TESIS DEFENDIDA POR Leonora Elizabeth Martínez Núñez Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

(Dra. Meritxell Riquelme) Director del Comité

(Dr. Salomon Bartnicki García)

Miemoro del Comité

(Dra. Blánda Claudia Farfán)

i

Miembro del Comité

(Dra. Rufii Ternández Martínez)

Coordinador del programa de posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales Director de Estudios de Posgrado

23 de Noviembre de 2011

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGIA

Localización de las β (1-3) endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2 y su papel en la morfogénesis de *Neurospora crassa.*

TESIS

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

Presenta: LEONORA ELIZABETH MARTÍNEZ NÚÑEZ

Ensenada, Baja California, México, NOVIEMBRE de 2011

RESUMEN de la tesis de Leonora Elizabeth Martínez Núñez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en microbiología. Ensenada, Baja California. Noviembre de 2011.

Localización de las β (1-3) endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2 y su papel en

la morfogénesis de Neurospora crassa.

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme

El modelo de crecimiento unitario de la pared celular propone que la extensión polarizada de las hifas en los hongos filamentosos es resultado de la síntesis y descarga de nuevos polímeros de la pared celular, la acción de enzimas hidrolíticos que proporcionan plasticidad a la pared y la fuerza de turgencia para promover la expansión de la célula. Existe poca información sobre las enzimas con capacidad de hidrolizar compuestos de la pared celular y que podrían contribuir a su plastificación. Las proteínas EGLC-1 y EGLC-2 son β (1-3) endoglucanasas putativas de *Neurospora crassa*, con un posible sitio de unión al grupo glucosil fosfatidilinositol (GPI) que permite su anclaje a la membrana plasmática. Por medio de PCR de fusión e integración en el plásmido pMF272 se construyeron dos vectores recombinantes que contienen el gen de la proteína verde fluorescente (gfp) insertado en la secuencia de eglc-1 justo después de la secuencia codificante para el péptido señal, y de eglc-2 justo antes del posible sitio de unión a GPI. Estos plásmidos se expresaron en la cepa de N. crassa FGSC #9717. Las cepas transformantes expresando EGLC-1-GFP o EGLC-2-GFP se analizaron mediante microscopía confocal de escaneo con láser para conocer su localización y dinámica. Estas endoglucanasas se encontraron en los eventos morfogenéticos importantes para el desarrollo del hongo. proteínas se localizan Ambas en el ápice de hifas y septos,. Los patrones de fluorescencia en cada uno de estos sitios fueron diferentes en cada caso, además de que EGLC-1-GFP también fue localizada en el septo de los conidióforos. Tambien se llevaron a cabo ensayos con inhibidores del citoesqueleto y del transporte de proteínas. Tanto el benomilo (inhibidor de los microtúbulos) como la brefeldina A (inhibidor de la vía secretora clásica) parecen no afectar la localización de EGLC-2-GFP, sólo la latrunculina A (inhibidor de cables de actina) tiene un efecto en la localización de EGLC-2-GFP. Los resultados obtenidos demuestran que enzimas con actividad lítica, tales como las endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2 de N. crassa, se encuentran en sitios claves de crecimiento, donde probablemente intervienen promoviendo la remodelación de la pared celular, tal como lo postula el modelo unitario de crecimiento de la pared celular.

Palabras Ciave: β (1-3) endoglucanasas, remodelación de pared celular, plasticidad, *N. crassa*

ABSTRACT of the thesis presented by Leonora Elizabeth Martínez Núñez as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Microbiology. Ensenada, Baja California, México. November 2011.

Localization of the β (1-3) endoglucanases EGLC-1 and EGLC-2 and their role in the morphogenesis of *Neurospora crassa*.

The unitary model of cell wall growth suggests that the polarized extension of hyphae in filamentous fungi is the result of the synthesis and deposition of new cell wall polymers, the action of hydrolytic enzymes that provide plasticity to the wall and turgor pressure to drive cell expansion. There is a little information on enzymes capable of hydrolyzing cell wall polymers that could serve to plasticize the cell wall. EGLC-1 and EGLC-2 are putative β (1-3) endoglucanases in Neurospora crassa, with potential binding sites for a glucosvl phosphatidylinositol group (GPI) which would allow them to anchor into the plasma membrane. Through fusion PCR and integration into the plasmid pMF272, two recombinant vectors were constructed containing the encoding sequence for green fluorescent protein (gfp). The gfp sequence was inserted within the eglc-1 sequence, just after the signal peptide encoding sequence. For the eglc-2 sequence, the insertion was just before the GPI-binding site. These plasmids were expressed in N. crassa strain FGSC # 9717 and prototrophic strains expressing EGLC-1-GFP or EGLC-2-GFP were analyzed by confocal laser scanning microscopy to monitor the location and dynamics of these proteins. These endoglucanases were found in morphogenetic events important to the development of the fungus. Both proteins were localized in the hyphal apical plasma membrane and in septa. The fluorescence patterns observed at each of these sites were different ifor each protein. Additionally, EGLC-1-GFP was localized at the septum of mature conidiophores. The effects of cytoskeleton inhibitors and secretory pathway transport on the dynamics of EGLC-2-GFP were analyzed. Neither benomyl (a microtubule inhibitor) nor brefeldin A (a secretory pathway inhibitor) affected strongly the localization of the proteins; only latrunculin A (an actin cables inhibitor) had a small effect in the localization of EGLC-2-GFP. The results reported here show that lytic activity of enzymes such as endoqlucanases EGLC-1 and EGLC-2 in N. crassa, is present in critical areas of fungal morphogenesis, where they probably play a role in cell wall remodeling, as postulated by the unitary model of cell wall growth.

Keywords: β (1-3) endoglucanases, cell wall remodelling, plasticity, *Neurospora* crassa.

A Fresita... lo mejor... lo aprendí de ti

,

1

۷

AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto fue posible gracias a la beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Gracias además al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE) por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones y a la planta académica de la institución cuyos conocimientos transmitidos hacia mi son invaluables.

Me gustaría agradecer de manera especial a mi Directora de Tesis, la Dra. Meritxell Riquelme Pérez, por todas las aportaciones y comentarios acerca de este proyecto, los resultados obtenidos son producto de largas horas de trabajo y esfuerzo motivados por el ejemplo a seguir que ella significa para mí. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y enseñarme tanto, estoy segura de que seguiré haciéndolo por mucho tiempo más.

Mil gracias a mi comité de Tesis, la Dra. Claudia Farfán y el Dr. Salomón Bartnicki García, por todos los comentarios y críticas que contribuyeron a la finalización de este proyecto de tesis. Siempre tuvieron algo positivo que decirme, gracias.

Muchas gracias a la Dra. Rufina Hernández Martínez, por tomarse la molestia de llamarme por teléfono y ofrecerme la oportunidad de formar parte de este grupo, me cambio la vida, y además, por todas las demás molestias que le he ocasionado con mis preguntas. Gracias Adriana Mejía, por todas y cada una de las preguntas y dudas resueltas, por siempre tener disposición de ayudarme con trámites y papeleo.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología por la disposición siempre de ayudar, Diego, Isadora, Olga, por todas las dudas resueltas.

Gracias especialmente a mis compañeros y amigos del Grupo Riquelme por tooooooda la ayuda, no tiene precio que soportaran todas mis dudas. Eddy y Adriana, mil gracias. Gracias a los que no quieren estar en mi lista, pero de alguna manera contribuyeron a que finalizara este proyecto.

Roxy, gracias por todo, por todo lo que me has ensenado y por todo lo que hemos pasado en horas laborales y no tan laborales. Te quiero un montón .

Muchas gracias a Katrin, porque desde el principio supe que ibas a ser especial para mí, gracias por estudiar conmigo y explicarme cosas que nunca iba a entender, y gracias por siempre estar ahí y por alcahuetearme.

Este espacio especial es para agradecer a los nuevos amigos que hice en la maestría, Jairo, Tzitziki, Félix, Samantha (y Sofi) y Andrea, por compartir conmigo

tantas cosas en estos dos años, son muy especiales para mí. Además Andrea, gracias también por presentarme a Joan, gracias a las dos por sacarme de paseo en ensenada.

De manera personal, quiero dar MIL MILLONES de gracias a mis amigas hermanas de Xalapa por que siempre se preocuparon por mi y por como estaba, por siempre querer saber de mi vida y por no olvidarme a pesar de la distancia, mil gracias Aleyda, Crystell, Ivettte, Vanish, Karim, Brenda, Deya, gracias por seguir ahí.

Quiero agradecer infinitamente a mi FRESITA, que más que mi mami, es mi amiga, sin ti jamás hubiera llegado aquí, y no tengo palabras para agradecer todos los sacrificios que has hecho para que yo sea lo que soy ahora. GRACIAS también por hacernos una familia después de todo. Gracias a mis hermanos, por preocuparse por mi y estar siempre ahí.

Y quiero agradecer súper especialmente a COMETIN, cambiaste mi vida, gracias por apoyarme y entenderme y siempre estar ahí conmigo y no dejarme en los momentos de mayor estrés de mi vida "Music sounds better with you"*

CONTENIDO

Resumen español	iii
Resumen ingles	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas	xviii

I. Introducción	1
I. 1 Importancia de los hongos	1
I. 2 La pared celular de los hongos	2
I. 3 Glucoproteínas de membrana	4
I. 4 Quitina y quitosano	5
I. 5 Glucano	6
I. 6 La pared celular y el crecimiento apical	7
II. Antecedentes	11
III. Justificación	17
IV. Hipótesis	18
V. Objetivos	18
V. I General	18

V. 2 Particulares	18
VI. Materiales y métodos	19
VI. 1 Cepas, medios y condiciones de cultivo	19
VI. 2 Análisis bioinformático	20
VI. 3 Extracción de ADN genómico de Neurospora crassa	21
VI. 4 Diseño de oligonucleótidos para PCR de fusión	21
VI. 4. 1 eglc-1:: gfp	22
VI. 4. 1. 1 Amplificación del fragmento ps	22
VI. 4. 1. 2 Amplificación del fragmento gfp	22
VI. 4. 1. 3 Amplificación del fragmento gpi	23
VI. 4. 1. 4 Amplificación del fragmento fusión ps + gfp y gpi + gfp	23
VI. 4. 1. 5 Amplificación del fragmento fusión eglc-1::gfp	23
VI. 4. 2 ps::gfp::eglc-2	24
VI. 4. 2. 2 Amplificación del fragmento gfp	24
VI. 4. 2. 3 Amplificación del fragmento orf	24
VI. 4. 2. 4 Amplificación del fragmento fusión ps + gfp y orf + gfp	25
VI. 4. 2. 5 Amplificación del fragmento fusión ps::gfp::eglc-2	25
VI. 5 Clonación y construcción de plásmidos	26
VI. 5. 1 Construcción del plásmido pLMN02	27
VI. 5. 2 Construcción del plásmido pLMN04	29
VI. 5. 3 Secuenciación de los vectores recombinantes	30
VI. 6 Transformación de Neurospora crassa	30
VI. 6. 1 Obtención de conidios	30
VI. 6. 2 Linearización de plásmidos y electroporación	31

VI. 6. 3 Selección de transformantes	
VI. 6. 4 Ensayos con inhibidores	
VI. 6. 5 Microscopía confocal y procesamiento de imágenes	
VI. 7 Caracterización de cepas	
VI. 7. 1 Comprobación de mutantes	
VI. 7. 2 Tasa de crecimiento a 30º C y 37º C	
VI. 7. 3 Crecimiento de hifas aéreas	
VI. 7. 4 Conteo de ramificaciones	34
VI. 7. 5 Cruzas genéticas	

VII. Resultados	36
VII. 1 Análisis bioinformático	36
VII. 2 Obtención de fragmentos de fusión por PCR	37
VII. 2. 1 eglc-1: gfp	37
VII. 2. 2 ps::gfp::eglc-2	37
VII. 3 Obtención de plásmidos recombinantes	38
VII. 3. 1 pLMN04: eg/c-1::gfp	38
VII. 3. 2 pLMN02: ps::gfp::eglc-2	39
VII. 4 Obtención y selección de transformantes	41
VII. 4. 1 Transformación de N. crassa con los vectores recombinantes	41
VII. 5 Análisis por microscopía confocal de cepas transformantes	41
VII. 6 Localización de EGLC-1-GFP	42
VII. 6. 1 EGLC-1-GFP en hifas maduras	42
VII. 6. 2 EGLC-1-GFP en conidióforos y germínulas	44
VII. 7 Localización de EGLC-2-GFP	46

VII. 7. 1 EGLC-2-GFP en hifas maduras	
VII. 7. 2 EGLC-2-GFP en germínulas	
VII. 7. 3 EGLC-2-GFP e inhibidores	
II. 8 Caracterización de cepas	
VII. 8. 1 Comprobación de cepas mutantes	55
VII. 8. 2 Tasa de crecimiento a 30° C	57
VII. 8. 3 Tasa de crecimiento a 37° C	
VII. 8. 4 Crecimiento de hifas aéreas a 30° C	58
VII. 8. 5 Conteo de ramificaciones	59
VII. 8. 6 Cruzas genéticas	60

VIII. Discusión y Conclusión	61
------------------------------	----

IX.	Bibliografía	6	9
-----	--------------	---	---

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema representativo de la pared celular en hongos (Bowman y Free 2006).	5
2	Esquema representativo de dos de los modelos propuestos para explicar como ocurre el ensamblaje de la pared celular.	10
3	Esquema de las estrategias seguidas para obtener la fusión para eglc-1 y eglc-2 con gfp.	21
4	Mapa del plásmido pMF272.	27
5	Representación esquemática de los resultados arrojados por los servidores Big Fungal PI predictor y Signal P 3.0. La línea azul entre la secuencia de aminoácidos indica el sitio de corte del péptido señal.	26
	Color de acercar 10/ con los amplicanos obtenidos novo acla	30
6	1::gfp (A) y para ps::gfp::eglc-2 (B).	37
7	Mapa de los vectores recombinantes pLMN02 y pLMN04 construidos.	38
8	Gel de agarosa con los amplicones obtenidos en la PCR de colonia (eglc-1::gfp 2,000 pb) (A) y el perfil de restricción con EcoRI y Xbal liberando el fragmento de fusión eglc-1::gfp.	39
9	Gel de agarosa con los amplicones obtenidos en la PCR de colonia (ps::gfp::eglc-2 2500 pb) (A) y el perfil de restricción con EcoRI y Xbal liberando el fragmento fusión ps::gfp::eglc-2.	40
10	Localización de EGLC-1-GFP en el ápice de hifas de la cepa transformante TLMN04. EGLC-1-GFP se acumula en pequeñas zonas en el ápice de la hifa madura (flechas). En la imagen en contraste de fases se puede identificar al Spk y en la sobreposición se observa como la fluorescencia de EGLC-1- GFP se encuentra adyacente al Spk. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 10 µm.	42

Figura

Página

Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en el septo de las hifas de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en la zona central de los septos de las hifas (escala: 10 µm). (B) Se localiza también en algunos puntos de la membrana plasmática perpendicular a los septos (flechas) (escala: 5 µm). (C) Serie de tiempo donde se observó fluorescencia avanzando desde la zona periférica hacia la parte central del septo, para permanecer en esta zona. El tiempo Os 11 indica el momento en que comenzó a captarse la secuencia (escala: 10 µm). (D) Reconstrucción en 3D de la región fluorescente del septo formada con 20 rebanadas ópticas de 0.5µm (escala: 10 µm). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X $_{43}$ (N.A. 1.3 Carl Zeiss®).

Localización de EGLC-1-GFP en conidióforos de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en los septos divisorios de los conidióforos (flechas blancas). En la imagen en contraste de fases se puede apreciar que los sitios de constricción de los conidios que están por ser liberados coinciden con los sitios de acumulación de fluorescencia, EGLC-1-GFP Se

12 localiza en los polos de los conidios que han sido recién liberados o a punto de hacerlo. (B) Rebanada óptica de 0.5 μm que muestra la formación de dos poros fluorescentes (flechas amarillas). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 10 μm.

44

Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en germínulas de la cepa transformante TLMN04. EGCL-1-GFP se localiza como grumos fluorescentes acumulados en el citoplasma

de las germínulas a diferentes tiempos de crecimiento. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). (Escala 3 hrs: 5 μm, escala 4 y 5 hrs: 10 μm).

Figura

12

13

Página

Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en el septo de las hifas de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en la zona central de los septos de las hifas (escala: 10 µm). (B) Se localiza también en algunos puntos de la membrana plasmática perpendicular a los septos (flechas) (escala: 5 µm). (C) Serie de tiempo donde se observó fluorescencia avanzando desde la zona periférica hacia la parte 11 central del septo, para permanecer en esta zona. El tiempo Os indica el momento en que comenzó a captarse la secuencia (escala: 10 µm). (D) Reconstrucción en 3D de la región fluorescente del septo formada con 20 rebanadas ópticas de 0.5µm (escala: 10 µm). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X 43 (N.A. 1.3 Carl Zeiss®).

