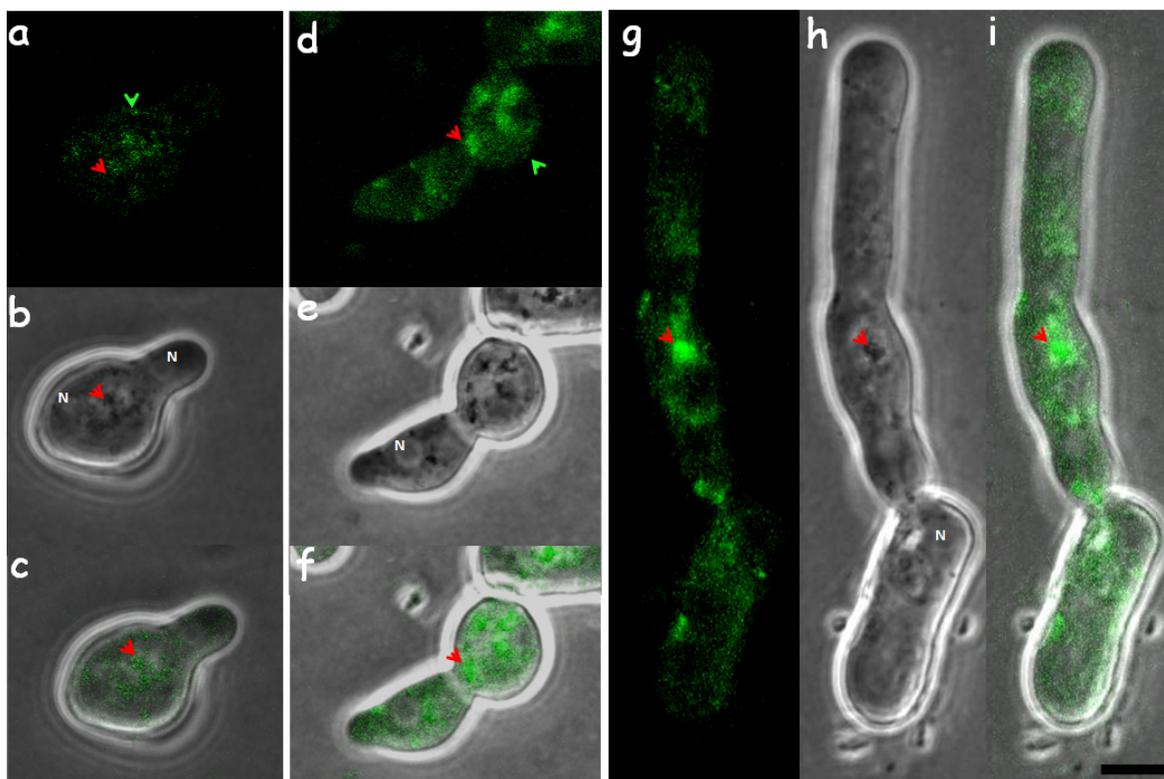


Figura 26. Imagen confocal de germinulas de la transformante TAB-15-3 de 3 (a-c), 4 (d-f) y 5 hrs. (g-i). En “a”, “d” y “g” se muestra la señal de canal de fluorescencia; en “b”, “e” y “h” la señal del canal de contraste de fases; y en “c”, “f” e “i” se muestran las superposiciones de las señales de los canales de fluorescencia y de contraste de fases de cada germinula. Las flechas rojas indican acumulaciones de la fluorescencia de SEC-15-GFP en el citoplasma y las verdes cerca de la membrana; “N” los núcleos. Barra = 5 µm.

V.2.7 Cruzas

Se tiñeron los protoperitecios de las transformantes TAB-15-3 y TAB-5-2 con FM4-64 y se tomaron imágenes (Fig. 27). Las hifas que comenzaban a formar el protoperitecio, mostraron un enrollamiento concéntrico y una fluorescencia de las fusiones, SEC-15-GFP y SEC-5-GFP acumulada en algunos sitios, tales como el septo y algunas regiones del citoplasma. Los protoperitecios también fueron teñidos con FM4-64 y observados bajo el microscopio confocal. Se obtuvieron cruzas de las transformantes TAB-15-3 y TAB-5-2 con las cepas: tipo silvestre, $\Delta sec-15$, $\Delta sec-5$ (Fig. 28, 29, Tabla II).

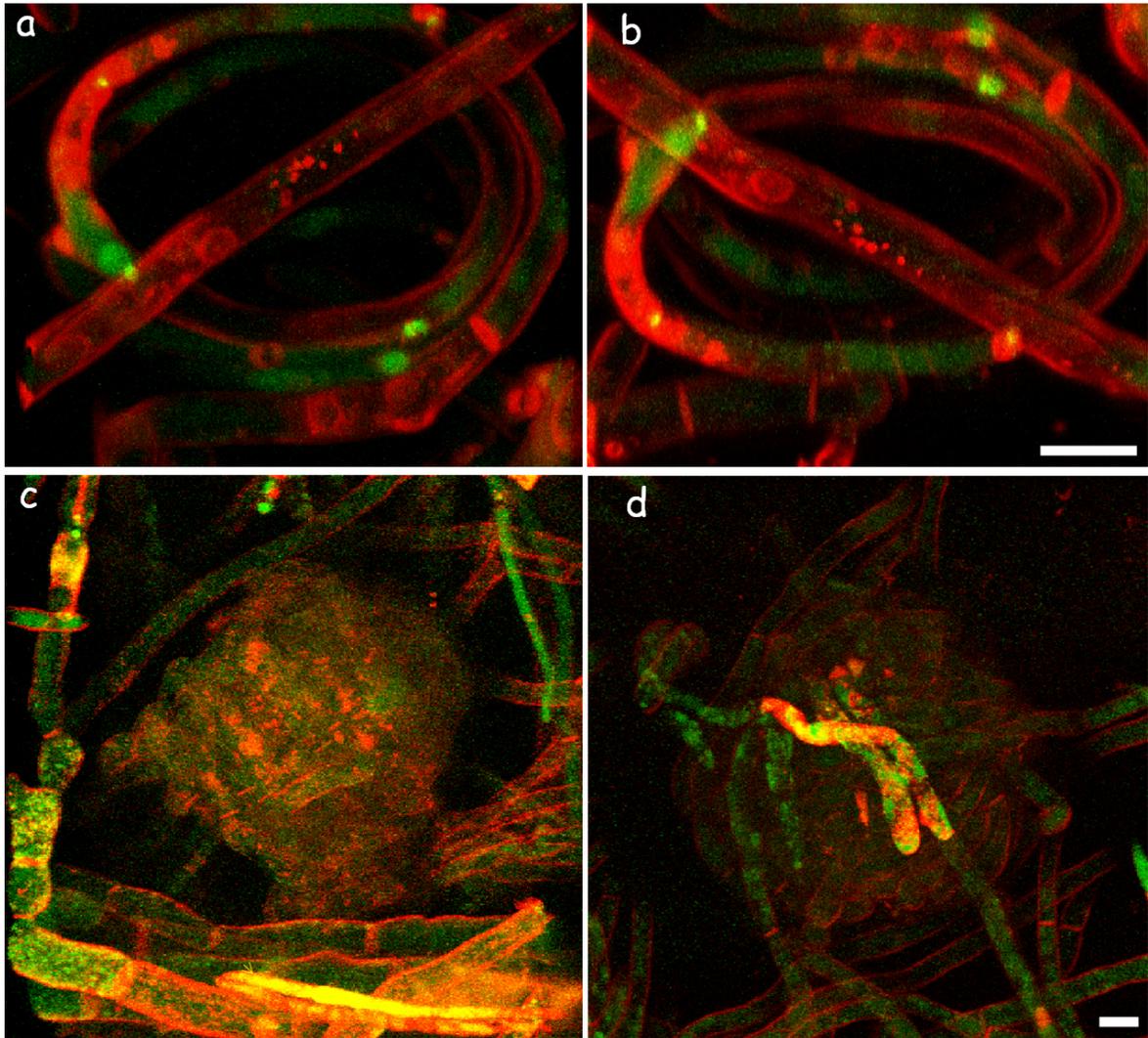


Figura 27. Reconstrucciones tridimensionales de los protoperitecios de las transformantes TAB-15-3 (a,c) y TAB-5-2 (b,d) teñidos con FM4-64 y antes de esparcir conidios del tipo de apareamiento complementario. El color verde representa la fluorescencia de las fusiones SEC-15-GFP (a,c) y SEC-5-GFP (b,d), el rojo la fluorescencia del fluorocromo FM4-64 y el amarillo los sitios donde convergen el FM4-64 y la GFP. Barra = 5 μ m.

