

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



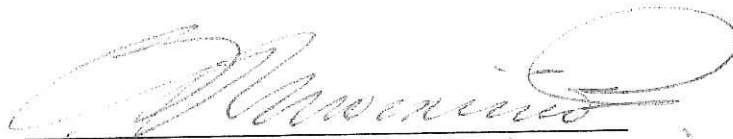
**Papel de la Dineína Citoplasmática en la Organización del
Citoesqueleto Microtubular de *Neurospora crassa***

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

IVAN JOSE GALVAN MENDOZA

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO SEPTIEMBRE DE 2006

TESIS DEFENDIDA POR
Iván José Galván Mendoza
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité



Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
*Coordinador del programa de
posgrado en Acuicultura y
Biotecnología Marina*



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

21 de Junio de 2006

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



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

**PAPEL DE LA DINEINA CITOPLASMATICA EN LA ORGANIZACIÓN DEL
CITOESQUELETO MICROTUBULAR DE *Neurospora crassa***

TESIS

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

Presenta:

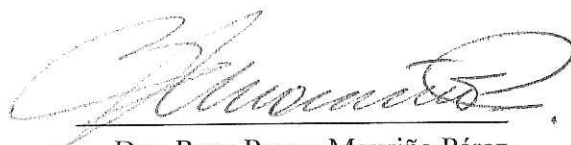
IVAN JOSE GALVAN MENDOZA

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2006.

RESUMEN de la tesis de **Iván José Galván Mendoza**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 2006.

PAPEL DE LA DINEÍNA CITOPASMÁTICA EN LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO MICROTUBULAR DE *Neurospora crassa*.

Resumen aprobado por:



Dra. Rosa Reyna Mourinho Pérez
Director de Tesis

El citoesqueleto microtubular en los hongos filamentosos aún no ha sido estudiado en su totalidad. Su nucleación, polaridad y organización *in vivo* ha generado diversas controversias en especial en cuanto a la función de las proteínas motoras se refiere. La dineína se ha descrito como una proteína motora asociada al extremo terminal positivo de los microtúbulos (Mts) y en células animales se ha demostrado que participa en la polimerización, nucleación y organización del citoesqueleto microtubular. El objetivo de esta tesis es el de identificar el papel de la dineína en la organización de los Mts en *Neurospora crassa*, comparando su dinámica en la cepas silvestres y en mutantes deficientes en dineína (*ropy-1*) y en dinactina (*ropy-3*), para ello se realizaron cruces de cepas tipo silvestre con los Mts marcados (beta tubulina::GFP) con mutantes *ropy-1* y *ropy-3*. Asimismo se marcó la cadena ligera intermedia de la dineína (DLIC) con la proteína verde fluorescente (GFP) con el fin de localizarla y observarla *in vivo* dentro de la célula. Se fusionó el gen de la GFP al de la DLIC y se transformó *N. crassa*. Mediante microscopía confocal el citoesqueleto microtubular observado de la mutante *ropy-1* de *N. crassa* presentó Mts fragmentados, escasa densidad de Mts y la velocidad de elongación fue tres veces menor con respecto a la cepa silvestres, mientras que en la mutante *ropy-3* se observaron Mts de mayor longitud, desorganizados y formando grupos. Las cepas silvestres presentaron una densa red microtubular cercana al ápice. Los Mts se encontraron organizados en paralelo al eje de crecimiento, su organización y densidad fue menor en las zonas distales que en la punta, su crecimiento promedio fue de $0.056 \mu\text{m s}^{-1}$. La dineína fue observada asociada a los núcleos, su distribución sugiere una asistencia en el desplazamiento nuclear tanto en zonas cercanas a la punta como en zonas distales. En conclusión, la ausencia de dineína o dinactina funcional en *N. crassa* ocasiona alteraciones en la distribución, organización, tamaño y movimiento de Mts en la región apical y subapical que es el área crítica para el crecimiento celular de los hongos.

Palabras clave: Microtúbulo, dineína, GFP

ABSTRACT of the thesis presented by **Iván José Galván Mendoza** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. September 2006.

ROLE OF THE DYNEIN CITOPLASMATICA IN THE ORGANIZATION OF THE
MICROTUBULAR CYTOSKELETON OF *Neurospora crassa*.

The microtubular cytoskeleton has not been fully described yet. Some issues about microtubule (Mt) nucleation, polarity and organization have been controversial. Dynein is a motor protein related to plus end of Mts, in animal cells has been shown that this protein participate in the polymerization, nucleation and organization of Mts. Nevertheless, it has not been explored in fungi. The goal of this work is identify the role of dynein in the organization of Mts in *Neurospora crassa*, comparing the dynamics of the microtubular cytoskeleton of wild type and mutants of dynein (*ropy-1*) and dynactin (*ropy-3*). On the other hand, dynein light intermediate chain (DLIC) was labeled with green fluorescent protein (GFP) in order to localize it and describe its in vivo dynamics.

Crosses of *N. crassa* wild type whose Mts were tagged with GFP and *ropy-1* and *ropy-3* mutants were performed. DLIC gene was fused to GFP gene and *N. crassa* was transformed by electroporation. A Confocal microscope LSM-Meta (Carl Zeiss) was used to capture images.

In wild-type *N. crassa*, cytoplasmic MTs were mainly arranged longitudinally along the hyphal tube. Straight segments were rare; most MTs showed a distinct helical curvature with a long pitch and a tendency to intertwine with one another to form a loosely braided network throughout the cytoplasm. In the apical and subapical zones, there was a high density of MTs. In both *ropy-1* and *ropy-3* mutants, there was a marked decrease in the number of MTs along the distorted hyphal tubes. This decrease was especially evident in the apical region. In the *ropy* mutants, MTs were generally shorter than in the wild type and showed a greater tendency to form thick bundles. Overall, the microtubular cytoskeleton of the *ropy* mutants appeared scant and disorganized. In the 3-D images, the helical character of MTs was evident but pitch and orientation relative to the growing axis fluctuated widely giving rise to the obliquely or transversely oriented segments of MTs seen frequently on 2-D images of the *ropy* mutants. As hyphae elongated, the MTs moved forward in a helical pattern that was more readily apparent in the mutants because of the fewer number of MTs. In conclusion, the dynein or dynactin deficiencies of the *ropy* mutants cause a severe perturbation in MTs organization, as previously described, but also in microtubule polymerization and dynamics with serious negative consequences on organelle motion and distribution and hyphal growth rate.

Key words: Microtubule, dynein, GFP

A mi hijo Jhosel Galván Guerrero

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez cuya mano me guió fuera y dentro de laboratorio siempre para bien.

Agradezco al Dr. Salomón Bartnicky-García por haberme admitido en tiempos difíciles para mí como estudiante en su laboratorio.

Agradezco a la Dra Meritxell Riquelme, a la Dra Elizabeth Ponce y al Dr. Helmut Maske por su apoyo y valiosas críticas que dieron forma a ésta tesis.

Agradezco a mi esposa Isabel Guerrero Garduño pues mi sueño es el suyo.

Agradezco a mi padre por la educación que me brindó con su ejemplo.

Agradezco a mi madre y hermanas quienes siempre creyeron en mí y nunca se cansaron en brindarme su apoyo el cual siempre fue incondicional y desmedido.

Agradezco a mis compañeros del departamento de microbiología quienes me hicieron ver mis virtudes y defectos en los suyos.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por haberme acogido tan calidamente en sus instalaciones.

Agradezco a CONACyT cuyo apoyo económico y asistencia hizo posible en todo la realización de ésta tesis.

Finalmente agradezco a Dios por haberme dado la fortaleza de levantarme cada vez que caí y por haberme puesto manos frente a mí; siempre dispuestas a ayudarme a levantar.

INDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Crecimiento celular Polarizado	4
II.2. Citoesqueleto celular	5
II.3. Centros Organizadores de Microtúbulos	6
II.4. La dineína como organizadora y nucleadora de Mts	11
II.5. Hipótesis	11
II.5.1. Objetivo general	11
II.5.2. Objetivos particulares	11
III. MATERIALES Y METODOS	12
III.1. Organismos y medio de cultivo	12
III.2. Cruza de <i>N. crassa</i> con los Mts marcados con GFP y mutantes <i>ropy-1</i> y <i>ropy-3</i>	13
III.3. Microscopía confocal	14
III.4. Diseño de oligonucleótidos	15
III.5. Obtención del plásmido pRM02	17
III.6. Recuperación de conidias de la cepa mutante N623 ^{his-3}	18
III.7. Transformación de <i>N. crassa</i> (electroporación)	18
III.8. Recuperación de transformantes	18
IV. RESULTADOS	
IV.1. Descripción del sistema microtubular de las mutantes <i>ropy-1</i> y <i>ropy-3</i> in <i>Vivo</i>	19
V. DISCUSIÓN	
V.1. Distribución de la dineína en <i>N. crassa</i>	32
VI. CONCLUSION	36
VII. LITERATURA CITADA	37

LISTA DE FIGURAS

Figura		Páginas
1	Representación esquemática de la dineína (A) y de la dinactina (B) y de cada uno de sus componentes, así como de su función teórica. En las líneas inferiores se observa el fenotipo de las mutantes <i>ropy1</i> y <i>3</i> en comparación de una cepa silvestre.	8
2	Imagen confocal de la hifa tipo silvestre (a), mutante <i>ropy-1</i> (b) y mutante <i>ropy-3</i> (c). Cada imagen representa un plano focal de 1 μ m. Escala = 5 μ m	19
3	Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de <i>N. crassa</i> tipo silvestre. (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Escala = 10 μ m.	21
4	Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de <i>N. crassa ropy-1</i> . (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Escala = 10 μ m. Las cabezas de flecha blancas muestran la posición del huso acromático de un núcleo en mitosis, y las amarillas muestran un Mt largo.	22
5	Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de <i>N. crassa</i> tipo <i>ropy-3</i> . (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Las cabezas de flecha blanca muestran Mts individuales y las amarillas Mts agrupados. Escala = 10 μ m.	24
6	Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de <i>N. crassa</i> de tipo silvestre. Las flechas blancas muestran los husos acromáticos de núcleos en diferentes estadios de la mitosis. Escala = 10 μ m.	25
7	Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de <i>N. crassa ropy-1</i> . Escala = 20 μ m.	26
8	Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de <i>N. crassa ropy-3</i> . Escala = 10 μ m.	27
9	Elongación de hifas de <i>N. crassa</i> silvestre, <i>ropy-1</i> y <i>ropy-3</i> . n = 30 por cada grupo.	28

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACION)

Figura		Páginas
10	Imágenes de dos dimensiones en contraste de fases (a), fluorescencia (b) y una sobre posición de ambas (c). Escala = 10 μ m.	29
11	Imágenes en dos dimensiones tomadas en contraste de fases (a), fluorescencia (b) y una sobre posición de ambas (c). Escala = 10 μ m.	30
12	Reconstrucción en dos dimensiones de una hifa de <i>N crassa</i> con dineína marcada con GFP. Se aprecia en la zona cercana a la punta una acumulación de partículas, que aumentan de intensidad hacia las zonas nucleares así como en la zona distal al ápice	30
13	Imagen de fluorescencia en dos dimensiones del sitio de ramificación. Las flechas blancas muestran puntos de dineína asociados a un núcleo. Escala = 10 μ m.	31
14	Esquema de la relación de la dineína y los núcleos basada en la dinámica <i>in Vivo</i> .	35

I. Introducción

A las proteínas motoras asociadas a los Mts en particular el complejo dineína/dinactina se les ha atribuido el papel de transporte de núcleos y otros organelos como su principal función (Holzbaur y Vallee, 1994; Bruno et al., 1996; Tinsley y Minke, 1996; Inoue y Turgeon, 1998; Eckley et al., 1999; Reese, 2000; Yamamoto y Hairo, 2003). Sin embargo se ha referido en células pigmentarias de peces (melanóforos) una función alterna vinculada a la nucleación, organización y polimerización de los Mts (Rodionov y Lim, 1994; Vorobjev y Malikov, 2001; Malikov y Kashina, 2004).