Localización de EGLC-1-GFP en conidióforos de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en los septos divisorios de los conidióforos (flechas blancas). En la imagen en contraste de fases se puede apreciar que los sitios de constricción de los conidios que están por ser liberados coinciden con los sitios de acumulación de fluorescencia. EGLC-1-GFP Se localiza en los polos de los conidios que han sido recién liberados o a punto de hacerlo. (B) Rebanada óptica de 0.5 µm que

muestra la formación de dos poros fluorescentes (flechas amarillas). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 10 µm.

44

Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en germínulas de la cepa transformante TLMN04. EGCL-1-GFP se localiza como grumos fluorescentes acumulados en el citoplasma de las germínulas a diferentes tiempos de crecimiento. Las

imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). (Escala 3 hrs: 5 μm, escala 4 y 5 hrs: 10 μm).

45

Figura

16

Página

46

X۷

Localización de EGLC-2-GFP en el ápice de hifas de la cepa transformante TLMN02. EGCL-2-GFP se localiza formando un domo que ocupa la zona de la punta de la hifa durante el crecimiento. Las imágenes fueron tomadas con

14 durante el crecimiento. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 5 μm.

Localización de EGLC-2-GFP en el domo apical de las ramificaciones en crecimiento. Se observan las imágenes confocales de dos hifas diferentes en proceso de ramificación. La fusión EGLC-2-GFP se acumula en las zonas donde surge una nueva hifa y continua en esa zona durante su crecimiento (flechas). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm..

Localización apical de EGLC-2-GFP en la cepa transformante TLMN02 comparada con la tinción del colorante vital FM4-64. Se observa la tinción del Spk en rojo con FM4-64 y en verde EGCL-2-GFP; al sobreponer las imágenes no hay colocalización aparente de las señales de fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

Análisis de FRAP en la cepa transformante TLMN02. La serie de tiempo muestra la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento que duró 69 segundos (recuadro blanco). En los siguientes cuadros las flechas
17 indican las zonas donde la fluorescencia comenzó a recuperarse, casi de inmediato. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm.

48

Figura

20

Página

Imagen confocal de la cepa transformante TLMN02 que muestra la localización de EGLC-2-GFP en los septos y la comparación con la tinción de los mismos con el colorante vital FM4-64. Se logra observar en rojo el marcaje del septo y en verde una fluorescencia muy tenue correspondiente a EGLC-2-GFP. Al sobreponer las

18 imágenes se observa la colocalización de las señales de fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

Localización de EGLC-2-GFP en los ápices de hifas en recuperación creciendo dentro de otra hifa con daño celular. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttíngen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

Figura 20. Localización de EGLC-2-GFP en las zonas de contacto entre hifas y deslocalización en el domo apical de las hifas crecientes. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm.

Imagen confocal de germínulas y conidios de la cepa transformante TLMN02 donde se puede apreciar la localización de la fluorescencia de EGLC-2-GFP. (A) Se observa la acumulación de fluorescencia de EGLC-2-GFP en el domo apical de una germínula de 5 hrs de crecimiento (Escala: 10 µm). (B) fluorescencia de un conidio en

21 etapa de hidratación (1 hr, escala: 5 μm). (C) se observa la fluorescencia de EGLC-2-GFP en el domo apical del tubo germinativo en proceso de crecimiento (2 hrs, escala: 5 μm). (D) Conidióforo sin acumulación de fluorescencia (escala: 20 μm). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®).

xvi

Figura

Página

60

Crecimiento de hifas aéreas por 7 días a 30° C de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δeglc-2), FGSC #20091 (Δeglc-1),

 26 FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I). Valor de p: 0.0031.
 59

Conteo de ramificaciones de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δeglc-2), FGSC #20091 (Δeglc-1), FGSC #9718 (parental)

27 #11749 (Degic-2), FGSC #20091 (Degic-1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I). p: 0.0014.

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales componentes de la pared celular fúngica según el grupo taxonómico.	3
II	Cepas utilizadas en este estudio. (#FGSC: Número de cepa en el Fungal Genetics Stock Center).	19
111	Listado de oligonucleótidos diseñados para cada estrategia de fusión.	26
IV	Resumen de cruzas genéticas elaboradas con distintas cepas.	35
V	Resumen de cruzas genéticas y resultados. Las X indican que no se obtuvieron peritecios, la p, indica la obtención de peritecios.	60

I. Introducción

I. 1 Importancia de los hongos

El reino de los hongos contiene un estimado de 1.5 millones de especies (Hawksworth 1991). El impacto de los hongos en la población humana y en los ecosistemas es muy alto, comparable al de las plantas y las bacterias. Los hongos son probablemente el grupo de microorganismos biotecnológicamente más útil y son usados para sintetizar un amplio rango de compuestos económicamente importantes como enzimas y metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos y otros productos farmacéuticos. Los hongos juegan un papel importante en el planeta y tienen un rol ecológico crítico en el reciclaje de nutrientes, aunque también están involucrados en el deterioro de productos económicamente útiles, incluyendo madera para construcción, materiales artificiales y alimentos. De las más de 100,000 especies conocidas de hongos, unas 50 causan enfermedades en humanos, y más de 10,000 causan enfermedades en plantas (Agrios 1997). Los hongos anualmente son causantes de la mayor pérdida económica en el campo (7-10%), muy por encima de las pérdidas causadas por bacterias, nemátodos e insectos, entre otros. El enfogue actual de la investigación científica está dirigido a buscar soluciones para combatir estas enfermedades. En el ámbito de salud pública, las micosis en humanos son combatidas con fungicidas fuertes que a largo plazo causan daño renal y hepático. Es por eso que se buscan nuevos blancos celulares y moleculares exclusivos del hongo patógeno que no afecten la salud del hombre. En el área agrícola se busca reducir el uso de fungicidas y disminuir el daño al ambiente y los efectos nocivos de estos hacia las especies fumigadas y a los consumidores.

La unidad vegetativa de los hongos filamentosos es la hifa, la cual consiste de una célula elongada que se expande por el ápice de manera polarizada. Estas tienen un diámetro entre 3 y 30 µm según la especie. Las levaduras en cambio son células semiesféricas con diámetros que oscilan entre los 5 y 10 µm. Las hifas regularmente muestran ramificaciones y constituyen una estructura denominada micelio. Es en la punta de las hifas donde se da una actividad en extremo notoria de formación de pared celular y membrana plasmática lo cual contribuye al crecimiento en el diámetro de la colonia fúngica. Las actividades polarizadas del citoplasma fúngico son críticas para entender el crecimiento de los hongos. La punta de la hifa no solo sintetiza la pared celular y secreta enzimas, también percibe señales físicas y químicas que modifican el desarrollo y crecimiento de la colonia (Bartnicki-García 1987).

I. 2 La pared celular de los hongos

La pared celular proporciona características físicas únicas a los hongos; les permite soportar la gran presión de turgencia generada en su interior, crucial en la supervivencia y desarrollo de estos organismos, cuya nutrición depende de la absorción de materia orgánica externa. La fuerza mecánica que representa esta estructura permite a los hongos adoptar diversas formas y con ello adaptarse a la diversidad de espacios ecológicos. La presión de turgencia le otorga poder de penetración y diseminación del micelio, lo que le permite colonizar sustratos peculiares y explotar la materia orgánica de forma exitosa (Bartnicki-García 1987). Esta capacidad les proporciona un nicho único en la naturaleza y les ha permitido probablemente evolucionar de forma separada con respecto a las plantas y los animales (Wessels 1994).

Los compuestos químicos que conforman la pared celular de los hongos representan un sistema eficaz de protección para el organismo y sus células contra la luz ultravioleta, lisis enzimática, solventes orgánicos, sustancias tóxicas y la desecación (Gow y Gad 1995).. La pared celular de los hongos químicamente contiene entre 80 y 90% de polisacáridos, siendo el resto de su composición proteínas y lípidos (Bartnicki-García 1968). El contenido y la proporción de los principales polímeros de la pared celular varían según el grupo taxonómico. Entre los componentes más abundantes se encuentran los mencionados en la Tabla I. Los componentes que dan rigidez a la pared celular son los fibrilares (quitina,

quitosano, polisacáridos fibrilares y celulosa); éstos se encuentran en la capa interna de la pared celular. En la capa externa se encuentra un material tipo gel que funciona como una matriz constituida de glucanos y glucoproteínas embebidas.

Tabla I. Principales componentes de la pared celular fúngica según el grupo taxonómico.

Grupo taxonómico	Componentes fibrilares	Componentes de la matriz
Oomycota	Celulosa; β-(1-3)-β-(1-6)- glucanos	Glucanos
Quitridiomycota	Quitina; glucanos	Glucanos
Zygomycota	Quitina; quitosano	Acido poliglucurónico; glucuronomanoproteinas
Ascomycota	Quitina; β-(1-3)-β-(1-6)- glucanos	α-(1-3)-glucanos; galactomanoproteinas
Basidiomycota	Quitina; β-(1-3)-β-(1-6)- glucanos	α-(1-3)-glucanos; xilomanoproteinas

Adaptado de Bartnicki-García 1968 y Wessels y Sietsma 1981.

I. 3 Glucoproteínas de membrana

Las glucoproteínas presentes en la pared celular están extensamente modificadas con N- y O- glicosilaciones y, en muchas instancias, contienen un ancla GPI (Glucosilfosfatidilinositol). Estas glucoproteínas, la quitina y los glucanos están ligados por uniones cruzadas para formar una red compleja, que forma la base estructural de la pared celular (Fig. 1; Bowman y Free 2006). En particular las proteínas que tienen sitios de unión a GPI o que están ancladas a la membrana por este tipo de estructura alifática son insertadas en la membrana del retículo endoplásmico directamente a través de un translocón. Poseen un péptido señal en el extremo N-terminal que indica su corte por una peptidasa y tienen una secuencia interna de paro que le permite permanecer en la membrana del retículo. Estas señales dirigen el proceso de translocación. Mientras que una secuencia corta de aminoácidos adyacente al dominio insertado en la membrana es reconocida por una transamidasa localizada dentro de la membrana del retículo. Esta enzima simultáneamente corta y transfiere la porción luminal de la proteína a un ancla GPI previamente formada e instalada en la membrana del retículo endoplásmico. Estas proteínas pueden difundirse fácilmente en el plano de la bicapa lipídica. Se ha visto que en algunas células epiteliales humanas con crecimiento polarizado estas proteínas son dirigidas por el ancla GPI hacia la región apical (Lodish et al. 2008).



Figura 1. Esquema representativo de la pared celular en hongos (Bowman y Free 2006).

I. 4 Quitina y quitosano

La quitina es un homopolímero lineal compuesto por residuos de Nacetilglucosamina (GlcNAc) unidos por enlaces glucosídicos β -(1-4). La configuración beta (β) del enlace le confiere características físicas y estructurales distintas a otros polisacáridos que se encuentran en la naturaleza como el almidón, glucógeno y dextrano. La quitina es abundante en la naturaleza. Se encuentra en invertebrados, protistas y es probablemente el componente universal de las paredes celulares de los hongos. La forma cristalina de quitina en los hongos es la α -quitina, en donde cadenas individuales son agregadas en microfibrillas, con puentes de hidrógeno sujetando cadenas adyacentes juntas de modo antiparalelo. El resultado final es una estructura fuerte y rígida (Gooday 1979). La quitina es sintetizada por proteínas de membrana denominadas quitinas sintasas; éstas catalizan la reacción:

 $\mathsf{UDP}\text{-}\mathsf{GlcNAc} + (\mathsf{GlcNAc})_n \leftrightarrow (\mathsf{GlcNAc})_{n+1} + \mathsf{UDP}$

Existen varias quitina sintasas que han sido clasificadas en siete clases (I-VII), según la secuencia de aminoácidos (Choquer et al. 2004). Estudios previos han sugerido que las guitina sintasas tienen papeles específicos en la síntesis de la pared celular y que son dependientes de espacio y tiempo (Riquelme et al. 2007). Esta familia proteica comprende varias isoenzimas, algunas de las cuales pueden presentar redundancia funcional, es decir que la pérdida de una quitina sintasa es compensada por la acción de otra proteína con la misma actividad (Fujiwara 2000). La quitina se asocia con otros componentes y estas interacciones son de importancia para la pared. Se han sugerido distintos modelos respecto a la organización estructural de los diferentes polisacáridos en la pared celular de los hongos, siendo la guitina un componente importante que se encuentra formando enlaces con ella misma y con otros polímeros como los glucanos (Cabib et al. 2001; Wessels 1986). Algunos estudios han estimado que la proporción aproximada de guitina de la pared celular en S. cerevisiae es del 1-3% mientras que en Neurospora crassa representa entre el 7 y el 20% (Bartnicki-Garcia 1968; Bulawa 1993; Bull 1970; Ruiz-Herrera y Sentandreu 1989; Schoffelmeer et al. 1999). Sin embargo, los porcentajes de quitina son muy variables entre diferentes especies; por ejemplo, en Blastomyces dermatitidis se ha encontrado desde el 23% de guitina en la forma de hifa y hasta el 37% en la forma de levadura (Kanetsuna y Carbonell 1971), en Ustilago maydis el contenido de guitina de la pared celular es de 14% (Ruiz-Herrera et al. 1996), y en Cryptococcus neoformans 7% (James et al. 1990). El quitosano es la forma desacetilada de la quitina y es el principal componente de las paredes de Zygomycetes, pero es un componente en menor proporción en otros grupos importantes de hongos (Briza et al. 1988).

I. 5 Glucano

Los β -glucanos son el componente más abundante de las paredes celulares en la mayoría de hongos. Ascomicetos y Basidiomicetos contienen β (1-3) glucanos con ramificaciones β (1-6). Los glucanos ramificados pueden formar geles o triples hélices interconectadas. Las uniones covalentes de glucanos con quitina contribuyen a rigidizar la estructura de la pared madura (Gow y Gadd 1995).

Existen también α (1-3) glucanos que comprenden un componente importante de la matriz externa de la pared. Los β -glucanos de la pared son sintetizados vía un azúcar nucleótido (UDP glucosa). Las proteínas sintetizadoras son intrinsecas de la membrana plasmática, en donde aceptan el sustrato del citosol y alimentan la cadena creciente de glucanos hacia dentro de la pared (Shematek *et al.* 1980; Jabri *et al.* 1989). La reacción de síntesis es:

 $\mathsf{UDP}\text{-}\mathsf{Glc} + \mathsf{(Glc)}_{\mathsf{n}} \leftrightarrow \mathsf{(Glc)}_{\mathsf{n+1}} + \mathsf{UDP}$

El sistema catalítico que sintetiza los glucanos de la pared celular en los hongos es un complejo formado por una glucano sintasa y al menos otros 2 componentes: una subunidad catalítica y una subunidad reguladora (Kang y Cabib 1986). Estructuralmente los β glucanos pueden ser clasificados según la configuración de su cadena y el tipo de uniones predominantes que tienen. Cada tipo de unión genera conformaciones secundarias características de los ß glucanos, tales como triples hélices con alto contenido de puentes de hidrógeno. Si los tipos de uniones aumentan y se diversifican, ésto puede tener como resultado cambios en las propiedades del polímero tales como solubilidad, estabilidad, así como una alteración de su sensibilidad a las enzimas hidrolíticas que puedan degradarlos (Pitson et al. 1993). El papel de los glucanos es diverso, dependiendo de su tamaño, estructura, propiedades físicas y químicas, y de lo que es muy importante, su localización. El papel primario atribuido a los glucanos en hongos es estructural, asistiendo al mantenimiento de la rigidez de la pared celular. Sin embargo la naturaleza y localización de los glucanos de la pared sugieren la posibilidad de que puedan ser degradados y usados como fuentes nutricionales lo cual puede ocurrir si los nutrientes externos son limitados (Del Rey 1979) o como consecuencia del cambio en la composición de la pared durante la morfogénesis (Wessels y Sietsma 1981).

I. 6 La pared celular y el crecimiento apical

En la mayoría de las células fúngicas, la síntesis de la pared celular es un proceso altamente polarizado que determina la morfogénesis de las hifas. El Spitzenkörper

(Spk), un cuerpo apical común en las hifas en crecimiento de muchas especies fúngicas, contiene un acúmulo de vesículas secretoras, ribosomas, actina, proteínas involucradas en la polaridad celular y material amorfo no caracterizado (Roberson *et al.* 2010). Esta estructura apical fue descubierta inicialmente en los ápices de hifas de *Coprinus* spp. tras una tinción con hematoxilina de hierro (Brunswick, 1924). Unas décadas más tarde el Spk fue identificado en los ápices de *Polystictus versicolor* y se sugirió su papel determinante de la dirección del crecimiento de las hifas (Girbardt, 1957). El modelo hifoide de la morfogénesis fúngica postuló que el Spk funciona como un centro suministrador de vesículas (VSC) que regula el paso de éstas del cuerpo hifal a la membrana plasmática apical (Bartnicki-García *et al.* 1989). En los años sucesivos numerosos trabajos han identificado la presencia del Spk en los ápices de diferences especies fúngica. En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en caracterizar la composición de las vesículas que componen el Spk y en entender su mecanismo de regulación del tráfico vesicular apical.

