

TESIS DEFENDIDA POR  
Lisandro Sánchez Hernández  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Director del Comité*

---

Dr. Alexei Fedrovish Licea Navarro  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Sharon Zinah Herzka Llona  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Coordinador del programa de  
posgrado en Ciencias*

---

Dr. David Hilario Covarrubias  
Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

12 de Octubre de 2010.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA



---

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

---

LOCALIZACIÓN Y PAPEL DE LA SEPTINA CDC-3 DURANTE LA  
MORFOGÉNESIS EN *Neurospora crassa*

TESIS

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

Presenta:

**Lisandro Sánchez Hernández**

Ensenada, Baja California, México, Octubre del 2010

**RESUMEN** de la tesis de **Lisandro Sánchez Hernández** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en **Microbiología**. Ensenada, Baja California. 12 de Octubre de 2010.

## **LOCALIZACIÓN Y EL PAPEL DE LA SEPTINA CDC-3 DURANTE LA MORFOGÉNESIS EN *Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Director de Tesis

En los organismos eucariotas durante la morfogénesis se encuentran diversos patrones que han sido conservados a través de la evolución. Muchos de estos patrones son mediados por proteínas altamente conservadas que pueden tener funciones similares entre diferentes grupos de organismos. Este es el caso de las proteínas con dominio GTP denominadas septinas, las cuales se encuentran distribuidas en varios grupos de organismos eucariotas, excepto en plantas y bacterias. Ejemplos de estas proteínas se pueden observar en muchos organismos fúngicos, como: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans* y *Ashbya gossypii*, en los cuales se han encontrado patrones similares en la distribución y función de algunas septinas. Se ha reportado que septinas como AspB en *A. nidulans* y CDC3 en *S. cerevisiae*, las cuales son homólogas a Sep7 en mamíferos, tienen un papel importante en la ramificación, septación, crecimiento polarizado, así como en la regulación y sincronización de algunos de estos eventos con los procesos de división celular como mitosis y citocinesis. El hongo filamentoso *Neurospora crassa* presenta cinco septinas entre las que se encuentra la septina CDC-3 (HYP-1), cuya localización y papel en el acontecer de la morfogénesis se describen en el presente estudio por medio del marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP) y análisis por microscopía confocal. Las observaciones realizadas mostraron la localización de la CDC-3-GFP en la región subapical de las hifas en forma de collar, así como en septos nacientes, formando un disco que recorre de la membrana hacia el interior de la hifa. Este disco alrededor del poro septal posteriormente desaparece. Por otro lado, se observó la localización de la septina CDC-3-GFP cerca de los núcleos y ocasionalmente se pudo observar núcleos durante la mitosis. También se pudo observar que la septina estaba implicada en la formación de un anillo durante la anastomosis, así como en la formación de cúmulos en el poro de hifas atrofiadas, bloqueando la pérdida de citoplasma. Tomando en cuenta las estructuras que forman las septinas y las observaciones documentadas en este análisis así como las

referenciadas en la bibliografía, se sugiere que las septinas actúan como una red molecular que ayuda a dar soporte y posicionan espacial y temporalmente a los componentes que participan en la reestructuración de la membrana y la pared celular.

**Palabras Clave:** Morfogénesis, Septinas, *Neurospora crassa*, Ciclo celular.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Lisandro Sánchez Hernández** as a partial requirement to obtain the MASTER OF LIFE SCIENCES WITH ORIENTATION IN **Microbiology**. Ensenada, Baja California, Mexico. 12<sup>th</sup> October 2010.

**LOCALIZATION AND ROLE OF THE SEPTIN CDC-3 DURING *Neurospora crassa* MORPHOGENESIS.**

During morphogenesis in eukaryotic organisms, several diverse patterns have been found that are conserved through evolution. Many of these patterns have been analyzed by studying highly conserved proteins with similar functions among different groups of organisms. One example of these proteins are the septins, proteins with a GTP domain, which are present in various organisms, except plants and bacteria. Some examples of these proteins can be observed in fungi such as: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans* and *Ashbya gossypii*, in which there have been found similar distribution patterns and function of some septins. Particularly, there are reports of septins like AspB in *A. nidulans* and CDC3 in *S. cerevisiae*, which are homologs of Sep7 in mammals, and have an important role in branching, polarized growth, septation and in regulation and synchronization of some cellular division events such as mitosis and cytokinesis. In the filamentous fungus *Neurospora crassa*, there are five septins including the CDC-3 (HYP-1), whose localization and function during morphogenesis processes are described in this study by tagging the protein with the green fluorescence protein (GFP) and analyzing it by microscopy. As a result, septin was localized in the subapical region in a collar-like form. On the other hand, this septin was observed participating during septum formation. First, and in nascent septa, forming a disc that runs through the membrane into the hyphae. This disc concentrated around the septal pore and then disappeared. On the other hand, we observed CDC-3-GFP in nuclei as isometric shaped clusters, which occasionally could be observed in nuclei during mitosis. Furthermore, septin CDC-3 was also found in a ring at the merging point of anastomosed hyphae and in the pore of degenerated hyphae stopping cytoplasm loss. Considering the reported structures formed by septins and the results obtained in this work, it could be suggested that septins act as a molecular network that helps or gives support to components involved in the restructuration of the cell wall and plasma membrane.

**Keywords:** Morphogenesis, septins, *Neurospora crassa*, cell cycle.

## **Dedicatorias**

**A mi madre adorada por su amor y esfuerzo incansable  
Gracias.**

**A mis queridas hermanas Pati y José que nunca han dejado de creer en mí y han permanecido a mi lado en las buenas y en las malas, cobijándome con su cariño y comprensión. A todos mis hermanos y sobrinos en particular a Richar por alegrarme la vida con sus ocurrencias y su buena vibra.**

La ciencia, una deliciosa y extravagante manera de disfrutar la vida.

## **Agradecimientos**

A Rocío por su cariño, ternura y apoyo en los buenos y no tan buenos momentos a lo largo de este trayecto de mi vida, sin su linda esencia el camino no hubiese sido tan agradable.

A mis compañeros de la maestría y del laboratorio que hicieron muy agradable mi estancia en el mismo. En particular a Cynthia y Roxy por su apoyo y acertados comentarios que enriquecieron este trabajo y por aguantar mis bromas. Al buen camarada Mario por siempre tener una excelente actitud y buena vibra en todo momento.

Agradezco a la Dra. Meritxell Riquelme Pérez por los conocimientos y la experiencia transmitida durante la elaboración de este trabajo y en particular por compartir su compromiso y pasión por la ciencia.

Al Dr. Michael Freitag por su colaboración con material biológico y opiniones para enriquecer este trabajo.

Agradezco al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y al Instituto Nacional de Cancerología por las facilidades brindadas y el apoyo técnico en microscopía durante mi estancia en la Cd. de México.

A la Dra. Saé Muñoz Hernández y al M. en C. Alejandro López Saavedra del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo técnico en microscopía.

Al Dr. Jesús Aguirre Linares del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por las facilidades brindadas y el apoyo técnico durante mi estancia en la Cd. de México.

A mi comité por su asesoría, disposición y aportaciones a esta tesis: Dr. Alexei Federovich Licea Navarro y Dra. Sharon Herzka Llona.

A todo el personal del Departamento de Microbiología por su apoyo.

A mi grandioso pueblo de México por pagar mis estudios y este proyecto.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada B.C, México con la gestión del CONACyT.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen español</b> -----	i
<b>Resumen inglés</b> -----	iii
<b>Dedicatorias</b> -----	iv
<b>Agradecimientos</b> -----	v
<b>Contenido</b> -----	vi
<b>Lista de Figuras</b> -----	viii
<b>Lista de Tablas</b> -----	xxi
<b>CAPITULO I. Introducción</b> -----	1
<b>I.1 Morfogénesis</b> -----	1
<b>I.2 División nuclear</b> -----	2
<b>I.3 Cinetocoro</b> -----	4
<b>I.4 Anclaje de microtúbulos al cinetocoro</b> -----	6
<b>I.5 Septinas</b> -----	8
<b>I.6 Heterómeros de las septinas</b> -----	10
<b>I.7 Citocinesis</b> -----	12
<b>I.8 Las septinas en la citocinesis</b> -----	14
<b>I.9 Septinas como andamiaje de proteínas</b> -----	15
<b>I.10 Septinas como barreras moleculares</b> -----	16
<b>I.11 Septinas en hongos filamentosos</b> -----	18
<b>I.12 GFP y fluorocromos</b> -----	29
<b>CAPITULO II. Hipótesis, Justificación, Objetivo general y</b> -----	30
<b>Objetivos particulares</b>	
<b>II.1 Hipótesis</b> -----	30
<b>II.2 Justificación</b> -----	30
<b>II.3 Objetivo general</b> -----	31
<b>II.4 Objetivos particulares</b> -----	31
<b>CAPÍTULO III. Diseño Metodológico</b> -----	32
<b>III.1 Cepas y medios</b> -----	32
<b>III.2 Diseño de Oligonucleótidos</b> -----	34
<b>III.3 Extracción de DNA</b> -----	34

## CONTENIDO (Continuación)

III.4 Construcciones génicas -----	35
III.5 Electroforesis -----	37
III.6 Transformación-----	38
III.7 Microscopía confocal de barrido con láser-----	39
III.8 Cruzas -----	41
III.9 Caracterización de las cepas mutantes -----	43
III.10 Comprobación de la integración de <i>gen</i> por PCR-----	44
<b>CAPÍTULO IV. Resultados-----</b>	<b>45</b>
IV.1 Bioinformática-----	45
IV.2 Técnicas de biología celular y molecular-----	47
IV.3 Transformaciones de <i>N. crassa</i> -----	50
IV.4 Microscopía confocal de barrido con Láser y de contraste de fases -----	51
IV.4.1 Localización celular de CDC-3 en la zona apical de hifas maduras.-----	51
IV.5 Localización de CDC-3-GFP en Septos-----	56
IV.6 Reconstrucciones de septos en 3D-----	59
IV.7 Colocalización de CDC-3-GFP y Chs-1-mChfp en septos	60
IV.8 Análisis de CDC-3-GFP en conidios y germínulas-----	61
IV.9 Cruzas-----	66
IV.10 Septinas en anastomosis -----	72
IV.11 Las Septinas bloquean fuga de citoplasma en Septos-----	73
IV.12 Análisis de las mutantes-----	75
IV.13 Análisis de mutantes a nivel macroscópico-----	76
IV.13.1 Estadística descriptiva de ramificaciones-----	78
IV.14 Crecimiento -----	80
IV.15 Tasa de crecimiento-----	82
IV.15.1. Temperatura 30°C y 24 horas de cultivo -----	82
IV.15.1.1 Estadística descriptiva -----	82
IV.15.1.2 Prueba <i>Kruskal-Wallis</i> para medias de crecimiento-----	83
IV.15.2. Temperatura 37°C y 24 horas de cultivo -----	84
IV.15.2.1 Estadística descriptiva -----	84
IV.15.2.2 Prueba de <i>Kruskal-Wallis</i> para medias de crecimiento-----	85
IV.16 Corroboración de la integración del gen <i>cdc-3-gfp</i> en el genoma de <i>N. crassa</i> .-----	86

## CONTENIDO (Continuación)

<b>CAPITULO V. Discusión y conclusiones</b> -----	88
<b>V.1 Discusión</b> -----	88
<b>V.1.1 Septinas en el ápice</b> -----	88
<b>V.1.2 Septinas en septos</b> -----	91
<b>V.1.3 Septinas en núcleos</b> -----	93
<b>V.1.4 Septinas en la Anastomosis</b> -----	95
<b>V.1.5 Septinas emergentes bloqueando la fuga de citoplasma.--</b>	95
<b>V.2 Conclusiones</b> -----	96
<b>CAPITULO VI.</b> -----	98
<b>Bibliografía</b> -----	100
<b>Apéndices</b>	

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Estructura de la cromatina <b>A)</b> Representación molecular de los tipos de histonas y las asociaciones que estructuran para dar lugar al nucleosoma (Modificado de; Alberts <i>et al.</i> , 2002); <b>B)</b> Esquema de la organización del DNA y la formación y compactación de la cromatina hasta la formación de cromosomas (Modificado de; Alberts <i>et al.</i> , 2002).	3
2	Representación de los componentes básicos del centrómero y del cinetocoro de mamífero y el anclaje de los microtúbulos a la cinesina CENP-E (Adaptado de: Musacchio <i>et al.</i> , 2007).	5
3	Interacción entre la septina SEPT7, la proteína centromérica CENP-E y los microtúbulos. a) Septina SEPT7 marcada con la proteína GFP, b) proteína CENP-E marcada con la proteína rojafluorescente dSRFP; c) cromatina marcada con DAPI; d) y e) colocalización de SEPT7 y CENP-E en la cromatina metafásica (Zhu, 2008).	7
4	Organización y polimerización de las septinas en heterómeros en diferentes organismos: Maíferos SEPT2-SEPT6-SEPT7 en <i>Caenorhabditis elegans</i> UNC-59-UNC-61 y en <i>S. cerevisiae</i> Cdc3-Cdc10-Cdc11-Cdc12 (Weirich <i>et al.</i> , 2008).	9

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 5 | <p>Septinas marcadas y modelo del collar de septinas en en <i>S.cerevisiae</i> <b>A)</b> Septinas marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) formando un anillo durante la citocinesis en <i>S. cerevisiae</i> (escala 10µm); <b>B)</b> Modelo que representa la dinámica de las septinas en el cuello de la levadura <i>S. cerevisiae</i> en gemación; <b>a)</b> septinas marcadas con GFP a lo largo de la gemación. <b>b)</b> Anillo formado por haces de SEPT2, SEPT6 y SEPT7 <i>in vitro</i> y visualizado por microscopía electrónica (escala 100nm); <b>c)</b> Modelo de los filamentos de septina antes de la citocinesis; los filamentos se alinean a lo largo del eje de brote de la madre. Tras la citocinesis, los filamentos se someten a una rotación de 90°; <b>d)</b> Modelo que muestra ligeramente curvado el anillo de septinas antes de separarse en la citocinesis (Tomado de Philippsen Lab, Biozentrum Basel: Weirich <i>et al.</i>, 2008).</p> | 14 |
| 6 | <p>Modelo de la organización de las septinas como barrera molecular en la formación del anillo y del collar de septinas durante el proceso de citocinesis en el cuello de la gemación en la levadura (aproximado por el plano gris), mostrando la membrana plasmática (naranja), dominios G globulares de las septinas (bolas blancas), y proteínas no septinas (azul y verde) (Modificado de McMurray y Thorner, 2009).</p>  | 17 |
| 7 | <p>Septina AspB durante la ramificación y la mitosis; <b>a-c)</b> Presencia de anillo de la septina AspB en <i>A. nidulans</i> en los primeros procesos de ramificación. <b>d-f)</b> Ramificación emergiendo de hifa con anillo de la septina AspB. <b>g-i)</b> AspB se observa en forma de anillo en la base de la rama mientras los núcleos están en mitosis. <b>a-d-g)</b> contraste de fases; <b>b-c, e-f, h-i)</b> microscopía de fluorescencia. Modificado de Westfall y Momany, 2002 (escala 5µm).</p>   | 20 |

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

8	Septina AspA localizada en conidios en germinación, en ramificaciones y en septación. Los paneles muestran los diferentes procesos de morfogénesis donde participa la proteína AspA tomados en microscopia de fluorescencia. <b>A)</b> Conidios recién inoculados con puntos de fluorescencia <b>B)</b> Crecimiento de tubos germinativos con fluorescencia en las puntas <b>C)</b> Germínulas en crecimiento. <b>D)</b> Hifas maduras con fluorescencia en la punta <b>E)</b> Hifas con septos <b>F)</b> Fluorescencia en el inicio de la ramificación (Escala 5µm) en A,B,C,D,E.F.	21
9	Presencia de AgSep7 marcada con GFP en la parte subapical y en septos de hifas de <i>A. gossypii</i> (Helfer y Gladfelter, 2006) (escala 10µm).	23
10	Variedades de la distribución de las septinas ligadas a su función en la fisiología celular (Lindsey y Momany, 2006).	24
11	Árbol filogenético de las septinas de los grupos 2A y 2B en donde se encuentran Cdc3 de <i>S. cerevisiae</i> , AspB de <i>A. nidulans</i> , Sep7 de <i>Homo sapiens</i> y CDC-3 (HYP-1) de <i>N. crassa</i> . (Pan, Malmberg y Momany, 2007).	26
12	Proteínas nucleares marcadas en <i>N. crassa</i> . <b>A)</b> La histona 1 marcada con GFP en los núcleos de hifas de <i>N. crassa</i> ; <b>B)</b> Núcleos marcados con la proteína centromérica CenH3 marcada con GFP en hifas de <i>N. crassa</i> (Freitag <i>et al.</i> , 2004; Estudios preliminares realizados Sánchez-Hernández, 2009) (Barra-5µm).	28
13	Construcción génica de <i>cdc-3-orf-gly-gfp-hph</i> y <i>hph-cdc-3-utr</i> .	37
14	Imagen que muestra el “método de bloque de Agar invertido” (modificado de Hickey <i>et al.</i> , 2005 en Beltrán-Aguilar, 2006).	40

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 15 Secuencia sin intrones de *cdc-3* (*hyp-1*). En rojo se marca el codón de inicio en verde el codón de término.
- 16 Gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en el cual se muestra en los carriles 2 y 3 DNA extraído de la cepa FGSC#988 de *N. crassa*. En el carril 1 como referencia el genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*. 47
- 17 Gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en el cual se muestra; en el **carril 2** la amplificación de una región del ORF de 1,422 pb del gen *cdc-3*. En el **carril 3** se muestra la amplificación de la región UTR de 920 pb del gen *cdc-3* y en el **carril 4** se muestra la amplificación del fragmento que contiene el brazo de glicinas el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el gen de resistencia a higromicina de 2916 pb. En el **carril 1** como referencia genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*. 48
- 18 Amplificación de Fragmentos fusionados mostrados en un gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL). En el **carril 2-3** fragmento denominado brazo derecho de 1,993 pb que contiene el complemento del gen de resistencia a higromicina 1,073 pb y la región utr de *cdc-3* 920 pb (*hph-utr*). En el **carril 4-5** se muestra el fragmento denominado brazo izquierdo, el cual comprende parte del orf 1,422 pb, el brazo de glicinas 30 pb, el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) 720 pb y parte del gen de resistencia a higromicina (*hph*) 1093 pb. En el **carril 1** como referencia genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*. 49
- 19 Expresión de CDC-3-GFP en la zona apical. **A)** Micrografía de fluorescencia en la que se observan cúmulos de la proteína CDC-3-GFP al rededor de la zona del Spitzenkörper y en la membrana (flecha blanca). Se aprecia como decrece la intensidad de la señal hacia la zona sub-apical. Barra 10µm. 52

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 20      Secuencia de imágenes de una serie de tiempo donde se muestran el crecimiento de hifas maduras con la expresión variable de CDC-3-GFP. Se puede observar cómo varía la acumulación de la proteína en el ápice de la hifa durante su crecimiento y como decrece la señal de la fluorescencia en la zona subapical. Barra 10µm. Tiempo en seg. 53
- 21      Hifas maduras de la cepa de *N. crassa cdc-3-gfp* fijadas con metanol ácido acético 3:1 y los núcleos teñidos con DAPI. **A)** Hifa fijada donde se muestra que la proteína CDC-3-GFP se acumula en la punta y con mayor intensidad en la periferia de la membrana de la punta (flecha blanca). **B)** Núcleos de la hifa teñidos con DAPI (azul). **C)** Sobreposición de **A** y **B**. **D)** Magnificación de la región apical y sub-apical. Barra=10 µm y 5µm. 54
- 22      Hifas observadas con un objetivo 40x en las cuales se muestra la distribución de la septina CDC-3-GFP en septos y en puntas. **A)** Distribución de la fluorescencia en los septos, mismos que se encuentran en diferente proceso de formación en todas las hifas observadas; **B)** Acumulación de la proteína CDC-3-GFP al mismo tiempo en ápice y en septos en formación. Barra = 50µm. 55
- 23      Micrografía donde se muestra la distribución de la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP en diferentes fases de formación de los septos. **A)** Hifas teñidas con el colorante vital FM4-64 en donde se muestran las endomembranas de las vesículas que fluyen en el citoplasma y la membrana plasmática de la hifa. La flecha blanca indica la membrana en un septo ya formado y en donde la proteína CDC-3-GFP ya no está presente después de la formación del septo. **B)** Hifas donde se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP en diferentes puntos de la formación de septos la flecha amarilla indica un septo al inicio de su formación. La flecha roja indica un septo en formación. **C)** superposición de **A** y **B**. Barra = 20µm. 56

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 24 | Secuencia de imágenes donde se muestran hifas con la membrana marcada con el colorante vital FM4-64 y la proteína CDC-3-GFP en diferentes puntos de la organización del septo. Se puede observar cómo se acumula la proteína en la membrana de la hifa, para posteriormente recorrerse hacia el centro de la misma, en donde posteriormente desaparece quedando delimitada la estructura del septo en la que se aprecia establecida la membrana con el colorante FM4-64. En el panel izquierdo se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3 en el panel central se muestra la fluorescencia del colorante FM4-64 en el panel derecho el sobreposición de ambas proteínas. La participación de la proteína CDC-3 en este proceso dura aproximadamente 7 minutos. Barra 10µm Barra 5µm.   | 58 |
| 25 | Reconstrucción tridimensional de la septina CDC-3-GFP en el septo donde se muestran hifas con la membrana marcada con el colorante vital FM4-64 y la proteína CDC-3-GFP que estructura forma de disco con un poro en el centro durante la formación del septo.  | 59 |
| 26 | Secuencia de imágenes donde se muestra la formación del septo en una hifa de <i>N.crassa</i> heterocarión expresando la quitina sintetasa 1 marcada con mcherry (CHS-1-mChFP) y la septina CDC3 marcada con GFP. Se puede observar cómo se acumulan simultáneamente las proteínas en la membrana de la hifa, para posteriormente adentrarse hacia la parte central de la hifa, en donde posteriormente desaparece la septina y permanece la quitina. La participación de la proteína CDC-3-GFP en este proceso dura aproximadamente un promedio de 8 a 10 minutos. De nuevo eso son segundos en la imagen En la columna izquierda se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP; en el panel central se muestra la fluorescencia de la proteína CHS-1-mChFP; en el panel derecho el sobreposición de ambas proteínas. Tiempo aproximado 11 minutos. Barra 5µm. | 60 |

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 27 Conidios de la cepa CDC-3 después de 3 horas de inoculación y como control la cepa FGSC9718. **A)** Se muestran puntos de la septina CDC-3-GFP en el centro del conidio (flecha blanca). **B)** Contraste de fases. **C)** Conidios de la cepa 9718. **D)** Contraste de fases. Barras 2 $\mu$ m. 62
- 28 Conidios de la cepa *cdc-3-gfp* después de 3 hrs. de inoculación fijados con metanol y ácido acético (3:1) y los núcleos teñidos con DAPI. **A)** Conidios con la septina CDC-3-GFP en medio de dos núcleos (flecha roja). **B)** Cúmulos circulares de CDC-3-GFP posicionados sobre núcleos (flecha blanca). **C)** Contraste de fases donde se aprecian los núcleos. **D)** Núcleos teñidos con DAPI. **E)** sobreposición de **A** y **B** donde se puede observar la colocalización de puntos fluorescentes de *cdc-3-GFP* sobre núcleos teñidos con DAPI. Barra 2  $\mu$ m en A y 5 $\mu$ m en B. 63
- 29 Micrografía confocal de barrido en donde se muestran germínulas de la cepa *cdc-3-gfp* después de 4 hrs. de inoculación. **A)** Cúmulos de fluorescencia intensa en la zona intermedia de la germínula (flecha blanca). **B)** Contraste de fases de germínula con cúmulo de septinas en medio del tubo germinativo (flecha roja). Barra 5 $\mu$ m. 64
- 30 Germínulas de la cepa *cdc-3-gfp* después de 4 hrs. de inoculación y teñidas con el colorante FM4-64. **A)** Conidios con la membrana celular y membranas vacuolares teñidas con FM4-64. **B)** En esta micrografía se observan puntos de fluorescencia junto a estructuras que podrían ser núcleos. **C)** Vista en contraste de fases. **D)** Sobreposición de **A** y **B** donde se puede contrastar la localización de membranas y puntos fluorescentes de CDC-3-GFP. Barra 5 $\mu$ m. 65

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 31 Micrografía en la que se observa el ápice de una germínula de la cepa con la histona 1 marcada con la proteína roja fluorescente (H1-RFP) y la septina CDC-3-GFP. **A)** Núcleos con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en la periferia de la membrana apical con una acumulación mayor en la zona central de la punta (flecha amarilla). También se observa un cúmulo de fluorescencia junto al núcleo (flecha blanca). **C)** Vista en contraste de fases donde se aprecian los núcleos, en uno de ellos se observa una estructura circular adyacente que concuerda con la fluorescencia de la septina CDC-3-GFP (flecha roja). **D)** sobreposición de **A, B y C**. Barra 2 $\mu$ m. 66
- 32 Micrografía en la que se observa una germínula con H1-RFP y la septina CDC-3-GFP después de 4 horas de crecimiento. **A)** se observan la cromatina con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Se observa la acumulación de la septina CDC-3-GFP en la periferia de la membrana apical con una acumulación mayor en la zona correspondiente a la zona central de la membrana en la punta También se observan cúmulos de fluorescencia junto a la cromatina (flecha blanca). **C)** Vista en contraste de fases. **D)** sobreposición de **A, B y C**. Barra 5 $\mu$ m. 67
- 33 Micrografía en la que se observa lo que aparentemente es una proyección de cromatina hacia el ápice (flecha amarilla). **A)** Cromatina con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en la periferia de la membrana apical, también se observa fluorescencia de esta proteína colocalizando con la proyección de cromatina. Aunado a ello se observan dos puntos de fluorescencia en diferentes zonas del núcleo (Flechas blancas). **C)** Vista en contraste de fases. **D)** Sobreposición de **A, B y C**. Barra 5 $\mu$ m. 68

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 34 Acumulaciones de la septina CDC-3-GFP junto con la cromatina. **A)** Cromatina marcada en rojo por la histona H1. **B)** Proteína CDC-3-GFP dispersándose en el citoplasma. **C)** Vista en contraste de fases donde también se aprecian cúmulos de septinas. **D)** Sobreposición de **A**, **B** y **C** en el que se puede ver la colocación de la septina sobre fragmentos de cromatina (flecha blanca). **E)** Hebras de cromatina entre los núcleos en división y cúmulos de septina sobre ellos (flechas blancas). Barra 10 $\mu$ m y 5 $\mu$ m. 70
- 35 Estructuras circulares de la septina CDC-3-GFP en núcleos **A)** Núcleos marcados en rojo por la histona H1. **B)** acumulación circular de la proteína CDC-3-GFP. **C)** Vista en contraste de fases en donde se observan cúmulos isométricos junto a los núcleos fases. **B)** Sobrelape de contraste de fases y la fluorescencia en donde se pueden ver cúmulos de la proteína CDC-3-GFP junto a los núcleos (flechas blancas). Barra 5 $\mu$ m. 72
- 36 Cúmulos de la septina CDC-3-GFP junto a un núcleo en división, también se pueden observar un núcleo en división con cúmulo adyacente de la proteína CDC-3-GFP (flechas blancas). Barra 5 $\mu$ m. 73
- 37 Hifas en proceso de anastomosis, durante el cual se forma un anillo de septinas. A-B) Anillo de septinas CDC-3-GFP (flecha blanca). Barra 10 $\mu$ m. 74

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 38 Micrografías donde se muestran hifas con trauma y pérdida de material citoplasmático y a la septina en el lugar donde se detiene el flujo del citoplasma en el septo más cercano a la fuga. **A)** Hifa con pérdida de material citoplasmático en la punta; **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en el poro del septo (flecha blanca) para evitar la fuga de citoplasma. **B)** Contraste de fases el septo de la hifa atrofiada. **C)** Sobreposición de **B** y **C**, donde se ve la septina en el centro del poro bloqueando la salida de citoplasma. Barra, 10  $\mu$ m A y 5  $\mu$ m en B y C. 75
- 39 Comprobación de las cepas mutantes. Se muestran los geles en donde se comprueban la ausencia del gen de la septina en las mutantes. En ambos geles se muestra: el genoma del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (**carril 1**). Amplificación del gen *cdc-3* usando como templado ADN de la cepa silvestre (**carril 2**). Amplificación del gen *cdc-3* usando como templado ADN de las cepas mutantes (**carriles 3-6**). En el gel inferior se utilizó la amplificación de un gen testigo (miosina 2) para corroborar la presencia de DNA (**carriles 2-5**). 76
- 40 Análisis macroscópico y microscópico de la mutante  $\Delta cdc-3$  en condiciones de estrés a 37°C. Se muestra la morfología y el crecimiento colonial, el nivel de ramificación y la morfología característica de las hifas de cada una de las cepas. **A)** Cepa FGSC# 988 muestra un crecimiento normal, una ramificación normal y una morfología hifode de la célula. **B)** Cepa FGSC# 9718: se observa un crecimiento similar al de la cepa silvestre, sin ramificaciones excesivas y una forma hifode de la célula. **C)** Cepa *cdc-3-gfp*: se puede observar que el crecimiento de la colonia y la ramificación es similar al de la cepa FGSC# 9718 y la silvestre, la forma de la célula es hifode. **D)** La mutante FGSC# 11972 presenta un crecimiento de la colonia menor; el aspecto de la colonia es algodonoso y se observan capas en el micelio; la ramificación es mayor y algunas hifas tenían un menor diámetro y eran onduladas. 77

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 41 Gráfica que describe los promedios de ramificación de 3 muestras independientes de cada una de las cepas de *N. crassa*: mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, control FGSC# 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 30°C. Podemos observar que los promedios de ramificaciones la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  es mayor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988. 78
- 42 Gráficas de ramificación. Se muestran las gráfica resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta la ramificación de la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC#9718 y silvestre FGSC# 988 a 30°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que hay diferencias significativas entre las medias de ramificación de las diferentes cepas con una  $p < .0250$ , La cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  con respecto a la cepa control FGSC# 988 con una  $p < 0.027868$ . 79
- 43 Comparación de crecimiento del diámetro colonial a 30°C de las cepas silvestre FGSC# 988, FGSC# 9718, *cdc-3-gfp* y mutante FGSC# 11972  $\Delta cdc-3$ . A) Cepa silvestre FGSC# 988 en donde se observa un crecimiento normal. B) Cepa FGSC# 9718 en donde se realizó la transformación. C) *cdc-3-gfp* observamos que el crecimiento de la cepa es similar al de la cepa wt. D)  $\Delta cdc-3$  en esta cepa el crecimiento es menor con respecto a todas las demás. 80
- 44 Comparación de crecimiento colonial a 37°C de la cepa silvestre FGSC3# 988, FGSC# 9718, la cepa *cdc-3-gfp* y la cepa mutante FGSC# 11972  $\Delta cdc-3$ . **A)** Colonia de la cepa *silvestre* en donde se observa un crecimiento normal pero menor que a 30°C. **B)** Colonia de la cepa FGSC# 9718. **C)** Colonia de la cepa *cdc-3-gfp* observamos similitud con el crecimiento de la cepa silvestre. **D)** Colonia de la cepa mutante FGSC# 11972  $\Delta cdc-3$ . 81

- 45 Gráfica que describe los promedios del diámetro de crecimiento de tres muestras independientes de cada una de las cepas. de *N. crassa*: Mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, Control 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 30°C. Podemos observar que los promedios de crecimiento de la cepa Mutante  $\Delta cdc-3$  es menor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988. 82
- 46 Gráficas del diámetro de crecimiento. Se muestran las gráficas resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta el diámetro crecimiento de la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988 a 30°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que a 30°C hay diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las diferentes cepas con una  $p < 0.0241$ , la cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  con respecto a la cepa control FGSC# 9718 con una  $p < 0.046766$ . 83
- 47 Gráfica que describe los promedios de crecimiento de tres muestras independientes de cada una de las cepas. de *N. crassa*: Mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, Control 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 37°C. Podemos observar que los promedios de crecimiento de la cepa Mutante  $\Delta cdc-3$  es menor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988. 84

- 48 Gráficas del diámetro de crecimiento. Se muestran las gráficas resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta el diámetro de crecimiento de la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988 a 37°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que a 37°C hay diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las diferentes cepas con una  $p < 0.0378$ , la cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  con respecto a la cepa control FGSC# 9718 con una  $p < 0.02786$ . 85
- 49 Amplificación de Fragmentos fusionados usando como templado ADN genómico de la cepa transformante *Nccdc-3-gfp* y como control negativo ADN genómico de la cepa silvestre. En el **Carril 2** se muestra la amplificación del fragmento denominado brazo izquierdo de 3,265 pb. **Carril 3** control negativo. **Carril 4** amplificación del constructo denominado brazo derecho de 1,993 pb. **Carril 5** Control negativo. **Carril 6** fragmento de 2,916 pb que contiene el brazo de glicinas, el gen para la proteína verde fluorescente y el gen de resistencia a higromicina. **Carril 7** control negativo. En el **Carril 1** como referencia el genoma del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*. 87

Tabla		Página
I	Clasificaciones de las septinas a través de los diferentes grupos de organismos (Weirich <i>et al.</i> , 2008)	11
II	Genes homólogos de las septinas entre mamíferos, <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>N. crassa</i> (Pan, Malmberg y Momany, 2007).	25
III	Genotipo de las cepas utilizadas	32
IV	Cruzas realizadas y objetivo correspondiente	42
V	Mutantes de <i>cdc-3</i> de <i>Neurospora crassa</i>	44
VI	Oligonucleótidos utilizados	46
VI	Mutantes de la septina <i>cdc-3</i> utilizadas en este estudio	75

## Capítulo I

---

### INTRODUCCIÓN

---

#### I.1 Morfogénesis

La morfogénesis celular fúngica es el resultado de un programa genético coordinado con el ciclo celular y señales extracelulares que depende de otros procesos tales como el transporte intracelular, la organización del citoesqueleto y la biosíntesis de la pared celular. Todos estos procesos deben estar espacial y temporalmente regulados por proteínas que actúan directamente en la progresión de las etapas del ciclo celular, tales como las ciclinas y las proteínas del citoesqueleto.

