

TESIS DEFENDIDA POR
Ana Isabel García Santiago
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García
Miembro del Comité

Dr. Axayacatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez

*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias en Orientación
en Microbiología.*

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales

Director de Estudios de Posgrado

2 de Marzo del 2010.

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA**

TITULO DE LA TESIS

**LA RAB GTPASA SEC-4 PARTICIPA EN LA MORFOGÉNESIS DE HIFAS DE
NEUROSPORA CRASSA.**

TESIS

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

Presenta:

ANA ISABEL GARCIA SANTIAGO

Ensenada, Baja California, México, Marzo del 2010.

RESUMEN de la tesis de Ana Isabel García Santiago, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California. Marzo del 2010.

LA RAB GTPASA SEC-4 PARTICIPA EN LA MORFOGENESIS DE HIFAS DE *NEUROSPORA CRASSA*.

Resumen aprobado por: _____
Dra. Meritxell Riquelme Pérez
(Directora de Tesis).

El ápice de las hifas de *Neurospora crassa* presenta una acumulación de vesículas secretoras que forman el Spitzenkörper (Spk), cuya función principal es dirigir el crecimiento. En levaduras, la fusión de las vesículas a la membrana plasmática en los sitios de crecimiento depende de la función de la Rab (por sus siglas en inglés *Ras-related protein in brain*) GTPasa Sec4p y su activador GEF (por sus siglas en inglés *Guanine nucleotide Exchange Factors*) Sec2p. La Sec4p es modificada postraduccionalmente por la unión covalente de isoprenoides a residuos de cisteína en la región carboxilo terminal (C-terminal), necesarios para su asociación con la membrana plasmática de la vesícula. Para que Sec4p pueda asociarse a las vesículas generadas en el Golgi necesita ser activada por Sec2p, el cual, induce a Sec4p a intercambiar GDP por GTP. Estudios mutagénicos de Sec4p y Sec2p en levaduras, demuestran que la ausencia de estas proteínas producen un fenotipo letal y causan una acumulación de vesículas en el citoplasma. Este estudio trata de entender el papel de SEC-4 y SEC-2 en la ruta secretora, y conocer los efectos provocados por la ausencia de estos genes en la morfogénesis de hifas y en la formación del Spk en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. El análisis mediante microscopía confocal de escaneo con láser de cepas expresando SEC-4 etiquetada con GFP en su extremo C-terminal, demostró que la región C-terminal posee dominios requeridos para su correcta localización. Contrariamente a lo observado en levaduras, en *N. crassa* la eliminación de *sec-4* (NCU01911.2) ó *sec-2* (NCU06404.2) no es letal. Sin embargo, la eliminación de *sec-2* ($\Delta sec-2$) no repercute en la morfología o la tasa de crecimiento de las hifas durante el crecimiento vegetativo. Por el contrario, la eliminación de *sec-4* (TGasa-1) tiene repercusiones desfavorables: 1) La tasa de crecimiento disminuye drásticamente ($3.0 \mu\text{m min}^{-1}$) comparada con la del control (FGSC# 9718; $23.0 \mu\text{m min}^{-1}$). 2) La morfología tubular de las hifas y el comportamiento del Spk son aberrantes. Observamos por microscopía de contraste de fases que *N. crassa* TGasa-1 presenta variaciones en el diámetro hifal, hifas helicoidales y un incremento en el número de septos y ramas. El Spk, presentó movimientos abruptos que originaron cambios repentinos de dirección del crecimiento que deformaron el ápice hifal; asimismo el Spk presentó un diámetro menor ($0.49\text{-}1.25 \mu\text{m}$) que el de la cepa control ($0.86\text{-}1.6 \mu\text{m}$). También observamos, la formación de septos cercanos al ápice ($10\text{-}20 \mu\text{m}$) en hifas dañadas, formación de ramas abortivas y una ramificación inusual. En la región distal observamos la acumulación de vacuolas y zonas constreñidas. 3) El ensamblaje del exocisto se ve impedido. El análisis por microscopía confocal de escaneo con láser de la progenie de las cruces de *N. crassa* TGasa-1 con dos componentes del exocisto SEC-5 y SEC-15, etiquetados con GFP, demostraron que SEC-4 es necesaria para el correcto ensamblaje del exocisto, ya que la ausencia de

SEC-4 deslocaliza la fluorescencia de SEC-5-GFP y SEC-15-GFP. Por lo anterior, proponemos que el papel de SEC-4 en *N. crassa* es el de favorecer el proceso de reconocimiento y fusión de vesículas a la membrana plasmática en colaboración con el exocisto para optimizar la exocitosis.

Palabras Clave: Spk, vesícula, SEC-4, SEC-2, *N. crassa*, morfogénesis.

ABSTRACT of the thesis presented by Ana Isabel García Santiago as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree con Orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California, México. Marzo 2010.

**THE Rab-GTPase SEC-4 HAS A ROLE IN HYPHAL MORPHOGENESIS OF
NEUROSPORA CRASSA.**

The apex of *Neurospora crassa* hyphae presents an accumulation of secretory vesicles that constitute the Spitzenkörper, whose main function is to direct growth. In yeast, vesicle fusion with the plasma membrane at sites of growth depends on the function of Rab (*Ras-related protein in brain*) GTPase Sec4p and its activator GEF Sec2p (*Guanine nucleotide Exchange Factors*). Sec4p is modified by covalent posttranslational addition of an isoprenoid group to cysteine residues in the carboxil terminal region (C-terminal), necessary for its association with vesicles. For Sec4p to associate with vesicles generated in Golgi, it needs to be activated by Sec2p. This induces Sec4p to exchange GDP for GTP. Mutagenesis studies of Sec4p in yeast demonstrated that the absence of this protein results in a lethal phenotype and causes an accumulation of vesicles in the cytoplasm. The aim of this study was to better understand the role of SEC-4 and SEC-2 in the secretory pathway and to identify the effects of deleting these genes on the morphology of hyphae in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Analyses by laser scanning confocal microscopy of strains expressing SEC-4 tagged with GFP at its C-terminal end showed that the C-terminal region has domains required for its proper localization. Contrary to what was observed in yeast, *N. crassa* with *sec-4* (NCU01911.2) or *sec-2* (NCU06404.2) deleted were both viable. However, the elimination of *sec-2* ($\Delta sec-2$) does not affect the morphology or growth rate of hyphae during its in vegetative growth. In contrast, the elimination of *sec-4* (TGasa-1) has adverse effects: 1) drastically reduced growth rate ($3.0 \mu\text{m min}^{-1}$) compared to that of the control (FGSC # 9718; $23.0 \mu\text{m min}^{-1}$); 2) The tubular morphology of hyphae and behavior of the Spk were aberrant. Phase-contrast microscopy of *N. crassa* TGasa-1 hyphae showed variations in hyphal diameter, hyphal coils and an increase in the number of septa and branches. The Spk presented abrupt movements that resulted in sudden changes in direction of growth and consequently in deformation of the hyphal apex; the Spk had a smaller diameter (± 0.49 - $1.25 \mu\text{m}$) than in the control strain (± 0.86 - $1.6 \mu\text{m}$). We also observed formation of septa near the apex (10-20 μm) in damaged hyphae, formation of abortive branches and an unusual branching pattern. In the distal parts of the hyphae accumulation of vacuoles and constricted areas were observed; 3) Exocyst assembly was impeded. Confocal microscopy analysis of progeny from crosses of *N. crassa* TGasa-1 with strains in which components of the exocyst complex SEC-5 and SEC-15 were tagged with GFP, demonstrated that SEC-4 is necessary for the proper assembly and localization of the exocyst, since the absence of SEC-4 resulted in mislocalized fluorescence of SEC-5-GFP and SEC-15-GFP. For these reasons, we propose that the role of SEC-4 in *N. crassa* is to participate in the process of recognition and fusion of vesicles with the plasma membrane in collaboration with the exocyst complex improving the efficiency exocytosis.

Keywords: Spk, vesicles, SEC-4, SEC-2, *N. crassa*, morphogenesis.

Dedicatorias

Dedico la presente tesis a mi hijo Abdiel Damián Hernández García, a mi esposo Marco Antonio Hernández Interiano, la Dra. Rosa Mouriño y a la Dra. Olga Callejas, por acompañarme en los momentos difíciles y enseñarme que siempre hay esperanza frente a los problemas.

Ofrezco este proyecto a mi familia y amistades las cuales me ayudaron con su apoyo incondicional a ampliar mis conocimientos, inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

Agradecimientos

Gracias a los intercambios y exposiciones de ideas con mis compañeros y amigos de estudios durante el proceso de la maestría.

Quiero agradecer a Dra. Meritxell Riquelme Pérez y a los miembros del comité por su apoyo y su tiempo empleado a ayudarme en este trabajo, sus palabras y sus consejos a como llevar de manera optima este trabajo me ayudaron mucho.

A mis Padres, Hermano y Hermana por creer y confiar siempre en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado en la vida.

Gracias a CONACYT, CICESE y el laboratorio de Microbiología por proveer los recursos económicos y equipo de trabajo que hicieron posible esta investigación.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Los hongos y el crecimiento apical	1
I.2. La ruta de secreción en los hongos	2
I.3. Propiedades de las Rab GTPasas	3
I.4. Modelo de función de las Rab GTPasas	5
II. ANTECEDENTES	6
II.1. Proteínas fluorescentes como herramienta de marcaje molecular de proteínas	6
II.2. Rab GTPasas	8
II.3. SEC-2 en la ruta secretora	12
II.4. SEC-4 en la ruta secretora	14
II.5. Efectos observados por la eliminación del gen <i>sec-4</i>	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPOTESIS	20
V. OBJETIVO GENERAL	21
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	21
VII. METODOLOGÍA	22
VII.1. Cepas y medios de cultivos	22
VII.2. Diseño de oligonucleótidos	23
VII.3. Análisis de los alineamientos de SEC-2 y SEC-4	23
VII.4. Extracción de ADN genómico de <i>N. crassa</i>	23
VII.5. Construcciones moleculares	24
VII.6. Diseño de protocolo para PCR de fusión	24
VII.7. Transformación de <i>N. crassa</i> y selección de transformantes	28
VII.8. Selección y comprobación de transformantes	29
VII.9. Microscopía y análisis de imágenes	29
VII.10. Obtención de cepas homocariontes	30
VII.11. Obtención de la Δ<i>sec-4</i> en <i>N. crassa</i>	30
VII.12. Caracterización de las cepas mutantes	31

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII.13. Cruzas de las cepas <i>N. crassa</i> mutantes con otras cepas de <i>N. crassa</i> que tenían las proteínas SEC-5 y SEC-15 marcadas con GFP.....	32
VII.14. Conservación de cepas a largo plazo.....	33
VIII. RESULTADOS.....	34
VIII.1. Análisis Bioinformático.....	34
V.III.2. Diseño de oligonucleótidos.....	39
VIII.3. Construcciones moleculares por PCR de fusión.....	40
V.III.4 Análisis de las transformantes SEC-2 y SEC-4 etiquetadas con proteínas fluorescentes.....	43
V.III.5. Análisis de las transformantes SEC-4-gly-GFP.....	45
V.III.6. Caracterización de las cepas mutantes.....	49
V.III.7. Corroboración de la eliminación de los genes <i>sec-2</i> y <i>sec-4</i>.....	51
V.III.8. Análisis de las tasas de crecimiento de las mutantes.....	53
V.III.9. Análisis de la morfología macroscópica de las mutantes.....	55
V.III.10. Análisis de la morfología micelial de las mutantes.....	61
V.III.11. Análisis de la morfología microscópica de las mutantes.....	64
V.III.12. Cruzas entre la <i>N. crassa</i> TGasa-1 con 2 componentes del exocisto SEC-5-GFP y SEC-15-GFP.....	70
IX. DISCUSIÓN.....	74
IX. 1. Comportamiento y función del Spk en la TGasa1.....	75
IX.2. Alteraciones en la formación de ramas y septos de <i>N. crassa</i>.....	76
IX.3. Exocisto y <i>N. crassa</i> TGasa-1.....	76
IX.4. Papel de SEC-2 y SEC-4 en la ruta secretora.....	78
X. CONCLUSIONES.....	81
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	82

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Modelo hifoide de la morfogénesis de hongos. Imagen extraída de Bartnicki-García <i>et al.</i> , 1989.	2
2	Comparación de las secuencias conservadas correspondientes a la región del dominio efector (Residuos 49-57 de Sec4p <i>Sacharomyces cerevisiae</i>) presente en las proteínas Ras de diferentes especies. Extraído de Haubruck <i>et al.</i> , 1990.	4
3	Modelo aceptado del ciclo de las proteínas Rab. Imagen extraída de Chavrier y Gould, 1999.	3
4	Estructura de la Rab GTPasa Sec4p en el complejo con el GEF Sec2p, a) Diagrama de listones. Sec4p de color gris y Sec2p de color púrpura/lila. Switches I (color añil) y II (color naranja) están etiquetados en el bucle P de Sec4p. b) Sec4p como un gusano de Ca en la superficie Sec2p. c) Residuos etiquetados de Sec4p a 4 °A de Sec2p. Residuos de contacto en Sec2p de color púrpura o lila, dependiendo del monómero Sec2p a la que pertenecen. d) Residuos etiquetados de Sec2p a 4 °A de Sec4p.; residuos contactados en la caja de Sec4p, los residuos en switches I y II en añil y en naranja respectivamente. Imagen extraída de Dong <i>et al.</i> , 2007.	9
5	Modelo de la ruta de secreción en levaduras. Imagen extraída de Sudbery y Court, 2007.	11
6	Microscopía confocal de fluorescencia de la localización de Sec2p-GFP en levaduras. Imagen extraída de Elkind <i>et al.</i> , 2000.	13
7	Microscopía confocal de fluorescencia de la localización de GFP-SEC4 en levaduras. Imagen extraída de Zajac <i>et al.</i> , 2005.	14
8	Microscopía confocal de células de <i>A. gossypii</i> . Mostrando la localización de AgSEC4-GFP. Barra 5 µm. Imagen extraída de Schmitz <i>et al.</i> , 2006.	16

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
9	Comparación de las cepas <i>A. niger</i> (N402) y <i>A. niger</i> Δ <i>srgA</i> (BS18), creciendo con glucosa como fuente de carbono a 30 °C, a y b) <i>A. niger</i> como control y <i>A. niger</i> Δ <i>srgA</i> , morfología colonial después de 4 días de crecimiento. c y d) <i>A. niger</i> como control y <i>A. niger</i> Δ <i>srgA</i> , observación bajo microscopio de las hifas aéreas de las colonias respectivas. Las cepas fueron crecidas por 2 días en placas cubiertas con celofán. Imagen extraída de Punt <i>et al.</i> , 2001.	19
10	Construcciones moleculares para etiquetar con proteínas fluorescentes, SEC-2 y SEC-4.	26
11	Diseño de la construcción molecular para utilizarse en la técnica de PCR (Polymerase chain reaction) de fusión.	26
12	Diseño de la construcción molecular para utilizarse en la técnica de PCR (Polymerase chain reaction) de fusión.	27
13	Diseño de la medición de la tasa de crecimiento de las <i>N. crassa</i> mutantes. Las líneas horizontales indican la marca de crecimiento en el horario establecido. <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> se marcó cada hora (hr) y <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-4</i> se marcó cada 12 hr. Las líneas verticales se marcaron al finalizar las mediciones para obtener 10 mediciones por cada horario de medición.	32
14	Esquema que muestra el procedimiento utilizado para la conservación de cepas a largo plazo en glicerol (10%).	33
15	Secuencia del marco de lectura abierto de <i>sec-2</i> (NCU01911.2).	36
16	Secuencia del marco de lectura abierto de <i>sec-4</i> (NCU06404.2).	36
17	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias correspondientes SEC-2 con el programa CLC Sequence Viewer 6.3. <i>A. niger</i> (XP_001394949.1), <i>A. flavus</i> (XP_002384173.1), <i>A. fumigatus</i> (XP_754963.1), <i>P. marneffeii</i> (XP_002152517.1), <i>Coccidioides posadasii</i> (XP_001246665.1), <i>N. crassa</i> (XP_965542.2), <i>S. pombe</i> (NP_593182.1), <i>S. cerevisiae</i> (NP_014127.1), <i>A. gossypii</i> (NP_986218.1), <i>C.albicans</i> (XP_002417848.1).	37

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
18	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias correspondientes SEC-4 con el programa CLC Sequence Viewer 6.3 donde se aprecia los dominios conservados. En el marco rojo se aprecia el dominio de prenilación de cisteínas presente en la Rab GTPasa SEC-4 (CC). En el marco negro se aprecia el dominio efector de SEC-4 (motivos conservados de unión a GTP). <i>A. fumigatus</i> (XP_746667.1), <i>A. nidulans</i> (XP_664578.1), <i>A. niger</i> (XP_001400630.1), <i>Magnaporthe grisea</i> (XP_369329.1), <i>N. crassa</i> (NCU06404.3), <i>S. pombe</i> (NP_594580.1), <i>A. gossypii</i> (NP_986645.1), <i>S. cerevisiae</i> (NP_116650.1), <i>S. cerevisiae</i> YPT1 (gi 836716).	38
19	Amplificación de los amplicones de <i>sec-2</i> correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión. a) <i>sec-2-orf-mchfp</i> (1010 pb). b) <i>sec-2-utr</i> (1033 pb). c) <i>sec-2-orf-gfp</i> (1037pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	40
20	Amplificación de los amplicones de <i>sec-4</i> correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión, a) <i>sec-4-orf-gfp</i> (983 pb). b) <i>sec-4-orf-mchfp</i> (977 pb). c) <i>sec-4-utr</i> (1087 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	40
21	Amplificación de la región proteína fluorescente-hph en la primera ronda de PCR de fusión. a) <i>mchfp-hph</i> (2309 pb). b) <i>gfp-hph</i> (2200 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	41
22	Amplificación de los amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) <i>sec-2-hph-utr</i> (2002 pb). b) <i>sec-2-orf-gfp-hph</i> (2735 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	41
23	Amplificación de los amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) <i>sec-2-orf-mchfp-hph</i> (2819 pb). b) <i>sec-4-orf-gfp-hph</i> (2681 pb). c) <i>sec-4-orf-mchfp-hph</i> (2765 pb). d) <i>sec-4-hph-utr</i> (2051 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	41

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
24	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con mChFP. Objetivo 100X. a) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-Ch-1; la fluorescencia se localiza en el citoplasma. b) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-Ch-2; la fluorescencia se localiza en parches a lo largo de la hifa. Barra 5 μ m.	43
25	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Cepa control <i>N. crassa</i> TJV1-1; expresión citoplasmática de la GFP (Verdín <i>et al.</i> , Dato sin publicar). b) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-G-1; la fluorescencia se localiza en el citoplasma a lo largo de toda la hifa. Barra 5 μ m.	43
26	Amplificación de los amplicones de SEC-4 correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión. a) <i>sec-4-orf-gfp</i> (1024 pb). b) <i>sec-4-utr</i> (956 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	45
27	Amplificación del amplicon <i>gly-gfp-hph</i> (2274 pb) en la primera ronda de PCR de fusión. Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	45
28	Fusión de amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) <i>sec-4-orf-gly-gfp-hph</i> (2397 pb). b) <i>sec-4-hph-utr</i> (2141 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.	45
29	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1; patrón de fluorescencia en diferentes hifas; la fluorescencia se localiza en las regiones subapicales. b) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en la región subapical. a) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en puntos en la región distal. Barra 5 μ m.	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
30	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1 marcaje con FM4-64; la fluorescencia se localiza en la región apical y subapical. b) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en la región subapical con una distribución citoplasmática. c) Transformante <i>N. crassa</i> TSec-4-gly-G-1 observación bajo microscopía de contraste de fases; se observó que una pequeña parte del Spk corresponde al área sin fluorescencia observada en b, d) Transformante <i>N. crassa</i> Tsec-4-gly-G-1 superposición de a y b; se observó que no hay colocalización de los marcajes de FM4-64 y GFP. Barra 5 μ m.	47
31	Colonias de las transformantes TGasa en medio de recuperación incubadas por 3 días a 30 °C.	48
32	Colonias en placas Petri con MMV incubadas por 72 hr a 25 °C. a) <i>N. crassa</i> como control. b-k) Transformantes <i>N. crassa</i> TGasa.	49
33	Colonias en placas Petri con MMV incubadas por 72 hr a 30 °C. a) <i>N. crassa</i> como control. b-k) Transformantes <i>N. crassa</i> TGasa.	49
34	ADN genómico de a) <i>N. crassa</i> Δ sec-2 b) <i>N. crassa</i> TGasa-1, c) <i>N. crassa</i> TGasa-2. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.	50
35	Cultivos de micelio de las mutantes Δ sec-4 en MMV líquido en condiciones de oscuridad por 7 días a 30 °C. a) <i>N. crassa</i> como control, el micelio es una masa continua. b y c) <i>N. crassa</i> TGasa-1 y <i>N. crassa</i> TGasa-2, respectivamente. Se observó en c y d que el micelio está fragmentado.	50

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
36	Corroboración de la eliminación del gen <i>sec-2</i> (1929 pb) por PCR. a) control: oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-2</i> usando ADN genómico de <i>N. crassa</i> como templado. b) control: oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-4</i> (1065 pb) usando ADN de <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> como templado. c) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-2</i> usando ADN genómico de <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> como templado. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.	51
37	Corroboración de la eliminación del gen <i>sec-4</i> (1065 pb) por PCR. a) control: oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-4</i> usando ADN genómico de <i>N. crassa</i> como templado. b) control: oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-2</i> (1929 pb) usando ADN de <i>N. crassa</i> TGasa-1 como templado. c) control: oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-2</i> (1929 pb) usando ADN de <i>N. crassa</i> TGasa-2 como templado. d) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-4</i> usando ADN genómico de <i>N. crassa</i> TGasa-1 como templado. e) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para <i>sec-4</i> usando ADN genómico de <i>N. crassa</i> TGasa-2 como templado. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.	51
38	Análisis del crecimiento de de <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> . a) Medición del crecimiento. b) Medición de la tasa de crecimiento.	53
39	Análisis del crecimiento de de <i>N. crassa</i> TGasa-1. a) Medición del crecimiento. b) Medición de la tasa de crecimiento..	53
40	Morfología de la colonia de <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> incubada a 30 °C. a, c, d) cepa control de <i>N. crassa</i> N1 (FGSC# 9718) a las 12, 24 y 48 hrs respectivamente. b, d y f) <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> a las 12, 24 y 48 hrs respectivamente.	57
41	Comparación de la morfología de la colonia de <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> a las 26 hr de crecimiento. a, c) <i>N. crassa</i> (FGSC# 9718) como control incubada a 25 °C y 30 °C. b, d) <i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i> incubada a 25 °C y 30 °C.	58

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
42	Comparación de la morfología de las colonias de <i>N. crassa</i> TGasa a diferentes temperaturas a las 26 horas de crecimiento. a y d) <i>N. crassa</i> (FGSC# 9718) como control incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente. b, e) <i>N. crassa</i> TGasa-1 incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente. c, f) <i>N. crassa</i> TGasa-2 incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente.	59
43	Observación de la morfología de las colonias de <i>N. crassa</i> TGasa a, d, g) <i>N. crassa</i> (FGSC# 9718) como control a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente. b, e, h) <i>N. crassa</i> TGasa-1 a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente. c, f, i) <i>N. crassa</i> TGasa-2 a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente.	60
44	Microscopía de bajo aumento. a, c) <i>N. crassa</i> como control; objetivo 20X y barra 1000 µm; objetivo 40X y barra 100 µm, respectivamente. b) <i>N. crassa</i> $\Delta sec-2$; objetivo 20X y barra 1000 µm; objetivo 40X y barra 100 µm, respectivamente.	61
45	Microscopía de bajo aumento. a, c y e) <i>N. crassa</i> como control; objetivo 7X y barra 1000 µm; objetivo 25X y barra 500 µm; objetivo 90X y barra 100 µm, respectivamente. b, d, f) <i>N. crassa</i> TGasa-1; objetivo 7X y barra 1000 µm; objetivo 25X y barra 500 µm; objetivo 90X y barra 100 µm, respectivamente.	62
46	Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> como control, b, c) <i>N. crassa</i> $\Delta sec-2$. Barra 5 µm.	64
47	Observación mediante microscopía de contraste de fases de la tasa de crecimiento hifal durante el crecimiento vegetativo. Objetivo a 100X. a) <i>N. crassa</i> como control. b) <i>N. crassa</i> $\Delta sec-2$ nótese que la elongación de la hifa en el tiempo es muy similar al control. Barra 5 µm.	65
48	Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> como control, b) <i>N. crassa</i> TGasa-1 hifas con regiones de grosor variable, c) <i>N. crassa</i> TGasa-2 hifas elicoidales, constricciones. Barra 5 µm.	67

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
49	Marcaje con FM4-64. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> como control, b) <i>N. crassa</i> TGasa-1 ramificación inusual c y d) <i>N. crassa</i> TGasa-1 formación de septos continuos e) <i>N. crassa</i> TGasa-1 formación de septos muy cercanos al ápice. Barra 5 μ m.	68
50	Observación mediante microscopía de contraste de fases de la tasa de crecimiento hifal durante el crecimiento vegetativo. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> como control. d) <i>N. crassa</i> TGasa-1. Nótese que el tiempo de elongación de la hifa es mucho mayor que para la cepa silvestre y que las variaciones en el diámetro de la hifa afecta la morfología tubular de hifas. Barra 5 μ m.	69
51	Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> TGasa-1 se observa los movimientos bruscos del Spk durante el crecimiento que dan lugar a una hifa amorfa. La flecha señala el Spk, el cual, presentó un menor tamaño que el control. Barra 5 μ m.	69
52	Microscopía de bajo aumento. Objetivo 40X. a) control: peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas <i>ATPase nca-2</i> con <i>N623</i> . b y c) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas <i>N623</i> con <i>N. crassa Δsec-2</i> a los 25 días de crecimiento. Nótese la prolongación del cuello del peritecio. Barra 100 μ m.	71
53	Microscopía de bajo aumento. Objetivo 40X. a) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas <i>ATPase nca-2</i> con <i>N623</i> como control. b) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas <i>N150</i> con TGasa-1. c) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas <i>sec-5-gfp</i> con TGasa-1. d) Peritecios obtenidos entre cruzas de las cepas <i>sec-15-gfp</i> con TGasa-1. A los 25 días de crecimiento. Barra 100 μ m.	71
54	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser. Objetivo 100X. a) <i>N. crassa</i> SEC-5 componente del exocisto marcado con GFP, la fluorescencia se localiza en la región apical de la membrana plasmática. b) <i>N. crassa</i> TGasa-5 la fluorescencia no se acumula en la membrana plasmática; la fluorescencia está dispersa en parches a lo largo de la hifa. Barra 5 μ m.	72

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
55	Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser. Objetivo 100X. a, b) <i>N. crassa</i> SEC-15 componente del exocisto marcado con GFP, la fluorescencia se localiza en la región apical de la membrana plasmática y en la región central del septo. c, d) <i>N. crassa</i> TGasa-4 la fluorescencia no se acumula en la membrana plasmática; la fluorescencia está dispersa en puntos a lo largo de la hifa. Barra 5 μm .	73

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Propiedades de selección de las proteínas fluorescentes (Wei, 2005).	7
II	Cepas de <i>N. crassa</i> usadas en este estudio.	22
III	Tabla III. Niveles de similitud nucleotídica (% identidad) de las secuencias de <i>N. crassa</i> con los homólogos de las proteínas de estudio en otras especies de hongos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).	39
IV	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos.	39
V	Comparación del diámetro (μm) del Spk de <i>N. crassa</i> wt (9718) con las cepas mutantes.	65
VI	Cruzas realizadas en este trabajo.	70
V11	Caracteres a considerar en la selección de la progenie proveniente de las cruzas.	70

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Los hongos y el crecimiento apical

Los hongos filamentosos se caracterizan por tener un crecimiento altamente polarizado y de tipo apical. La extensión se restringe a una pequeña área de la punta de la hifa y requiere de la biosíntesis y transporte de material a través de un mecanismo de secreción que involucra el movimiento ordenado de vesículas desde las regiones más distales de la hifa hasta el ápice (Davis, 2000).

Estudios basados en microscopía electrónica de transmisión revelan que hay vesículas de dos tamaños: vesículas pequeñas entre 20 y 80 nm, entre las cuales se encuentran los quitosomas, los cuales contienen una forma inactiva de la enzima quitina sintetasa y vesículas grandes de 80 a 200 nm, las cuales corresponden a vesículas secretoras (Bartnicki-García, 2002).

El ápice de la hifa está más o menos desprovisto de la mayoría de organelos celulares y se ha observado que presenta un gran número de vesículas citoplasmáticas que se agrupan formando un pequeño cuerpo refringente que se tiñe densamente con hematoxilina de hierro, denominado Spitzenkörper (del alemán Spitzen= punta + körper= cuerpo) y desde allí migran a la superficie celular (Girbardt, 1957). El Spitzenkörper (Spk) es un complejo multivesicular que por su posición, composición y comportamiento se piensa que funciona como un centro suministrador de vesículas (VSC) para la elongación de la hifa (Bartnicki-García *et al.*, 1989). El desplazamiento linear del Spk crea un fuerte gradiente de exocitosis responsable de la morfogénesis y dirección del crecimiento en la hifa fúngica (Figura 1) (Bartnicki-García *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1998; Riquelme *et al.*, 2000).

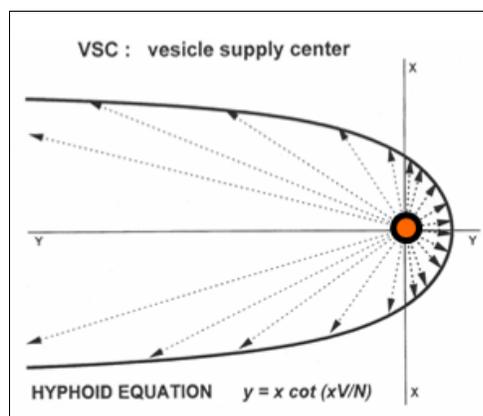


Figura 1. Modelo hifoide de la morfogénesis de hongos. Imagen extraída de Bartnicki-García *et al.*, 1989.

I.2. La ruta de secreción en los hongos

En la ruta biosintética secretora, las proteínas son transportadas desde el retículo endoplasmático hacia el complejo de Golgi en unas estructuras esféricas membranales conocidas como vesículas de secreción, a la espera de que aparezca la señal de disparo de transporte o de secreción. De tal forma, que el transporte de proteínas por medio del sistema endomembranal está determinado por una coordinación de eventos de gemación y fusión de vesículas con la membrana del compartimento receptor (Lodish *et al.*, 1999). La formación de vesículas es un proceso que está altamente regulado y requiere de otras moléculas que controlan la localización así como el transporte de estas vesículas en la célula. Por ello, la ruta secretora necesita de la interacción de una serie de complejos multiproteicos, tales como las proteínas Rab (por sus siglas en inglés Ras-Related Protein in Brain) y de receptores complementarios SNAREs (por sus siglas en inglés N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptors). Las proteínas Rab actúan como dominios organizadores de vesículas regulando múltiples pasos en el tráfico vesicular, desde la formación de la vesícula del compartimento donador hasta su fusión con el compartimento blanco (Grosshans *et al.*, 2006). Además, es importante mencionar que las proteínas Rab reclutan efectores para proporcionar especificidad a la vesícula al momento de su reconocimiento, pero a su vez estos efectores también contribuyen a la localización de la proteína Rab (Tuvim *et al.*, 2001).

El crecimiento de la hifa es mantenido por el flujo continuo de vesículas secretoras destinadas a fusionarse con la membrana plasmática. La fusión de las vesículas con la membrana en el ápice de la hifa libera la maquinaria biosintética para el ensamblaje de la pared y también adiciona nueva membrana a la hifa en crecimiento (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Markgraf *et al.*, 2007; Sudbery y Court, 2007). La punta de la hifa es el sitio de mayor adición de membrana y de síntesis de la pared celular, por lo que se podría esperar que allí ocurriera una gran secreción de proteínas así como enzimas extracelulares (Walworth *et al.*, 1992).

I.3. Propiedades de las Rab GTPasas

Las Rab GTPasas son integrantes de la superfamilia de proteínas Ras, la cual engloba a 5 familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. Los miembros de la familia Ras participan en el control de la proliferación celular. Los integrantes de la familia Rho GTPasas participan en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. Los componentes de la familia Arf; regulan el transporte de vesículas entre los distintos compartimentos en el tráfico intracelular, y finalmente los miembros de la familia Ran están involucrados en el transporte entre núcleo y el citoplasma (Lundquist, 2006).

Las Rab constituyen la familia más grande de las pequeñas GTPasas. Se localizan en la cara citoplasmática de diferentes compartimentos y contribuyen a determinar la dirección del transporte y fusión de vesículas. Las Rab son proteínas monoméricas que poseen dominios conservados asociados con el tráfico de vesículas secretoras y cada una de éstas presenta una distribución característica en las membranas celulares (Tuvim *et al.*, 2001). La mayoría de estas proteínas están asociadas a la membrana a través de dos grupos geranil en, o cerca de su región C-terminal. Los cambios conformacionales de las formas Rab unida a GDP (difosfatos de guanósina) a Rab unida a GTP (trifosfatos de guanósina) determinan sus interacciones con otras moléculas. Sólo las Rabs unidas a GTP están asociadas a membranas (Novick y Zerial, 1997). Estas proteínas Rab se anclan a las membranas cuando son activadas por GEF (por sus siglas en inglés Guanine nucleotide Exchange Factors) que promueven su unión a GTP (Grosshans *et al.*, 2006).

Análisis de modelos computacionales de la organización estructural de las proteínas Rab, así como de estas proteínas cristalizadas por métodos bioquímicos demuestran que la región carboxilo terminal (C-terminal) es muy variable (Ali *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2007).