En los hongos filamentosos se han obtenido una amplia gama de mutantes en algunas de las fracciones del complejo dineína/dinactina (Bruno et al., 1996; Rowland, 2000; Xiang y Plaman, 2003). Los resultados de estas mutaciones son células anormales en su crecimiento (Hoch, 1985; Derksen, 1990; Haimo, 1997; Inoue y Turgeon, 1998; Riquelme y Roberson, 2002; Horio et al., 2005; Sampson y Heath, 2005).

Por otro lado, en *Aspergillus nidulans* se ha localizado a la dineína estacionada en la terminal positiva del Mt y desvinculada al desplazamiento nuclear (Xiang et al., 1995; Zhang y Han, 2002; Zhang y Li, 2003). En otros hongos como *Dictiostelium discoideum* y *Ustilago maydis* así como en células animales, la dineína muestra una organización y dinámica vinculada al citoesqueleto microtubular (Koonce et al., 1992; Lehmler et al., 1997; Malikov y Kashina, 2004).

Por todo lo anterior se llevo a cabo un estudio para identificar el papel del complejo dineína/dinactina en la organización y polimerización de los Mts, utilizando mutantes deficientes en dineína (*ropy-1*) y deficientes en dinactina (*ropy-3*) en comparación con

cepas mutantes de *N. crassa*. Así como el marcaje molecular con GFP de la dineína con la finalidad de conocer su localización y dinámica dentro de la célula.

Se eligió *N. crassa* como modelo debido a que es un ascomiceto con una alta velocidad de crecimiento, muy fácil de cultivar, con un tamaño de hifa que facilita su observación, un ciclo de vida sexual fácilmente inducible, esta disponible la información de su genoma completo y hay un gran número de mutantes dineína/dinactina (Rowland, 2000; Borkovich et al., 2004).

II. Antecedentes

II.1. Crecimiento celular polarizado

El crecimiento celular polarizado consiste en la elongación de la membrana plasmática en uno o varios puntos bien definidos de la célula. El crecimiento celular polarizado es un tipo de crecimiento que presentan los rizomas, las células nerviosas y los hongos filamentosos entre otros (Wessels, 1986).

Las células de los hongos llamadas hifas son estructuras cilíndricas que tienen un crecimiento polarizado hacia el ápice en donde se encuentra el Spitzenkörper (Spk) o cuerpo apical. El Spk es un organelo constituido por vesículas agregadas y se ha demostrado que tiene relación con la dirección y el crecimiento de la célula (Brunswik, 1924; Girbardt, 1957; Bracker y Murphy, 1997; Riquelme et al., 1998). El Spk es una estructura que concentra vesículas de diferentes tamaños, algunas de estas están relacionadas con la exocitosis celular que se lleva a cabo en el ápice donde se da la extensión y el crecimiento de la célula (Girbardt, 1957; Grove y Bracker, 1970; Howard, 1981). Se piensa que el transporte de vesículas es crucial para el crecimiento celular polarizado, y que las vesículas secretoras son producidas a grandes distancias del ápice y requieren ser transportadas hasta el Spk y posteriormente al sitio de formación de la membrana citoplásmica (Harris et al., 2005).

En el transporte de vesículas el citoesqueleto juega un papel muy importante tomando en cuenta la disposición de sus componentes. Los microtúbulos (Mts) asisten al desplazamiento de vesículas a larga distancia hasta el Spk y que éste funciona como una

estación de cambio donde las vesículas se intercambian con los microfilamentos de actina y a su vez son llevados hasta el plasmalema (Harris et al., 2005).

II. 2. Citoesqueleto celular

El citoesqueleto celular es la red de macromoléculas más importante presente en las células eucariotas, ya que permite llevar a cabo una gran variedad de movimientos coordinados y dirigidos, entre los cuales puede mencionarse el crecimiento y desarrollo de las células en animales, plantas y hongos (Howard, 1981; Hoch, 1985; Geitmann, 2000; Nédélec y Surrey, 2003; Xiang y Plamann, 2003).

Los elementos que conforman el citoesqueleto celular son los microtúbulos (Mts), los filamentos de actina, y los filamentos intermedios (Derksen, 1990; Haimo, 1997; Geitmann, 2000; Nédélec y Surrey, 2003; Horio, 2005; Sampson y Heath, 2005).

Los Mts fueron de los primeros elementos del citoesqueleto en describirse. Son polímeros cilíndricos de 15 a 25 nm de diámetro y con un espesor de 5nm aproximadamente. La mayoría se encuentran paralelos al eje longitudinal de las células, pero perpendiculares a las mitocondrias, cuerpos multivesiculares, núcleos y vesículas secretoras (Howard, 1980; Derksen, 1990; Haimo, 1997).

Los Mts están formados por heterodímeros de α y β -tubulina, que se ensamblan alternadamente y forman de 9 a 16 polímeros lineales llamados protofilamentos los cuales se organizan formando un cilindro hueco (Oakley 1980; Derksen, 1990; Haimo, 1997; Nédélec y Surrey, 2003).

Los Mts tienen diversas funciones en la célula, dentro de las cuales se encuentra la formación de husos acromáticos durante la mitosis y la meiosis (Aist, 1999).

Se ha propuesto en hongos, que los Mts tienen una función importante en el crecimiento apical de las hifas, pues se sugiere están vinculados al transporte de vesículas desde el aparato de Golgi hasta el ápice (Derksen, 1990; Inoue y Turgeon, 1998; Geitmann, 2000; Horio y Oakley, 2005; Sampson y Heath, 2005). También es posible que mantengan el crecimiento y la morfología normal de las hifas tal como fue descrito para *Aspergillus nidulans* (Riquelme et al., 1998; Riquelme et al., 2002; Horio y Oakley, 2005).

II. 3. Centros organizadores de microtúbulos

Los Mts no son elementos que se forman espontáneamente en cualquier sitio de la célula sino que requieren de sitios de nucleación específicos para su polimerización (Tucker, 1984; Oakley, 1992; Oakley, 2000; Straube y Brill, 2003). Estos sitios son conocidos como Centros Organizadores de Microtúbulos (COMt) (Tucker, 1984; Oakley, 2000; Straube y Brill, 2003). Los Mts en animales se polimerizan a partir de los centrosomas mientras que en los hongos se polimerizan a partir de los cuerpos polares de los núcleos que es una estructura equivalente (Oakley, 1992). En estos sitios se ha encontrado una proteína llamada γ -tubulina que actúa como nucleadora o cadena templete para la polimerización de la α y β -tubulina (Oakley, 1992 y 2000). Se ha demostrado que los Mts tienen polaridad, el extremo que parte de la matriz de γ -tubulina es la terminal negativa, mientras que el extremo opuesto el cual se polimeriza y despolimeriza rápidamente es la terminal positiva (Oakley, 2000).

En hongos se ha sugerido la presencia de la γ -tubulina en sitios diferentes a los cuerpos polares, Mac Daniel y Roberson (2000) inmunolocalizaron γ -tubulina en la punta de hifas

de *Allomyces macrogynus*. Éste hallazgo aunado a la demostración de polimerización *de novo* desde el ápice de células de *Neurospora crassa* (Mouriño-Pérez et al., 2006), han hecho suponer que los COMts no solo se encuentran en los cuerpos polares de los núcleos como se había descrito anteriormente (Oakey, 1992; Sampson y Heath, 2005).

En células especializadas de animales (melanóforos) se ha observado que la presencia de la γ -tubulina no es el único factor para la organización y nucleación de los Mts, la dineína que es una proteína motora, sugiere tener un papel similar al de la γ -tubulina (Rodionov y Lim, 1994; Vorobjev y Malikov, 2001; Malikov y Kashina, 2004).

II. 4. La dineína como organizadora y nucleadora de Mts.

Los Mts están asociados a proteínas que presentan sitios de unión para la fosforilación del ATP, las fosforilaciones consecutivas facilitan cambios conformacionales que les permiten desplazarse sobre los Mts (King, 2000; Asai, 2001; Straube y Enard, 2001). Estas proteínas cuentan con diferentes sitios de unión para asociarse al Mt y por otro lado a un organelo membranoso (vesícula, núcleo, mitocondria, etc.) con la finalidad de asistirlo en su desplazamiento dentro de la célula (Holzbaur y Vallee, 1994; Wu y Sandrock, 1998; Asai, 2001; Reese, 2000). La dineína citoplasmática consta de dos cadenas pesadas de ~500 kDa (DHCs), algunas cadenas intermedias de ~74 kDa (DICs), cuatro cadenas intermedias ligeras (DLICs) de 50 a 60 kDa y algunas cadenas ligeras (DLCs) de 6 a 22 kDa (Bruno et al., 1996; Tinsley y Minke, 1996; Reese 2000; Kumar y Zhou, 2001; King y Brown, 2003; Yamamoto y Hairo, 2003; Gaetz, 2004). La cadena pesada (DHC) es la unidad motora de la dineína, es una ATPasa asociada con la actividad celular y tiene seis subunidades en

módulos de AAA, la primera de las cuales contiene un sitio de unión al sitio catalítico de ATP. Los módulos AAA forman una estructura en forma de anillo que le da la apariencia globular de las cabezas que se apoyan entre dos estructuras extendidas, el tallo y el pistilo. La DHC se sabe que interactúa con un Mt en la punta del tallo y con las otras estructuras celulares en el pistilo. La cadena intermedia ligera (DLIC), intermedia (DIC) y ligera (DLC) de la dineína, están asociados con el pistilo y probablemente involucradas en la unión de cada estructura y vinculadas con la regulación de su actividad motora (Holzbaur y Valle, 1994; King y Brown, 2000; Asai, 2001; Yamamoto y Hairo, 2003).

La dineína citoplasmática requiere al complejo de la dinactina para su función (Tinsley y Minke, 1996; Kumar y Zhou, 2001; King y Brown, 2003). La dinactina es un complejo de proteínas que comprende dos distintos componentes estructurales, el primero esta formado por una unidad corta que consiste en un filamento que se asemeja al de actina y se proyecta como un brazo retráctil, mientras que el segundo esta formado de un polímero relacionado a una proteína asociada a la Arp1 (Eckley y Gill, 1999) y a proteínas ancladas (p62, p25 y Arp11) (Tinsley y Minke, 1996; Yamamoto y Hairo, 2003).

El brazo esta formado por un dímero llamado p150^{Glued}, el cual cuenta con distintos sitios de unión para con los Mts, DIC y Arp1. El brazo esta probablemente conectado al filamento que se asemeja a un filamento de actina, estos junto con la proteína p24 se unen a la dinamitina (p62). Se ha especulado que la dinactina es intermediario en la interacción de la dineína citoplasmática con las estructuras celulares y/o regula su motilidad (Tinsley y Minke, 1996; Eckley y Gill, 1999; Yamamoto y Hairo, 2003).

