

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Análisis funcional de la miosina de clase II en la organización
apical en el hongo filamentoso *Neurospora crassa***

Tesis

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

Presenta

Fernando Alonso Núñez Moreno

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Fernando Alonso Núñez Moreno

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Director de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

Miembro del comité

Dr. Salomón Bartnicki García

Miembro del comité



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinador del Posgrado en ciencias de la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Fernando Alonso Núñez Moreno © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis de **Fernando Alonso Núñez Moreno**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en ciencias en ciencias de la vida con orientación en microbiología.

Análisis funcional de la miosina de clase II en la organización apical del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Rosa Reyna Mouriño Pérez

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es un modelo de estudio con crecimiento polarizado como resultado de la distribución controlada de vesículas secretoras a la punta en crecimiento. Uno de los componentes más importantes para el crecimiento polarizado es el citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas a actina (ABPs), incluyendo los motores moleculares de la familia de las miosinas. Las miosinas de clase II son proteínas capaces de utilizar la energía química del ATP y formar filamentos bipolares para generar movimiento y fuerza. En el presente trabajo se estudió a la MYO-2, una miosina de clase II de *N. crassa* y su papel en la morfogénesis y el crecimiento polarizado utilizando una cepa que expresa la MYO-2 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) y una mutante por delección ($\Delta myo-2$). La MYO-2-GFP se localizó en el septo, macroconidios y en la punta de la hifa, co-localizando con el Spitzenkörper. La MYO-2-GFP co-localiza con el Spk teñido con FM4-64. El análisis FRAP muestra una recuperación de la fluorescencia del 50% a los 51 segundos y una recuperación total a los 2:10 minutos. Los ensayos con blebistatina muestran que la localización de la MYO-2 es dependiente de su actividad ATPasa ubicada en el dominio motor y la deslocalización provoca cambios en la morfología de la hifa. La cepa mutante $\Delta myo-2$, mostró anomalías en vacuolas, una reducción de 77% en la tasa de crecimiento, una reducción de la formación de micelio aéreo en un 95%, una reducción del 57% en el diámetro de las hifas, una reducción del 45% en su biomasa y una reducción del 54% en el número de ramificaciones. La septación y conidiación están severamente afectadas, así como la capacidad de controlar daños ante lesiones mecánicas. Las observaciones de la punta de la cepa mutante $\Delta myo-2$ muestra que el Spk se encuentra morfológicamente normal en ausencia de la MYO-2, sin embargo, se observa un aumento en los cambios del eje de crecimiento en la cepa mutante $\Delta myo-2$. Los resultados de este trabajo indican que la MYO-2 es fundamental para la formación del septo, liberación de macroconidios y micelio aéreo, se encuentra asociado estructuralmente con Spk y participa en el direccionamiento del crecimiento.

Palabras clave: miosina, blebistatina, Spitzenkörper, *Neurospora crassa*

Abstract of the thesis presented by **Fernando Alonso Núñez Moreno** as a partial requirement to obtain the master in science degree in life science with orientation in microbiology.

**Functional analysis of a class II myosin in the apical organization of the fungus
*Neurospora crassa***

Abstract approved by:

Rosa Reyna Mouriño Pérez

The filamentous fungus *Neurospora crassa* is a model of study that has polarized growth as a result of the controlled release of exocytic vesicles to the tip. One of the most important component for polarize growth is the actin cytoskeleton and the actin binding proteins (ABP), including motor molecules like the family of myosins. The type II myosins are proteins capable of using the chemical energy of ATP and assemble in bipolar filaments to generate movement and force. In the present work MYO-2 a type II myosin was studied in *N. crassa*, we explored the role of this protein in morphogenesis and polarized growth by using a strain that expresses MYO-2 fused to a green fluorescent protein (GFP) and a deletion mutant of *myo-2* ($\Delta myo-2$). The MYO-2-GFP was localized to the tip of the hypha, in the septum and in microconidia. The MYO-2-GFP in the tip co-localizes with the Spk stained with FM4-64. The FRAP analysis shows a recovery of 50% of the fluorescence after 51 seconds and a total recovery after 2:10 minutes. The assays with blebistatin show that the localization of MYO-2 is dependent on its ATPase activity, localized in the motor domain. The mutant strain $\Delta myo-2$, showed vacuole abnormalities, a reduction in growth rate of 77%, a reduction in aerial mycelium formation of 95%, a reduction in diameter of the hypha of 57%, biomass reduction of 45% and the number of ramifications in 54%. Septation and conidiation are severely affected as well as the capacity to control damage after mechanical injury. The analysis of the tip in mutant strain $\Delta myo-2$ showed that the Spk is morphologically normal in the absence of MYO-2, however, it's been observed an increase in the change of the growth axis in the mutant strains $\Delta myo-2$. The results of this work suggest that the MYO-2 is fundamental for the formation of septa, liberation of macroconidia and the formation of aerial mycelium, it is structurally associated to the Spk and is involved in the directioning of growth.

Keywords: myosin, blebistatin, Spitzenkörper, *Neurospora crassa*

Dedicatoria

Para Lissvia

y

Sofía

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca de posgrado otorgada y al fondo CONACYT-Ciencia Básica 133518 por el financiamiento del proyecto.