Se han propuesto diversos modelos para explicar como la célula tubular de una hifa es generada por crecimiento apical (Fig. 2). Uno de ellos es el del estado estacionario o estable (SS) planteado por Wessels (1986), en donde se propone que el crecimiento apical involucra diferentes cambios en las propiedades físicas de la pared celular de la hifa, la cual es construida por un proceso que transforma y expande la pared celular depositada recientemente, desde el domo apical hacia una pared rígida de forma cilíndrica en la base del domo. Este material recientemente añadido en cierto modo es plástico, debido a la presencia de cadenas individuales de polímeros y la falta de uniones cruzadas entre los componentes de la pared. Este material no es microfibrilar y tiene cierta sensibilidad a quitinasas; dicha sensibilidad disminuye a medida que la pared progresa hacia la zona subapical y las cadenas individuales de quitina se cristalizan en microfibrillas (Wessels 1986; Sietsma y Wessels 1994). Otro modelo básicamente diferente es el propuesto por Bartnicki-García (1973), que postula

que la forma de la hifa está determinada por un patrón de distribución polarizada de vesículas involucradas en la descarga y construcción de la pared celular. Este modelo supone que el crecimiento es resultado de diversas acciones: síntesis y descarga de nuevos polímeros de pared, acción enzimática que proporcione plasticidad por la pérdida de la estructura rígida de la pared y fuerza de turgencia para expandir la pared celular (Bartnicki-García 1973). La pared celular es una estructura altamente dinámica, sujeta a constante cambio: por ejemplo durante la expansión y división celular en levaduras, durante la germinación de esporas, ramificación de hifas y formación de septos en hongos filamentosos. La ramificación de los polímeros de la pared celular y las uniones cruzadas, así como el mantenimiento de la plasticidad de la pared durante la morfogénesis pueden depender de la presencia de enzimas hidrolíticas intimamente asociadas con la pared celular de los hongos. La mayoría de estas hidrolasas tienen actividad quitinasa o glucanasa y algunas también exhiben actividad transglicosilasa. Por lo tanto pueden estar relacionadas con la ruptura y reformación de las uniones dentro y entre los polímeros, permitiendo la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y la morfogénesis (Adams 2004). En este trabajo de tesis se estudió la localización de dos β (1-3) endoglucanasas putativas y su papel durante el crecimiento apical y otros procesos morfogenéticos de N. crassa.



Figura 2. Esquema representativo de dos de los modelos propuestos para explicar como ocurre el ensamblaje de la pared celular.

II. Antecedentes

Las β -glucanasas pertenecen al grupo de las glucosil hidrolasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace glucosídico entre dos unidades de glucosa. Se clasifican en alrededor de 100 familias (Davies y Henrissat 1995). Existen diversos tipos de enzimas degradadoras de β -glucanos clasificadas de acuerdo al tipo de enlace β -glucosídico que digieren y el mecanismo por medio del cual atacan un sustrato. Estas enzimas pueden ser exo- β -glucanasas, que hidrolizan cadenas de glucanos secuencialmente cortando los residuos del extremo no reductor y produciendo usualmente glucosa; y por otro lado se encuentran las endo- β - glucanasas, que hidrolizan los enlaces al azar a lo largo de la cadena de polisacárido, liberando pequeños oligosacáridos (Pitson *et al.* 1993).

La mayoría de las glucanasas fúngicas descritas son extracelulares, es decir son secretadas al medio. Esta secreción sigue el mismo mecanismo descrito para otras enzimas extracelulares, que son empacadas en vesículas derivadas del retículo endoplásmico, pasan por el aparato de Golgi y migran por el citoplasma hasta llegar a la membrana celular y fusionarse con ella (Meyer *et al.* 1976). En algunos hongos, las glucanasas son retenidas en el espacio periplásmico donde pueden llevar a cabo diversas funciones, incluyendo la movilización de los glucanos a través de la pared celular. Las Glucanasas β (1-3) y β (1-6) pueden ser transportadas dentro del citoplasma en vesículas, y en hongos filamentosos estas vesículas se encuentran usualmente en el ápice o en sitios de ramificación en las hifas (Meyer *et al.* 1976) por lo que se cree que estas enzimas están implicadas en la extensión hifal (Gooday y Trinci 1980).

Diversos aislados de pared celular de algunos hongos exhiben una apreciable actividad autocatalítica (Farkas 1979). Se ha propuesto que la rígida pared celular preexistente es primero atacada por enzimas hidrolíticas, dirigidas a los enlaces

entre polisacáridos, y los espacios resultantes son llenados con material de pared celular recién sintetizado. La continua repetición de este proceso asegura el crecimiento de la pared celular sin interferir en su integridad (Johnson 1968). Debido a que los β (1-3) glucanos son abundantes en la pared y que para la actividad de la β (1-3) glucanosiltranferasa se requieren numerosos extremos libres, reductores y no reductores, algunas enzimas con actividad β (1-3) glucano hidrolítica han sido investigadas (Latgé y Calderone 2006). Algunas enzimas fúngicas que degradan β glucanos fueron reportadas inicialmente para levaduras (Brock 1965) y posteriormente para hongos filamentosos (Reese y Mandels 1966). Se han identificado varias glucanasas en las secuencias genómicas de algunos hongos. Los estudios moleculares se han centrado en endoglucanasas, especialmente por su modo de acción (cortar internamente polisacáridos de estructura compleja) el cual sugiere que estas glucosilhidrolasas juegan un papel morfogenético (Latgé y Calderone 2006).

Previamente ha sido reportado que la síntesis de β (1-3) glucanasas en levaduras está acoplada a eventos morfogenéticos en los cuales estas enzimas están presumiblemente involucradas (Farkas 1973). En estudios previos se afirma que durante el ciclo mitótico de *Saccharomyces cerevisiae*, el contenido de una β (1-3) glucanasa aumenta al máximo en la célula al tiempo que se genera la yema emergente y se sugiere que la síntesis de esta enzima está altamente relacionada con un paso previo a la gemación (Cortat *et al.* 1972). En *Hansenula wingei* la activación de una β (1-3) glucanasa después del proceso de apareamiento fue detectada, y los autores proponen que la enzima es necesaria para la fusión celular (Brock 1965). Las β (1-3) endoglucanasas son sintetizadas o activadas una vez por ciclo mitótico después de la síntesis de ADN, al inicio de la fase G2 en *S. cerevisiae*. Estos resultados fueron determinados experimentalmente a partir de dos cultivos de la levadura llevados posteriormente a un proceso de centrifugación diferencial para separar células en diferentes estadios del ciclo y midiendo la actividad endoglucanasa para cada fracción.

Algunas endoglucanasas identificadas actúan durante la separación celular mientras que otras están involucradas en la modificación, extensión y rearreglo de las cadenas de β (1-3) glucanos (Del Rey *et al.* 1979). Por ejemplo las cepas mutantes de S. cerevisiae que carecen de la proteína Eng1p, muestran defectos en la separación celular, y la proteína se localiza asimétricamente del lado del septo correspondiente a la célula hija sugiriendo que está involucrada en la disolución del septo entre madre e hija (Baladrón et al. 2002). Algunas cepas mutantes que carecen de los genes que codifican para tres glucanasas solubles de pared celular de S. cerevisiae (SCW3, SCW4 y SCW10) no presentan cambios importantes en el fenotipo sin embargo la disrupción de un gen relacionado, SCW11, ocasiona que la célula no se separe después de que se ha dividido (Cappellaro et al. 1998). En S. cerevisiae la disrupción del gen YHR143W resulta en la inhibición de la separación celular después de la división, y promueve el crecimiento en forma de pseudohifas (Dolin et al. 2001). En este mismo estudio se reportó que cepas mutantes del gen YER124C también presentan defectos en este proceso de separación y al mismo tiempo aumenta la sensibilidad de las células a algunos antibióticos. Los autores muestran que al etiquetar la proteína Yhr143wp con la proteína fluorescente GFP, ésta se localizó en la pared celular. Dichos estudios demostraron que las proteínas Yhr143wp y Yer124cp están asociadas al metabolismo de la pared celular.

En *Schizosaccharomyces pombe* también se han hecho recientemente investigaciones relacionadas a la división celular, que implica la producción de dos células de igual tamaño, la fisión de éstas es llevada a cabo por la formación de un septo primario rodeado por dos septos secundarios, uno por cada célula hija, durante la etapa final se da la división, separación celular e hidrólisis del septo primario por una β (1-3) endoglucanasa denominada Eng1p. Este material debe ser hidrolizado totalmente antes de que se lleve a cabo la separación total de las células hijas (Dekker *et al.* 2004). En la pared celular se encuentran también α (1-3) glucanos, por lo que en ese mismo trabajo analizaron la función celular de dos

 α -endoglucanasas putativas, denominadas Agn1p y Agn2p en *S. pombe*. Las cepas mutantes carentes de *AGN2* presentan dificultades para llevar a cabo la lisis interna de la pared del asca para liberar las esporas. Las mutantes de *AGN1* producen células agrupadas que permanecen unidas unas a otras por el material en el septo. El producto purificado de Agn1p tiene actividad α (1-3) endoglucanasa produciendo principalmente pentasacáaridos. Algunos autores aseguran que también la proteína Eng2p es requerida para la degradación de los β (1-3) glucanos de la pared del asca. Esto fue determinado por el análisis de mutantes para esta proteína y confirmado por experimentos posteriores donde un producto purificado de *ENG2* fue agregado a un cultivo de mutantes para Eng2p, lo que restauró la liberación de las ascosporas (Encinar del Dedo *et al.* 2009).

En el oomiceto Saprolegnia monoica, se ha reportado la localización subcelular de algunas glucanasas. En experimentos donde separaron fracciones por gradiente de densidad y se caracterizaron por medio de pruebas enzimáticas y microscopía electrónica, se observó que las fracciones con β glucanasas están contenidas en dictiosomas y en vesículas apicales. Los micelios se crecieron en membranas de celofán y se cortaron en zonas concéntricas, con ello determinaron que en el borde de la colonia (en la zona de extensión) es donde se concentra la actividad β (1-3) glucanasa y celulasa, y sus actividades disminuyen conforme aumenta la edad en la zona (Fevre 1977). En Sclerotium rolfsii se reportó la actividad de β (1-3) glucanasas y su distribución en el micelio. Por medio de inmunofluorescencia encontraron zonas con actividad β (1-3) glucanasa en las hifas, en la formación de la fíbula y de septos nuevos, así como en la formación de ramas laterales (Kritzman et al. 1978). La actividad de estas enzimas ha sido reportada para otros basidiomicetes también como Sclerotium glucanicum (Rapp 1992) У Schizophyllum commune (Wessels y Niederpruem 1967). En Coprinus cinereus una β (1-3) endoglucanasa parece tener un papel esencial en la formación y elongación del estípite, que es la estructura que sostiene la parte superior del cuerpo fructífero en este grupo de hongos. Los autores aseguran que es un buen modelo para estudiar la elongación hifal. Las propiedades mecánicas de la pared celular del estípite cambian y los polisacáridos se modifican, como lo indica la disminución del peso molecular en los extractos analizados (Kamada *et al.* 1985). En ascomicetes, se ha detectado la presencia de exoglucanasas secretadas al medio en *Aspergillus fumigatus* y de manera paralela, de una endoglucanasa no secretada. Esta β (1-3) endoglucanasa se encontró asociada a la pared celular y era de alrededor de 74 kDa. Del total de la actividad glucanasa detectada, el 13% correspondía a la actividad específica de esta enzima durante la formación del micelio. Estos estudios realizados en *A. fumigatus* llevaron a los autores a proponer que estas proteínas son expresadas de manera constitutiva y actúan específicamente en los enlaces β (1-3) en los glucanos asociados a la pared celular, por lo que están involucradas en la expansión de ésta durante el crecimiento (Fontaine *et al.* 1997).

En el ascomiceto Neurospora crassa, inicialmente, se evaluó la forma de regulación que posee para la expresión de glucanasas, esto se detectó creciendo el hongo en medios suplementados con glucosa y en medios escasos de nutrientes (Del Rey et al. 1979). El resultado obtenido fue que N. crassa presenta alta actividad glucanasa en medios que no tienen glucosa, contrario a lo que ocurre en los medios que la poseen. Los autores proponen que esto se debe a que el hongo busca utilizar los oligosacáridos que hay en su pared como reserva por lo que comienza a expresar glucanasas que atacan a los glucanos de su pared y así encuentran una fuente alterna de glucosa. Proponen también que estas enzimas pueden estar involucradas en el proceso de formación de la pared ya que su expresión aumenta durante el crecimiento exponencial de algunos hongos como en Trichoderma viride y S. cerevisiae. En N. crassa las asocian al metabolismo y a la movilización de glucanos externos o de pared o algún otro cambio morfogenético durante la conidiación (Del Rey et al. 1979). En 1990 se purificó un complejo celulolítico a partir de N. crassa en el que se identificaron cuatro fracciones con actividad endoglucanasa (Yazdi et al. 1990). Recientemente se dió a conocer un listado de proteínas con capacidad de degradar la pared celular de una planta en particular (Miscanthus), ésto con la finalidad de identificar compuestos industrialmente importantes, dentro de estas proteínas identificadas, se encuentran tres con alta actividad endoglucanasa, las cuales tienen homología con las encontradas en otros hongos. La pérdida de estas proteínas en N. crassa no afecta notablemente el fenotipo. La pérdida de una endoglucanasa en particular ocasionó la alta expresión de otra enzima relacionada, estos resultados sugieren la existencia de redundancia funcional entre estas proteínas (Tian et al. 2009). N. crassa es un organismo modelo usado ampliamente por varias razones, una de las más importantes es que su genoma ha sido completamente secuenciado (Borkovich et al. 2004) y existen bases de datos públicas en línea que proporcionan información sumamente útil sobre el genoma de este hongo (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora). Dentro del listado de proteínas putativas con actividad endoglucanasa se encuentran dos con posibles sitios de unión a grupo GPI y ancladas a la membrana, EGLC-1 y EGLC-2, reciben ese nombre como una manera de abreviar el término endoglucanasa y fueron numeradas arbitrariamente en este proyecto para su identificación. Ambas proteínas son el objeto de estudio de este trabajo.

III. Justificación

La importancia de los hongos radica en su crítico papel ecológico como organismos reintegradores de materia orgánica. Son organismos que pueden tener un impacto negativo en sectores como el agrícola y el de la salud pública. Es por ello que la ciencia básica busca entender la biología de estos organismos para generar conocimiento que sea útil en el área de ciencia aplicada y que contribuya a encontrar mejores formas de erradicar su presencia o de utilizarlos para obtener beneficios. La relevancia de conocer la biogénesis de la pared celular de los hongos, no sólo puede percibirse a largo plazo en el ámbito de la ciencia aplicada, por el contrario, a corto plazo generamos conocimiento sobre tópicos importantes en el desarrollo y crecimiento polarizado que estos organismos exhiben. El entendimiento de cómo los hongos establecen un gradiente polarizado de crecimiento de formación de pared es claramente uno de los objetivos máximos en la búsqueda de las bases del crecimiento apical. Aunque la estructura básica y los componentes mayoritarios de la pared de los hongos se conocen, mucha información acerca de los mecanismos moleculares está por conocerse. Los estudios moleculares ayudarán a caracterizar los elementos proteicos que juegan un papel clave en la morfogénesis de la hifa. Existe una diferencia conceptual entre los modelos planteados para explicar el ensamblaje de la pared celular. específicamente en el papel de las enzimas líticas, en este caso particular, las endoglucanasas que no son secretadas al medio extracelular. No se sabe si estas enzimas se encuentran involucradas en la modulación de la plasticidad de la pared y su presencia está relacionada a eventos morfogenéticos clave en el desarrollo del hongo. La obtención de información correspondiente a esta premisa, contribuirá al entendimiento de la biología del organismo y, a largo plazo, repercutirá en la aplicación de estos conocimientos en áreas específicas de interés como el sector agrícola, industrial e incluso el de la salud pública.

IV. Hipótesis

Las β (1-3) endoglucanasas se localizan en sitios clave de la morfogénesis de *Neurospora crassa* como son los ápices hifales, los puntos de ramificación, así como en los sitios de germinación de los conidios y en los puntos de unión durante el proceso de anastomosis de las hifas.

V. Objetivos

V. I General

Determinar la localización de dos β (1-3) endoglucanasas, EGLC-1 y EGLC-2 y su papel en la morfogénesis de *N. crassa* durante el crecimiento vegetativo.

V. 2 Particulares

Determinar la localización y dinámica de las β (1-3) endoglucanasas marcadas con proteínas fluorescentes mediante el uso de microscopía confocal de escaneo con láser.

Evaluar el desarrollo de cepas mutantes para ambas β (1-3) endoglucanasas y determinar su importancia en la morfogénesis de *N. crassa*.
VI. Materiales y métodos

VI. 1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas listadas en la Tabla II corresponden a las utilizadas en este estudio. Todas las cepas de trabajo fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel 1956) solidificado con agar (DIFCO) al 1.5%. Para mantener la cepa auxótrofa de *N. crassa* FGSC#9717 (*mat A his-3*; Δ *mus-51::bar*⁺), después esterilizar el medio se adicionó el aminoácido básico L-histidina a una concentración final de 0.5mg/ml (esterilizado por filtración). Para las cepas FGSC#20091 y FGSC#20092 (Δ eg/c-1), FGSC#11749 y FGSC#11750 (Δ eg/c-2) resistentes a la higromicina, se añadió al medio higromicina B (Calbiochem®) a una concentración final de 200µg/ml.

