

TESIS DEFENDIDA POR
ROSA MARÍA RAMÍREZ COTA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García
Miembro del Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité

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

Dr. David H. Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

3 de diciembre de 2010

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



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

***LOCALIZACIÓN Y DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS GRB Y APS-1 DURANTE
LA DIVISIÓN NUCLEAR EN EL HONGO FILAMENTOSO *Neurospora crassa****

TESIS

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

Presenta:
ROSA MARÍA RAMÍREZ COTA

Ensenada, Baja California, México, diciembre de 2010

RESUMEN de la tesis de **Rosa María Ramírez Cota**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California. Diciembre de 2010.

**LOCALIZACIÓN Y DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS GRB Y APS-1
DURANTE LA DIVISIÓN NUCLEAR EN EL HONGO FILAMENTOSO
*Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director de Tesis

La γ -tubulina es responsable de la formación de *ново* de Microtúbulos (Mts) a partir de los Centros Organizadores de Microtúbulos. Las pericentrinas son proteínas para el reclutamiento del complejo de la γ -tubulina a la placa interna del SPB (por sus siglas en inglés Spindle Pole Body), y son importantes para promover el correcto ensamblaje del huso mitótico. Mientras que otro grupo de proteínas se encargan del reclutamiento del complejo a la placa externa del SPB, y son importantes para posicionamiento nuclear en hongos. En este trabajo se describe la localización y dinámica de las proteínas GRB y APS-1, homologas a Pcp-1 y Mto1 de *Schizosaccharomyces pombe*, en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Estas proteínas fueron marcadas con las proteínas fluorescentes GFP o mCHFP. Tanto la GRB como la APS-1 se observaron cómo puntos brillantes asociados a los núcleos, durante todos los estadios del ciclo de vida de *N. crassa*. Estas co-localizan con la γ -tubulina en SPBs. La GRB se encuentra embebida en la membrana nuclear. Además de interactuar con los Mts citoplasmáticos en interfase y con los Mts del huso acromático en mitosis. Algunos núcleos presentan dos puntos de GRB localizada en extremos opuestos, previo a la formación del huso. La GRB se localiza muy cercanamente a la histona centromérica CenH3. La delección del gen *grb* es letal. La APS-1, se observó también libre en el citoplasma, pero no se localizó en los septos. La mutación Δ aps-1 indica que esta proteína es esencial en *N. crassa*. En base a las observaciones se puede decir que tanto GRB como APS-1 son parte de los SPBs y son esenciales ya que están involucradas en los procesos de mitosis.

Palabras Clave: *Neurospora crassa*, mitosis, SPBs, γ -tubulina, pericentrina, Pcp-1, Mto1

ABSTRACT of the thesis presented by **Rosa María Ramírez Cota** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in LIFE SCIENCES with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, México. December 2010.

LOCALIZATION AND DINAMICS OF THE GRB AND APS-1 DURING NUCLEAR DIVISION IN THE FILAMENTOUS FUNGUS *Neurospora crassa*

The γ -tubulin associated with the Microtubule Organizing Centers (MTOC) is controlling the de novo synthesis of Microtubules (Mts). The pericentrin proteins are responsible of the recruitment of the γ -tubulin complex to the inner plate of the Spindle Pole Body (SPB), and are important to ensure the correct mitotic spindle assembly. The positioning of the γ -tubulin complex on the outside of the SPB plate is carried out by other proteins, important in the positioning of the nuclei in fungi. In this work we describe the positioning and dynamics of GRB and APS-1, homolog's of Pcp-1 and Mto1 of *Schizosaccharomyces pombe*, in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. GRB and APS-1 were tagged with the fluorescent proteins GFP or mCHFP, and observed as bright spots on the nuclei surface and associated with γ -tubulin at the SPBs, during all the stages of the life cycle of *N. crassa*. GRB is embedded in the nuclei membrane, and also associated with the cytoplasmic Mts and with the Mts of the spindle during mitosis. GRB is sometimes found on two opposite ends of the nucleus before the spindle is formed. GRB is localized closed to the centromeric histone CenH3. The deletion of the gen *grb* is lethal. APS-1 was not localized at the septa but could be found within the cytoplasm. The mutation Δ aps-1 shows this protein to be essential in *N. crassa*. These observations suggest that both GRB and APS-1 are part of the SPBs and are essential because they form part of the mitosis machinery

Keywords: *Neurospora crassa*, mitosis, SPBs, γ -tubulin, pericentrin, Pcp-1, Mto1

Dedicatorias

***a mi madre** por su amor inmenso*

***a mis hermanas** porque son mi gran tesoro, fuente de
inspiración*

***a David y Julian** por ser la luz de mi vida*

***a mis amigas** que son verdaderos angeles en mi camino*

Agradecimientos

A **CONACYT, CICESE y al Departamento de Microbiología** por brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al **Dr. Helmut Maske Rubach** y al **Dr. Salomón Bartniki García** por sus valiosas sugerencias y contribuciones en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al **Dr. Michael Freitag, Pallavi Phatalle y Olga Callejas** por sus enseñanzas dentro del laboratorio, por su disponibilidad para resolver controversias del diseño experimental y por todos los momentos en que tuve alguna duda por pequeña o grande que fuera y estuvieron ahí para resolverla.

Especialmente a la **Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez** por su dedicación, apoyo y tiempo brindado en el desarrollo de este trabajo. Sobre todo por el especial interés y preocupación por el bienestar de sus estudiantes. Gracias por hacer de su grupo de trabajo una verdadera familia. Al **Dr. Juan Gódinez** por recibirme en su casa siempre de buen ánimo y por apoyarme en todo momento.

A **Ruth, Rosy, Naidy, Isadora, Diego, Ramón, Jovis** y a todos mis compañeros del laboratorio y de generación con quienes desarrolle fuertes lazos de amistad.

A mi **familia y amigos** por creer en mí y apoyarme en todo momento. Especialmente a **José Antonio** por su inmenso cariño, por estar en los momentos difíciles y ayudarme a enfrentarlos de la mejor manera.

Contenido

Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	xiv
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
II.1 Hongos filamentosos	4
II.2 Microtúbulos	5
II.3 γ -tubulina	5
II.4 Estructura y composición del SPB.....	8
II.5 Mitosis en hongos filamentosos.....	12
III. Hipótesis.....	15
IV. Objetivos	16
V. Metodología	17
V.1 Organismos y medios de cultivo	17
V.2 Bioinformática	17
V.3 Oligonucleótidos.....	19
V.4 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	19
V.5 Construcción de plásmidos	21
V.6 Construcción de cassettes para marcaje endógeno	28
V.7 Transformación de <i>N. crassa</i>	31
V.8 Southern Blot	33
V.9 Cruzas de <i>N. crassa</i>	36

Contenido (continuación)

V.10 Fusión de cepas de <i>N. crassa</i>	37
V.11 Microscopía y análisis de imágenes.....	37
VI. Resultados	39
VI.1 Construcción de los plásmido pMF272+grb y pJV15-2+grb.....	39
VI.2 Construcción genética para el marcaje endógeno	42
VI.3 Caracterización de la localización y dinámica de la GRB	45
VI.4 Caracterización de la localización y dinámica de la APS-1	53
VI.5 Caracterización de las cepas mutantes Δ APS-1 y Δ GRB.	58
VII. Discusiones	61
VII.1 Localización y dinámica de la GRB.....	61
VII.2 Localización y dinámica de la APS-1	66
VIII. Conclusiones	68
VIII.1 Localización y dinámica de la GRB en <i>N. crassa</i>	68
VIII.2 Localización y dinámica de la APS-1 en <i>N. crassa</i>	69
IX. Bibliografía.....	70

Lista de Figuras

	Página	
1	<p><i>Estructura y composición del SPB. El SPB está embebido en la membrana nuclear, tiene una placa externa en contacto con el citoplasma con Mts citoplasmáticos y una cara interna en el nucleoplasma con Mts nucleares. La placa central se asocia a las proteínas de membrana nuclear Ndc1, Mps2 y Bbp1. Las placas internas se encuentran entre la placa central y la placa externa. El puente medio conformado por varias proteínas es el sitio de ensamblaje del SPB hijo (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004).</i></p>	9
2	<p><i>Duplicación del SPB. 1) La duplicación del SPB se inicia con la elongación del puente medio y la acumulación de los materiales que forman al SPB satélite, 2) continua con la expansión del SPB satélite formando las placas central, intermedias y externa, 3) posteriormente ocurre la inserción del SPB a la membrana y la formación de la placa interna, 4) seguida por la migración de los SPBs a extremos opuestos del núcleo (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004)</i></p>	12
3	<p><i>Diagrama de los vectores utilizados para la expresión de GRB-GFP y GRB-mCHFP. (a) El plásmido pMF272 se caracteriza por la presencia del gen sgfp (5013-5732), cuya expresión está regulada por el promotor de N. crassa ccg-1 (4060-4979). Las secuencias 5' Δ-his-3 (8460-6350) y 3' his-3 (4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen his-3 de N. crassa. El gen β-lactamasa (468-1328) confiere resistencia a ampicilina a las células de E. coli que lo contienen. El plásmido pJV15-2 derivado de pMF272 contiene la secuencia de la mchfp en lugar de la gfp (5031-5720) y su expresión es regulada por el promotor fuerte ccg-1 al igual que en el pMF272. (b) El plásmido pMF272+grb derivado del pMF2-72 se caracteriza por la presencia del ORF del gen grb (4986-9560) seguido por la gfp (9569-10288), y el plásmido pJV15-2+grb derivado del pJV15-2 se caracteriza por presentar el ORF del gen grb (4986-9560) seguido por la mchfp (9571-10287)</i></p>	23

Lista de Figuras (continuación)

- 4 *Diagrama del plásmido pZero_pMF357_pPP43. El plásmido se caracteriza por expresar el ORF del gen gfp (2979-3695) seguido por el gen hph (4120-5145), la secuencia 10Xgly (2970-2999) produce una bisagra de 10 glicinas y la secuencia loxP(5172-5205) es reconocida por la enzima recombinasa Cre en bacterias que es útil para recombinación entre dos secuencias loxP, resultando en la escisión, recombinación o traslocación del DNA (Van Duyne, 2001), el plásmido posee además el gen de resistencia al antibiótico kanamicina (1182-1976). (d) Diagrama del pRR1_0mcherry derivado de la clonación de mchfp en el pZero_pMF357_pPP43, se caracteriza por expresar el ORF del gen mchfp (2979-3686) seguido por el gen hph (4120-5145)* 27
- 5 *PCR de fusión para el marcaje endógeno de proteínas en el hongo N. crassa. (a) amplificación de los fragmentos 5' y 3' de los genes de interés y del cassette 10Xgli (que codifica para 10 glicinas) seguido de la secuencia que codifica para la proteína fluorescente (GFP o mCHFP) y del gen de resistencia a higromicina (hph). (b) PCR de fusión del fragmento 5' con el cassette 10XGli_FP_1/2Hph y del fragmento 3' con 1/2Hph. (c) los dos cassettes construidos se utilizan en la transformación de DNA genómico de N. crassa, mediante recombinación homóloga se reemplaza el gen nativo de la proteína de interés por los cassettes que contienen el 5'_10Xgli_FP_hph.* 31
- 6 *Método del bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un fragmento del agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos (Modificado de Hickey et al., 2004 en Ramírez-Cota, 2008)* 38
- 7 *Construcción de los plásmidos pJV15-2+grb y pMF272+grb (a) electroforesis de pMF272, pJV15-2 y el ORF de grb digeridos con las enzimas de restricción XbaI y PaeI para su posterior ligación, (b) PCR de colonia de las recombinantes de E. coli que contienen el gen grb ligado a pJV15-2 y pMF272, las flechas señalan las clonas positivas para el grb, (c) digestión enzimática con XbaI y PaeI para corroborar la correcta integración del ORF del gen grb en los plásmidos pJV15-2 y pMF2-72. Gel de agarosa al 1%, λ = marcador de peso molecular* 40

Lista de Figuras (continuación)

- 8 *Construcción del plásmido pRR1_0mcherry (a) Electroforesis gen mchfp y del vector pZero_pMF357_pPP43 digeridos con las enzimas de restricción XbaI y PaeI para su posterior ligación, (b) PCR de colonia de las recombinantes de E. coli que contienen el gen mchfp ligado al vector pZero_pMF357_pPP43, (c) digestión enzimática con NcoI para corroborar la integración correcta del ORF del gen mchfp en el pZero_pMF357_pPP43, las flechas señalan las clonas positivas. Gel de agarosa al 1%, λ = marcador de peso molecular.* 41
- 9 *Construcción de los cassettes para marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina con las proteínas fluorescentes GFP y mChFP. (a) electroforesis de los cassettes GFP-Hph y mCHFP-Hph amplificados a partir de los plásmidos pZero_pMF357_pPP43 y pRR1_0mcherry, respectivamente. (b) electroforesis de los fragmentos 5' y 3' de los genes gtub, aps-1 y grb amplificados por PCR a partir de DNA genómico de N. crassa N39. (c) electroforesis de los productos del PCR de fusión de los fragmentos 5' y 3' de los genes con los cassettes GFP+Hph y CHFP+Hph para posteriormente ser utilizados en la transformación genética de N. crassa.* 43
- 10 *Southern blot de las cepas transformantes de N. crassa para corroborar la correcta integración del DNA. (a) DNA de la cepa N. crassa GRB-mCHFP digerido con las enzimas PvuII y AvII, (b) DNA de las transformantes N. crassa APS-1-mCHFP (8,7 y 2) y N. crassa APS-1-mCHFP (4,3 y 2) digeridos con las enzimas SacII y NdeI, (c) DNA de la cepa N. crassa γ -tubulina-GFP y N. crassa γ -tubulina-mCHFP digerido con las enzimas SmaI y HindIII. El DNA de todas las digestiones fue hibridado con la sonda radioactiva Hph-P³², las flechas señalan el tamaño de los fragmentos de DNA correspondientes a una correcta integración del DNA transformante en el genoma de N. crassa N3011, las cepas N3011 y wt (N39) fueron utilizadas como controles negativos.* 44

Lista de Figuras (continuación)

- 11 *Imagen de conidias que muestran la expresión de la GRB-GFP y GRB-mCHFP regulada por el promotor ccg-1 y por el promotor endógeno. (a)-(c) N. crassa GRB-GFP; P-ccg1, (d)-(f) N. crassa GRB-mCHFP; P-ccg1 y (g)-(i) N. crassa GRB-mCHFP; P-endógeno. (a), (d) y (g) Canal fluorescente que muestra la GRB con los diferentes marcajes; (b), (e) y (h) canal de contraste fases; y (c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=5 μ m* 45
- 12 *Imagen de germínulas de 6 h de crecimiento, que muestran la expresión de la GRB-GFP y GRB-mCHFP regulada por el promotor ccg-1 y por el promotor endógeno. (a)-(c) N. crassa GRB-GFP; P-ccg1, (d)-(f) N. crassa GRB-mCHFP; P-ccg1 y (g)-(i) N. crassa GRB-mCHFP; P-endógeno. (a), (d) y (g) Canal fluorescente que muestra la GRB con los diferentes marcajes; (b), (e) y (h) canal de contraste fases; y (c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=10 μ m.* 46
- 13 *Imagen de hifas maduras de las cepas que expresan el marcaje de la GRB con proteínas fluorescentes, cuya expresión es regulada por el promotor ccg-1 o por el promotor endógeno. (a)-(c) N. crassa GRB-GFP; P-ccg1, (d)-(f) N. crassa GRB-mCHFP; P-ccg1 y (g)-(i) N. crassa GRB-mCHFP; P-endógeno. (a), (d) y (g) Canal fluorescente que muestra la GRB con los diferentes marcajes; (b), (e) y (h) canal de contraste fases; (c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=10 μ m.* 47
- 14 *Imagen de ascosporas de la cepa N. crassa GRB-mCHFP per-1 tomada por microscopia confocal. (a) y (c) canal de fluorescencia, (b) y (d) superposición del canal de fluorescencia y el canal de contraste de fases, en donde se observa la distribución de la GRB-mCHFP en el asca (a) y (b) y de una ascospora (c) y (d).* 48

Lista de Figuras (continuación)

- 15 *Asociación de la GRB con los núcleos durante diferentes estadios celulares de N. crassa. (a) Canal de fluorescencia de una conidia de N. crassa que expresa la GRB-GFP en verde y los núcleos dRFP-H1 en rojo, (b) distribución de la GRB en una germinula de 6h de crecimiento, (c) acercamiento de dos núcleos que muestran la asociación de la GRB en el SPB, (e) hifa madura con 12 h de crecimiento en donde se observan núcleos en interfase y en mitosis, (d) y (f) acercamiento de dos núcleos en mitosis.* 49
- 16 *Asociación de la GRB con la γ -tubulina en una hifa madura de N. crassa. (a) Canal de fluorescencia que muestra la distribución de la γ -tubulina-GFP, (b) canal de fluorescencia que muestra la distribución de la proteína GRB-mCHFP y (c) superposición de (a) y (b), (d) y (e). Acercamiento de una zona subapical y basal de la hifa en (c) que muestra la co-localización de la GRB con la γ -tubulina en los SPBs. Escala= 10 μ m.* 50
- 17 *Localización de la GRB en relación a la membrana nuclear de conidias de N. crassa. Imagen confocal de la superposición de dos canales de fluorescencia de conidias que expresa la GRB en rojo y la membrana nuclear en verde.* 51
- 18 *Asociación de la GRB con los Mts. (a) Región basal de una hifa madura que muestra la GRB-GFP asociada a los Mts marcados con la β -tubulina-mCHFP, (b) acercamiento de un huso mitótico con la GRB asociada en los extremos del mismo, (c) y (d) acercamiento de dos núcleos con la GRB-GFP localizada en extremos opuestos, previo a la formación del huso, región apical y subapical de una hifa madura.* 52
- 19 *Asociación de la GRB con la histona Cen-H3. (a), (b), (d) y (e) son acercamientos de SPBs de una hifa madura (c) que expresa la proteína GRB-mCHFP y la proteína CenH3-GFP.* 53
- 20 *Imagen de 2D de una conidia que muestra la distribución de la APS-1. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μ m. Escala=5 μ m.* 54

Lista de Figuras (continuación)

- 21 *Localización de la APS-1 en una germínula con 6 h de crecimiento. La APS-1 se distribuye en forma de acumulaciones fluorescentes aparentemente asociadas a los núcleos a lo largo de todo el citoplasma. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μm . Escala=10 μm .* 55
- 22 *Localización de la APS-1 en hifas maduras. La APS-1 se distribuye a lo largo de la hifa, aparentemente asociada a los núcleos, las hifas presentan un crecimiento afectado. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μm . Escala=10 μm .* 56
- 23 *Asociación de la APS-1 con la γ -tubulina en una hifa madura de *N. crassa*. (a) Canal de fluorescencia que muestra la distribución de la APS-1-GFP, (b) canal de fluorescencia que muestra la distribución de la proteína γ -tubulina -mCHFP y (c) superposición de a y b. Las flechas muestran la co-localización de APS-1 con la γ -tubulina en los SPBs y los asteriscos indican la APS-1 que no co-localiza con la γ -tubulina. Escala=10 μm .* 57
- 24 *Imagen en 2D de hifas maduras de la cepa que expresa APS-1-GFP teñidas con FM4-64. (a)-(c) Zona apical y (d)-(f) zona distal de hifas las hifas. (a) y (d). Canal de fluorescencia que muestra la distribución de la APS-1-GFP, (b) y (e) canal de fluorescencia que muestra la tinción con el FM4-64 y (c) y (f) superposición de (a) y (b). Escala=10 μm .* 58
- 25 *Imagen de peritecio, ascosporas y germínulas generadas de la cruce de las mutantes $\Delta\text{APS-1}$ y ΔGRB1 con la cepa NMF61. Escala=200 μm .* 59
- 26 *PCR para corroborar la delección de la GRB. (+) DNA genómico de la cepa tipo silvestre, (-) agua, (ΔH) DNA genómico del heterocarion, ($\Delta\text{5-}\Delta\text{7}$) DNA genómico del homocarion obtenido a partir de la cepa. Las bandas corresponden al tamaño del ORF del gen *grb*.* 60

Lista de Figuras (continuación)

- 27 *Diagrama representativo de la localización de GRB en N. crassa. La GRB se encuentra embebida en la membrana nuclear, asociada con la γ -tubulina en los SPBs de los núcleos. En los núcleos en interfase la GRB y la CenH3 se encuentran en una posición muy cercana, mientras que en la mitosis están alejadas. La GRB se asocia a un extremo de los Mts citoplasmáticos que emanan del SPB, y en mitosis se localiza en los extremos opuestos del huso mitótico.*

Lista de Tablas

		Página
I	<i>Organismos utilizados en este estudio.</i>	18
II	<i>Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.</i>	20
III	<i>Plásmidos utilizados en este trabajo.</i>	21

I. Introducción

Los hongos son organismos eucariotas que afectan nuestra vida en diversos aspectos como en la ecología, la industria, la medicina y la agricultura entre otros. Muchos hongos son utilizados por el humano debido a sus características benéficas como la alimentación, la producción de antibióticos, procesos de fermentación, etc. Al mismo tiempo, los hongos son una amenaza para la salud de plantas y animales. Las enfermedades de plantas producidas por hongos, generan grandes pérdidas económicas en la agricultura. En humanos también causan diversas enfermedades como la candidiasis (*Candida spp*) y la aspergilosis (*Aspergillus*) entre otras. Los hongos pueden estar en el ambiente en forma de levadura o en forma micelial. A estos últimos se les denominan hongos filamentosos.

Las células de los hongos filamentosos son llamadas hifas, se caracterizan por tener forma tubular, con crecimiento polarizado en el ápice, son septadas y generalmente multinucleadas. El principal punto de crecimiento de estos hongos se encuentra en la punta de las hifas y ocurre por secreción de materiales como enzimas, precursores de membrana y pared celular (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Trinci, 1978; Harold, 1990, 1997; Riquelme *et al.*, 2000; Bartnicki-García, 2002). Este crecimiento apical está asociado a una acumulación de vesículas en el ápice de la hifa que se denomina Spitzenkörper (Spk), que se ha hipotetizado como el director del crecimiento polarizado (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Grove y Bracker, 1970; Howard y Aist, 1977; Trinci, 1978; Howard, 1981; Harold, 1990, 1997; Riquelme *et al.*, 2000; Bartnicki-García, 2002).

Se ha establecido que el transporte de materiales hacia el Spk está regulado por el citoesqueleto celular, que es una red de macromoléculas, que permite coordinar los movimientos al interior de la célula para la organización citoplasmática y el crecimiento celular. Los microtúbulos (Mts) y los filamentos de actina son los elementos más importantes del citoesqueleto en hongos filamentosos, los primeros son considerados como los principales responsables del transporte a larga distancia de vesículas secretoras al Spk, mientras que los filamentos de actina están involucrados principalmente en el movimiento a corta distancia del Spk a la membrana (Howard y Aist, 1977, 1980; Howard, 1981; Gooday, 1983; Roberson y Fuller, 1988; Gow, 1989; Hasek y Bartnicki-García, 1994; Heath, 1994; McDaniel y Roberson, 1998; Harris *et al.*, 2005; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006). Los Mts intervienen además en el posicionamiento de diversos organelos, la regulación de los movimientos intracelulares, así como durante la formación del huso mitótico. La polimerización de los Mts ocurre en los Centros Organizadores de Microtúbulos (MTOCs- por sus siglas en inglés Microtubule Organizing Centers) que en hongos filamentosos corresponden a los SPBs (por sus siglas en inglés Spindle Pole Bodies).

El SPB es un organelo laminar en forma de disco que se encuentra embebido en la membrana nuclear (Bullitt *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*, 1999; Adams y Kilmartin, 1999), con una cara al citoplasma y una cara nuclear, donde se polimerizan tanto los Mts nucleares como los citoplasmáticos.

El principal componente de los MTOCs es la γ -tubulina, una proteína conservada en células eucariotas, responsable de la formación de *novo* de Mts a partir de dímeros de α - y β -tubulina (Oakley y B. Oakley, 1989; Oakley *et al.*, 1990; Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991; Oakley, 1992). En la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, la polimerización de Mts nucleares está regulada por la proteína Spc110p, que se encarga del reclutamiento del complejo de la Tub4 (γ -tubulina) (Friedman *et al.*, 2001), mientras que la proteína Spc72p es responsable del reclutamiento del complejo de

la Tub4 en la placa externa del SPB (Pereira *et al.*, 1999; Hoepfner *et al.*, 2000). En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, la proteína Mto1 se encarga del reclutamiento y la polimerización de los Mts citoplasmáticos en la placa externa del SPB (Sawin y Tran, 2006) y la proteína Pcp1, ortólogo de la Spc110, se encarga del reclutamiento del complejo de la γ -tubulina hacia su placa interna, su mutación causa defectos en la formación del huso mitótico (Fong *et al.*, 2010).

Pese a la importancia de las proteínas de reclutamiento del complejo de la γ -tubulina al SPB, poco se sabe de ellas en hongos filamentosos. Hasta el momento solo se ha descrito el papel de la proteína ApsB, ortólogo de Mto1, en *Aspergillus nidulans*. La cual se encarga de la organización de los Mts en la cara citoplasmática del SPB, en los septos y en el citoplasma de *A. nidulans* (Veith *et al.*, 2005; Zekert *et al.*, 2010), la mutación de esta proteína no es letal, pero si ocasiona defectos en el desplazamiento de los núcleos (Clutterbuck, 1994). Aunque Flory y colaboradores (2002) demostraron la existencia del ortólogo de la pericentrina en *A. nidulans*, el gen hipotético AF365926, hasta el momento no se han reportado estudios que confirmen su funcionalidad. El hongo filamentosos *Neurospora crassa* es un buen candidato para el estudio de las proteínas de reclutamiento de la γ -tubulina, debido a que sus núcleos son haploides, posee un gen por cada proteína (Beadly y Tatum, 1941), su genoma ha sido totalmente secuenciado (Galagan *et al.*, 2003), presenta hifas de gran tamaño (aproximadamente 10 μ m de diámetro) y el uso de técnicas de marcaje con proteínas fluorescentes facilita el estudio de la dinámica de proteínas *in vivo*.

