

Tesis defendida por
Ramón Osvaldo Echaury Espinosa
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García
Miembro del Comité

Dr. Meritxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dr. Robert W. Roberson
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador del Posgrado en
Ciencias en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de la Dirección de Estudios
de Posgrado

Diciembre 2013

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

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 crasa*

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Doctor en Ciencias
Presenta:

Ramón Osvaldo Echauri Espinosa

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Ramón Osvaldo Echaury Espinosa, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

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*

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

El citoesqueleto de actina es un elemento clave en el crecimiento polarizado en las células fúngicas. Este citoesqueleto es altamente dinámico, regulado por una gran diversidad de proteínas denominadas ABPs (Proteínas de unión a actina), entre las cuales se encuentran las miosinas y la coronina. Las miosinas son proteínas motoras encargadas de generar fuerza motriz dentro de la célula. Por otro lado, la coronina regula la tasa de recambio entre actina filamentosa y monomérica a través de la regulación de un nucleador de actina llamado Arp2/3. MYO-5-GFP, MYO-2-GFP y CDC-4-GFP se localizaron en el Spk. MYO-5-GFP ocupó una mayor porción del Spk que aquella teñida por el colorante FM4-64. MYO-2-GFP se localizó sólo en la región central del Spk y CDC-4 colocalizó con el Spk en su totalidad al mismo tiempo que se encontró en el domo apical en forma de media luna. El efecto de citocalasina A y benomilo en la localización de estas proteínas reveló que son dependientes de actina y no de microtúbulos. Durante la formación de septos, MYO-2 y CDC-4 se encontraron en forma de filamentos los cuales viajan desde las regiones basales hasta el sitio donde se dará la formación del anillo contractil de actomiosina (CAR) y permanecieron allí hasta la formación del septo. Por su parte, MYO-5 no se encontró en forma de filamentos más si se localizó en el septo. Por otro lado la coronina-GFP se localizó en forma de parches, formando un anillo subapical. Estos parches subapicales de coronina co-localizaron con la fimbrina, con el complejo Arp2/3 y con actina. La delección de *crn-1* afectó la velocidad de crecimiento y la morfología hifal. La dinámica y localización de actina se vio afectada así como la internalización del colorante FM4-64 se vio retrasada en comparación con una cepa silvestre, lo que indica una alteración del proceso endocítico. El análisis de la dinámica de las Rho-GTPasas CDC-42 y RAC etiquetadas con YFP en la mutante $\Delta crn-1$ reveló que estos marcadores de polaridad y secreción normalmente localizados adelante del anillo endocítico subapical, se desplazan llegando a observarse posteriores a este. La coronina al parecer mantiene en equilibrio al aparato endocítico en la zona subapical, permitiendo una delimitación clara entre las zonas apical (exocítica) y subapical (endocítica) y un crecimiento apical constante.

Palabras clave: **Crecimiento Polarizado, Actina, Miosina, Coronina**

Abstract of the thesis presented by Ramon Osvaldo Echauri Espinosa as a partial requirement to obtain the Doctor in Science degree in Life Science with orientation in Microbiology

Localization and dynamics of the myosin proteins of class II (MYO-2), class V (MYO-5), myosin light chain (CDC-4) and coronin (*CRN-1*) in the filamentous fungi *Neurospora crassa*.

Abstract approved by:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

The actin cytoskeleton is a key element in polarized growth. Actin is a highly dynamic component regulated by a great diversity of proteins called ABPs (Actin Binding Proteins), which include myosin and coronin. Myosin are motor proteins that generate motive power within the cell. Coronin proteins regulate actin turnover through regulation of the Arp2/3 complex. MYO-5-GFP, MYO-2-GFP and CDC-4-GFP were localized in the hyphal apex co-localizing with the Spk. MYO-5-GFP cover a wider area than that of the Spk labeled with FM4-64. MYO-2-GFP had a more restricted localization, at the center of the Spk. CDC-4 colocalized with the entire Spk and also was found at the apical dome in the form of a crescent. Cytochalasin A and benomyl treatments showed that myosins require the actin but not the microtubular cytoskeleton to reach the tip. Before septum formation, MYO-2-GFP and CDC-4-GFP were found forming filaments prior to the construction of the actomyosin ring. Both proteins move from previous sites of septation to new septation places. MYO-5-GFP was observed only after the actomyosin ring was formed and all myosins remained at the septum until its synthesis was completed. *CRN-1*-GFP was localized in patches, forming a subapical collar near the hyphal apex; significantly, it was absent from the apex. The subapical patches of coronin co-localized with fimbrin, Arp2/3 complex, and actin, altogether they comprise the endocytic collar. Deletion of *crn-1* resulted in reduced hyphal growth rates, distorted hyphal morphology and uneven wall thickness; it also affected growth directionality and increased branching. The Spk of $\Delta crn-1$ mutant was unstable giving rise to periods of polar and isotropic growth. Uptake delay of FM4-64 in the $\Delta crn-1$ mutant indicated a partial disruption in endocytosis. Observation of the dynamics of the so-called polarity markers CDC-42 and RAC labeled with YFP, normally located in front of the subapical ring, changed their location to areas posterior to this ring. These observations underscore coronin as an important component of F-actin remodeling in *N. crassa*. Although coronin is not essential in this fungus, its deletion influenced negatively the operation of the actin cytoskeleton involved in the orderly deployment of the apical growth apparatus, thus preventing normal hyphal growth and morphogenesis.

Keywords: **Polarized Growth, Actin, Myosin, Coronin**

Dedicatorias

a mi familia

Agradecimientos

Quiero dar las gracias en primer lugar al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyar la investigación científica y a los estudiantes de posgrado a través de becas. Así como también a la institución receptora CICESE, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirnos realizar nuestros estudios de posgrado.

También quiero agradecer a la Dra. Rosa R. Mouriño Pérez y al Dr. Salomón Bartnicki García por su apoyo, sugerencias y el constante empuje y aliento brindado para la realización y termino de este posgrado. A cada uno de los miembros de mi comité de tesis la Dra. Meritxell Riquelme Pérez, Dra. Ernestina Castro Longoria y Dr. Robert W. Roberson por todo su apoyo, aportaciones, sugerencias y comentarios brindados para la realización de este trabajo.

Gracias también a Olga Callejas, que siempre apoya a todos los estudiantes sin excepción alguno. Y no podían faltar a mis padres Amalia Espinosa y Ramón Echaury por su gran apoyo y amor incondicional a lo largo de todos estos años de formación académica y personal, por ser siempre constantes y por mostrar esa gran dedicación a pesar de los tropiezos que hemos dado juntos, los amo y gracias, sin ellos nada de esto sería posible

Contenido

Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Capítulo 1.....	1
1. Introducción.....	1
Capítulo 2.....	5
2. Antecedentes.....	5
2.1. Actina.....	5
2.2. Miosinas.....	7
2.3. Coronina.....	12
Capítulo 3.....	15
3. Hipótesis.....	15
3.1. Miosinas.....	15
3.2. Coronina.....	15
Capítulo 4.....	16
4. Objetivos.....	16
4.1. Objetivo General.....	16
4.2. Objetivos Específicos.....	16
Capítulo 5.....	17
5. Materiales y Métodos.....	17
5.1. Cepas de <i>Neurospora crassa</i>	17
5.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	18
5.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	18
5.3.1. Hongos.....	18
5.3.2. Bacterias.....	19
5.4. Ensayos en biología molecular.....	19
5.4.1. Diseño de oligonucleótidos y vectores de clonación.....	19
5.4.2. Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	20
5.4.3. Separación de DNA mediante electroforesis.....	20
5.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
5.4.5. Transformación genética de <i>E. coli</i>	21
5.4.6. Purificación de DNA plasmídico.....	22
5.4.7. Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	22
5.4.8. Ligación de fragmentos de DNA a vectores de clonación.....	23
5.4.9. Selección y verificación de clones positivas.....	23
5.4.10. Transformaciones en <i>N. crassa</i>	24
5.4.11. Recuperación de transformantes de <i>N. crassa</i>	25
5.5. Cruzas.....	25
5.6. Análisis bajo microscopía.....	26
5.6.1. Microscopía de alto aumento.....	26
5.6.2. Dobles marcapos.....	26
5.6.3. Utilización de colorantes y drogas inhibidoras del citoesqueleto.....	27

5.6.4. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión	27
Capítulo 6.....	29
6. Resultados	29
6.1. Miosinas.....	29
6.1.1. CDC-4-GFP:.....	29
6.1.2. Myo-2 GFP	38
6.1.3. Miosina clase V (Myo-5).....	42
6.2 Coronina.....	46
6.2.1 Coronina marcada con GFP (CRN-1-GFP).....	46
6.2.2 Mutante de coronina	51
6.2.3. Mutante de Δ crn-1 y endocitosis.	54
6.2.4. Dinámica de GTPasas dentro del domo apical de la mutante Δ crn1	56
Capítulo 7.....	60
7. Discusión.....	60
7.1 Miosinas en <i>N. crassa</i>	60
7.2 Miosinas en el ápice.....	60
7.3 Miosinas en el septo	63
7.2 Coronina.....	65
7.2.1 Coronina y ABPs son un componente del collar subapical endocítico.....	65
7.2.2 Consecuencias morfogénicas de la delección de coronina	66
7.2.3 Coronina es necesaria para la estabilidad y prevalencia del Spk	67
7.2.4. ¿Están la exocitosis y la endocitosis ligadas?.....	68
7.2.5 Dos citoesqueletos de actina funcionalmente diferentes durante el crecimiento hifal	69
7.3. Conclusiones.....	72
7.3.1 Miosinas.....	72
7.3.2 Coronina.....	72
8. Referencias bibliográficas	73

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema de los dominios de la miosinas V de ratón. Modificado de Hodge y Cope, 2000.	7
2	La proteína CDC-4 se localiza en el ápice.	31
3	Efecto de drogas despolimerizantes del citoesqueleto de actina y microtúbulos en la distribución de CDC-4-GFP.	32
4	CDC4-GFP durante la formación del septo..	33
5	CDC4-GFP está presente en forma de parches durante la formación del septo desde antes de la formación del CAR.	34
6	Localización de CDC4-GFP durante la constricción del CAR en la formación del septo.	35
7	Localización de CDC-4-mChFP y actina marcada con Lifeact-GFP en la región apical y subapical.	36
8	CDC-4-mChFP y actina (Lifeact-GFP) en el septo.	37
9	Imagen de Myo2-GFP en la zona apical.	39
10	Imagen de MYO-2-GFP durante la formación del septo.	40
11	Efecto de la despolimerización del citoesqueleto microtubular y de actina en la localización de MYO-2-GFP.	41
12	Localización de MYO-5-GFP en el ápice.	43
13	Localización de MYO-5-GFP durante la formación de un septo.	44
14	Efecto de drogas despolimerizantes del citoesqueleto microtubular y de actina en la distribución de MYO-5-GFP.	45
15	Distribución de <i>CRN-1</i> -GFP.	47
16	Co-expresión de <i>CRN-1</i> -mChFP con fimbrina, el complejo Arp2/3 y actina.	49
17	Efecto de los agentes despolimerizantes del citoesqueleto de	50

actina y microtúbulos en la distribución de *CRN-1*-GFP.

18	Fenotipo de la mutante $\Delta crn-1$.	53
19	Dinámica del collar endocítico y el comportamiento del Spk en la mutante $\Delta crn-1$.	54
20	Internalización del colorante lipofílico FM4-64 en la mutante $\Delta crn-1$ y cepa silvestre.	55
21	Comportamiento de la proteína Cdc42-YFP en la cepa mutante $\Delta crn-1$.	57
22	Marcador de GTPasas CRIB en la mutante $\Delta crn-1$.	58
23	Modelo de la dinámica de GTPasas activadas Cdc-42 y RAC en la mutante $\Delta crn-1$.	59

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Genes para miosinas encontrados en el genoma de <i>N. crassa</i> y sus homólogos en <i>A. nidulans</i> .	9
2	Cepas de <i>N. crassa</i> , plásmidos y oligonucleótidos	17

Capítulo 1

1. Introducción

Los hongos, son un reino del cual se ha sugerido existen alrededor de 1.5 a 5 (O'brien et al., 2005) millones de especies, de las cuales, tan solo el 10% ha sido descrita (Hawksworth, 2001). Estos organismos, divergieron de los animales un poco después que las plantas, hace alrededor de 1 – 1.5 millones de años, lo que les confiere características muy similares a los animales (Heckman et al., 2001).

Los hongos tienen un gran impacto en los ecosistemas. Los saprófitos son el principal grupo de organismos responsable de la degradación de materia orgánica muerta en el planeta, siendo esenciales para el reciclamiento de nutrientes, especialmente el carbón (Carlile et al., 2001). Asimismo, las micorrizas, son hongos que tienen asociaciones simbióticas con raíces de plantas superiores, confiriéndoles mejores condiciones de nutrición, crecimiento y salud (Brundrett, 2004). Otro aspecto de los hongos que resulta negativo para los humanos, es su capacidad de producir enfermedades diversas (Latgé, 1999). Adicionalmente, los hongos también son utilizados en la industria como productores de enzimas y metabolitos secundarios para uso humano (Conesa et al., 2001; Punt et al., 2002).

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es un hongo que crece naturalmente en lugares tropicales y sub-tropicales. Se le puede encontrar creciendo en materia en descomposición; principalmente después de incendios. El nombre del género se refiere a la forma característica de las estrías que tienen las ascosporas (Davis & Perkins, 2002). Hoy día, este hongo es considerado un organismo modelo, por lo que es extensivamente estudiado para entender fenómenos biológicos particulares, donde los descubrimientos hechos son aplicados a otros organismos.

Neurospora crassa se ha utilizado en una gran diversidad de investigaciones científicas en todo el mundo; como por ejemplo, estudios moleculares involucrados en ritmos circadianos, epigenética y silenciamiento de genes, hasta polaridad,

fusión y morfogénesis celular entre otros (Cogoni & Macino, 1999; Riquelme et al., 2002; Castro-Longoria et al., 2007; Smith et al., 2008). Actualmente se tiene disponible el genoma completo de este hongo (Galagan et al., 2003).

Las células de los hongos filamentosos son llamadas hifas. Estas son estructuras alargadas envueltas por pared celular y tienen forma de filamentos cilíndricos que crecen, ramifican y se fusionan entre sí para formar una red circular interconectada de hifas llamada micelio. Para formar estas células tubulares, los hongos filamentosos crecen en forma polarizada; este tipo de crecimiento es también encontrado en otros organismos, como los tubos de polen de plantas vasculares, los rizoides de algas, los axones y dendritas neuronales de células de mamíferos, entre otros (Heath, 1990; Geitman et al., 2001; Libbrecht et al., 2001; Momany, 2002; Campanoni et al., 2007). Este tipo de crecimiento característico de hongos filamentosos, se da a través de la elongación de la punta de la hifa de manera constante. Para que este tipo de crecimiento se lleve a cabo de forma continua, se requiere de la incorporación de materiales necesarios para construir la pared celular, la cual envuelve la membrana plasmática de la célula. Esto involucra un acarreamiento masivo de vesículas exocíticas que acarrear enzimas que contribuyen a la síntesis de polímeros que forman la pared celular (Heath, 1990; Heath y Steinberg, 1999). Para coordinar el proceso de secreción, en el ápice se localiza generalmente una acumulación de vesículas que es muy característica y de la cual depende la polarización del crecimiento, a esta parte del aparato secretor se le denomina Spitzenkorper (Spk) (Bartnicki-García, 2002 y referencias incluidas). Adicionalmente al Spk existen otros complejos proteicos que regulan la secreción como el polarisoma y los marcadores celulares terminales (proteínas de acoplamiento de vesículas) localizados en la corteza celular (Virag & Harris, 2006; Park & Bi, 2007; Araujo-Palomares et al., 2009). Se ha demostrado que la localización y posicionamiento del Spk es de vital importancia para la dirección del crecimiento polarizado (Riquelme et al., 1998) y que el citoesqueleto de actina, tiene una participación importante en la estabilidad de este cuerpo apical (Delgado-Álvarez et al., 2010) y participa en distintos procesos celulares,

entre los que se encuentran la morfogénesis, el crecimiento apical, el transporte intracelular de organelos y macromoléculas así como en el proceso de diferenciación (Bartnicki-García, 2002; Walther & Wendland, 2003; Walker & Garrill, 2006; Delgado-Álvarez et al 2010). Además, está involucrado en el tráfico de membrana, incluyendo la exocitosis y la endocitosis (Chimini et al., 2000; Moseley & Goode, 2006).

El citoesqueleto de actina tiene la particularidad de ser altamente dinámico, forma estructuras simples o de alto orden, dependiendo de las necesidades celulares. Las estructuras hechas de actina pueden ser cables contráctiles que permiten la acción de jalar o impulsar, redes compuestas por cables flexibles que permiten expandir o invaginar la membrana plasmática, cables rígidos que sirven de soporte, filamentos flexibles que sirven en la formación de parches o anillos que sirven para constreñir la membrana plasmática. Todas estas estructuras dependen de las Proteínas de Unión a Actina (ABPs por sus siglas en inglés) con las que se asocia la actina (Winder & Ayscough, 2005; Uetrecht & Bear, 2006; Moseley & Goode, 2006).

Con respecto a las estructuras de actina en hongos filamentosos, dentro de los diversos arreglos, se han podido reconocer en las hifas dos regiones donde la actina está presente y que impactan notoriamente en el crecimiento de las células. Una región es el ápice, en la que se observa una acumulación de actina, probablemente de filamentos (Taheri-Talesh et al., 2008; Delgado-Álvarez et al., 2010), que ocupa el núcleo del Spk y que apoya la exocitosis y otra más en el subápice donde se han observado parches corticales que conforman un collar que contiene proteínas reconocidas por su participación en la endocitosis (Araujo-Bazán et al., 2008; Upadhyay & Shaw, 2008; Delgado-Álvarez et al., 2010). La cercanía de estas estructuras, hacen pensar que la exocitosis y la endocitosis son procesos que están cercanamente relacionados, porque mientras en el ápice hay una secreción masiva de vesículas, en el subapice se puede recuperar el exceso de membrana que se produce durante la exocitosis. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre esta relación y sobre el papel de algunas ABPs tanto en el

proceso de exocitosis como de endocitosis. Algunos ejemplos de estas ABPs, de las que se conoce poco son las miosinas y la coronina; las primeras son un grupo muy importante de proteínas encargadas de generar fuerza motriz dentro de la célula y son denominadas proteínas motoras (Utrecht & Bear, 2006). La coronina está localizada en sitios de alta remodelación dinámica de actina y en parches endocíticos (Winder & Ayscough, 2005; Moseley & Goode, 2006).

Por todo lo anterior se realizó un estudio sobre estas ABPs (miosinas (MYO-5, MYO-2 y CDC-4) y coronina), para conocer su dinámica y localización y observar con que estructuras de la maquinaria exocítica y endocítica se encuentran asociadas en el hongo filamentoso *N. crassa*.

Capítulo 2

2. Antecedentes

2.1. Actina

La actina puede encontrarse de forma monomérica, llamada G-actina (42 kD), o polimerizada formando microfilamentos (F-actina) de 7 nm de grosor. Cada monómero de actina tiene una hendidura con un sitio de alta afinidad a adenosín tri-fosfato (ATP), y en este sitio se une al siguiente monómero de actina en un ángulo que determina la distribución helicoidal de los filamentos de actina. Ya que todos los monómeros de un microfilamento apuntan hacia el mismo extremo, se dice que el polímero presenta polaridad en su estructura. El extremo del microfilamento, donde los sitios de unión a ATP están expuestos, es considerado como el polo negativo (-), y el extremo opuesto es el positivo (+). La polimerización de actina ocurre en dirección al extremo (+), del lado opuesto a la hendidura del último monómero del filamento (Lodish et al., 2004).

Los monómeros de actina se ensamblan por enlaces de tipo no covalentes para formar microfilamentos. Los enlaces débiles entre los monómeros mantienen la ventaja de que los extremos del filamento pueden liberar o incorporar fácilmente nuevas moléculas, de manera que se pueden remodelar rápidamente y cambiar la estructura celular de la que son responsables en respuesta a estímulos ambientales (Alberts et al., 2004).

Aunque la actina hidroliza ATP, se ha observado que esto no interviene en el ensamblaje, puesto que, por una parte, la hidrólisis se produce en gran medida en sitios centrales del filamento y no en los extremos. El ciclo de actina que liga la hidrólisis de ATP y la polimerización de actina, consiste en la adición de monómeros de G-actina preferentemente en el extremo positivo y, el simultáneo desensamblaje de F-actina-ADP en monómeros en el extremo negativo, donde el ADP es subsecuentemente fosforilado a ATP, cerrando así un ciclo. La energía de

la hidrólisis se utiliza para crear un verdadero 'estado estacionario', es decir, de un flujo en lugar de un simple equilibrio, el cual es dinámico, polar y con gran fuerza de tracción al filamento. Esto justifica el gasto de energía por la ganancia de funciones biológicas esenciales. Además, la configuración de los distintos tipos de monómeros es detectada por las proteínas de unión a actina que controlan el ciclo de la actina (Lodish et al., 2004; Alberts et al., 2004). La hidrólisis del ATP causada por la polimerización de actina y la disociación del fósforo, son considerados un temporizador interno que indican el tiempo de vida de un filamento, detonando procesos de desensamble de los filamentos de actina en la célula (Carlier et al., 1988). La hidrólisis de ATP es irreversible y llega a tener un tiempo medio de hasta ~2 s (Blanchoin & Pollard, 2002). Por otro lado la disociación de fosforo posee un tiempo medio de 350 s, haciéndolo un intermediario relativamente longevo en filamentos de actina recién ensamblados (Carlier & Pantaloni, 1986). Todo esto aporta al citoesqueleto de actina la gran facilidad de formar varias estructuras dependiendo de las necesidades celulares. La actina en forma de cables contráctiles que permiten la acción de jalar o impulsar; también forma redes compuesta por cables flexibles que permiten expandir o invaginar la membrana plasmática, forma cables rígidos que sirven de soporte y filamentos flexibles que sirven en la formación de parches o anillos los cuales sirven para constreñir la membrana plasmática.

Para que estas estructuras se formen, la polimerización y despolimerización de los monómeros de actina en filamentos, así como la asociación de estos filamentos en forma de cables o redes o en asociación con la membrana plasmática u otro citoesqueleto, es regulada por una gran diversidad Proteínas de Unión a Actina (ABPs por sus siglas en inglés). Entre ellas tenemos a la coronina, localizada en sitios de alta remodelación dinámica de actina y en parches endocíticos. Otro grupo muy importante de proteínas de unión a actina encargadas de generar fuerza motriz dentro de la célula, denominadas proteínas motoras, son las miosinas (Dos Remedios et al., 2003; Winder & Ayscough, 2005; Moseley & Goode, 2006; Walker & Garrill, 2005).

2.2. Miosinas

Las miosinas son una familia sumamente diversa de motores moleculares que aparecieron durante las primeras etapas de la evolución de los eucariotas. Durante mucho tiempo, el término 'miosina' aplicaba solo a aquellos filamentos bipolares delgados de células musculares ('mio' del griego músculo) y de hendiduras citocinéticas. Con base a esta definición, se han descrito bioinformáticamente otras miosinas en diversos organismos y células especializadas, que tienen un dominio motor canónico de 80 kDa (Goodson & Dawson, 2006).