Al **CICESE, al Departamento de Microbiología y al Laboratorio de Microscopía Óptica** por los espacios y la oportunidad que me dieron para realizar mi trabajo.

A la **Dra. Rosa R. Mouriño Pérez** por ser mi mentora y guía durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales, la **Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes** y al **Dr. Salomón Bartnicki García** por sus observaciones y recomendaciones durante cada una de las reuniones que sostuvimos respecto a este trabajo

A la **Dra. Olga A. Callejas Negrete** por toda la ayuda que me brindó durante mi estancia en el laboratorio de microbiología y por su disposición para compartir su conocimiento y enseñar a las personas que inician su formación científica.

A mis compañeros de laboratorio por toda la ayuda que me han brindado, con mención especial para **Fausto y Arianne**, quienes me apoyaron en diferentes aspectos del desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todo **el personal** que hace posible tener al laboratorio y las instalaciones del departamento de microbiología en óptimas condiciones.

Tabla de contenidos

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Reino fungi	1
1.2 <i>Neurospora crassa</i>	1
1.3 Crecimiento polarizado.....	3
1.4 Spitzenkörper	4
1.5 Citoesqueleto	5
1.5.1 Actina.....	6
1.5.2 Miosinas	8
1.5.2.1 Miosina II	8
Capítulo 2. Justificación	13
Capítulo 3. Planteamiento del problema	14
Capítulo 4. Hipótesis	15
Capítulo 5. Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Capítulo 6. Material y métodos	17
6.1 Análisis bioinformático	17
6.2. Microbiología	17

	vii
6.2.1 Cepas y condiciones de cultivo	17
6.2.2 Obtención de conidios	17
6.2.3 Obtención de micelio	18
6.2.4 Cruzas sexuales	18
6.3 Microscopía	19
6.3.1 Microscopía estereoscópica	19
6.3.2 Microscopía confocal.....	19
6.3.3 Gráfica de dirección del Spk.....	19
6.3.4 Tinciones	20
6.3.5 Ensayos con blebistatina.....	20
6.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta myo-2$	20
6.4.1 Morfología colonial	20
6.4.3 Medición de la tasa de ramificación.....	21
6.4.4 Medición de biomasa.....	21
6.4.5 Medición de la producción de conidios.....	21
6.4.6 Visualización de conidióforos	21
6.4.7 Ensayos de lesión mecánica	21
6.4.8 Medición del diámetro de las hifas	21
6.4.9 Cuantificación de quitina	22
6.5 Biología molecular	22
6.5.1 Análisis de la mutante.....	22
Capítulo 7. Resultados	23
7.1 Análisis bioinformático	23
7.1.1 Alineamiento local en el genoma de <i>N. crassa</i>	23
7.1.2 Análisis de dominios	23
7.2 Microscopía con proteínas fluorescentes	25

	viii
7.2.1 Dinámica y localización de la MYO-2	25
7.2.2 Localización de la MYO-2-GFP y el Spk	26
7.2.3 FRAP apical.....	27
7.2.4 Ensayos con blebistatina	28
7.3 Caracterización de la $\Delta myo-2$	30
7.3.1 Comprobación de la mutación por delección de la <i>myo-2</i>	30
7.3.2 Tasa de crecimiento.....	31
7.3.3 Biomasa	32
7.3.4 Ramificación.....	32
7.3.5 Diámetro de las hifas.....	33
7.3.6 Septación	33
7.3.7 Esporulación.....	36
7.3.8 Respuesta al daño mecánico	37
7.3.9 Fragilidad de la pared celular	37
7.3.10 Cuantificación de proteínas y quitina.....	40
7.3.11 Vacuolas	40
7.3.12 Mitocondrias	41
7.3.13 El Spk.....	42
7.3.14 Dirección del crecimiento	43
Capítulo 8. Discusión.....	45
8.1 La MYO-2 y el Spk	45
8.2 Impacto de la ausencia de <i>myo-2</i> en el crecimiento de <i>N. crassa</i>	45
8.3 Formación de septos y esporas en la mutante $\Delta myo-2$	46
8.4 Mitocondrias y vacuolas en la mutante $\Delta myo2$	46
Capítulo 9 Conclusiones.....	48
Lista de referencias bibliográficas	49

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo vital del hongo <i>Neurospora crassa</i>	2
2	Modelo del ápice de una hifa.....	4
3	Esquema de la polimerización de los filamentos de actina.....	6
4	Polimerización de actina mediada por nucleadores.....	7
5	Modelo de la miosina de clase II.....	9
6	Modelo de los filamentos bipolares de la miosina de clase II y filamentos de actina.....	10
7	Técnica para visualizar conidióforos.....	22
8	Alineamiento local de secuencias aminoacídicas de la MYO-2....	23
9	Dominios de la MYO-2.....	24
10	Alineamiento local con secuencias aminoacídicas del dominio motor de la MYO-2.....	24
11	Localización de la MYO-2-GFP en hifas y macroconidios de <i>Neurospora crassa</i>	25
12	La MYO-2-GFP se localiza en el ápice de la hifa y co-localiza con el Spk	26
13	La MYO-2-GFP se localiza en el Spk.....	26
14	La MYO-2 tiene una alta tasa de recambio en la punta	27
15	La localización de la MYO-2-GFP en el ápice depende de su actividad ATPasa.....	28
16	El inhibidor blebistatina afecta la morfología de la hifa en crecimiento	29
17	Corroboración mediante PCR de la delección del gen de la MYO-2.....	30
18	La cepa $\Delta myo-2$ presenta una reducción en el crecimiento colonial comparada con la WT.....	31
19	La cepa $\Delta myo-2$ tiene una menor cantidad de ramas comparada con la cepa WT.....	32
20	Las hifas de la cepa $\Delta myo-2$ tienen un menor diámetro en	33