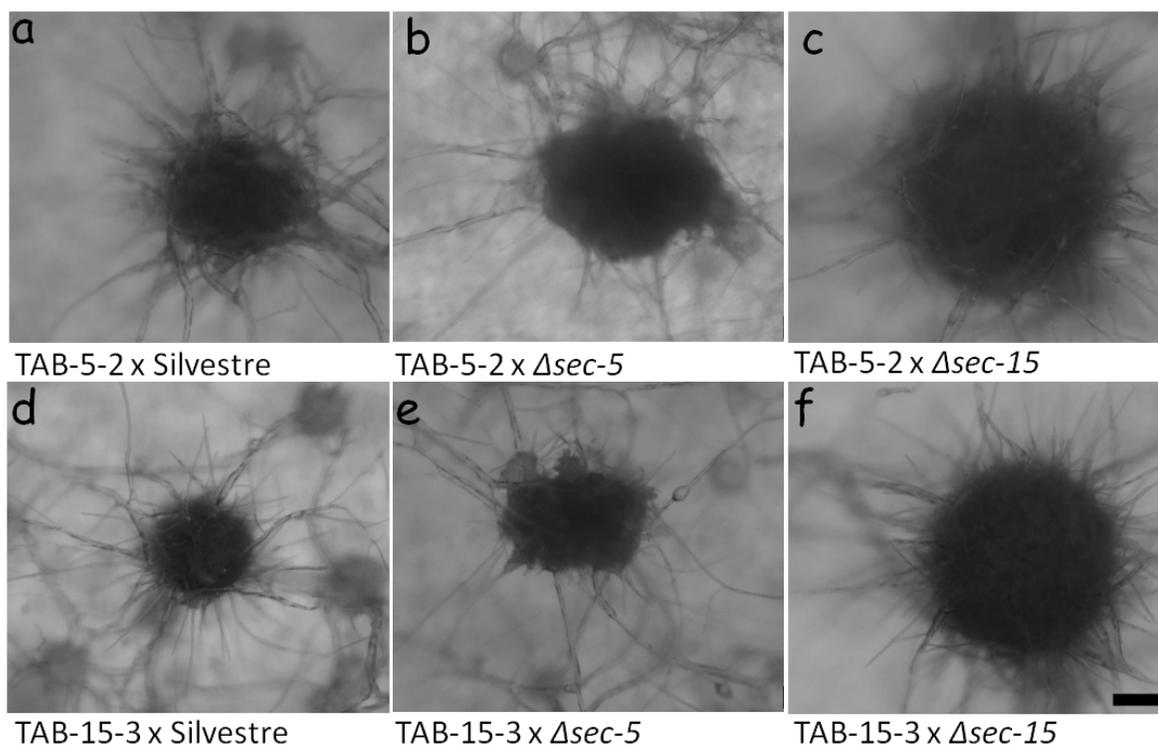


Figura 28. Imágenes de los peritecios resultantes de las cruzas de las cepas transformantes TAB-5-2 (a-c) y TAB-15-3 (d-f) con las cepas: tipo silvestre (a,d), $\Delta sec-5$ (b,e) $\Delta sec-15$ (c,f). Barra = 100 μ m.

Tabla II. Resultados de las cruzas (peritecios/ascosporas) para la obtención de cepas homocariontes, cepas con recuperación del fenotipo silvestre y cepas con fusiones SEC-15-GFP y SEC-5-GFP con un fondo mutante.

Cepas	Tipo Silvestre	$\Delta sec-15$	$\Delta sec-5$
TAB-15-3	+/+	+/+	+/-
TAB-5-2	+/-	+/-	+/-

Capítulo VI

Discusión

VI.1 Crecimiento apical

El Spitzenkörper es una estructura a la que se ha atribuido entre otras, la función de recolectar vesículas secretoras que contienen material para construir pared y repartirlas hacia la membrana plasmática (Bartnicki-García, 1990). El dinamismo del Spitzenkörper y su correlación con el crecimiento y morfología de las hifas ha sido motivos importantes en la búsqueda de respuestas sobre el crecimiento polarizado y morfología en hongos filamentosos (Girbardt, 1957; 1973; Riquelme *et al.*, 1998). La acumulación de la fluorescencia observada por microscopía confocal correspondiente a los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5 a manera de una capucha cortical en la membrana plasmática del ápice de las hifas, señala una estrecha relación espacial y temporal con el Spitzenkörper. El hecho que el exocisto se encuentre delante del Spitzenkörper, sugiere su participación en el atado de las vesículas secretoras para el consecuente atracado y fusión de estas con la membrana plasmática contribuyendo a la expansión celular (TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999a; Bonifacino y Glick, 2004). La proteína SPA-2, componente del polarisoma, ha sido observada por microscopía confocal de barrido con Láser, distribuída desde el centro del Spitzenkörper hasta la membrana apical de las hifas de *N. crassa*, siendo el centro del Spitzenkörper el punto desde donde se abre una especie de abanico hacia la punta (Araujo-Palomares *et al.*, 2008). Si se toma en cuenta el arco del abanico de SPA-2-GFP y se compara con la acumulación de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP en el domo apical, se aprecia una coincidencia muy notable en la membrana apical. Cabe señalar que el modelo matemático para el crecimiento hifal, propuesto por Bartnicki-García y cols. (1989)

indica una coincidencia entre la zona cortical marcada por los componentes del exocisto etiquetados con GFP y la zona correspondiente a la menor distancia entre los vectores que representan las rutas de las vesículas secretoras que van del CSV a la membrana plasmática. El modelo hifoide y lo observado experimentalmente en este trabajo corroboran una vez más de que el domo apical es el sitio donde se concentra el proceso de exocitosis (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al.*, 1995; Bartnicki-García, 2002).

La distribución de la proteína t-SNARE Sso1p que en *S. cerevisiae* se presenta de manera muy continua en toda la membrana plasmática y no muestra polarización aparente (Aalto *et al.*, 1993). En hifas vivas de *A. nidulans* se ha observado la distribución de la proteína t-SNARE: SSOA, homóloga de Sso1p, en varios sitios de la membrana plasmática (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). La fusión GFP-SSOA se acumula en el domo apical, inmediatamente después del domo apical. Las hifas muestran un espacio sin fluorescencia y hacia las regiones subapicales la fluorescencia se muestra discontinua a manera de parches brillantes y zonas menos brillantes (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Las proteínas del exocisto SEC-3, SEC-15, SEC-5 y EXO-70, pueden observarse acumuladas en el área adyacente a la membrana plasmática apical y parece ser que SSO-1 se asocia a la membrana plasmática sin hacer distinción entre los sitios de exocitosis, endocitosis e incluso aquellos donde se cree existe un tráfico de membrana en menor proporción con respecto a los ápices (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Köhli *et al.*, 2008). Como la sobreexpresión de Sso1 y Sso2p en *S. cerevisiae* puede silenciar la ausencia de SEC-3, SEC-15, SEC-5 y EXO-70, parece ser que la célula utiliza a las proteínas del exocisto para delimitar la zona de exocitosis y hacerla más eficiente en el sitio indicado (Aalto *et al.*, 1993; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Köhli *et al.*, 2008). De acuerdo con los estudios anteriores, parece bastante lógico que SEC-15 y SEC-5 se acumulen en la membrana plasmática apical y no en las regiones subapicales como SSOA. En lo que respecta a la sobreexpresión de SSOA en un hongo filamentoso, faltan estudios para comprobar si este t-SNARE podría complementar la ausencia de los componentes del exocisto. De ser así la célula de un hongo filamentoso debería tender a desarrollar estructuras similares a las pseudohifas y con menos probabiliades, estructuras semejantes a levaduras.