La mayoría de las miosinas están organizadas en tres dominios: cabeza, cuello y cola (Figura 1).

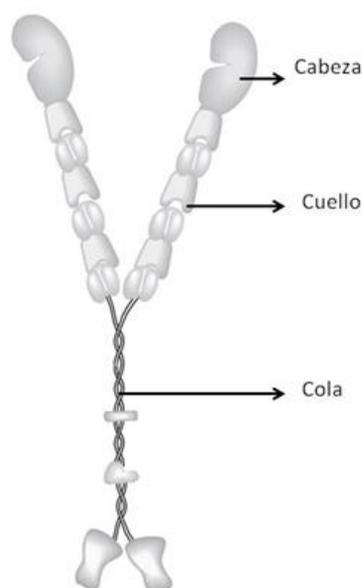


Figura 1. Esquema de los dominios de la miosinas V de ratón. Modificado de Hodge & Cope, 2000, 3353–3354.

A) Cabeza: este dominio N-terminal (dominio motor) se ancla a los filamentos de actina y utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para generar la fuerza necesaria para 'caminar' sobre el filamento en dirección a la terminal

positiva. La miosina VI es la única que se mueve en dirección a la terminal negativa.

B) Cuello: este dominio actúa como enlazador y nivelador de la fuerza generada por el dominio catalítico. Posee uno o varios motivos IQ (isoleucina, glutamina) de unión a cadmodulina y otros tipos de proteínas. También puede servir de sitio de anclaje para miosinas esenciales de cadena ligera (ELC de sus siglas en inglés 'essential light chains'), y miosinas regulatorias de cadena ligera (RLG de sus siglas en inglés 'regulatory light chains'), las cuales son otras proteínas distintas que forman parte de un complejo macromolecular que generalmente posee funciones de regulación.

C) Cola: este dominio C-terminal es el responsable de acoplarse con 'la carga' (vesículas) o con otras subunidades de otras miosinas. Las colas de las miosinas poseen secuencias heptadas repetidas que permiten la formación de α -hélices. Es en esta región donde sucede la dimerización de las cadenas pesadas, dando como resultado la formación de dos cabezas motoras

Las miosinas están categorizadas en diferentes clases dependiendo de su estructura general, la cual va a determinar su función. En la actualidad hay 35 clases de miosinas. Organismos unicelulares, como las levaduras, expresan solo una cantidad mínima de miosinas requeridas para mantener sus funciones celulares básicas (Borkovich et al., 2004; Moseley & Goode, 2006). Para *Saccharomyces cerevisiae* se conocen cinco miosinas de tres clases diferentes. El nematodo *Caenorhabditis elegans* tiene al menos 15 genes de miosinas representando siete clases. El genoma humano incluye 40 genes de miosinas en 12 clases (Hodge & Cope, 2000; Borkovich et al., 2004). Para *N. crassa* se tienen descritas en el Neurospora Data Base del Broad Institute, cinco genes relacionados a miosinas (Tabla I):

Tabla I: Genes para miosinas encontrados en el genoma de *N. crassa* y sus homólogos en *A. nidulans*.

<i>Neurospora crassa</i>			<i>Aspergillus nidulans</i>		
Numero de locus	Descripción	Tamaño pb	Numero de locus	Descripción	Tamaño pb
NCU00551	Proteína similar a miosina de clase II	8,266*	AN4706	miosina clase II	7428
NCU01440	Miosina-2 (Clase V)	7,020*	AN8862	Miosina clase V	5000
NCU06617	Regulador de miosina de cadena ligera CDC4	1,498*	AN6732	Beta-cadmodulina	1166
NCU01413	Mcl1: similar a cadena de miosina de clase I	3,248	AN1424	Proteína hipotética	2163
NCU02111	Proteína similar a miosina de clase I	4,592	AN1558	Miosina 1	3771

(*) Miosinas estudiadas en este trabajo.

El primer miembro de la familia de miosinas en ser descrito fue la miosina de clase II. Una característica única de esta miosina es su capacidad de formar filamentos. Esta miosina es la conocida por ser la responsable de la contracción muscular. Esta se lleva a cabo bajo el modelo de acción de filamentos deslizantes, donde filamentos bipolares de miosina inducen la contracción forzando dos filamentos de actina de polaridad opuesta a que se deslicen el uno sobre el otro, causando el acortamiento de la fibra muscular. Un mecanismo similar es el responsable de la migración celular y del control de la morfología de la célula (Krendel & Mooseker, 2005). Otro ejemplo de deslizamiento de filamentos se da durante la constricción del anillo de actina durante la citocinesis en levaduras. En *S. cerevisiae* se sabe que cada cadena pesada de la miosina de clase II, Myp1p, se une a dos cadenas ligeras; una ELC próxima a la cabeza de la miosina y una más que es de regulación, la cual queda debajo de la ELC. Esta interacción está mediada por dos motivos IQ en la cadena pesada. La región ELC es necesaria para la citocinesis en *Dictyostelium discoideum* y podría regular la actividad de

ATPasa de la cadena pesada (Pollenz et al., 1992). En *Schizosaccharomyces pombe* la ELC CDC-4p, también interactúa con la miosina de clase V MYO-51p (Luo et al., 2004). Taheri-Talesh et al. (2012) reportaron que esta miosina de clase II en *A. nidulans*, se localiza en el septo y que es esencial para la formación del mismo, así como también para la deposición normal de quitina pero no para la extensión polar de la hifa. Por otro lado en *N. crassa*, la miosina de clase II MYO-2 fue observada durante la formación de septos (Calvert et al., 2011). Sin embargo no se reportó durante la formación del entramado de cables de actomiosina (SAT por sus siglas en inglés 'septal actomyosin tangle') observado por Delgado-Alvarez (no publicado).

La miosina de clase V es de transporte, por ser una proteína motora procesiva, lo que quiere decir que mientras la miosina transporta su cargo a través de los filamentos de actina, está siempre se mantiene anclada a actina, caminando sobre los filamentos sin desprenderse de estos, lo que permite un transporte continuo de materiales. La proteína de levadura de clase V, Myo2p, actúa como transportador de vacuolas durante la gemación, asegurando el transporte de la vacuola de la célula madre a la célula hija. Una vez localizada la vacuola en la célula hija, la proteína Vac17p (encargada de anclar específicamente a Myo2p a la vacuola) es proteolíticamente degradada (Tang et al., 2003). En *Ustilago maydis*, se tiene reportado que esta proteína participa en el crecimiento polarizado transportando vesículas de forma anterógrada. En mutantes de proteínas motoras de microtúbulos (cinesina-1 y cinesina-3), el crecimiento polarizado aún se mantenía incluso después de prevenir cualquier transporte mediado por microtúbulos, lo que sugiere que Myo5 desempeña un papel muy importante en el mantenimiento del suministro de vesículas necesarias para la polaridad del crecimiento (Weber et al., 2003; Schuchardt et al., 2005). En mutantes UmMYO-5, donde se escindió el gen que codifica para Myo5, se observaron patrones de crecimiento erráticos así como una acumulación de depósitos irregulares de quitina a lo largo de la hifa por lo que se sugiere que esta miosina es requerida para el mantenimiento del crecimiento polarizado (Weber et

al., 2003). En *S. cerevisiae*, la miosina de clase V, Myo4p, es responsable del transporte de RNAm hacia la célula hija (Pruyne et al., 2004). En mamíferos, esta miosina se encuentra asociada a un complejo llamado CART (del inglés: cytoskeleton associated recycling or transport) el cual está implicado en el reciclamiento de receptores de membrana, su transporte hacia endosomas y de regreso hacia la membrana plasmática (Yan et al., 2005). En *A. nidulans*, MyoE se localiza en el Spk y en ciertas regiones del citoplasma, transportando lo que se creen son endosomas; también, se reportó que es indispensable para la localización en el ápice de SynA (una proteína v-SNARE, responsable del acoplamiento vesicular durante la exocitosis) (Taheri-Talesh et al., 2012).

Las miosinas de cadena ligera son distintas a las miosinas convencionales y poseen propiedades particulares, diferentes a las miosinas de cadena pesada. Estas no son consideradas 'miosinas' per se, son componentes de los complejos macromoleculares que forman a las miosinas convencionales (Kathleen et al., 1994). Estas proteínas se encargan de regular funciones tales como: actividad ATPasa, ensamblaje dimérico de las cadenas pesadas, anclaje a actina, fuerza de anclaje a actina, velocidad de deslizamiento de cables de actina, distancia de los pasos de la región motora sobre actina (Nurse et al., 1994; Trybus, 1994; Lou et al., 2004).

En *N. crassa* se ha identificado una proteína convencional de cadena ligera llamada CDC-4. En *S. pombe*, CDC4p es descrita como una proteína esencial para la contracción del anillo de acto-miosina. Este locus fue identificado por Nurse et al. (1994) en un tamizaje para mutantes que controlaran la división celular. Células que tenían este gen interrumpido o con mutaciones puntuales condicionales se volvían elongadas, acumulaban más de un núcleo y no se podían dividir. En estudios recientes, CDC4 se ha demostrado que es una miosina de cadena ligera con dos dominios conocidos por su anclaje a Ca⁺ denominado EF-hand (del inglés) con forma de cuña, donde se anclan las moléculas de calcio (McCollum et al., 1995). Se ha descrito que esta proteína puede anclarse a la región ELC y RLC de la miosina II (Desautels et al., 2001). Al mismo tiempo,

también se ha descrito que CDC4p puede variar en cuanto a su localización celular, estando presente a lo largo de toda la célula durante las fases previas a la división celular, donde cambia su localización a estar presente solo en el sitio donde se lleva a cabo la construcción del anillo contráctil (McCollum et al., 1995).

2.3. Coronina

La coronina es una proteína de unión a actina originalmente aislada de *D. discoideum* (de Hostos et al., 1991). Pertenece a la familia Triptófano-Aspartato-repetitiva (WD; Triptófano (Trp, W) Acido aspártico (Asp, D)) y juega un papel importante en varios procesos de regulación de actina (de Hostos, 1999; Uetrecht & Bear, 2006). La coronina posee cinco dominios, los cuales consisten en una extensión N-terminal (NE), un dominio de siete hojas β el cual posee unión a actina, una extensión C-terminal (CE) un dominio llamado región única (U) la cual se desconoce su función y varía entre las coroninas de distintos organismos, así como también posee un dominio con forma de espiral 'coiled-coil' (CC) el cual es de unión a actina (Uetrecht & Bear, 2006).

En levaduras, la coronina se localiza en la zona cortical, se encuentra asociada a parches de actina, e in-vitro se ancla a microfilamentos de actina con gran afinidad y promueve el rápido ensamblado y unión de estos. Los dominios que regulan esta actividad de la coronina son altamente conservados (Maniak et al. 1995; de Hostos 1999; Goode et al., 1999). La familia de las coroninas contiene en su región N-terminal el sitio de fosforilación CC que regula la interacción con proteínas tales como el complejo Arp2/3, al cual regulan mediante la inhibición de su actividad de nucleación (Machesky et al., 1997; Cai et al., 2005; Moseley & Goode, 2006). También posee una región característica WD40 repetitiva que es muy conocida en otras proteínas por regular interacciones proteína-proteína (de Hostos, 1999). La coronina también ha sido reconocida por tener la función de unir microfilamentos de actina y de unir microfilamentos de actina a microtúbulos (Goode et al., 1999). Asimismo se cree que la coronina también está involucrada en la modulación dinámica de actina (Gandhi et al., 2009). La regulación del papel

que desempeña el complejo Arp2/3 resulta sumamente importante ya que este complejo es crucial en la regulación de la polimerización de actina. Este complejo actúa asociándose a un lado del microfilamento creciente de actina, donde comienza a oligomerizar una especie de ramificación, formando un ángulo característico de 70° con respecto al filamento líder (Utrecht et al., 2006). Este complejo, también tiene la característica de servir como nucleador para la polimerización de microfilamentos de actina de novo, pero solo lo puede hacer para la formación de parches (Moseley y Goode et al., 2006).

La purificación de la coronina (Crn1p) en *S. cerevisiae*, demostró que ésta se ancla desde su dominio CC a la actina y entrelaza filamentos de actina ya sea en arreglos 'sueltos', en forma de filamentos pequeños sobrepuestos o en forma de paquetes o parches sencillos de filamentos largos (Goode et al., 1999). La sobreexpresión de *crn1* en levadura, causa un arresto de la célula durante su crecimiento, evitando que ésta continúe su desarrollo, sin embargo, este efecto puede ser revertido ya sea suprimiendo el dominio de unión a actina (ABD) o el dominio CC. La localización de Crn1p en los parches de actina depende también de estos dos dominios (Humphries et al., 2002). La delección del gen de la coronina en levadura no causa efecto aparente ya sea en el crecimiento celular, la morfología o la organización de la actina, lo que sugiere que las funciones que ésta lleva a cabo son redundantes con algún otro factor celular (Moseley & Goode, 2006). Sin embargo, la falta de *crn1* muestra defectos sinérgicos en el crecimiento celular y la organización de actina con mutaciones en la actina *act1-59* y *cof1-22* (Oku et al., 2003). Lo que sugiere que CRN1 puede promover el desensamblaje de actina en lugar de estabilizar los filamentos de actina (Goode et al., 1999). Las células que poseen un fenotipo mutado de la coronina, muestran defectos en locomoción, tasa de crecimiento y presentan una desorganización del citoesqueleto de actina (Utrecht et al., 2006).

La coronina parece estar asociada a casi todas las estructuras que contienen F-actina. Por lo que no es sorprendente observar que mutaciones en coronina, afectan todos aquellos procesos mediados por la actina (citocinesis,

movilidad celular, fagocitosis, endocitosis, exocitosis, micropinocitosis) (Maniak et al., 1995; Fukui et al., 1999).

Los mecanismos que son causantes de la activación del complejo de proteínas asociadas a actina (Arp 2/3) ha sido el enfoque de muchos estudios. La primer evidencia de interacción entre la coronina y el complejo Arp2/3 provino de la purificación del complejo de lisados de neutrófilos. La coronina 1A en humano fue identificada como una proteína co-purificada en esta preparación (Machesky et al., 1997). Esta observación fue confirmada y extendida en estudios en levaduras (Humphries et al., 2002).

Más evidencias de la interacción del complejo Arp2/3 con la coronina provienen de estudios con la Coronina 1B (Cai et al., 2005). Coronina endógena 1B puede ser co-inmunoprecipitada con el complejo Arp2/3 proveniente de una gran variedad de tipos celulares (Cai et al., 2005). Interesantemente, la interacción entre la Coronina 1B y el complejo Arp2/3 es regulada por la fosforilación de serina 2 de la Coronina 1B por medio de la proteína quinasa C (PKC) (Utrecht et al., 2006).

Capítulo 3

3. Hipótesis

3.1. Miosinas

Las miosina de clase II y clase V tienen una dinámica, localización y función diferente. Mientras que la miosina reguladora CDC-4 participa en las funciones de ambas miosinas.

3.2. Coronina

La coronina es un componente de los parches de actina donde se encuentra el complejo Arp2/3, y está asociada al collar endocítico en *N. crassa*.

Como la coronina se ha asociado a la endocitosis en otros organismos, la delección de esta proteína producirá ausencia o retraso en la endocitosis den *N. crassa*.

Capítulo 4

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

- Caracterizar la localización y dinámica de MYO-2, MYO-5, CDC-4 y *CRN-1* en hifas maduras de *N. crassa* durante el crecimiento polarizado y la formación de septos.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar si la MYO-2 y MYO-5 tienen localizaciones independientes.
- Identificar la localización de la CDC-4 y la interacción con cada una de las miosinas.
- Identificar la localización y dinámica de la coronina en relación a la actina, la fimbrina y el complejo Arp2/3.
- Evaluar el efecto de la mutación en el gen *crn-1* en la endocitosis y en el crecimiento polarizado
- Identificar el efecto de la mutación en el gen *crn-1* en la dinámica y localización del collar endocítico y en la estabilidad del Spk
- Identificar el efecto de la mutación en el gen *crn-1* en la dinámica y localización de marcadores exocíticos como las Rho GTPasas CDC-42 y RAC-1.

Capítulo 5

5. Materiales y métodos

5.1. Cepas de *Neurospora crassa*

Las cepas de *N. crassa* utilizadas en este trabajo se encuentran enlistadas en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *N. crassa*, plásmidos y oligonucleótidos

Nombre	Genotipo y descripción	Referencia
Cepas		
FGSC2225	<i>mat A</i> Silvestre	FGSC
FGSC9717	<i>mat A-Δmus⁻⁵¹-his-3</i>	FGSC
FGSC0202.4	<i>mat a Δcrn-1</i>	FGSC
TRM100-RE01	<i>mat A Δcrn-1; his-3</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM101-RE02	<i>mat A Δcrn-1; his-3⁺::Pccg-1-Lifeact-egfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM102-RE03	<i>mat A Δcrn-1; his-3⁺::Pccg-1-fim-1-sgfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM103-RE04	<i>mat A Δcrn-1 his-3⁺::Pccg-1-bml-1-sgfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM24-OC17	<i>mat A crn-1-sgfp- his-3⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM25-OC18	<i>mat A crn-1-mCherry⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM104-RE05	<i>mat A crn-1-mCherry⁺; his-3⁺::Pccg-1-Lifeact-egfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM105-RE06	<i>mat A crn-1-mCherry⁺; his-3⁺::Pccg-1-Lifeact-egfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM106-RE07	<i>mat A crn-1-mCherry⁺; mat A his-3⁺::Pccg-1-fim-1-sgfp⁺</i>	Echauri-Espinosa, 2012
TRM107-RE08	<i>mat a CDC-4-sgfp-his-3⁺</i>	Este trabajo
TRM108-RE09	<i>mat a CDC-4-sgfp</i>	Este trabajo
SMRP-298 clase V	<i>mat A Pmyo2-MYO-2::10xgly::sgfp::hph</i>	Sanchez-León no publicado
MYO-2-GFP clase II	<i>mat A MYO-2-sgfp</i>	Calver <i>et al.</i> , 2011
<i>yfp-cdc-42</i>	<i>mat A pgpd-yfp-cdc-42::his-3; Δcdc-42::hph_R A</i>	Araujo-Palomares, 2011
<i>yfp-rac</i>	<i>mat A pgpd-yfp-rac::his-3; Δrac::hph_R A</i>	Araujo-Palomares, 2011
Plásmidos		
pMF272	<i>Pccg-1-sgfp⁺</i>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
pRM-24-OC17	<i>Pccg-1-crn-1-sgfp⁺</i>	Este trabajo
pRM-25-OC18	<i>Pccg-1-crn-1-mCherry⁺</i>	Este trabajo
pRM-49-OC30	<i>Pccg-1-lifeact-egfp⁺</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010
pRM-08-D02	<i>Pccg-1-fim-sgfp⁺</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010
pLS-NG01	<i>Parp2-arp-2-sgfp⁺</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010
pMF309	<i>Pccg-1-bml-1-sgfp⁺</i>	Este trabajo
pRM-CDC-4	<i>Pccg-1-CDC-4-sgfp</i>	Este trabajo
Oligonucleótidos		
COR-XBAI F	5' GCTCTAGAATGCGCCGAAGCCAAGCC 3'	
COR-PACI R	5' CCTTAATTAACGACCTAGCAGCCTCGAGC 3'	
CDC-4-PAC F	5' GACTAGTATGGTAAGTGGACCTGTCC 3'	
CDC-4-SPE R	5' CCTTAATTAAGTTGGCAAGGATGGTC 3'	

Secuencia de enzimas de restricción en negritas

5.2. Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada en el presente trabajo fue DH5 α cuyo genotipo es F ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk, m+ k) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ - (Invitrogen®).

5.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

5.3.1. Hongos

Todas las cepas de *N. crassa* fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (MMV), el cual contiene, sales de Vogel 1X (Apéndice A), sacarosa 2% (w/v) y agua destilada (Vogel, 1956). En el caso de medio sólido se utilizó como agente solidificante agar (Agarmex) al 1.5%. En algunos ensayos se utilizó el aminoácido L-histidina (Calbiochem), el cual es un aminoácido básico que permite crecer a la cepa auxotrófica FGSC #9717. Antes de añadir el aminoácido al medio de cultivo se esterilizó por filtración utilizando filtros con membrana de Polietersulfona con poros de 0.2 μ m (Whatman®) y se utilizó a una concentración final de 25 mg ml⁻¹.

Para inducir la reproducción sexual y así determinar el tipo de apareamiento (mat) de las cepas transformadas y obtener cepas específicas como la cepa TRM100-RE01 (Tabla 2) se utilizó medio sintético para cruza (MSC) (Westergaard & Mitchell, 1947) que contiene sales para cruza 2X (Apéndice B), sacarosa al 2% (w/v), agar al 2% y agua destilada.

Para cultivar las cepas transformadas de *N. crassa* se utilizó medio FGS (Fructosa, Glucosa y Sorbosa) que contiene sales de Vogel 1X, agar al 1% y aditivo FGS 1X (Apéndice C). El aditivo FGS se preparó con sorbosa al 20%, fructosa al 0.5% y glucosa al 0.5%. Todos los componentes del aditivo FGS fueron esterilizados por filtración utilizando filtros de membrana de celulosa-acetato con poro de 0.45 μ m (PRO-XTM). Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave (VWR® Accu Sterilizar AS12) a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión.

5.3.2. Bacterias

Para el crecimiento de bacterias se utilizó medio Luria-Bertani (LB) en forma líquida y sólida. El medio LB contiene 1% de Bacto-Triptona, 0.5% de Extracto de Levadura, 1% de Cloruro de Sodio (NaCl). Cuando se requirió el medio en forma sólida se agregaron 20g de agar bacteriológico por litro (Agarmex S.A. de C.V.). Finalmente la preparación se esterilizó por autoclave. LB sólido o líquido con de ampicilina, se utilizó el mismo medio con una concentración de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para seleccionar las cepas bacterianas transformadas. Los inóculos se sembraron utilizando palillos estériles; las cajas se incubaron a 37°C durante 14 h. Los cultivos de bacterias para la obtención de plásmidos se realizaron en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C toda la noche en un agitador orbital (LAB-LINE) a 200-250 rpm.

5.4. Ensayos en biología molecular

5.4.1. Diseño de oligonucleótidos y vectores de clonación

Las secuencias de los genes que codifican para NCU02111.7 (*myo-5*) NCU00551.7 (*myo-2*), NCU06617.7 (*cdc-4*), NCU00202.7 (*crn-1*) en *N. crassa*, se obtuvieron del sitio <http://www.broadinstitute.org>. Para el etiquetamiento en el C-terminal de CDC-4 (Tabla 2), en el oligonucleótido sentido se agregó la secuencia que corta la enzima de restricción *PacI* (TTAATTAA) seguida de la secuencia del codón de inicio ATG del gen, mientras que la secuencia antisentido contenía el sitio de restricción para la enzima *SpeI* (ACTAGT) eliminando el codón de paro. Para coronina (*crn-1*), se utilizaron las secuencias de *XbaI* TCTAGA y *PacI* TTAATTAA como sitios de restricción.

Antes de enviar a sintetizar cada uno de los oligonucleótidos se analizaron con el software FastPCR Professional® versión 6.0.196 beta 2 para identificar la posible formación de dímeros y horquillamientos no deseados, así como los parámetros físicos y químicos de los oligonucleótidos (T_m , % G-C, % A-T) y su estabilidad interna.