# LAB	#FGSC	TIPO DE APAREAMIENTO	GENOTIPO
SMRP13	#988	Mat a	Tipo silvestre
SMRP14	#9013	Mat A	Tipo silvestre
SMRP25	#9718	Mat a	∆mus-51∷bar⁺
SMRP24	#9717	Mat A	∆mus-51::bar ⁺ ; his-3
SMRP17	#4347	Mat a	Fluffy
SMRP18	#4313	Mat A	Fluffy
SMRP249	#20091	Mat A	∆eglc-1
SMRP250	#20092	Mat a	Δeglc-1
SMRP251	#11749	Mat A	∆eglc-2
SMRP252	#11750	Mat A	∆eglc-2
SMRP245	# 20680	Mat a	ΔSad 2 RIP

Tabla II. Cepas utilizadas en este estudio. (#FGSC: Número de cepa en el Fungal Genetics Stock Center).

Para la selección de cepas transformadas de *N. crassa* se utilizó medio MMV-FGS (2% Sales de Vogel, 1% agar, 10% aditivo FGS). El aditivo FGS se preparó con 20% de sorbosa, 0.5% de fructosa y 0.5% de glucosa (todos esterilizados por filtración). Se utilizó el medio sintético básico de cruzamiento (SCM) bajo en

nitrógeno (Westergaard y Mitchel 1942) para inducir la reproducción sexual y aislar ascosporas para obtener homocariontes de las cepas transformadas de *N. crassa.* Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121° C por 15 minutos en una autoclave VWR® Accu Sterilizer AS12.

Para el crecimiento en medio líquido o sólido (1.5% agar bacteriológico Becton Dickinson, Co.) de células competentes de E. colí TOP10 se utilizó el medio Luria-Bertani (LB, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% de cloruro de sodio). La obtención de células competentes se realizó a partir de colonias crecidas en una caja Petri con medio LB sólido. Una colonia aislada se inoculó en un tubo de ensayo con medio LB líquido estéril y se incubó a 37º C con agitación a 250rpm durante 12 a 16 horas en una incubadora con plataforma rotatoria (Environ Shaker, Lab-Line®). El volumen total del cultivo se agregó a un matraz con 250ml de medio LB incubando a 37° C y 250rpm hasta obtener una OD₅₅₀de 0.45 – 0.5 (aproximadamente 1 hora). El cultivo se transfirió a dos tubos estériles de polipropileno de 50ml y se mantuvieron en hielo por 30 minutos para después ser centrifugados a 2500 rpm a 4°C por 10 minutos en un rotor Sorvall. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió cuidadosamente sobre hielo con 30 ml de una solución fría y estéril de MgCl₂ 80mM - CaCl₂ 20 mM. Posteriormente se volvió a centrifugar a 2500rpm a 4°C durante 10 minutos se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendieron las células en 2 ml de CaCl₂ 100mM, estéril y frío. Finalmente se hicieron alícuotas de 50 µl (todo en hielo y frío) y se congelaron rápidamente y se almacenaron a -86°C hasta su uso posterior.

VI. 2 Análisis bioinformático

Inicialmente, se identificaron en el sitio web del Broad Institute (MIT) dos proteínas putativas que codifican para β (1-3) endoglucanasas, identificadas como EGLC-1 y EGLC-2, ambas con posibles sitios de unión a GPI (<u>http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html</u>).

Posteriormente se llevó a cabo un breve análisis bioinformático usando diferentes bases de datos en línea (servidor de proteómica del Swiss Institute of Bioinformatics, denomidado ExPasy) para identificar los sitios de corte para el péptido señal (SignalP 3.0), los aminoácidos específicos para unión a GPI (big-PI Fungal Predictor) y los dominios catalíticos (Pfam Sanger Institute).

VI. 3 Extracción de ADN genómico de Neurospora crassa

Se extrajo ADN genómico de una cepa de *N. crassa* tipo silvestre SMRP13 (Mat *a*; FGSC #988) a partir de micelio liofilizado y por medio del Kit DNA DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®); el ADN obtenido se utilizó como templado para llevar a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN iniciales.

VI. 4 Diseño de oligonucleótidos para PCR de fusión

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fusión de los genes *eglc-1* y *eglc-2* con el gen de la proteína verde fluorescente *gfp* (Tabla III). Las estrategias de fusión fueron diferentes para cada gen (Fig. 3). Todas las secuencias de los oligonucleótidos fueron analizadas en el programa FastPCR® versión 3.8.30 para identificar la posible formación de estructuras secundarias o dímeros.



Figura 3. Esquema de las estrategias seguidas para obtener la fusión para eglc-1 y eglc-2 con gfp.

VI. 4. 1 eg/c-1:: gfp

Esta estrategia fusiona el gen *gfp* con el gen *eglc-1* después de la secuencia de corte del péptido señal pero poco antes de la secuencia que indica el sitio de unión a GPI (Fig. 3). Se diseñaron 6 oligonucleótidos; P1 corresponde al inicio de la secuencia de *eglc-1* más una secuencia de corte para *Xbal* al inicio. P2 se diseñó en antisentido e incluye una secuencia que corresponde al gen de la *gfp* unida a una secuencia para *eglc-1*. Este par de oligonucleótidos se usaron para amplificar el fragmento correspondiente al péptido señal más una porción del marco de lectura abierto de *eglc-1* unido a una pequeña secuencia de *gfp*. P3 se diseñó tomando en cuenta el final de la secuencia de *gfp* más 12 pares de bases que corresponden a la secuencia previa al sitio de unión a GPI. P4 es antisentido e incluye la secuencia final de *eglc-1* más una secuencia de corte para *EcoR*I. Este par de oligonucleótidos sirvió para amplificar el fragmento final del marco de lectura abierto de *eglc-1* unido a una pequeña secuencia de *gfp*. P5 y P6 corresponden a oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para amplificar la secuencia del *gfp*.

VI. 4. 1. 1 Amplificación del fragmento ps

Se llevó a cabo mediante PCR; el volumen de la reacción fue de 50 µl conteniendo: 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado de ADN genómico, 1 µl del oligonucleótido P1, 1 µl del oligonucleótido P2, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (5 u/µl) (TAKARA BIO INC).

VI. 4. 1. 2 Amplificación del fragmento gfp

La reacción para la amplificación por PCR se preparó como sigue: 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado pMF272, 1 µl del oligonucleótido P5, 1 µl del oligonucleótido P6, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (5 u/µl).

VI. 4. 1. 3 Amplificación del fragmento gpi

Se llevó a cabo por medio de PCR usando 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado ADN genómico, 1 µl del oligonucleótido P3, 1 µl del oligonucleótido P4, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*[™] (5u/µl).

Las tres amplificaciones se realizaron en un termociclador iCycler (BioRad®) bajo las siguientes condiciones: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 56° C por 1.30 minutos, 72° C por 1.30 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron 30 veces.

VI. 4. 1. 4 Amplificación del fragmento fusión ps + gfp y gpi + gfp

Se llevó a cabo por medio de PCR usando 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado de *gfp*, 1 µl de templado de *ps*, 1 µl del oligonucleótido P1, 1 µl del oligonucleótido P6, 28.75 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (5 u/µl). Para el caso *gpi* + *gfp* se usó como templado 1 µl de *gpi*, 1µl de templado de *gfp* y los oligonucleótidos P5 y P4.

El temociclo utilizado fue: 94°C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 56° C por 2 minutos, 72° C por 2 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron 30 veces.

VI. 4. 1. 5 Amplificación del fragmento fusión eglc-1::gfp

Para la amplificación por PCR se usaron los mismos reactivos y cantidades antes mencionados, excepto que se usó como templado 1 μ l de *sp* + *gfp* y 1 μ l de *gpi* + *gfp* y los cebadores P1 y P4. El termociclo fue: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 56° C por 2.30 minutos, 72° C por 2.30 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces.

VI. 4. 2 ps::gfp::eglc-2

En esta estrategia también se fusionó el gen *gfp* con el gen *eglc-2*, pero en este caso *gfp* fue colocado justo después del sitio de corte del péptido señal y usando 500 pares de bases río arriba del inicio de la secuencia de *eglc-2* (Fig. 3). P1 lleva una secuencia de corte para *Xba*l y 20 pares de bases correspondientes al UTR de *eglc-2* este cebador es sentido. P2 lleva 11 pares de bases correspondientes a la secuencia señal, 9 pares de bases del marco de lectura abierto del gen, un codón que codifica para prolina para dar mayor movilidad a la estructura de la proteína y 20 pares de bases correspondientes a *gfp*, es antisentido. P3 tiene 20 pares de bases correspondientes *gfp*, un codón de prolina y 20 pares de bases parte del marco de lectura abierto de *eglc-2*, es sentido. P4 tiene una secuencia de corte para *EcoR*l y 20 pares de bases del marco de lectura abierto, es antisentido. P5 y P6 corresponden a oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para amplificar la secuencia del gen *gfp*.

VI. 4. 2. 1 Amplificación del fragmento ps

Se llevó a cabo por medio de PCR en una reacción de 50 µl conteniendo: 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado de ADN genómico, 1 µl del oligonucleótido P1, 1 µl del oligonucleótido P2, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (5u/µl)..

VI. 4. 2. 2 Amplificación del fragmento gfp

La reacción de PCR fue: 5 µl de MgCl₂, 4 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 1 µl de templado del cassettes *hph-gfp* pMF272, 1 µl del oligonucleótido P5, 1 µl del oligonucleótido P6, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*[™] (5u/µl).

VI. 4. 2. 3 Amplificación del fragmento orf

Para la amplificación por PCR se preparó la siguiente reacción: 5 μ l de MgCl₂, 4 μ l de DNTPs, 5 μ l del buffer LaTak 10x, 1 μ l de templado ADN genómico, 1 μ l del

oligonucleótido P3, 1 µl del oligonucleótido P4, 32.8 µl de agua destilada grado HPLC y 0.2 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (5u/µl).

Las tres amplificaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 55° C por 1.30 minutos, 72° C por 1.30 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron 30 veces.

VI. 4. 2. 4 Amplificación del fragmento fusión ps + gfp y orf + gfp

Ambos fragmentos se amplificaron mediante PCR. Para la fusión ps +gfp la reacción consistió en: 5 µl de MgCl₂, 8 µl de DNTPs, 5 µl del buffer LaTak 10x, 2 µl de templado de *gfp*, 2 µl de templado de *ps*, 1 µl del oligonucleótido P1, 1 µl del oligonucleótido P6, 25.75 µl de agua destilada grado HPLC y 0.25 µl de la polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (5 u/µl). Para el caso *orf* + *gfp* se usó como templado 2 µl de *orf*, 2 µl de templado de *gfp* y los oligonucleótidos P5 y P4.

La reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 59° C por 2 minutos, 72° C por 2 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces.

VI. 4. 2. 5 Amplificación del fragmento fusión ps::gfp::eglc-2

Para la reacción de amplificación se usaron los mismos reactivos y cantidades que en los PCR anteriores, excepto que se usó como templado 2 μ l de *sp* + *gfp* y 2 μ l de *orf* + *gfp* y los cebadores P1 y P4. El temociclo fue: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 59° C por 3 minutos, 72° C por 3 minutos, 75° C por 5 minutos, 4° C final. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron 30 veces.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) (grado analítico, Promega ®) conteniendo bromuro de etidio (0.1µg/ml, Invitrogen®) y se compararon con el marcador molecular Lambda ADN *EcoR*I + *Hind*III (Promega®). El gel se sumergió en una solución de TAE 1X (40mM Trisacetato, 1mM EDTA) dentro de una celda de electroforesis Mini Sub Cell GT

(Biorad®). Los productos de PCR se cargaron en el gel de electroforesis, mezclándolos con solución amortiguadora de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) a razón de 6:1. El voltaje utilizado en la mayoría de las pruebas de electroforesis fue de 7.5 V/cm usando la unidad de carga PowerPac BASIC (Biorad®). La detección de las bandas amplificadas de ADN en el gel se llevó a cabo irradiando con luz ultravioleta con el equipo Molecular Imager Gel Doc XR System (Biorad®). Las bandas de ADN del tamaño esperado, cuando se requería, fueron escindidas del gel y purificadas usando el kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen). La elución final se realizó con 30µl de agua destilada grado HPLC.

eglc- 1	P 1	5'TGCTCTAGAGCATGTATCAACTCTCGCAAC3'
	P2	5'TCCTCGCCCTTGCTCACCATCAAGCTAGCCACAGT3'
	P3	5'TGGACGAGCTGTACAAGTAACCATCAGGTACTAGC3'
	P4	5'CCGGAATTCCGGTCACGGACCAAAAAGAGC3'
eglc- 2	P1	5'GCTCTAGACCCACAGTCATGTTCCATTC3'
	P2	5'TGCTCACCATAGGGTAGGCCTCGGCGGATACGC3'
	P 3	5'GCATGGACGAGCTGTACAAGCCTGAGGCCTACCTCGGCTTCAA3'
	P4	5'CGGAATTCTTAAAGCATAGCAAAGACAC3'
Gfp	P5	5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'
	P6	5' CTTGTACAGCTCGTCCATGC 3'

VI. 5 Clonación y construcción de plásmidos

Para la construcción de los plásmidos recombinantes se utilizó como base el plásmido pMF272 (Freitag *et al.* 2004; Número de acceso del Gene-Bank: AY598428; Fig. 4), que contiene la secuencia de un promotor fuerte, el P*ccg-1*, y también la secuencia de la proteína verde fluorescente (*sgfp*) en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple. También contiene la secuencia del gen *his-3* (EC 4.2.1.19) que codifica para una imidazol acetol fosfato transaminasa, responsable de convertir el imidazol acetol fosfato en histidinol fosfato en la ruta de biosíntesis de la histidina. Esto es útil en la selección de transformantes por complementar la auxotrofía para histidina. El plásmido tiene un gen que codifica para una β

lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina; ésto es útil para la selección de las células *E. coli* top 10 transformantes.



Figura 4. Mapa del plásmido pMF272.

VI. 5. 1 Construcción del plásmido pLMN02

Una vez obtenido el fragmento de fusión *ps::gfp::eglc-2*, se llevó a cabo una reacción de digestión con las enzimas de restricción *Xbal* y *EcoR*I (New England Biolabs ®) tanto del inserto *ps::gfp::eglc-2* como del vector pMF272 bajo las siguientes condiciones: 5 µl de ADN pMF272, 2 µl de BSA 10 X, 2 µl de Buffer NEB4, 9.5 µl de agua destilada grado HPLC, 1 µl de *Xbal* y 0.5 µl de *EcoR*I para el vector; 22.5 µl de ADN inserto *ps::gfp::eglc-2*, 3 µl de BSA 10 X, 3 µl de Buffer NEB4, 1 µl de *Xbal* y 0.5 µl de *EcoR*I para el inserto. Ambas reacciones se incubaron durante 3 horas a 37° C, al vector se le agregó 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón para evitar la religación de los extremos (Promega®) y se incubó por una hora adicional a 37° C. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio como se especifica anteriormente y las bandas de interés fueron escindidas (inserto y vector) y purificadas con el kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen). La elución final se realizó con 30µl de agua destilada grado HPLC. Estos productos purificados se usaron para llevar a cabo una reacción de ligación a razón de 3:1 en concentración del inserto con respecto al

vector. la reacción se llevó a cabo de la siguiente forma: 15 µl del inserto ps::gfp::eglc-2 (135 ng de ADN totales), 3 µl del vector pMF272 (45 ng de ADN totales), 2 µl del buffer T4 DNA Ligasa Buffer 10X y 1 µl de T4 DNA Ligasa (New England Biolabs ®). Esta reacción se incubó a temperatura ambiente 22º C - 25º C por 24 horas y después se almacenó hasta su uso a 4º C. El producto de la ligación se usó para transformar células de E. coli Top 10 calcio-competentes por choque térmico. Las células conservadas a -86º C se descongelaron en hielo y se tomó una alícuota de 50µl para mezclar con 5 µl del vector recombinante (producto de la ligación) en un tubo estéril de 1.5 ml. La solución se mezcló suavemente sin pipetear y se mantuvo en hielo por 30 minutos. Luego se introdujo el tubo en un bloque térmico Standard Heatblock (VWR®) por 2 minutos a una temperatura de 42° C. Se introdujo el tubo nuevamente en hielo por 2 minutos, se añadieron 950 µl de medio LB precalentado a 37º C y se incubó por 1 hora a la misma temperatura y 225rpm. La suspensión celular fue centrifugada por 1 min a 14000rpm, se extrajeron 850 µl de medio y la pastilla se resuspendió en el medio sobrante, se sembraron 50 µl de la suspensión en una placa con LB sólido aidicionado con ampicilina (100 µg/ml), y se incubó de 10 a 16 horas a 37º C hasta observar colonias en la placa. El plásmido pMF272 contiene en su secuencia el gen que codifica para la β-lactamasa, proteína que confiere resistencia a la ampicilina, de esta manera se seleccionaron solamente las colonias que presentaron crecimiento y resistencia a la ampicilina para realizar la prueba de PCR de colonia, como se describe a continuación: con un palillo de madera estéril se tomó una parte de la colonia, se inoculó en una placa LB sólido con ampicilina y el resto se introdujo en el tubo para PCR conteniendo: 2 µl del buffer Green Go Taq flexi, 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de DNTPs (2.5 mM), 1 µl cebador P1 eglc-2 y 1 µl cebador P4 egcl2 más 12.8 µl de agua destilada grado HPLC, 0.25 µl de la Go Tag Polimerasa (Promega®). Este proceso se realizó para las colonias seleccionadas que presuntamente fueron positivas y se uso como templado el ADN obtenido de la colonia de *E. coli.* Las condiciones de amplificación fueron: 95° C por 5 minutos, 95° C por 30 segundos, 59° C por 1 minuto, 72° C por 1

minuto, 72° C por 10 minutos y 4° CI de temperatura final. Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces. El producto obtenido de la reacción se visualizó en un gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio como se ha mencionado antes y se identificaron las bandas correspondientes al fragmento *ps::gfp::eglc-2* de alrededor de 2,500 pb.