Mediante la comparación de secuencias de las proteínas Mto1 y Pcp1 en el genoma de *N. crassa* se identificaron los genes que codifican para estas, se analizó su dinámica y localización, así como su asociación con la γ -tubulina y los Mts durante la interfase y mitosis en el hongo filamentosos *N. crassa*.

II. Antecedentes

II.1 Hongos filamentosos

Las células de los hongos filamentosos son llamadas hifas, se caracterizan por presentar forma tubular, pueden ser septadas o aseptadas y generalmente son multinucleadas. El crecimiento en las hifas ocurre por la secreción polarizada de vesículas que transportan enzimas y material de crecimiento en el ápice de las células (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Gow, 1994; Bartnicki-García, 2002; Harris y Momany, 2004; Harris *et al.*, 2005). El Spk parece ser el principal orquestador del crecimiento polarizado regulando el proceso de exocitosis, se encarga de recibir, organizar y distribuir las vesículas exocíticas que serán secretadas en el ápice (Bartnicki-García, 2002). El citoesqueleto juega un papel fundamental en el crecimiento y la morfogénesis hifal (Heath *et al.*, 1982; Heath y Kaminskyj, 1989; Bartnicki-García, 2002). Los Mts son considerados como los principales responsables del transporte de vesículas a largas distancias hacia el Spk, mientras que el citoesqueleto de actina se encarga del transporte de vesículas a cortas distancias del Spk hacia la membrana (Howard y Aist, 1977,1980; Howard, 1981; Gooday, 1983; Gow, 1989; Roberson y Fuller, 1988; Hasek y Bartnicki-García, 1994; Heath, 1994; McDaniel y Roberson, 1998; Harris *et al.*, 2005).

El citoesqueleto microtubular es esencial para varios procesos celulares de las hifas como la mitosis, el crecimiento y la organización celular (Horio y Oakley, 2005; Fuchs *et al.*, 2005), la distribución y transporte de organelos (Seiler *et al.*, 1999; Straube *et al.*, 2001) y el mantenimiento de la polaridad celular (Riquelme *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2003; Horio y Oakley, 2005).

II.2 Microtúbulos

Los Mts son polímeros cilíndricos de 25 nm de diámetro que conforman la unidad básica del citoesqueleto microtubular. Están compuestos por dímeros de α y β -tubulina ensamblados alternadamente, con una terminal negativa y una positiva que es más dinámica. Los extremos de los Mts poseen inestabilidad dinámica caracterizada por el acortamiento y alargamiento de la longitud (Desai y Mitchison, 1997).

La dinámica de los Mts es regulada por diferentes proteínas que se asocian a ellos interactuando principalmente con sus terminales positiva y negativa. En el extremo positivo se encuentran varias proteínas que interactúan con el Mt regulando su inestabilidad dinámica. Dentro de las proteínas asociadas a los Mts (MAPs, por sus siglas en inglés-Microtubule Associated Proteins) se encuentran aquellas que los estabilizan y promueven su polimerización, las que inducen la despolimerización y las que se asocian a lo largo del Mt para el transporte de organelos y vesículas.

En el extremo negativo del Mt se encuentra la γ -tubulina, una proteína altamente conservada en células eucariotas, que se encarga de la nucleación de los Mts (Oakley y Oakley, 1989, Oakley et al., 1990). La nucleación de los Mts ocurre en sitios específicos llamados MTOCs.

II.3 γ -tubulina

Los MTOCs se encargan del arreglo temporal y espacial de los Mts (Brinkley, 1985; Mazia, 1987; Kimble y Kuriyama, 1992; Pereira y Shiebel, 1997; Erickson, 2000; Moritz y Agard; 2001). La γ -tubulina es el elemento central de los MTOCs, en células de mamíferos está asociada a los centrosomas y en células de hongos a los SPBs (Oakley y Oakley, 1989; Oakley et al., 1990; Horio et al., 1991;

Zheng *et al.*, 1991; Raff *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; López *et al.*, 1995; Sobel y Snyder, 1995; Zheng *et al.*, 1995; Marschall *et al.*, 1996).

La γ -tubulina se descubrió en 1989 en *A. nidulans*, localizada en los SPBs (Oakley *et al.*, 1990). La γ -tubulina pertenece a la familia de las tubulinas (Oakley y B. Oakey, 1989), es una proteína altamente conservada en células eucariotas (B. Oakley *et al.*, 1990; Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991). Esta proteína no forma parte del filamento del Mt, pero es un componente importante para la formación y la dinámica del mismo. Se encuentra localizada en la región negativa del Mt, confiriéndole una mayor estabilidad.

En células eucariotas, la γ -tubulina se encuentra asociada a otras proteínas formando dos complejos: el complejo pequeño de γ -tubulina (γ -TuSC), que está formado de dos subunidades de γ -tubulina y el complejo grande en anillo de γ -tubulina (γ -TuRC) formado de 12 a 14 unidades a las proteínas GRIPs (Gamma Ring Proteins por sus siglas en inglés) ensambladas en espiral con un diámetro de 25 nm aproximadamente (Zheng *et al.*, 1995; Erickson, 2000).

La γ -tubulina se distribuye de manera dispersa en el citoplasma y se acumula en los MTOCs (Mead y Schroer, 1995; Moudjou *et al.*, 1996; Straube *et al.*, 2003; Ramírez-Cota, 2008). En células animales la concentración de la γ -tubulina en los centrosomas cambia durante el ciclo celular (Stearns *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 1992) con un incremento repentino en el inicio de la mitosis (Khodjakov y Rieder, 1999). Dichtenber y colaboradores (1998) encontraron que los niveles de la γ -tubulina y de la pericentrina se incrementan progresivamente en los centrosomas de la fase G1, alcanzando su pico máximo en metafase e inmediatamente después alcanza los niveles basales. El rápido reclutamiento de la γ -tubulina a los MTOCs durante la mitosis ha sido asociado a las pericentrinas en mamíferos y a sus ortólogos en el resto de células eucariotas. En mamíferos la pericentrina (kendrina) se localiza en la matriz pericentriolar

interactuando con la γ -tubulina formando un entramado desde donde se polimerizan los Mts (Dictenber *et al.*, 1998) y en hongos el ortólogo de la pericentrina se localiza en la placa interna del SPB (Knop y Schiebel, 1997, 1998; Flory *et al.*, 2002).

II.3.1 Pericentrina

La pericentrina es una proteína altamente conservada en células eucariotas. En todos los casos se han visto implicadas en la nucleación de los Mts del huso mitótico mediante el ensamblaje del complejo de la γ -tubulina durante la mitosis (Knop y Schiebel, 1997, 1998; Zimmerman *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2005; Zhang y Megraw, 2007). En *S. cerevisiae* la proteína Spc110p interactúa con el complejo de Tub4p, homólogo de la γ -tubulina (Knop y Schiebel, 1997, 1998) y su mutación genera la deslocalización del complejo hacia el nucleoplasma (Yorder *et al.*, 2005). Esta proteína se asocia a la placa interna del SPB a través del dominio de unión de calmodulina en el extremo C-terminal, mientras que con el extremo N-terminal interactúa con las proteínas Spc97p y Spc98p del complejo de la Tub4p. Dichos dominios se encuentran conservados en la proteína Pcp1 de la levadura de fisión *S. pombe*, la delección de esta proteína afecta la viabilidad del hongo (Flory *et al.*, 2002). Al igual que sus ortólogos en otros organismos, está involucrada en el correcto ensamblaje del huso mitótico (Rajagoplan *et al.*, 2004). Fong y colaboradores (2010) demostraron que la mutante sensible a temperatura de Pcp1 afecta el reclutamiento de la γ -tubulina al SPB y la incorrecta formación de sí mismo.

II.3.2 Reclutamiento de la γ -tubulina en la placa externa del SPB

En hongos, el SPB es el principal nucleador de Mts, y se encarga tanto de la formación de Mts nucleares como de la formación de Mts citoplasmáticos. Como se mencionó anteriormente las proteínas Pcp1 de *S. pombe* y Spc110p de *S.*

cerevisiae, se encargan el reclutamiento del complejo de la γ -tubulina a la placa interna del SPB. Mientras que el reclutamiento del complejo de la γ -tubulina en la cara citoplasmática del SPB es realizada por las proteínas Spc72p en la levadura de gemación y por Mto1 en la levadura de fisión. La proteína Spc72p interactúa con el complejo de la Tub4p mediante el dominio N-terminal en la cara citoplasmática del SPB. La mutación de esta proteína genera malformación de los Mts citoplasmáticos y en consecuencia células polinucleadas y anucleadas. La sobre expresión de esta proteína genera múltiples Mts citoplasmáticos. La proteína Mto1 es requerida para el reclutamiento de la γ -tubulina en los MTOCs citoplasmáticos, incluyendo la cara citoplasmática del SPB (Sawin *et al.*, 2004; Venkatram *et al.*, 2004).

II.4 Estructura y composición del SPB

Aunque el SPB se ha identificado en hongos filamentosos, su estructura y composición no ha sido descrita. Afortunadamente existe un vasto conocimiento del SPB en levaduras, principalmente en *S. cerevisiae*. Mediante trabajos de microscopía electrónica, en esta levadura de gemación, se ha logrado describir la estructura del SPB, la cual está conformada por una placa externa electrodensa en contacto con el citoplasma, la placa central asociada en la membrana nuclear, la placa interna en contacto con el nucleoplasma y dos placas intermedias (IL-1 y IL-2) que se encuentran localizadas entre la placa externa y la placa central (Figura 1) (Robinow y Marak 1966; Moens y Rapport, 1971; Byers y Goetsch, 1974, 1975; - de la revisión Jaspersen y Winey, 2004). Un extremo de la placa central está asociado a una estructura conocida como el puente-medio (half-bridge), en donde se acumulan los elementos para formar el SPB hijo (Byers y Goetsch, 1974, 1975; Adams y Kilmartin, 1999).

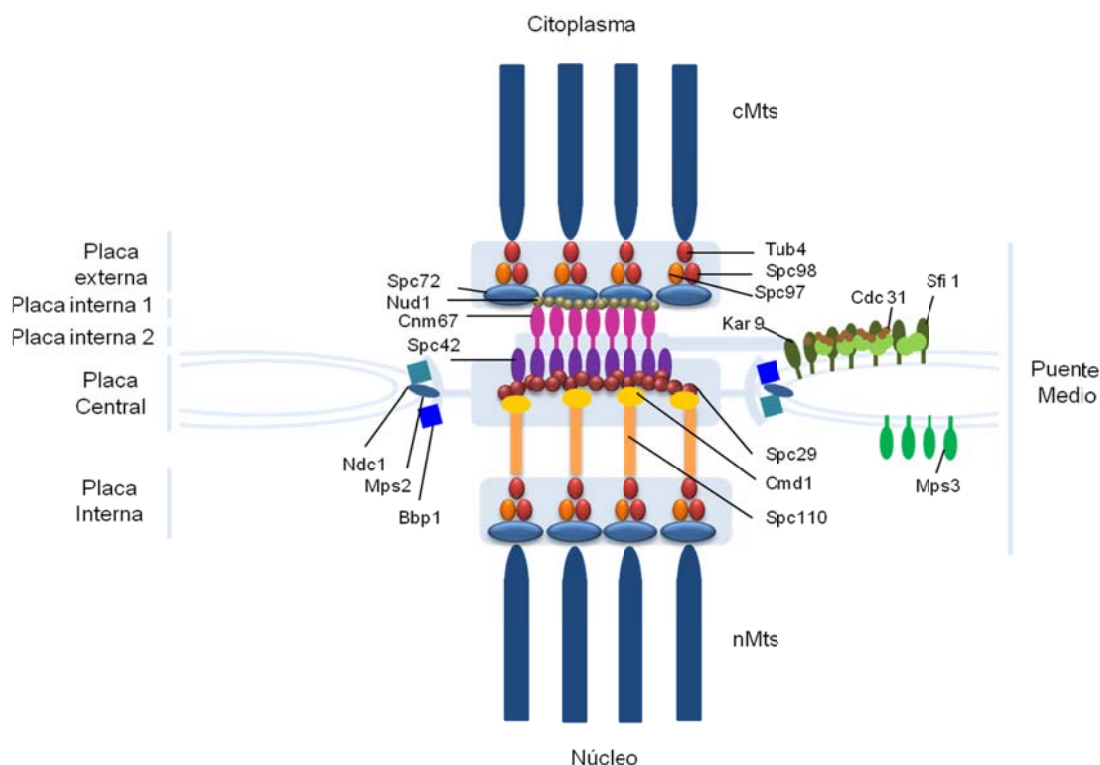


Figura 1. Estructura y composición del SPB. El SPB está embebido en la membrana nuclear, tiene una placa externa en contacto con el citoplasma con Mts citoplasmáticos y una cara interna en el nucleoplasma con Mts nucleares. La placa central se asocia a las proteínas de membrana nuclear Ndc1, Mps2 y Bbp1. Las placas internas se encuentran entre la placa central y la placa externa. El puente medio conformado por varias proteínas es el sitio de ensamblaje del SPB hijo (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004).

De acuerdo a Jaspersen y Winey (2004) los componentes del SPB son aquellas proteínas que lo forman, cuya mutación o delección resulta en un defecto dramático en su función y estructura. El núcleo del SPB está conformado por la proteína coiled-coil Spc42 (Donaldson y Kilmartin, 1996), aproximadamente 10,000 moléculas de esta proteína se ensamblan en un arreglo hexagonal dando lugar a la placa IL-2 (Bullit *et al.*, 1997). La región N-terminal de Spc42 interactúa con Spc29, la cual conforma la estructura de la placa central e interactúa con la región C-terminal de Spc110p (Stirling *et al.*, 1994; Kilmartin y Goh, 1996; Spang

et al., 1996; Sundberg *et al.*, 1996 Elliott *et al.*, 1999). La longitud de Spc110 determina la distancia de la placa central y la placa interna (Kilmartin *et al.*, 1993; O'Toole *et al.*, 1999). La región N-terminal de Spc110 se encuentra dirigida a la placa interna e interactúa directamente con Spc98, proteína de unión a Tub4p homólogo de la γ -tubulina (Kilmartin y Goh, 1996; Knop y Schiebel, 1997; Sundberg y Davis, 1997; Nguyen *et al.*, 1998; Vinh *et al.*, 2002). Tanto Tub4p, como Spc98p y Spc97p se localizan en la placa externa, Spc97 interactúa con la región N-terminal de la proteína Spc72 (Knop y Scheibel, 1998). La región C-terminal de Spc72 interactúa con la región C-terminal de Nud1p en la placa externa (Gruneberg *et al.*, 2000) y con la proteína de unión a Mts Stu2 mediante un dominio en la región central (Usui *et al.*, 2003). La proteína Cnm67p de la placa IL-1, funciona como enlace entre la placa externa y la placa IL-2, asociándose a la proteína Nud1p mediante la región N-terminal y mediante la región C-terminal con la C terminal de Spc42 (Adams y Kilmartin, 1999; Schaerer *et al.*, 2001).

Las proteínas que componen al SPB carecen de dominios transmembranales, por lo que el mantenimiento del SPB en la membrana depende de la interacción de la placa central con las proteínas de la membrana nuclear Ndc1, Mps2 y Bbp1. Ndc1 y Mps son proteínas membranales que se localizan en los extremos de la placa central del SPB, la mutación de estas proteínas impide la inserción del nuevo SPB en la membrana nuclear (Winey *et al.*, 1991, 1993; Chial *et al.*, 1998; Muñoz-Centeno *et al.*, 1999). La proteína Mps2 se une a la proteína Bbp1, la cual es necesaria para que se inserte el SPB en la membrana (Scharmm *et al.*, 2000). Dicha proteína no es membranal, pero interactúa con Mps2, así como con la proteína de la placa central Spc29 y la proteína del puente medio Kar9 (Scharmm *et al.*, 2000). La cara citoplasmática del puente medio es el sitio de ensamblaje del nuevo SPB (Byers y Goetsch, 1975). La estructura del puente medio es mantenida por las proteínas transmembranales Kar1 y Mps3 (Rose y Fink 1987; Vallen *et al.*, 1992; Spang *et al.*, 1995; Jaspersen *et al.*, 2002;). Estas proteínas interactúan con Cdc31, homólogo de la centrina en la cara

citoplasmática del puente medio, a su vez Cdc31 se asocia a la proteína Sfi1, la cual es necesaria para la duplicación del SPB (Byers, 1981; Baum *et al.*, 1986; Spang *et al.*, 1993,1995; Biggins y Rose 1994; Vallen *et al.*, 1994; Jaspersen *et al.*, 2002; Kilmartin, 2003; Li *et al.*, 2006).

II.4.1 Duplicación del SPB

La duplicación del SPB puede dividirse en tres etapas (Figura 2); la primera etapa ocurre durante la fase del ciclo celular G1, consiste en la elongación del puente medio y la formación de un SPB satélite en la placa externa del puente medio (Byers y Goetsch, 1974, 1975). En esta etapa se ensamblan las proteínas Spc42, Spc29, Cnm67 y Nud1 que le confieren estructura al SPB satélite (Adams y Kilmartin, 1999), además se requieren de la actividad de las proteínas Cdc31, Kar1, Mps3, Sfi1 y Mps1 (Byers, 1981; Rose y Fink, 1987; Winey *et al.*, 1991; Castillo *et al.*, 2002; Jaspersen *et al.*, 2002; Kilmartin, 2003). En la segunda etapa ocurre la duplicación del puente medio, la formación de la placa externa, las placas intermedias y central del SPB (Byers y Goetsch, 1974, 1975; Adams y Kilmartin, 1999). En la tercera etapa ocurre la fusión del puente medio y el reclutamiento de proteínas de membrana asociadas al SPB, generando un poro nuclear que permite la inserción de este en la membrana nuclear, al mismo tiempo ocurre el ensamblaje de la placa interna (Byers y Goetsch, 1974, 1975). Las proteínas Mps2, Ndc1, Bbp1 son requeridas para la inserción del SPB (Winey *et al.*, 1991, 1993; Schutz y Winey 1998; Schramm *et al.*, 2000), mientras que las proteínas Spc110, Cmd1 y el complejo de la γ -tubulina son ensambladas en la placa interna del SPB. La delección de Spc110 genera un SPB sin placa interna y Mts nucleares (Kilmartin y Goh, 1996; Sundberg *et al.*, 1996; Sundberg y Davis, 1997). Finalmente ocurre la ruptura del puente medio y la migración del SPB hijo en dirección opuesta al SPB madre. La ruptura del puente medio depende de la proteína Cdc28 en asociación con las ciclinas mitóticas Clb1-4 y la actividad del complejo ubiquitin ligasa Skp1-Cullin-F-box (SCF por las siglas en inglés) (Byers y

Goetsch, 1974, Fitch *et al.*, 1992; Mathias *et al.*, 1996), mientras que la migración del SPB es dependiente de los Mts y de las cinesinas Cin8 y Kip1 (Jacobs *et al.*, 1988; Roof *et al.*, 1992).

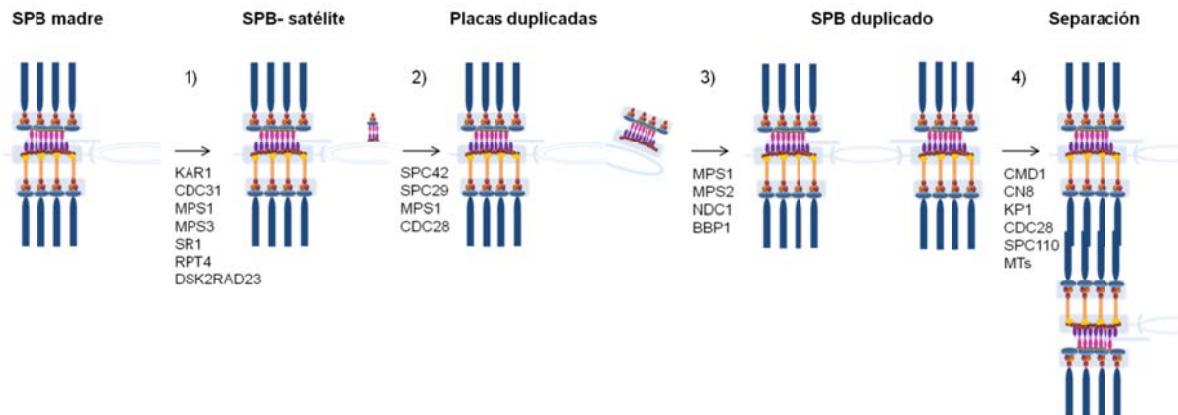


Figura 2. Duplicación del SPB. 1) La duplicación del SPB se inicia con la elongación del puente medio y la acumulación de los materiales que forman al SPB satélite, 2) continúa con la expansión del SPB satélite formando las placas central, intermedias y externa, 3) posteriormente ocurre la inserción del SPB a la membrana y la formación de la placa interna, 4) seguida por la migración de los SPBs a extremos opuestos del núcleo (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004).

II.5 Mitosis en hongos filamentosos

A diferencia de los eucariotas superiores, en hongos filamentosos el huso mitótico es formado a partir del ortólogo de los centromeros, los SPBs y la mitosis es cerrada, es decir que el proceso de segregación de los cromosomas ocurre dentro del núcleo mientras que en los eucariotas superiores la membrana nuclear es totalmente desensamblada.

La mitosis en ascomicetos y basidiomicetos inicia con un núcleo en interfase que posee un SPB anclado a la membrana nuclear, el cual se encuentra

asociado a los cromosomas a través de los filamentos de cromatina (Aist y Morris, 1999 y referencias citadas). Antes de la síntesis del DNA el SPB se duplica y durante la profase temprana migra hacia el polo opuesto del núcleo desde donde se polimerizan los Mts que darán origen al huso mitótico (Aist y Morris, 1999 y referencias citadas). Durante la metafase ocurre la condensación de los cromosomas y la asociación de estos con los Mts del huso mitótico a través de los centromeros (Knox-Davies, 1966; Motta, 1967; Robinow y Caten, 1969; Girbardt, 1971; Aist y Williams, 1972; Aist y Morris, 1999). La anafase ocurre en dos etapas, en la primera etapa denominada como anafase A, los cromosomas migran asincrónicamente hacia los polos opuestos en dirección a cada SPB, cuando llegan se inicia la polimerización de Mts citoplasmáticos o Mts astrales (Lú, 1964; Aist, 1969; Robinow y Caten, 1969; Aist y Bayles, 1988). En la anafase B, el huso mitótico incrementa su tamaño hasta tres veces y los Mts astrales alcanzan su mayor tamaño, mientras que la membrana nuclear colapsa en el centro dando lugar a dos núcleos hijos (Aist, 1969; Aist y Williams, 1972; Aist y Bayles, 1988). Finalmente en los núcleos post-mitóticos desaparece el huso mitótico y los microtubúlos astrales disminuyen, inmediatamente después entran a un periodo de rápida migración. El movimiento nuclear posterior a la anafase B ha sido relacionado a los Mts astrales asociados al SPB que ejercen una fuerza que jala la membrana nuclear en dirección al movimiento del núcleo (Aist, 1969; Aist y Morris, 1999).

III. Planteamiento del problema

Pese a que la organización y dinámica microtubular en *Neurospora crassa* ha sido ampliamente estudiada, se desconoce la existencia de los elementos moleculares que están involucrados en la nucleación y organización de los Mts en los SPBs y en sitios alternos a estos, que no está asociado al factor ya estudiado que es la γ -tubulina. La proteína GRB (NCU02411) y APS-1 (NCU12039) parecen ser buenos candidatos para funcionar como MTOCs dependientes o independientes de γ -tubulina.

IV. Hipótesis

Las proteínas GRB y APS-1 funcionan como MTOCs dependientes o independientes de γ -tubulina en *Neurospora crassa*. La GRB se encuentra asociada a la γ -tubulina en el SPB, constituyendo un MTOCs del huso mitótico. Mientras que la APS-1 forma parte de los MTOCs dependientes de γ -tubulina en el SPB y de MTOCs independientes de γ -tubulina en el citoplasma.

V. Objetivos

V.1 Objetivo General

Determinar la localización y la dinámica de las proteínas APS-1 y GRB durante la división nuclear del hongo *Neurospora crassa*.

V.2 Objetivos Específicos

Describir la distribución celular de las proteínas APS-1 y GRB en diferentes estadios celulares de *N. crassa*.

Identificar la relación espacial de las proteínas APS-1 y GRB con la γ -tubulina y los Mts.

VI. Metodología

VI.1 Organismos y medios de cultivo

Los organismos utilizados se enlistan en la Tabla I. Las células de *Escherichia coli* DH5- α se cultivaron en Medio Luria Bertani (LB) y en LB ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 37°C . Las cepas de *N. crassa* se mantuvieron y cultivaron en Medio Mínimo de Vogel (VMM- por sus siglas en inglés Vogel's Minimal Medium) con sacarosa (1.5 %) y agar (1.5 %) a una temperatura de 28°C . Las cepas de *N. crassa* con genotipo $his^{-3} hph^{+}$ fueron cultivadas en VMM enriquecido con histidina (0.5 mg ml^{-1}) e higromicina (0.2 mg ml^{-1}) a 28°C . Para la obtención de homocariones las cepas se crecieron en medio sintético de cruza con 1% de agar (SCM- por sus siglas en inglés Synthetic Crossing Medium) (Westergaard y Mitchel, 1947) a 25°C en oscuridad, hasta la maduración de los peritecios. Las conidias electroporadas se crecieron en medio FIGS (MMV+ fructosa 0.05%, glucosa 0.05%, sorbosa 2%) a 28°C hasta que aparecieron las colonias transformantes.