Al igual que otras proteínas Ras, las Rab GTPasas son modificadas postraduccionalmente por la unión covalente de isoprenoides a residuos de cisteína en el extremo carboxilo. La asociación de la Rab GTPasa con la membrana diana requiere de la prenilación de uno o más residuos de cisteína en la región carboxilo terminal (C-terminal) presentes en un motivo conservado (CXXX, CC, CXC, CCXX ó CCXXX, donde X es cualquier aminoácido) (Stenmark *et al.*, 2001). Asimismo, en el C-terminal se han identificado motivos conservados de unión a GTP llamados dominios efectores que intervienen en la especificidad de las Rab (Figura 2) (Haubruck *et al.*, 1990).

Human	H-ras	30	DEYDPTIEDSYR
<i>S. cerev.</i>	Ras1	37	DGYDPTIEDSYR
<i>S. cerev.</i>	Ras2	37	DEYDPTIEDSYR
<i>S. pombe</i>	ras1	35	DEYDPTIEDSYR
<i>Dict. disc.</i>	ras1	30	DEYDPTIEDSYR
Mouse	ypt1	38	ESYISTIGVDFK
<i>S. cerev.</i>	Ypt1	35	NDYISTIGVDFK
<i>S. pombe</i>	ypt1	38	ESYISTIGVDFK
<i>S. pombe</i>	ypt2	36	PSFITTTIGIDFK
<i>S. cerev.</i>	Sec4	47	PSFITTTIGIDFK
<i>Dict. disc.</i>	sas1	42	PSFITTTIGIDFK
<i>Dict. disc.</i>	sas2	42	PSFIATIGIDFK
<i>S. pombe</i>	ryh1	38	NTYQATIGIDFL
Human	rab6	40	NTYQATIGIDFL
Human	rab3A	49	PAFVSTVGVDFK
Human	rab2	33	PVHDLTIGVEFG
Human	rab4	35	DDSNHTIGVEFG
Human	rhoA	32	EYVPTVFNYYV
Human	rhoB	32	EYVPTVFNYYV
Human	rhoC	32	EYVPTVFNYYI
<i>Aplysia</i>	rho	32	EYVPTVFNYYV
<i>S. cerev.</i>	Rho1	37	EYVPTVFNYYV
<i>S. cerev.</i>	Rho2	34	EQYHPTVFNYYV

Figura 2. Comparación de las secuencias conservadas correspondientes a la región del dominio efector (Residuos 49-57 de Sec4p *Sacharomyces cerevisiae*) presente en las proteínas Ras de diferentes especies. Extraído de Haubruck *et al.*, 1990.

I.4 Modelo de función de las Rab GTPasas

El ciclo de las Rab básicamente propone, que estas proteínas se unen a la vesícula de transporte a nivel del compartimento donador; la vesícula de transporte lleva sobre su superficie a las Rab hasta llegar al compartimento blanco ó aceptor de la vesícula donde se fusiona y libera su contenido. Al fusionarse la vesícula, la proteína Rab es liberada para su reciclaje hasta el compartimento donador por medio de un intermediario citosólico. Las proteínas Rab son mantenidas en el citosol en su forma inactiva, unida a GDP, por la acción de las GDI (Inhibidor de la Disociación de GDP) proteínas que además tienen la habilidad de extraer de la membrana a las Rab-GDP. El proceso de unión de las Rab-GDP citosólicas a la membrana del compartimento donador está facilitado por proteínas GDF (por sus siglas en inglés Displacement Factor). Posteriormente los GEF catalizan el intercambio de GDP por GTP y finalmente, las proteínas GAPs (GAPs por sus siglas en inglés GTPase Activating Proteins) facilitan la conversión de Rab-GTP en Rab-GDP (Chavrier y Gould, 1999) (Figura 3).

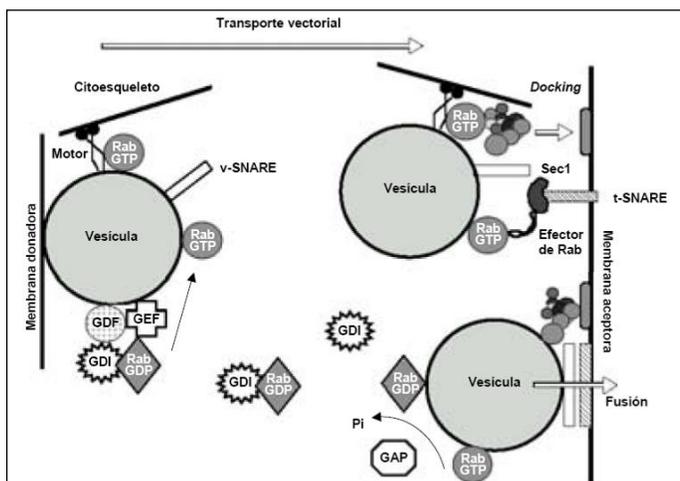


Figura 3. Modelo aceptado del ciclo de las proteínas Rab. Imagen extraída de Chavrier y Gould, 1999.

Actualmente se desconoce si las proteínas Sec4p y Sec2p descritas en la ruta de secreción en levaduras, desempeñan una función similar en hongos filamentosos. Por ello, estamos interesados en analizar la función de los homólogos de estas proteínas SEC-4 y SEC-2 en *Neurospora crassa*. En este estudio analizamos la localización de estas proteínas al añadirles marcadores fluorescentes, y observamos los efectos en la morfología y el crecimiento de hifas al eliminar los genes que codifican para éstas proteínas del genoma de *N. crassa*.

II. ANTECEDENTES

II.1. Proteínas fluorescentes como herramienta de marcaje molecular de proteínas

Para llevar a cabo el seguimiento de proteínas específicas en la célula una estrategia desarrollada en los últimos años en biología molecular, consiste en unir secuencias de ADN correspondientes a proteínas de interés a las secuencias de ADN codificantes de proteínas fluorescentes (FPs, fluorescent proteins). Las FPs generan fluorescencia al ser sintetizadas por un sinnúmero de tipos celulares y pueden estudiarse en células vivas sin necesidad de fijación y tinción, mediante microscopía de fluorescencia (Fernández-Vaquero *et al.*, 2005).

Las FPs tales como la proteína fluorescente verde ó GFP (por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) y la roja RFP (por sus siglas en inglés *Red Fluorescent Protein*) han demostrado ser herramientas poderosas para la observación *in vivo* de la dinámica de diferentes proteínas y organelos celulares (Fernández-Vaquero *et al.*, 2005). A partir de la forma silvestre de GFP de la medusa *Aequorea victoria* y más recientemente de otras proteínas similares, se han obtenido numerosas variantes mediante mutagénesis, con el objetivo de mejorar sus propiedades ópticas y generar diversos colores. La GFP es una proteína de 238 aminoácidos que absorbe luz a 395 nm y emite fluorescencia verde a 508 nm (Tsien, 1998). La fluorescencia es una propiedad que tienen algunas sustancias que consiste en emitir una luz de color o frecuencia diferente a la que absorben. Es un fenómeno físico por el cual una sustancia emite radiación visible como resultado de su excitación por una longitud de onda específica (Tabla 1). En el proceso de bioluminiscencia de *A. victoria* la aequorina es un complejo formado por una apoproteína de 21.4 KD, oxígeno molecular y una celenterazina (compuesto de imidazol de peso molecular 423). Cuando la aequorina es activada por Ca^{+2} , este cataliza la oxidación de la celenterazina dando lugar a una celenteramida, la cual se encuentra en su estado excitado. La celenteramida retorna a un estado basal emitiendo luz a 470 nm, es decir, la luz azul generada por la aequorina purificada. *In vivo* la transferencia de energía ocurre del estado excitado de la celenteramina a la GFP, la cual, es responsable de la fluorescencia verde (Hernández, 2001; Wei, 2005).

Los marcajes con proteínas fluorescentes permiten obtener datos sobre la localización, dinámica y redes de interacción molecular de numerosas proteínas con una gran resolución temporal y espacial. Por ello, han sido utilizadas como una herramienta de estudio en la ubicación intracelular específica de las proteínas Rab para localizar una etapa única de la exocitosis o endocitosis en el transporte polarizado de las vesículas (Walworth *et al.*, 1992; Schimmöller *et al.*, 1998).

Tabla 1. Propiedades de selección de las proteínas fluorescentes (Wei, 2005).

Proteína fluorescente	Pico de Excitación (nm)	Pico de Emisión (nm)	Coefficiente extinción ($M^{-1}cm^{-1}$)	Fluorescencia Producida (Quantum)	Referencia
EBFP	383	445	31,000	0.25	Patterson <i>et al.</i> , 2001
ECFP	434	477	26,000	0.40	Patterson <i>et al.</i> , 2001
Cerulean CFP	433	475	43,000	0.62	Rizzo <i>et al.</i> , 2004
EGFP	489	508	55,000	0.60	Patterson <i>et al.</i> , 2001
EYFP	514	527	84,000	0.61	Patterson <i>et al.</i> , 2001
Venus YFP	515	528	92,200	0.57	Nagai <i>et al.</i> , 2002
Citrine YFP	516	529	77,000	0.76	Griesbeck <i>et al.</i> , 2001
DsRed	558	583	75,000	0.79	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mRFP1	584	607	50,000	0.25	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mHoneydew	487/504	537/562	17,000	0.12	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mBanana	540	553	6,000	0.70	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mOrange	548	562	71,000	0.69	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mTangerine	568	585	38,000	0.30	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	Shaner <i>et al.</i> , 2004
mCherry	587	610	72,000	0.22	Shaner <i>et al.</i> , 2004

II.2. Rab GTPasas

Las Rab GTPasas participan en el movimiento vectorial de vesículas secretoras del complejo de Golgi a los sitios polarizados de crecimiento (Deneka *et al.*, 2003). Actualmente se han identificado numerosas Rab GTPasas que juegan una variedad de funciones en diferentes procesos celulares y están presentes en diversos eucariotas, entre ellos *S. cerevisiae* (11 miembros), *Caenorhabditis elegans* (29 miembros), *Drosophila melanogaster* (26 miembros) y *Homo sapiens sapiens* (60 miembros) (Stenmark y Olkkonen, 2001).

La especificidad de localización de la Rab está dada por la estructura única de cada miembro de la familia. Las Rab GTPasas oscilan entre las membranas y el citosol. Se ha descrito su función en un ciclo: en su estado unido a GDP son inactivas y se encuentran en el citosol y en su estado unido a GTP son activas y se encuentran unidas a la membrana de un organelo o de una vesícula (Walch-Solimena *et al.*, 1997).

Las proteínas Rab de levaduras se conocen como Ypts (por sus siglas en inglés yeast protein transport). Las primeras proteínas Rab fueron identificadas en levaduras como genes (*SEC4* y *YPT1*) involucrados en la ruta de secreción en 1980. No obstante, fue hasta 1987 que se dió a conocer que *SEC4* codificaba para una proteína Rab GTPasa (Novick *et al.*, 1980).

En las levaduras durante el tráfico vesicular del Golgi a la membrana plasmática, Sec2p y Sec4p son encontradas en asociación con vesículas secretoras y localizadas en sitios de secreción polarizada (Walch-Solimena *et al.*, 1997). Sec4p es una proteína implicada en el direccionamiento y la regulación del anclaje inicial de la vesícula a la membrana diana. Sec4p es activada por el GEF Sec2p al promover el intercambio de GDP (estado inactivo) a GTP (estado activo) (Walch-Solimena *et al.*, 1997; Deneka *et al.*, 2003).

El ciclo de las GTPasas está controlado por las GAPs y los GEFs. Las GTPasas activadoras de proteínas GAPs que estimulan la actividad GTPasa, promoviendo la conversión de GTP a GDP (Ortiz *et al.*, 2002; Tuvim *et al.*, 2001; Ali y Seabra, 2005).

Los GEFs son proteínas periféricas reclutadas en el citosol que tienen una localización exclusiva dentro de la célula y estimulan la actividad intercambiadora de nucleótidos de la GTPasa, promoviendo la conversión de GDP por GTP (Ali y Reabra, 2005; Markgraf *et al.*, 2007).

Recientemente se ha dado a conocer la estructura cristalina del complejo Sec4p-Sec2p presente en levaduras, el cual, consiste de 2 dominios monoméricos, uno de Sec4p y otro de Sec2p dimerizados en paralelo (Figura 4) (Dong *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007).

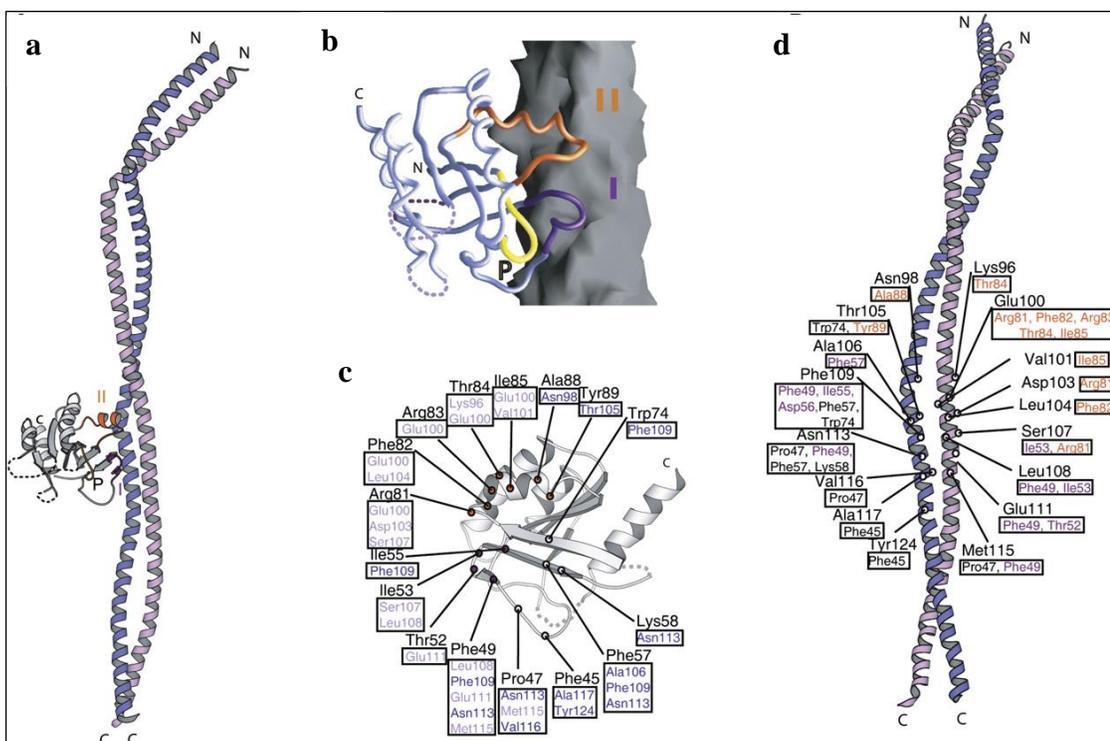


Figura 4. Estructura de la Rab GTPasa Sec4p en el complejo con el GEF Sec2p, a) Diagrama de listones. Sec4p de color gris y Sec2p de color púrpura/lila. Switches I (color añil) y II (color naranja) están etiquetados en el bucle P de Sec4p. b) Sec4p como un gusano de Ca en la superficie Sec2p. c) Residuos etiquetados de Sec4p a 4 °Å de Sec2p. Residuos de contacto en Sec2p de color púrpura o lila, dependiendo del monómero Sec2p a la que pertenecen. d) Residuos etiquetados de Sec2p a 4 °Å de Sec4p; residuos contactados en la caja de Sec4p, los residuos en switches I y II en añil y en naranja respectivamente. Imagen extraída de Dong *et al.*, 2007.

La transmisión de una señal Rab específica requiere del reconocimiento de un efector específico; un efector por definición es aquel que reconoce la conformación GTP de una Rab GTPasa. Los efectores de las Rabs son altamente divergentes (Grosshans *et al.*, 2006).

El exocisto fue el primer complejo de fusión identificado como un efector de la Rab GTPasa Sec4p. El exocisto es un complejo octamérico evolutivamente conservado (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p y Exo84p) implicado en el acercamiento de vesículas secretoras a los sitios específicos de exocitosis (Novick *et al.*, 1980). Estudios de coinmunoprecipitación en levaduras demuestran la relación de Sec4p con 2 proteínas del exocisto: Sec15p y Sec8p (Guo *et al.*, 1999; Toikkanen *et al.*, 2003). Estudios más recientes en levaduras utilizando coinmunoprecipitación identificaron otro efector de Sec4p, un miembro identificado como supresor de tumor que está implicado en la polaridad celular de células epiteliales, Sro7p (Grosshans *et al.*, 2006).

Wiederkehr y colaboradores en el 2004, propusieron que el exocisto funciona como un complejo de ensamble de vesículas que arriban a sitios de exocitosis, y que establece una conexión inicial entre vesículas secretoras y la membrana plasmática, donde Sec4p regula la unión de estas vesículas (en inglés tether). En mutantes de levaduras $\Delta Sec5$ y $\Delta Exo70$, Sec4p y Sec1p (v-SNARE) resultan ser eficientes supresores por lo que se especula que Sec5p y Exo70p poseen una función de bypass en el acarreo de vesículas fuera del exocisto cuando la secreción es estimulada por la sobreproducción de Sec1p ó Sec4p (Wiederkehr *et al.*, 2004). Sin embargo, la localización de Sec1p es afectada por la ausencia de Sec4p (Carr *et al.*, 1999).

Es importante destacar que se utiliza a los hongos como un sistema modelo para estudiar las funciones celulares eucariotas. Se ha encontrado que la mayoría de Rab GTPasas de levadura tienen uno o más homólogos en mamíferos y e funcionalmente una Rab de mamífero puede sustituir su homólogo en los hongos, lo que demuestra la conservación de las funciones de las proteínas Rab en los eucariotas (Stenmark y Olkkonen, 2001).

En los modelos de la vía secretora de levaduras (Figura 5) se asume que el acoplamiento de la vesícula a la membrana diana podría ser mediado directamente por la interacción de las Rab GTPasa sobre la superficie de la vesícula con otros efectores (Brennwald, 2000).

El modelo de secreción descrito actualmente en levaduras, inicia con la activación de la Rab GTPasa Ypt31p. Esta proteína participa en la liberación de vesículas formadas en el Golgi y permanece unida a la vesícula para reclutar a el GEF Sec2p, el cual, se asocia a la Sec4p y la induce a pasar a un estado activo al promover el intercambio de GDP por GTP. La unión a GTP altera la conformación de la Sec4p, exponiendo su grupo lipídico para su anclaje con la membrana de la vesícula. Sec4p en su forma activa permanece unida a la superficie de la vesícula y utiliza los cables de actina para el transporte de la vesícula a su destino de fusión. Para que la vesícula pueda fusionarse a la membrana plasmática, el complejo vesícula-Sec4p-GTP se une a la subunidad Sec15p del complejo exocisto (Ali y Seabra, 2005). También, Los receptores de apareamiento Snc1 (v-SNARE) con Sec9p (t-SNARE) contribuyen al anclaje de la vesícula a la membrana plasmática. Después de la fusión de la vesícula con la membrana diana, la Rab Sec4p unida a GTP es liberada del compartimento aceptor al sufrir un cambio conformacional en su estructura lo que provoca la hidrólisis de un enlace fosfodiéster del GTP. La Sec4p unida a GDP permanece en el citosol unida a un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) que impide que Rab pueda liberar el GDP (Schimmöller *et al.*, 1998; Grosshans *et al.*, 2006; Markgraf *et al.*, 2007). Para que la Sec4p pueda ser reutilizada en una nueva ronda de transporte necesita ser estimulada por el supresor Dss4p (por sus siglas en inglés Dominant suppressor of Sec4p) que promueve la disociación de su GDP (Moya *et al.*, 1993).

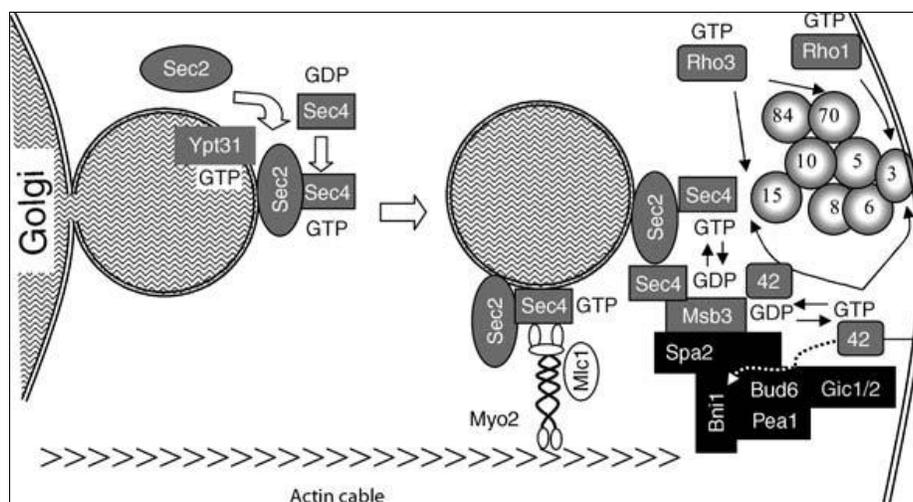


Figura 5. Modelo de la ruta de secreción en levaduras. Imagen extraída de Sudbery y Court, 2007.

II.3. SEC-2 en la ruta secretora

El gen *SEC2* en levaduras es epistático a otros genes tardíos *SEC* y posee un rol en la liberación de vesículas polarizadas al ser considerada como un GEF. La secuencia de *SEC2* codifica una proteína de 759 aminoácidos (Walch-Solimena *et al.*, 1997). Sec2p es una proteína hidrofílica con una masa molecular de 83.49 KD (Sato *et al.*, 2007). Sec2p se sintetiza como proteína soluble en el citosol y se asocia rápidamente a la superficie de vesículas secretoras (Walworth *et al.*, 1989). Sec2p se considera el GEF activador de la Rab GTPasa Sec4p y es requerido para la entrega polarizada de esta proteína a los sitios de exocitosis (Ali y Reabra, 2005; Markgraf *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 1990).

Funcionalmente Sec2p puede ser dividida en 2 dominios: la región amino terminal (N-terminal) y la región carboxilo terminal (C-terminal). La región N-terminal contiene un dominio largo vuelta-doble-vuelta necesario para la homodimerización de Sec2p e interacción con Sec4p. La región N-terminal de Sec2p exhibe una homología con la proteína Rabin3 de mamífero (Walch-Solimena *et al.*, 1997). La región C-terminal de 58 aminoácidos posee un motivo estructural no predicho y de función desconocida. Sin embargo, la eliminación de esta región produce defectos en la secreción y crecimiento en mutantes sensibles a la temperatura

(Nair *et al.*, 1990). Las cisteínas presentes en la región C-terminal son requeridas para la asociación de Sec2p a la superficie de vesículas secretoras (Walworth *et al.*, 1989).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo de unión de Sec2p a vesículas secretoras, ya que no contiene dominios transmembranales o modificaciones lipídicas. Sin embargo, la interacción de Sec2p con vesículas secretoras es parcialmente independiente de la interacción de Sec4p, debido a que en mutantes donde se ha eliminado una parte de los dominios requeridos (58 aminoácidos 450-508) para su asociación con vesículas secretoras, observaron que la actividad intercambiadora de nucleótidos no se ve afectada, por lo que se plantea que Sec2p podría existir como receptor en las vesículas secretoras (Ortiz *et al.*, 2002).

Sec2p es requerida para el transporte polarizado de vesículas secretoras en *S. cerevisiae*, donde se ha observado que se localiza en los lados del septo del cuello de la yema entre la célula hija y la célula madre, así también en la punta de las yemas (Figura 6) (Zahraouis *et al.*, 1989). Marcajes de Sec2p con GFP en *Candida albicans* demuestran una acumulación de esta proteína en la región apical de pseudohifas en crecimiento (Bishop *et al.*, 2009).

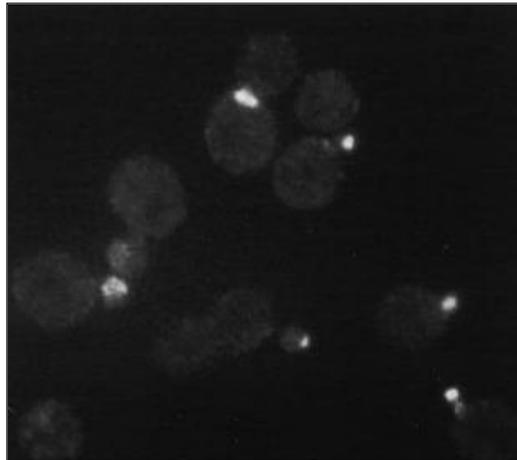


Figura 6. Microscopía confocal de fluorescencia de la localización de Sec2p-GFP en levaduras. Imagen extraída de Elkind *et al.* 2000.

Por otro lado, análisis de la eliminación de *SEC2* en levaduras demuestran que la presencia de este gen es esencial y provoca una acumulación de vesículas en el citoplasma (Zahraouis *et al.*, 1989). La localización de Sec2p depende de la función de Myo2p (miosina tipo V), Sec1p (v-SNAREs), Sec6p (un componente del exocisto), y Sec9 (t-SNARE) (Elkind *et al.*, 2000). Myo2p actúa como motor en el reclutamiento de vesículas secretoras vía dominio C-terminal y promueve su transporte a lo largo de los filamentos de actina (Catlett y Weisman, 1998). Se ha propuesto que Sec2p podría interactuar con Sec4p y Sec15p en el control del tráfico vesicular (Nair *et al.*, 1990).

II.4. SEC4 en la ruta secretora

Sec4p se sintetiza como proteína soluble en el citosol y se asocia rápidamente a las vesículas para ser transportadas a la membrana plasmática (probablemente para la exocitosis) y poder una vez terminada su función ser reciclada detrás de las vesículas secretoras recién formadas (Walworth *et al.*, 1992; Zahraouis *et al.*, 1989). Estudios de coimmunoprecipitación en células silvestres de levaduras, revelan que Sec4p se localiza en el citoplasma y en la membrana plasmática (Zahraouis *et al.*, 1989). Lo anterior, concuerda con los marcajes de Sec4p etiquetadas con GFP en la región N-terminal en levaduras; donde demuestran una localización de esta proteína en la punta de la yemas (Figura 7) (Zajac *et al.*, 2005).

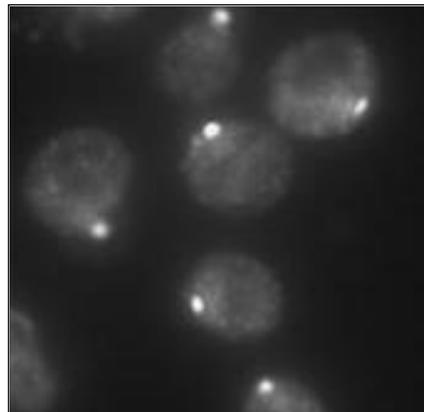


Figura 7. Microscopía confocal de fluorescencia de la localización de *GFP-SEC4* en levaduras. Imagen extraída de Zajac *et al.*, 2005.

La primera indicación de que las proteínas Rab están involucradas en el tráfico de vesículas fue propuesta por Novick, quien encontró que Sec4p coimmunoprecipita con Myo2p (Catlett y Weisman, 1998), lo que hace suponer que el movimiento de vesículas secretoras ocurre en la conformación activa de GTP-Sec4p dependiente de Myo2 a lo largo de los cables de actina. Sin embargo, no se conoce como Sec4p puede mantenerse unida al motor de miosina (Wagner *et al.*, 2002). Además, se ha observado que en levaduras mutantes en actina (ACT1) ó miosina (MYO2) se despolariza la secreción y el crecimiento, pero no se obstruye la secreción (Wagner *et al.*, 2002; Deneka *et al.*, 2003; Grosshans *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae* Ypt1p desempeña un papel en el transporte de proteínas en los estados iniciales del tráfico de la ruta secretora: en el paso de retículo endoplasmático a cis Golgi y cis a medio Golgi. Marcajes con GFP demuestran que está concentrada en la yema por lo que se reporta que juega un papel en el control de la exocitosis en la membrana plasmática (Walworth *et al.*, 1992; Clement *et al.*, 1998).

En *S. cerevisiae* las proteínas Ypt31p y Ypt32p son importantes para que las vesículas puedan salir del aparato de Golgi, mientras que las proteínas Sec4p controlan el tráfico de vesículas del post-Golgi a la membrana plasmática (Markgraf *et al.*, 2007). La sobreexpresión de Ypt32p en parte devuelve la localización polarizada de Sec4p; lo que conlleva que Ypt32p puede servir como un sitio de acoplamiento en la membrana para Sec2p. Estas observaciones sugieren que la actividad de Ypt32p y Sec4p puede ser de regulación de la cascada vía Sec2p (Deneka *et al.*, 2003).

En eucariotas Sec4p comparte semejanza significativa en su secuencia con la proteína Ras en los dominios requeridos para la interacción con los nucleótidos de guanina y la introducción de análogos de GTP en el interior de células de mamífero resulta en exocitosis masiva (Tuvim *et al.*, 2001). Se han descrito los homólogos de Sec4p de *Saccharomyces cerevisiae* en las levaduras tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Ypt2), *Candida albicans* (CaSec4), y en los hongos filamentosos *Aspergillus niger* (SgrA), *Colletotrichum lindemuthianum* (CLPT1), *Ashbya gossypii* (AgSEC4) y *Mucor circinelloides* (Sec4).

Análisis de Western de fracciones celulares obtenidas por gradientes de sacarosa en mutantes termosensibles de Sec4p de *S. cerevisiae* crecidas a la temperatura restrictiva (37 °C) han reportado que una parte de Sec2p cofracciona con Sec4p (Walch-Solimena *et al.*, 1997). Otros estudios de coimmunoprecipitación han demostrado que la función de Sec4p es atenuada por Mso1p, un componente del complejo SNARE exocítico (Castillo-Flores *et al.*, 2007).

En *S. pombe* el gen *SEC4* (Ypt2) codifica una proteína de 200 aminoácidos con una masa molecular de 22.757 KD. La Ypt2p presenta una identidad de 64.7% con la Sec4p de *S. cerevisiae* y un 76.6% con la proteína sas1 de *D. discoideum*. La eliminación del gen *YPT2* es letal al igual que en *S. cerevisiae* (Haubruck *et al.*, 1990). En *A. niger* el gen *SRGA* presenta un 72% de identidad con *SEC4* de *S. pombe* y un 56% con *S. cerevisiae* respectivamente (Punt *et al.*, 2001). Asimismo, *SRGA* posee un alto porcentaje de identidad (82.6%) con el gen *CLPT1* en *C. lindemuthianum* (Siriputthaiwan *et al.*, 2005).

Por medio de amplificaciones por PCR se aisló el gen *AgSEC4* en *A. gossypii* y se realizó la fusión N-terminal de *SEC4* con GFP mediante clonación en el plásmido YCp111GFPSEC4. El análisis microscópico de las células transformadas con dicho plásmido demostró que el producto de la fusión se localiza en la punta de la hifa (Figura 8) (Schmitz *et al.*, 2006).

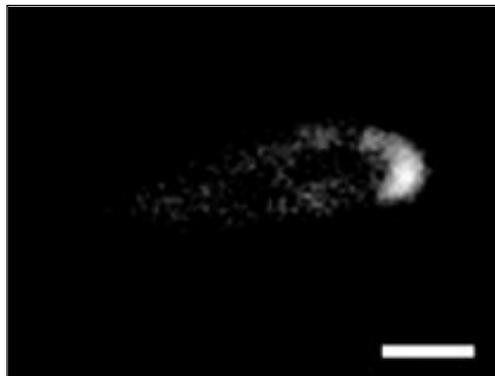


Figura 8. Microscopía confocal de células de *A. gossypii*. Mostrando la localización de *AgSEC4*-GFP. Barra 5 μ m. Imagen extraída de Schmitz *et al.*, 2006.

Estudios de fraccionamiento celular con gradiente de sacarosa en el hongo filamentoso *M. circinelloides* mostraron 2 poblaciones diferentes de vesículas: quitosomas y vesículas que acarrean glucosa oxidasa (GOX por sus siglas en inglés glucose oxydase). Se usaron ensayos de unión con GTP (α - 32 P), los cuales, analizan la interacción selectiva y no covalente de GTP, para analizar la presencia de Sec4 en dichas vesículas, y encontraron que Sec4 está asociado a ambos tipos de vesículas: quitosomas y vesículas que acarrean GOX (Moreno-Jiménez *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha reportado el marcaje de la quitina sintetasa 1 (CHS-1) con GFP en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. El análisis con microscopía confocal demostró que la CHS-1 se localiza en el Spk, en septos y en la zona subapical de la hifa (Sánchez-León, 2007). Este marcaje de la CHS-1 es considerado como un marcador de microvesículas, ya que la forma inactiva de la enzima quitina sintetasa esta presente en los quitosomas, cuerpos vesiculares inferiores a 80 nm de diámetro. La CHS cataliza biosíntesis de N-acetilglucosamina; un homopolímero componente de la quitina. La quitina es el principal componente estructural de la pared celular de los hongos filamentosos (Bartnicki-García *et al.*, 1989).

Recientemente se ha reportado el marcaje con GFP de una proteína GS-1 requerida para la actividad de la β -1-3 glucano sintetasa (componente de la pared celular en hongos) en *N. crassa*. La proteína GS-1-GFP presenta una localización en la punta de la hifa formando una estructura en forma de anillo, el cual, sus descubridores llamarán “Spitzenring” (Verdín *et al.*, 2009).

La fluorescencia de GS-1-GFP se acumula alrededor de las microvesículas del Spk, por lo que se especula que GS-1 colocaliza con vesículas secretoras; sin embargo, a medida que la hifa crece y el Spk se retrae, la distribución de la fluorescencia presente en el Spitzenring no es uniforme, es decir, la acumulación de la fluorescencia en esta estructura varía a lo largo del crecimiento de la hifa; observándose una acumulación de fluorescencia en parches que dan la apariencia de un anillo, 2 cuerpos en forma esférica ó un doble anillo (Verdín *et al.*, 2009).