Las clonas que dieron positivo en la PCR de colonia fueron inoculadas, cada una en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina, e incubadas por 12 – 14 horas a 37° C y 225 rpm para posteriormente realizar la extracción de ADN plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen). Una vez obtenido el ADN plasmídico se seleccionaron sólo 5 productos para realizar una última prueba de digestión con *EcoRI* y *XbaI*, para corroborar que efectivamente el inserto se encontraba dentro del plásmido y los sitios de clonación estaban intactos. La reacción se realizó bajo las mismas condiciones antes mencionadas, usando 3 µl del ADN plasmídico para digerir. El producto se visualizó en gel de agarosa y se comprobó la liberación de un fragmento de 2,500 pb nuevamente que corresponde a la fusión *ps::gfp::eglc-2*.

VI. 5. 2 Construcción del plásmido pLMN04

Se usó el mismo procedimiento que para la construcción de pLMN02, pero en este caso se usó como inserto la fusión *eglc-1::gfp*. Las reacciones de digestión y ligación se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones usando la relación 3:1 vector (200 ng totales de ADN) e inserto (60 ng totales de ADN) para la ligación. La purificación de los productos de digestión se llevó a cabo de la misma manera que para pLMN02. El plásmido recombinante producto de la ligación se usó para transformar células de *E. coli* calcio competentes. Se realizó PCR de colonia de las clonas presuntamente positivas bajo las mismas condiciones excepto que en este caso se usaron los cebadores P1 y P4 *eglc-1* y la temperatura de alineamiento fue de 56° C. De las clonas que dieron positivo para la PCR de colonia se extrajo ADN plasmídico y se realizó un perfil de restricción con *EcoR*I y *Xba*I para corroborar la inserción del fragmento *eglc-1::gfp* de 2,000 pb. Además

se guardaron alícuotas de los cultivos de *E. coli* de cada plásmido en glicerol al 50% y se almacenaron a – 86° C para su futuro uso y re-extracción de plásmido.

VI. 5. 3 Secuenciación de los vectores recombinantes

Se enviaron a secuenciar los plásmidos pLMN02 y PLMN04 a SeqXCell, Inc. (San Diego, California) para verificar que no hubiera ocurrido ninguna mutación en la secuencia de los genes. Se enviaron seis muestras, tres por cada plásmido, conteniendo de 500 a 1000 ng de ADN plasmídico más 6.4 pmoles de los cebadores específicos seleccionados para este proceso que son: PMF272F (CAAATCAACACAACACTCAAACCA), PMF272-R-2 (AGATGAACT TCAGGGTCAGCTTG) y MRp10F (AGAGACAAGAAAATTACCCCCTTCTT) para PLMN04 y PMF272F, GFP STOP fwd (GGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC) y MRp10F para LMN02. Para el análisis de la secuencias obtenidas se utilizó el software ApE (A Plasmid Editor v1.10.4.) de libre acceso en red.

VI. 6 Transformación de Neurospora crassa

VI. 6. 1 Obtención de conidios

Los conidios para la transformación se obtuvieron de la cepa de *N. crassa* FGSC#9717 (Tabla II). La característica de esta cepa es que tiene eliminado el gen *mus-51*, un gen homólogo al gen humano *ku70* responsable del NHEJ ("nonhomologous end-joining"), fenónemo que ocurre con frecuencia en *N. crassa* y en la mayoría de hongos filamentosos, donde ADN exógeno se integra en sitios no homólogos en el genoma. La eliminación de *mus-51* impide casi por completo la integración ectópica de los cassettes de inserción en el genoma de *N. crassa* durante la recombinación que se efectúa después de la transformación cuando se utiliza 1kb de ADN flanqueante (Ninomiya *et al.* 2004). La cepa #9717 se inoculó en un matraz con 100ml de MMV sólido, suplementado con L-histidina (0.5 mg/ml). El cultivo se incubó a 30°C en oscuridad hasta obtener micelio abundante sobre el medio y paredes del matraz. Para inducir la conidiación se expuso el cultivo a la luz. Una vez que se observaron grandes cantidades de conidios se adicionaron 50

ml de agua no ionizada estéril fría al matraz, agitando circularmente para desprender los conidios del micelio y paredes del matraz hasta obtener la mayor cantidad de esporas en el medio acuoso. Se vertió la suspensión de conidios filtrándola con una tela de poros finos en un tubo desechable estéril de polipropileno de 50 ml hasta obtener un volumen final aproximado de 35 ml. Para el lavado de los conidios se centrifugó la suspensión a 5,000 rpm por 5 minutos a 4°C en una centrífuga Multifuge 1S-R (Kendro®), desechando el sobrenadante (con cuidado de no desprender la pastilla) y se resuspendió la pastilla suavemente con 30ml de sorbitol estéril (1M). El lavado se repitió dos veces más y después del tercer centrifugado la pastilla fue resuspendida en sorbitol (1M) hasta obtener una concentración de conidios de 2.5 x 10^9 por mililitro. Ajustada la concentración se prepararon alícuotas en tubos de 0.2 ml y se conservaron a -20° C.

VI. 6. 2 Linearización de plásmidos y electroporación

Las transformaciones de N. crassa fueron realizadas por la técnica de electroporación, sin embargo para aumentar la eficiencia de transformación, los plásmidos pLMN02 y pLMN04 fueron sometidos a una reacción de digestión para ser linearizados. Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: para pLMN02 se usaron 10 µl de ADN plasmídico pLMN02, 5 µl de agua destilada grado HPLC, 4 µl del buffer NEB4 y 1 µl de la enzima de restricción Ndel (New England Biolabs®) en un volumen final de 20 µl. Para pLMN04 se usaron 15 µl de ADN plasmídico pLMN04, 2 µl de BSA 10 X, 2 µl del Buffer NEB3 y 1 µl de la enzima Notl, con un volumen final de 20 µl. Ambas reacciones fueron incubadas a 37º C por 3 horas, después 1 µl de fosfatasa alcalina fue agregado a la reacción para evitar la religación de los vectores. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa 1% y purificados a partir del fragmento de banda escindido del gel por medio del kit Qiaguick Gel Extraction Kit® (Qiagen). Una vez obtenidos los productos de la digestión purificados, se mezclaron 60 µl de la suspensión de conidios 2.5 x 10⁹ células/ml de la cepa #9717 en un tubo estéril de 1.5 ml con 5-10 µl (1 µg) del plásmido linearizado, y se transfirieron en una cubeta de electroporación estéril de 0.2 cm (Precision Electroporation Cuvettes, Daigger®) y se mantuvo en hielo por 5-10 minutos. La electroporación se realizó en un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad®) usando el siguiente protocolo: 600 Ohms, 25 µFD y 1.5 kV para obtener un tiempo constante entre 12 y 14 milisegundos. Después del pulso se añadió inmediatamente 1ml de sorbitol (1M) y se transfirieron los conidios a un tubo cónico de polipropileno de 50 ml al que se le añadió 1 ml de solución de recuperación estéril que contiene 1 ml de sales de Vogel 50X, 1 g de extracto de levadura y 50 ml de agua destilada. Las muestras se incubaron a 30° C con agitación muy lenta (20rpm) durante 3 horas. Los conidios fueron sembrados en 6 placas petri con medio FGS descrito anteriormente, aproximadamente 350 µl de la solución con conidios por placa. La presencia de sorbosa en este medio permitiría la fácil selección de las colonias transformantes y evitaría la mezcla de unas colonias con otras dentro de la misma placa. Las placas se incubaron a 30° C por 5 días hasta observar colonias.

VI. 6. 3 Selección de transformantes

Una vez obtenidas las colonias transformantes se traspasaron de 15 a 20 colonias para cada caso (pLMN02 y pLMN04) a tubos de borosilicato de 4 ml conteniendo 2 ml de MMV y se incubaron a 30° C hasta observar micelio y grandes cantidades de conidios. Posteriormente las cepas obtenidas fueron traspasadas a placas de petri con 25 ml de MMV inoculadas en un extremo y se incubaron a 25° C por 16-20 horas. Para analizar si presentaban fluorescencia se revisaron en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), con el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®) y usando aceite de inmersión Immersol 518 (Carl Zeiss®). Se usó el láser lón Argón de la línea 488nm con el filtro bandpass de emisión de (505-530nm). Se utilizó la técnica de bloque de agar invertido para realizar las observaciones (Hickey *et al.* 2004).

VI. 6. 4 Ensayos con inhibidores

Una vez obtenidas las transformantes de *N. crassa* expresando fluorescencia se llevaron a cabo ensayos en presencia de los inhibidores del citoesqueleto,

Latrunculina A (especificamente actina) y Benomilo (microtúbulos), además de Brefeldina A, que inhibe el transporte de proteínas desde retículo endoplásmico hacia aparato de Golgi, para identificar si la localización de EGLC-1-GFP y EGLC-2-GFP era afectada por éstos. Se usó una concentración de 20 µg/ml de Latrunculina A, 10 µg/ml de Benomilo y 5 µg/ml de Brefeldina A. Se colocaron 10 µl de la solución sobre un cubreobjetos y se llevó a cabo la técnica de bloque invertido mencionada anteriormente para realizar microscopía confocal de escaneo con laser.

VI. 6. 5 Microscopía confocal y procesamiento de imágenes

Una vez identificadas las cepas transformantes se usó el mismo microscopio confocal con las mismas especificaciones arriba mencionadas para realizar la observación y la captura de imágenes de cada cepa transformante. Para el procesamiento de imágenes se usó el software LSM Image Browser (Carl Zeiss ®) y Adobe Photoshop® (versión 7.0).

VI. 7 Caracterización de cepas

Uno de los objetivos de este estudio es la caracterización y comparación de cepas mutantes nulas para EGLC-1 y EGLC-2 con respecto a las cepas de tipo silvestre y de tipo parental. Las cepas mutantes fueron obtenidas del Fungal Genetics Stock Center (FGSC). En la Tabla II anteriormente se listaron las cepas utilizadas para estos fines y el genotipo que presenta cada una de ellas.

Las cepas fueron crecidas en 50 ml de MMV a 28° C con luz constante para obtener conidios que fueron recuperados por filtración y centrifugación y almacenados en 1ml de sorbitol 1M para su posterior uso.

VI. 7. 1 Comprobación de mutantes

Para el caso de las cepas $\triangle eglc-1$ y $\triangle eglc-2$ se llevó a cabo extracción de ADN genómico a partir de esporas por el método fenol/ cloroformo/ alcohol isoamilico usando microesferas de vidrio (Hervás-Aguilar *et al.* 2007) y usando este ADN como templado se realizó una reacción de PCR para comprobar que las cepas efectivamente carecieran de los genes de interés. Se utilizaron los

oligonucleótidos P1 y P4 específicos para la PCR de fusión correspondientes a cada gen de interés y además los genes de la quitina sintasa 7 (*chs-7*) como controles, así como ADN de la cepa #9717. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1.5 µl de MgCl₂, 3 µl de Buffer 10 X Green Go Taq flexi, 0.8 µl de DNTPs, 1 µl de cebador P1 o P4 para cada caso (*eglc-1::gfp* o *ps::gfp::eglc-2*), 1 µl de ADN templado de tipo silvestre o proveniente de las mutantes FGSC#20091 ó FGSC#11749, 11.45 µl de agua destilada grado HPLC y 0.25 de la enzima Go taq Polimerasa (Promega ®). La reacción se llevó a cabo a 95° C por 2 minutos, 95° C por 30 segundos, 57° C por 3 minutos, 72° C por 3 minutos, 72° C por 3 o veces. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% y se comprobó que en ninguno de los ADN de las cepas mutantes se amplificaran los fragmentos correspondientes al gen *eglc-1* o al gen *eglc-2* respectivamente comparando con los controles correspondientes para *chs-7* y el ADN de la cepa parental #9717.

VI. 7. 2 Tasa de crecimiento a 30° C y 37° C

En placas con 25 ml de MMV se inocularon 1 x 10⁴ conidios de cada una de las cepas antes mencionadas y se midió el crecimiento de cada cultivo a las 24 y 36 horas marcando con una línea los bordes de la colonia y después trazando 4 líneas verticales desde el punto de inoculación hacia el otro extremo de la caja. Se midió el incremento de crecimiento en centímetros. Cada cepa fue sembrada en 4 cajas e incubadas a 30° C y 37° C con luz constante.

VI. 7. 3 Crecimiento de hifas aéreas

En tubos de borosilicato con 2 ml de MMV se inocularon 1 x 10⁴ conidios de cada una de las cepas antes mencionadas, se incubaron a 30° C por 7 días, cada cepa por triplicado y se midió el crecimiento de las hifas aéreas desde la superficie del medio.

VI. 7. 4 Conteo de ramificaciones

En cajas Petri con 25 ml de MMV se inocularon 1 x 10⁴ de conidios de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron por 18 horas a 30° C. Al microscopio estereoscópico se realizó el conteo de ramificaciones en 30 hifas principales en 1,000 µm desde el ápice de la hifa hacia la base.

VI. 7. 5 Cruzas genéticas

Con la finalidad de descartar la posible esterilidad de las cepas obtenidas y comprobar los tipos de apareamiento enviados por el FGSC, se realizaron diferentes cruzas genéticas a partir de conidios de cada una de las cepas (Tabla IV). Se usó el medio sintético básico de cruzamiento (SCM) bajo en nitrógeno para inducir la reproducción sexual, obtener peritecios y aislar ascosporas.

WT (a)	WT (A)	Fluffy (A)	Fluffy (a)	20092 (Δ eglc-1; a)
Cruzada con	Cruzada	Cruzada	Cruzada	Cruzada
20091 (Δ	con 20091	con 20091	con 20091	con 20091
<i>eg/c-1;</i> A)	(Δ <i>eglc-1;</i> A)	(Δ <i>eglc-1;</i> A)	(Δ <i>eglc-1</i> ; A)	(Δ <i>eglc-1;</i> A)
Cruzada con	Cruzada	Cruzada	Cruzada	Cruzada
20092 (Δ	con 20092	con 20092	con 20092	con 20092
<i>eglc-1;</i> a)	(Δ <i>eglc-1;</i> a)	(Δ <i>eglc-1</i> ; a)	(Δ <i>eglc-1</i> ; a)	(Δ <i>eglc-1</i> ; a)
Cruzada con	Cruzada	Cruzada	Cruzada	Cruzada
11750 (Δ	con 11750	con 11750	con 11750	con 11750
eg/c-2; A)	(Δ eg/c-2; A)	(Δ <i>egic-2;</i> A)	(Δ <i>egl</i> c-2; A)	(Δ <i>eglc-2;</i> A)
Cruzada con	Cruzada	Cruzada	Cruzada	Cruzada
11749 (Δ	con 11749	con 11749	con 11749	con 11749
<i>eglc-2;</i> Α)	(Δ <i>eglc-2;</i> A)	(Δ <i>eglc-2;</i> A)	(Δ <i>eglc-2;</i> A)	(Δ <i>eglc-2;</i> A)

Tabla IV. F	Resumen de	e cruzas	genéticas	elaboradas	con distintas	cepas.
			<u> </u>			

VII. Resultados

VII. 1 Análisis bioinformático

El gen *eglc-1* (NCU06381.4) de 1,838 nucleótidos codifica para una β (1-3) endoglucanasa putativa con posible sitio de unión a GPI en el aminoácido 379, cerca del extremo C-terminal, posee una secuencia que codifica para un péptido señal de aproximadamente 19 a 20 aminoácidos en el extremo N-terminal que es sensible a peptidasas. El gen *eglc-2* (NCU09175.4) conformado por 1735 nucleótidos codifica también para una β (1-3) endoglucanasa putativa con posible sitio de unión a GPI en el aminoácido 384 hacia el extremo C-terminal y la secuencia que corresponde al péptido señal se encuentra entre los primeros 20 a 21 aminoácidos hacia el extremo N- terminal (Fig. 5) De acuerdo al servidor Pfam Sanger Institute, ambas proteínas pertenecen a la familia 17 de las glucosil hidrolasas.