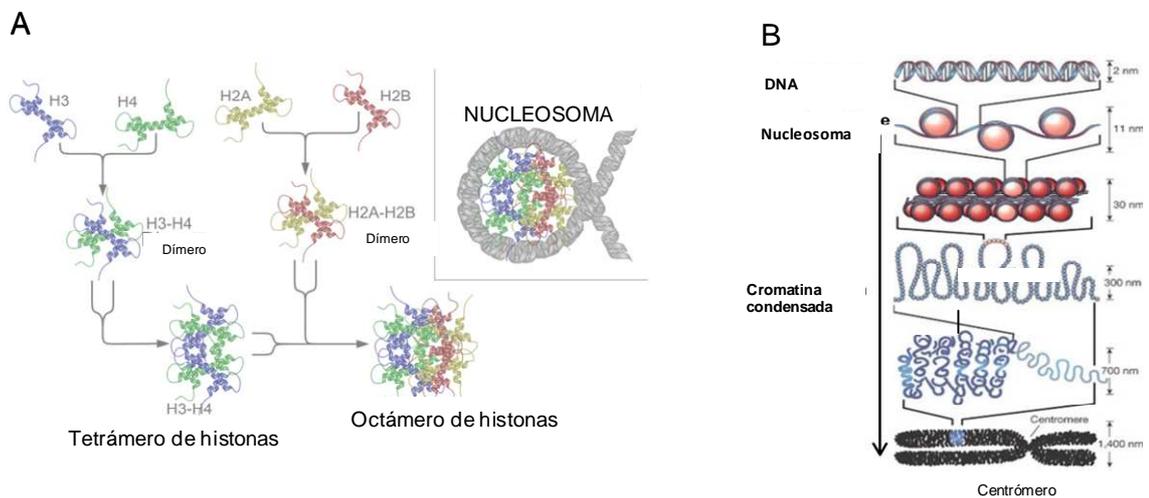
En el ciclo celular, se presentan diferentes etapas durante las cuales la célula se transforma morfológicamente de acuerdo a las necesidades de cada etapa del ciclo. El estado  $G_1$  (del inglés *Growth* o *Gap 1*) es la primera fase del ciclo celular en la que existe crecimiento, síntesis de proteínas y de RNA. La fase S (del inglés *Synthesis*) representa la síntesis o duplicación del DNA, el estado  $G_2$  (del inglés *Growth* o *Gap 2*) da lugar a una segunda etapa de crecimiento celular en la que continúa la síntesis de proteínas y RNA con el fin de compilar los recursos orgánicos necesarios para la división de la célula. El estado M, representa la mitosis, en la cual se compacta y organiza el DNA que posteriormente se reparte entre la célula progenitora y la progenie. En esta etapa también se lleva a cabo la citocinesis, proceso en el cual se lleva a cabo la división del citoplasma y de la membrana plasmática que darán lugar a dos células independientes (Lodish *et al.*, 2008).

## I.2 División nuclear

Durante la etapa de mitosis la membrana nuclear se desensambla y los microtúbulos invaden el espacio nuclear a este proceso se le denomina mitosis abierta. En la mayoría de los hongos filamentosos, como *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, se presenta una variación denominada mitosis cerrada, en la que el huso mitótico se forma dentro o en la periferia del núcleo y los microtúbulos penetran a través de la membrana nuclear por medio de la apertura de poros nucleares y la membrana nuclear mantiene su estructura durante todo el ciclo celular (Aist y Morris, 1999). Tanto en la mitosis abierta como en la cerrada se presenta una interacción directa entre los componentes del citoesqueleto y el material genético (Harris, 2006). En los hongos filamentosos multinucleados, se puede encontrar una sincronía entre los eventos mitóticos ligados a procesos morfogénicos tales como las ramificaciones. Esta sincronía se ha localizado en *A. nidulans*, *Alternaria solani*, y *Fusarium oxysporum* (Clutterbuck 1970; Fiddy y Trinci, 1976; Gladfelter, 2006). En contraste, hongos como *N. crassa* y *Ashbya gossypii* (Serna y Stadler, 1978; Gladfelter *et al* 2006) no presentan mitosis sincronizadas entre sus núcleos, pero aún no se sabe si hay o no relación entre los procesos de mitosis y morfogénesis.

Durante la fase de mitosis el material genético, se ensambla y se compacta en cromosomas que están conformados por dos cromatidas unidas por una región denominada centrómero (Lodish *et al.*, 2008). Los cromosomas eucarióticos son el resultado de un estado máximo de compactación de la cromatina la cual esta constituida por DNA y una gran cantidad de proteínas llamadas histonas y no histonas, así como de otras moléculas asociadas (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2002). Las histonas son proteínas altamente conservadas entre los eucariontes, de las cuales se han caracterizado varios tipos denominadas como H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Lodish *et al.*, 2008). En particular, la cromatina centromérica se caracteriza por la presencia de una isoforma específica de la histona H3, denominada CENP-

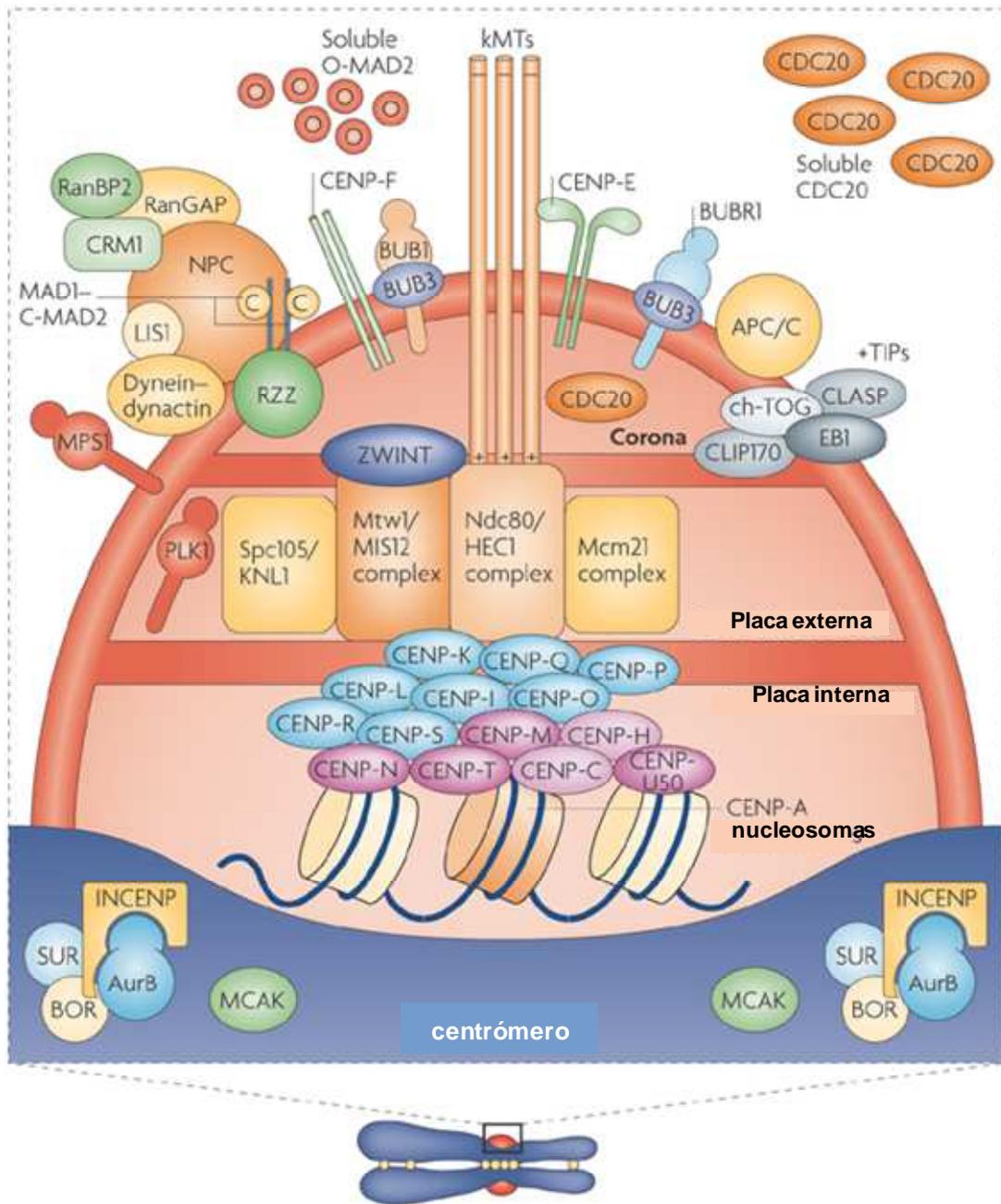
A en vertebrados y CenH3 en hongos (Baker y Rogers, 2006). Esta histona muestra un 57% de homología en el carboxilo terminal con la histona H3. La diferencia que caracteriza estas variantes es un giro en un dominio llamado HFD que se encuentra cerca del carboxilo terminal (Malik y Henikoff, 2003). Esta variante es parte fundamental de la estructura del centrómero y sirve de base para el ensamblaje del cinetocoro (Jeanteur, 2005).



**Figura 1.** Estructura de la cromatina. **A)** Representación molecular de los tipos de histonas y las asociaciones que estructuran para dar lugar al nucleosoma (Modificado de Alberts *et al.*, 2002); **B)** Esquema de la organización del DNA y la formación y compactación de la cromatina hasta la formación de cromosomas (Modificado de Alberts *et al.*, 2002).

### I.3 Cinetocoro

El cinetocoro es una estructura multiproteica que sirve como estructura de unión para las interacciones de los componentes del citoesqueleto y el material genético. Las funciones del cinetocoro incluyen el anclaje de los cromosomas a los microtúbulos (MTs) del huso mitótico, la verificación del anclaje correcto, la activación del punto de monitoreo de mitosis (un mecanismo de control de calidad que retrasa la salida de mitosis si se detectan errores en los anclajes de los microtúbulos) y la generación de fuerzas que impulsan los movimientos cromosómicos durante la división celular (Musacchio *et al.*, 2007; Cheeseman, 2004). La capa más profunda del cinetocoro es la placa interna, que se organiza sobre una estructura de cromatina que contiene nucleosomas. Esta estructura presenta una histona especializada, llamada CENP-A en mamíferos y CenH3 en hongos, que sustituye a la histona H3 en el centrómero también se encuentran los componentes constitutivos de la estructura basal, tales como las proteínas CENP-C, CENP-N y CENP-T y CENP-USO (Figura 2) que están unidos a la cromatina (Musacchio *et al.*, 2007). La placa externa esta compuesta sobre todo por proteínas de anclaje a microtúbulos que se unen al cinetocoro denominados kMTs, (por *kinetochore microtubules*) en estos sitios se anclan los extremos de los microtúbulos con un anillo de  $\beta$ -tubulina denominado extremo (+). Un extremo de la tubulina está compuesto por un anillo de  $\alpha$ -tubulina denominado extremo (-) y el opuesto, por un anillo de  $\beta$ -tubulina denominado extremo (+), en el cual la tubulina polimeriza por adición de dímeros en uno de los extremos del microtúbulo (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2008). Las proteínas que sirven de anclaje a microtúbulos incluyen a las cinesinas, que han sido denominados como motores moleculares debido a que tienen la capacidad de transformar energía química en trabajo o movimiento. Las cinesinas están compuestas de dos dominios denominados cabeza de forma globular, un tallo central y un par de dominios cola, también globulares pero más pequeños.

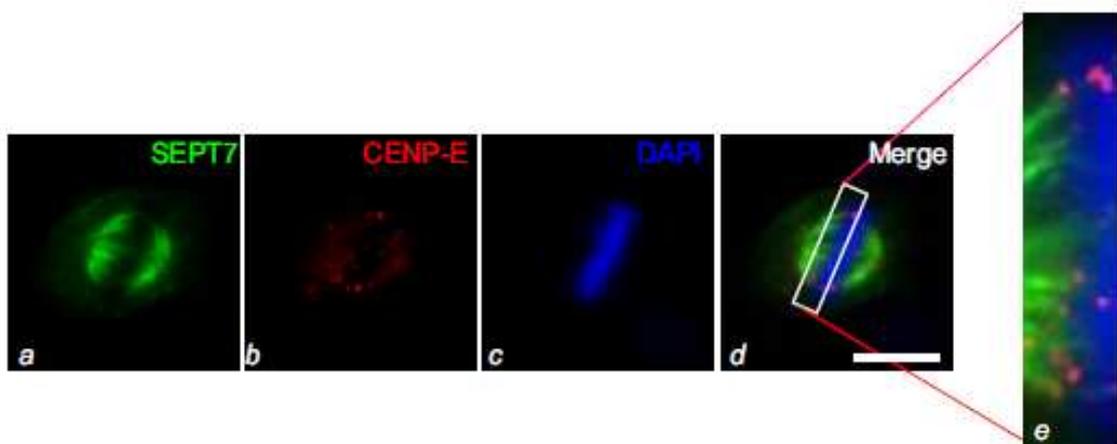


**Figura 2.** Representación de los componentes básicos del centrómero y del cinetocoro de mamífero y el anclaje de los microtúbulos a la cinesina CENP-E (Adaptado de Musacchio *et al.*, 2007).

#### I.4 Anclaje de microtúbulos al cinetocoro

En mamíferos la cinesina CENP-E (Del inglés Centromere Protein E) participa en el anclaje y movimiento de los microtúbulos mediante el amino terminal y un dominio del carboxilo terminal. CENP-E se concentra en el cinetocoro al final de la fase G2 del ciclo celular y participa en los movimientos de los cromosomas de la prometáfase hasta la anafase de la mitosis (Musacchio *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 1997). En hongos ascomicetos se han caracterizado cinesinas homólogas a CENP-E como *Kin7a* o *Kin1*, las cuales también actúan como motores moleculares anclando y moviendo microtúbulos en las zonas de crecimiento; En particular, se ha caracterizado la actividad de las cinesinas Kin de *N. crassa*, y se ha mostrado actividad cinética al ser expuestas a los nucleótidos ADP o ATP y a microtúbulos en comparación con otras cinesinas de mamíferos (Steinberg *et al.*, 1996 ; Schuchardt *et al.*, 2005; Schoch *et al.*, 2003). También estudios recientes muestran la participación de una red de proteínas que tienen un sitio de unión a GTP llamadas septinas, que son importantes para el funcionamiento y localización de CENP-E y otros efectores que coordinan la alineación de los cromosomas, su posterior segregación y la citocinesis (Spiliotis *et al.*, 2005). En otros estudios análisis bioquímicos en mamíferos muestran que la septina que interactúa directamente con CENP-E es la septina denominada SEP7 por medio de su región hélice súper enrollada (*traducido del inglés: coiled-coil*) localizada cerca de su carboxilo terminal (Zhu, 2008). Esta interacción SEP7-CENP-E es crítica para establecer la localización espacial y temporal de CENP-E en el cinetocoro y permite el correcto anclaje y movimiento de los microtúbulos durante la mitosis (Figura 3). Este proceso fue corroborado por Zhu en 2008 por medio de la anulación de la expresión de la *sep7*, mediante el empleo de RNA de interferencia durante los procesos mitóticos, en células MDCK I (*por sus siglas en inglés:Marbin-Darbi canine kidney*). Encontraron alteraciones en la localización de CENP-E, lo cual derivó en errores en la segregación de los cromosomas. En ese estudio, también se observó una coparticipación de otras septinas *sep2* y *sep6*

con *sep7* que en conjunto forman un heterómero que ayuda a la estabilidad cromosómica durante las diferentes fases de la mitosis (Zhu, 2008). Otros organismos en los que se ha observado una relación entre las septinas y la regulación de la mitosis son las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*, en las que se han localizado septinas en la placa metafásica, influyendo en su orientación durante la anafase tardía (Castillon *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha observado que células de levadura con algunas septinas mutadas, muestran defectos en la división celular, alteraciones en la organización de la polaridad y crecimiento de la punta de la gemación, alteraciones en los puntos de monitoreo del ciclo celular y en la división de los núcleos celulares (Schaar *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 2004; Zhu, 2008; Gladfelter *et al.*, 2005).



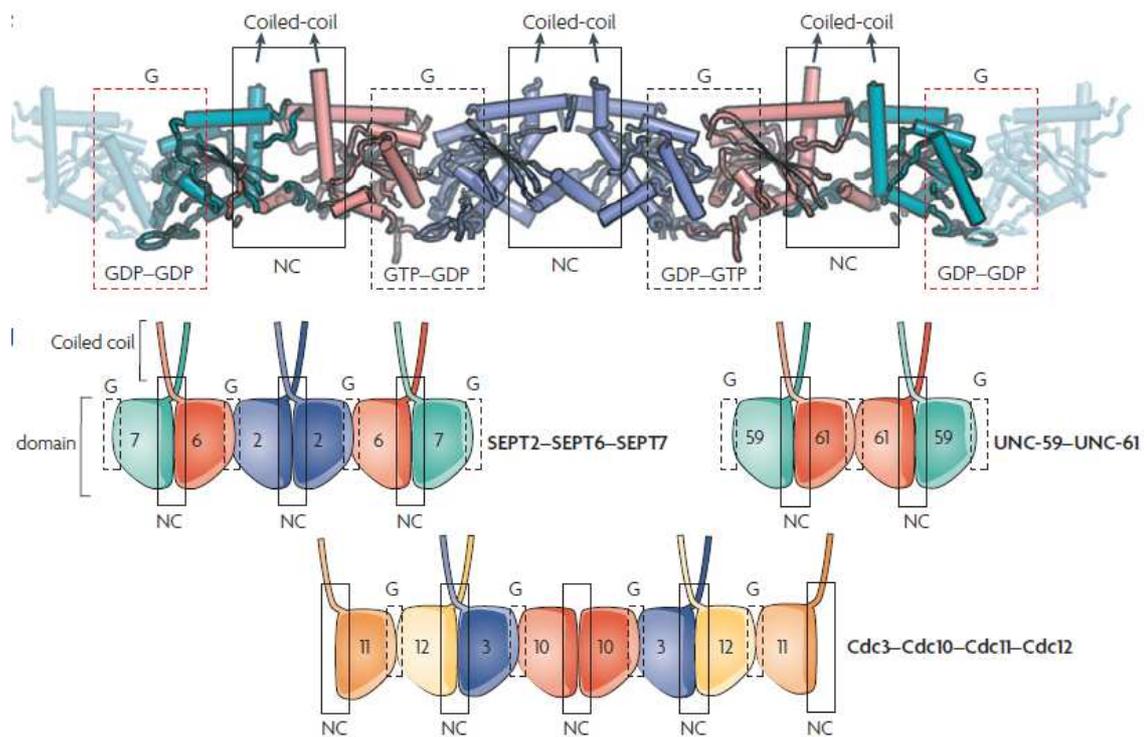
**Figura 3.** Interacción entre la septina SEPT7, la proteína centromérica CENP-E y los microtúbulos. a) Septina SEPT7 marcada con la proteína GFP, b) proteína CENP-E marcada con la proteína rojafluorescente dSRFP; c) cromatina marcada con DAPI; d) y e) colocalización de SEPT7 y CENP-E en la cromatina metafásica (Zhu, 2008).

## I.5 Septinas

Las septinas fueron descritas por primera vez en la levadura *S. cerevisiae* durante la organización del anillo contráctil en la citocinesis, en la gemación. El análisis de las mutantes de estas proteínas mostró alteraciones tanto en los procesos morfogénicos durante la gemación, así como en los procesos de polaridad en la mitosis y alteraciones del ciclo celular (Hartwell, *et al.*, 1971). Se han identificado septinas ubicuamente tanto en hongos y animales pero se encuentran ausentes en plantas y bacterias. El número de septinas que puede tener un grupo de organismos puede variar, pueden ser dos como en *Caenorhabditis elegans* hasta doce en mamíferos (Lindsey y Momany, 2006). La caracterización de las septinas en las levaduras y mamíferos ha mostrado que su estructura puede funcionar como un andamiaje que permite posicionar y organizar los sitios de división nuclear, aunque también pueden estar actuando de manera independiente en diferentes procesos celulares (Gladfelter, 2006). Los análisis de microscopía electrónica y cristalografía tanto en *S. cerevisiae* como en mamíferos, revelan que estas proteínas forman estructuras filamentosas que se entrelazan formando una especie de red proteica que puede ser dinámica a través del ciclo celular (Figura 4) (Weirich *et al.*, 2008).

En la estructura molecular de las septinas se encuentran sitios de unión a guanósín trifosfato (GTP) que son importantes para la unión entre septinas. Estas proteínas también tienen tres motivos altamente conservados llamados G1, G3 y G4. Una posible función de estos dominios es la participación en la unión y estabilidad de la hidrólisis de GTP, pero las funciones específicas de estos motivos aún no están del todo claras. El dominio GTPasa que se encuentra en el amino terminal contiene una región polibásica que se puede unir a fosfoinosítoles lo que posibilita la interacción con la membrana (Fangfang y Momany, 2007). Los dominios GTPasa ubicados en el carboxilo terminal son altamente conservados entre las septinas en diversos grupos de organismos. Algunas septinas contienen una extensión del carboxilo terminal que tiene una región con forma de hélice

súper enrollada (*traducido del inglés: coiled-coil*) que propicia estabilidad entre la interacción de algunas septinas (Fangfang y Momany, 2007; Cao *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Organización y polimerización de las septinas en heterómeros en diferentes organismos: Mamíferos SEPT2-SEPT6-SEPT7, en *Caenorhabditis elegans* UNC-59-UNC-61 y en *S. cerevisiae* Cdc3-Cdc10-Cdc11-Cdc12 (Weirich *et al.*, 2008).

## I.6 Heterómeros de las septinas

Análisis bioquímicos indican que algunas variantes de las septinas se polimerizan formando heterómeros que se estructuran en microfilamentos (Gladfelter, 2006a). En mamíferos, se ha encontrado que la serie de septinas SEP2-SEP6-SEP7 forman heterómeros, que participan en procesos morfogénicos. Algunos homólogos de estas proteínas se han encontrado asociándose también en *S. cerevisiae* Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p y Cdc12p y en *C. elegans* UNC59-UNC61-UNC61-UNC59 formando filamentos alineados no polares con solo dos dímeros de proteínas. En otros grupos de organismos (Tabla I) se ha documentado la formación de heterómeros con algunas variantes específicas de cada especie (Weirich *et al.*, 2008 ; Corinne *et al.*, 2007).

Por su parte Field y Kellogg (1999), Farkasovsky (2005) y Bertin (2008) empiezan a dilucidar los procesos bioquímicos fundamentales para la dimerización entre variantes de las septinas en *S. cerevisiae*, en *C. elegans* y en *Ashbya gossypii*, respectivamente. Se describió que las estructuras tipo  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  localizadas en los dominios de unión a GTP son la base de la unión entre las septinas. La interacción de estos dominios propicia la hidrólisis de GTP, que a su vez promueve un cambio conformacional que complementa la unión. La interfaz de la dimerización se estabiliza por las regiones amino y carboxilo terminal. Estos autores proponen que las extensiones del carboxilo terminal le confieren flexibilidad a la dimerización pero que no son determinantes para que esta se lleve a cabo (Weirich *et al.*, 2008). Por otro lado se ha observado que la guanosina trifosfatasa (*GTPase*, por sus siglas en inglés: *guanosine triphosphatase*) Cdc42p (por sus siglas en inglés: *cell división cycle 42 protein*), una proteína de la superfamilia de las ras GTPasas, es la responsable de orquestar múltiples procesos durante el ciclo celular, incluyendo la polimerización del anillo de septinas. Las mutantes de *cdc42* muestran defectos específicos en la organización de septinas, lo cual sugiere el

papel de *cdc42* en el ensamblaje de las septinas (Smith *et al.*, 2002; Caviston *et al.*, 2003; Gladfelter *et al.*, 2007).

Los modelos actuales que explican la función de *cdc42* se basan en los conocimientos establecidos para otras proteínas de la familia ras que actúan como un interruptor en los transductores de señales, hidrolizando GTP a GDP. Se piensa que de una manera similar Cdc42 puede participar y proveer de estos nucleótidos necesarios para la polimerización de las septinas (Smith *et al.*, 2002). A su vez Cdc42 promueve la activación de proteínas GAP efectoras como Bem3p, Rga1p, and Rga2p que reclutan a las septinas y promueven la unión e intercambio de GTP y GDP entre las septinas (Smith *et al.*, 2002; Caviston *et al.*, 2003).

**Tabla I.** Clasificaciones de las septinas en diferentes grupos de organismos (Modificado de Weirich *et al.*, 2008).

Organismo	Grupo1 A	Grupo1B	Grupo2 A	Grupo2 B	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc10		Cdc3		Cdc11 Shs1 Spr28	Cdc12 Spr3	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spn2		Spn1		Spn3 Spn5 Spn7	Spn4 Spn6	
<i>Candida albicans</i>	Cdc10		Cdc3		Cdc11 Sep7 Spr28	Cdc12 Spr3	
<i>Ashbya gossypii</i>	Agcdc10		Agcdc3		Agcdc11	Agcdc12	AgSep7
<i>Aspergillus nidulans</i>	AspD		AspB		AspA	aspC	AspE
<i>Neurospora crassa</i>	cdc10		cdc3		cdc11	cdc12	cdc5
<i>Caenorhabditis elegans</i>		UNC-61		UNC-59			
<i>Drosophila melanogaster</i>		SEP2, SEP5		Pnut, SEP1, SEP4			
<i>Xenopus leavis</i>	HYP1			SEP2			
Mamíferos	SEP3, SEP9 SEP12	SEp6 SEP8 SEP10 SEP11 SEP14		SEP1 SEP2 SEP4 SEP5 SEP7 SEP13			

Los heterómeros de las septinas, se han localizado participando en la modulación de cambios en componentes del citoesqueleto tales como la actina y microtúbulos, con los cuales participan en la formación de anillos multiproteínicos, así como en interacción con sitios específicos de la membrana plasmática. Algunos ejemplos de la formación de anillos de septinas se pueden encontrar en células de diferentes organismos como mamíferos, levaduras y hongos filamentosos, sobre todo durante la citocinesis en donde se ha observado una interacción de la actina y los microtúbulos en la formación de los anillos de septinas pero no en la remodelación y crecimiento de estos anillos (DeMay *et al.*, 2009).

## **I.7 Citocinesis**

La citocinesis ocurre inmediatamente después de la mitosis. Procede a través de la sucesión ordenada de varias etapas: elección del plano de división, ensamblaje de la maquinaria de división, invaginación de la membrana plasmática y separación celular.

En las hifas de los Basidiomicetos, Ascomicetos y hongos mitospóricos la citocinesis presenta algunas variaciones y se le denomina como septación. Durante la septación las células no se separan en su totalidad y forman un poro que las comunica a través de paredes transversales llamadas septos. Algunos septos forman una placa continua, otros dejan uno o varios poros. Cada poro establece una conexión entre células adyacentes que pueden permitir el paso de orgánulos y material citoplasmático (Howard y Gow, 2007). Los hongos Ascomicetos exhiben normalmente un septo simple con un poro que presenta cuerpos de Woronin (compuesto de proteínas de estructura isomorfa). Los Basidiomicetos también tienen septos con un poro, pero normalmente el poro exhibe una prolongación en forma de frijol, que se denomina "doliporo" y

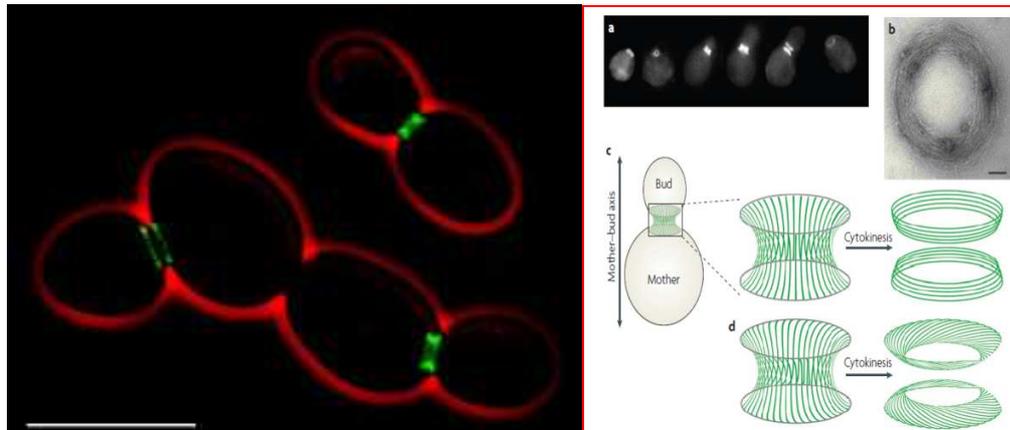
generalmente a ambos lados de este, se observa una especie de capuchón, denominado parentesoma (Howard y Gow, 2007).

En *N. crassa* en general los septos tienen una forma anular y se forman aproximadamente cada 55  $\mu\text{m}$ , a partir de 100 a 180  $\mu\text{m}$  de las puntas en crecimiento (Hunsley y Gooday, 1974). Los poros de los septos generalmente miden de 350 nm a 500 nm (Hunsley y Gooday, 1974). Los septos en *N. crassa* presentan cuerpos de Woronin, los cuales bloquean el poro para evitar la pérdida de citoplasma en caso de que la hifa presente una lesión (Trinci y Collinge, 1973). La formación del septo requiere inserción de membrana, formación de nueva pared celular y la constricción de un anillo de actinmiosina (Jochová *et al.*, 1999).

En células animales, protozoos y hongos el componente fundamental de la maquinaria de la citocinesis es un anillo contráctil, formado por actina y miosina. Tanto en mamíferos como en hongos las septinas son fundamentales para el ensamblaje del anillo contráctil de actinmiosina que genera la constricción de la membrana celular. Sin embargo el nivel de interacción que se presenta entre las septinas, la actina y la miosina aún no es clara y no existen evidencias contundentes que indican una interacción bioquímica directa entre estas proteínas. Kinoshita *et al.*, (2002) analizaron en células de *Drosophila melanogaster* una proteína llamada anilin que puede ser la proteína de unión entre las septinas y el anillo de actinmiosina. En estudios recientes se ha demostrado que la anilina se une a numerosos componentes del citoesqueleto durante la citocinesis tales como la F-actina, miosina II y septinas e incluso interactúa con la membrana plasmática, pero las funciones moleculares de la anilina aún no son del todo claras (Hickson *et al.*, 2008). Se ha observado que el ensamblaje de las septinas es regulado en principio por una interacción con la anilina antes de la aparición del anillo de actinmiosina. También se ha observado un papel fundamental de la anilina en el reclutamiento y organización de los parches de F-actina y de la miosina tipo 2 en el anillo de las septinas (Hickson *et al.*, 2008).

## I.8 Las septinas en la citocinesis

La formación del anillo de septinas durante la citocinesis, a parte de tener un papel en la formación del anillo contráctil de actinmiosina también se piensa que se encuentran implicadas en la regulación espacial de la citocinesis mediante interacciones con la membrana, delimitando sitios de anclaje de otras proteínas o sitios específicos de exocitosis (Joo *et al.*, 2005). Estas implicaciones se han analizado en *S. cerevisiae* donde el anillo de septinas (Figura 5) parece delimitar el sitio de la futura gemación. Las septinas se comienzan a ensamblar desde la fase G1 del ciclo celular, mucho antes que los demás componentes que participarán en la citocinesis y permanecen entre la célula progenitora y progenie durante la mayor parte del ciclo celular hasta su división (Cid *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Septinas marcadas y modelo del collar de septinas en en *S.cerevisiae*  
**A)** Septinas marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) formando un anillo durante la citocinesis en *S. cerevisiae* (escala 10 $\mu$ m); **B)** Modelo que representa la dinámica de las septinas en el cuello de la levadura *S. cerevisiae* en gemación; **a)** septinas marcadas con GFP a lo largo de la gemación. **b)** Anillo formado por haces de SEPT2, SEPT6 y SEPT7 *in vitro* y visualizado por microscopia electrónica (escala 100nm); **c)** Modelo de los filamentos de septina antes de la citocinesis; los filamentos se alinean a lo largo del eje de brote de la madre. Tras la citocinesis, los filamentos se someten a una rotación de 90°; **d)** Modelo que

muestra ligeramente curvado el anillo de septinas antes de separarse en la citocinesis (Tomado de Philippsen Lab, Biozentrum Basel: Weirich *et al.*, 2008).