5.4.2. Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

Para la extracción de DNA genómico, se utilizó *N. crassa* cepa FGSC #4200, la cual se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio MMV líquido, el cual se incubó de 3 a 5 días a 28°C en completa oscuridad y de esta manera evitar la formación de conidios. El cultivo posteriormente se filtró por medio de tela sintética estéril para eliminar la presencia de líquido. Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada estéril para eliminar el exceso de MMV. El micelio se secó utilizando papel filtro de 125 mm de diámetro (Whatman®) estéril y se guardó en un ultracongelador (Nuaire®) a una temperatura de -80°C hasta su uso. Antes de la extracción de DNA, el micelio congelado vertió en un mortero pre-enfriado 30 min en un ultracongelador a -70°C, posteriormente se trituro en presencia de nitrógeno líquido moliendo hasta obtener un polvo fino. La extracción de DNA genómico de *N. crassa* se realizó utilizando el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (50) de QIAGEN.

5.4.3. Separación de DNA mediante electroforesis

Se sometió el DNA genómico a electroforesis en geles de agarosa (Sambrook & Russell 2001). La agarosa se preparó al 1% en amortiguador TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM, pH 8.0) y bromuro de etidio al 0.1%. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80 V por un tiempo de 35-40 minutos en una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, BioRad®) utilizando un regulador PowerPac Basic™ de BioRad. El DNA se visualizó al irradiar el gel con luz ultravioleta bajo un transiluminador (Molecular imager GelDoc XR, BioRad®). El tamaño de las bandas se determinó por comparación con marcadores de tamaño de DNA (DNA del fago λ digerido con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*).

5.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico que se obtuvo de la cepa FGSC #4200, se utilizó como patrón para realizar la amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler™ de BioRad®. En estos experimentos se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos que hibridaron en los extremos 5' y 3' del fragmento de DNA que se deseaba amplificar. Las muestras que se usaron como molde, junto con los oligonucleótidos correspondientes, se sometieron a una serie de ciclos de desnaturalización, unión y extensión del oligonucleótido bajo la acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando la amplificación del fragmento de DNA de interés, cuyos extremos quedaron definidos por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. Para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés se utilizó una mezcla de reacción que contenía: 1.5 µl del oligonucleótido sentido, 1.5 µl del oligonucleótido antisentido, 2 µl de DNA genómico y 45 µl de SuperMix (PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen®) con capacidad de amplificación de 1 kb min⁻¹. Para la purificación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizó el Kit QIAquick®Gel Extraction (Qiagen) bajo las recomendaciones del fabricante.

5.4.5. Transformación genética de *E. coli*

La obtención de células químicamente competentes de *E. coli* se realizó de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). La transformación de células quimiocompetentes de la cepa DH5α (Invitrogen®) de *E. coli* se realizó utilizando 50 µl de células, y 5 µl del producto de la ligación del vector y el inserto. La mezcla conteniendo las células se incubó por 30 minutos sobre una cama de hielo, para provocar un choque térmico la mezcla se incubó durante 2 min a 42°C, e inmediatamente se transfirió sobre hielo por 2 min. A la mezcla se le adicionó 900 µl de medio LB y se incubaron 1h a 37°C con agitación constante a 200-250 rpm. Después se extendieron sobre medio LB-ampicilina sólido previamente espatulado

con 20 μ l de X-gal (20mg ml⁻¹) y 4 μ l de IPTG (10mM), incubándose durante 12 h a 37°C para seleccionar las colonias blancas (recombinantes) resistentes a ampicilina.

5.4.6. Purificación de DNA plasmídico

Para la purificación de DNA plasmídico se utilizó el método de lisis-alcalina (Sambrook y Russell, 2001), con la finalidad de analizar colonias que tuvieran la recombinante requerida, el cual consiste en lo siguiente: En 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido, se inoculó con una colonia y se incubó a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Se recolectó la pastilla bacteriana por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente la pastilla se resuspendió en vortex con 100 μ l de amortiguador TER (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; RNAsa 0.1 mg ml⁻¹), resuspendida la mezcla, se adicionaron 150 μ l de SDS alcalino (SDS 1%, NaOH 0.2 M), se mezcló por inversión suave y se incubó 5 minutos en hielo. Pasada la incubación se adicionaron 200 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.5, se mezcló por inversión suave y se incubó en hielo durante 10 minutos. Finalizada la incubación se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos, recuperándose después el sobrenadante. Al sobrenadante obtenido se le trató con 1 μ l de RNAsa 10 mM y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Después del tratamiento con RNAsa, se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 por 30 minutos. Posterior a la incubación se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm para recuperar la pastilla. Posteriormente, la pastilla se lavó con 200 μ l con etanol al 70%, centrifugándose 5 minutos a 13,000 rpm. Se dejó secar la pastilla durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 μ l de TE 1/10 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM, pH 8.0).

5.4.7. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Para realizar el análisis de restricción se siguieron las condiciones recomendadas por la casa comercial (Invitrogen, New England Biolabs o

Promega). Cada mezcla de reacción contenía 1 unidad de enzima por cada μg de DNA con el amortiguador de digestión 10% v/v. La mezcla se incubó al menos 4 horas a la temperatura adecuada.

Para disminuir la frecuencia de reacciones intramoleculares de ligación en vectores al ser ligados con insertos, el vector linearizado se trató con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (Promega). La mezcla de reacción contenía 1 unidad de SAP por cada 50 ng de plásmido linearizado. Para que se llevara a cabo la reacción se incubó a 37°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se hizo una electroforesis de la muestra en un gel de agarosa y se recuperó el fragmento a partir del gel con el kit de QiaGen.

5.4.8. Ligación de fragmentos de DNA a vectores de clonación

La ligación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen o Promega). El vector previamente tratado con fosfatasa alcalina y el inserto a ligar se mezclaron en una relación 1:3, utilizando un volumen final de 15 μl , en amortiguador de ligación a una concentración final del 10% v/v y 1 unidad de enzima, la mezcla se incubó toda la noche a 25°C .

5.4.9. Selección y verificación de clonas positivas

Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina fueron sometidas a un ensayo de PCR de colonia. Para ello con un palillo de madera estéril se tomó una parte de la colonia bacteriana, se inoculó en una placa conteniendo medio LB-sólido con ampicilina y el resto se introdujo en un tubo para PCR conteniendo: 2 μl de amortiguador Green GoTaq flexi, 1 μl de MgCl_2 (50mM), 1 μl de dNTPs (2.5 mM), 1 μl de oligonucleótido sentido 10 μM y 1 μl de oligonucleótido antisentido 10 μM , 12.8 μl de agua destilada y 0.25 μl de polimerasa GoTaq (Promega®). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30 seg, posteriormente una fase de alineamiento a 58°C por 30 seg y finalmente una fase de extensión a 72°C por 1min por kb del gen amplificado. Cuando se completaron

los 35 ciclos se programó una extensión final de 72°C por 8 min y para finalizar la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos de la PCR de colonia fueron sometidos a una electroforesis. Las clonas que dieron positivo en la PCR de colonia fueron inoculadas cada una en 5ml de medio LB-líquido con ampicilina, e incubadas por 12 a 14 horas a 37°C en agitación constante a 225rpm para posteriormente realizar la extracción de DNA plasmídico. Obtenido el DNA plasmídico se realizó una prueba de restricción, para corroborar que el inserto se encontraba dentro del plásmido con los sitios de clonación intactos.

5.4.10. Transformaciones en *N. crassa*

Para realizar la transformación de conidios de *N. crassa* se utilizó la cepa del FGSC #9717. La cepa 9717 tiene una mutación en el gen *mus-51*, que impide que se lleve a cabo una recombinación ectópica. También esta cepa posee una mutación en el locus *his-3* lo que le hace auxotrofa para histidina. La cepa se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200ml de MMV sólido suplementado con 25 mg ml⁻¹ de histidina. La incubación se realizó por alrededor de 14 d a una temperatura de 28°C. Una vez que en el cultivo se formaron los suficientes conidios, éstos fueron resuspendidos en agua destilada estéril. Los conidios fueron transferidos a tubos cónicos estériles y fríos de 50 ml (FALCON®). Se centrifugaron en frío en una centrífuga MultiFuge 15-R Heraeus, por 5 min a 2500 rpm. Posteriormente, se realizaron lavados tanto en agua destilada/desionizada estéril como en sorbitol 1 M estéril y frío. Para optimizar la transformación de los conidios se utilizó una suspensión con una concentración de 2.5 X 10⁸ conidios ml⁻¹ o una suspensión de conidios con una densidad óptica (OD₆₀₀) entre 0.2 a 1.0 utilizando espectrofotómetro (Modelo 6505, JENWAY UV/Vis). La transformación de los conidios de *N. crassa* se realizó mediante la técnica de electroporación. En una celda para electroporación se colocaron 90 µl de conidios y 10 µl de plásmido respectivo sin linealizar. Se aplicó un pulso eléctrico con un electroporador Gen Pulser Xcell System (Modelo 165-2660 BIO-RAD) a un voltaje de 1,500 volts (V), una capacitancia de 25 microfaradios (µF) y una resistencia de

600 Ohms (Ω) durante 14 milisegundos (ms). Inmediatamente después del pulso eléctrico, los conidios fueron resuspendidos en 1 ml de sorbitol 1 M, y posteriormente, la mezcla de conidios-sorbitol, se resuspendió en 5 ml de solución de recuperación incubándose a 30°C con agitación suave por 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación los conidios se sembraron en 4 placas de Petri conteniendo medio agar FGS incubándose a 30°C por 4 a 5 d.

5.4.11. Recuperación de transformantes de *N. crassa*

Las transformantes se recuperaron resembrándolas en tubos de borosilicato de 12 X 75mm (PYREX®) conteniendo MMV sin histidina. Se incubaron a una temperatura de 28°C hasta que el micelio se encontraba maduro y con abundante producción de esporas asexuales. Los conidios se revisaron bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 200) equipado con una lámpara de fluorescencia que permitió seleccionar aquellas transformantes que expresaron fluorescencia.

5.5. Cruzas

El procedimiento fue el siguiente: se sembraron las cepas mutantes en cajas de Petri con MSC. Se incubaron durante 5 días a 28° C. Posteriormente se inoculó en las mismas cajas la cepa de tipo de apareamiento complementario. Se incubaron durante 7 días a 25° C en oscuridad total. Las estructuras sexuales que se obtienen se denominan peritecios, los cuales contienen las ascosporas que una vez maduras son expulsadas. Estas se recolectaron con agua destilada estéril y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Las ascosporas se estriaron en cajas de Petri con MMV agar 1.5% y se les dio un shock térmico a 60 °C durante 3 h y se incubaron a 28° C durante 12 h. Se recuperaron colonias y se transfirieron a tubos de 5 ml con MMV agar 1.5% inclinado y se incubaron a 28 °C durante 48 h.

5.6. Análisis bajo microscopía

5.6.1. Microscopía de alto aumento

Para analizar las células de *N. crassa* se utilizó la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2004). Primero, los conidios se cultivaron en MMV sólido incubándose a 20°C, cuando las células formaron una colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro, se realizó el corte de un bloque de MMV en la periferia de la colonia en forma rectangular, y después de un periodo de recuperación de 5 a 10 minutos, se procedió al análisis bajo el microscopio.

Se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser LSM-510 META (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión 100X de contraste de fases (N.A. 13: Plan Neofluar, Carl Zeiss). Para examinar la expresión de la YFP y GFP se utilizó un láser de Argón/2 con una Exc/Em 514/527nm para la YFP y una Exc/Em 488/505-530 nm para la GFP. Para la expresión de la mCherryFP se usó un láser de He1/Ne1 Exc/Em 543/600-630nm. Este microscopio, es equipado con un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases. Para la obtención de imágenes y series de tiempo se utilizó el software LSM-510 versión 3.2 (Carl Zeiss) y se evaluaron con el LSM-510 Image Examiner versión 3.2. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a formato TIFF (Tagged Image File Format). Las secuencias de imágenes obtenidas se transformaron a formato AVI (Audio/Video Interleave) utilizando el software LSM Examiner versión 3.2. El procesamiento de imágenes individuales y reconstrucciones, se realizaron utilizando el programa de cómputo Adobe Photoshop® CS3 y Adobe Illustrator® CS5.

5.6.2. Dobles marcajes

Para observar la relación entre coronina y otros reguladores clave de actina, incluyendo al complejo Arp2/3, fimbrina y actina, se generaron heterocariones a través de fusiones vegetativas de cepas expresando coronina-mChFP y fimbrina-GFP, ARP-2-GFP y Lifeact-GFP (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010)

respectivamente. También, para observar la relación entre CDC-4 y actina, se generaron heterocariones a través de fusiones vegetativas de cepas expresando CDC-4-mChFP y Lifeact-GFP. Para esto, una placa con MMV fue inoculada con esporas de ambas cepas e incubadas por 10 horas a 28°C. Subsecuentemente, las colonias fueron revisadas para seleccionar aquellas que estuvieran expresando ambas proteínas fluorescentes.

5.6.3. Utilización de colorantes y drogas inhibidoras del citoesqueleto

Para poder visualizar la dinámica de las proteínas marcadas fluorescentemente con relación al Spk y la dinámica interna de la célula, se utilizó el marcador lipofílico FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR). Este marcador tiñe la membrana plasmática así como los organelos membranosos (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Utilizando el método del agar invertido (Hickey *et al.*, 2002) se incubaron las cepas expresando la construcción con GFP con FM4-64 (5 μM). También, se utilizó este colorante para medir la tasa de internalización del mismo durante el crecimiento polarizado. Para esto, a las muestras ya montadas en el microscopio y teniendo una hifa seleccionada en el campo visual, se les inyectó el FM4-64 con una aguja de fina en la parte más cercana a la zona de crecimiento y se visualizaron inmediatamente. De esta forma fue posible realizar el análisis de internalización del colorante partiendo de un tiempo cero verdadero.

También, para observar el comportamiento de las proteínas marcadas fluorescentemente, el Spk y su relación con el citoesqueleto de actina y microtúbulos, se utilizaron las drogas citocalasina A [2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$] y benomilo [2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$]. Se prepararon las muestras con el método del agar invertido y se añadieron 10 μl de la droga despolimerizante.

5.6.4. Microscopía electrónica de barrido y transmisión

Para obtener imágenes por microscopía electrónica de barrido, se inoculó la cepa mutante $\Delta\text{crn-1}$ en cajas de Petri con MMV agar 1.5% sobre una membrana de diálisis. Las membranas fueron cortadas, lavadas y esterilizadas por autoclave

previamente. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 12 h y se fijaron con formaldehído al 4% en buffer PIPES (50mM, pH 6.8, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂) Después de 2 h se lavaron con PBS (NaCl = 4 g·l⁻¹; KCl = 0.1 g·l⁻¹; KH₂PO₄ = 0.06 g·l⁻¹; Na₂HPO₄ = 0.455 g·l⁻¹) una vez y posteriormente con agua destilada y desionizada estéril, se cortaron fragmentos de 1 cm² aproximadamente y se montaron en portaobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se metalizaron con oro.

Para la microscopia electrónica de transmisión (TEM), se crecieron germínulas en una estéril, delgada, y desionizada membrana de diálisis sobre placas de MMV a 23 C. Las células fueron criofijadas sumergiéndolas rápidamente dentro de propano líquido enfriado a 218 C con nitrógeno líquido. Las células criofijadas fueron vueltas a congelar en acetona conteniendo 2% de tetra óxido de osmio y 0.05% de acetato de uranilo a -285 C por 48h. Después de haber sido enjuagadas en 100% de acetona, las células se cubrieron con una resina epoxica, quedando fijadas entre un cubreobjetos de vidrio recubierto con Teflón y un film de Aclar y, polimerizadas a -60 C por 24h. Una vez polimerizada la resina, las células fueron cortadas en secciones delgadas en un ultramicrotomo Leica (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL) y post-tenidas por 10min en 2% de acetato de uranilo en 50% etanol y citrato por 5 min. Las secciones fueron examinadas utilizando un FEI CM12S TEM (FEI Electronics Instruments, Co., Mahwah, NJ) a 100 kV acoplado a una cámara CCD Gatan 689 102461024 área del pixel; Gatan Inc., Pleasanton, CA). Las figuras finales fueron construidas utilizando un Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc, San José, CA).

Capítulo 6

6. Resultados

6.1. Miosinas

6.1.1. CDC-4-GFP:

Se ha establecido que en *S. pombe*, CDC-4 interacciona con las miosinas de clase II y V. La principal función de esta proteína es la de regular la actividad de la ATPasa de Mg^{2+} y la estabilidad de los filamentos de actina. El marcaje con GFP de la proteína CDC-4 reveló que se encuentra co-localizando con el Spk, así como también en la zona del domo apical, en forma de media luna (Figura 2). La fluorescencia de CDC-4-GFP se observa co-localizando con Spk satélites como se muestra en la Figura 2 C.

Para observar el comportamiento de la proteína de CDC-4-GFP y el Spk en relación al citoesqueleto de actina, se utilizaron dos drogas que despolimerizan el citoesqueleto; benomilo y citocalasina A; la primera afecta los microtúbulos y la segunda el citoesqueleto de actina. Al despolimerizar los microtúbulos con benomilo, el crecimiento se afectó, las hifas se hincharon en la punta, pero el Spk no se desintegró por completo, ni tampoco se afectó la localización de CDC-4-GFP, que permaneció co-localizando con el Spk (Figura 3 A-C). Sin embargo, el uso de citocalasina A, que afecta directamente al citoesqueleto de actina, tuvo un mayor efecto en la morfología de la hifa, el Spk desapareció por completo y también la fluorescencia de CDC-4-GFP disminuyó notablemente, quedando exclusivamente la fluorescencia en la zona del domo apical. (Figura 3 D-F).

Debido a que CDC-4 es considerada una proteína reguladora de la miosina de clase II (Myo-2) y, ésta está involucrada en la formación de septos, se realizaron observaciones en la zona. Inicialmente se observó la región más cercana a la membrana plasmática. Se observó que CDC-4-GFP forma una red de cables que coalescen en el momento de la formación del anillo contráctil de

actomiosina (CAR) del septo (Figura 4 A-F). Pasando de la región cortical, a la región media de la hifa, se observó como la fluorescencia de CDC-4-GFP se contraía junto con el CAR hasta finalizar el proceso de formación del septo, y posteriormente desaparece junto con todo el citoesqueleto de actina (Figura 4 G-I). Junto con la red de filamentos, se observaron parches viajando hacia el sitio de septación moviéndose muy rápidamente, siendo solo visibles en las regiones más cercanas al septo (Figura 5 E). Al observar el crecimiento de la membrana plasmática teñida con FM4-64 al interior de la célula, se observó que la señal fluorescente de CDC-4-GFP aparece varios minutos antes de cualquier señal de la formación del septo (Figura 6 A-C). Una vez que el CAR se forma, parte de los filamentos decorados por CDC-4-GFP migran hacia el siguiente sitio de septación (Figura 5).

Para observar la relación que tiene la proteína CDC-4 con el citoesqueleto de actina, se llevó a cabo una fusión vegetativa entre una cepa que contenía la actina marcada con el reportero Lifeact -GFP y otra con CDC-4 etiquetada con la proteína fluorescente mChFP (CDC-4-mChFP). Esta fusión, reveló que efectivamente CDC-4 co-localiza con el citoesqueleto de actina en la región apical donde se encuentra el Spk (Figura 7) y también durante la formación del septo donde se visualizan los cables de actina decorados con CDC-4-mChFP. La Actina forma una gran red de cables que se ha denominado como SAT (Septal Actomyosin Tangle en inglés) donde se observa CDC-4 como parte de esta red de actomiosina (Figura 8). De igual forma, la actina se observa en muchos parches alrededor del septo y coinciden con los parches marcados con CDC-4-mChFP (Figura 8 A-B), sin embargo hay algunos que solo están etiquetados con Lifeact-GFP y carecen de CDC-4-mChFP (Figura 8 F)

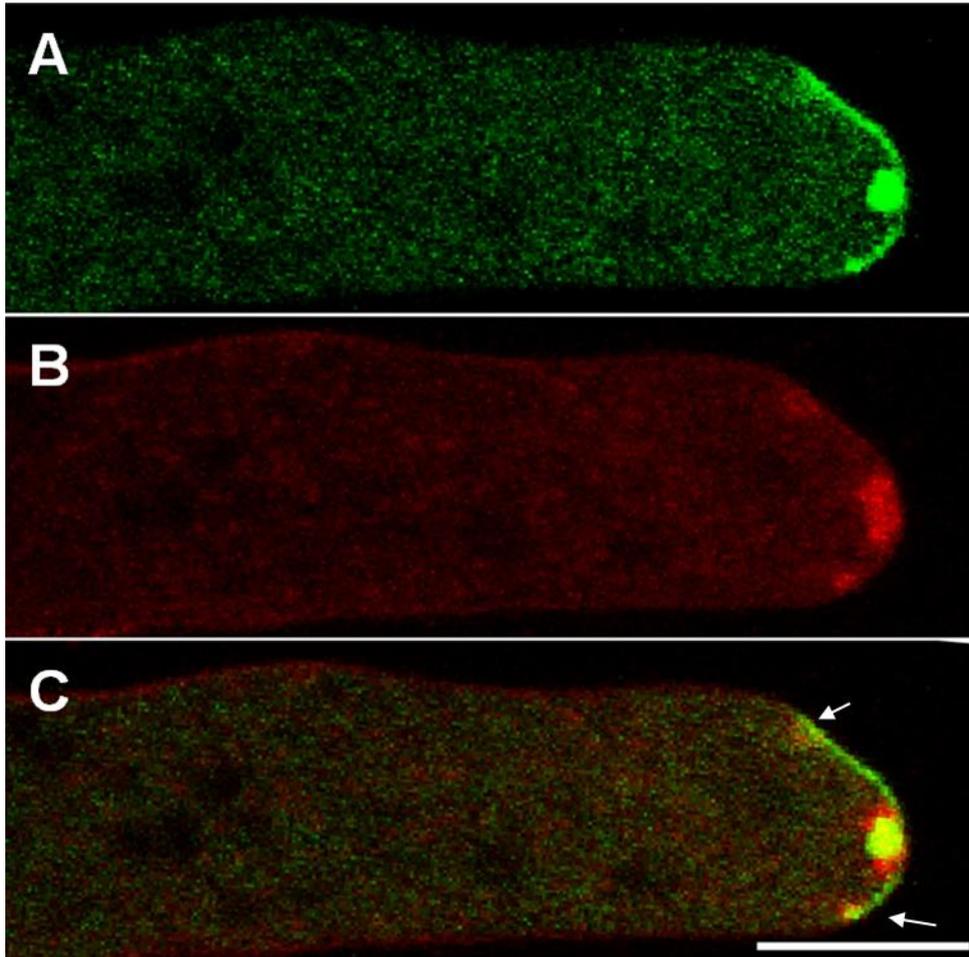


Figura 2. La proteína CDC-4 se localiza en el ápice. En A) se observa proteína CDC4-GFP acumulada en el ápice en el Spk y una creciente en el domo apical. B) el Spk teñido con FM4-64 y en C) La co-localización de la CDC4-GFP en el Spk y también con la membrana del domo apical. Las flechas blancas indican la presencia de Spk satélites y su co-localización con Cdc4-GFP. Escala 10 μ m

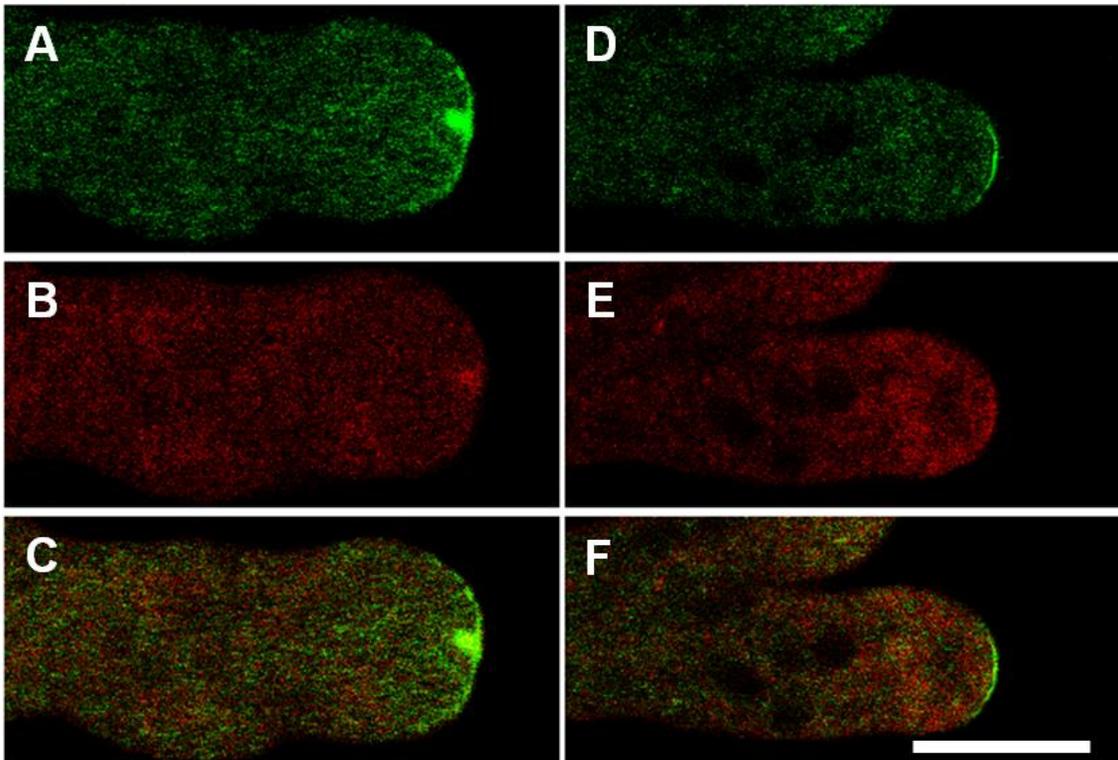


Figura 3. Efecto de drogas despolimerizantes del citoesqueleto de actina y microtúbulos en la distribución de CDC-4-GFP. (A–C) hifa tratada con benomilo [2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$]. Se aprecia como CDC-4-GFP permanece en el ápice al igual que el Spk teñido con FM4-64. En (D-F) la hifa tratada con citocalasina A [2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$]. Tanto la señal de CDC4-GFP como de FM4-64 en el Spk se desorganizó, sin embargo CDC4-GFP permaneció en forma de creciente en el domo apical. Escala = 10 μm .