	comparación con la cepa WT.....	
21	La cepa $\Delta myo-2$ es incapaz de formar septos funcionales.....	34
22	La cepa mutante $\Delta myo-2$ no es capaz de formar septos.....	35
23	La cepa <i>myo2</i> no es capaz de conidiar de una manera efectiva..	36
24	La cepa $\Delta myo-2$ no es capaz de formar micelio aéreo.....	36
25	La cepa mutante <i>myo-2</i> no es capaz de controlar las pérdidas citoplasmáticas secundarias a una lesión mecánica.....	38
26	La cepa $\Delta myo-2$ suele tener ruptura espontanea en el ápex al igual que la cepa WT.....	39
27	La cepa $\Delta myo-2$ tiene una menor susceptibilidad a los estresantes osmóticos y una mayor sensibilidad a los estresantes de la pared celular comparada con la WT.....	39
28	La cepa $\Delta myo-2$ tiene una mayor cantidad de quitina, pero menor cantidad de proteínas que la cepa WT.....	40
29	La cepa mutante $\Delta myo-2$ muestra vacuolas de gran tamaño.....	41
30	En la cepa $\Delta myo-2$ se mantiene la restricción de las vacuolas en la punta de la hifa.....	41
31	La localización y dinámica de las mitocondrias en la cepa $\Delta myo-2$ es igual que la WT.....	42
32	El Spk en la $\Delta myo-2$ tiene un tamaño similar al de la WT. Microscopía confocal.....	43
33	La cepa $\Delta myo-2$ tiene más cambios de dirección que la cepa WT	44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Lista de cepas utilizadas.....	17
2	Oligonucleótidos y sus secuencias utilizadas en este trabajo.....	22

Capítulo 1. Introducción

1.1 Reino fungi

Los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, se cree que existen 1.5 millones de especies de hongos, de las cuales sólo se han identificado 7% (Arenas et al., 2008, Maiar et al., 2009). Son organismos eucariotas, heterótrofos, que requieren nutrientes provenientes del medio para utilizarlos como fuentes de energía y material para la biosíntesis. Su característica distintiva es la pared celular de quitina y glucanos, además de que digieren los nutrientes fuera de la célula y después los absorben (Deacon et al., 2006).

Los hongos se pueden dividir morfológicamente en dos tipos, los hongos levaduriformes y los hongos filamentosos, los últimos crecen por medio de estructuras tubulares llamadas hifas, que se alargan sólo en una región determinada formando el ápice de la hifa, ramificándose a medida que avanzan e interconectándose hasta formar una red llamada micelio (Deacon et al., 2006). En gran parte de su desarrollo, los hongos se mantienen en estado haploide, además los hongos filamentosos son multinucleados. Tienen reproducción asexual, típicamente por esporas y también algunos tienen reproducción sexual (Deacon et al., 2006). Los hongos tienen un papel fundamental en el ambiente. Son descomponedores, patógenos de plantas, animales y humanos, pueden ser simbioses y participan en los ciclos biogeoquímicos del planeta. Han sido utilizados desde la antigüedad en múltiples procesos, como la producción de comestibles, la biorremediación y la biotecnología; en la producción de diversas sustancias incluyendo muchos de los antibióticos utilizados en la actualidad.

1.2 *Neurospora crassa*

El primer registro de *N. crassa* fue en 1843 cuando una infestación por un “hongo naranja” afectó panaderías francesas. Es un hongo filamentosos miembro del fílum Ascomycota, en la naturaleza es comúnmente encontrado en vegetación que ha sido expuesta a fuego o por fuegos provocados en procesos de agricultura. Shear y Dodge en 1927 encontraron la fase sexual del hongo llamándole *Neurospora* debido a las características ascosporas, éstas poseen ornamentaciones en las paredes, similares a neuronas (Raju, 2009).

En 1941 Beadle y Tatum plantearon, con base en sus investigaciones en *N. crassa*, la hipótesis de un gen una enzima, por lo cual ganaron el premio Nobel de medicina y fisiología en 1958.