Sin embargo, el anclaje de las septinas en la región particular de la membrana durante la citocinesis aún no ha sido del todo dilucidado. Se ha propuesto que la interacción con dominios ricos en fosfoinositol ubicados en la capa lipídica de la membrana le permita a las septinas anclarse por medio de los dominios polibásicos que se encuentran en el amino terminal (Zhang *et al.*, 1999; Takiguch *et al.*, 2009; Fangfang *et al.*, 2007). Un ejemplo de esta interacción se observó durante el crecimiento del hongo diploide *Candida albicans*, en el que se observó una colocación de las septinas marcadas con GFP y dominios ricos en ergosteroles y en fosfoinositol marcados en la membrana con un colorante lipofílico específico. Esta colocación demarcaba las regiones de crecimiento, de ramificación y de septación, pero aún no se sabe la bioquímica de la interacción septina-membrana (Martin y Konopka, 2004).

### **I.9 Septinas como andamiaje de proteínas**

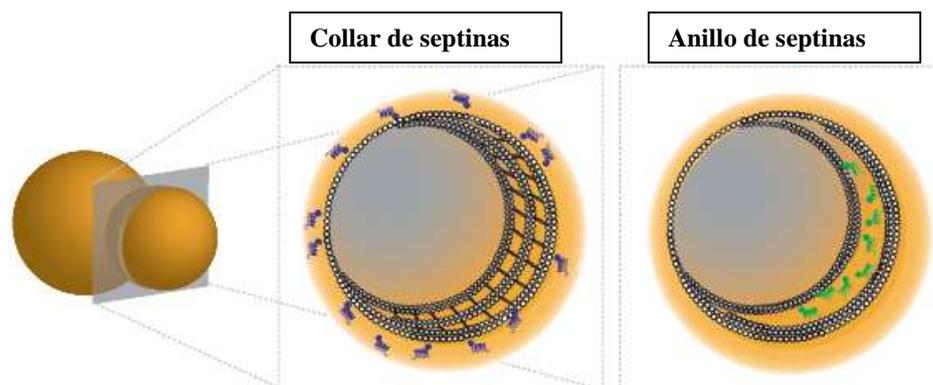
Las septinas también se han vinculado a la membrana durante la citocinesis actuando como un regulador espacial que delimita el área de exocitosis, lo cual permite la generación de nueva membrana. En este proceso se ha observado interacción de las septinas con proteínas SNAREs de membrana (Beites *et al.*, 1999). Las proteínas SNARE (acrónimo del inglés *Soluble Attachment Receptor*) se localizan tanto en las membranas de las vesículas destinadas a fusionarse con la membrana plasmática como en la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2002). En experimentos realizados en células de riñón de rata (NRK) se encontraron colocándose a las septinas y la proteína SNARE llamada syntaxina en la hendidura celular durante la citocinesis (Joo *et al.*, 2005; Beites *et al.*, 1999). Por otro lado estudios realizados en células de cerebro de ratón permitieron aislar un largo complejo de septinas, las cuales inmunoprecipitaron con la proteína Sec8 un

componente del exocisto (Hazuka *et al.*, 1999). En *S. pombe* se observó una correlación entre la posición de las septinas y los componentes del exocisto Sec8 y exo70 para que se exociten en el lugar adecuado las hidrolasas necesarias para la separación celular (Cuadrado *et al.*, 2005). En *S. cerevisiae* mutaciones en la septina *cdc12* derivaron en la deslocalización y acumulación del componente del exocisto Sec3 (Finger *et al.*, 1998). Los datos anteriores apoyan la idea de que las septinas podrían estar contribuyendo como un andamiaje para la ubicación puntual de los componentes del exocisto.

### **I.10 Septinas como barreras moleculares**

Otra función que se le atribuye a los complejos de septinas durante la citocinesis, es la de una barrera que regula el paso de material citoplasmático y de organelos, en la cual se anclan y organiza la maquinaria necesaria para generar nueva membrana y posicionar las proteínas que separaran a las células. Se ha observado que en el cuello de la célula en gemación de *S. cerevisiae* se observa una distribución asimétrica de proteínas, ubicándose en su mayoría del lado de la progenie. Esta distribución fue alterada cuando se indujo una mutación sensible a temperatura en la septina *cdc12* (Takizawa *et al.*, 2000). Otros estudios han revelado que proteínas como Bni4 y Kcc4 que se encuentran distribuidas cada una en diferentes caras del septo, se unen a diferentes dominios de las septinas, delimitando la distribución de éstas al inicio de la formación del anillo de septinas en el septo (Kozubowski *et al.*, 2005). En otros estudios en *S. cerevisiae*, también se indujeron mutaciones sensibles a temperatura de las septinas *cdc12* y *cdc5*, en las que se observó una deslocalización de la enzima quitina sintetasa 3, la cual es responsable de la formación de la nueva pared en el cuello de la levadura y como consecuencia, se observaron alteraciones en la constitución del septo (DeMarini *et al.*, 1997). Otro antecedente que muestra a las septinas como una barrera durante la citocinesis es demostrado por Barrar en el 2000, en donde se observó que proteínas como Myo2p, Sec3p y Spa2p fueron localizadas de manera asimétrica

en los lados de la hendidura de gemación, y esta localización fue interrumpida cuando las septinas mostraban alteraciones en el ensamblaje (Barrar *et al.*, 2000). También se ha observado que la localización de las septinas justo en el punto de la hendidura durante la citocinesis (Figura 6) parece compartimentalizar los sitios de ubicación del complejo de exocitosis (Dobbelaere *et al.*, 2004; McMurray y Thorner, 2009). De hecho, estudios ultraestructurales en *S. cerevesiae* revelaron que la estructura de los heterómeros de septinas podría ser capaz de formar una gasa molecular que podría funcionar como una barrera de difusión molecular (Vrabioiu *et al.*, 2006; Rodal *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Modelo de la organización de las septinas como barrera molecular en la formación del anillo y del collar de septinas durante el proceso de citocinesis en el cuello de la gemación en la levadura (aproximado por el plano gris), mostrando la membrana plasmática (naranja), dominios G globulares de las septinas (bolitas blancas), y proteínas no septinas (azul y verde) (Modificado de McMurray y Thorner, 2009).

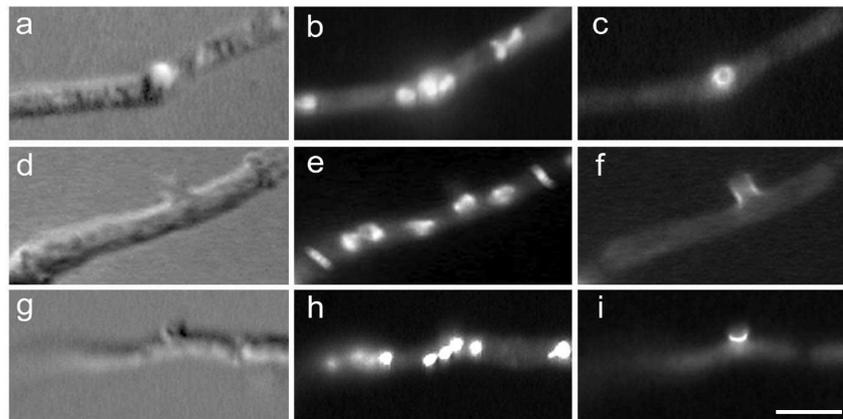
### **I.11 Septinas en hongos filamentosos**

Muchos de los avances recientes en cuanto al conocimiento de los procesos en los que participan las septinas se han desarrollado en hongos filamentosos puesto que estos organismos presentan una mayor dinámica y variedad en los procesos de morfogénesis celular durante su desarrollo y en los diferentes estadios de su ciclo de vida, en comparación con otros organismos.

Los hongos filamentosos tienen una estructura celular característica llamada hifa, la cual está compuesta por una serie de células interconectadas envueltas en una pared celular y dependiendo de la especie pueden o no presentar estructuras llamados septos a lo largo de un continuo celular (Howard y Gow, 2007). Estas características en conjunto le permiten conformar una estructura celular tubular que puede generar múltiples ramificaciones las cuales en conjunto derivan en la formación de colonias con geometrías que se adecuan a las diferentes condiciones físico-químicas del ambiente. Esta adecuación en gran medida está dada por la dinámica, resistencia y plasticidad que le confiere a la hifa la pared celular (Howard y Gow, 2007).

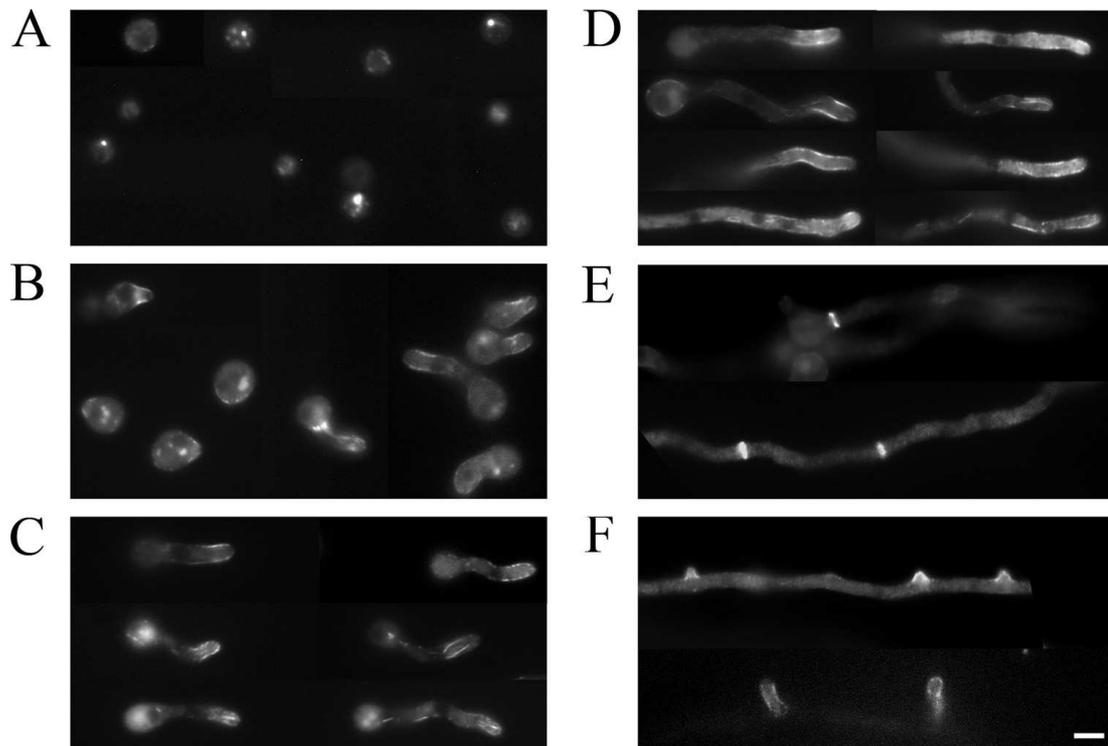
En la generación y crecimiento de las hifas se encuentran involucrados múltiples mecanismos que contribuyen al transporte, organización y distribución de moléculas orgánicas básicas hacia la región apical, debido a que en esta región es donde se concentra la mayor actividad en cuanto a la agregación de nueva membrana plasmática y la generación de pared celular, esta última se encuentra constituida por glucanos, quitina, proteínas y lípidos que son polimerizados en las zonas apicales de las hifas (Bartnicki-García, 1968; Riquelme *et al.*, 2007).

Por ejemplo, en *A. nidulans* y *Ashbya gossypii*, se han encontrado patrones similares en la distribución de las septinas durante eventos mitóticos sincronizados con la ramificación. Durante estos procesos se ha observado la formación de anillos en la base de las ramas y en las puntas durante la generación de las mismas. Cabe mencionar que en estos procesos de formación de anillos de septinas también se ha registrado actividad importante de proteínas como Cdc42 y algunas cinasas que regulan directamente el ensamblaje y remodelación de las septinas y que pueden estar relacionados con la progresión de eventos mitóticos (Harris, 2008). También se ha reportado que las septinas AspB en *A. nidulans*, la cual es homóloga a Cdc3 de *S. cerevisiae* y Sep7 en mamíferos, juegan un papel importante en la citocinesis, la conidiación y la septación. En esta última, se observó una acumulación de las septinas durante la formación del septo pero no se encontró relación entre la acumulación de la septina AspB y los procesos mitóticos (Harris *et al.*, 1994). Un fenómeno similar se lleva a cabo durante la formación de los septos en los que las septinas forman un anillo y asociación con la actinmiosina (Figura 7) (Westfall y Momany 2002; Lindsey y Momany 2006). Mutaciones en el gen de la septina AspB generan organismos con fenotipos anormales que incluyen una septación irregular y un elevado número de ramificaciones amorfas, así como la generación de estructuras reproductivas inmaduras (Westfall y Momany, 2002).



**Figura 7.** Septina AspB durante la ramificación y la mitosis; **a-c)** Presencia de anillo de la septina AspB en *A. nidulans* en los primeros procesos de ramificación. **d-f)** Ramificación emergiendo de hifa con anillo de la septina AspB. **g-i)** AspB se observa en forma de anillo en la base de la rama mientras los núcleos están en mitosis. **A-d-g)** contraste de fases; **b-c, e-f, h-i)** microscopía de fluorescencia. Modificado de Westfall y Momany, 2002 (escala 5 $\mu$ m).

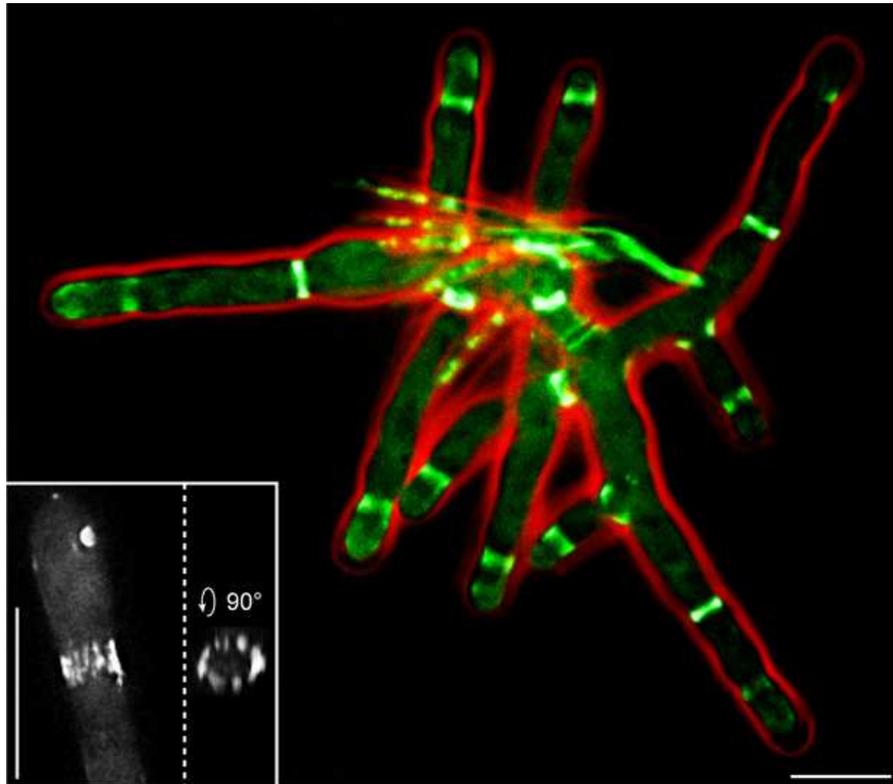
Por otro lado Lindsey y Momany (2010) analizaron la localización y la función de las septinas AspA y AspC en *A. nidulans*. Este análisis mostró que la localización y la función de estas septinas era dependiente una de otra, y se localizaron participando en los procesos de ramificación, septación y de crecimiento polar. Aunado a ello, encontraron que la mutación de  $\Delta aspa$  afectaba el crecimiento isotrópico de los conidios mostrando una polaridad anormal. Este efecto se incrementó cuando se analizaron juntas las mutaciones de  $\Delta aspa$  y de  $\Delta aspc$ . También se pudo observar un índice bajo en los procesos de septación, así como poca ramificación. El análisis indicó que la suma de ambas mutaciones influyendo drásticamente en el escaso desarrollo del organismo. Estos estudios nos dan un panorama de la dinámica y diversidad de septinas que están implicadas en las diferentes etapas del desarrollo de los hongos filamentosos (Figura 8).



**Figura 8.** Septina Aspa localizada en conidios en germinación, en ramificaciones y en septación en *A. nidulans*. Los paneles muestran los diferentes procesos de morfogénesis donde participa la proteína *AspA* tomados en microscopia de fluorescencia. **A)** Conidios con poco tiempo de inoculación con puntos de fluorescencia; **B)** Crecimiento de tubos germinativos con fluorescencia en las punta; **C)** Germínulas en crecimiento; **D)** Hifas maduras con fluorescencia en la punta; **E)** Hifas con septos; **F)** Fluorescencia en el inicio de la ramificación (Escala 5 $\mu$ m en A,B,C,D,E.F).

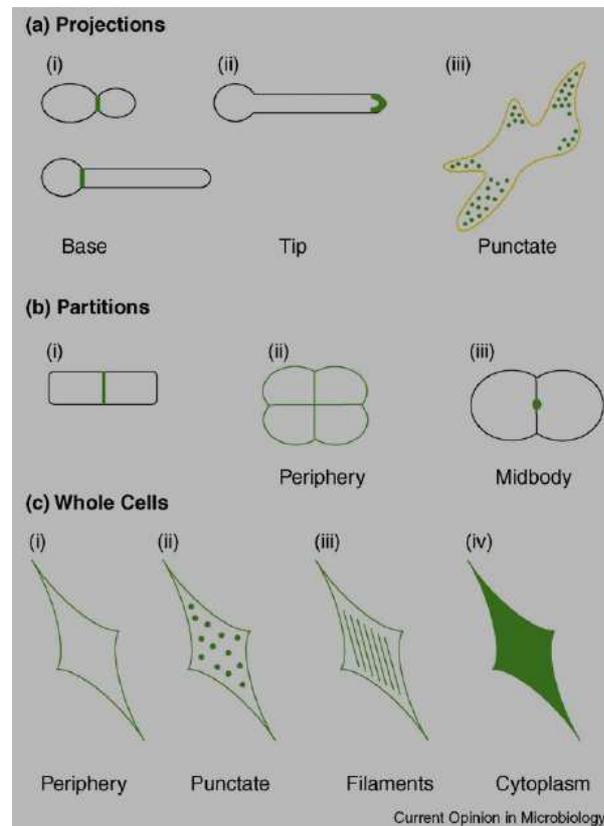
En *A. gossypii* la septina *AgSep7* se ha localizado en la punta de las hifas y está involucrada en los procesos de crecimiento y ramificación de las hifas (Figura 9). Aunado a ello, estos estudios también establecieron que la localización y acumulación de la septina *AgSep7*, homóloga de la septina *cdc10* en *S. cerevisiae*, en las ramificaciones influye sobre los núcleos promoviendo la mitosis así como la dirección del huso mitótico (Lindsey y Momany, 2006; Helfer y

Gladfelter, 2006). En el caso de *C. albicans*, mutaciones en las septinas mostraron graves deficiencias durante el crecimiento en el proceso infectivo y una atenuación en la virulencia del patógeno que afectó la capacidad de penetración en el tejido del hospedero. También se observó una disminución en la capacidad de ramificación en cultivos con agar sólido (Warenda *et al.*, 2003). En el hongo del maíz *Ustilago maydis* las septinas están implicadas durante los procesos de crecimiento y cambio morfológico durante la fitopatogénesis (Lindsey y Momany, 2006).



**Figura 9.** Presencia de AgSep7 marcada con GFP en la parte subapical y en septos de hifas de *A. gossypii* (Helfer y Gladfelter, 2006) (escala 10 $\mu$ m).

Los ejemplos anteriores, muestran un panorama de los diversos procesos en los que se encuentran implicadas las septinas en algunos organismos fúngicos. Aun falta dilucidar muchas de las funciones e interacciones que llevan a cabo estas proteínas. La mayoría de estos estudios se han concentrado en hongos filamentosos como *C. albicans*, *U. maydis*, *A. nidulans* y *A. gossypii*, ya que son modelos en los que se tienen bien estudiados procesos tales como la ramificación y el crecimiento polarizado así como la septación lo cual los hace ideales para estudiar la dinámica de las septinas y sus implicaciones en estos procesos.



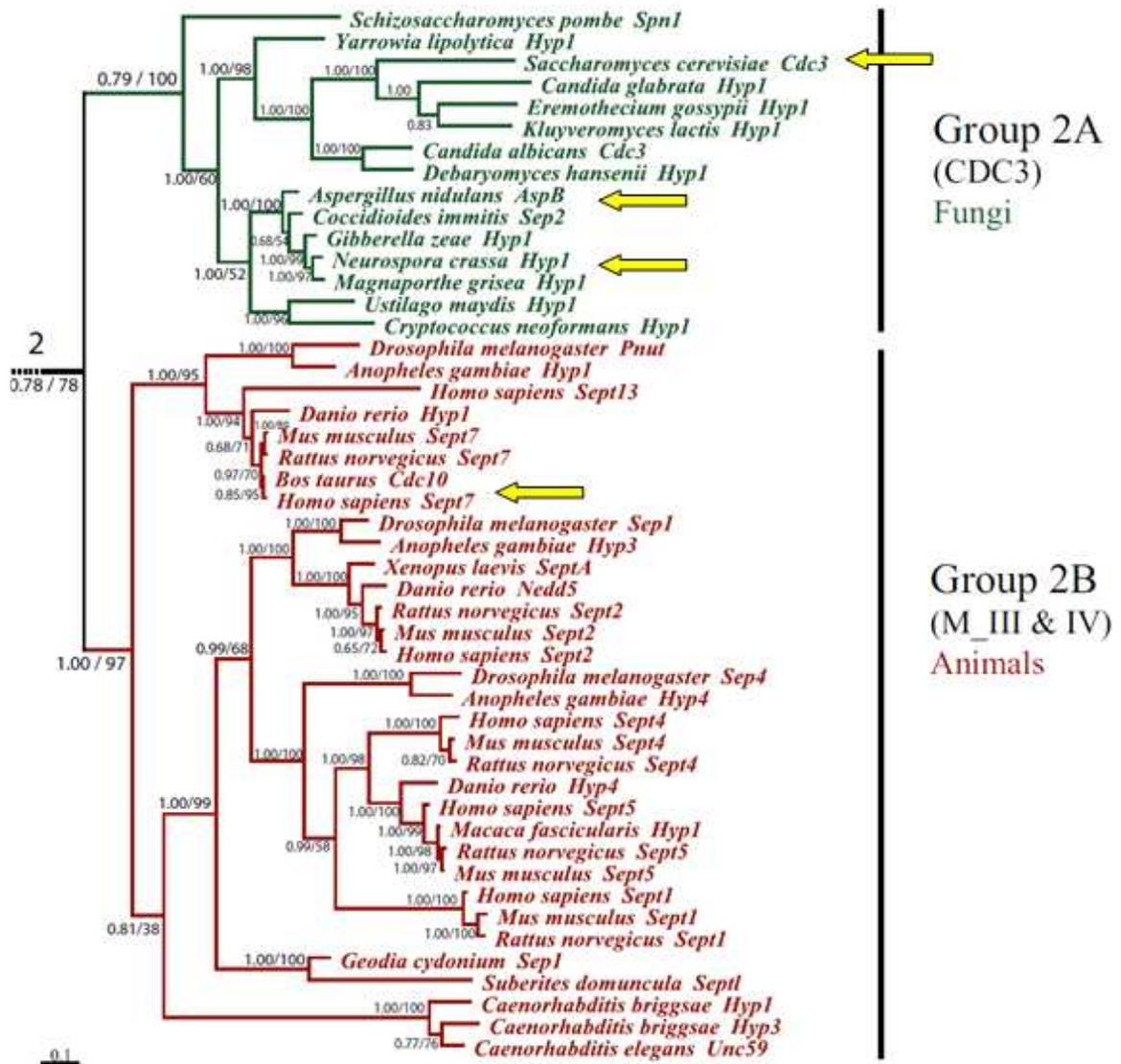
**Figura 10.** Variedades de la distribución de las septinas ligadas a su función en la fisiología celular (Lindsey y Momany, 2006).

Otro de los hongos que presenta características ideales para el estudio de las septinas es *N. crassa*. Este organismo presenta en su genoma secuencias putativas de siete septinas altamente conservadas en relación con las de otros organismos como *S. cerevisiae*, *A. nidulans* y con mamíferos (Fangfang *et al.*, 2007). En este organismo se han realizado muchos de los hallazgos fundamentales de la biología celular, tales como el crecimiento polarizado, septación, ramificación y tráfico vesicular, en algunos de estos procesos se ha identificado en otros organismos un papel fundamental de las septinas. Aunado a ello también se han realizado diversos estudios a nivel genético debido a la plasticidad y facilidad de manipulación genética de *N. crassa*, la cual propicia que

se pueden aislar, manipular y caracterizar los efectos inmediatos de diferentes mutantes. De las septinas que se han identificado en *N. crassa* no se ha estudiado su localización ni su función en los procesos de desarrollo. Una de las septinas de *N. crassa* que puede ser relevante en los procesos de morfogénesis y mitosis es la septina *cdc-3* (*hyp-1*) debido a su homología con las septinas *cdc3* de *S. cerevisiae* y *AspB* en *A. nidulans* para las que se han observado implicaciones en estos procesos (Tabla II).

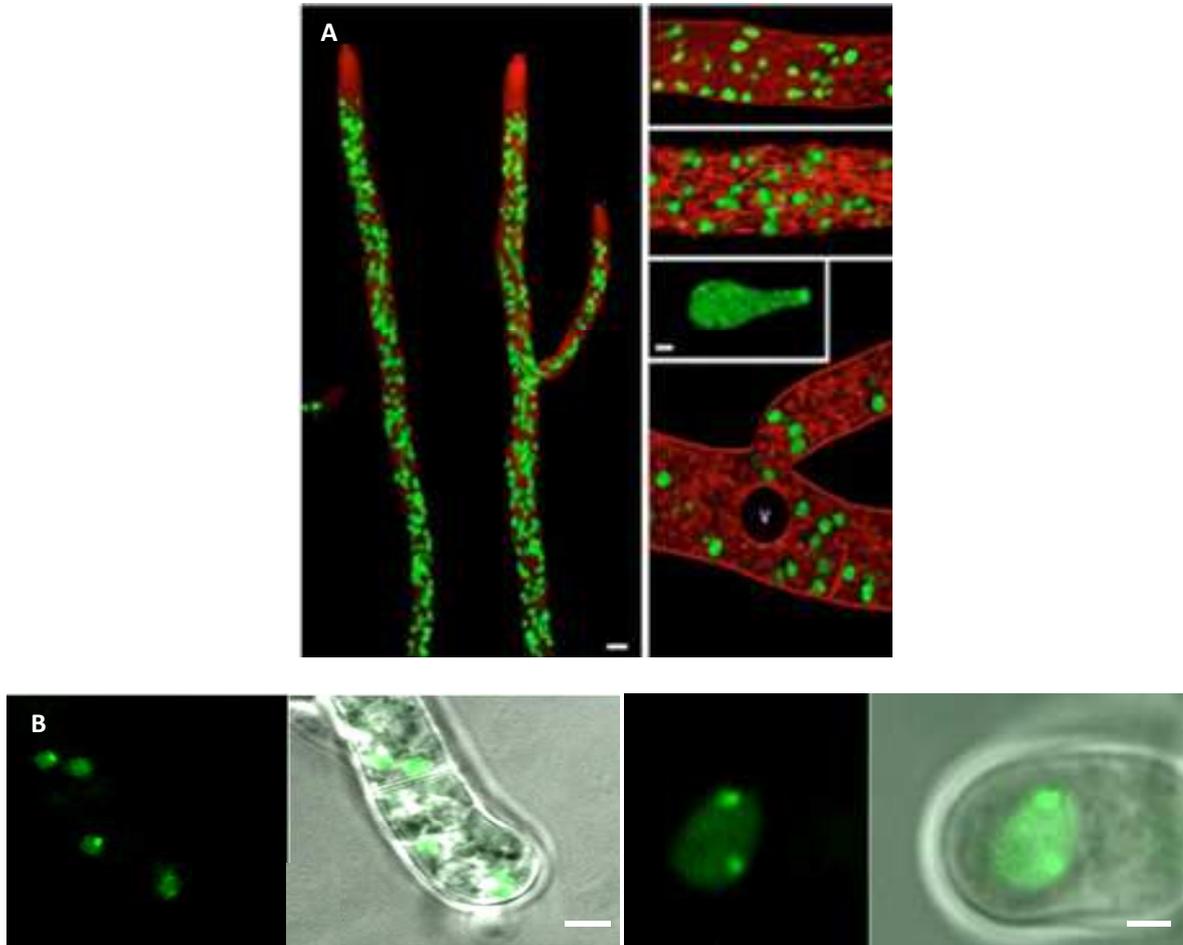
**Tabla II.** Genes homólogos de las septinas entre mamíferos, *S. cerevisiae*, *A. nidulans* y *N. crassa* (Pan, Malmberg y Momany, 2007).

Mamíferos	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>N. crassa</i> N° de acceso
<b>Sept7</b>	<b><i>cdc3</i></b>	<b><i>aspB</i></b>	<b><i>Nccdc-3</i></b> <b>(<i>hyp-1</i>)</b>	<b>NCU08297.3</b>



**Figura 11.** Árbol filogenético de las septinas de los grupos 2A y 2B en donde se encuentran Cdc3 de *S. cerevisiae*, AspB de *A. nidulans*, Sep7 de *Homo sapiens* y CDC-3 (HYP-1) de *N. crassa* (Pan, Malmberg y Momany, 2007).

Recientemente se han realizado estudios importantes para dilucidar los procesos y proteínas requeridas para el establecimiento del centrómero y del cinetocoro. Esto se ha realizado por medio del marcaje de proteínas fundamentales en estas estructuras, tales como la histona H1, componente de la cromatina general y la histona CenH3, propia de centrómero con el fin de caracterizar espacial y temporalmente su participación y función en el centrómero (Freitag *et al.*, 2004). Estos estudios pueden servir como base para el estudio de la dinámica de las septinas en los procesos de división nuclear de *N. crassa* (Figura 12).



**Figura 12.** Proteínas nucleares marcadas en *N. crassa*. **A)** La histona 1 marcada con GFP en los núcleos de hifas de *N. crassa*; **B)** Núcleos marcados con la proteína centromérica CenH3 marcada con GFP en hifas de *N. crassa* (Freitag *et al.*, 2004; Estudios preliminares realizados Sánchez-Hernández, 2009) (Barra 5 $\mu$ m).

## I.12 GFP y fluorocromos

La proteína verde fluorescente (GFP) fue descubierta por Shimomura y cols. (1962) como adjunta de la proteína Aequorina en la medusa *Aequorea victoria*. Su secuencia (720 pb, 240 aa y 27 kDa) y conformación tridimensional (por cristalografía) son conocidas (Prasher *et al.*, 1985; Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) La excitación máxima se da con exposiciones de  $\lambda = 488$  nm y su emisión máxima se da a una  $\lambda = 510$  nm.

El FM4-64 (N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamonio)fenil) hexatrienil) piridinio dibromuro)) (Molecular Probes, #T3166), es un colorante vital fluorescente que en hongos filamentosos marca la zona apical de las hifas, específicamente las membranas de las vesículas que rodean al Spitzenkörper (Hickey *et al.*, 2005). La excitación máxima se da con exposiciones de  $\lambda = 514$  nm y su emisión máxima se da a una  $\lambda = 670$  nm.

El DAPI o 4,6-diamidino-2-fenilindole es un fluorocromo que marca DNA, al intercalarse entre los pares de bases, puesto que el DAPI pasa intacto la membrana de la célula, y puede ser utilizado para marcaje de células vivas o fijas. El DAPI se excita con luz ultravioleta. Su máximo de absorción está en 358 nanómetros y su máximo de la emisión está en 461 nanómetros. Esta emisión es bastante amplia. El DAPI también puede marcar RNA. Aunque no emite una señal de fluorescencia fuerte su emisión cambia alrededor de 500 nanómetros cuando se asocia al RNA (Zink *et al.*, 2003).

## Capítulo II

---

### HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES

---

#### II.1 Hipótesis

La septina CDC-3 se encuentra distribuida en puntos claves determinantes de la morfogénesis fúngica, tales como la ramificación, septación, crecimiento apical y estará asociada a los núcleos durante el desarrollo vegetativo del hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

#### II.2 Justificación

En el hongo filamentoso *N. crassa* se han generado amplios conocimientos de procesos morfogenéticos como el crecimiento polarizado, septación, ramificación y tráfico vesicular, esto lo hace un buen modelo para investigar las implicaciones de las septinas en la morfogénesis celular. Aunado a ello también se han realizado diversos estudios a nivel genético debido a la plasticidad y facilidad de manipulación genética de *N. crassa* la cual propicia que se pueden aislar, manipular y caracterizar los efectos inmediatos de diferentes mutantes.

Los estudios sobre septinas en hongos filamentosos pueden ser de gran utilidad para comprender los procesos de la morfogénesis en la patogénesis fúngica, así como en algunos procesos de la dinámica celular en la carcinogénesis y neuropatías, en donde se requiere de una reorganización del citoesqueleto para generar cambios en la morfología de la célula.