Si bien la fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP se desvanece de la membrana plasmática al viajar del domo apical hacia las regiones subapicales, es probable que en *N. crassa* exista un complejo endocítico justo detrás del domo apical, como lo indica la presencia de la proteína FimA-GFP en otros hongos (Drubin *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1991; Kubler y Riezman, 1993; Delgado-Álvarez *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). El marcaje de los sitios de exocitosis, entre ellos el establecido por los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5, podría ser reciclado al viajar de la membrana plasmática a la red *trans*-Golgi. En la red *trans*-Golgi SEC-15 y SEC-5 podrían asociarse a la membrana que puede contener otras proteínas del exocisto y otros marcadores de la polaridad, elementos cuyo destino sea la membrana plasmática apical, tales como proteínas asociadas a membrana y productos celulares a secretar.

El Spitzenkörper posee microvesículas en su centro y macrovesículas en la capa externa (Girbardt, 1969; Grove y Bracker, 1970; Grove *et al.*, 1970; Bracker *et al.*, 1976; Howard y Aist, 1980; Howard, 1981). En *S. cerevisiae* se ha observado por microscopía electrónica empleando anticuerpos conjugados con oro y por videomicroscopía de epifluorescencia que todos los componentes del exocisto se asocian en algún momento con vesículas a excepción de Sec3p (Boyd *et al.*, 2004). La fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP observada en las capas externas del Spitzenkörper sugiere que los componentes SEC-15 y SEC-5 podrían formar parte de las vesículas que se secretan por la vía convencional (Holcomb *et al.*, 1988; Bartnicki-García, 2006; Riquelme *et al.*, 2007). La ausencia de fluorescencia en el centro del Spitzenkörper, en cepas con componentes del exocisto marcados con GFP no se reportó antes de este trabajo, tal vez por el tamaño de las hifas de *A. nidulans* o el tipo de microscopía empleado en los trabajos con *A. gossypii* (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Köhli *et al.*, 2008). La técnica de microscopía empleada por Köhli y cols. (2008), es de epifluorescencia, empleando esta técnica resulta muy difícil distinguir diferencias entre diferentes capas de la célula apiladas en el eje z, porque bajo esta técnica la imagen se construye con la luz proveniente de todos los niveles del eje z, de tal manera que si hay señal de fluorescencia no se sabe de que nivel de la célula proviene esta, es decir no se sabe si esta señal fluorescente es de un punto cercano al espectador o lejano. Lo que es también importante es que bajo epifluorescencia es complicado poder distinguir si un nivel en el eje z esta produciendo señal o no. En cambio la técnica de

Microscopía confocal de barrido con Láser, es diferente, por tomar rebanadas ópticas y separarlas una de otra, de tal forma que se elimina la luz proveniente de otras capas de la célula permitiendo ver que es lo que aparece fluorescente en cada nivel del eje z. Este último tipo de microscopía es la que ha permitido en este trabajo, entre otras cosas observar que en el centro del Spitzenkörper los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5 se encuentran ausentes.

VI.2 Inhibición con BFA-Bodipy 558/568

El tratamiento de las hifas de *N. crassa* con el metabolito fúngico secundario BFA-Bodipy 558/568, inhibidor de la ruta secretora convencional, permitió la observación de una acumulación tanto de SEC-15 como de SEC-5 en la red de endomembranas de R.E., Golgi y *trans*-Golgi. Considerando que los organelos R.E., Golgi y *trans*-Golgi forman parte de la ruta secretora convencional y la fluorescencia, tanto del fluorocromo Bodipy 558/568 conjugado con BFA, como la fluorescencia de la GFP unida a SEC-15 y SEC-5 colocalizan, es muy probable que los componentes del exocisto alcancen la membrana plasmática a través de la ruta secretora convencional. Si SEC-15 y SEC-5 son sintetizados en el citoplasma y llegan a la membrana plasmática por una ruta no- clásica, la colocalización en los diferentes compartimentos podría ser parte de un reciclaje a través de endosomas y de los endosomas a la red *trans*-Golgi, después a los equivalentes de Golgi y por último al retículo endoplasmático (Cole *et al.*, 1996; Pelham, 1991; sciaky *et al.*, 1997; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Abenza *et al.*, 2009). Algo que es muy eminente es la correlación entre la desaparición del cúmulo de fluorescencia de SEC-15-GFP y SEC-5-GFP en el domo apical y el cese de crecimiento por exposición a BFA-Bodipy 558/568.

VI.3 Septos

Los septos de las hifas de *N. crassa* se forman a una distancia entre 100 y 180 μm de los ápices. Cada septo se forma en aproximadamente 6 min. Como es necesario el transporte de material para formar el septo, proteínas como tropomiosina, fimbrina, actina,

microtúbulos, proteínas asociadas a microtúbulos, entre otras han sido localizadas adyacentes al septo (Riquelme *et al.*, 2007; Delgado-Álvarez *et al.*, 2008; Echaurren-Espinosa *et al.*, 2008; Román-Gavilanes *et al.*, 2008). Sin embargo SEC-15 y SEC-5 mostraron una débil acumulación asociada a los septos en formación y evidente solo en las reconstrucciones tridimensionales. En los casos donde el cúmulo de la fluorescencia de SEC-15 y SEC-5 en los septos fue más notable, fue en aquellos donde los septos contaban con un tiempo mayor a los 30 min de formación y donde era evidente un gran flujo citoplasmático a través del poro. Estos septos con un marcaje fluorescente intenso mostraron poros de diámetros con más de 500 nm, en algunos casos de 3 μm , cuando el tamaño regular es alrededor de 350 nm (Hunsley y Gooday, 1974). El que estos poros sean mucho mayores de lo común, podría sugerir al menos dos posibles descripciones de los hechos: una que la construcción centrípeta de los septos haya cesado extraordinariamente manteniendo diámetros mayores de 500 nm; la otra podría ser una disolución o rompimiento del septo fragmentado por el desgaste del flujo citoplasmático o por la degradación enzimática de los componentes del septo. El fluorocromo vital FM4-64, se acumula en algunos puntos del septo que coinciden con las proteínas SEC-15 y SEC-5 respectivamente. Esto sugiere que ha sucedido una acumulación activa, tal vez derivada por vesículas que contienen en sus membranas FM4-64 y que al encontrar membranas marcadas con SEC-15 y/o SEC-5 se han fusionado con la membrana del septo incrementando la cantidad del colorante en estos sitios.

VI.4 Anastomosis

Para que una hifa se pueda fusionar a otra hasta compartir el citoplasma y los organelos contenidos en el, es de vital importancia la dirección de quitinasas y glucanasas para degradar la pared de las dos hifas, así como sintetasas de quitina y sintetasas de glucanos para sellar los sitios aledaños al poro y evitar derrame citoplasmático (Hickey *et al.*, 2002). La localización de SEC-15 y SEC-5 en los sitios de unión de las hifas podría implicar la dirección, tanto de enzimas sintetizadoras como de enzimas líticas para

fortalecer y/o remodelar las uniones, uniones que tiene que soportar la fricción del citoplasma migrante y la presión que suele ser de 4-5 bar (Lew y Levina, 2004).