VI.2 Bioinformática

La búsqueda de las proteínas homologas de Mto1 (SPCC417.07c) y Pcp1 (SPAC6G9.06c) de *S. pombe* en el genoma de *N. crassa* fue realizada utilizando el programa *blastp* (Protein query/Protein database) de *N. crassa* database (© 2010 Broad Institute) en la siguiente dirección electrónica: <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/Blast.html;jsessionid=D37263331AA7657629A04350ECF84250.route980?sp=Sblastp>.

Se identificó el gen de la proteína *anucleate primary sterigmata protein B* (NCU12039.4) con 23 % de identidad con la proteína Mto1, el cual se denominó como APS-1, y una proteína hipotética (NCU02411.4) con 20 % de identidad con la proteína Pcp1, a la cual llamamos como GRB (por sus siglas en inglés- Gamma-tubulin Ring complex Binding protein). El análisis de las secuencias nucleóticas y el diseño de oligonucleótidos se realizó mediante el *software* Ape-A plasmid Editor v1.12 (©M. Wayne Davis, 2003-2005).

Tabla I. Organismos utilizados en este estudio.

ORGANISMO	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5- α	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi¹ gyrA96 relA1</i> λ -	Promega ®
<i>N. crassa</i> Tipo silvestre N150	<i>mat a</i> 74-OR23-1VA mt A	FGSC # 4200 FGSC # 2489
Δ mus-51:: <i>his</i> - ³ N3011	<i>delta mus-51::bar+</i> ; <i>his-3 mat A</i> <i>mus-51 delta::bar</i> ; <i>his-3 mat a</i>	FGSC # 9717 FGSC #9538
NMF138	<i>drfp:: h1 mat A</i>	Michael Freitag
NMF160	<i>Sad-2; hph+ mat A</i>	Michael Freitag
NMF 161	<i>Sad-2; hph+ mat a</i>	Michael Freitag
N2525	<i>ric^{RIP4} his³⁺::Pccg-1 Bml::sgfp⁺ mat a</i>	Michael Freitag
XPP95	<i>cen-h3-gfp ndc-1 mat a</i>	Pallavi Phatale
NMF140	<i>gfp-son1 mat a</i>	Michael Freitag
<i>per-1 A</i>	<i>csp-2;per-1 mat a</i>	FGSC #6662
<i>per-1 a</i>	<i>csp-2;per-1 mat a</i>	FGSC #6663
Δ <i>grb</i>	Δ <i>grb hph+ het mat a</i>	FGSC#11615
Δ <i>aps-1</i>	Δ <i>aps-1 hph+ het mat a</i>	FGSC#16154
TRM19-OC12	<i>β-tubulina-mchfp his⁻³⁺ :: pccg-1 mat a</i>	Callejas-Negrete
TRM01-RR01	<i>tbg::sgfp mat a::pccg-1</i>	Ramírez-Cota, 2008
TRM61-RR04	<i>grb::sgfp his⁻³⁺ ::pccg-1 mat a</i>	Este trabajo
TRM63-RR06	<i>grb::mchfp his⁻³⁺::pccg-1 mat a</i>	Este trabajo
TRM66-RR07	<i>grb::mchfp his⁻³ hph⁺ mat a</i>	Este trabajo
TRM67-RR08	<i>tbg::gfp his⁻³ hph⁺ mat a</i>	Este trabajo
TRM68-RR09	<i>tbg::mchfp his⁻³ hph⁺ mat a</i>	Este trabajo
TRM69-RR10	<i>aps-1::gfp his⁻³ hph⁺ mat a</i>	Este trabajo
TRM70-RR11	<i>aps-1::mchfp his⁻³ hph⁺ mat a</i>	Este trabajo

VI.3 Oligonucleótidos

Para realizar el marcaje fluorescente de GRB expresado bajo el control del promotor *ccg-1* (Freitag *et al.*, 2004), se diseñaron oligonucleótidos en base al marco de lectura abierto (ORF- por sus siglas en inglés Open Reading Frame) del gen *grb* (NCU02411.4) con una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *XbaI* hacia el extremo 5' y una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *PacI* en el extremo 3'. Estas secuencias se encuentran en los sitios de clonación múltiple de los vectores que se utilizaron para las construcciones.

Para el marcaje endógeno de los genes *grb*, *aps-1* y *tbg*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para cada gen; un par para amplificar el fragmento 5' que corresponde aproximadamente a 1 kb de la región terminal del ORF excluyendo el codón de paro, y otro para el fragmento 3' que corresponde aproximadamente a 1kb de la secuencia río abajo de cada gen. Los oligonucleotidos glyF y LoxpR se utilizaron para amplificar el cassette que contiene el ORF de proteína fluorescente (GFP o mCHFP) unido al gen de resistencia a higromicina (*hph*- por sus siglas en inglés Higromycin Phosphotransferase) (Tabla II). Para la construcción de los cassettes 5' de cada gen unido al ORF de la proteína fluorescente y a la secuencia *hph* interrumpida (1/2 *hph*), se utilizaron los oligonucleotidos 5' sentido de cada gen en combinación con el oligonucleótido *hphSM* antisentido. Para la construcción de los cassettes *hph* + 3' de cada gen, se utilizó el oligonucleotido *hphSM* sentido en combinación con el oligo 3' antisentido de cada gen.

VI.4 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

El DNA de las cepas de interés se extrajo de micelio cultivado en MMV líquido a 30°C durante 3 d. El micelio se filtró y se lavó con agua destilada-estéril.

Se dejó secar, se depositó en tubos de 1.5 ml y se almacenó a -80°C por 48 h. Posteriormente se transfirió a un mortero frío y estéril, donde se agregó nitrógeno líquido y se maceró hasta tener un polvo fino. El polvo se procesó con el Kit DNeasy® plant (QUIAGEN, Cat. No. 69104) siguiendo el protocolo del fabricante.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

OLIGO-NUCLEÓTIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
GRBxbaF	5' GCT [^] CTAG.AATGGTCCAGCCGGGCG TC 3'	Este trabajo
GRBpacR	5' CCTTA.AT [^] TAAGATAGCAGCCCCCTCA 3'	Este trabajo
APS-15'F	5' AGCGTGACCTGTGGAGAGAATATCA 3'	Este trabajo
APS-15'R	5' CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCG GATCCCCTTTTCGCCGTT 3'	Este trabajo
APS-13'F	5' TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGA TGGTATGGACCGTAGCCGG 3'	Este trabajo
APS-13'R 3'	5' ATATAAGAACGAGAATGAGTAAAA 3'	Este trabajo
GRB5'F	5' AAAAAGCTCGAGCGGGCGAGAA 3'	Este trabajo
GRB5'R	5' CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCG ATAGCAGCCCCCCTCAT 3'	Este trabajo
GRB3'F	5' TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGT CATGGTCATGACAACGTA 3'	Este trabajo
GRB3'R	5' TTGAAAGTCAAATACCGAGTCTTCTT 3'	Este trabajo
Tbg5'F	5' TTCTTTCTACTCGAGCGACTGAA 3'	Este trabajo
Tbg5'R	5' CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCA GCCATTCTTGTCCGT 3'	Este trabajo
Tbg3'F	5' TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGG TCTTAGCCGGACAGATGAT 3'	Este trabajo
Tbg3'R	5' TTTTCTTCTGGGGAAGTTGGAGCAA 3'	Este trabajo
GlyF	5' GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAG 3'	Michael Freitag
LoxpR	5' TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG 3'	Michael Freitag
hphSMF	5' AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG 3'	Michael Freitag
hphSMR	5' GGTCATTGACTGGAGCGAGGCGA 3'	Michael Freitag
FPPacF	5' TTAATTAACATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAG 3'	Michael Freitag
FPEcoR	5'CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA 3'	Michael Freitag

Tabla III. Plásmidos utilizados en este trabajo

PLASMIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pMF272	<i>N. crassa his-3, ccg1</i> , sitio de clonación múltiple (<i>Xba I</i> , <i>Spe I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i> y <i>Pac I</i>), <i>sgfp</i> carboxi terminal; <i>amp^R</i>	Freitag, 2004
pJV15-2	<i>N. crassa his-3, ccg1</i> , sitio de clonación múltiple (<i>Xba I</i> , <i>Spe I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i> y <i>Pac I</i>), <i>mCHFP</i> carboxi terminal; <i>amp^R</i>	Jorge Verdín
pMF272+GRB	<i>N. crassa his-3, ccg1</i> , sitio de clonación múltiple (<i>Xba I</i> , <i>Spe I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i> y <i>Pac I</i>), <i>GRB::sgfp</i> ; <i>amp^R</i>	Este trabajo
pJV15-2+GRB	<i>N. crassa his-3, ccg1</i> , sitio de clonación múltiple (<i>Xba I</i> , <i>Spe I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i> y <i>Pac I</i>), <i>GRB::mCHFP</i> ; <i>amp^R</i>	Este trabajo
pZero_pMF357_pPP43	<i>kan</i> ; <i>gfp</i> ; 10xgly; <i>hph</i> ; <i>loxp</i>	Pathale <i>et al.</i>
pRR1_0mCherry	<i>kan</i> ; <i>mCHFP</i> ; 10xgly; <i>hph</i> ; <i>loxp</i>	Este trabajo

VI.5 Construcción de plásmidos

VI.5.1 Plásmidos *pMF272+grb* y *pJV15-2+grb*

El marco de lectura abierto del gen *grb* (~4,600 pb) se amplificó por PCR utilizando la enzima Supermix Platinum (Invitrogen®). La mezcla de reacción contenía 1.5 µl de oligonucleótido GRBxbaF sentido (10 µM), 1.5 µl de oligonucleótido GRBpacR antisentido (10 µM), 2 µl de DNA genómico de *N. crassa* silvestre y 45 µl de supermix, en un volumen final de 50 µl. La mezcla se introdujo en un termociclador BIORAD modelo (iCycler™ Sealing Ring for iCycler 96 Well Reaction Module 170-8731) con el siguiente ciclo: 2 min a 94°C más 35 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 59°C de alineamiento y 5 min a 68°C de extensión, terminando con un ciclo de 7 min a 68°C de extensión final.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sambroock y Russell, 2001) en tampón TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM; pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 75 V. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con el marcador de peso molecular λ (DNA del fago λ cortado con EcoRI y Hind III), y las bandas de DNA correspondientes al

grb se purificaron mediante el kit de purificación Promega® (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Cat. #A9281), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

El gen *grb* se insertó al sitio de clonación múltiple entre la secuencia de reconocimiento para *Xba*I (T[^]CTAGA) y *Pac*I (TTAAT[^]TAA) de pMF272 y pJV15-2, dando lugar a pMF272+GRB y pJV15-2+GRB respectivamente (Figura 3). Para ello se digirieron tanto el *grb* y los plásmidos con las enzimas *Pac*I y *Xba*I. La mezcla de reacción para la digestión del inserto contenía 38 μ l de *grb*, 5 μ l NE Buffer 4, 5 μ l de BSA 10 X, 1 μ l de *Xba*I (20 U μ l⁻¹) y 1 μ l de *Pac*I (10 U μ l⁻¹) en un volumen final de 50 μ l, ambas enzimas de *New England Biolabs*®. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C. Para la digestión de los plásmidos la mezcla de reacción contenía 5 μ l del plásmido (pMF272 o pJV15-2), 5 μ l NE Buffer 4, 5 μ l de BSA 10 X, 1 μ l de *Xba*I (20 U μ l⁻¹) y 1 μ l de *Pac*I (10 U μ l⁻¹), en un volumen final de 50 μ l. Las digestiones se incubaron 3 h a 37°C y después de 2 h de incubación se agregó 1.5 μ l de fosfatasa alcalina de camarón al los plasmidos (Promega®).

Tanto la digestión del inserto y de los plásmidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior purificación con el kit Promega® (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Cat. #A9281). Los plásmidos e insertos se ligaron a una proporción de 1 μ l:3 μ l en un volumen final de 15 μ l, utilizando la enzima T4 DNA ligasa Promega®. La mezcla se dejó incubando a 35°C durante toda la noche. Esta mezcla se utilizó en la transformación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5- α .

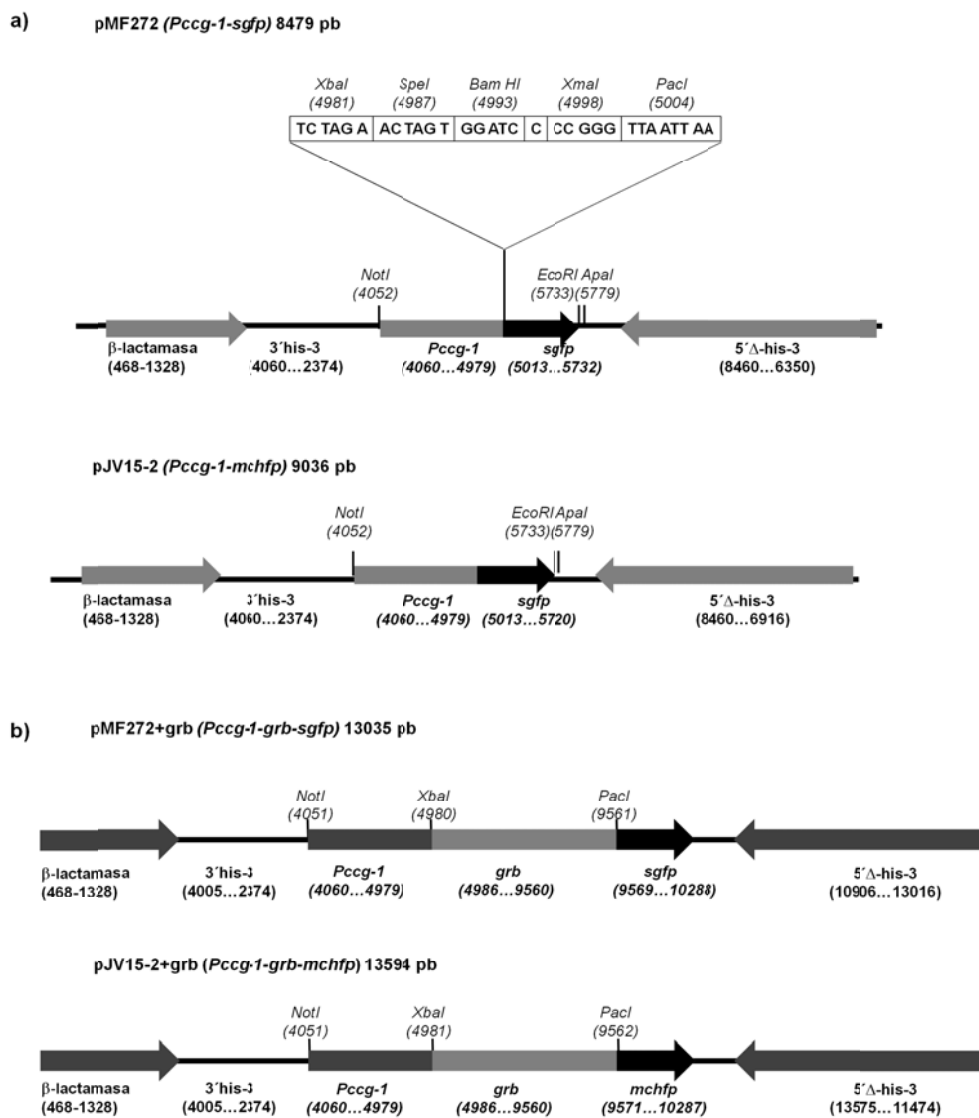


Figura 3. Diagrama de los vectores utilizados para la expresión de GRB-GFP y GRB-mCHFP. (a) El plásmido pMF272 se caracteriza por la presencia del gen *sgfp* (5013-5732), cuya expresión está regulada por el promotor de *N. crassa* *ccg-1* (4060-4979). Las secuencias 5' Δ-his-3 (8460-6350) y 3' his-3 (4005-2379) sirven para dirigir el plásmido al locus del gen *his-3* de *N. crassa*. El gen β-lactamasa (468-1328) confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* que lo contienen. El plásmido pJV15-2 derivado de pMF272 contiene la secuencia de la *mchfp* en lugar de la *gfp* (5013-5720) y su expresión es regulada por el promotor fuerte *ccg-1* al igual que en el pMF272. (b) El plásmido pMF272+grb derivado del pMF272 se caracteriza por la presencia del ORF del gen *grb* (4986-9560) seguido por la *gfp* (9569-10288), y el plásmido pJV15-2+grb derivado del pJV15-2 se caracteriza por presentar el ORF del gen *grb* (4986-9560) seguido por la *mchfp* (9571-10287).

Para la transformación de células competentes se adicionaron 5 μ l de la mezcla de ligación pMF272+*grb* o pJV15-2+*grb* a 50 μ l de células competentes de *E. coli* DH5- α . La mezcla se incubó 30 min en hielo, posteriormente se le dio un choque térmico a 42°C durante 2 min, y finalmente se mantuvo 2 min en hielo. Se agregaron 900 μ l de LB líquido y se incubó a 37°C durante una hora en agitación a 200 rpm, se centrifugó un minuto a 13,000 rpm y se eliminaron 850 μ l del sobrenadante. La pastilla celular de las recombinantes pMF272+*grb* y pJV15-2+*grb* se sembró en placas de LB- ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Para corroborar la clonación de los fragmentos de interés en los plásmidos se realizó un PCR de colonia. El cual consistió en utilizar como cadena patrón una suspensión bacteriana de las distintas recombinantes.

A cada suspensión bacteriana de las clonas transformadas con el pMF272+*GRB* y el pJV15-2+*GRB* se le agregó 0.5 μ l de buffer 10X, 2.5 μ l de MgCl 25 mM, 2.5 μ l de dNTPs 1mM, 1.25 μ l de los oligonucleótidos GRBxbaF 10 μ M y GRBpacR 10 μ M, y finalmente 0.3 μ l de la enzima Go-Taq flexy (Promega®) en un volumen final de 20 μ l. Para la PCR se utilizó el ciclo descrito anteriormente para la amplificación del gen *grb*.

Las colonias positivas mencionadas anteriormente se sembraron en 5 ml de LB-ampicilina líquido y se incubaron 37°C en agitación a 250 rpm durante toda la noche. La suspensión bacteriana fue transferida a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron durante un min a 13,000 rpm. El sobrenadante se desechó, y la pastilla celular se resuspendió en 100 μ l de la solución P1 (Tris-HCl pH 8 50 mM, EDTA 10 mM, RNASA 0.1 mg ml⁻¹). Después se agregó 150 μ l de la solución P2 (NaOH, 200 mM, SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión (7 tiempos), se incubó 5 min en hielo. Pasada la incubación se agregaron 200 μ l de la solución P3 (Acetato de Potasio 1M pH 5.5) y se mezcló por inversión (7 tiempos), se incubó 10 min en hielo, y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml. El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol

al 96% y se incubó a -20°C durante 30 min, se mezcló por inversión varias veces y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó y el DNA se lavó con 500 μl de etanol al 70%, después se centrifugó 5 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando a temperatura ambiente durante 10 min. El DNA plasmídico se resuspendió en 80 μl de agua HPLC libre de nucleasas.

Para corroborar la integridad del ORF del gen *grb*, se digirieron los plásmidos pMF272+*grb* y pJV15-2+*grb* con las enzimas de restricción *Xba*I y *Pac*I. Para esto se utilizaron 2 μl de plásmido ($100\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), 0.25 μl de *Xba*I (20 U), 0.5 μl de *Pac*I (10 U), 2 μl de buffer NEB #2 10X, 2 μl de BSA 10X y 13.25 μl de agua HPLC, para obtener un volumen final de 20 μl . La mezcla se incubó 2.5 h a 37°C . Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

IV.5.2 Plásmido pRR1_0mCherry

El ORF de la proteína fluorescente mCherry contenido en el pJV15-2 (Tabla III) se amplificó con la técnica de PCR. La mezcla de reacción contenía 2.5 μl del buffer *Pfu Taq* 10x, 0.25 μl de dNTP's 20 mM, 0.5 μl del oligonucleótido sentido FPPacF 10 μM , 0.5 μl del oligonucleótido antisentido FPEcoRI 10 μM , 1 μl de pJV15-2 y 0.5 μl de *Pfu DNA polymerase* (casera, aportada amablemente por el Dr. Michael Freitag) en un volumen final de 25 μl (la mezcla de reacción se hizo por duplicado). La reacción se colocó en el Termociclador DNA Engine Peltier® Thermal Cycler (BioRad) y se sometió a las siguientes condiciones de temperatura: 2 min a 94°C más 35 ciclos de 20 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 55°C de alineamiento y 1 min 30 segundos a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final.

El producto de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Sambroock y Russell, 2001) en tampón TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM; pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 75 V en una cámara especial para tal fin. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con el marcador de peso molecular λ (DNA del fago λ cortado con *EcoRI* y *Hind III*), y las bandas de DNA correspondientes *mCHFP* se purificaron siguiendo el protocolo del kit de purificación Promega® (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Cat. #A9281).

El gen *mchfp* se insertó en el sitio de clonación múltiple entre las enzimas *PacI* (TTAAT[^]TAA) y *EcoRI* (G[^]AATTC) de pZero_pMF357_pPP43 dando lugar al pRR1_0mCherry (Figura 4). Para ello se realizó la doble digestión de *mCHFP* (inserto) y de pZero_pMF357_pPP43 con las enzimas *PacI* (*New England Biolabs*) y *EcoRI* (*Invitrogen*). Para la mezcla de reacción del inserto se utilizaron 35 μ l de *mCHFP* y para la mezcla de reacción del plásmido se utilizaron 5 μ l pZero_pMF357_pPP43, ambas digestiones contenían 5 μ l NE Buffer 4, 5 μ l de BSA 10 X, 1 μ l de *PacI* (10 U μ l⁻¹) y 1 μ l de *EcoRI* (10 U μ l⁻¹), en un volumen final de 50 μ l. La reacción se incubó a 37°C durante 3 h, después de 2 h de incubación se agregó 1.5 μ l de fosfatasa alcalina de camarón (Promega®) a la digestión del plásmido y se incubó una hora más.

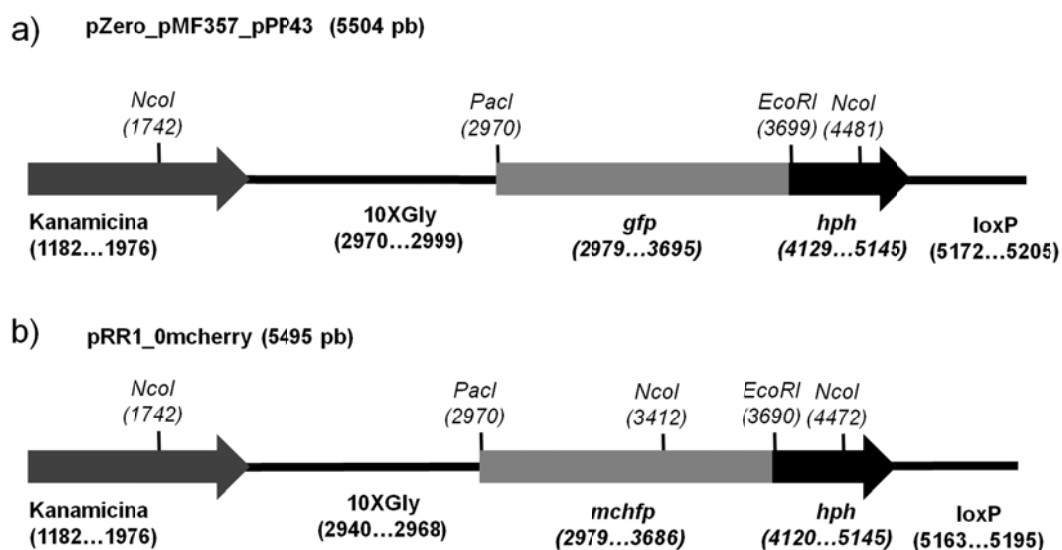


Figura 4. Diagrama del plásmido pZero_pMF357_pPP43. El plásmido se caracteriza por expresar el ORF del gen *gfp* (2979-3695) seguido por el gen *hph* (4120-5145), la secuencia 10Xgly (2970-2999) produce una bisagra de 10 glicinas y la secuencia *loxP*(5172-5205) es reconocida por la enzima recombinasa Cre en bacterias que es útil para recombinación entre dos secuencias *loxP*, resultando en la escisión, recombinación o traslocación del DNA (Van Duyne, 2001), el plásmido posee además el gen de resistencia al antibiótico kanamicina (1182-1976). (d) Diagrama del pRR1_0mcherry derivado de la clonación de *mchfp* en el pZero_pMF357_pPP43, se caracteriza por expresar el ORF del gen *mchfp* (2979-3686) seguido por el gen *hph* (4120-5145).

Para la transformación de células competentes, se adicionaron 5 μ l de la mezcla de ligación pZero_pMF357_pPP43+mCHFP a 50 μ l de células competentes de *E. coli* DH5- α . La mezcla se incubó 30 min en hielo, posteriormente se le dio un choque térmico a 42°C durante 2 min, y finalmente se mantuvo 2 min en hielo. Se agregaron 900 μ l de LB líquido y se incubó a 37°C durante una hora en agitación a 200 rpm, se centrifugó un minuto a 13,000 rpm y se eliminaron 850 μ l del sobrenadante. La pastilla celular de las recombinantes se sembró en medio Broth agar-kanamicina, las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Para corroborar la clonación de los fragmentos de interés en los plásmidos, se realizó un PCR de colonia. El cual consistió en utilizar como cadena patrón una suspensión bacteriana de las distintas recombinantes. Las suspensiones bacterianas de las recombinantes que contienen el pZero_pMF357_pPP43+mCHFP, se utilizaron en la mezcla de reacción para amplificar el ORF de *mCHFP* con la enzima *Pfu* DNA polimerasa bajo las mismas condiciones de reacción mencionadas anteriormente.