### **II.3 Objetivo general**

Observar la distribución de la septina CDC-3 durante el desarrollo vegetativo de *N. crassa* y analizar su posible implicación durante los procesos de división nuclear.

### **II.4 Objetivos particulares**

-Caracterizar la distribución de la septina CDC-3 durante los diferentes procesos de desarrollo vegetativo de *N. crassa* mediante el marcaje con la proteína verde fluorescente GFP.

-Caracterizar la distribución de CDC-3 marcada con la proteína verde fluorescente GFP en el núcleo durante los procesos de división nuclear.

-Analizar las alteraciones en la morfogénesis en mutantes carentes de septina *cdc-3*.

## Capítulo III

### DISEÑO METODOLÓGICO

#### III.1 Cepas y medios

En este estudio se utilizaron cepas del hongo filamentoso *N. crassa* de tipo silvestre como control, así como la cepa *N. crassa* FGSC# 9717 ( $\Delta$  *mus-51::bar+*; *his-3*; *Mat A*) y la cepa FGSC# 9718 ( $\Delta$  *mus-51::bar+*; *Mat a*) para realizar las transformaciones y cepas knockout (KO) para el gen *Ncdc-3*. Asimismo, se utilizó la cepa con la Histona H1 marcada con la proteína roja fluorescente (dsRFP), obtenida y donada por el Dr. Michael Freitag del Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Oregon en Eugene. También se utilizó la cepa *TJV6-4* con la quitina sintasa-1 marcada con mCherry (*chs-1-mchfp Mat A*) obtenida en el laboratorio de Microbiología por el Dr. Jorge Verdín. Para mayor detalle de las cepas consultar la Tabla III.

**Tabla III.** Genotipo de las cepas utilizadas

FGSC números o denominación	genotipo de <i>Neurospora crassa</i>	NCU (numero de acceso)	Referencia
988	<i>Wt Mat a</i>	-----	<i>Colot et al. 2006.</i>
9013	<i>Wt Mat A</i>	-----	
9717	$\Delta$ <i>mus-51::bar+</i> ; <i>his-3</i> ; <i>Mat A</i>	-----	<i>Colot et al. 2006</i>
9718	$\Delta$ <i>mus-51::bar+</i> ; <i>Mat a</i>	-----	<i>Colot et al. 2006</i>
-- <i>cdc3-gfp</i>	<i>cdc-3-gfp Mat a</i>	-----	En este estudio

	<i>cenh3-gfp Mat a</i>	-----	Freitag <i>et al.</i> , 2004
<b>--NRF138</b>	. <i>h-1-rfp Mat A</i>	-----	Freitag <i>et al.</i> , 2004
<b>--TJV6.4</b>	<i>chs-1-mchfp Mat A</i>	-----	Verdin <i>et al.</i> , 2009
<b>11146</b>	$\Delta$ <i>cdc-3 Mat A</i>	NCU08297.2	Laboratorio de Dartmouth
<b>11972</b>	$\Delta$ <i>cdc-3 Mat A</i>	NCU08297.2	Laboratorio de Louise Glass
<b>11147</b>	$\Delta$ <i>cdc-3 Mat a</i>	NCU08297.2	Laboratorio de Dartmouth
<b>11971</b>	$\Delta$ <i>cdc-3 Mat a</i>	NCU08297.2	Laboratorio de Louise Glass

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

Para el mantenimiento de las cepas, se utilizó medio mínimo de Vogel (VMM) formulado por Vogel (1956) suplementado con sacarosa al 1.5% y agar solidificado al 1.5%. Se adiciono con el aminoácido básico L-histidina a una concentración final de 0.5mg/ml para las cepas auxotrofas para histidina y con higromicina B (Calbiochem®) para las cepas resistentes a higromicina a una concentración final de 200  $\mu$ l/ml al medio MMV. Para la obtención de cepas transformadas de *N. crassa* homocariontes se utilizó el medio sintético básico de cruzas (SCM) (Westergaard y Mitchell, 1942) que contiene medio SC 2% ( $KNO_3$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ , NaCl,  $CaCl_2$ , biotina, solución de elementos traza,  $H_2O$  destilada, cloroformo), sacarosa, suplementos y  $H_2O$  destilada.

### III.2 Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos, se realizó en función de la secuencia del gen *cdc-3 (hyp-1)* en *N. crassa* (NCU08297.3). Los oligonucleótidos se diseñaron, para que amplificaran secuencias de un tamaño de 1kb en el *orf* y 1kb para *utr*, tomando una secuencia complementaria en los extremos.

Las secuencias fueron obtenidas de <http://broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/> del Broad Institute, en donde se encuentra la secuencia completa de *N. crassa*. El diseño de los fragmentos se realizó con base a la secuencia del gene *cdc-3 (hyp-1)* obtenida del Broad institute y se comprobaron las condiciones de estabilidad de los oligonucleótidos con el empleo del programa FastPCR Professional versión 5.2.0.12 (Primer Digital Ltd <http://primerdigital.com>) y ApE (A plasmid Editor, Copyright © 2003-2007 por M. Wayne Davis versión 1.11.0.0).

### III.3 Extracción de DNA

Se realizaron extracciones de DNA genómico de las diferentes cepas silvestres y *knockout*, así como de las transformantes de *N. crassa*, para lo cual se inocularon cultivos en un matraz Erlen Meyer de 250 mL con 50 ml de MMV líquido con sacarosa al 1.5% y se incubaron a 30°C durante 4 a 5 días sin agitación y en obscuridad. El micelio resultante del cultivo se filtró en un embudo estéril y se lavó con agua destilada. Posteriormente el micelio obtenido se colocó en un tubo eppendorf con orificios para mayor eficiencia del secado, se colocó en un liofilizador FreeZone® 2.5 Dry Systems (LABCONCO), en el cual permaneció durante 18-25 horas a una presión 0.133 mBar y una temperatura de -50 °C. Posteriormente, se procesó el micelio seco para homogenizar en un mortero y lo obtenido se procesó para la extracción de DNA por medio de un Kit de extracción de DNA (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### III.4 Construcciones génicas

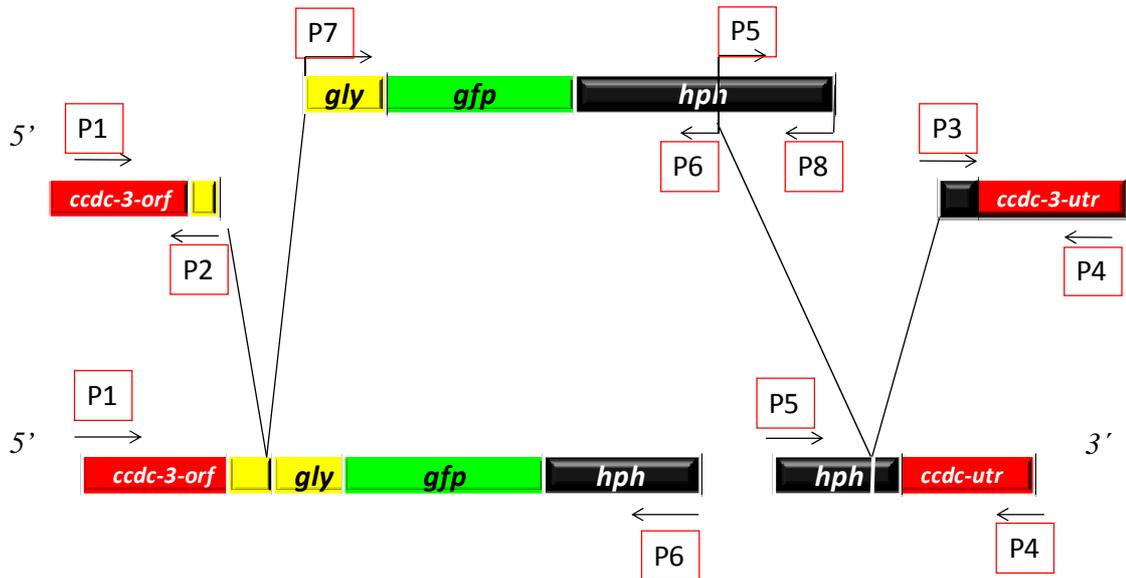
A partir de una construcción génica obtenida a través del vector pZErOR-2-GFP-*hph* de 5,506 pb el cual contiene la secuencia para 10 glicinas, el gen que codifica para la proteína verde florecerte GFP y el gen de resistencia a higromicina, se procedió a generar nuevas construcciones híbridas que incluyeran a los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen de la septina *cdc-3*, por medio de dos rondas de PCR. En la primera se amplificaron por separado, 1,422 pb del marco de lectura abierto (*ORF*) de la septina *cdc-3* y 946 pb de la región *UTR* (del inglés *un translated region*), que es una región no codificante río abajo del marco de lectura abierto. A su vez se amplificó el constructo que contiene 30 nucleótidos para 10 glicinas, el gen de la *gfp* de 720 pb y el gen de resistencia para higromicina de 2,661 pb que en conjunto tienen 2,916 pb. Para esta ronda de PCR se designaron los siguientes oligonucleótidos para: *cdc-3-orf-gfp* (P1/P2/orf-gfp), *cdc-3-utr* (P3/P4/utr); *gfp-hph* (P7/P8/ hph-gfp). Para las amplificaciones de las regiones *cdc-3-orf* y *cdc-3-utr* se utilizó como templado DNA genómico de la cepa N1 FGSC# 988 *Wt Mat a* de *N. crassa*. Como templado para la amplificación de *gfp-hph* se utilizó el plásmido pMF357.

En la segunda ronda de PCR se realizó la unión de los fragmentos por medio de la combinación de los oligonucleótidos con el fin de fusionar los fragmentos obtenidos. Este procedimiento dió como resultado dos fragmentos de diferentes tamaños uno que contenía el marco de lectura abierta de 1,422 pb los 30 pb correspondientes al brazo de glicina, 720 pb del gen codificante la proteína verde fluorescente y una región de 1,093 pb del gen de resistencia a higromicina, esto debido al empleo de un oligonucleótido designado como p6 que se une y amplifica solo una región del gen de resistencia a higromicina. Lo anterior dió como resultado un primer constructo conteniendo *cdc-3-orf-gly-gfp-hph* de 3,234 pb. Por otro lado la secuencia complementaria del gen de resistencia a higromicina con el *utr-cdc-3* por medio del empleo combinado de los oligonucleótidos uno que

reconoce a partir de una región del *hph* y el oligonucleótido que amplifica el *utr-cdc-3* generando el fragmento *hph-utr-cdc-3* de 1,993 pb. La combinación de los oligonucleótidos correspondientes a la hibridación en la segunda ronda de PCR es la siguiente: *cdc-3-gfp-hph* (P1-P6/gfp-hph), *cdc-3-hph-utr* (P5-P4/hph-utr).

Para las amplificaciones de los fragmentos de interés (Figura 13), se utilizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Shevchuk *et al.*, 2004). La técnica de PCR de fusión (Honda y selker 2009) amplifica fragmentos de DNA mediante PCR con regiones complementarias en los fragmentos a fusionar. Esta técnica se utilizó para el diseño de todas las construcciones génicas de este estudio. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1  $\mu$ L de una solución con deoxinucleótidos trifosfatados (*DNTPs por sus siglas en inglés: Deoxinucleotides Triphosphates; (dATPs, dCTPs, dGTPs y dTTPs)*), a una concentración de 10 mM cada uno de ellos; 1  $\mu$ L de cebador *fwd* [10 mM], 1  $\mu$ L de cebador *rev* [10 mM], 1  $\mu$ L (250 ng) de ADN genómico de *N. crassa* N1 (FGSC#988), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 0.2  $\mu$ L de polimerasa TaKaRa ® [5u/ $\mu$ L], 2  $\mu$ L de amortiguador La Tak 10X PCR Buffer® y se aforó con agua destilada estéril para un volumen de 20  $\mu$ L.

Se utilizó un termociclador (LabNet International®) bajo los siguientes parámetros por 30 ciclos que constaron de una desnaturalización de ADN a 94°C por 30 segundos, alineamiento de 55°C por 30 seg., extensión a 72°C por 1:30 seg. Una extensión final a 72°C por 5 min. Para la fusión de los fragmentos se utilizó la enzima LA TaKaRa (polimerasa de alta fidelidad). Como resultado de esta construcción se obtuvieron los siguientes constructos:



**Figura 13.** Construcción genética de *cdc-3-orf-gly-gfp-hph* y *hph-cdc-3-utr*.

### III.5 Electroforesis

Después de haber amplificado los fragmentos correspondientes, se corrieron en un gel de agarosa. Cada uno de los productos de PCR obtenidos fueron mezclados con un amortiguador de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) en proporción de 6:1 y fueron colocados en los pozos del gel de agarosa al 1% (Promega®) conteniendo bromuro de etidio al 0.1µg/ml (Invitrogen®). Para identificar el tamaño de los fragmentos esperados en el gel de agarosa, se utilizó un marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII (Promega®). El gel de agarosa fue sumergido en una solución de TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) dentro de la celda de electroforesis Mini Sub Cell GT (Biorad®). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis durante 60 minutos, bajo 65 Ω (Resistencia) y 400 AMP (Amperes). Se expuso a luz ultravioleta el gel de agarosa para la observación de los fragmentos de ADN. Los amplicones resultantes fueron extraídos del gel y purificados con el kit Qiaquick

Gel Extraction Kit (Qiagen®) siguiendo el protocolo del fabricante. Este procedimiento se aplicó a los productos de PCR de la primera y segunda ronda.

### III.6 Transformación

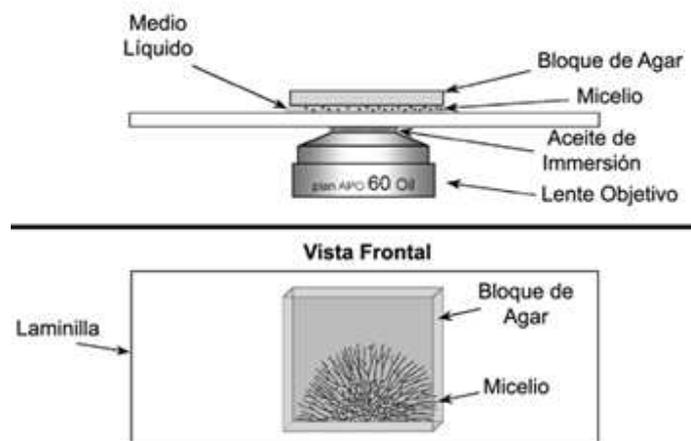
Para la transformación se cultivó la cepa FGSC# 9718 en un matraz de 500 ml con 50 ml de medio mínimo de Vogel (VMM) solidificado con agar al 1% y se incubó por 7 días a 30°C. Posteriormente se efectuó la cosecha de conidios bajo condiciones estériles. Para ello se añadieron 50 ml de sorbitol 1M estéril al matraz y se agitó para desprender los conidios del medio de cultivo. Después se filtró la solución con la ayuda de un embudo recubierto internamente con un filtro, para permitir únicamente el paso de conidios. El filtrado se recuperó en un tubo Falcón de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se efectuó el lavado de los conidios de la siguiente forma, se suspendieron los conidios en 20 ml de sorbitol 1M estéril y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Después se suspendieron en 1,000 µl de sorbitol 1M estéril. Para la transformación en *N. crassa*, se dispuso en pozos de electroporación una suspensión de macroconidios de la cepa de *N. crassa* FGSC# 9718 ( $\Delta$  *mus-51::bar+*; *Mat a*) a una concentración de  $2.5 \times 10^9$  conidios/mL suspendidos en sorbitol. Se utilizarón 40 µL de la suspensión de conidios a los que se agregaron 1 µg del DNA de la construcciones génicas, 5 µl de *cdc-3-orf-gly-gfp-hph* (brazo izquierdo) y 5 µl de *hph-cdc-3-utr* (brazo derecho). A continuación se transfirió la mezcla a la celda de electroporación 0.2 mm (en hielo), la cual fue colocada posteriormente en el electroporador (BioRad Gene Pulser Xcell), en el que se indujo una descarga de 1500 V (600 Ω y 25µF) por 15 ms. Después de la electroporación se añadieron 60 µL de sorbitol (1M) a cada celda. Se transfirió la solución a un tubo con 1.5ml de medio de recuperación (Sales de Vogel sin sacarosa 1X) y se mantuvo en agitación 30°C 4 horas. Trascurrido este tiempo, la solución de conidios se agregó a 15 ml de medio TopAgar (sales de vogel 50%,

FGS 2%, sorbitol 2M, agar, H<sub>2</sub>O destilada y se mezcló suavemente. A continuación se vació en placas de selección (3 placas para cada transformante) que contenían medio FGS adicionado con higromicina B (200 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 3 a 5 días hasta observar colonias de *N. crassa*. Las colonias crecidas fueron transferidas a tubos de cristal de 4 ml conteniendo 1.5 ml de VMM sólido con higromicina B (200 µg/ml). Los tubos fueron incubados a 30°C por 7 días. Posteriormente se tomaron conidios de cada uno de los tubos y fueron crecidos en cajas Petri con MMV sólido, cada una de las colonias fue analizada mediante microscopía confocal de escaneo con láser.

### **III.7 Microscopía confocal de barrido con láser.**

Los conidios resultantes de las colonias aisladas después de la transformación se cultivaron en placas Petri (100 x 15mm) que contenían MMV sólido y se incubaron a 28°C durante 12-16 hrs. hasta obtener colonias con un diámetro aproximadamente de 5 cm. Posteriormente la muestra se montó en un portaobjetos siguiendo la técnica de bloque de Agar Invertido (Figura 14) (Hickey *et al.*, 2005). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal de barrido con láser con un microscopio confocal de la marca Zeiss LSM 510 Meta; provisto de tres láseres (uno de Ar: 458, 477, 488, 514 nm; y dos de He-Ne: 543 y 633 nm); un objetivo de inmersión en aceite de 100X A.N. de 1.3, un objetivo de inmersión en aceite de 63X; un canal para luz transmitida y dos para fluorescencia, uno sencillo y otro Meta (Carl Zeiss®) para adquisición de hasta 8 fluorocromos de manera simultánea. Para la obtención de imágenes y series de tiempo, se utilizó el software LSM-510 (versión 3.2; Carl Zeiss®) y se evaluó con el LSM-510 Image Examiner (versión 3.2). Las longitudes de excitación y emisión usadas, fueron 488nm y 510nm para GFP y 587nm y 610nm para mChFp así como 514nm de excitación y de emisión máxima 670 nm para el colorante lipofílico FM4-64. El cual se adiciona minutos antes sobre el cubre objetos a una concentración de 10µM antes de colocar el bloque de agar invertido. Para observar los núcleos teñidos

con DAPI, los conidios se fijaron con una solución de (3:1) ácido acético y metanol por 30 min. a 4°C y se tiñeron con 4-6 Diamidino-2- Phenylindole (DAPI) 1µg/ml por 15 min. a 4°C. Las longitudes de excitación y de emisión usadas fueron 358 nm y 461 nm, respectivamente.



**Figura 14.** Imagen que muestra el “método del bloque de Agar invertido” (modificado de Hickey *et al.*, 2005 en Beltrán-Aguilar, 2006).

### III.8 Cruzas

Las cepas transformadas seleccionadas, se cruzaron con otras cepas compatibles con el fin de obtener cepas homocariontes con todos los núcleos transformados, las cuales sirvieron para el posterior análisis de colocalización con microscopía confocal. Para las cruzas se utilizó medio sintético de cruzas (MSC) el cual contiene Medio SC 2x para 50ml, sacarosa 2g, suplementos, agua destilada y con un bajo nivel de nitrógeno para estimular la reproducción sexual. Para la obtención de cepas homocariontes por cruce se utilizaron  $2\mu\text{l}$  de conidios de la cepa N150 *mat A* ( $7 \times 10^7$ ). Para ello los conidios fueron previamente cosechados y fueron lavados con sorbitol 1M y centrifugados por 5 minutos a 5,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla con conidios se suspendió en 1 ml de VMM. Los conidios de la cepa transformante *Mat a* fueron esparcidos sobre micelio de la cepa N150 tipo *Mat A*, crecida previamente en placas Petri con medio SCM. Las placas fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a temperatura ambiente hasta observar la presencia de peritecios y obtener ascosporas. Las ascosporas fueron sometidas a choque térmico a 60°C durante 1 hora y después inoculadas en placas Petri (100 x 15mm) con VMM sólido con higromicina B (200  $\mu\text{g/ml}$ ) e incubadas a 28°C hasta que se observaron ascosporas en etapa de germinación. Se colectaron 30 colonias provenientes cada una de éstas de la germinación de una sola ascospora germinadas (se observó bajo microscopio estereoscópico) con ayuda de una pipeta Pasteur y cada una de estas fue inoculada en tubos con agar MMV inclinado.

Una vez seleccionadas las cepas homocariontes resultantes de la cruce y después de haber obtenido conidios, se inocularon en una caja Petri que contenía MMV y se dejaron crecer por 1 día a 30°C. Con ayuda de microscopía confocal en la selección de la progenie de las cruzas se tomaron en consideración las siguientes características: fenotipo, crecimiento en higromicina y expresión de la

fluorescencia de GFP. En la siguiente tabla se muestran de manera práctica las diferentes cruzas realizadas en este estudio.

**Tabla IV.** Cruzas realizadas y objetivo correspondiente.

	<i>Δcdc-3 Mat A o Mat a</i>	<i>cdc-3-gfp Mat a</i>
<b>Histona 1 marcada con la proteína roja. H-1-RFP <i>Mat A</i></b>		Analizar si la septina CDC-3-GFP se encuentra en el núcleo con la histona 1 marcado en rojo
<b>Quitina sintetasa. CHS-1-mCHFP <i>Mat A</i></b>	Observar las posibles alteración en los septos marcados en rojo con CHS-1-mCHFP en la cepa carente de <i>cdc-3</i>	Observar cronológicamente el posicionamiento en el septo de la CHS-1-mCHFP y de CDC-3-GFP
<b>Cepa N150 <i>Mat A WT</i></b>		Obtener todos los núcleos transformados (homocariote)

### III.9 Caracterización de las cepas mutantes

Se realizó una búsqueda en el Fungal Genetics Stock Center <http://www.fgsc.net/> de las cepas mutantes que no tuvieran el gen *cdc-3* en *N. crassa* y se localizaron cepas con esa característica de dos laboratorios diferentes (Tabla V) las cuales se solicitaron al Fungal Genetics Stock Center. Inicialmente se realizó la extracción de DNA de las cepas mutantes para comprobación de las cepas K.O. mediante la amplificación por PCR con los oligonucleótidos diseñados para amplificar *cdc-3* P1 (*cdc-3-orf*) y P3 (*cdc-3-utr*), y la enzima *Go-Taq* DNA Polimerasa (Promega). Se utilizó un control positivo y DNA genómico de la cepa silvestre N1 (FGSC# 988) de *N. crassa* y para la caracterización fenotípica de las cepas mutantes se analizó la morfología de la colonia a nivel macroscópica y microscópica, así como la tasa de crecimiento. Dichas características fueron comparadas con la cepa silvestre de *N. crassa*, la cepa FGSC# 9718 y la cepa transformante *cdc-3-gfp*. Se tomaron fotografías a diferentes aumentos de las hifas fúngicas con el microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®).

Para la observación de la morfología microscópica se inocularon por triplicado la cepas  $\Delta cdc-3$  en cajas Petri (150 x 15 mm) con MMV y se tomaron fotografías cada 12 hrs. y 24 hrs., respectivamente, con una cámara digital Samsung® de 3.2 megapíxeles. Para la medición de la tasa de crecimiento se cultivaron por triplicado las cepas de *N. crassa*  $\Delta cdc-3$  en placas Petri (150 x 15 mm) con MMV y se incubaron a 30°C. Para la evaluación del crecimiento de *N. crassa*  $\Delta cdc-3$  se marcaron los diámetros del crecimiento en las 3 placas en 5 ocasiones, cada una de estas mediciones se realizó cada 5 hrs. debido a la tasa de crecimiento de las cepas. Una vez finalizadas las mediciones, se obtuvo el promedio de 10 mediciones por cada una de las cajas y se realizaron los análisis estadísticos mediante una prueba de *Kruskal Wallis* para valorar la significancia de los datos obtenidos en las tasas de crecimiento de las cepas mutantes.

**Tabla V.** Mutantes  $\Delta cdc-3$  ( $\Delta hyp-1$ ) de *Neurospora crassa*

NCU	FGSC	Genotipo	Laboratorio
1 NCU08297.2	FGSC #11972	<i>Mat A</i> Homocarión	Dartmouth
2 NCU08297.2	FGSC #11971	<i>Mat a</i> Homocarión	Dartmouth
3 NCU08297.2	FGSC #11147	<i>Mat a</i> Homocarión	Louise Glass
4 NCU08297.2	FGSC #11146	<i>Mat A</i> Homocarión	Louise Glass

### III.10 Comprobación de la integración del constructo por PCR

Se cultivaron las cepas transformantes por 1 semana en MMV líquido a 28°C sin agitación y se filtró el micelio con el empleo de un matraz Kitasato, un embudo y una bomba para generar vacío. El micelio obtenido se liofizó en un liofilizador automático (Labconco®) y con un equipo de extracción de ADN para plantas (DNeasy Plant Extraction Kit Qiagen®) se purificó ADN genómico de las transformantes. La integración de los genes se verificó por PCR y el resultado de la reacción se corrió en un gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL).

## Capítulo IV

---

### RESULTADOS

---

#### IV.1 Bioinformática

Como resultado de la búsqueda bioinformática se identificaron 7 genes hipotéticos de septinas (*hyp-1 – hyp-5*) en *N. crassa*, de los cuales se seleccionó el gen *hyp-1* NCU08297.3. Este gen fue renombrado en el presente estudio como *cdc-3*. Esta septina se seleccionó debido a las importantes implicaciones conocidas en la morfogénesis celular en homólogos correspondientes en otros eucariontes, tales como *cdc3* de *S. cerevisiae*, así como al gen *AspB* de *A. nidulans* y *Sept 7* en *Homo sapiens*.

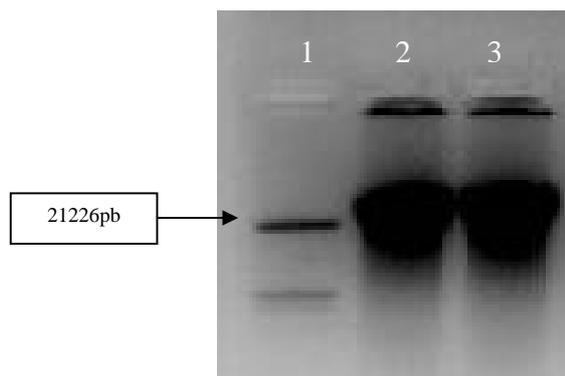
Como primer paso para la construcción génica se realizó una búsqueda *in silico* en el genoma de *N. crassa*, en el cual se identificó un marco de lectura abierto (*orf*) (por sus siglas en inglés open reading frame) de 1,257pb el cual incluye solo exones que codifican para una proteína hipotética la cual está compuesta de 419 aminoácidos. Por otra parte se ubicó en el codón de inicio (ATG) en la posición 460 pb y el codón de término (TAA) en la posición 1,717pb.

A partir del marco de lectura abierto en el cual se incluyeron exones e intrones (*orf*) se diseñaron los oligonucleótidos denominados (*cdc-3-F-orf* P1, sentido) y el oligo (*cdc-3-R-10xGly* P2, antisentido) para amplificar un fragmento de 1,422pb. Por otro lado a partir de la región no traducida UTR (del inglés *untranslated region* o bien de *untranslated trailer*) se diseñaron oligonucleótidos denominados (*cdc-3-utr-F* P3 sentido) y (*cdc-3-utr-R* P4 antisentido) para amplificar un fragmento de 920pb. Las secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla VI (Figura 15).



## IV.2 Técnicas de biología Molecular

Para la amplificación de fragmentos se extrajo DNA genómico de la cepa silvestre FGSC# 988 para utilizar como templado (Figura 16).



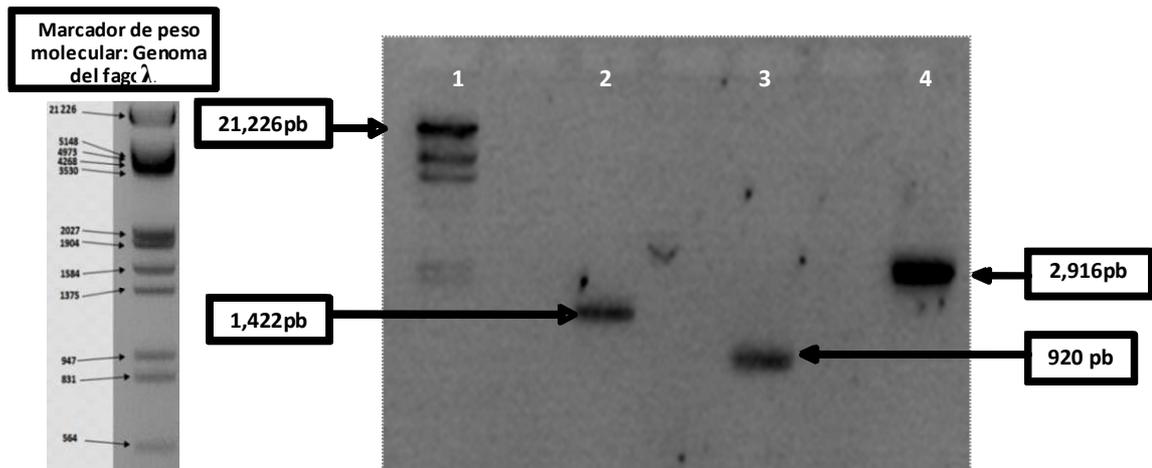
**Figura 16.** Gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en el cual se muestra en los carriles 2 y 3 el DNA extraído de la cepa FGSC# 988 de *N. crassa*. En el carril 1 como referencia el genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

También se realizó la amplificación de un fragmento conteniendo un brazo de 10 glicinas, el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el gen de resistencia a higromicina (*hph*), con el empleo de los oligonucleótidos denominados como P7 y P 8 disponibles en el laboratorio (Tabla VI).

Se procedió a la amplificación por separado de los fragmentos de 1,422pb contenido en el *orf* (*cdc-3-orf*) y otro fragmento de 920 pb de la región no codificante *utr* (*cdc-3-utr*) y el fragmento de 2,916 pb que contiene el brazo de glicinas, el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el gen de resistencia a higromicina (*hph*).

Este procedimiento se realizó en una primera ronda de PCR con el fin de obtener suficientes fragmentos para utilizarse posteriormente como templados en

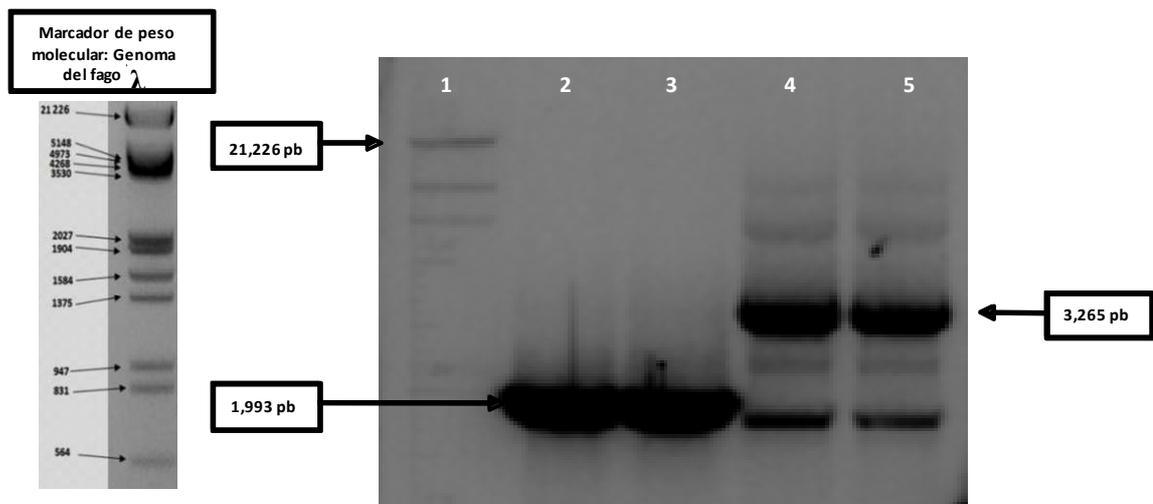
subsecuentes ciclos de PCR en los que se unirán los fragmentos. La amplificación de los fragmentos se realizó con la enzima polimerasa TaKaRa ® y se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 17).



**Figura 17.** Gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el cual se muestra: en el **carril 2** la amplificación de una región del ORF de 1,422 pb del gen *cdc-3*. En el **carril 3** se muestra la amplificación de la región UTR de 920 pb del gen *cdc-3* y en el **carril 4** se muestra la amplificación del fragmento que contiene el brazo de glicinas el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el gen de resistencia a higromicina de 2,916 pb. En el **carril 1** como referencia el genoma del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

Una vez obtenidos los fragmentos, se llevó a cabo otra ronda de PCR con el fin de fusionar los fragmentos obtenidos. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos denominados P1 como sentido y P6 como antisentido para amplificar en un solo fragmento parte del *orf* del gen *cdc-3*, el brazo de glicinas, el gen de la proteína verde fluorescente y un fragmento de 1,093 pb del gen de resistencia a higromicina. Por otro lado se utilizaron los oligonucleótidos denominados P5 como sentido y P4 antisentido para amplificar en un solo fragmento el complemento del gen de resistencia higromicina de 1,073 pb y parte de la región *utr* de *cdc-3* de 920 pb. Como resultado de lo anterior se obtuvieron dos fragmentos: El primer

fragmento denominado como brazo izquierdo el cual agrupa a *cdc-3-orf-gly-gfp-hph* y tiene aproximadamente 3,265 pb. El segundo fragmento denominado brazo derecho contiene el fragmento complementario del gen de resistencia a higromicina 1,073 pb y parte de la región utr *dc-3-utr* el cual tiene aproximadamente 1,993 pb (Figura 18).