El arreglo o distribución de la fluorescencia de FM4-64 y las proteínas SEC-15 y SEC-5 en el área del poro que comunica a las hifas fusionadas difiere espacialmente, en algunos casos coincide y en otros solo aparece una señal fluorescente. Las razones de que el fluorocromo FM4-64 y SEC-15-GFP o SEC-5 colocalicen en algunos sitios y en otros difieran, sugiere una determinación funcional, para cada sitio.

En el presente trabajo se expone por vez primera a los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5 fusionados con GFP observados por microscopía confocal de barrido con Láser en áreas adyacentes a la membrana plasmática apical en el hongo filamentoso *N. crassa*. El que la fluorescencia de las fusiones se encuentre en el domo apical de las hifas, hace pensar que realiza el mismo papel de exocitosis en *N. crassa* que en los organismos en los que se ha descrito previamente (TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999a). También por vez primera en un hongo filamentoso es detectada la ausencia de los componentes SEC-15 y SEC-5 del exocisto en el centro del Spitzenkörper, ya que las proteínas SEC-15-GFP y SEC-5-GFP solo se han localizado en las áreas externas del Spitzenkörper.

El haber encontrado cúmulos de fluorescencia en sitios como los septos y sitios como los puntos de fusión vegetativa indica que el exocisto no solo se encuentra en implicado en procesos relacionados a la zona de mayor crecimiento hifal, la punta, sino que tal vez ayude a la regulación de otros procesos en estos lugares.

Referencias

Abenza J. F., Pantazopoulou A., Rodríguez J. M., Galindo A., Peñalva M. A., 2009. Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 10(1): 57-75.

Achstetter T, Franzusoff A, Field C, Schekman R., 1988. SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 263(24): 11711-11717.

Adamo J. E., Rossi G. y Brennwald P., 1999. The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol. Biol. Cell* 10: 4121-4133.

Adams D. J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029-2035.

Agrios G. N., 1985. *Fitopatología*. 3ª Reimpresión, Ed. Limusa, México. 530pp.

Agrios G. N., 1997. *Phytopathology*. 4ª Edición, Ed. Limusa, México. 530pp.

Alonso-Nuñez M.L., An H., Martín-Cuadrado A.B., Mehta S., Petit C., Sipiczki M., del Rey F., Gould K. L. y de Aldana C. R., 2005. Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* 16: 2003-2017.

Araujo-Palomares C. L., Riquelme M. y Castro-Longoria E., 2008. SpaNc localizes at the cellular apex of germlings and mature hyphae of *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The *Neurospora* 2008 meeting at Asilomar, Pacific Grove, EE UU.

Aronov S., Gelin-Licht R., Zipor G., Haim L., Safran E. y Gerst J. E., 2007. mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 27(9): 3441-3455.

Ayad-Durieux Y., Knechtle P., Goff S., Dietrich F. y Philippsen P., 2000. A PAK-like protein kinase is required for maturation of young hyphae and septation in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *J. Cell Sci.* 113(24): 4563-4575.

Baladrón V., Ufano S., Dueñas, E., Martín-Cuadrado A. B., del Rey F. y Vázquez-de Aldana C. R., 2002. Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 1(5): 774-786.

Banuet F., 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2): 249-274.

Bartnicki-Garcia S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-107.

Bartnicki-Garcia S y Lippman E., 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science.* 165(890): 302-304.

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

Bartnicki-Garcia S., 1990. Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis, p. 211-232. En: Heath I. B. *Tip growth in plant and fungal cells.* ed. Academic Press, San Diego, EEUU.

Bartnicki-García S., Bartnicki D. D., Gierz G., López-Franco R. y Bracker C. E., 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* 19: 153-159.

Bartnicki-Garcia S., Bracker C. E., Gierz G., López-Franco R. y Lu H., 2000. Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophys J.* 79(5): 2382-2390.

Bartnicki-García S., 2002. Importancia de la biofísica en la morfogénesis de los hongos. Modelos cibernéticos y matemáticos para simular el desarrollo celular. *Mensaje Bioquímico* 26: 147-162.

Bartnicki-Garcia S., 2006. Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res.* 6(7): 957-965. *Rev.*

Bhatnagar R. S. y Gordon J. I., 1997. Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle. *Trends Cell Biol.* 7(1): 14-20.

Bhatnagar R. S., Fütterer K., Waksman G. y Gordon J. I., 1999. The structure of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1441(2-3): 162-172.

Bickle M., Delley P. A., Schmidt A. y Hall M. N., 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* 17(8): 2235-2245

Biella S., Smith M. L., Aist J. R., Cortesi P. y Milgroom M. G., 2002. Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proc. Biol. Sci.* 269(1506): 2269-2276.

Bogusky M. S. y McCormick F., 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-653.

Boehm M. y Bonifacino J. S., 2001. Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell.* 12(10):2907-2920.

Bonifacino J. S. y Lippincott-Schwartz J., 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 409-414.

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

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

Botstein D., Segev N., Stearns T., Hoyt M. A., Holden J. y Kahn R. A., 1988. Diverse biological functions of small GTP-binding proteins in yeast. *Cold Spring Harb. Simp. Quant. Biol.* 53, 629-636.

Bourne H. R., Sanders D. A. y McCormick F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349(6305): 117-127.

Boutin J. A., 1997. Myristoylation. *Cell Signal* 9(1): 15-35.

Boyd C., Hughes T., Pypaert M. y Novick P., 2004. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* 167(5): 889-901.

Cabib E., Bowers B. y Roberts R. L., 1983. Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80(11): 3318-3321.

Cai H., Reinish K. y Ferro-Novick S., 2007. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Develop. Cell.* 12: 671-682.

Callejas-Negrete O. A., Mouriño-Pérez R. R., Roberson R. W. y Bartnicki-García S., 2008. PAC-1A dynamics in *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en: *Neurospora 2008* at Asilomar, Pacific Grove, EE UU.

Camus C., Boy-Marcotte E. y Jacquet M., 1994. Two subclasses of guanine exchange factor (GEF) domains revealed by comparison of activities of chimeric genes constructed from CDC25, SDC25 and BUD5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 245(2): 167-176.

Carlile M. J. y Gooday G. W., 1978. Cell fusion in myxomycetes, and fungi. En: *Membrane fusion*, editado por: Poste G., Nicholson G. L., Ed. Elsevier, Holanda, 219-265 pp.

Carlile M. J., Watkinson S. C. y Gooday G. H., 2001. *The fungi*. Ed. Academic Press. San Diego, EE UU 588 pp.

Carr C. M., Grote E., Munson M., Hughson F. M. y Novick P. J., 1999. Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *J. Cell Biol.* 146(2): 333-344.

Caten C. E., 1972. Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *J. Gen. Microbiol.* 72: 221-229.

Chaffin W. L., López-Ribot J. L., Casanova M., Gozalbo D. y Martínez J. P., 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1): 130-180.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. y Prasher D. C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802-805.

Chalfie M. y Kain S. R., 2006. Green Fluorescent Protein, properties, applications and tools. 2a. ed. J. Wiley, USA. 443pp.

Chauhan N., Inglis D., Roman E., Pla J., Li D., Calera J. A. y Calderone R., 2003. *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* 2(5): 1018-1024.

Chen W., Elias R. V., Cao W., Lerioux V. y McGinnis J. F., 1999. Anti-recoverin antibodies cause the apoptotic death of mammalian photoreceptor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 57(5):

Chew E., Aweiss Y., Lu C.Y. y Banuett F., 2008. Fuz1, a MYND domain protein, is required for cell morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mycologia* 100(1): 31-46.

Cohen-Kupiec R. y Chet I., 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 270-277.

Cole N. B., Sciaky N., Marotta A., Song J. y Lippincott-Schwartz J., 1996. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks of peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell.* 7: 631-650.

Collinge A. J. y Trinci A. P., 1974. Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* 9(4): 353-368.

Cox A. D. y Der C. J., 2002. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol. Ther.* 1: 599-606.

