

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA
CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA**

**Caracterización de la miosina de clase V del hongo
filamentoso *Neurospora crassa***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Arianne Ramírez del Villar

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por
Ariane Ramírez del Villar

y aprobada por el siguiente Comité



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité



Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Miembro del Comité



Dr. Fernando Lara Rojas
Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias de las Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Octubre, 2014

Resumen de la tesis de **Arianne Ramírez del Villar**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Caracterización de la miosina de clase V del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen elaborado por:

Arianne Ramírez del Villar

Los hongos filamentosos crecen en forma polarizada a través de la secreción de vesículas que contienen componentes de la pared celular y que viajan hacia el ápice de la célula. El movimiento de estos componentes es producido por proteínas motoras asociadas al citoesqueleto y en el caso de los filamentos de actina, estos motores se conocen como miosinas. Se ha reportado que la miosina de clase V es responsable del transporte de cargas intracelulares. Tiene un dominio diluido situado en el extremo carboxilo que une a la miosina a diferentes cargas. En hongos filamentosos, pocos estudios se han realizado acerca de la miosina de clase V. En este trabajo, se estudió la dinámica y localización de la miosina de clase V, así como la mutante carente del gen de la miosina de clase V en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Se encontró que la miosina de clase V se localiza en el citoplasma en conidios, y una vez que germinan, esta se localiza en el ápice formando un domo apical donde permanece en las hifas maduras. Además, forman parte del septo. La ausencia de la miosina de clase V produce alteraciones en el crecimiento y la morfología de las hifas. Las colonias de la miosina de clase V mutante son más pequeñas y más compactas que las de la cepa WT (86,92% más pequeñas). Las colonias mutantes tenían un descenso de 90,51% en la tasa de crecimiento en comparación con la WT y sólo produjeron 22,80% de la biomasa de la WT. Las observaciones con microscopía confocal muestran diferencias en la distribución de los componentes de la pared celular de los conidios, germínulas e hifas maduras entre las dos cepas. Por otra parte, en las hifas mutantes, el Spitzenkörper está claramente desorganizado, observándose como una mancha difusa en el ápice. Las vacuolas se localizan en la punta y no las zonas más alejadas a esta como en la WT. Además, hubo una reducción en la producción de conidios de la mutante (0,09%) pero un aumento en su área (2.5 veces mayor) y en la cantidad de núcleos por conidio, así como anomalías en la morfología de los conidióforos. La mutante de la miosina de clase V ramifica principalmente en la punta de la hifa y las hifas tenían un diámetro más pequeño (33,33% menor) que en el WT. Toda esta información sugiere que la miosina de clase V en *N. crassa* aunque no es esencial, juega un papel importante en la morfogénesis y el crecimiento del hongo.

Palabras clave: **miosina, transporte, cargas, crecimiento, *Neurospora crassa***

Abstract of the thesis presented by **Arianne Ramírez del Villar** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Science with orientation in Microbiology

Characterization of class V myosin in filamentous fungus *Neurospora crassa*

Abstract by:

Arianne Ramírez del Villar

Filamentous fungi grow as polarized through secretion vesicles containing cell wall components and traveling towards the apex of the cell. The movement of these components is caused by motor proteins associated with cytoskeleton. The motor proteins associated with actin cytoskeleton are known as myosins. It has been reported that myosin class V is responsible for intracellular transport of cargo. It has a dilute domain located at the carboxyl terminus that binds myosin at different cargoes. In filamentous fungi, few studies have been performed on the class V myosin. In this work, was studied the dynamics and localization of myosin V class, as well as the mutant lacking of this gene in the fungus filamentous *Neurospora crassa*. We found that the class V myosin is localized in the cytoplasm in conidia, and after germinate, is located at the apex like apical dome where it remains in mature hyphae. Furthermore, form part of the septum. The absence of myosin class V produces alterations in growth and morphology of the hyphae. Colonies of the myosin class V mutant are smaller and more compact than the WT strain (86.92% less). The mutant colonies had a 90.51% decline in the growth rate compared to the WT and produced only 22.80% of the biomass of the WT. Observations in the confocal microscopy showed differences in the distribution of cell wall components of conidia, germling and mature hyphae in the mutant strain. Moreover, in the mutant hyphae, the Spitzenkörper clearly is disorganized observed as a diffuse spot at the apex. Vacuoles are located at the tip and not the furthest away of this region as WT. Furthermore, there was a decrease in the production of conidia of the mutant (0.09%) but an increase in area (2.5 times) and in the number of nuclei per conidium, as well as abnormalities in the morphology of the conidiophores. The mutant, branches mainly at the tip of the hyphae and the hyphae have a smaller diameter (33.33% less) than in the WT. This information suggests that myosin class V in *N. crassa* although not essential, plays an important role in morphogenesis and growth of fungus.

Keywords: **myosin, transport, cargoes, growth, *Neurospora crassa***

Dedicatoria

A mi madre,

Carlos

y

Valeria



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada. Al **DFG-CONACyT** 75306 por el financiamiento del proyecto. Al **CICESE** y al **Departamento de Microbiología** por permitirme tomar clases y realizar mi trabajo en sus instalaciones.

A la **Dra. Carmen Paniagua** y al **Dr. Fernando Lara**, miembros de mi comité, por su disponibilidad y aportaciones durante la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis la **Dra. Rosa Mouriño** por el apoyo, tiempo y paciencia dedicados en el desarrollo de este trabajo. También le agradezco porque cree en mí (aunque me regañe mucho) y me lleva a los congresos.

A la **Dra. Meritxell Riquelme** y **Eddy Sánchez** por proporcionarnos la cepa etiquetada y a Eddy por sus consejos en el laboratorio.

A mi **mamá**, cuyo amor y ejemplo de lucha es lo que me ha dado el ánimo para seguir adelante, para querer ser mejor persona, es un honor ser su hija, gracias por creer siempre en mí (aunque a veces yo ya no lo hacía), nunca podré agradecer todo lo que me has dado.

A mi **Tía Angélica** porque aunque este lejos, siempre me está apoyando. A mis hermanos **Beto** y **Mauri** por su amor y por animarme a continuar. A los **padres de Carlos** (Ángeles y Juan Carlos) por toda la ayuda que me han brindado.

A **Carlos** por el amor, la paciencia (mucho paciencia), el apoyo y por querer sacarme siempre una sonrisa, por ser mi amigo y compañero en la vida. A **Valeria** por hacer que me diera cuenta de las buenas cosas de la vida, querer ser mejor persona y hacerme muy feliz (aunque no se dé cuenta).

A **Michel** por siempre estar a mi lado, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por siempre preocuparse por mí, por ser una verdadera amiga/hermana/comadre.

A mi compañero y amigo **Fausto** por todo el apoyo y comprensión en esos momentos de crisis y por todos los buenos momentos.

A **Isabel** por apoyarme, tanto en mi trabajo como en lo personal, y por siempre ayudarme a ver el mundo de una mejor manera. También por no abandonarme en aquel congreso y hacer que fuera muy divertido. Gracias por tu amistad.

A **Olga** por su apoyo con la microscopia y consejos en el laboratorio. Al **Dr. Lara** por su amistad, apoyo y paciencia. A **Diego** porque aunque me hacía perder mucho el tiempo con sus búsquedas en Google (que por cierto en nada me convenían) me apoyo en las clases y en el trabajo de laboratorio. A **Fernando A.** por su amistad y las consultas médicas gratis.

A las “niñitas” de servicio social **Mary José** y **Gaby** por reducir la carga de trabajo en el laboratorio y hacerme pasar buenos momentos en el laboratorio. A la “niñita” **Aleyka** porque dejó un estatus MUY ALTO de lo que era hacer un servicio social y queremos que regrese.

A **Lluvia** (Lluis) por su amistad, por el apoyo, por ser mi compañera en las mañanas de soledad en el laboratorio (y por los churros locos). A **Adria** por ser mi amiga, por siempre preocuparse por mí y por todo su apoyo. A **Leonora** por su amistad y los buenos momentos en el laboratorio y fuera de él. A **Marisela** por su apoyo y amistad. En general a todas por hacerme reír mucho con sus ocurrencias y por amenizar todas las comidas.

A **Aldo** por todos los consejos gastronómicos, el transporte y sus conocimientos de inglés que ayudaron a que me fuera bien en mis exposiciones (ojalá también hubieras podido contestar las preguntas, jaja). A **Raquel** por su buen humor y las grandes frases de vida que nos enseñó. A **Alex** por su amistad y sus ideas para ganar dinero en YouTube. A **Diego M.** por llevarnos a comer o de comer.

A todos por creer en mí, por estar cuando más los necesitaba, por su amistad, las risas y los buenos momentos.

Tabla de contenido

	Página
Resumen	ii
Abstract	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Generalidades.....	3
1.1.2 Citoesqueleto	4
1.1.3 Citoesqueleto de actina.....	5
1.1.4 Miosinas.....	8
1.1.4.1 Miosina de clase V	12
1.1.4.2 Movimiento de las miosinas de clase V	13
1.1.4.3 Transporte de cargas dependiente de la miosina de clase V	14
1.1.4.4 Participación en el crecimiento polarizado	18
1.2 Justificación	19
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general.....	20
1.4.2 Objetivos específicos	20
Capítulo 2. Materiales y métodos	21
2.1 Cepas y condiciones de cultivo	21
2.1.1 Cepas.....	21
2.1.2 Condiciones de cultivo	21
2.1.3 Obtención de conidios.....	21
2.1.4 Obtención de micelio.....	22
2.2 Análisis bioinformático	22
2.2.1 Búsqueda de dominios.....	22
2.2.2 Alineamiento de proteínas y dominios	23
2.3 Microscopía	23
2.3.1 Microscopía estereoscópica.....	23
2.3.2 Microscopía confocal	23
2.3.3 Microscopía de FRAP	24
2.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta myo-5$	25
2.4.1 Medición de biomasa.....	25
2.4.2 Morfología de la mutante $\Delta myo-5$	25
2.4.2.1 Morfología colonial	25
2.4.2.2 Morfología microscópica.....	25
2.4.3 Análisis biométricos de la mutante $\Delta myo-5$	26
2.4.3.1 Medición del crecimiento radial	26
2.4.3.2 Medición del diámetro de las hifas	27

Tabla de contenido (continuación)

2.4.3.3	Medición de la producción de conidios.....	27
2.4.3.4	Morfología y medición del área de conidios	27
2.4.3.5	Morfología de los conidióforos.....	27
2.4.3.6	Observación del número de núcleos en conidios	28
2.4.3.7	Número de tubos germinales	28
2.4.3.8	Distribución de acumulaciones de componentes de la pared celular	28
2.4.3.9	Morfología de los septos	29
2.4.3.10	Distribución de mitocondrias en hifas	29
2.4.3.11	Distribución de vacuolas en hifas	29
2.4.3.12	Organización del Spitzenkörper en hifas	30
Capítulo 3. Resultados.....		31
3.1	Localización de MYO-5-GFP en los diferentes estadios del ciclo de celular. .	31
3.2	Dinámica de MYO-5.....	33
3.3	Fenotipo de <i>N. crassa</i> en ausencia de la miosina de clase V	36
3.3.1	Crecimiento vegetativo en la mutante $\Delta myo-5$	36
3.3.1.1	Morfología de la colonia	36
3.3.1.2	Morfología de las hifas	38
3.3.2	Evaluación de la reproducción asexual en la mutante $\Delta myo-5$	41
3.3.2.1	Morfología y producción de conidios	41
3.3.2.2	Numero de núcleos en los conidios.....	44
3.3.3	Germinación en la mutante $\Delta myo-5$	45
3.3.4	Análisis de la distribución de acumulaciones de componentes de la pared celular en los diferentes estadios del ciclo de vida de la cepa mutante $\Delta myo-5$	46
3.3.4.1	Distribución de acumulaciones en conidios de la mutante $\Delta myo-5$	46
3.3.4.2	Distribución de acumulaciones en germínulas de la mutante $\Delta myo-5$	47
3.3.4.3	Distribución de acumulaciones en hifas de la mutante $\Delta myo-5$	49
3.3.5	Morfología de los septos	51
3.3.6	Distribución de mitocondrias y vacuolas en la mutante $\Delta myo-5$	53
3.3.7	Organización del Spitzenkörper en la mutante $\Delta myo-5$	55
Capítulo 4. Discusión.....		57
4.1	Localización y dinámica de MYO-5-GFP	57
4.2	Cinética de crecimiento en ausencia de MYO-5	58
4.3	Reproducción asexual en la mutante $\Delta myo-5$	59
4.4	La pared celular en la mutante $\Delta myo-5$	59
4.5	Septación en ausencia de MYO-5	60
4.6	Transporte de estructuras intracelulares.....	61
4.7	Organización del Spk en la mutante $\Delta myo-5$	61
Capítulo 5. Conclusión.....		62
Lista de referencias.....		63
Apéndice		74

Lista de figuras

Figura	Página	
1	Esquema que representa la forma en que se produce el crecimiento polarizado típico de los hongos filamentosos.....	4
2	Modelo de la actina monomérica o G-actina.....	6
3	Estados de la actina.....	7
4	Polimerización y despolimerización del filamento de actina.....	8
5	Función de algunas proteínas de unión a actina.....	9
6	Ejemplo de la estructura de algunas miosinas.....	10
7	El dominio motor es la característica en común que presentan todas las miosinas.....	11
8	Gráfico que muestra el número de miosinas por clase.....	12
9	Estructura general de las miosinas de clase V.....	14
10	Movimiento de la miosina de clase V en el filamento de actina.....	15
11	Vista general de la cola globular de la miosina de clase V.....	17
12	La miosina de clase V se asocia a receptores específicos para regular el movimiento de cargas intracelulares.....	18
13	Esquema del método de bloque de agar invertido para observación en el microscopio invertido confocal.....	25
14	Técnicas para la medición de la tasa de elongación, el diámetro de las hifas y tamaño de la colonia.....	28
15	Localización en conidios de MYO-5-GFP.....	33
16	Localización de MYO-5-GFP en germínulas.....	34
17	Gráfica que muestra el porcentaje de germínulas que presentan un patrón de localización específico de MYO-5-GFP.....	34
18	Localización de MYO-5-GFP en hifas.....	35
19	MYO-5-GFP viaja a la región apical como acumulaciones.....	36
20	FRAP de la región apical de una hifa de la cepa MYO-5-GFP.....	37
21	FRAP de la región subapical de una hifa de la cepa MYO-5-GFP.....	38
22	Morfología colonial de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$ a las 24 h de crecimiento.....	39
23	Análisis biométricos de las colonias de la cepa silvestre WT y la mutante $\Delta myo-5$	40
24	Morfología microscópica de las colonias de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$	41
25	Diámetro de hifas de la cepa WT y la cepa mutante $\Delta myo-5$	41
26	Tipo de ramificación en las hifas de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$	42
27	Esquema de la secuencia de formación de ramas en la mutante la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$	43
28	Número de ramas producidas por las hifas de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$	44
29	Conidios en la mutante $\Delta myo-5$	45
30	Conidióforos de la cepa WT y $\Delta myo-5$	46
31	Producción de conidios en la mutante $\Delta myo-5$	46
32	Número de núcleos en la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$	47

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
33	Número de tubos germinales por conidio.....	48
34	Localización de componentes de la pared celular en conidios de la cepa WT y $\Delta myo-5$	50
35	Distribución de los componentes de la pared celular en germínulas a las 3 h de germinación.....	51
36	Distribución de los componentes de la pared celular en germínulas a las 5 h de germinación.....	52
37	Localización de acumulaciones de los componentes de la pared celular en hifas de la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$	53
38	Morfología de los septos en la mutante $\Delta myo-5$	55
39	Análisis de septación en la mutante $\Delta myo-5$	56
40	Localización de las mitocondrias en la cepa WT y en la mutante $\Delta myo-5$	57
41	Localización de vacuolas en la cepa WT y en la mutante $\Delta myo-5$	58
42	Organización del Spitzenkörper en la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$	59

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Cepas utilizadas y generadas en este estudio.....	22
2 Número de acceso de las proteínas utilizadas en este estudio.....	24
3 Condiciones para la observación de acumulaciones de componentes de la pared celular en los diferentes estadios de desarrollo de <i>N. crassa</i>	30

Capítulo 1. Introducción

Los hongos filamentosos tienen la característica principal de crecer polarizadamente, lo que les confiere la morfología típica tubular conocida como hifa (Bartnicki-García, Hergert, y Gierz, 1989; Gierz y Bartnicki-García, 2001). Durante varios años los mecanismos por los que se genera el crecimiento polarizado y por ende la forma de la hifa han sido ampliamente estudiados, el modelo del Centro Suministrador de Vesículas (o VSC por sus siglas en inglés Vesicle Supply Center) intenta explicar cómo se produce el crecimiento polarizado (Bartnicki-García et al., 1989), el cual sugiere que la forma de la hifa en crecimiento se da por el movimiento de vesículas exocíticas hacia el VSC, representado por el Spitzenkörper (Spk), y que son enviadas desde aquí hacia la membrana plasmática. El transporte de las vesículas que serán exocitadas es dirigido por el citoesqueleto de actina (F-actina) y el de microtúbulos (Horio y Oakley, 2005; Harris y Tepass, 2010;), a los cuales se asocian proteínas motoras.

Las proteínas motoras que se asocian al citoesqueleto de actina mediante la hidrólisis de ATP se conocen como miosinas (Loubéry y Coudrier, 2008; Reck-Peterson, Provance, Mooseker, y Mercer, 2000; Wu, Bowers, Rao, Wei, y Hammer, 1998). En la actualidad, se han descrito 35 clases de miosinas que tienen una cantidad diferente de miembros por clase (Odrionitz y Kollmar, 2007). De esta gran variedad de clases de miosinas, las miosinas de clase V están involucradas en el transporte de cargas intracelulares como vesículas y/o vacuolas en muchos eucariotas, incluyendo los hongos (Govindan, Bowser, y Novick, 1995; Reck-Peterson et al., 2000; Weber, Gruber, y Steinberg, 2003; Sellers y Weisman, 2008; Zhang et al., 2011; Taheri-Talesh, Xiong, y Oakley, 2012)

Para llevar a cabo su función de transporte, las miosinas poseen una región conocida como cabeza que presenta un dominio motor el cual le sirve para poder unirse a la actina y moverse a través de ella (Sellers y Weisman, 2008). Además, poseen una región llamada cuello que le ayuda también a desplazarse a través de los filamentos de actina (Sellers y Weisman, 2008). Finalmente, tienen una región denominada cola en donde se localiza un dominio globular, que se encuentra involucrado en el transporte de cargas (Sellers y Weisman, 2008).

Diversos estudios en eucariotas, demuestran que las miosinas de clase V están participando en el tráfico de cargas intracelulares hacia los sitios de crecimiento celular (Woo, Lee, y Song, 2003; Lisé et al., 2006). En vertebrados, se localizan en zonas de crecimiento de neuronas y células germinales y están involucradas en la regulación del tráfico vesicular (Evans et al., 1998; Tabb, Molyneaux, Cohen, Kuznetsov, y Langford, 1998; Wagner, Brenowitz, y Hammer, 2011; Wu et al., 1998). En levaduras, también se localizan en sitios de crecimiento, transportando diversos tipos de cargas (Govindan et al., 1995; Karpova et al., 2000; Lillie y Brown, 1994; Motegi, Arai, y Mabuchi, 2001; Reck-Peterson et al., 2000; Sellers y Weisman, 2008).

Sin embargo, en hongos filamentosos pocos estudios se han llevado a cabo acerca del papel que la miosina de clase V está realizando en el crecimiento. En *Aspergillus nidulans*, se localiza en la punta y en los septos de las hifas en crecimiento, y su ausencia produce defectos en la morfología y desarrollo de las hifas (Taheri-Talesh et al., 2012; Zhang et al., 2011). En *Neurospora crassa*, únicamente se conoce que se localiza en zonas de crecimiento como la punta y los septos de las hifas (Echauri-Espinosa, 2014). Debido a lo anterior, resulta fundamental dilucidar el papel de las miosinas de clase V en el transporte de componentes subcelulares y su posible contribución con el crecimiento y morfogénesis en hongos filamentosos como es el caso de *N. crassa*.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades

Los hongos filamentosos son microorganismos constituidos por células que se conocen como hifas cuya característica principal es su forma tubular, ésta forma depende del establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado (Bartnicki-García et al., 1989; Gierz y Bartnicki-García, 2001). El modelo del centro suministrador de vesículas (o VSC por sus siglas en inglés *vesicle supply center*) establecido por Bartnicki-García (1989) propone que el crecimiento polarizado de los hongos está dado por el movimiento de vesículas provenientes del Golgi que se localiza en la zona subapical. Estas viajan hacia un VSC localizado en la punta de la hifa, que corresponde al Spitzenkörper (Spk). Las vesículas transportadas contienen enzimas o precursores necesarios para la formación de la pared celular, como las glucano sintetas encargadas de sintetizar polímeros de glucano, o las quitina sintetas que participan en la formación de fibrillas de quitina (Ruiz-Herrera, Bracker y Bartnicki-García, 1984). Se ha propuesto que el transporte de estas vesículas exocíticas, hacia la punta, es dirigido por el citoesqueleto de actina (F-actina) y el de microtúbulos (Horio y Oakley, 2005; Harris y Tepass, 2010) (Figura 1).

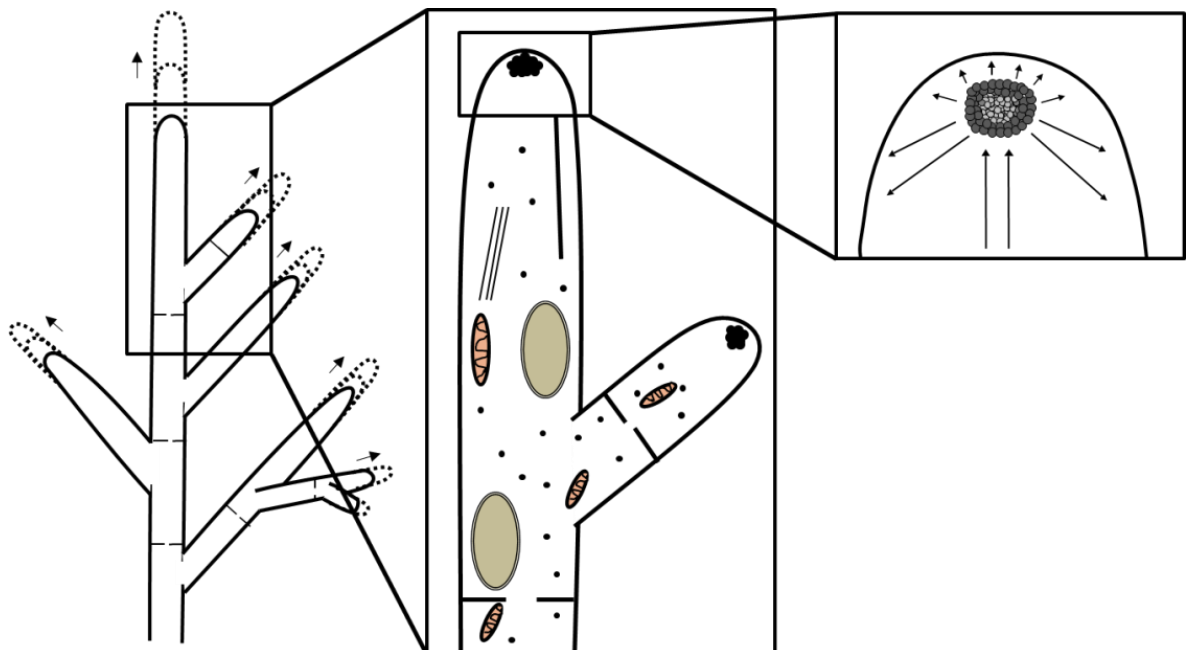


Figura 1. Esquema que representa la forma en que se produce el crecimiento polarizado típico de los hongos filamentosos. Las flechas en la primera hifa (de izquierda a derecha) indica la dirección en que se produce el crecimiento. En el segundo y tercer recuadro se muestra el Spk y la dirección en que las vesículas exocíticas se mueven.

1.1.2 Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura tridimensional dinámica que participa en la organización celular interna, interviene en procesos de transporte y tráfico de organelos y vesículas y juega un papel importante en diversos procesos celulares como la división celular (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, y Walter, 2010). En la mayoría de las células eucariotas, existen tres tipos de citoesqueleto: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los microfilamentos de actina (Alberts et al., 2010), todos son polímeros de subunidades de diferente naturaleza que se encuentran unidas por enlaces no covalentes. .

Los microtúbulos miden alrededor de 25 nm de diámetro y están formados por dímeros de dos proteínas globulares α -tubulina y β -tubulina. Al unirse estas proteínas forman tubos que consisten un cilindro integrado por trece protofilamentos paralelos, y cada uno de éstos consiste en una cadena lineal de dímeros en los que las α -tubulina y β -tubulina se alternan a lo largo de toda su extensión. Los microtúbulos participan en la organización celular, la división celular (mitosis y meiosis) y en el transporte de cargas intracelulares (Alberts et al., 2010).

Los filamentos intermedios, están formados por proteínas fibrosas alargadas que tienen una cabeza globular en el extremo amino (NH_2), una cola globular en el extremo carboxilo (COOH) y un dominio alargado central en forma de bastón. Estas proteínas se unen para formar dímeros y posteriormente tetrámeros escalonados, los cuales a su vez se unen por sus extremos para dar lugar a una estructura helicoidal que contiene ocho cadenas de tetrámeros y que constituyen el filamento intermedio final que mide entre 8 y 12 nm de diámetro. Los microfilamentos intermedios forman la lámina nuclear, confieren resistencia a las células contra estrés mecánico, entre otras funciones (Alberts et al., 2010).

Finalmente, está el citoesqueleto formado por microfilamentos de actina los cuales miden de 6 a 8 nm de diámetro (Alberts et al., 2010).

1.1.3 Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina está integrado por una proteína globular denominada G-actina, ésta se une para formar los filamentos que se denominan F-actina. La G-actina contiene 374 residuos de aminoácidos y su masa molecular es de 42 kDa (Collins y Elzinga, 1975). Estudios cristalográficos indican que la G-actina está constituida por un dominio grande y uno pequeño, estos dominios se encuentran separados por una hendidura en cuyo centro se sitúa el lugar de unión a ATP (Elzinga, Collins, Kuehl, y Adelstein, 1973). Cada dominio a su vez está constituido por dos subdominios. El dominio pequeño se divide en el subdominio I (residuos 1-32, 70-144 y 338-374) y subdominio II (residuos 33-69), mientras que el dominio grande está integrado por los subdominios III (residuos 145-180 y 270-337) y IV (residuos 181-269) Los subdominios I y III están conectados por estructuras tipo α hélices y constituyen el sitio de unión del nucleótido (ATP o ADP) junto con el subdominio IV (Figura 2) (Dos Remedios y Chhabra, 2008).