Las colonias positivas se sembraron en 5 ml de LB-kanamicina y se incubaron a 37°C en agitación a 250 rpm durante toda la noche. La suspensión bacteriana fue transferida a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron durante un min a 13,000 rpm. El DNA plasmídico se purificó como se explicó en el apartado V.5.1. Los plásmidos extraídos fueron digeridos con la enzima de restricción *Nco* I (*Biolabs*). Para esto se utilizaron 2 µl de plásmido (100 ng µl⁻¹), 0.5 µl de *Nco* I (10 U), 2 µl de buffer NEB #3 10X y 16.5 µl de agua HPLC, para obtener un volumen final de 20 µl. la mezcla se incubó 2 h a 37°C. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

VI.6 Construcción de cassettes para marcaje endógeno

Los cassettes para el marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina con las proteínas fluorescentes GFP y mCHFP, se construyeron mediante la técnica de PCR de fusión (Figura 5). Para ello se amplificaron los fragmentos de DNA de los genes *gfp_hph* y *mchfp_hph* contenidos en los plásmidos pZero_pMF357_pPP43 y pRR1_0mcherry, los cuales se fusionaron con los fragmentos 5' (aproximadamente de 1kb de DNA correspondiente a la región terminal del ORF del gen) o 3' (secuencia río abajo de gen de aproximadamente 1k) del *grb*, *aps-1* y *tbg*.

VI.6.1 PCR del cassette *gfp_hph* y *mchfp_hph*

La mezcla de reacción para amplificar los fragmentos *gfp_hph* y *mchfp_hph* contenía 2.5 µl de Pfu Buffer 10X, 0.5 µl de oligonucleótido sentido GlyF 10 µM, 0.5 µl de oligonucleótido antisentido LoxpR 10 µM, 0.25 µl de DNTP's 20 mM, 0.5 µl de DNA templete (pZero_pMF357_pPP43 o pRR1_0mCherry), 0.5 µl de *Pfu DNA polimerasa* (Enzima casera; Michael Freitag), en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se colocó en un Termociclador DNA Engine Peltier® Thermal Cycler (BioRad) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94°C más 35 ciclos de 20 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 60°C de alineamiento y 4 min 40 s a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (bromuro de etidio al 0.1 %) a 80 V. Las bandas correspondientes a los cassettes se purificaron mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®).

VI.6.2 PCR de los fragmentos 5' y 3' de los genes *grb*, *aps-1* y *tbg*

Para la amplificación de los fragmentos 5' de cada gen la mezcla de reacción contenía 2.5 µl de Pfu Buffer 10X, 0.25 µl de DNTP's 20 mM, 0.5 µl de *Pfu DNA polimerasa*, 0.5 µl de oligonucleótido sentido (5'F o 3'F de cada gen), 0.5 µl de oligonucleótido antisentido (5'R o 3'R de cada gen) y como templete se utilizó 0.5 µl de DNA genómico de *N. crassa*, la reacción se llevó a un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se colocó en un Termociclador DNA Engine Peltier® Thermal Cycler (BioRad) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94°C más 35 ciclos de 20 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 55°C de alineamiento y 2 min 30 segundos a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (bromuro de etidio al 0.1 %) a 80 V. Las bandas

correspondientes a los cassettes se purificaron mediante el Kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®).

VI.6.3 PCR de fusión de los fragmentos 5' y 3' de los genes *grb*, *aps-1* y *tbg* con *gfp_hph* y *mchfp_hph*

Los cassettes generados mediante la técnica de PCR de fusión, recibieron la denominación 5' o 3' seguido del nombre de la proteína y el marcaje *sgfp* o *mchfp*. Los fragmentos 5' consisten en una secuencia 5' de cada gen seguida por una bisagra de 10 glicinas, el gen de la *sgfp* o *mchfp* y la secuencia incompleta del gen *hph* (1/2hph). Los fragmentos 3' están formados por una secuencia incompleta del gen *hph* seguido por la secuencia 3' de cada gen (Figura 5b).

La mezcla de reacción para amplificar el cassette 5'x_10XGli_gfp"o"mchfp_1/2hph (en donde x=*grb*, *aps-1* o *gtub*): 12.5 µl de 2X *Phusium mix* (Tinnzymes®), 1.0 µl del oligonucleótido sentido 5'F de cada gen 10 mM (*tbg*, *grb* o *Aps-1*), 1.0 µl del oligonucleótido antisentido HPH-SM R 10 mM, como cadena patron 1.0 µl del cassette *gfp_hph* o *mchfp_hph* y 1.0 µl del fragmento 5' (*tbg*, *grb* o *aps-1*). La mezcla de reacción para amplificar el cassette 1/2hph_3'x ((en donde x=*grb*, *aps-1* o *tbg*) de cada gen contenía los mismos reactivos que la mezcla anterior con las siguientes modificaciones: 1.0 µl del oligonucleótido sentido HPH-SM F 10 mM, 1.0 µl del oligonucleótido antisentido 3'R 10 mM de cada gen y 1.0 µl del fragmento 3' del gen *tbg*, *grb* o *aps-1*. Ambas mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 25 µl y se colocaron en un Termociclador DNA Engine Peltier® Thermal Cycler (BioRad) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94°C más 35 ciclos de 20 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 55°C de alineamiento y 3 min segundos a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (bromuro de etidio al 0.1 %) a 80 V. Las bandas correspondientes a los cassettes se purificaron mediante el Kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®).

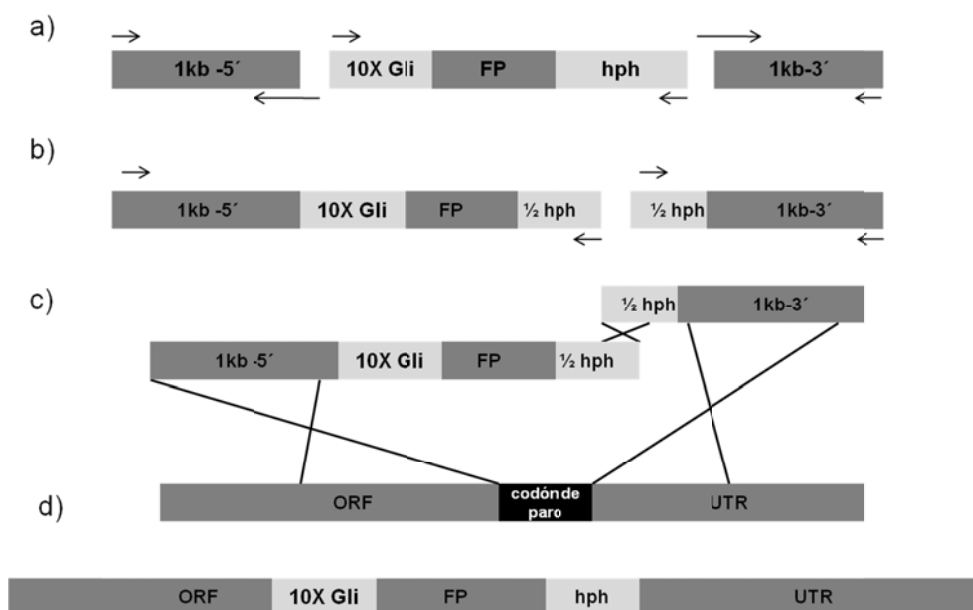


Figura 5. PCR de fusión para el marcaje endógeno de proteínas en el hongo *N. crassa*. (a) amplificación de los fragmentos 5' y 3' de los genes de interés y del cassette 10Xgli (que codifica para 10 glicinas) seguido de la secuencia que codifica para la proteína fluorescente (GFP o mCHFP) y del gen de resistencia a higromicina (hph). (b) PCR de fusión del fragmento 5' con el cassette 10XGli_FP_1/2Hph y del fragmento 3' con 1/2Hph. (c) los dos cassettes construidos se utilizan en la transformación de DNA genómico de *N. crassa*, mediante recombinación homóloga se reemplaza el gen nativo de la proteína de interés por los cassettes que contienen el 5'_10Xgli_FP_hph.

VI.7 Transformación de *N. crassa*

Las cepas de *N. crassa* FGSC # 9717 (*delta mus-51::bar+*; *his-3 mat A*) y FGSC #9538 (*mus-51 delta::bar*; *his-3 mat a*) se sembraron en MMV enriquecido

con histidina, e incubaron a 28°C durante una semana, y se expusieron a luz solar a temperatura ambiente por 3 d. Las conidias maduras se extrajeron agregando agua estéril, agitando vigorosamente el matraz hasta desprender las conidias. El sobrenadante se filtró con una gasa estéril en un tubo de 50 ml. Este procedimiento se repitió en varias ocasiones. El total del sobrenadante filtrado se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm y se desechó el sobrenadante. La pastilla de conidias se lavó 3 veces con sorbitol 1 M estéril. Finalmente se resuspendieron en 80 μ l de sorbitol 1 M. Las conidias de la cepa FGSC #9717 se transformaron con los plásmidos pMF272+GRB y pJV15-2+GRB, mientras que las conidias de la cepa FGSC #9538 se transformaron con los cassettes 5'x_10XGli_gfp o mchfp_1/2hph y 1/2hph_3'x.

En una celda de electroporación estéril de 0.2 mm se mezclaron 80 μ l de conidias de la cepa FGSC # 9717 con 20 μ l de plásmido pMF272+GRB o pJV15-2+GRB (100 ng μ l⁻¹) y se incubaron 15 min en hielo. De la misma manera, para el marcaje endógeno, se mezclaron 50 μ l de conidias de la cepa FGSC #9538 con 10 μ l de cada uno de los cassettes. Para el marcaje endógeno con GFP se utilizaron los fragmentos 5'x_10XGli_gfp_1/2hph y 1/2hph_3'x, y para el marcaje endógeno con mCHFP se utilizaron los fragmentos 5'x_10XGli_mchfp_1/2hph y 1/2mchfp_3'x. Tanto para el marcaje exógeno (plásmidos) y endógeno (fragmentos de DNA), el ensayo de transformación genética se hizo en el electroporador Biorad Gene Pulser Electroporator bajo las siguientes condiciones: 600 OHMS, 25 μ F, 1.5 KV por 12-14 milisegundos. Posterior al pulso eléctrico se agregaron 900 μ l de sorbitol frío. Las conidias electroporadas con los plásmidos se transfirieron a un tubo de 25 ml estéril y se mezclaron con 4 ml MMV-líquido, incubándose durante 2 h en agitación (200 rpm) a 30°C en oscuridad. Después de la incubación se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min, descartándose 4.8 ml del sobrenadante y las conidias se resuspendieron en el volumen restante, posteriormente se sembraron en 4 placas de medio FIGS agar. Mientras que las conidias electroporadas con los fragmentos de DNA para marcaje endógeno, se

transfirieron a tubos de cultivo con 5 ml con medio de recuperación (3 tubos por cada transformante) y se incubaron a 30°C durante 2 h a 200 rpm, posteriormente cada cultivo se transfirió a un tubo de cultivo con 5 ml de medio top agar (almacenados a 55 °C). Inmediatamente se vaciaron sobre las placas con medio bottom agar solido con histidina (0.5 mg ml⁻¹) e higromicina (0.3 mg ml⁻¹). Las placas se incubaron a 30°C hasta que aparecieron las primeras colonias. Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero no se agregó ningún plásmido o cassette de DNA a las conidias.

La recuperación de las colonias transformantes se realizó transfiriéndolas individualmente en tubos de 5 ml con MMV agar incubándolas a 28°C. Las colonias que expresaban la GFP o mCHFP, se seleccionaron de acuerdo a la emisión de fluorescencia observada con el microscopio confocal LSM Meta 510 (Carl Zeiss), con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 510 nm para la GFP, y una longitud de onda de excitación de 505-530 nm y de emisión de 596-703 nm para la mCHFP.

VI.8 Southern Blot

VI.8.1 Digestión Enzimática

La integración correcta de los cassettes, para el marcaje endógeno de los genes *tbg*, *grb* y *aps-1* en el genoma de *N. crassa*, se corroboró por la técnica de Southern Blot (Sambrook y Rusell, 2001). Para ello se realizó la extracción casera de DNA genómico de las cepas transformantes. El DNA genómico obtenido fue digerido con distintas enzimas de restricción. Las transformantes que contienen *tbg-gfp* y *tbg-mchfp* (TRM67-RR08 y TRM68-RR09 respectivamente) se digirieron con las endonucleasas *HindIII* (Invitrogen) y *SmaI* (Invitrogen). La mezcla de reacción para la digestión con *HindIII* contenía 10 µl de DNA genómico de las cepas TRM67-RR07 o TRM68-RR08, 2 µl de Reactante 2 y 0.5 µl de enzima

HindIII en un volumen final de 20 μ l, se incubó toda noche a 37°C. La mezcla de reacción para *SmaI* contenía 10 μ l de DNA genómico (TRM67-RR08y TRM68-RR09), 2 μ l de Reactante 2 y 0.5 μ l de enzima *SmaI* en un volumen final de 20 μ l, y se incubó a 30°C durante toda la noche; La transformante GRB-mCHFP (TRM66-RR07) se digirió con las enzimas *SacI* (New England Biolabs) y *PstI* (Invitrogen). La mezcla de reacción para la digestión con *SacI* contenía 10 μ l de DNA genómico de la cepa TRM66-RR07, 2 μ l de NEB I 10X, 2 μ l de BSA 10 X y 0.5 μ l de enzima *SacI* en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de reacción para la digestión con *PstI* contenía 10 μ l de DNA genómico de la cepa TRM66-RR07, 2 μ l de Reactante 10 y 0.5 μ l de enzima *PstI* en un volumen final de 20 μ l. Ambas digestiones se incubaron durante toda la noche a 37°C. El DNA de las cepas que expresan la APS-1-GFP y APS-1-mCHFP (TRM69-RR10 y TRM70-RR11) se digirieron con las enzimas *NdeI* y *SacII*, ambas enzimas de New England Biolabs. La mezcla de reacción contenía 10 μ l de DNA genómico (TRM69-RR10 o TRM70-RR11), 2 μ l de NEB buffer 4 10X y 0.5 μ l de enzima *NdeI* o *SacII* en un volumen final de 20 μ l, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para todas las digestiones se utilizó DNA de la cepa silvestre y de la cepa parental como control negativo.

VI.8.2 Transferencia del DNA a la membrana de nitrocelulosa

El DNA digerido con las diferentes enzimas se separó en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio al 0.1% a 100 V durante 8 horas. El gel se cubrió con una solución de HCl 0.2 M incubándose de 10-20 min para su depurinación, posteriormente se transfirió a una solución de NaOH 0.4 M durante 10-20 min para la desnaturalización del DNA. Para realizar la transferencia del DNA a la membrana de nitrocelulosa (Zetabind), a la cámara de transferencia se agregó $\frac{3}{4}$ de la solución de NaOH 0.4 M, se colocó una base de vidrio en la parte superior del recipiente y se cubrió con papel filtro sumergido en la misma solución, el gel se

depósito arriba del papel filtro humedecido, posteriormente arriba del gel se colocó la membrana de nitrocelulosa (claramente etiquetada y previamente humedecida en agua), posteriormente se colocó otra capa de papel filtro humedecido con la solución de NaOH 0.4 M y se agregó una capa gruesa de papel secante, finalmente se puso una base de vidrio para generar mayor presión y ayudar en la transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nitrocelulosa que está cargada positivamente (la transferencia se dejó por dos días).

VI.8.3 Marcaje de la sonda con P³²

El DNA de las cepas transformantes se hibridó utilizando como sonda el ORF del gen de resistencia a higromicina (*hph*) obtenido por PCR. Para el marcaje radiactivo de la sonda, se utilizaron de 50-100 ng de DNA de *hph* resuspendidos en 10 µl de TE. Dicho DNA fue desnaturalizado a 100°C durante 3 min, posterior a la incubación se colocó en hielo y se agregó 2µl del rxn mix 10X (contiene los oligonucleotidos en buffer), 3 µl de dNTP's (la mezcla no tiene dCTP's), 0.5 µl de la enzima *Klenow polimerasa* y 4 µl de P³²CTP. La mezcla se llevo a un volumen final de 20 µl y se incubó a 37°C por una hora, terminando la incubación se colocó en hielo y se llevó a un volumen final de 150 µl con H₂O mQ, posteriormente se colocó durante 3 min a 100°C para desnaturalizar el DNA ya marcado radiactivamente. Inmediatamente se colocó en hielo y se utilizó para la hibridación de la membrana de nitrocelulosa.

VI.8.4 Hibridación del DNA

Después de realizar la transferencia de DNA se removió el papel secante y el papel filtro, el gel y la membrana de nitrocelulosa se voltearon, se retiró el gel y se le fijó el DNA a la membrana utilizando una cámara de U.V. (aproximadamente 5 min). La membrana se transfirió a un tubo de hibridación, adicionándole 50 ml de la solución de pre-lavado (1 M NaPO₄, 4 M NaCl, 0.5 M EDTA, 10% SDS) y se

incubó 15 min en agitación a 67°C, se descartó la solución de pre-lavado y se agregaron 50 ml de la solución de pre-hibridación y se incubó en agitación durante 15 min a 67°C. Posterior a la incubación se agregó la sonda previamente marcada y desnaturalizada a la solución de pre-hibridación sin tocar la membrana, se dejó incubando durante toda la noche a 67°C en un horno de hibridación Techne Hybridization.

VI.8.5 Revelado de la membrana de nitrocelulosa

Para el revelado de la membrana se descartó la solución de hibridación y se lavó 4 veces con 50 ml de la solución Zeta wash y se incubó a 67°C en agitación durante diferentes tiempos: el primero lavado durante 20 min, el segundo lavado 18 min, el tercer lavado 15 min y el cuarto lavado 12 min. Posteriormente la membrana se cubrió perfectamente en papel plástico (*Saran wrap*) para evitar el contacto directo de la membrana con la cámara de revelado. La membrana se expuso en una placa autoradiográfica durante un día y la imagen de la membrana se tomó utilizando un escáner GE Storm 820 phosphoimager.

VI.9 Cruzas de *N. crassa*

Para la obtención de los homocarios de las transformantes, se realizaron las cruas de las transformantes con las cepas de *N. crassa Sad-2; hph+ mat a* y *Sad-2; hph+ mat A*. Primero se inoculó micelio de las cepas transformantes en Medio Sintético de Cruzas y se incubó a 25°C durante 5 d. Posteriormente se re-inoculó el cultivo con micelio de la otra cepa, continuando la incubación a 25°C en oscuridad total hasta la aparición y maduración de peritecios. De los peritecios se recuperaron ascosporas con agua desionizada estéril, que se sembraron en placas de MMV o MMV-histidina en el cual se sometió a un choque térmico a 60°C durante 1 h para activarlas. Posteriormente se incubaron a 28°C toda la noche y las colonias individuales se aislaron en tubos de 5 ml con MMV agar. Nuevamente

se observaron bajo microscopía de fluorescencia para seleccionar aquellas que expresaran la sGFP o mCHFP.

VI.10 Fusión de cepas de *N. crassa*

La fusión de hifas, es un proceso que ocurre de manera natural entre hifas de una misma colonia o hifas de diferentes cepas que tienen el mismo tipo de apareamiento. Este proceso consiste básicamente en el reconocimiento de dos hifas (maduras o germinales) que se encuentran muy cercanas, la remoción de pared y membrana celular de ambas hifas y su posterior fusión, que continúa con el flujo del componente citoplasmático y los organelos hacia la hifa contraria, dando lugar a una colonia o cepa heterocarión (núcleos con diferente información genética).

Para observar la relación de las proteínas GRB y APS-1, con los núcleos, el citoesqueleto microtubular y con la γ -tubulina se realizó la fusión de cepas que tienen los diferentes marcajes. Para ello se resuspendieron esporas de un cultivo joven (2 o 3 d en MMV a 28°C) en 500 μ l de H₂O destilada estéril de las cepas a fusionar, se colocaron 40 μ l de la suspensión de conidias de las diferentes cepas en una placa de MMV y se incubaron por 12 h a 28°C, y se analizaron por microscopía confocal.

VI.11 Microscopía y análisis de imágenes

Las cepas transformantes de *N. crassa* se observaron por microscopía confocal, utilizando el método de agar invertido (Figura 6) (Hickey *et al.*, 2004). Las cepas fueron observadas a alto aumento con un objetivo de 100 X; 1.3 A. N. plan-apocromático de inmersión en aceite, utilizando un microscopio confocal LSM Meta 510 Carl Zeiss (Göttingem, Alemania). Se tomaron imágenes simultáneamente en dos canales: uno de luz fluorescente, utilizando un láser de

Argón para la excitación de la GFP (488 nm) y otro de luz transmitida para la obtención de imágenes en contraste de fases. Para la excitación de la dRFP y de la mCHFP se utilizó un láser de HeNe a una longitud de onda de excitación de 543 nm. Se grabaron imágenes en dos dimensiones y series de tiempo con el software LSM 510 versión 3.2 y se analizaron con el software LSM examiner versión 3.2.

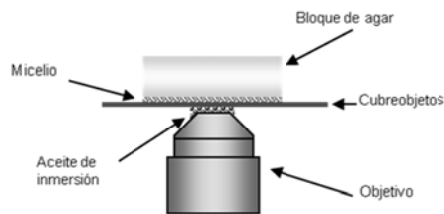


Figura 6. Método del bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un fragmento del agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos (Modificado de Hickey et al., 2004 en Ramírez-Cota, 2008).

VII. Resultados

VII.1 Construcción de los plásmido pMF272+grb y pJV15-2+grb

En la figura 7 se muestra la construcción de los plásmidos pMF272+grb y pJV15-2+grb, que se generaron a partir de la clonación de *grb* en los sitios de clonación múltiple *Xba*I y *Pac*I de pMF272 y pJV15-2 (Figura 7a). El PCR de colonia de las clonas de *E. coli* que se transformaron con estos plásmidos se muestra en la figura 7b, las clonas 1, 4, 5 y 7 contienen el ORF de *grb* en el vector pMF2-72+*grb* y las clonas 6, 7 y 9 lo contienen en el vector pJV15-2+*grb*. Además se muestran los resultados de la liberación de los fragmentos posterior a la digestión enzimática con *Xba*I y *Pac*I (Figura 7c).

El plásmido pRR1_0mcherry derivado del pZero_pMF357_pPP43, se caracteriza por contener la secuencia genética de la mCHFP seguida de la secuencia del gen de resistencia a higromicina (*hph*). En la figura 8 se muestra la clonación del gen *mchfp* en el sitio de clonación múltiple *Xba*I y *Pac*I del pZero_pMF357_pPP43. La integración correcta del gen fue corroborada por PCR de colonia y por la digestión con la enzima *Nco*I (Figura 8b y c), encontrándose 6 clonas positivas (las clonas 1, 4, 5, 7, 8 y 9) de 10 analizadas. El plásmido pZero_pMF357_pPP43 y el pRR1_0mcherry de la clona No. 1 fueron utilizados para la generación de constructos para el marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina.