Cross, J.C. et al. 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266: 1508-1518.

Dascher C. y Balch W. E., 1994. Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 269(2): 1437-1448.

Debets A. J. M. y Griffiths A. J. F., 1998. Polymorphism of het-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycol. Res.* 102: 1343-1349.

Dekker N., Speijer D., Grün C.H., van den Berg M., de Haan A. y Hochstenbach F., 2004. Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* 15: 3903-3914.

Delgado-Álvarez D. L., Mouriño-Pérez R. R. y Smith L., 2008. Confocal and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) imaging of fimbrin in *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The *Neurospora* 2008 meeting at Asilomar, Pacific Grove, California, EE UU.

Dell'Angelica E. C., 2001. Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! Trends Cell Biol. 11(8): 315-318.

Delley P. A. y Hall M. N., 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. J. Cell Biol. 147(1): 163-174.

Donaldson J. G. y Klausner R. D., 1994. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. Curr Opin Cell Biol. 6(4): 527-532.

Dong Y., Pruyne D. y Bretscher A., 2003. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. J. Cell Biol. 161(6): 1081-1092.

Dong G., Hutagalung A. H., Fu C., Novick P. y Reinisch K. M., 2005. The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. Nature Struct. & Mol. Biol. 12(12): 1094-1100.

Drgonová J., Drgon T., Tanaka K., Kollar R., Chen G. C., Ford R. A., Chan C. S., Takai Y. y Cabib E., 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. Science 272: 277-279.

Drgonová J., Drgon T., Roh D. H. y Cabib E., 1999. The GTP binding protein Rho1p is required for cell progression and polarization of the yeast cell. J. Cell Biol. 146: 373-387.

Dworak H.A. y Sink H., 2002. Myoblast fusion in *Drosophila*. Bioessays 24(7): 591-601.

Echauri Espinosa R. O., Smith L., Roberson R. W. y Mouriño Pérez R. R., 2008. The role of coronin in polarized growth in *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The *Neurospora* 2008 meeting at Asilomar, Pacific Grove California, EE UU.

Enderlin C. S. y Selitrennikoff C. P., 1994. Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3) beta-glucan synthase activity and cell wall formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91(20): 9500-9504.

Etienne-Manneville S., 2004. Cdc42--the centre of polarity, J. Cell. Sci. 117(8): 1291-1300.

Evangelista M., Blundell K., Longtine M. S., Chow C. J., Adames N., Pringle J. R., Peter M. y Boone C., 1997. Bni1p, a yeast formin linkin Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276: 118-122.

Evangelista M., Pruyne D., Amberg D. C., Boone C. y Bretscher A., 2004. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4: 32-41.

Fankhauser C., Raymond A., Cerutti L., Utzig S., Hofmann K. y Simanis V., 1995. The *S. pombe* *cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* 82: 435-444.

Fasshauer D., Sutton R. B., Brunger A. T. y Jahn R., 1998. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 15781-15786.

Finger F. P., Novick P., 1997. Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 8(4): 647-662.

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

Fleissner A., Sarkar S., Jacobson D. J., Roca G. M., Read N. D. y Glass N. L., 2005. The *so* locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 4: 920-930.

Fleissner A. y Glass N. L., 2007. SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot. Cell* 6(1): 84-94.

Franzusoff A., Schekman R., 1989. Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J.* 8(9): 2695-2702.

Franzusoff A., Redding K., Crosby J., Fuller R. S., 1991. Schekman R., Localization of components involved in protein transport and processing through the yeast Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 112(1): 27-37.

Franzusoff A., Lauzé E. y Howell K. E., 1992. Immuno-isolation of Sec7p-coated transport vesicles from the yeast secretory pathway. *Nature* 355(6356): 173-175.

Freitag M., Ciuffetti L. M. y Selker E., 2001. Expression and visualization of Green Fluorescent Protein (GFP) in *Neurospora crassa*. <http://www.fgsc.net> (Julio de 2006).

Freitag M., William R. L., Kothe G. O. y Selker E. U., 2002. A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 99: 8802-8807.

Freitag M., Hickey T. K., Khlafallah, Read N. D. y Selker E., 2004. HP1 Is Essential for DNA Methylation in *Neurospora*. *Mol. Cell*. 13: 427-434.

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

Fykse E. M., Li C. y Südhof T. C., 1995. Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca²⁺/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro. *J. Neurosci*. 15(3 Pt 2): 2385-2395.

Galagan J. E., Calvo S. E., Borkovich K. A., Selker E. U., Read N. D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L. J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C. B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M. A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C. P., Kinsey J. A., Braun E. L., Zelter A., Schulte U., Kothe G. O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzenberg R. L., Perkins D. D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R. J., Osmani S. A., DeSouza C. P., Glass L., Orbach M. J., Berglund J. A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D. O., Alex L. A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M. S., Lander E.S., Nusbaum C., y Birren B., 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422(6934): 859-868.

Gao X. D., Albert S., Tcheperegine S. E., Burd C. G., Gallwitz D. y Bi E., 2003. The GAP activity of Msb3 and Msb4 for the Rab GTPase Sec4 is required for efficient exocytosis and actin organization. *J. Cell Biol*. 162: 635-646.

García I., Jiménez D., Martín V., Durán A. y Sánchez, Y. 2005. The α -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97: 569-576.

Garnjobst L., 1953. Genetic control of heterokaryosis in *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 40: 607-614

Garnjobst L. y Wilson J. F., 1956. Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42: 613-618.

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

Gasman S., Chasserot-Golaz S., Malacombe M., Way M. y Bader M. F., 2004. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. Mol. Biol. Cell 15: 520-531.

Gerber S. H. y Sudhof T. C., 2002. Molecular determinants of regulated exocytosis. Diabetes 51: S3-S11

Gierz G. y Bartnicki-Garcia S., 2001. A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. J. Theor. Biol. 208(2): 151-164.

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

Glass N. L., Jacobson D. J. y Shiu P. K., 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. Annu. Rev. Genet. 34: 165-186.

Glass N. L. y Kaneko I., 2003. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. Eukaryot. Cell 2(1): 1-8.

Glass N. L., Rasmussen C., Roca M. G. y Read N. D., 2004. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. Trends Microbiol. 12(3): 135-141.

Gooday G. W., 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation 1: 177-190.

Gordon C. L., Archer D. B., Jeenes D. J., Doonan J. H., Wells B., Trinci A. P. y Robson G. D., 2000. A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. J. Microbiol. Methods 42(1): 39-48.

Gow N. A. R. y Gadd G. M., 1995. The growing Fungus. Ed. Chapman Hall. Londres, Reino Unido. 473pp.

Grindstaff K. K., Yeaman, C., Anandasabapathy N., Hsu S. C., Rodriguez-Boulan E., Scheller R. H. y Nelson W. J., 1998. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and

specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 93: 731-740.

Grote E. y Novick P. J., 1999. Promiscuity in Rab-SNARE interactions. *Mol. Biol. Cell* 10: 4149-4161.

Grove S. N. y Bracker C. E., 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J. Bacteriol.* 104(2): 989-1009.

Gull K., 1978. Form and function of septa in filamentous fungi. En: *The filamentous fungi*, vol. 3, *Developmental Mycology*, Editores Smith J. E. y Berry D. R., Ed. Chapman & Hall, London, Reino Unido. 78-93 pp.

Guo W., Grant A. y Novick P., 1999a. Exo84p is protein essential for secretion. *The J. Biol. Chem.* 274: 23558-23564.

Guo W., Roth, D., Walch-Solimena, C. y Novick, P. 1999b. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* 18: 1071-1080.

Guo W., Tamanoi F. y Novick P., 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nature Cell Biol.* 3: 353-360.

Gupta G. D. y Heath I. B., 2000. A tip-high gradient of a putative plasma membrane SNARE approximates the exocytics gradient in hyphal apices of the fungus *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 29: 187-199.