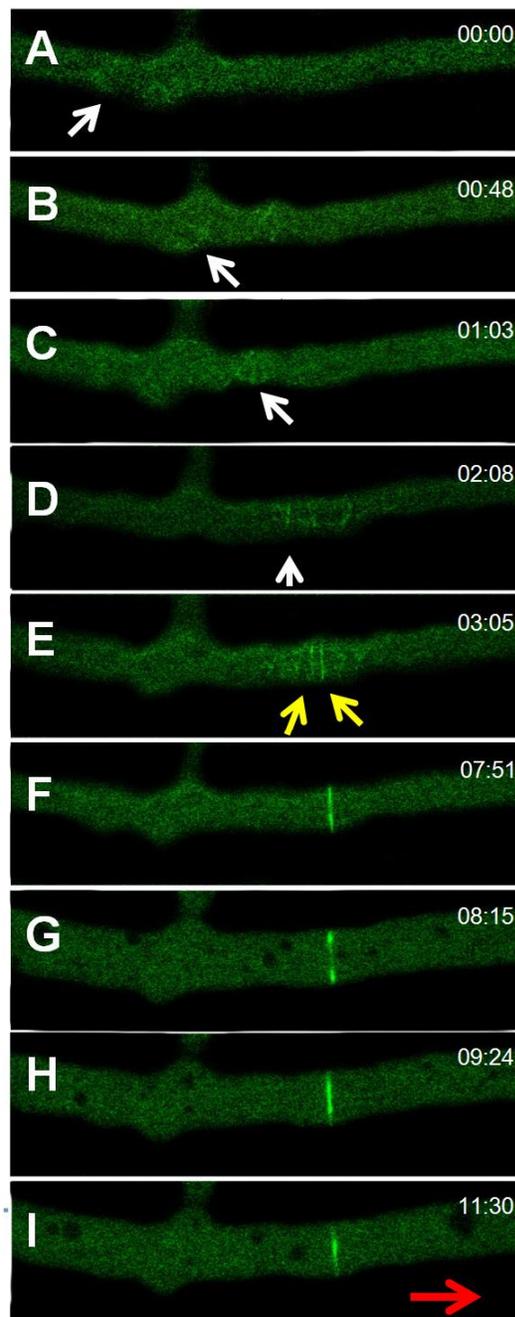


Figura 4. CDC4-GFP durante la formación del septo. Se muestran filamentos marcados CDC4-GFP en la región cortical de la hifa, que posteriormente coalescen desde la región anterior y posterior de la hifa hasta formar parte del anillo contráctil de actomiosina (CAR). G-I) muestra como el CAR se contrae. La flecha roja indica la dirección del crecimiento. Escala = 10 μ m.

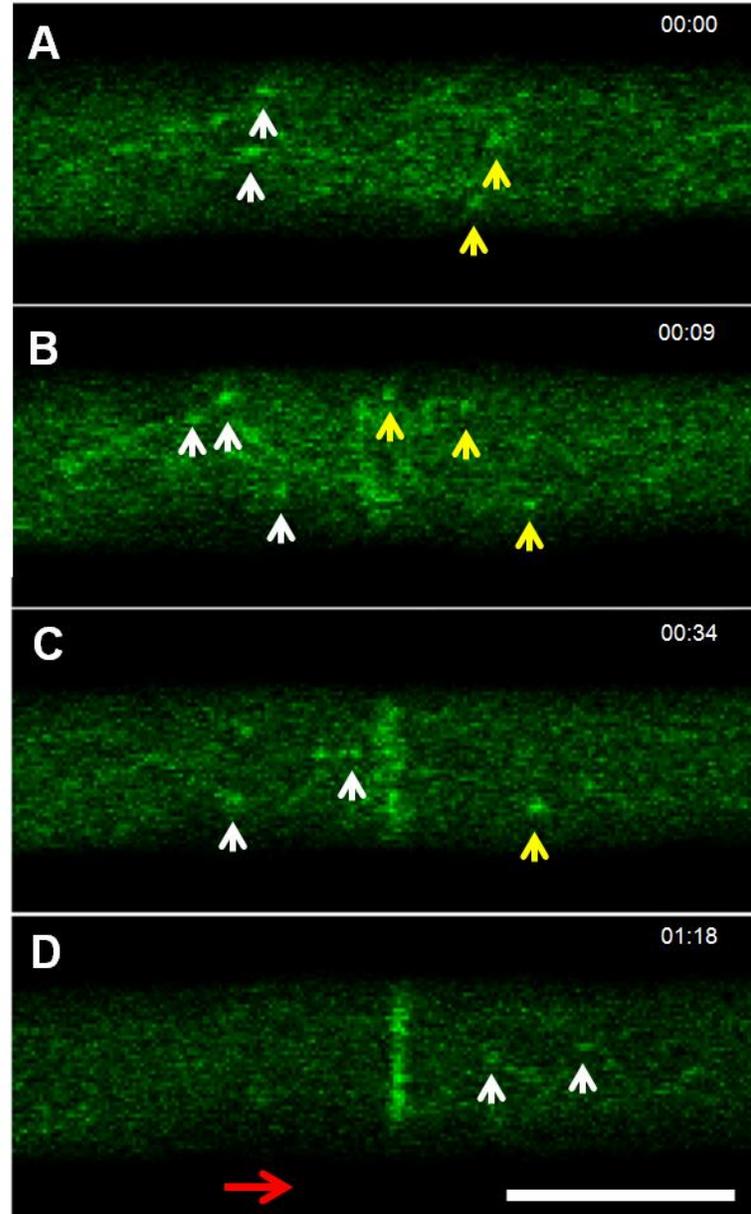


Figura 5. CDC4-GFP está presente en forma de parches durante la formación del septo desde antes de la formación del CAR. (A–D) muestran los parches de CDC4-GFP alrededor del septo. Los parches se mueven en sentido anterógrado y retrogrado hacia el sitio de formación del septo. La flecha roja indica la dirección del crecimiento. Escala = 10 μ m. Tiempo en min:seg.

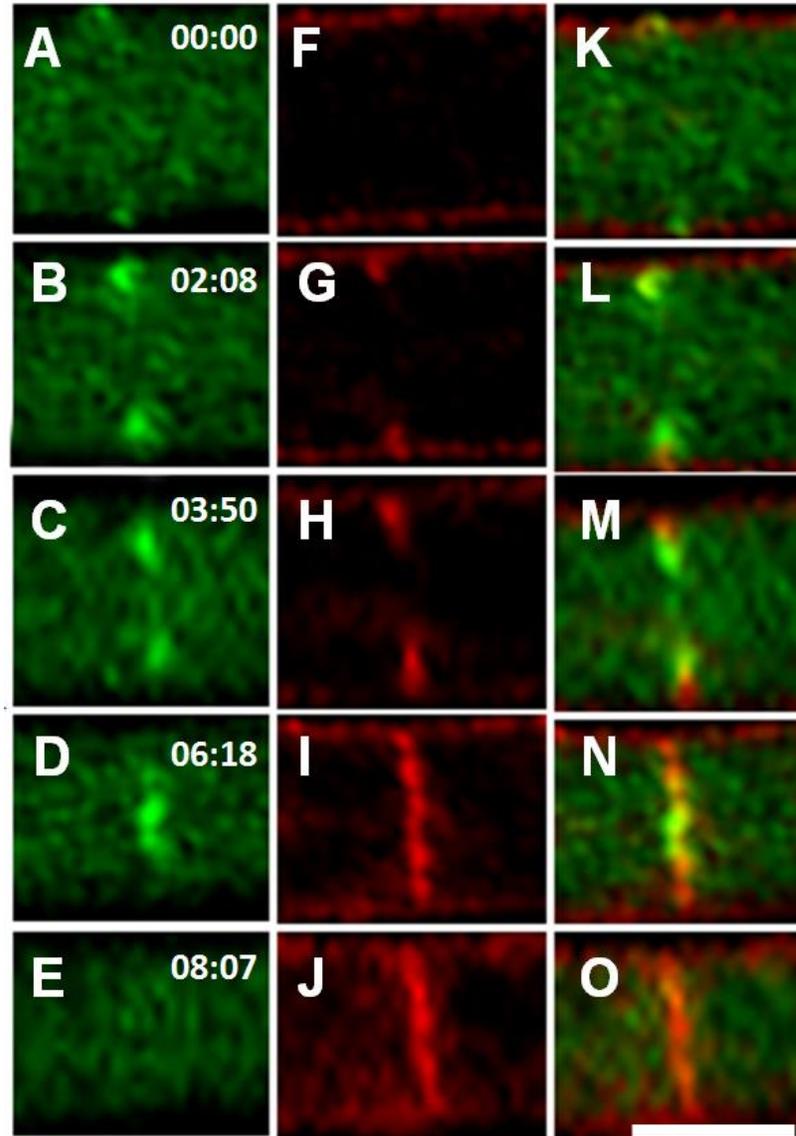


Figura 6. Localización de CDC4-GFP durante la constricción del CAR en la formación del septo. (A – E) CDC4-GFP. (F-J) tinción con FM4-64 y (K-O) muestra las imágenes superpuestas de CDC4-GFP y la tinción con FM4-64. Escala = 10 μ m. Tiempo en min:seg.

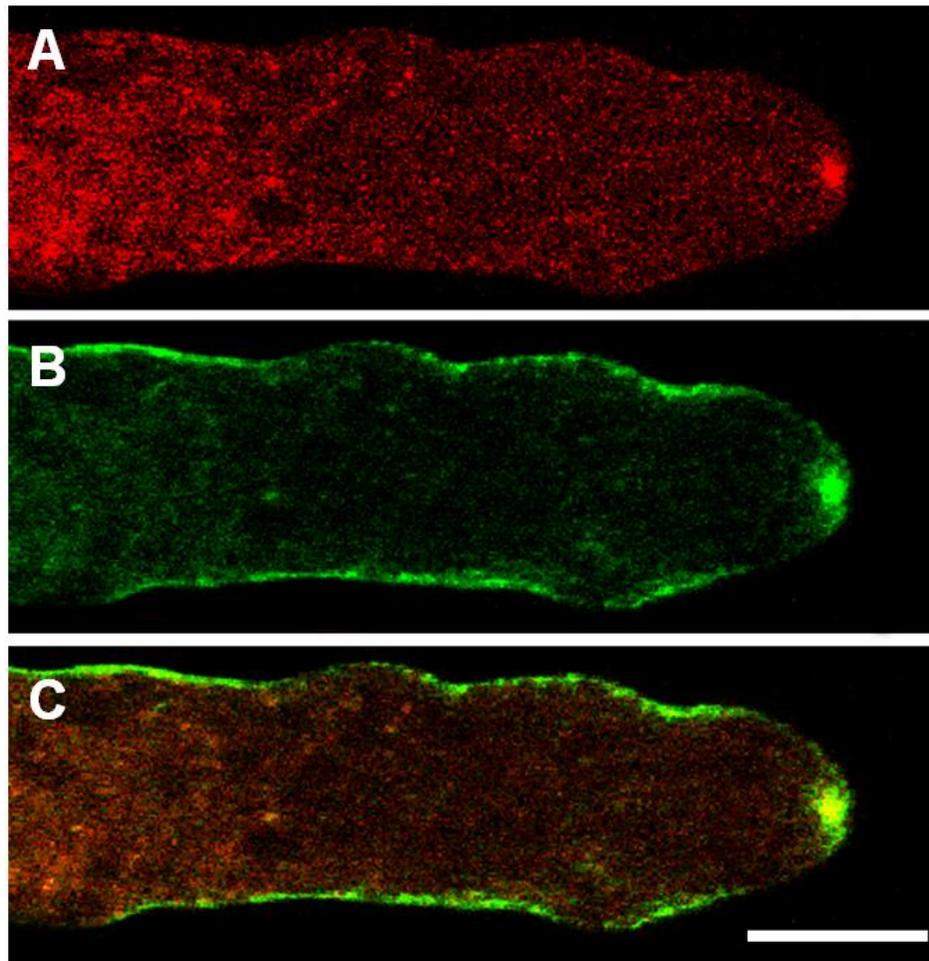


Figura 7. Localización de CDC-4-mChFP y actina marcada con Lifeact-GFP en la región apical y subapical. (A) CDC-4-mChFP en el ápice. En este caso no se puede observar la creyente en el domo apical, probablemente porque la proteína mChFP es más difícil de visualizar que la GFP. (B) localización de actina marcada con Lifeact-GFP y (C) Traslape de los dos canales de fluorescencia. Escala =10 μ m.

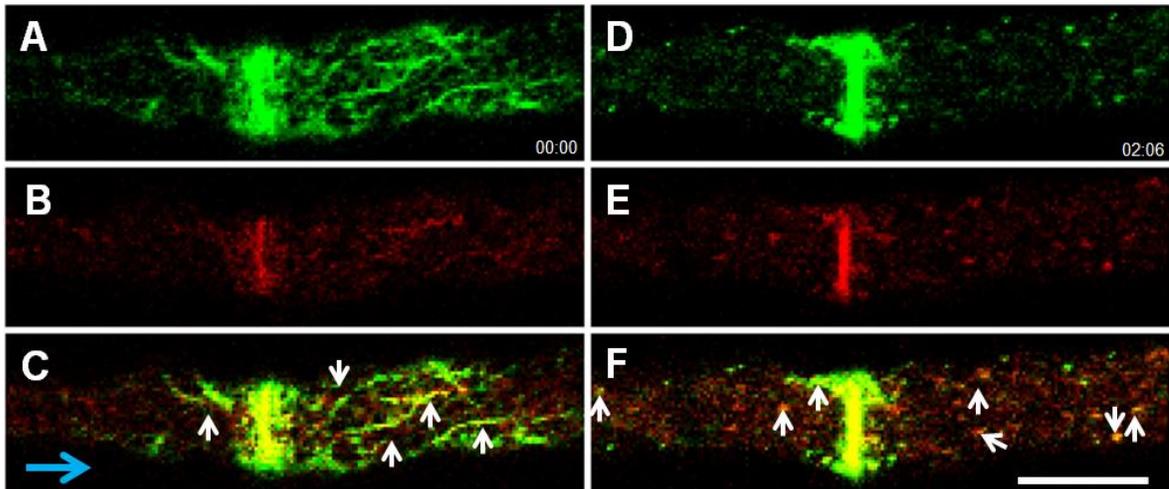


Figura 8. CDC-4-mChFP y actina (Lifeact-GFP) en el septo. En (A y D) se observa la actina marcada con Lifeact-GFP; se aprecian los cables y parches de actina. En (B y E) se observa la localización de CDC-4-mChFP que también se observa en cables y parches pero de manera más tenue y en (C y F) se aprecia el traslape de los dos fluorocromos. Las flechas blancas indican las zonas en las que se observa co-localización de ambas proteínas. La flecha azul indica la dirección de crecimiento. Tiempo en min:seg. Escala = 10 μ m.

6.1.2. Myo-2 GFP

En hongos filamentosos, la miosina de clase II ha sido reportada participando en la construcción de septos (Calvert *et al.*, 2012; Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Para las observaciones de la MYO-2 marcada con GFP se utilizó una cepa amablemente donada por la Dra. Meredith Calvert de la Universidad Nacional de Singapur. MYO-2-GFP se encontró en la región apical co-localizando con el Spk (Figura 9). También se localizó en estructuras que podrían ser Spk satélites, los cuales se ven teñidos por el colorante FM4-64 (Figura 9 C). En las regiones basales, MYO2-GFP fue visualizada durante la formación de septos, formando parte de los cables del SAT. La fluorescencia de MYO2-GFP mostró una intensidad mayor que la de CDC-4-GFP (Figura 10). Asimismo, fue mucho más notorio que en la cepa de CDC-4-GFP cómo es que los cables continúan avanzando en el mismo sentido que el crecimiento polarizado (Figura 10F). Para observar el comportamiento de la proteína de MYO2-GFP y su llegada al Spk también se utilizaron drogas que despolimerizan el citoesqueleto, el uso de benomilo afectó la distribución de MYO2-GFP en el Spk, formado una nube difusa, sin embargo, no afectó por completo su localización el ápice a pesar de que no se pudo observar el Spk teñido por FM4-64 (Figura 11 A-C). Con el uso de citocalasina A, se observó que MYO2-GFP desapareció del ápice así como el Spk teñido con FM4-64 (Figura 11 D-F).

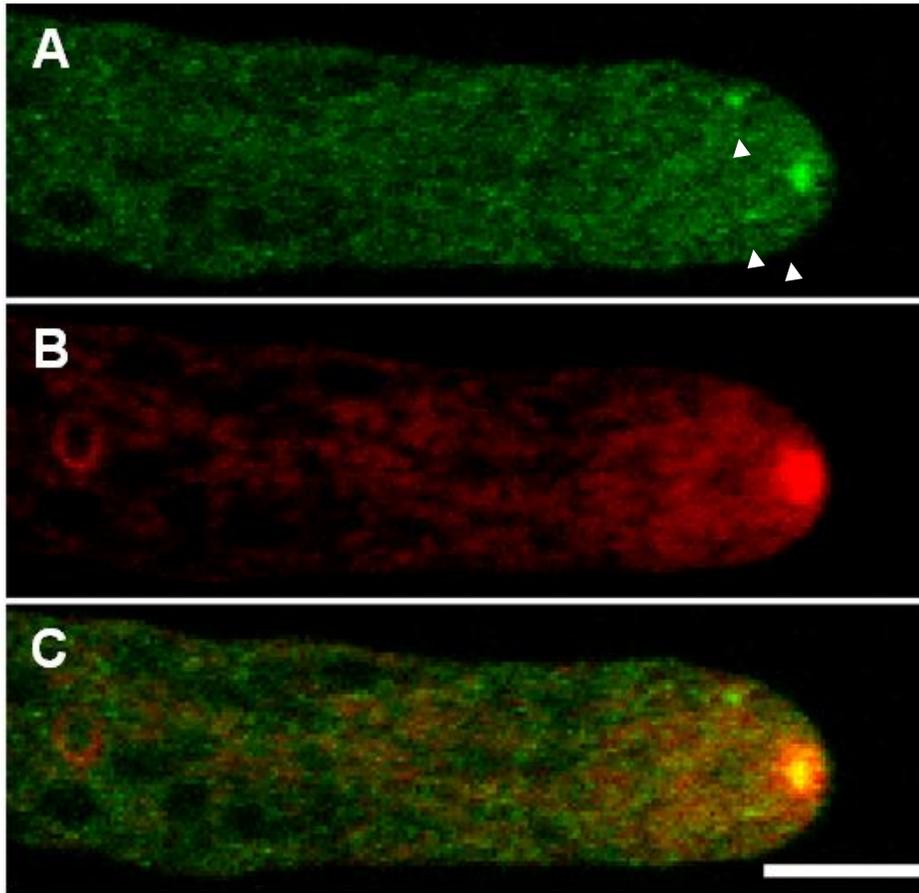


Figura 9. Imagen de Myo2-GFP en la zona apical. En (A) MYO-2-GFP en el ápice, en (B) la tinción del Spk con FM4-64 y en (C) el traslape de los dos canales. La proteína MYO-2-GFP se observa ocasionalmente en forma de parches móviles los cuales se indican con las cabezas de flechas blancas. Escala = 10 μ m.