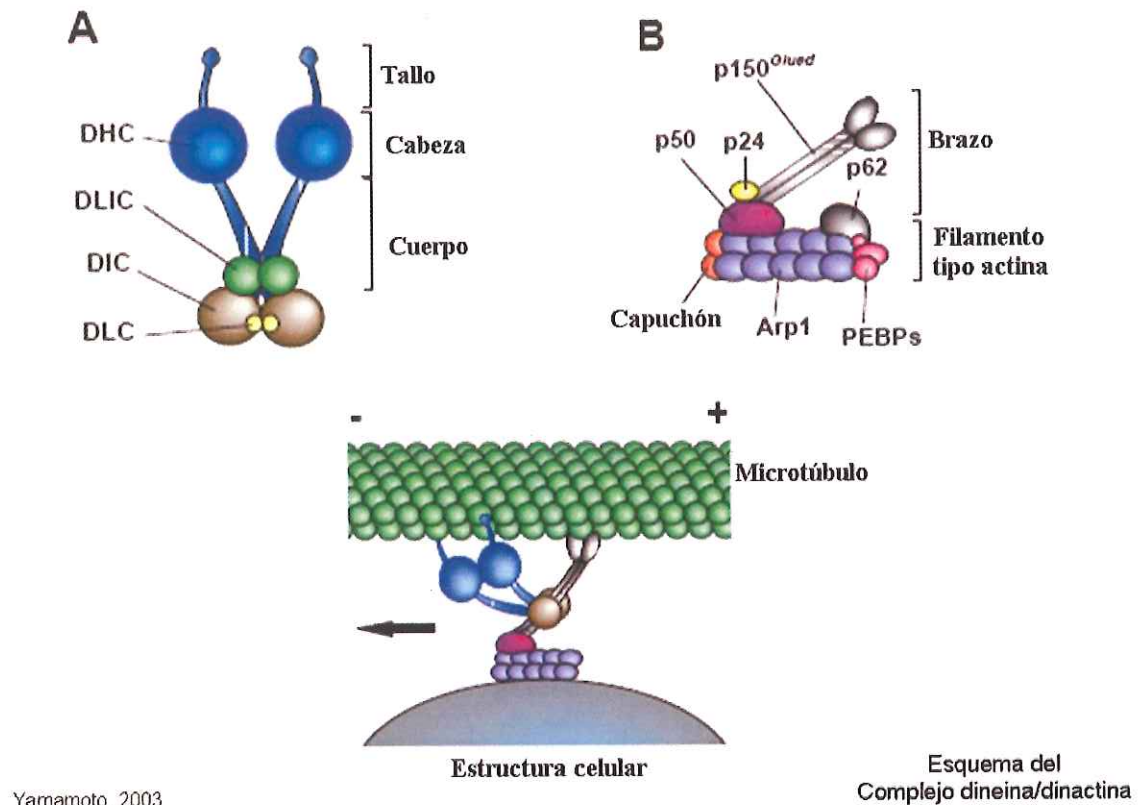


Figura 1. Representación esquemática de la dineína (A) y de la dinactina (B) y de cada uno de sus componentes, así como de su función teórica. En las líneas inferiores se observa el fenotipo de las mutantes *ropy1* y *3* en comparación de una cepa silvestre.

En células animales especializadas en el transporte de pigmentos (cromatóforos) se ha observado que la dineína tiene un efecto catalizador y organizador en la polimerización de las subunidades de tubulina aún en presencia de la γ -tubulina (Rodionov y Lim, 2001; Malikov y Kashina, 2004). En experimentos *in Vitro*, se sugiere que la dineína es capaz de conferir polaridad a los Mts debido a que la adición de subunidades de α y β tubulina se

lleva a cabo en un solo extremo de la molécula de dineína y en ausencia de dineína el Mt la polimerización se realiza en ambos sentidos. (Vorobjev y Malikov, 2001; Malikov y Kashina, 2004). Otro hallazgo fue que al utilizar drogas que inhiben a la dineína como el ortovanadato los Mts tienden a desorganizarse, despolimerizarse y se reduce su nucleación. La ausencia de la kinesina que es otra proteína motora de los Mts no ha mostrado tener efecto en la organización y polimerización del citoesqueleto microtubular (Malikov y Kashina, 2004).

Los trabajos con cromatóforos han sugerido que la dineína es un agente nucleador, organizador y polimerizador de los Mts. Sin embargo en los hongos filamentosos aún no se cuenta con información suficiente que sugiera que la dineína se organice y funcione de igual forma que en las células animales. Existen evidencias en mutantes con deficiencias en diferentes fragmentos del complejo dineína/dinactina que muestran alteraciones en el crecimiento celular polarizado y alteraciones en la organización del citoesqueleto microtubular en hongos filamentosos (Inoue y Turgeon, 1998; Riquelme y Roberson, 2002; Xiang y Plamman, 2003; Gaetz, 2004; Sampson y Health, 2005).

Con el fin de entender el funcionamiento y organización de la dineína citoplasmática en hongos filamentosos, se han realizado diversos estudios particularmente con fusiones de la cadena pesada de la dineína y la proteína verde fluorescente (GFP) en *Aspergillus nidulans* (Xiang et al., 1996; Zhang y Han, 2002; Zhang y Li, 2003).

Los resultados reportados para *Aspergillus nidulans* describen a la dineína como una proteína motora asociada a los extremos terminales positivos de los Mts. (Xiang et al.,

1995; Zhang y Han, 2002). También se ha sugerido que la dineína es dependiente de la kinesina para posicionarse en los extremos terminales positivos de los Mts (Zhan y Li, 2003). Sin embargo existe evidencia en hongos como *Dictiostelium* y *Ustilago* en donde la dineína se encuentra en el citoplasma y no concentrada en las terminales positivas de los Mts (Koonce et al., 1992; Lehmler et al., 1997).

El hecho que la dineína citoplasmática se encuentre concentrada en un solo punto del Mt contraviene la función básica de la dineína la cual es transportar cuerpos membranosos de un extremo positivo del Mt al extremo negativo (Holzbaur y Vallee, 1994; Reese, 2000; Asai, 2001; Xiang y Plamman, 2003). En el mismo sentido se ha sugerido la asistencia de la dineína citoplasmática en el desplazamiento nuclear (Bruno et al., 1996; Tinsley y Minke, 1996; Reese, 2000; Yamamoto y Hairo, 2003), el cual sería imposible si la dineína se encontrara concentrada solo en las terminales positivas de los Mts.

Con base a todo lo anterior, en éste trabajo se llevó a cabo un estudio para mostrar la dinámica y organización de los Mts in vivo en mutantes *ropy-1* (dineína) y *ropy-3* (dinactina) en comparación con la cepa silvestre de *Neurospora crassa*, así como marcar molecularmente con proteína verde fluorescente (GFP) la dineína para conocer su localización en el citoplasma, pues no existe ninguna evidencia publicada sobre el comportamiento de ésta proteína en éste ascomiceto mientras que lo descrito para *Aspergillus nidulans* genera grandes dudas sobre su localización y función.

II. 5. Hipótesis

La dineína tiene la capacidad de polimerizar y organizar a los microtúbulos en hongos filamentosos como es *Neurospora crassa*.

II. 5. 1. Objetivo

Identificar el papel de la dineína en la polimerización y organización de los Mts en *Neurospora crassa*.

II. 5. 2. Objetivos particulares

- 1.- Comparar la dinámica *in vivo* de los Mts en la cepa silvestre y en las mutantes de *N. crassa* con defectos en fracciones del complejo dineína-dinactina como *ropy-1* y *ropy-3* contra la cepa silvestre.
- 2.- Marcar molecularmente a la dineína con GFP y describir la dinámica de la dineína marcada con GFP dentro de las hifas de *N. crassa in vivo*

III. Materiales y Métodos

III.1. Organismos y medios de cultivo

Se utilizaron cepas de *N. crassa* mutantes *ropy-1* (FGsC# 007Ha) y *ropy-3* (FGsC# 0075Ha) y N623^{his-3} (A) así como una cepa silvestre con la subunidad β -tubulina marcada con GFP (FGsC# 078A). Además células competentes tipo DH5 α de *E. coli*.

Los medios utilizados fueron: medio sintético para cruzas, agar mínimo de Vogel como medio de cultivo regular, agar agua con ampicilina (100 μ g ml⁻¹) para observaciones en el microscopio confocal, medio líquido y sólido LB con ampicilina (100 μ g ml⁻¹) para el cultivo de *E. coli*, medio mínimo Vogel con histidina (25mg ml⁻¹) como medio de cultivo para la cepa N623^{his3-}, agar FIGS y solución FIGS 10X como medio de crecimiento para las transformantes (éste medio contiene sorbosa con el fin de retrasar el crecimiento de las colonias transformadas y hacer más sencillo la selección de éstas).

III.2. Cruza de *N. crassa* con los Mts marcados con GFP y mutantes *ropy-1* y *ropy-3*

Se inoculó *N. crassa* (FGsC# 078A) con los Mts marcados con GFP en medio sintético para cruzas (reproducción sexual) y se incubó a 28 °C por siete días. Posteriormente se inoculó con esporas de *N. crassa ropy-1* (FGsC# 007Ha) y *ropy-3* (FGsC# 0075Ha) por separado y se incubaron a 25 °C por una semana en oscuridad total con el fin de producir un apareamiento sexual entre tipos complementarios (A y a). Cuando los peritecios liberaron las ascosporas se colectaron y se mantuvieron en agua destilada a 4 °C.

Se tomó una alícuota de 30 μ l de ascosporas y se sometieron a un choque térmico, con el fin de activar las esporas e inducir la germinación, las ascosporas se incubaron a una temperatura de 60 °C por dos horas. Posteriormente se sembraron en medio mínimo Vogel y se incubaron de 18 a 24 horas a 28 °C. Se recuperaron las colonias con fenotipo ropy con la ayuda de un Microscopio Estereoscópico Marca Olympus Modelo SZX12 en tubos de borosilicato de 5 ml con medio mínimo Vogel solidificado en forma inclinada; las colonias transferidas se incubaron durante 24 horas a 28 °C. Se realizó un tamizaje de las colonias para identificar las que emitían fluorescencia con un Microscopio Invertido de Epifluorescencia Marca Carl Zeiss utilizando un objetivo de 20X y se transfirieron a placas de agar con Medio Mínimo Vogel para posteriormente ser observadas a mayor aumento con un objetivo plan Neo-Fluar de 100X/1.3 A.N. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488nm. Las colonias positivas para la mutación y la fluorescencia de los Mts se almacenaron a -20 °C y a -86 °C para su conservación. La conservación de las colonias positivas se realizó en siembras en tubos inclinados con medio completo Vogel a -20°C

III. 3. Microscopía confocal

Se realizaron series de tiempo, y reconstrucciones en 3D y 2D, utilizando un microscopio confocal marca Carl Zeiss Modelo LSM-Meta. El objetivo utilizado fue un plan-neofluar 100X/1.3 A.N. de inmersión en aceite.

Las series de tiempo de imágenes de hifas se realizaron en dos canales simultáneamente, el primero de fluorescencia para observar los Mts::GFP y el segundo con un foto multiplicador de luz transmitida para imágenes de contraste de fase, ambas utilizando la

iluminación de un láser de argón a 488 nm de longitud de onda. Se tomaron de 50 a 100 imágenes con el pinhole abierto a una unidad Airy y una resolución de 512×512 píxeles con un intervalo de 2 segundos entre cada imagen.