Gupta G. D. y Heath I. B., 2002. Predicting the distribution, conservation, and functions of SNAREs and related proteins in fungi. *Fung. Genet. Biol.* 36: 1-21.

Haarer B. K., Corbett A., Kweon Y., Petzold A. S., Silver P. y Brown S. S., 1996. SEC3 mutations are synthetically lethal with profilin mutations and cause defects in diploid-specific bud-site selection. *Genetics* 144(2): 495-510.

Hart C. A., Ahkong Q. F., Fisher D., Goodall A. H., Hallinan T. y Lucy J. A., 1975. Effects of detergents on virus- and chemically induced fusion of erythrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 3(5): 733-734.

Hattula K., Furuholm J., Arffman A., Peränen J. A., 2002. Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol. Biol. Cell.* 13(9):3268-3280.

Hazuka C. D., Foletti D. L., Hsu S. C., Kee Y., Hopf F. W. y Scheller R. H., 1999. The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J. Neurosci.* 19(4): 1324-1334.

He B., Xi F., Zhang J., TerBush D., Zhang X. y Guo W., 2007. Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J. Cell Biol.* 176(6): 771-777.

Heim R., Cubitt A. B. Y Tsien R. Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664.

Heinisch J. J., Lorberg A., Schmitz H. P. y Jacoby J.J., 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32(4): 671-680.

Herskowitz I., Park H. O., Sanders S., Valtz N. y Peter M., 1995. Programming of cell polarity in budding yeast by endogenous and exogenous signals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60: 717-727.

Hickey P. C., 2001. Imaging vesicle trafficking and organelle dynamics in living fungal hyphae. Tesis de Doctorado, University of Edinburgh, UK.

Hickey P. C., Jacobson D., Read N. D. y Louise Glass N. L., 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37(1): 109-119.

Hickey P., Swift S. R., Roca M. G. y Read N. D., 2005. 3 Live-Cell Imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Meth. Microbiol.* 34: 63-87.

Hirst J. y Robinson M. S., 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1404(1-2): 173-193.

Horio T. y Oakley B. R., 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 16(2): 918-926.

Horiuchi H., Fujiwara M., Yamashita S., Ohta A. y Takagi M., 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.

Hou Z., Xue C., Peng Y., Katan T., Kistler H. C. y Xu J. R., 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility,

- heterokaryon formation, and plant infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15(11): 1119-1127.
- Hsu S. C., Ting A. E., Hazuka C. D., Davanger S., Kenny J. W., Kee Y. y Scheller R. H., 1996. The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* 17: 1209 -1219.
- Hunsley D. y Gooday G. W., 1974. The structure and development of septa in *Neurospora crassa*. *Protoplasma* 82(1): 125-146.
- Ichinomiya M., Yamada E., Yamashita S., Ohta A. y Horiuchi H., 2005. Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 4(6): 1125-1136.
- Ingham R. J., Colwill K., Howard C., Dettwiler S., Lim C. S., Yu J., Hersi K., Raaijmakers J., Gish G., Mbamalu G., Taylor L., Yeung B., Vassilovski G., Amin M., Chen F., Matskova L., Winberg G., Ernberg I., Linding R., O'donnell P., Starostine A., Keller W., Metalnikov P., Stark C. y Pawson T., 2005. WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol. Cell Biol.* 25(16): 7092-7106.
- Jabri E., Taft C., Quigley D., Hrmova M., Phelps P., Alders M. y Selitrennikoff C. P., 1989. (1-3)- β -glucan synthase of *Neurospora*. *Curr. Microbiol.* 19: 153-161.
- Jacobson D. J., Beurkens K. y Klomparens K. L., 1998. Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at het loci in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 45-56.
- Jafar-Nejad H., Andrews H. K., Acar M., Bayat V., Wirtz-Peitz F., Mehta S. Q., Knoblich J. A., Bellen H. J., 2005. Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors. *Dev. Cell.* 9(3):351-363.
- Jamieson J. D. y Palade G. E., 1966. Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 55(2): 424-431.
- Jamieson J. D. y Palade G. E., 1967a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 34(2): 577-596.
- Jamieson J. D. y Palade G. E., 1967b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell Biol.* 34(2): 597-615.

Jin R., Junutula J. R., Matern H. T., Ervin K. E., Scheller H. R. y Brunger A. T., 2005. Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the Ra1A GTPase. *EMBO J.* 24: 2064-2074.

Jochová J., Rupes I. y Streiblová E., 1991. F-actin contractile rings in protoplasts of the yeast *Schizosaccharomyces*. *Cell Biol. Int. Rep.* 15(7): 607-610.

Johnson D. I., 1999. Cdc42: an essential rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:54-105.

Jollès P., Muzzarelli R. A. A., 1999. *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel. 360 pp.

Jones E. Y., Tormo J., Reid S. W. y Stuart D. I., 1998. Recognition surfaces of MHC class I. *Immunol. Rev.* 163: 121-128.

Jung U. S. y Levin D.E., 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* 34(5): 1049-1057.

Kamada Y., Jung U. S., Piotrowski J. y Levin D. E., 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9(13):1559-1571.

Kamada Y., Qadota H., Python C. P., Anraku Y., Ohya Y. y Levin D. E., 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol. Chem.* 271(16): 9193-9196.

Kim J. M., Lu L., Shao R., Chin J. y Liu B., 2006. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 173(2): 685-696.

Klein U., Goossens T., Fischer M., Kanzler H., Braeuninger A., Rajewsky K. y Küppers R., 1998. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* 162: 261-280.

Köhli M., Galati V., Boudier K., Roberson R. W. y Philippsen P., 2008. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J. Cell Sci.* 121: 3878-3889.

Krüger M. y Fischer R., 1998. Integrity of a Zn finger-like domain in SamB is crucial for morphogenesis in ascomycetous fungi. *EMBO J.* 17: 204-214.

Kurischko C., Kuravi V. K., Wannissorn N., Nazarov P. A., Husain M., Zhang C., Shokat K. M., McCaffery J. M. y Luca F. C., 2008. The yeast LATS/Ndr kinase Cbk1 regulates growth via Golgi-dependent glycosylation and secretion. *Mol. Biol. Cell* 19(12): 5559-5578.

Kurjan J., 1992. Pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1097-1129.

Leslie J. F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.

Leslie J. F. y Klein K. K., 1996. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics* 144(2): 557-567.

Leslie J. F. y Yamashiro C. T., 1997. Effects of the *tol* mutation on allelic interactions at *het* loci in *Neurospora crassa*. *Genome* 40(6): 834-840.

Li C. R., Lee R. T., Wang Y. M., Zheng X. D. y Wang Y., 2007. *Candida albicans* hyphal morphogenesis occurs in Sec3p-independent and Sec3p-dependent phases separated by septin ring formation. *J. Cell Sci.* 120: 1898-1907.

Lippincott J. y Li R., 1998. Dual function of Cyk2, a *cdc15/PSTPIP* family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J. Cell Biol.* 143(7): 1947-1960.

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

Lippincott-Schwartz J., 2001. The secretory membrane system studied in real-time. Robert Feulgen Prize Lecture, *Histochem. Cell Biol.* 116(2): 97-107.

Lipschutz J. H., Guo W., O'Brien L. E., Nguyen Y. H., Novick P. y Mostov K. E., 2000. Exocyst is involved in cystogenesis and tubulogenesis and acts by modulating synthesis and delivery of basolateral plasma membrane and secretory proteins. *Mol. Biol. Cell.* 11(12): 4259-4275.

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

Macías M. J., Hyvönen M., Baraldi E., Schultz J., Sudol M., Saraste M. y Oschkinat H., 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382(6592): 646-649.

Macías M. J., Wiesner S. y Sudol M., 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 513: 30-37.

Martín-Cuadrado A. B., Dueñas E., Sipiczki M., Vázquez de Aldana C. R. y del Rey F., 2003. The endo- β -1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 116: 1689-1698.