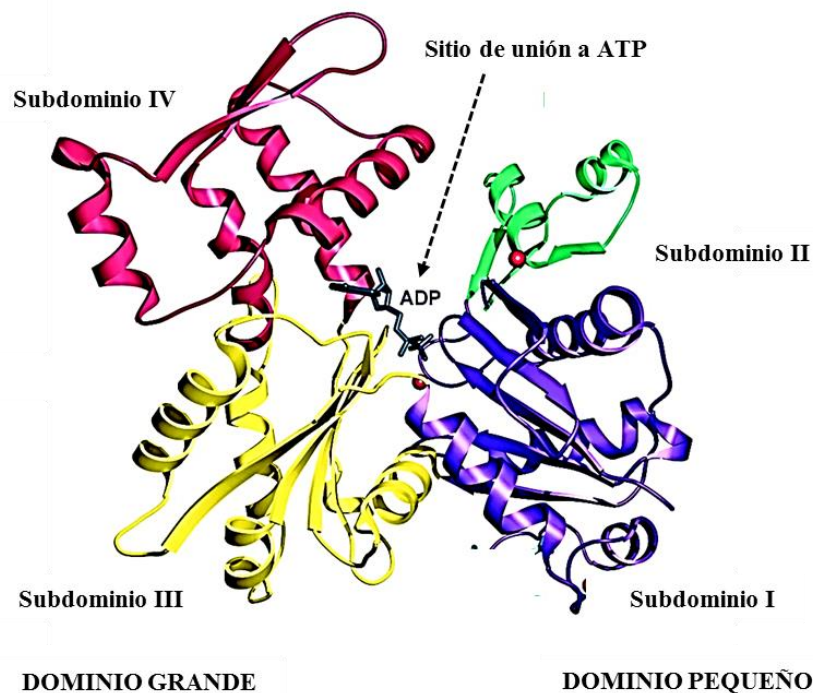


Figura 2. Modelo de la actina monomérica o G-actina. Se muestran los dos dominios (pequeño y grande), los cuatro subdominios (I, II, III y IV) y el sitio de unión a ATP que componen a la proteína. Modificado de Otterbein, Graceffa, y Domínguez (2001).

Los monómeros de actina se orientan respecto al siguiente mediante un giro de 166° y un desplazamiento de 2.75 nm, lo que le confiere a la F-actina el aspecto de una doble hebra, que deja a los subdominios I y II hacia la parte exterior de la molécula.

Cada molécula de actina contiene un complejo del ion Mg^{2+} con ATP o ADP. De este modo, existen cuatro estados de la actina: ATP–G-actina, ADP–G-actina, ATP–F-actina y ADP–F-actina (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaria, Baltimore y Darnell, 2000) (Figura 3). Los estados ATP–G-actina y ADP–F-actina son predominantes en las células. El sitio de unión a ATP actúa como una bisagra, de modo que cuando el ATP o ADP se une a la G-actina, altera la conformación de la proteína, lo que permite que los dominios se flexionen uno con respecto al otro (Lodish et al., 2000).

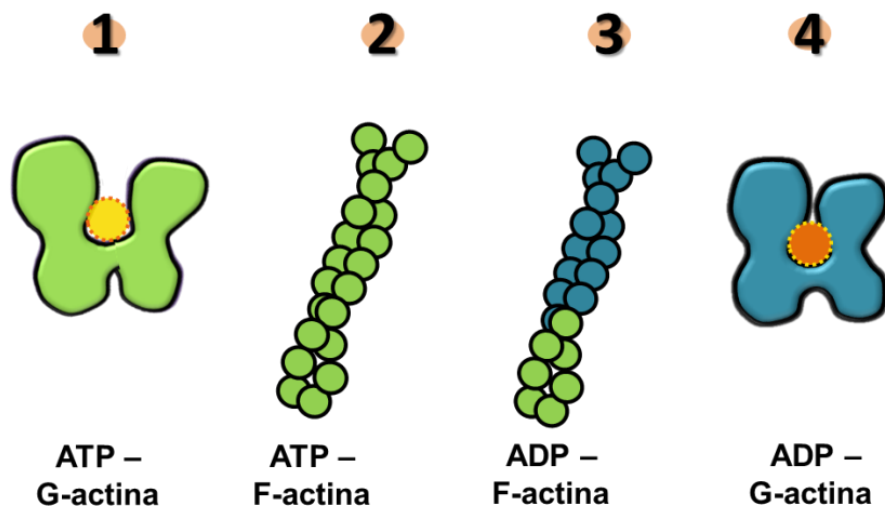


Figura 3. Estados de la actina. (1) ATP–G-actina, es la actina en forma monómerica asociada a ATP (punto amarillo). (2) ATP–F-actina, es ATP–G-actina unida a otros ATP–G-actina para formar filamentos de actina. (3) ADP–F-actina, cuando el ATP de la actina monómerica en los ATP – F-actina es hidrolizada. (4) ADP–G-actina, es la actina monómerica asociada a ADP (punto naranja).

Los filamentos de actina presentan dos extremos: el extremo positivo, en donde predominantemente se da la polimerización de ATP-G-actina; y el extremo negativo donde predomina la despolimerización. La constante de asociación de la actina es diferente en los dos extremos, sin embargo, es mayor para el monómero de actina unido a ATP. Una vez que se polimeriza la actina, se hidroliza el ATP liberando P_i y resultando en actina asociada a ADP (Pollard, Earnshaw y Lippincott-Schwartz, 2007) (Figura 4).

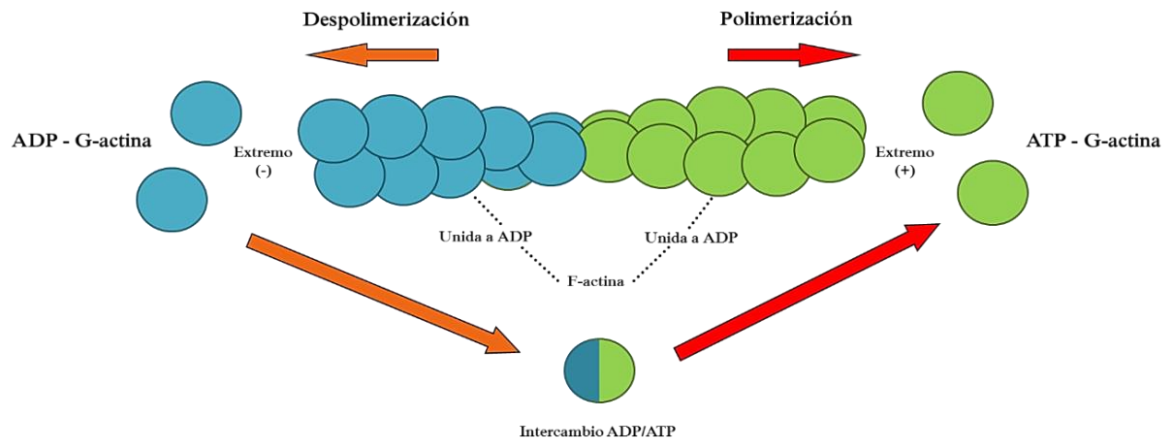


Figura 4. Polimerización y despolimerización del filamento de actina. Los monómeros de actina se unen al extremo positivo en su estado ATP-G-actina, por lo que el filamento va creciendo en ese extremo. Por otra parte, en el extremo negativo, cuando el ATP de la G-actina unida al filamento es hidrolizado, libera un P_i y entonces pasa a un estado ADP-G-actina y se separa del filamento. Fuera del filamento, la ADP-G-actina intercambia su ADP por un ATP y entonces puede volver a unirse a otro filamento de actina. Modificado de Pollard et al., (2007).

La actina participa en una gran cantidad de eventos tales como la citocinesis, el tráfico vesicular, la motilidad celular, la endocitosis y la fagocitosis, por lo que resulta esencial para la viabilidad de las células (Alberts et al., 2010). Para poder llevar a cabo estas funciones, se asocia a proteínas estructurales y reguladoras, que en conjunto se conocen como *proteínas de unión a actina* (ABPs por sus siglas en inglés Actin-Binding Protein). Las ABPs desempeñan una variedad de funciones que afectan la polimerización y organización, así como la despolimerización de la F-actina y la disposición tridimensional de los mismos (Alberts et al., 2010) (Figura 5).

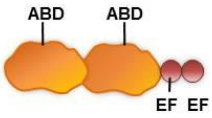
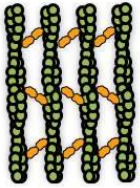
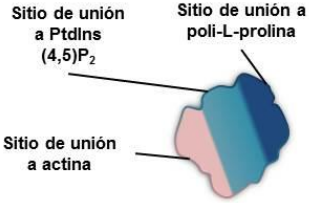
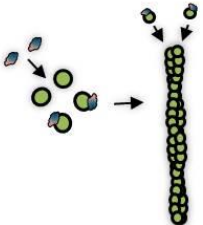
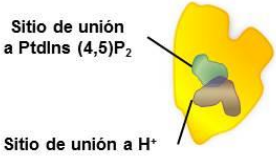
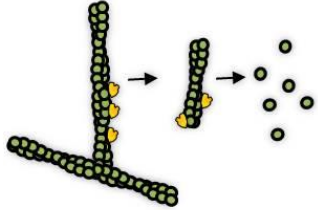

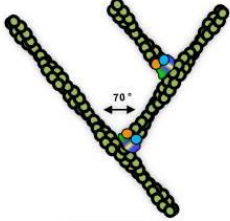
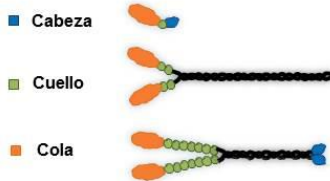
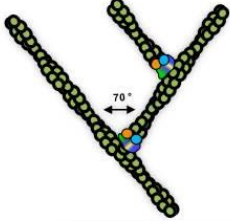
Proteína	Estructura	Función
Fimbrina		<p>Permite la formación de haces de F-actina mediante el establecimiento de puentes cruzados entre los filamentos (Goldsmith, Pokala, Matsudaira, y Almo, 1997)</p> 
Profilina		<p>Se unen a la G-actina libre y favorecen su unión a los filamentos preexistentes (Staiger, Goodbody, Hussey, Valenta, Drebak y Lloyd, 1993)</p> 
Cofilina		<p>Participa en la remodelación de la F-actina, despolimerizándolo en el extremo (-) (Nishida y Sakai, 1987)</p> 
Complejo Arp2/3		<p>Se unen a la F-actina y propician la nucleación de nueva F-actina (Padrick, Doolittle, Brautigam, King, y Rosen, 2011)</p> 
Miosina		<p>Participan en el transporte de cargas intracelulares, la citocinesis y el crecimiento (Wu et al., 1998; Reck-Peterson et al., 2000; Loubéry y Coudrier, 2008).</p> 

Figura 5. Función de algunas proteínas de unión a actina.

1.1.4 Miosinas

Las miosinas son proteínas motoras de unión a actina que participan en el transporte de cargas intracelulares, la citocinesis y el crecimiento. Las miosinas se unen a la F-actina mediante la hidrólisis de ATP y se desplazan de manera continua a lo largo del filamento (Wu et al., 1998; Reck-Peterson et al., 2000; Loubéry y Coudrier, 2008).

Las miosinas constan de tres regiones principales: cabeza, cuello y cola (Figura 6). La región conocida como “cabeza” se localiza en el amino terminal, y corresponde al dominio motor, el cual sirve para unirse a la F-actina y moverse a través de ella. El dominio motor está altamente conservado entre las distintas clases de miosinas, consiste en 7 hebras de hojas β rodeadas por numerosas α hélices. Posee un sitio de unión a ATP que se abre y cierra cuando se une el ATP y otro sitio de unión a actina seguida por una región “convertidora” (Figura 7). La región convertidora gira 60° en respuesta a la unión de ATP y une al dominio motor al “cuello” (Rayment et al., 1993; 1993; Domínguez, Freyzon, Trybus, y Cohen, 1998; Houdusse, Kalabokis, Himmel, Szent-Györgyi, y Cohen, 1999; Coluccio, 2008)

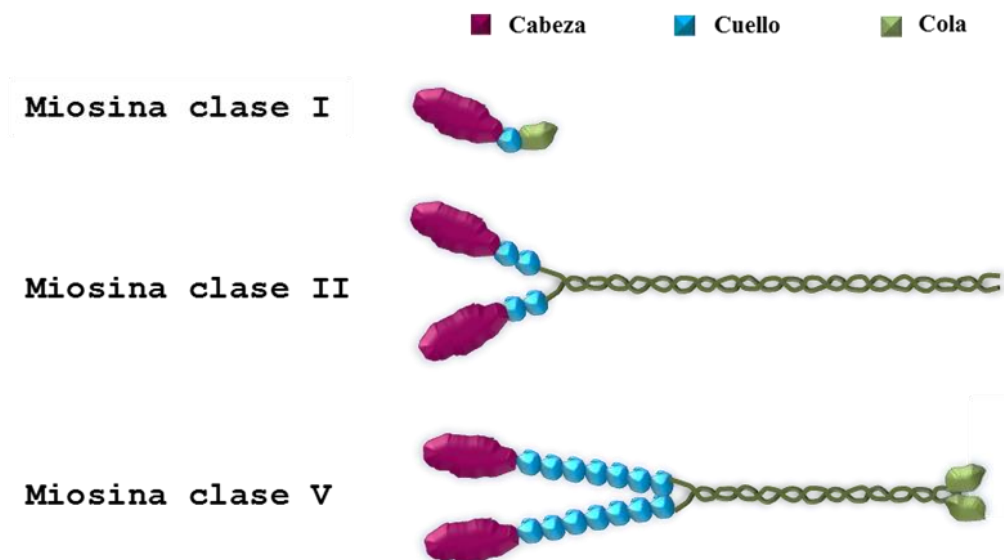


Figura 6. Ejemplo de la estructura de algunas miosinas. Las miosinas en general constan de tres regiones: cabeza, cuello y cola. Modificado de Papadopulos, Tomatis, Kasula, y Meunier, 2013)

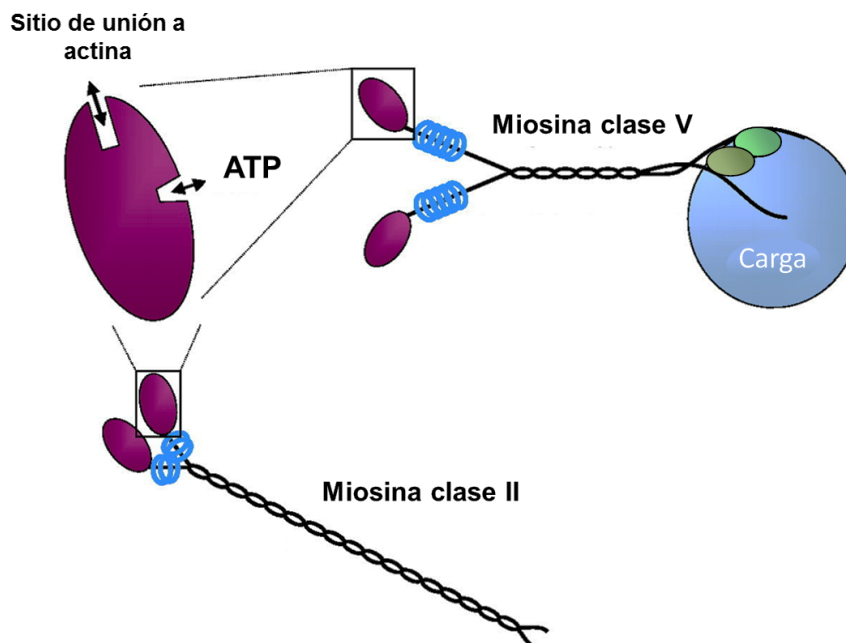


Figura 7. El dominio motor es la característica en común que presentan todas las miosinas. Posee un sitio de unión a actina y ATP. En la imagen se muestran dos clases de miosinas comunes en la mayoría de los vertebrados, las cuales, al igual que el resto de las miosinas, se distinguen por sus colas. Adaptado de Hutagalung, Landsverk, Price y Epstein (2002)

La región del “cuello” está compuesta de una larga hélice de longitud variable dependiendo del número de secuencias consenso ([I, L, V]QxxxRGxxx[R, K]) conocidas como dominios IQ (de cero a seis), a estos dominios se asocian proteínas de cadena ligera que presentan regiones EF hand (Coluccio, 2008).

Finalmente, la región de la “cola” le confiere diferentes funciones a la proteína dependiendo del tipo de miosina. Esta región es muy variable en cuanto a la longitud de la secuencia, composición y organización. Las miosinas que tienen la región de la cola como un dominio α hélice enrollada, se cree que son diméricas, mientras que las que no tienen la región enrollada son monoméricas con un solo dominio motor (Coluccio, 2008).

En la actualidad, se han descrito 35 clases de miosinas (Figura 8), con un número diferente de miembros por cada clase (Odrionitz y Kollmar, 2007). De esta gran variedad de clases de miosinas, únicamente se han purificado las miosinas pertenecientes a la clase I, II y V, y muchos de los hallazgos de estructura, función y regulación son derivados de estas clases y extrapolados a otras miosinas cuya estructura molecular aún se desconoce (Cameron, Machado, y Meza, 2003). Las

miosinas de clase I tienen una sola cadena pesada, no forman filamentos, y poseen la capacidad de interactuar con fosfolípidos ácidos, lo que le permite unirse directamente a la membrana en donde llevan a cabo funciones como la endocitosis (Geli y Riezman, 1996; Steinberg, 2007). Las miosinas de clase II están ampliamente caracterizadas en una gran variedad de organismos, cumplen un papel importante en la contracción muscular en células animales y participan en la citocinesis y la septación en levaduras y hongos filamentosos (Calvert et al., 2011; Song et al., 2013; Delgado-Álvarez, Bartnicki-García, Seiler, y Mouriño-Pérez, 2014). Finalmente, las miosinas de clase V están involucradas en el transporte intracelular de diferentes cargas como vesículas secretoras o vacuolas (Mulvihill, Pollard, Win, y Hyams, 2001; Woo et al., 2003).

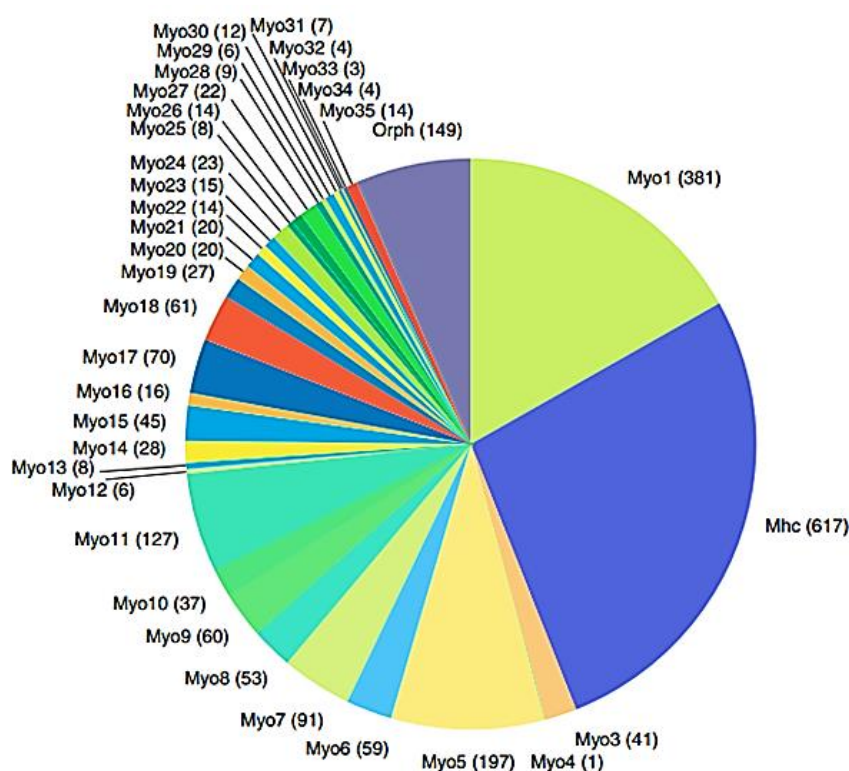


Figura 8. Número de miosinas por clase. Actualmente, se han identificado 35 clases de miosinas con un número variable de miembros por clase. Modificado de Odronitz y Kollmar (2007).

No todos los organismos presentan las mismas clases de miosinas, ni el mismo número de miembros. Con más de 28 genes, las células de mamíferos presentan el mayor número de genes que codifican para miosinas, y se han identificado miembros de las clases I, II, III, V, VI, VII, IX, X y XV (Coluccio, 2000). En el genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans*, se han encontrado dos miembros de la clase I,

seis de la clase II, dos de la clase VI y uno de la clase V, VII, IX y XII (Baker y Titus, 1997). Las miosinas pertenecientes a las clases VIII, XI y XIII son exclusivas de plantas (Reichelt y Kendrick-Jones, 2000). Sin embargo, se han encontrado pocas clases de miosinas en los hongos. En el genoma de la levadura *S. cerevisiae* se han identificaron 5 genes que codifican a miosinas (dos de clase I, una de clase II y dos de clase V), mientras que en los hongos filamentosos *A. nidulans* y *N. crassa*, están presentes las mismas clases pero solo poseen un miembro de cada una (Brown, 1997; Xiang y Plamann, 2003)

1.1.4.1 Miosina de clase V

En la mayoría de los eucariontes, el movimiento a larga distancia de cargas intracelulares, como vesículas y otras estructuras no vesiculares, se lleva a cabo sobre los microtúbulos y está estrechamente coordinada con el movimiento a corta distancia realizado sobre la actina en la periferia celular. Éste transporte de cargas sobre la actina se realiza mediante las miosinas de clase V (Sellers y Weisman, 2008).

Inicialmente, la miosina de clase V fue purificada del cerebro de gallinas y determinada como una proteína no convencional con sitios de unión a calmodulina, que presentaba propiedades bioquímicas similares a las miosinas (Larson, Espindola y Espreafico, 1990; Espindola et al., 1992; Espreafico et al., 1992). Esta miosina es una proteína multimérica, con un peso molecular aproximado de 210 kDa y al igual que todas las miosinas posee la estructura básica: cabeza, cuello y cola (Sellers y Weisman, 2008). La cabeza presenta el dominio motor en el amino terminal (Sellers y Weisman, 2008). El cuello es una región que contiene seis motivos IQ (Sellers y Weisman, 2008). La región de la cola consiste en largos tramos de hélices enrolladas que se encuentran periódicamente interrumpidas por regiones que no forman hélices enrolladas (Sellers y Weisman, 2008). La miosina de clase V se dimeriza mediante el dominio de las hélices enrolladas para formar una molécula con dos cabezas. La cola finaliza con un dominio globular, que se encuentra involucrado en el transporte de distintas cargas intracelulares (Sellers y Weisman, 2008) (Figura 9).

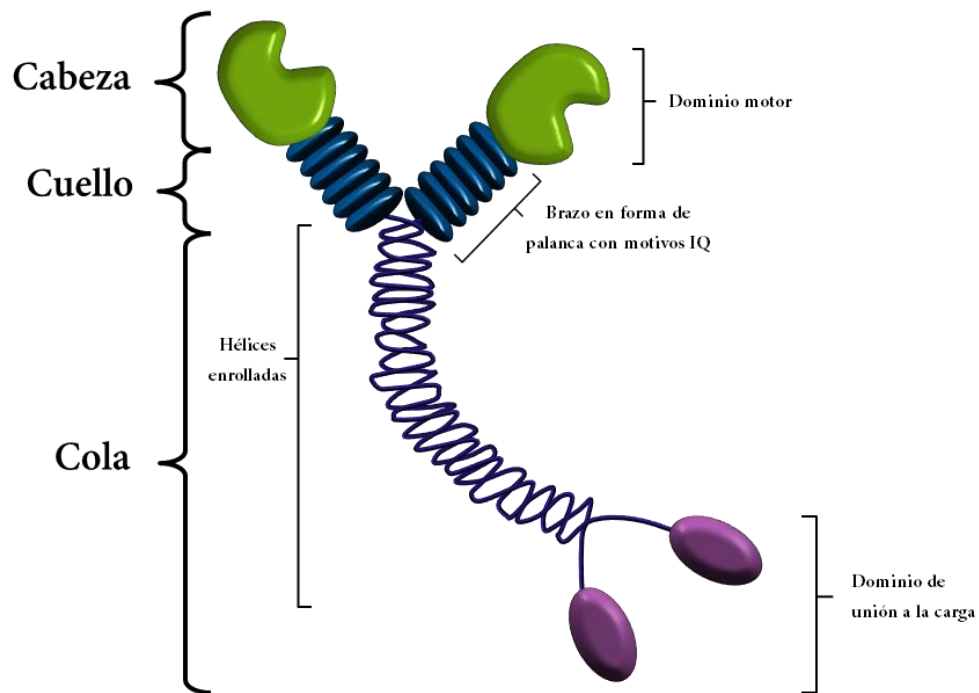


Figura 9. Estructura general de las miosinas de clase V. En la cabeza se encuentra el dominio motor con sitios de unión a actina y ATP. En general, el cuello o brazo en forma de palanca está compuesto de 6 motivos IQ. En el amino terminal se encuentra la cola compuesta por hélices enrolladas y un dominio de unión a la carga. Modificado de Tóth, Kovács, Wang, Nyitray, y Sellers (2005).

1.1.4.2 Movimiento de las miosinas de clase V

La idea de que el cuello en las miosinas actúa como un “brazo en forma de palanca”, que se mueve alrededor de un punto de giro en el dominio motor, fue originalmente sugerida debido a las estructuras cristalizadas de las miosinas de clase II. Estas estructuras muestran diferentes posiciones en la región del cuello en distintos estados de unión a nucleótidos (Holmes y Geeves, 2000). Un modelo que intenta describir cómo es el movimiento de la miosina a través de los filamentos es el modelo “mano a mano” o “hand-over-hand”. (Yildiz et al., 2003; Dunn y Spudich, 2007) (Figura 10).