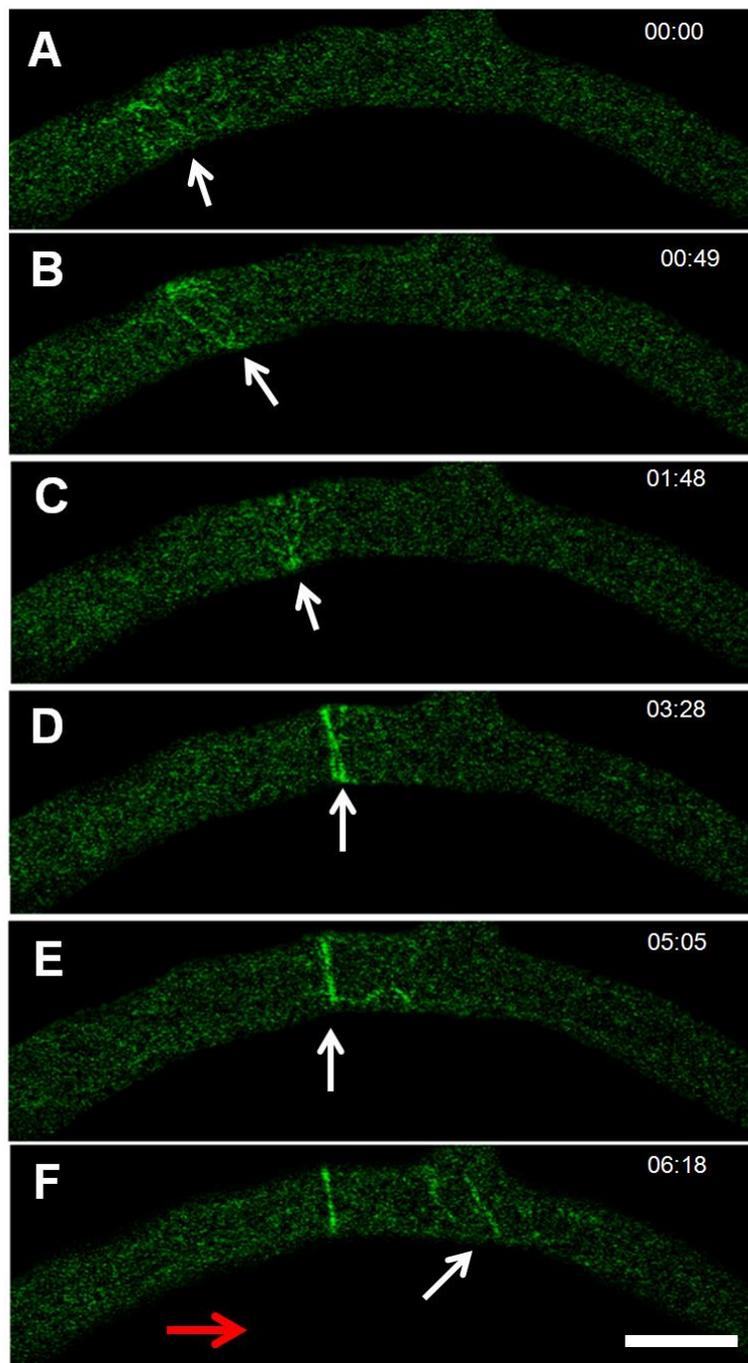


Figura 10. Imagen de MYO-2-GFP durante la formación del septo. La referencia para estimar el tiempo cero es la primera observación de fluorescencia. Las flechas blancas indican los filamentos en movimiento hasta que estos coalescen en el sitio donde se llevará a cabo la construcción del septo. Escala =10 μ m. Tiempo en min:seg.

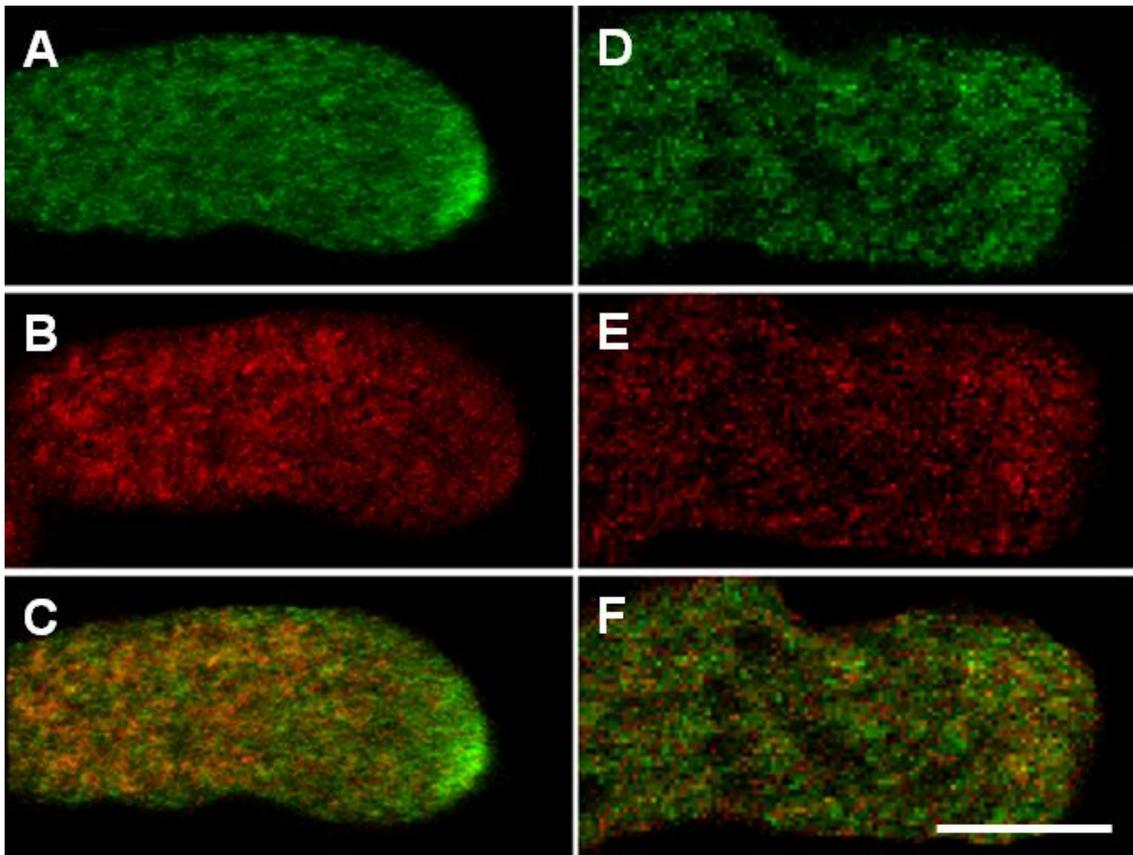


Figura 11. Efecto de la despolimerización del citoesqueleto microtubular y de actina en la localización de MYO-2-GFP. En (A – C) la hifa fue tratada con benomilo [$2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$]. Se aprecia como la proteína aún permanece en el ápice. El Spk teñido con FM4-64 se desensambló con los dos tratamientos. En (D – F) la hifa fue tratada con citocalasina A [$2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$]. En este caso la señal de MYO-2-GFP desapareció de la punta al igual que el Spk. Escala = 10 μm .

6.1.3. Miosina clase V (Myo-5)

La miosina de clase V, en *Ustilago maydis* ha sido descrita como una proteína que participa en el crecimiento polarizado, transportando vesículas de forma retrograda y se localiza en el ápice (Weber *et al.*, 2003; Schuchardt *et al.*, 2005). En este trabajo se observó un patrón similar, donde se visualizó una gran acumulación de fluorescencia en forma de un gradiente desde el domo apical hacia la región subapical concentrándose mayormente en la zona del Spk (Figura 12 A-C). En la región subapical, se observaron parches que viajaban en ambas direcciones, hacia el ápice y hacia la región basal (Figura 12 A-C). Curiosamente, en otros organismos no se ha reportado la presencia de MYO-5 durante la formación de septos, sin embargo, en *N. crassa*, si se encontró una señal de fluorescencia, aunque algo tenue, durante la formación del septo (Figura 13). Para observar el comportamiento de la proteína de MYO-5-GFP y el Spk en relación al citoesqueleto de actina, también se utilizaron agentes despolimerizantes del citoesqueleto; benomilo y citocalasina. El uso de benomilo afectó ligeramente la distribución de MYO-5-GFP en el ápice, a pesar de la despolimerización de los microtúbulos, MYO-5-GFP llega al Spk (Figura 14 A-C). Sin embargo, con el uso de citocalasina A, se observó que el Spk se despolimerizó por completo así como la señal de MYO-5-GFP (Figura 14 D-F).

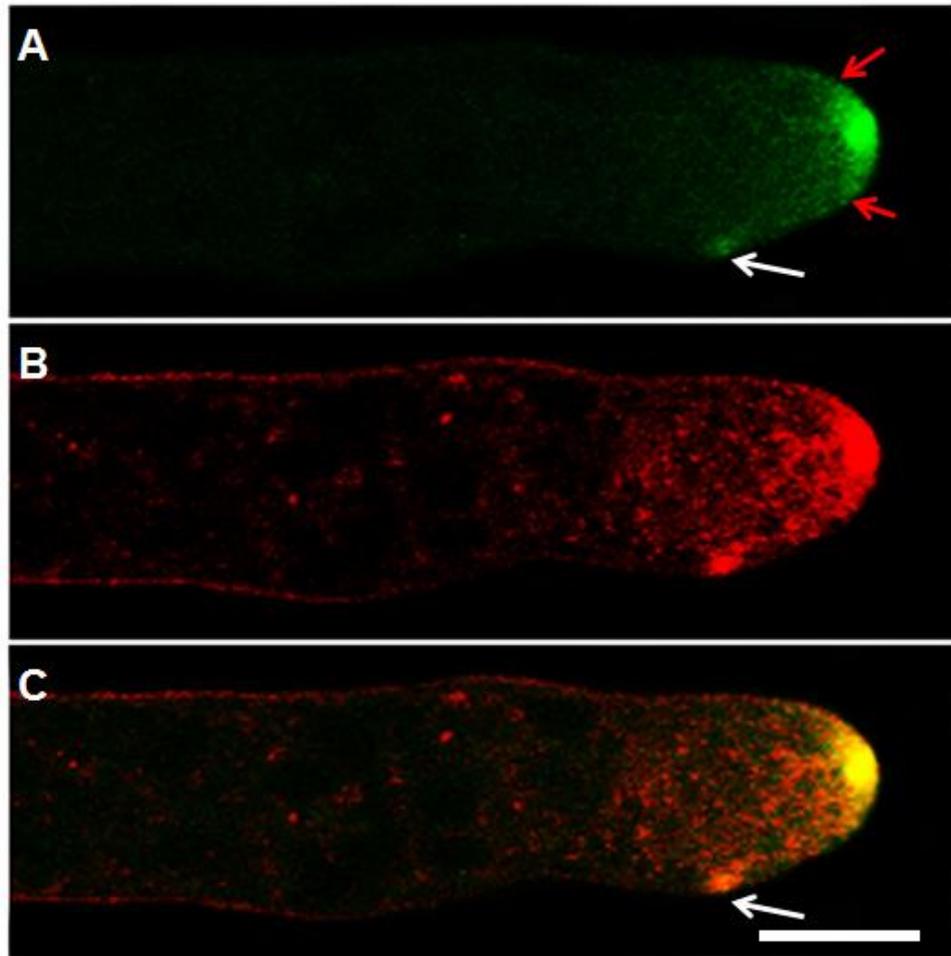


Figura 12. Localización de MYO-5-GFP en el ápice. (A) MYO-5-GFP se encuentra en el Spk y además en forma de una nube difusa en la zona adyacente (flechas rojas). También, se pueden observar parches que viajan en dirección contraria al flujo citoplasmático (flechas blancas) (B) se observa la tinción con FM4-64. (C) Traslape de MYO-5-GFP y tinción con FM4-64. Escala = 10 μ m.

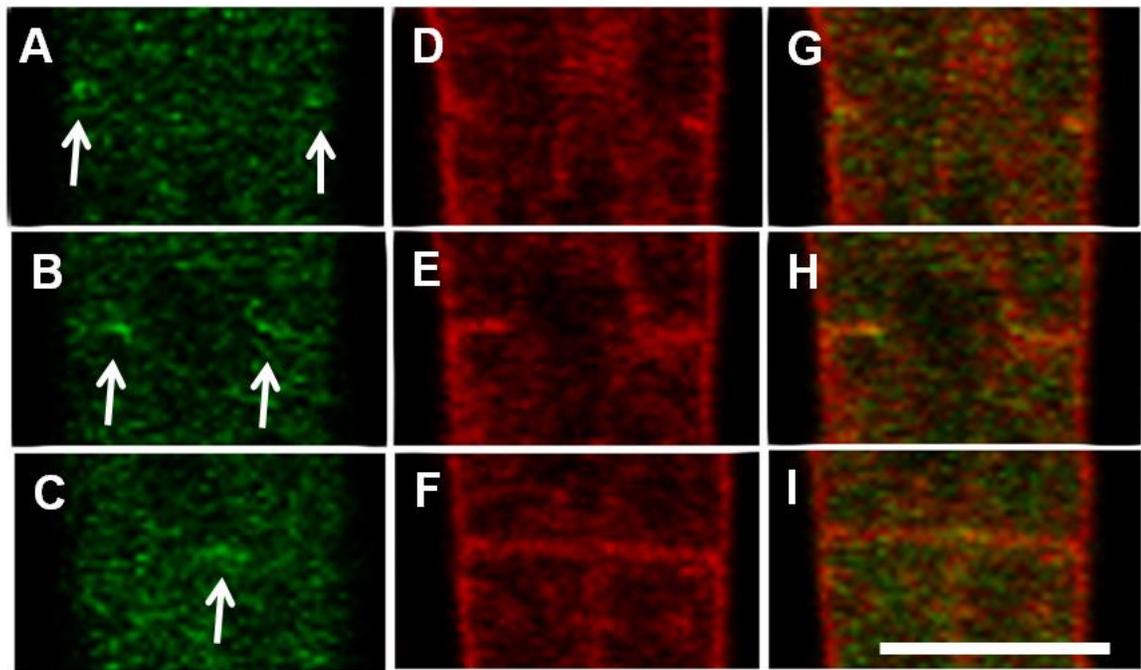


Figura 13. Localización de MYO-5-GFP durante la formación de un septo. (A-C) Se puede observar que la señal de MYO-5-GFP es muy tenue (flechas blancas) y solo está presente cuando se inició el crecimiento de la membrana hacia adentro de la hifa. (D-F) se observa la tinción con FM4-64 de (G-I) se observa el traslape de los dos canales de fluorescencia. Escala = 10um.

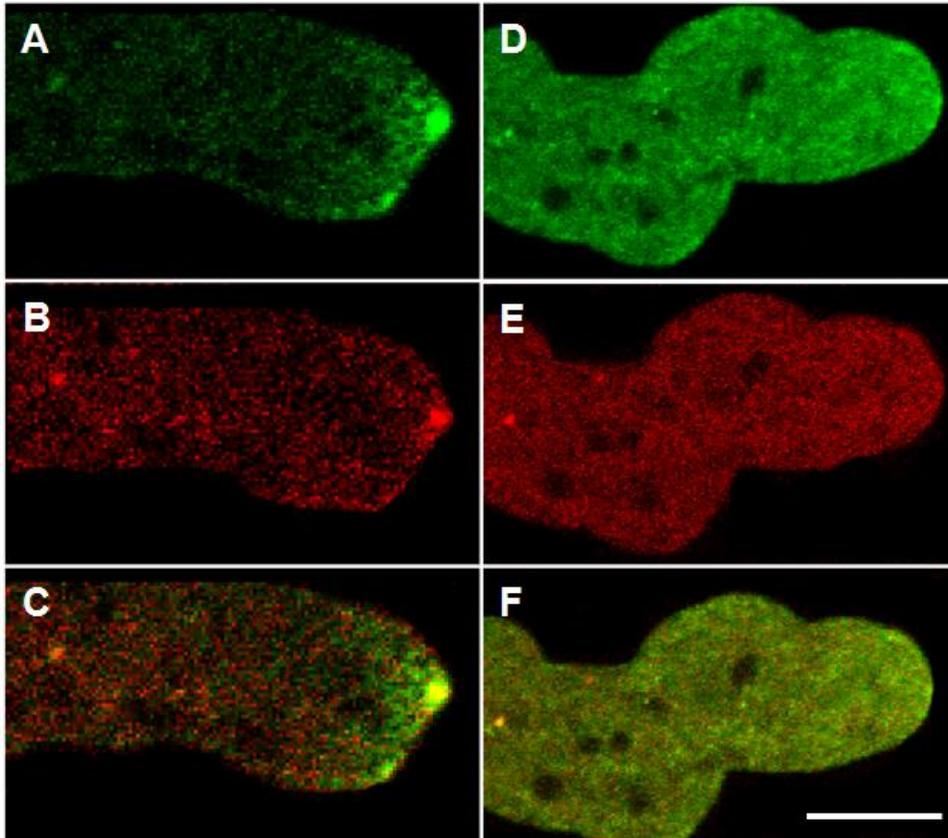


Figura 14. Efecto de drogas despolimerizantes del citoesqueleto microtubular y de actina en la distribución de MYO-5-GFP. (A – C) hifa tratada con benomilo [$2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$]. Se aprecia como MYO-5-GFP permanece en el ápice, incluso se formó una segunda acumulación de fluorescencia semejando un Spk. En el canal con FM4-64, es posible apreciar el Spk teñido por este colorante. (D – F) hifa tratada con citocalasina A [$2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$]. En este caso la señal de MYO-5-GFP desapareció de la punta y se puede observar un aumento de fluorescencia en toda la hifa, la tinción con FM4-64 revela que el Spk desapareció. Escala = $10 \mu\text{m}$.

6.2 Coronina

6.2.1 *Coronina* marcada con GFP (*CRN-1-GFP*)

La proteína coronina fue encontrada originalmente en las zonas corticales de *Dictyostellium discoideum* (Maniak *et al.*, 1995). En hongos filamentosos, su localización no había sido descrita hasta la realización de este trabajo. *CRN-1-GFP* fue encontrada a lo largo de toda la hifa, en las zonas corticales, en forma de parches móviles. Estos parches se concentraban cerca del ápice formando un collar de entre 8 y 9 μm de ancho; esto dejaba una zona libre de parches de ~ 4 μm en la región apical (Figura 15 A-C). En las regiones más distales de la hifa, *CRN-1-GFP* se encontró más esparcida y en una proporción mucho menor que con lo observado para la zona subapical. Conforme la hifa se elongaba, el collar subapical de coronina se mantuvo a una distancia siempre constante de la punta de la hifa, excepto en aquellas ocasiones en las que el Spk desaparecía y, los parches se movían invadiendo el ápice.

Los parches de *CRN-1-GFP* se localizaban justo inmediatamente después de la membrana plasmática teñida con FM4-64 (Figura 14 C-E). Se llevó a cabo una reconstrucción en 3D de una serie de imágenes confocales obtenidas del eje z para una mejor visualización de la arquitectura del collar de *CRN-1-GFP* y, se puede apreciar como los parches forman prácticamente un anillo perfecto justo en la zona subapical (Figura 15 D-E).

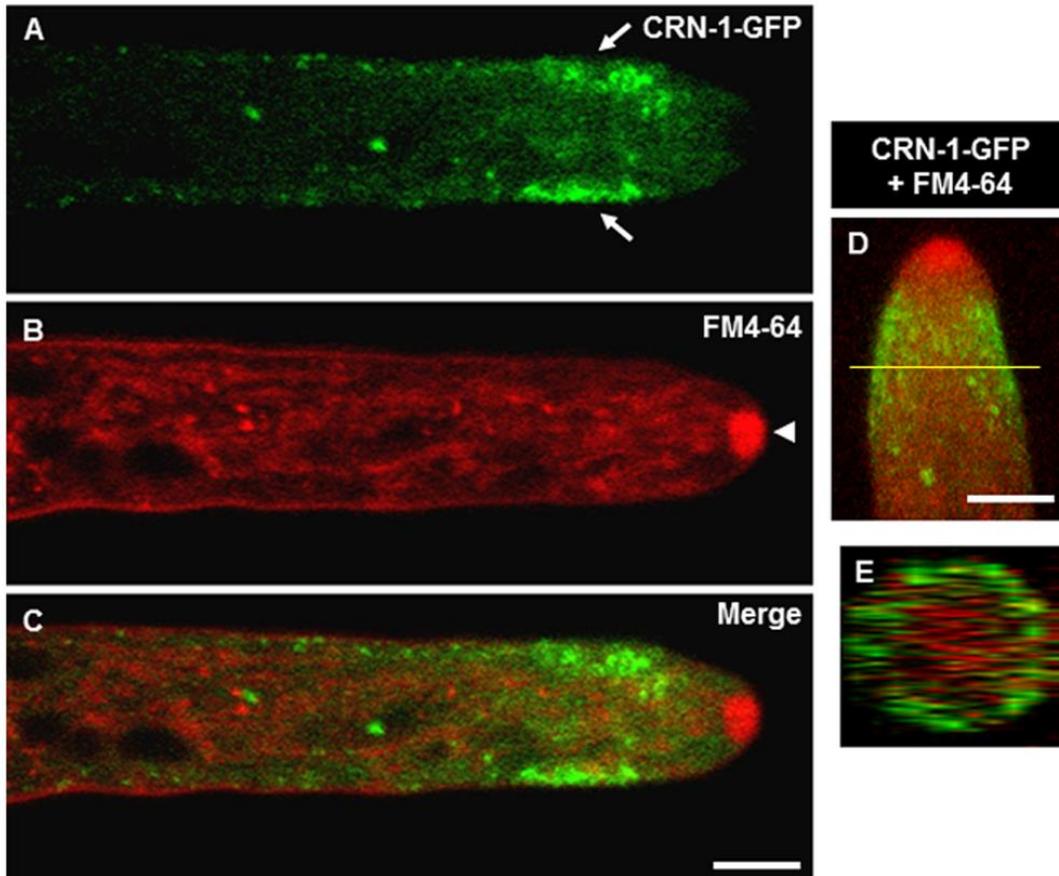


Figura 15. Distribución de *CRN-1-GFP* (A). En (B) se muestra la tinción con FM4-64. (C) es el traslape de los dos canales de fluorescencia. La imagen en (D) es una reconstrucción tridimensional de varias rebanadas ópticas del anillo subapical marcado *CRN-1-GFP*. (E) Vista ortogonal de la región marcada con la línea amarilla en (D). Las flechas blancas indican la presencia de *CRN-1-GFP* en el anillo endocítico y la cabeza de flecha la presencia del Spk. Coronina no se encontró en el Spk. Escala = 10μm

Para observar la relación de coronina con actina y otras proteínas de unión a actina (ABPs) durante el crecimiento polarizado, se fusionó vegetativamente la cepa de *N. crassa* expresando la proteína coronina marcada con la proteína fluorescente mcherry (mChFP), con las cepas expresando las proteínas Fim-GFP, Arp2-GFP y Lifact-GFP. Los parches de *CRN-1*-mChFP co-localizaron con Fim-GFP (Figura 16 A-C) y con el complejo Arp2/3 (Figura 16 D-F). Cuando se visualizó *CRN-1*-mChFP con Lifact-GFP, la actina se observó a lo largo de toda la hifa examinada y solo alguno de los parches co-localizaban con *CRN-1*-mChFP en la zona del collar subapical (Figura 16 G-I). Un hallazgo significativo fue la ausencia de coronina en el Spk o inmediatamente después de este a pesar de existir una señal muy fuerte de actina en el Spk (Figura 16 G-I). Al mismo tiempo, tampoco se observó la presencia de coronina en forma de filamentos, lo que sugiere que coronina no se asocia a los cables de actina (Figura 16 J-L). Por el contrario, los resultados obtenidos indican una asociación de coronina exclusivamente con parches de F-actina.