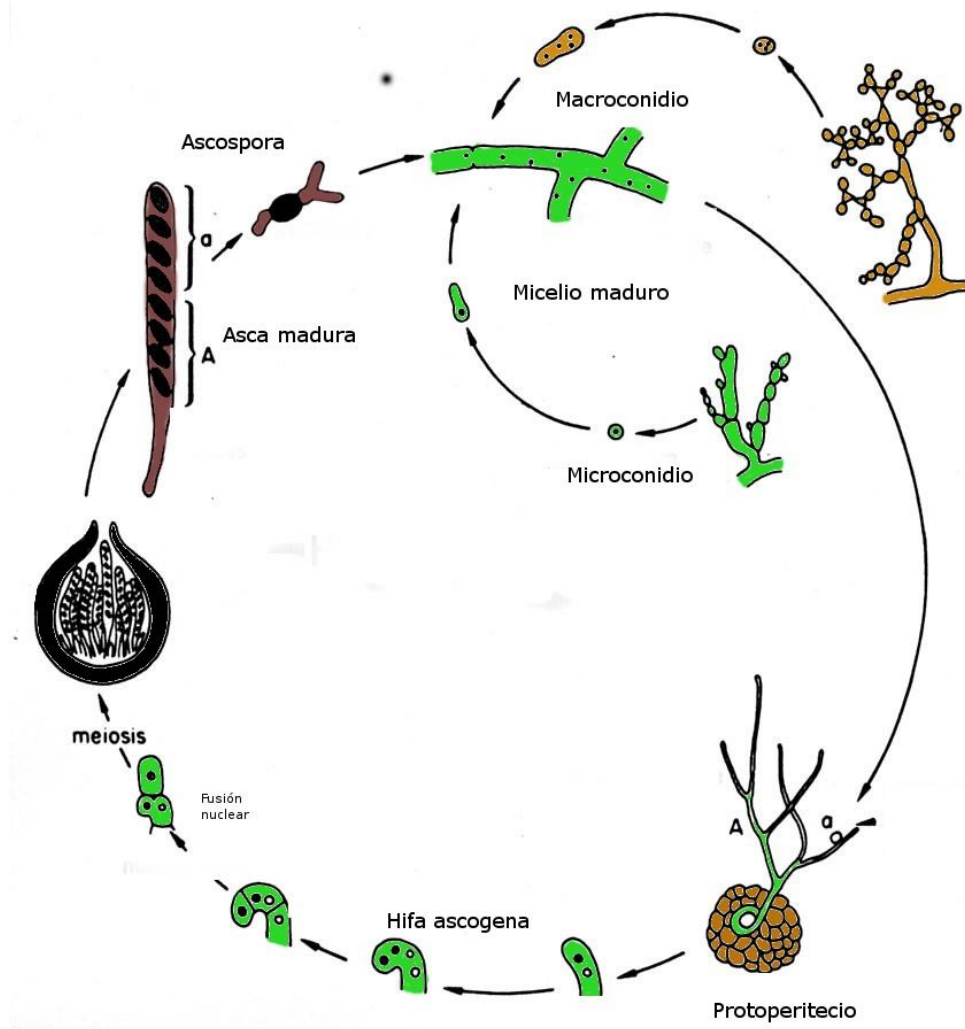


Figura 1. Ciclo vital del hongo heterotálico *N. crassa*, presenta una fase sexual que finaliza con la generación de ascosporas productos de la meiosis. Una fase asexual que finaliza con la producción de microconidios o macroconidios y una fase vegetativa de forma micelial. FGSC modificado (<http://www.fgsc.net/neurospora/sectionB2.htm>)

Todas las especies de *Neurospora* son haploides y la mayor parte de su ciclo de vida permanecen en este estado. *N. crassa* tiene un ciclo de vida heterotálico, requiere de la unión de dos cepas con un gen de apareamiento (mating type) distinto para proceder a la fase diploide y reproducirse sexualmente. En la parte asexual del ciclo, la germinación de las esporas asexuales haploides resulta en la generación de un conjunto de hifas ramificadas que constituyen la colonia. Las colonias no tienen separaciones totales entre

cada segmento por lo que son esencialmente una sola célula haploide multinucleada. Una colonia libera mediante hifas aéreas los macroconidios (reproducción asexual) que suelen ser multinucleados y los microconidios (uninucleados), dispersándose y reiniciando el ciclo asexual al encontrar un ambiente propicio (Figura 1). En la fase sexual, cuando dos colonias de diferentes tipos de apareamiento entran en contacto sus paredes celulares y núcleos se fusionan, resultando en un estado diploide transitorio dentro de los cuerpos fructíferos llamados peritecios (Figura 1). Estas células hacen meiosis y sus productos se almacenan en un saco llamado asca (característico de la división de los ascomicetos), en *N. crassa* se realiza una fase extra de mitosis dando como resultado ocho ascosporas.

Las hifas son tubos con paredes rígidas con excepción de la punta, que es donde el crecimiento ocurre. Los componentes de la membrana celular y la pared celular son sintetizados a cierta distancia de la punta y posteriormente son transportados a los nuevos sitios de crecimiento en forma de vesículas mediante el citoesqueleto. Las vesículas se acumulan en la punta en una estructura llamada Spitzenkörper (Spk) que distribuye las vesículas a la región del ápice en extensión. Las nuevas ramas son sitios nuevos de crecimiento polarizado que emergen a cierta distancia de la punta.

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos lista a *N. crassa* como uno de los 12 hongos modelos utilizados en investigaciones biomédicas y básicas. Algunas de las características que lo hacen útil como modelo para genetistas son: a) requerimientos nutricionales simples, b) crecimiento vegetativo rápido, c) ciclo de vida corto de 2-3 semanas, d) dos tipos distintos de apareamiento útiles para realizar cruza genéticas, e) muchos estadios identificables durante el desarrollo sexual, f) ascas prominentes para el estudio de procesos meióticos y ascosporas, g) fase vegetativa haploide, h) hongo no patogénico (Raju, 2009).