Se tomaron imágenes de hifas individuales en diferentes planos en el eje X, Y y Z con lo cual se realizaran reconstrucciones tridimensionales. Estas imágenes fueron tomadas con el pinhole a una unidad de Airy lo que representa rebanadas ópticas de 0.9 μm y se utilizó una resolución de 512×512 píxeles y solo utilizando el canal de fluorescencia

Las imágenes en dos dimensiones fueron tomadas en dos canales con una resolución de 1048×1048 píxeles. El modelaje en 3D fue realizado utilizando la función de proyecciones en el programa del confocal. Las reconstrucciones de hifas en 2D se realizaron tomando fotos individuales a una resolución de 1048 X 1048 píxeles con el pinhole a 6 unidades de Airy tomando imágenes individuales desde la punta de la hifa hasta las zonas distales. Las imágenes individuales se transformaron a formato TIFF (tagged image file format) y las secuencias a formato avi utilizando el software de LSM Examiner versión 3.2. El procesamiento de las imágenes individuales y las reconstrucciones se realizaron con el programa Adobe Photoshop® 7.0.

III. 4. Diseño de oligonucleótidos

Se obtuvo la secuencia del gen DLIC (Cadena Intermedia Ligera de la Dineína) del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information (Número de referencia XM_322085).

El gen mide 1596 pb. Se utilizó el programa DNA Star, lasergene y pDraw32 para confirmar que las secuencias de las enzimas de restricción utilizadas para el corte del vector no estuvieran presentes en el gen.

Las enzimas de restricción utilizadas para la digestión del vector y de las terminaciones del vector fueron la **XbaI** 5' TCT AGA 3' y **PacI** 5' TTA ATT AA 3'.

Al oligonucleótido sentido se le añadió la secuencia de la enzima **XbaI** y 4 nucleótidos al azar para hacer mas eficiente la digestión de los extremos, quedando de la siguiente manera 5' TATATCTAGA ATGGCGGCCAACACGAAC 3'. Para el oligonucleotido antisentido se utilizaron 15 bases de la secuencia final del gen, eliminando el codón de paro, añadiendo la secuencia de la enzima **PacI** y 4 nucleótidos al azar 5' GCACTTAATTAATGACTGCCGGCTCC 3'

III. 5. Obtención del plásmido pRM02

El plásmido pMF272 (donado por el Dr. Michael Freitag de la Universidad de Oregon), cuenta con la secuencia que codifica para la GFP y con dos secuencias flanqueantes que son homólogas a las secuencias que codifican para la histidina en *N. crassa* lo que nos facilita su integración al genoma. El plásmido pMF272 cuenta también con un sitio de clonación múltiple en donde el gen DLIC será ligado al plásmido. El pMF272 con la ligación del gen DLIC nos resultará en el plásmido pRM02.

El gen DLIC fue amplificado utilizando el protocolo descrito para la Taq polimerasa platinum Hi Fidelity marca Invitrogen, y fue purificado del gel utilizando el protocolo del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Qiagen).

El gen se ligó con el plásmido pGEM-T-easy® con el propósito de obtener extremos 5' y 3' más largos de forma que aumentase la eficiencia del corte por las enzimas **XbaI** y **PacI**. Se utilizaron 3 µl del inserto DLIC amplificado por PCR para obtener el plásmido pIG01. El plásmido pIG01 se clonó en células competentes de *E. coli* tipo DH5α utilizando el protocolo sugerido por Biolabs. Las colonias positivas se incubaron en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg ml⁻¹) durante 12 horas en agitación constante.

El plásmido pIG01 se recuperó por miniprep utilizando el kit marca Qiagen, QIAprep spin miniprep kit (50).

El plásmido pIG01 fue digerido con las enzimas **XbaI** y **PacI**. La digestión se incubó a 37 °C por 3 horas. La reacción se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda fue recuperada del gel con el procedimiento de extracción por kit (QIAprep spin miniprep kit 50)

El vector pMF272 se digirió por separado utilizando el mismo procedimiento añadiéndose en la última hora de digestión 1 µl (10 mM) de fosfatasa alcalina de camarón.

Posteriormente se obtuvo el plásmido pRM02 ligando el vector pMF272 (Freitag et al., 2004) con el gen DLIC. El plásmido pRM02 se clonó en células competentes de *E. coli* tipo DH5α utilizando el protocolo de transformación sugerido por Biolabs.

Las células competentes fueron sembradas en agar LB con ampicilina (100 µg ml⁻¹). Se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Algunas colonias fueron inoculadas en LB líquido con ampicilina (100 µg ml⁻¹). Las colonias se incubaron en agitación constante por 12 horas a 37 °C.

Se realizó una PCR de colonia para verificar la presencia del inserto en cada uno de las colonias seleccionadas, se utilizó un control positivo, el plásmido pMR06 que tiene un inserto de 1.6 kb. Se utilizó el oligo sentido diseñado para el vector pMF272 así como el oligo antisentido utilizado para amplificar el gen DLIC. Se tomó una muestra de cada una de las colonias seleccionadas así como del control positivo y se inoculó respectivamente en cada tubo. La recuperación del plásmido se hizo por mini prep, utilizando el kit QIAprep spin miniprep kit (50) de la marca Qiagen.

El vector pRM02 fue linearizado para ser incorporado al genoma de *Neurospora crassa* usando la enzima SspI (Biolabs)

III. 6. Recuperación de conidias de la cepa mutante N623^{his-3}

El vector pMF272 cuenta con un sitio recombinante con la secuencia que codifica para la histidina en *N. crassa*^{his-3}, la recombinación corrige la mutación permitiéndole sintetizar histidina sin necesidad de consumirla del medio, de ésta manera podemos dirigir la integración del vector con el gen DLIC y la secuencia de la GFP en el genoma de *N. crassa*.

En un matraz con 200 ml de medio mínimo líquido Vogel adicionado con histidina (25mg ml⁻¹) se inocularon esporas de la cepa N623^{his-3}. Se incubaron durante una semana a 28 °C. Las esporas se colectaron vertiendo sorbitol 1 M en el matraz y agitando. El sobrenadante se filtro con en gasa estéril y el liquido con las esporas se conservo a -20 °C hasta ser utilizadas para la transformación.

III. 7. Transformación de *N. crassa* (electroporación)

La transformación de *N. crassa* se llevó a cabo por electroporación como lo describe Margolin (Margolin et al., 1997). En una celda para electroporación se colocaron 60 µl de conidias y 10 µl del vector linearizado pRM02 (Digestión con Ssp I). Se aplicó un pulso eléctrico con un electroporador (Gen Pulser Xcell Electroporation System 165-2660 marca Bio-Rad) de 1.5 kV durante 15 milisegundos con una resistencia de 600 Ohms, posteriormente las conidias fueron sembradas en cuatro cajas de agar FIGS. Se incubaron a 30 °C por siete días.

III. 8. Recuperación de transformantes

Las transformantes se recuperaron y resembraron en tubos con medio completo Vogel. Se incubaron a 28 °C por 24 h. Se realizó un tamizaje para encontrar las colonias que tuvieran fluorescencia con un microscopio estereoscópico Olympus modelo SZX12.

IV. Resultados

IV. I. Descripción del sistema microtubular de las mutantes *ropy-1* y *ropy-3* *inVivo*

En las imágenes fluorescentes capturadas en dos dimensiones se observó una red microtubular organizada en paralelo al eje de crecimiento en las hifas silvestres. Las imágenes de fluorescencia sugieren que los núcleos se encuentran dentro del entramado microtubular, particularmente en la zona subapical (Fig. 1a).

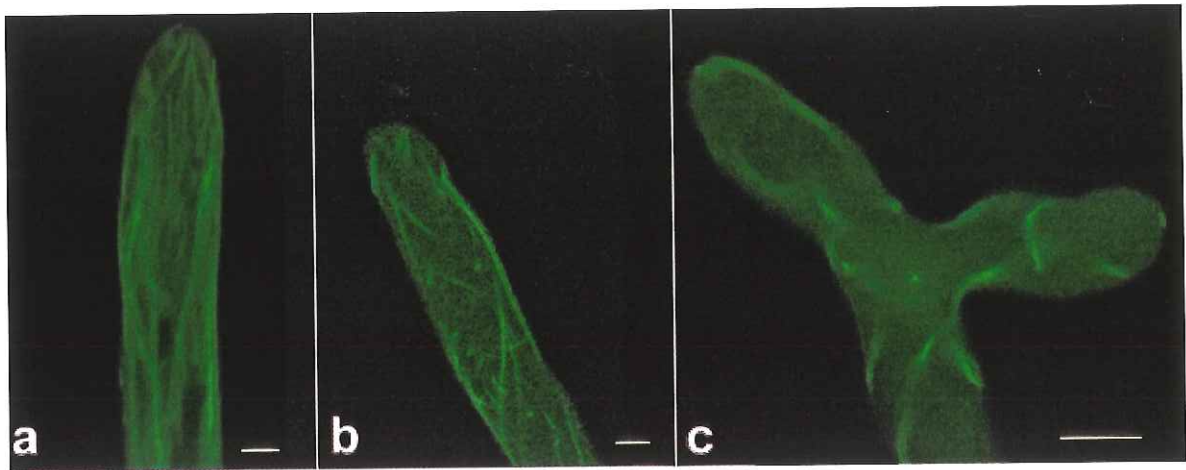


Figura 2. Imagen confocal de la hifa tipo silvestre (a), mutante *ropy-1* (b) y mutante *ropy-3*(c). Cada imagen representa un plano focal de 1 μm . Escala = 5 μm

En la mutante *ropy-3* se observan Mts desorganizados (Fig. 1c) en comparación de las hifas silvestres (Fig. 1a). Los Mts se distribuyen en forma transversal y longitudinal al eje de crecimiento de la hifa. Había escasos Mts en la región apical. Se observaron Mts cortos y acumulaciones de β -tubulina en la zona subapical.

La mutante *ropy-1* presentó una gran cantidad de Mts cortos en comparación con la mutante *ropy-3*. Los Mts no están organizados y la polimerización se ve afectada (Fig. 1b). Se realizaron imágenes en diferentes planos del eje Z, y se sumaron para realizar una reconstrucción en tres dimensiones. Todas las imágenes individuales mostraron una disposición similar de los Mts, lo que sugiere que se encuentran en forma homogénea en todo lo ancho de la hifa en la cepa silvestre, mostrando un sistema microtubular con mayor densidad en algunas áreas cercanas a la punta. Los Mts se encontraron ordenados en la zona apical y se observaron extendidos hasta las zonas distales a mas de 20 μm de distancia del ápice (Figura 2).

La mutante *ropy-1* presentó un sistema microtubular desorganizado a comparación de las hifas silvestres, principalmente en las zonas cercanas a la punta de la hifa. Se observó que hay núcleos en mitosis en zonas cercanas al ápice a diferencia de las hifas silvestres en donde sólo se apreciaron en zonas distales a la punta (Figura 3).

La mutante *ropy-3* muestra un citoesqueleto microtubular más organizado que el observado en las mutantes *ropy-1*, lo que fue evidente en las zonas más cercanas al ápice (Figuras 3 y 4). Sin embargo, también fue posible observar Mts cortos y acumulaciones de β -tubulina en algunas zonas, principalmente en las zonas distales a la punta. Los Mts cercanos al ápice tienden a agruparse. La distribución de los Mts a lo ancho de las hifas de mutantes *ropy-1* y *ropy-3* no fue homogénea (Figura 3 y 4). Fue posible observar Mts aislados con una longitud superior a las 20 μm (Fig. 4b, e y f). Se observó un núcleo en anafase cercano al ápice (Fig. 3i).