En el hongo filamentoso *N. crassa* también se ha realizado el marcaje de las proteínas SEC-5 y SEC-15 con GFP; en donde se reporta para ambas proteínas, una distribución aleatoria en el citoplasma, en la región central del septo y una acumulación de puntos fluorescentes en la región adyacente a la membrana plasmática formando una especie de capucha cortical en la punta de la hifa en crecimiento (Beltrán, 2009).

II.5. Efectos observados en hongos por la eliminación del gen *sec-4*

Estudios de análisis genotípicos de mutaciones en las secuencias consenso de unión de Sec4 (*Leu79*) al nucleótido de guanina en la región C-terminal (Walworth *et al.*, 1989), demuestran que la integridad de esta región es importante para su actividad biológica correcta. Al expresar mutaciones dominantes negativas en los dominios de unión a GTP, en levaduras (*S. cerevisiae* y *C. albicans*) se reduce la afinidad de unión de Sec4p a GTP (Kastan *et al.*, 2007). Para corroborar la función de Sec4p se han realizado mutantes knock-out (K.O.) de levaduras, donde reportan que la ausencia de este gen es letal y causa un defecto en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática, causando la acumulación de vesículas secretoras en el citoplasma de una forma despolarizada similar a la que se ha visto en mutantes de actina 1 (*act1-1*) y células tratadas con latrunculina A (LAT-A) (Zahraouis *et al.*, 1989).

En *C. lindemuthianum* la expresión constitutiva de mutaciones dominantes negativas puede conducir a un fenotipo letal, por lo que obtuvieron una cepa transgénica con interrupción del homólogo de *SEC4* inducido bajo el control del gen promotor de la pectinasa. En presencia de pectina la mutación suprime la función de Sec4p y provoca una acumulación de vesículas a lo largo de la pared de la hifa (Siriputthaiwan *et al.*, 2005).

Mutantes con el gen *srgA* eliminado en *A. niger* (Δ *srgA*) presentaron una inusual ramificación apical y un incremento en el diámetro de la hifa de 1.1–1.8 mm, comparado al diámetro de la hifa de 0.9 mm de la cepa silvestre. La morfología colonial de Δ *srgA* consiste en colonias muy

compactas con pigmentos de color amarillo (Figura 9). La disrupción del gen *srgA* no es letal, pero afecta la polaridad de la hifa y la esporulación (Punt *et al.*, 2001).

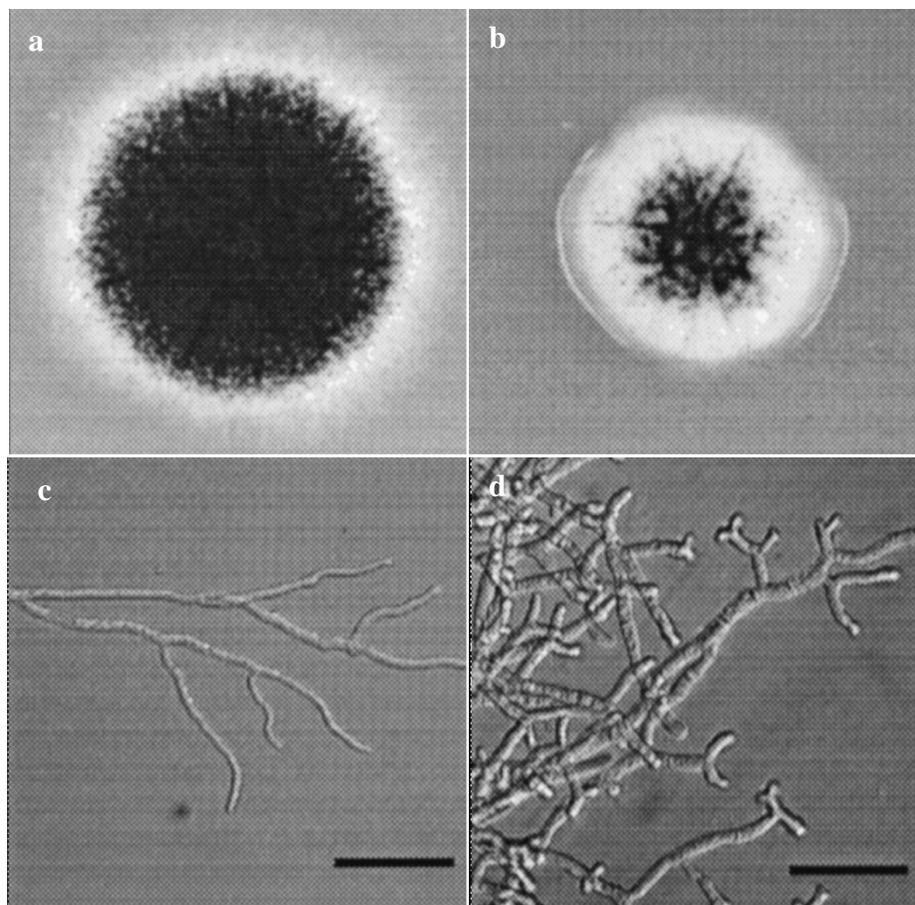


Figura 9. Comparación de las cepas *A. niger* (N402) y *A. niger* Δ *srgA* (BS18), creciendo con glucosa como fuente de carbono a 30 °C, a y b) *A. niger* como control y *A. niger* Δ *srgA*, morfología de la colonia después de 4 días de crecimiento. c y d) *A. niger* como control y *A. niger* Δ *srgA*, observación bajo microscopio de las hifas aéreas de las colonias respectivas. Las cepas fueron crecidas por 2 días en placas cubiertas con celofán. Imagen extraída de Punt *et al.*, 2001.

En *A. gossypii* etiquetaron con GFP en la región N- terminal del homólogo de Sec4p llamado como AgSEC4. Asimismo, realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de las hifas de esta cepa; al ser expuestas a latrunculina A (afecta a la actina) a 200 μ M durante 1.5 minutos. Observaron que el movimiento de vesículas estaba afectado, causando una acumulación de fluorescencia uniforme en toda la hifa. Además, en mutantes con cambio de un aminoácido en el dominio Fh2 de F-actina (Δ AgBNII) en combinación con la fusión GFP-AgSEC4 observaron una acumulación de vesículas secretoras en la punta de la hifa (Schmitz *et al.*, 2006). Lo que indica que Sec4p necesita de los cables de actina para su correcta localización.

III. JUSTIFICACIÓN

Estamos interesados en el crecimiento apical y morfogénesis de los hongos filamentosos, por lo que en *N. crassa* hemos estado identificando diferentes componentes involucrados en el transporte y fusión de vesículas secretoras durante el crecimiento polarizado. Ahora estamos intentando conocer el papel de estos componentes y cómo ocurre el tráfico vesicular para elucidar cuestiones pendientes sobre el crecimiento. A largo plazo se pretende crear un modelo de la vía/s secretora/s con toda la información recabada.

Se conoce muy poco del papel de las Rab GTPasas y sus activadores en la regulación del tráfico de vesículas en hongos filamentosos. Por lo que este trabajo pretende conocer la localización y el papel de los componentes de la ruta secretora SEC-2 y SEC-4 en *N. crassa*. Asimismo, se quiere recabar información básica para ayudar a establecer el modelo de secreción en hongos filamentosos y compararlo con el modelo de secreción existente en levaduras.

IV. HIPÓTESIS

1. SEC-2 y SEC-4 están involucradas en el transporte y entrega de vesículas del post Golgi a la membrana plasmática para que se efectúe la exocitosis en el proceso de síntesis de la pared celular fúngica, por lo que la ausencia de estos genes provocarán alteraciones en la morfología de las hifas en *N. crassa*.
2. El crecimiento polarizado apical en *N. crassa* requiere de SEC-2 y SEC-4 para la entrega vectorial constante de vesículas secretoras en la membrana plasmática. Por lo que, la localización de SEC-2 y SEC-4 se localizará en el ápice celular y a lo largo de las hifas en crecimiento en *N. crassa*.

V. OBJETIVO GENERAL

Marcar las proteínas SEC-2 y SEC-4 mediante el uso de proteínas fluorescentes y estudiar el efecto de la eliminación de los genes correspondientes en el crecimiento de hifas de *N. crassa*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener transformantes de *N. crassa* que expresen SEC-2 y SEC-4 fusionadas con proteínas fluorescentes GFP y mChFP.

Analizar el patrón de distribución de SEC-2 y SEC-4 etiquetadas con proteínas fluorescentes en hifas en crecimiento de *N. crassa* mediante técnicas de microscopía confocal de escaneo con láser.

Analizar cepas K.O de *N. crassa* en las que se haya eliminado el gen *sec-2* ($\Delta sec-2$) y el gen *sec-4* ($\Delta sec-4$).

Obtener cruzas genéticas de *N. crassa* $\Delta sec-4$ con las cepas de *N. crassa* que tienen etiquetado con GFP 2 proteínas componentes del exocisto: SEC-5 y SEC-15.

VII. METODOLOGÍA

VII.I. Cepas y medios de cultivo

Las cepas de *N. crassa* (Tabla II) se cultivaron en medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1956) solidificado con agar (DIFCO) al 1.5 % más sacarosa 1.5 gr/L y se incubaron a 28 °C. Para el crecimiento de cepas de *N. crassa* auxótrofas para histidina se añadió este aminoácido (Histidina Calbiochem®) a una concentración final de 0.5 mg/ml. Para la selección de cepas transformadas de *N. crassa* resistentes a higromicina se añadió higromicina B (Calbiochem®) a una concentración final de 200 µl/ml al medio MMV adicionado con FGS (2% Sales de Vogel, 1% agar, 10% aditivo FGS–Fructosa, Glucosa y Sorbosa–). Para la obtención de cepas transformadas de *N. crassa* homocariontes se utilizó el medio sintético básico de cruzas (SCM) (Westergaard y Mitchell, 1942) que contiene medio SC 2% (KNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, CaCl₂, biotina, solución de elementos traza, H₂O destilada, cloroformo), sacarosa, suplementos y H₂O destilada.

Tabla II. Cepas de *N. crassa* usadas en este estudio

FGSC # Cepa	Genotipo	NCU	Cepa	Referencia
9717	Δ <i>mus-51::bar+</i> ; <i>his-3</i> ; <i>mat A</i>	**		<i>Colot et al. 2006.</i>
9718	Δ <i>mus-51::bar^r</i> ; <i>mat a</i>	**		<i>Colot et al. 2006.</i>
988	Wt <i>mat a</i>	**		<i>Colot et al. 2006.</i>
9013	Wt <i>mat A</i>	NCU01862.2		<i>Case et al. 1965</i>
13368	Δ <i>sec-2 mat a</i>	NCU01911.3	Δ <i>sec-2</i>	<i>Colot et al. 2006.</i>
*	SEC-2 –GFP	**	TSec-2-G-1	Este estudio
	SEC-2 –ChFp	**	TSec-2-Ch-1	Este estudio
	SEC-2 –ChFp	**	TSec-2-Ch-2	Este estudio
	Δ <i>sec-4 mat a</i>	NCU06404.3	TGasa-1	Este estudio
	Δ <i>sec-4</i>	**	TGasa-2	Este estudio
	Δ <i>sec-4-N150</i>	**	TGasa-3	Este estudio
	SEC-4 –GFP	**	TSec-4-G-1	Este estudio
	SEC-4 –ChFp	**	TSec-4-Ch-1	Este estudio
	SEC-4 –gly-GFP	**	TSec-4-gly-G-1	Este estudio
	Δ <i>sec-4-sec-5-gfp</i>	**	TGasa-5	Este estudio
	Δ <i>sec-4-sec-15-gfp</i>	**	TGasa-4	Este estudio

FGSC. Número de cepa en el Fungal Genetics Stock Center. *Numero pendiente de asignación. Se enviará la cepa al FGSC. **Ausente

VII.2. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos de interés, inicialmente se realizó la búsqueda de los marcos de lectura abiertos correspondientes a las secuencias de *sec-2* (NCU01911.3) y *sec-4* (NCU06404.3) de *N. crassa* homólogas de *SEC-2* y *SEC-4* de levadura en la página web: <http://www.broad.mti.edu/annotation/genome/neurospora>. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con la ayuda de los programas FastPCR Professional versión 5.2.0.12 (Primer Digital Ltd <http://primerdigital.com>) y ApE (A plasmid Editor, Copyright © 2003-2007 por M. Wayne Davis versión 1.11.0.0).

VII.3. Análisis de los alineamientos de SEC-2 y SEC-4

Se realizó el alineamiento de secuencias mediante el programa CLC Sequence Viewer versión 6.3 para la comparación de secuencias aminoacídicas predichas correspondientes a *sec-2* y *sec-4* en hongos modelos utilizados en el estudio de la ruta de secretora.

VII.4. Extracción de ADN genómico de *N. crassa*

Para la extracción de ADN genómico de *N. crassa* se cultivó la cepa silvestre N1 (FGSC# 988) en un matraz con 30 ml de MMV líquido durante cuatro días y se incubó a 30 °C en condiciones de oscuridad y sin agitación. Después se filtró el micelio con un embudo estéril y se lavó con abundante agua destilada. Posteriormente con ayuda de una pinza el micelio fue colocado en papel filtro Whatman estéril para secarlo. El micelio obtenido se colocó en un tubo eppendorf destapado; la boca del tubo se cubrió con parafilm y se hicieron cuatro agujeros pequeños con una aguja. Dicho tubo fue colocado en el liofilizador FreeZone® 2.5 Dry Systems (LABCONCO) durante 18-25 horas a una presión 0.133 mBar y una temperatura de -50 °C. El micelio liofilizado se desmenuzó con un palillo. Se extrajo el ADN genómico con el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este mismo procedimiento fue aplicado para la extracción de ADN genómico de la cepa K.O. de *N. crassa* Δ *sec-2* (FGSC# 13368) y *N. crassa* Δ *sec-4*.

VII.5. Construcciones moleculares

Para la amplificación de los fragmentos de interés (Figuras 10 y 11), se utilizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Shevchuk *et al.*, 2004) con el termociclador iCycler (BioRad®) y la enzima de alta fidelidad Platinum® HIFI DNA Polymerase (Invitrogen®). La técnica de PCR de fusión implica la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR con regiones sobrelapantes complementarias en los fragmentos a fusionar, tal como se muestra en la figura 11. Esta técnica se utilizó para el diseño de todas las construcciones moleculares planteadas en este trabajo (Figura 10).

VII.6. Diseño de protocolo para PCR de fusión

Para cada una de las construcciones moleculares de SEC-2-GFP, SEC-2-mChFP, SEC-4-GFP y SEC-4-mChFP se realizó lo siguiente de forma separada: en la primera ronda de PCR se amplificaron los 3 primeros fragmentos del diseño molecular (Figura 11), la región *orf* del gen, la región *utr* del gen y la región *hph-gfp*. Estos primeros fragmentos fueron utilizados como plantados en la siguiente ronda de PCR para obtener los fragmentos *sec-orf-proteína fluorescente-hph* y *hph-sec-utr*.

Primera ronda de PCR: se amplificaron los genes de interés así como las regiones flanqueantes 3' y la región correspondiente al gen de la proteína fluorescente verde ó roja-gen unida al cassette de resistencia a higromicina (*gfp-hph* ó *mchfp-hph*) con los oligonucleótidos correspondientes. Se designaron los siguientes oligonucleótidos para esta ronda: *sec-2-orf-gfp* (P₁/P₂/orf-gfp), *sec-2-orf-mchfp* (P₁/P₂/orf-mchfp), *sec-2-utr* (P₃/P₄/utr); *sec-4-orf-gfp* (P₁/P₂/orf-gfp), *sec-4-orf-mchfp* (P₁/P₂/orf-mchfp), *sec-4-utr* (P₃/P₄/utr); *gfp-hph* (P₇/P₈/hph-gfp); *hph-mchfp* (P₉/P₈/hph-mchfp), y se llevaron a cabo las reacciones convencionales de PCR (Figura 11). Para las amplificaciones de las regiones *hph-gfp* y *mchfp-hph* se utilizó como plantado los plásmidos pMF357 y pJV14-1, respectivamente.

Segunda ronda de PCR (fusión de 2 fragmentos): se utilizaron los amplicones purificados de la primera ronda de PCR como templados (0.5 μ l) y se efectuó la segunda ronda de PCR usando los oligonucleótidos correspondientes: *sec-2-gfp-hph* (P₁-P₆/gfp-hph), *sec-2-mchfp-hph* (P₁-P₆/mchfp-hph), *sec-2-hph-utr* (P₅-P₄/hph-utr); *sec-4-gfp-hph* (P₁-P₆/gfp-hph), *sec-4-mchfp-hph* (P₁-P₆/mchfp-hph), *sec-4-hph-utr* (P₅-P₄/hph-utr) (Figura 11).

Cada uno de los productos de PCR obtenidos fueron mezclados con un amortiguador de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) en proporción de 6:1 y fueron colocados en los pozos del gel de agarosa al 1% (Promega®) conteniendo bromuro de etidio al 0.1 μ g/ml (Invitrogen®). Para identificar el tamaño de los fragmentos esperados en el gel de agarosa, utilizamos 2 marcadores moleculares: Lambda DNA/EcoRI+ HindIII Markers (Promega®) y BenchTop 1 Kb DNALadder (Promega®). El gel de agarosa fue sumergido en una solución de TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) dentro de la celda de electroforesis Mini Sub Cell GT (Biorad®). Los productos de PCR se corrieron electroforéticamente durante 60 minutos, 65 Ω (Resistencia), 400 AMP (Amperes). Se expuso a luz ultravioleta el gel de agarosa para la observación de los fragmentos de ADN. Los amplicones resultantes fueron purificados con el kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen®) siguiendo el protocolo del fabricante. Este procedimiento se aplicó a los productos de PCR de fusión de la primera y segunda ronda.

Una vez obtenidos los amplicones purificados de la segunda ronda de PCR de fusión, se utilizaron para transformar mediante electroporación (electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad®) los conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*.

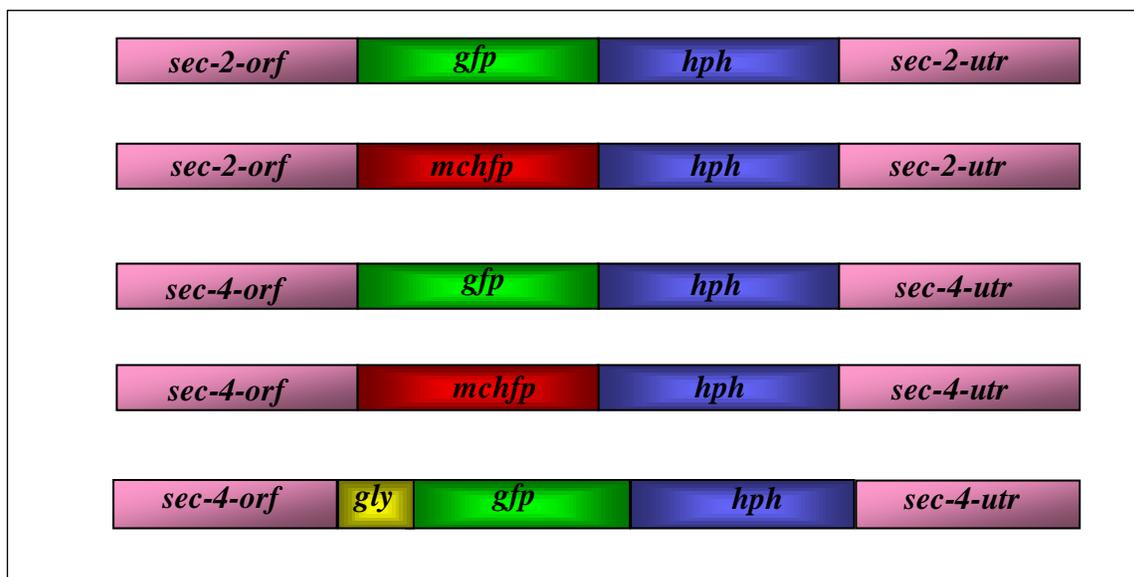
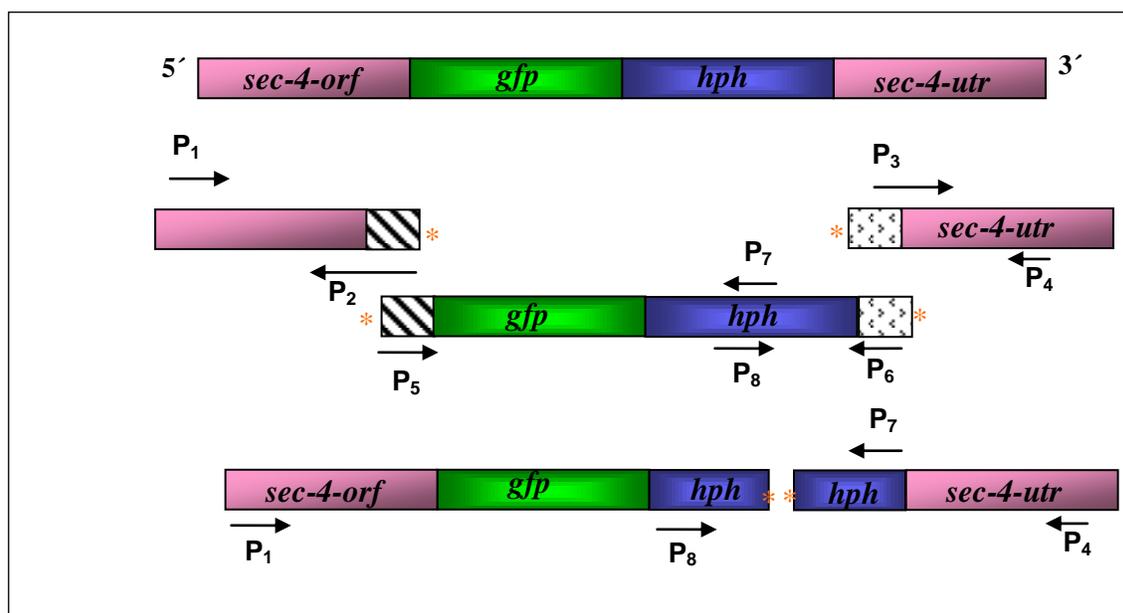


Figura 10. Construcciones moleculares para etiquetar con proteínas fluorescentes, SEC-2 y SEC-4.



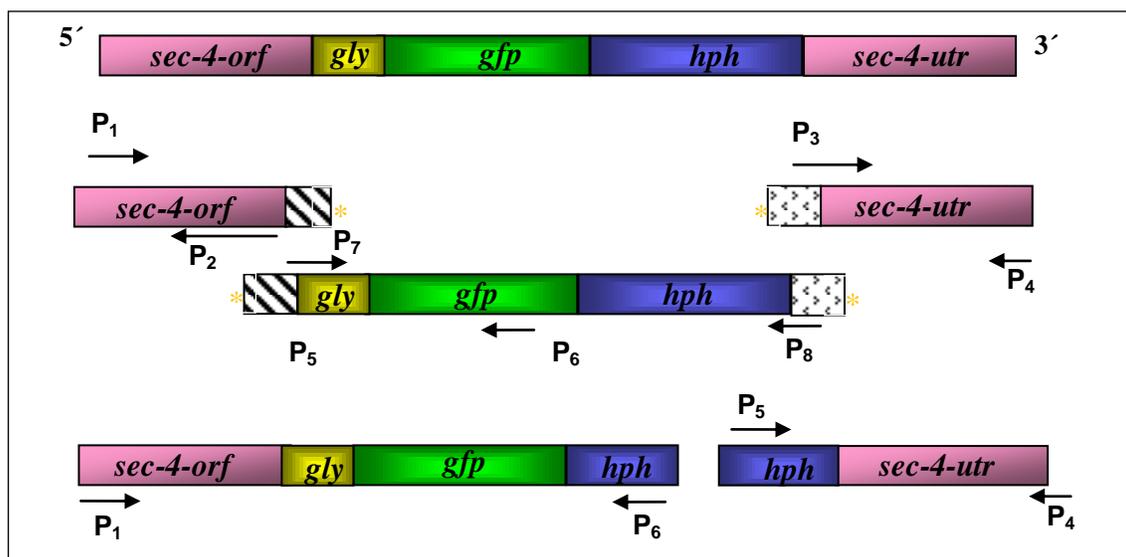
*Regiones de DNA sobrelapantes con secuencias complementarias en ambos fragmentos

Figura 11. Diseño de la construcción molecular para utilizarse en la técnica de PCR (Polymerase chain reaction) de fusión.

Posteriormente se diseñó otra construcción molecular de SEC-4-gly-GFP (Figura 12) la cual, a diferencia de las anteriores posee una etiqueta que consiste en un brazo de 10 de glicinas unidas a a la GFP; esto favorece al plegamiento de la estructura tridimensional de la proteína (Honda y Selker, 2009).

Primera ronda de PCR: se amplificaron los genes de interés así como las regiones flanqueantes 3' y la región correspondiente al gen de la proteína verde fluorescente unida al cassette de resistencia a higromicina. Se designaron los siguientes oligonucleótidos para esta ronda: *sec-4-orf-gly-gfp* (P₁/P₂/orf-gfp), *sec-4-utr* (P₃/P₄/utr), *gly-gfp-hph* (P₇/P₈/gly-gfp-hph), y se llevaron a cabo las reacciones convencionales de PCR (Figura 12). Para la amplificación de la región *gly-gfp-hph*, se utilizó como templado el plásmido pZErO (Honda y Selker, 2009).

Segunda ronda de PCR (fusión de dos fragmentos): se utilizaron los amplicones purificados de la primera ronda de PCR como templados (0.5 µl) y se efectuó la segunda ronda de PCR usando los oligonucleótidos correspondientes: *sec-4-orf-gly-gfp-hph* (P₁-P₆/gfp-hph), *sec-4-hph-utr* (P₅-P₄/hph-utr) (Figura 12).



*Regiones de DNA sobrelapantes con secuencias complementarias en ambos fragmentos.

Figura 12. Diseño de la construcción molecular para utilizarse en la técnica de PCR (Polymerase chain reaction) de fusión.

VII.7. Transformación de *N. crassa* y selección de transformantes

Para poder realizar la transformación en *N. crassa* con las construcciones moleculares, fue necesario realizar como paso previo la obtención de conidios. Para ello se cultivó la cepa FGSC# 9717 en un matraz de 500 ml con 50 ml de medio mínimo de Vogel (VMM) solidificado con agar al 1% y fue incubado por 7 días a 30 °C. Posteriormente se efectuó la cosecha de conidios bajo condiciones estériles; se añadieron 50 ml de sorbitol 1M estéril al matraz y se agitó vigorosamente para desprender los conidios del medio de cultivo. Después se filtró la solución con la ayuda de un embudo que recubierto internamente con magitel para permitir únicamente el paso de conidios. El filtrado se recuperó en un tubo Falcón de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se efectuó el lavado de los conidios de la siguiente forma: se resuspendieron los conidios en 20 ml de sorbitol 1M estéril y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Después se resuspendieron en aproximadamente 1000 µl de sorbitol 1M estéril.

Para cada una de las construcciones se realizaron las siguientes mezclas por separado en tubos eppendorf en frío: SEC-2-gfp (5 µl de DNA de la fusión *sec-2-orf-gfp-hph* y 5 µl de la fusión *sec-2-hph- utr*), SEC-2-mChFP (5 µl de DNA de la fusión *sec-2-orf-mchfp-hph* y 5 µl de la fusión *sec-2-hph- utr*), SEC-4-gfp (5 µl de DNA de la fusión *sec-4-orf-gfp-hph* y 5 µl de la fusión *sec-4-hph- utr*) y SEC-4-mChFP (5 µl de DNA de la fusión *sec-4-orf-mchfp-hph* y 5 µl de la fusión *sec-4-hph-utr*), SEC-4-gly-gfp (5 µl de DNA de la fusión *sec-4-orf-gly-gfp-hph* y 5 µl de DNA de la fusión *sec-4-hph-utr*). A cada mezcla se le añadió 90 µl de la solución de conidios obtenida previamente. Se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó durante 10 minutos en hielo. Después se transfirió la mezcla a la celda de electroporación 0.2 mm (en hielo). Se colocó en la celda dentro del electroporador y se le suministró un pulso (600 OHMS, 25 µFD y 1.5 kV en un tiempo constante entre 12-14 milisegundos) e inmediatamente se la añadió 1 ml de sorbitol 1M. Los conidios fueron transferidos con una pipeta Pasteur estéril a un tubo Falcón de 50 ml al que se le añadió 15 ml de MMV líquido sin sacarosa. Las muestras fueron incubadas a 30 °C en agitación lenta (20 rpm) durante 2 a 4 horas. Trascurrido este tiempo, la solución de conidios se agregó a 15 ml de medio TopAgar (sales

de vogel 50%, FGS2%, sorbitol 2M, agar, H₂O destilada); se mezcló suavemente por inversión y se vertió en placas de selección (3 placas para cada transformante) que contenían medio FGS adicionado con higromicina B (200 µg/ml) e histidina (0.5 mg/ml). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 3 a 5 días hasta observar colonias de *N. crassa*.

VII.8. Selección y comprobación de transformantes

Las colonias crecidas fueron transferidas a tubos de borosilicato de 4 ml con 1.5 ml de VMM sólido con histidina e higromicina B. Los tubos fueron incubados a 30 °C por 7 días. Posteriormente cada una de las muestras contenidas en estos tubos fue analizada mediante microscopía de fluorescencia de escaneo con láser.

VII.9. Microscopía y análisis de imágenes

Para observar la expresión de SEC-2 ó SEC-4 marcadas con mChFP y/o GFP en hifas maduras de *N. crassa*, las células se cultivaron en placas Petri (100 x 15mm) que contenían MMV sólido con histidina y se incubaron a 28 °C durante 12-16 horas. Cuando las células formaron una colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro, se realizó el corte de un bloque de agar en la periferia de la colonia en forma rectangular y se colocó de manera invertida en un cubreobjetos para su observación al microscopio según Hickey y colaboradores (2005). Se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser LSM-510 META (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con un lente de inmersión 100X de contraste de fases (N.A. 1.3) (Plan Neofluar, Carl Zeiss). Se usó un láser de argón de línea de 488 nm con filtros dicróicos de emisión de 515-530 nm y un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases. Para la obtención de imágenes y series de tiempo, se utilizó el software LSM-510 (versión 3.2; Carl Zeiss) y se evaluó con el LSM-510 Image Examiner (versión 3.2). Las longitudes de excitación y emisión usadas, fueron 489 y 508 para GFP, y 587 y 610 para mChFp.

VII.10. Obtención de cepas homocariontes

Para la obtención de cepas homocariontes los conidios de la cepa N1 *mat a* previamente cosechados fueron lavados con sorbitol 1M y centrifugados por 5 minutos a 5,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de conidios se resuspendió en 1 ml de VMM. Los conidios fueron esparcidos sobre micelio de la cepa transformante tipo *mat A*, crecida previamente en placas Petri con medio SCM. Las placas fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a temperatura ambiente hasta observar la presencia de peritecios y obtener ascosporas. Las ascosporas fueron sometidas a choque térmico a 60 °C durante 1 hora y después inoculadas en placas Petri (100 x 15mm) con VMM sólido con higromicina B (200 µg/ml) e incubadas a 28 °C hasta que se observaron ascosporas en etapa de germinación. Se colectaron 30 colonias provenientes cada una de éstas de la germinación de una sola ascospora germinadas (se observó bajo microscopio estereoscópico) con ayuda de una pipeta Pasteur y cada una de estas fue inoculada en placas con MMV.

VII.11. Obtención de la *Δsec-4* en *N. crassa*

Para la obtención de una cepa *Δsec-4* con el cassette de interrupción de dicho gen (proporcionado por Darmouth Proyecto Genome) se procedió de acuerdo al protocolo de transformación descrito anteriormente. Con la diferencia, que los conidios utilizados precedieron de la cepa FGSC# 9718. Después del choque eléctrico al que fueron expuestos los conidios, estos fueron transferidos con una pipeta Pasteur estéril a un tubo cónico de polipropileno al que se añadieron 10 ml de MMV líquido sin sacarosa. Las muestras fueron incubadas a 30 °C en agitación lenta (20 rpm) durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de espera se le añadió al tubo 20 ml de Top-Agar (sales de Vogels 50%, FGS 2%, sorbitol, agar, H₂O) y se mezcló por inversión. La mezcla fue vertida en 4 placas de selección que contenían medio FGS adicionado con higromicina B (200 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 3-5 días hasta observar colonias de *N. crassa*. Se seleccionaron 10 colonias de las placas de recuperación, las cuales, se inocularon en tubos con MMV más higromicina B e incubaron a 30 °C por 3 días.

Posteriormente las colonias fueron transferidas a cajas Petri con MMV para observar si la morfología de la colonia estaba afectada y las colonias que presentaron este patrón se inocularon en matraces de 500 ml con 50 ml de MMV sólido para la obtención de un stock de conidios. Los matraces se incubaron a 30 °C durante 10 días. Para la extracción de conidios se procedió de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

VII.12. Caracterización de las cepas mutantes

Inicialmente se realizó la comprobación de las cepas K.O. mediante la amplificación por PCR del gen eliminado con la enzima *Go-Taq* ADN Polimerasa (Promega®). Para la $\Delta sec-2$ se utilizaron los oligos P1 (*sec-2-orf*) y P3 (*sec-2-utr*), con lo que no esperábamos que hubiera amplificación. Además, se utilizó un control positivo en el cual se utilizó como templado DNA genómico de la cepa silvestre N1 (FGSC# 988) de *N. crassa*. El mismo procedimiento descrito anteriormente fue aplicado para la *N. crassa* $\Delta sec-4$. Para la caracterización de las cepas mutantes se analizó la morfología de la colonia a nivel macroscópica y microscópica, así como la tasa de crecimiento; dichas características fueron comparadas con el fenotipo silvestre de *N. crassa*. Se tomaron fotografías a diferentes aumentos de las hifas fúngicas con el microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®).