**Figura 18.** Amplificación de Fragmentos fusionados mostrados en un gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL). En el **carril 2-3** fragmento denominado brazo derecho de 1,993 pb que contiene el complemento del gen de resistencia a higromicina 1,073 pb y la región utr de *cdc-3* 920 pb (*hph-utr*). En el **carril 4-5** se muestra el fragmento denominado brazo izquierdo de 3,265 pb, el cual comprende parte del orf 1,422 pb, el brazo de glicinas 30 pb, el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) 720 pb y parte del gen de resistencia a higromicina (*hph*) 1,093 pb. En el **carril 1** como referencia el genoma del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

### **IV.3 Transformaciones de *N. crassa***

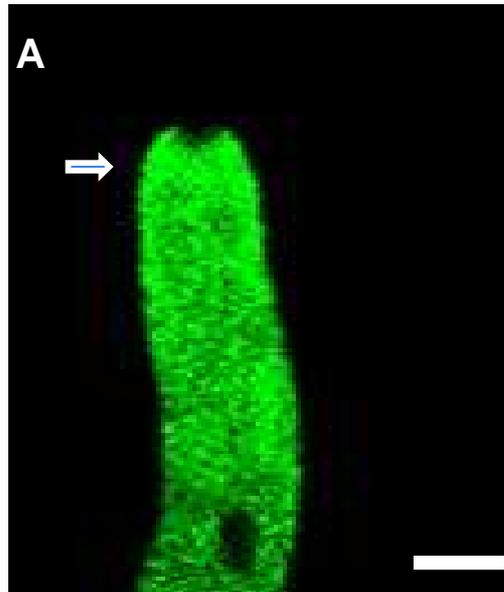
A partir de los dos fragmentos obtenidos se procedió a realizar la transformación. Como resultado de la electroporación obtuvimos un tiempo constante de 13.5 milisegundos en el que fluyeron 1.5 kv.

Como resultado se obtuvieron 5 colonias capaces de crecer en medio con higromicina. Para confirmar la transformación y la expresión de fluorescencia se revisaron las 5 cepas en el microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss®). Durante el análisis se pudo observar fluorescencia en las 5 colonias. Las cepas transformantes *cdc-3-gfp* se observaron en estado vegetativo, así como otros estadios celulares que incluyen: conidiospora, germínula después de 3, 4 y 5 hrs de haber sido inoculadas, e hifas maduras.

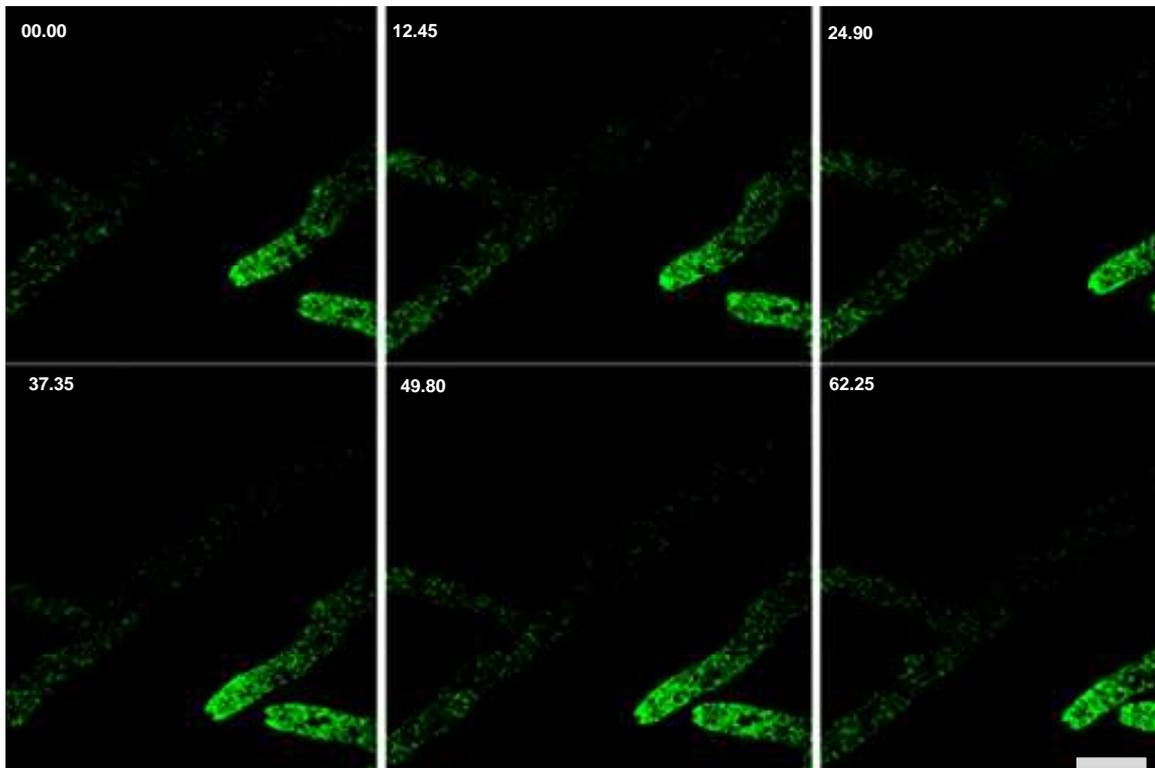
#### **IV.4 Microscopía confocal de barrido con Láser y de contraste de fases**

##### **IV.4.1 Localización celular de CDC-3 en la zona apical de hifas maduras**

Se analizaron hifas vegetativas heterocariontes maduras por microscopía confocal de barrido con láser después de haber sido inoculadas en cajas de Petri con MMV (sacarosa y agar al 1.5 %) e incubadas a 28°C por 12 hrs. Se encontró fluorescencia de CDC-3-GFP en las puntas de las hifas. Esta señal se presentaba de manera intensa alrededor de la zona del Spitzenkörper (centro suministrador de vesículas). La intensidad de la fluorescencia disminuye hacia la zona sub-apical hasta ser casi nula en las zonas distales. La fluorescencia acumulada en la punta mostró una variabilidad en cuanto a distribución e intensidad, lo cual aparentemente está en función del crecimiento de las propias hifas. La intensidad de la señal se aumentaba en hifas con crecimiento alto (Figura 19; Película 1).

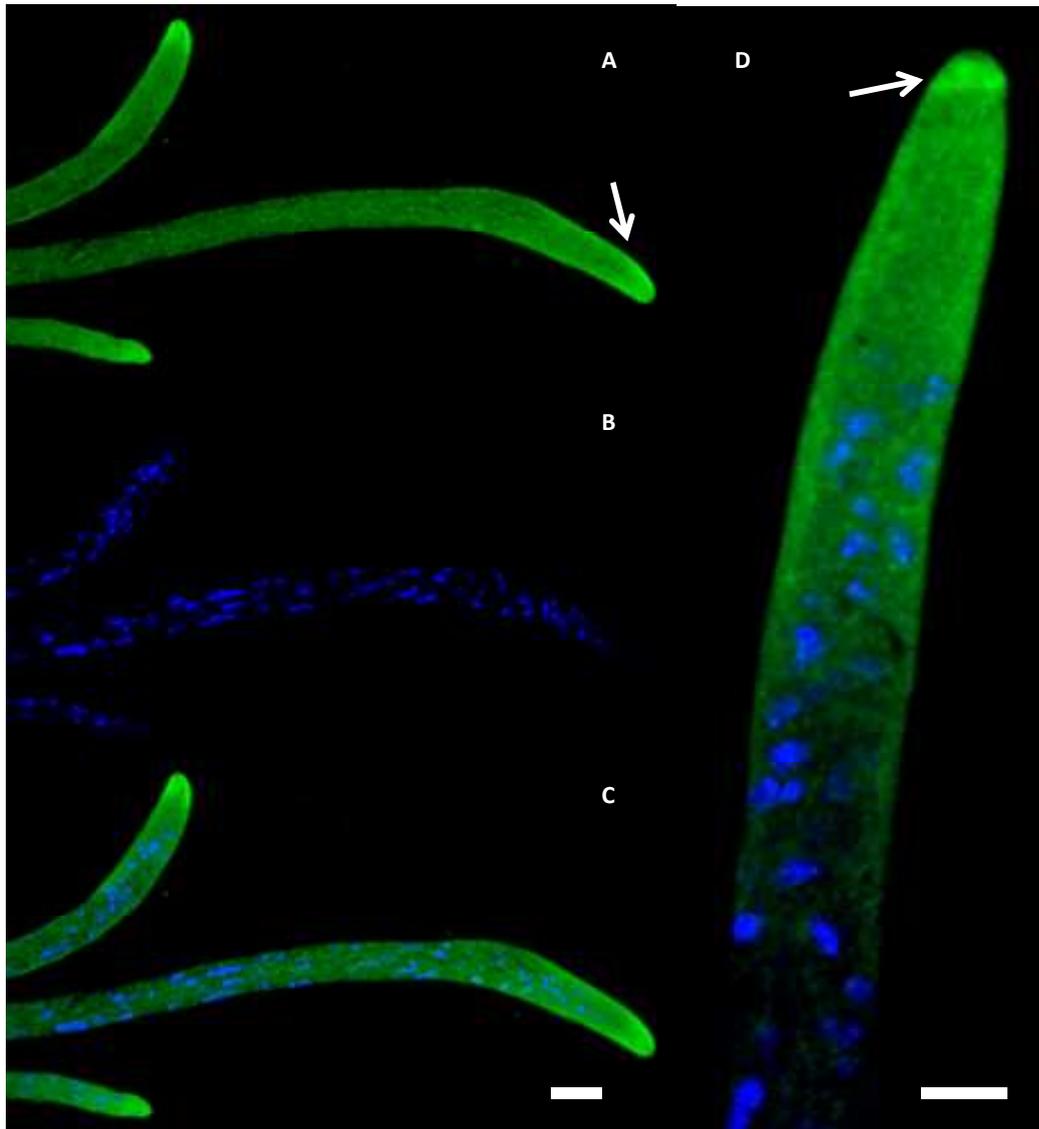


**Figura 19.** Expresión de CDC-3-GFP en la zona apical de una hifa madura de *N.crassa*. **A)** Micrografía de fluorescencia en la que se observa acumulación de la proteína CDC-3-GFP alrededor de la zona inferior del Spitzenkörper y en la membrana (flecha blanca). Se aprecia como decrece la intensidad de la señal hacia la zona subapical. Barra=10 $\mu$ m.



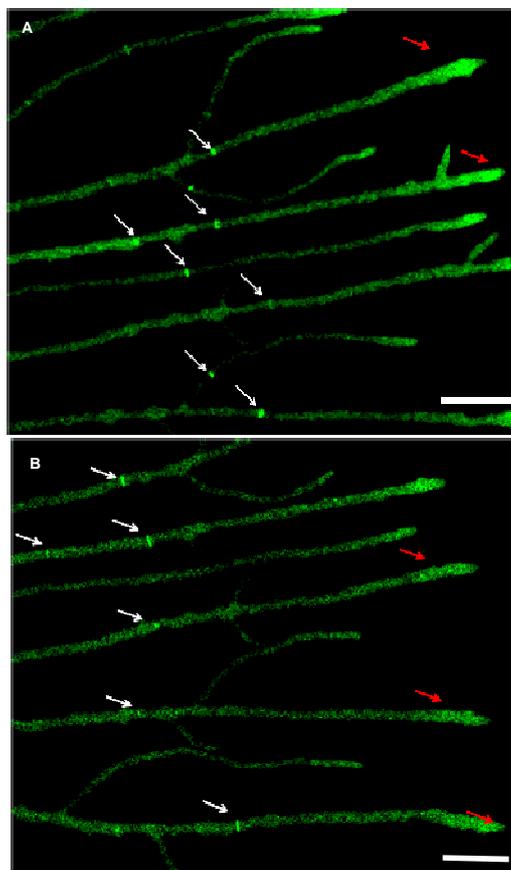
**Figura 20.** Secuencia de imágenes de una serie de tiempo donde se muestran el crecimiento de hifas maduras con la expresión variable de CDC-3-GFP. Se puede observar cómo varía la acumulación de la proteína en el ápice de la hifa durante su crecimiento y como decrece la señal de la fluorescencia en la zona subapical. Barra 10 $\mu$ m. Tiempo en seg.

Para poder evaluar si la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP en la región apical estaba vinculada con los núcleos se procedió a teñir los núcleos con DAPI y a observar en microscopía confocal de fluorescencia. Como resultado de ello se observó que la fluorescencia se acumulaba en la punta, la cual abarca un área de aproximadamente 2  $\mu$ m de la membrana apical hacia la zona subapical. Se observó que la fluorescencia se intensificaba en la periferia de la membrana en la zona subapical pero que no se vinculaba directamente con los núcleos (Figura 21, Pelicula 2).



**Figura 21.** Hifas maduras de la cepa de *N. crassa cdc-3-gfp* fijadas con metanol y ácido acético (3:1) y con núcleos teñidos con DAPI. **A)** Hifa fijada donde se muestra que la proteína CDC-3-GFP se acumula en la punta y con mayor intensidad en la periferia de la membrana de la punta (flecha blanca); **B)** Núcleos de la hifa teñidos con DAPI (azul); **C)** Superposición de **A** y **B**; **D)** Aumento de la región apical y subapical. Barras=10  $\mu\text{m}$  en C y 5  $\mu\text{m}$  en D.

Para poder visualizar la distribución de la septina CDC-3-GFP en las hifas a nivel general se observó la colonia con objetivos de 40 x en microscopía confocal de fluorescencia (Figura 22; Película 2). Estas observaciones permitieron ver que la distribución de la septina CDC-3 no solo se concentraba en las regiones apicales sino en los septos, mismos que se observaban en proceso de formación en todas las hifas que se podían visualizar en el microscopio.

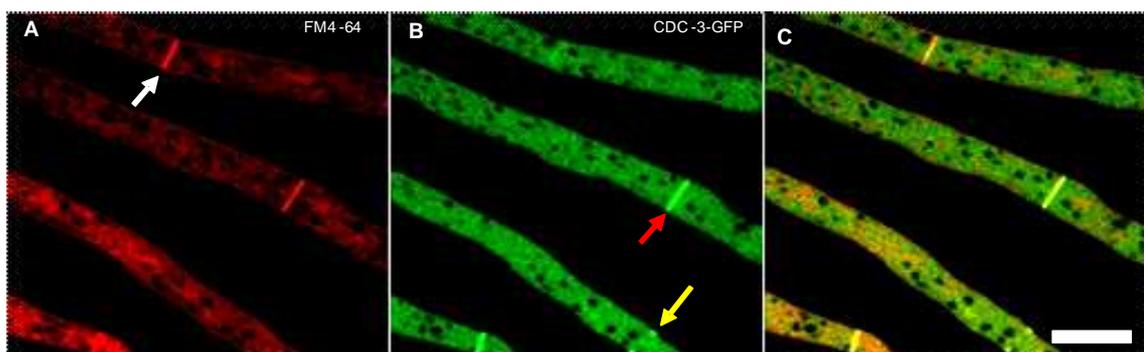


**Figura 22.** Hifas observadas con un objetivo 40x en las cuales se muestra la distribución de la septina CDC-3-GFP en septos y en puntas. **A)** Distribución de la fluorescencia en los septos, mismos que se encuentran en diferente proceso de formación en todas las hifas observadas; **B)** Acumulación de la proteína CDC-3-GFP al mismo tiempo en ápice y en septos en formación. Barra = 50 $\mu$ m.

#### IV.5 Localización de CDC-3-GFP en Septos

Posterior al análisis de las regiones apicales se analizó la distribución de la proteína en regiones distales, se encontró que la proteína se concentraba en los septos durante su formación. En primer término se observó una acumulación de la proteína en la membrana de la hifa en la zona donde se formaría el septo. Después, la fluorescencia avanzó hacia el interior del citoplasma, para posteriormente concentrarse en el centro de la hifa y finalmente desaparecer.

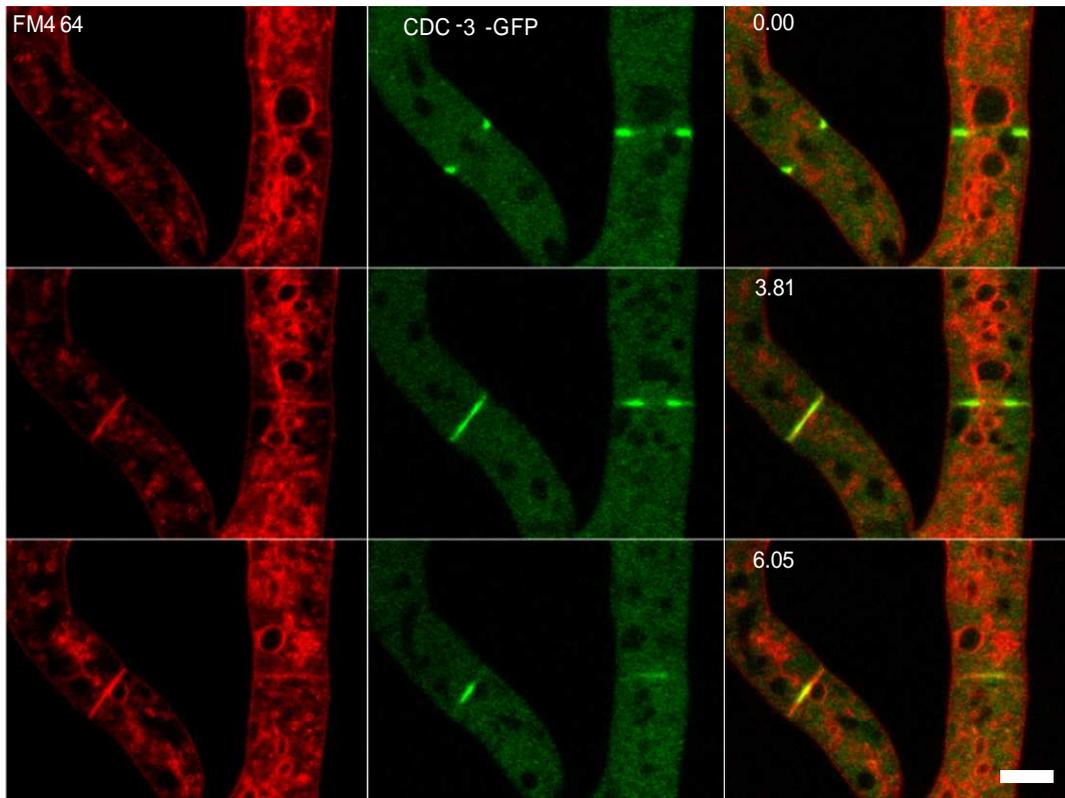
Durante el recorrido de la proteína en la formación del septo, se observó que el flujo del citoplasma disminuía y se concentraba hacia la zona central de la hifa paralelo al del recorrido de la proteína CDC-3-GFP lo cual indicaba la formación de una barrera que delimitaba el paso solo en el centro de la hifa. Para poder visualizar la ubicación espacio-temporal de CDC-3-GFP durante la formación del septo se analizaron hifas teñidas con el colorante vital de endomembranas FM4-64 (Figura 23), lo cual permitió visualizar y delimitar la formación del septo, así como observar la incorporación de la membrana en el septo y el comportamiento de las membranas teñidas.



**Figura 23.** Micrografía donde se muestra la distribución de la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP en diferentes fases de formación de los septos. **A)** Hifas teñidas con el colorante vital FM4-64 en donde se muestran las endomembranas

de las vesículas que fluyen en el citoplasma y la membrana plasmática de la hifa. La flecha blanca indica la membrana en un septo ya formado y en donde la proteína CDC-3-GFP ya no está presente después de la formación del septo. **B)** Hifas donde se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP en diferentes puntos de la formación de septos la flecha amarilla indica un septo al inicio de su formación. La flecha roja indica un septo en formación. **C)** superposición de **A** y **B**. Barra = 20 $\mu$ m.

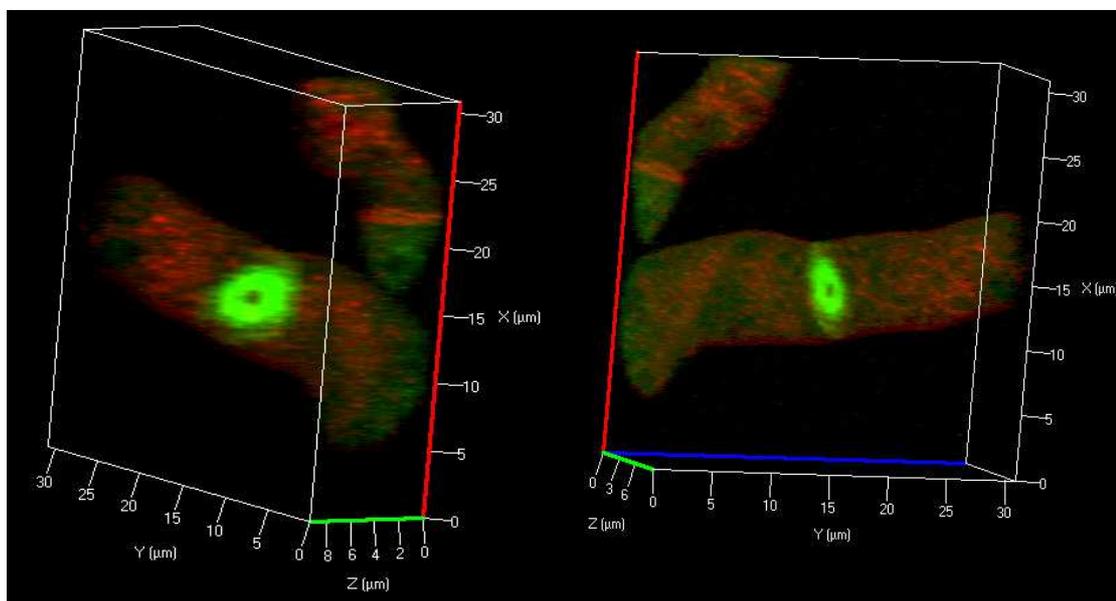
En el análisis por microscopía confocal, se realizaron series de tiempo con el fin de monitorear en vivo los procesos en los que se encontraba implicada la septina CDC-3. En particular se dio seguimiento a la dinámica que mostraba esta proteína durante la formación del septo, encontrando que la acumulación de la proteína se incrementaba paulatinamente hacia el interior de la hifa, acumulándose finalmente solo en el centro en el cual se formaba un poro por donde continuaba el flujo citoplasmático. Este proceso tenía una duración de 8 a 10 min. en promedio antes de que la señal de fluorescencia desapareciera en el centro de la hifa. El recorrido realizado por la septina en este proceso estaba acompañado de la incorporación de membrana durante la formación del septo. Esto se pudo documentar en las series de tiempo realizadas en las hifas que fueron tenidas con FM4-64, en las cuales se podía observar a la proteína CDC-3-GFP colocalizando con la membrana teñida con FM4-64, la cual se incorporaba al septo haciendo el mismo recorrido de la membrana de la hifa, hacia el centro de la misma. Una vez delimitada la estructura del septo, la proteína CDC-3-GFP desaparecía y permanecía la membrana en el septo (Figura 24, Película 3).



**Figura 24.** Secuencia de imágenes donde se muestran hifas con la membrana marcada con el colorante vital FM4-64 (centro) y la proteína CDC-3-GFP (izquierda) en diferentes etapas de la organización del septo. Se puede observar cómo se acumula la proteína en un punto específico de la membrana de la hifa, para posteriormente acumularse y recorrerse hacia el centro de la misma, en donde posteriormente desaparece quedando delimitada la estructura del septo en la que se aprecia la membrana teñida con el colorante FM4-64. En el panel izquierdo se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP, en el panel central se muestra la fluorescencia del colorante FM4-64 y en el panel derecho el sobreposición de ambas proteínas. La participación de la proteína CDC-3-GFP en este proceso dura aproximadamente de 8 a 10 min. Barra 5 $\mu$ m.

#### IV.6 Reconstrucción de septos en 3D

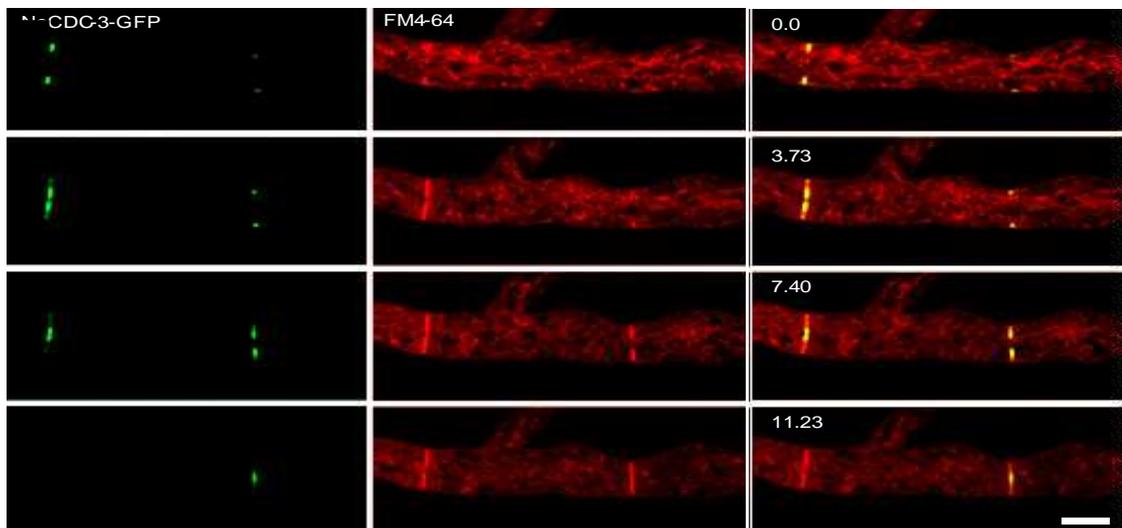
Para visualizar más a detalle la localización de la proteína CDC-3-GFP en el proceso de formación del septo, se realizaron reconstrucciones tridimensionales a más de 200 $\mu\text{m}$  de distancia con respecto a la punta de las hifas. Se obtuvieron de 30 a 50 cortes ópticos de un espesor entre 0.2  $\mu\text{m}$  y 0.7  $\mu\text{m}$ . Se empleó el colorante FM4-64 para delimitar la posición de la septina con respecto a la membrana del septo. Como resultado de lo anterior se pudo constatar la formación de un disco concéntrico que atraviesa longitudinalmente la hifa dejando un poro en el centro. Esta observación concuerda con el comportamiento del flujo citoplasmático durante la formación del septo, en la que se observa que el flujo citoplasmático se reduce paulatinamente en la parte central del septo, a la par del recorrido de la septina (Figura 25).



**Figura 25.** Reconstrucción tridimensional de la septina CDC-3-GFP en el septo donde se muestran hifas con la membrana marcada con el colorante vital FM4-64 y la proteína CDC-3-GFP con estructura en forma de disco con un poro en el centro durante la formación del septo.

#### IV.7 Colocalización de CDC-3-GFP y Chs-1-mChfp en septos

Para complementar el análisis de las septinas y comprender más a fondo su papel en la formación del septo, se analizó la progenie resultante de cruzar cepas que expresan la septina CDC-3-GFP y las cepas que expresan la quitina sintetasa 1 marcada con mCherry (CHS-1-mChFP). Esto permitió observar la distribución espacial y cronológica de estos componentes en el septo. En primer término, se observó que la septina se acumulaba en la membrana de la hifa a la par que la CHS-1-mChFP. Ambas proteínas tienen un recorrido hacia el centro de la hifa. A lo largo del recorrido la septina se acumulaba solo en la parte avanzante durante el recorrido. Inicialmente, se observó que CDC-3-GFP y CHS-1-mChFP colocalizaban, pero conforme se desplazaban hacia el centro de la hifa la septina se concentraba hacia la parte central hasta desaparecer, mientras que la CHS-1-mChFP permanece distribuida a lo largo del septo (Figura 26; Película 4).

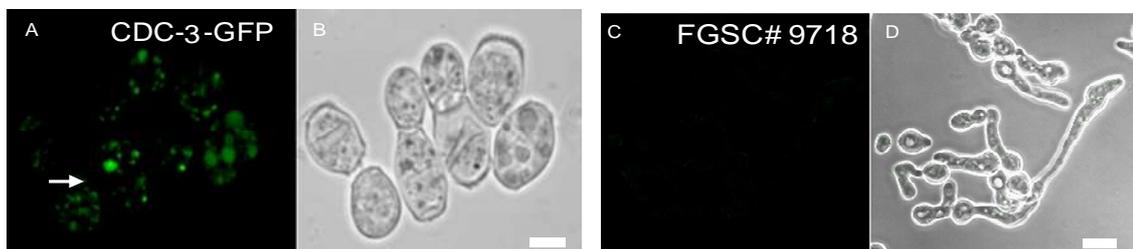


**Figura 26.** Secuencia de imágenes donde se muestra la formación del septo en una hifa de *N. crassa* heterocarión expresando la quitina sintetasa 1 marcada con mcherry (CHS-1-mChFP) y la septina CDC3 marcada con GFP. Se puede observar cómo se acumulan simultáneamente las proteínas en la membrana de

la hifa, para posteriormente adentrarse hacia la parte central de la hifa, en donde posteriormente desaparece la septina y permanece la quitina. La participación de la proteína CDC-3-GFP en este proceso dura aproximadamente un promedio de 8 a 10 minutos. De nuevo eso son segundos en la imagen. En la columna izquierda se muestra la fluorescencia de la proteína CDC-3-GFP; en el panel central se muestra la fluorescencia de la proteína CHS-1-mChFP; en el panel derecho el sobreposición de ambas proteínas. Tiempo aproximado 11 minutos. Barra 5 $\mu$ m.

#### IV.8 Análisis de CDC-3-GFP en conidios y germínulas

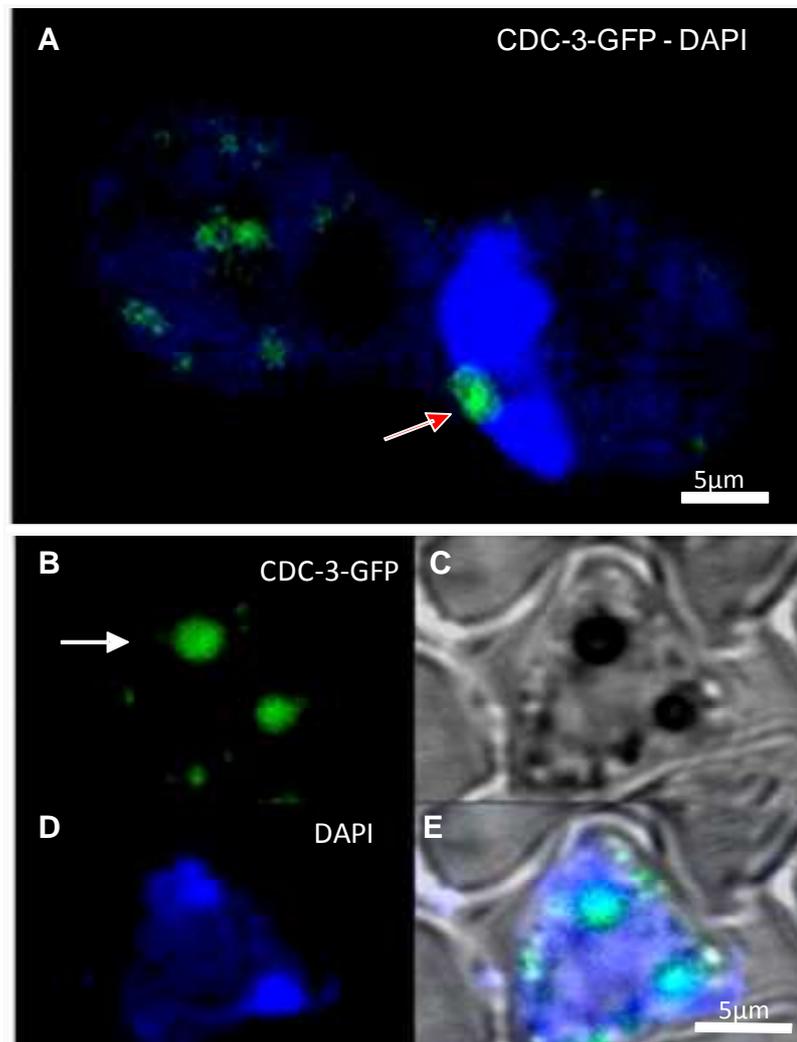
Se analizó la localización que tiene la septina CDC-3 en la germinación de los conidios, así como en los procesos de división mitótica que se presenta con alta frecuencia durante la germinación. Para ello se analizaron conidios y germínulas después de 4 y 5 hrs. de cultivo para poder ver la dinámica de la septina durante la germinación. Los conidios después de 4 hrs. de cultivo, mostraban acumulación de fluorescencia en diferentes zonas, sin embargo no se podía distinguir con precisión la cercanía de estos cúmulos con los núcleos u otro organelo específico (Figura 27). Por otra parte, para contrastar y descartar que la fluorescencia detectada en las acumulaciones fuera resultado de autofluorescencia, se analizaron conidios de cepas silvestres que carecían de marcaje. Estas observaciones también se realizaron bajo los mismos parámetros microscópicos que para la cepa transformante.