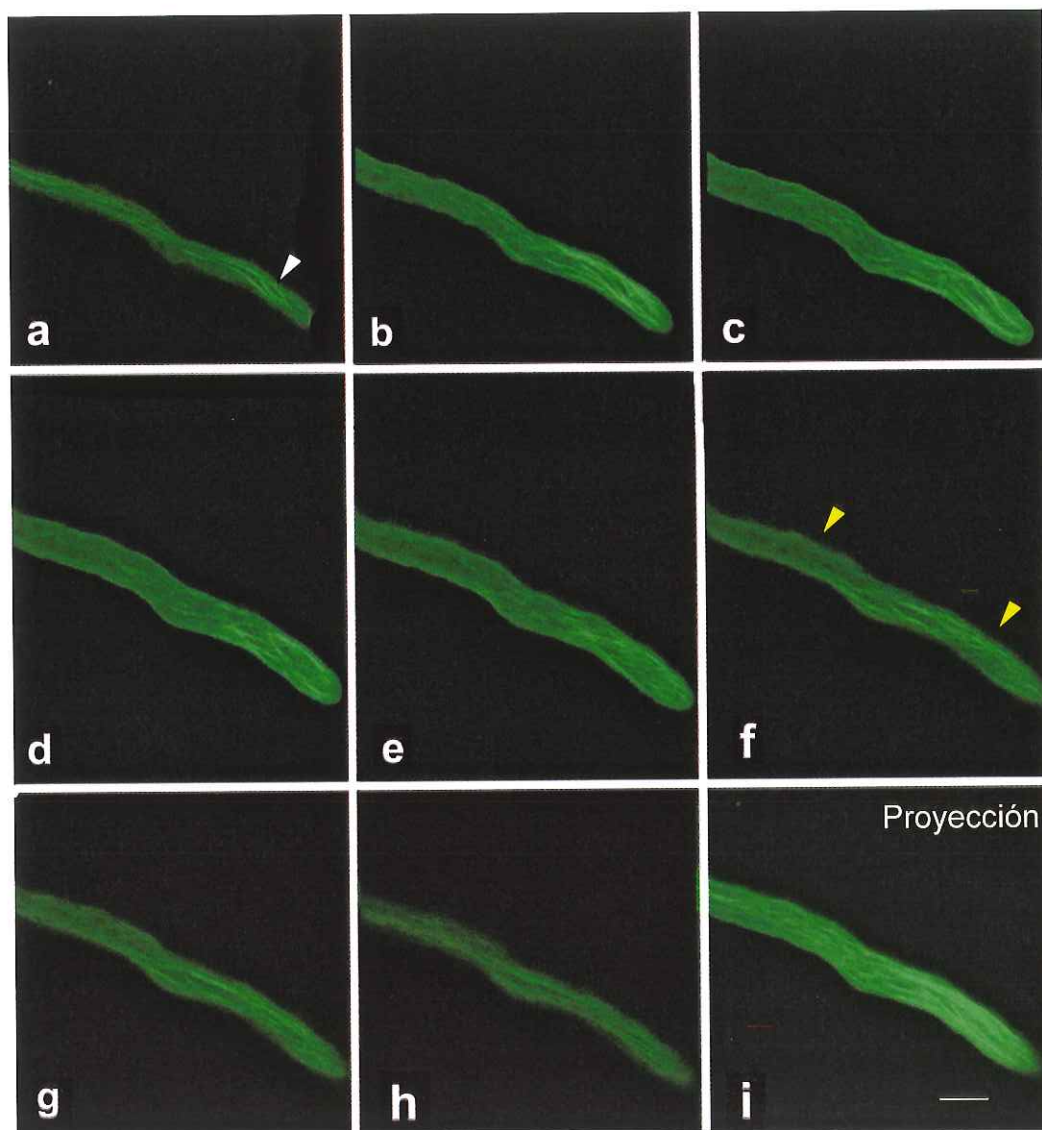


Figura 3.- Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de *N. crassa* tipo silvestre. (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Escala = 10 μm .

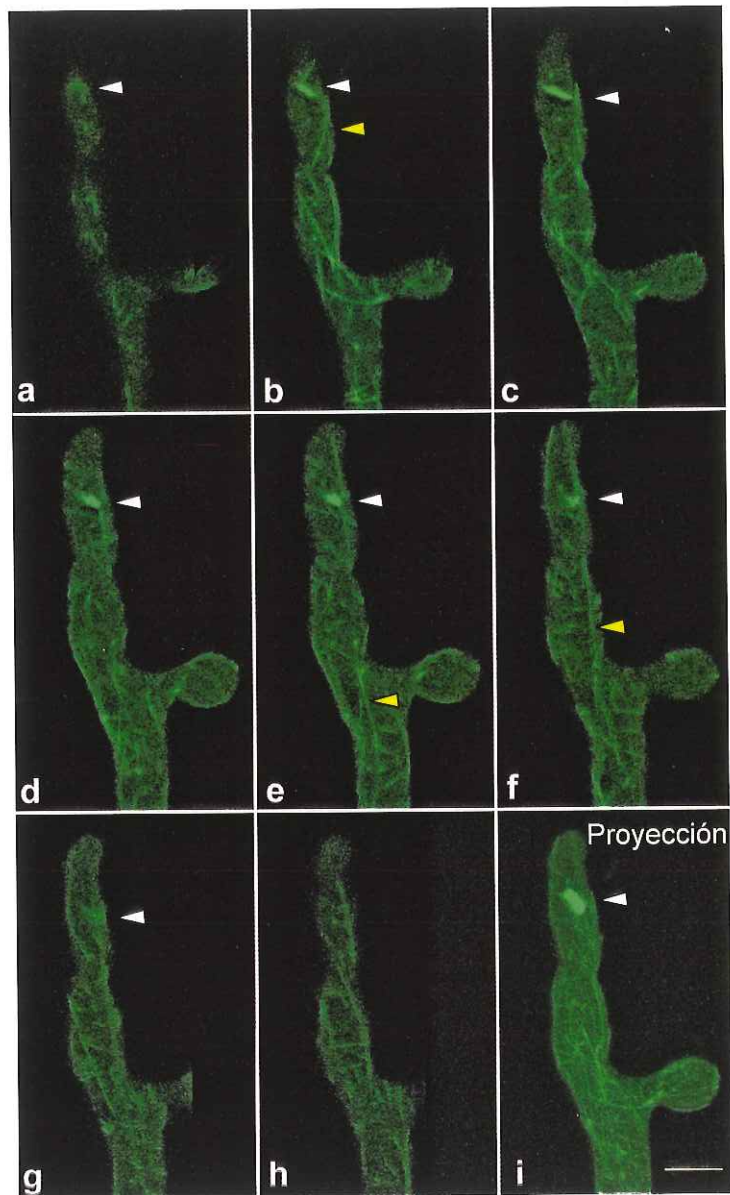


Figura 4.- Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de *N. crassa ropy-1*. (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Escala = 10 μm . Las cabezas de flecha blancas muestran la posición del huso acromático de un núcleo en mitosis, y las amarillas muestran un Mt largo.

Se realizaron reconstrucciones en dos dimensiones partiendo desde la punta hasta la región basal de la hifa para observar la organización de los microtúbulos en las diferentes regiones. En las hifas tipo silvestre se observó que en la región apical y subapical la densidad de los MTs era mayor en comparación con la zona basal. Asimismo, los Mts estaban organizados en las zonas más densas y su organización disminuye conforme se alejan del ápice (Figura 5).

La mutante *ropy-1* tiene una distribución similar a lo largo de la hifa, y a diferencia de la cepa silvestre muestra un menor número de Mts en el ápice y su número se incrementa en la zona subapical y basal. Sin embargo, se presentan en forma fragmentada y desorganizada (Figura 6). En las mutantes *ropy-3*, se observó una distribución similar a la de la *ropy-1*, presentándose un mayor número de Mts asociados (Figura 7).

La velocidad de elongación de las hifas también resultó afectada por la ausencia de dineína; el índice promedio de elongación de las hifas silvestres fue de $0.060 \mu\text{m s}^{-1}$ mientras que para las mutantes *ropy-1* y *ropy-3* fue de $0.013 \mu\text{m s}^{-1}$ y $0.023 \mu\text{m s}^{-1}$ respectivamente (Figura 8).

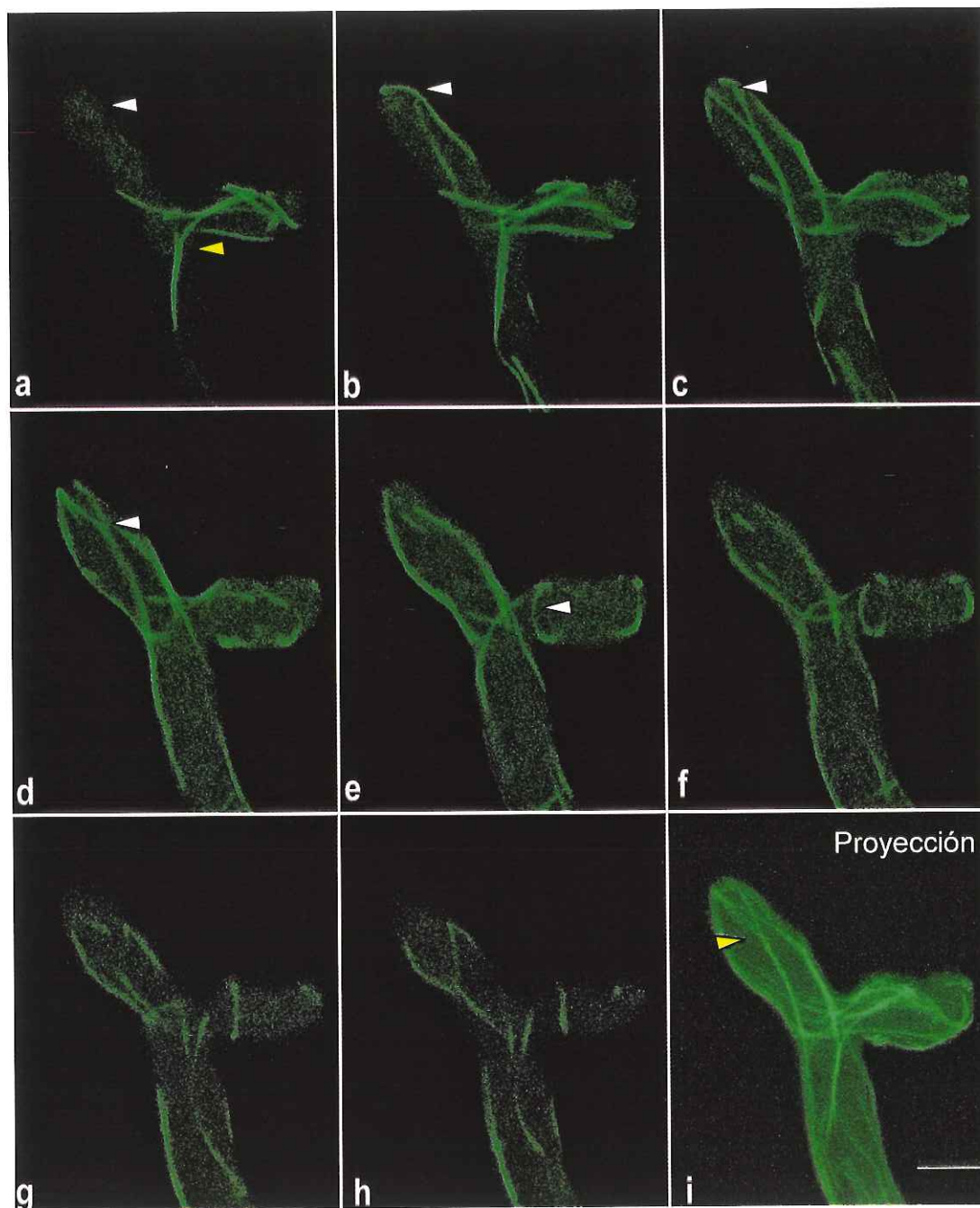


Figura 5.- Imágenes confocales en diferentes planos del eje Z (a-h) de hifas de *N. crassa* tipo *ropy-3*. (i) es la proyección en un solo ángulo de las imágenes de a-h). Las cabezas de flecha blanca muestran Mts individuales y las amarillas Mts agrupados. Escala = 10 μ m.