Para la observación de la morfología microscópica se inoculó por triplicado la *N. crassa* $\Delta sec-2$ y *N. crassa* $\Delta sec-4$ en cajas Petri (150 x 15 mm) con MMV y se tomaron fotografías cada 12 horas y 24 horas, respectivamente, con una cámara digital Samsung® de 3.2 megapíxeles. Para la medición de la tasa de crecimiento se cultivó por triplicado las cepas de *N. crassa* $\Delta sec-2$ y *N. crassa* $\Delta sec-4$ en placas Petri (150 x 15 mm) con MMV y se incubaron a 30 °C (Figura 13).

Para la evaluación del crecimiento de *N. crassa* $\Delta sec-2$ se marcó los diámetros del crecimiento en las 3 placas en 6 ocasiones; cada una de estas mediciones se realizó cada hora. Para la *N. crassa* $\Delta sec-4$ se marcó los diámetros del crecimiento en las 3 placas en 4 ocasiones; cada una

de estas mediciones se realizó cada 12 horas, debido al lento crecimiento de esta cepa. Una vez finalizadas las mediciones, se obtuvo el promedio de 10 mediciones por cada horario en cada una de las cajas y se realizó los análisis estadísticos de la prueba T para valorar la significancia de los datos obtenidos en las tasas de crecimiento de las cepas mutantes.

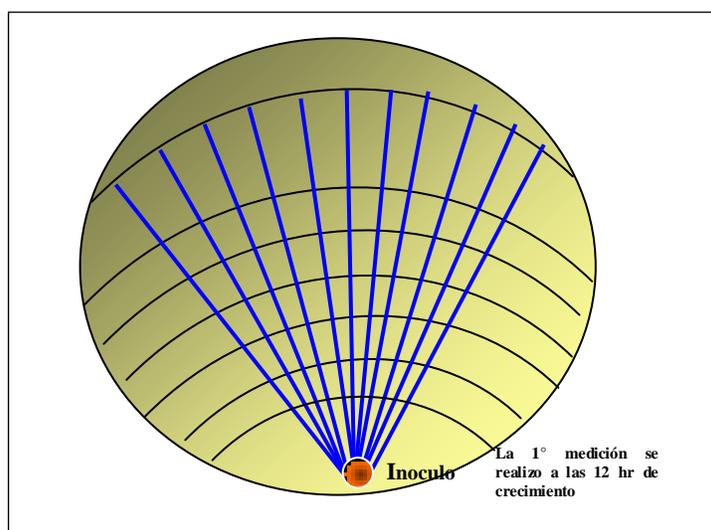


Figura 13. Diseño de la medición de la tasa de crecimiento de las *N. crassa* mutantes. Las líneas horizontales indican la marca de crecimiento en el horario establecido. *N. crassa* $\Delta sec-2$ se marcó cada hora (hr) y *N. crassa* $\Delta sec-4$ se marcó cada 12 hr. Las líneas verticales se marcaron al finalizar las mediciones para obtener 10 mediciones por cada horario de medición.

VII.13. Cruzas de las cepas *N. crassa* mutantes con otras cepas de *N. crassa* que tenían las proteínas SEC5 y SEC-15 marcadas con GFP

Se realizaron cruzas de las cepas $\Delta sec-2$ y $\Delta sec-4$, con otras proteínas relacionadas en la ruta de secreción que ya habían sido marcadas anteriormente con GFP en el laboratorio. Las cruzas realizadas fueron: $\Delta sec-4-sec-5-gfp$, $\Delta sec-4-sec-15-gfp$, $\Delta sec-4-N150$, $\Delta sec-2-n623$ y *ATPase nca-2-N623* como control. Para realizar lo anterior, se inocularon esporas de la cepa *mat A* en una caja Petri que contenía medio sintético de cruza y se dejó crecer durante 2 días a 30 °C en condiciones de oscuridad. Después se dispersó una dilución de esporas (10 μ l de esporas en 90 μ l de H₂O estéril) de la cepa *mat a* en toda la caja y se incubaron durante 20 días a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. A continuación se recuperaron las ascosporas en un tubo eppendorf con H₂O estéril. Se reactivaron colocándolas 1 hora a 60 °C.

Las ascosporas una vez activadas se dispersaron en una caja Petri que contenía MMV y se dejaron crecer por 1 día a 30 °C. Con ayuda del microscopio estereoscópico se realizó la selección de 30 ascosporas germinadas. Cada ascospora fue inoculada en una caja Petri que contenía MMV e incubada un día a 30 °C.

En la selección de la progenie de las cruzas se tomó en consideración las siguientes características: en $\Delta sec-4-sec-5-gfp$ y $\Delta sec-4-sec-15-gfp$ los caracteres de selección fueron, el fenotipo de la $\Delta sec-4$, crecimiento en higromicina y expresión de la fluorescencia de GFP. En $\Delta sec-4-N150$, el carácter de selección fue el fenotipo de $\Delta sec-4$ y crecimiento en higromicina. En $\Delta sec-2-N623$ el carácter de selección fue ausencia de crecimiento en histidina y crecimiento en higromicina.

VII.14. Conservación de cepas a largo plazo

Las cepas destinadas a la conservación fueron cultivadas en placas de MMV sólido y se cortó una porción de la colonia en cuadritos de 1mm x 1mm aproximadamente. Los cuadritos de micelio fueron colocados en glicerol (10%) y guardados a -80 °C en un ultracongelador (Figura 14). También se almacenó a -20 °C una copia de las cepas anteriores en tubos con MMV.

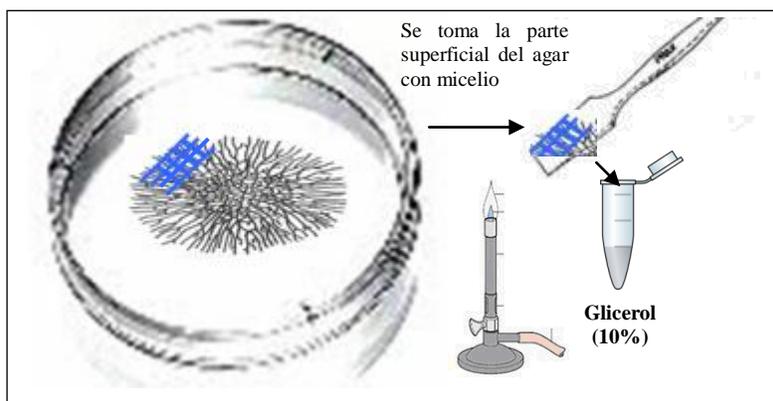


Figura 14. Esquema que muestra el procedimiento utilizado para la conservación de cepas a largo plazo en glicerol (10%).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Análisis Bioinformático

Se realizó la búsqueda de posibles secuencias para *sec-4* y *sec-2* en el genoma de *N. crassa* en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) homólogos de SEC-2 y SEC-4 descritos en algunos hongos que han sido estudiados como organismos modelos de estudio (Figuras 15 y 16).

El análisis *in silico* del genoma de *N. crassa* reveló los *orf* candidatos *sec-2* (Figura 15) y *sec-4* (Figura 16) codificantes de una proteína hipotética de 643 y 206 aminoácidos, respectivamente. La secuencia de nucleótidos mostró un marco de lectura abierto de la proteína SEC-2 (NCU01911.2) de 1929 pb con el codón de inicio (ATG) en la posición 200646 y el codón de término (TAA) en la posición 202688 del cóntigo 3; en el cromosoma I. El marco de lectura abierto de SEC-4 (NCU06404.2) de 1065 pb, con el codón de inicio (ATG) en la posición 6648 y el codón de término (TAA) en la posición 7442 del contigo 26; en el cromosoma IV. El producto del gen *sec-4* es llamado SAS1.

10	20	30	40	50	60	
ATG	CTGGCTGGT	GATGTTTGGGTACGGAGG	AAAACCGTCGAGGCGG	AAAAGACA	ACTCTG	240
TTGGGAGT	CATTGCCGAAGAGAAGC	AGGCTCGTTTGGATGTGGAAC	AGCAAAAAGAAA			300
ATTGAACAGG	AGTTGGAGAACC	TGACAGCCGCC	TATTCGAGGAAGCC	AACAAA	TGGTC	360
ATCTCTGCC	AAGGAAGAGGCC	AGGATCGAACAGGAG	ATACTGCAGCGGAAG	AACGAC	CAA	420
CTTAGGGC	ACAACCTCGTGGAT	ACCGAGGGACTACTCAA	ATCACAAACAGGAG	CAACTAG	CC	480
GAGCTAAAG	CACCTTATGGAGG	ACATGAGCGCCG	GAGAAGCACGAG	CAGATAC	CTCCACG	540
GCGCCTT	CTTCTCCAGGTT	TCAGCAAGTTT	GAGCTGCAAAAT	GAGGAAGG	CCCTTCCGAT	600
CGCTTAC	ACCATGGGCAT	CACGACCGCCAACT	TAGCGTGGCCG	AGTCCATG	TCTCCTTCG	660
TACCCTAC	CAGTTTTACTTAT	CTCTTGAAGCCCG	TACTTCGTACCG	ACCTAG	CATCGTAT	720
AACGACTT	CAAAAGATCTC	ATTGCGACAT	CCAAGAGGAT	CTCTGCC	CAGCAACGCGT	780
ACACCAT	CTACCGGCTCT	GCACTGACGTCT	CTCGGCC	TGGGCT	TAGGATCGGT	840
CATCTT	GGCTCGCCAAT	GCCTCCAGCAC	GTCTCTTCG	ACCAT	CGCAACTGC	900
ACCTTCT	CCAAAACCTCC	ACTACACCCACA	ACGGCCGTT	ACCGCC	AGCCCTGG	960
GCCATCC	CCCTGCGGCC	CTTGAAGGAT	ACCAGGTTTT	ACAAGAG	GGTCCGTG	1020
ATTGAAC	CAACACTAC	GGCTCGATAT	CGCTCCGGG	CTTCT	TGGCTTGC	1080
GTCCCT	TACAGCGAT	GACTGACGG	CTCGTTGT	CGTAGAG	CCAGTCCC	1140
ACAAC	TAGCAGGTT	CGGACGGGTT	TCGAGGCCG	AGTTGAG	CCCGTGC	1200
GAGTCC	AGGCCAG	AGGAGGAATTT	CTTCGGA	AACATCG	ATTCGGAT	1260
TCCGCG	CAAACTGG	ATATGC	AGGATTTGC	TGTCTCG	AGTCCGAT	1320
GATTTCT	TAGGATTTCT	TGCAATAGT	CAAGGACGG	TCACTGG	CGAGCGG	1380
GC	TGAGAA	GGCGGC	ATGGGCCG	AAAGCG	TACGGG	1440
ATCGGT	GGCGAT	GAACCG	CTGCTG	TGTAAG	TTGAACA	1500
GAGGTGG	CAGATG	CGATCC	AGCAGGAG	AGTTCG	GAACGG	1560
CAACTC	ACTTCCA	AATATT	GCCACGG	AGCCTGT	CGACCA	1620
GAAGC	CCCGTGG	AAGAGG	TTGTGGT	ACCTATT	GCGATC	1680
GTTGAA	ATCAT	CGAA	CAAAAG	GTGCG	AGGCTCC	1740
GAGAC	CAAG	CTAGTT	TGGAGG	AGCCCA	AGACCC	1800
CGGAA	ATC	ACCAAT	GC	CCG	CAATCC	1860
GAGGTT	GAG	CCAG	CAACT	GAGGA	ACCAAG	1920
CCAGCT	TGA					1929

Figura 15. Secuencia del marco de lectura abierto de *sec-2* (NCU01911.2).

10	20	30	40	50	60	
CTGTTT	CCTGAACT	GCGCAT	CGTCA	ACCAC	ATTTCG	240
CTTTCC	CGCAACT	TACCAG	TGTACA	ACAG	CCCGAC	300
ATATCC	CCCTTT	GCCGA	ATTC	CGG	AGTCCG	360
ACGAC	GGGCGG	CGGCG	TAA	CCCC	ACAC	420
ATTTT	CTGAT	CAAG	CTCT	TGAT	CGG	480
TGCG	CTTAG	CGAAG	ACTC	ATT	CA	540
AGATCC	GCACA	AATCG	AAT	CGAT	GGCA	600
GTCAAG	AGCG	TTTCC	GTACC	ATC	ACG	660
TGTTT	ACG	CGT	GAC	GG	AT	720
TGGAG	CAAC	ACG	CGA	AGG	AGT	780
AGGAAA	AGAG	GGCG	GGTT	TCCA	AG	840
CCTTCC	TGAG	GGTT	TCGG	CA	AG	900
CCAAC	GAC	ATCA	AGA	AG	CG	960
CGGG	CGT	GA	CGT	CAG	CG	1020
AACGG	TAG	CAG	TTGT	TGG	CG	1065

Figura 16. Secuencia del marco de lectura abierto de *sec-4* (NCU06404.2).

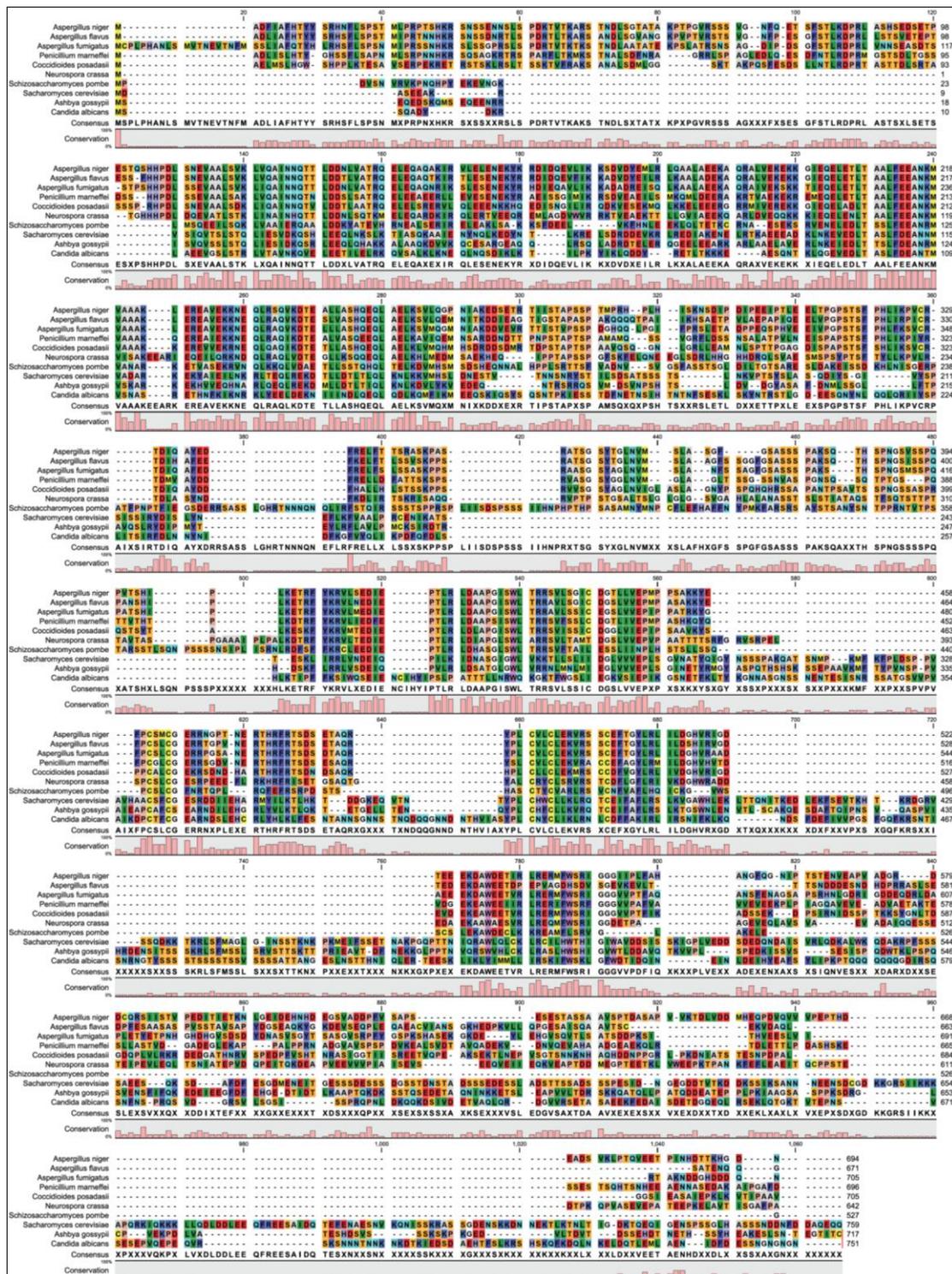


Figura 17. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias correspondientes de SEC-2 con el programa CLC Sequence Viewer 6.3. *A. niger* (XP_001394949.1), *A. flavus* (XP_002384173.1), *A. fumigatus* (XP_754963.1), *P. marneffei* (XP_002152517.1), *Coccidioides posadasii* (XP_001246665.1), *N. crassa* (XP_965542.2), *S. pombe* (NP_593182.1), *S. cerevisiae* (NP_014127.1), *A. gossypii* (NP_986218.1), *C. albicans* (XP_002417848.1).

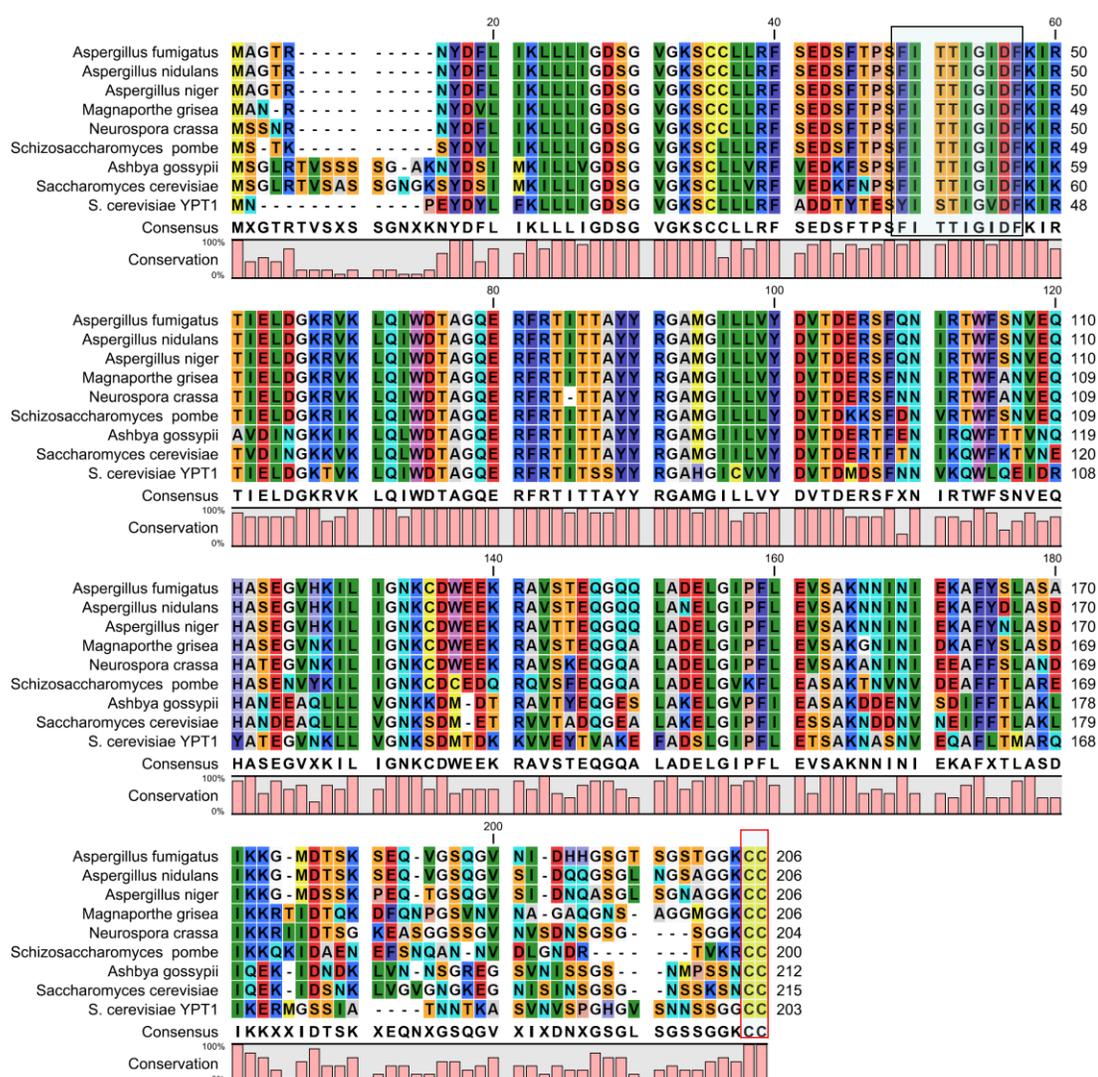


Figura 18. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias correspondientes de SEC-4 con el programa CLC Sequence Viewer 6.3 donde se aprecia los dominios conservados. En el marco rojo se aprecia el dominio de prenilación de cisteínas presente en la Rab GTPasa SEC-4 (CC). En el marco negro se aprecia el dominio efector de SEC-4 (motivos conservados de unión a GTP). *A. fumigatus* (XP_746667.1), *A. nidulans* (XP_664578.1), *A. niger* (XP_001400630.1), *Magnaporthe grisea* (XP_369329.1), *N. crassa* (NCU06404.3), *S. pombe* (NP_594580.1), *A. gossypii* (NP_986645.1), *S. cerevisiae* (NP_116650.1), *S. cerevisiae* YPT1 (gi 836716).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SEC-2 de *N. crassa* reveló que presenta homología parcial con las secuencias de aminoácidos de SEC-2 de otros hongos (Figura 17) asimismo, la identidad entre las secuencias es menor del 50%. SEC-2 exhibe un porcentaje de identidad del 47% con su homólogo en *Aspergillus fumigatus*, 45% en *A. niger* y *Coccidioides immitis*, 44% en *Penicillium marneffeii*, 43% *A. nidulans*, 41% con *A. flavus*, 37% con *S. pombe* y 31% en *A. gossypii*. (Tabla III). Sin embargo, pueden apreciarse algunos dominios conservados que están presentes en todas las secuencias. El alineamiento de aminoácidos de SEC-4 de *N. crassa* reveló que hay una identidad superior al 50% con las secuencias de aminoácidos de los homólogos de esta proteína en otros hongos. SEC-4 de *N. crassa* exhibe un porcentaje de identidad del 83% en *Magnaporthe grisea*, 83% *P. marneffeii*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. fumigatus*, 72% *S. pombe* y *Dictyostelium discoideum*, 65% *S. cerevisiae*, 62% *C. albicans*, 59% *YPI N. crassa* y 56% *A. gossypii* (Tabla III). La máxima homología de la secuencia de SEC-4 de *N. crassa* se encontró con las secuencias correspondientes de SEC-4 en otros hongos filamentosos. También podemos observar variaciones mínimas al comparar las secuencias homólogas de SEC-4 presentes en hongos filamentosos y levaduras. Asimismo, se puede observar en la figura 18 que la parte N-terminal del alineamiento de SEC-4 presenta mayor similitud entre las secuencias en comparación con el C-terminal.

Tabla III. Niveles de similitud nucleotídica (% identidad) de las secuencias de *N. crassa* con los homólogos de las proteínas de estudio en otras especies de hongos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Blast de SEC-2 <i>N. crassa</i>			Blast de SEC-4 <i>N. crassa</i>		
Referencia	Especie fúngica	% Identidad	Referencia	Especie fúngica	% Identidad
XP_754963.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	47	XP_370465.1	<i>Magnaporthe grisea</i>	86
XP_001394949.1	<i>Aspergillus niger</i>	45	XP_002148141.1	<i>Penicillium marneffeii</i>	83
XP_001246665.1	<i>Coccidioides immitis</i>	45	XP_664578.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	83
XP_002152517.1	<i>Penicillium marneffeii</i>	44	XP_001400630.1	<i>Aspergillus niger</i>	83
XP_662363.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	43	XP_001826516.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83
XP_002384173.1	<i>Aspergillus flavus</i>	41	NP_594580.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	72
NP_593182.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	37	XP_641380.1	<i>Dictyostelium discoideum</i>	72
NP_986218.1	<i>Ashbya gossypii</i>	31	NP_983169.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
NP_014127.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	NP_116650.1	<i>Candida albicans</i>	62
XP_756700.1	<i>Ustilago maydis</i>	27	XP_718333.1	<i>Neurospora crassa</i> YPT1	59
XP_722253.1	<i>Candida albicans</i>	25	NP_986645.1	<i>Ashbya gossypii</i>	56

VIII.2. Diseño de oligonucleótidos

Una vez obtenidas las secuencias de SEC-2 y SEC-4 de *N. crassa* se procedió a diseñar los oligonucleótidos (Tabla IV).

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos

Nombre	Secuencia	TM	%GC	bases
SEC-2 -P1	cactacggctc gatacgcctc	59.2	59	22
SEC-2 -P2GFP	agctcctgcccttgctcaccatagctgggaaagccccggatc g	72.9	60.8	46
SEC-2 -P2ChFp	ttccttatgtagcttgcacatagctgggaaagccccgg	66.6	48.7	41
SEC-2 -UTR-P3	gaccgggaaccagttaacgctc gacattattac gatttattc gatggc	65.8	44.6	47
SEC-2 -UTR-P4	gcaga gt gga gcctcaacta gttc g	60.9	56	25
SEC-4 -P1	gtgtc ga gtaacaggaattac g	52.3	40.9	22
SEC-4 -P2GFP	gctcctc gcccttgctcaccatacagcactt gcc gcc ggatc	73.3	64.2	42
SEC-4 -P2ChFP	cttatatgtagcttgcacatagcaactt gcc gcc g	66	48.7	41
SEC-4 -UTR-P3	cgggaaccagttaac gtc gac gccaaacgggtagca gtt g	69.7	57.5	40
SEC-4 -UTR-P4	gcttcctc ggcaactatgtaaac g	57.7	50	24
P7-hph	gcggatttc ggctccaaca	60	55	20
P8-hph	acagcgtctcc gacctgatgca	64	59	22
P1 SEC-4-F-XbaI	gctcta gaatgctc ga gtaaca ggaattac	82	41	29
P2 SEC-4-R-PacI	ccttaattaacagcaactt gcc gcc ggatc	74	50	25
SEC-4-R-Gly	cctccgcctccgccctc gcc gccctcc gccacagcaactt gcc gcc ggatcctgac	100	76	25
SEC-4UTR-R	gcagtgtgcttctcggcaactatg	74	62	26
SEC-4-UTR-F-lox	tgctatac gaagttatggatccga gctc ggccaacgggtagca gttgtgt	87	53	53
P7 hph SM-R	tcgctc gctcca gccaatgacc	65	61	23
P8 hph SM-F	aaaaagcctgaactcaccgc gac g	64	54	24
P9 10XGly-F	ggc gga ggc gcc gga gcc gga gcc gga g	81	86	29
P10 loxP-R	cga gctc ggatccataacttcgtata gca	63	48	29

VIII.3. Construcciones moleculares por PCR de fusión

Para poder visualizar mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular *in vivo* de SEC-2 y SEC-4 etiquetadas con FPs en *N. crassa*, se procedió a realizar una construcción molecular para cada proteína de interés para fusionarla con una proteína fluorescente y obtener proteínas recombinantes SEC-2-GFP, SEC-2-mChFP, SEC-4-GFP y SEC-4-mchFP. Como primer paso en la realización de la construcción molecular, se procedió a la amplificación de la primera ronda de PCR de fusión para obtener los primeros amplicones: *sec-2-orf-gfp* de 1037 pb, *sec-2-orf-mchfp* de 1010 pb, *sec-2-utr* de 1033 pb, *sec-4-orf-gfp* de 983 pb, *sec-4-orf-mchfp* de 977 pb, *sec-4-utr* de 1087 pb, *hph-gfp* de 2200 pb, y *hph-mchfp* de 2309 pb (Figuras 19-21).

Los amplicones obtenidos en la primera ronda de PCR de fusión fueron utilizados como templado en la segunda ronda de PCR de fusión, para obtener los fragmentos: *sec-2-orf-hph-gfp*

de 2735 pb, *sec-2-orf-mchfp-hph* de 2819 pb, *sec-2-hph-utr* de 2002 pb, *sec-4-orf-gfp-hph* de 2681 pb, *sec-4-orf-mchfp-hph* de 2765 pb, *sec-4-hph-utr* de 2051 pb (Figuras 22 y 23). Estos fragmentos finales fueron utilizados para transformar conidios de la cepa FGSC# 9717 de *N. crassa*. Por recombinación homóloga (2° entrecruzamientos), estos fragmentos reemplazaron el gen nativo de *sec-2* y *sec-4* respectivamente con copias de estos genes fusionados a los genes de los reporteros fluorescentes.

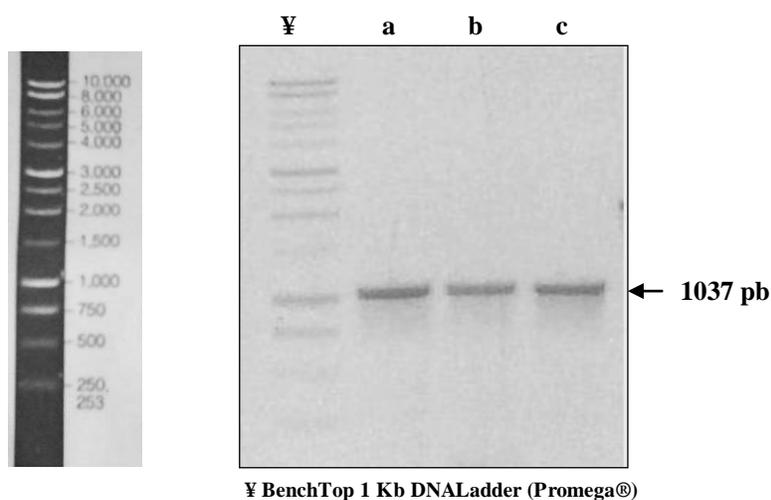


Figura 19. Amplificación de los amplicones de *sec-2* correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión. a) *sec-2-orf-mchfp* (1010 pb). b) *sec-2-utr* (1033 pb). c) *sec-2-orf-gfp* (1037pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

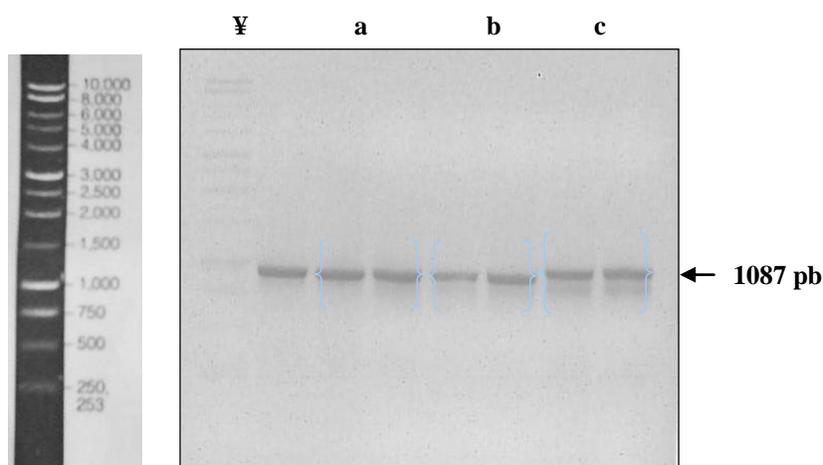


Figura 20. Amplificación de los amplicones de *sec-4* correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión, a) *sec-4-orf-gfp* (983 pb). b) *sec-4-orf-mchfp* (977 pb). c) *sec-4-utr* (1087 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

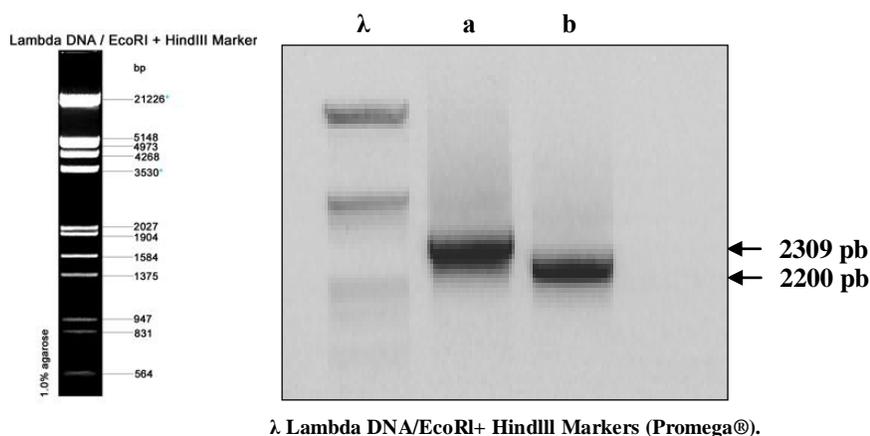


Figura 21. Amplificación de la región proteína fluorescente-hph en la primera ronda de PCR de fusión. a) *mchfp-hph* (2309 pb). b) *gfp-hph* (2200 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

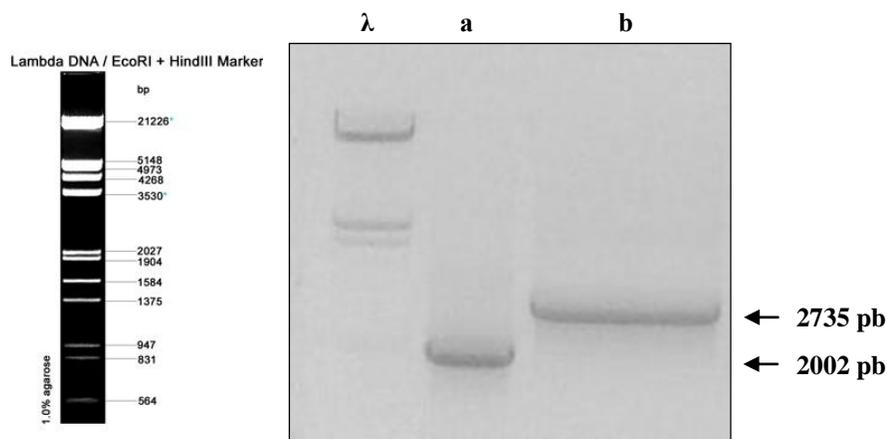


Figura 22. Amplificación de los amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) *sec-2-hph-utr* (2002 pb). b) *sec-2-orf-gfp-hph* (2735 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

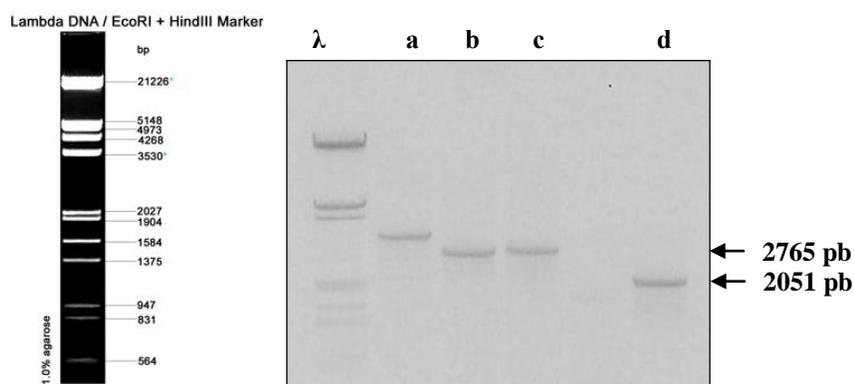


Figura 23. Amplificación de los amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) *sec-2-orf-mchfp-hph* (2819 pb). b) *sec-4-orf-gfp-hph* (2681 pb). c) *sec-4-orf-mchfp-hph* (2765 pb). d) *sec-4-hph-utr* (2051 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

VIII.4. Análisis de las transformantes SEC-2 y SEC-4 etiquetadas con proteínas fluorescentes.