**Figura 27.** Conidios de la cepa CDC-3 después de 3 horas de inoculación y como control la cepa FGSC9718. **A)** Se muestran puntos de la septina CDC-3-GFP en el

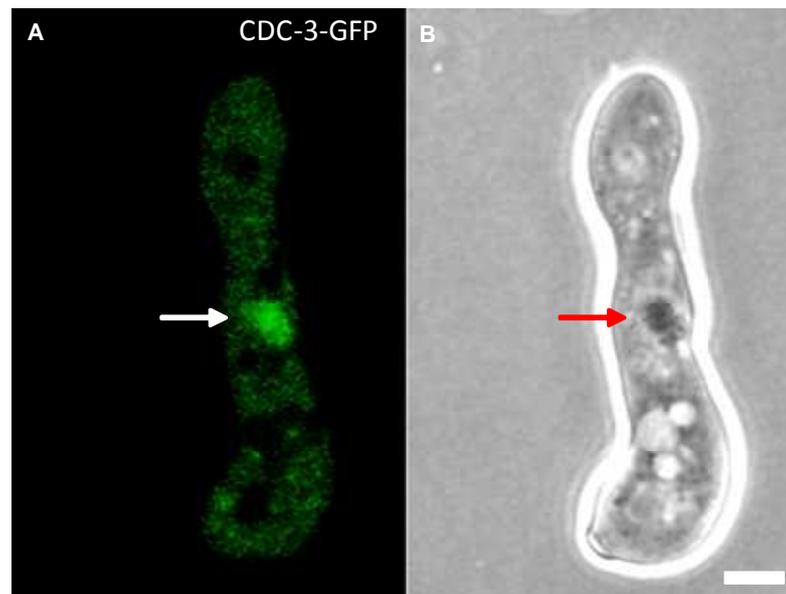
centro del conidio (flecha blanca). **B)** Contraste de fases. **C)** Conidios de la cepa 9718. **D)** Contraste de fases. Barras 2 $\mu$ m.

Para analizar si la septina CDC-3-GFP se localizaba en los núcleos de los conidios, inicialmente se procedió a la fijación y tinción con DAPI de los núcleos de los conidios después de 3 hrs. de inoculación. En este análisis se logró apreciar en un número de 20 conidios, con acumulaciones circulares con alta intensidad de fluorescencia que se localizaron en varios casos adyacentes a los núcleos marcados con DAPI y en otros casos sobre los mismos núcleos (Figura 28). Este resultado sugirió que la septina CDC-3 pudiera estar interactuando con los núcleos, pero aún no se podía definir con certeza su colocación con los mismos, debido a las características de la técnica, la cual solo permite el análisis de organismos inertes y no se aprecia la dinámica de los procesos en este caso de la interacción septina-núcleo (Figura 28).



**Figura 28.** Conidios de la cepa *cdc-3-gfp* después de 3 hrs. de inoculación fijados con metanol y ácido acético (3:1) y los núcleos teñidos con DAPI. **A)** Conidios con la septina CDC-3-GFP en medio de dos núcleos (flecha roja). **B)** Cúmulos circulares de CDC-3-GFP posicionados sobre núcleos (flecha blanca). **C)** Contraste de fases donde se aprecian los núcleos. **D)** Núcleos teñidos con DAPI. **E)** sobreposición de **A** y **B** donde se puede observar la colocalización de puntos fluorescentes de CDC-3- GFP sobre núcleos teñidos con DAPI. Barra 2  $\mu\text{m}$  en A y 5  $\mu\text{m}$  en B.

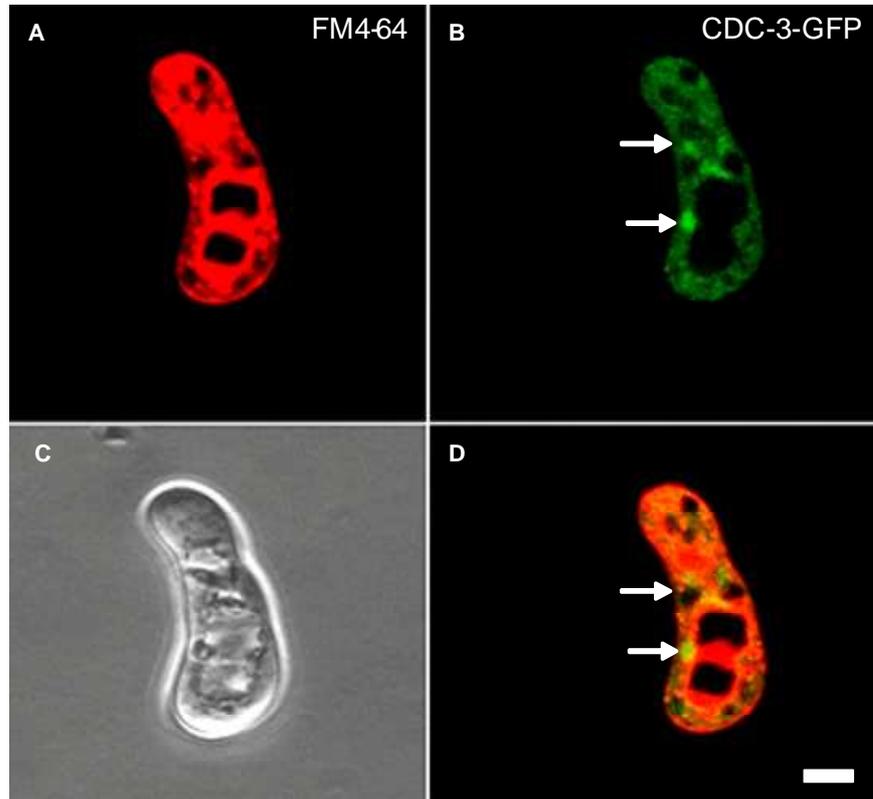
Siguiendo el análisis del desarrollo de los conidios, se monitorearon por microscopía confocal germínulas de la cepa *cdc-3* después de 4 hrs. de ser inoculadas para poder observar la dinámica de la septina y su participación en el crecimiento del tubo germinativo. Como resultado de esto se observaron cúmulos grandes de CDC-3-GFP en regiones intermedias del tubo germinativo (Figura 29).



**Figura 29.** Micrografía confocal de barrido en donde se muestran germínulas de la cepa *cdc-3-gfp* después de 4 hrs. de inoculación. **A)** Cúmulos de fluorescencia intensa en la zona intermedia de la germínula (flecha blanca). **B)** Contraste de fases de germínula con cúmulo de septinas en medio del tubo germinativo (flecha roja). Barra 5 $\mu$ m.

Para poder contrastar con algunas estructuras internas de los conidios como vesículas con los que pudiera estar colocalizando los puntos y cúmulos de la septina CDC-3 se tiñeron las células con el colorante vital FM4-64 y se analizó la posición de la fluorescencia con respecto las membranas. Las observaciones obtenidas en más de 20 conidios analizados muestran que los puntos de

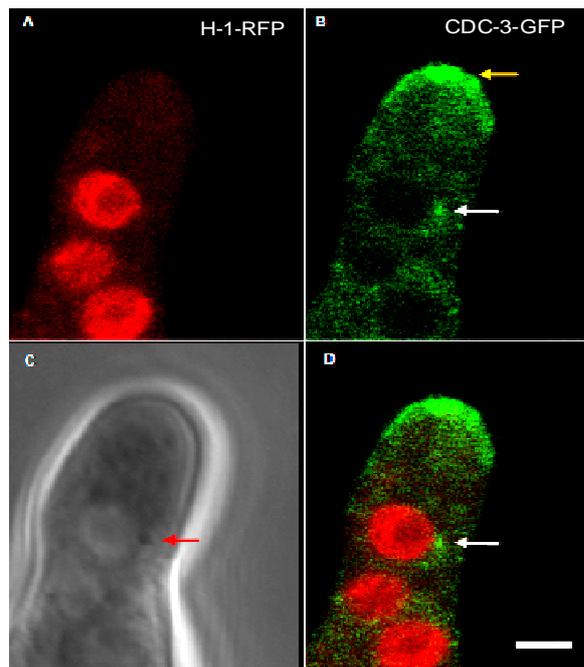
fluorescencia observados en los conidios no se encontraban dentro de vesículas sino adyacentes a estructuras que pudiesen ser núcleos (Figura 30; Película 5).



**Figura 30.** Germínulas de la cepa *cdc-3-gfp* después de 4 hrs. de inoculación y teñidas con el colorante FM4-64. **A)** Conidios con la membrana celular y membranas vacuolares teñidas con FM4-64. **B)** En esta micrografía se observan puntos de fluorescencia junto a estructuras que podrían ser núcleos. **C)** Vista en contraste de fases. **D)** Sobreposición de **A** y **B** donde se puede contrastar la localización de membranas y puntos fluorescentes de CDC-3-GFP. Barra 5 $\mu$ m.

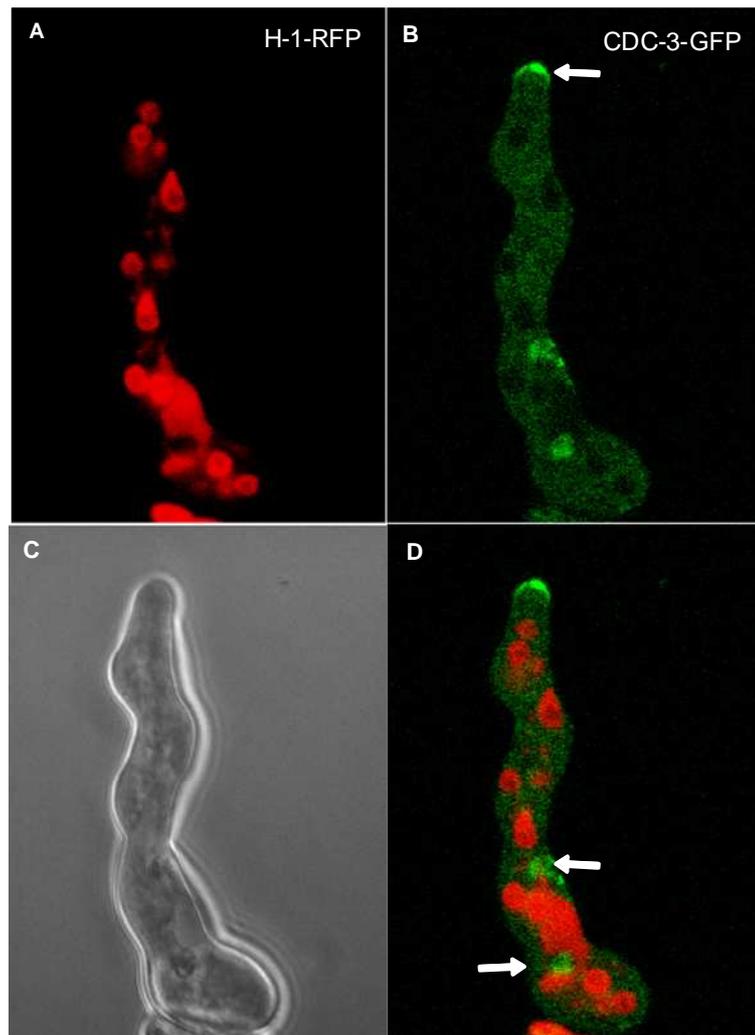
## IV.9 Cruzas

Se procedió a realizar el análisis por microscopía confocal de las cepas homocariones resultantes de cruzas. En primer lugar se analizó la cepa con la histona H1 marcada con la proteína roja cruzada con la transformante *cdc-3-gfp*. Con esta crusa se logró obtener una cepa apta para visualizar la localización de la septina y nucleos marcados simultáneamente en células vivas. Se analizaron las germínulas después de 4 y 5 hrs. de crecimiento. Se encontró fluorescencia en las zonas apicales concentrada la membrana apical y en ocasiones con una acumulación mayor en el centro de la punta (Figuras 31 y 32). La distribución de fluorescencia encontrada en las puntas es diferente a la reportada en hifas maduras ya que no se observa fluorescencia en las regiones subapicales.



**Figura 31.** Micrografía en la que se observa el ápice de una germínula de la cepa con la histona 1 marcada con la proteína roja fluorescente (H1-RFP) y la septina CDC-3-GFP. **A)** Núcleos con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en la periferia de la membrana apical con una acumulación

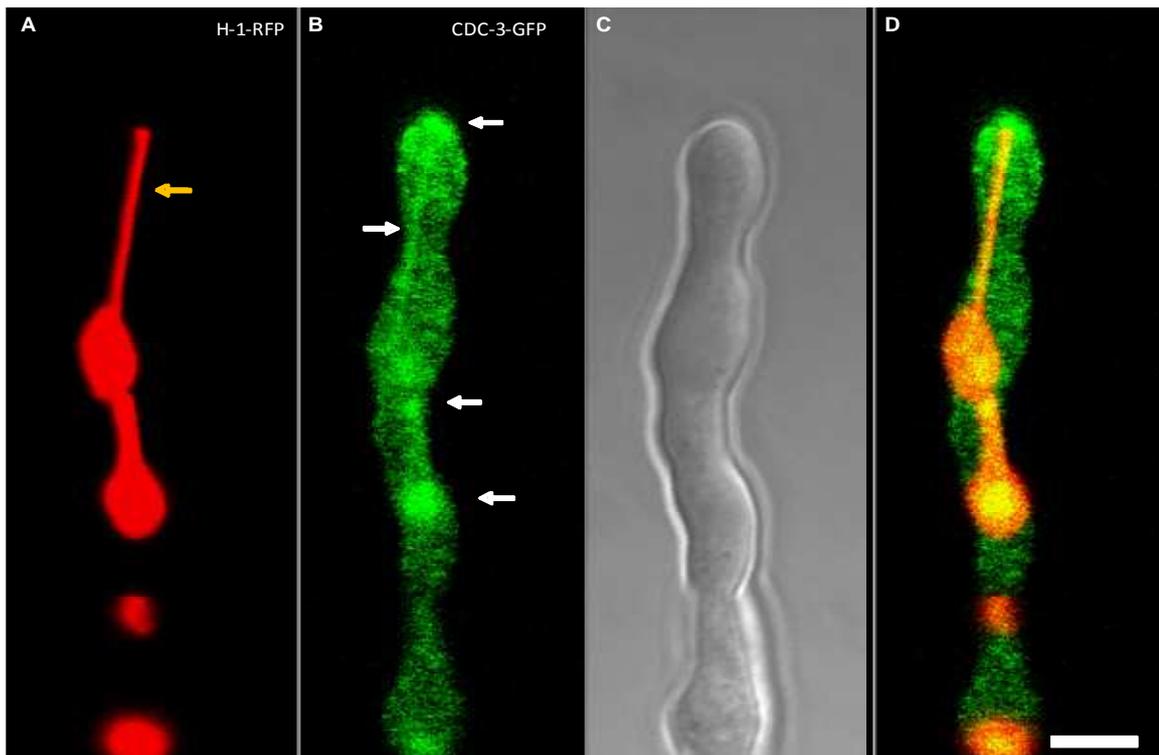
mayor en la zona central de la punta (flecha amarilla). También se observa un cúmulo de fluorescencia junto a uno de los núcleos (flecha blanca). **C)** Vista en contraste de fases donde se aprecian los núcleos, en uno de ellos se observa una estructura circular adyacente que concuerda con la fluorescencia de la septina CDC-3-GFP (flecha roja). **D)** sobreposición de **A, B y C**. Barra 2 $\mu$ m.



**Figura 32.** Micrografía en la que se observa una germínula con H1-RFP y la septina CDC-3-GFP después de 4 hrs. de crecimiento. **A)** Núcleos con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en la periferia de la membrana apical con una acumulación mayor en la zona correspondiente a la

zona central de la membrana apical; también se observan dos acúmulos de fluorescencia cerca de un grupo de núcleos (flechas blancas). **C)** Vista en contraste de fases. **D)** Sobreposición de **A**, **B** y **C**. Barra 5 $\mu$ m.

Durante el análisis de fluorescencia realizado en los ápices de las germínulas se observaron aparentes hebras de cromatina extendiéndose hacia la zona apical. Fenómenos similares se observaron en otras ocasiones en núcleos en la zona subapical en donde aparentes proyecciones de cromatina se observaban entre los núcleos mostrando algunos cúmulos de septina en las hebras de cromatina. Este fenómeno se describirá mas adelante (Figura 33).

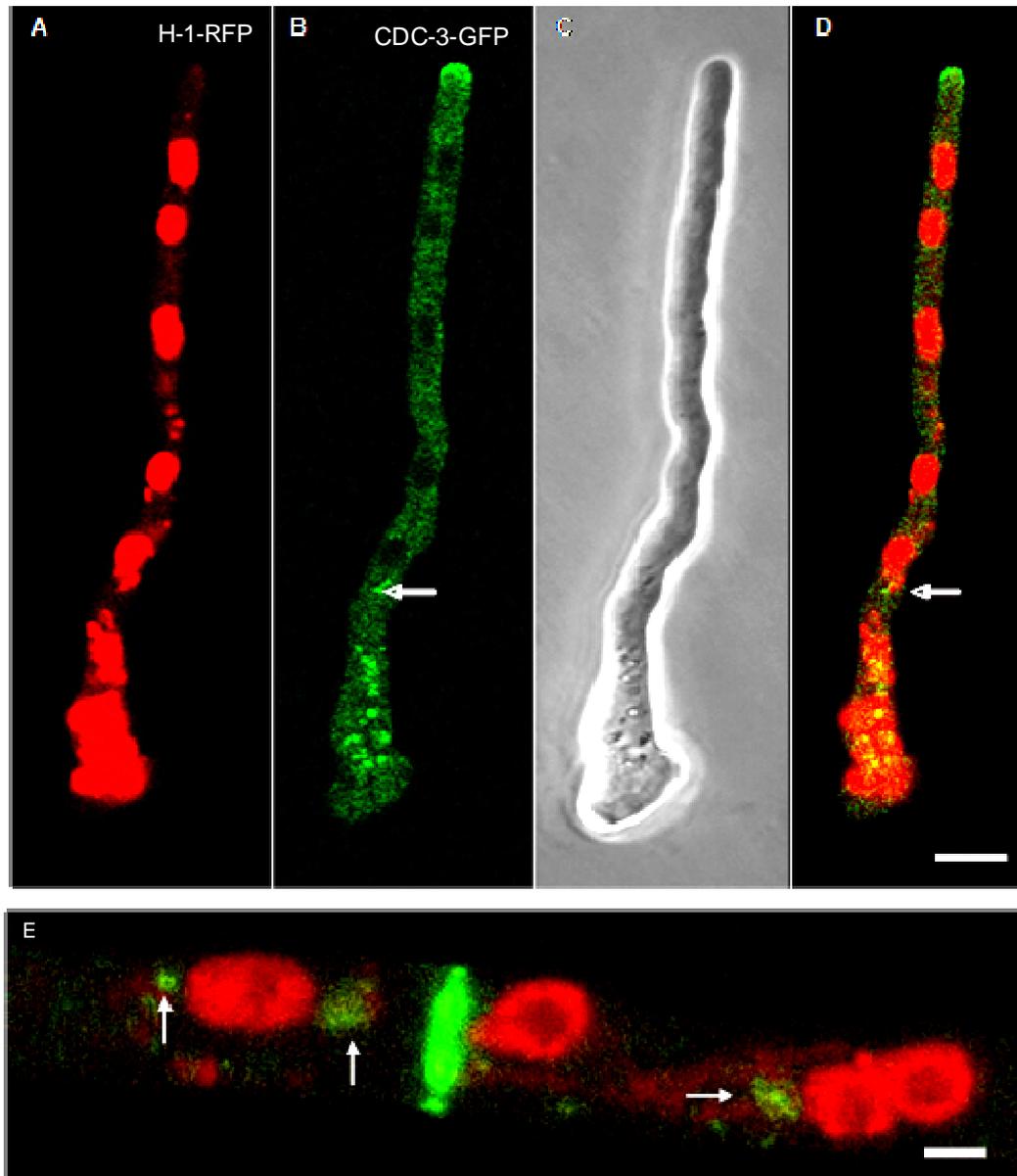


**Figura 33.** Micrografía en la que se observa lo que aparentemente es una proyección de cromatina hacia el ápice (flecha amarilla). **A)** Cromatina con la histona 1 marcada en rojo. **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en la

periferia de la membrana apical, también se observa fluorescencia de esta proteína colocalizando con la proyección de cromatina. Aunado a ello se observan dos puntos de fluorescencia en diferentes zonas del núcleo (Flechas blancas). **C)** Vista en contraste de fases. **D)** Sobreposición de **A**, **B** y **C**. Barra 5 $\mu$ m.

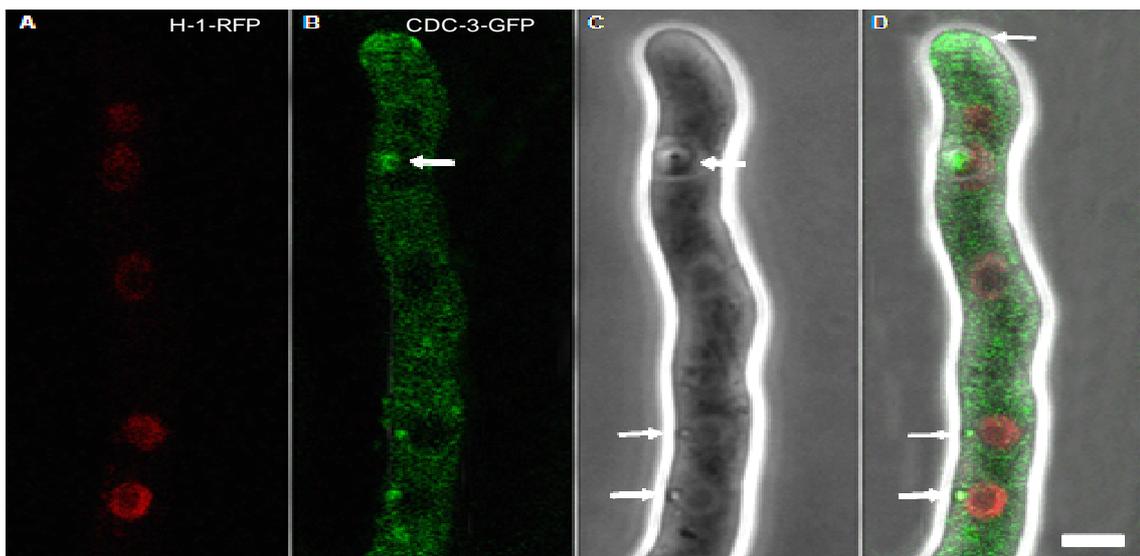
Después de haber observado los fenómenos ocurridos en el ápice nos enfocamos en analizar la localización de la septina en los núcleos, obteniendo resultados interesantes. En primer lugar observamos que los cúmulos de septinas en la zona intermedia de las germínulas mencionados con anterioridad estaban entre con acumulaciones de cromatina.

La acumulación de ambos componentes era dinámica y después de un tiempo variable las dos acumulaciones se fragmentaban y se dispersaban a lo largo del citoplasma, sin que los fragmentos de cada una de ellas dejaran de estar cercanas (Figura 34). A partir de la acumulación de la cromatina observada se organizaban los núcleos y otras estructuras aparentemente de cromatina en forma de hebra. Cabe resaltar que las posibles hebras de cromatina en las zonas adyacentes a los núcleos colocalizaban cúmulos de la septina en estudio (Figura 34, Película 6). Estos fenómenos fueron documentados en 60 germínulas en diferentes cultivos.

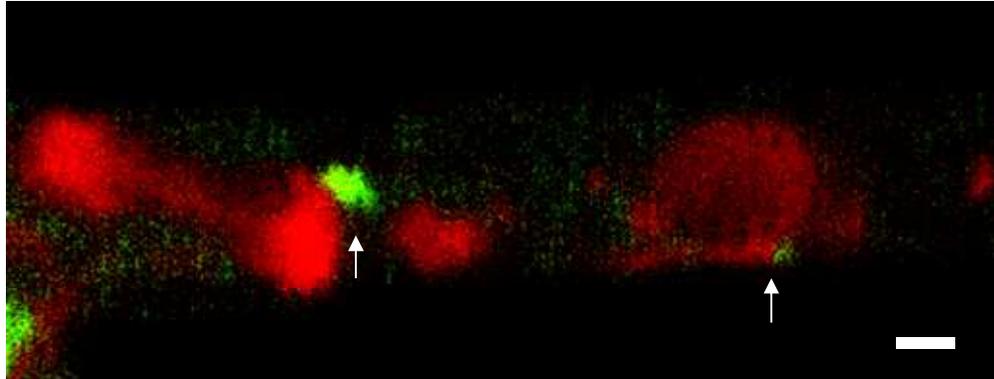


**Figura 34.** Acumulaciones de la septina CDC-3-GFP junto con la cromatina. **A)** Cromatina marcada en rojo por la histona H1. **B)** Proteína CDC-3-GFP dispersándose en el citoplasma. **C)** Vista en contraste de fases donde también se aprecian cúmulos de septinas. **D)** Sobreposición de **A**, **B** y **C** en el que se puede ver la colocalización de la septina sobre fragmentos de cromatina (flecha blanca). **E)** Hebras de cromatina entre los núcleos en división y cúmulos de septina sobre ellos (flechas blancas). Barra 10 $\mu$ m y 5 $\mu$ m.

Durante el análisis realizado directamente en los núcleos, se pudo apreciar cúmulos circulares de la proteína CDC-3-GFP asociados directamente a los núcleos; éstos se observaban colocalizando sobre el núcleo o adyacentes al mismo. La observación de esta interacción dependía de la perspectiva y el ángulo en el cual se observara el núcleo, debido a la dinámica de los núcleos en el citoplasma y a la fase de mitosis en la que se encontraban. Por otro lado la observación realizada por contraste de fases permitía ver la refracción de las estructuras circulares en donde se localizaba la proteína CDC-3-GFP lo cual nos permitía definir la ubicación de las septinas en el núcleo (Figura 35; Película 7).



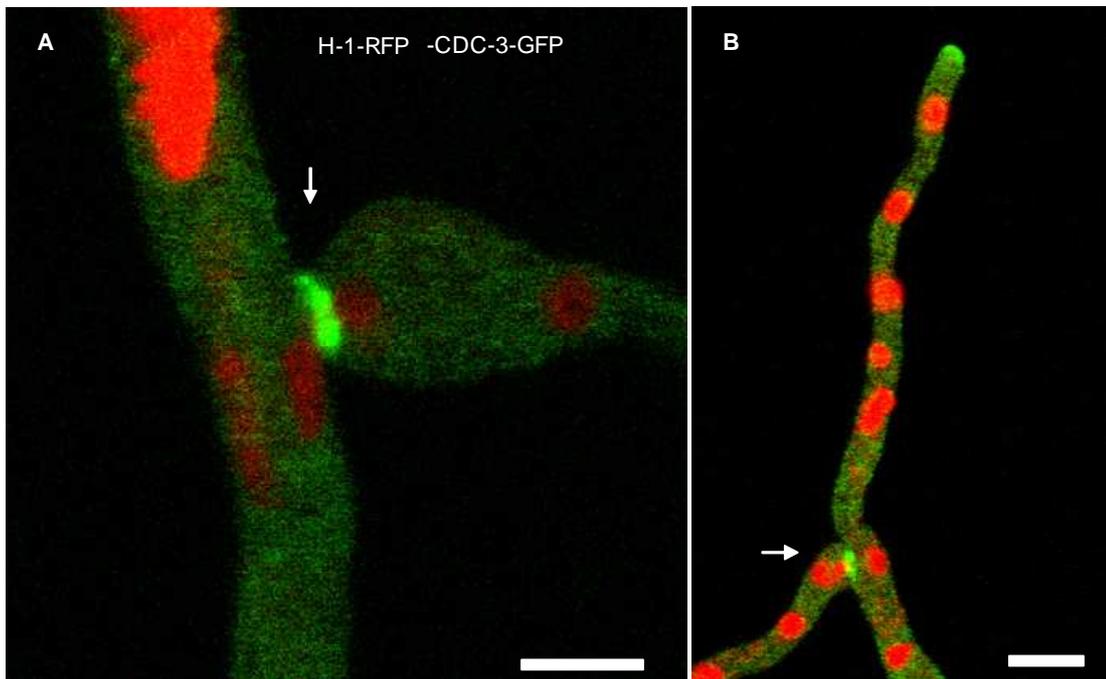
**Figura 35.** Estructuras circulares de la septina CDC-3-GFP en núcleos **A)** Núcleos marcados en rojo por la histona H1. **B)** acumulación circular de la proteína CDC-3-GFP. **C)** Vista en contraste de fases en donde se observan cúmulos isométricos junto a los núcleos fases. **B)** Sobrelape de contraste de fases y la fluorescencia en donde se pueden ver cúmulos de la proteína CDC-3-GFP junto a los núcleos (flechas blancas). Barra 5 $\mu$ m.



**Figura 36.** Cúmulos de la septina CDC-3-GFP junto a un núcleo en división. Se puede observar un núcleo en división con cúmulo adyacente de la proteína CDC-3-GFP (flechas blancas). Barra 5 $\mu$ m.

#### **IV.10 Septinas en anastomosis**

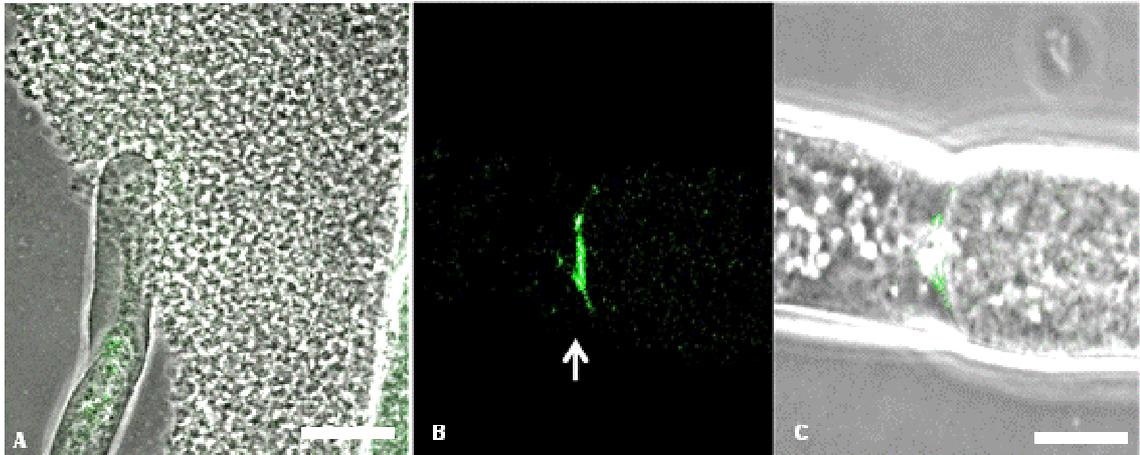
Durante el monitoreo del desarrollo de las germínulas, también se observó que la septina CDC-3-GFP estaba presente en las zonas de contacto entre las hifas en procesos de anastomosis. Se observó una acumulación de septina CDC-3-GFP en un ápice momentos antes de hacer contacto con otra hifa. Después del contacto se generaba la formación de un anillo que desaparecía después del contacto. El tiempo que se observaba la septina en este proceso fue variable de un evento a otro (Figura 37).



**Figura 37.** Hifas en proceso de anastomosis, durante el cual se forma un anillo de septinas. A-B) Anillo de septinas CDC-3-GFP (flecha blanca). Barra 10 $\mu$ m.

#### IV.11 Papel de las septinas durante la fuga de citoplasma en septos

Cuando las hifas sufrían una ruptura de la membrana y pared celular y como consecuencia el material citoplasmático se fugaba al medio extracelular, la proteína CDC-3-GFP se acumulaba en torno al poro central del primer septo cercano a la fuga y bloqueaba el flujo citoplasmático evitando la muerte de toda la hifa. Este fenómeno pudo observarse en varias ocasiones en respuesta a la pérdida de material citoplasmático (Figura 38).