FEAAIETNTKILLGVWASGTNTIËPEIKALQNGIAKYGKKLTDLIIGASIGSEDLYRVSVTGIONKSGVGAGPAELVKFIADWKKAF QGTAIANVPIGHVDTWDAWTNGTNKPVIDAVDWVGVDEYPYYENGKGNNIENSGYLFDRAYDAIEGAVGGKPIWVTETGWPY VGQTWDQAAATIKNQQYYWQEVGCRKLFGKVPFTWVNLRDSNPEDNEMKFAITDNLSTTPHFDLTCPKTFKTTPKGSSSASA TSSATGTGVSSPSSMESGSSGSGSGSGSGSGSGSGSSGTASSSEPATVTAPAETAVAT**GS**ATSVKGVSAAAVAGMTLLVGVFAML

Figura 5. Representación esquemática de los resultados arrojados por los servidores Big Fungal PI predictor y Signal P 3.0. La línea azul entre la secuencia de aminoácidos indica el sitio de corte del péptido señal.

VII. 2 Obtención de fragmentos de fusión por PCR

VII. 2. 1 egic-1: gfp

Utilizando los oligonucleótidos específicos (P1-P6) para *eglc-1::gfp* se logró obtener el fragmento de fusión de aproximadamente 2,000 pb que lleva el mismo nombre. Inicialmente y por separado se obtuvieron los fragmentos individuales *ps* (1,200 pb), *gfp* (717 pb) y *gpi* (100 pb). Posteriormente se fusionaron *ps* y *gfp* (1,917 pb) y en otra reacción *orf* y *gfp* (817 pb). Finalmente en una última reacción se pudo obtener *eglc-1::gfp* (Fig. 6A).

VII. 2. 2 ps::gfp::eglc-2

Para este caso se utilizaron los cebadores específicos (P1- P6) para *ps::gfp::eglc-* 2 y con ellos se logró obtener el fragmento de fusión de aproximadamente 2,500 pb. Por separado se obtuvieron inicialmente los fragmentos *ps* (590 pb), *gfp* (717 pb) y *orf* (1,194 pb). Posteriormente se fusionaron *ps* y *gfp* (1,307 pb) y *gfp* y *orf* (1,911 pb) en otra reacción, y finalmente en una reacción adicional se obtuvo la fusión final *ps::gfp::eglc-2* (Fig. 6B).



Figura 6. Geles de agarosa 1% con los amplicones obtenidos para eglc-1::gfp (A) y para ps::gfp::eglc-2 (B).

VII. 3 Obtención de plásmidos recombinantes

VII. 3. 1 pLMN04: eglc-1::gfp

Tras digerir el fragmento de fusión *eglc-1::gfp* y el vector pMF272 con enzimas de restricción específicas, los productos purificados correspondientes se ligaron y el vector recombinante resultante, pLMN04 (Fig. 7) se usó para transformar células de *E. coli* calciocompetentes. Quince colonias fueron presuntamente positivas al crecer en medio LB sólido con ampicilina. De estas colonias se llevó a cabo PCR de colonia con cebadores específicos para amplificar el fragmento *eglc-1::gfp* (2,000 pb) y comprobar su integración en el vector. Trece clonas amplificaron el inserto y de ellas se extrajo ADN plasmídico. El ADN de las clonas 1, 3, 5 y 7 se utilizó para comprobar mediante un perfil con enzimas de restricción (*Xbal* y *Eco*RI) la liberación del mismo fragmento y al mismo tiempo comprobar que los sitios de restricción estuvieran intactos. Para los cuatro casos la liberación del fragmento *eglc-1::gfp* de 2,000 pb fue satisfactoria (Fig. 8). Se seleccionó la clona 5 para la subsiguiente transformación de *N. crassa*.



Figura 7. Mapa de los vectores recombinantes pLMN02 y pLMN04 construidos.





Figura 8. Gel de agarosa con los amplicones obtenidos en la PCR de colonia (eglc-1::gfp 2,000 pb) (A) y el perfil de restricción con EcoRI y Xbal liberando el fragmento de fusión eglc-1::gfp.

VII. 3. 2 pLMN02: ps::gfp::eglc-2

A 1 kb

2000 pb

Una vez obtenido el fragmento de fusión *ps::gfp::eglc-2* y mediante una reacción de digestión con enzimas de restricción y una posterior reacción de ligación se logró insertar este fragmento dentro del vector pMF272 (Freitag *et al.* 2004) obteniendo así el vector recombinante pLMN02 (Fig. 7). El producto de la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* calciocompetentes, resultando en un total de dieciséis colonias transformantes presuntamente positivas que crecieron en medio sólido LB con ampicilina, y para las cuales se llevó a cabo PCR de colonia para comprobar la amplificación del fragmento *ps::gfp::eglc-2* (2,500 pb)

usando cebadores específicos. Un total de nueve clonas resultaron positivas para la inserción del fragmento, de las cuales se llevó a cabo extracción de ADN plasmídico. El ADN de las clonas 4, 11, 12, 14 y 15 se utilizó para comprobar mediante un perfil con enzimas de restricción (*Xbal* y *Eco*RI) la liberación del mismo fragmento y al mismo tiempo comprobar que los sitios de restricción estuvieran intactos. Para los 5 casos la liberación del fragmento *ps::gfp::eglc-2* de 2,500 pb fue satisfactoria (Fig. 9). Se seleccionó la clona 2 para la subsiguiente transformación de *N. crassa*.



Figura 9. Gel de agarosa con los amplicones obtenidos en la PCR de colonia (ps::gfp::eglc-2 2500 pb) (A) y el perfil de restricción con EcoRI y Xbal liberando el fragmento fusión ps::gfp::eglc-2.

Los resultados de secuenciación obtenidos de los plásmidos recombinantes permitieron comprobar que no hubo errores en las secuencias de fusión. Para PLMN02 se obtuvieron 1114 pb del extremo 5' (unido a *ccg-1*) hacia 3' (fusión con *gfp*) del gen *eglc-2* (cebador PMF272F) y también 1150 pb del extremo 5' del final

de la secuencia de *gfp* y su fusión con el marco de lectura abierto de *eglc-2* (cebador GFP STOP fwd). Para el plásmido PLMN04 se obtuvieron 1157 pb del extremo 5' (unión de *eglc-1* con *ccg-1*) hacia 3' sobre el marco de lectura abierto del gen *eglc-1* (cebador PMF272F) y además 1158 pb desde el inicio de la secuencia de *gfp* con dirección 3' para la fusión con el marco de lectura abierto de *eglc-1* (cebador PMF272-R-2). No se detectaron mutaciones en la secuencia nucleotídica de estos fragmentos al compararse con la secuencia *in silico*. No se pudieron obtener secuencias con el cebador Mrp10.

VII. 4 Obtención y selección de transformantes

VII. 4. 1 Transformación de N. crassa con los vectores recombinantes

El plásmido pLMN02 fue linearizado con la enzima de restricción *Nd*el y fue utilizado en una concentración de 500 ng a 1.0 µg para transformar, por electroporación, 2.5 x 10^9 conidios por mililitro de *N. crassa* FGSC#9717. La electroporación dió un tiempo constante de 14.5 milisegundos. Se obtuvieron doce transformantes capaces de crecer en medio sin histidina. El plásmido pLMN04 fue linearizado con la enzima de restricción *Not*l y usado en una concentración de 500 ng a 1.0 µg para transformar por electroporación 2.5 x 10^9 conidios por mililitro de *N. crassa* FGSC#9717. Resultaron 15 milisegundos de la electroporación y se obtuvieron seis transformantes capaces de crecer en medio sin histidina. En estas transformantes se realizó una búsqueda de fluorescencia mediante microscopía confocal de escaneo con láser. Una transformante para cada caso presentó fluorescencia.

VII. 5 Análisis por microscopía confocal de cepas transformantes

Las cepas transformantes TLMN02 y TLMN04 fueron seleccionadas para el análisis de la dinámica de las proteínas EGLC-1-GFP y EGLC-2-GFP, respectivamente.

VII. 6 Localización de EGLC-1-GFP

VII. 6. 1 EGLC-1-GFP en hifas maduras

Mediante análisis de microscopía confocal de escaneo con láser de la cepa transformante TLMN04, fue posible determinar la localización de EGLC-1-GFP. Esta proteína se encontró de manera muy tenue en forma de pequeñas acumulaciones en el ápice de hifas maduras (Fig. 10). Las pequeñas acumulaciones no tienen forma regular y se observaron justo en el límite entre la membrana plasmática y el citoplasma del ápice hifal. Este patrón se observó solo en 6 hifas de 20 analizadas.



Figura 10. Localización de EGLC-1-GFP en el ápice de hifas de la cepa transformante TLMN04. EGLC-1-GFP se acumula en pequeñas zonas en el ápice de la hifa madura (flechas). En la imagen en contraste de fases se puede identificar al Spk y en la sobreposición se observa como la fluorescencia de EGLC-1-GFP se encuentra adyacente al Spk. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 10 µm.

Por otro lado, EGLC-1-GFP se observó con mucha mayor intensidad en los septos ya formados de 14 hifas analizadas (Fig. 11A). La fluorescencia de EGLC-1-GFP se observó restringida a la zona central del septo en imágenes en 2D. En un par de ocasiones, además de verse fluorescencia en el septo, se lograron ver puntos fluorescentes asociados a la membrana plasmática lateral o circulando por el citoplasma (Fig. 11B). En septos en formación, la fluorescencia se observó avanzando desde la zona periférica hacia la parte central del septo, para permanecer en esta zona (Fig. 11C). Al realizar una reconstrucción 3D con el software LSM-510 META se pudo apreciar el anillo formado alrededor del poro septal (Figs. 11C-D).



Figura 11. Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en el septo de las hifas de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en la zona central de los septos de las hifas (escala: 10 µm). (B) Se localiza también en algunos puntos de la membrana plasmática perpendicular a los septos (flechas) (escala: 5 µm). (C) Serie de tiempo donde se observó fluorescencia avanzando desde la zona periférica hacia la parte central del septo, para permanecer en esta zona. El tiempo 0s indica el momento en que comenzó a captarse la secuencia (escala: 10 µm). (D) Reconstrucción en 3D de la región fluorescente del septo formada con 20 rebanadas ópticas de 0.5µm (escala: 10 µm). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®).

VII. 6. 2 EGLC-1-GFP en conidióforos y germínulas

En conidióforos de la cepa transformante TLMN04 logró observarse expresión de EGLC-1-GFP en los septos divisorios entre futuros conidios, pero sólo en una etapa adelantada de la separación (Figs. 12A-B), así como en la superficie de los polos de los conidios recién liberados. Al tomar una rebanada óptica de 0.5 µm de una reconstrucción en 3D de EGLC-1-GFP en conidióforos se puede apreciar la formación de un poro fluorescente en los sitios de acumulación de fluorescencia (Fig. 12B).



Figura 12. Localización de EGLC-1-GFP en conidióforos de la cepa transformante TLMN04. (A) EGCL-1-GFP se localiza en los septos divisorios de los conidióforos (flechas blancas). En la imagen en contraste de fases se puede apreciar que los sitios de constricción de los conidios que están por ser liberados coinciden con los sitios de acumulación de fluorescencia. EGLC-1-GFP Se localiza en los polos de los conidios que han sido recién liberados o a punto de hacerlo. (B) Rebanada óptica de 0.5 μm que muestra la formación de dos poros fluorescentes (flechas amarillas). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala: 10 μm.

En germínulas de 2 a 5 hrs. (15±5 µm de longitud promedio; n=5) EGLC-1-GFP se encontró acumulada en el citoplasma en forma de puntos y círculos fluorescentes moviéndose a través de la germínula y algunas veces llegando hasta la punta o permaneciendo en un solo sitio por periodos largos de tiempo (Fig. 13).



Figura 13. Imagen confocal de la localización de EGLC-1-GFP en germínulas de la cepa transformante TLMN04. EGCL-1-GFP se localiza como grumos fluorescentes acumulados en el citoplasma de las germínulas a diferentes tiempos de crecimiento. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). (Escala 3 hrs: 5 μm, escala 4 y 5 hrs: 10 μm).

VII. 7 Localización de EGLC-2-GFP

VII. 7. 1 EGLC-2-GFP en hifas maduras

Mediante análisis de microscopía confocal de escaneo con láser de la cepa transformante TLMN02, fue posible determinar la localización de EGLC-2-GFP. Esta proteína se localizó principalmente en los ápices de las hifas analizadas (n= 18) formando un domo como el descrito por la ecuación hifoide y = x cot (xV/N), (Fig. 14).



Figura 14. Localización de EGLC-2-GFP en el ápice de hifas de la cepa transformante TLMN02. EGCL-2-GFP se localiza formando un domo que ocupa la zona de la punta de la hifa durante el crecimiento. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 5 µm.

EGLC-2-GFP se acumula en zonas de la membrana plasmática en el subápice de las hifas de donde surgen nuevas ramificaciones; dicha fluorescencia permanece en el domo apical de la hifa reciente durante su crecimiento (n= 7) (Fig. 15).



Figura 15. Localización de EGLC-2-GFP en el domo apical de las ramificaciones en crecimiento. Se observan las imágenes confocales de dos hifas diferentes en proceso de ramificación. La fusión EGLC-2-GFP se acumula en las zonas donde surge una nueva hifa y continua en esa zona durante su crecimiento (flechas). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm.

En imágenes en contraste de fase cuando se logra observar el Spk, la acumulación de fluorescencia se limita a las zonas de la membrana plasmática circundantes al área inmediatamente delante del Spk. Esto también se observó al aplicar el colorante vital FM4-64 que tiñe las membranas y el Spk. Se observó que la fluorescencia producida por EGLC-2-GFP no se sobrepone con la fluorescencia producida por el colorante FM4-64 (n= 5) (Fig. 16).



Figura 16. Localización apical de EGLC-2-GFP en la cepa transformante TLMN02 comparada con la tinción del colorante vital FM4-64. Se observa la tinción del Spk en rojo con FM4-64 y en verde EGCL-2-GFP; al sobreponer las imágenes no hay colocalización aparente de las señales de fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

Para determinar si la fusión EGLC-2-GFP estaba llegando continuamente al ápice de la hifa y monitorear el flujo de la proteína se evaluó la recuperación de la fluorescencia después de realizar fotoblanqueamiento de algunas células con el laser del microscopio confocal (FRAP por sus siglas en inglés Fluorescence Recovery After Photobleaching) y se observó que después de incidir el laser sobre la célula y fotoblanquear toda la fluorescencia, nueva fluorescencia apical,

correspondiente a EGLC-2-GFP, vuelve a encontrarse de manera muy rápida y continua en esa zona durante el crecimiento normal de la hifa (Fig. 17).



Figura 17. Análisis de FRAP en la cepa transformante TLMN02. La serie de tiempo muestra la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento que duró 69 segundos (recuadro blanco). En los siguientes cuadros las flechas indican las zonas donde la fluorescencia comenzó a recuperarse, casi de inmediato. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm.

La fusión EGLC-2-GFP también fue localizada en los septos de hifas maduras hacia la zona basal de la colonia. En este caso la fluorescencia fue muy tenue y poco frecuente. Cuando se realizó una tinción con FM4-64, que marca los septos, se observó colocalización de las señales fluorescentes (n=3) (Fig. 18).



Figura 18. Imagen confocal de la cepa transformante TLMN02 que muestra la localización de EGLC-2-GFP en los septos y la comparación con la tinción de los mismos con el colorante vital FM4-64. Se logra observar en rojo el marcaje del septo y en verde una fluorescencia muy tenue correspondiente a EGLC-2-GFP. Al sobreponer las imágenes se observa la colocalización de las señales de fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

Debido al manejo de la cepa TLMN02 para realizar la microscopía es normal que algunas de las hifas sufran muerte celular. Cuando ésto ocurrió al realizar el análisis de la cepa transformante, se pudo observar la recuperación de hifas nuevas creciendo dentro de las hifas dañadas. En los ápices de estas hifas en recuperación se pudo observar el mismo patrón de fluorescencia, sin embargo es un fenómeno que se observó sólo un par de ocasiones (Fig. 19).



Figura 19. Localización de EGLC-2-GFP en los ápices de hifas en recuperación creciendo dentro de otra hifa con daño celular. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 µm.

También se observó la fluorescencia de EGLC-2-GFP en hifas creciendo al lado de otra hifa con daño celular. La fluorescencia se acumulaba en las zonas de contacto entre estas hifas y se deslocalizaba del domo apical (Fig. 20).



Figura 20. Localización de EGLC-2-GFP en las zonas de contacto entre hifas y deslocalización en el domo apical de las hifas crecientes. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®). Escala 10 μm.

VII. 7. 2 EGLC-2-GFP en germínulas

Al realizar el análisis de germínulas de 2 a 5 hrs. (15±10 µm de longitud promedio; n=9) de la cepa transformante TLMN02, EGLC-2-GFP logró observarse en el domo apical (Fig. 21A). En los conidios en fase de hidratación se observó de manera acumulada en un extremo del conidio donde después surgía el tubo germinal (Figs. 21B-C). Sin embargo, al observar conidióforos, EGLC-2-GFP no se observó acumulada en ninguna zona de la estructura (Fig. 21D).