1.3 Crecimiento polarizado

El crecimiento polarizado es un proceso de crecimiento localizado en una región específica de la célula y consiste en la distribución asimétrica de los componentes celulares a dicha región. Algunas células desarrollan elongaciones en forma tubular, como las neuronas en animales, tubos de polen, rizoides en plantas e hifas en hongos

filamentosos (Virag y Harris, 2005). El crecimiento de la hifa depende de la biosíntesis desarrollada en la punta, los componentes de la pared celular y la membrana plasmática son sintetizados a cierta distancia del ápice y son transportados a esta región por vesículas a través de los filamentos del citoesqueleto (Figura 2). Las vesículas se acumulan en la punta en el Spk, que distribuye las vesículas a la región apical en extensión (Bartnicki-García et al., 1989).

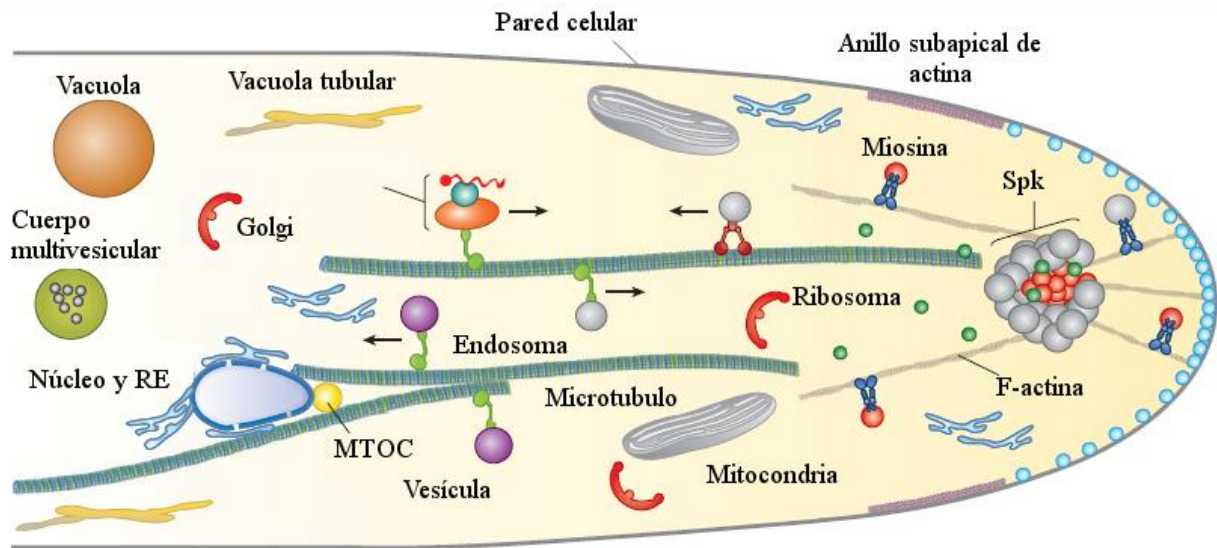


Figura 2. Modelo del ápice de una hifa, se observan los componentes celulares distribuidos de manera ordenada (Modificado de Riquelme et al., 2013).

1.4 Spitzenkörper

El Spk fue identificado hace más de 100 años en hifas de *Coprinus narcoticus* y *Coprinus sterquilinus* (Brunswik, 1924). Actualmente se sabe que participa en diversos procesos celulares incluyendo el mantenimiento del crecimiento polarizado y la dirección de crecimiento. En 1989, Bartnicki-García y colaboradores propusieron que el Spk funciona como un Centro Suministrador de Vesículas (VSC, por sus siglas en inglés) y regula la llegada de vesículas de una manera ordenada a la membrana celular en la punta de la hifa. El Spk está estructurado en dos regiones, una externa con macrovesículas y una interna con microvesículas (Riquelme y Sánchez-León, 2014), además se pueden localizar ribosomas y componentes del citoesqueleto como microtúbulos y microfilamentos de actina (Howard et al., 1981).

Los microtúbulos encontrados en el Spk sugieren una función de transporte de vesículas y organelos de la parte posterior de la hifa al ápice. La evidencia acumulada sobre la localización de microfilamentos de actina y algunas proteínas de unión a actina (ABPs por sus siglas en inglés Actin Binding Proteins) en la región del Spk indican que los microfilamentos de actina median la llegada de vesículas a este sitio y posteriormente controlan la fusión de estas vesículas a la membrana plasmática (Taheri-Talesh et al., 2012). La localización del Spk indica por lo menos parcialmente la dirección del crecimiento (Brunswick 1924; Bartnicki-Garcia et al., 1995). Bracker y colaboradores (1997) demostraron, utilizando pinzas ópticas, que el desplazamiento del Spk modifica la trayectoria de crecimiento de la hifa.

1.5 Citoesqueleto

La forma, la organización interna y la polaridad funcional de una célula está dada por una red en tres dimensiones de proteínas filamentosas llamada citoesqueleto (Lodish et al., 2012). El citoesqueleto se extiende en la célula y está anclado a la membrana plasmática y organelos internos, provee un andamiaje para la organización celular. Se compone de cuatro tipos de filamentos, todos regulados y organizados en tiempo y espacio, los microtúbulos, los filamentos intermedios, los microfilamentos de actina y las septinas (Mishra et al., 2014)

Los microtúbulos son tubos largos formados por dímeros de α y β -tubulina y organizados por proteínas asociadas a los microtúbulos. Estos proveen un andamiaje para la organización de organelos y soporte estructural (Steinberg y Schliwa, 1993). Los filamentos intermedios son filamentos específicos para cada tejido que tienen diferentes funciones, incluyendo el soporte estructural de la membrana nuclear, proveen integridad estructural a las células en los tejidos, así como en funciones estructurales y de barrera en la piel, pelo y uñas. Este tipo de filamentos no se han descrito en el reino de los hongos.