Para investigar la relación funcional que *CRN-1*-GFP tiene con actina y microtúbulos, se probó el efecto de inhibidores que afectan el funcionamiento y la dinámica de estos polímeros del citoesqueleto en la dinámica de *CRN-1*-GFP. A una concentración baja de citocalasina A ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), el collar de parches de *CRN-1*-GFP se desorganizó por completo y estos parches se movieron hacia el domo apical (Figura 17 A). A una concentración mayor ($5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), los parches desaparecieron casi por completo (Figura 17 B). Por otra parte, la integridad de los parches de actina no se vio afectada por el uso del agente despolimerizador de microtúbulos, benomilo, sin embargo la distribución de los parches se vio afectada, desplazándose los parches hacia el domo apical (Figura 17 C).

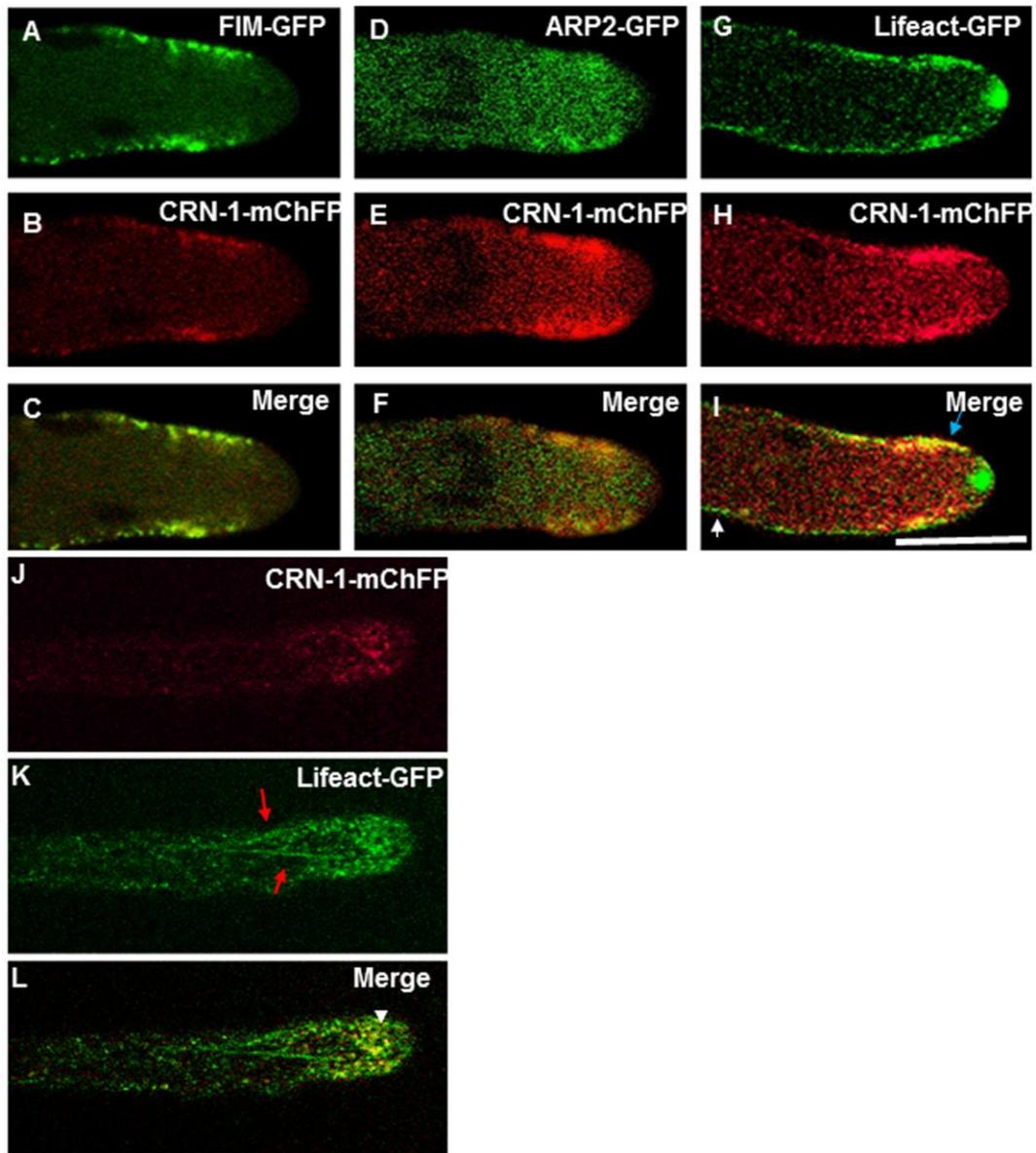


Figura 16. Co-expresión de *CRN-1-mChFP* con fimbrina, el complejo Arp2/3 y actina. (A-C) Co-localización de *CRN-1-mChFP* con FIM-GFP. (D-F) Co-localización de ARP2-GFP (complejo Arp2/3) con *CRN-1-mChFP*. (G-I) Co-localización parcial de actina (Lifeact-GFP) con *CRN-1-mChFP*. La flecha azul indica una área donde co-localizan estas dos proteínas. (J-L) Visualización de cables de actina (flechas rojas) y *CRN-1-mChFP*. Se puede observar como no hay asociación de parches de actina con los cables. La cabeza de flecha indica co-localización entre actina y *CRN-1-mChFP*. Escala = 10 μm .

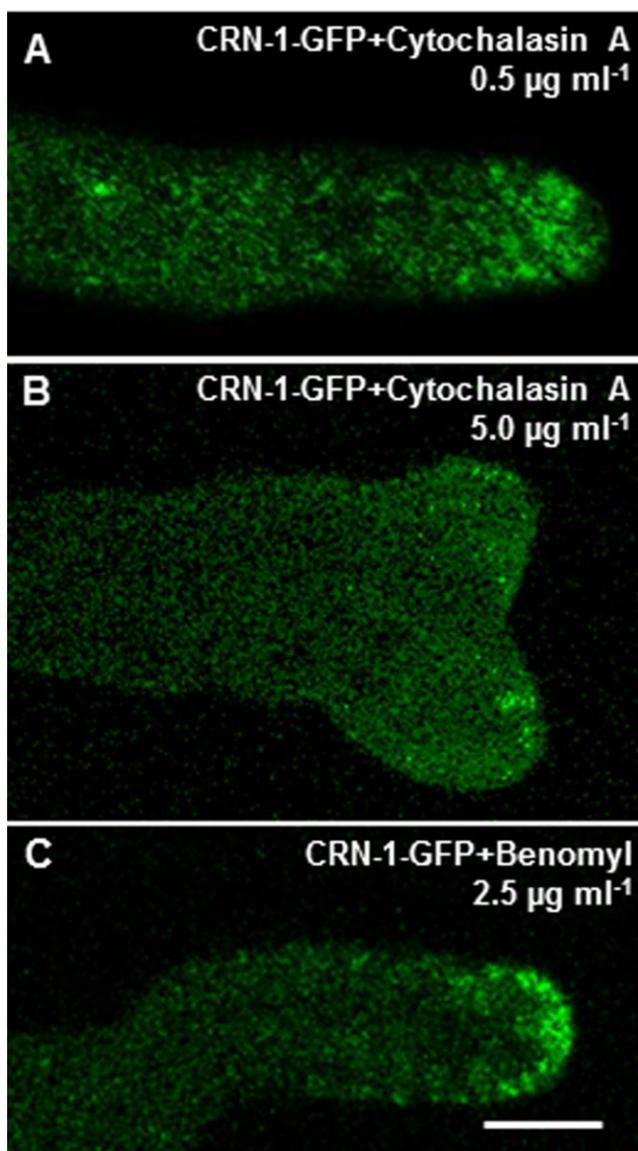


Figura 17. Efecto de los agentes despolimerizantes del citoesqueleto de actina y microtúbulos en la distribución de *CRN-1-GFP*. Las hifas fueron expuestas a: (A) citocalasina A [$1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$] (B) citocalasina A [$5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$] y (C) La droga anti-tubulina, benomilo a [$2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$]. Escala = $10 \mu\text{m}$.

6.2.2 Mutante de coronina

Por medio de PCR, se corroboró la ausencia del gen de *crn-1* en una mutante por delección de $\Delta crn-1$ provista por el FGSC (Fungal Genetics Stock Center, por sus siglas en inglés). Las caracterizaciones macroscópicas y microscópicas revelaron una colonia compacta de crecimiento lento, ondulado y con muy poca conidiación (Figura 18). La frecuencia lateral de ramificación de hifas líderes en la periferia de la colonia se vio incrementada 5 veces en la mutante de $\Delta crn-1$ (Figura 18E, 18F). Las hifas de la mutante de coronina crecían en su mayoría siguiendo una trayectoria errática, a diferencia de las hifas de la cepa silvestre las cuales crecían con su usual trayectoria lineal (Figura 18I, 18J). El contorno de las hifas de $\Delta crn-1$ en su mayoría era irregular (Figura 18G) a diferencia del contorno liso de las hifas de la cepa silvestre (Figura 18 H). Una diferencia importante fue descubierta a través del uso de TEM, donde se observó que $\Delta crn-1$ tenía hifas con paredes irregulares bordeadas por una membrana plasmática ondulada (Figura 18 K) a diferencia de las hifas de la cepa silvestre las cuales mostraban una pared celular de grosor uniforme (Figura 18L).

Así como Delgado-Álvarez *et al.*, (2012) reportó en la cepa silvestre de *N. crassa* una fuerte señal de F-actina en el Spk y en el collar endocítico de la zona subapical. En el presente estudio se encontraron resultados similares en la cepa mutante de $\Delta crn-1$. Sin embargo, la distribución y la dinámica de actina en la cepa mutante de $\Delta crn-1$ cambia intermitentemente durante los periodos de crecimiento polarizado e isotrópico observados. Estos cambios se correlaciona con cambios en el la posición y presencia del Spk y en la morfología del ápice en crecimiento. La fuerte señal de F-actina en la zona apical continuamente desaparecía, simultáneamente con el Spk tenido con FM4- (Figura 19 A - D). Mientras el Spk y su núcleo de actina estuvieran presentes, se mantenía un crecimiento y morfología elongada constantes (Figura 19 A). Otro cambio visible que acompañaba a la desaparición del Spk era el reacomodo de los parches de F-actina localizados en

la zona del collar sub-apical hacia la zona apical, invadiendo el área previamente ocupada por el Spk (**Figura 19 C**).

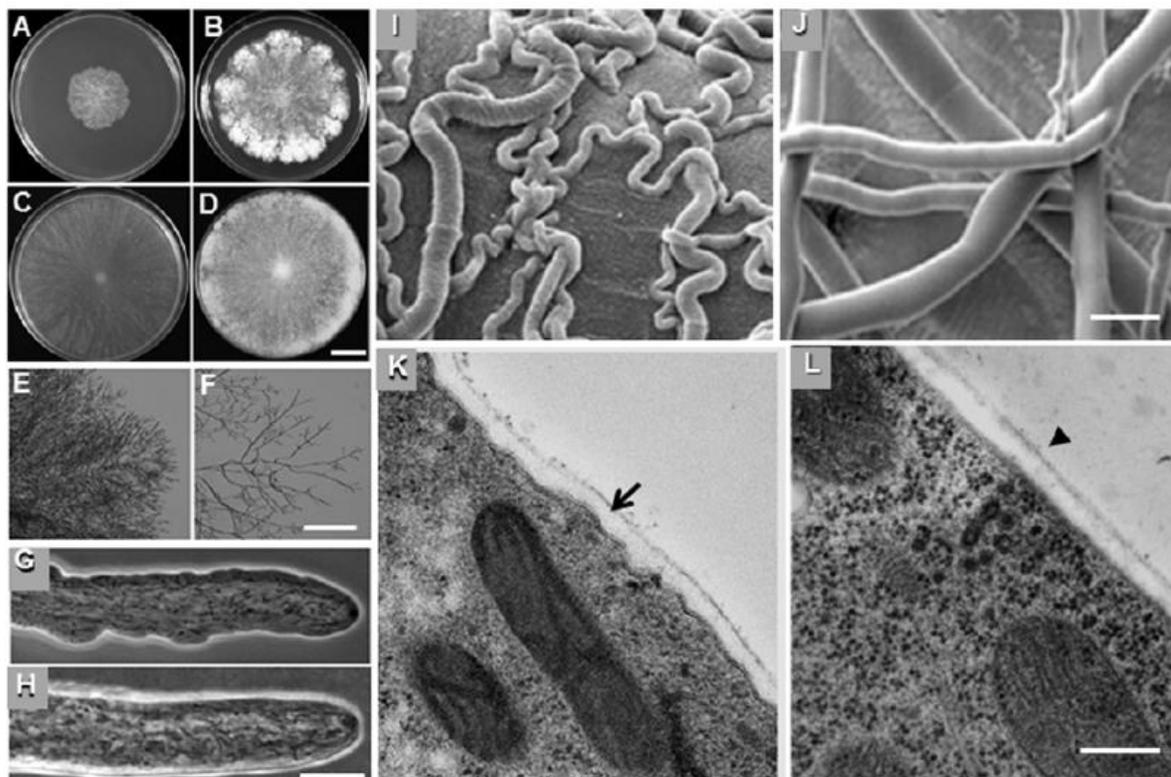


Figura 18. Fenotipo de la mutante $\Delta crn-1$. Morfología colonial (A-B) de $\Delta crn-1$ y (C-D) cepa silvestre después de 24 y 48 h de incubación en MMV a 28°C. Imágenes de baja magnificación del borde de la colonia de (E) $\Delta crn-1$ y (H) la cepa silvestre. Imágenes de contraste de fases de (G) $\Delta crn-1$ y (H) la cepa silvestre. Imágenes por microscopía electrónica de barrido (I) $\Delta crn-1$ y (J) la cepa silvestre. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la región sub-apical de germinulas de 6h de incubación de (K) $\Delta crn-1$ y (L) la cepa silvestre. Una comparación del grosor irregular de la pared celular y la membrana plasmática ondulada de la mutante $\Delta crn-1$ (flecha) con la envoltura uniforme de la cepa silvestre (cabeza de flecha). Escala = A–D) 2.5 cm, (E–F) 100 μ m, (G–J) 10 μ m, (K–L) 1.0 μ m.

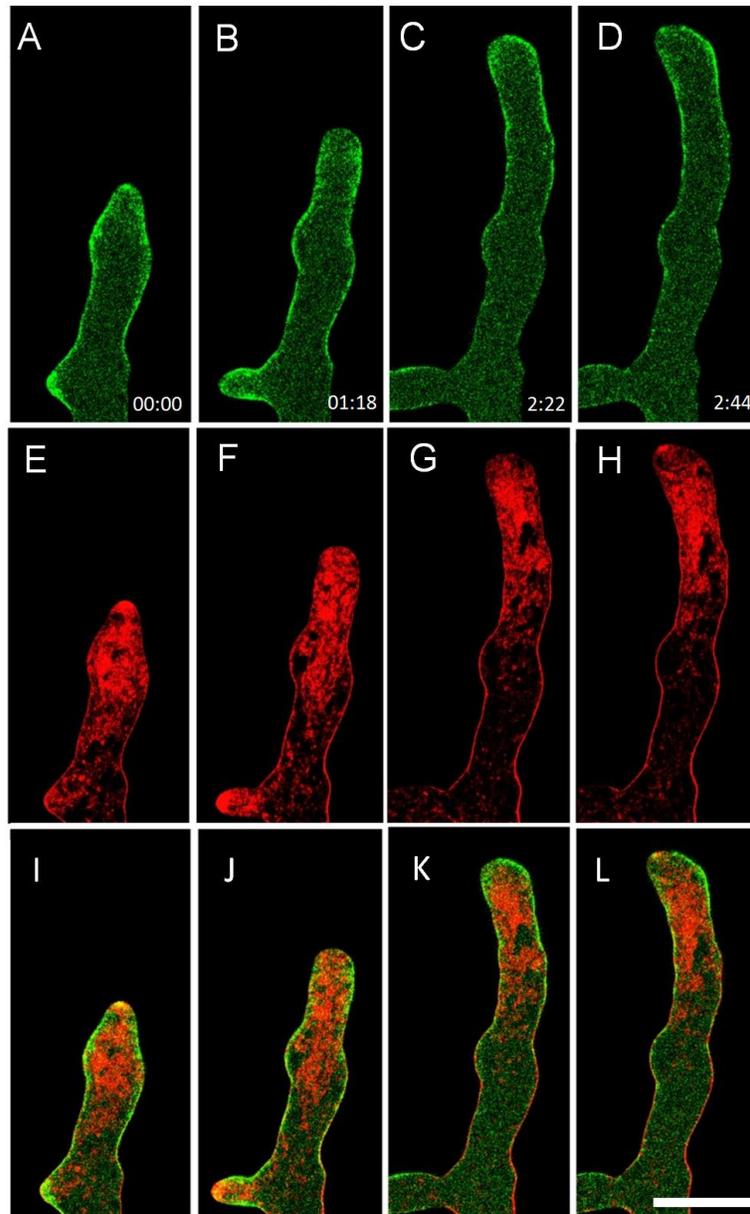


Figura 19. Dinámica del collar endocítico y el comportamiento del Spk en la mutante $\Delta crn1$. En (A-D) se muestra la distribución de actina (Lifeact-GFP), su comportamiento cambia cuando el Spk desaparece, pasando los parches subapicales hacia la zona apical. (E-H) es la tinción con FM4-64. (I-L) es la superimposición de los dos canales de fluorescencia. Escala =10 μ m. Tiempo en min:seg.

6.2.3. Mutante de $\Delta crn-1$ y endocitosis.

El marcador lipofílico FM4-64 ha sido ampliamente utilizado como un marcador fluorescente de endocitosis y de otros componentes del tráfico de membranas en células animales y hongos (Betz *et al.*, 1996; Fisher-Parton *et al.*, 2000). Por lo tanto se utilizó este colorante para medir el tiempo que le tomaba a la cepa mutante $\Delta crn-1$ internalizar este colorante. La tasa de internalización del marcador endocítico FM4-64 se vio significativamente reducida en la mutante $\Delta crn-1$ (Figura 20). Inmediatamente después de añadir el colorante, la membrana plasmática de la cepa silvestre y la cepa mutante se teñían (Figura 20 A-E). Sin embargo, después de tres minutos, la intensidad de la fluorescencia de la cepa silvestre era 3 veces mayor que aquella observada en la cepa mutante de $\Delta crn-1$. La diferencia en la intensidad de la fluorescencia citoplasmática entre la cepa silvestre y la mutante persistió durante todo el periodo de observación (Figura 20I). El tiempo promedio para que el Spk se tiñera por completo fue de ~ 7 min en la cepa mutante de $\Delta crn-1$ y de ~ 2 min para la cepa silvestre (n=30). Para saber si la internalización del colorante coincidía con aquella del collar endocítico, se llevó a cabo un perfil de fluorescencia a lo largo de la hifa y se obtuvo un máximo de intensidad el cual si coincidió con la posición del collar endocítico (Figura 20 J-K)

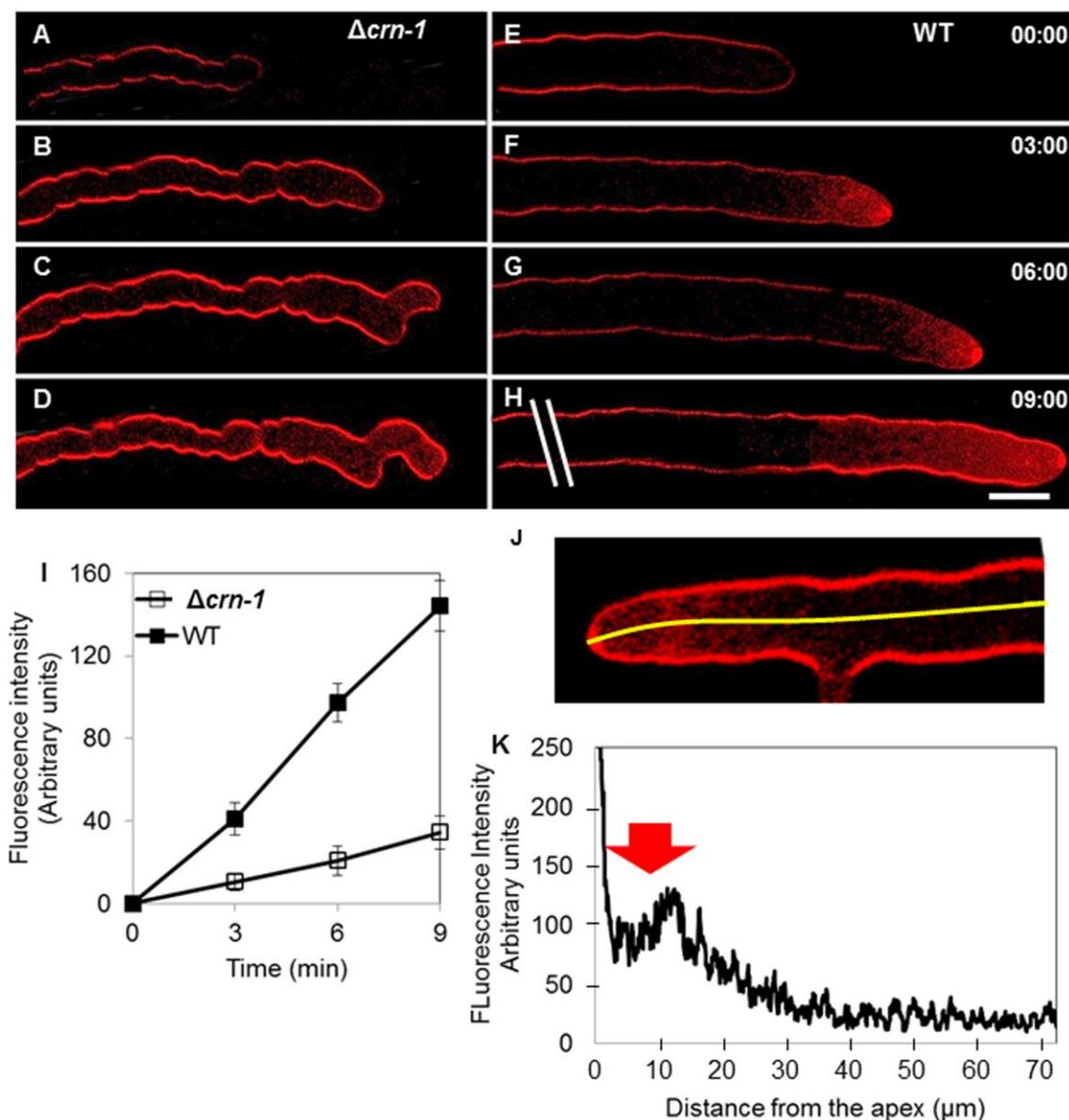


Figura 20. Internalización del colorante lipofílico FM4-64 en la (A-D) mutante $\Delta crn-1$ y (E-H) cepa silvestre. Las líneas dobles blancas indican una distancia de crecimiento de 20 μm . (I) Gráfica de intensidad de fluorescencia de la región subapical (a una distancia de la punta de 10 μm ; el área medida fue de 50 píxeles) de la cepa mutante $\Delta crn-1$ y silvestre (n=30). (J) La imagen muestra la zona de $\sim 70 \mu\text{m}$ de largo (línea amarilla) de donde se midió la intensidad de fluorescencia presentada en la gráfica en (K) (n = 10). La flecha roja indica la donde empieza la zona endocítica. Escala = 10 μm . Tiempo en min:seg.