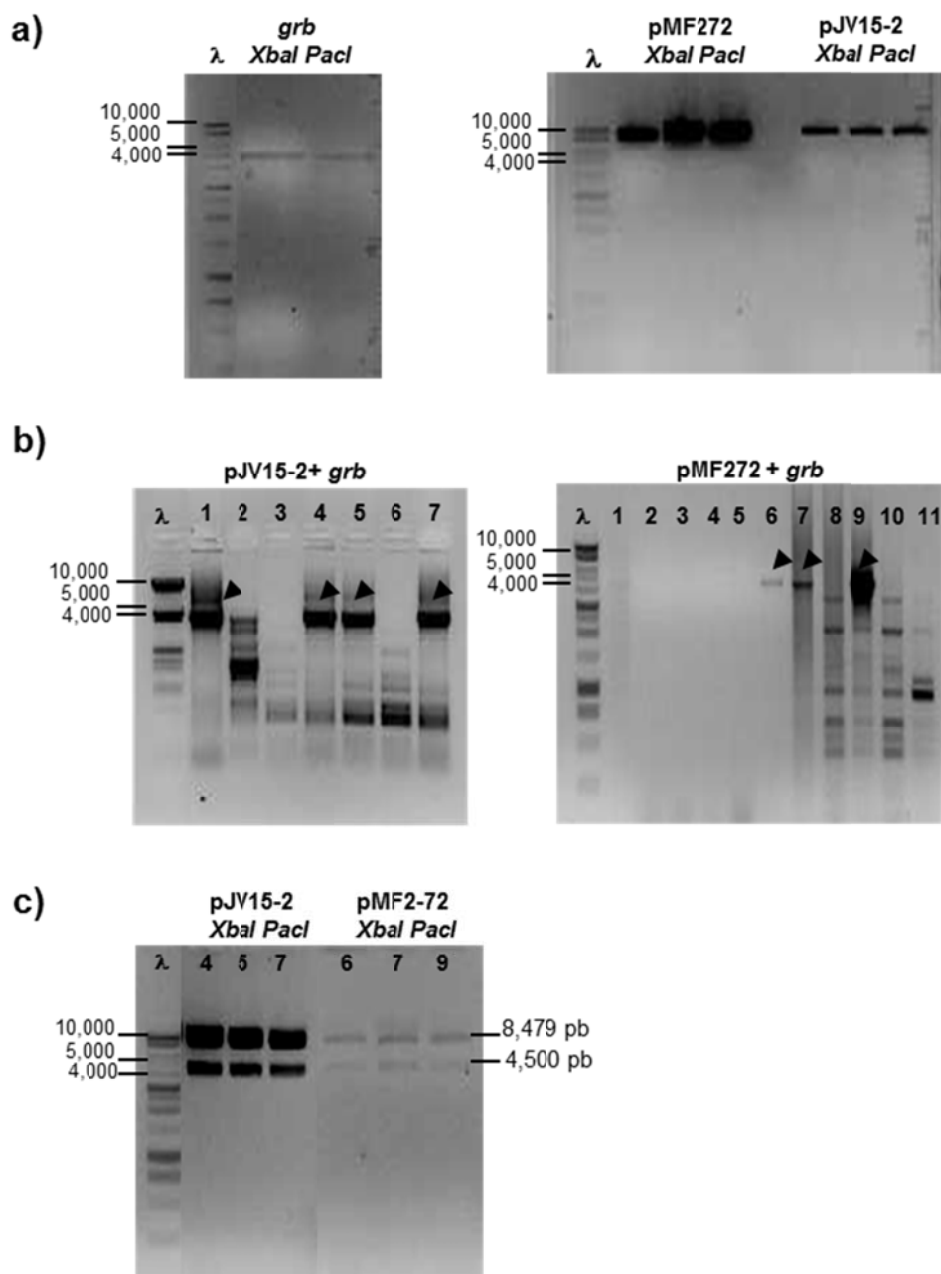


Figura 7. Construcción de los plásmidos pJV15-2+*grb* y pMF272+*grb*. (a) Electroforesis de pMF272, pJV15-2 y el ORF de *grb* digeridos con las enzimas de restricción *Xba*I y *Pac*I para su posterior ligación, (b) PCR de colonia de las recombinantes de *E. coli* que contienen el gen *grb* ligado a pJV15-2 y pMF272, las flechas señalan las clonas positivas para el *grb*, (c) digestión enzimática con *Xba*I y *Pac*I para corroborar la correcta integración del ORF del gen *grb* en los plásmidos pJV15-2 y pMF2-72. Gel de agarosa al 1%, λ = marcador de peso molecular.

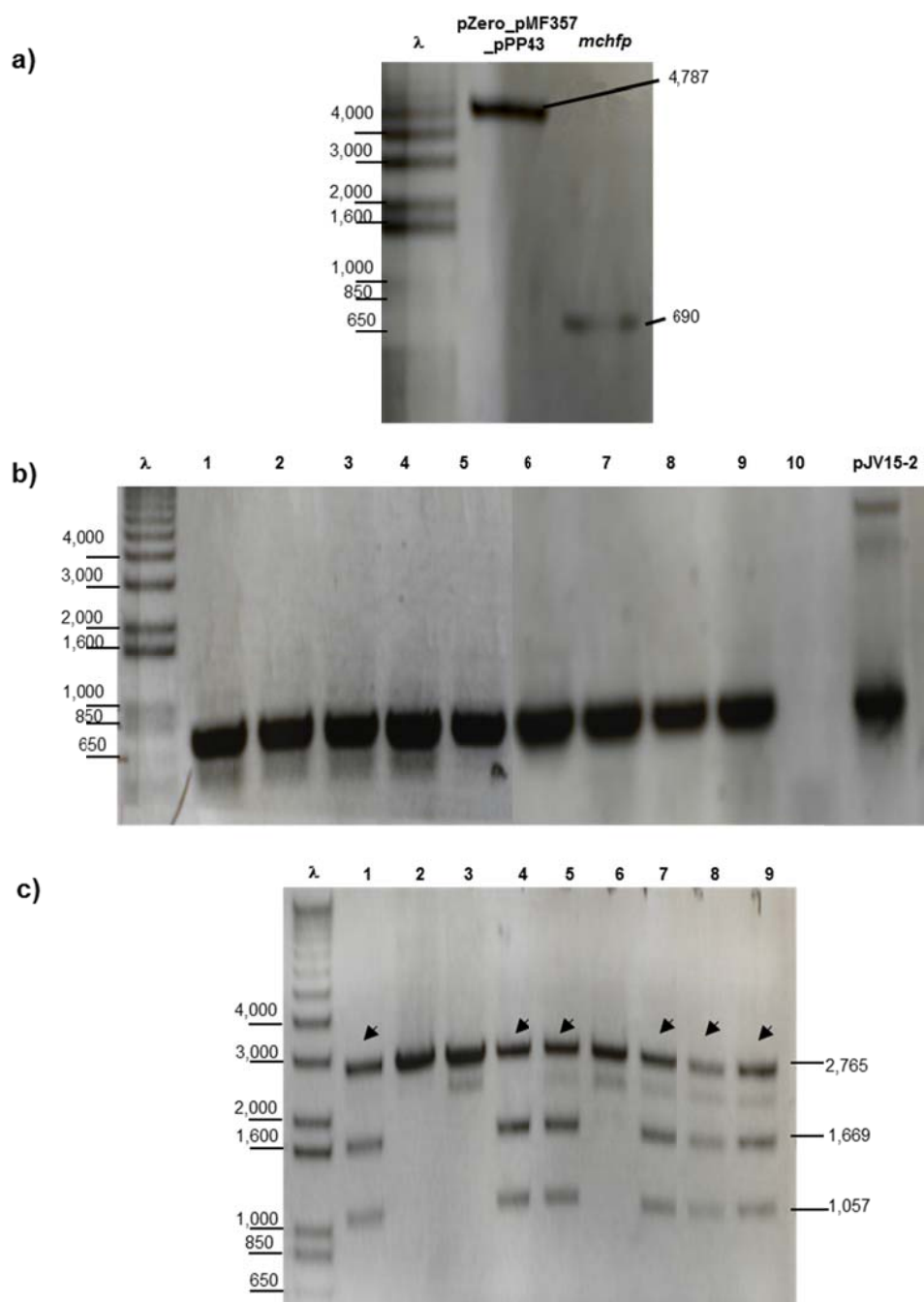


Figura 8. Construcción del plásmido *pRR1_0mcherry*. (a) Electroforesis gen *mchfp* y del vector *pZero_pMF357_pPP43* digeridos con las enzimas de restricción *XbaI* y *PacI* para su posterior ligación, (b) PCR de colonia de las recombinantes de *E. coli* que contienen el gen *mchfp* ligado al vector *pZero_pMF357_pPP43*, (c) digestión enzimática con *NcoI* para corroborar la integración correcta del ORF del gen *mchfp* en el *pZero_pMF357_pPP43*, las flechas señalan las clonas positivas. Gel de agarosa al 1%, λ = marcador de peso molecular.

VII.2 Construcción genética para el marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina

Los cassettes para el marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina con las proteínas fluorescentes GFP y mCHFP, contruidos mediante la técnica de PCR de fusión se muestran en la figura 9c. Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA de los genes *gfp_hph* y *mchfp_hph* contenidos en los plásmidos pZero_pMF357_pPP43 y pRR1_0mcherry se muestran en la figura 9a y los fragmentos 5' y 3' de los genes *grb*, *aps-1* y *tbg* se muestran en la figura 9b.

Estos cassettes se utilizaron para transformar conidias de *N. crassa* como se mencionó en materiales y métodos, de un total de 6 transformaciones solo se obtuvieron 5 cepas transformantes con el siguiente genotipo; *N. crassa his-3,hph+*, *grb-mchfp* (TRM66-RR07), *N. crassa his-3,hph+*, *APS-1-gfp* (TRM69-RR10), *N. crassa his-3,hph+*, *APS-1-mchfp* (TRM70-RR11), *N. crassa his-3,hph+*, *γ -tubulina-gfp* (TRM67-RR08) y *N. crassa his-3,hph+*, *γ -tubulina -mchfp* (TRM68-RR09). El análisis de Southern blot de las colonias de las diferentes transformantes demostró la correcta integración genética de los cassettes en el DNA genómico de la cepa parental *N. crassa N3011* (Figura 10). Todas las colonias de las cepas TRM66-RR07, TRM69-RR10 y TRM70-RR11 mostraron una correcta integración genética, mientras que solo la colonia No. 4 de la cepa TRM67-RR08 y la colonia No. 2 de la cepa TRM68-RR09 tuvieron una correcta integración (Figura 10c).

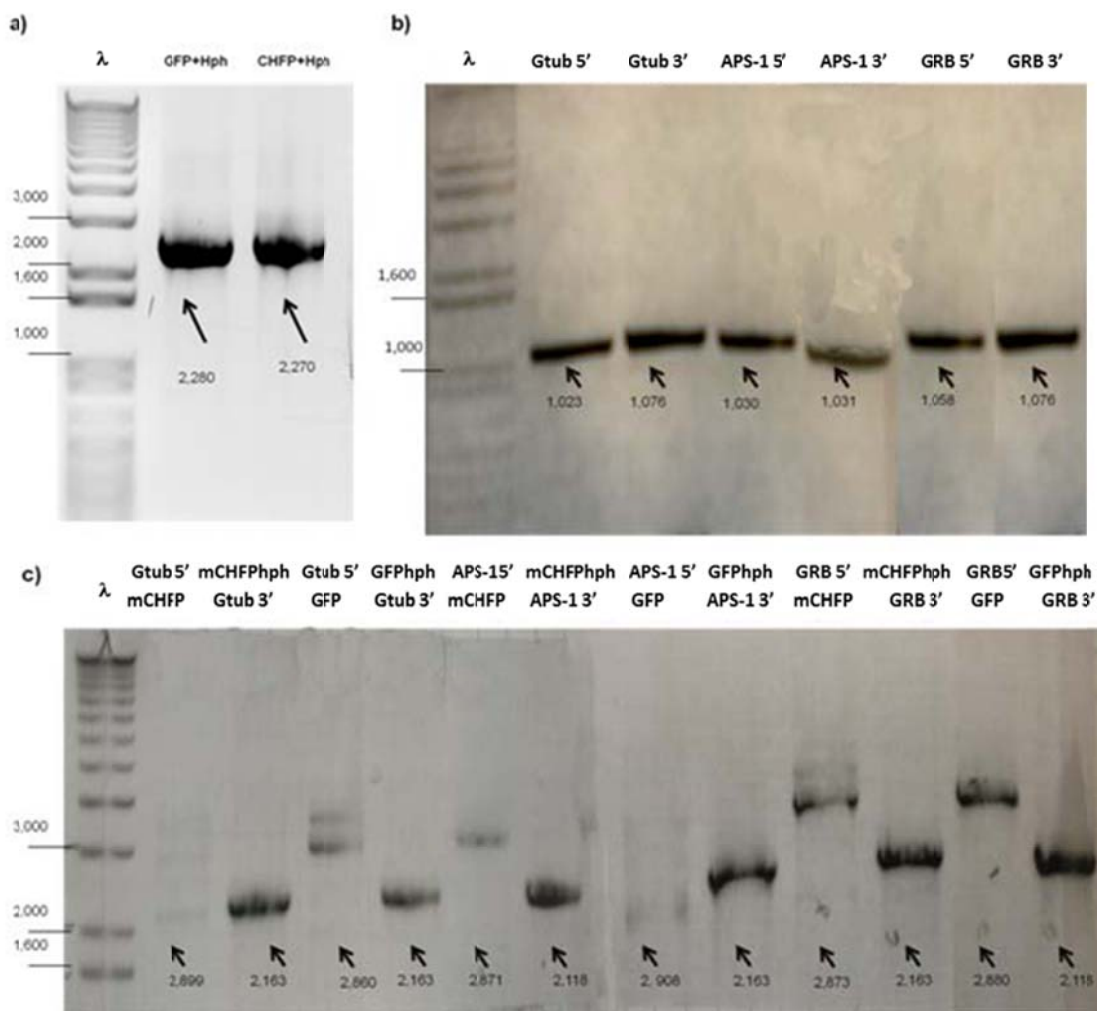


Figura 9. Construcción de los cassettes para marcaje endógeno de las proteínas GRB, APS-1 y γ -tubulina con las proteínas fluorescentes GFP y mChFP. (a) Electroforesis de los cassettes GFP-Hph y mCHFP-Hph amplificados a partir de los plásmidos pZero_pMF357_pPP43 y pRR1_0mcherry, respectivamente. (b) Electroforesis de los fragmentos 5' y 3' de los genes *gtub*, *aps-1* y *grb* amplificados por PCR a partir de DNA genómico de *N. crassa* N39. (c) electroforesis de los productos del PCR de fusión de los fragmentos 5' y 3' de los genes con los cassettes GFP+Hph y CHFP+Hph para posteriormente ser utilizados en la transformación genética de *N. crassa*.

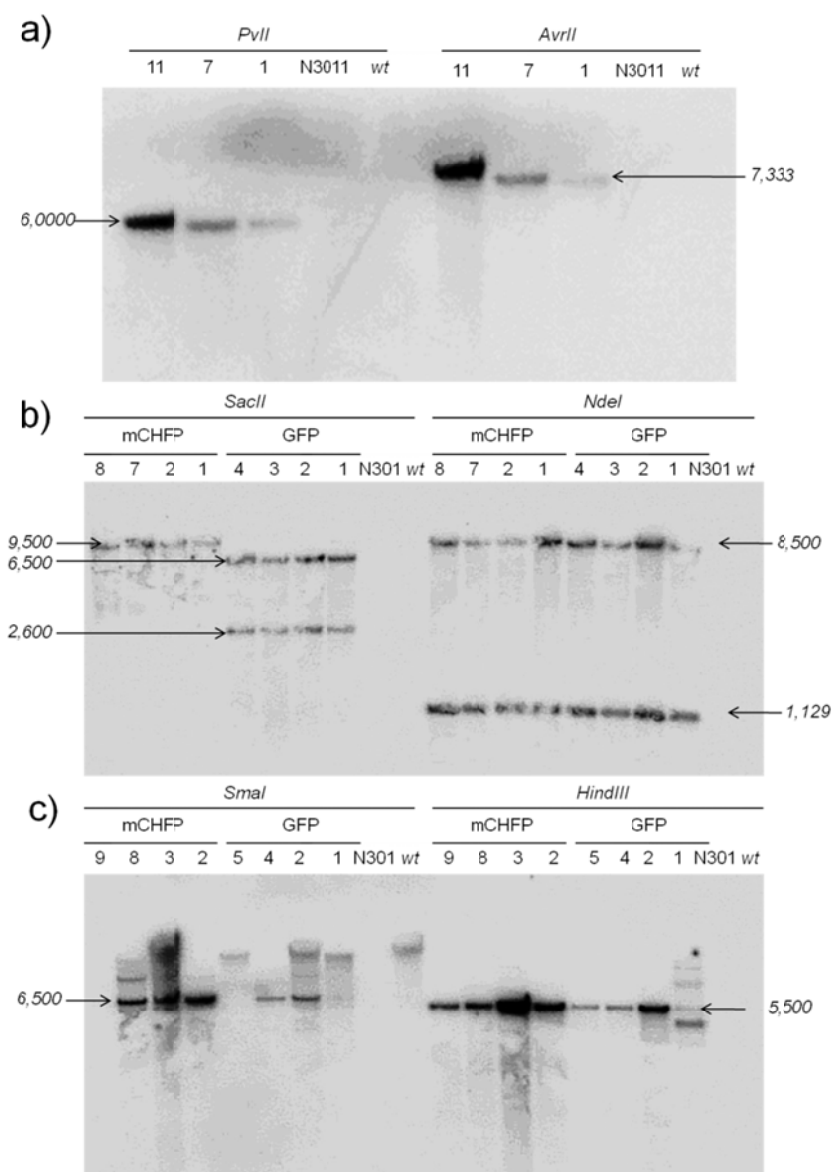


Figura 10. Southern blot de las cepas transformantes de *N. crassa* para corroborar la correcta integración del DNA. (a) DNA de la cepa *N. crassa* GRB-mCHFP digerido con las enzimas *PvuII* y *AvrII*, (b) DNA de las transformantes *N. crassa* APS-1-mCHFP (8,7 y 2) y *N. crassa* APS-1-mCHFP (4,3 y 2) digeridos con las enzimas *SacII* y *NdeI*, (c) DNA de la cepa. *N. crassa* γ -tubulina-GFP y *N. crassa* γ -tubulina-mCHFP digerido con las enzimas *SmaI* y *HindIII*. El DNA de todas las digestiones fue hibridado con la sonda radioactiva *Hph-P*³², las flechas señalan el tamaño de los fragmentos de DNA correspondientes a una correcta integración del DNA transformante en el genoma de *N. crassa* N3011, las cepas N3011 y wt (N39) fueron utilizadas como controles negativos.

VII.3 Caracterización de la localización y dinámica de la GRB

VII.3.1 Localización de GRB

Mediante microscopía confocal, se determinó la localización celular de GRB-mCHFP o GRB-GFP en diferentes etapas del ciclo celular del hongo filamentoso *N. crassa*. La GRB en conidias se localizó como un punto fluorescente intenso asociado a los núcleos (Figura 11). No se observó diferencias en la distribución de la proteína al ser regulada por el promotor *ccg-1* o el promotor endógeno (Figura 11-13). Por lo que, el análisis de la GRB se realizó de manera indistinta en ambas cepas.

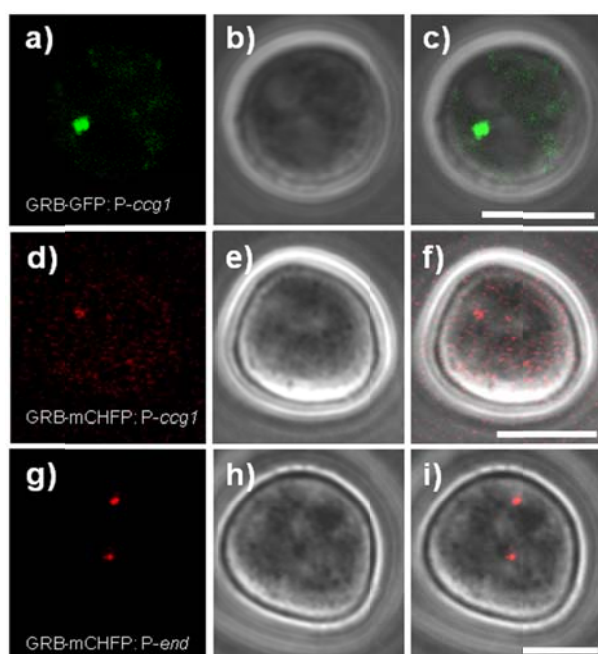


Figura 11. Imagen de conidias que muestran la expresión de la GRB-GFP y GRB-mCHFP regulada por el promotor *ccg-1* y por el promotor endógeno. (a)-(c) *N. crassa* GRB-GFP; *P-ccg1*, (d)-(f) *N. crassa* GRB-mCHFP; *P-ccg1* y (g)-(i) *N. crassa* GRB-mCHFP; *P-end*ógeno. (a), (d) y (g) Canal fluorescente que muestra la GRB con los diferentes marcajes; (b), (e) y (h) canal de contraste fases; y (c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=5 μ m.

La señal de la GRB en germínulas con 6 h de crecimiento conservó el mismo patrón de distribución que la GRB de conidias (Figura 12). Aunque, la cantidad de puntos fluorescentes fue mayor a la observada en las conidias. En hifas maduras la señal de la GRB es mayor, esto coincide con que hay mayor cantidad de núcleos, además los puntos fluorescentes presentan una mayor dinámica siguiendo el movimiento nuclear en dirección anterograda o retrograda (Figura 13).

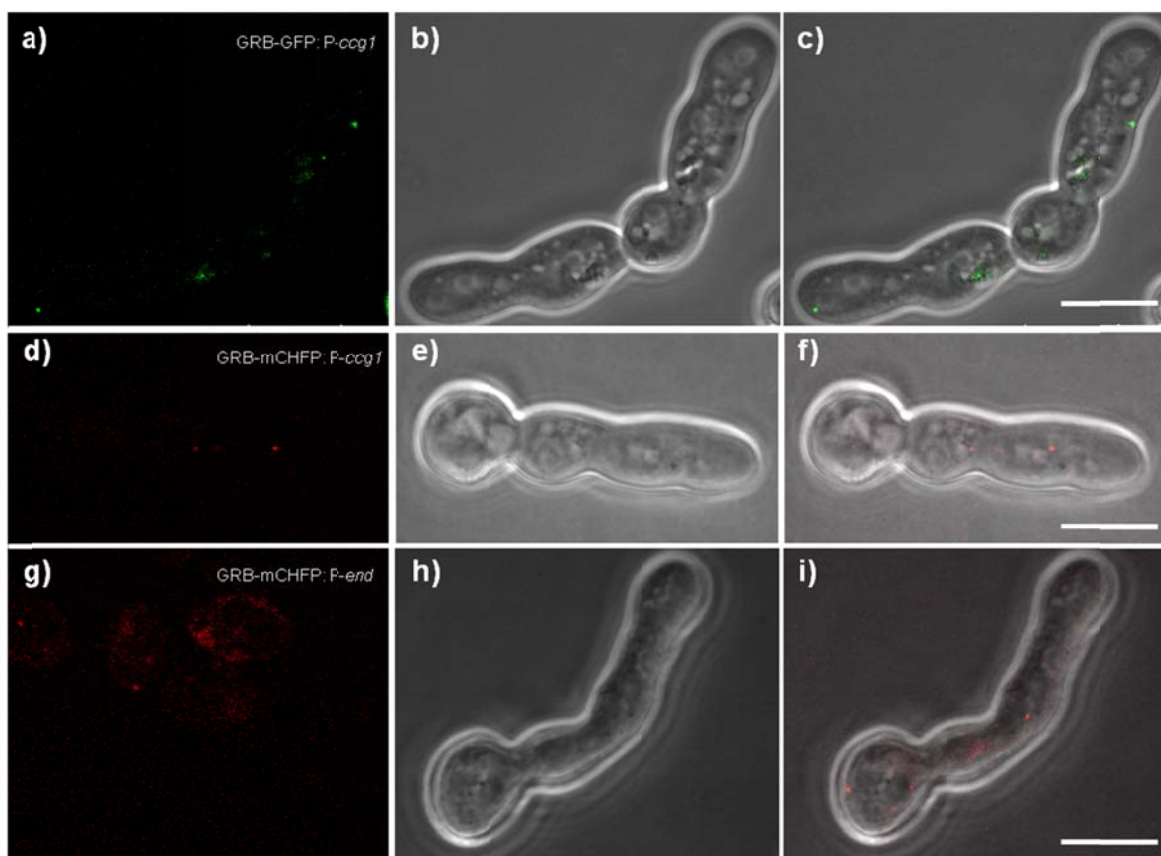
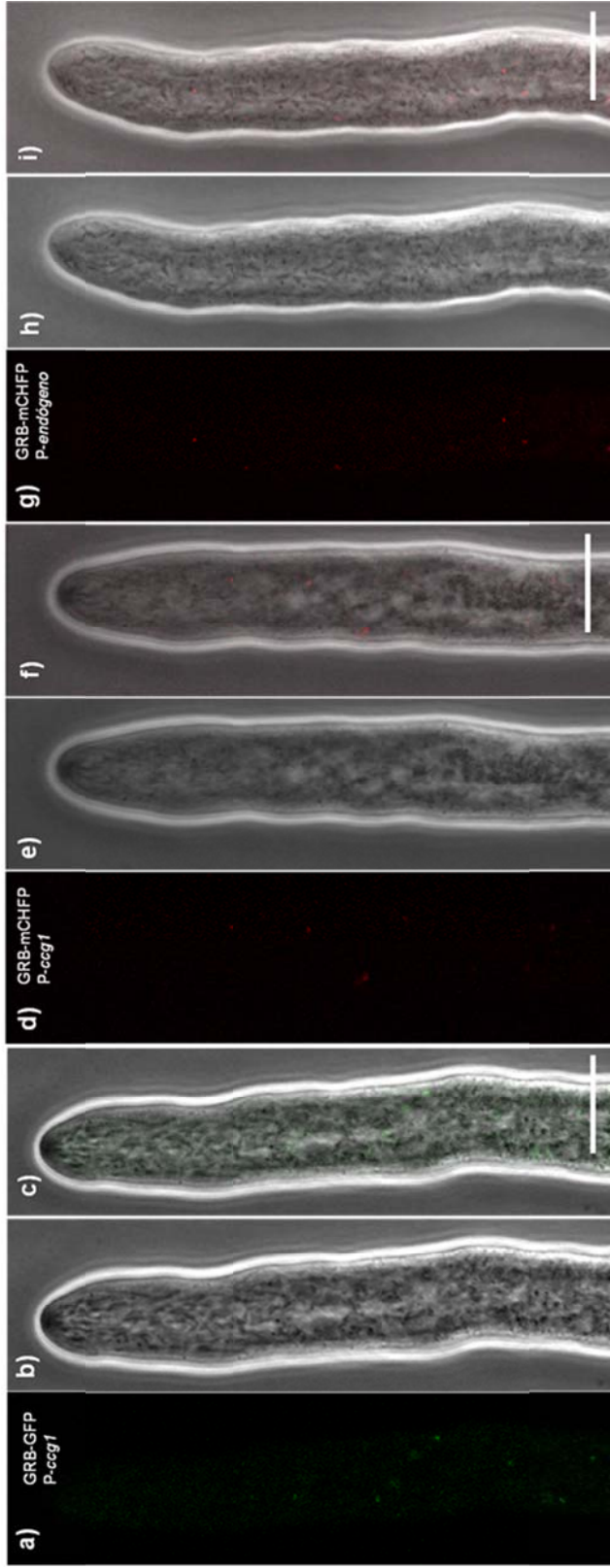


Figura 12. Imagen de germínulas de 6 h de crecimiento, que muestran la expresión de la GRB-GFP y GRB-mCHFP regulada por el promotor *ccg-1* y por el promotor endógeno. (a)-(c) *N. crassa* GRB-GFP; *P-ccg1*, (d)-(f) *N. crassa* GRB-mCHFP; *P-ccg1* y (g)-(i) *N. crassa* GRB-mCHFP; *P-endógeno*. (a), (d) y (g) Canal fluorescente que muestra la GRB con los diferentes marcajes; (b), (e) y (h) canal de contraste fases; y (c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=10 μm .