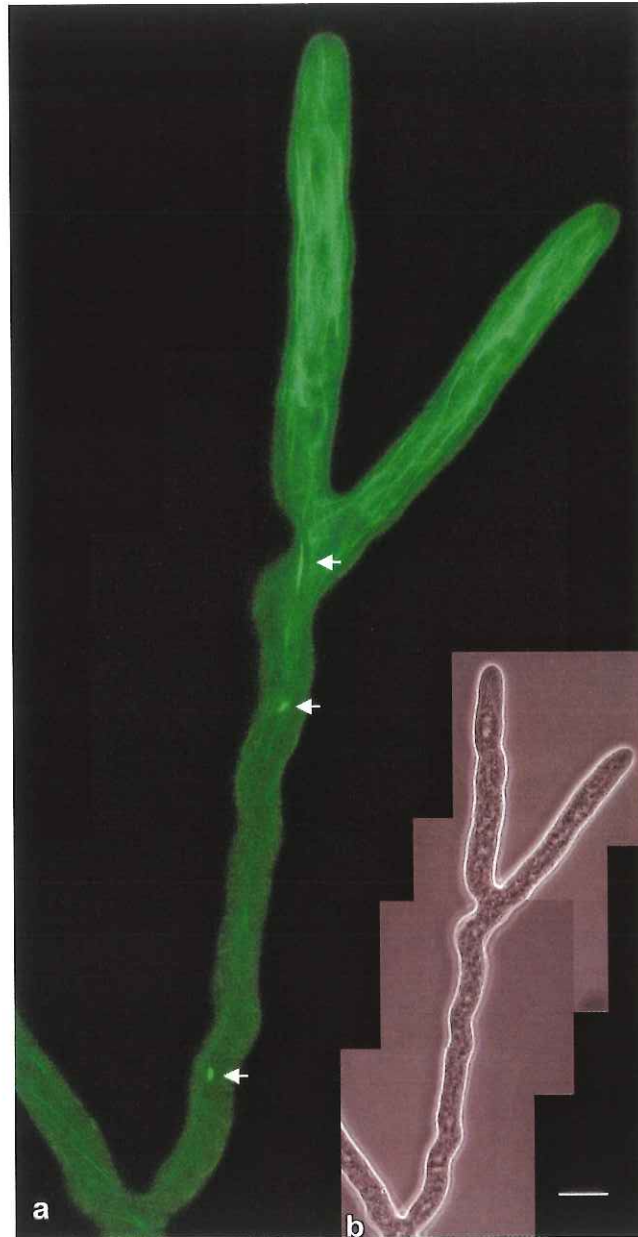


Figura 6.- Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de *N. crassa* de tipo silvestre. Las flechas blancas muestran los husos acromáticos de núcleos en diferentes estadios de la mitosis. Escala = 10 μ m.

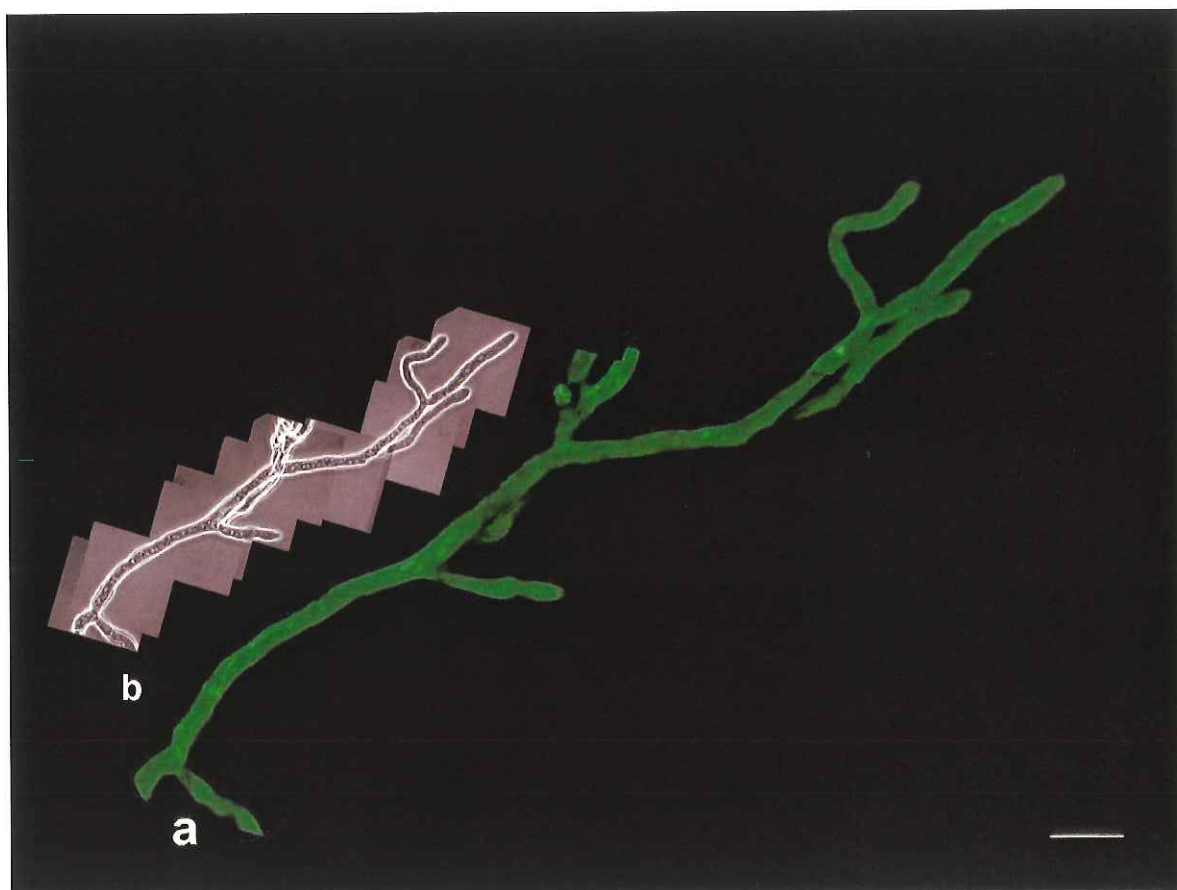


Figura 7.- Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de *N. crassa ropy-1*. Escala = 20 μm .

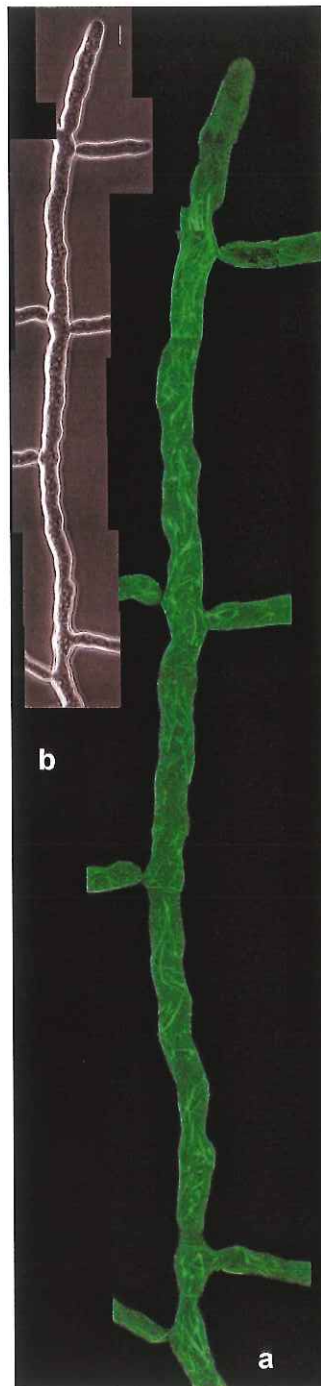


Figura 8.- Reconstrucción en 2 dimensiones de imágenes de fluorescencia (a) y contraste de fase (b) de una hifa de *N. crassa rosy-3*. Escala = 10 μm .

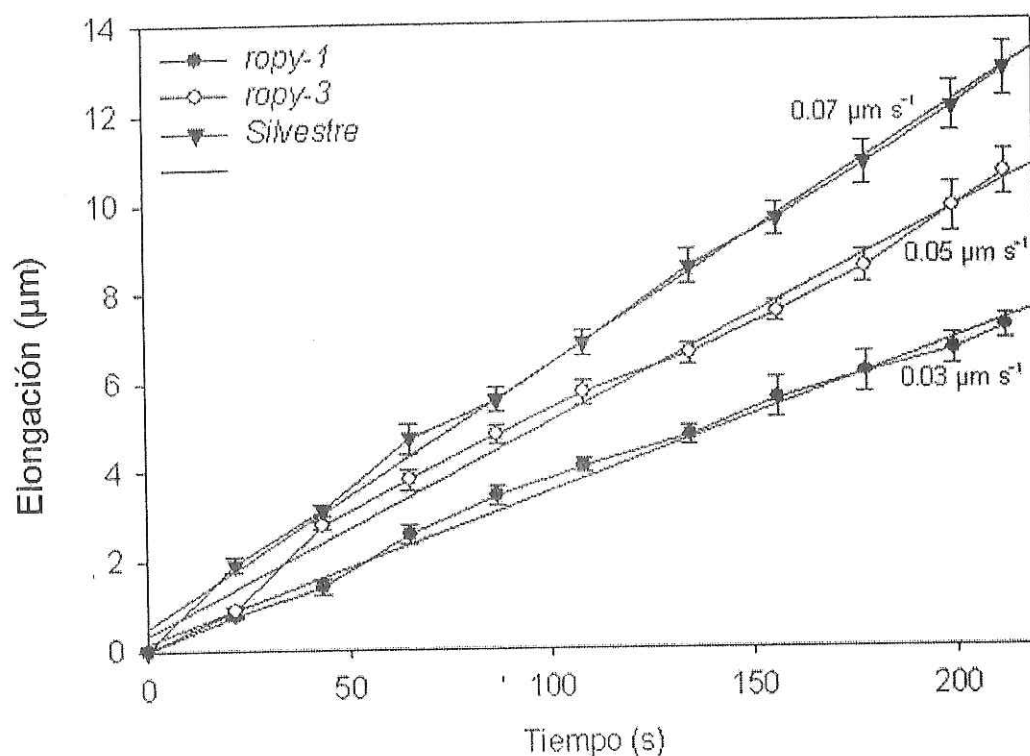


Figura 9.- Elongación de hifas de *N. crassa* silvestre, *ropy-1* y *ropy-3*. n = 30 hifas por cada grupo.

Las imágenes en dos dimensiones realizadas con microscopia confocal mostraron que la dineína se observa como una nube de puntos fluorescentes alrededor de los núcleos y otros organelos (Figura 9). En regiones distales se observó que la fluorescencia se organiza en forma de filamentos.

La posición en la que se encontró la dineína coincide con las zonas de alta densidad de Mts, lo que sugiere una asociación. Las zonas apical y subapical son las que tuvieron una mayor concentración de dineína (Figura 10)

Las imágenes tomadas en el eje-z de la hifa mostraron que se encuentra distribuida homogéneamente en todo lo ancho. Las reconstrucciones de hifas en dos dimensiones sugieren que la dineína se encuentra en la región subapical donde empiezan a aparecer los núcleos y prácticamente no se ve fluorescencia en el ápice (Figura 11).