Martín-Cuadrado A. B., Encinar del Dedo J., de Medina-Redondo M., Fontaine T., del Rey F., Latgé J. P. y Vázquez de Aldana C. R., 2008. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-beta-glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol. Microbiol.* 69(1): 188-200.

Matsui, Y., and A. Toh-e. 1992b. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5690-5699.

May G., Shaw F., Badrane H. y Vekemans X., 1999. The signature of balancing selection: fungal mating compatibility gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(16): 9172-9177.

Mazur P. y Baginsky W., 1996. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* 271(24): 14604-14609.

McMurrough I. y Bartnicki-Garcia S., 1971. Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 246(12): 4008-4016.

McMurrough I., Flores-Carreón A. y Bartnicki-Garcia S., 1971. Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 246(12): 3999-4007.

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

Mösch H. U., Köhler T. y Braus G. H., 2001. Different domains of the essential GTPase Cdc42p required for growth and development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21(1): 235-248.

Moskalenko S., Henry D. O., Rossé C., Mirey G., Camonis J. H. y White M. A., 2002. The exocyst is a Ral effector complex. *Nature Cell Biol.* 4: 66-72.

Moskalenko S., Tong C., Rose C., Mirey G., Formstescher E., Daviet L., Camonis J. y White M., 2003. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunits interactions. *J. Biol. Chem.* 278: 51743-51748.

Mullins C. y Bonifacino J. S., 2001. Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol. Cell Biol.* 21(23):7981-7994.

Munson M. y Novick P., 2006. The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(7): 577-581.

Mylyk O. M., 1975. Heterokaryon incompatibility genes in *Neurospora crassa* detected using duplication-producing chromosome rearrangements. *Genetics* 80: 107-124.

Mylyk O. M., 1976. Heteromorphism for Heterokaryon Incompatibility Genes in Natural Populations of *Neurospora crassa*. *Genetics* 83(2): 275-284.

Nair J., Müller H., Peterson M. y Novick P., 1990. Sec2 protein contains a coiled-coil domain essential for vesicular transport and a dispensable carboxy terminal domain. *J. Cell Biol.* 110(6): 1897-1909.

Nasrallah J. B., 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(5): 368-373.

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

Newman C. M. y Magee A. I., 1993. Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1155(1): 79-96.

Nielsen E., Cheung A. Y. y Ueda T., 2008. The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol.* 147: 1516-1526.

Novick P. y Schekman R., 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1858-1862.

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

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

Oda K. y Nishimura Y., 1989. Brefeldin A inhibits the targeting of cathepsin D and cathepsin H to lysosomes in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163(1): 220-5.

Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y. y Remington S. J., 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273(5280): 1392-1395.

Palade G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.

Pandey A, Roca MG, Read ND, Glass NL., 2004. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 3(2): 348-358.

Pandit A. y Maheshwari R., 1996. A demonstration of the role of het genes in heterokaryon formation in *Neurospora* under simulated field conditions. *Fungal Genet. Biol.* 20: 99-102.

Pelham H. R., 1991. Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 585-591.

Pelham H. R. B., 2001. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* 3: 99-101.

Phelps P., Stark T. y Selitrennikoff C. P., 1990. Cell wall assembly of *Neurospora crassa*: Isolation and analysis of cell wall-less mutants. *Curr. Microbiol.* 21: 233-242.

Philip B. y Levin D. E., 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell Biol.* 21(1): 271-280.

Pickett J. A. y Edwardson J. M., 2006. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic.* 7(2): 109-116.

Prasher D., McCann R. O. y Cormier M. J., 1985. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126(3): 1259-1268.

Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G. y Cormier M. J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.

Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J., 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389(6646): 81-85.

Prevost, B., 1807. Memoir sur la cause immediate de la carie ou charbon des bles. Paris, traducido del francés por G.W. Keitt y publicado por la American Phytopathological Society como un "Clásico fitopatológico", No. 6, Menasha, Wis., 1939.

Prigent M., Dubois T., Raposo G., Derrien v., Tenza D., Rossé C., Camonis J. y Chavrier P., 2003. ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J. Cell Biol.* 163(5): 1111-1121.

Puhalla J. E. y Mayfield J. E., 1974. The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. *Genetics* 76: 411-422.

Punt P. J., Seiboth B., Weenink X. O., van Zeijl C., Lenders M., Konetschny C., Ram A. F., Montijn R., Kubicek C. P., van den Hondel C. A., 2001. Identification and characterization of a family of secretion-related small GTPase-encoding genes from the filamentous fungus *Aspergillus niger*: a putative SEC4 homologue is not essential for growth. *Mol. Microbiol.* 41(2): 513-525.

Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., y Ohya Y., 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 272: 279-281.

Ramírez-Cota R., Roberson R. W., Bartnicki-García S. y Mouriño-Pérez R. R., 2008. Localization of gamma-tubulin in *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en *Neurospora* at Asilomar 2008, Pacific Grove, EE UU.

Randazzo P. A., Inoue H. y Bharti S., 2007. Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol. Cell* 99: 583-600.

Rasmussen C. G. y Glass N. L., 2005. A Rho-type GTPase, *rho-4*, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 4(11): 1913-1925.

Rasmussen C. G. y Glass N. L., 2007. Localization of RHO-4 indicates differential regulation of conidial versus vegetative septation in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 6(7): 1097-1107.

Read N. R. y Roca M. G., 2006. Vegetative hyphal fusion in filamentous fungi. En: Baluska F., Volkmann D. y Barlow P. W. *Cell-Cell Channels*. Ed. Landes Bioscience. 97-98 pp.

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

Riquelme M., Freitag M., Sánchez-León-Hing E. F. y Bowman B., 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The 23rd Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, EEUU.

Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J. M., Sánchez-León E., Verdín-Ramos J. A., Beltrán-Aguilar A. y Freitag M., 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 6(10): 1853-1864.

Richmond J. E. y Broadie K. S., 2002. The synaptic vesicle cycle. exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 499-507.

Robinson M. S. y Bonifacino J. S., 2001. Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(4): 444-453.

Robinson N. G., Guo L., Imai J., Toh E. A., Matsui Y., Tamanoi F., 1999. Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol. Cell Biol.* 19: 3580-3587.

Román-Gavilanes A. I., 2008 Dinámica de la proteína MTB-3 en *Neurospora crassa*. Tesis de Licenciatura, UABC, México. 70 pp.

Romero-Cova S., 1993. Hongos Fitopatógenos. 1ª Reimpresión U.A.P. Dir. del Patronato Universitario, A.C. México. 347pp.

Roth D., Guo W. y Novick P., 1998. Dominant negative alleles of SEC10 reveal distinct domains involved in secretion and morphogenesis in yeast. *Mol. Biol. Cell* 9(7): 1725-1739.

Rothman J. E. y Warren G., 1994. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* 4: 220-233.

Sabatini B. L. y Regehr W. G., 1999. Timing of synaptic transmission. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 521-542.

Salaün C., James D. J. y Chamberlain L. H., 2004. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic.* 5(4): 255-264.

Salminen A. y Novick P., 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi complex event in yeast secretion. *Cell.* 49: 527-538.

Sánchez-León-Hing E. F., Riquelme M., Bartnicki-García S. y Freitag M., 2008. Live Imaging of chitin synthase 1 (CHS-1) traffic in growing cells of *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The *Neurospora* 2008 meeting at Asilomar, Pacific Grove, EEUU.

Santos B., Duran A. y Valdivieso M. H., 1997. CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17(5): 2485-2496.

Santos B. y Snyder M., 1997. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell Biol.* 136(1):95-110.

Santos B., Martín-Cuadrado A. B., Vázquez de Aldana C. R., del Rey F. y Pérez P., 2005. Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot. Cell.* 4(10): 1639-1645.