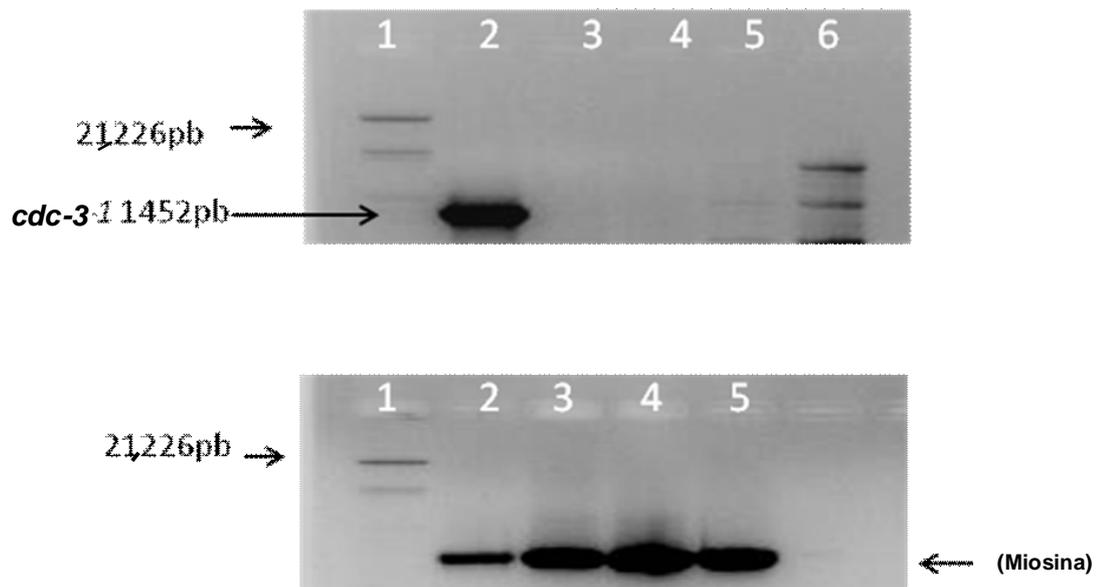
**Figura 38.** Micrografías donde se muestran hifas con trauma y pérdida de material citoplasmático y a la septina en el lugar donde se detiene el flujo del citoplasma en el septo más cercano a la fuga. **A)** Hifa con pérdida de material citoplasmático en la punta; **B)** Acumulación de la septina CDC-3-GFP en el poro del septo (flecha blanca) para evitar la fuga de citoplasma. **B)** Contraste de fases el septo de la hifa atrofiada. **C)** Sobreposición de **B** y **C**, donde se ve la septina en el centro del poro bloqueando la salida de citoplasma. Barra, 10  $\mu\text{m}$  A y 5  $\mu\text{m}$  en B y C.

#### IV.12 Análisis de las mutantes

Para analizar del papel de la septina en la morfogénesis, se utilizaron cepas carentes del gen de la septina  $\Delta cdc-3$  para observar las repercusiones en el fenotipo. En primer término se comprobó la carencia del gen de cada mutante utilizadas en este estudio, mediante su amplificación por PCR y comprobación en un gel de agarosa. Se corroboró que todas las mutantes utilizadas en este estudio (Tabla VI) carecían del gen de la septina *cdc-3* (Figura 39).

**Tabla VI.** Mutantes de la septina  $\Delta cdc-3$  utilizadas en este estudio.

#	FGS	Genotipo	Procedencia
1	FGSC #11972	<i>Mat A</i> Homocarion	Laboratorio de Dartmouth
2	FGSC #11971	<i>Mat a</i> Homocarion	Laboratorio de Dartmouth
3	FGSC #11147	<i>Mat a</i> Homocarion	Laboratorio de Louise Glass
4	FGSC #11146	<i>Mat A</i> Homocarion	Laboratorio de Louise Glass



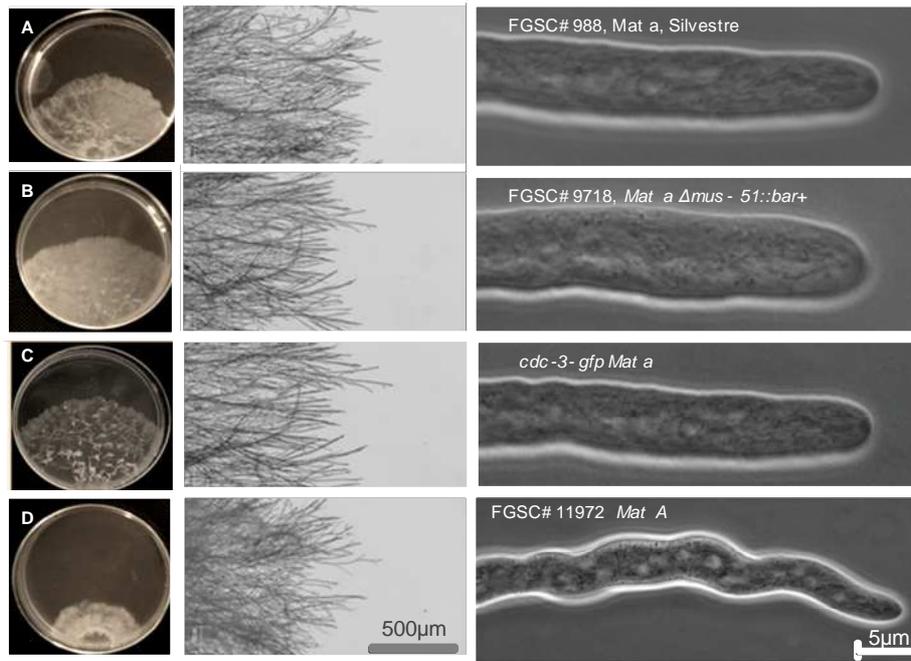
**Figura 39.** Comprobación de las cepas mutantes. Se muestran los geles en donde se comprueban la ausencia del gen de la septina en las mutantes. En ambos geles se muestra: el genoma del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (**carril 1**). Amplificación del gen *cdc-3* usando como templado ADN de la cepa silvestre (**carril 2**). Amplificación del gen *cdc-3* usando como templado ADN de las cepas mutantes (carriles**3-6**). En el gel inferior se utilizo la amplificación de un gen testigo (miosina 2) para corroborar la presencia de DNA (**carriles 2-5**).

#### IV.13 Análisis de mutantes en nivel macroscópico

Para el análisis macroscópico y microscópico se seleccionó una de las cepas mutantes FGSC# 11972 *Mat A* (Tabla VI) y se comparó con la cepa silvestre FGSC# 988, la cepa FGSC# 9718 usada para hacer la transformación, y la cepa transformada obtenida en este estudio.

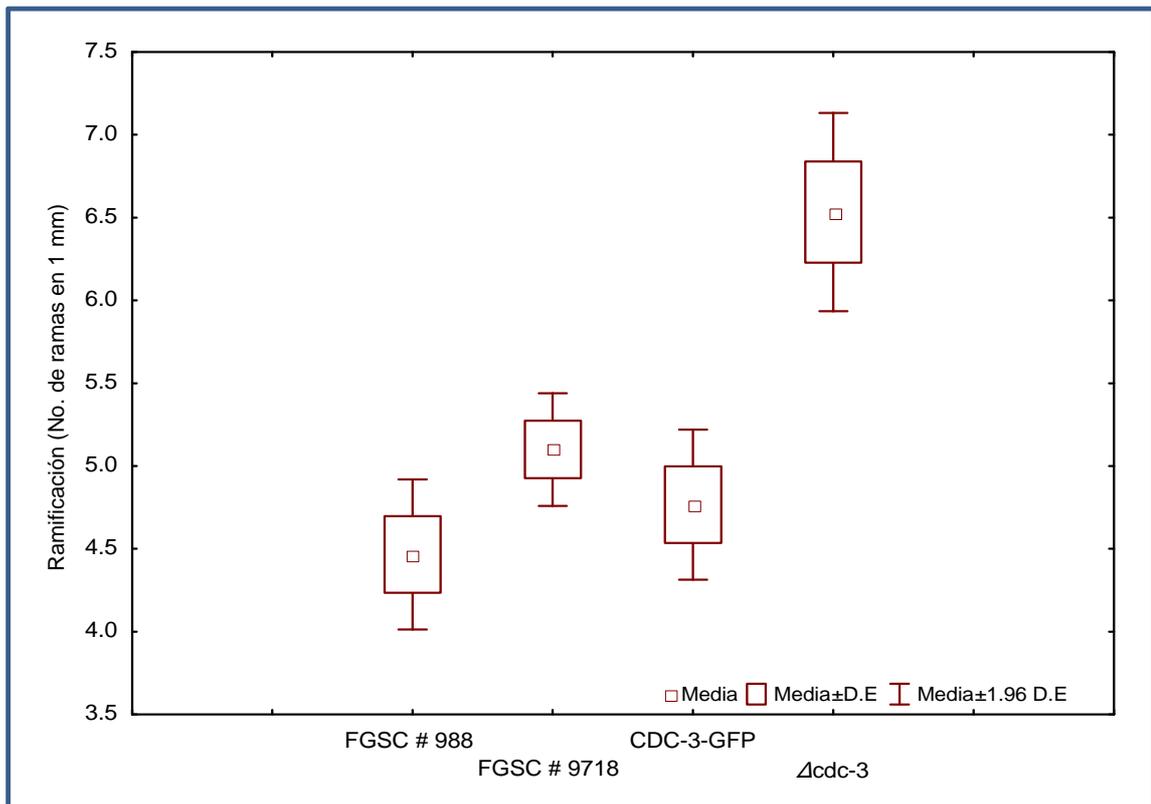
Se observó que las cepas FGSC# 988, FGSC# 9718 y *cdc-3-gfp* presentaban características muy similares a la cepa silvestre en cuanto a crecimiento, aspecto de la colonia, ramificación, y aspecto hifoide, y comunes en cepas silvestres. En contraste, la cepa mutante mostraba un crecimiento colonial menor, un aspecto

algodonoso que se presentaba en forma de capas, una mayor ramificación e hifas amorfas y de diámetro menor (Figuras 40 ,41 y 42).



**Figura 40.** Análisis macroscópico y microscópico de la mutante  $\Delta cdc-3$  en condiciones de estrés a 37°C. Se muestra la morfología y el crecimiento colonial, el nivel de ramificación y la morfología característica de las hifas de cada una de las cepas. **A)** Cepa FGSC# 988 muestra un crecimiento normal, una ramificación normal y una morfología hifoide de la célula. **B)** Cepa FGSC# 9718: se observa un crecimiento similar al de la cepa silvestre, sin ramificaciones excesivas y una forma hifoide de la célula. **C)** Cepa *cdc-3-gfp*: se puede observar que el crecimiento de la colonia y la ramificación es similar al de la cepa FGSC# 9718 y la silvestre, la forma de la célula es hifoide. **D)** La mutante FGSC# 11972 presenta un crecimiento de la colonia menor; el aspecto de la colonia es algodonoso y se observan capas en el micelio; la ramificación es mayor y ocasionalmente se observaron hifas tenían un menor diámetro y eran onduladas.

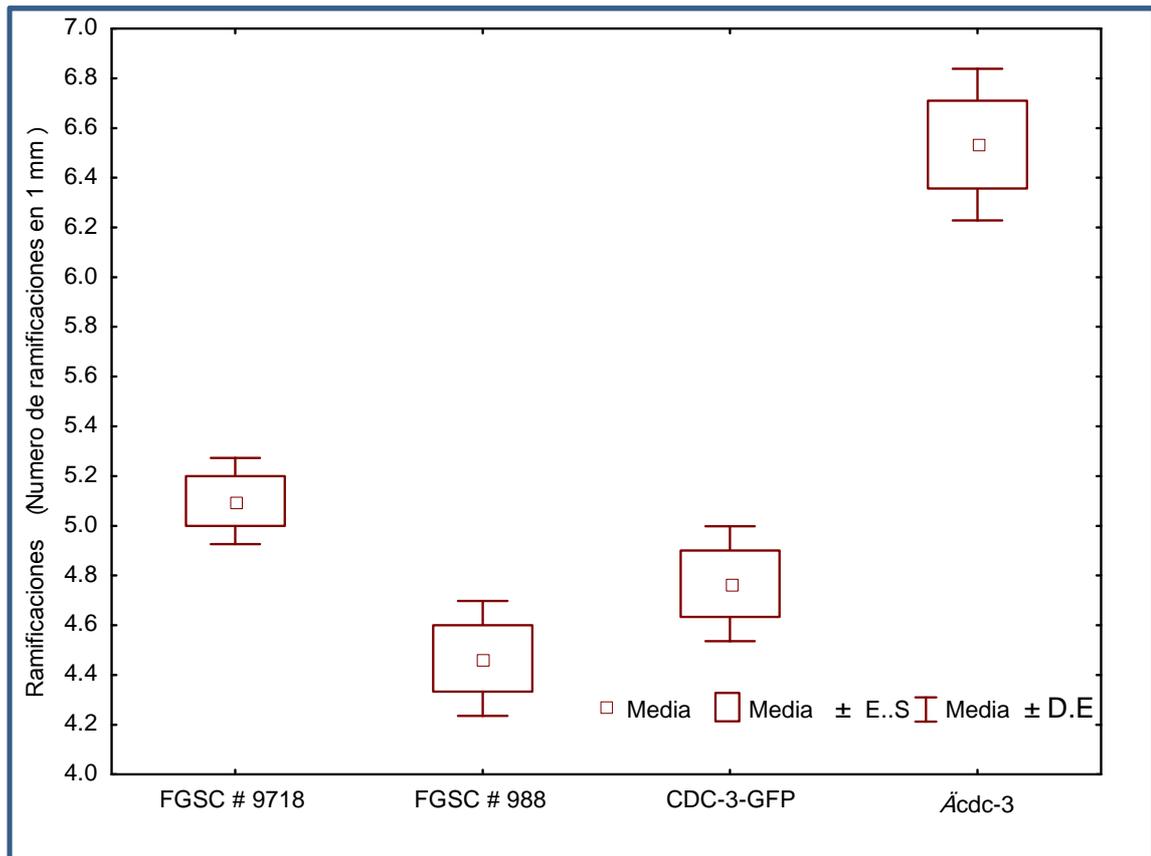
#### IV.13.1|Estadística descriptiva de ramificaciones



**Figura 41.** Gráfica que describe los promedios de ramificación de 3 muestras independientes de cada una de las cepas de *N. crassa*: mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, control FGSC# 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 30°C. Podemos observar que los promedios de ramificaciones la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  es mayor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988.

### Prueba de *Kruskal-Wallis* para comparar medias de ramificaciones

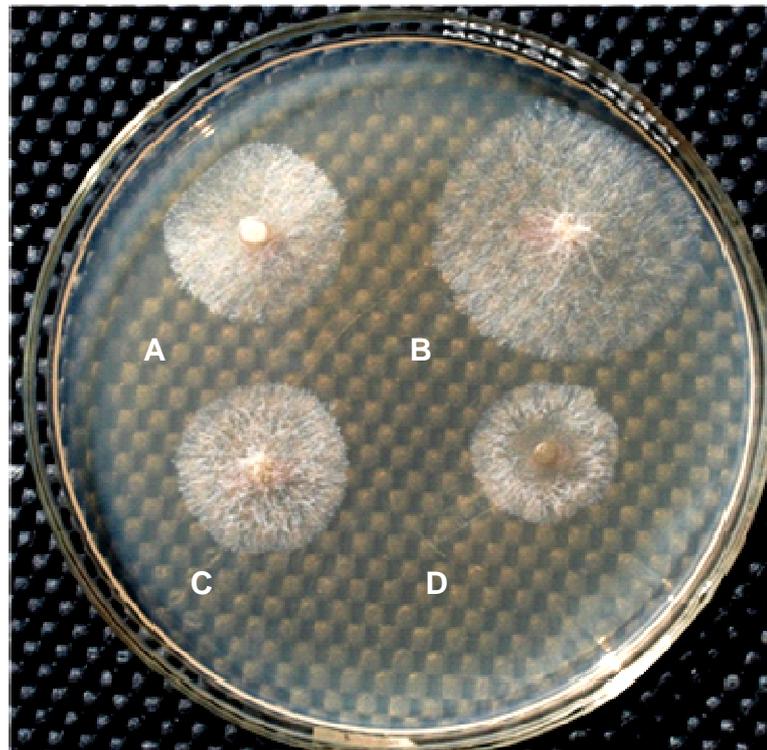
Nota: D.E.: desviación estándar, Dif.: diferencia, g.l.: grados de libertad.



**Figura 42.** Gráficas de ramificación. Se muestran las gráfica resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta la ramificación de la cepa mutante  $\Delta$ cdc-3 contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC#9718 y silvestre FGSC# 988 a 30°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que hay diferencias significativas entre las medias de ramificación de las diferentes cepas con una  $p < .0250$ , La cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta$ cdc-3 con respecto a la cepa control FGSC# 988 con una  $p < 0.027868$  (Apendice II).

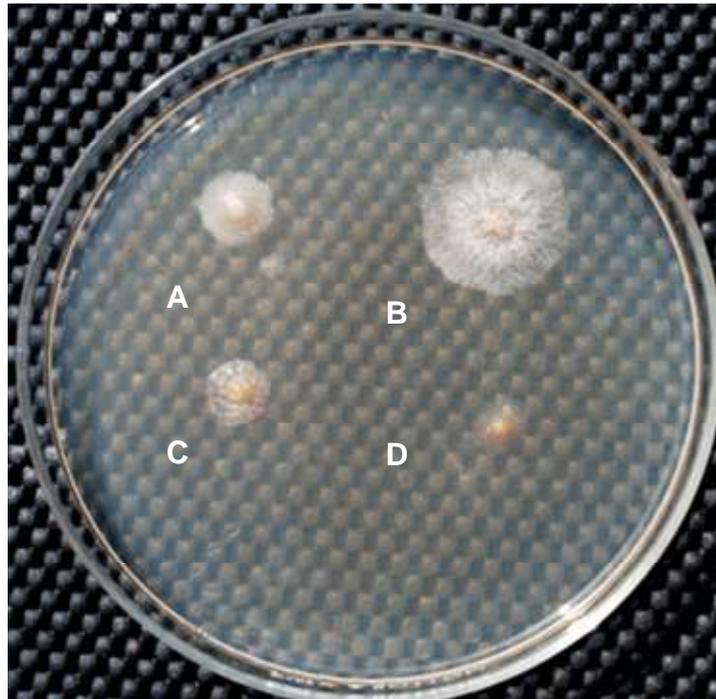
#### IV.14 Crecimiento

Se analizó y comparó a nivel colonial las diferencias de crecimiento y morfología que presentaban la cepa mutante y la cepa FGSC# 9718, la cepa *cdc-3-gfp* y la cepa silvestre FGSC# 988, cultivadas tanto a 30°C como a 37°C. En ambas condiciones se pudo observar una diferencia en cuanto al crecimiento de cada una de las cepas. La cepa mutante  $\Delta cdc-3$  presentó menor diámetro de crecimiento colonial seguida de la cepa transformante así como de la cepa silvestre y la cepa FGSC# 9718 (Figuras 43, 44).



**Figura 43.** Comparación de crecimiento colonial a 30°C de las cepas silvestre FGSC# 988, FGSC# 9718, *cdc-3-gfp* y mutante FGSC# 11972  $\Delta cdc-3$ . A) Cepa silvestre FGSC# 988 en donde se observa un crecimiento normal. B) Cepa FGSC# 9718 en donde se realizó la transformación. C) *cdc-3-gfp* observamos que el

crecimiento de la cepa es similar al de la cepa wt. D)  $\Delta cdc-3$  en esta cepa el crecimiento es menor con respecto a todas las demás.

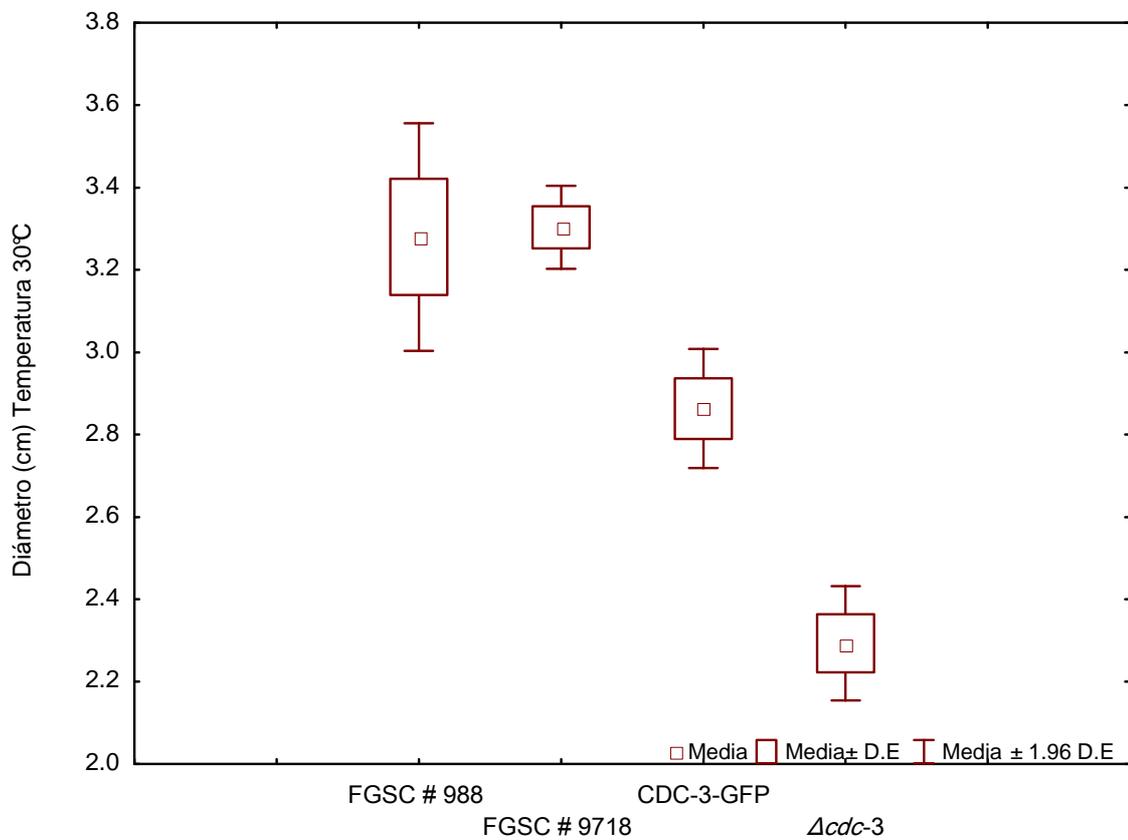


**Figura 44.** Comparación de crecimiento colonial a 37°C de la cepa silvestre FGSC3 988, FGSC# 9718, la cepa *cdc-3-gfp* y la cepa mutante FGSC# 11972  $\Delta cdc-3$ . **A)** Colonia de la cepa *silvestre* en donde se observa un crecimiento normal pero menor que a 30°C. **B)** Colonia de la cepa FGSC# 9718. **C)** Colonia de la cepa *cdc-3-gfp* observamos similitud con el crecimiento de la cepa silvestre. **D)** Colonia de la cepa mutante FGSC#11972  $\Delta cdc-3$ .

## IV.15 Tasa de crecimiento

### IV.15.1. TEMPERATURA 30°C y 24 horas de cultivo

#### IV.15.1.1 Estadística descriptiva

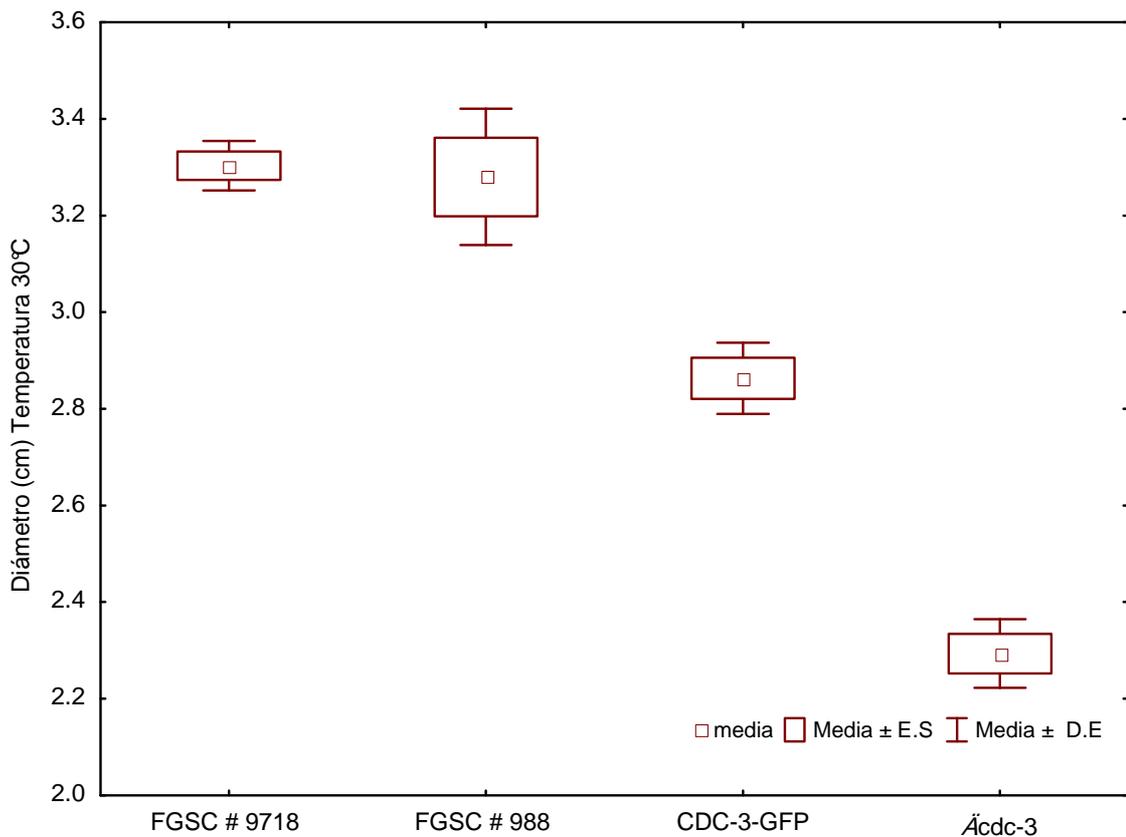


**Figura 45.** Gráfica que describe los promedios del diámetro del crecimiento de tres muestras independientes de cada una de las cepas. de *N. crassa*: Mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, Control FGSC # 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 30°C. Podemos observar que los promedios de crecimiento de la cepa Mutante  $\Delta cdc-3$  es menor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC9718 y silvestre FGSC988.

#### IV.15.1.2 Prueba de *Kruskal-Wallis* para comparar medias de crecimiento.

Nota: D.E.: desviación estándar, Dif.: diferencia, g.l.: grados de libertad.

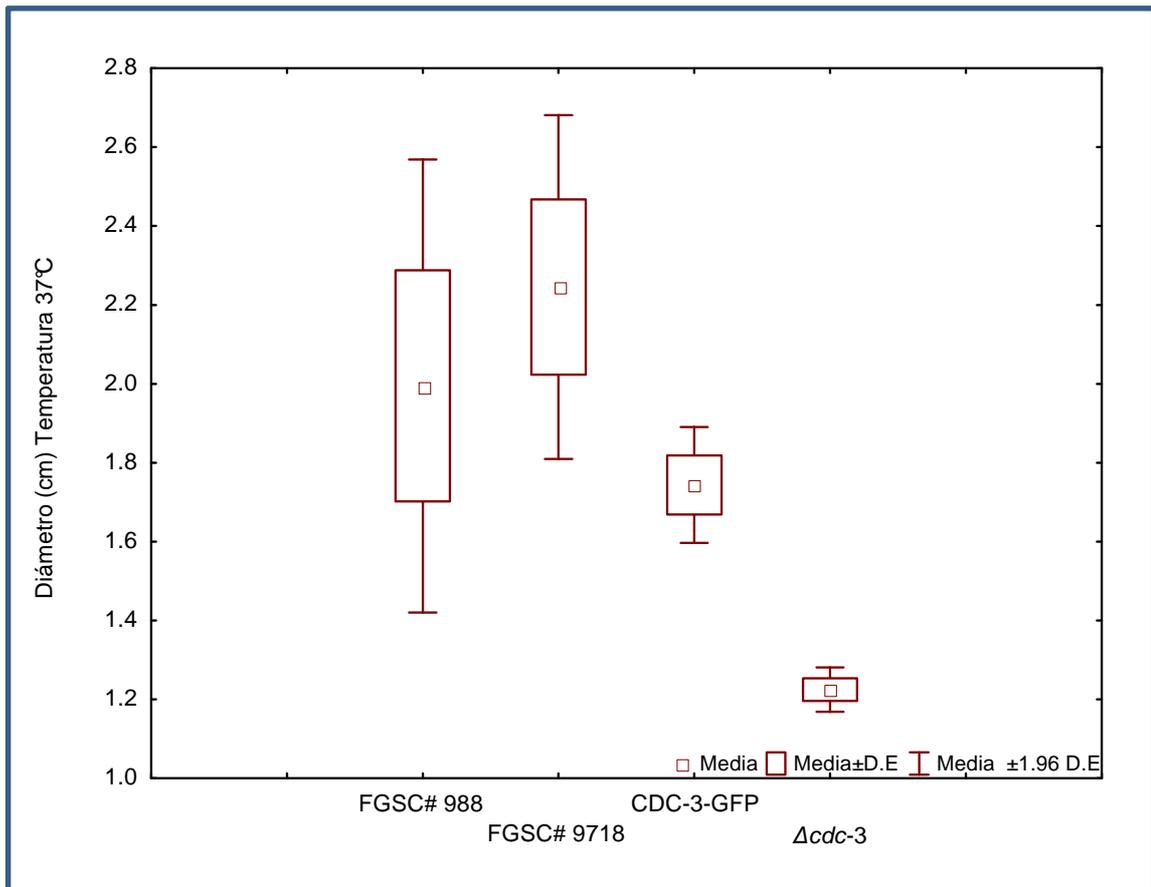
Cepa mutante  $\Delta cdc-3$  comparadas con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988.



**Figura 46.** Gráficas de diámetro de crecimiento. Se muestran las gráficas resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta el diámetro de crecimiento de la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988 a 30°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que a 30°C hay diferencias significativas entre las medias del diámetro de crecimiento de las diferentes cepas con una  $p < 0.0241$ , la cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  con respecto a la cepa control FGSC# 9718 con una  $p < 0.046766$  (Apendice II).

## IV.15.2.TEMPERATURA 37°C y 24 horas de cultivo

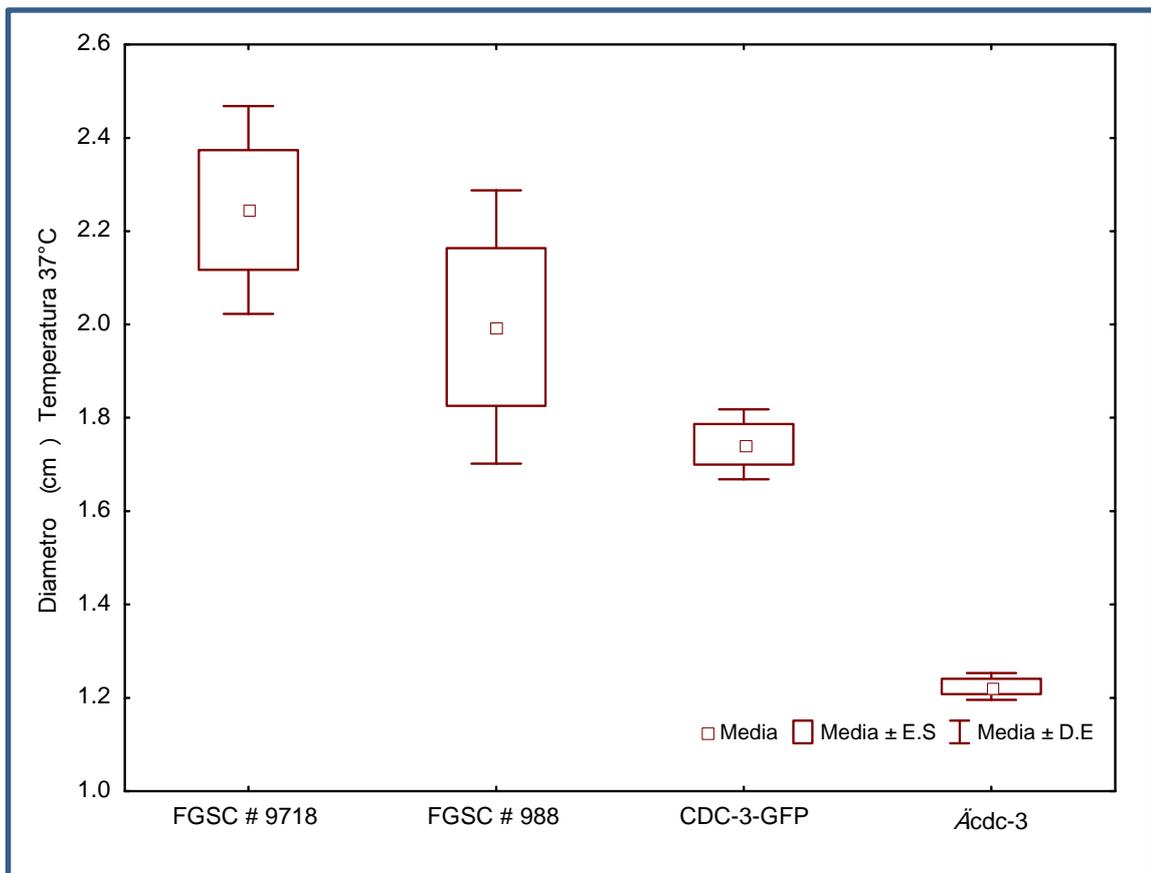
### IV.15.2.1 Estadística descriptiva



**Figura 47.** Gráfica que describe los promedios del diámetro de crecimiento de tres muestras independientes de cada una de las cepas de *N. crassa*: Mutante  $\Delta cdc-3$ , CDC-3-GFP, Control 9718 y silvestre después de 24 hrs. de cultivo a 37°C. Podemos observar que los promedios del diámetro de crecimiento de la cepa Mutante  $\Delta cdc-3$  es menor en comparación con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC# 9718 y silvestre FGSC# 988.