Una vez obtenidos los amplicones correspondientes se utilizaron para transformar conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*. Para la selección de transformantes se empleó microscopía confocal de escaneo con láser. Se seleccionaron aquellas transformantes que presentaron fluorescencia dentro del rango establecido para cada proteína fluorescente y en comparación con la cepa usada para la transformación, sin fluorescencia, que se utilizó como control.

En las placas de recuperación de las transformantes SEC-2-GFP y SEC-2 mChFP se observó la presencia de muchas colonias, por ello, para el análisis de microscopía confocal de escaneo con láser únicamente se seleccionaron 40 colonias de cada transformante, entre las cuales, no se observó ninguna transformante de SEC-2-GFP ó SEC-2-mChFP que expresara fluorescencia

Para las cepas transformantes de SEC-4-mChFP se obtuvieron 35 colonias en las 3 placas de recuperación y únicamente 10 colonias presentaron fluorescencia; de las cuales, 9 presentaron un patrón de localización de fluorescencia citoplasmática y en 1 de estas colonias se observó la presencia de pequeños parches de fluorescencia en la región subapical y en la región distal de la hifa (Figura 24). Para las cepas transformantes de SEC-4-GFP, se obtuvieron 6 colonias en una de las placas de recuperación y únicamente 1 de estas colonias presentó fluorescencia de forma dispersa en el citoplasma a lo largo de toda la hifa (Figura 25).

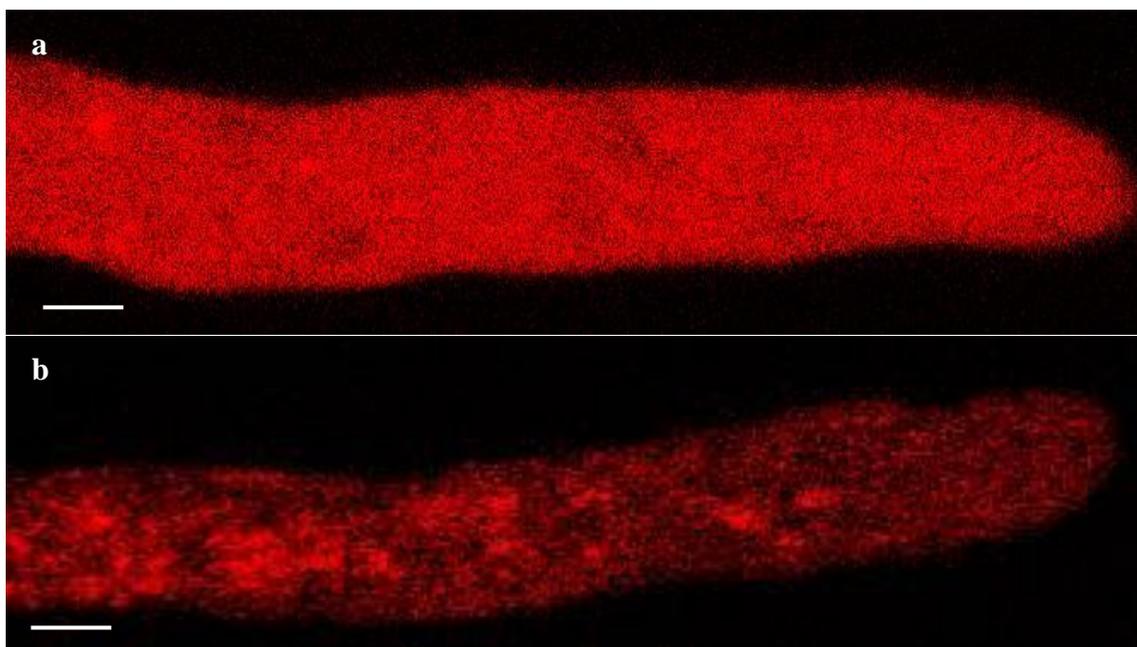


Figura 24. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con mChFP. Objetivo 100X. a) Transformante *N. crassa* TSec-4-Ch-1; la fluorescencia se localiza en el citoplasma. b) Transformante *N. crassa* TSec-4-Ch-2; la fluorescencia se localiza en parches a lo largo de la hifa. Barra 5 μ m.

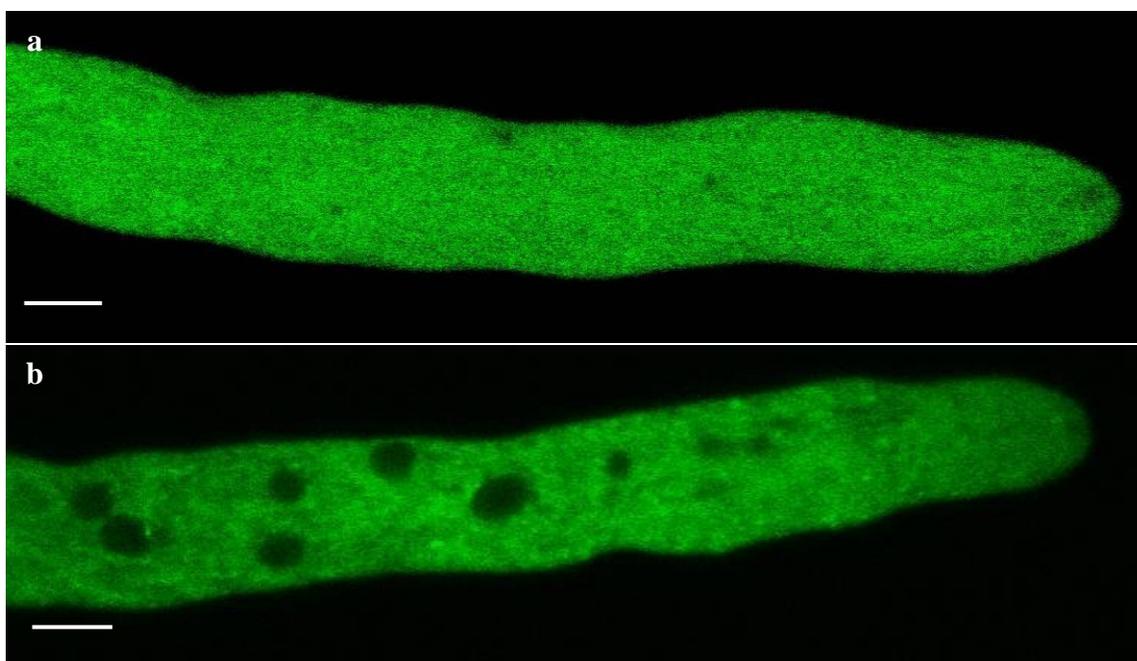


Figura 25. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Cepa control *N. crassa* TJV 1-1; expresión citoplasmática de la GFP (Verdín *et al.*, Dato sin publicar). b) Transformante *N. crassa* TSec-4-G-1; la fluorescencia se localiza en el citoplasma a lo largo de toda la hifa. Barra 5 μ m.

VIII.5. Análisis de las transformantes SEC-4-gly-GFP

Los marcajes obtenidos indican una localización dispersa, así que para asegurarnos de que ese resultado no se debía a un mal plegamiento de la proteína recombinante decidimos realizar el diseño de otra construcción molecular que a diferencia de las anteriores incluye un brazo de 10 glicinas entre la proteína y la GFP (Figura 12), lo que favorece al plegamiento tridimensional de la proteína. La realización de este diseño molecular se efectuó mediante PCR de fusión; en la amplificación de la primera ronda de PCR de fusión obtuvimos los amplicones: *sec-4-orf-gly-gfp*, *gly-gfp-hph* y *sec-4-utr* (Figuras 26 y 27) de 1024 pb, 2274 pb y 956 pb, respectivamente. Estos amplicones fueron utilizados como templado en la segunda ronda de PCR de fusión para obtener los fragmentos: *sec-4-orf-gly-gfp-hph* y *sec-4-hph-utr* (Figura 28) de 2397 pb y 2141 pb, respectivamente. Una vez obtenidos los amplicones correspondientes se utilizaron para transformar conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*.

Se realizó la selección de transformantes mediante el análisis por microscopía confocal de escaneo con láser de 20 colonias transformantes SEC-4-gly-GFP provenientes de las placas de recuperación. Obtuvimos 11 colonias positivas que expresaron fluorescencia dentro del rango establecido. A diferencia de los marcajes anteriores, en las transformantes SEC-4-gly-GFP la fluorescencia se localiza mayoritariamente en la región subapical (Figura 29 a y b) y a lo largo de la hifa se observan puntos fluorescentes incluso en la región distal (Figura 29 c).

Para observar si existía colocalización de la transformante SEC-4-gly-GFP con alguna región del Spk las hifas se tiñeron con FM4-64; el patrón encontrado demuestra que no hay colocalización entre el marcaje de SEC-4 con GFP y la región teñida con FM4-64 (Figura 30).

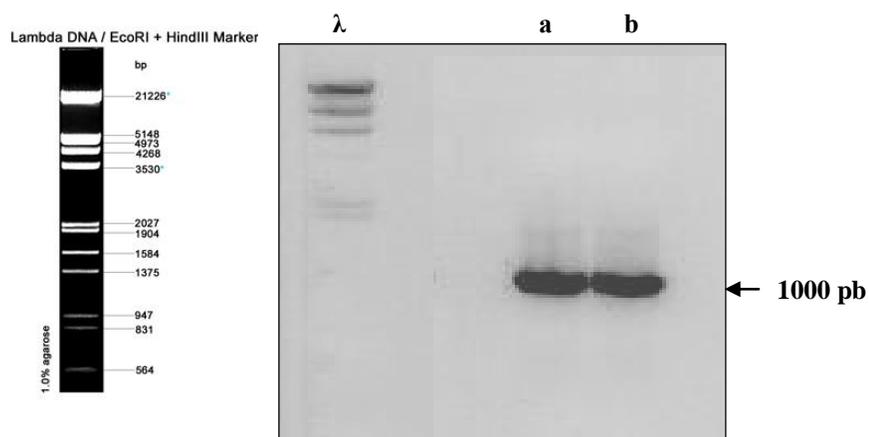


Figura 26. Amplificación de los amplicones de SEC-4 correspondientes a la primera ronda de PCR de fusión. a) *sec-4-orf-gfp* (1024 pb). b) *sec-4-utr* (956 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

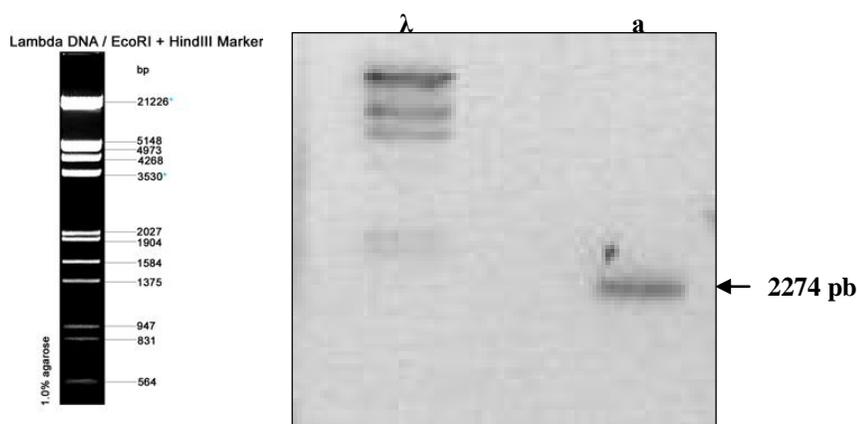


Figura 27. Amplificación del amplicon *gly-gfp-hph* (2274 pb) en la primera ronda de PCR de fusión. Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

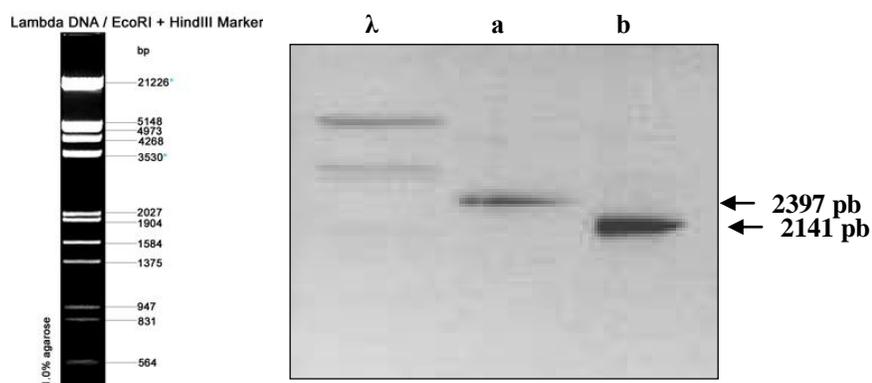


Figura 28. Fusión de amplicones de la segunda ronda de PCR de fusión. a) *sec-4-orf-gly-gfp-hph* (2397 pb). b) *sec-4-hph-utr* (2141 pb). Gel de agarosa al 1% y 0.01% de bromuro de etidio.

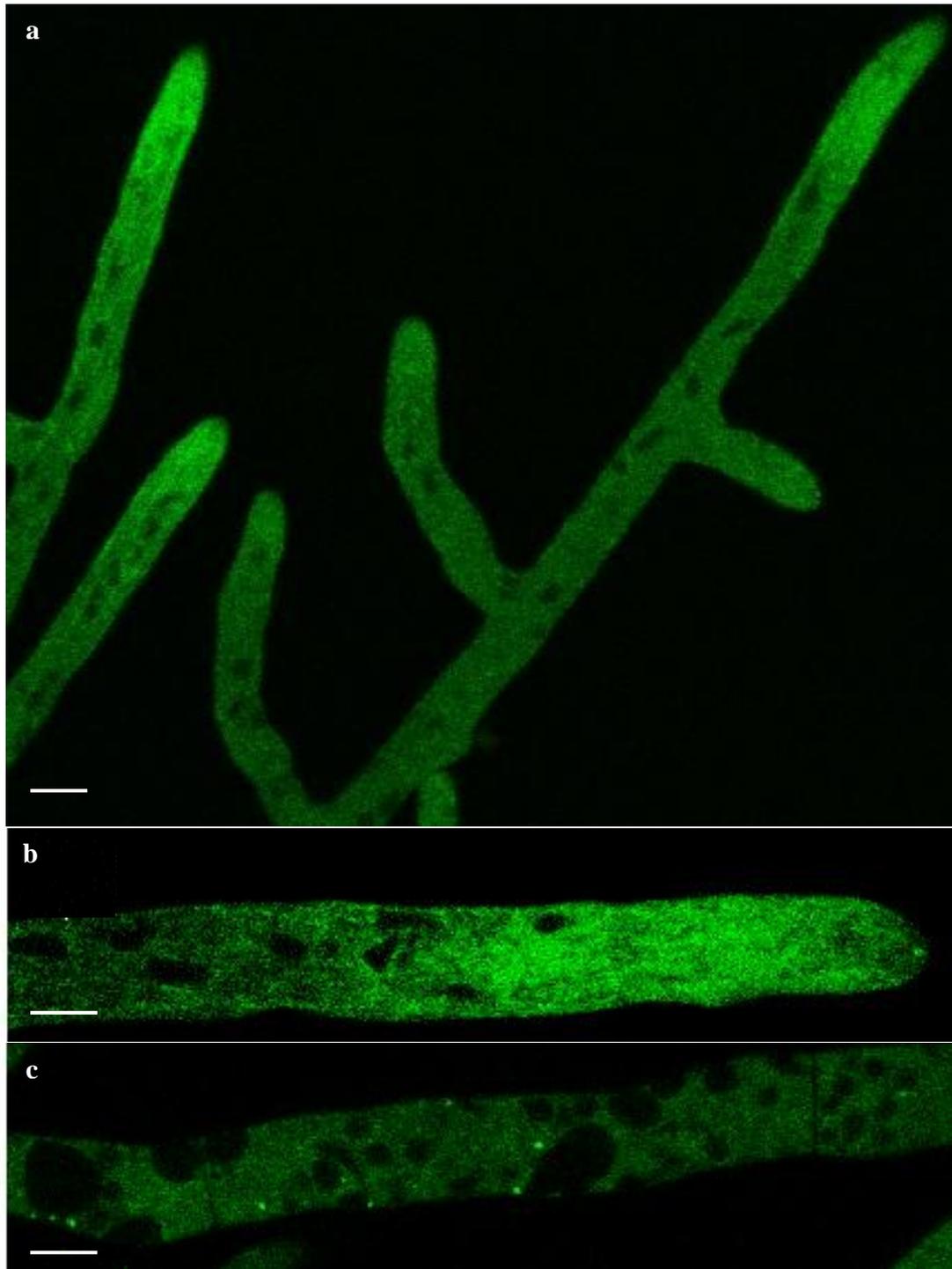


Figura 29. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización de SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1; patrón de fluorescencia en diferentes hifas; la fluorescencia se localiza en las regiones subapicales. b) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en la región subapical. c) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en puntos en la región distal. Barra 5 μm .

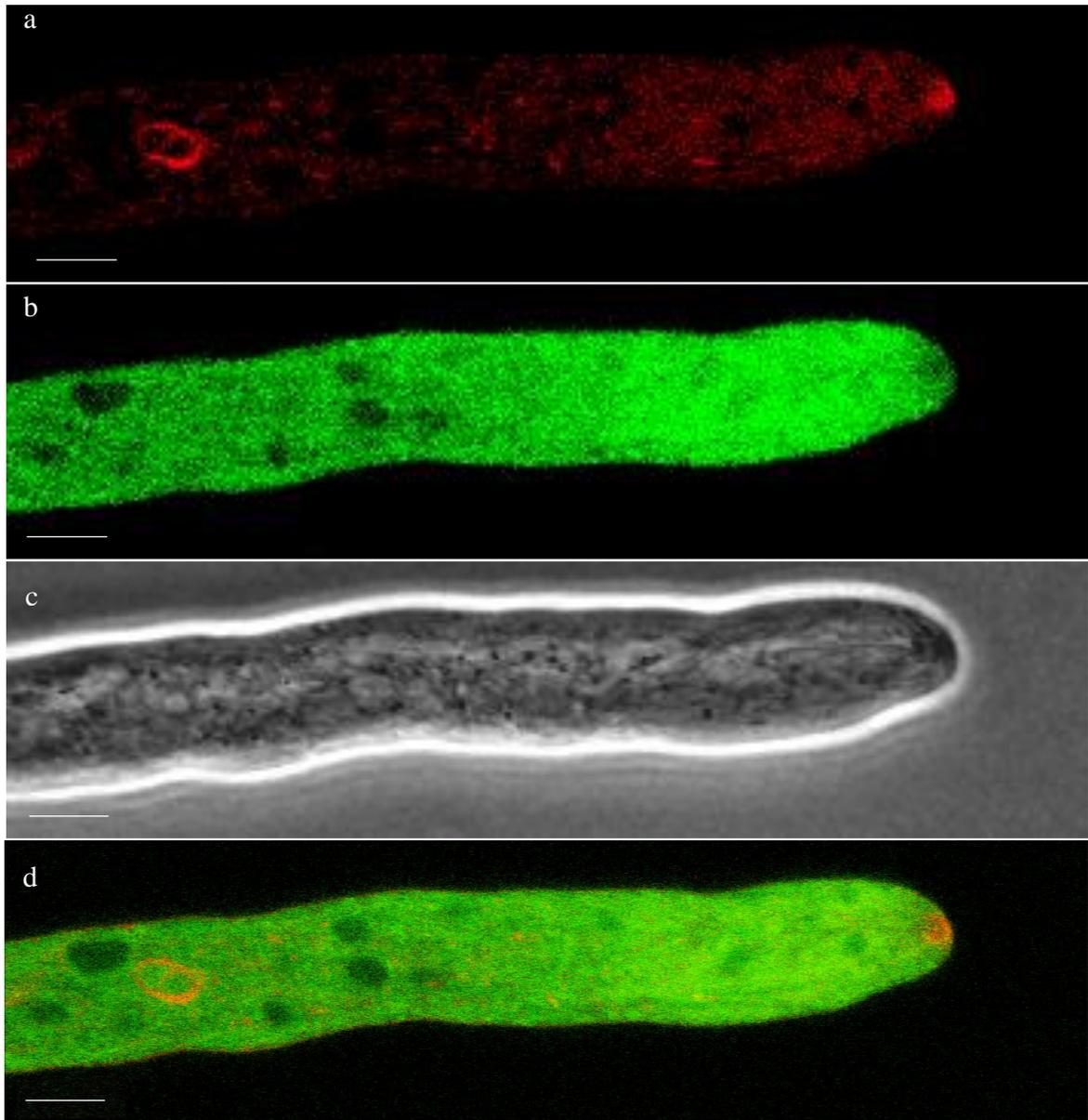


Figura 30. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser de la localización SEC-4 etiquetada con GFP. Objetivo 100X. a) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1 marcaje con FM4-64; la fluorescencia se localiza en la región apical y subapical. b) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1; la fluorescencia se localiza en la región subapical con una distribución citoplasmática. c) Transformante *N. crassa* TSec-4-gly-G-1 observación bajo microscopía de contraste de fases; se observó que una pequeña parte del Spk corresponde al área sin fluorescencia observada en b, d) Transformante *N. crassa* Tsec-4-gly-G-1 superposición de a y b; se observó que no hay colocalización de los marcajes de FM4-64 y GFP. Barra 5 μ m.

VIII.6. Caracterización de las cepas mutantes

- **Obtención de la cepa *N. crassa* $\Delta sec-2$**

La cepa *N. crassa* $\Delta sec-2$ fué proporcionada por Darmouth Proyecto Genome.

- **Obtención de la cepa *N. crassa* $\Delta sec-4$ (TGasa)**

Con la finalidad de establecer el papel de SEC-4 en la morfogénesis de *N. crassa*, se procedió a transformar conidios de la cepa 9718 con la construcción de un cassette cuya finalidad es la de eliminar el gen de *sec-4*. Obtuvimos 10 colonias en las placas de selección tal como se muestra en la figura 31 y se crecieron por separado a 25 °C y 30 °C. De éstas colonias, únicamente 2 presentaron un crecimiento más afectado a 30 °C y en menor grado a 25 °C en comparación a la de las cepas utilizadas como control (Figuras 32 y 33).



Figura 31. Colonias de las transformantes *N. crassa* TGasa en medio de recuperación incubadas por 3 días a 30°C.

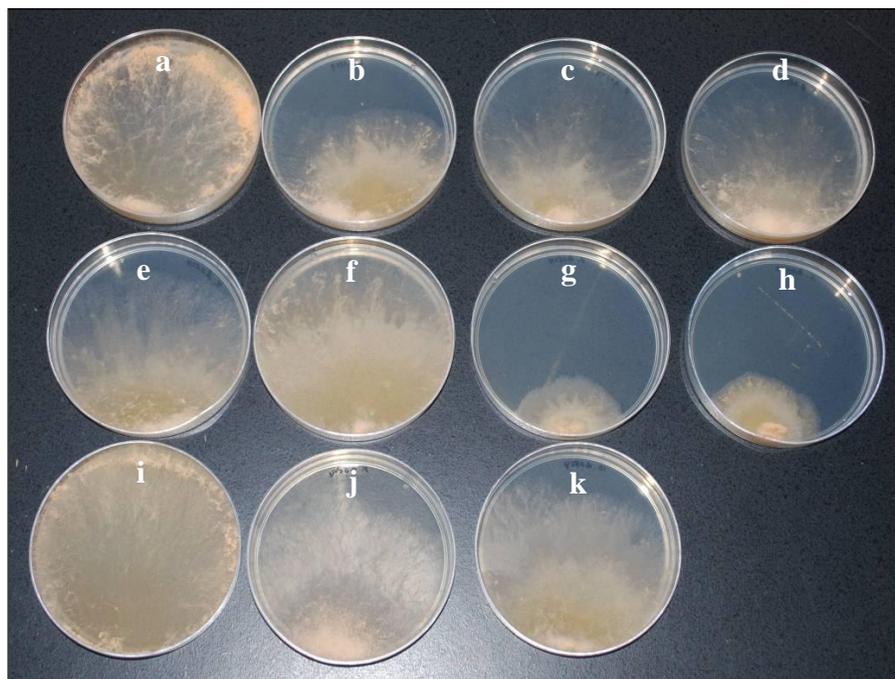


Figura 32. Colonias en placas Petri con MMV incubadas por 72 hr a 25 °C. a) *N. crassa* como control. b-k) Transformantes *N. crassa* TGasa.

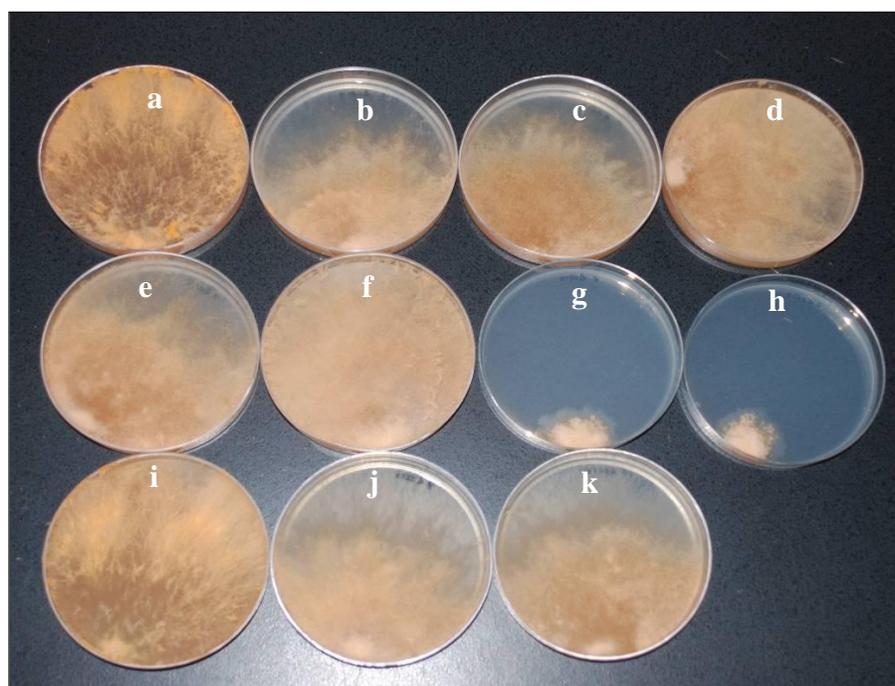


Figura 33. Colonias en placas Petri con MMV incubadas por 72 hr a 30 °C. a) *N. crassa* como control. b-k) Transformantes *N. crassa* TGasa.

VIII.7. Corroboración de la eliminación de los genes *sec-2* y *sec-4*

Para este experimento se realizó los cultivos de micelio en MMV líquido de las cepas O.K. de *sec-2* y *sec-4* para obtener el ADN genómico que se utilizó como templado en las reacciones de PCR para corroborar la eliminación de estos genes (Figura 34). Los cultivos de micelio de las cepas de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 (Figura 35 b y c) presentaron una morfología diferente al micelio de la cepa control de *N. crassa* (Figura 35 a).

Se comprobó mediante PCR la eliminación de los genes *sec-4* (NCU06404.3) y *sec-2* (NCU01911.3); demostrando de esta forma la ausencia de estos genes en la cepa de *N. crassa* $\Delta sec-2$, TGasa-1 y TGasa-2 respectivamente, tal como se observa en las figuras 36 y 37.

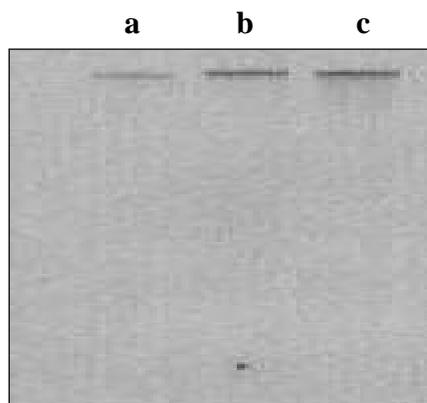


Figura 34. ADN genómico de a) *N. crassa* $\Delta sec-2$ b) *N. crassa* TGasa-1, c) *N. crassa* TGasa-2. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.



Figura 35. Cultivos de micelio de las mutantes $\Delta sec-4$ en MMV líquido en condiciones de oscuridad por 7 días a 30 °C. a) *N. crassa* como control, el micelio es una masa continua. b y c) *N. crassa* TGasa-1 y *N. crassa* TGasa-2, respectivamente. Se observó en b y c que el micelio está fragmentado.

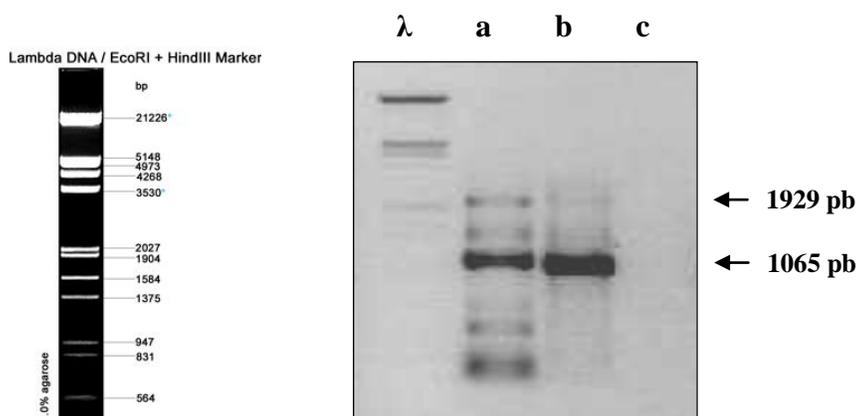


Figura 36. Corroboración de la eliminación del gen *sec-2* (1929 pb) por PCR. a) control: oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-2* usando ADN genómico de *N. crassa* como templado. b) control: oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-4* (1065 pb) usando ADN de *N. crassa* Δ *sec-2* como templado. c) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-2* usando ADN genómico de *N. crassa* Δ *sec-2* como templado. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.

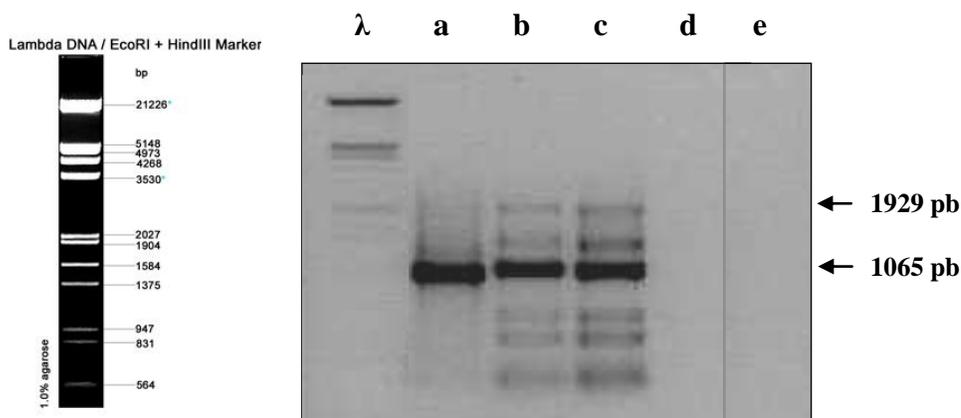


Figura 37. Corroboración de la eliminación del gen *sec-4* (1065 pb) por PCR. a) control: oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-4* usando ADN genómico de *N. crassa* como templado. b) control: oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-2* (1929 pb) usando ADN de *N. crassa* TGasa-1 como templado. c) control: oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-2* (1929 pb) usando ADN de *N. crassa* TGasa-2 como templado. d) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-4* usando ADN genómico de *N. crassa* TGasa-1 como templado. e) Ausencia de la amplificación con los oligonucleótidos P1 y P2 para *sec-4* usando ADN genómico de *N. crassa* TGasa-2 como templado. Gel de agarosa al 1% y 0.01 de bromuro de etidio.