6.2.4. Dinámica de GTPasas dentro del domo apical de la mutante $\Delta crn1$

Las proteínas Rho GTPasas son reguladores claves que activan una variedad de proteínas efectoras cuando están en estado GTP y regresan a un estado de inactividad cuando están en estado GDP. Juegan un papel muy importante en muchas cascadas de señalización regulando procesos claves como la polaridad celular, entre otros. Estas proteínas han sido reportadas teniendo una localización exclusiva en el domo apical (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Para observar su comportamiento bajo el fenotipo de la mutante $\Delta cor1$ se llevaron a cabo dos transformaciones, una conteniendo el plásmido (Plásmido de CDC-42) el cual solo tiene marcada la proteína CDC-42 con YFP y otra con el marcador de anclaje interactivo para CDC-42 y RAC (CRIB), el cual exclusivamente etiqueta GTPasas activadas en sitios donde el crecimiento polarizado es activo, incluyendo CDC-42^{GTP} y Rac^{GTP}.

En hifas maduras de la cepa mutante de $\Delta crn-1$, la proteína CDC-42-YFP se observó posterior al ápice durante los momentos de crecimiento isotrópico (Figura 21 A), en comparación con los momentos de crecimiento polarizado, donde la localización de la proteína era en el domo apical (Figura 21 D). Este desplazamiento de la fluorescencia se correspondía con el crecimiento de la hifa en grosor (Figura 21 G). Durante la visualización del comportamiento del marcador interactivo CRIB, se observó una distribución de la fluorescencia en forma de luna creciente, la cual ocupaba el ápice y parte del subápice. Esta fluorescencia, se desplazaba más allá de su localización habitual, y se hacía evidente como es que en estas zonas, la membrana plasmática se expandía mientras durara la fluorescencia (Figura 22 A-G). Por otro lado en la cepa silvestre, este marcador CRIB se visualizó en el domo apical con una forma de luna creciente o capuchón muy bien definidos respectivamente, los cuales, se mantenían constantes en esta zona sin pasar de la zona sub apical (Figura 22 H-N). De estas observaciones se puede deducir un modelo de crecimiento en el cual se observa cómo se desplaza la fluorescencia del marcador CRIB hacia las zonas sub-apical y basal, dando

como resultado el crecimiento isotrópico característico de los abultamientos que presenta la cepa mutante $\Delta crn-1$ (Figura 23).

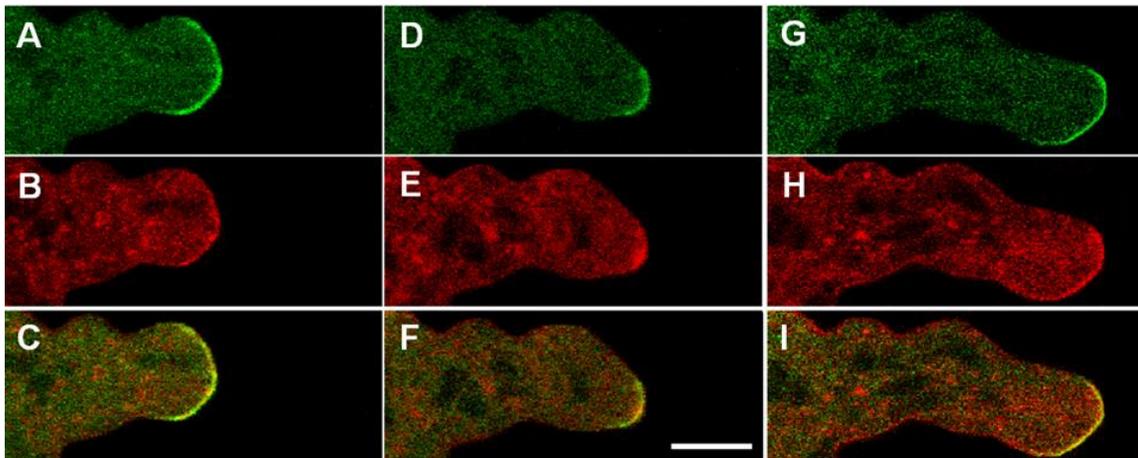


Figura 21. Comportamiento de la proteína Cdc42-YFP en la cepa mutante $\Delta crn-1$. En (A, D y G) se observa a Cdc42-YFP cuando no hay una dirección específica de crecimiento delimitada por un Spk (A). En (B, E y H) se observa la tinción con FM4-64. En (C, F y I) el traslape de los dos canales de fluorescencia. Escala 10 μ m. Tiempo min: seg.

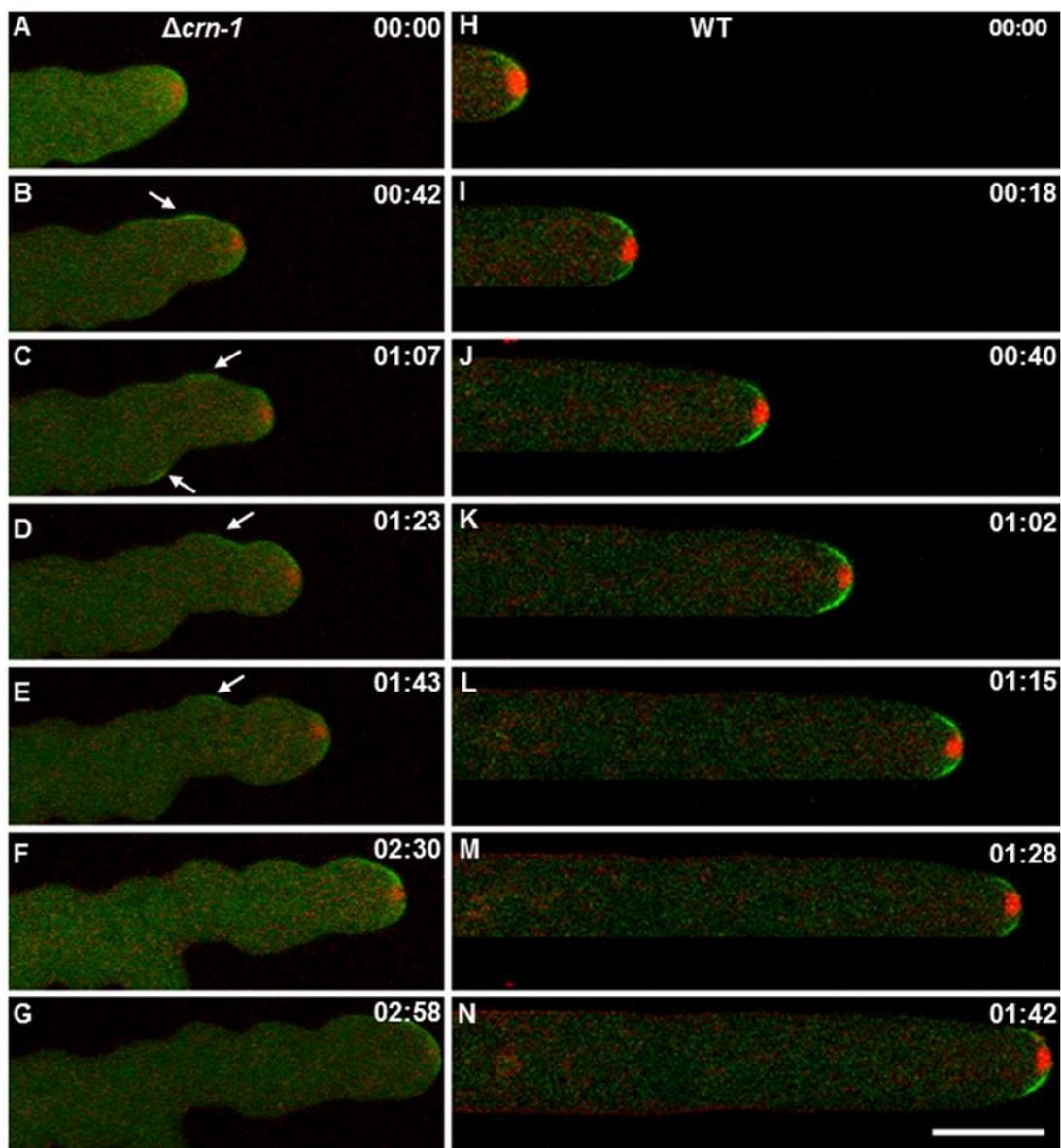


Figura 22. Marcador de GTPasas CRIB en la mutante $\Delta crn-1$. Se desplaza de la zona apical o domo apical (A), hacia las zonas sub-apical (B) e incluso se localiza en la zona basal (C-G). Esta distribución, se correlaciona con crecimiento isotrópico característico de la cepa mutante $\Delta crn-1$, a diferencia de la cepa silvestre (H-N), la cual presentó una distribución de este marcador constante en la zona del domo apical. Escala = 10 μ m. Tiempo en min:seg.

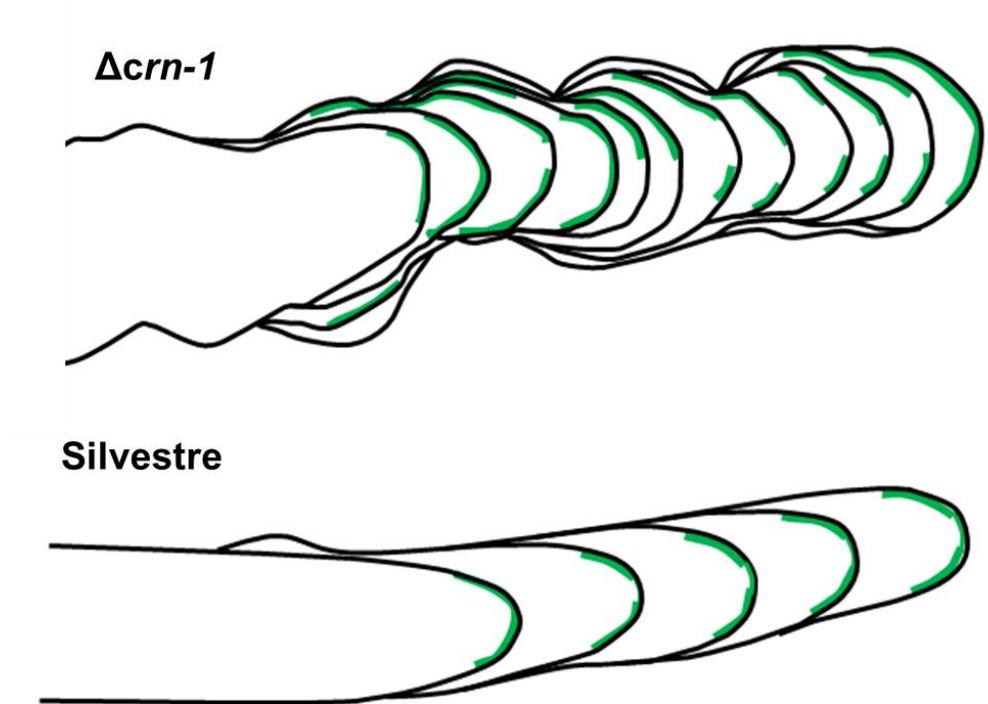


Figura 23. Modelo de la dinámica de GTPasas activadas Cdc-42 y RAC en la mutante $\Delta crn-1$. Las zonas coloreadas de verde representan el marcaje de CRIB. Se observa como este marcaje se desplaza del domo apical y al mismo tiempo, donde se observa, la membrana y la pared se expanden. Esto es muy diferente en la cepa silvestre, donde las zonas de color verde siempre se mantienen constantes.

Capítulo 7

7. Discusión

7.1 Miosinas en *N. crassa*

Las miosinas son proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, las cuales participan junto con esta en varios procesos como división celular, transporte de organelos, endocitosis y recientemente se han implicado en polaridad celular en hifas de hongos (Tang *et al.*, 2003; Jonsdottir & Li, 2004; Krendel & Mooseker 2005; Schuchardt *et al.*, 2005). En hongos filamentosos, es poco lo que se conoce sobre las miosinas (Weber *et al.*, 2003; Schuchardt *et al.*, 2005; Canovas *et al.*, 2011; Calvert *et al.* 2011; Taheri-Talesh *et al.*, 2012). En base a sus características, las miosinas se dividen en más de 30 clases de las cuales solo tres fueron encontradas en *N. crassa*. Se estudiaron las miosinas de las clases II y V; implicadas en formación del anillo de actomiosina durante la formación del septo y en el transporte de materiales hacia el ápice.

7.2 Miosinas en el ápice

Tal y como se esperaba, la MYO-5 se localizó en el ápice de las hifas de *N. crassa*. En trabajos previos, Delgado-Álvarez y colaboradores (2010) describieron una acumulación de actina en el ápice etiquetada con Lifeact-GFP así como también en *A. nidulans* se describió la localización de la miosina de clase V (MyoE) en el ápice (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). En esta región, se ha observado a nivel ultra estructural una maraña de filamentos de actina que se encuentran en el núcleo del Spk (Roberson, no publicado). Estos filamentos de actina, son probablemente las vías a través de las cuales la MYO-5, que es una miosina procesiva, participe en el transporte de algún tipo de vesículas, aunque no es claro que tipo es, debido a que observaciones del transporte de los quitosomas han mostrado que son independientes del movimiento de la MYO-5 (Fajardo-Somera, 2013 Tesis de doctorado). En *A. nidulans*, se observó que MyoE es necesaria para

la correcta localización de SynA (una v-SNARE) en el Spk (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). En este estudio, se puede deducir por la intensidad de la fluorescencia en el ápice, que hay una gran cantidad de esta proteína concentrada en el Spk y en zonas aledañas, por lo que se podría suponer que está asociada a la organización del tráfico en esta zona, sin embargo, esto todavía tendrá que ser probado. La existencia de parches de MYO-5 que se desplazan en dirección contraria al flujo citoplasmático, indica que MYO-5 transporta carga en ambas direcciones, en sentido al crecimiento polarizado o en sentido contrario, por lo que posiblemente tenga un papel en el transporte endosomal. Cuando los microtúbulos son despolimerizados con benomilo, MYO-5 aún continúa llegando al ápice junto con el Spk. En *A. nidulans* se hipotetiza que MyoE es transportada por medio del citoesqueleto microtubular para su posterior arribo al Spk a través del citoesqueleto de actina y es transportada de regreso a las regiones basales a través de microtúbulos (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). En los experimentos con benomilo, se puede apreciar una disminución de la intensidad de fluorescencia así como un decremento de fluorescencia en las zonas adyacentes al Spk. Cuando el citoesqueleto de microtúbulos está afectado, se puede especular que existe una población de Myo5 que no llega al ápice. Por lo que se puede concluir que parte del movimiento de MYO-5 al Spk es independiente del citoesqueleto microtubular sin embargo es totalmente dependiente del citoesqueleto de actina para llegar y mantenerse en el ápice, como es de esperarse.

Estudios recientes muestran que el Spk está conformado de manera estratificada,, en la región del centro se encuentran microvesículas y en la región exterior macrovesículas (Verdín *et al* 2009). Como se mencionó anteriormente, el citoesqueleto de actina forma una compleja red de filamentos en donde las vesículas son depositadas, como en una canastilla, guardando la correlación de micro y macrovesículas. Adicionalmente de los filamentos de actina, se han observado otros componentes en el Spk, como la tropomiosina que regula la asociación entre filamentos de actina y miosinas (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). En *S. cereviceae*, la miosina de clase II Myo1p, podría estar directamente involucrada

en la separación de vesículas de la membrana celular en levaduras (Jonsdottir & Li, 2004). En *A. nidulans*, la miosina de clase II MyoB, juega un papel muy importante en la construcción de septos, no se localiza en el ápice y no es necesaria para el crecimiento apical, concluyendo los autores que no es necesaria para que se lleve a cabo ni la endocitosis ni la exocitosis. Sin embargo, en *N. crassa* la presencia de Myo2 en el ápice, sugeriría la participación de esta proteína en el desarrollo de algún evento involucrado en el crecimiento apical. Este es el primer reporte de una miosina de clase II en el ápice de hongos filamentosos. Esta proteína por sus características, la hacen una proteína excelente para generar fuerza motriz o contráctil a través de tirar simultáneamente de varios filamentos de actina. Su forma le facilita unirse a otras miosinas de clase II para agregarse en filamentos que a su vez se unen a los filamentos de actina para así tener una mayor área de acción para tirar subsecuentemente de otro filamento de actina adyacente. Una posible función de la miosina clase II en el Spk sería ayudando en el movimiento de vesículas dentro del Spk, sirviendo como punto de apoyo donde cada cabeza de miosina tiene la capacidad para empujar una vesícula recubierta de actina, aunque no se tienen antecedentes de esta función. Otra posibilidad, es el aprovechamiento de la fuerza contráctil que confieren estas proteínas, para controlar la plasticidad del Spk al reducir o aumentar el tamaño de la rejilla de actina que estaría sosteniendo al Spk. Además, podría facilitar el movimiento del Spk junto con el ápice en crecimiento. Hasta el momento no se sabe exactamente cómo es que el Spk se desplaza dentro de la célula y más aún como se mantiene en la punta. En muchos organismos, la actina es la responsable del movimiento de células (Geitman *et al.*, 2001; Libbrecht *et al.*, 2001; Momany, 2002). La constante polimerización y despolimerización de filamentos de actina decorados con la miosina de clase II es suficiente para extender lamelopodios y generar la fuerza necesaria para impulsar migración celular (Ponti *et al* 2004). Filamentos adyacentes unos con otros son deslizados unos sobre otros por acción de la miosina de clase II. Movimientos muy rápidos en muy poco tiempo (Anderson *et al* 2008). Estos mismos movimientos podrían

impulsar a un cuerpo formado por una red filamentosa de actina, conteniendo muchas vesículas en su interior y altamente dinámico. La integridad del Spk aún puede ser mantenida una vez que el citoesqueleto de microtúbulos es despolimerizado, sin embargo esto no sucede cuando la actina es afectada, donde el Spk es mucho más difícil de observar formado en el ápice.

Las miosinas de cadena ligera no son consideradas miosinas per se, sin embargo, juegan un papel muy importante en la regulación y estabilidad estructural de las miosinas. La fosforilación de las cadenas ligeras de las miosinas ha demostrado tener una función de regulación en la interacción con actina y en agregarse en forma de filamentos (Xie *et al.*, 1994; Fromherz & Szent-Gyori 1995). En levadura, la miosina de cadena ligera reconocida por participar con la miosina de clase II es Cdc-4p y También se le ha encontrado uniéndose a otras miosinas (Luo *et al.*, 2004). En *N. crassa* CDC-4 tuvo la misma localización en el ápice que las otras miosinas, co-localizando con el Spk. Al mismo tiempo, también se le encontró en el domo apical a diferencia de las otras miosinas, las cuales no fue evidente su presencia en esta región. El marcaje de la proteína CDC-4 bajo el promotor ccg1, no reveló esta localización, pero si ocurrió al expresarla bajo la regulación del promotor nativo con el marcaje con GFP. CDC-4 podría estar participando con ambas miosinas en el ápice, sin embargo esto es muy difícil de probar al momento, porque al intentar fusionar vegetativamente hifas expresando CDC-4-mChFP y cualquier miosina con GFP, la fluorescencia de cada una se observaba deslocalizada. Lo que sugiere que CDC-4 si podría estar participando con ambas miosinas pero que la presencia de las moléculas de proteínas fluorescentes en cada una de ellas les impide físicamente interactuar.

7.3 Miosinas en el septo

A diferencia del ápice, donde no era esperado encontrar a la MYO-2, en el septo ha sido descrita como uno de los componentes del anillo de actomiosina (Calvert *et al.*, 2012). En ausencia de MyoB, la septación prácticamente desaparece. Así mismo, MyoB es indispensable para la deposición normal de

quitina en los septos (Taheri-talesh *et al.*, 2012). En este estudio se encontró que esta proteína se encuentra en el septo desde fases previas a la formación de anillo, cuando se forma la maraña de cables de actina denominada como SAT (Septal Actomyosin Tangle) (Álvarez-Delgado *et al.*, en prep). Como en otros organismos, (Vicente-Manzanares., *et al.*, 2009) esta proteína decora los filamentos que sirven como rieles para deslizar otros filamentos de actina. La constante polimerización y despolimerización de actina más la fuerza contráctil generada por MYO-2 filamentosa debe de guiar la coalescencia de todos los cables para formar el anillo de actomiosina. El marcaje de CDC-4-mChFP junto con actina, revela claramente cuan dinámico es el movimiento de filamentos de actina. La visualización de CDC-4-mChFP estaría sugiriendo que está habiendo participación de esta proteína con alguna miosina. Su localización también decorando filamentos de actina, sugiere una interacción entre actina filamentosa, MYO-2 y CDC-4. Esta participación es altamente dinámica pues se da mientras los cables están en movimiento, el cual podría estar siendo mediado por MYO-2. MYO-5 tuvo una participación menos notoria, al encontrarse una vez ya formado el anillo de actomiosina y ser muy tenue la intensidad de la señal emitida. Por lo que debe de estar participando en llevar algunas vesículas a la zona de crecimiento y formación del septo.

Aún faltan muchas preguntas por responder. La función de las miosinas durante el crecimiento polarizado en el ápice podría resolverse aún más estudiando mutantes para cada miosina. Dobles mutantes nos ayudarían a entender el peso de las funciones mediadas por las miosinas durante el desarrollo hifal. La visualización de un doble marcaje con CDC-4, revelaría mejor la dinámica que existe entre esta proteína y las miosinas. Análisis de TIRF mostrarían con mayor claridad la localización que tienen las miosinas en el ápice. En este estudio se describieron la dinámica y localización de dos de las tres clases en *N crassa*, así como el de una miosina de cadena ligera. Este trabajo abre camino para

futuras investigaciones en esta área del crecimiento polarizado como es el de la participación de la actina y miosinas en hongos filamentosos.