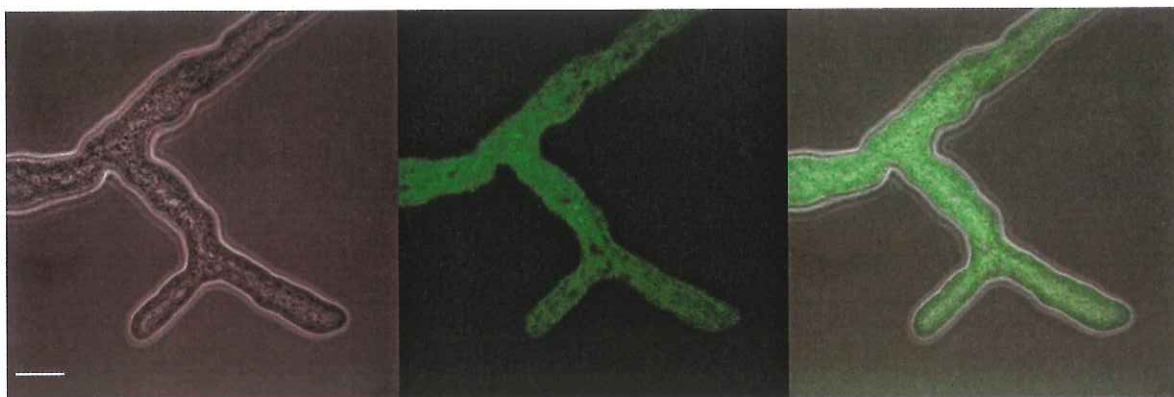


Figura 10.- Imágenes de dos dimensiones en contraste de fases (a), fluorescencia(b) y una sobre posición de ambas (c). Escala = 10 μ m.

Las series de tiempo mostraron que en el ápice es escasa la fluorescencia asociada a la dineína, en la zona subapical de la hifa se observaron partículas fluorescentes de mayor tamaño, intensidad y mas dinámicas. Se observaron núcleos que están rodeados de puntos fluorescentes esto sugiere que podrían estar asistidos en su desplazamiento por las partículas de dineína (Figura 12).

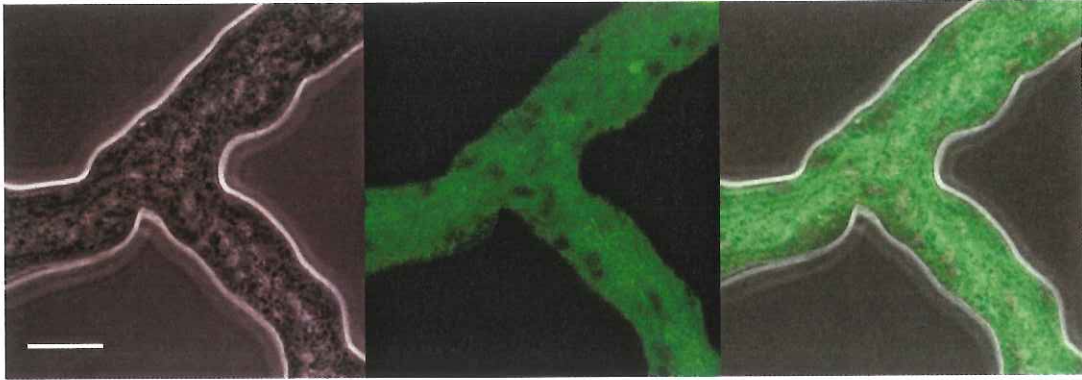


Figura 11.- Imágenes en dos dimensiones tomadas en contraste de fases (a), fluorescencia (b) y una sobre posición de ambas (c). Escala = 10 μm .

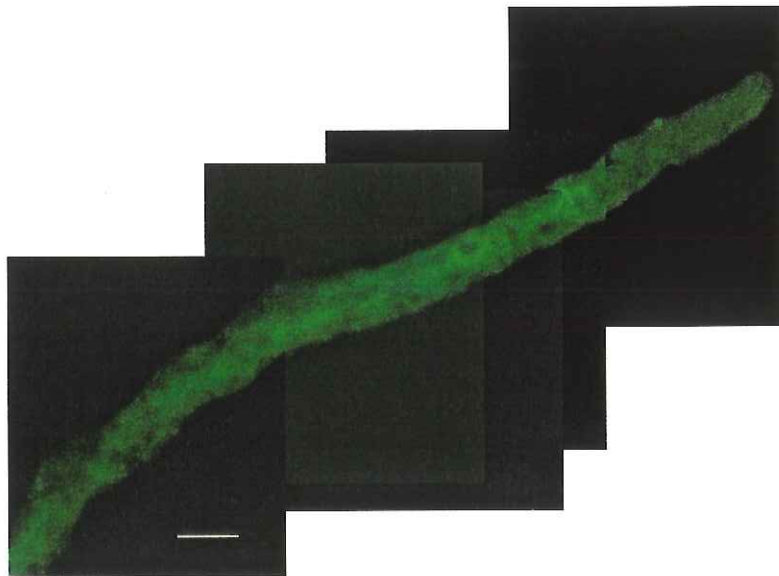


Figura 12.- Reconstrucción en dos dimensiones de una hifa de *N. crassa* con dineína marcada con GFP. Se aprecia en la zona cercana a la punta una acumulación de partículas, que aumentan de intensidad hacia las zonas nucleares así como en la zona distal al ápice

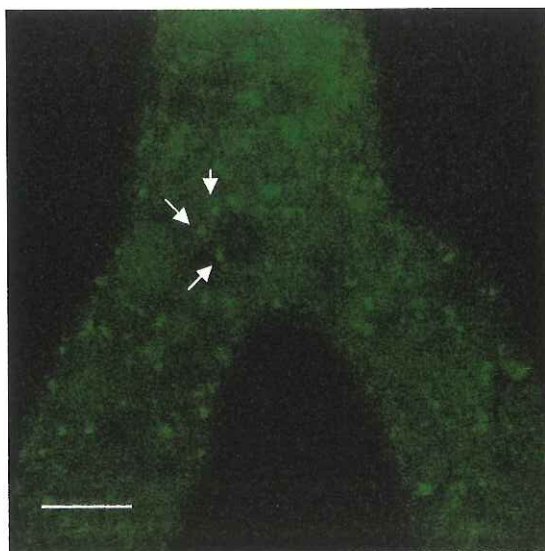


Figura 13.- Imagen de fluorescencia en dos dimensiones del sitio de ramificación. Las flechas blancas muestran puntos de dineína asociados a un núcleo. Escala = 5 μm .

V. Discusión

V.1. Distribución de la dineína en *N. crassa*

El uso de microscopía confocal y marcaje con GFP han sido herramientas valiosas que han permitido el análisis *in vivo* de la distribución y dinámica de los Mts en hifas en crecimiento. Se pudo apreciar en las distintas imágenes que en las cepas mutantes la densidad de Mts en la zona apical es mucho menor que en la cepa silvestre. La cepa silvestre presentó Mts largos y organizados en paralelo al eje longitudinal de crecimiento principalmente en las zonas apical y subapical, con una disminución en la densidad microtubular en zonas distales de las hifas (Mouriño-Pérez et al., 2006).

Los Mts en *ropy-1* y *ropy-3* están desorganizados y son de menor longitud que los observados en la cepa silvestre. *ropy-1* presentó Mts altamente fragmentados (Riquelme et al., 2002) y finos. *ropy-3* presentó Mts también más cortos en comparación a la cepa silvestre, pero mucho más definidos y gruesos.

Al igual que los estudios en animales, se encontró que la dineína citoplasmática es indispensable para una correcta distribución de los Mts y su polimerización (Vorobjev y Malikov, 2001; Malikov et al., 2004). Las mutantes carentes de la función de la dineína presentan un citoesqueleto microtubular desorganizado y los Mts cortos que se observan en la mutante *ropy-1* pueden ser un indicio de una polimerización defectuosa (Riquelme et al., 2002; Malikov et al., 2004).

En este estudio también fue posible mostrar la disfunción que se produce en la organización microtubular cuando el complejo de la dinactina no se encuentra funcional. La subunidad p150^{Glued} perteneciente al complejo de la dinactina y disfuncional en las

mutantes *ropy-3* mostró ser una unidad importante para la organización de los Mts al observarse en la mayoría de las veces agrupados, la polimerización de la tubulina esta menos afectada que en la *ropy-1*.

Entre las dos mutantes *ropy-1* y *ropy-3* se encontraron diferencias, los Mts están fragmentados y cortos en las mutantes *ropy-1* mientras que las mutantes *ropy-3* presentaron Mts de mayor longitud, con menor fragmentación pero con una tendencia a agruparse. Estas discrepancias entre el comportamiento de la *ropy-1* y la *ropy-3*, hace pensar que afectar a la cadena pesada de la dineína tiene un mayor efecto en el funcionamiento de la proteína que afectar a la dinactina o que cada componente del complejo dineína/ dinactina tiene una función específica para la organización de los Mts.

El crecimiento celular es afectado en la mutante *ropy-1* la cual fue seis veces menor que en las cepas tipo silvestres (Seiler et al., 1998; Riquelme et al., 2002) y 3 veces menor en *ropy-3*, probablemente debido a que la pérdida de función de las cadenas pesadas elimina la función de la dineína mientras que la pérdida de la función de la unidad p150^{Glued} sólo la altera pero no elimina su función del todo.

Los resultados obtenidos sugieren que la dineína citoplasmática no se encuentra fija en el extremo positivo del microtúbulo a diferencia de lo descrito para *Aspergillus nidulans* (Xiang et al., 1995) o en un movimiento bidireccional sobre los Mts como fue descrito para *Dyctiostelium* (Koonce et al., 1992). La dineína observada en *N. crassa* sugiere tener una función estrecha con el movimiento nuclear. En algunas observaciones en series de tiempo fue posible observarla alrededor de los núcleos durante su desplazamiento. Sin embargo, también fue posible observar acumulaciones de dineína en zonas proximales a la

punta sin aparentemente estar vinculadas al movimiento nuclear. El movimiento retrogrado que se describe para la dineína sobre los Mts no fue observado en las hifas transformadas. La nube de dineína que envuelve a los Mts presenta un movimiento dirigido a la zona de crecimiento de la hifa. En zonas donde la red microtubular es más densa, la nube de dineína puede observarse marcando algunos filamentos que se desplazan de acuerdo a la dirección del flujo citoplásmico.

Con base a las observaciones realizadas es posible sugerir que la dineína y los Mts forman un complejo que asiste al movimiento nuclear y esta unión confiere estabilidad a todo el sistema microtubular (Figura 13). Esta hipótesis es sugerida a partir de lo observado en las mutantes *ropy-1* donde las cadenas pesadas de la dineína no se encuentran unidas al Mt y en consecuencia los dímeros de tubulina se encuentran en su mayoría despolimerizados, a diferencia de lo observado en la mutante *ropy-3* donde las cadenas pesadas de la dineína se encuentren unidas a los Mts pero dissociadas a la unidad p150^{Glued} del complejo de la dinactina. En estas mutantes los Mts en su mayoría no están despolimerizados pero pierden organización, esto podría significar que la dineína/dinactina funciona otorgando cohesión y estabilidad a los dímeros de tubulina que forman a los Mts como lo muestra Malikov en células animales (Malikov et al., 2004).