VIII.8. Análisis de las tasas de crecimiento de las mutantes

- **Tasa de crecimiento de *N. crassa* $\Delta sec-2$**

La tasa de crecimiento de esta cepa ($25.0 \mu\text{m min}^{-1}$) fue muy similar a la de la cepa control ($24.0 \mu\text{m min}^{-1}$). Por lo que no existe diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de estas cepas (prueba T con una $P > 0.05$). Este patrón se repitió en las réplicas realizadas (Figura 38).

- **Tasa de crecimiento de *N. crassa* TGasa-1**

La tasa de crecimiento de la *N. crassa* TGasa-1 ($3.0 \mu\text{m min}^{-1}$) fue menor que la cepa control ($23.0 \mu\text{m min}^{-1}$). Por lo que existe diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de estas cepas (prueba T con una $P < 0.05$). Este patrón se repitió en las réplicas realizadas en las cepas TGasa-1 así como en las cepas TGasa-2 (Figura 39).

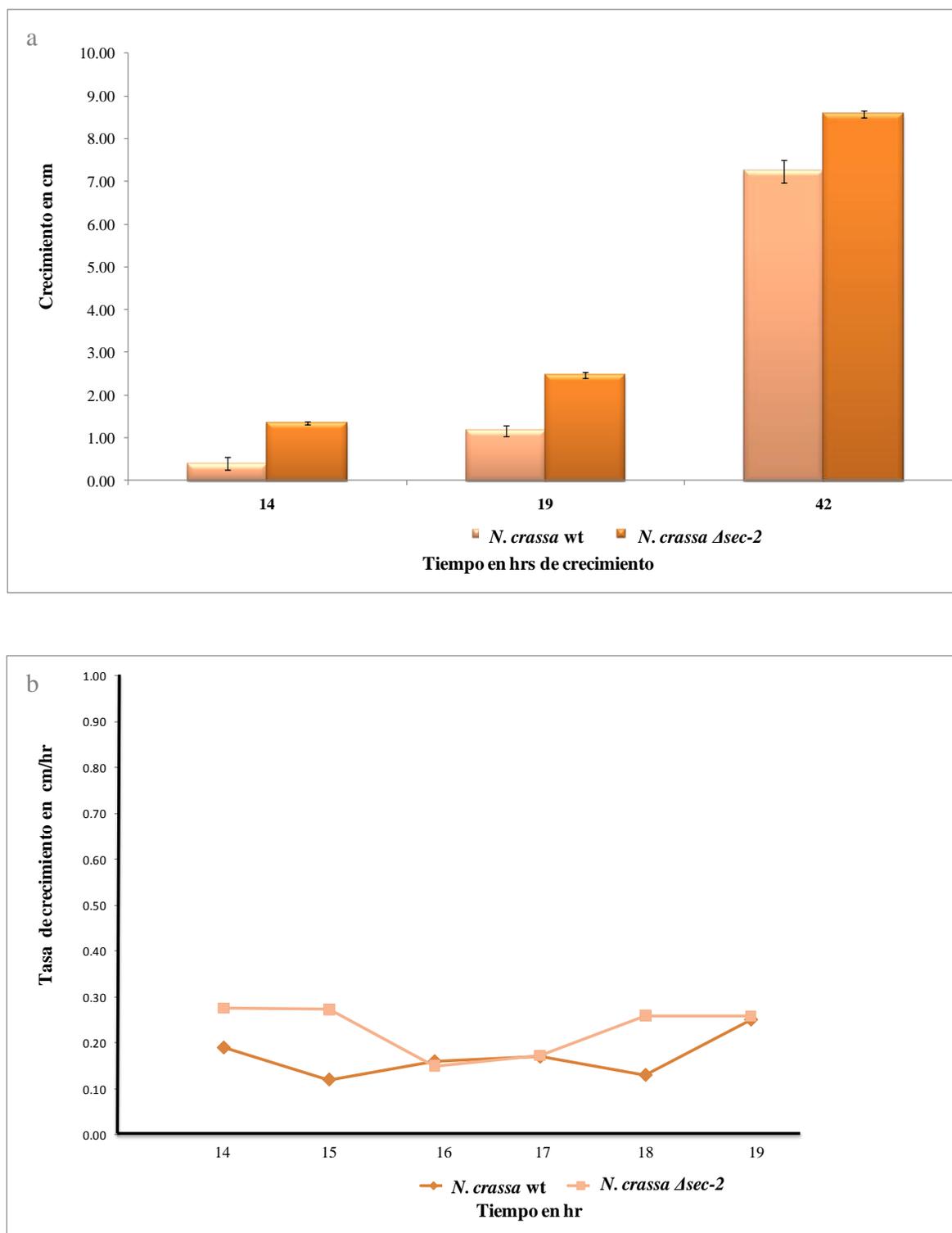


Figura 38. Análisis del crecimiento de *N. crassa* $\Delta sec-2$. a) Medición del crecimiento. b) Medición de la tasa de crecimiento.

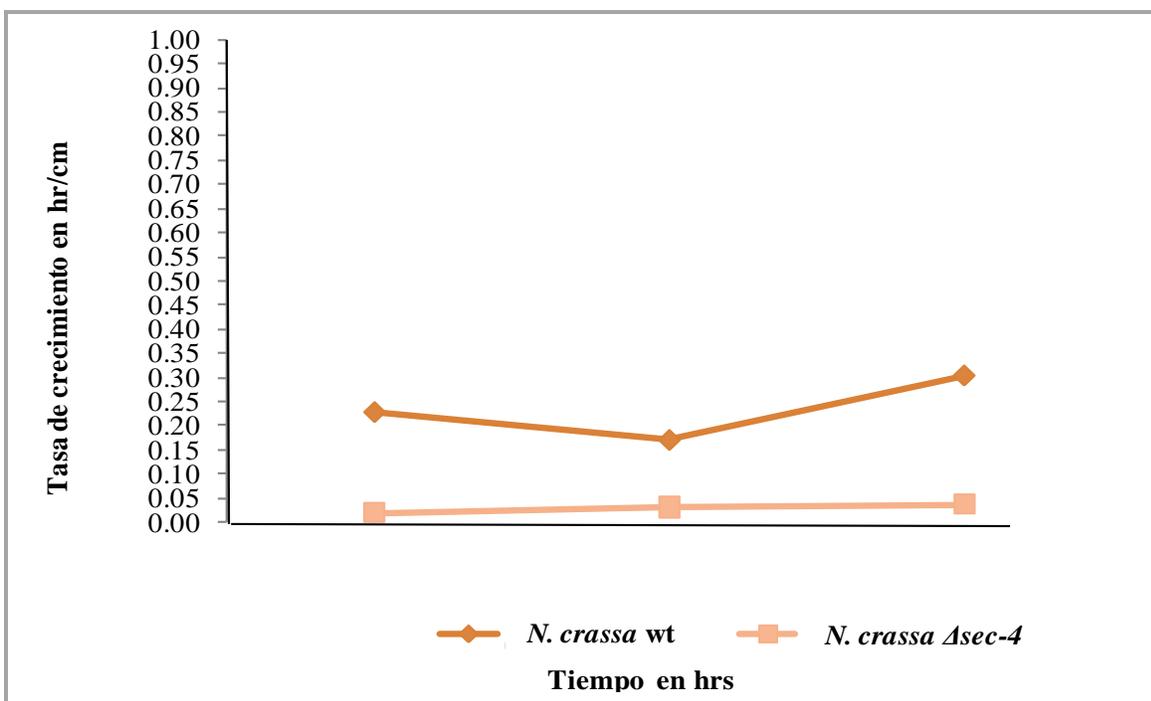
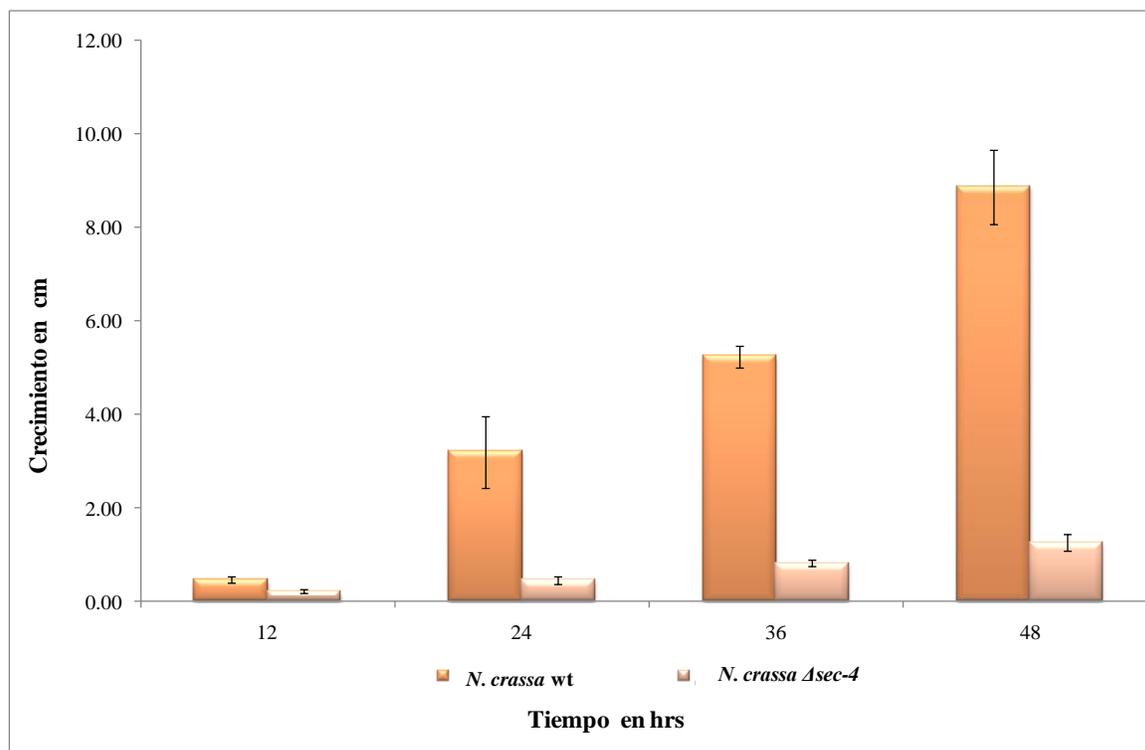


Figura 39. Análisis del crecimiento de de *N. crassa* TGasa-1. a) Medición del crecimiento. b) Medición de la tasa de crecimiento.

VIII.9. Análisis de la morfología macroscópica de las mutantes

- **Morfología de la colonia de *N. crassa* $\Delta sec-2$**

La morfología de la colonia de *N. crassa* $\Delta sec-2$ es muy similar a la observada en la cepa control de *N. crassa* (FGSC# 9718) (Figura 40). Así mismo, las colonias de *N. crassa* $\Delta sec-2$ incubadas a 2 temperaturas diferentes (25 °C y 30 °C) presentaron una apariencia similar a la morfología de la cepa control (Figura 41).

- **Morfología de la colonia de *N. crassa* TGasa-1**

La ausencia de *sec-4* repercute en la morfología de la colonia. El crecimiento de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 en MMV a temperatura ambiente (25 °C) mostraron colonias de menor diámetro que la cepa control. Estas colonias mostraron una textura aterciopelada de color naranja pálido, de topografía colonial elevada en la región central y en la periferia un poco algodonosa por la presencia de hifas aéreas de tamaño similar a la cepa control, con bordes ondulados y de menor tamaño que la cepa control (Figura 42 a, b y c). La morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa-1 fueron comparadas con la cepa *N. crassa* FGSC# 9718, ya que se derivan de esta cepa.

Las colonias de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 incubadas a 30 °C presentaron un menor diámetro comparado a la de la colonia incubada a 25 °C así como la de la cepa control (Figura 42 d). Presentaron una textura algodonosa de color blanco en casi toda la colonia ya que en la periferia presenta pequeños parches de color naranja pálido, la topografía colonial presenta elevaciones en forma de valles, bordes irregulares no uniformes (Figura 42 e y f).

La observación continua a las 24, 48 y 72 horas de las cepas de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 incubadas a 30 °C permitió una descripción más detallada la morfología de la colonia de estas cepas en comparación con la de la cepa control de *N. crassa*.

La morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 a las 24 horas de crecimiento midieron de 5-8 mm de diámetro, presentaron una textura coreosa con aspecto viscoso, topografía aplanada, en la región central se observó de color naranja donde se había colocado el inóculo de conidios y en la periferia de color blanco, de bordes ondulados; no uniformes a lo largo del diámetro de la colonia (Figura 43 a, b y c).

La morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 a las 48 horas de crecimiento midieron de 16-20 mm de diámetro, presentaron una línea circular de 2-3 mm de grosor formada de micelio adherido en el agar que dividía a la colonia en dos regiones, la región central de topografía aplanada de color blanco con apariencia aterciopelada y la región periférica de topografía colonial elevada con apariencia algodonosa de color blanco. Los bordes de la colonia eran ondulados no uniformes alrededor de la colonia (Figura 43 d, e y f).

La morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 a las 72 horas de crecimiento midieron de 30-40 mm de diámetro, presentaron una topografía aterciopelada en la región central de color naranja y en la periferia un poco algodonosa de color blanco, los bordes eran ondulados, no uniformes, más marcados a lo largo del diámetro de la colonia lo que le proporcionó una apariencia de huevo estrellado (Figura 43 g, h e i).

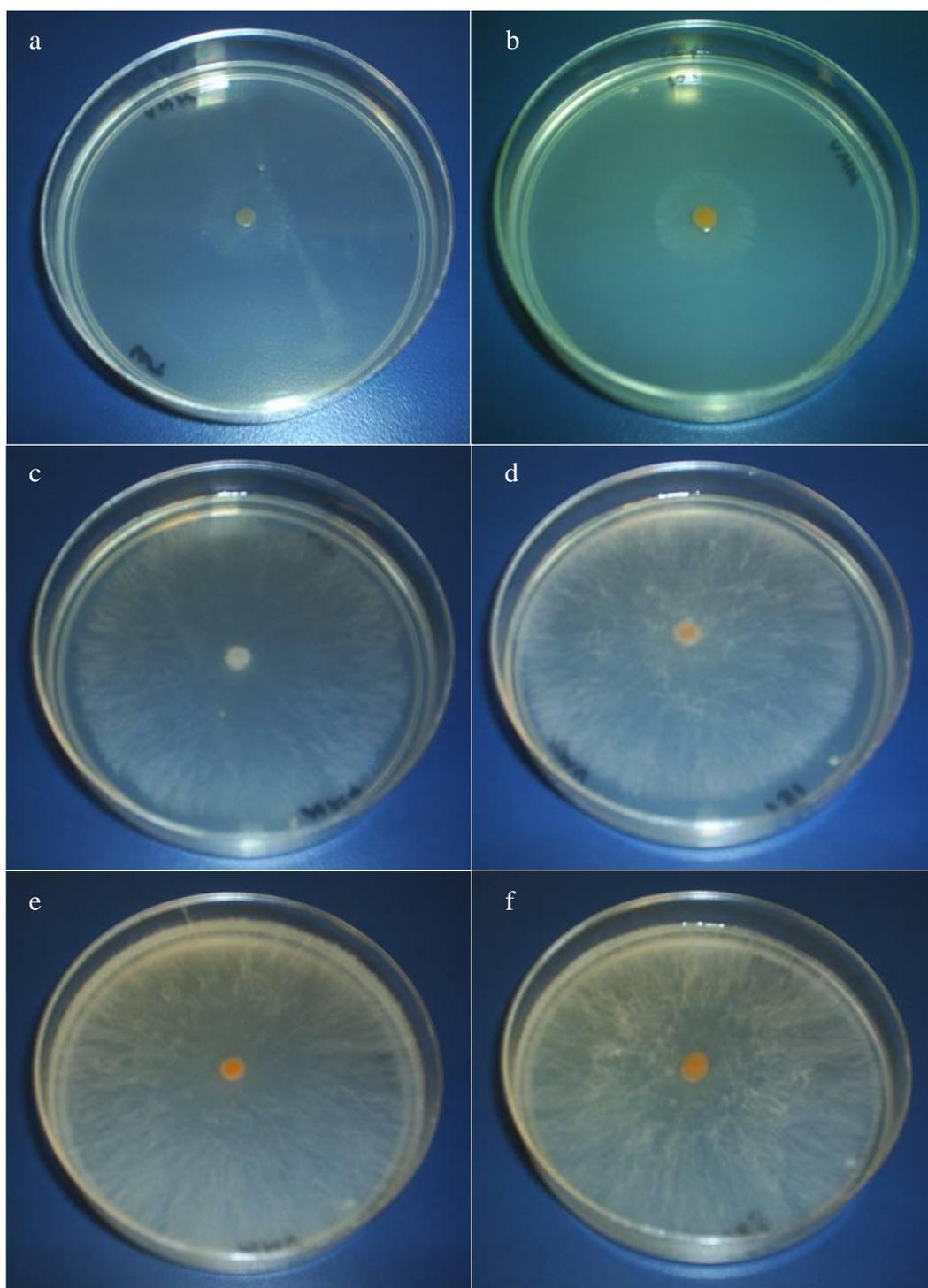


Figura 40. Morfología de la colonia de *N. crassa* $\Delta sec-2$ incubada a 30 °C. a, c, d) cepa control de *N. crassa* N1 (FGSC# 9718) a las 12, 24 y 48 hrs respectivamente. b, d y f) *N. crassa* $\Delta sec-2$ a las 12, 24 y 48 hrs respectivamente.

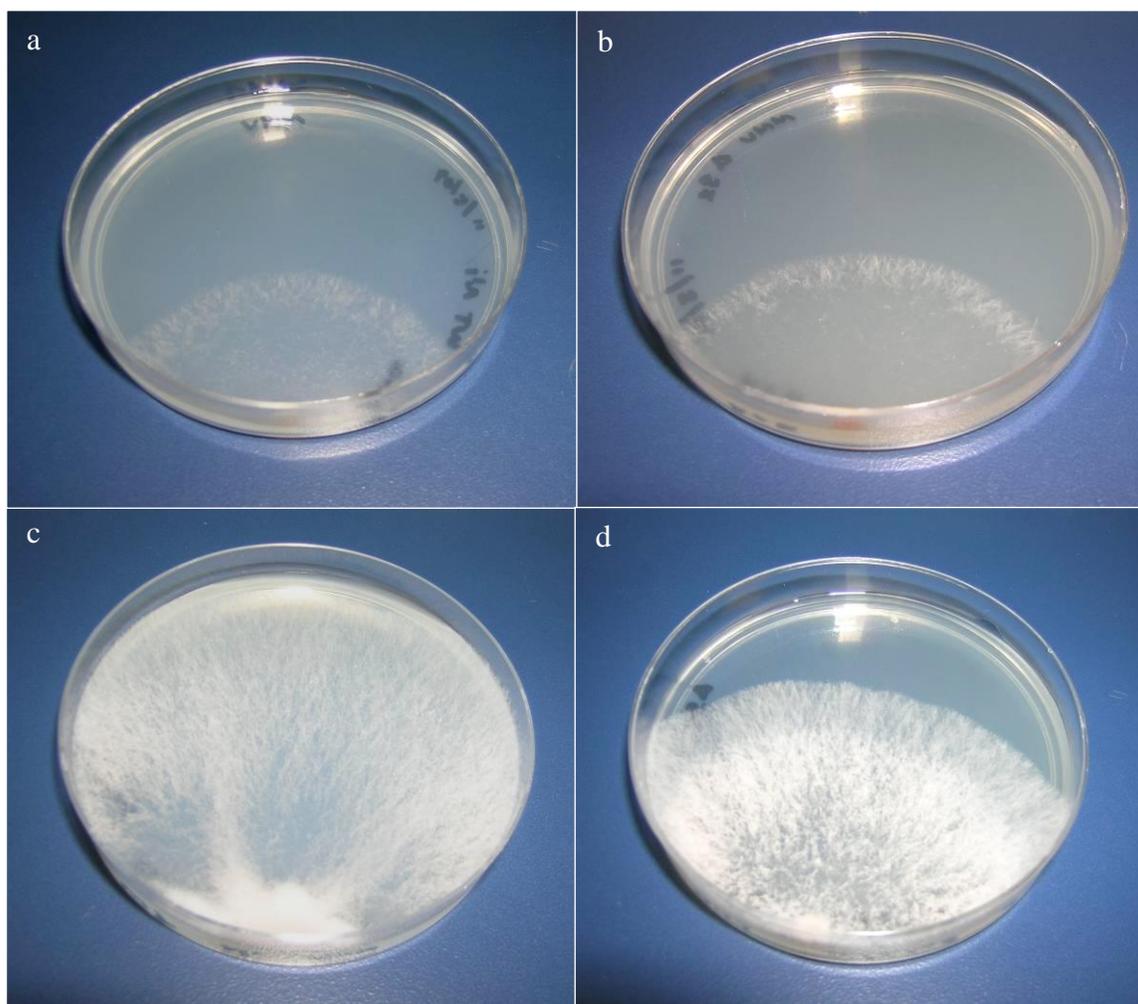


Figura 41. Comparación de la morfología de la colonia de *N. crassa* $\Delta sec-2$ a las 26 hr de crecimiento. a, c) *N. crassa* (FGSC# 9718) como control incubada a 25 °C y 30 °C. b, d) *N. crassa* $\Delta sec-2$ incubada a 25 °C y 30 °C.

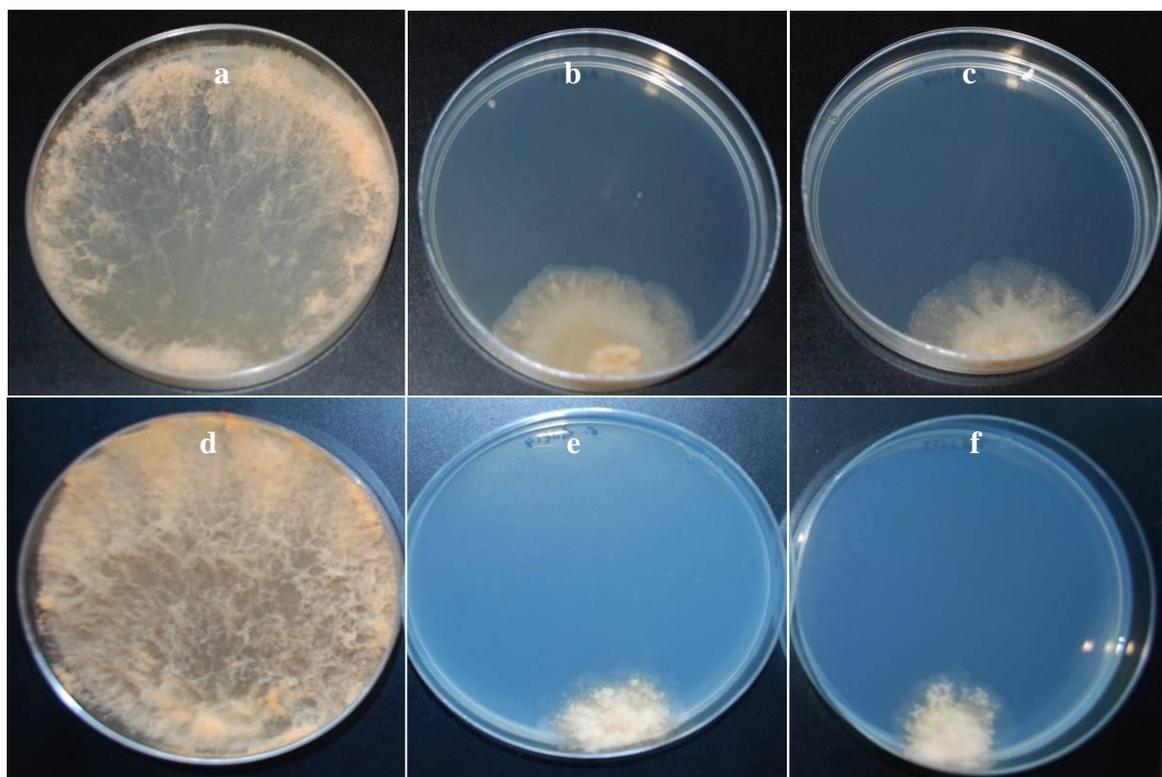


Figura 42. Comparación de la morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa a diferentes temperaturas a las 26 horas de crecimiento. a, d) *N. crassa* (FGSC# 9718) como control incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente. b, e) *N. crassa* TGasa-1 incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente. c, f) *N. crassa* TGasa-2 incubada a 25 °C y 30 °C, respectivamente.

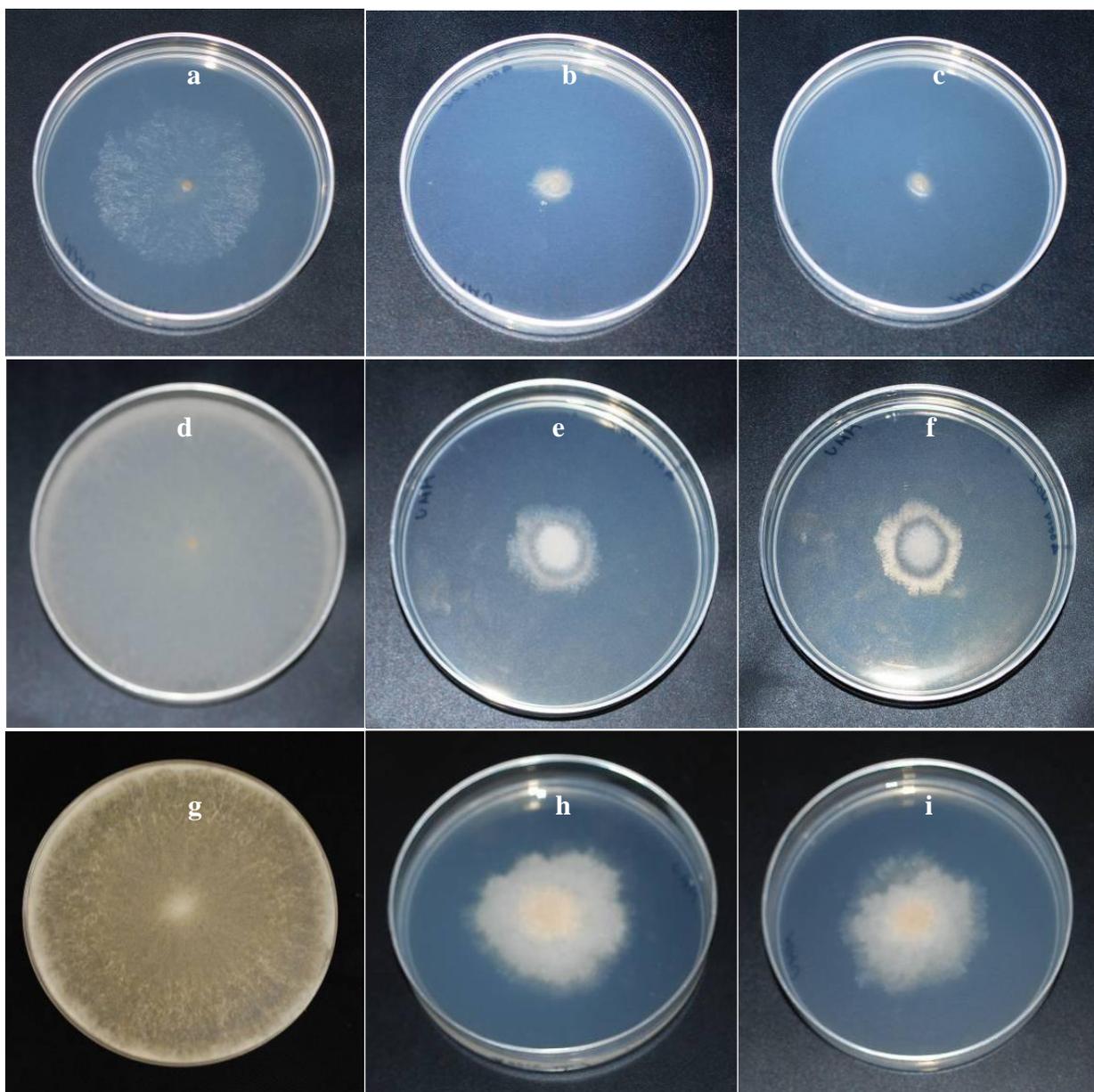


Figura 43. Observación de la morfología de las colonias de *N. crassa* TGasa. a, d, g) *N. crassa* (FGSC# 9718) como control a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente. b, e, h) *N. crassa* TGasa-1 a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente. c, f, i) *N. crassa* TGasa-2 a las 24, 48 y 72 hrs de crecimiento, respectivamente.

VIII.10. Análisis de la morfología micelial de las mutantes

- Análisis de *N. crassa* $\Delta sec-2$

N. crassa $\Delta sec-2$ no mostró diferencias morfológicas comparadas a la cepa de *N. crassa* FGSC# 9718 utilizada como control, a diferentes aumentos (Figura 44).

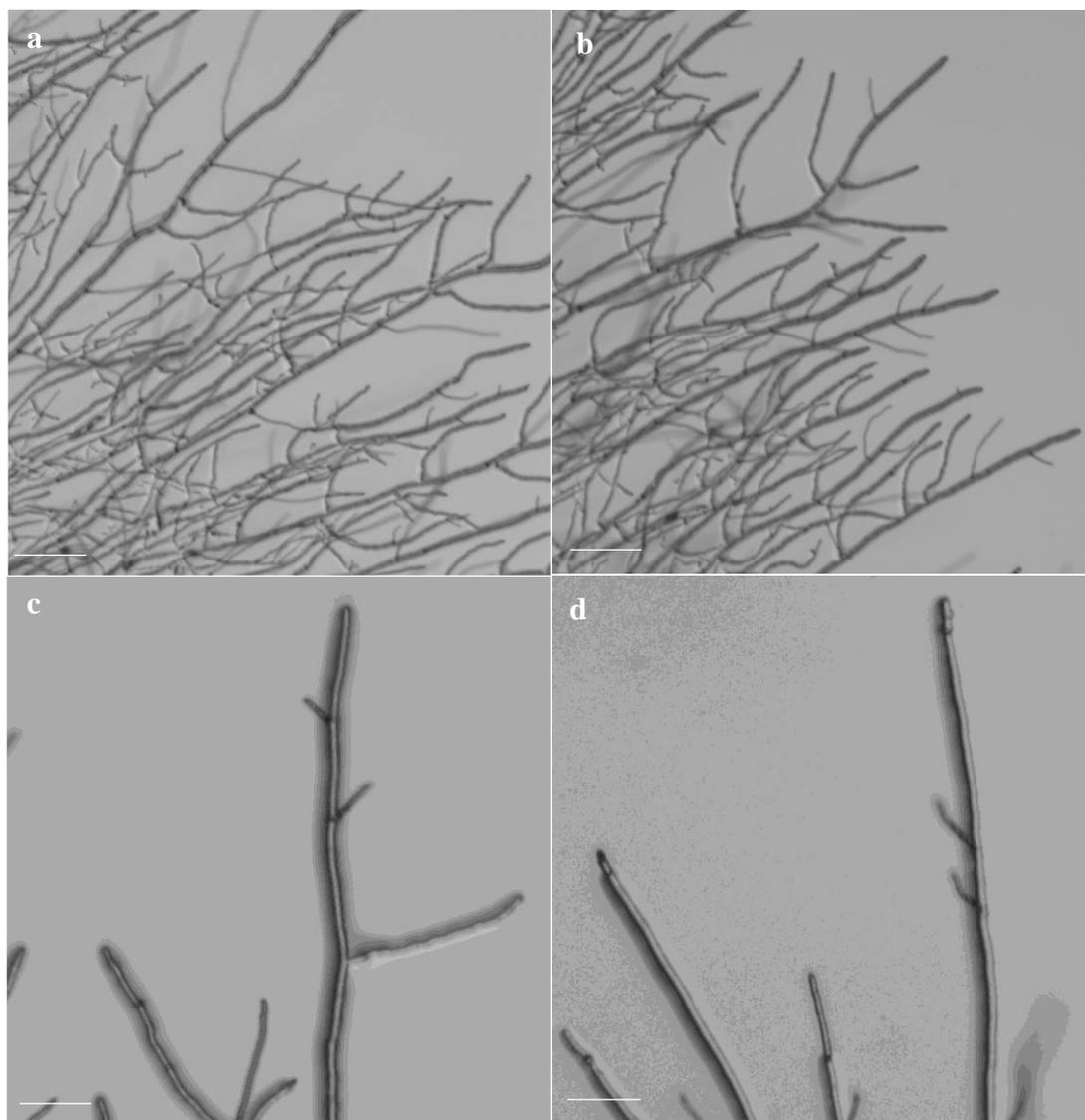


Figura 44. Microscopía de bajo aumento. a, c) *N. crassa* como control; objetivo 20X y barra 1000 μm; objetivo 40X y barra 100 μm, respectivamente. b) *N. crassa* $\Delta sec-2$; objetivo 20X y barra 1000 μm; objetivo 40X y barra 100 μm, respectivamente.

- **Análisis de la TGasa-1**

Reveló la presencia de una mayor cantidad de hifas aéreas que la cepa control. Las hifas se congregaron de forma diferente a la disposición usual de *N. crassa*. Asimismo las hifas fueron más delgadas y estaban apiladas muy cerca unas de otras formando una malla apretada (Figura 45 b). El patrón de ramificación de *N. crassa* TGasa-1 fue diferente a la cepa control, las ramas estuvieron onduladas y en mayor cantidad (Figura 45 d). También presentaron ramas laterales cortas en disposición helicoidal (Figura 45 f).