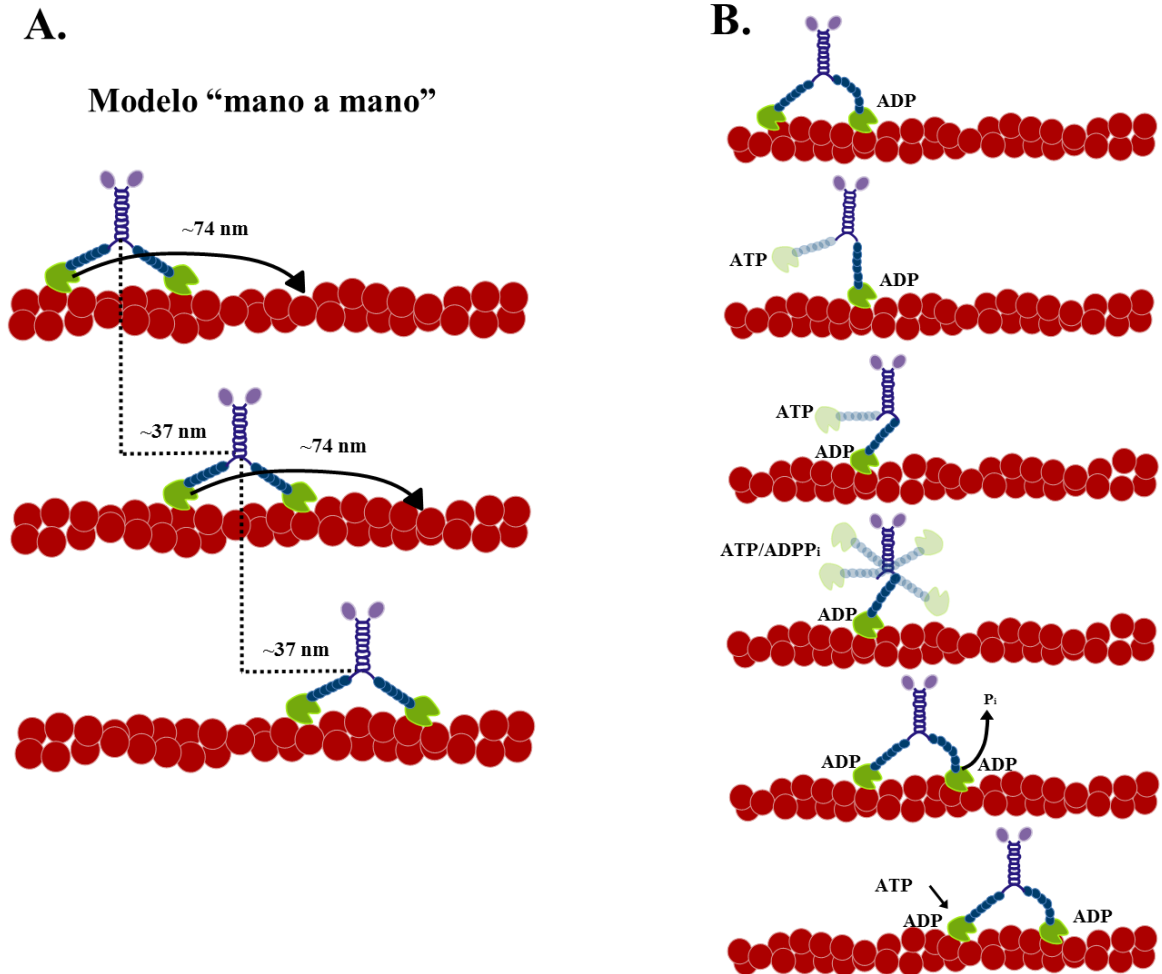


Figura 10. Movimiento de la miosina de clase V en el filamento de actina. A. En el modelo “mano a mano” se piensa que la cabeza trasera se desplaza 74 nm hacia adelante mientras la otra permanece sin moverse en el filamento, además el cuello se mueve 37 nm. B. Cuando la cabeza se separa del filamento de actina, debido a la sustitución de ADP a ATP, gira libremente alrededor del cuello hasta que se une al filamento de actina y pierde el P_i del ATP. Modificado de Yildiz et al. (2003) y Dunn y Spudich, (2007).

1.1.4.3 Transporte de cargas dependiente de la miosina de clase V

El tipo de cargas transportadas por la miosina de clase V es muy amplio. En mamíferos mueve múltiples cargas incluyendo melanosomas (Provance et al., 1996; Nascimento et al., 1997; Wei et al., 1997; Wu et al., 1997, 1998; Rogers et al., 1999), retículo endoplásmico liso (Dekker-Ohno et al., 1996), centrosomas (Espreafico et al., 1998), vesículas membranosas en las células nerviosas (Evans et al., 1998), vesículas de transporte retrogrado en neuronas motoras (Lalli et al., 2003) y vesículas secretoras del núcleo denso en células pancreáticas (Ivarsson et al., 2005; Varadi et al., 2005). Asimismo, la miosina Va de mamíferos, mueve múltiples cargas membranosas y un complejo de ribonucleoproteína mensajera en espinas dendríticas (Yoshimura et al., 2006). En la levadura *S. cerevisiae* la miosina de clase

V, Myo2p, está involucrada en el transporte de algunas vesículas secretoras (Lillie y Brown, 1994; Govindan et al., 1995), las vacuolas (Hill et al., 1996; Catlett y Weisman, 1998), el Golgi tardío (Rossanese et al., 2001), los peroxisomas (Hoepfner et al., 2001; Fagarasanu et al., 2006) y las mitocondrias (Itoh et al., 2002; Boldogh et al., 2004) La Myo4p es otra miosina de clase V de la levadura *S. cerevisiae* que mueve determinados ARNm (Takizawa y Vale, 2000; Böhl et al., 2000; Long et al., 2000) además de del retículo endoplásmico cortical (Estrada et al., 2003; Schmid, Jaedicke, Du, y Jansen, 2006).

En la cola globular de la miosina, localizada en el C-terminal, se encuentra un dominio conocido como *dilute* (Mercer, Seperack, Strobel, Copeland y Jenkins, 1991; Takagishi, Oda, Hayasaka, Dekker-ohno, y Shikata, 1996). Diversos estudios demuestran que la cola globular es la única región de la miosina requerida para la unión a cargas. En mamíferos, la miosina Va etiquetada con la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés *Green fluorescent protein*) se encuentra colocalizando con centrosomas y melanosomas, incluso en ausencia del dominio motor (Espreafico et al., 1998; X Wu et al., 1998). Además, en *S. cerevisiae*, las cepas con mutaciones puntuales en la cola globular muestran defectos en el transporte de vesículas secretoras y vacuolas (Catlett y Weisman, 1998; Schott, Ho, Pruyne, y Bretscher, 1999; Catlett, Duex, Tang, y Weisman, 2000; Pashkova, et al., 2005; Pashkova, Catlett, Novak, y Weisman, 2005; Pashkova, Jin, Ramaswamy, y Weisman, 2006)

La cola globular se compone de dos haces de α hélices (Pashkova et al., 2006) (Figura 11A). Los haces comparten una hélice, la hélice 6, que se extiende a lo largo de toda la molécula. La primera mitad de la hélice 6 es parte de un haz, mientras que la segunda mitad es parte del otro paquete adyacente. También tiene un bucle largo que surge de la hélice 13, la cual se extiende hacia el extremo N-terminal a lo largo de ambos haces. El C-terminal de la cola globular interactúa con el extremo N-terminal. De este modo, los dos haces tienen dos puntos de contacto, el primero a través de una hélice compartida y el segundo por medio del bucle largo, que son esenciales para su función (Pashkova et al., 2006) (Figura 11B)

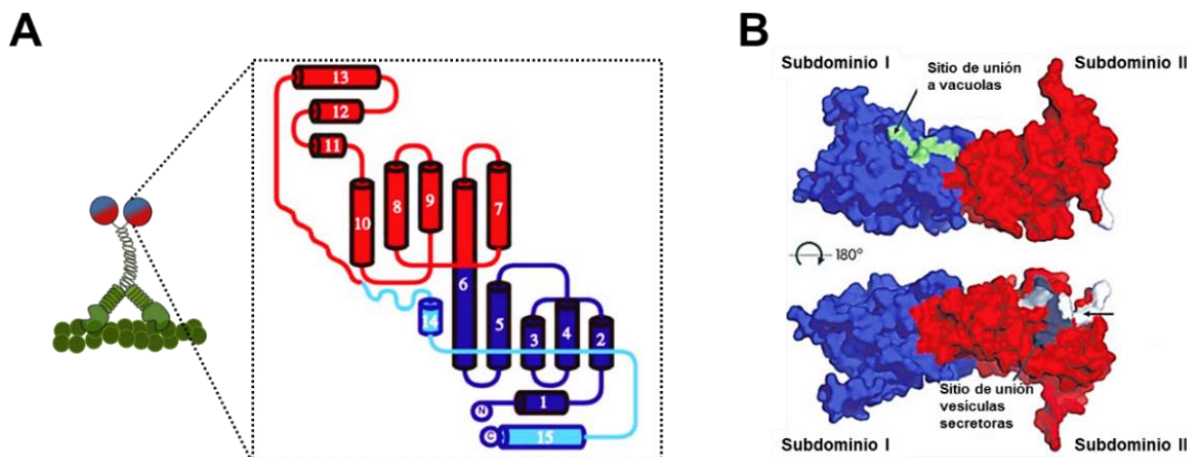


Figura 11. Vista general de la cola globular de la miosina de clase V. A) diagrama topológico. La cola globular está formada por dos haces de hélices α (cilindros rojo y azul marino) que comparten la mitad de la hélice α número 6. También presenta un largo bucle que inicia en la hélice 13 y se extiende hasta el extremo N-terminal (cilindros 14 y 15) a lo largo de ambos haces. Subdominio I color azul y subdominio II color rojo. Modificado de Pashkova et al. (2006). **B) Esquema superficial.** El subdominio I tiene un sitio de unión a vacuolas, mientras que en el subdominio II se localiza el sitio de unión a vesículas secretoras. Modificado de Fagarasanu et al. (2010).

Análisis genéticos e imágenes obtenidas en alta resolución de la estructura de la cola globular demostraron que esta proteína posee dos subdominios: subdominio I y subdominio II (Figura 11B). En *S. cerevisiae* mutaciones puntuales en el subdominio I de Myo2p, mostraron defectos en el transporte de vacuolas y lisosomas sin afectar el movimiento de vesículas secretoras (Catlett et al., 2000; Catlett y Weisman, 1998; Pashkova, Catlett, Novak, y Weisman, 2005; Pashkova et al., 2006; Pashkova, Catlett, Novak, Wu, et al., 2005b). Adicionalmente, mutaciones puntuales en el otro subdominio afectaron el movimiento de vesículas secretoras pero no de vacuolas (Schott et al., 1999), lo que sugiere que hay especificidad de cada subdominio por la carga. Aunque, se ha demostrado que todas las funciones de Myo2p requieren de una estrecha asociación de ambos subdominios, es decir, la unión de la carga a un subdominio inhibe la unión del cargo al segundo subdominio y viceversa (Pashkova et al., 2006).

La regulación espacial y temporal de movimientos de una carga individual a través de las miosinas de clase V se lleva a cabo por la unión a receptores específicos (Coluccio, 2008). La identificación de receptores específicos ha sido muy difícil. Con ayuda de estudios genéticos en animales, se ha logrado identificar los receptores específicos para melanosomas. El complejo está compuesto por la miosina Va, la

Slac2-a o melanofilina y la Rab GTPasa, Rab27a (Fukuda, Kuroda, y Mikoshiba, 2002; Hume et al., 2002; Nagashima et al., 2002; Provance, James y Mercer, 2002; Wu, Wang, Rao, Sellers, y Hammer, 2002; Coluccio, 2008). La región media de la melanofilina se une directamente a la miosina Va (Nagashima et al., 2002; Wu et al., 2002; Strom, Hume, Tarafder, Barkagianni, y Seabra, 2002; Kuroda, Ariga, y Fukuda, 2003; Wu, Sakamoto, Zhang, Sellers, y Hammer, 2006), y el amino terminal de la melanofilina, el dominio de unión a RAB (RBD27 por su siglas en inglés *Rab-binding domain*) se une directamente a Rab27a (Figura 12A). Por otro lado, en la levadura *S. cerevisiae*, se han identificado tres proteínas que son requeridas para el movimiento de vacuolas: Myo2p, la miosina de clase V, Vac17p, una proteína que se une directamente al subdominio I en la cola globular de Myo2p y Vac8p que se une directamente a Vac17p y el complejo Myo2p-Vac17p-Vac8p se une a la membrana de la vacuola (Tang, Kauffman, Novak, Nau, Catlett y Weisman, 2003; Ishikawa et al., 2003). Además, estudios con mutaciones en donde eliminan el gen *VAC17* (Tang et al., 2003; Ishikawa et al., 2003) o *VAC8* (Pan y Goldfarb, 1998; Wang, Catlett, y Weisman, 1998) tienen como consecuencia la pérdida del movimiento vacuolar, lo que confirma que la formación del complejo Myo2p-Vac17p-Vac8p es importante en el movimiento de vacuolas en este organismo (Figura 12B).

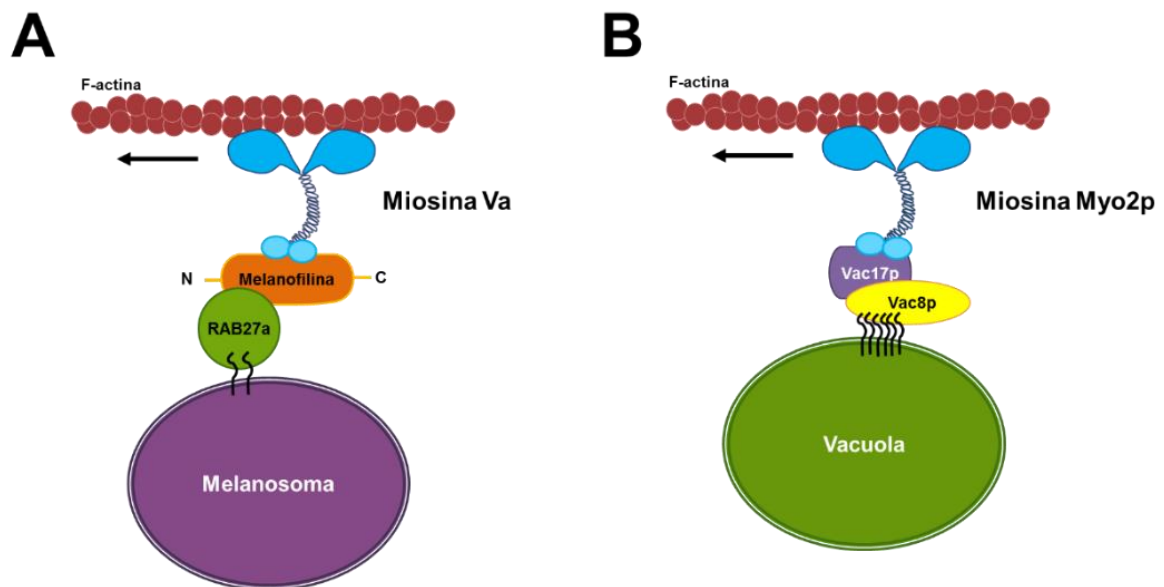


Figura 12. La miosina de clase V se asocia a receptores específicos para regular el movimiento de cargas intracelulares. **A)** En animales, la proteína melanofilina se une en la región media a la miosina Va y en el N terminal a la Rab GTPasa, RAB27a. **B)** En *S. cerevisiae*, la proteína Vac17p se une directamente a la región específica para vacuolas en la cola de Myo2p. Vac17p se une a Vac8p que a su vez se une a la membrana de las vacuolas. Adaptado de Ishikawa et al. (2003).

Myo2p se une a los peroxisomas a través de su interacción con la proteína Inp2p, localizada en la membrana del peroxisoma (Fagarasanu et al., 2006). A los microtúbulos se une a través de su interacción con Kar9p (una proteína que se une a los núcleos), que a su vez interactúa con Bim1/EB1, un complejo de unión a microtúbulos (Beach, Thibodeaux, Maddox, Yeh, y Bloom, 2000; Yin, Pruyne, Huffaker y Bretscher, 2000; Liakopoulos, Kusch, Grava, Vogel, y Barral, 2003). Myo2p también se une a Mmr1p (por sus siglas en inglés *mitochondrial Myo2p receptor-related 1*) y Ypt11p (GTPasa tipo Rab) para poder distribuir correctamente las mitocondrias (Itoh et al., 2002; Boldogh et al., 2004; Itoh, Toh-e, y Matsui, 2004). Del mismo modo, la proteína motora Myo4p, se une directamente al N-terminal de She3p, y el C-terminal de She3p se asocia con el ARNm *ASH1* (que comúnmente se acumula en la célula hija y evita el cambio de tipo de apareamiento), mientras la proteína She2p, otra proteína de unión a RNA, facilita una interacción específica entre She3p y la secuencia del ARNm *AHS1* conocida como *zipcodes* (Jansen, Dowzer, Michaelis, Galova, y Nasmyth, 1996; Böhl et al., 2000; Long et al., 2000; Dunn, Sakamoto, Hong, Sellers, y Takizawa, 2007; Hodges, Krementsova, y Trybus, 2008)

1.1.4.4 Participación de la miosina de clase V en el crecimiento polarizado

Diversos estudios en eucariotas, demuestran que las miosinas de clase V participan en el tráfico de diversas cargas intracelulares hacia sitios de crecimiento (Woo et al., 2003; Lisé et al., 2006). Los vertebrados generalmente poseen tres miembros de las miosinas pertenecientes a la clase V, (MyoVa, MyoVb y MyoVc), las cuales se localizan en zonas de crecimiento en neuronas y células germinales y están involucradas en la regulación del tráfico vesicular (Evans et al., 1998; Tabb et al., 1998; Wu et al., 1998). En hongos, las miosinas de clase V también se localizan en los sitios donde está produciéndose el crecimiento. En la levadura *S. cerevisiae* existen dos miembros, Myo2p y Myo4p, cuya función hipotética es promover el transporte de diversas cargas (por ejemplo, vesículas, organelos, complejos proteicos, mRNA) a sitios de polarización celular (Lillie y Brown, 1994; Govindan et al., 1995; Reck-Peterson et al., 2000; Karpova et al., 2000; Sellers y Weisman, 2008). Estudios en el hongo dimórfico *Ustilago maydis*, utilizando cepas mutantes en las cuales se eliminaba por completo el gen *myo5*, mostraron que se requiere para

todos los estados morfológicos presentes durante su ciclo de vida (Weber et al., 2003). Del mismo modo, la ausencia de gen *myoE* en *A. nidulans*, resulta en defectos en el crecimiento polarizado y la incorrecta distribución de los componentes de la pared celular (Zhang et al., 2011; Taheri-Talesh et al., 2012). En el hongo *N. crassa*, el gen *myo-5* colocaliza con el Spk, mientras que en la zona subapical colocaliza con el septo (Echauri-Espinosa, 2014).

1.2 Justificación

Durante el crecimiento polarizado de los hongos filamentosos se presenta el movimiento de diversos componentes celulares. El movimiento es dirigido por proteínas motoras a través del citoesqueleto, que en el caso del citoesqueleto de actina se conocen como miosinas. Existen tres clases de miosinas en hongos filamentosos, que realizan diferentes funciones propias de cada clase. De acuerdo a reportes en otros organismos eucariontes, el movimiento de cargas intracelulares se lleva a cabo por la miosina de clase V. En hongos filamentosos como *N. crassa*, se sabe que la miosina de clase V está localizada en los sitios de crecimiento de hifas, como son el ápice y el septo, pero se desconoce la dinámica de esta proteína. Además, se desconoce cuáles son los componentes celulares que está transportando y la importancia de esta proteína en el crecimiento celular del hongo.

Dilucidar el papel e importancia de la miosina de clase V en el transporte de componentes subcelulares y su posible contribución con el crecimiento y morfogénesis en hongos filamentosos como es el caso de *N. crassa*, resulta crucial para el avance del conocimiento de los procesos de crecimiento de los hongos filamentosos.

1.3 Hipótesis

La miosina de clase V de *N. crassa* MYO-5 está asociada al movimiento de vesículas secretoras que apoyan el crecimiento y la morfogénesis de las hifas y además ayudan en el transporte de organelos como las vacuolas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Caracterizar la miosina clase V del hongo filamentoso *N. crassa*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente a la mutante por delección de la miosina clase V de *N. crassa*.
- Describir la dinámica y localización de la miosina clase V etiquetada con GFP.
- Identificar el efecto de la mutación de MYO-5 en la dinámica y localización de vacuolas y vesículas secretoras.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

2.1.1 Cepas

Las cepas de *N. crassa* utilizadas se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas y generadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Neurospora crassa</i>		
Tipo silvestre (WT)	<i>mat a</i>	FGSC* #4200
Δ <i>myo-5</i>	<i>mat A Δmyo-5::hph⁺</i>	FGSC #11442
MYO-5-GFP	<i>mat A Pmyo-5::myo-5::sgfp::hph⁺</i>	Sánchez-León, no publicado

FGSC, Fungal Genetics Stock Center

gfp: proteína verde fluorescente por sus siglas en inglés *Green fluorescent protein*

2.1.2 Condiciones de cultivo

Las cepas se mantuvieron en Medio Mínimo de Vogel's (VMM- por sus siglas en inglés Vogel's Minimal Medium) con agar y sacarosa al 1.5% a una temperatura de 30°C. Las cepas con genotipo *hph⁺* fueron cultivadas en VMM con higromicina B (0.15 mg ml⁻¹) a 30°C.

2.1.3 Obtención de conidios

Se inoculó micelio de las diferentes cepas de *N. crassa* en matraces Erlenmeyer con 150 ml de VMM y se incubaron a 30°C hasta obtener los conidios. Los conidios fueron colectados añadiendo 50 ml de sorbitol 1 M para lavar las paredes y se agitó vigorosamente. Se recuperó la suspensión en tubos de 50 ml por filtración con un embudo con tela estéril, y se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm. Se hicieron dos lavados más con 15 ml de sorbitol 1 M y se centrifugó en las mismas condiciones,

eliminando el sobrenadante después de cada centrifugada. Los conidios se resuspendieron en 500 µl de sorbitol 1 M y se almacenaron a -20°C.

2.1.4 Obtención de micelio

En un matraz con 150 ml de VMM líquido se inocularon 5.41×10^9 conidios y se incubaron a 30°C por 72 h en agitación constante a 150 rpm. El micelio se cosecho por filtración utilizando una bomba de vacío y un embudo Büchner que contenía un papel filtro y se hizo un lavado con agua destilada estéril. El micelio se transfirió a tubos de 50 ml. El micelio se secó liofilizándolo a 44°C y 0.133 mBar por 48 h en un liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5.

2.2 Análisis bioinformático

2.2.1 Búsqueda de dominios

Para la búsqueda de los dominios de la única miosina de clase V de *N. crassa* se analizó la secuencia proteica de este gen la cual se obtuvo de la base de datos del genoma de *N. crassa* (www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html). Para la búsqueda de dominios se utilizó el portal de análisis bioinformático InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) del EBI (European Bioinformatics Institute). Adicionalmente se buscaron las secuencias proteicas para la miosina de clase V de los hongos *A. nidulans myoE*, y para el miembro de esta misma clase de miosina de *S. cerevisiae*, *Myo2* (las bases de datos utilizadas fueron http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html y http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/saccharomyces_cerevisiae, respectivamente). Se elaboró un esquema de los dominios encontrados con el programa para la visualización de estructuras de dominios de proteína DOG 2.0 (Ren et al., 2009). En la tabla 2 se presentan los números de acceso para cada proteína.

Tabla 2. Número de acceso de las proteínas utilizadas en este estudio

Organismo	Proteína	Nombre asignado por el Broad Institute	Numero de acceso
<i>Neurospora crassa</i>	MYO-5	myosin-2	NCU01440.7
<i>Aspergillus nidulans</i>	MyoE	class V myosin	ANID_08862
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Myo2p	class V myosin	SCRG_01705.1

2.2.2 Alineamiento de proteínas y dominios

Para el alineamiento de las proteínas y los dominios de las miosinas de clase V, se usó el editor de alineación de secuencias BioEdit © (Hall, 1999). El porcentaje de identidad entre las proteínas y los dominios de los diferentes organismos se analizó con el programa *bl2seq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

2.3 Microscopia

2.3.1 Microscopía estereoscópica

Se tomaron imágenes de las colonias en un microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®) con un aumento de 90X utilizando un lente DF PLAPO 1X PF (Olympus®) y una cámara Olympus DP70.

2.3.2 Microscopía confocal

Mediante microscopia confocal se observaron todas las cepas que contenían GFP en los diferentes estadios de desarrollo (conidios, germínulas e hifas). Las células fueron observadas utilizando los microscopios confocales de barrido laser Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan) y LSM510 META Carl Zeiss invertido (Göttingem, Alemania), Se usó el método del bloque de agar invertido para la manipulación y visualización de las células (Figura 13) (Hickey et al., 2005). Se tomaron imágenes y videos utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación a 488 nm; emisión a 510 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC- por sus siglas en inglés Differential Interference

Contrast). Se usó el objetivo de 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.42 A.N.). Estos microscopios también se utilizaron para la observación de la morfología de los diferentes estadios de desarrollo de la mutante $\Delta myo-5$, así como diferentes estructuras celulares.

Para la observación de estructuras marcadas con diferentes fluoróforos, se utilizó exclusivamente el microscopio confocal Olympus usando los objetivos UPlanFLN de 60X, 1.42 A.N. y UPlanFLN de 40X, 1.30 A.N. de inmersión en aceite (), con dos canales simultáneamente.. Con el fluoróforo DAPI se utilizó el filtro de excitación a 405 nm y de emisión a 461 nm. Para la observación del fluoróforo Solophenyl flavine se utilizó el filtro FITC (excitación 488 nm; excitación 519 nm). Para la observación de los fluoróforos SYTO® 64 Red y FM® 4-64 se utilizó el filtro Texas Red (excitación 543 nm; excitación 612 nm). Para la observación del fluoróforo Oregon Green 488 se utilizó el filtro Oregon Green BAPTA-1(excitación 488 nm; excitación 526 nm).

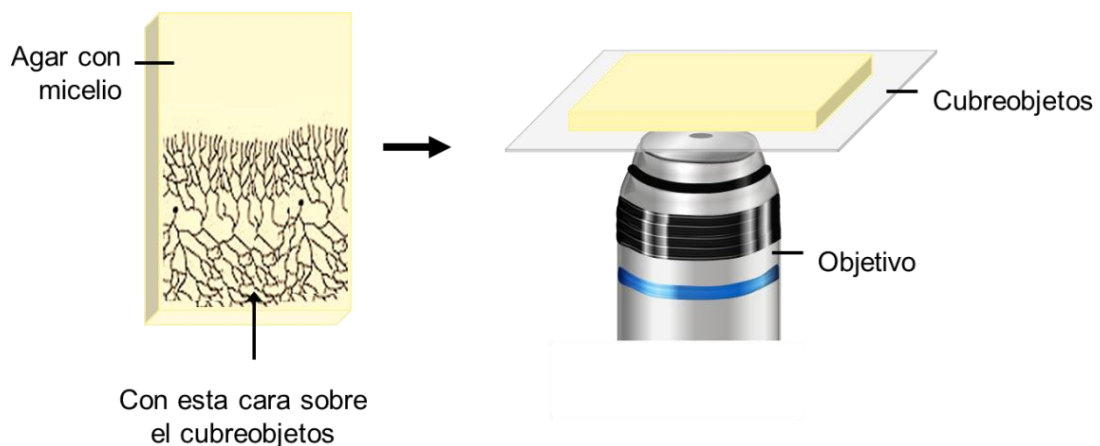


Figura 13. Esquema del método de bloque de agar invertido para observación en el microscopio invertido confocal. El método consiste en cortar un bloque de agar con la muestra y colocarlo sobre un cubreobjetos de modo que la muestra quede en contacto sobre éste. Modificado de Hickey et al. (2005)

2.3.3 Microscopia de FRAP

Se utilizó la técnica de microscopia confocal de Recuperación de la fluorescencia después del Fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés Fluorescence Recovery After Photobleaching) para visualizar como se recuperaba la fluorescencia

en diferentes regiones de las hifas marcadas con MYO-5-GFP. Se eligió un área rectangular de la hifa que correspondía a la región apical y se expuso a una longitud de excitación de 488 nm con un láser de argón/2 a una intensidad de 6 % durante 6 s. Lo mismo se hizo para diferentes zonas de la región subapical. Antes y después de realizar el FRAP se tomaron videos de aproximadamente 4 min.