Los microfilamentos de actina son polímeros, organizados en cúmulos funcionales y en redes por proteínas de unión a actina (Lodish et al., 2012).

1.5.1 Actina

La actina existe como un monómero llamado G-actina y como una forma filamentosa llamada F-actina (cadena lineal de monómeros de G-actina). Cada molécula de actina contiene un ion de magnesio unido a ATP o ADP. Cuando el ATP o ADP está unido a la actina el nucleótido afecta la conformación de la molécula aumentando o disminuyendo su afinidad, con ADP la G-actina se desnaturaliza rápidamente (Figura 3) (Berepiki et al., 2011). El proceso de polimerización es reversible transformándose la F-actina en G-actina. Los microfilamentos de actina se pueden ensamblar en una gran variedad de estructuras dentro de una célula, cada una de estas estructuras realiza una función particular. Las células utilizan los filamentos de actina de diversas maneras: como una molécula estructural, aprovechando el poder de la polimerización para realizar trabajo o como pistas para otras moléculas motoras, como la familia de las miosinas (Lodish et al., 2012).

Todas las subunidades en un filamento de actina están orientadas de la misma manera, exhibiendo una polaridad en el sitio donde su polimerización es favorecida, esta zona de alto crecimiento es llamada polo positivo, mientras el polo donde la disociación es favorecida es llamado el polo negativo (Lodish et al., 2012).

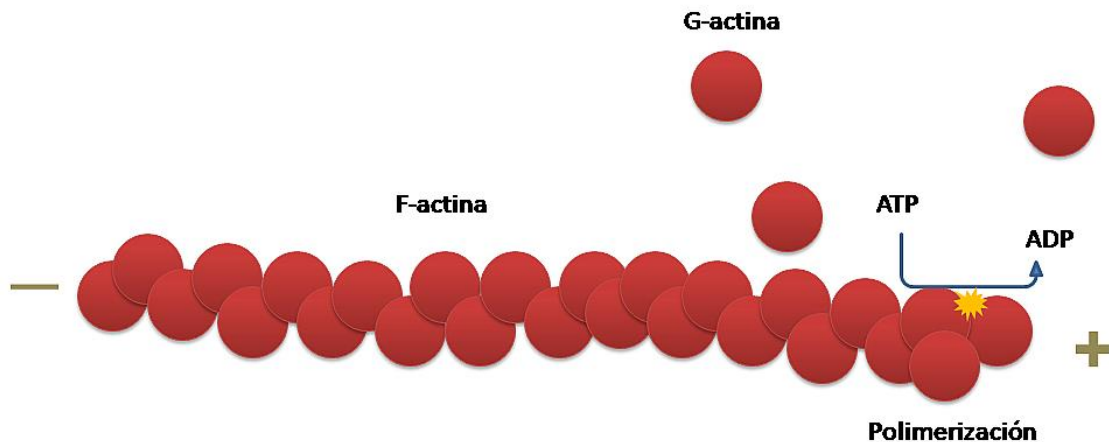


Figura 3. Esquema de la polimerización de los filamentos de actina. Existe un polo negativo y un polo positivo, en este último se lleva a cabo el proceso de polimerización de nuevos monómeros de actina por un proceso dependiente de ATP.

El paso limitante en la polimerización de la actina es la formación de un núcleo de actina inicial de donde un filamento puede crecer. En las células esta característica inherente a la actina es usada en el control de la polimerización; es decir el sitio de donde se inicia la polimerización será determinado por la formación de un núcleo de actina inicial. Existen dos clases de proteínas que inician la nucleación de la actina, la familia de las forminas y el complejo Arp 2/3 (Sirotkin et al., 2010; Chesarone et al., 2010) (Figura 4). Las estructuras complejas de los microfilamentos de actina resultan de la actividad de las ABPs y los factores promotores de nucleación.

Los parches de actina son redes densas de filamentos de actina ramificados, nucleados por el complejo Arp2/3 que está relacionado con la endocitosis y suele localizarse en zonas de crecimiento polarizado. Las mutaciones en el citoesqueleto incluyendo en el complejo Arp 2/3 impiden la endocitosis (Ayscough et al., 1997; Sekiya-Kawasaki et al., 2003; Carreno et al., 2004;). Los cables de actina son ramilletes polarizados de actina o filamentos paralelos que se extienden hacia el eje más largo de las células (Adams y Pringle, 1984; Pruyne et al., 2004; Moseley y Goode, 2006). Las forminas nuclean estos filamentos de actina facilitando la elongación (Chesarone et al., 2010). Algunas células utilizan estos cables de actina para el transporte de sustancias y así lograr el crecimiento polarizado.