VII. 7. 3 EGLC-2-GFP e inhibidores

Con la aplicación del inhibidor del citoesqueleto (específicamente de cables de actina) Latrunculina A, se pudo apreciar la deslocalización de EGLC-2-GFP por algunos minutos para reaparecer en un área reducida del domo apical, comenzar a acumularse y a partir de esa zona regenerar el crecimiento normal de la hifa (Fig. 22A). Al usar el inhibidor Benomilo, que inhibe la polimerización de los microtúbulos del citoesqueleto, la hifa experimenta los efectos morfológicos del inhibidor, sin embargo, EGLC-2-GFP sigue localizándose en el domo apical durante el crecimiento de las hifas (Fig. 22B). Al observar los efectos de la Brefeldina A, que inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplásmico a aparato de Golgi, la hifa detiene su crecimiento por el efecto del inhibidor, sin embargo, EGLC-2-GFP sigue localizada en el ápice muy intensamente a pesar de la presencia de la Brefeldina A (Fig. 22C).



Figura 22. Localización de EGLC-2-GFP en la cepa transformante TLMN02 después de ser sometida a diferentes inhibidores tanto del citoesqueleto como del transporte de proteínas. (A) Efecto de la Latrunculina A (20 µg/ml); la flecha indica el momento en que la fluorescencia es recuperada después de algunos minutos y se vuelve a localizar apicalmente (Escala: 10 µm). (B) Efecto del Benomilo (10 µg/ml); no hay efecto aparente en la localización de la fluorescencia de EGLC-2-GFP a pesar de modificar la morfología de la hifa (Escala: 20 µm). (C) Efecto de la Brefeldina A (5 µg/ml); a pesar de detener el crecimiento de la célula, no hay efecto aparente en la localización de EGLC-2-GFP (Escala: 10 µm). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), y el lente objetivo Neofluar 100X (N.A. 1.3 Carl Zeiss®).
VII. 8 Caracterización de cepas

VII. 8. 1 Comprobación de cepas mutantes

Se extrajo ADN a partir de esporas de las cepas mutantes para *eglc-1* y *eglc-2* así como de la cepa parental #FGSC 9717 (Tabla II) por el método de microesferas de vidrio (Hervás-Aguilar *et al.* 2007); de este modo se obtiene poca concentración de ADN pero es útil para realizar pruebas de rutina. Con el ADN obtenido (Fig. 23A) se comprobó por PCR que las cepas solicitadas efectivamente carecieran de los genes de interés y además que fueran homocariontes, es decir que todos los núcleos de las hifas expresaran la misma información. Los resultados de la PCR fueron satisfactorios, dado que los cebadores para *eglc-1* y *eglc-2* amplificaron únicamente cuando se usó como templado el ADN de la cepa parental no así para el ADN de las cepas mutantes y el control, el cebador para el gen de *chs-7* amplificó tanto el ADN de tipo parental como el ADN de tipo mutante (Fig. 23B).



Figura 23. Resultados obtenidos de la comprobación de las cepas mutantes mediante PCR. A) Gel de agarosa 1% con el producto de la extracción de ADN a partir de conidios con el método de microesferas de vidrio. La concentración fue baja pero suficente para la PCR de comprobación. B) El resultado del PCR de comprobación mostrado en un gel de agarosa 1%. Carril 1.1 y 2.1 ADN de tipo parental con cebadores para eglc-2 (arriba) y eglc-1 (abajo). Carril 1.2 ADN de cepa mutante Δ eglc-2 (#11749) con cebadores para eglc-2, carril 1.3 ADN de cepa mutante Δ eglc-2 (#11749) con cebadores para eglc-2, carril 1.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-2 (#11750) con cebadores para eglc-2, carril 2.2 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20091) con cebadores para eglc-1, carril 2.3 ADN de cepa mutante (#20091) Δ eglc-1 con cebadores para chs-7, carril 2.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20091) con cebadores para eglc-1, carril 2.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20091) con cebadores para eglc-1, carril 2.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20091) con cebadores para eglc-1, carril 2.4 ADN de cepa mutante (#20091) Δ eglc-1 con cebadores para chs-7, carril 2.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20091) con cebadores para eglc-1, carril 2.4 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20092) con cebadores para eglc-1, carril 2.5 ADN de cepa mutante Δ eglc-1 (#20092) con cebadores para chs-7.

VII. 8. 2 Tasa de crecimiento a 30° C

Se midió el crecimiento de cuatro cepas, FGSC #11749 ($\Delta eglc$ -2), FGSC #20091 ($\Delta eglc$ -1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). El análisis estadístico realizado nos permite apreciar una diferencia significativa en cuanto a reducción del crecimiento entre la cepa mutante para $\Delta eglc$ -2 comparado con el resto de las cepas analizadas, esta diferencia es solo del 15% respecto a la cepa de tipo silvestre y del 23% con respecto a la cepa de tipo parental (Fig. 24).



Figura 24. Crecimiento a 30° C de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δ eglc-2), FGSC #20091 (Δ eglc-1),FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (\blacksquare), Error Estándar (\Box) Intervalo de confianza 95% (I). Valor de p: 0.000001.

VII. 8. 3 Tasa de crecimiento a 37° C

Se midió el crecimiento de cuatro cepas, FGSC #11749 ($\Delta eglc$ -2), FGSC #20091 ($\Delta eglc$ -1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). El análisis estadístico detectó una diferencia significativa entre la cepa mutante para $\Delta eglc$ -1 del 52% con respecto a la cepa de tipo parental. Para la cepa mutante de $\Delta eglc$ -2

tambien se observó una diferencia del 56% con respecto a la cepa de tipo parental (Fig. 25). Si comparamos los tratamientos a 30° C y a 37° C, podemos observar que existe diferencia entre ellos, es decir se observa menor crecimiento a 37° C que a 30° C.



Figura 25. Crecimiento a 37° C de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δeglc-2), FGSC #20091 (Δeglc-1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I). Valor de p: 0.001

VII. 8. 4 Crecimiento de hifas aéreas a 30° C

Se midió la altura que alcanzaron las hifas aéreas creciendo en tubos de borosilicato después de 7 días de cultivo a 30° C de las cuatro cepas analizadas. El análisis estadístico mostró que hay una diferencia significativa entre la mutante para Δ eglc-2 y la cepa parental del 19% (Fig. 26).



Figura 26. Crecimiento de hifas aéreas por 7 días a 30° C de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δeglc-2), FGSC #20091 (Δeglc-1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I). Valor de p: 0.0031.

VII. 8. 5 Conteo de ramificaciones

Utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 se contaron las ramificaciones de las cuatro cepas analizadas. El análisis estadístico detectó una diferencia significativa entre el número de ramificaciones producidas por la cepa de tipo silvestre con respecto a las otras tres cepas analizadas, sin embargo en términos generales la diferencia es de una o dos ramas en el conteo (Fig. 27).



Figura 27. Conteo de ramificaciones de las cuatro cepas analizadas, FGSC #11749 (Δeglc-2), FGSC #20091 (Δeglc-1), FGSC #9718 (parental) y FGSC #988 (tipo silvestre). Media (■), Error Estándar (□), Intervalo de confianza 95% (I): p: 0.0014

VII. 8. 6 Cruzas genéticas

En la tabla V se resume el resultado de las diferentes cruzas genéticas realizadas. Se obtuvieron peritecios en las cruzas entre las cepas mutantes y las cepas de tipo silvestre, con ello se descartó la esterilidad de las cepas mutantes. También se comprobaron los tipos de apareamiento para cada cepa mutante proporcionado por el FGSC.

Tabla V.	Resumen	de cruzas	genéticas	y resultados.	Las X	indican	que	no se	obtuviero	n
peritecio	s, la p, indi	ica la obter	nción de pe	ritecios.						

Mutante simple	WT (a)	WT (A)	Fluffy (A)	Fluffy (a)	20092 (<i>mat a ∆eglc-</i> 1)
(Δ eglc-1; A)	P	x	×	p	
(Δ eglc-1; a)	x	р	р	x	
(Δ eglc-2; A)	Р	x	X	р	P
(Δ egic-2; A)	P	X	X	р	P

VIII. Discusión y Conclusión

El etiquetamiento con *gfp* de los genes *eglc*-1 y *eglc*-2 de *Neurospora crassa* codificantes para dos β (1-3) endoglucanasas con sitios de unión a GPI y con la presencia de una secuencia péptido señal, permitió determinar la localización celular de estas proteínas. Cabe resaltar que la estrategia de etiquetamiento con la proteína fluorescente verde insertada en el medio de la proteína de interés fue novedosa. Es la primera vez que en *N. crassa* se realiza el etiquetamiento con *gfp* en medio del gen de interés y la primera vez que se reporta para *N. crassa* la localización de β (1-3) endoglucanasas *in vivo*. Usar a la proteína verde fluorescente como reportera de la dinámica de otras proteínas, es factible debido a que ambas pueden funcionar y plegarse de manera adecuada simultáneamente (Lorang *et al.* 2001).

Ambas proteínas, EGLC-1-GFP y EGLC-2-GFP, se localizaron en los ápices de las hifas y en los septos, sin embargo EGLC-1-GFP se ve intensamente localizada en los septos y EGLC-2-GFP se observa con mayor intensidad en el domo apical. Las estructuras y patrones de fluorescencia para cada construcción son diferentes en cada evento morfogenético; EGLC-1-GFP en los ápices se ve como pequeñas acumulaciones y se observó en pocos casos; EGLC-2-GFP por el contrario es muy brillante en los ápices y forma un domo apical. EGLC-1-GFP se localiza en la zona central de los septos rodeando el poro y EGLC-2-GFP se encuentra sobre toda la zona del septo de manera muy tenue.

En un trabajo reciente se etiquetó la endoglucanasa GH5-1 (NCU00762) de *N. crassa* con GFP con la finalidad de facilitar su purificación mediante cromatografía de exclusión (Sun *et al.* 2011). Esta endoglucanasa es secretada al medio exterior, a diferencia de EGLC-1 y EGLC-2 que son proteínas que actúan a nivel de la pared celular por estar ancladas a la membrana plasmática mediante un grupo GPI. La función endoglucanasa putativa para estas dos proteínas sugiere que tienen algún papel en la construcción de la pared celular, aunado a esto la

presencia de un sitio de modificación GPI y su anclaje a la membrana plasmática nos motivó a seleccionarlas ya que coincide con lo reportado para otras enzimas involucradas en la remodelación de la pared (Mouyna *et al.* 2000: Cabib *et al.* 2007).

Al realizar el análisis por microscopía de las cepas transformantes se encontró que EGLC-1-GFP aparecía algunas veces en el ápice de la hifa y otras no. Lo mismo ocurrió con la localización de EGLC-2-GFP en los septos. Esto puede deberse a que las cepas transformantes TLMN04 y TLMN02 son heterocariones, lo cual significa que contienen núcleos que poseen la fusión con GFP y núcleos que no, por lo que no es sorprendente no ver el mismo patrón de fluorescencia en todas y cada una de las hifas de la cepa transformante.

Previamente enzimas con actividad glucanasa se etiquetaron con proteínas fluorescentes y se analizó su localización en las levaduras *S. cerevisiae* (Rolli *et al.* 2011) y *S. pombe* (Dekker *et al.* 2004). En *Aspergillus fumigatus* se han purificado y caracterizado algunas β (1-3) endoglucanasas ancladas a la membrana plasmática mediante un grupo GPI (Hartl *et al.* 2011), pero no se ha llevado a cabo su localización celular.

La localización de EGLC-2-GFP, y menos frecuentemente de EGLC-1-GFP, en el domo apical de las hifas de *N. crassa* sugiere una función de estas proteínas específicamente en estas zonas. Según lo reportado para el oomiceto *Saprolegnia monoica* (Fevre 1977) la mayor actividad glucanasa y celulasa del micelio de este hongo se encuentra en los ápices de las hifas y zonas de ramificación; en el presente estudio no se midió actividad β (1-3) endoglucanasa en las cepas transformantes TLMN02 y TLMN04, sin embargo la presencia de estas enzimas en el ápice coincide con la mayor actividad β (1-3) endoglucanasa encontrada en los ápices de *S. monoica*.

Según el modelo de crecimiento unitario de la pared celular (Bartnicki-García 1973), la remodelación de la pared celular necesaria para llevar a cabo los

eventos morfogenéticos clave para el desarrollo de los hongos filamentosos y la determinación de la forma de sus células se debe a la adición de enzimas plastificadoras o líticas que hacen más suave la pared celular, la presión de turgencia que es la fuerza que empuja y genera el crecimiento y la adición de nuevos materiales de síntesis que regeneren esta pared suavizada. De acuerdo a la información sobre el crecimiento apical polarizado de los hongos, se sabe que es en la punta donde se lleva a cabo la extensión de las hifas, por lo que la presencia de estas enzimas en el ápice podría estar directamente relacionada con la plastificación de la pared celular para permitir la expansión de la hifa. Sin embargo, la pared celular está formada de otros compuestos además de β (1-3) glucanos y existen uniones cruzadas entre quitina y glucanos, por lo que puede haber más enzimas involucradas en la plastificación de esta zona. De igual manera la formación de septos y la germinación de esporas son eventos de suma importancia en la morfogénesis del hongo. En este estudio se pudo observar la presencia de enzimas con actividad lítica en los sitios de germinación de conidios, en los sitios o septos divisorios entre conidios, en las ramificaciones de las hifas, en los septos de las hifas, e incluso en la fusión de algunas hifas. Lo anterior proporciona información relevante en cuanto a la función que estas proteínas están realizando en el metabolismo del hongo.

El modelo del estado estacionario o de equilibrio (Wessels 1986), propone que el material abundante de la pared celular, β (1-3) glucanos y quitina, es depositado hacia la pared celular en forma plastificada (material parecido a un gel), y por lo tanto la pared apical es sensible a la presión generada por el citoplasma y es deformable. Este material es posteriormente sujeto a acción enzimática para generar uniones cruzadas entre quitina y β (1-3) glucanos. En este punto ya no existe concordancia con los resultados generados en este estudio debido a la presencia apical de las β (1-3) endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2. Wessels excluye de su modelo el papel de las enzimas líticas, pero por otro lado asegura que efectivamente la composición de la pared celular en el ápice es diferente del

sub-ápice de las hifas (Wessels 1994), lo que en este estudio se atribuye a la presencia de enzimas con actividad lítica, tanto β (1-3) endoglucanasas como a otras proteínas capaces de desestructurar las microfibrillas de quitina presentes en la pared celular apical. El mismo Wessels (1966) en un estudio realizado para evaluar la degradación de glucanos en el hongo *Schizoplhyllum commune* asegura que la actividad de lisis durante la formación del pileo en esta especie es un proceso acompañado por la degradación de glucanos en el micelio y debe requerir la acción combinada de glucanasas y quitinasas y que probablemente la acción de unas está limitando la acción de las otras.

La localización de estas enzimas en los septos no tiene precedente en hongos filamentosos. En la levadura de fisión S. pombe, la α (1-3) endoglucanasa Agn1p, y la β (1-3) endoglucanasa, Eng1p se localizan en el septo primario de la división celular (Dekker et al. 2004). Ambas enzimas están involucradas en la disolución del septo entre células en el proceso de división celular. En S. cerevisiae Eng1p se localiza asimétricamente en el septo del lado de la célula hija, sugiriendo que esta proteína está involucrada, junto con alguna quitinasa, en la disolución del septo entre ambas células en el proceso de celular (Baladrón et al. 2002). En N. crassa este evento de separación celular se da en los conidioforos en el momento de liberar las conidiosporas, sin embargo no todas las hifas del micelio están determinadas a convertirse en conidióforos, además de que EGLC-2 no fue localizada en conidióforos, por lo que la localización de EGLC-2 en la zona septal no tiene un papel claro. La presencia de EGLC-1 en los septos de las hifas y conidióforos tiene más sentido pero no se sabe con certeza qué papel desempeña en estas zonas. EGLC-1 está restringida a la zona periférica del poro septal, lo cual coincide también con la localización de Eng1p en forma de un anillo alrededor del septo primario de división en S. pombe (Martin-Cuadrado 2003). El septo requiere que se ensamble nuevamente la pared celular durante su formación y la invaginación de la membrana plasmática desde la pared lateral de la hifa y se extienda hacia el centro formando una división. Anteriormente se mencionó la disolución del septo divisorio en la separación de conidios del conidióforo, y es en este punto donde la proteína EGLC-1 fue localizada frecuentemente sobre la superficie de la pared celular en los polos de los conidios por liberarse y recién liberados. Algunos estudios con cepas mutantes para endoglucanasas sugieren que la falta de estas enzimas genera un fenotipo con dificultades para liberar ascosporas (Baladrón *et al.* 2002). El tipo de esporas es diferente en este caso, pero continúan siendo estructuras de reproducción, por lo que este antecedente da la pauta para identificar la presencia de estas enzimas en los cuerpos fructíferos y ascosporas de *N. crassa*.