#### IV.15.2.2 Prueba de *Kruskal-Wallis* para comparar medias de crecimiento.

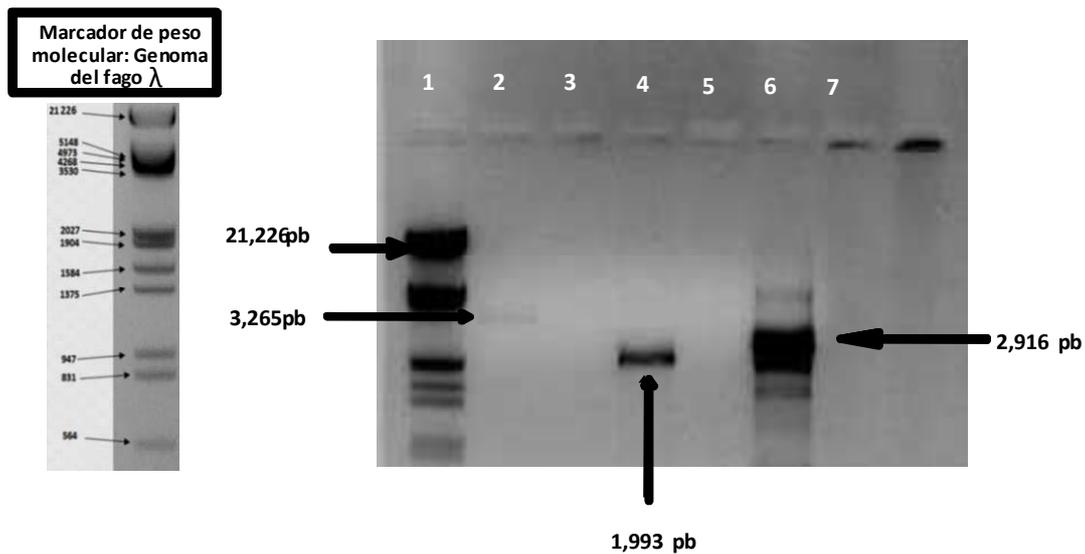
Cepa mutante  $\Delta cdc-3$  comparada con las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC # 9718 y silvestre FGSC # 988.



**Figura 48.** Gráficas del diámetro de crecimiento. Se muestran las gráficas resultante de la prueba de *Kruskal-Wallis* en la que se contrasta el crecimiento de la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  contra las cepas CDC-3-GFP, Control FGSC#9718 y silvestre FGSC# 988 a 37°C después de 24 hrs. de cultivo. El estadístico de *Kruskal-Wallis* indica que a 37°C hay diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las diferentes cepas con una  $p < 0.0378$ , la cepa que presenta la diferencia significativa es la cepa mutante  $\Delta cdc-3$  con respecto a la cepa control FGSC# 9718 con una  $p < 0.02786$  (Apendice II).

#### **IV.16 Corroboración de la integración del gen *cdc-3-gfp* en el genoma de *N. crassa***

La corroboración de la integración de los fragmentos en el genoma de *N. crassa* fue comprobada por PCR usando los oligonucleótidos denominados P1 como sentido y P6 como antisentido para amplificar el fragmento denominado brazo derecho. Por otro lado se utilizaron los oligonucleótidos denominados P5 como sentido y P4 antisentido para amplificar el fragmento denominado brazo izquierdo. A su vez se utilizaron los oligonucleótidos denominados como P7 y P8 para amplificar el fragmento que contiene el brazo de glicinas, el gen de la *gfp* y el gen de resistencia a higromicina. Los fragmentos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa (1.%) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL). Las bandas de los fragmentos indican la integración del gen de la septina etiquetado con *gfp* en el genoma de la transformante *cdc-3-gfp* (Figura 42).



**Figura 49.** Amplificación de Fragmentos fusionados usando como templado ADN genómico de la cepa transformante *cdc-3-gfp* y como control negativo ADN genómico de la cepa silvestre. En el **Carril 2** se muestra la amplificación del fragmento denominado brazo izquierdo de 3,265 pb. **Carril 3** control negativo. **Carril 4** amplificación del constructo denominado brazo derecho de 1,993 pb. **Carril 5** Contro negativo. **Carril 6** fragmento de 2,916 pb que contiene el brazo de glicinas, el gen para la proteína verde fluorescente y el gen de resistencia a higromicina. **Carril 7** control negativo. En el **Carril 1** como referencia el genoma del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

## Capítulo V

---

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

#### V.1 Discusión

##### V.1.1 Septinas en el ápice

Las septinas se han comenzado a clasificar como componentes importantes del citoesqueleto, debido a las características de sus dominios de unión GTP que les permiten formar heterómeros entre variantes de las septinas (Momany y Gladfelter, 2006). Estas proteínas se han descrito en múltiples procesos de la morfogénesis celular, en donde se les ha adjudicado funciones como formación de andamiajes estructurales para el posicionamiento de complejos y componentes moleculares.

En la generación y crecimiento de las hifas se encuentran involucrados múltiples mecanismos que contribuyen al transporte, organización y distribución de moléculas orgánicas básicas hacia la región apical, debido a que en esta región es donde se concentra la mayor actividad en cuanto a la agregación de nueva membrana plasmática y la generación de pared celular. En esta actividad celular están implicadas estructuras como el Spitzenkörper y componentes como el polarisoma y el complejo de exocitosis entre otros que participan en el crecimiento apical y que necesitan una organización espacio temporal (Steinberg, 2000). Esta organización del crecimiento podría estar dada por la organización de las septinas en forma de una red molecular. Las observaciones de este estudio, donde se pudo documentar la acumulación de la septina CDC-3-GFP en la región apical y subapical en forma de collar dinámico y tomando en cuenta la estructura de los filamentos de las septinas, sugieren que las septinas en la región apical participan en la organización de los componentes ubicados en el ápice de hifas maduras. A

su vez, podrían estar delimitando la regionalización de los componentes por medio de interacciones fisicoquímicas, debido a la formación de gasas moleculares compuestas de filamentos de septinas que delimiten la posición de los componentes en la región apical. En estudios ultraestructurales por microscopía electrónica en *S. cerevisiae* que revelaron que las múltiples polimerizaciones de los heterómeros de septinas podrían conformar una gasa molecular (Vrabioiu *et al.*, 2006; Rodal *et al.*, 2005).

Un ejemplo de que las septinas conforman un andamiaje molecular se ha observado durante la citocinesis, en donde se encontró que proteínas como Myo2p, Sec3p y Spa2p están localizadas de manera asimétrica en los lados de la hendidura de la gemación de *S. cerevisiae*, y esta localización fue interrumpida cuando las septinas mostraron alteraciones en el ensamblaje (Barrar *et al.*, 2000). Por otra parte, en otros estudios realizados en *S. cerevisiae* se observó la localización de las septinas justo en el punto de la hendidura durante la citocinesis, lo cual parece compartimentalizar los sitios de la ubicación del complejo de exocitosis (Dobbelaere *et al.*, 2004; McMurray y Thorner, 2009)

Aunado a lo anterior, las observaciones realizadas en este estudio en germínulas de más de 20µm, indican una distribución de CDC-3-GFP diferente a la encontrada en hifas maduras, ya que la fluorescencia se concentró en un cúmulo bien definido en la superficie celular situada delante del Spitzenkörper, es decir se concentra en una franja de fluorescencia en la membrana. En este punto del desarrollo de las germínulas, resulta interesante que en análisis realizados en hongos filamentosos y pseudo filamentosos como el caso de *Candida albicans* en donde se ha localizado la proteína Cdc42 en una distribución similar a la que se encontró en este estudio para CDC-3 en *N. crassa* (Crampin *et al.*, 2005). Cabe destacar que Cdc42 puede participar y proveer de nucleótidos necesarios para la polimerización de las septinas. A su vez Cdc42 promueve la activación de proteínas GAP efectoras como Bem3p, Rga1p, and Rga2p que reclutan a las

septinas y promueven la unión e intercambio de GTP y GDP entre las septinas (Smith *et al.*, 2002; Caviston *et al.*, 2003).

Por otro lado la generación de nueva membrana en la zona apical durante el crecimiento de la hifa y las asociaciones encontradas entre las septinas con regiones particulares de la bicapa lipídica en las que se especula que la interacción de dominios ricos en fosfoinositol le permite a las septinas anclarse a la membrana por medio de los dominios polibásicos que se encuentran en el extremo amino terminal (Zhang *et al.*, 1999; Takiguch *et al.*, 2009; Fangfang *et al.*, 2007). Esto podría explicar en parte la distribución de las septinas en la periferia de la membrana apical. Por otra parte las septinas también se han vinculado a la membrana actuando como un regulador espacial que delimita el área de exocitosis, lo cual permite la generación de nueva membrana. En este proceso se ha observado interacción de las septinas con proteínas SNAREs de membrana, así como los complejos de exocitosis posicionándolos en la región en donde se genera nueva membrana ( Joo *et al.*, 2005; Beites *et al.*,1999).

Algunas septinas que han sido marcadas en hongos filamentosos como la septina AspA en *A. nidulans* y AgSep7 de *A. gossypii* así como Cdc3 y Cdc11 en *C. albicans* mostraron una localización en la región apical y sub apical así como en las puntas de las ramificaciones que se estaban generando (Court y Sudbery 2007). Mutaciones en la septina  $\Delta$ aspa de *A. nidulans* mostraron alteraciones en la polaridad de las germínulas. A su vez la mutación de la septina AgSep7 de *A. gossypii* mostró alteraciones en el crecimiento y en la constitución de la punta de la hifa (Lindsey y Momany, 2010; Helfer y Gladfelter, 2006). Algunos rasgos en cuanto a la distribución y función resultantes del análisis de las septinas en otros organismos concuerdan con los reportados en este estudio.

Las observaciones obtenidas tanto del ápice de hifas maduras como de germínulas nos dan un panorama del papel que las septinas pudieran estar realizando como redes moleculares en la zona apical durante el desarrollo de la hifa, participando activa y dinámicamente en la organización y distribución de moléculas básicas en diferentes procesos de la región apical.

### **V.1.2 Septinas en septos**

Las septinas fueron descritas por primera vez en los procesos de citocinesis de *S. cerevisiae* (Hartwell *et al.*, 1970). Una de las características fundamentales de las septinas es la formación de un anillo durante la citocinesis. Este anillo podría servir de base para el anclaje de posteriores componentes que den paso a la formación del anillo contráctil de actinmiosina. También se piensa que se encuentran implicadas en la regulación espacial de otros complejos involucrados en la citocinesis mediante interacciones con la membrana, delimitando sitios de anclaje de otras proteínas o sitios específicos de exocitosis (Joo *et al.*, 2005). Sin embargo, el anclaje de las septinas en una región particular de la membrana durante la citocinesis aún no ha sido del todo dilucidado. Se especula que la interacción con dominios ricos en fosfoinositol le permita a las septinas anclarse a la membrana por medio de dominios polibásicos (Zhang *et al.*, 1999; Takiguch *et al.*, 2009; Fangfang *et al.*, 2007). Las observaciones realizadas en este estudio muestran un comportamiento dinámico de la septina CDC-3-GFP. Durante la septación, en primer término se observa una acumulación de la proteína en la membrana plasmática, seguido de un recorrido que dura aproximadamente 7 minutos, hacia el centro de la hifa, en donde finalmente desaparece.

Al hacer un análisis por medio de la colocalización con otros componentes fundamentales en la formación del septo, como lo son la membrana plasmática y la quitina sintasa 1, la cual contribuye la formación de la pared celular, se pudo observar que la CDC-3-GFP colocaliza inicialmente con ambos componentes, mismos que permanecen después que la CDC-3-GFP desaparece. Esto nos da indicios de que el papel de la septina es importante solo para la constitución primaria del septo y pudiese estar participando como un soporte primario para establecer la ubicación de los componentes precursores de la membrana plasmática tales como las proteínas SNARES y el complejo de exocitosis, así como delimitando la zona de exocitosis, ya que algunos ejemplos de estas interacciones se pueden encontrar en experimentos realizados en células de riñón de rata (NRK) en donde se encontraron colocalizando a las septinas y la proteína SNARE llamada sintaxina en la hendidura celular durante la citocinesis (Joo *et al.*, 2005; Beites *et al.*, 1999).

Por otro lado en estudios realizados en células de cerebro de ratón se aisló un largo complejo de septinas que inmunoprecipitaron con la proteína Sec8, la cual es un componente del exocisto (Hazuka *et al.*, 1999). Por otro lado en *S. pombe* se correlaciona la posición de las septinas con los componentes del exocisto Sec8 y Exo70 para que se exociten en el lugar adecuado las hidrolasas necesarias para la separación celular (Cuadrado *et al.*, 2005). Por su parte las septinas pudieran estar reclutando a las quitinasas para guiar su posición en la formación de la nueva pared celular, una relación en estos términos se observó en estudios en *S. cerevisiae*, en donde se indujeron mutaciones sensibles a temperatura de las septinas *cdc12* y *cdc5*, en las que se observó una deslocalización de la enzima quitina sintasa 3, la cual es responsable de la formación de la nueva pared en el cuello de la levadura y como consecuencia se observaron alteraciones en la constitución del septo (DeMarini *et al.*, 1997).

Resultaría interesante el realizar estudios para dilucidar el posicionamiento cronológico de componentes del anillo de actinmiosina en *N. crassa* para

complementar la información del papel de las septinas durante la septación, ya que en otros modelos biológicos no se ha podido establecer con claridad el orden cronológico y espacial de estos componentes durante la septación y *N. crassa* brinda un excelente modelo para estudiar este proceso celular.

### V.1.3 Septinas en núcleos

En el presente trabajo se pudo observar acumulaciones de la septina CDC-3-GFP cerca de la cromatina. Algunas interacciones entre las septinas y los núcleos ya ha sido reportada en otros organismos eucariontes. Pero aun no se sabe del todo cual es su función y su distribución en la cromatina en el ciclo celular.

Los procesos de división nuclear en la mayoría de los eucariontes implican una maquinaria altamente conservada que incluyen los mecanismos de segregación cromosómica. Alteraciones en estos mecanismos pueden ocasionar una gran inestabilidad genética. Como ejemplo de esto podemos encontrar componentes del citoesqueleto, como los microtúbulos los cuales tienen una participación fundamental. Recientes investigaciones han identificado a las septinas en los procesos de segregación cromosómica. Algunos estudios han dado indicios del papel que pueden tener las septinas durante los eventos mitóticos.

Análisis bioquímicos en mamíferos indican que la septina SEPT7 interactúa de manera directa con la cinesina CENP-E por medio de una región hélice súper enrollada (*traducido del inglés: coiled-coil*) localizada cerca de su carboxilo terminal (Zhu, 2008). Esta interacción SEP7-CENP-E es crítica para establecer la localización espacial y temporal de CENP-E en el cinetocoro y para permitir un correcto anclaje y movimiento de los microtúbulos durante la mitosis (Zhu, 2008). Por otro lado la participación de las septinas en la división nuclear se ha documentado también en las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae*, en donde se

han localizado septinas en la placa metafásica, influyendo en su orientación durante la anafase tardía (Castillon *et al.*, 2003). Por otro lado en *A. nidulans* y *Ashbya gossypii*, se han encontrado patrones en la distribución de las septinas durante eventos mitóticos sincronizados con la ramificación y el crecimiento apical (Lindsey y Momany, 2010; Helfer y Gladfelter, 2006).

En el presente estudio realizado en *N. crassa* pudimos observar estructuras circulares de la proteína CDC-3 en conidios después de 3 horas de haber sido inoculadas. En este punto del desarrollo se activa e incrementa la actividad mitótica. Debido a ello las estructuras circulares que pudimos apreciar cerca de los núcleos. Sin embargo las observaciones realizadas en germínulas fueron las que dieron un panorama más a fondo de la localización de la septina CDC-3-GFP con los núcleos. Se observaron estructuras circulares de septinas sobre los núcleos que podían ser visualizados tanto en fluorescencia como en contraste de fases, lo cual podría atribuirse a una gran acumulación de heterómeros de septinas formando una estructura que refracta la luz y que se puede apreciar en contraste de fases.

Por otra parte también observamos en algunos casos la septina CDC-3-GFP cerca de proyecciones posiblemente de cromatina que se encontraban adyacentes al núcleo. Ocasionalmente observamos este tipo de fenómenos en algunos núcleos en proceso de mitosis, pero con las observaciones realizadas hasta el momento no es posible definir si la septina CDC-3 está interactuando con la cromatina. Algunas observaciones inesperadas han mostrado la formación de proyecciones que en primer término y a reserva de subsecuentes estudios podrían estar conformadas de cromatina derivada de los núcleos. Dichas proyecciones se observaron relacionadas con una estructura circular de septinas CDC-3-GFP. Este tipo de fenómenos no se han reportado en células eucariontes hasta el momento.

#### **V.1.4 Septinas en la Anastomosis**

La localización ubicua de las septinas en etapas múltiples del desarrollo de *N. crassa*, así como en otros organismos dan indicios de que las septinas cumplen un papel estructural, como el caso de la formación del septo en donde forman un disco que se podría estar posicionando los complejos moleculares precursores del septo. En el caso de la fusión vegetativa, también se requieren complejos como el exocisto y proteínas SNAREs que dirijan las diversas moléculas como enzimas líticas quitinasas y glucanasas para degradar la pared de las dos hifas, así como sintetinas de quitina y sintetinas de glucanos para sellar los sitios adyacentes al poro y evitar derrame citoplasmático (Hickey *et al.*, 2002). La posición de un anillo de septinas durante un largo lapso de tiempo en el proceso de fusión de las hifas puede implicar que estas septinas no solo estén posicionando componentes y complejos sino como un soporte que fortalezca y ayude a remodelar las uniones que soportan la fricción del citoplasma que fluye de una célula a otra.

#### **V.1.5 Septinas emergentes bloqueando la fuga de citoplasma.**

Otro fenómeno interesante que se observó durante estos estudios es el bloqueo de la fuga de citoplasma en células que presentaban un trauma en la pared y membrana celular lo cual derivaba en la pérdida de material citoplasmático, que podría derivar en la muerte de una hifa completa. Durante este fenómeno se observó la acumulación de la septina CDC-3-GFP en el poro central del septo más cercano a la fuga, en donde se bloqueaba la fuga de material citoplasmático y de esta manera se evitaba la muerte de toda la hifa. Probablemente las septinas estén funcionando como un dique que disminuya paulatinamente el flujo de citoplasma y a su vez ayudan a posicionar a otros componentes que participen en la formación de nueva membrana y pared celular para dar lugar a la regeneración de la hifa.

## V.2 Conclusiones

Los objetivos planteados al principio de este estudio se desarrollaron satisfactoriamente. Se pudo observar la participación de la septina CDC-3 en etapas morfogénicas importantes así como en procesos nucleares de *N. crassa*.

Las observaciones realizadas en este estudio contribuyen a respaldar el modelo propuesto en otros estudios en los que se plantea a las septinas como un componente importante del citoesqueleto encargado entre otras cosas de formar redes de filamentos que actúan como andamiaje molecular para posicionar espacial y temporalmente componentes y complejos celulares. En este caso debido a la distribución de las septinas observada durante el estudio podrían estar implicados componentes que participan en la reestructuración y generación de la membrana y la pared celular, durante el crecimiento apical así como en los procesos en la formación de septos y durante la anastomosis.

Se logró observar a la septina CDC-3-GFP cerca de los núcleos y en ocasiones en núcleos en proceso de división. Sin embargo debido a las características de la organización y distribución de los núcleos y a la complejidad del ciclo celular en *N. crassa* se requieren más estudios para corroborar si las septinas están involucradas en procesos nucleares.

En cuanto al análisis realizado de las cepas carentes del gen *cdc-3*, se comprobó que la falta de la septina afecta el crecimiento del organismo ya que se observa una diferencia altamente significativa e cuanto a la tasa de crecimiento de la mutante con respecto a la cepa silvestre. Aunado a ello el aspecto general de la colonia presentaba alteraciones en el fenotipo con respecto a la cepa silvestre. Aunque las alteraciones que presenta el organismo no son suficientes para mermar del todos los procesos de morfogénesis como, la septación, la ramificación e inclusive el crecimiento que aunque se ve alterado no se detiene.

Esto podría explicarse debido a que la asociación de los heterómeros de las demás septinas podría estar supliendo la función de la proteína faltante, en este caso CDC-3. Sería necesario evaluar el efecto de la carencia de varias septinas.

## Capítulo VI

---

### BIBLIOGRAFÍA

---

- Aist J.R., Morris N.R. 1999. Mitosis in filamentous fungi: how we got where we are. *Fungal Genet. Biol.* 27:1- 25.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002 *Molecular Biology of the cell*. 4. ed. New York. Garland Publishing. 630.
- Baker R. E., Rogers K. 2006. Phylogenetic Analysis of Fungal CenH3 Proteins. *Genet.* 174: 1481-92.
- Barral Y., Mermall V., Mooseker M.S., Snyder M. 2000. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol. Cell* 5: 841-851.
- Bartnicki-Garcia S.1968. Cell wall chemistry,morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-107.
- Beites C.L., Xie H., Bowser R., Trimble W.S.1999.The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neuro.* 2: 434-439.
- Bertin A., McMurray M.,Grob P.,Park S.,Garcia G.,Patanwala I.,Ng H.,Alber T., Thorner J.,Nogales E. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *PNAS* 105: 8274-8279.
- Crampin H., Finley K., Gerami-Nejad, M., Court, H., Gale, C., Berman, J., Sudbery, P. E. 2005. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J. Cell Sci.* 118, 2935-2947.
- Cao L., Yu, W., Wu, Y., Yu L. 2009. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell. Mol. Life. Sciences.* 66: 3309-23.

- Castillon G.A., Adames N.R., Rosello C.H., Seidel H.S., Longtine, J.A., Heil-Chapdelaine R.A. 2003. Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast. *Curr. Biol.* 13:654-658.
- Caviston J.P., Longtine M., Pringle J.R., Bi E. 2003. The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14: 4051-4066.
- Cheeseman I. M., Niessen S. A., Hyndman F., Yates, J.R., Oegema K. D. A. 2004. A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain. *Genet. Dev.* 18: 2255-2268.
- Cid J., Lubicaa A., Sánchez M., Molina M., Nombela C. 2001. Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiol.* 147: 1437-1450.
- Clutterbuck A.J. 1970. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 60: 133-135.
- Corinne M.J., Hite M.K., Weirich C.S., Fitzgerald D.J., Jawhari H., Faty M., Schläpfer D., Kroschewski R., Winkler F.K., Walz T., Barral Y., Steinmetz M.O. 2007. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *Eur. Mol. Biol. J.* 26: 3296 -3307.
- Court H., Sudbery P. 2007. Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 18: 265-281.
- Cuadrado A.B.M., Morrell J.L., Konomi M., Petit H.C., Osumi M., Balasubramanian M., Gould K.L., del Rey F., Vazquez C.R. 2005. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell.* 16: 4867-4881.
- DeMarini D.J., Adams A.E., Fares H., De Virgilio C., Valle G., Chuang J.S. Pringle J.R. 1997. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* 139: 75-93.
- Dobbelaere J., Barral Y. 2004. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science.* 305: 393-396.

- DeMay B.S., Meseroll, R.A., Occhipinti P., Gladfelter A.S. 2009. Regulation of distinct septin rings in a single cell by Elm1p and Gin4p kinases. *Mol. Biol. Cell.* 20: 2311-2326.
- Fangfang P., Russell M.L., Momany M. 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol.* 7: 1-17.
- Farkasovsky M., Herter P., Voss B., Wittinghofer A. 2005 Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biol. Chem.* 386: 643-656.
- Field C.M., Kellogg D. 1999. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol.* 9: 387-394.
- Fiddy C., Trinci A.P.J. 1976. Nuclei, septation, branching and growth of *Geotrichum candidum*. *J. Gen. Microbiol.* 97: 185-192.
- Finger F.P., Novick, P. 1998. Spatial regulation of exocytosis: Lessons from yeast. *J. Cell Biol.* 142: 609-612.
- Freitag M., Ciuffetti L.M., Selker E. 2001. Expression and visualization of Green Fluorescent Protein (GFP) in *Neurospora crassa*. <http://www.fgsc.net> (Julio de 2006).
- Freitag M., Hickey P.C., Khlafallah T.K., Read N.D., Selker E.U. 2004. HP1 is essential for DNA methylation in *Neurospora*. *Mol. Cell.* 13: 427-34.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L.J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C.B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M.A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C.P., Kinsey J.A., Braun E. L., Zelter A., Schulte U., Kothe G. O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzenberg R.L., Perkins D.D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R. J., Osmani S.A., DeSouza C.P., Glass L., Orbach M.J., Berglund J.A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D.O., Alex L.A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M.S., Lander E.S., Nusbaum C., Birren B. 2003. The

- genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-868.
- Gladfelter A.S., Kozubowski L., Zyla T.R., Lew D.J. 2005. Interplay between septin organization, cell cycle and cell shape in yeast. *J. Cell Science*. 118: 1617-1628.
- Gladfelter A.S. 2006a. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 223-229.
- Gladfelter A.S. 2006. Nuclear anarchy: asynchronous mitosis in multinucleated fungal hyphae. *Curr. Op. Microbiol.* 9: 547-52.
- Gladfelter A.S., Hungerbuehler A.K., Philippsen P. 2006. Asynchronous nuclear division cycles in multinucleate cells. *J. Cell Biol.* 172: 347-362.
- Gladfelter A.S., Montagna C. 2007. Seeking truth on Monte Verita. Workshop on The Molecular Biology and Biochemistry of Septins and Septin Function. *EMBO Rep.* 8: 1120-1126.
- Harris S.D. 2006. Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int. Rev. Cyt.* 251: 41-77.
- Harris S.D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia* 100: 823-832.
- Harris S.D., Morrell J.L., Hamer J.E. 1994. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* 136: 517-532.
- Hartwell L.H., Culotti B.J. 1970. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66:352-359
- Hartwell L.H. 1971. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exptl. Cell Res.* 69: 265-276.
- Hazuka C.D., Foletti D.L., Hsu S.C., Kee Y., Hopf F.W., Scheller R.H. 1999. The sec6/8 complex is located at the neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J. Neurosci.* 19: 1324-1334.

- Heim R., Cubitt A.B.Y., Tsien R.Y. 1995. Improved Green Fluorescence. *Nature* 373: 663-664.
- Helfer H., Gladfelter A.S. 2006. AgSwe1p regulates mitosis in response to morphogenesis and nutrients in multinucleated *Ashbya gossypii* cells. *Mol. Biol. Cell.* 17: 4494-512.
- Hickey P.C., Jacobson D., Read N.D., Louise Glass N.L. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37: 109-119.
- Hickey P., Swift S.R., Roca M.G., Read N.D. 2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Meth. Microbiol.* 34: 63-87.
- Hickson G.R.X., O'Farrell P. H. 2008. Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *J. Cell. Biol.* 180: 285-294.
- Honda S., Selker, E.U. 2009. Tools for fungal proteomics: Multifunctional *Neurospora crassa* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* 182: 11-23.
- Howard R.J., Gow N.A.R. (eds). 2007. *Biology of the Fungal Cell.* (The Mycota VIII). 2a.Ed. Springer, Heidelberg. 341pp.
- Howell B.J., Moree B., Farrar E.M., Stewart S., Fang G., Salmon E.D. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol.* 14: 953-964.
- Hunsley D., Gooday G.W. 1974. The structure and development of septa in *Neurospora crassa*. *Protoplasma.* 82: 125-146.
- Jeanteur P. 2005. Epigenetics and chromatin. New York. Springer. 266p.
- Jochová J., Rupeš I., Streiblová E. 1999. F-actin contractile rings in protoplasts of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biol. Int. Rep.* 15: 607-610.
- Joo E., Tsang C.W., Trimble W.S. 2005. Septins: Traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic.* 6: 626-634.

- Kinoshita M. 2002. The septins. *Gen. Biol.* 4: 1-9.
- Kong C., Xie H., McPherson P.S., Grinstein S., Trimble W.S. 1999. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* 9: 1458-1467.
- Kozubowski L., Larson J.R., Tatchell K. 2005. Role of the septin ring in the asymmetric localization of proteins at the mother-bud neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 16: 3455-3466.
- Lindsey R., Momany M. 2006. Septin localization across kingdoms: three themes with variations. *Current Opin. Microbiol.* 9: 559-565.
- Lindsey R., Momany M. 2010. A septin from the filamentous fungus *A. nidulans* induces atypical pseudohyphae in the budding yeast *S. cerevisiae*. *PLoS One.* 5: 1-9.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L. Darnell J. 2000. *Molecular Biology of the Cell*. Panamericana. New York. 961p
- Malik H., Henikoff S. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10: 882-891.
- Musacchio A. Salomon D.E. 2007. The spindle assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 379-393.
- Mimori-Kiyosue Y., Tsukita S. 2003. Search and capture of microtubules through plus ends binding proteins (+TIPs). *J. Biochem.* 134: 321-326.
- Martin S.W., Konopka J.B. 2004. SUMO modification of septin-interacting proteins in *Candida albicans*. *J. Biol Chem.* 279: 40861-40867.
- McMurray M.A., Thorner J. 2009. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell. Div.* 4: 1-14.
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395.

- Pan, F., Malmberg, R. M. Momany. 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* 7:103.
- Prasher D., McCann R.O., Cormier M.J., 1985. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 1259-1268.
- Riquelme M., Freitag M., Sánchez-León-Hing E.F., Bowman B. 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. Presentación de cartel en The 23rd Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, EEUU.
- Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J.M., Sánchez-León E., Verdín-Ramos J.A., Beltrán-Aguilar A., Freitag M. 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 6: 1853-1864.
- Rodal A.A., Kozubowski L., Goode B.L., Drubin D.G., Hartwig G.H. 2005. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol. Biol. Cell.* 16: 372-384.
- Schaar B.T., Chan G.K.T., Maddox P., Salmon E.D., Yen T.J. 1997. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J. Cell Biol.* 139: 1373-1382.
- Shevchuk N., Bryksin A., Nusinovich Y., Cabello F. C., Sutherland M., Ladisch S. 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic acids. Res.* 32:19-31.
- Schoch C.L., Aist J.R., Yoder O.C., Gillian T.B. 2003. A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 39: 1-15.
- Schuchardt I., Assmann D., Thines E., Schuberth C., Steinberg, G. 2005. Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* 16: 5191-5201.

- Serna L., Stadle D. 1978. Nuclear division cycle in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 176: 341-351.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59: 223-239.
- Smith G.R., Givan S.A., Cullen P., Sprague G.F. 2002. GTPase activating proteins for Cdc42. *Eukariot. Cell.* 1: 469-480.
- Steinberg G. 2000. The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol.* 8: 162-168.
- Steinberg, G., Schliwa, M. 1996. Characterization of the biophysical and motility properties of kinesin from the fungus *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 271: 7516-7521.
- Spiliotis E.T., Kinoshita M., Nelson W.J. 2005. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science.* 307: 1781-1785.
- Takiguchi T.Y., Kinoshita M., Takiguchi K. 2009. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol.* 19: 140-145.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., Vale, R.D. 2000. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290: 341-344.
- Trinci A.P.J., Collinge A.J. 1973. Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma.*80: 57-67.
- Vrabioiu A.M., Mitchison T.J., 2006. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy, *Nature.* 443: 466-469.
- Warena J.A., Kauffman S., Taylor S.P., Jeffrey B.M., Konopka B.J. 2003. *Candida albicans* septin mutants are defective for invasive growth and virulence. *Infect. Immunity.* 71: 4045-4051.
- Weirich C.S., Erzberger J.P., Barral Y. 2008. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Mol. Cell Biol.* 9: 478-489.

- Westfall J.P., Momany M. 2002. *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol. Biol. Cell.* 13:110-118.
- Yang F., Moss L.G., Phillips G.N.Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14: 1246-1251.
- Yao X., Anderson K.L., Cleveland D.W. 1997. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. *J. Cell. Biol.* 139: 2435-2447.
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P. S., Grinstein, S. Trimble, W. S. 1999. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* 9, 1458-1467.
- Zhu M., Fengsong W., Yao P.Y., Du J., Gao X., Wang X., Wu Q., Ward T., Li J., Kioko S., Hu R., Xie W., Ding X., Yao X. 2008. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J. Biol. Chem.* 283: 18916-18925.
- Zink D., Sadoni N., Stelzer E. 2003. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods.* 29: 42-50.

**APÉNDICE I**

---

**Abreviaturas**

<b>ADN</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>ApE</b>	A plasmid editor
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>cm</b>	centímetros
<b>dNTP's</b>	2'-deoxinucleosido 5'-trifosfato
<b>EDTA</b>	Acido etilen-di-amino-tetra-acético
<b>Fast PCR</b>	Primer design and sequencing software protocolsEspaciadores
<b>FGSC</b>	Fungal Genomic Stock Center
<b>HCl</b>	Acido clorhídrico
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>Kb</b>	Kilo bases
<b>MMV</b>	Medio minimo de Vogels
<b>µg</b>	microgramos

<b>mg</b>	miligramos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	minutos
<b>μL</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimoles
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanómetros
<b>° C</b>	Grados centígrados
<b>p.H.</b>	Potencial de hidrogeno
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris/Borate/EDTA
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) amino-metano
<b>x g</b>	Veces la fuerza de gravedad