2.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta myo-5$

Para esta parte de los experimentos se utilizaron la cepa WT como control y la mutante de miosina de clase V de *N. crassa*, $\Delta myo-5$.

2.4.1 Medición de biomasa

El micelio liofilizado (ver apartado 2.1.4) se pesó en una balanza analítica para determinar el peso seco en gramos que producen ambas cepas en 72 h.

2.4.2 Morfología de la mutante $\Delta myo-5$

2.4.2.1 Morfología colonial

La morfología de las colonias fue observada inoculando 5.41×10^9 conidios en el centro de placas con VMM. Las muestras se incubaron a 30°C durante 24 h. Se tomaron imágenes con microscopia de bajo aumento en un microscopio estereoscopio (ver apartado 2.3.1). Adicionalmente, se tomaron imágenes de las colonias completas con una cámara digital Nikon D3100 con un lente AF-S NIKKOR 18-55mm/1:3.5-5.6G.

2.4.2.2 Morfología microscópica

Para la visualización microscópica de las hifas, se inocularon conidios en el centro de placas de VMM con agar al 3% y se incubaron a 30°C por 15 h. Se hicieron observaciones en el microscopio confocal Carl Zeiss y Olympus (ver apartado 2.3.2).

2.4.3 Análisis biométricos de la mutante $\Delta myo-5$

2.4.3.1 Medición del crecimiento radial

Para medir el crecimiento se inocularon 5.41×10^9 conidios en una zona del borde de placas de 150x15 mm. Las placas se incubaron a 30°C y se hicieron mediciones cada 4 h hasta que una de las cepas llenara la placa. Se marcaron 10 transectos verticales y se midió el crecimiento en cada tiempo para cada transecto (Figura 14A).

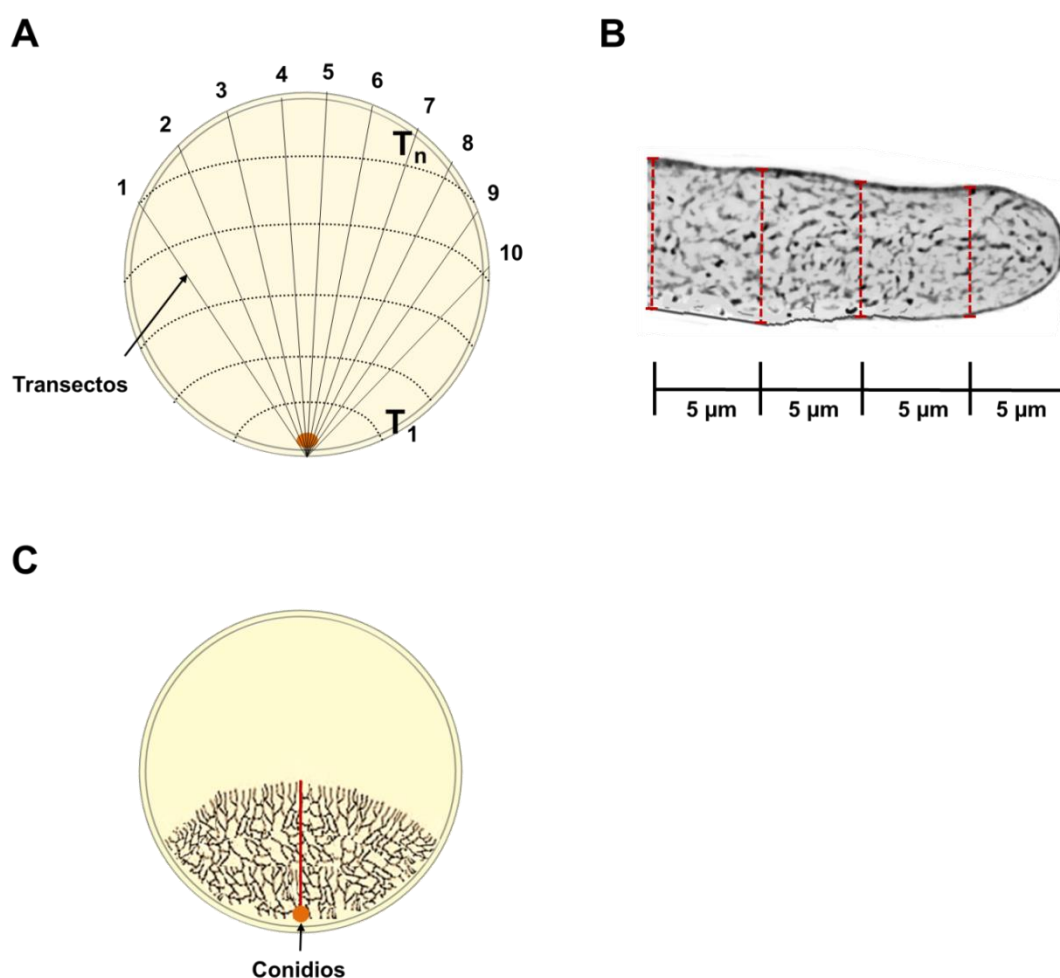


Figura 14. Técnicas para la medición de la tasa de elongación, el diámetro de las hifas y tamaño de la colonia. A) Para la tasa de elongación se marcó el borde de la colonia cada 4 h (línea punteada) y, una vez que se llenó la placa, se trazaron 10 transectos en sentido vertical (línea no punteada numerada) y se midió el crecimiento. B) El diámetro de las hifas se calculó haciendo cuatro mediciones (línea roja punteada) cada 5 µm. C) El área de la colonia se calculó midiendo en radio de la colonia (línea roja) después de 24 h de crecimiento.

2.4.3.2 Medición del diámetro de las hifas

Para analizar el diámetro se inocularon conidios en placas con VMM al 3% y se incubaron a 30°C por 15 h. Utilizando un microscopio confocal de barrido laser LSM510 META Carl Zeiss invertido (Göttingem, Alemania) se obtuvieron imágenes de las hifas, utilizando el objetivo de 100X Ph3 Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.3 A.N.). El programa utilizado para el análisis de las imágenes fue Piximètre versión 5.7 (<http://ach.log.free.fr/Piximetre>). Para conocer el diámetro se midieron de forma vertical 30 hifas cada 5 µm a partir de la punta (hasta una distancia de 20 µm) (Figura 14B) y presenta el promedio de las mediciones.

2.4.3.3 Medición de la producción de conidios

En tubos de cultivo con VMM se sembraron 5.41×10^9 conidios y se incubaron a 30°C por 5 días. Los conidios se cosecharon agregando 5 ml de sorbitol 1M y agitando fuertemente para desprender bien los conidios. Se filtraron usando un embudo con tela Magitel®. La concentración de conidios producida fue determinada mediante conteos en una cámara de Neubauer.

2.4.3.4 Morfología y medición del área de conidios

La morfología de los conidios fue observada con el microscopio confocal Carl Zeiss con el objetivo de 100X. A partir de las imágenes obtenidas se midió el área con el software ImageJ v.1.47 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997-2012).

2.4.3.5 Morfología de los conidióforos

Para observar conidióforos se inocularon conidios en placas con agar-agua al 3%. Se incubaron a 30°C durante 24 h. Las placas se expusieron a la luz durante 6 h para inducir la producción de conidióforos (Springer y Yanofsky, 1989). Para la visualización y obtención de imágenes de los conidios se utilizó el microscopio confocal Olympus con el objetivo de 60X (ver apartado 2.3.2)

2.4.3.6 Observación del número de núcleos en conidios

Los núcleos fueron observados haciendo un frotis con conidios y fijándolo con calor. Se añadió el fluoróforo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ($1\mu\text{g ml}^{-1}$). Se colocó un cuadro de VMM agar sobre el frotis. Los núcleos se visualizaron en el microscopio confocal Olympus con el objetivo de 60X.

2.4.3.7 Número de tubos germinales

El número de tubos germinales fue analizado inoculando 5.41×10^9 conidios en placas con VMM, las cuales fueron incubadas por 3 h a 30°C . Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Carl Zeiss invertido (Göttingem, Alemania) con el objetivo de 63X (ver apartado 2.3.2). Se contaron los tubos germinales producidos por conidio.

2.4.3.8 Distribución de acumulaciones de componentes de la pared celular

Se llevaron a cabo observaciones de la acumulación de los componentes de la pared celular en diferentes estadios de desarrollo de *N. crassa*, utilizando el fluoróforo vital Solophenyl flavine al 0.1% (Hoch, Galvani, Szarowski, y Turner, 2005), el cual se usa para visualizar la pared celular. La tabla 3 muestra las condiciones particulares para la observación de la acumulación de componentes de la pared celular en los distintos estadios de crecimiento. Todas las observaciones se hicieron con el microscopio confocal Olympus con el objetivo de 60X. Se generaron imágenes en 3D de las células en sus diferentes estadios con el programa FLUOVIEW versión 4.0a View (Olympus ©).

Tabla 3. Condiciones para la observación de acumulaciones de componentes de la pared celular en los diferentes estadios de desarrollo de *N. crassa*

Estadio de desarrollo	Medio de cultivo	Condiciones de siembra	Temperatura de incubación	Período de incubación
Conidio	VMM al 3%	Espatulado de conidios	Sin incubación previa	Sin incubación previa
Conidióforo	Agar-agua al 3%	Ver apartado 2.4.3.5	Ver apartado 2.4.3.5	Ver apartado 2.4.3.5
Germínula	VMM al 3%	Espatulado de conidios	30 °C	3 h y 5 h
Hifa	VMM al 3%	Inoculación de conidios en el centro de la placa	30 °C	15 h

2.4.3.9 Morfología de los septos

Para observar los septos se inocularon conidios en el centro de una placa con VMM al 3% y se incubaron a 30°C por 18 h. Utilizando el fluoróforo Solophenyl flavine al 0.1%, se hicieron imágenes en el microscopio confocal Olympus con el objetivo de 60X y 40X. Se generaron imágenes en 3D del septo con el programa FLUOVIEW versión 4.0a View (Olympus ©). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Piximètre versión 5.7 (<http://ach.log.free.fr/Piximetre>). Se midió la distancia del ápice hasta el primer septo, la distancia entre los septos y la frecuencia de septos en 300 µm desde la punta.

2.4.3.10 Distribución de mitocondrias en hifas

Para observar la distribución de las mitocondrias en las hifas se utilizó fluoróforo vital SYTO® 64 Red (20 µM) el cual es usado para visualizar mitocondrias. Se inocularon conidios en el borde de placas con VMM al 3% y se incubaron a 30°C por un periodo de 24 h. Se hicieron imágenes en el microscopio confocal con el objetivo 60X.

2.4.3.11 Distribución de vacuolas en hifas

La observación de vacuolas se hizo utilizando el fluoróforo vital Oregon Green 488, carboxylic acid diacetate (10 µm), el cual es un fluoróforo fluorado análogo de la

fluoresceína que tiñe el lumen de las vacuolas (Cole, Hyde, y Ashford, 1997) En placas con VMM al 3% se inocularon conidios y se incubaron por 24 h a 30°C. Se tomaron imágenes y videos en el microscopio confocal Olympus con el objetivo 60X. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Piximètre versión 5.7 (<http://ach.log.free.fr/Piximetre>).

2.4.3.12 Organización del Spitzenkörper en hifas

Para observar el Spk en las hifas se empleó el fluoróforo vital FM® 4-64 (*N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide) (5 µM), el cual se usa para teñir todos los elementos que presenten membrana celular incluyendo al Spk (Fischer-Parton et al., 2000). En placas con VMM al 3% se inocularon conidios y se incubaron por 24 h a 30°C. Se tomaron imágenes y videos en el microscopio confocal Olympus con el objetivo 60X.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Localización de MYO-5-GFP en los diferentes estadios del ciclo de celular.

Para conocer la distribución de la miosina de clase V en los diferentes estadios del ciclo celular se hicieron observaciones de esta proteína etiquetada con GFP. En conidios, se observó que MYO-5-GFP forma cúmulos en el citoplasma que al parecer se mueven aleatoriamente. La MYO-5-GFP colocaliza con estructuras teñidas con FM4-64, que deben corresponder a algún organelo membranoso (Figura 15).

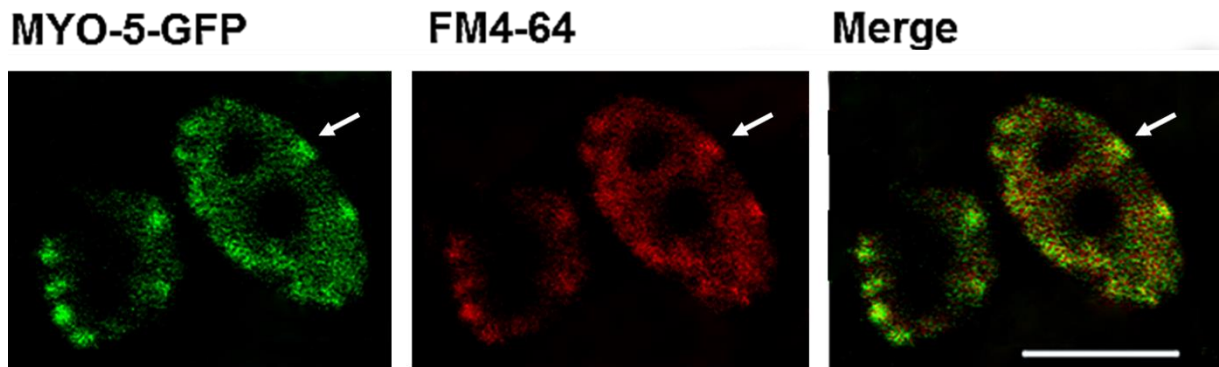


Figura 15. Localización en conidios de MYO-5-GFP. MYO-5-GFP se localiza en cúmulos en el citoplasma (flechas) que colocalizan con estructuras teñidas con FM4-64, el cual se une a membranas. Barra de escala = 5 μ m

En germínulas, la MYO-5-GFP presentaba tres patrones diferentes de distribución que dependían del tamaño del tubo germinal (Figura 16 y 17). Dentro de los primeros 20 μ m, MYO-5-GFP se localiza en el citoplasma (100%), de la misma manera como se observa en conidios. En los siguientes 20 μ m- 30 μ m, se localiza en el citoplasma y en el ápice del tubo germinal (60%). Finalmente, a partir de los 30 μ m, MYO-5-GFP se localiza únicamente en el ápice (60%).

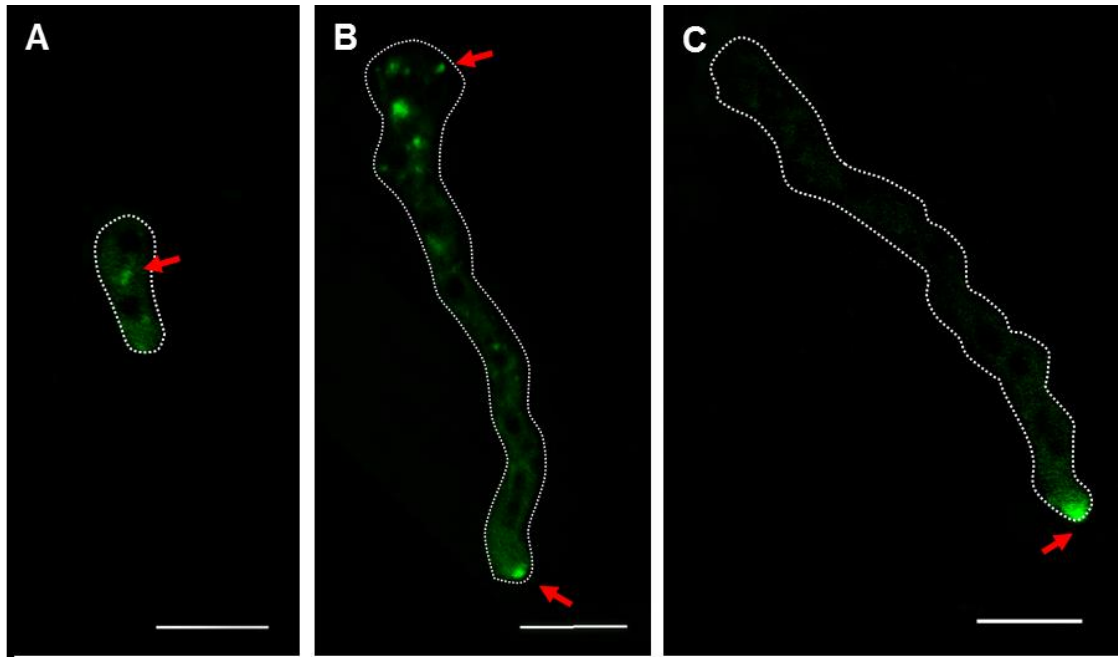


Figura 16. Localización de MYO-5-GFP en germinulas. En los primeros 20 μm MYO-5-GFP se localiza en el citoplasma (A), de 20 μm a 30 μm se localiza en el citoplasma y en el ápice (B). A partir de los 30 μm se encuentra solo en el ápice. Las flechas rojas indican la localización de MYO-5-GFP. Barra de escala = 10 μm

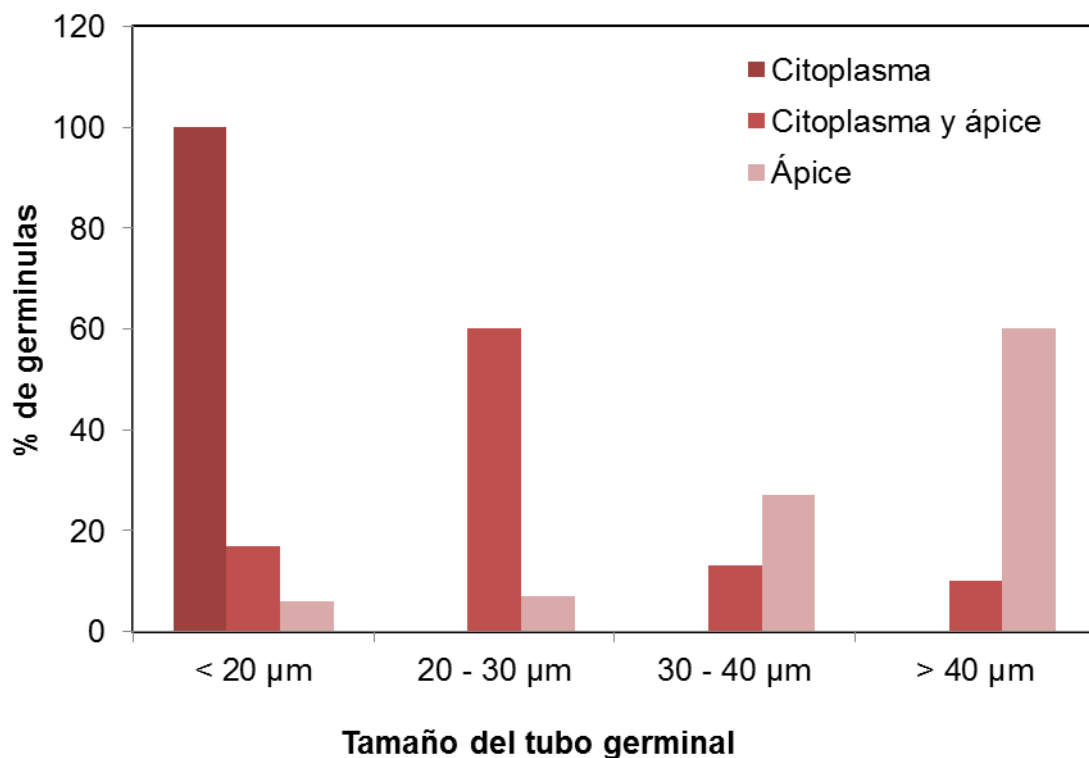


Figura 17. Grafica que muestra el porcentaje de germinulas que presentan un patrón de localización específico de MYO-5-GFP.

En hifas con 24 h de crecimiento se observó que la señal de la MYO-5-GFP está localizada el ápice formando un domo (Figura 18) que abarca aproximadamente 3-4

μm . Además del ápice, MYO-5-GFP se observó formando parte del septo, aunque la intensidad de la fluorescencia fue menor que la observada en la punta.

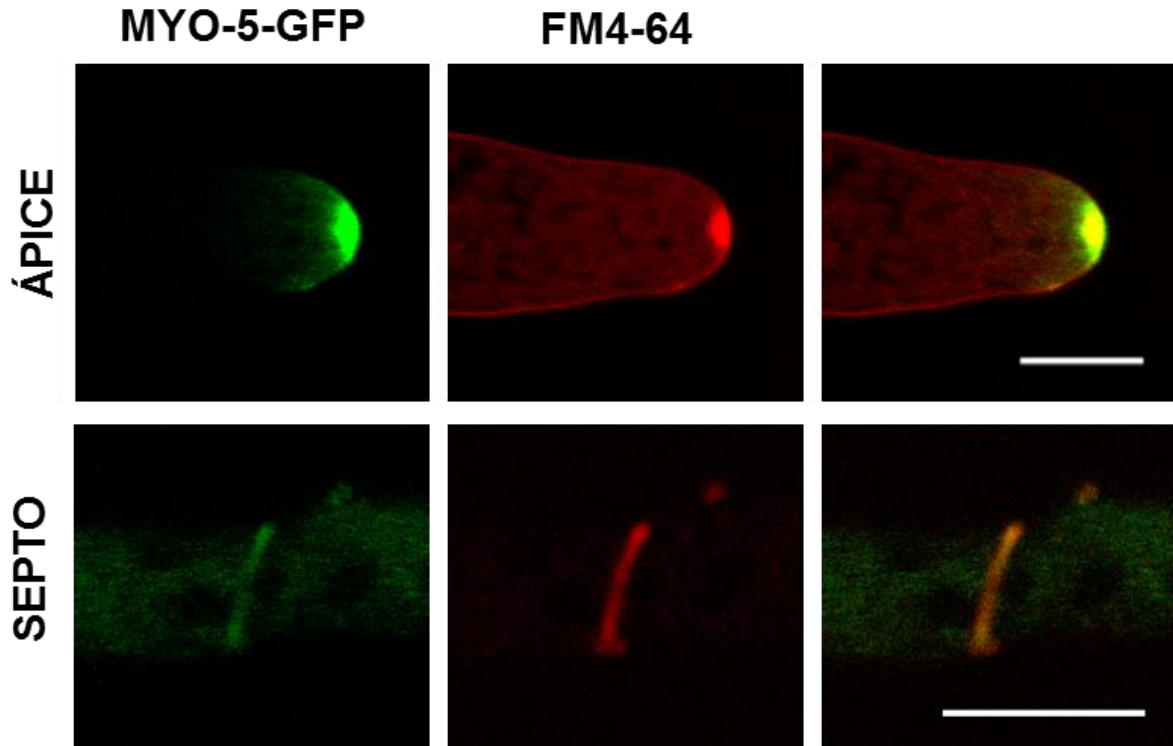


Figura 18. Localización de MYO-5-GFP en las hifas. En el ápice, MYO-5-GFP forma un abanico (primera fila) que colocaliza con el Spk. También forma parte del septo aunque la intensidad es menor(segunda fila). La columna izquierda muestra la localización de MYO-5-GFP. En la columna central se observa la tinción con FM4-64. La columna derecha muestra la colocalización de ambas columnas. Barra de escala = 10 μm .

3.2 Dinámica de MYO-5

Para conocer el movimiento y dinámica de MYO-5-GFP, se hicieron observaciones con microscopía confocal de la punta donde se encuentra localizada la señal de fluorescencia. Las observaciones sugieren que MYO-5-GFP viajaba a lo largo del borde de la membrana desde la región subapical en acumulaciones hacia la región apical (Figura 19).

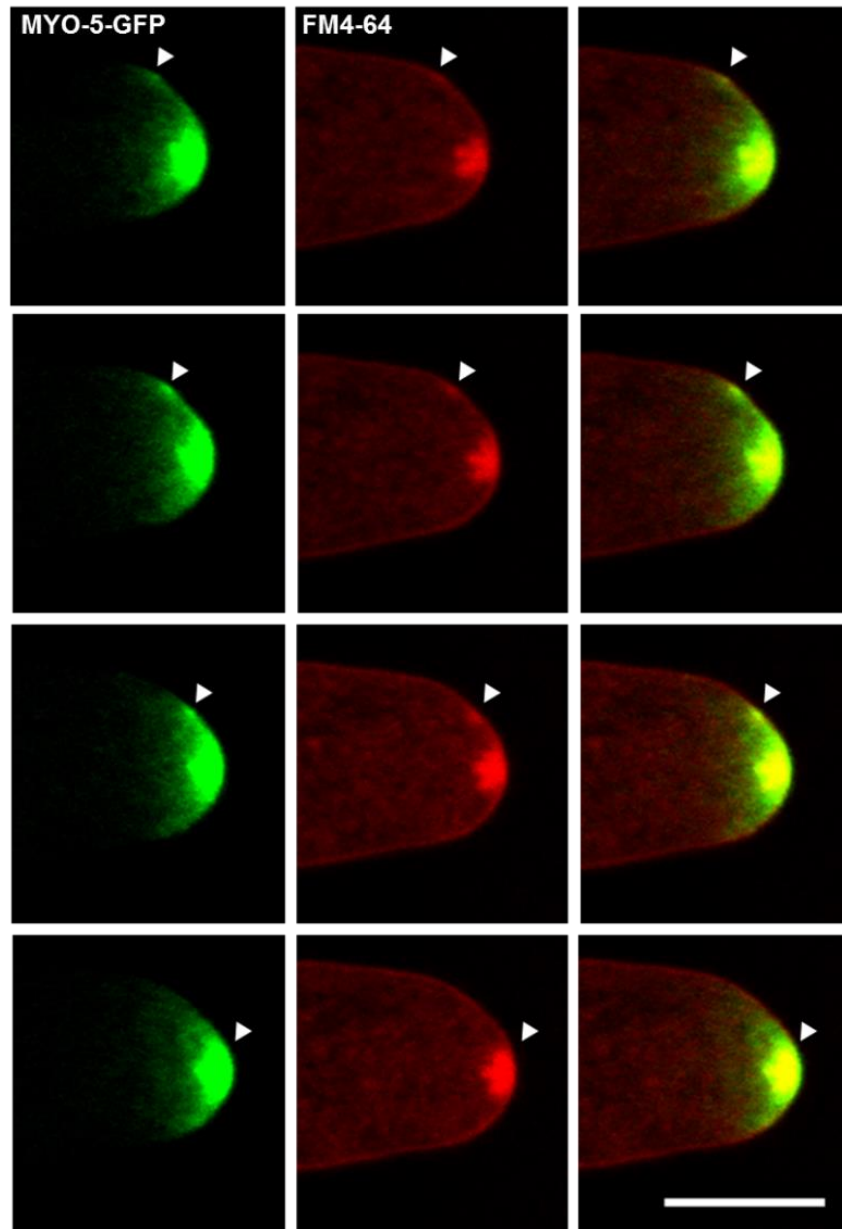
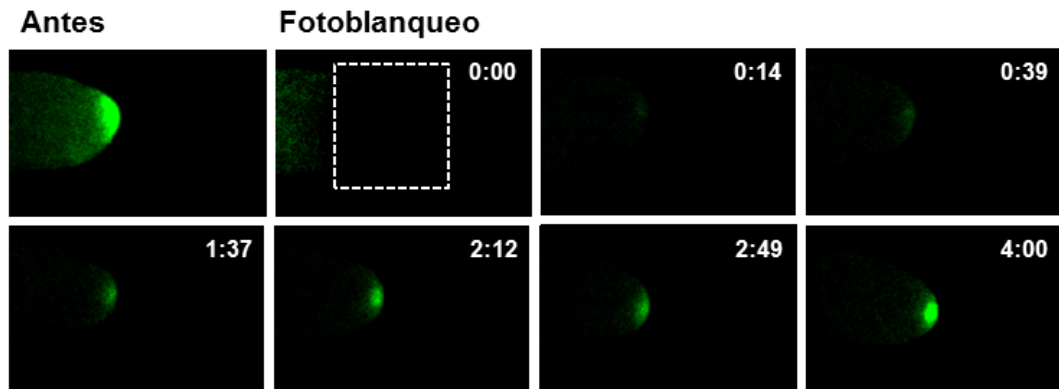


Figura 19. MYO-5-GFP viaja a la región apical como acumulaciones. Las flechas muestran el movimiento de una acumulación de MYO-5-GFP hacia la punta. Barra de escala = 10 μm

Para conocer si MYO-5-GFP viajaba de la región subapical hacia la punta, se hizo un análisis de FRAP en la región apical y en la región subapical. Después del fotoblanqueo, se observó que en la región apical el tiempo aproximado en el que la fluorescencia se recuperó fue de 25 s. El tiempo en que la fluorescencia se observó en una concentración similar a la detectada anterior a realizar el fotoblanqueo fue de aproximadamente 4 min (Figura 20).