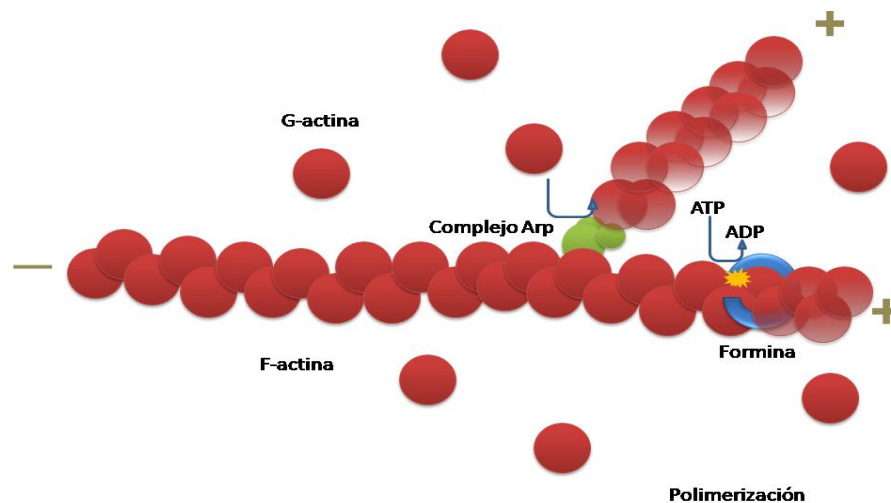


Figura 4. Polimerización de actina mediada por nucleadores. Los filamentos de actina son nucleados por la enzima formina mediante un proceso que requiere ATP y que se localiza en el polo positivo. El complejo Arp 2/3 se coloca en los filamentos de actina para nuclear nuevas ramas del filamento, generando ramificaciones en los filamentos de actina.

Los anillos de actomiosina se ensamblan en sitios incipientes de división celular y, además de generar la fuerza requerida para la división, funcionan como sitios de localización y formación de nueva pared celular (Wloka y Bi, 2012). El anillo de actomiosina es una estructura compleja de más de 100 proteínas, incluyendo la F-actina, la miosina de clase II, nucleadores de actina, proteínas entrecruzadoras de actina y moduladores de la contractilidad de la actomiosina (Mishra et al., 2014)

1.5.2 Miosinas

Las miosinas constituyen una gran superfamilia de proteínas que tienen un dominio en común que interactúa con actina, realiza hidrólisis de ATP y producen movimiento (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Las miosinas están típicamente constituidas de 3 dominios funcionales (1) un dominio motor que interactúa con la actina y une ATP, (2) el dominio del cuello que une a las cadenas ligeras o la calmodulina y (3) el dominio de la cola donde se asocia con otras miosinas de clase II (Figura 5). Mediante el dominio motor las miosinas poseen la capacidad de convertir la energía química (hidrólisis de ATP) en energía mecánica, sin embargo, las diferencias se encuentran en sus regiones carboxilo-terminal donde algunas de las funciones y estructuras son únicas para cada clase de miosinas. Con base en los análisis filogenéticos de las secuencias proteicas de las miosinas, éstas se han agrupado en más de 35 familias hasta ahora (Maravillas-Montero y Santos-Argumedo, 2012).

1.5.2.1 Miosina II

Las miosinas clase II, son motores moleculares basados en actina que se encuentran en el músculo esquelético, cardíaco, liso, y miosinas no musculares. La MYO-2 no muscular se encuentra tanto en células musculares como en no musculares y se ha descubierto en múltiples organismos eucariotas incluyendo hongos.

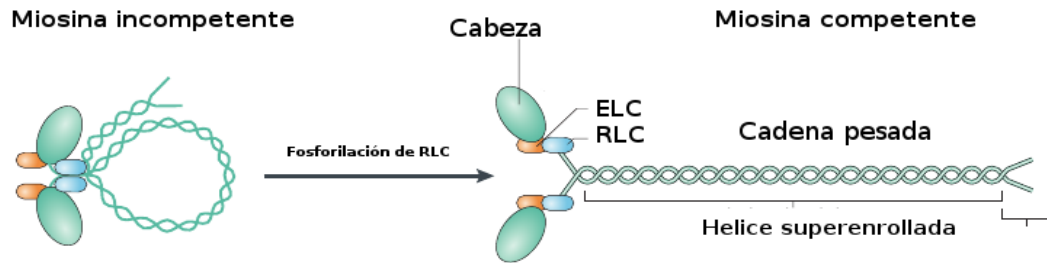


Figura 5. Modelo de la miosina de clase II. En sus estados inactivos (izquierda) y su estado activo (derecha) donde se aprecian los dominios principales, desde la región amino-terminal a la carboxilo-terminal; cabeza, cuello, y cola, la región del cuello está unida a otras proteínas llamadas cadenas ligeras esenciales y cadenas ligeras reguladoras. Modificado de Vicente-Manzanares, 2009.

Son fundamentales en procesos que requieren cambio de forma y movimiento como en la adhesión, migración y división celular (Vicente-Manzanares et al., 2009). Se ha observado la participación de las miosinas de clase II en múltiples procesos celulares, manteniendo similitudes en todas las células eucariotas estudiadas.