El papel que juegan las proteínas motoras en el crecimiento celular polarizado de los hongos aún esta lejos de ser entendido del todo puesto que las diferencias dentro de un mismo grupo de proteínas genéticamente conservadas varia de una especie a otra.

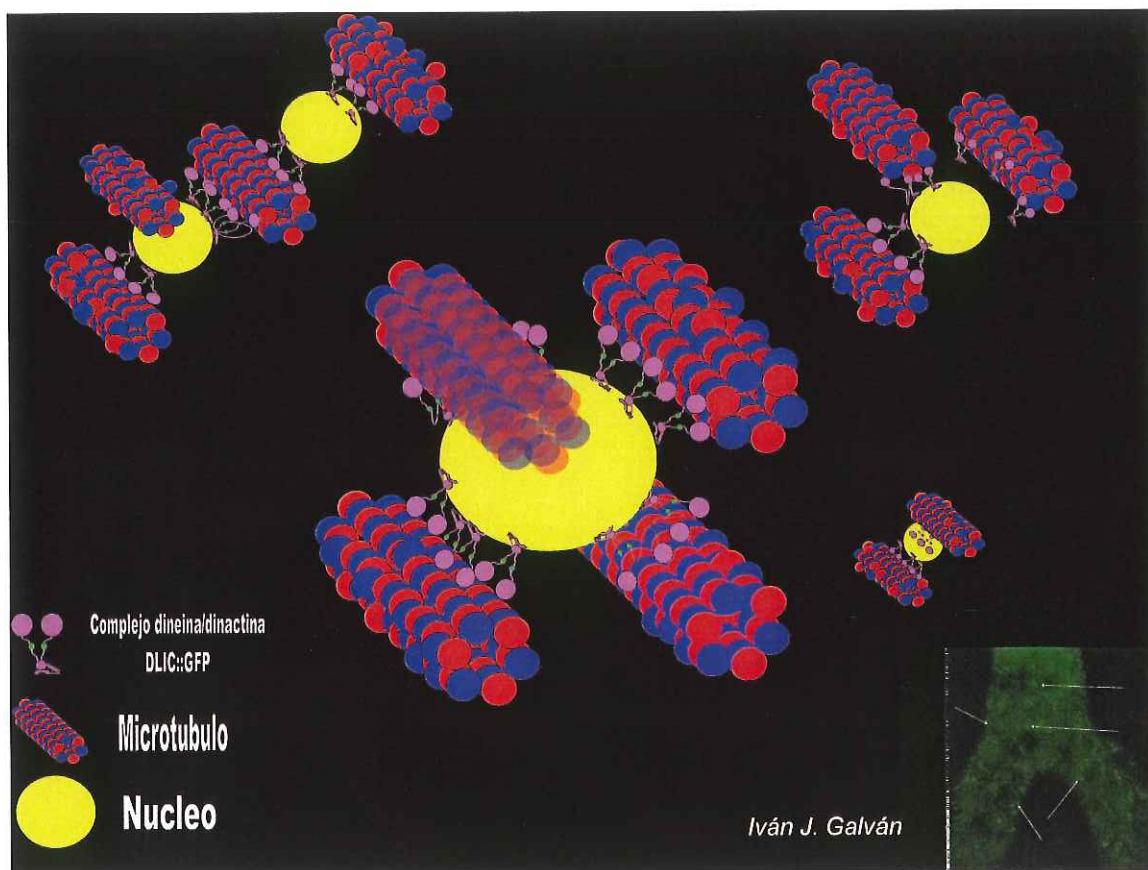


Figura 14.- Esquema de la relación de la dineína y los núcleos basada en la dinámica *in Vivo*.

VI. Conclusión

- El uso de microscopía confocal y marcaje con GFP ha permitido el análisis en vivo de la distribución y dinámica de los microtúbulos en hifas en crecimiento de las mutantes *ropy-1* y *ropy-3* con alta precisión.
- En las cepas mutantes la densidad de Mts en la zona apical es mucho menor que en la cepa silvestre. La cepa silvestre presentó Mts largos y organizados en paralelo al eje longitudinal de crecimiento principalmente en las zonas apical y subapical, con una disminución en la densidad microtubular en zonas distales de las hifas.
- Los Mts en *ropy-1* y *ropy-3* están más desorganizados y son de menor longitud que en la cepa silvestre. *ropy-1* presentó Mts altamente fragmentados y finos. *ropy-3* presentó Mts también más cortos en comparación a la cepa silvestre, pero mucho más definidos y gruesos.
- Los resultados obtenidos sugieren que cada componente del complejo dineína/dinactina tiene una función específica para la organización de los microtúbulos.
- La dineína se encuentra distribuida alrededor de núcleos y organelos en la región subapical de las células, sugiriendo una asociación en el desplazamiento nuclear.
- No se encontró dineína en la terminal positiva de los Mts.
- No se observaron movimientos retrógrados de la dineína.

VII. Literatura Citada

- Aist J. R. 1999. Mitosis in filamentous fungi: how we got where we are. Fungal Genet Biol 27(1): 1-25.
- Asai D. J. and Koonce M. P. 2001. The dynein heavy chain: structure, mechanics, and evolution. Fungal Genet Biol 11(5): 196-202.
- Bartnicki-García S., Hergert F., Gierz G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. Protoplasma 153(5): 6-57.
- Borkovich K. A. and Alex L. A. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68(1): 1-108.
- Bracker C. E. and Murphy D. J. 1997. Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae. SPIE 2983(12): 67-80.
- Bruno K. S., Tinsley J. H., Minke P. F., Plaman M. 1996. Genetic interactions among cytoplasmic dynein, dynactin and nuclear distribution mutants of *Neurospora crassa*. Genetics 93(10): 4775-4780.
- Brunswik H. 1924. Untersuchungen uber die geschlechts und kernverhaltnisse bei der hymenomyzetengattung Coprinus. Botanische Abhandlung 312(4): 1-152.
- Derksen J. 1990. Microtubules in tip growth systems. Tip Growth in Plant and Fungal Cells 123(15): 148-181.

- Eckley D. M., Gill S. R., Melkonian, K. A., Bringham, J. B., Goodson, H.V., Heuser, J. E., Schroer, T. A. 1999. Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the Arp1 minifilament pointed end. Journal of cell 147(2): 307-320.
- Gaetz J. 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. J. Cell Biol. 166(4): 465-471.
- Geitmann A. and Emons A. M. 2000. The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. Journal of Microscopy 198(Pt3): 218-245.
- Girbardt M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. Planta 50(1): 47-59.
- Grove S. N. and Bracker C. E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. Journal of Bacteriology 104(2): 989-1009.
- Haimo L. T. 1997. Ordering microtubules. BioEssays 19(7): 547-550.
- Harris S. D. and Read N.D. 2005. Polarisome meets spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. Eukaryot. Cell 4(2): 225-229.
- Hoch H. C. 1985. The microtubule cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germlings: Its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytoskeleton. Protoplasma 124(3): 112-122.
- Holzbaur E. L. F. and Vallee R. B. 1994. Dyneins: molecular structure and cellular function. Annu. Rev 10(2): 339-372.
- Horio T. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. Mol. Biol. Cell 16(2): 918-926.

- Howard R. J. 1980. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze- substitution of hyphal tip cells. J. Cell Biol. 87(1): 55-64.
- Howard R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkorper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. J. Cell Sci. 48(1): 89-103.
- Inoue S. and Turgeon B.G. 1998. Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. J. Cell Sci. 111(11): 1555-1566.
- King S. J. and Brown C.L. 2003. Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. Mol. Biol. Cell 14(12): 5089-5097.
- King S. M. 2000. AAA domains and organization of the dynein motor unit. J. Cell Sci. 113(14): 2521-2526.
- Koonce M. P., Grissom P. M., McIntosh R. 1992. Dynein from *Dictyostelium*: Primary structure comparisons between a cytoplasmic motor enzyme and flagellar dynein. Journal of cell biology. 119(6): 1597-1604.
- Kumar S. and Zhou L. 2001. Dynactin-membrane interaction is regulated by the C-terminal domains of p150Glued. EMBO Rep. 2(10): 939-944.
- Lehmlier C., Steinberg G., Snetselaar K. M., Schliwa M. 1997. Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. EMBO Journal. 16(12): 3464-3473.

- Malikov V. and Kashina A. 2004. Cytoplasmic dynein nucleates microtubules to organize them into radial arrays *in vivo*. Mol. Biol. Cell 15(6): 2742-2749.
- McDaniel D. P. and Roberson R.W. 2000. Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. Fungal Genet Biol 31(3): 233-44.
- Mouriño-Pérez R.R., Roberson R.W., Bartnicki-García S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol 43 (6): 389-400.
- Nédélec F. T. and Surrey. 2003. Self-organization and forces in the microtubule cytoskeleton. Current Opinion in Cell Biology 15(7): 118-124.
- Oakley B. R. and Morris N. R. 1980. Nuclear movement is β -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. Cell 19(1): 255-262.
- Oakley B.R. 1992. γ -tubulin: the microtubule organizer?. Trends Cell Biol 2(1): 1-5.
- Oakley B. R. 2000. γ -tubulin. Curr Top Dev Biol 49(5): 27-54.
- Reese E. L. 2000. Dynein, dynactin, and kinesin II's interaction with microtubules is regulated during bidirectional organelle transport. J. Cell Biol. 151(1): 155-166.
- Riquelme M., Reynaga-Pena C. G., Bartnicki-García S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? Fungal Genet Biol 24(1-2): 101-9.
- Riquelme M., Roberson R. W. McDaniel D. P., Bartnicki-García S. 2002. The effects of ropy-1 mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol 37(2): 171-9.

- Roberson R. W. 1994. The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. Protoplasma 182(13): 19-31.
- Rodionov V. I. and Lim S. S. 1994. Microtubule dynamics in fish melanophores. J. Cell Biol. 126(6): 1455-1464.
- Rowland H. Davis. 2000. *Neurospora: Contributions of a model organism*. Oxford Press. 250p.
- Sampson K. and Heath H. 2005. The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. Microbiology 151(5): 1543-1555.
- Straube A. and Enard W. 2001. A split motor domain in a cytoplasmic dynein. EMBO J. 20(18): 5091-5100.
- Straube A. and Brill M. 2003. Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: Polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. Mol. Biol. Cell 14(2): 642-657.
- Tinsley J. H. and Minke P.F. 1996. p150Glued, the largest subunit of the dynactin complex, is nonessential in *Neurospora* but required for nuclear distribution. Mol. Biol. Cell 7(5): 731-742.
- Tucker J. B. 1984. Spatial organization of microtubule-organizing centers and microtubules. J. Cell Biol. 99(1): 55-62.
- Vorobjev I. and Malikov V. 2001. Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. PNAS 98(18): 10160-10165.

- Wessels J. G. H. 1986. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. International Review of Cytology 104(8): 37-79.
- Wu Q. and Sandrock T. M. 1998. A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. Mol. Biol. Cell 9(1): 89-101.
- Xiang X., Roghi C., Morris R. 1995. Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. Cell Biol 92(21): 9890-9894.
- Xiang X. and Plamann M. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. Current Opinion in Microbiology 6(6): 628-633.
- Yamamoto A. and Hairo M. 2003. Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. J. Cell Sci. 116(22): 4501-4512.
- Zhang J. G. and Han A. 2002. Cytoplasmic dynein intermediate chain and heavy chain are dependent upon each other for microtubule end localization in *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 44(2): 381-392.
- Zhang J. and Li S. 2003. Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. Mol. Biol. Cell 14(4): 1479-1488.