A



B

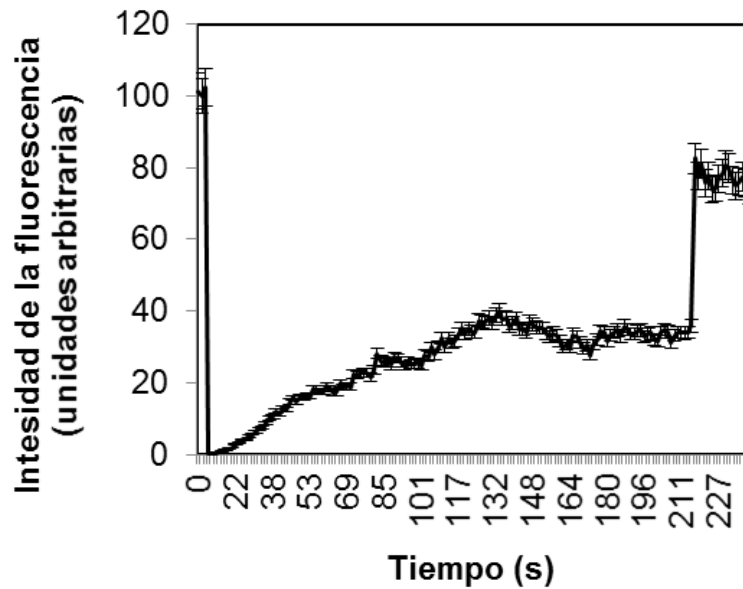


Figura 20. FRAP de la región apical de una hifa de la cepa MYO-5-GFP. A) Se observa que después del FRAP el tiempo en que la fluorescencia se recupera en una concentración similar a la inicial es de 4 min. B) Gráfica que muestra la recuperación de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo. Barras de error indican un intervalo de confianza del 95%.

En la región subapical, se observó que después del FRAP el tiempo en que la fluorescencia desaparece parcialmente en el ápice es de 1.27 min, y requiere aproximadamente 20 s en recuperar la fluorescencia a una concentración similar a la detectada anterior al fotoblanqueo (Figura 21).

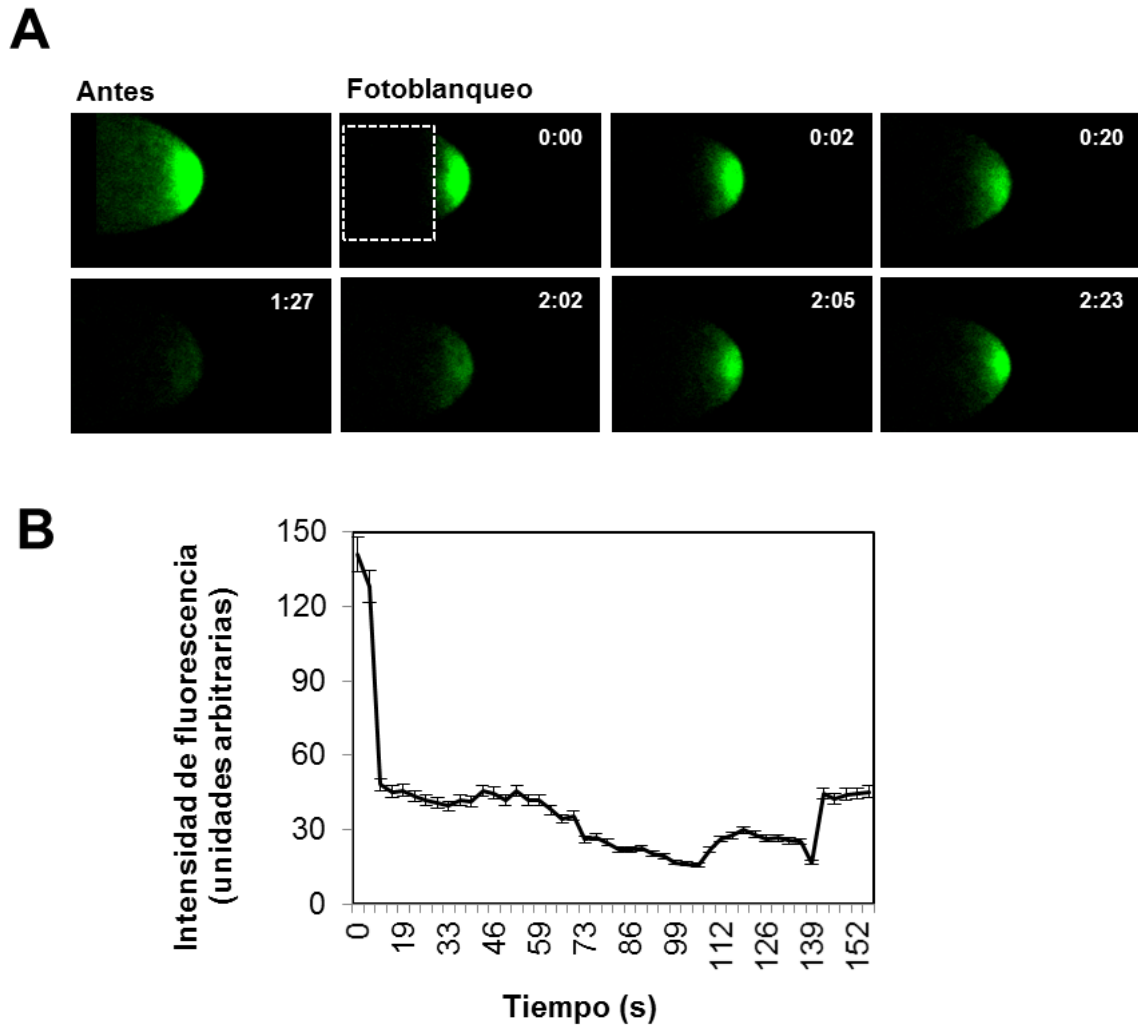


Figura 21. FRAP de la región subapical de una hifa de la cepa MYO-5-GFP. A) Posterior al FRAP, la fluorescencia requiere aproximadamente de 1 min 30 s para desaparecer parcialmente de la punta y requiere del mismo tiempo para que ésta se observe en la punta en una concentración similar a la inicial. B) Gráfica que muestra la recuperación de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo. Barras de error indican un intervalo de confianza del 95%.

3.3 Fenotipo de *N. crassa* en ausencia de la miosina de clase V

3.3.1 Crecimiento vegetativo en la mutante $\Delta myo-5$

3.3.1.1 Morfología de la colonia

Para conocer si la ausencia de la proteína MYO-5 afectaba la morfología, se hicieron observaciones macroscópicas, y se evaluó la tasa de elongación y la producción de biomasa.

Se encontró que las colonias de la cepa mutante abarcaron 1.7 % ($2.83 \pm 0.23 \text{ cm}^2$) del área de la cepa WT ($165.51 \pm 1.92 \text{ cm}^2$) (Figura 22). Además, en la mutante

$\Delta myo-5$ el promedio de elongación fue de $4.60 \mu\text{m min}^{-1}$, lo cual corresponde a solo el 9.49% de la elongación de la cepa WT (Figura 23A). La cantidad de biomasa producida en la mutante $\Delta myo-5$ fue de $149.2 \pm 2.34 \text{ mg d}^{-1}$ (biomasa \pm error estándar), mientras que de la WT fue de $193.3 \pm 14.25 \text{ mg d}^{-1}$, lo que indica que la mutante produce 22.8% menos de biomasa que la cepa WT (Figura 23B)

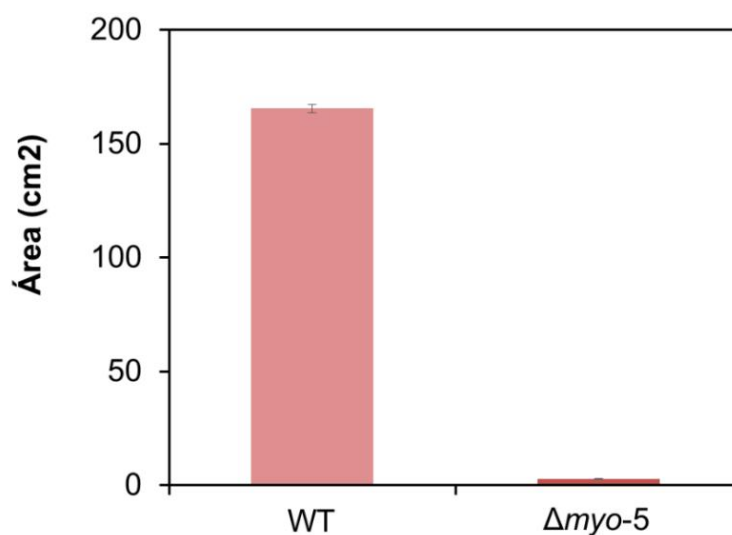
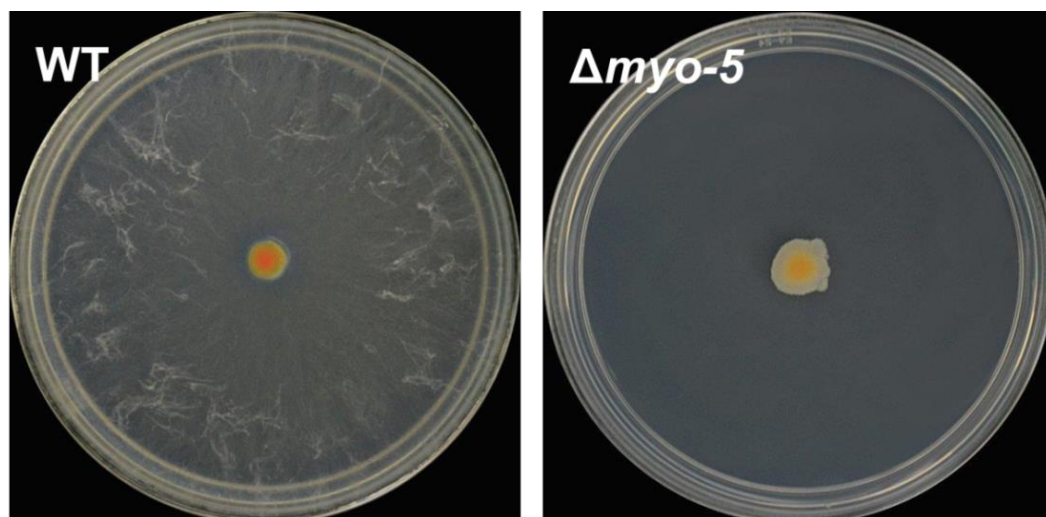


Figura 22. Morfología colonial de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$ después de 24 h de crecimiento. Las colonias de la cepa mutante $\Delta myo-5$ son más compactas que las de la WT. La grafica muestra el tamaño de la colonia de ambas cepas después de un periodo de incubación de 24 h. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

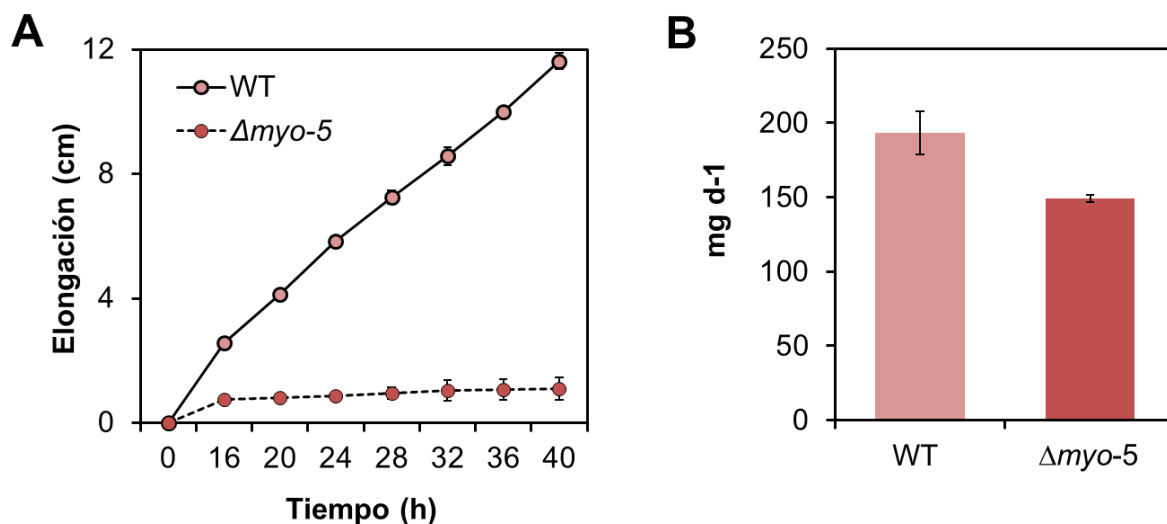


Figura 23. Análisis biométricos de las colonias de la cepa silvestre WT y la mutante $\Delta myo-5$. A) Medición de la tasa de crecimiento radial. La mutante $\Delta myo-5$ crece en promedio 9.49% de lo que crece la WT. B) Biomasa medida en 24 h. La mutante $\Delta myo-5$ produce 22.8% menos que la WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

3.3.1.2 Morfología de las hifas

Se analizó la morfología de las hifas de las colonias mutantes del gen *myo-5*, para conocer las diferencias con la WT. Las colonias de la mutante $\Delta myo-5$ mostraron que las hifas crecen de forma compacta (Figura 24B). Además, las hifas son más delgadas en la mutante ($5.48 \pm 0.27 \mu\text{m}$), presentando un diámetro de 33.3% menor al de la WT ($8.21 \pm 0.11 \mu\text{m}$) (Figura 24D y 25).

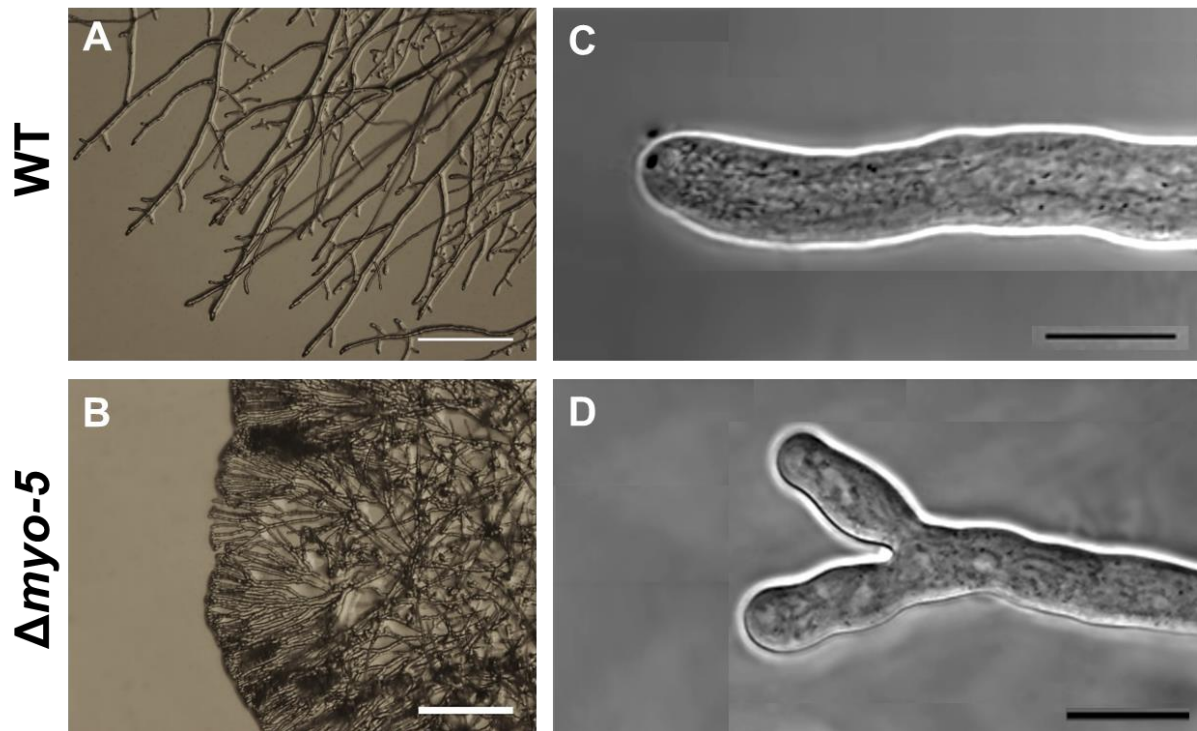


Figura 24. Morfología microscópica de las colonias de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$. Las imágenes obtenidas con el microscopio de bajo aumento muestran que las hifas de la mutante $\Delta myo-5$ crecen unas encima de otras (A y B). Las hifas en la mutante $\Delta myo-5$ presentan ramificaciones apicales, mientras que las de la WT son laterales (C y D). Barra de escala = 200 μm (A y B); 10 μm (C y D).

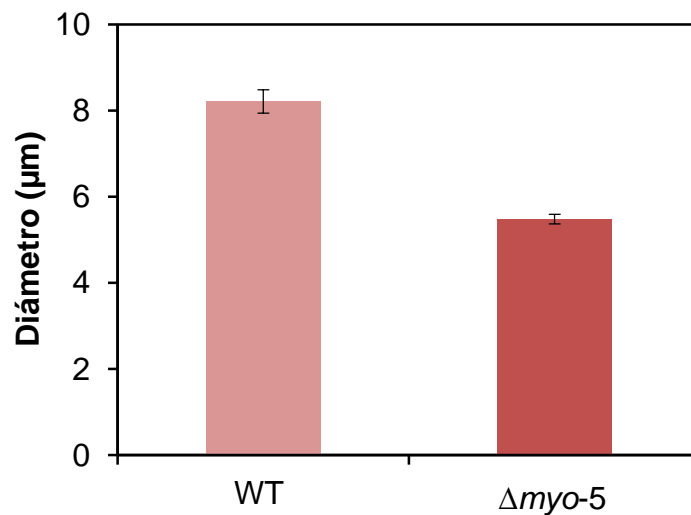


Figura 25. Diámetro de hifas de la cepa WT y la cepa mutante $\Delta myo-5$. Las hifas de la cepa mutante tienen el 66.7% del diámetro de la WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

Las hifas de la mutante $\Delta myo-5$ forman ramificaciones de tipo apical, mientras que las de la WT son únicamente laterales (Figura 26). Como paso previo a la formación

de una rama en las hifas mutantes, se presenta el ensanchamiento o crecimiento isotrópico de la punta para posteriormente comenzar a diferenciarse en dos puntas (Figura 27).

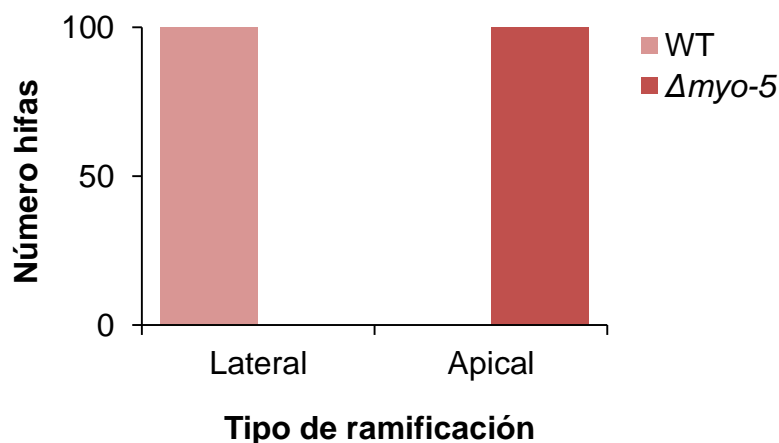


Figura 26. Tipo de ramificación en las hifas de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$. Las hifas de la cepa WT forman ramificaciones laterales, mientras que las hifas de la mutante $\Delta myo-5$ forman ramas apicales (n = 100).

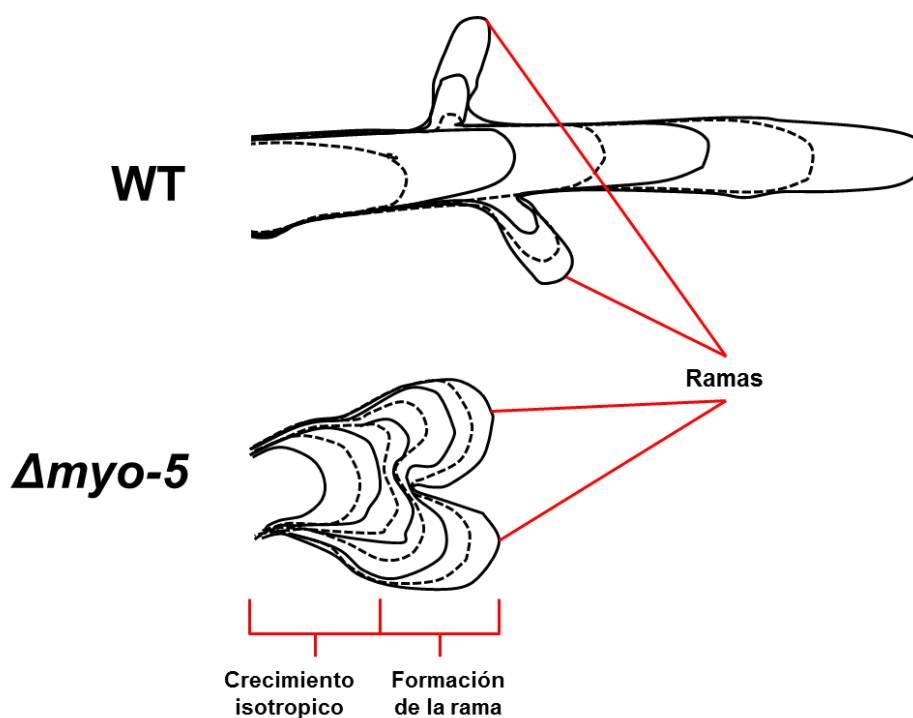


Figura 27. Esquema de la secuencia de formación de ramas en la mutante la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$. Antes de formar una rama, las hifas en $\Delta myo-5$ crecen isotrópicamente en el ápice y después comienzan a diferenciarse en dos puntas. Contrario a esto, las ramas en la WT se forman lateralmente y sin crecimiento isotrópico.

El número de ramificaciones que produce la cepa mutante $\Delta myo-5$, en una distancia de 500 μm desde la punta ($n= 30$), es en promedio entre 5 y 7 ramas, lo que representa aproximadamente el doble de las que produce la cepa de tipo silvestre (Figura 28)

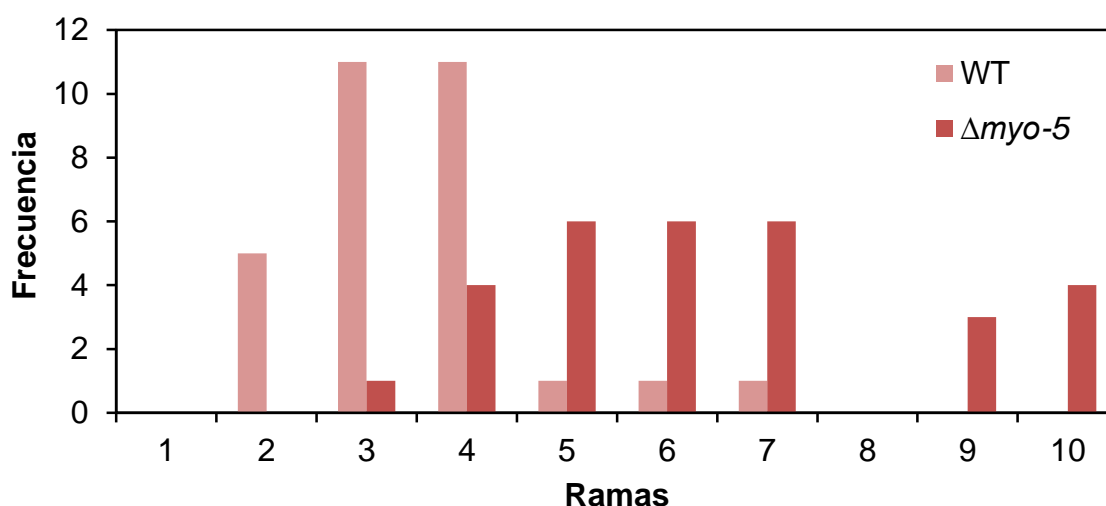


Figura 28. Número de ramas producidas por las hifas de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$. La WT produce en promedio 3 y 4 ramas, mientras que $\Delta myo-5$ produce de 5 a 7 ramas.