(c), (f) é (i) sobreposición de las imágenes del canal de fluorescencia y de contraste de fases. Escala=10 μm .

La localización de la GRB en ascosporas se determinó mediante el análisis de la cepa que produce la GRB-mChFP en un trasfondo genético con la mutación *per-1*, la cual se caracteriza por producir ascosporas sin color, facilitando la toma de imágenes de contraste de fases en este estadio celular. Los resultados de microscopía confocal mostraron que la GRB se distribuye de manera similar en ascosporas que en conidias, a manera de puntos brillantes asociados a los núcleos (Figura 14d).

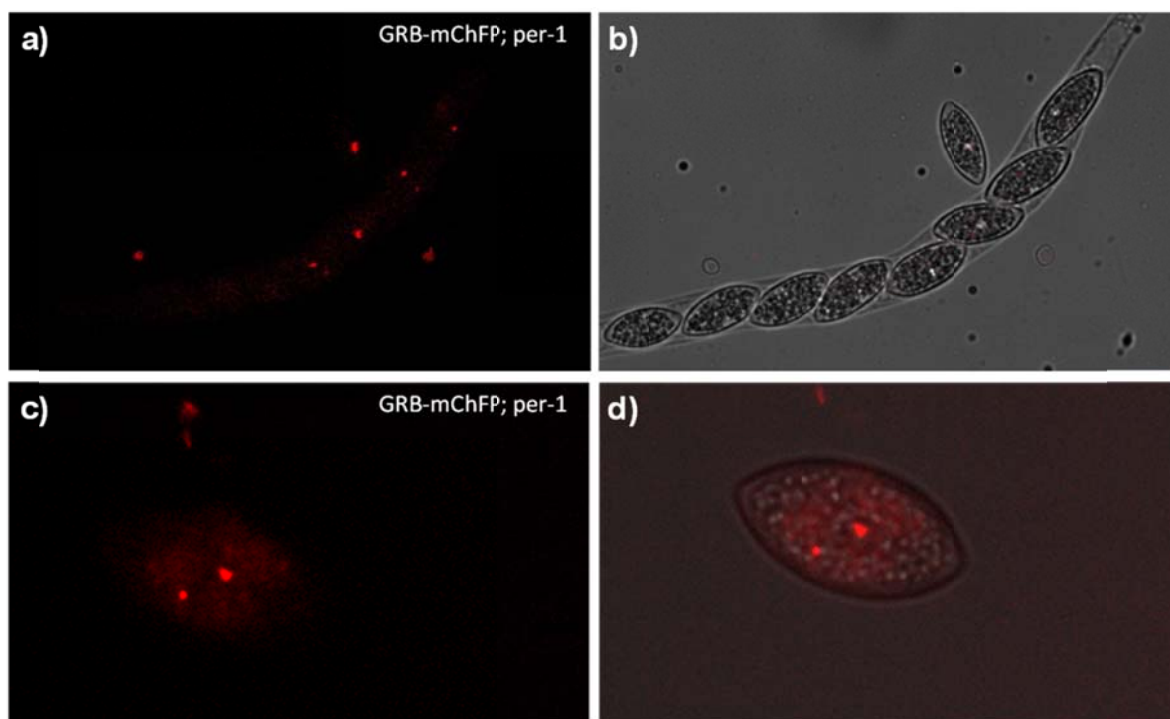


Figura 14. Imagen de ascosporas de la cepa *N. crassa* GRB-mChFP *per-1* tomada por microscopía confocal. (a) y (c) canal de fluorescencia, (b) y (d) superposición del canal de fluorescencia y el canal de contraste de fases, en donde se observa la distribución de la GRB-mChFP en el asca (a) y (b) y de una ascospora (c) y (d).

VII.3.2 Asociación de la GRB con los núcleos

Para corroborar la asociación de GRB a los núcleos de *N. crassa* se realizó la fusión de las cepas que expresan las proteínas GRB-GFP y la dRFP-H1. El

producto de esta fusión da origen a un heterocarion que expresa la proteína GRB en verde y los núcleos en rojo (Figura 15), la toma de imágenes de microscopía confocal de este heterocarion hizo evidente la asociación de la GRB con los núcleos. Esta asociación se mantiene durante los diferentes estadios celulares, se observa desde conidias con 0 h de crecimiento (Figura 15a), germínulas e hifas maduras (Figura 15e).

La mayoría de los núcleos poseen un acumulo brillante de GRB asociado a ellos (Figura 15c), aunque ocasionalmente se observan núcleos que presentan dos puntos brillantes de GRB localizada en extremos opuestos de los núcleos (15d y f), aparentemente la localización de la GRB está asociada a los SPBs de los núcleos y los núcleos que presentan un punto brillante de GRB podrían corresponder a núcleos en interfase y los núcleos con dos puntos brillantes de GRB asociados a ellos podrían corresponder a núcleos en mitosis.

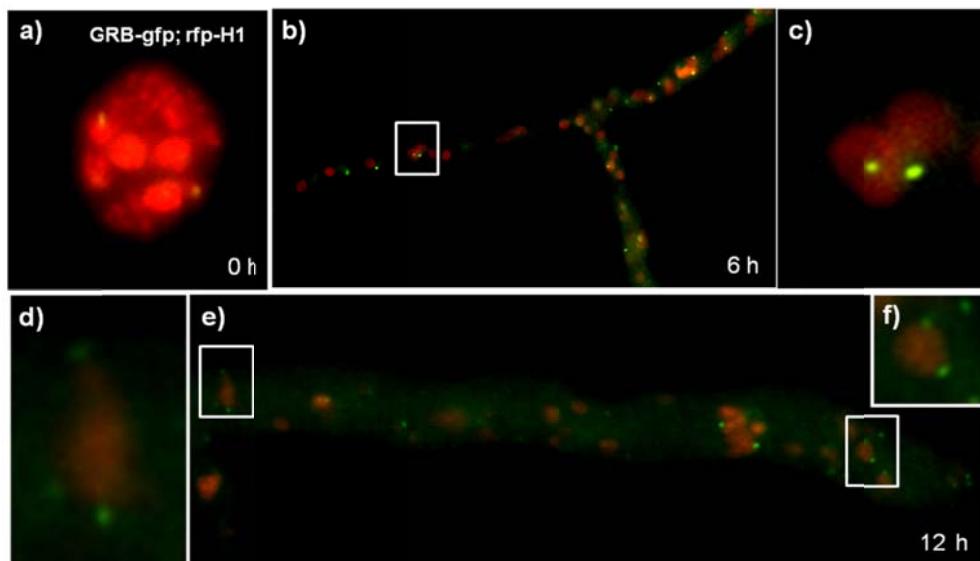


Figura 15. Asociación de la GRB con los núcleos durante diferentes estadios celulares de *N. crassa*. (a) Canal de fluorescencia de una conidia de *N. crassa* que expresa la GRB-GFP en verde y los núcleos dRFP-H1 en rojo, (b) distribución de la GRB en una germínula de 6 h de crecimiento, (c) acercamiento de dos núcleos que muestran la asociación de la GRB en el SPB, (e) hifa madura con 12 h de crecimiento en donde se observan núcleos en interfase y en mitosis, (d) y (f) acercamiento de dos núcleos en mitosis.

VII.3.3 Asociación de la GRB con la γ -tubulina

Para comprobar la hipótesis de que la GRB se localiza en los SPBs se tomaron imágenes de microscopía confocal del heterocarion que produce la GRB-mChFP y la γ -tubulina-GFP. Observándose que la GRB se distribuye como puntos brillantes que co-localizan completamente con la γ -tubulina en hifas maduras de *N. crassa* (Figura 16d y e). Las imágenes de series de tiempo mostraron que la GRB y la γ -tubulina se mueven a la par siguiendo la dirección de movimiento de los núcleos.

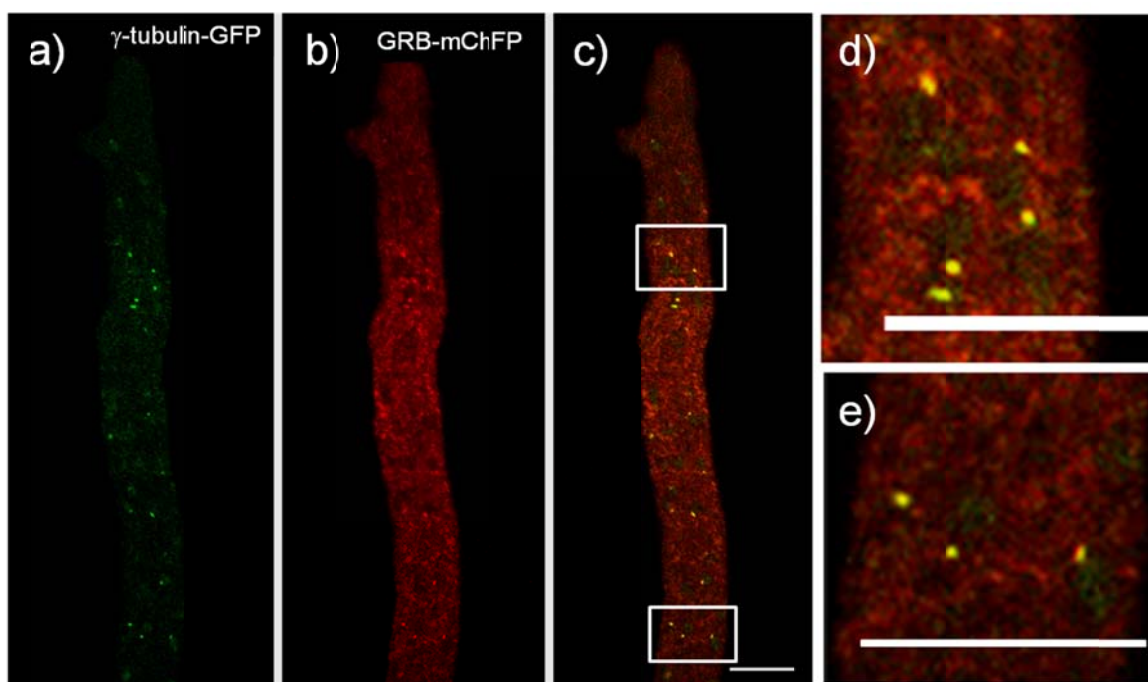


Figura 16. Asociación de la GRB con la γ -tubulina en una hifa madura de *N. crassa*. (a) Canal de fluorescencia que muestra la distribución de la γ -tubulina-GFP, (b) canal de fluorescencia que muestra la distribución de la proteína GRB-mChFP y (c) superposición de a y b, (d) y (e) acercamiento de una zona subapical y basal de la hifa en (c) que muestra la co-localización de la GRB con la γ -tubulina en los SPBs. Escala= 10 μ m.

Para determinar si la GRB se localiza en la placa externa o en la placa interna del SPB se tomaron imágenes de conidas heterocariones que expresan la GRB-

mCHFP y la nucleoporina Son-1 en verde, marcada con GFP. Las imágenes de esta cepa mostraron que la GRB está asociada a la membrana nuclear en un extremo del núcleo, y aparentemente se encuentra embebida en la membrana nuclear (Figura 17).

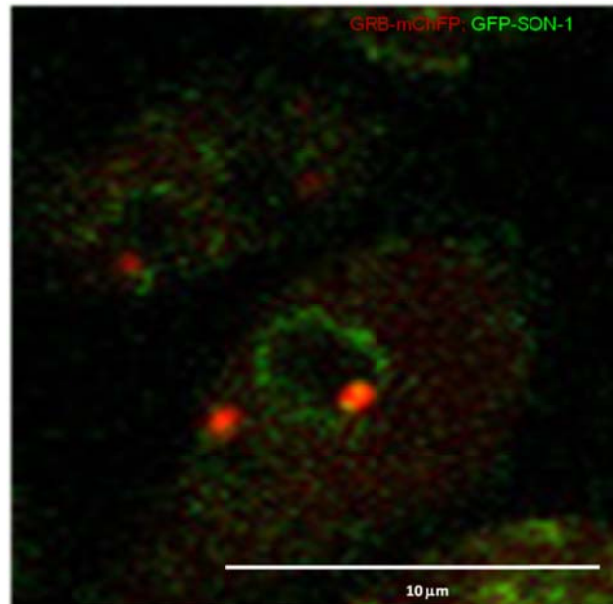


Figura 17. Localización de la GRB en relación a la membrana nuclear de conidias de *N. crassa*. Imagen confocal de la superposición de dos canales de fluorescencia de conidias que expresa la GRB en rojo y la membrana nuclear en verde.

VII.3.4 Interacción de la GRB con el citoesqueleto microtúbular

La cepa heterocarion con el doble marcaje de la GRB-GFP y la β -tubulina-mCHFP muestra que la GRB se encuentra asociada a los Mts citoplasmáticos en hifas maduras (Figura 18a) y que en núcleos en mitosis la GRB está localizada en los extremos opuestos del huso mitótico (Figura 18b). Además se observó que en núcleos que aparentemente van a iniciar la formación del huso mitótico la GRB se encuentra en ambos polos (Figura 18 c y d).

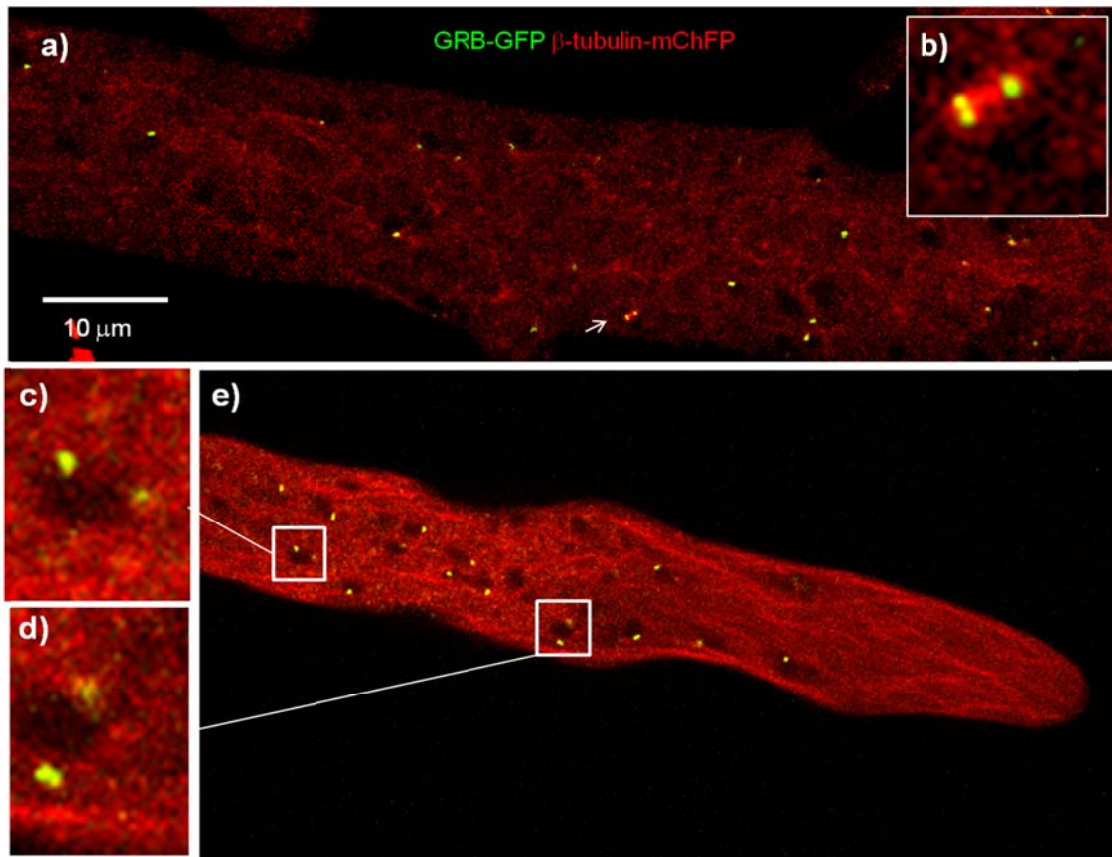


Figura 18. Asociación de la GRB con los Mts. (a) Región basal de una hifa madura que muestra la GRB-GFP asociada a los Mts marcados con la β -tubulina-mChFP, (b) acercamiento de un huso mitótico con la GRB asociada en los extremos del mismo, (c) y (d) acercamiento de dos núcleos con la GRB-GFP localizada en extremos opuestos, previo a la formación del huso, región apical y subapical de una hifa madura.

VII.3.5 GRB y la histona centromérica CenH3

La histona centromérica CenH3 es un componente estructural del cinetocoro de los cromosomas en hongos. Mediante microscopía confocal del heterocarion que produce CenH3-GFP y la GRB-mChFP se observó que en núcleos en interfase, la CenH3 se encuentra acumulada en una región muy adyacente a la GRB (Figura 19), y en núcleos en mitosis se encuentra en la región central del núcleo.

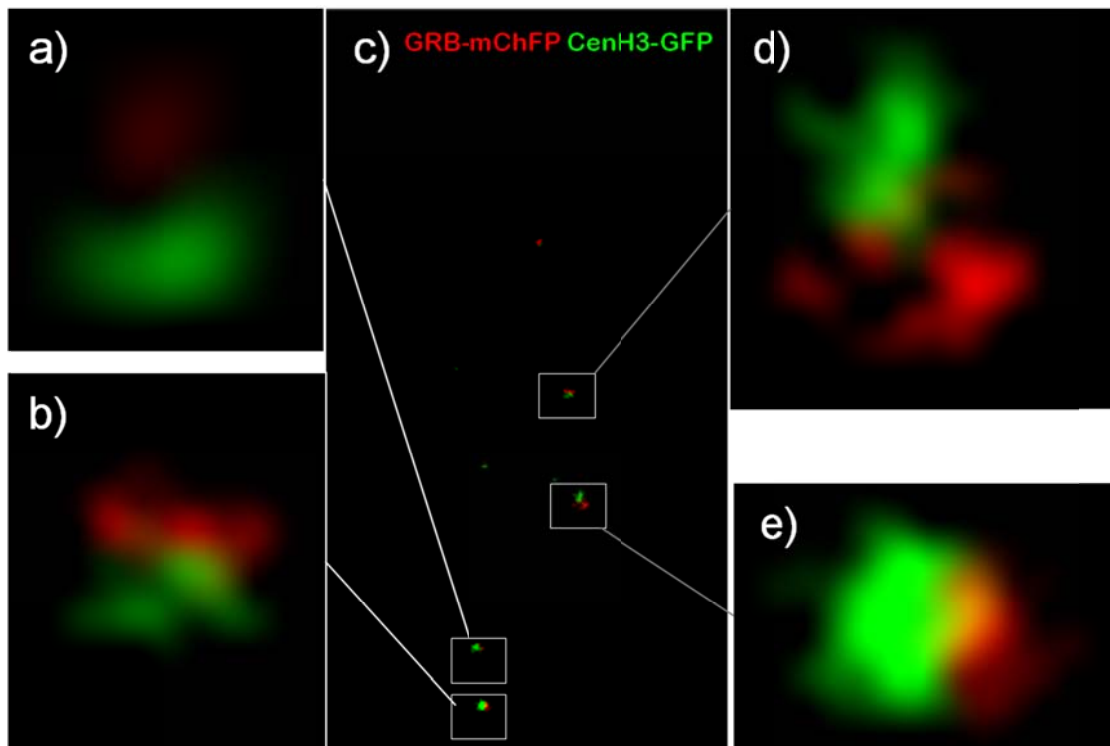


Figura 19. Asociación de la GRB con la histona Cen-H3. (a), (b), (d) y (e) Acercamiento de los SPBs de una hifa madura que expresa la proteína GRB-mChFP y la proteína CenH3-GFP. (c) Región apical y subapical de una hifa madura.

VII.4 Caracterización de la localización y dinámica de la APS-1

VII.4.1 Localización celular de la APS-1

Se observaron conidias, gemínulas e hifas maduras de la cepa que expresa la APS-1-GFP, utilizando microscopía confocal. En conidias la APS-1 se aprecia acumulaciones pequeñas a manera de puntos brillantes distribuidos en el citoplasma, aparentemente asociados a los núcleos (Figura 20).

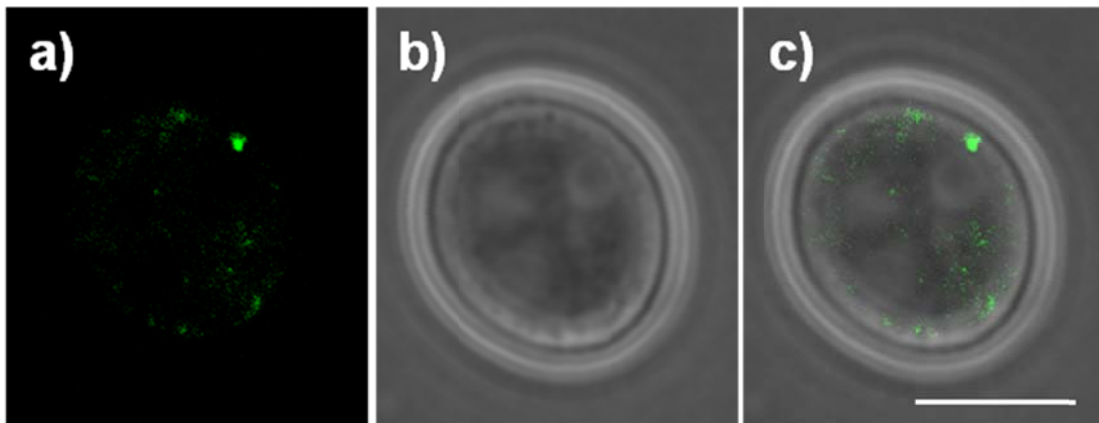


Figura 20. Imagen de 2D de una conidia que muestra la distribución de la APS-1. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de $0.9 \mu\text{m}$. Escala= $5\mu\text{m}$.

En germínulas la APS-1 se observa como acumulaciones puntuales fluorescentes, distribuidas desde la esfera germinal hasta el tubo germinal (Figura 21). En hifas maduras, la APS-1 se localiza a lo largo de las hifas en forma de acumulaciones fluorescentes, que al igual que en conidias y germínulas parecen estar asociadas a los núcleos (Figura 22). Los puntos fluorescentes son móviles en todos los estadios celulares, sin embargo son más dinámicos en las hifas maduras, cuyo movimiento corresponde al desplazamiento nuclear que es más activo en las hifas maduras (Figura 22).

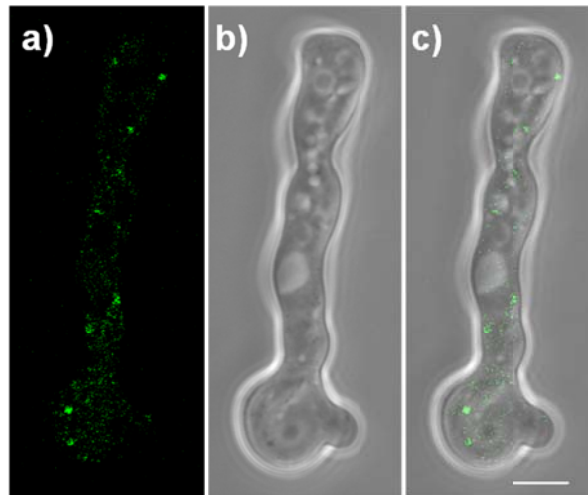
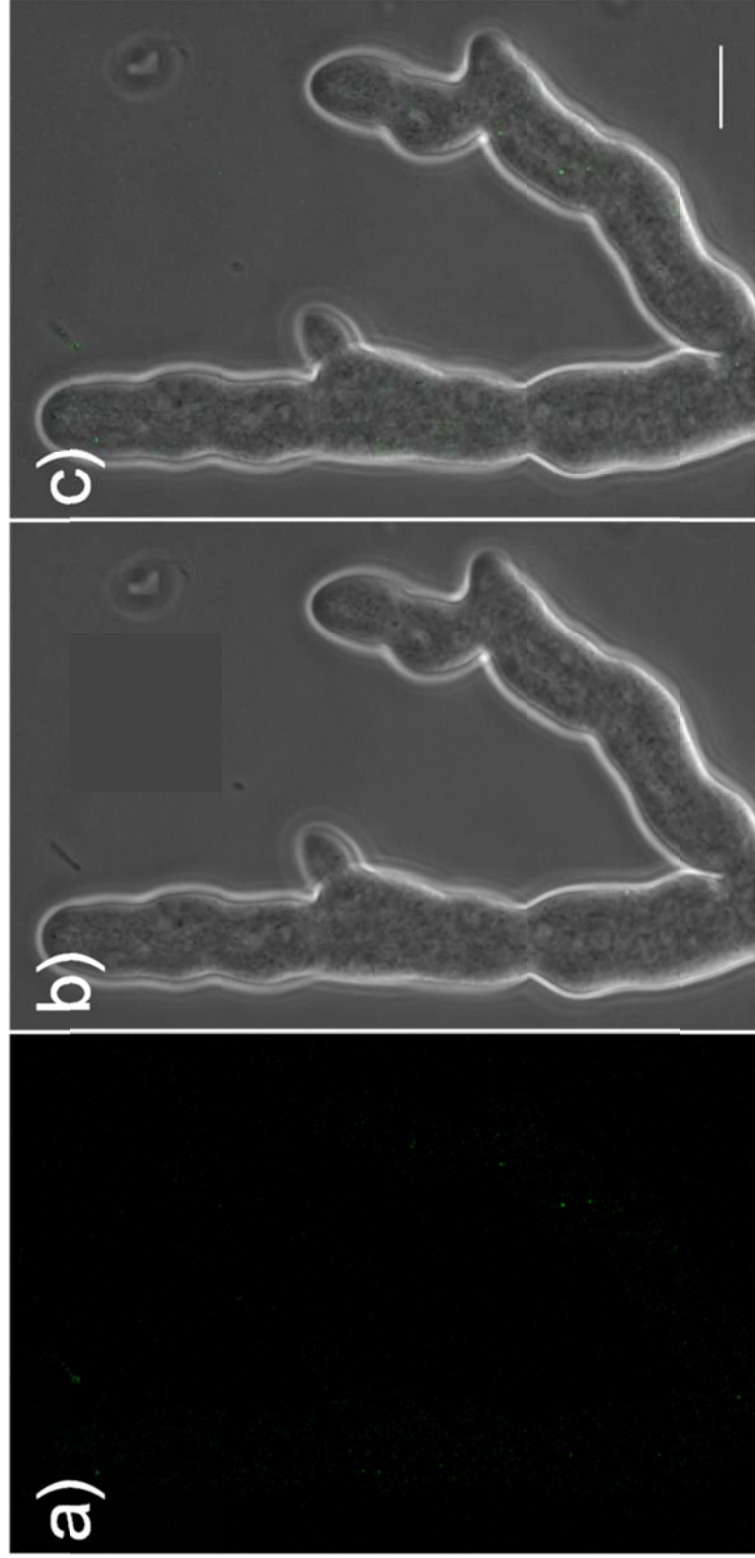


Figura 21. Localización de la APS-1 en una germínula con 6 horas de crecimiento. La APS-1 se distribuye en forma de acumulaciones fluorescentes aparentemente asociadas a los núcleos a lo largo de todo el citoplasma. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de $0.9 \mu\text{m}$. Escala= $10 \mu\text{m}$.