Sarkar S., Lyer G., Wu J. y Glass N. L., 2002. Nonsel self recognition is mediated by HET-C heterocomplex formation during vegetative incompatibility. *EMBO J.* 21(18): 4841-4850.

Saupe S. J., Kulliau G. A., Smith M. L. y Gixs N. L., 1996 The product of the het-c heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa* has characteristics of a glycine-rich cell wall protein. *Genetics* 143: 1589- 1600.

Saupe S. J. y Glass N. L., 1997. Allelic specificity at the het-c heterokaryon incompatibility locus of *Neurospora crassa* is determined by a highly variable domain. *Genetics* 146(4): 1299-1309.

Saupe S. J., Clavé C. y Bégueret J., 2000. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 608-612.

Schimoler-O'Rourke R., Renault S., Mo W. y Selitrennikoff C. P., 2003. *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr. Microbiol.* 46(6): 408-412.

Schmitz H. P., Kaufmann A., Köhli M., Laissue P. P. y Philippsen P., 2006. From function to shape: a novel role of a formin in morphogenesis of the fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell* 17: 130-145.

Schulze-Lefert P., 2004. Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4): 377-383.

Sciaky N., Presley J., Smith C., Zaal K. J., Cole N., Moreira J. E., Terasaki M., Siggia E. y Lippincott-Schwartz J., 1997. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.* 139(5): 1137-1155.

Seidl V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22: 36-42.

Sharpless K. E. y Harris S. D., 2002. Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol. Biol. Cell* 13(2): 469-479.

Shematek E. M., Braatz J. A. y Cabib E., 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3) glucan synthetase. *J. Biol. Chem.* 255(3): 888-894.

Shimomura O., Johnson F. H. y Saiga Y., 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59: 223-239.

Sivaram M. V. S., Furgason M. L. M, Brewer D. N. y Munson M., 2006. The structure of the exocyst subunit Sec6p defines a conserved architecture with diverse roles. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13: 555-556.

Söllner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. y Rothman J. E., 1993a. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362(6418): 318-324.

Söllner T., Bennett M. K., Whiteheart S. W., Scheller R. H. y Rothman J. E., 1993b. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75(3): 409-418.

Springer S., Spang A. y Schekman R., 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* 97(2): 145-148.

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

Stroupe C. y Brunger A. T., 2000. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304(4): 585-598.

Sugihara K., Asano S., Tanaka K., Iwamatsu A., Okawa K., Ohta Y., 2002. The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat. Cell. Biol.* 4: 73-78.

Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R. y Brunger A. T., 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395: 347-353.

Taheri-Talesh N., Horio T., Araujo-Bazán L., Dou X., Espeso E. A., Peñalva M. A., Osmani S. A., Oakley B. R., 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 19(4): 1439-1449.

Takano K., Toyooka K. y Suetsugu S., 2008. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 27: 2817-2828.

Takatsuki A. y Tamura G., 1985. Inhibitors affecting synthesis and intracellular translocation of glycoproteins as probes. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 30(6): 417-440.

Takeshita N., Yamashita S., Ohta A. y Horiuchi H., 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(5): 1380-1394.

Tamura G., Ando K., Suzuki S., Takatsuki A. y Arima K., 1968. Antiviral activity of brefeldin A and verrucarín A. *J. Antibiot.* 21(2): 160-161.

Tcheperegine S. E. , Gao X. D. y Bi E., 2005. Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol. Cell Biol.* 25(19): 8567-8580.

TerBush D. R. y Novick P., 1995. Sec6, Sec8 y Sec15 are components of a multisubunit complex wich localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130: 299-312.

TerBush D. R., Maurice T., Roth D. y Novick P., 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15: 6483-6494.

Trilla J. A., Cos T., Durán A. y Roncero C., 1997. Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast* 13(9): 795-807.

Trilla J. A., Durán A. y Roncero C., 1999. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145(6): 1153-1163. Erratum en: *J. Cell Biol.* 1999 146(1): 264.

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544

Uchida M. y Roberson R. W., 2006. Cryofixation and freeze substitution for ultrastructural studies of *Neurospora crassa* hyphae.
http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols/Cryofixation_NC.pdf (Julio de 2007).

Valdivia R. H., Baggott D., Chuang J. S. y Schekman R. W., 2002. The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell.* 2(3): 283-294.

Valdivia R. H. y Schekman R., 2003. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U .S. A.* 100(18):10287-10292.

Verdín-Ramos J., Bartnicki-García S. y Riquelme M., 2008. *In vivo* localization of *Neurospora crassa* GS-1, a protein involved in beta-(1,3)-glucan synthesis. Presentación de cartel en The *Neurospora* 2008 meeting at Asilomar, Pacific Grove California, EE UU.

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

Vogt N. y Seiler S., 2008. The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. Mol. Biol. Cell 19(11): 4554-4569.

Walch-Solimena C., Collins R. N. y Novick P. J., 1997. Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. J. Cell Biol. 137(7): 1495-1509.

Wang H., Tang X., Liu J., Trautmann S., Balasundaram D., McCollum D. y Balasubramanian MK. 2002. The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Biol. Cell. 13(2): 515-529.

Weber I., Assmann D., Thines E. y Steinberg G., 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.

Weimbs T., Low S. H., Chapin S., Mostov K. E., Bucher P. y Hofmann K., 1997. A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3046-3051.

Wendland J. y Philippsen P., 2002. An IQGAP-related protein, encoded by AgCYK1, is required for septation in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. Fungal Genet. Biol. 37(1): 81-88.

Wennerberg K., Rossman K. L. y Der C. J., 2005. The Ras superfamily at glance. J. Cell Sci. 118: 843-846.

Wessels J. G. H., 1993. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. New Phytol. 123: 397-413.

Woodbury D. J., Rognlien K., 2000. The t-SNARE syntaxin is sufficient for spontaneous fusion of synaptic vesicles to planar membranes. Cell Biol. Int. 24(11): 809-818.

Wösten H. A., Moukha S. M., Sietsma J. H. y Wessels J. G., 1991. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. J. Gen Microbiol. 137(8): 2017-2023.

Wu J. y Glass N. L., 2001. Identification of specificity determinants and generation of alleles with novel specificity at the het-c heterokaryon incompatibility locus of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1045-1057.

Xiang Q., Rasmussen C. y Glass N. L., 2002. The ham-2 locus, encoding a putative transmembrane protein, is required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Genetics* 160(1): 169-180.

Xu K. F., Shen X., Li H., Pacheco-Rodriguez G., Moss J. y Vaughan M., 2005. Interaction of BIG2, a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, with exocyst protein Exo70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(8): 2784-2789.

Yamashina S., Katsumata O., Tamaki H. y Takatsuki A., 1990. Morphological effects of brefeldin A on the intracellular transport of secretory materials in parotid acinar cells. *Cell Struct. Funct.* 15(1): 31-37.

Yamochi W., Tanaka K., Nonaka H., Maeda A., Musha T. y Takai Y., 1994. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 125(5): 1077-1093.

Yang F., Moss L.G. y Phillips G. N. Jr., 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14(10): 1246-1251.

Yang J., Tian B., Liang L., Zhang K. Q., 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *App. Microbiol. Biotechnol.* 75: 21-31.

Zhang X., Bi E., Novick P., Du L., Kozminski K., Lipschutz J. y Guo W., 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.* 276:46745-46750.

Zhang Y., *et al.*, 2005. New England Biololabs Inc. 2005-2006. Catalog and technical reference.

Zhao C., Jung U. S., Garrett-Engele P., Roe T., Cyert M. S. y Levin D. E., 1998. Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell Biol.* 18(2): 1013-1022.

Ziman M., Chuang J. S., Tsung M., Hamamoto S. y Schekman R., 1998. Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 9(6): 1565-1576.

Zuo X., Zhang J., Zhang Y., Hsu S. C., Zhou D. y Guo W., 2006. Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat. Cell Biol.* 8(12): 1383-1388.