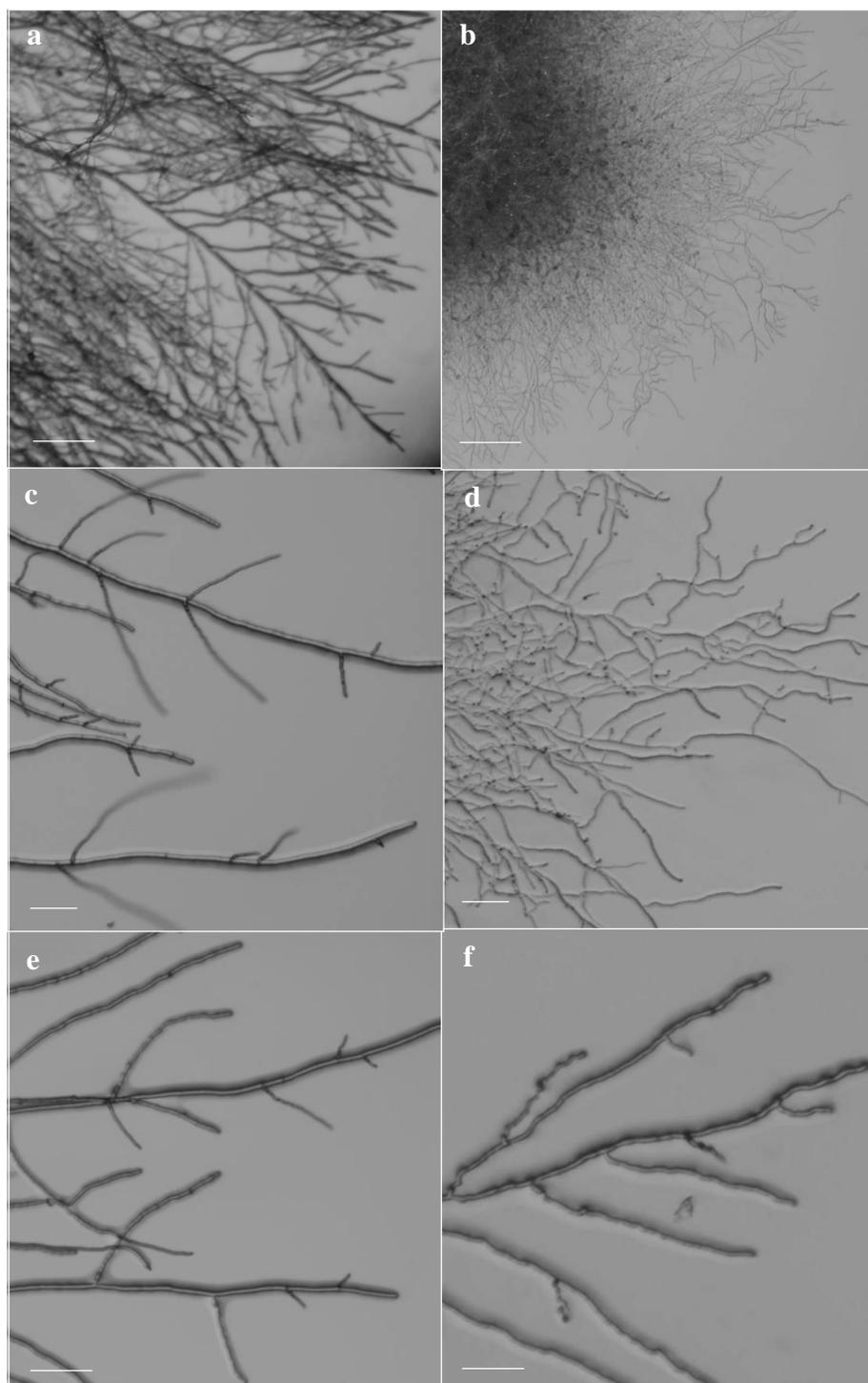


Figura 45. Microscopía de bajo aumento. a, c y e) *N. crassa* como control; objetivo 7X y barra 1000 μm ; objetivo 25X y barra 500 μm ; objetivo 90X y barra 100 μm , respectivamente. b, d, f) *N. crassa* TGasa-1; objetivo 7X y barra 1000 μm ; objetivo 25X y barra 500 μm ; objetivo 90X y barra 100 μm , respectivamente.

VIII.11. Análisis de la morfología microscópica de las mutantes

El análisis de la morfología a nivel de hifas de *N. crassa* $\Delta sec-2$ mediante microscopía de fases no mostró diferencia en comparación a la cepa control (Figura 46 a y b). También se observó en algunas ocasiones durante el crecimiento de hifas de *N. crassa* $\Delta sec-2$, movimientos ondulantes de la hifa (Figura 46 c). El diámetro del diámetro del Spk (se midió cuando era más evidente durante el crecimiento) de *N. crassa* $\Delta sec-2$ ($\pm 0.81-1.67 \mu\text{m}$) es similar al diámetro del Spk de *N. crassa* FGSC# 9718 utilizada como control ($\pm 0.86-1.6 \mu\text{m}$) (Tabla V) (Figura 47).

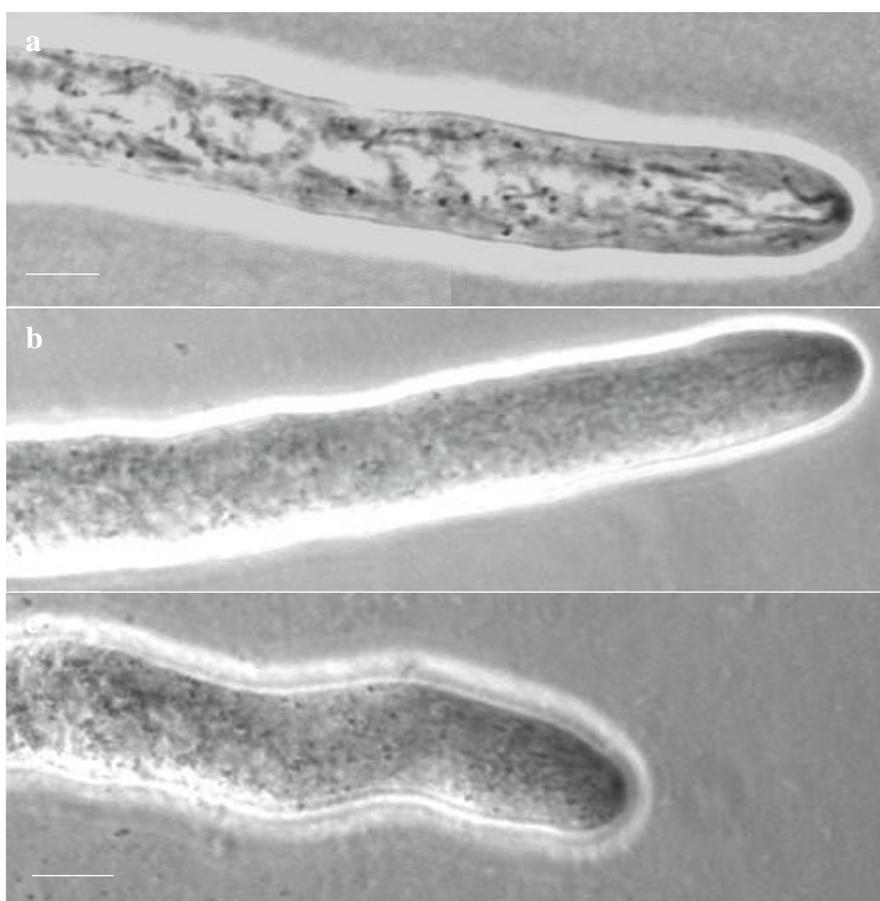


Figura 46. Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) *N. crassa* como control, b, c) *N. crassa* $\Delta sec-2$. Barra 5 μm .

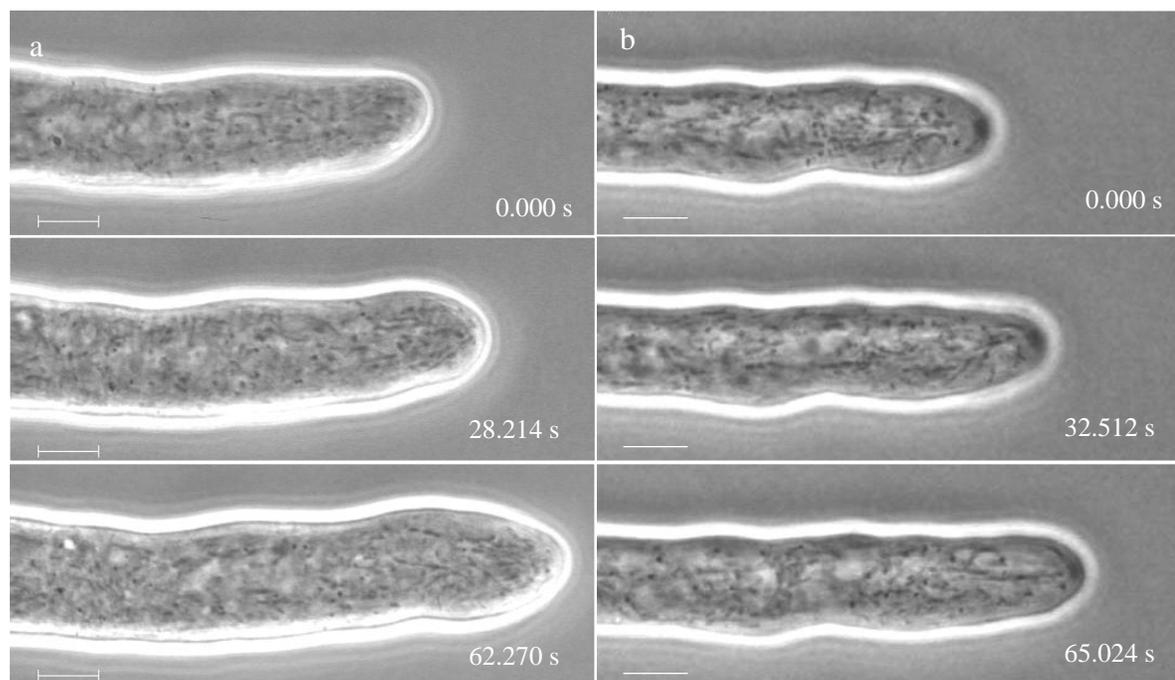


Figura 47. Observación mediante microscopía de contraste de fases de fases de la tasa de crecimiento hifal durante el crecimiento vegetativo. Objetivo a 100X. a) *N. crassa* como control. b) *N. crassa* Δ *sec-2* nótese que la elongación de la hifa en el tiempo es muy similar al control. Barra 5 μ m.

Tabla V. Comparación del diámetro (μ m) del Spk de *N. crassa* wt (9718) con las cepas mutantes.

<i>N. crassa</i> wt	<i>N. crassa</i> Δ <i>sec-2</i>	<i>N. crassa</i> TGASA-1
0.82	0.81	0.49
1.02	0.89	0.57
1.08	0.92	0.59
1.08	1	0.64
1.1	1.05	0.65
1.15	1.07	0.72
1.16	1.09	0.75
1.2	1.1	0.8
1.2	1.13	0.81
1.22	1.23	0.87
1.24	1.25	0.89
1.25	1.3	0.92
1.4	1.3	0.94
1.44	1.34	0.99
1.44	1.37	1.13
1.44	1.39	1.15
1.44	1.44	1.19
1.48	1.45	1.2
1.53	1.5	1.25
1.6	1.67	1.25

- **Análisis de *N. crassa* TGasa-1**

El análisis de la morfología mediante microscopía de fases a nivel de hifas de la *N. crassa* TGasa-1 y TGasa-2 mostró que éstas presentaban serios defectos morfológicos. Las hifas mostraron alteraciones que consistieron en, variaciones en los diámetros apicales, hifas amorfas con diámetros variables en su longitud observándose zonas gruesas y zonas estrechas, hifas helicoidales, hifas con aéreas constreñidas, una inusual ramificación, la formación de las ramas cercanas unas de otras que no están plenamente desarrolladas, el aumento de la presencia de septos y una acumulación de vacuolas en las regiones distales de las hifas (Figura 48-53). También se observaron frecuentemente hifas con la región apical rota y septos muy cercanos a la región apical a 10-20 μm del ápice hifal (Figura 52). El marcaje de hifas de *N. crassa* TGasa-1 con FM4-64 permitió la observación de formación de septos muy cercanos a la punta de la hifa (n= 10 hifas) cuando habían sufrido una ruptura en la región apical (Figura 53).

El Spk presentó movimientos abruptos que causaban cambios en la dirección del crecimiento así como la deformación de la región apical (Figura 50). El diámetro del Spk de la *N. crassa* TGasa-1 (0.86-1.6 μm) presentó un diámetro menor comparado al presente en *N. crassa* FGSC# 9718 como control (0.49-1.25 μm) (Tabla V).

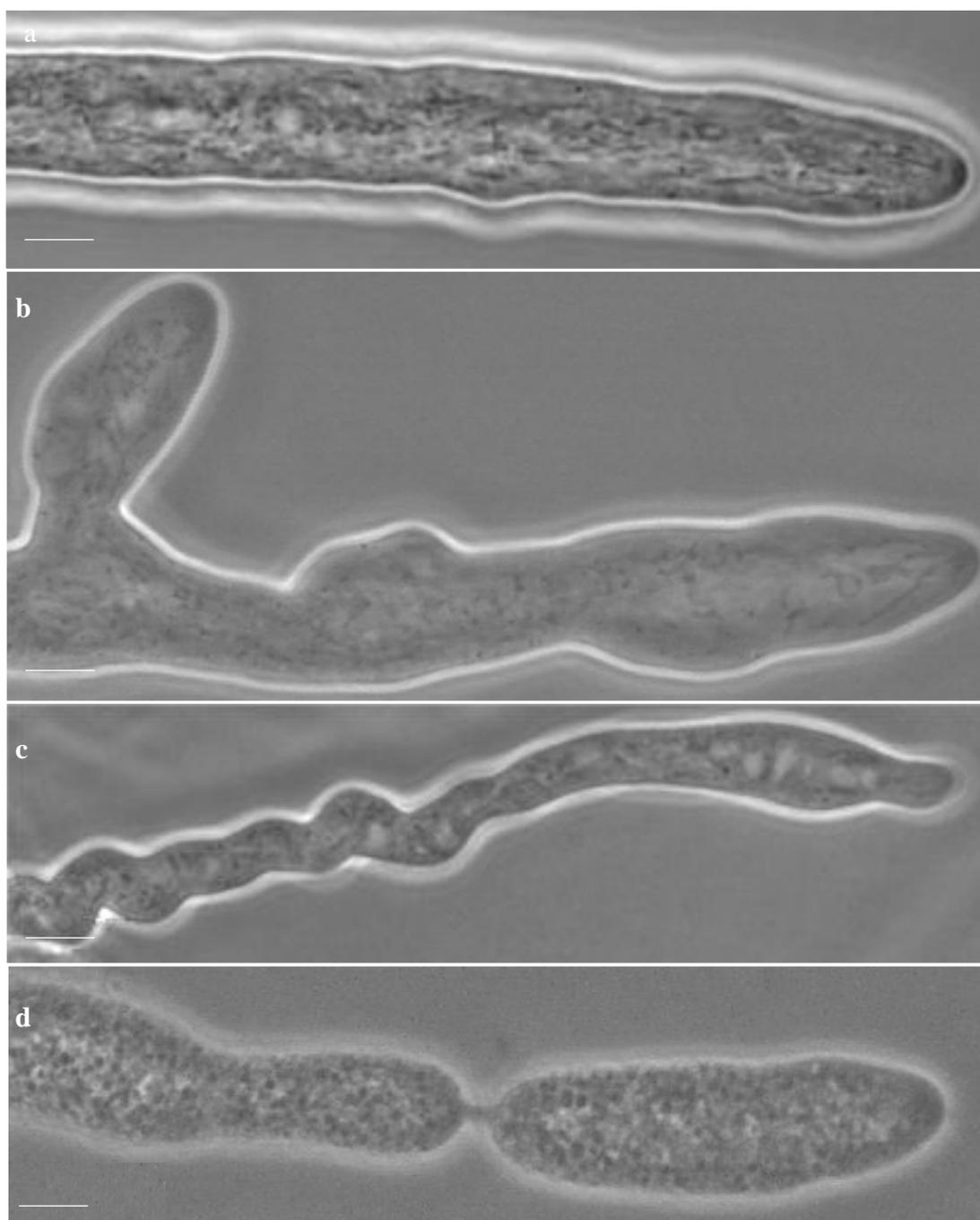


Figura 48. Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) *N. crassa* como control, b) *N. crassa* TGasa-1 hifas con regiones de grosor variable, c) *N. crassa* TGasa-1 hifas elicoidales, d) constricciones. Barra 5 μ m.

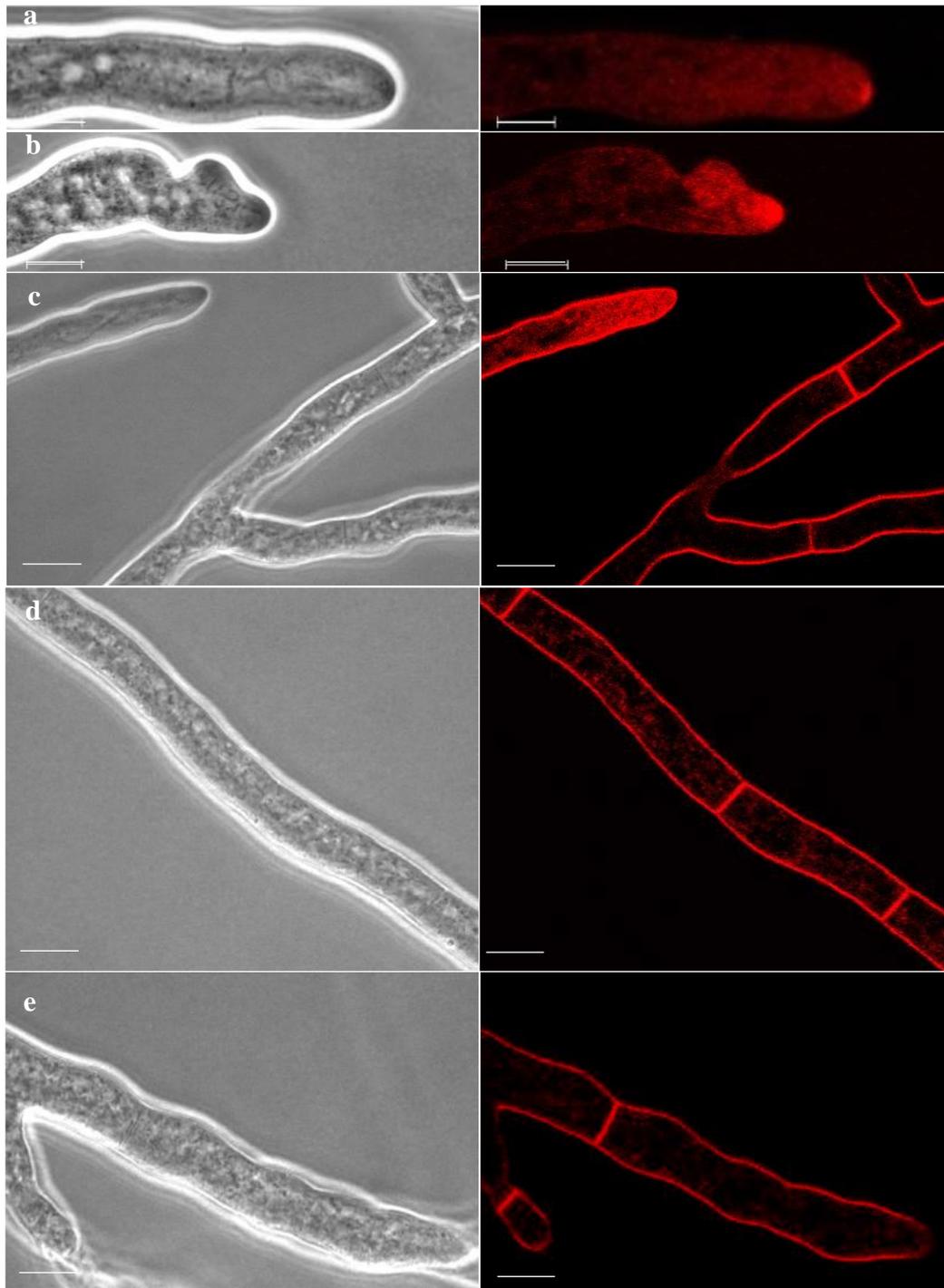


Figura 49. Marcaje con FM4-64. Objetivo 100X. a) *N. crassa* como control, b) *N. crassa* TGasa-1 ramificación inusual c y d) *N. crassa* TGasa-1 formación de septos continuos e) *N. crassa* TGasa-1 formación de septos muy cercanos al ápice. Barra 5 μ m.

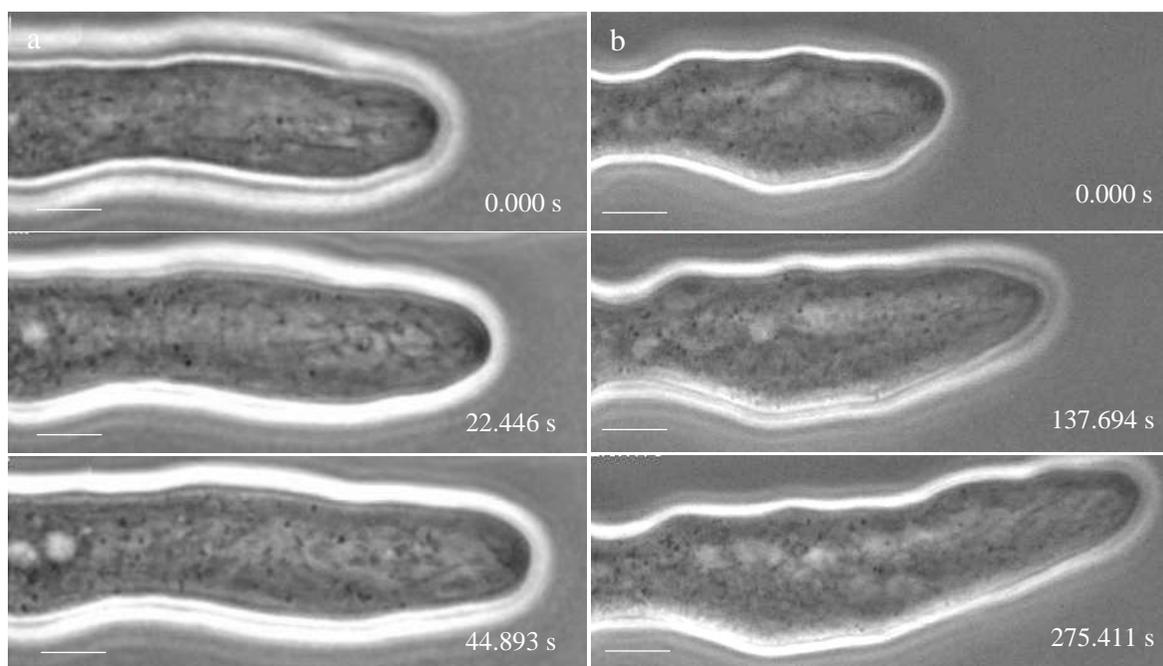


Figura 50. Observación mediante microscopía de contraste de fases de fases de la tasa de crecimiento hifal durante el crecimiento vegetativo. Objetivo 100X. a) *N. crassa* como control. b) *N. crassa* $T-\Delta sec-4-1$. Nótese que el tiempo de elongación de la hifa es mucho mayor que para la cepa silvestre y que las variaciones en el diámetro de la hifa afecta la morfología tubular de hifas. Barra 5 μ m.

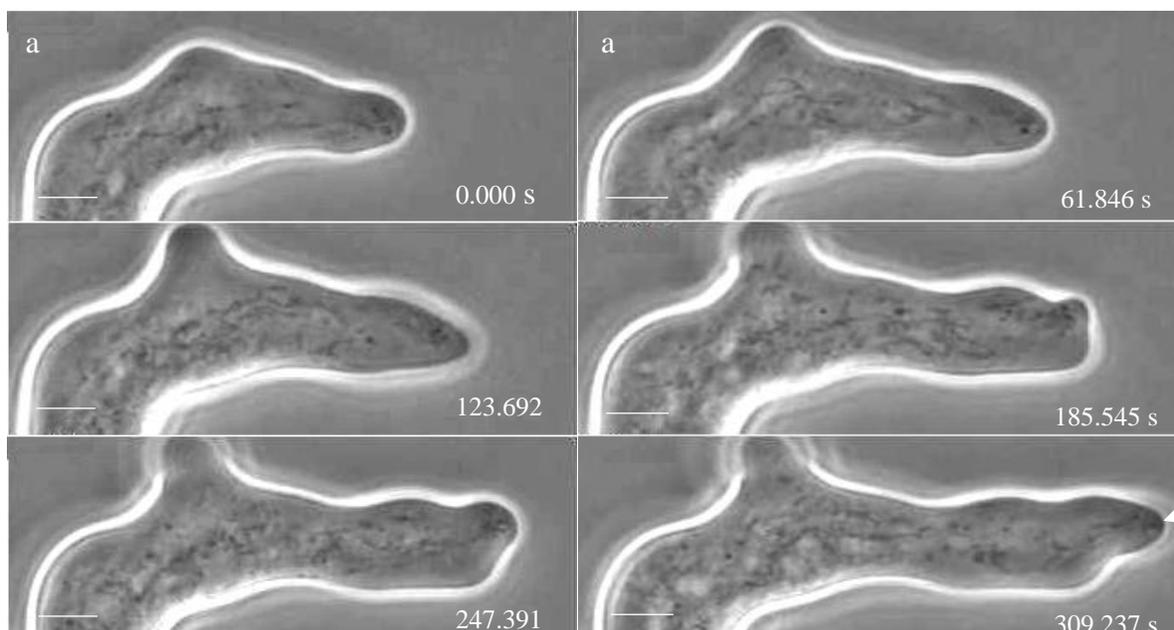


Figura 51. Observación bajo microscopía de contraste de fases. Objetivo 100X. a) *N. crassa* TGasa-1 se observa los movimientos bruscos del Spk durante el crecimiento que dan lugar a una hifa amorfa. La flecha señala el Spk, el cual, presentó un menor tamaño que el de la cepa control. Barra 5 μ m.

VIII.12. Cruzas entre la *N. crassa* TGasa-1 con 2 componentes del exocisto SEC-5-GFP y SEC-15-GFP

Las cruzas realizadas en este trabajo fueron las establecidas en la Tabla VI. Para la selección de la progenie de las cruzas los criterios a considerar fueron los establecidos en la Tabla VII. De las cruzas realizadas entre la cepa $\Delta sec-2$ y N623, únicamente obtuvimos la germinación de 6 ascosporas, de las cuales ninguna resultó ser $\Delta sec-2^{his-}$ al ser sometidas a los criterios de selección de esta cepa. La forma de los peritecios provenientes de esta crusa presentaron un cuello recto más alargado en comparación al cuello que poseen los peritecios normales de *N. crassa* (Figura 52). Obtuvimos satisfactoriamente la selección de progenie de las cruzas de *N. crassa* TGasa 3, TGasa-4 y TGasa-5. Es importante recalcar que la forma de los peritecios provenientes de estas cruzas presentaron una morfología diferente en comparación al cuello que poseen los peritecios normales de *N. crassa* (Figura 53).

Tabla VI. Cruzas realizadas en este trabajo.

Apareamiento de las cepas	Selección de la progenie
$\Delta sec-2$ (mat a) X N623(mat A)	$\Delta sec-2^{his-}$
TGasa-1 (mat a) X N150 (mat A)	TGasa-3
T-Gasa1 (mat a) X Tap-15-3-4 A his ³⁺	TGasa-4
T-Gasa-1 (mat a) X Tap-5-2-1 A his ³⁺	TGasa-5
ATPase nca-2 (mat a) X N623 (mat A)	ATPase nca-2 ^{his-}

Tabla VII. Caracteres a considerar en la selección de la progenie proveniente de las cruzas.

Progenie	Número de ascosporas germinadas seleccionadas	Morfología afectada	Crecimiento en histidina	Crecimiento en higromicina	Fluorescencia	Total
$\Delta sec-2^{his-}$	30	NA	2	1	NA	0
TGasa-5	30	7	NA	5	4	4
TGasa-4	30	6	NA	6	1	1
TGasa-3	30	5	NA	1	NA	1

NA: no aplica.

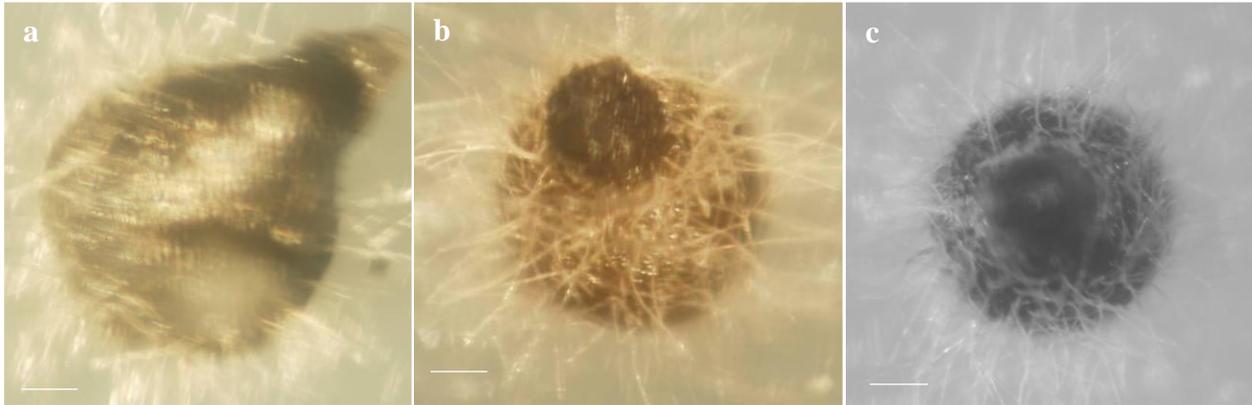


Figura 52. Microscopía de bajo aumento. Objetivo 40X. a) control: peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas *ATPase nca-2* con *N623*. b y c) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas *N623* con *N. crassa* Δ *sec-2* a los 25 días de crecimiento. Nótese la prolongación del cuello del peritecio. Barra 100 μ m.

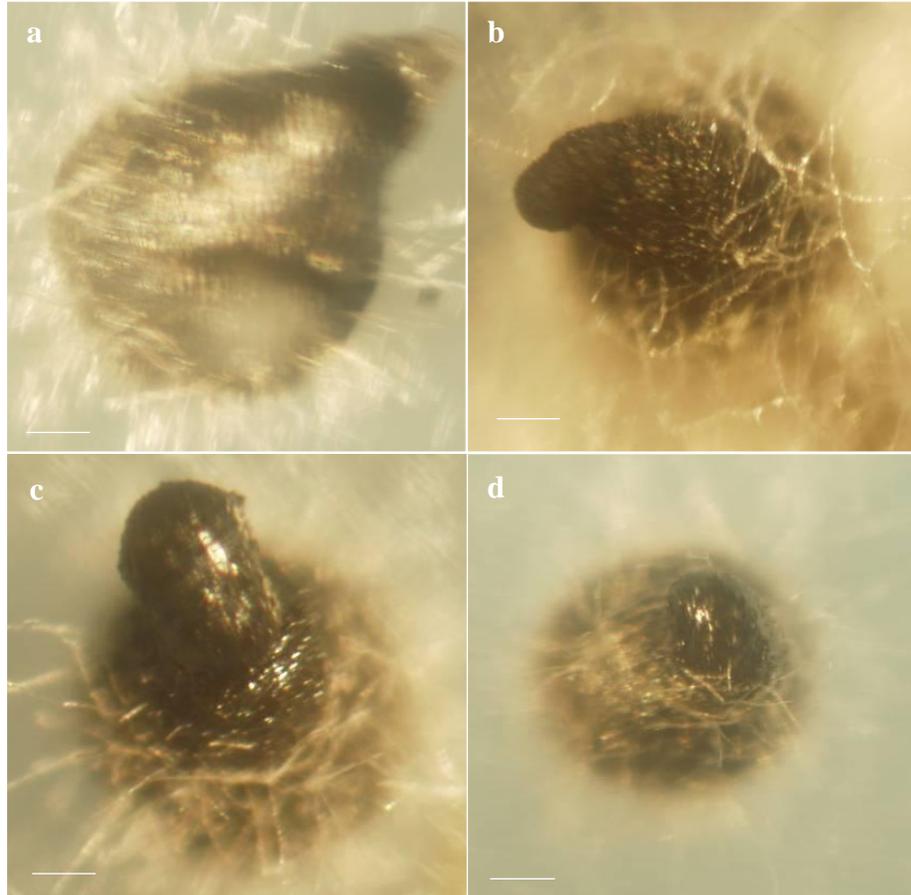


Figura 53. Microscopía de bajo aumento. Objetivo 40X. a) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas *ATPase nca-2* con *N623* como control. b) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas *N150* con *TGasa-1*. c) Peritecios obtenidos de las cruzas entre las cepas *sec-5-gfp* con *TGasa-1*. d) Peritecios obtenidos entre cruzas de las cepas *sec-15-gfp* con *TGasa-1*. A los 25 días de crecimiento. Barra 100 μ m.

El análisis de *N. crassa* TGasa-4 y TGasa-5 mediante microscopía confocal de escaneo con láser demostró que las proteínas SEC-5-GFP y SEC-15-GFP en estas cepas respectivamente, no se localizan en la membrana plasmática del ápice celular. En la cepa de *N. crassa* TGasa-5 el marcaje mostró una localización en forma dispersa en el citoplasma formando parches a lo largo de la hifa. Este marcaje encontrado no forma la capucha cortical de fluorescencia en la punta de la hifa (Figura 54). En la cepa de *N. crassa* TGasa-4 marcaje mostró una localización en puntos fluorescentes a lo largo de la hifa. No encontramos fluorescencia de SEC-15 en la región central de los septos (Figura 55).