Se ha propuesto que es en el Spk donde se acumulan las vesículas secretoras antes de ser dirigidas radialmente al domo apical para dar la forma característica de la hifa (Bartnicki-García et al. 1989) sin embargo y a pesar de que EGLC-2-GFP se acumula en la membrana plasmática del domo, no parece haber ningún contacto o acumulación de esta proteina en el Spk. Aunado a ésto, cuando la cepa transformante TLMN02 (expresando EGLC-2-GFP) fue sometida a ensayos con brefeldina A, no se observó ningún efecto en la acumulación de la proteína EGLC-2-GFP en el domo apical. La brefeldina es un compuesto usado tradicionalmente como inhibidor del transporte de proteínas de retículo endoplasmático a Golgi, este compuesto actúa modificando el mantenimiento y formación de compartimentos subcelulares (Pelham 1991), el hecho de que este inhibidor no afecte la localización de EGLC-2 deja abierta la pregunta de si esta proteína sigue una ruta de secreción convencional. Cuando se habla de proteínas con péptido señal y un posible sitio de unión a GPI, se sabe, teóricamente, que serán traslocadas directamente a retículo endoplasmático y después pasarán a Golgi para viajar en forma de vesículas a su destino, sin embargo para EGLC-2-GFP no se observa ningún efecto aunque se esté interrumpiendo el flujo de retículo endoplasmático a Golgi. Para el hongo filamentoso N. crassa se ha reportado que la quitina sintasa clase I (CHS-3) y clase VI (CHS-6) viajan por una ruta alterna de secreción (Riguelme et al. 2007). Esto podría hacerse extensivo para EGLC-2, sin embargo es necesario llevar a cabo un estudio más completo para determinar la ruta por la cual esta proteína llega a su destino. Las vesículas transportadoras viajan hacia la punta de la hifa sobre microtúbulos y filamentos de actina con la finalidad de fusionarse con la membrana plasmática apical (Horio y Oakley 2005; Taheri-Talesh et al. 2008) En este estudio al realizar la inhibición de estos componentes del citoesqueleto en la cepa transformante TLMN02 se observó que no hay un efecto aparente que modifique la localización de EGLC-2-GFP usando Benomilo (dirigido a microtúbulos), por lo que probablemente esta endoglucanasa no se transporta sobre estas estructuras. Por otro lado, al agregar Latrunculina A (dirigido a cables de actina), se observa una disminución en la fluorescencia apical de EGLC-2-GFP, sin embargo se regenera en cuestión de minutos, lo cual sugiere que probablemente la actina tiene un papel más activo en el tráfico de EGLC-2 al ápice. Estos resultados coinciden con lo reportado para la guitina sintetasa I (CHS-I), cuyo tráfico hacia el ápice no es afectado por la presencia de Benomilo pero si por la adición de Latrunculina A (Sánchez-León et al. 2011). Se cree que el polarisoma, el complejo ARP2/3 asociado a actina y el exocisto son la maquinaria responsable del crecimiento y descarga polarizada de las vesículas. El exocisto se ha considerado como uno de los principales indicadores de exocitosis, y en este estudio se detectó que las endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2 tienen una localización similar a los componentes del exocisto SEC-6 y SEC-8 (Riquelme M. comunicación personal) por lo cual sería interesante conocer cuál es la relación de estos componentes con las endoglucanasas aquí etiquetadas. La localización de la endoglucanasa EGLC-2 tiene similitud con la localización de las Rho GTPasas RAC y CDC-42 y el factor de intercambio de guanina CDC-24, ambas en N. crassa ocupan la zona apical formando un domo (Araujo-Palomares et al. 2011). La localización de esta última es altamente similar a EGLC-2 tanto en hifas maduras, como en sitios de ramificación, germinación de conidios y el ápice de germínulas, por lo que sería muy interesante conocer la relación de estas proteínas y como están interactuando en el mismo espacio en el ápice de la hifa en N. crassa.

Se puede deducir que EGLC-2 está en constante arribo al domo apical a partir del uso de FRAP, donde se observó que después de incidir el laser del microscopio confocal sobre un área específica de interés, nueva fluorescencia perteneciente a la fusión EGLC-2-GFP aparecía en la zona fotoblanqueda.

En relación al estudio y caracterización de las mutantes simples para EGLC-1 y EGLC-2 los resultados no muestran un efecto considerable en el fenotipo Si bien existe una diferencia significativa en la tasa de crecimiento de la cepa $\Delta eglc$ -2 con respecto a las demás cepas analizadas, el fenotipo no fue afectado y la cepa creció sin problemas. Esto puede deberse a que hay otras enzimas que pueden realizar la misma función; en este caso EGLC-1 podría es una opción, es decir existe redundancia funcional en este tipo de proteínas; ésta también puede ser la razón por la cual ambas proteínas se localizan casi en las mismas zonas del hongo. Similar a este es el caso para *Aspergillus fumigatus*, en donde la mutante para la Eng2 no fenotipicamente es similar al tipo silvestre, lo cual se atribuye a la presencia de otras nueve endo β (1-3) endoglucanasas presentes en este hongo (Hartl *et al.* 2011).

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis de las cepas mutantes, las proteínas EGLC-1 y EGLC-2 no parecen tener un papel morfogenético por si solas. Para este tipo de proteínas se requiere del análisis de cepas con múltiples mutaciones para este tipo de proteínas, además de que la identificación de otros factores asociados a las (1-3) endoglucanasas aquí estudiadas nos permitiría establecer un papel más acertado de estas enzimas.

En conclusión, se logró etiquetar a las proteínas EGLC-1 y EGLC-2 con la proteína GFP y con ello encontrar su localización en células vivas de *N. crassa.* Lo que nos da un indicio de que podrían estar participando directamente en la remodelación y plastificación de los β (1-3) glucanos de la pared celular en los sitios donde fueron encontradas.

La carencia individual de estas proteínas no parece ser letal para el desarrollo del hongo, sin embargo hay una disminución en la tasa de crecimiento de la mutante $\Delta eglc-2$, por lo que se puede suponer que el hongo encuentra la forma de compensar la carencia de una de estas proteínas con otra que realice una función similar sin que afecte de manera significativa su desarrollo. Es importante realizar estudios de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión de las mutantes simples presentadas aguí, así como de una doble mutante para determinar diferencias estructurales en alta resolución que nos permitan identificar el efecto de estas mutaciones a este nivel. Las β (1-3) endoglucanasas analizadas en este trabajo se localizan en zonas de importancia morfogenética y podrían tener un papel específico en la remodelación de la pared celular y su plastificación, lo que permite el desarrollo y crecimiento del hongo, así como la determinación de su forma característica. No es claro como estas proteínas llegan a su destino, por lo que es importante un estudio más específico sobre su ruta de secreción es importante. Este es un estudio preliminar sobre enzimas plastificadoras de la pared celular en N. crassa. Es necesario determinar sus interacciones con otras enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular y la secreción y descarga de vesículas.

IX. Bibliografía

Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150 (7):2029-2035.

Agrios, G.N. 1997. Phytopathology. Ed. Limusa. 4a. edición. México. 530 p.

Araujo-Palomares, C.L., C. Richthammer, S. Seiler, y E. Castro-Longoria. 2011. Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*, 6(11): e27148.

Araujo-Palomares, C.L., M. Riquelme, y E. Castro-Longoria. 2009. The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkörper. *Fungal Genetics and Biology.* 46(8):551-563.

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

Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, 22:87-107.

Bartnicki-García, S. 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: J. M. Ashworth y J. E. Smith (eds.). *Microbial Differentiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 245-267 p.

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

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

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

Borkovich, K. A., Alex L. A., Yarden O., Freitag M., Turner G. E., Read N. D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., PlamannM., Goodrich-Tanrikulu M., Schulte U., Mannhaupt G., Nargang F. E., Radford A., Selitrennikoff C., Galagan J. E., Dunlap J. C., Loros J.J., Catcheside D., Inoue H., Aramayo R., Polymenis M.,

Selker E. U., Sachs M. S., Marzluf G. A., Paulsen I., Davis R., Ebbole D. J., ZelterA., Kalkman E. R., O'rourke R., Bowring F., Yeadon J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W., y Pratt R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:1-108.

Bowman, S.M. y Free, S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8):799-808.

Briza, P., A. Ellinger, G. Winkler, y M. Breitenbach. 1988. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *The Journal of Biological Chemistry.* 263 (23): 11569-11574.

Briza, P., A. Ellinger, G. Winkler y M. Breitenbach. 1990. Characterization of a DL-Dityrosine-containing macromolecule from yeast ascospore walls. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(25):15118-15123.

Brock, T. 1965. β-Glucanase of yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19: 623-629.

Brunswick, H. 1924. Untersuchungen über Geschlechts and kerverhaktnisse bei der Hymenomyzetengattung Coprinus. Botanische Abhandlungen, ed. K. Goebel. 5. Jena: Gustav Fischer.

Bulawa, C. E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 47:505-534.

Bull, A.T. 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63(1):75-94.

Cabib, E., D. H, Roh, M. Schmidt, L. B, Crotti, y A. Varma. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23):19679-19682.

Cabib, E., N. Blanco, C. Grau, J. M. Rodríguez-Peña, y J. Arroyo. 2007. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*, 63(3):921-935.

Cappellaro, C., V. Mrsa, y W. Tanner. 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *Journal of Bacteriology*. 180(19): 5030-5037.

Choquer, M., M. Boccara, I. R. Gonçalves, M. C. Soulié y A. Vidal-Cros. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *European Journal of Biochemistry*, 271(11):2153-2164.

Cortat, M., P. Matile, y A. Wiemken. 1972. Isolation of glucanase-containing vesicles from budding yeast. *Archives of Microbiology*, 82:189-120.

Davies, G. y B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9):853-859.

Dekker, N., D. Speijer, M. van den Berg, A. de Haan, y F. Hostenbach. 2004. Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Molecular Biology of the Cell*, 15(8):3903-3914.

Doolin, M.T., A.L, Johnson, L. H. Johnston, y G. Butler. 2001. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Molecular Microbiology*, 40(2):422-432.

Encinar del Dedo, J., E. Duenas, Y. Amaiz, F. del Rey, y C.R. Vazquez de Aldana. 2009. β glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 8(8):1278-1286.

Farkas, V. 1979. Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiological Reviews*, 43(2): 117-144.

Farkas, V. 1973. Extracellular β-glucanases of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta, 321(1):246-255.

Fevre, M. 1977. Subcellular localization of glucanase and cellulase in *Saprolegnia monoica*. *Microbiology*, 103(2):287-295.

Fontaine, T., R. P. Hartlandet, A. Beauvais, M. Diaquin, y J. P. Latgé. 1997. Purification and characterization of an endo-1,3-β-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Biochemistry*, 243:315-321.

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

Fujiwara, M., M. Ichinomiya, T. Motoyama, H. Horiuchi, A. Ohta, y M. Takagi. 2000. Evidence that the Aspergillus nidulans class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophore development. *Journal of Biochemistry*, 127(3): 359-366.

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

Gooday, G.W. 1979. Chitin synthesis and differentiation in *Coprinus cinereus*. En: J. H. Burnett y A. P. J. Trinci, (eds.). *Fungal Walls and Hyphal Growth*. Cambridge: Cambridge University Press, 203-223 p.

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

Hart, L., A. Gastebois, V. Aimanianda, y J. P. Latgé. 2011. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology.* 48(2):185-191.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6):641-655.

Hervás-Aguilar, A., J. M. Rodriguez, J. Tilbum, H. N. Arst, y M. A. Peñalva. 2007. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor *PacC*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(48):4735-4747.

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

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

Jabri E., C. Taf, D. Quigley, M. Hrmova, P. Phelps, M. Alders, y C. P. Selitrennikoff. 1989. (1–3)-β-glucan synthase of *Neurospora*. *Current Microbiology*, 19:153-161.

James, P.G., R. Chemiak, J. Ronald, C. A. Stortz, y R. Errol. 1990. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydrate Research*, 198(1):23-38.

Johnson, B.F. 1968. Lysis of yeast cell walls induced by 2-deoxyglucose at their sites of glucan synthesis. *Journal of Bacteriology*, 95(3):1169-1172.

Kamada, T., F. Tadashi, T. Nakagawa, y T. Takemaru. 1985. Changes in $(1\rightarrow 3)$ - β -glucanase activities during stipe elongation in *Coprinus cinereus*. Current *Microbiology*, 12(5):257-259.

Kanetsuna, F. y L. M. Carbonell. 1971. Cell wall composition of the yeast like and mycelial forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Bacteriology*. 106(3): 946-948.

Kang, M.S. y E. Cabib. 1986. Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of $(1-3)-\beta$ -D-

glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16): 5808-1582.

Kritzman, G., I. Chet, y Y. Henis. 1978. Localization of β -(1,3)-Glucanase in the mycelium of Sclerotium rolfsii. Journal of Bacteriology, 134(2):470-475.

Latgé, J.P. y R. Calderone. 2006. The Fungal Cell Wall. En: Kües y Fischer (eds.). *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin. 449 p.

Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, Hidde, P y P. Matsudaira. 2008. *Molecular Cell Biology* 6th ed., W.H. Freeman & company, New York. 1150 p.

Lorang, J. M., R. P. Tuori, J. P. Martinez, T. L. Sawyer, R. S. Redman, J. A. Rollins, T. J. Wolpert, K. B. Johnson, R. J. Rodriguez, M. B. Dickman, y L. M. Ciuffetti. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 1987-1994.

Martin-Cuadrado, A. B. 2003. The endo- β -1,3-glucanase *eng1p* is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, 116(9):1689-1698.

Meyer, R., R. W. Parish, y H. R. Hohl, 1976. Hyphal tip growth in *Phytophthora*. *Archives of Microbiology*, 110(2-3):215-224.

Mouyna, I., T. Fontaine, M. Vai, M. Monod, W. A. Fonzi, M. Diaquin, L. Popolo, R. P. Hartland, y J. P. Latgé. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20):14882-14889.

Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii, y H. Inoue. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for non-homologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:12248-12253.

Pelham, H. R. B. 1991. Multiple targets for brefeldin A. Cell, 67(3):449-451.

Pitson, S. M., R. J. Seviour, y B. M. McDougall. 1993. Noncellulolytic fungal βglucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(3):178-192.

Rapp, P. 1992. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glucanicum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1117(1): 7-14.

Reese, E.T. y M. Mandels. 1966. β-glucanases other than cellulase. *Methods in Enzymology*, 8:607-615.

Del Rey, F., I. Garcia-Acha y C. Nombela. 1979. The Regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. *Microbiology*, 110(1):83-89.

Del Rey, F., T. Santos, I. Garcia-Acha y C. Nombela. 1979. Synthesis of 1,3-βglucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during the mitotic cycle, mating and sporulation. *Journal of Bacteriology*, 139(3):924-931.

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

Roberson, R. W., M. Abril, M. Blackwell, P. Letcher, D. J. mc Laughlin, R. R. Mourino-Perez, M. Riquelme y M. Uchida. 2010. Hyphal Structure. En: K. A. Borkovich y D. J. Ebbole (eds.). *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi.* ASM Press, Washington, DC. 8-24 p.

Rolli, E., E. Ragni, M. de Medina-Redondo, J. Arroyo, C. R. Vazquez de Aldana, y L. Popolo. 2011. Expression, stability, and replacement of glucan-remodeling enzymes during developmental transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9): 1585-1598.

Ruiz-Herrera, J. y R. Sentandreu, 1989. Fungal cell wall synthesis and assembly. *Current Topics in Medical Mycology*, 3: 168-217.

Ruiz-Herrera, J., C. G. Leon, A. Carabez-Trejo, y E. Reyes-Salinas. 1996. Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*. 20(2): 133-142.

Schoffelmeer, E. A. M., F. M. Klis, J. H. Sietsma, y B. J. C. Cornelissen. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 27:275-282.

Shematek E. M., J. A. Braatz, y E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. Preparation and properties of β -(1 -3) glucan synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(3): 888-894.

Sietsma, J.H. y J. G. H. Wessels, J.G.H. 1994. Apical wall biogenesis. En: J. G. H. Wessels y F. Menhardt (eds.). *The Mycota I. Growth, Differentiation and sexuality.* Springer-Verlag, Berlin. 449 p.

Sun, J., C. M. Phillips, C. T. Andreson, W. T. Beeson, M. Marletta y N. L. Glass. 2011. Expression and characterization of the *Neurospora crassa* endoglucanase GH5-1. *Protein Expression and Purification*, 75(2): 147-154.

Sánchez-León, E., J. Verdin, M. Freitag, R. Roberson, S. Bartnicki-Garcia, y M. Riquelme. 2011. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell*, 10(5): 683-695.

Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araujo-Bazan, D. Xiaowei, E. A. Espeso, M. A. Penalva, S. A. Osmani, y B. R. Oakley. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans. Molecular Biology of the Cell*, 19(4): 1439-1449.

Tian, C., W. T. Beeson, A. T. Iavarone, J. Sun, M. Marletta, C. Jamie, y N. L. Glass. 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52): 22157-22162.

Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, 13:42-43.

Wessels, J. G. H. 1966. Control of cell-wall glucan degradation during development in *Schizophyllum commune*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 32(4): 341-355.

Wessels, J. G. H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 413-437.

Wessels, J. G. H. 1986. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *International Review of Cytology*, 104: 37-79.

Wessels, J. G. H. y D. J. Niederpruem. 1967. Role of a cell-wall glucan-degrading enzyme in mating of *Schizophyllum commune*. *Journal of Bacteriology*, 94(5): 1594-1602.

Wessels, J. G. H. y J. H. Sietsma. 1981. Fungal cell walls: a survey. En: W. Tanner y F. A. Loewus, (eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer, Berlin. 352-394 p.

Westergaard, M. y H. K. Mitchel. 1942. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10): 573-577.

Yazdi, M.T., J. R. Woodward, y A. Radford. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *Journal of General Microbiology*, 136(7): 1313-1319.