7.2 Coronina

7.2.1 Coronina y ABPs son un componente del collar subapical endocítico

En hifas de hongos, la existencia de una región especializada del citoesqueleto de actina en el sub ápice fue primeramente descubierta en *Aspergillus nidulans*, y se caracterizaba por la presencia de parches de ciertas proteínas de unión a actina (ABPs), tales como AbpA, AmpA, SlaB (Araujo-Bazán, 2008) y fimbrina (Shaw, 2008)), estos parches se encontraban formando un arreglo anular o collar a una distancia corta del ápice de la hifa. Se presentó evidencia indirecta correlacionando este collar con el mayor sitio de endocitosis de hifas en crecimiento. En hifas de *N. crassa* se detectó un collar subapical similar de fimbrina y de otra proteína de unión a actina, el complejo Arp2/3 (Delgado Álvarez *et al.*, 2010). Una vez visualizada la actina en hifas maduras de *N. crassa* mediante el uso de Lifeact, se volvió evidente la relación entre el collar, los parches de ABPs y el citoesqueleto de actina (Delgado-Álvarez *et al* 2010; Berepiki *et al* 2010). Coronina ahora puede ser incluida como otro componente del collar sub apical en *N. crassa* y por ello otro componente más de la maquinaria endocítica de este hongo. La co-localización de coronina con otras ABPs en los mismos parches favorece la noción de que estas ABPs tengan funciones integradas dentro de la endocitosis (de Hostos, 1999; Rybakin, 2005). La alteración de los cables de actina cuando las hifas fueron tratadas con agentes anti actina, ocasionó el desensamblaje del Spk con el citoesqueleto de actina asociado a él, así como la migración cortical de los parches del collar hacia el ápice de la célula. La gran resistencia de los parches de actina a la despolimerización, comparada con los filamentos de actina puede ser atribuida a la presencia estabilizante de diferentes tipos de ABP's en los parches. (Delgado-Álvarez *et al* 2010; Young *et al* 2004)

7.2.2 Consecuencias morfológicas de la delección de coronina

La morfología y el comportamiento de la mutante $\Delta crn-1$ nos proveyeron de conocimiento directo muy útil sobre el rol que cumple el citoesqueleto de actina en el crecimiento polarizado y la morfogénesis hifal. Interesantemente, a pesar de la ausencia de coronina, el hongo continuaba siendo funcional en capacidad de crecimiento, morfogénesis hifal y conidiogénesis, aunque estas funciones estaban notoriamente afectadas. El crecimiento en general se redujo en un 36%, la morfogénesis hifal y la direccionalidad fueron profundamente afectadas así como el crecimiento polarizado era apagado y prendido intermitentemente. Los relieves de las hifas eran desigualmente ondulados y la pared celular mostraba un grosor marcadamente irregular. Este cúmulo de alteraciones se puede atribuir a perturbaciones intermitentes del patrón de migración vesicular exocítico, el cual ha sido predicho como responsable del patrón hifoide normal para la forma de las hifas (Bartnicki-García, 2002; Bartnicki-García *et al*, 1989). Notoriamente, en ausencia de coronina, el citoesqueleto de actina se torna inestable, impactando intermitentemente el ensamblaje del Spk y por consiguiente el proceso ordenado de construcción de pared celular. Presumiblemente, el núcleo rico en actina del Spk es el blanco focal de las perturbaciones citoesqueleticas. En ausencia de un Spk la exocitosis polarizada se vuelve desorganizada produciendo un reparto errático de los componentes para la construcción de pared celular y por ello paredes gruesamente irregulares y una alterada morfología son apreciables. Aunque la falta de coronina afecta fuertemente a la célula, no es un factor esencial para el crecimiento hifal, así como lo son otros componentes de la maquinaria endocítica como la proteína SlaB, la cual se ha demostrado como esencial en *Aspergillus nidulans* (Hervas-Aguilar y Peñalba, 2010). El hallazgo de que *CRN-1-GFP* no se encontraba en el ápice de las hifas fue sorprendente ya que la delección de *crn-1* causo efectos adversos en las actividades apicales (Spk y exocitosis). Esto nos habla de que las perturbaciones en el comportamiento del Spk y la morfogénesis apical observada en la mutante $\Delta crn-1$ deben de ser efectos

indirectos, y que coronina impacta la función del citoesqueleto de actina tanto sub apical como apical debido a que estos están funcionalmente interrelacionados. Aún queda por determinarse a que extensión cualquier reducción en la endocitosis puede afectar al comportamiento del Spk. Todos estos hallazgos indican que un citoesqueleto de actina defectuoso puede soportar el crecimiento polarizado hifal, aunque con serias distorsiones en ciertos momentos; evidentemente, una morfogénesis normal u óptima requiere de un citoesqueleto de actina intacto.

7.2.3 Coronina es necesaria para la estabilidad y prevalencia del Spk

Se cree que el Spk funciona como un centro suministrador de vesículas necesario para la expansión polarizada de la pared celular y membrana plasmática de la punta de la hifa. También, se ha observado que la posición y trayectoria del Spk es suficiente para generar un gradiente ordenado de construcción de pared responsable de la forma hifoide característica de las hifas y de la direccionalidad de su crecimiento (Bartnicki-García, 1996; Riquelme *et al.*, 1998). Recientemente ha sido demostrado que el Spk de *N.crassa* almacena en forma estratificada las microvesículas responsables para la síntesis de quitina (quitosomas) y macrovesículas involucradas en síntesis de B 1, 3-glucana (Verdín *et al.*, 2009). Primero Girbardt (1957) y después Bartnicki-García *et al* (1996), Riquelme *et al* (1998) y más convincentemente Bracker *et al* (1997) correlacionaron la posición y la trayectoria del Spk con la dirección de crecimiento. La variable y algo errática morfología de la mutante de coronina, permitió observar la relación entre el ensamblaje de actina y el Spk de forma detalla y dinámica así como también permitió evaluar sus consecuencias morfogénicas. Cuando se observó que el Spk estaba presente y bien definido, había una señal de actina muy fuerte en el núcleo del Spk. La hifa crecía rápidamente y generaba tubos con formas hifoides. Cuando el Spk estaba ausente, el núcleo de actina desaparecía, la polaridad se disminuía o se perdía y la célula comenzaba una expansión isotrópica y las puntas adoptaban una forma hemiesferoide. La mayoría de los cambios morfológicos observados pueden ser correlacionados con una repetida falla para mantener un

Spk con un núcleo funcional. Esta alteración en la integridad del Spk produce la morfología abultada y ondulada de la hifa de la mutante $\Delta crn-1$. La recurrente pérdida de la integridad del Spk coinciden con la dispersión del collar marcado por actina-GFP fuera de su lugar normal en el subápice, sugiriendo que ambas perturbaciones fueron causadas por una falla generalizada del citoesqueleto de actina desprovisto de coronina. El perfil ondulado de las hifas mutantes de $\Delta crn-1$, más el grosor irregular de la pared celular son fuertes indicadores que la migración ordenada de vesículas constructoras de pared fue alterada intermitentemente debido a la ausencia del efecto estabilizante de coronina. Los abultamientos en el perfil abultado de la hifa pueden ser resultado de 1) una irregularidad en la integración y desintegración del Spk, esto ocasiona periodos de crecimiento hifoidal y periodos de crecimiento isotrópico respectivamente; 2) formación aleatoria de centros de crecimiento secundarios en el subapice proximal, algunos de los cuales aparentan ser intentos abortivos de ramificaciones los cuales fueron incapaces de mantener el crecimiento polarizado. Claramente, en ausencia de coronina el Spk difícilmente mantiene su integridad y movimiento constantes, perdiendo intermitentemente su habilidad de coordinar el flujo exocítico de vesículas. Como resultado, el crecimiento se torna isotrópico y un efímero centro de crecimiento secundario puede aparecer en la región inmediata a la subapical. Coronina aparenta ser importante en mantener un función estabilizadora de la organización de todo el aparato apical de crecimiento y del anillo endocítico subapical.

7.2.4. ¿Están la exocitosis y la endocitosis ligadas?

La proximidad espacial y la complementariedad funcional entre el reparto de vesículas secretoras en el domo apical y la recuperación de membrana plasmática y proteínas en el collar endocítico subapical posee preguntas intrigantes de posibles regulaciones cruzadas entre dos procesos en hifas de hongos (Peñalva, 2010, Shaw *et al.*, 2011). El rol de la exocitosis sobre la endocitosis parece ser directo, con la endocitosis siendo la consecuencia de un

exceso de acumulación de membrana plasmática generada por exocitosis. Sin embargo, lo contrario es menos claro, pero está siendo activamente explorado (Peñalva, 2010, Shaw *et al.*, 2011). Cálculos sobre deposición de membrana a través de la exocitosis apical y la cantidad necesaria para extender la membrana plasmática indican que un exceso de membrana es usualmente producido durante la elongación hifal (Bartnicki-García, no publicado). En acuerdo con esta suposición, un rol primario para la endocitosis sería el de mantener un balance correcto en la hifa en crecimiento. Junto con el reciclaje de membrana, la endocitosis también podría funcionar recuperando proteínas integrales dentro de la membrana, por lo tanto creando una relación en tándem entre la exocitosis y la endocitosis. Nuestras observaciones sobre la incorporación del colorante FM4-64, indican que la ausencia de coronina redujo más no eliminó la endocitosis. Sin embargo, los estudios con las Rho-GTPasas en la mutante de coronina, sugieren que aún sigue habiendo actividad de deposición de membrana la cual solo está restringida a la zona apical durante el crecimiento de una cepa silvestre. Ahora bien, debido a que coronina solo se localiza en el sub ápice y no en el Spk, los defectos presentados en el Spk no se explican con la internalización de marcadores de polaridad y secreción. A no ser que alguna de las proteínas que son endocitadas sea una proteína que active la polimerización de actina en el ápice y, al mismo tiempo, esta proteína tenga que ser reciclada de vuelta al ápice para mantener continua la señal de polimerización de f-actina necesaria para mantener un núcleo de actina funcional que sostenga al Spk. Debido a esto, así como es discutido anteriormente, parecería que la coronina no sería una proteína esencial para la operación del collar subapical endocítico, más si asegura un rango óptimo de endocitosis.

7.2.5 Dos citoesqueletos de actina funcionalmente diferentes durante el crecimiento hifal

Nuestro hallazgo de que coronina, mas fimbrina y el complejo Arp2/3 están presentes en el anillo subapical, más no en la región del domo apical de *N. crassa*

apoya la noción de que existen dos citoesqueletos de actina funcionales diferentes involucrados en el crecimiento polarizado de la hifa, uno en forma de collar subapical hecho de actina y parches de ABP's y otro hecho de cables de actina. Mientras el citoesqueleto de actina en el ápice hifal dirige la exocitosis, aquel en el sub ápice estaría envuelto en dirigir la endocitosis. Presumiblemente, una razón para la participación de varias ABPs en el sub ápice de la hifa son los requerimientos distintos para llevar a cabo la intrusión a diferencia de la extrusión de vesículas dentro y fuera del citoplasma respectivamente. Estos dos procesos se enfrentan a obstáculos totalmente diferentes; y aún más la endocitosis debe sobreponerse a la enorme fuerza de turgor del citoplasma, mientras que el paso final de la exocitosis sería enormemente facilitado por el turgor citoplasmático. Debido a que hemos comprobado que coronina fue realmente borrada de la mutante $\Delta crn-1$; coronina, siendo no esencial, si juega un papel muy importante en mantener al citoesqueleto de actina y tal vez a todo el citoesqueleto de actina operando normalmente. Esta conclusión estaría en acuerdo con el hecho ya sabido de que coronina tiene un rol en unir microtúbulos con actina F (Goode *et al.*, 1999; Heil-Chapdelaine *et al.*, 1998). La incompleta pérdida de polaridad y crecimiento de la mutante $\Delta crn-1$ puede ser que se deba probablemente a una compensación funcional conferida por otros elementos del citoesqueleto. Aparentemente, el grado de redundancia varía en otros organismos tal como es evidente por el hecho de que la delección de coronina en levadura no tiene cambios aparentes obvios en el fenotipo y por ende parece ser completamente compensada (Goode *et al.*, 1999). El modo exacto de operar de la proteína coronina aún no es completamente conocido. Hallazgos en otros organismos sugiere que coronina opera en conjunto con otras ABPs, notablemente cofilina y Arp2/3 para promover tanto el ensamblaje y desensamblaje de actina (Gandhi *et al.*, 2009). Coronina es el interruptor entre el activar y desactivar al complejo Arp2/3 y afectar la tasa de recambio de actina en los parches (Liu *et al.* 2011). Puestos todos nuestros hallazgos juntos, estos indican que un citoesqueleto de actina defectuoso puede soportar el crecimiento polarizado hifal aunque algunas

veces presenta serias distorsiones; evidentemente, una morfogénesis normal u óptima requiere de un citoesqueleto de actina intacto.

7.3. Conclusiones

7.3.1 Miosinas

- ❖ MYO-5, MYO-2 y CDC-4 se localizan en el ápice, colocalizando con el Spk.
- ❖ MYO-5, MYO-2 y CDC-4 forman pocos parches que viajan en dirección contraria al flujo citoplasmático. Posibles endosomas.
- ❖ CDC-4 se encuentra en el domo apical, en forma de media luna
- ❖ MYO-5, MYO-2 y CDC-4 participan en la formación de septos y se localizan en el anillo de actomiosina.
- ❖ Solo MYO-2 y CDC-4 se visualizan en forma de cables antes de la construcción de anillo de actomiosina.
- ❖ Solo CDC-4 y no MYO-2 ni MYO-5 se visualizó en forma de parches durante la construcción del anillo de actomiosina

7.3.2 Coronina

- ❖ *CRN-1* se localiza en el anillo endocítico sub-apical
- ❖ La co-localización de coronina y ABPs apoya la idea de que estas proteínas trabajan en conjunto durante la endocitosis
- ❖ *CRN-1* parece tener una función estabilizadora de la organización de todo el aparato apical y subapical de actina durante el crecimiento polarizado
- ❖ La falta de *CRN-1* retrasa la tasa de internalización de FM4-64
- ❖ Existe una zona de mayor acumulación de FM4-64 y ésta coincide con la zona donde se encuentra el anillo endocítico sub-apical.
- ❖ En ausencia de coronina, los marcadores de polaridad CCD-42 y RAC extienden su localización de la zona apical a la zona sub-apical.

8. Referencias bibliográficas

Anderson, B. L., Boldogh, I., Evangelista, M., Boone, C., Greene, L. A., & Pon, L. A. (1998). The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, MYO-5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *Journal of Cellular Biology*. 141: 1357–1370.

Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A. & Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 67: 891–905.

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

Aschenbrenner, L., Lee, T., & Hasson T. (2003). Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Molecular Biology of the Cell*. 14: 2728–2743.

Atkinson, H.A., Daniels, A., & Read, N.D. (2002). Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*. 37: 233–244.

Bahler, M. (1996). Myosins on the move to signal transduction. *Current Opinion of Cell Biology* 8: 18–22.

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

Bartnicki-García, S. (1996). The hypha: unifying thread of the fungal kingdom. In: B. Sutton (ed). *A Century of Mycology*. Cambridge: Cambridge University Press p.105–133.

Bartnicki-García, S. (2002). Hyphal tip growth: outstanding questions. In H .D. Osiewacz (ed.) *Molecular biology of fungal development*. Marcel Dekker, Inc., New York N.Y. p. 29-58.

Berepiki, A., Lichius, A, Shoji J, Y., Tilsner, J., & Read, N. D. (2010). F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 9: 547–557.

Bracker, C. E., Murphy, D. J., & Lopez-Franco R. (1997). Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis growing in fungal hyphae. *Proceedings of SPIE* 2983: 67.

Bridgman, P. C. (1999). Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *Cellular Biology*. 146: 1045–1060.

Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 79: 473-495.

Cai, L., Holoweckyj N. & Schaller, M. D. (2005). Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 131913-23

Campanoni, P., Sutter, J. U., Davis, C. S., Littlejohn, G. R. & Blatt, M. R. (2007). A generalized method for transfecting root epidermis uncovers endosomal dynamics in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Journal*. 51: 322–330.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. Academic Press, London. 588 p.

Castro-Longoria, E., Brody, S. & Bartnicki-Garcia, S. (2007). Kinetics of circadian band development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 672–681.

Chimini, G. & Chavrier, R. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nature Cell Biology*. 2: 1191-1196

Cogoni, C. & Macino, G. (1999). Homology dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 657-662.

Conesa, A., Punt, P. J., Van L. N., & Van den Hondel, C. A. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*. 33: 155-171.

Davis, R. H & Perkins, D. D. (2002). *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*. 3: 39-403

de Hostos, E. L. (1999). The coronin family of actin-associated proteins. *Trends in Cell Biology* 9: 345–350.

Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith L. G. & Mouriño Pérez R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 47: 573-586.

Desautels, M., Den Haese, J. P., Slupsky, C. M., McIntosh, L. P. & Hemmingsen, S. M. (2001). CDC-4p, a contractile ring protein essential for cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a phosphatidylinositol 4-kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 5932–5942.

Dos Remedios, C. G, Chhabra, D. Kekic, M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry, D. A. & Nosworthy, N. J. (2003). Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiology Review*. 83: 433-473.

Evangelista M., Klebl, B. M., Tong, A. H., Webb, B. A., Leeuw, T., Leberer E., Whiteway, M., Thomas, D. Y. & Boone, C. (2000). A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *The Journal of Cell Biology*. 148: 353–362.

Fischer-Parton, S., Parto R. M., Hickey P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., & Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analyzing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*. 198: 246–259.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi M., Qui, D., Ianakiev P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I.,

Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C. & Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422: 859-868.

Gandhi, M., Achard, V., Blanchoin, L., & Goode, B. (2009). Coronin Switches Roles in Actin Disassembly Depending on the Nucleotide State of Actin. *Molecular Cell*. 34: 364–374.

Geli, M. I., & Riezman, H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272: 533–535.

Girbardt, M. (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta*. 50: 47–59.

Goode, B. L., Wong, J. J., Butti, A. C., Peter, M., & McCormack, A. L. (1999). Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *Journal of Cellular Biology*. 144: 83–98.

Goode, B. L., Wong, J. J. & Butty, A. C. (1999). Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *Journal of Cellular Biology*. 144: p 83–98

Goodson, H. V. & Dawson, S. C. (2006). Multiplaying myosins. *PNAS*. 103(10): 3499.

Harris, S. D. (2006). Cell polarity in filamentous fungi: zapping the mold. *International Review of Cytology*. 251: 41–77.

Hasson, T. (2003). Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *Journal of Cell Science*. 116: 3453–3461.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105. 1422-1432.

Heath, I. B. (1990). The roles of actin in tip growth of fungi. *International Review of Cytology*. 123: 95-127.

Heath, I.B., & Steinberg, G. (1999). Mechanism of hyphal growth: Ameba in a tube revisited. *Fungal Genetics Biology*. 28: 79-93.

Heckman, D. S., Geiser D. M., Eidell B. R., Stauffer R. L., Kardos N. L., & Hedges S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*. 293: 1129-1133.

Heil-Chapdelaine, R. A., Tran, N. K., & Cooper, J. A. (1998). The role of *Saccharomyces cerevisiae* coronin in the actin and microtubule cytoskeletons. *Current Biology*. 8: 1281–1284.

Hervas-Aguilar, A. & Penalva, M. A. (2010). Endocytic Machinery Protein SlaB Is Dispensable for Polarity Establishment but Necessary for Polarity Maintenance in Hyphal Tip Cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 9: 1504–1518.

Hickey, P. C., Swift, S.R., Roca, M. G. & Read, N. D. (2004). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*. 34:63-87.

Hodge, T. & Cope M. J. (2000). A myosin family tree. *Journal of Cell Science*. 113: 3353–3354.

Jonsdottir, G. A., & Li, R. (2004). Dynamics of yeast myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Current Biology*. 14: 1604–1609

Langford, G. M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic*. 3: 859–865.

Libbrecht, L., Cassima, D., Desmet, V., & Roskams T. (2001). Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochemistry and Cell Biology*. 116: 233–239

Liu, S. L., Needham K. M., & May J. R. (2011). Mechanism of a Concentrationdependent Switch between Activation and Inhibition of Arp2/3 complex by Coronin. *Journal of Biological Chemistry*. 586: 17039–17046

Lodish, H. A., Berk, P., Matsudaira, C. A., Kaiser M., Krieger M.P., Scott L., Zipursky J., & Darnell G. (2004). *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. W. H. Freeman, pp. 700-787

Luo, J., Vallen E. A., Dravis, C., Tcheperegine, S. E., Drees, B., & Bi E. (2004). Identification and functional analysis of the essential and regulatory light chains of the only type II myosin Myo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 165 (6):843–855

Machesky, L. M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F. J., Grogan, A., Totty, N. F., Burlingame, A. L., Hsuan, J. J. & Segal, A. W. (1997). Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodia protrusions and is composed of evolutionary conserved proteins. *Biochemical Journal*. 328: 105-112

Maniak, M., Rauchenberger, R., & Albrecht, R. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*. 83: 915-24.

McCollum, D., Feoktistova, A., Morphew, M., Balasubramanian, M. K. & Gould, K. L. 1995. The *Schizosaccharomyces pombe* CDC-4+ gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*. 130: 651-660

Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 580–585

Moseley, J. B. & Goode, B. I. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 70: 1605–645.

Osharov, N., Yamashita R. A., Chung Y. S., & May G. S. (1998). Structural requirements for in vivo myosin I function in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 27017–27025.

Park, I. C., Horiuchi, H., Hwang C. W., Yeh, W. H., Ohta A., Ryu J. C., & Takagi M. (1999). Isolation of *csm1* encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain from the rice blast fungus. *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 131–139.

Peñalva, M. A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology*. 42: 963–975.

Peñalva, M. A. (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Current Opinion in Microbiology* 13: 684–689.

Pollard, T. D. & Borisy G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112: 453–465.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., & Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 559–591.

Punt, P. J., Seiboth, B., Weenink, X. O., Van, Z. C., Lenders, M., Konetschny, C., Ram, A. F., Montijn, R., Kubicek, C. P., & van den Hondel, C. A. (2001). Identification and characterization of a family of secretion-related small GTPase-encoding genes from the filamentous fungus *Aspergillus niger*: a putative SEC4 homologue is not essential for growth. *Molecular Microbiology*. 41: 513-525.

Read, N. D. & Kalkman, E. R. (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology*. 39: 199–203.

Riquelme M., Reynaga-Peña C. G., Gierz G., & Bartnicki-García S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae?. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 101–109.

Riquelme, M., McDaniel D. P., Roberson, R. W. & Bartnicki-Garcia, S. (2002). The effect of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 37: 171–179

Rybakin, V., & Clemen, C. S. (2005). Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays*. 27: 625–32.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. , New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schuchardt, I., Abmann, D., Thines, E., Schuberth, C. & 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: 5191–5201.

Smith, M., K, Wood, W. B. & Knight, J. K. (2008). The Genetics Concept Assessment: a new concept inventory for gauging student understanding of genetics. *CBE Life Science Education*. 7: 422–430.

Taheri-Talesh N., Xiong Yi & Oakley B. R. (2012). The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. DOI: 7(2) e31218 DOI 10.1371/journal.pone.0031218

Taheri-Talesh, N., Tetsuya H., Araujo-Bazan, L., Xiaowei D., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2008). The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*, *Molecular Biology of the Cell*. 19: 1439–1449.

Tang, F., Kauffman, E. J., Novak, J. L., Nau, J. J, Catlett, N. L., & Weisman, L. S. (2003). Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature*. 422: 87–92.

- Trybus, K. M. (1994). Regulation of expressed truncated smooth muscle myosins. Role of the essential light chain and tail length. *Journal of Biological Chemistry*. 269(33): 20819–20822
- Vicente-Manzanares, M., Xuefei, M., Adelstein, R. S., & Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10(11): 778–790
- Virag, A., & Harris, S.D. (2006). The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycological Research* 110:4–13.
- Walker, S. K. & Garrill, A. (2006). 'Actin microfilaments in fungi.' *Mycologist*. 20: 26-31
- Walther, A. & Wendland, J. (2003). An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Current Genetics*. 42(6): 339-343.
- Weber, I., Gruber, C. & Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 15: 2826–2842.
- Westergaard, M. & Mitchell, H. K. (1947). *Neurospora V*: a synthetic medium favoring sexual production. *American Journal of Botany* 34:573-574
- Winder, S.J. & Ayscough, K. R. (2005). mActin Binding Proteins. *Journal of Cell Science*. 118: 651-654
- Yamashita, R. A., Osherov, N. & May, G. S. (2000). Localization of wild type and mutant class I myosin proteins in *Aspergillus nidulans* using GFP-fusion proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 45: 163–172.
- Yan, Q., Sun, W., Kujala, P., Lotfi, Y., Vida, T., & Bean, A. (2005). CART: An Hrs/Actinin-4/BERP/Myosin V Protein Complex Required for Efficient Receptor Recycling. *Molecular Biology of the Cell*. 16: 2470–2482.
- Young, M.E., Cooper, J.A., & Bridgman, P.C. (2004). Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *Journal of Cell Biology*. 166: 629–635.