Tanto las conidias y germínulas presentan una morfología celular similar a la cepa tipo silvestre (Figura 20 y 21). Sin embargo, las hifas maduras presentan una morfología aberrante con abultamientos en algunas regiones de las hifas, un crecimiento lento, presentando ramificaciones apicales y subapicales muy cercanos al ápice de la hifa (Figura 22).



aparentemente asociada a los núcleos, las hifas presentan un crecimiento afectado. (a) Canal de fluorescencia. (b) Canal de contraste de fases. (c) Composición de (a) y (b). Rebanada focal de 0.9 μm . Escala=10 μm

VII.4.1 Asociación de la APS-1 con estructuras celulares

Para determinar si la APS-1 se encuentra localizada en los SPBs de los núcleos, se tomaron imágenes de microscopía confocal de la cepa heterocarión que expresa la APS-1-GFP y la γ -tubulina-mCHFP. Las imágenes obtenidas, mostraron que la APS-1 co-localiza con algunas señales de la γ -tubulina, pero no con todas, además también se observaron puntos fluorescentes correspondientes a la APS-1 que no co-localizaban con la γ -tubulina (Figura 23).

Probablemente los puntos que co-localizan corresponden a una población de APS-1 asociada a los SPBs, mientras que los que no co-localizan corresponden a una población libre en el citoplasma (Figura 23-c).

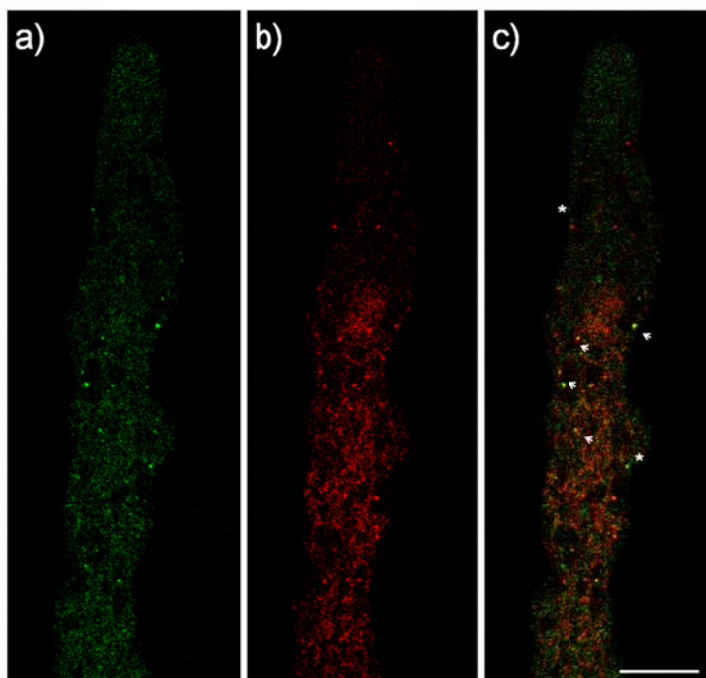


Figura 23. Asociación de la APS-1 con la γ -tubulina en una hifa madura de *N. crassa*. (a) Canal de fluorescencia que muestra la distribución de la APS-1-GFP, (b) canal de fluorescencia que muestra la distribución de la proteína γ -tubulina - mCHFP y (c) superposición de a y b. Las flechas muestran la co-localización de APS-1 con la γ -tubulina en los SPBs y los asteriscos indican la APS-1 libre. Escala=10 μ m.

El marcaje de membranas con FM4-64 de hifas maduras de la cepa que expresa la APS-1-GFP, no mostró asociación de la APS-1 con el Spk (Figura 24-c), ni con los septos (Figura 24-f).

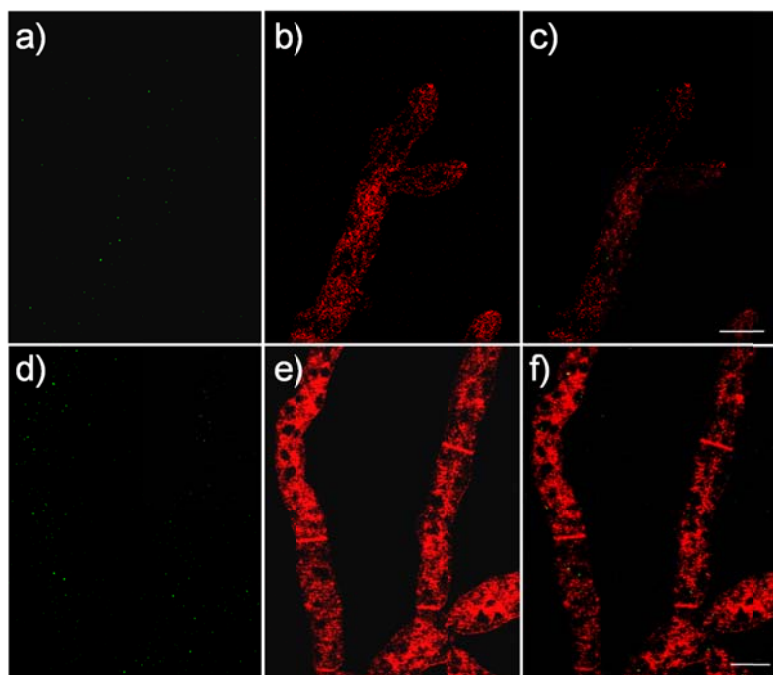


Figura 24. Imagen en 2D de hifas maduras de la cepa que expresa APS-1-GFP teñidas con FM4-64. (a)-(c) Zona apical y (d)-(f) zona distal de las hifas. (a) y (d) canal de fluorescencia que muestra la distribución de la APS-1-GFP, (b) y (e) canal de fluorescencia que muestra la tinción con el FM4-64 y (c) y (f) superposición de a y b. Escala=10 μ m.

VII.5 Caracterización de las cepas mutantes Δ APS-1 y Δ GRB.

VII.5.1 Cruzas para obtener los homocariones de las cepas mutantes

Las cepas mutantes obtenidas comercialmente son cepas heterocariones, es decir que contienen núcleos que expresan las proteínas APS-1 y GRB nativas, y núcleos que tienen la mutación por delección de los genes para estas proteínas. Para determinar el efecto de la mutación de estas proteínas se procedió a realizar las cruzas para obtener homocariones con estas mutantes.

La figura 25 muestra los peritecios y ascosporas obtenidos de las cruza de las cepas mutantes con la cepa NMF160. El número y tamaño de las ascosporas producidas de la cruza de la cepa Δ APS-1 fue muy reducido (Figura 25). Además, las ascosporas no fueron fértiles.

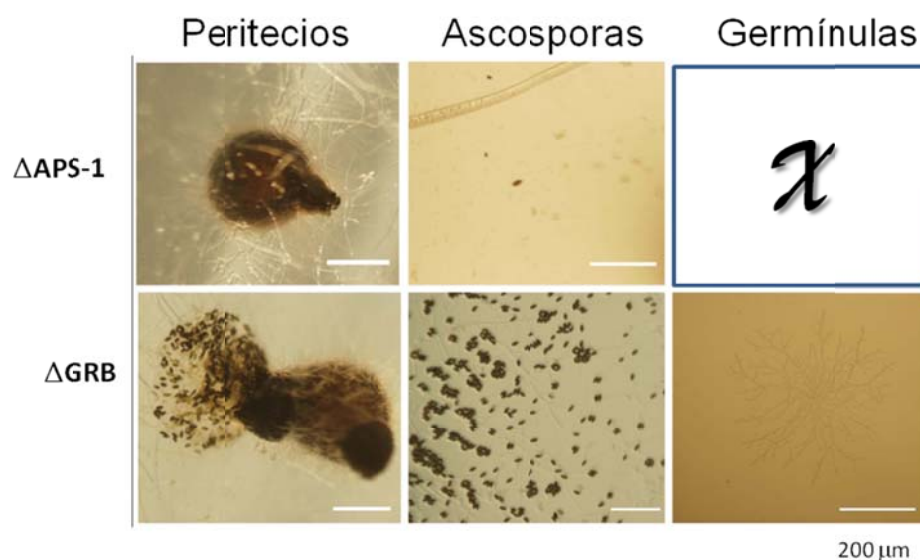


Figura 25. Imagen de peritecio, ascosporas y germínulas generadas de la cruza de las mutantes Δ APS-1 y Δ GRB con la cepa NMF60. Escala=200 μ m

La cruza de la cepa Δ GRB, produjo ascosporas fértiles, que dieron origen a colonias homocariones. El DNA genómico de estos y de la cepa comercial se analizaron por PCR para corroborar la mutación del gen *grb* (Figura 26). El PCR amplificó el ORF del gen *grb* tanto en el control positivo como en las cepas mutantes, demostrando que tanto el heterocarion como los homocariones no poseen la deleción del gen. El análisis por Southern blot de la cepa heterocarion corroboró estas observaciones.

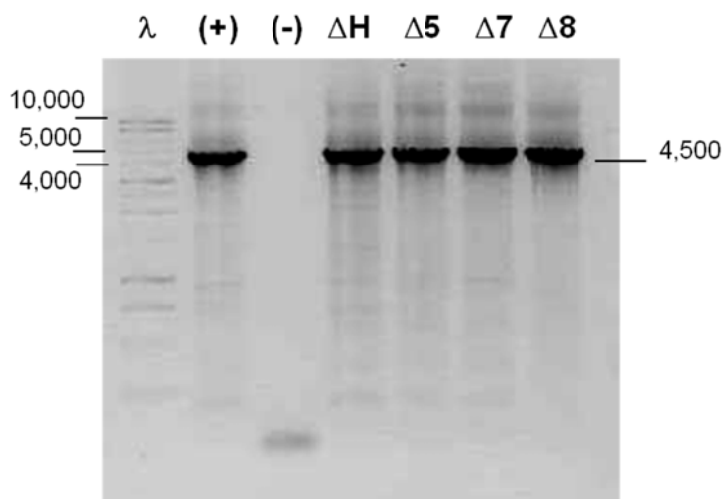


Figura 26. PCR para corroborar la deleción de la GRB. (+) DNA genómico de la cepa tipo silvestre, (-) agua, (ΔH) DNA genómico del heterocarion, ($\Delta 5$ - $\Delta 7$) DNA genómico del homocarion obtenido a partir de la cepa. Las bandas corresponden al tamaño del ORF del gen *grb*.

VIII. Discusiones

VIII.1 Localización y dinámica de la GRB

En este trabajo realizamos la caracterización de la GRB, homóloga de Pcp1 de *S. pombe* en el hongo filamentoso *N. crassa*. Aunque se ha reportado la presencia de la secuencia homóloga para la proteína tipo pericentrina en *A. nidulans* (Flory *et al.*, 2002), este es el primer reporte que describe la localización y dinámica de estas proteínas en un hongo filamentoso.

Para describir la localización *in vivo* de la GRB se realizó el marcaje de la proteína con las proteínas fluorescentes GFP y mCHFP, expresada bajo el promotor fuerte *ccg-1* y el promotor endógeno de la misma. El empleo de la técnica de marcaje de proteínas con proteínas fluorescentes en hongos ha permitido la observación *in vivo* de proteínas y estructuras celulares (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998; Freitag *et al.*, 2004; Horio y Oakley, 2005; Sampson y Heath, 2005; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006). En *Neurospora crassa* el plásmido pMF272 y sus derivados han permitido el marcaje con proteínas fluorescentes de proteínas como la β -tubulina, la H1, γ -tubulina, fimbrina, entre otras (Freitag *et al.*, 2004; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006; Ramírez-Cota, 2008; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de este marcaje ha generado algunas controversias, debido a que las cepas transformantes con este tipo de plásmidos expresan dos poblaciones de la proteína de interés, aquella que no está marcada con la proteína fluorescente y la que sí está marcada. Por lo que existe la posibilidad de que la población endógena este cumpliendo su papel de manera normal y la proteína marcada no esté realizando las mismas funciones. Para resolver estas controversias se desarrolló la técnica de marcaje endógeno (Szewczyk *et al.*, 2007), que consiste en generar cepas transformantes en las que el gen que de la

proteína quimérica reemplaza al gen endógeno. La expresión de esta proteína es regulada por su propio promotor.

En el presente trabajo se demostró que no hay diferencias en la distribución y dinámica de la GRB-GFP o GRB-mCHFP, cuando su expresión es regulada por el promotor exógeno *ccg-1* o por el endógeno. La GRB se distribuye como acumulaciones fluorescentes asociadas a los núcleos tanto en ascosporas, como conidias, germínulas e hifas maduras. Este patrón de distribución se ha observado en los homólogos de GRB en levaduras y mamíferos (Moser, *et al.*, 1997; Hagan y Hyams, 1988; Flory, *et al.*, 2002; Fong *et al.*, 2010).

Las cepas que expresan el marcaje en el extremo carboxi-terminal no mostraron efectos negativos en el crecimiento y morfología. En todos los casos se encontró una localización puntual asociada a los núcleos. Esto concuerda con lo reportado por Flory *et al.* (2002), en el que el marcaje endógeno de la GRB con GFP tanto en el extremo carboxi- o amino-terminal se localiza en los SPBs y las células no presentan defectos en crecimiento.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal del heterocarión que expresa el doble marcaje de los núcleos en rojo (dRFP-H1) y la GRB en verde, demostraron que la asociación de la GRB a los núcleos es constante a través del ciclo de división nuclear. Algunos núcleos poseen un punto fluorescente intenso de GRB asociado a ellos y otros presentan dos puntos fluorescentes localizados en extremos opuestos. Debido a que en levaduras las proteínas tipo pericentrinas se encuentran asociadas al SPB de los núcleos en interfase y en mitosis (Flory *et al.*, 2002), suponemos que los núcleos que presentan un solo punto brillante corresponden a núcleos en interfase y los que presentan dos puntos fluorescentes corresponden a núcleos en mitosis.

La co-localización de la GRB con la γ -tubulina en los núcleos, indica que en *N. crassa* la GRB se encuentra asociada a los SPBs al igual que sus homólogos

en levaduras. El SPB es una estructura granular que consta de diferentes láminas ancladas a la membrana nuclear. Una de estas láminas es la lámina externa que entra en contacto con el citoplasma celular y la otra es la lámina interna que esta en contacto con el nucleoplasma. Para determinar la localización de GRB en las placas del SPB realizamos la fusión de la cepa que expresa GRB-mCHFP con la cepa que expresa la nucleoporina GFP-SON1. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que la GRB se encuentra embebida en la membrana nuclear. Sin embargo, la resolución de estas imágenes no permiten determinar si la GRB se encuentra en la placa interna o en la placa externa del SPB. Para determinar con precisión la localización de la GRB con respecto a las placas del SPB es necesario realizar observaciones de microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, podemos asumir que la GRB se encuentra localizada en la placa interna del SPB, debido a que sus homólogos en levaduras han sido localizados en dicha región (Moser *et al.*, 1997; Flory *et al.*, 2002).

El SPB es conocido como el principal centro organizador (MTOC) tanto de Mts citoplasmáticos como de Mts mitóticos y la γ -tubulina es la principal responsable de la formación de *novo* de Mts a partir de los MTOCs. Como se esperaba el marcaje de la GRB-GFP y la β -tubulina-mCHFP mostró una asociación de los Mts citoplasmáticos asociados a un punto fluorescente de GRB en los núcleos en interfase, y los Mts del huso mitótico con un punto brillante de GRB en cada extremo del huso. A diferencia de la levadura de fisión, en la cual la polimerización de los Mts del huso inicia desde la migración del SPB hijo (Ding *et al.*, 1997; West *et al.*, 1998), nosotros encontramos núcleos con dos puntos brillantes de GRB previo a la formación del huso mitótico, lo que sugiere que en *N. crassa* el SPB migra hacia los extremos opuestos del núcleo antes de iniciar la formación del huso mitótico.

Las observaciones realizadas en este trabajo indican que la GRB se encuentra localizada en los SPBs, a su vez asociada a la γ -tubulina y a los Mts. Siguiendo el mismo comportamiento dinámico del SPB durante el ciclo nuclear,

por lo que creemos que esta proteína constituye un elemento importante en la regulación de la mitosis en *N. crassa*. Aunque con estas observaciones, es difícil establecer el papel que juega esta proteína en el proceso de la mitosis en *N. crassa*, se ha demostrado que sus homólogos en otros organismos están involucrados en la formación del huso mitótico mediante el reclutamiento del complejo de la γ -tubulina al SPB de hongos (Yoder *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2010) y a los centrosomas de células animales (Zimmerman *et al.*, 2004; Zhang y Megraw, 2007).

Las mutantes de las proteínas tipo pericentrina tienen un efecto negativo en la formación del huso y la segregación de cromosomas. Además, en *S. pombe* se demostró que la sobreexpresión de la proteína causa defectos en la segregación de cromosomas, la formación de múltiples fragmentos mitóticos y la presencia de varias estructuras anormales, por ejemplo múltiples SPBs (Flory *et al.*, 2002). Al igual que en algunas líneas celulares cancerígenas de humanos, que presentan estructuras anormales como centrosomas, la formación anormal del huso y la incorrecta segregación de DNA (Lingle *et al.*, 1998; Pihan *et al.*, 1998; Lingle y Salisbury, 1999; Flory *et al.*, 2000).

Para determinar el efecto de la mutante de la GRB en *N. crassa*, se adquirió una cepa comercial con la delección del ORF del gen de la GRB. Sin embargo, el análisis de Southern blot de la cepa adquirida mostró resultados negativos, es decir que la cepa comercial tenía el ORF de *grb*. Así mismo, el PCR que se realizó utilizando el par de oligonucleótidos del ORF de *grb*, mostró que tanto la cepa comercial como su progenie poseían el gen de la *grb*. Debido a esto, y a que la proteína es parte del SPB se asume que la delección de esta proteína es letal. Por lo que para determinar el análisis del efecto de la mutación de la GRB en la distribución de la γ -tubulina y el ensamblaje del huso mitótico, se propone la construcción de una cepa que exprese la mutante de la GRB sensible a temperatura.

Por otra parte, la localización cercana de la GRB con la histona centromérica CenH3 durante interfase y la separación de estas en mitosis, sugiere que podrían estar relacionadas con la regulación de la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Diversos estudios muestran que los cromosomas se encuentran asociados al SPB durante el ciclo nuclear, en interfase por la interacción del centrómero con un complejo proteico al SPB y durante la mitosis mediante los Mts del huso mitótico que se asocian por el extremo negativo al SPB y mediante el extremo positivo al centrómero (Girbard, 1971; Aist y Williams, 1972; Heath, 1994). Sin embargo, hasta el momento se desconocen los elementos moleculares que regulan la segregación de los cromosomas en hongos filamentosos. El estudio de el comportamiento de estas dos proteínas podría constituir las bases para comprender los mecanismos que regulan la segregación de cromosomas en *N. crassa*.

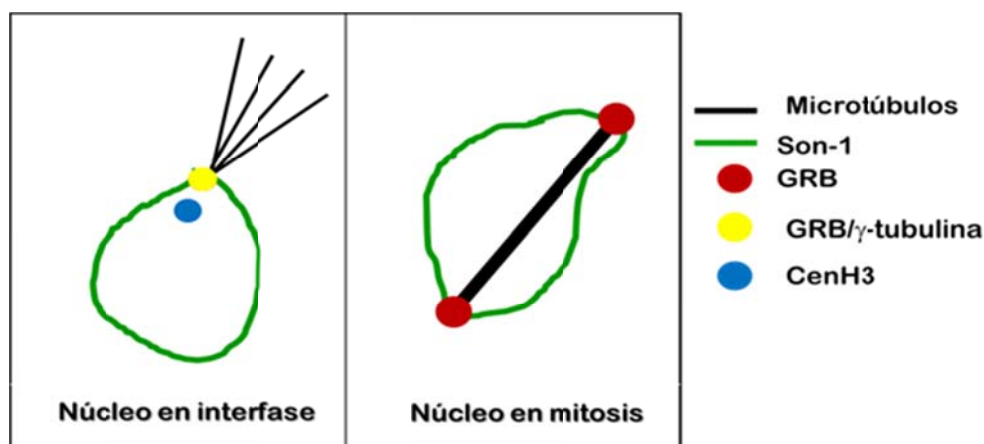


Figura 27. Diagrama representativo de la localización de GRB en *N. crassa*. La GRB se encuentra embebida en la membrana nuclear, asociada con la γ -tubulina en los SPBs de los núcleos. En los núcleos en interfase la GRB y la CenH3 se encuentran en una posición muy cercana, mientras que en la mitosis están alejadas. La GRB se asocia a un extremo de los Mts citoplasmáticos que emanan del SPB, y en mitosis se localiza en los extremos opuestos del huso mitótico.

VIII.2 Localización y dinámica de la APS-1

Con la finalidad de determinar la localización y dinámica de la proteína APS-1 en *N. crassa*, realizamos el marcaje endógeno con GFP en el carboxi-terminal de la proteína.

Las observaciones por microscopía confocal muestran que la proteína APS-1-GFP se distribuye a manera de puntos brillantes en el citoplasma, aparentemente asociada a los núcleos. Encontrándose esta localización conservada en los diferentes estadios celulares de *N. crassa*. Estas observaciones concuerdan con la localización de sus homólogos Mto1p y ApsB en los SPBs de *S. pombe* y *A. nidulans*, respectivamente (Suelmann *et al.*, 1998; Venkatram *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2005; Samejima *et al.*, 2008).

El doble marcaje de la APS-1-GFP y la γ -tubulina-mCHFP mostró puntos fluorescentes que indican la co-localización de estas proteínas, además se observaron señales fluorescentes que no co-localizan. En hongos, la γ -tubulina es el principal componente de los SPBs (Oakley *et al.*, 1990; Horio *et al.*, 1991; McDaniel y Roberson, 1998; Straube *et al.*, 2003; Fink y Steinberg, 2006). Por lo tanto, la co-localización de APS-1 con la γ -tubulina podría representar a la población de APS-1 asociada a los SPBs, mientras que la que no co-localiza corresponde a APS-1 libre en el citoplasma.

Konzack *et al.*, (2005) demostraron que la nucleación de Mts en *A. nidulans*, ocurre en tres diferentes localizaciones celulares. Una correspondiente a los SPBs, otra al citoplasma y a los septos. Los homólogos de APS-1 en la levadura de fisión y en *A. nidulans* se localizan en los MTOCs nucleares y citoplasmáticos (Venkatram *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2005; Zekert *et al.*, 2010). Sin embargo, el marcaje de membranas con el colorante lipofílico FM4-64 en la cepa que expresa el marcaje APS-1-GFP, no mostro la presencia de la APS-1-GFP en los septos.

En *A. nidulans*, el marcaje en el carboxi-terminal de la proteína ApsB ocasiona que la proteína pierda su localización en los septos y además causa una reducción en el número de Mts citoplasmáticos similar a la cepa mutante de ApsB (Veith *et al.*, 2005). Por lo tanto, es posible que en *N. crassa* la APS-1 tenga la misma distribución celular que la ApsB, pero esta no es evidente debido a que su localización es afectada por el marcaje en el carboxi-terminal de la proteína.

Las células de conidias y germínulas de la cepa que expresa la APS-1-GFP no muestran diferencias en cuanto a la morfología de la cepa silvestre, sin embargo las hifas maduras tienen un crecimiento tipo mutante. El cual se caracteriza por presentar un crecimiento lento, con una tasa elevada de ramificaciones, poseer una polaridad inestable, presentando ramificaciones apicales y ensanchamiento de las hifas. Esto demuestra que el marcaje en el carboxi-terminal de la APS-1 con la proteína GFP afecta la morfología y la tasa de crecimiento del hongo, por lo tanto también puede estar afectando la localización y funcionalidad de esta proteína.