3.3.2 Evaluación de la reproducción asexual en la mutante $\Delta myo-5$

3.3.2.1 Morfología y producción de conidios

Para conocer si la mutación de la miosina de clase V afectaba la reproducción asexual del hongo *N. crassa*, se observó la morfología de los conidios en el microscopio confocal. Los conidios en la mutante $\Delta myo-5$ son ovalados (Figura 29A) y tienen aproximadamente 2.5 veces mayor área que las de los WT (Figura 29B)

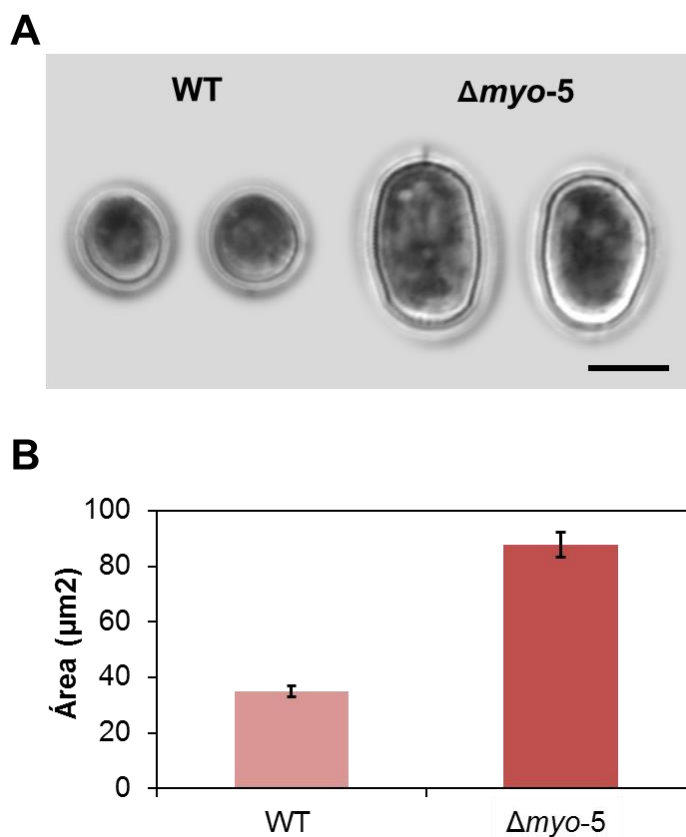


Figura 29. Conidios en la mutante $\Delta myo-5$. A) En la mutante $\Delta myo-5$ son más grandes que los de la WT y tienen forma ovalada. Barra de escala = 5 μm . B) La cepa mutante $\Delta myo-5$ forma conidios 2.5 veces de mayor área que los de la WT. Intervalo de confianza del 95%.

Los conidióforos en la mutante $\Delta myo-5$ se observan anormales con respecto a los de la WT. Los conidios inmaduros que se forman en el conidióforo son de mayor tamaño y se observa una menor cantidad de estos por conidióforo, comparado con los de la WT (Figura 30). Asimismo, existen regiones en el conidióforo de la mutante donde no se forman conidios (Figura 30, cabezas de flecha rojas).

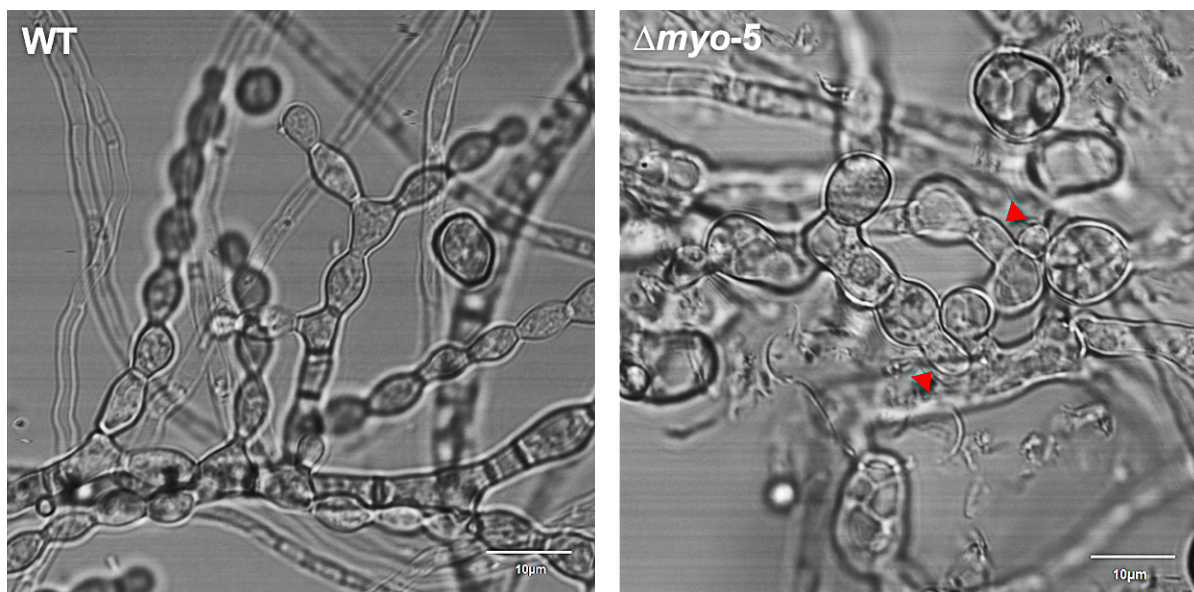


Figura 30. Conidióforos de la cepa WT y $\Delta myo-5$. En la mutante $\Delta myo-5$ (imagen de la derecha) se observa que los conidios formados son más grandes que los de la cepa WT (imagen de la izquierda), además tiene regiones donde no se produjeron conidios (cabezas de flecha rojas).. Barra de escala = 10 μm

Además de las anomalías morfológicas, se observó que en la cepa mutante $\Delta myo-5$ se producían únicamente 0.09% de conidios (2×10^5 conidios $ml^{-1} d^{-1}$) en relación a lo que produce la cepa control WT (1.08×10^9 conidios $ml^{-1} d^{-1}$) (Figura 31).

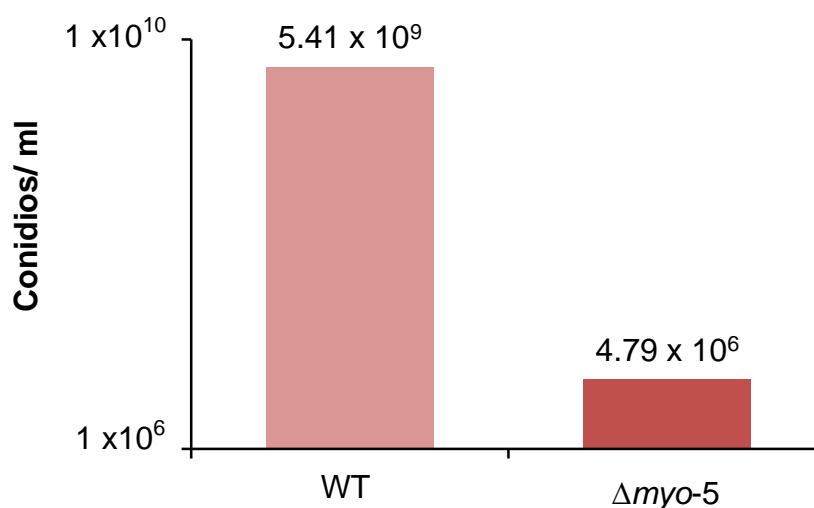


Figura 31. Producción de conidios en la mutante $\Delta myo-5$. La cepa mutante $\Delta myo-5$ produce menos del 1% de lo que produce la WT.

3.3.2.2 Numero de núcleos en los conidios

Para conocer si durante la formación de los conidios de $\Delta myo-5$ existía una relación con la cantidad de núcleos, se determinó el número de núcleos por conidio. En la cepa mutante $\Delta myo-5$, el número de núcleos por conidio varió entre 1 y 8 pero en su mayoría presentaron 4 (28%) (Figura 32). Por el contrario, en la cepa WT el rango de núcleos por conidios se encontró entre 1 y 2 núcleos (40% y 48%, respectivamente).

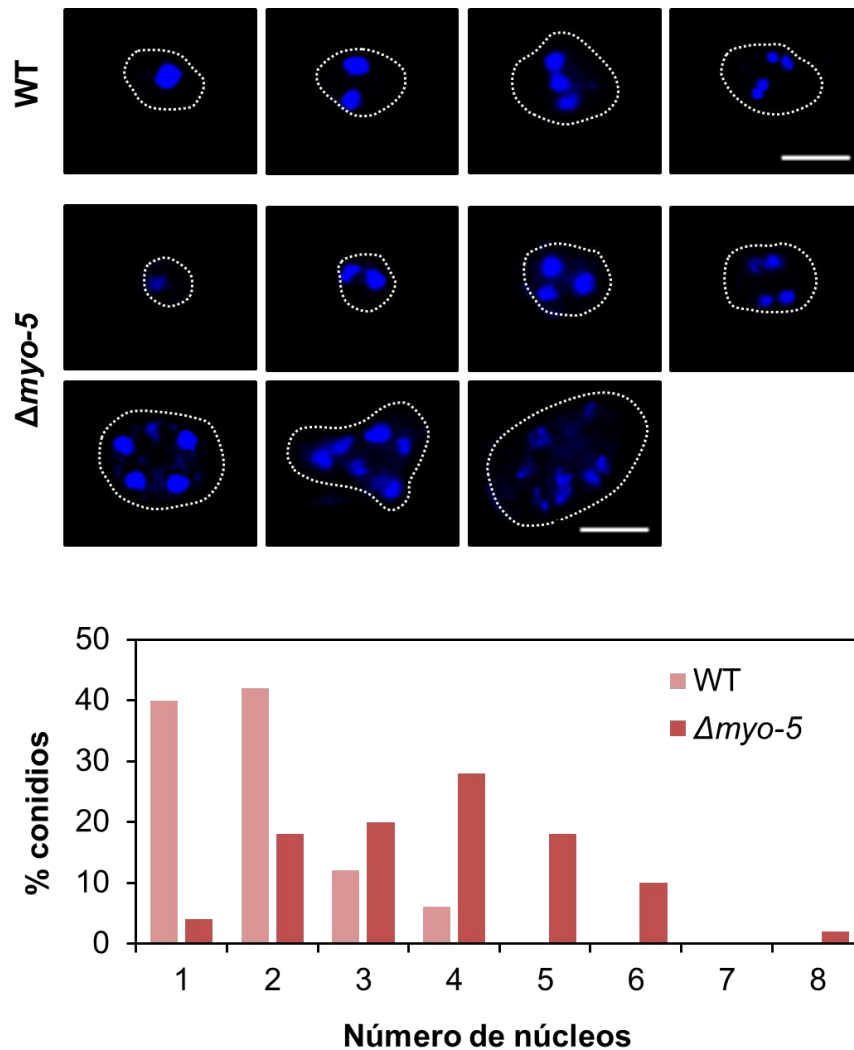


Figura 32. Número de núcleos en la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$. A) Núcleos teñidos con DAPI B) La grafica muestra el porcentaje de conidios con determinado número de núcleos. El rango de núcleos de la cepa WT se encuentra entre 1 y 2 núcleos por conidio, mientras que el rango en la mutante $\Delta myo-5$ está entre 3 y 4 núcleos. Barra de escala= 5 μm .

3.3.3 Germinación en la mutante $\Delta myo-5$

Para conocer si la ausencia de la miosina de clase V afectaba la germinación de los conidios, se midió el número de tubos germinales que se producían por conidio. En la mutante $\Delta myo-5$, se presentaron hasta tres tubos germinales, pero en su mayoría formaban un tubo germinal (67.57%). Aunque la WT también presenta un tubo germinal por conidio (93.24%), el porcentaje de conidios que presentan dos tubos germinales es menor que en la mutante $\Delta myo-5$ (Figura 33).

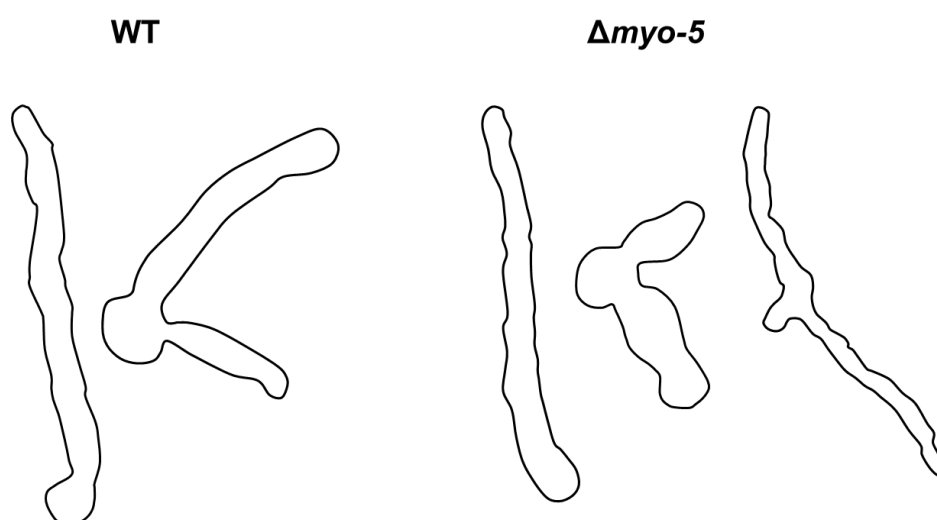
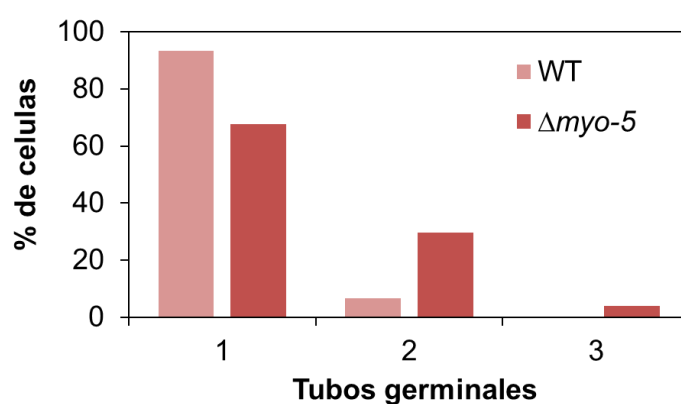


Figura 33. Número de tubos germinales por conidio. La mutante $\Delta myo-5$ presenta de uno a tres tubos germinales por conidio, el 67.57% corresponde a un tubo germinal, el 29.73% a dos tubos germinales y el 4.05% a tres tubos germinales. En la WT el 93.73% de los conidios forma un tubo germinal y el 6.76% dos tubos germinales. Los esquemas muestran los tubos germinales de la cepa WT y la mutante $\Delta myo-5$ que se forman por conidio.

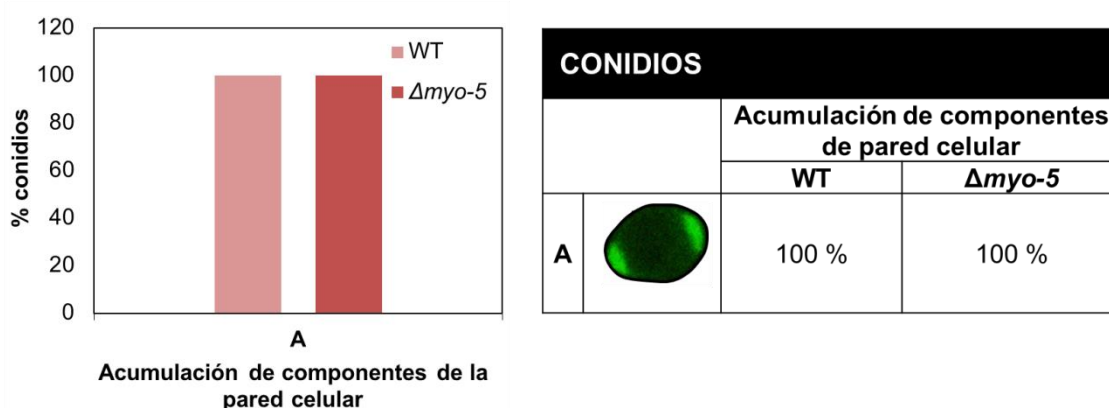
3.3.4 Análisis de la distribución de acumulaciones de componentes de la pared celular en los diferentes estadios del ciclo de vida de la cepa mutante $\Delta myo-5$

3.3.4.1 Distribución de acumulaciones en conidios de la mutante $\Delta myo-5$

Se analizaron conidios, germínulas e hifas para conocer si en ausencia del gen *myo-5* se observaban acumulaciones anormales de componentes de pared celular en las diferentes etapas del ciclo de vida.

En los conidios, tanto de la cepa WT como de la mutante $\Delta myo-5$, se observaron acumulaciones en los sitios donde la pared transversal se forma cuando se encuentran en el conidióforo (Figura 34).

A



B

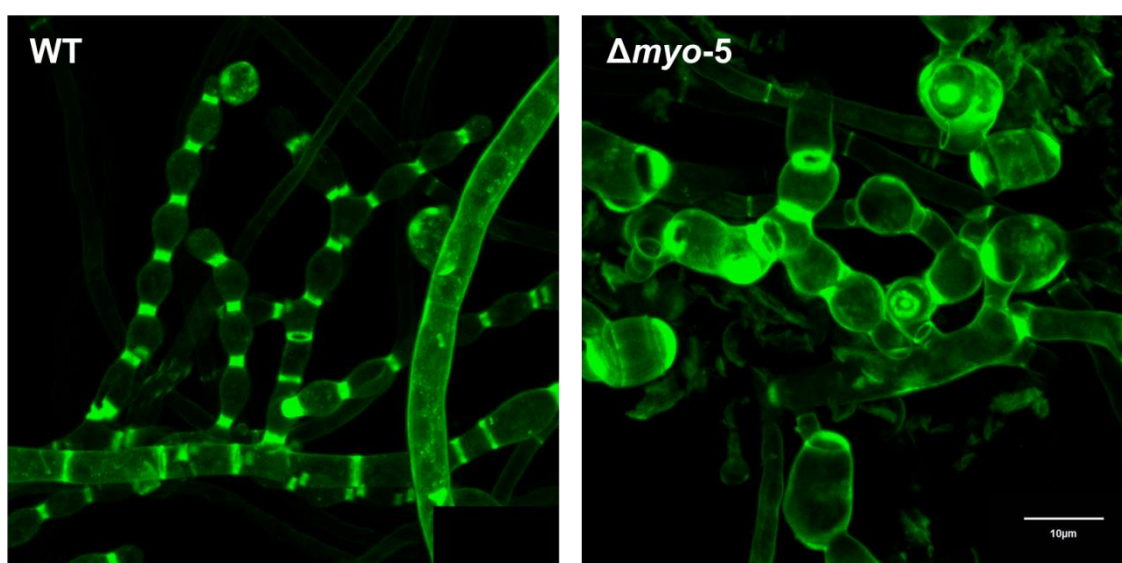
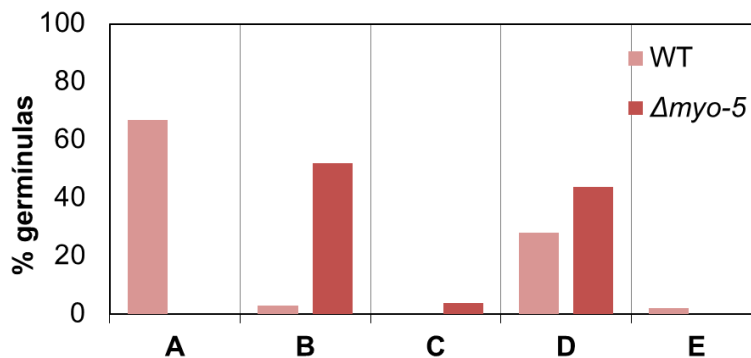


Figura 34. Localización de componentes de la pared celular en conidios de la cepa WT y $\Delta myo-5$. A) Tanto en la cepa WT como en la mutante $\Delta myo-5$, la acumulación de componentes de la pared celular se localizan en los sitios donde se formó la pared transversal cuando estaban en el conidióforo. B) Imágenes en 3D de conidióforos teñidos con Solophenyl flavine al 0.1%. Barra de escala= 10 μm .

3.3.4.2 Distribución de acumulaciones en germínulas de la mutante $\Delta myo-5$

Las germínulas teñidas con Solophenyl flavine al 0.1% fueron observadas a las 3 h y 5 h. Para los dos periodos analizados, se observaron cinco patrones principales de distribución de acumulaciones: 1) solo en la espora germinal, 2) sitios de crecimiento, 3) solo en sitios inespecíficos, 4) en la espora germinal y en sitios de crecimiento, y 5) sitios inespecíficos y en sitios de crecimiento. En la mutante $\Delta myo-5$, tanto en 3 hrs como en 5 hrs, el patrón predominante de acumulación de componentes de la pared celular en las germínulas fue en los sitios de crecimiento

(52 % y 63%, respectivamente), mientras que en la WT el patrón que predominó fue en la espora germinal (Figura 35 y 36).



Acumulación de componentes de la pared celular

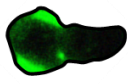
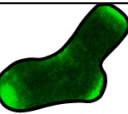
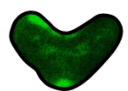


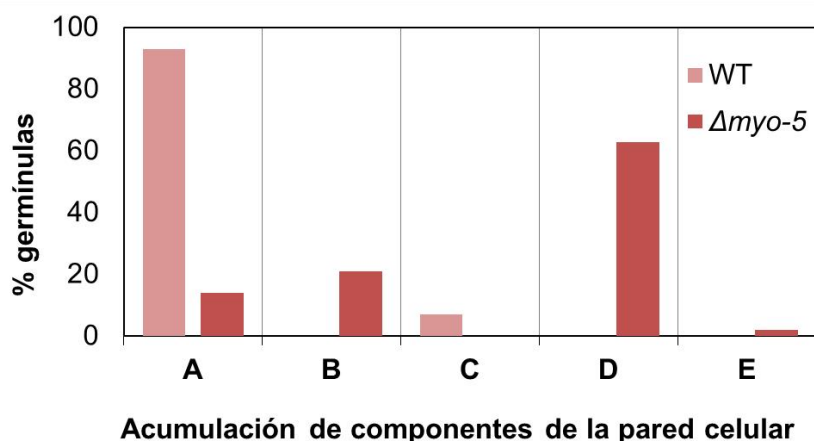
GERMINULAS (3 HRS)			
		Acumulación de componentes de pared celular	
		WT	$\Delta myo-5$
A		67 %	0 %
B		3 %	52 %
C		0 %	4 %
D		28 %	44 %
E		2 %	0 %

Figura 35. Distribución de los componentes de la pared celular en germinulas a las 3 h de germinación. Se observaron cinco patrones principales de distribución de acumulaciones: A) solo en la espora germinal, B) sitios de crecimiento, C) solo en sitios inespecíficos, D) en la espora germinal y en sitios de crecimiento, y E) sitios inespecíficos y en sitios de crecimiento.



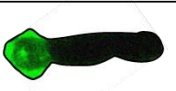




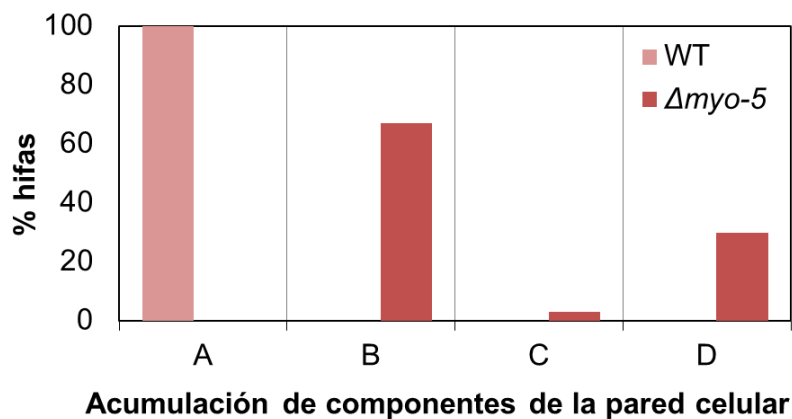
GERMINULAS (5 HRS)		Acumulación de componentes de la pared celular	
		WT	$\Delta myo-5$
A		93 %	14 %
B		0 %	21 %
C		7 %	0 %
D		0 %	63 %
E		0 %	2 %

Figura 36. Distribución de los componentes de la pared celular en germinulas a las 5 h de germinación. Se observaron cinco patrones principales de distribución de acumulaciones: A) solo en la espora germinal, B) solo sitios inespecíficos, C) en la espora germinal y en sitios de crecimiento D) solo en sitios de crecimiento, y E) en la espora germinal y sitios inespecíficos.

3.3.4.3 Distribución de acumulaciones en hifas de la mutante $\Delta myo-5$

Al igual que en germinulas las acumulaciones de los componentes de la pared celular en hifas es variable. Se observaron cuatro patrones: 1) formando un gradiente que va de menos a mayor iniciando del ápice, 2) concentrada en un sitio específico de la zona subapical, 3) en sitios inespecíficos, y 4) concentrada en sitios donde se produjo una rama. En las hifas de la WT, se acumulan formando un gradiente que va de menor a mayor desde el ápice (100 %). Por el contrario, en las

hifas de la mutante $\Delta myo-5$ las acumulaciones, en su mayoría, se concentran en áreas específicas en la zona subapical (67 %) o en las zonas donde se produjo la ramificación (30 %) (Figura 37).



HIFAS		Acumulación de componentes de la pared celular	
		WT	$\Delta myo-5$
A		100 %	0 %
B		0 %	67 %
C		0 %	3 %
D		0 %	30 %

Figura 37. Localización de acumulaciones de los componentes de la pared celular en hifas de la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$. Se observaron cuatro patrones: 1) formando un gradiente que va de menos a mayor iniciando del ápice, 2) concentrada en un sitio específico de la zona subapical, 3) en sitios inespecíficos, y 4) concentrada en sitios donde se produjo una rama.

3.3.5 Morfología de los septos

Debido a que la miosina de clase V en *N. crassa* se encuentra localizada en los septos, se hicieron observaciones de las hifas para conocer si la ausencia de la miosina de clase V afectaba la forma y frecuencia de estos. Los septos en la mutante $\Delta myo-5$ son normales en forma (Figura 38), sin embargo presentan diferencias en distancia y frecuencia. En la cepa silvestre el primer septo formado se localiza a una distancia promedio de 221.24 μm del ápice (Figura 39A), mientras que la distancia promedio entre cada septo es de 65.51 μm (Figura 39B). Por el contrario, en la mutante $\Delta myo-5$ el primer septo que se forma se encuentra a 94.01 μm de distancia promedio de la punta (Figura 39A) y entre cada septo solo hay 47.80 μm de distancia promedio (Figura 39B)

En la mutante $\Delta myo-5$ hay aproximadamente 5 septos en 300 μm de distancia desde la punta, mientras que en la WT la cantidad de septos en la misma distancia es mucho menor (1 septo cada 300 μm) (Figura 39C).