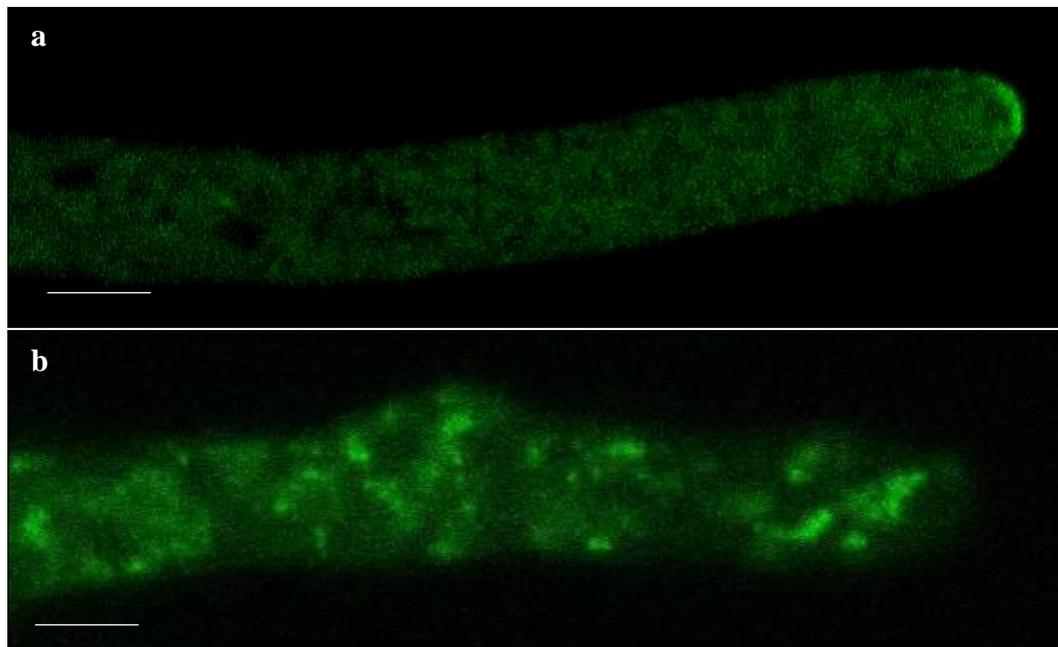


Figura 54. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser. Objetivo 100X. a) *N. crassa* SEC-5 componente del exocisto marcado con GFP, la fluorescencia se localiza en la región apical de la membrana plasmática. b) *N. crassa* TGasa-5 la fluorescencia no se acumula en la membrana plasmática; la fluorescencia está dispersa en parches a lo largo de la hifa. Barra 5 μm .

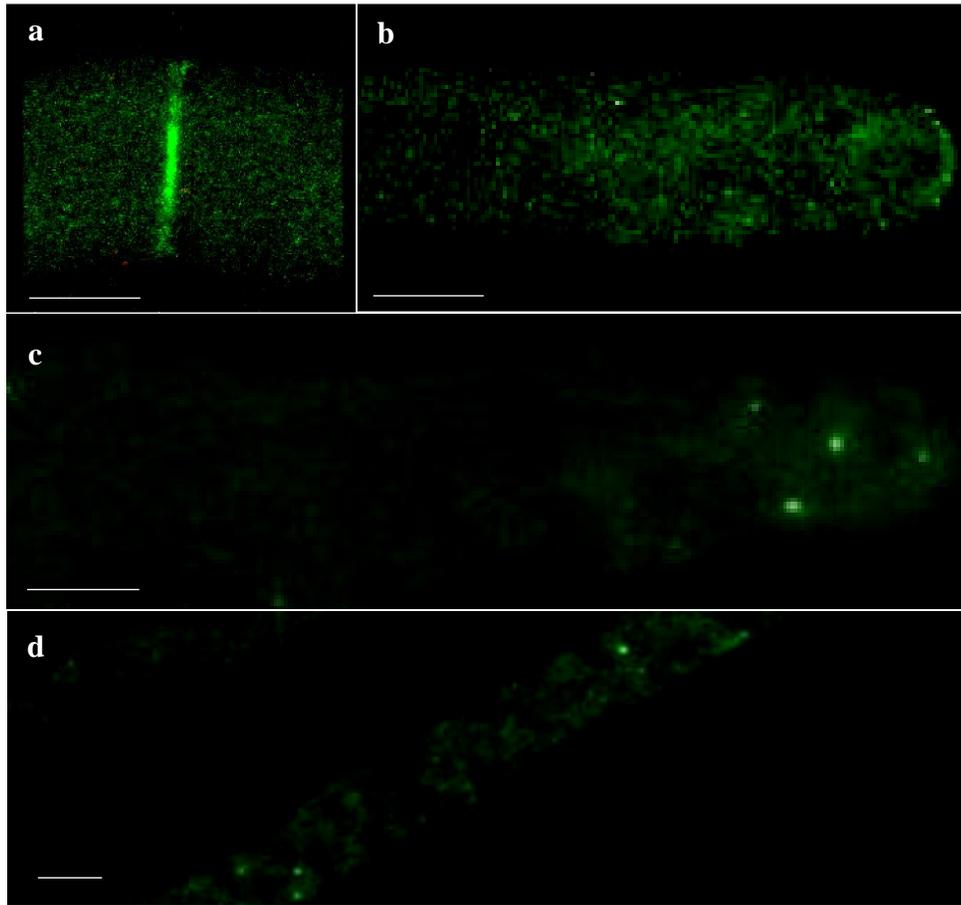


Figura 55. Observación bajo microscopía confocal de escaneo con láser. Objetivo 100X. a, b) *N. crassa* SEC-15 componente del exocisto marcado con GFP, la fluorescencia se localiza en la región apical de la membrana plasmática y en la región central del septo c, d) *N. crassa* TGasa-4, la fluorescencia no se acumula en la membrana plasmática; la fluorescencia está dispersa en puntos a lo largo de la hifa. Barra 5 μm.

IX. DISCUSIÓN

El tráfico vesicular del retículo endoplasmático a la membrana plasmática es controlado por varias Rab GTPasas y sus activadores (GEF), que proporcionan especificidad de reconocimiento a su destino de fusión. La especificidad de fusión entre membranas ocupa un papel central en el crecimiento celular y ha sido por consiguiente sujeto de muy reciente investigación en los hongos. Por ello, en este estudio analizamos el papel de la Rab GTPasa SEC-4 y su activador SEC-2 en la morfogénesis y exocitosis en hifas de *N. crassa*, así como su localización mediante marcajes con proteínas fluorescentes.

Se desconoce el papel que desempeña SEC-4 en la ruta secretora de hongos filamentosos. En levaduras se le atribuye un papel involucrado en la dirección y transporte de vesículas del Golgi a membrana plasmática (Walworth *et al.*, 1992). Los datos obtenidos en este trabajo son de alta relevancia e indican que SEC-4 es un buen candidato para ser estudiado como componente de la ruta secretora en *N. crassa* y proporciona información de la función de SEC-4 en hongos filamentosos.

La mayoría de Rab GTPasas de levadura tiene uno o más homólogos en mamíferos. La comparación de secuencias aminoacídicas de las proteínas Ras en varias especies, revelan que están bastante conservadas, con un porcentaje de identidad entre 30-55% (Stenmark y Olkkonen, 2001). El análisis bioinformático demostró una identidad superior al 50% entre la proteína de SEC-4 presente en *N. crassa* con los homólogos de esta proteína en otros hongos. Por lo que suponemos que en el hongo aquí estudiado SEC-4 desempeña una función similar en la ruta de secreción a la de otros hongos filamentosos (Stenmark y Olkkonen, 2001). Por el contrario, el análisis bioinformático de SEC-2 de *N. crassa* reveló que esta secuencia aminoacídica es muy variable entre sus homólogos fúngicos con un porcentaje de identidad inferior al 50%. Este hecho expresa que los activadores de las proteínas Rabs son altamente divergentes, como lo reporta Walworth y colaboradores (1989).

En las levaduras la eliminación de *SEC2* ó *SEC4* provoca efectos similares; muerte y acumulación de vesículas en el citoplasma (Walworth *et al.*, 1992). Sin embargo, en hongos filamentosos la formación del complejo Sec2p-Sec4p podría no ser indispensable, ya que la eliminación de *sec-2* en *N. crassa* no es letal y no tiene repercusiones en la morfología así como tampoco en la tasa de crecimiento de hifas. No obstante, la eliminación de *sec-4* repercute en la morfología de *N. crassa* y la tasa de crecimiento disminuye considerablemente. SEC-2 y SEC-4 en *N. crassa* poseen un papel diferente a lo descrito en levaduras. Esto podría sugerir que ó bien SEC-2 no es el activador de SEC-4, ya que si lo fuera, la ausencia de SEC-2 provocaría efectos similares porque SEC-4 estaría en estado inactivo, o bien la función de SEC-2 es compensada por otra proteína.

A diferencia a lo observado en levaduras la eliminación del homólogo de *sec-4* en los hongos filamentosos *N. crassa* y *A. niger* no es letal. No existen muchos datos de los efectos provocados por ausencia de *sec-4* en el crecimiento de hongos filamentosos. Punt y colaboradores (2001), reportaron en *A. niger* algunos de los efectos que observamos en *N. crassa* TGasa-1. Estos efectos de la eliminación del homólogo de este gen en *A. niger* (*ΔsrgA*) consistieron en un incremento en el diámetro hifal y una inusual ramificación, así como una colonia de tamaño reducido. En el hongo filamentosos *C. lindemuthianum* (*ΔCLPT1*), al igual que en levaduras, la eliminación del homólogo de *sec-4* es letal y provoca una acumulación de vesículas (Siriputthaiwan *et al.*, 2005). Esta diferencia nos hace pensar que la ruta de secreción no sólo podría presentar algunas variantes entre levaduras y hongos filamentosos, sino que también puede presentar variantes entre hongos patógenos.

IX.1 Comportamiento y función del Spk en la TGasa-1

El Spk presente en TGasa-1 se ve afectada por el cambio de movimientos repentinos en zig-zag. Estas observaciones podrían indicar que SEC-4 posee un rol en el comportamiento del Spk durante el crecimiento y que la ausencia de este gen repercute en la elongación y morfogénesis hifal. El tamaño del Spk presente en las hifas de *N. crassa* TGasa-1 es menor, presumiblemente en consecuencia de una disminución de vesículas en la región apical causada probablemente

por la desorientación de vesículas que no han logrado llegar a la punta y fusionarse a la membrana plasmática, ya que para ello se necesita la función de SEC-4. Este hallazgo apoya la idea que el Spk actúa como un VSC de vesículas en la morfogénesis hifal (Bartnicki-García *et al.*, 1989).

IX.2 Alteraciones en la formación de ramas y septos de *N. crassa* TGasa-1

El incremento de la presencia de ramas en *N. crassa* TGasa-1, podría deberse a que la elongación de la hifa disminuye considerablemente comparado a la elongación hifal de *N. crassa* control. Por lo que se forman más ramas para distribuir el material celular y evitar su acumulación en alguna zona hifal lo que podría causar que la hifa explotara.

El aumento en la presencia de septos en *N. crassa* TGasa-1, podría deberse a que la señal molecular involucrada para generar septos esté deslocalizada. Esto sugiere, que SEC-4 podría tener un papel en la morfogénesis de septos.

Por otro lado, la formación de septos cercanos al ápice de las hifas en la cepa TGasa-1, podría ser el resultado de la expresión de un mecanismo de protección para evitar que el material citoplasmático sea derramado fuera de la membrana plasmática, cuando las hifas están sometidas a condiciones de estrés y son más propensas de sufrir daños, tal como el rompimiento de las hifas de la TGasa-1 probablemente sean causados por las variaciones en el grosor del diámetro hifal.

IX.3 Exocisto y *N. crassa* TGasa-1

En levaduras el exocisto es un complejo octamérico evolutivamente conservado formado por Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p y Exo84p, que marca el sitio de fusión de la vesícula en la membrana plasmática (Novick *et al.*, 1980) y es regulado por varias GTPasas como Sec4p, RHO-1, RHO-3 y CDC-42 (Brennwald *et al.*, 2007). Los antecedentes indican que Sec4p interactúa con 2 componentes del exocisto, Sec15p y Sec8p ¿Pero quién libera Sec4p del

activador Sec2p? Medkova y colaboradores (2006) reportan que la región N-terminal de Sec2p interactúa con la subunidad Sec15p del exocisto para que a su vez, Sec15p pueda reclutar a Sec4p y proponen que esta unión provoca la liberación Sec2p del exocisto para su reciclaje. Lo anterior indica que Sec15p interactúa con el estado activo de Sec2p para liberarlo de su asociación con la vesícula, ya que la unión de Sec15p a Sec2p inhibe la función de la región C-terminal de Sec2p y esta región contiene dominios necesarios para su unión a las vesículas y al inactivarse significa que Sec15p y por lo consiguiente al no estar el activador de Sec4p pasa a su conformación de estado inactivo. Medkova y colaboradores en el 2001, también reportan que Sec15p se une a Sec2p en una región que también es utilizada por YPT32 para unirse a Sec2p, por lo que proponen que YPT32 compite con Sec15p para unirse a Sec2p. Estos nuevos hallazgos indican que Sec15p interactúa con la conformación inactiva de Sec4p para inactivar su función al liberar su activador, por lo que el papel del exocisto no sólo sería el de unión a vesículas secretoras a los sitios específicos de exocitosis, sino también estaría implicado en el reciclaje de proteínas.

Por el contrario en *N. crassa* se desconoce qué componentes del exocisto tienen relación con SEC-4, por lo que este estudio proporciona evidencia que la ausencia de *sec-4* provoca la deslocalización de dos componentes del exocisto, SEC-15 y SEC-5. Datos obtenidos por microscopía confocal de escaneo con láser de *N. crassa* TGasa-4 demuestran que la ausencia de *sec-4* provoca la deslocalización de la fluorescencia de SEC-15 tanto del domo apical como la presenciada en la región central de los septos, lo que implica que en *N. crassa* la SEC-4 se asocia a SEC-15 para facilitar la unión de vesículas a la membrana plasmática y posiblemente SEC-15 sea el encargado de liberar al activador de SEC-4 de la vesícula para inactivar su función.

La cepa de *N. crassa* T-GASA-5 observamos una deslocalización de SEC-5, lo que sugiere que SEC-4 se asocia a SEC-5 y posiblemente con la misma la finalidad que al unirse a SEC-15. Otra explicación sería que la deslocalización de SEC-5 a causa de la ausencia de SEC-4, podría tener un efecto sobre la unión de las subunidades que conforman el exocisto, ya que en levaduras se ha observado un efecto de desensamblaje del exocisto cuando el complejo Sec15p-Sec10p es

alterado por la ausencia de Sec3p, Sec5p, ó Exo70p (Wiederkehr *et al.*, 2004). Lo anterior, nos hace suponer que el exocisto funciona como un complejo de ensamblaje que promueve la unión de vesículas secretoras a subdominios específicos en la membrana plasmática, tal como lo propuso Wiederkehr y colaboradores en el 2004. Donde la estabilidad del ensamblaje asegura que las vesículas lleguen a su destino y liberen su contenido. La sobreexpresión de Sec4p en levaduras $\Delta Sec5p$ provoca un desensamblaje del exocisto (Wiederkehr *et al.*, 2004), así que asumiendo que las rutas secretoras son similares tendría lógica que en *N. crassa*, la ausencia de SEC-4 provoque la deslocalización de SEC-5 y por lo consiguiente también tiene un efecto en el desensamblaje del exocisto.

En base al análisis de los resultados de la eliminación de *sec-4*, proponemos que la función de SEC-4 en *N. crassa* es necesaria para optimizar el transporte de vesículas que se integran a la membrana plasmática mediante su asociación con el exocisto.

IX.4 Papel de SEC-2 y SEC-4 en la ruta secretora

El análisis de las transformantes *sec-2-gfp* y *sec-2-mchFP* mediante microscopía confocal reveló que estas cepas no presentaron fluorescencia. Posiblemente esto se deba a que la construcción diseñada estaba dirigida a fusionar la GFP en la región C-terminal de la proteína y de acuerdo con Walworth y colaboradores (1989), Sec2p se asocia a la superficie de vesículas secretoras mediante las cisteínas presentes en la región C-terminal, por lo que la integración de la etiqueta de la GFP en esta región afectó la localización de la proteína.

Por otro lado, en otros estudios, el marcaje de Sec2p en levaduras ha sido dirigido a integrar la proteína fluorescente en la región N-terminal (Buvelot *et al.*, 2006) que contiene un dominio largo vuelta-doble-vuelta necesario para su interacción con Sec4p (Nair *et al.*, 1990). Lo anterior nos hace suponer que el marcaje de Sec2p reportado en levaduras podría representar una deslocalización de esta proteína.

Los antecedentes indican que Sec2p se sintetiza en el citoplasma y se asocia a vesículas secretoras (Walworth *et al.*, 1989). Sin embargo, se desconoce en que momento del tráfico vesicular Sec2p se asocia a estas vesículas secretoras. No obstante, se describe a Sec2p como el activador de Sec4p y a su vez Sec4p se asocia a vesículas secretoras que siguen la trayectoria del Golgi a membrana plasmática, por lo que suponemos que Sec2p también sigue esa trayectoria. Si este hecho es real en los marcajes de Sec2p debería de observarse fluorescencia cercana a los cuerpos de Golgi y en zonas de formación de membrana plasmática. Por el contrario los marcajes de Sec2p en levaduras demuestran una exclusiva localización en la punta de la yema. Este hecho no concuerda con los antecedentes, si el marcaje de Sec2p en levaduras es correcto Sec2p no se asocia a vesículas formadas en el Golgi. La interpretación sería que Sec2p se une a vesículas que se integrarán a la membrana plasmática en zonas activas de crecimiento y por lo consiguiente la formación del complejo Sec2p-Sec4p ocurre también en esta región. Ahora bien, si existiese evidencia de que Sec2p se une a vesículas que siguen la trayectoria del Golgi a membrana plasmática, la posible razón de no observarse fluorescencia cercana a los cuerpos de Golgi podría deberse a que la concentración de Sec2p es mínima para ser detectada por este método y la velocidad a la que ocurre es muy rápida por lo que sólo se observa en zonas donde se acumula.

Los resultados provenientes de la microscopía confocal indican que el marcaje en *N. crassa* de las proteínas SEC4-GFP y SEC-4-mChFP por PCR de fusión, presentaron una localización de fluorescencia citoplasmática. Esta localización no corresponde a la localización de Sec4p reportado en trabajos previos con levaduras (*S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans*) (Walworth *et al.*, 1999), donde reportan una localización de Sec4p en la punta de la yema y la base del cuello de células en gemación. Así tampoco concuerda con la localización de fluorescencia en forma de domo apical reportada en el hongo filamentoso *A. gossypii* (AgSEC4) (Schmitz *et al.*, 2006). Por lo anterior, decidimos realizar el diseño de otra construcción molecular SEC-4-GFP para PCR de fusión que a diferencia de los diseños anteriores, este presenta un brazo de 10 glicinas que anteceden la unión de la GFP, para favorecer el plegamiento en la conformación tridimensional de la proteína. Sin embargo, este método tampoco proporcionó los resultados esperados ya que la fluorescencia en las transformantes se concentra en la región subapical y en

puntos a lo largo de la hifa perdurando hasta en las regiones distales. Este patrón de fluorescencia encontrado se aproxima más al patrón hipotetizado, ya que esperábamos observar fluorescencia en la región apical por ser un sitio activo de crecimiento y a lo largo de toda la hifa, porque actualmente se tienen datos que Sec4p coinmunoprecipita con la miosina tipo V (Myo2p) lo que hace suponer que usa los cables de actina para su transporte (Novick *et al.*, 1980). La fluorescencia observada de SEC-4-gly-GFP en puntos a lo largo de la hifa, así como en la región subapical; podría representar el marcaje con GFP de la deslocalización de la proteína ó una localización de SEC-4 diferente a lo reportado en levaduras. Debido a que las construcciones moleculares diseñadas para SEC-4 en *N. crassa* estaban dirigidas a fusionar por el extremo C-terminal con la GFP consiguiendo situar el ORF de *sec4* bajo el control del promotor nativo. La región C-terminal de SEC-4 posee las señales de localización para su asociación con las vesículas (Walworth *et al.*, 1989). Por lo que se recomienda dirigir la fusión de GFP a la región N-terminal de SEC-4 en *N. crassa*. No obstante, el desconocimiento de la localización de SEC-4 hace que perdure la incógnita si realmente SEC-4 se asocia a vesículas secretoras que siguen la trayectoria del Golgi a la membrana plasmática. Por lo que sería interesante realizar el marcaje de SEC-4 en *N. crassa* dirigida a integrar la proteína fluorescente en la región N-terminal, teniendo en cuenta, que la interacción de Sec4 con otros componentes de la ruta secretora probablemente requiera de la región N-terminal de Sec4p, por lo que la integridad de esta región también resultaría indispensable y podría causar la deslocalización de la proteína. Los mecanismos que determinan la distribución específica de las proteínas Rab en la célula no son bien conocidos, aunque se ha descrito que ésta es dependiente de secuencias hipervariables presentes en su región C-terminal (Chavrier *et al.*, 1991). Esta región contiene secuencias hipervariables de 35 a 40 aminoácidos que divergen entre los diferentes miembros Rab (Chavrier *et al.*, 1991). Lo anterior ha permitido postular que la región C-terminal es la región de la proteína que determina el blanco de fusión de a su membrana blanco, ya que en esta región están presentes los dominios requeridos para que la Rab se asocie a la membranas de las vesículas; por lo que al alterar la integridad de esta región se puede estar estropeando la deslocalización de la proteína.

El modelo que plantea la unión de las proteínas Rab a la membrana de fusión mediante regiones hipervariables en el C-terminal es ampliamente aceptado. Sin embargo, Ali y colaboradores (2001) no aprueban este modelo; sugieren un modelo, en el cual, las múltiples regiones de las Rab contribuyen a determinar el blanco de fusión. Un ejemplo del segundo modelo, es el observado en la Rab6 de células HeLa; ya que la Rab6 no necesita de las regiones hipervariables en el C-terminal para su correcta fusión al aparato del Golgi (Ali *et al.*, 2001). También hay reportes que indican que en algunas proteínas Rab como Rab5 y Rab3, la región N-terminal está involucrada en el reconocimiento y su fusión en la membrana de endosomas tempranos (Steele-Mortimer *et al.*, 1994). No obstante, ambos modelos podrían estar en lo cierto; posiblemente algunas proteínas Rab sigan el modelo de fusión con regiones hipervariables en la región C-terminal y otras proteínas Rab sigan el modelo propuesto por Ali y colaboradores, dependiendo de la función que realicen en la célula.

X. CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo se cumplió parcialmente, debido a que no logramos conocer la localización exacta de SEC-2 y SEC-4 en *N. crassa*. No obstante, se realizó satisfactoriamente el análisis del papel de SEC-4 en la ruta secretora.

El análisis bioinformático de SEC-2 mostró que su secuencia aminoacídica no es conservada y posee un porcentaje inferior al 50% de identidad entre los homólogos de este gen en otros hongos. Por el contrario, el análisis bioinformático de SEC-4 mostró que su secuencia aminoacídica es altamente conservada y posee un porcentaje superior al 50% de identidad entre los homólogos de este gen en otros hongos.

La eliminación del gen *sec-2* en *N. crassa* no es letal y no ocasiona defectos apreciables en la morfogénesis hifal. La tasa de crecimiento de la Δ *sec-2* fue mayor a la cepa control. La ausencia de *sec-2* repercute en la morfología de los peritecios de *N. crassa*.

La ausencia de *sec-4* en *N. crassa* no es esencial y tiene consecuencias marcadas en la morfología colonial, tasa de crecimiento y morfogénesis hifal, así como en otros eventos, tales como la ramificación, septación, en la morfología de los peritecios y localización de 2 componentes del exocisto, SEC-5 y SEC-15.

El Spk presente en la *N. crassa* TGasa-1 está alterado en su función y composición. Presentó un diámetro menor comparado al tamaño promedio presentado en la cepa silvestre de *N. crassa*. SEC-4 posee un rol en el comportamiento del Spk durante el crecimiento que repercute en la dirección del crecimiento y por lo consiguiente en la morfogénesis del ápice hifal.

XI. BIBLIOGRAFIA

Ali B., Wasmeier C., Lamoreux L., Strom M. y Seabra M., 2004, Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *Journal of Cell Science*, 117:6401-6412.

Ali B. y Seabra M., 2005, Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochemical Society Transactions*, 33:652-656.

Beltrán A., 2009, Localización y dinámica de los componentes del exocisto SEC-15 y SEC-5 en *Neurospora crassa*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 105p.

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

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

Bartnicki-Garcia S., 2002, Hyphal tip growth: outstanding questions. In: Osiewacz H., *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. 333p.

Buvelot F., Rahl P., Nussbaum M., Briggs B., Calero M., Janeczko M., Regan A., Chen C., Barral Y., Whittaker G y Collins R., 2006, Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Molecular and Cellular Biology*, 26:7299-7317.

Bishop A., Lane R. y Sudbery P., 2009, Phosphorylation of Sec2 by Cdc28-Hgc1 is required for transport of secretory vesicles to the Spitzenkörper during the hyphal growth of *Candida albicans*. En: 25th Fungal Genetics Conference at Asilomar. Asilomar Pacific Grove, California, E.U.

Brennwald P., 2000, Reversal of fortune: do Rab GTPases act on the target membrane?. *Journal of Cell Biology*, 149:1-3.

Brennwald P. y Guendalina R., 2007, Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 581:2119-2124.

Case, M., Brockman H. y Serres F., 1965, Further information on the origin of the yale and oak ridge wild-type strains of *Neurospora crassa*. *Neurospora Newsletter*, 8:25-26.

Castillo-Flores A., Weinberger A., Robinson M. y Gerst J., 2007, Mso1 is a novel component of the yeast exocytic SNARE complex. *Journal of Biological Chemistry*, 280:34033-34041.

Catlett N. y Weisman L., 1998, The terminal tail region of yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Journal of Cell Biology*, 95:1479-14804.

Carr C., Grote E., Munson M., Hughson F. y Novick P., 1999, Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *Journal of Cell Biology*, 146:333-44.

Chavrier P., Gorvel J., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J. y Zerial M., 1991, Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*, 353:769-772.

Chavrier P. y Gould B., 1999, The role of ARF GTPases in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology*, 11:466-475.

Clement M., Fournier H., Repentigny L. y Belhumeur P., 1998, Isolation and characterization of the *Candida albicans* *SEC4* gene. *Yeast*, 14:675-680.

Colot H., Park G., Turner G., Ringelberg C., Crew C., Litvinkova L., Weiss R., Borkovich K., y Dunlap J., 2006, A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103:10352-10357.

Davis H., 2000, *Neurospora* contributions of a model organism. Oxford University Press. New York. 333p.

Deneka M., Neeft M. y Sluijs P., 2003, Regulation of membrane transport by Rab GTPases. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 38:121-142.

Dong G., Medkova M., Novick P. y Reinisch K., 2007, A catalytic coiled coil: structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p. *Elsevier*, 25:455-462.

Elkind N., Walch-Solimena C. y Novick P., 2000, The role of the COOH terminus of Sec2p in the transport of post-Golgi vesicles. *Journal of Cell Biology*, 149:95-110.

Fernández-Vaquero C., Domingo V., Picazo F., Pérez J., Tranque P. y Llopis J., 2005, Análisis de la dinámica celular con proteínas fluorescentes. En: <http://www.biojournal.net/pdf/04.pdf>. Consultado en diciembre del 2009.

Girbardt M., 1957, Die ultrastruktur der apikalregion von pilzhyphen. *Protoplasma*, 67:413-441.

Grosshans B., Ortiz D. y Novick P., 2006, Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 32: 11821-11827.

Grosshans B., Andreeva A., Gangar A., Niessen S., Yates J., Brennwald P. y Novick P., 2006, The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *Journal of Cell Biology*, 172:55-66.

Griesbeck O., Baird G., Campbell R., Zacharias D. y Tsien R., 2001, Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276:29188-29194.

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

Haubruck H., Engelke U., Mertins P. y Gallwitz D., 1990, Structural and functional analysis of Ypt2, an essential Ras-related gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encoding a Sec4 protein homologue. *The EMBO Journal*, 9:1957-1969.

Hernández-Valdivia C., 2001, caracterización funcional y ensamblaje membranar del canal de potasio shaker H4, y de segmentos truncados en la porción amino o carboxilo. Tesis de Maestría. Universidad de Colima.43p.

Hickey P., Swift M., Roca M. y Read N., 2005, Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes. *Elsevier*, 34:63-87.

Honda S. y Selker E., 2009, Tools for Fungal Proteomics: Multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* 182: 11-23.

Kastan A., Gouds B., Northup J. y Novick P., 2007, Binding and hydrolysis of guanine nucleotides by Sec4p, a yeast protein involved in the regulation of vesicles traffic. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:9366-9372.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L. y Darnell J., 2000, *Molecular Biology of the Cell*. Panamericana. New York. 961p.

Lundquist E., 2006, Small GTPases. *WormBook*, The *C. elegans*, Research Community, in: <http://www.wormbook.org>. Consultado en octubre del 2007.

Markgraf D., Peplowska K. y Ungermann C., 2007, Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *Fungal Genetics and Biology*, 581:2125-2130.

Medkova M., France E. Coleman J. y Novick P., 2006, The Rab exchange factor Sec2p reversibly associates with the exocyst. *Molecular Biology of the Cell*, 17:2757-2769.

Moya M. y Novick P., 1993, DSS4-1 is a dominant suppressor of sec4-8 that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature*, 361:460-463.

Moreno-Jiménez R., García-Soto J. y Martínez-Cadena G., 2000, Small GTP-binding proteins are associated with chitosomes and vesicles carrying glucose oxidase from *Mucor circinelloides*. *Microbiology*, 154:842-851.

Nagai T., Ibata K., Park E., Kubota M., Mikoshiba K. y Miyawaki A., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20:87-90.

Nair J., Muller H., Peterson M. y Novick P., 1990, Sec2 protein contains a coiled-coil domain essential for vesicular transport and a dispensable carboxy terminal domain. *Journal of Cell Biology*, 110:1897-1909.

Novick P., Field C. y Schekman R., 1980, Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Elsevier*, 21:205-215.

Neuwald A., Kannan N., Poleksic A., Hata N. y Liu J., 2003, Ran's C-terminal, basic patch, and nucleotide exchange mechanisms in light of a canonical structure for Rab, Rho, Ras, and Ran GTPases. *Genome Research*, 13:673-692.

Ortiz D., Medkova M., Walch-Solimena C. y Novick P., 2002, Ypt32 recruits the Sec4 guanine nucleotide exchange factor, Sec2, to secretory vesicles; evidence for Rab cascade in yeast. *Journal of Cell Biology*, 157:1005-1015.

Punt P., Seiboth B., Weenink X., Zeijl C., Lenders M., Konetschny C., Ram A., Montijn R., Kubicek C. y Hondel C., 2001, Identification and characterization on a family of secretion-related small GTPase-encoding genes from the filamentous fungus *Aspergillus niger*: a putative SEC4 homologue is not essential for growth. *Molecular Microbiology*, 41:513-525.

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

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

Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J., Sánchez-León E., Verdín-Ramos J., 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*. *Eukaryotic Cell*, 6:1853-1864.

Rizzo M., Springer G., Granada B. y Piston D., 2004, An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology*, 22:445-449.

Sánchez-León E., 2007, localización de la quitina sintetasa 1 “CHS-1” en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 115p.

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

Sato Y., Fukai S., Ishitani R. y Nureki O., 2007, Crystal structure of the Sec4pSec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state. *Genome research*, 13:673-692.

Shevchuk N., Bryksin A., Nusinovich Y., Cabello F. C., Sutherland M. y Ladisch S., 2004, Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *nucleic acids. Research*, 32:19-31.

Schimmöller F., Simon I. y Pfeffer S., 1998, Rab GTPases, directors of vesicle docking. *Journal of Biological Chemistry*, 273:2161-22164.

Shaner N., Campbell R., Steinbach P., Giepmans B., Palmer A. y Tsien R., 2004, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22:1567-1572.

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

Steele-Mortimer O., Clague M., Huber L., Chavrier P., Gruenberg J. y Gorvel J., 1994, The N-terminal domain of a Rab protein is involved in membrane recognition and/or fusion. *The EMBO Journal*, 13:34-41.

Stenmark H. y Olkkonen V., 2001, The Rab-GTPase family. *Genome Biology*, 2:3007.1-3007.7.

Siriputthaiwan P., Jauneau A., Herbert C., Garcin D. y Dumas B., 2005, Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Cell Science*, 118:323-329.

Sudbery P. y Court H., 2007, *The Mycota VIII Biology of the Fungal Cell*. Howard/Gow®. Springer-Verlag. 164p.

Toikkanen J., Miller K., Soderlund H., Jantli J. y Keranen S., 2003, The beta subunit of the Sec61p endoplasmic reticulum translocon interacts with the exocyst complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278:20946-20953.

Tsien R., 1998, The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67:509-544.

Verdín J. Bartnicki-García S. y Riquelme M., 2009, Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74:1044-1053.

Walch-Solimena C., Collins R. y Novick P., 1997, Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *Journal of Cell biology*, 137:1495-1509.

Wagner W., Bielli P., Wacha S. y Ragnini-Wilson A., 2002, Mlc1p promotes septum closure during cytokinesis via the IQ motifs of the vesicle motor Myo2p. *The EMBO Journal*, 21:6397-6408.

Walworth N., Brennwald P., Kabcenell A., Garrett M. y Novick P., 1992, Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 12:2017-2028.

Westergaard M. y Mitchell H., 1942, *Neurospora*. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Microbial Cell Factories*, 14:573-577.

Wen W., 2005, Fluorescent proteins as tools to aid protein production. *Microbial Cell Factories*. 4:1-12.

Wiederkehr A., Johan-Owen C., Ferro-Novick S. y Novick P., 2004. Functional specialization within a vesicle tethering complex: bypass of a subset of exocyst deletion mutants by Sec1p or Sec4p. *The Journal of Cell Biology*, 167:875-887.

Zajac A., Sun X., Zhang J. y Guo W., 2005, Cyclical regulation of the exocyst and cell polarity determinants for polarized cell growth. *Molecular Biology of the Cell*, 16:1500-1512.

Zahraouis A., Touchott N., Chardin P. y Tavitian A., 1989, The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 264:12394-12401.