La cruce de la cepa que posee la Δ APS-1 (FGSC16154) para obtener los homocarios de la misma no produce progenie, lo que sugiere que la delección de esta proteína es letal. Estos hallazgos indican que la proteína APS-1 es una proteína esencial en *N. crassa*. Para futuros análisis se propone realizar el marcaje de la proteína APS-1 en el amino terminal y una mutante sensible a temperatura.

IX. Conclusiones

En este trabajo se demostró que las proteínas GRB y APS-1 funcionan como MTOCs dependientes de γ -tubulina en los SPBs. Tanto la GRB como la APS-1 son proteínas esenciales para la viabilidad del hongo, debido a que están involucradas en el proceso de mitosis.

El hecho de que la GRB y la APS-1 se localicen en el SPBs, y sigan la misma dinámica que sus homólogos en levaduras, demuestra que existe una conservación evolutiva de los componentes moleculares del SPBs involucrados en la organización de los Mts citoplasmáticos y nucleares.

A su vez, la presencia de la APS-1 en el citoplasma indica la existencia de MTOCs citoplasmáticos independientes de γ -tubulina.

IX.1 Localización y dinámica de la GRB en *N. crassa*

- La localización celular de la GRB en los diferentes estadios del ciclo celular de *N. crassa* está asociada a los SPBs de los núcleos embebida en la membrana nuclear, co-localiza con la γ -tubulina y se localiza en extremos opuestos del huso mitótico durante la mitosis.
- La GRB está relacionada con el ensamblaje del huso mitótico en *N. crassa*.
- La localización cercana de la GRB con la CenH3 sugiere que estas podrían estar relacionadas con la regulación de la segregación de los cromosomas durante la mitosis.
- La delección de GRB es letal en células de *N. crassa*.

IX.2 Localización y dinámica de la APS-1 en *N. crassa*

- APS-1 es una proteína esencial para *N. crassa*.
- La APS-1-GFP se localiza en los SPBs y colocaliza parcialmente con la γ -tubulina.
- El marcaje endógeno de la APS-1-GFP afecta la tasa de crecimiento del hongo.
- El dominio C-terminal de la APS-1 está involucrado en el posicionamiento de esta proteína en los septos.

X. Bibliografía

- Adams I. R. y J. V. Kilmartin. 1999. Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 145(4):809-823.
- Aist, J. R. 1969. The mitotic apparatus in fungi, *Ceratocystis fagacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Cell Biology*. 40:120-135.
- Aist, J. R., y C. J. Bayles. 1988. Video motion analysis of mitotic events in living cells of the fungus *Fusarium solani*. *Cell Motility. Cytoskeletal*. 9:325-336.
- Aist, J. R. y N. R. Morris. 1999. Mitosis in filamentous fungi: how we got where we are. *Fungal Genetics and Biology*. 27:1-25.
- Aist, J. R. y P. H. Williams. 1972. Ultrastructure and time course of mitosis in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Cell Biology*. 55:368-389.
- Bartnicki-García, S. y E. Lippman. 1969. Fungal morphogenesis: Cell wall reconstruction in *Mucor rouxii*. *Science*. 165(890):302-304.
- Bartnicki-García S., F. Hergert y G. Gierz. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153:46-57.
- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: Outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. 608pp.
- Baum P., C. Furlong y B. Byers. 1986. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca²⁺-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:5512-5516.
- Beadle, G. W. y E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27:499-506.

- Biggins S. y M. Rose. 1994. Direct interaction between yeast spindle pole body components: Kar1p is required for Cdc31p localization to the spindle pole body. *Journal of the Cell Biology*. 125:843-52.
- Brinkley, B. R. 1985. Microtubule organizing centers. *Cell Biology*. 1:145-172.
- Bullit E., M. Rout, J. Kilmartin y C. Akey. 1997. The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell*. 89:1077-1086.
- Byers B. 1981. Multiple roles of the spindle pole bodies in the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular Genetics in Yeast*, vol. 16, ed. D. von Wettstein, A. Stenderup, M. Kielland-Brandt, J. Friis, Copenhagen: Munksgaard. 119-133.
- Byers B. y L. Goetsch. 1974. Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 38:123-31.
- Byers B. y L. Goetsch. 1975. Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 124:511-523.
- Castillo A. R., J. B. Meehl, G. Morgan, A. Schutz-Geschwender y M. Winey M. 2002. The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *Journal of Bacteriology*. 156(3):453-465.
- Chial H. J., M. P. Rout, T. H. Giddings y M. Winey. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* Ndc1p is a shared component of nuclear pore complexes and spindle pole bodies. *Journal of Cell Biology*. 143:1789-1800.
- Clutterbuck, A. J. 1994. Mutants of *Aspergillus nidulans* deficient in nuclear migration during hyphal growth and conidiation. *Microbiology*. 140:1169-1174.
- Delgado-Álvarez D. D., O. A. Callejas-Negrete, N. Gómez, M. Freitag, R. W. Roberson, L. G. Smith y R. R. Mouriño-Pérez. 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 47(7):573-586.
- Desai, A. y T. J. Mitchison. 1997. Microtubule Polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13: 83-117.
- Dicthenberg J. B., W. Zimmeman, C. A. Sparks, C. Vidair, Y. Zheng, W. Carrington, F. S. Fay y S. J. Doxsey. 1998. γ -tubulin forms a protein complex and is organized into a novel lattice at the centrosome. *The Journal of Cell Biology*. 141(1): 163-174.

- Ding R., R. R. West, D. M. Morpew, B. R. Oakley y J. R. McIntosh. 1997. The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Molecular Biology of the Cell*. 8:1461-1479.
- Donaldson A. D. y J. V. Kilmartin. 1996. Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *The Journal of Cell Biology*. 132:887-901.
- Erickson, 2000. γ -tubulin nucleation: template or protofilament?. *Nature Cell Biology*. 2:E93-E96.
- Elliott S., M. Knop, G. Schlenstedt y E. Schiebel. 1999. Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:6205-6210.
- Fernandez-Abalos, J. M., H. Fox, C. Pitt, B. Wells y J. H. Doonan. 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 27:121-130.
- Fink, G. y G. Steinberg. 2006. Dynein-dependent motility of microtubules and nucleation sites supports polarization of the tubulin array in the fungus *Ustilagos maydis*. *Molecular Biology of the Cell*. 14:3242-3253.
- Fitch I., C. Dahmann, U. Surana, A. Amon, K. Nasmyth, L. Goetsch, B. Byers y B. Futcher. 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 3:805-818.
- Flory M. R., M. J. Moser, R. J. Monnat y T. N. Davis. 2000. Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:5919-5923.
- Flory M. R., M. Morpew, J. D. Joseph, A. R. Means y T. N. Davis. 2002. Pcp1p, an Spc110p-related calmodulin target at the centrosome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 13:47-58.
- Fong C. S., M. Sato y T. Toda. 2010. Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to γ -tubulin-dependent spindle formation. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 29:120-130.

- Freitag, M., P. C. Hickey, N. B. Raju, E. U. Selker y N. D. Read. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubule in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 41:897-910.
- Friedman D. B., J. W. Kern, B. J. Huneycutt, D. B. N. Vinh, D. K. Crawford, E. Steiner, D. Scheiltz, J. Yates III, K. A. Resing, N. G. Ahn, M. Winey y T. N. Davis. 2001. Yeast Mps1p phosphorylates the spindle pole component Spc110p in the N-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(21):17958-17967.
- Fuchs, U., I. Manns y G. Steinberg. 2005. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of Cell*. 16:2746-2758.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, K. A. Borkovich, E. U. Selker, N. D. Read, D. Jaffe, W. FitzHug, L. J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C. B. Nielsen, J., M. Endrizzi, D. Qui, P. Lanakiev, D. Bell Pedersen, M. A. Nelson, M. Werner-Washburne, C. P. Selitrennikoff, J. A. Kinsey, E. G. Braun, A. Zelter, U. Schuler, G. O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, S. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R. Metzenberg, D. D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R. J. Pratt, S. A. Osmani, C. P. DeSouza, L. Glass, M. J. Orbach, J. A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamman, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D. O. Natvig, L. A. Alex, G. Manhaupt, D. J. Ebole, M. Freitag, I. Paulsen, M. S. Sachs, E. S. Lander, C. Nusbaum, y B. Birren. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422 (6934):859-68.
- Girbardt, M. 1971. Ultrastructure of the fungal nucleus. II. The kinetochore equivalent. (KCE). *Journal of Cell Science*. 2:453-473.
- Gooday, G. W. 1983. The hyphal tip. In: Smith, J. E. (Ed). *Fungal Differentiation*. Marcel Dekker, New York. 315-356.
- Gow, N. A. R. 1989. Control of the extension of the hyphal apex. *Current Topics in Medical Mycology*. 3:109-152.
- Gow, N. A. R. 1994. Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology*. 140:3193-3205.
- Grove S. N. y Bracker C. E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology*. 104:989-1009.

- Gruneberg U., K. Campbell, C. Simpson, J. Grindlay y E. Schiebel. 2000. Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 19:6475-6488.
- Hagan I. M. y J. S. Hyams. 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*. 89:343-357.
- Harold, F. M. 1990. To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 54(4):381-431.
- Harold, F. M. 1997. How hyphae grow: morphogenesis explained?. *Protoplasma* 197:137-147.
- Harris, S. D y M. Momany. 2004. Polarity in filamentous fungi moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics of Biology*. 41:391-400 .
- Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, y M. Momany. 2005. Polarizome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genome Converge. *Eukaryotic Cell*. 4(2):225-229.
- Hasek, J. y S. Bartnicki-Garcia. 1994. The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Archives of Microbiology*. 161:363-369.
- Heath, I. B., M. C. Heath y F. Herr. 1982. Motile systems in fungi. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 35:563-587.
- Heath, I. B. y S. G. Kaminskyj. 1989. The organization of tip-growth related organelles and microtubules revealed by quantitative analysis of freeze-substituted oomycete hyphae. *Journal of Cell Science* 93:41-52.
- Heath, I. B. 1994. The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movement. In: Wessels, J. G. H., Meinhardt, F. (Eds), *The Mycota I Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 43-65.
- Hickey, P. C., S. R. Swift, M. G. Roca . y N. D. Read. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology* 34:63-87.
- Hoepfner, D., A. Bracht y P. Philippsen 2000. Time-lapse video microscopy analysis reveals astral microtubule detachment in the yeast spindle pole mutant *cnm67v*. *Molecular Biology of the Cell*. 11:1197-1211.

- Horio, T., S. Uzawa, M. K. Jung, B. R. Oakley, K. Tanaka y M. Yanagida. 1991. The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *Journal of Cell Science*. 99:693-700.
- Horio, T. y B. R. Oakley. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 16:918-926.
- Howard, R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *Journal of Cell Science* 48:89-103.
- Howard, R. J. y J. R. Aist. 1977. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D₂O. *Protoplasma*. 92:195-210.
- Howard, R. J. y J. R. Aist. 1980. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-carbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *Journal of Cell Biology*. 87:55-64.
- Hoepfner D, A. Brachat y P. Philippsen. 2000. Time-lapse video microscopy analysis reveals astral microtubule detachment in the yeast spindle pole mutant *cnm67*. *Molecular Biology of the Cell*. 11(4):1197–211.
- Jacobs C. W., A. E. M. Adams, P. J. Szaniszlo y J. R. Pringle. 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *The Journal of Cell Biology*. 107:1409-1426.
- Jaspersen S. L., T. H. Giddings y Winey M. 2002. Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *The Journal of Cell Biology*. 159 (6):945-956.
- Jaspersen S. L. y M. Winey. 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20:1-28.
- Joshi H. C., M. J. Palacios, L. McNamara y D. W. Cleveland. 1992. γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*. 256:80-83.
- Kilmartin J. V. 2003. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *The Journal of Cell Biology*. 162:1211-1221.

- Kilmartin J., S. Dyos, D. Kershaw D. y J. Finch. 1993. A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body whose transcript is cell cycle-regulated. *The Journal of Cell Biology*. 123:1175-1184.
- Kilmartin J. V. y P. Goh P. 1996. Spc110p: assembly properties and role in the connection of nuclear microtubules to the yeast spindle pole body. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 15:4592-4602.
- Kimble, M. y R. Kuriyama. 1992. Functional components of microtubule-organizing centers. *Cytology*. 136:1-50.
- Khodjakov A. y C. L. Rieder. 1999. The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *Journal of Cell Biology*. 146(3):585-596.
- Knop M. y E. Schiebel. 1997. Spc98p and Spc97p of the yeast γ -tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. 16(23):6985-6995.
- Knop M. y E. Schiebel. 1998. Receptors determine the cellular localization of a γ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. 17(14):3952-3967.
- Knox-Davies P. S. 1966. Nuclear division in the developing pycnospores of *Macrophomina phaseoli*. *American Journal of Botany*. 53(3):220-224.
- Konzack S., P. Rischitor, C. Enke y R. Fischer. 2005. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 16:497-506.
- Li S., A. M. Sandercock, P. Conduit, C. V. Robinson, R. L. Williams y J. V. Kilmartin. 2006. Structural role of Sfi1p-centrin filaments in budding yeast spindle pole body duplication. *Journal of Cell Biology*. 173:867-887.
- Liu B., H. C. Joshi, T. J. Wilson, C. D. Silflow, B. A. Palevitz y P. Snustad. 1994. γ -tubulin in Arabidopsis: Gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell*. 6:303-314.
- Lingle W. L. y J. L. Salisbury. 1999. Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *American Journal of Pathology*. 155(6):1941-1951.
- Lingle W. L., W. H. Lutz, J. N. Ingle, N. J. Maihle y J. L. Salisbury. 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:2950-2955.

- López, I., S. Khan, M. Sevik, W.Z. Cande y P. J. Hussey. 1995. Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays* γ -tubulin. *Plant Physiology*. 107:309-310.
- Lú, B. C. 1964. Chromosome cycles of the basidiomycete *Cyathus stercoreus* (Schw.) de Toni. *Chromosoma* 15:170-184.
- Marschall, L. G., R. L. Jeng, J. Mulholland y T. Stearns. 1996. Analysis of Tub4p, a yeast γ -tubulin-like protein: Implications for microtubule-organizing center function. *Journal of Cell Biology*. 134:443-454.
- Mathias N., S. L. Johnson, M. Winey, A. M. Adams, L. Goetsch, J. R. Pringle, B. Byers y M. G. Goebel. 1996. Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 16:6634-6643.
- Mazia, D. 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Cytology*. 100:49-92.
- McDaniel, D. P. y R. W. Roberson. 1998. γ -tubulin is a component of the Spitzenkörper and centrosomes in hyphal-tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*. 203:118-123.
- Meads, T. and Schroer, T. A. 1995. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 32:273-288.
- Moens P. y E. Rapport. 1971. Spindles, spindle plaques and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 50:344-361.
- Moritz M. y D. A. Agard. 2001. γ -tubulin complexes and microtubules nucleation. *Structural Biology*. 11:174-181.
- Moser M. J., M. R. Flory y T. N. Davis. 1997. Calmodulin localizes to the spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* and performs an essential function in chromosome segregation. *Journal of Cell Science*. 110:1805-1812.
- Motta J. J. 1967. A note on the mitotic apparatus in the rhizomorph meristem of *Armillaria mellea*. *Mycologia*. 59: 370-375.
- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. y Bornens, M. 1996. Gamma-tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *Journal of Cell Science*. 109:875-887.
- Mouriño-Perez R. R., R. W. Roberson y S. Bartnicki-Garcia Salomon. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 43(6):389-400.

- Muller E. G., B. E. Snyderman, I. Novik, D. W. Hailey, D. R. Gestaut, C. A. Niemann, E. T. O'Toole, Jr. T. H. Giddings, B. A. Sundin y T. N. Davis. 2005. The organization of the core proteins of the yeast spindle pole body. *Molecular Biology of the Cell*. 16:3341-3352.
- Muñoz-Centeno M. C., S. McBratney, A. Monterrosa, B. Byers, C. Mann y M. Winey. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* MPS2 encodes a membrane protein localized at the spindle pole body and the nuclear envelope. *Molecular Biology of the Cell*. 10:2393-2406.
- Nguyen T., D. B. N. Vinh, D. K. Crawford y T. N. Davis. 1998. A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast γ -tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*. 9:2201-16.
- Oakley B. R. 1992. Gamma-tubulin: the microtubule organizer?. *Trends Cell Biol.* 2(1):1-5.
- Oakley, B. R., C. E. Oakley, Y. Yoon y M. K. Jung. 1990. γ -tubulin is a component of the Spindle Pole Body That is Essential for Microtubule Function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 61:1289-1301.
- Oakley, C. E. y B. R. Oakley. 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by the *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 338:662-664.
- O'Toole E. T., M. Winey y J. R. McIntosh. 1999. High-voltage electron tomography of spindle pole bodies and early mitotic spindles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 10(6):2017-2031.
- Pereira, G. y E. Schuehek. 1997. Centrosome-microtubule nucleation. *Journal Cell Science*. 110:295-300.
- Pereira G, U. Gruneberg, M. Knop y E. Schiebel. 1999. Interaction of the yeast γ -tubulin complex-binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 18(15):4180-4195.
- Pihan G. A., A. Purohit, J. Wallace, H. Knecht, B. Woda, P. Quesenberry y S. J. Duxsey. 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Research*. 58:3974-3985.
- Ramírez-Cota R. 2008. Localización de la γ -tubulina en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura en Biología, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, 77pp.

- Raff, J. W., D. R. Kellogg y B. M. Alberts. 1993. *Drosophila* γ -tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *Journal Cell Biology*. 121:823-835.
- Rajagopalan S., A. Bimbo, M. K. Balasubramanian y S. Oliferenko. 2004. A potential tension-sensing mechanism that ensures timely anaphase onset upon metaphase spindle orientation. *Current Biology*. 14:69–74.
- Riquelme, M., P. C. G. Reynaga, G. Gires y S. Bartnicki-García. 1998. What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae?. *Fungal Genetic Biology*. 24(1-2):101-109.
- Riquelme M., G. Gierz, y S. Bartniki-García. 2000. Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* (146): 743-1752.
- Riquelme, M., R. Fisher y S. Bartnicki-García. 2003. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma*. 222:211-215.
- Robinow C. F. y J. Marak. 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *The Journal of Cell Biology*. 29:129-50.
- Robinow C. F. y C. E. Caten. 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*. 5:403-431.
- Roberson, R.W. y M. S. Fuller. 1988. Ultrastructural aspects of the hyphal tip of *Sclerotium rolfsii* preserved by freeze substitution. *Protoplasma* 146:143-149.
- Roof D. M., P. B. Meluh y M. D. Rose MD. 1992. Kinesin related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*. 118(1):95-108.
- Rose M. D. y G. R. Fink. 1987. *KAR1*, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell*. 48(6):1047-60.
- Sambrook J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2,344 pp.
- Samejima I., V. J. Miller, L. M. Grocock y K. E. Sawin. 2008. Two distinct regions of Mto1 are required for normal microtubule nucleation and efficient association with the γ -tubulin complex in vivo. *Journal of Cell Science*. 121:3971-3980.
- Sampson, K. y I. B. Heath. 2005. The dynamic behavior of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 151:1543-1555.

- Sawin K. E. y P. T. Tran. 2006. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast*. 23:1001-1014.
- Sawin K. E., P. C. C. Lourenco y H. A. Snaith. 2004. Microtubule nucleation at non-Spindle Pole Body Microtubule-Organizing Centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Current Biology*. 14:763-775.
- Schaerer F., G. Morgan, M. Winey y P. Philippsen. 2001. Cnm67p is a spacer protein of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body outer plaque. *Molecular Biology of the Cell*. 12:2519-33.
- Schramm C., S. Elliott, A. Shevchenko, A. Shevchenko y E. Schiebel. 2000. The Bbp1p Mps2p complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication. *European Molecular Biology Organization Journal*. 19(3):421-433.
- Schutz A. R. y M. Winey. 1998. New alleles of the yeast *MPS1* gene reveal multiple requirements in spindle pole body duplication. *Molecular Biology of the Cell*. 9:759-774.
- Seiler, S. L., M. Plamman y M. Schliwa. 1999. Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicles traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Current Biology*. 9:779-785.
- Sobel, S. G. y M. Snyder. 1995. A highly divergent γ -tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Cell Biology*. 131:1775-1788.
- Spang A., I. Courtney, U. Fackler, M. Matzner y E. Schiebel. 1993. The calcium-binding protein division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *Journal of the Cell Biology*. 123:405-416.
- Spang A., I. Courtney, K. Grein, M. Matzner y E. Schiebel. 1995. The Cdc31p-binding protein Kar1p is a component of the half bridge of the yeast spindle pole body. *Journal of the Cell Biology*. 128(5):863-877.
- Spang A, K. Grein y E. Schiebel. 1996. The spacer protein Spc110p targets calmodulin to the central plaque of the yeast spindle pole body. *The Journal of Cell Biology*. 109:2229-22237.
- Stearns, T., L. Evans y M. Kirschner. 1991. γ -tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell*. 65:825-836.

- Stirling D., K. Welch y M. Stark. 1994. Interaction with calmodulin is required for the function of Spc110p, an essential component of the yeast spindle pole body. *European Molecular Biology Organization Journal* .13:4329-4342.
- Straube, A., M. Brill, B. R. Oakley, T. Horio, y G. Steinber. 2003. Microtubule organization requires cell cycle dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing center in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*. 14:642-657.
- Straube, A., W. Enard, A. Berner, R. Wedlich-Soldner e I. Schulz, 2001. A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *European Molecular Biology Organization Journal*. 20:5091-50100.
- Suelmann R., N. Sievers, D. Galetzka, L. Robertson, W. E. Timberlake y R. Fischer. 1998. Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *apsB* mutants of *Aspergillus nidulans*: Molecular characterization of *apsB* and *in vivo* observation of nuclear behaviour. *Molecular Microbiology*. 30:831-842.
- Sundberg H., L. Goetsch, B. Byers y T. Davis. 1996. Role of calmodulin and Spc110 interaction in the proper assembly of spindle pole body components. *The Journal of Cell Biology*. 133:111-24.
- Sundberg H. y T. Davis. 1997. A mutational analysis identifies three functional regions of the spindle pole component Spc110p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 8:2575-2590.
- Szewczyk, E., T. Nayak, C. E. Oakley, H. Edgerton, Y. Xiong, N. Taheri-Talesh, S. A. Osmani, y B. R. Oakley. 2007. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* 1:3111-312.
- Trinci, A. P. J. 1978. Wall and hyphal growth. *Science Progress*. 65:75-99.
- Usui T., H. Maekawa, G. Pereira y E. Schiebel. 2003. The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 22:4779-4793.
- Vallen E., T. Y. Scherson, T. Roberts, K. van Zee y M. D. Rose. 1992. Asymmetric mitotic segregation of the yeast spindle pole body. *Cell*. 69:505-515.
- Vallen E., W. Ho, M. Winey y M. Rose. 1994. Genetic interactions between *CDC31* and *KAR1*, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 137:407-422.
- Van Duyne G. D., 2001 A structural view of Cre-*loxP* site-specific recombination. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 30:87-104.

- Veith, D., N. Scherr, V. P. Efimov y R. Fisher. 2005. Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Cell Science*. 118: 3705-3716.
- Venkatram S., J. J. Tasto, A. Feoktistova, J. L. Jennings, A. J. Link y K. L. Gould. 2004. Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast γ -tubulin complex function. *Molecular Biology of the Cell*. 15:2287-2301.
- Vinh D. B. N., J. W. Kern, W. O. Hancock, J. Howard y T. N. Davis. 2002. Reconstitution and characterization of budding yeast γ -tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell* 13:1144-1457.
- West R. R., E. V. Vaisberg, R. Ding, P. Nurse y J. R. McIntosh. 1998. cut11⁺: a gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. 9: 2839-2855.
- Westergaard M. y H. K. Mitchell. 1947. Neurospora V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*. 34:573-577.
- Winey M., L. Goetsch, P. Baum y B. Byers. 1991. *MPS1* and *MPS2*: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *Journal of the Cell Biology*. 114:745-754.
- Winey M., M. A. Hoyt, C. Chan, L. Goetsch, D. Botstein y B. Byers. 1993. *NDC1*: a nuclear periphery component required for yeast spindle pole body duplication. *Journal of the Cell Biology*. 122:743-751.
- Yoder T. J., M. A. McElwain, S. E. Francis, J. Bagley, E. G. Muller, B. Pak, E. T. O'Toole, M. Winey y T. N. Davis. 2005. Analysis of a spindle pole body mutant reveals a defect in bi-orientation and illuminates spindle forces. *Molecular Biology of the Cell*. 16:141-152.
- Zekert N., D. Veith y R. Fischer. 2010. Interaction of the *Aspergillus nidulans* Microtubule-Organizing Center (MTOC) Component ApsB with Gamma-Tubulin and Evidence for a Role of a Subclass of Peroxisomes. *Eukaryotic Cell*. 9(5):795-805.
- Zheng, Y., K. Jung y B. R. Oakley. 1991. γ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*. 65:817-823.
- Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts y T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378:578-583.

Zhang J., T. L. Megraw. 2007. Proper recruitment of γ -tubulin and DTACC/Msps to embryonic *Drosophila* centrosomes requires centrosomin motif 1. *Molecular Biology of the Cell*. 10:4037-4049.

Zimmerman W. C., Sillibourne, J. Rosa y S. J. Doxsey. 2004. Mitosis-specific anchoring of γ -tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Molecular Biology of the Cell*. 15:3642-3657.