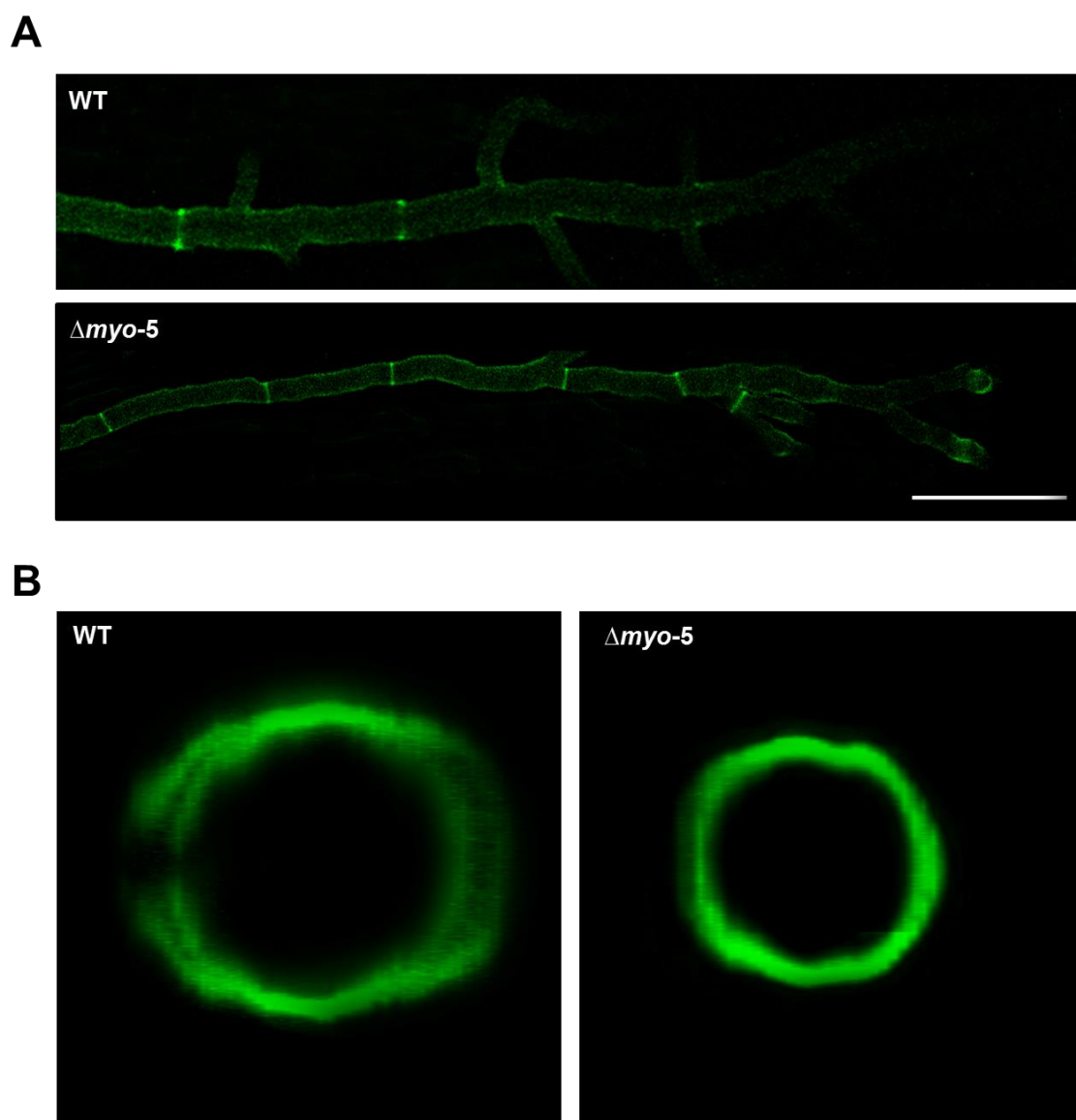


Figura 38. Morfología de los septos en la mutante $\Delta myo-5$. A) Los septos en la mutante $\Delta myo-5$ se forman correctamente pero se observa que la cantidad es diferente. B) Imágenes en 3D de los septos teñidos con Solophenyl flavine al 0.1%. Barra de escala = 50 μm .

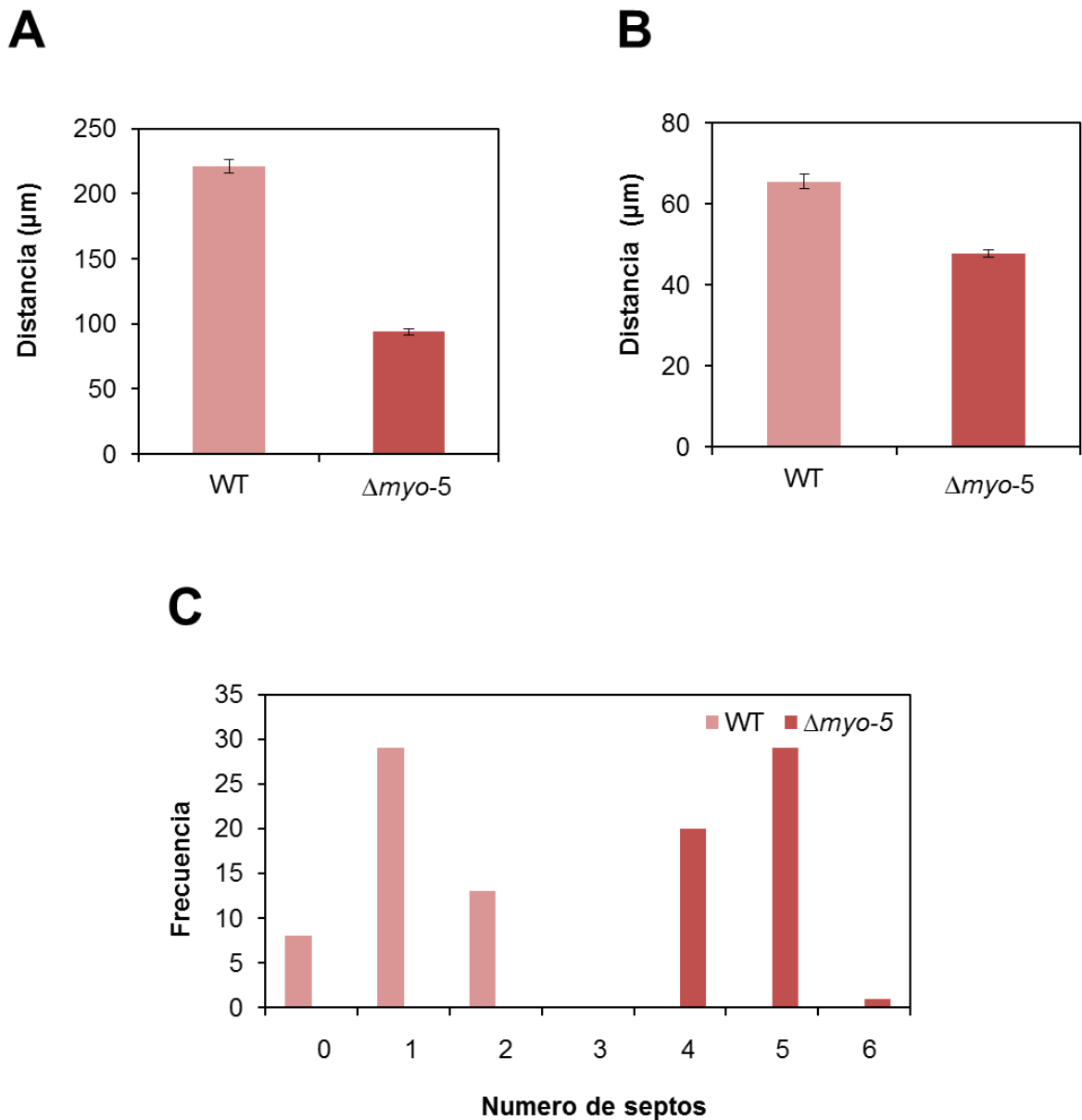


Figura 39. Análisis de septación en la mutante $\Delta myo-5$. A) Distancia promedio del primer septo formado hasta el ápice. En la WT esta distancia es mayor (221.24 μm) que en la mutante (94.01 μm). B) Distancia promedio entre septos. En la mutante $\Delta myo-5$ la distancia entre septos es menor (47.80 μm) en relación a la cepa WT (65.51 μm). C) Frecuencia de septos en 300 μm de distancia desde el ápice. En la mutante $\Delta myo-5$ la cantidad de septos es de 5, mientras que en la cepa WT es de 1 septo en la misma distancia. Barras de error con un intervalo de confianza de 95%.

3.3.6 Distribución de mitocondrias y vacuolas en la mutante $\Delta myo-5$

Se hicieron observaciones en el microscopio confocal para conocer si la ausencia de MYO-5 afectaba la distribución y localización de las mitocondrias y vacuolas, debido a que en otros hongos se ha reportado que participa en el tráfico mitocondrial y

vacuolar. Apparently in *N. crassa*, the distribution of the mitochondria is similar both in the WT strain as in the mutant $\Delta myo-5$. At the tip of the hyphae, a higher concentration of fluorescence is observed decreasing as it moves away from the tip (Figure 40)

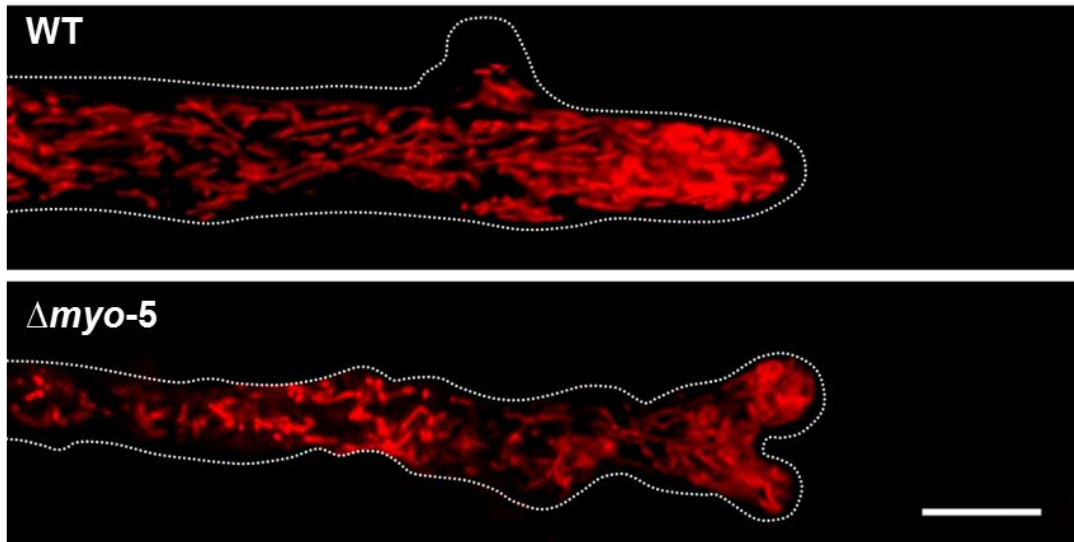


Figura 40. Localización de las mitocondrias en la cepa WT y en la mutante $\Delta myo-5$. Las mitocondrias fueron observadas en el microscopio confocal usando el fluoróforo SYTO® Red. La distribución de las mitocondrias es similar en ambas cepas, concentrando principalmente en el ápice. Barra de escala= 10 μm

Por el contrario, las observaciones de vacuolas en las hifas mostraron que existen diferencias en cuanto a morfología y distribución de las vacuolas. En la cepa WT las vacuolas son esféricas y tubulares y se ubican aproximadamente a 30 μm después del ápice, mientras que en la cepa mutante $\Delta myo-5$ parecen abundar las vacuolas esféricas, además de que están localizadas únicamente en los primeros 30 μm desde el ápice (Figura 41).

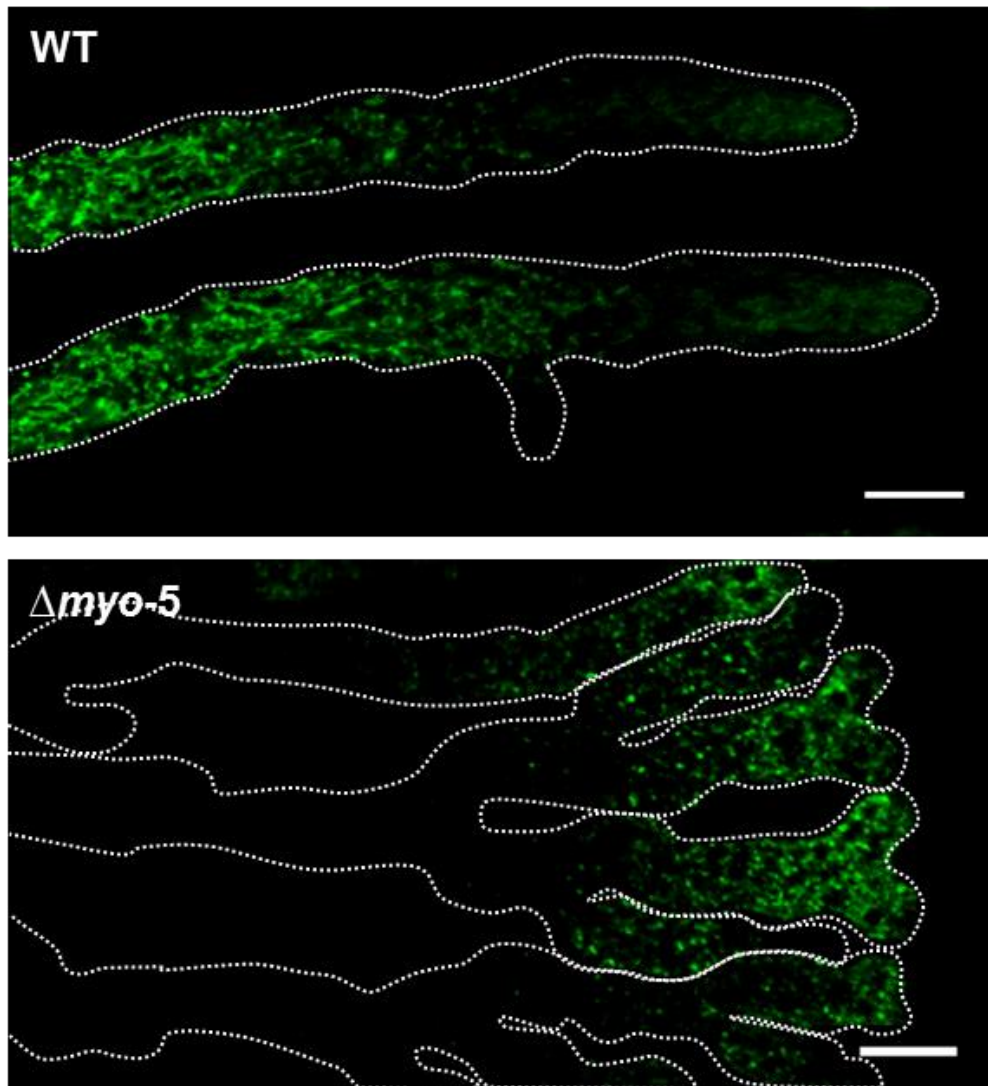


Figura 41. Localización de vacuolas en la cepa WT y en la mutante $\Delta myo-5$. Las vacuolas fueron visualizadas en el microscopio confocal utilizando el fluoróforo vital Oregon Green 488 carboxilic acid diacetate. En la cepa WT se observan vacuolas tubulares y esféricas localizadas a partir de los 30 μm posteriores al ápice. En la cepa mutante $\Delta myo-5$ predominan las vacuolas esféricas y se localizan en los primeros 30 μm . Barra de escala= 10 μm

3.3.7 Organización del Spitzenkörper en la mutante $\Delta myo-5$

El Spk se analizó en las hifas de la mutante $\Delta myo-5$ para conocer si existía una diferencia en la organización de este. Sorprendentemente se observó que en la mutante no se encuentra presente, y en su lugar esta una nube difusa la cual abarca parte de la zona subapical. (Figura 42).

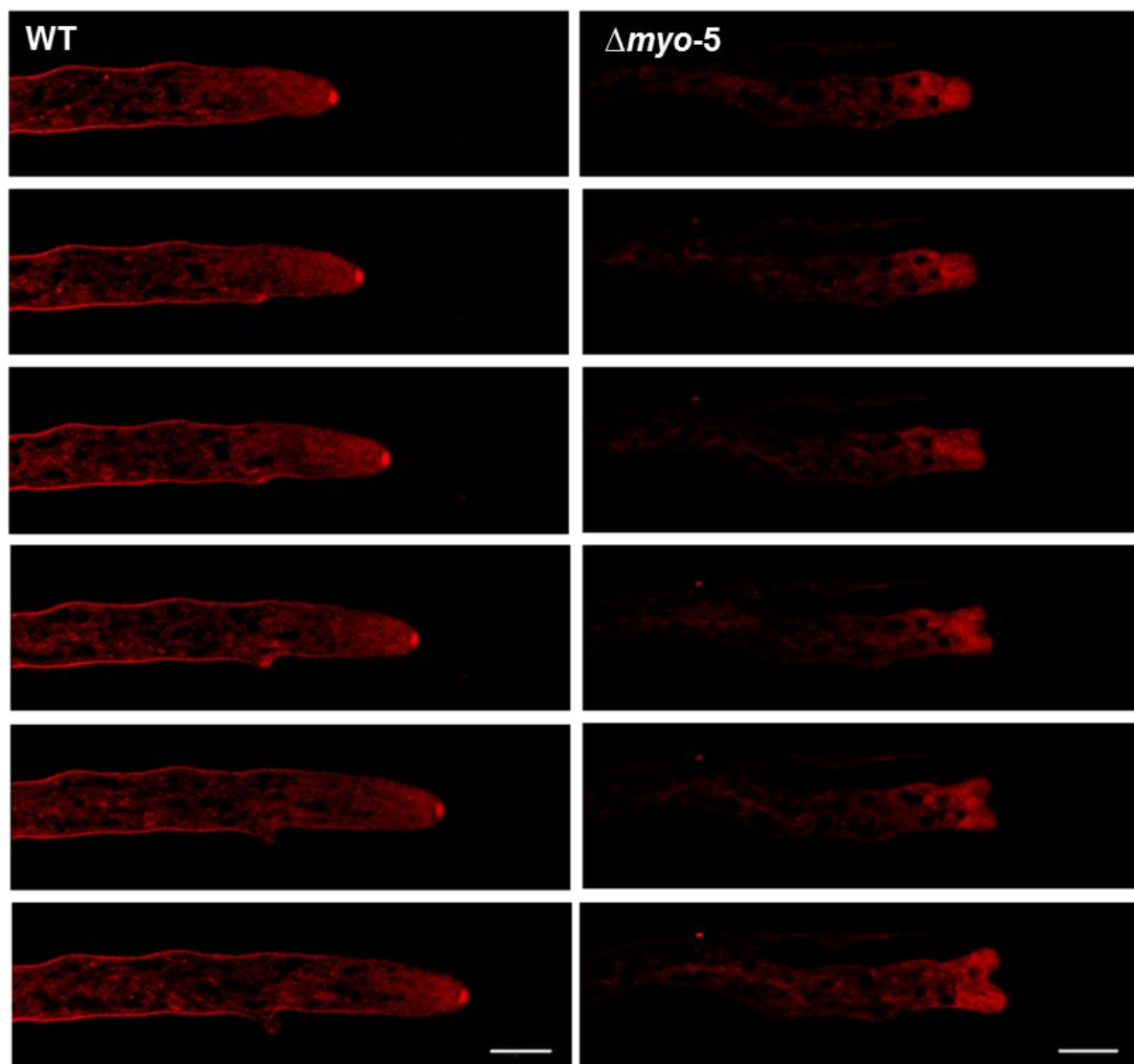


Figura 42. Organización del Spitzenkörper en la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$. Serie de tiempo que muestra que el Spk teñido con FM4-64, el cual tiñe estructuras membranosas. En la cepa WT el Spk se observa como un punto localizado en el ápice la hifa. Por el contrario, en la cepa mutante $\Delta myo-5$ se encuentra una nube difusa localizada en el ápice y en parte de la zona subapical. Barra de escala= 10 μm .

Capítulo 4. Discusión

El transporte intracelular en hongos filamentosos es un proceso muy importante para el mantenimiento de los diferentes organelos en los sitios donde son necesarios, por ejemplo, el transporte de vesículas exocíticas que apoya al crecimiento polarizado y la morfogénesis de las hifas (Bartnicki-García, et al 1989). Se ha especulado que el citoesqueleto microtubular es el responsable del transporte a larga distancia de estas vesículas hasta el Spk y de ahí hacia la membrana plasmática es el citoesqueleto de actina (Bartnicki-García, et al 1989; 1995; 2000), sin embargo, no hay evidencia experimental de que este sea el mecanismo en el hongo *N. crassa*. Por lo que se llevó a cabo el primer estudio de la única miosina que en teoría puede ser transportadora de organelos y vesículas en este hongo filamentosos. Esta miosina pertenece a la clase V, de la que hay un solo miembro, que se ha denominado como MYO-5 en *N. crassa*.

4.1 Localización y dinámica de MYO-5-GFP

Al igual que lo mostrado anteriormente (Echauri-Espinosa, 2014), en *N. crassa* la MYO-5-GFP se observó acumulada en el Spk y formando una especie de abanico en el domo apical, a diferencia de lo observado en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012) en *Ustilago maydis* (Schuchardt, Aßmann, Thines, Schuberth y Steinber, 2005), en donde la miosina de clase V únicamente colocaliza con el Spk y no se observa el abanico en el ápice. En este trabajo se mostró claramente como cúmulos de MYO-5 llegan por pulsos al Spk que coinciden con acumulaciones del colorante FM4-64 que tiñe membranas, lo que hace suponer que el ritmo de entrega de vesículas en el ápice no es constante por lo que el crecimiento de *N. crassa* como se ha mostrado anteriormente es en pulsos (López-Franco, Bartnicki-García y Bracker, 1994). En la región subapical no se observan partículas fluorescentes de MYO-5-GFP que viajen hacia el Spk, sin embargo, se pudo probar con los experimentos de FRAP, tanto del ápice como de la región subapical que esta proteína viaja desde regiones posteriores hasta la punta de la hifa, aunque se esperaría un tiempo de recuperación más rápido dada la velocidad de crecimiento de este hongo.

MYO-5 también se observó durante la formación de los septos, del mismo modo, que lo reportado en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012) y en el anillo de citocinesis de la levadura *S. cerevisiae* (Lillie y Brown, 1994; Karpova et al., 2000) y al igual que en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012), la intensidad de la fluorescencia producida por la miosina de clase V etiquetada con GFP en los septos fue sustancialmente menor que en el ápice. Esto puede deberse a que el transporte de vesículas secretoras a la zona de formación de septos no tiene un papel esencial.

Durante los estadios tempranos de desarrollo de *N. crassa*, la MYO-5-GFP está localizada de manera dispersa, incluso durante la germinación, lo que indica que no tiene un papel en el establecimiento del primer punto de crecimiento polarizado. Sin embargo, una vez que el tubo germinal alcanza determinado tamaño (entre 20 μm y 30 μm), la MYO-5 se desplaza hacia la punta de la hifa y ahí se concentra, manteniéndose hasta que se convierte en una hifa madura. Este patrón de distribución de MYO-5 en conidios, germínulas e hifas maduras corresponde a los estadios de formación del Spk descritos anteriormente (Araujo-Palomares et al., 2007), lo que sugiere que MYO-5 podría estar transportando vesículas que se van acumulando para formar el Spk.

4.2 Cinética de crecimiento en ausencia de MYO-5

La mutante por delección de $\Delta myo-5$ está fuertemente afectada en el crecimiento vegetativo y en la producción de biomasa, siendo el primero el más afectado. En este caso, se puede observar que el crecimiento radial es muy pobre, pero la mutante $\Delta myo-5$ produce un número sustancialmente mayor de ramificaciones lo que hace una colonia pequeña pero compacta, lo que explica que la diferencia en la producción de biomasa sea menor que la diferencia en el crecimiento radial entre la mutante $\Delta myo-5$ y la cepa silvestre. Como se ha observado en mutantes o experimentos con drogas que afectan a la actina (Torralba, Raudaskoski, Pedregosa y Laborda, 1998; Echaui-Espinosa, Callejas-Negrete, Roberson, Bartnicki-García y Mouriño-Pérez, 2012), la mutante $\Delta myo-5$ solo genera ramificaciones apicales, además presenta periodos de crecimiento polarizado intercalados con crecimiento isotrópico y también carece de un Spk robusto. Todos estos datos fenotípicos

orientan a pensar que la ausencia de MYO-5 hace que las hifas tengan problemas para el mantenimiento del sitio de polarización.

Se creía que al presentar periodos de crecimiento isotrópico y al ser el crecimiento radial más lento, las hifas en la mutante serían de mayor diámetro como las de la mutante en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012). Sin embargo, se encontró que en las hifas son de menor diámetro.

4.3 Reproducción asexual en la mutante $\Delta myo-5$

El análisis de la reproducción asexual en ausencia de la MYO-5, reveló resultados diferentes a los estudios realizados en el hongo dimórfico *Ustilago maydis*, en donde la mutante de la miosina de clase V produce esporidios normales (Weber et al., 2003). En *N. crassa* la ausencia de MYO-5, produjo conidios de mayor tamaño pero menor número de éstos. Los conidióforos fueron anormales y con deposiciones normales de pared celular. Sin embargo, en los conidios se encontró un aumento en el número de núcleos, se sugiere que el aumento en el tamaño de los conidios y el bajo número es causado por la formación aberrante de los conidióforos, que al parecer no se divide simétricamente dejando conidios grandes y otros inexistentes. El aumento en el número de núcleos no sugiere que la MYO-5 este participando en el transporte de estos, sino que probablemente se deba a un retraso en la formación de la pared transversal en los conidióforos, lo que permite que los núcleos continúen pasando o a divisiones nucleares previas a la formación del tubo germinal.

4.4 La pared celular en la mutante $\Delta myo-5$

Como se mencionó anteriormente, las observaciones de los componentes de la pared celular en conidios se acumularon de manera indistinta tanto en la WT como en la mutante $\Delta myo-5$. Por el contrario, en germínulas e hifas maduras de la mutante, los componentes de la pared se acumularon en sitios donde aparentemente el tubo germinal continua creciendo de forma polarizada, pero experimenta un cambio de dirección, lo cual se puede deber a lo que ya se ha mencionado anteriormente acerca de los problemas que tiene la mutante para

mantener un sitio de polarización. En hifas maduras de la cepa mutante, los componentes de la pared celular se concentraron en áreas específicas en la zona subapical (no muy lejos de la punta) o en la intersección formada después de que se produjo la ramificación apical, contrario a lo que ocurre en la WT en donde se forma un gradiente que va de menor a mayor iniciando en el ápice. La acumulación anormal de componentes observado en la mutante de MYO-5, así como en otras mutantes de la miosina de clase V y de actina (Novick y Botstein, 1985; Johnston, Prendergast y Singer, 1991) puede deberse a problemas en el transporte vesicular. Durante el desarrollo de germínulas e hifas no se observan acumulaciones de vesículas exocíticas, ya que un número determinado de vesículas llegan al Spk a una velocidad adecuada (Bartnicki-García et al., 1989). En ausencia de proteínas que participan en éste transporte, como son la actina y la MYO-5, las vesículas que son generadas en cantidades normales serían transportadas lentamente o dirigidas a sitios incorrectos, lo que causaría su acumulación y anomalías en la morfología celular.

4.5 Septación en ausencia de MYO-5

Estudios en mutantes nulas del gen de la miosina de clase V en *A. nidulans* muestran que la forma de los septos es normal, sin embargo son más numerosos y cercanos entre ellos (Taheri-Talesh, et al., 2012). Contrario a esto en la levadura de fisión *S. pombe* la ausencia de cualquiera de las dos miosinas de clase V produce defectos en la maduración y rompimiento del septo (Win, Gachet, Mulvihill, May y Hyams, 2001). Nuestros resultados son similares a los encontrados en *A. nidulans*, lo que sugiere que durante la septación la miosina de clase V no es esencial en el tráfico de vesículas y que el aumento en la frecuencia de los septos cuando la MYO-5 está ausente se debe a los problemas que tienen las hifas para mantener el crecimiento.

4.6 Transporte de estructuras intracelulares.

Se ha reportado que la miosina de clase V en *S. cerevisiae* está involucrada en el transporte de mitocondrias (Itoh et al., 2002; Boldogh et al., 2004) y de vacuolas (Hill et al., 1996; Catlett y Weisman, 1998). En este estudio se observó que en el caso de las mitocondrias, su localización y morfología era normal en la mutante de la MYO-5 por lo que concluimos que en *N. crassa* no es esencial para el movimiento mitocondrial. Contrario a lo observado en mitocondrias, las vacuolas en la mutante están severamente afectadas. En la WT las vacuolas son de forma esférica y tubular y se localizan a 30 μm del ápice, mientras que en las vacuolas de la mutante de la MYO-5 la forma predominante es esférica y se localizan en los primeros 30 μm . Este fenotipo observado resulta similar al observado en *N. crassa* en la mutante de la dineína (la cual tiene la función de mover cargas en sentido retrogrado), aunque las vacuolas que se acumulan eran en su mayoría alargadas (Seiler, Plamann y Schliwa, 1999), por lo que la MYO-5 podría estar participando en el tráfico de una población específica de vesículas y manteniéndolas en la región subapical.

4.7 Organización del Spk en la mutante $\Delta myo-5$

Como se ha reportado anteriormente, para que el crecimiento polarizado en las hifas se genere de forma correcta, es necesario que las vesículas que serán exocitadas lleguen al Spk para que éste las distribuya a la punta (Bartnicki-García, Hergert, y Gierz, 1989; Gierz y Bartnicki-García, 2001). En este trabajo se observó, que en la mutante de MYO-5 el Spk es prácticamente inexistente y en su lugar hay una nube apical de vesículas dispersas y desorganizadas. A pesar de esto las hifas pueden mantener temporalmente la polaridad y dirección de crecimiento y también crecer aunque pobremente. Esto hace evidente que para un crecimiento saludable la presencia de un Spk robusto es esencial. Por lo que se puede sugerir que la miosina de clase V está involucrada en el mantenimiento de la polaridad y de la dirección de crecimiento, así como en mantener la integridad del Spk.

Capítulo 5. Conclusión

- La MYO-5 se localiza en el ápice de las hifas de *N. crassa* principalmente en el Spk.
- La MYO-5 se localiza de forma poco abundante y transigente durante la formación de los septos.
- La MYO-5 se mueve desde la región basal hacia la región apical acarreando partículas membranosas.
- La MYO-5 mueve organelos membranosos teñidos con FM4-64.
- La MYO-5 mantiene a las vacuolas esféricas en la posición correcta.
- La MYO-5 participa en el mantenimiento y dirección de la polaridad así como en la integridad del Spk.

Lista de referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K., y Walter, P. (2010). *Molecular Biology of the Cell* (5^{ta} ed.) New York: Garland Science.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. y Lipman D. J. (1990) *Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Araujo-Palomares, C. L., Castro-Longoria, E., y Riquelme, M. (2007). Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(6), 492-503
- Baker, J. P., y Titus, M. a. (1997). A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 272(4), 523–535.
- Baker, J. P., y Titus, M. A. (1997). A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 272(4), 523-535.
- Bartnicki- García, S., Hergert, F., y Gierz, G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 153(1-2), 46–57.
- Bartnicki-García, S., Bracker, C. E., Lippman, E., y Ruiz-Herrera, J. (1984). Chitosomes from the wall-less “slime” mutant of *Neurospora crassa*. *Archives of microbiology*, 139(2-3), 105-112.
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E., y Bloom, K. (2000). The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Current Biology : CB*, 10(23), 1497–506.
- Böhl, F., Kruse, C., Frank, a, Ferring, D., y Jansen, R. P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The EMBO Journal*, 19(20), 5514–24.
- Boldogh, I. R., Ramcharan, S. L., Yang, H., y Pon, L. A. (2004). A Type V Myosin (Myo2p) and a Rab-like G-Protein (Ypt11p) Are Required for Retention of Newly Inherited Mitochondria in Yeast Cells during Cell Division. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 3994–4002.
- Brown, S. S. (1997). Myosins in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), 44–48.
- Calvert, M. E. K., Wright, G. D., Leong, F. Y., Chiam, K.H., Chen, Y., Jedd, G., y Balasubramanian, M. K. (2011). Myosin concentration underlies cell size-dependent scalability of actomyosin ring constriction. *The Journal of Cell Biology*, 195(5), 799–813.

- Cameron, I. C., Machado, M., y Meza, G. (2003). Las miosinas en el movimiento celular I, estructuras y propiedades cinéticas. *Revista de Educación Bioquímica*, 22(2), 53-59.
- Catlett, N. L., Duex, J. E., Tang, F., y Weisman, L. S. (2000). Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *The Journal of Cell Biology*, 150(3), 513–526.
- Catlett, N. L., y Weisman, L. S. (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95(25), 14799–804.
- Cole, L., Hyde, G. J., y Ashford, A. E. (1997). Uptake and compartmentalisation of fluorescent probes by *Pisolithus tinctorius* hyphae: evidence for an anion transport mechanism at the tonoplast but not for fluid-phase endocytosis. *Protoplasma*, 199(1-2), 18–29.
- Coluccio L.M. (2008) *Myosins A Superfamily of Molecular Motors* (Vol. 7). Springer Netherlands.
- Dekker-Ohno, K., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Oda, S., Wakasugi, N., Mikoshiba, K., Inouye, M., y Yamamura, H. (1996). Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain Research*, 714(1-2), 226–30.
- Delgado-Álvarez, D. L., Bartnicki-García, S., Seiler, S., y Mouriño-Pérez, R. R. (2014). Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. *PloS One*, 9(5), e96744.
- Domínguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., y Cohen, C. (1998). Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: Visualization of the pre-power stroke state. *Cell*, 94(5), 559–571.
- Dos Remedios, C. G., y Chhabra, D. (2008). *Actin-binding proteins and disease* (Vol. 8). Springer.
- Dunn, A. R., y Spudich, J. A. (2007). Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nature structural & molecular biology*, 14(3), 246-248.
- Dunn, B. D., Sakamoto, T., Hong, M.-S. S., Sellers, J. R., y Takizawa, P. A. (2007). Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mRNA. *The Journal of Cell Biology*, 178(7), 1193–206.
- Echauri-Espinosa, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., y Mouriño-Pérez, R. R. (2012). Coronin is a component of the endocytic collar of hyphae of *Neurospora crassa* and is necessary for normal growth and morphogenesis. *PloS one*, 7(5), e38237.
- Echauri-Espinosa, R.O. (2014) Localización y dinámica de las proteínas: miosinas de clase II (MYO-2) miosina de clase V (MYO-5), miosina de cadena ligera (CDC-4) y coronina (CRN-1) en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Tesis de

doctorado en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 80 p.

- Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M., y Adelstein, R. S. (1973). Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(9), 2687–91.
- Espindola, F. S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V, Martins, a R., Costa, F. R., Mooseker, M. S., y Larson, R. E. (1992). Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *The Journal of Cell Biology*, 118(2), 359–368.
- Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A, De Camilli, P. V, Larson, R. E., y Mooseker, M. S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *The Journal of Cell Biology*, 119(6), 1541–1557.
- Espreafico, E. M., Coling, D. E., Tsakraklides, V., Krogh, K., Wolenski, J. S., Kalinec, G., y Kachar, B. (1998). Localization of myosin-V in the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8636–8641.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., y Ferro-Novick, S. (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 163(6), 1255–66.
- Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C., y Mooseker, M. S. (1998). Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *Journal of cell science*, 111(14), 2055-2066.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., Eitzen, G. A, Aitchison, J. D., y Rachubinski, R. A. (2006). The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Cell*, 10(5), 587–600.
- Fagarasanu, A., Mast, F. D., Knoblach, B., y Rachubinski, R. A. (2010). Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 644-654.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A, y Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198(Pt 3), 246–59.
- Fukuda, M., Kuroda, T. S., y Mikoshiba, K. (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12432–12436.
- Geli, M. I., y Riezman, H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science*, 272(5261), 533-535.

- Gierz, G., y Bartnicki- García, S. (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *Journal of Theoretical Biology*, 208(2), 151-164.
- Goldsmith, S. C., Pokala, N., Matsudaira, P., y Almo, S. C. (1997). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the N-terminal actin binding domain of human fimbrin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 28(3), 452-453.
- Govindan, B., Bowser, R., y Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *The Journal of Cell Biology*, 128(6), 1055–1068.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series 41*, 95-98. Recuperado el 19 de septiembre de 2013 de <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Harris, K. P., y Tepass, U. (2010). Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic*, 11(10), 1272-1279. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01102.x
- Henriot, A., Cheype, J.L. (2014). *Piximètre: La mesure de dimensions sur images*. Recuperado el 18 de marzo de 2014 de: <http://ach.log.free.fr/Piximetre/>
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., y Read, N. D. (2005). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods Microbiol*, 34, 63-87.
- Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowski, D. H., y Turner, J. N. (2005). Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*, 97(3), 580–588.
- Hodges, A. R., Kremontsova, E. B., y Trybus, K. M. (2008). She3p binds to the rod of yeast myosin V and prevents it from dimerizing, forming a single-headed motor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6906–14. doi:10.1074/jbc.M708865200
- Hoepfner, D., van den Berg, M., Philippsen, P., Tabak, H. F., y Hetteema, E. H. (2001). A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 155(6), 979–990. doi:10.1083/jcb.200107028
- Holmes, K. C., y Geeves, M. a. (2000). The structural basis of muscle contraction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 355(1396), 419–31. doi:10.1098/rstb.2000.0583
- Horio, T., y Oakley, B. R. (2005). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 918–26. doi:10.1091/mbc.E04-09-0798
- Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Györgyi, a G., y Cohen, C. (1999). Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell*, 97(4), 459–70.

- Hume, A. N., Collinson, L. M., Hopkins, C. R., Strom, M., Barral, D. C., Bossi, G., Griffiths G. M., y Seabra, M. C. (2002). The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(3), 193–202.
- Hutagalung, A. H., Landsverk, M. L., Price, M. G., y Epstein, H. F. (2002). The UCS family of myosin chaperones. *Journal of Cell Science*, 115(21), 3983–3990. doi:10.1242/jcs.00107
- Ishikawa, K., Catlett, N. L., Novak, J. L., Tang, F., Nau, J. J., y Weisman, L. S. (2003). Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *The Journal of Cell Biology*, 160(6), 887–97. doi:10.1083/jcb.200210139
- Itoh, T., Toh-E, A., y Matsui, Y. (2004). Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *The EMBO Journal*, 23(13), 2520–30. doi:10.1038/sj.emboj.7600271
- Itoh, T., Watabe, A., Toh-e, A., & Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 22(22), 7744-7757. doi:10.1128/MCB.22.22.7744
- Ivarsson, R., Jing, X., Waselle, L., Regazzi, R., & Renström, E. (2005). Myosin 5a Controls Insulin Granule Recruitment During Late-Phase Secretion. *Traffic*, 6(11), 1027-1035. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00342.x
- Jansen, R. P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., y Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell*, 84(5), 687–97.
- Johnston, G. C., Prendergast, J. A., y Singer, R. A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *The Journal of Cell Biology*, 113(3), 539-551.
- Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J., y Cooper, J. A. (2000). Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1727-1737.
- Kuroda, T. S., Ariga, H., y Fukuda, M. (2003). The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Molecular and cellular biology*, 23(15), 5245-5255. doi:10.1128/MCB.23.15.5245
- Lalli, G., Gschmeissner, S., y Schiavo, G. (2003). Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *Journal of Cell Science*, 116(22), 4639–50. doi:10.1242/jcs.00727
- Larson, R. E., Espindola, F. S., y Espreafico, E. M. (1990). Calmodulin-Binding Proteins and Calcium/Calmodulin Regulated Enzyme Activities Associated with Brain Actomyosin. *Journal of neurochemistry*, 54(4), 1288-1294.

- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J., y Barral, Y. (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell*, 112(4), 561–74.
- Lillie, S. H., y Brown, S. S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 125(4), 825–842.
- Lisé, M.-F., Wong, T. P., Trinh, A., Hines, R. M., Liu, L., Kang, R., Dustin, J., Lu, J., Goldring, J. R., Wang, Y. T., Goldenring, Y., y El-Husseini, A. (2006). Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3669–78. doi:10.1074/jbc.M511725200
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology* (4th ed.) New York, W. H. Freeman.
- Long, R. M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R. H., y Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *The EMBO Journal*, 19(23), 6592–601. doi:10.1093/emboj/19.23.6592
- López-Franco, R., Bartnicki-García, S., y Bracker, C. E. (1994). Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 12228-12232.
- Loubéry, S., y Coudrier, E. (2008). Myosins in the secretory pathway: tethers or transporters?. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(18), 2790–800. doi:10.1007/s00018-008-8350-5
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., y Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, 349(6311), 709-713.
- Molist, P., Pombal., M.A., Mergías, M. (2011, Mayo). *Citoesqueleto*. Recuperado el 04 de agosto de 2013 de <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/7-actina.php>
- Motegi, F., Arai, R., y Mabuchi, I. (2001). Identification of Two Type V Myosins in Fission Yeast , One of Which Functions in Polarized Cell Growth and Moves Rapidly in the Cell, 12, 1367–1380.
- Motegi, F., Arai, R., y Mabuchi, I. (2001). Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1367–80.
- Mulvihill, D. P., Pollard, P. J., Win, T. Z., y Hyams, J. S. (2001). Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. *Current Biology: CB*, 11(14), 1124–7.
- Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., y Izumi, T. (2002). Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Letters*, 517(1-3), 233–8.

- Nascimento, a a, Amaral, R. G., Bizario, J. C., Larson, R. E., y Espreafico, E. M. (1997). Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild-type cell line for the dilute gene. *Molecular Biology of the Cell*, 8(10), 1971–88.
- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., y Sakai, H. (1987). Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5262-5266.
- Novick, P., y Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell*, 40(2), 405-416.
- Odrionitz, F., y Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology*, 8(9), R196. doi:10.1186/gb-2007-8-9-r196
- Otterbein, L. R., Graceffa, P., y Domínguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science*, 293(5530), 708-711.
- Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Brautigam, C. A., King, D. S., y Rosen, M. K. (2011). Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), E472-E479.
- Pan, X., y Goldfarb, D. S. (1998). YEB3/VAC8 encodes a myristylated armadillo protein of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane that functions in vacuole fusion and inheritance. *Journal of Cell Science*, 111(15), 2137-2147.
- Papadopulos, A., Tomatis, V. M., Kasula, R., y Meunier, F. a. (2013). The Cortical Acto-Myosin Network: From Diffusion Barrier to Functional Gateway in the Transport of Neurosecretory Vesicles to the Plasma Membrane. *Frontiers in Endocrinology*, 4. doi:10.3389/fendo.2013.00153
- Pashkova, N., Catlett, N. L., Novak, J. L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R. E., y Weisman, L. S. (2005). Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *The Journal of Cell Biology*, 168(3), 359–364. doi:10.1083/jcb.200407146
- Pashkova, N., Catlett, N. L., Novak, J. L., y Weisman, L. S. (2005). A point mutation in the cargo-binding domain of myosin V affects its interaction with multiple cargoes. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 787–798. doi:10.1128/EC.4.4.787
- Pashkova, N., Jin, Y., Ramaswamy, S., y Weisman, L. S. (2006). Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. *The EMBO Journal*, 25(4), 693–700. doi:10.1038/sj.emboj.7600965
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., y Lippincott-Schwartz, J. (2007). *Cell biology*. Elsevier Health Sciences.
- Provance, D. W., James, T. L., y Mercer, J. a. (2002). Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(2), 124–32.

- Provance, D. W., Wei, M., Ipe, V., y Mercer, J. A. (1996). Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14554–8.
- Rasband W.S. (1997–2012) *ImageJ*. Recuperado el 12 de enero de 2014 de: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Reck-Peterson, S. L., Provance, D. W., Mooseker, M. S., y Mercer, J. a. (2000). Class V myosins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1496(1), 36–51.
- Reichelt, S., y Kendrick-Jones, J. (2000). Myosins. In *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions* (pp. 29-44). Springer Netherlands.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., y Yao, X. (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Research*, 19(2), 271–3. doi:10.1038/cr.2009.6
- Rogers, S. L., Karcher, R. L., Roland, J. T., Minin, a a, Steffen, W., y Gelfand, V. I. (1999). Regulation of melanosome movement in the cell cycle by reversible association with myosin V. *The Journal of Cell Biology*, 146(6), 1265–76.
- Rossanese, O. W., Reinke, C. a, Bevis, B. J., Hammond, a T., Sears, I. B., O'Connor, J., y Glick, B. S. (2001). A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 153(1), 47–62.
- Ruiz-Herrera, J., Bracker, C. H. E., y Bartnicki-García, S. (1984). Sedimentation Properties of Chitosomes from *Mucor rouxii*. *Protoplasma*, 122(3), 178-190.
- Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.-G., y Jansen, R.-P. (2006). Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Current Biology : CB*, 16(15), 1538–43. doi:10.1016/j.cub.2006.06.025
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., y Bretscher, A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *The Journal of Cell Biology*, 147(4), 791–808.
- Schuchardt, I., Aßmann, D., Thines, E., Schuberth, C., y Steinberg, G. (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell*, 16(11), 5191-5201.
- Seiler, S., Plamann, M., y Schliwa, M. (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Current biology*, 9(15), 779-S1.
- Sellers, J. R., y Weisman, L.S. (2008). Myosin V. In: *Myosins A Superfamily of Molecular Motors* (pp. 289-323). Springer Netherlands.
- Shoji, J. Y., Arioka, M., y Kitamoto, K. (2006). Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryotic cell*, 5(2), 411-421.

- Song, B., Li, H.P., Zhang, J.B., Wang, J.H., Gong, A.D., Song, X.S., Chen, T., yLiao, Y.C. (2013). Type II myosin gene in *Fusarium graminearum* is required for septation, development, mycotoxin biosynthesis and pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 60–70. doi:10.1016/j.fgb.2013.02.010
- Springer, M.L., y Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 3(4), 559–571. doi:10.1101/gad.3.4.559
- Staiger, C.J., Goodbody, K. C., Hussey, P. J., Valenta, R., Drøbak, B. K., y Lloyd, C. W. (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *The Plant Journal*, 4(4), 631-641.
- Steinberg, G. (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell*, 6(3), 351–60. doi:10.1128/EC.00381-06
- Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E., y Seabra, M. C. (2002). A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25423–30. doi:10.1074/jbc.M202574200
- Tabb, J. S., Molyneaux, B. J., Cohen, D. L., Kuznetsov, S. a, y Langford, G. M. (1998). Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of Cell Science*, 111(21), 3221–34.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y., y Oakley, B. R. (2012). The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, 7(2), e31218. doi:10.1371/journal.pone.0031218
- Takagishi, Y., Oda, S. I., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., y Yamamura, H. (1996). The dilute-lethal (*d^l*) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neuroscience letters*, 215(3), 169-172.
- Takizawa, P. a, y Vale, R. D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5273–8. doi:10.1073/pnas.080585897
- Tang, F., Kauffman, E. J., Novak, J. L., Nau, J. J., Catlett, N. L., y Weisman, L. S. (2003). Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature*, 422(6927), 87-92.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., y Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 144(1), 45-53.
- Tóth, J., Kovács, M., Wang, F., Nyitray, L., y Sellers, J. R. (2005). Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30594–30603. doi:10.1074/jbc.M505209200

- Varadi, A., Tsuboi, T., y Rutter, G. A. (2005). Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 β -cells. *Molecular biology of the cell*, 16(6), 2670-2680.
- Wagner, W., Brenowitz, S. D., y Hammer, J. A. (2011). Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nature Cell Biology*, 13(1), 40–8. doi:10.1038/ncb2132
- Wang, Y. X., Catlett, N. L., y Weisman, L. S. (1998). Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *The Journal of Cell Biology*, 140(5), 1063–74.
- Weber, I., Gruber, C., y Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 15(12), 2826–2842. doi:10.1105/tpc.016246.mation
- Wei, Q., Wu, X., y Hammer, J. A. (1997). The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 18(5), 517–27.
- Win, T. Z., Gachet, Y., Mulvihill, D. P., May, K. M., y Hyams, J. S. (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *Journal of cell science*, 114(1), 69-79.
- Woo, M., Lee, K., y Song, K. (2003). MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), 195–202.
- Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., y Hammer J.A. (1998). Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *The Journal of Cell Biology*, 143(7), 1899–918.
- Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., y Hammer, J. A. (1997). Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *Journal of Cell Science*, 110(7), 847–859.
- Wu, X., Sakamoto, T., Zhang, F., Sellers, J. R., y Hammer, J. A. (2006). In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va. *FEBS Letters*, 580(25), 5863–5868. doi:10.1016/j.febslet.2006.09.047
- Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J. R., y Hammer, J. A. (2002). Rab27a Is an Essential Component of Melanosome Receptor for Myosin Va, 13(5), 1735–1749. doi:10.1091/mbc.01
- Xiang, X., y Plamann, M. (2003). Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 628–633. doi:10.1016/j.mib.2003.10.009

- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A, Ha, T., Goldman, Y. E., y Selvin, P. R. (2003). Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, *300*(5628), 2061–2065. doi:10.1126/science.1084398
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C., y Bretscher, A. (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, *406*(6799), 1013-1015.
- Yoshimura, A., Fujii, R., Watanabe, Y., Okabe, S., Fukui, K., y Takumi, T. (2006). Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Current Biology*, *16*(23), 2345–2351. doi:10.1016/j.cub.2006.10.024
- Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A., y Xiang, X. (2011). *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS ONE*, *6*(12), e28575. doi:10.1371/journal.pone.0028575

Apéndice

Apéndice 1. Porcentaje de identidad entre el dominio motor y los motivos IQ de la MYO-5 de *N. crassa* y los de la miosina de *A. nidulans* y los de las miosinas de *S. cerevisiae*

Tabla A1. Porcentaje de identidad entre el dominio motor y los motivos IQ

Organismo	Proteína completa	Fragmento S1	Dominio motor	Motivos IQ					
				1	2	3	4	5	6
An MyoE	77%	61%	83%	100%	50%	82%	35%	62%	73%
Sc Myo2p	47%	36%	63%	65%	0%	0%	-	-	80%
Sc Myo4p	41%	35%	58%	52%	-	0%	-	64%	-

Apéndice 2. Similitud entre el dominios globulares de unión a carga, así como de los sitios de unión a vacuolas y vesículas de la MYO-5 de *N. crassa* con *A. nidulans* y *S. cerevisiae*.

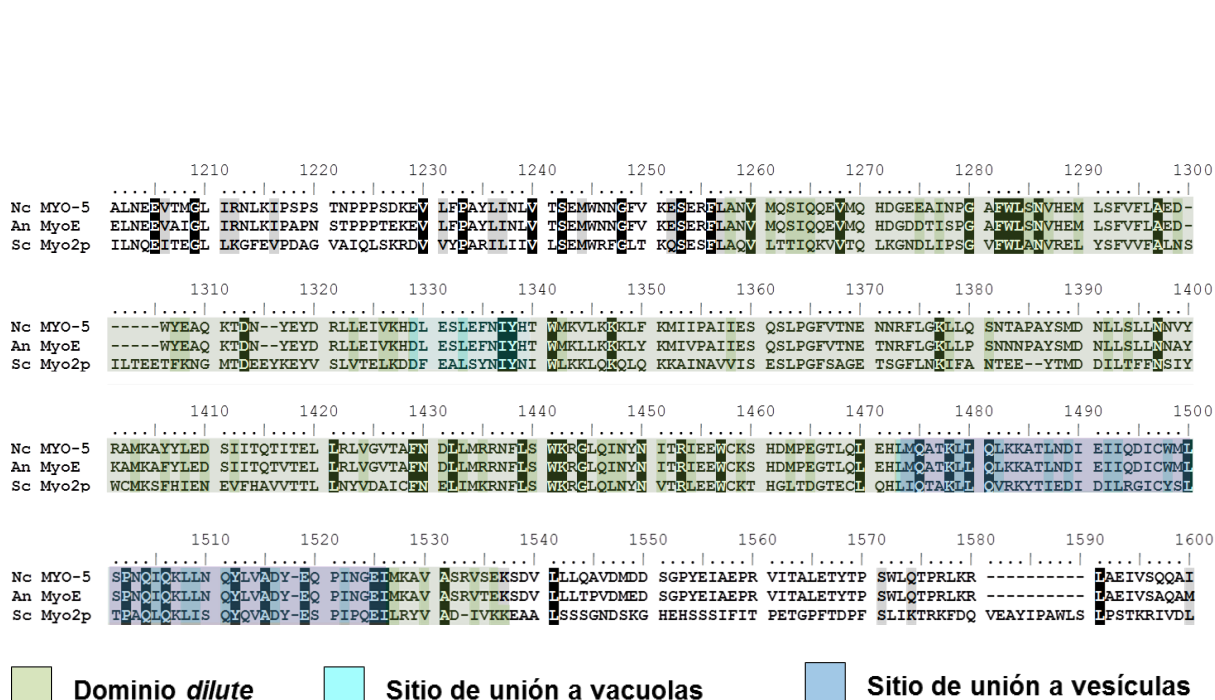


Figura A2. Alineamiento del dominio *dilute* y los sitios de unión a una carga específica con los de *A. nidulans* y *S. cerevisiae*.

Tabla A2. Porcentaje de identidad del dominio *dilute* y el sitio de unión a vesículas y el de vacuolas de la MYO-5 de *N. crassa* con *A. nidulans* y *S. cerevisiae*

Organismo	Dominio <i>dilute</i>	Sitio de unión a vacuolas	Sitio de unión a vesículas
An MyoE	94%	100 %	100 %
Sc Myo2p	46 %	55 %	57%