Las miosinas de clase II consisten de dos cadenas pesadas (230 kDa), dos cadenas ligeras esenciales (17 kDa), dos cadenas ligeras reguladoras (20 kDa) y está conformada por dos cabezas globulares en su región amino-terminal y una cola larga en la región carboxilo-terminal (Figura 5). Cada cabeza puede ser dividida en un dominio motor que contiene un sitio de unión a actina y un sitio de unión a ATP, así como un cuello que contiene sitios de unión para las cadenas ligeras esenciales y reguladoras. El dominio de la cola forma una alfa hélice superenrollada y está involucrada en el ensamblaje de la miosina II en filamentos (Takayuki et al., 2013). La actividad ATPasa está presente en la cabeza y su actividad es aumentada por la presencia de filamentos de actina, el dominio de la cola no contribuye a la motilidad, pero define qué es lo que se mueve por el dominio de la cabeza, en el caso de las miosinas de clase II permite la asociación de las moléculas de miosina en filamentos bipolares (Figura 6) (Reggiani et al., 2008). Para realizar su función contráctil la miosina de clase II requiere ensamblarse en filamentos (Takayuki et al., 2013). Muestra una transición dinámica entre el estado monomérico y el filamentoso y esta dinámica es regulada espacio-temporalmente en respuesta a diversas señales (Vicente-Manzanares et al., 2009). La miosina de clase II, al formar los filamentos bipolares, realiza hidrólisis de ATP y varias moléculas de miosina de clase II jalan juntas los filamentos de actina, convirtiendo la energía química liberada en energía mecánica.

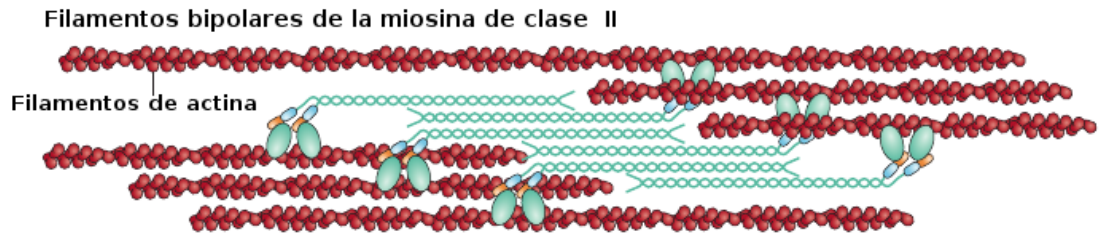


Figura 6. Modelo de los filamentos bipolares de la miosina de clase II y los filamentos de actina. Nótese el entrecruzamiento y estabilización que las moléculas de miosina le confieren a los filamentos de actina. Modificado de Vicente-Manzanares, 2009.

Las miosinas son reguladas mediante fosforilaciones y desfosforilaciones por enzimas cinasas y fosfatasa que realizan estas reacciones respectivamente. Existen dos grupos de residuos en las cadenas ligeras que son fosforiladas por distintas cinasas y tienen efectos contrastantes en las propiedades biofísicas de la miosina de clase II. El primer grupo es en la treonina 18/serina 19, estos residuos son fosforilados por una cinasa de cadena ligera de miosina, la cinasa RHO y otras. Esta fosforilación es un mecanismo que aumenta la actividad de ATPasa activada por actina y cambia a la molécula a la forma filamentosa (Beach et al., 2011). El segundo grupo de fosforilación es en el N-terminal de las cadenas ligeras reguladoras en la serina 1, 2 y treonina 9, estos son fosforilados por PKC, causando un aumento en 9 veces de la KM de cinasa de cadena ligera de miosina para la cadena ligera reguladora, por lo tanto, indirectamente favoreciendo una menor actividad de la miosina II (Beach et al., 2011).

La formación de filamentos en la miosina de clase II es regulada por la fosforilación de las cadenas ligeras reguladoras. La fosforilación de las cadenas regulatorias nulifica las interacciones entre cabeza-cabeza y cabeza-cola. Esto causa que la molécula compacta y de alta sedimentación (10S) se mantenga en una forma elongada de menor velocidad de sedimentación (6S), que forma filamentos bipolares en condiciones iónicas fisiológicas (Vicente-Manzanares et al., 2009).

La MYO-2 es fundamental en procesos celulares que requieren un cambio de forma y movimiento, como la adhesión, migración y la división celular (Vicente-Manzanares et al., 2009). Las funciones descritas para la MYO-2 son diversas y variadas, incluyen funciones en la citocinesis, endocitosis, exocitosis, movimiento celular, rigidez de la membrana, mecano-transductores, replicación mitocondrial, etc.

En *Dictyostelium discoideum* se observó que, ante un estímulo mecánico de estiramiento, se induce la migración y la localización de la MYO-2 perpendicular a dicho estímulo; en mutantes por delección de la MYO-2, se observó que el organismo se desplazaba independientemente al estímulo mecánico, indicando el papel que tiene la miosina de clase II en la dirección de la migración celular ante un estímulo mecánico. En el mismo estudio se utilizó una miosina de clase II incapaz de hidrolizar ATP y se observó que el patrón se restablece, esto sugiere que la función en la migración es independiente de la hidrólisis de ATP y contractilidad de la actomiosina (Iwadate et al., 2013). Otra función en la que hay evidencias de la participación de la MYO-2 es la endocitosis. Utilizando fibroblastos de ratones deficientes de *myo-2*, se obtuvieron células con defectos en la endocitosis mediada por clatrina, una disminución de la internalización de transferrina y aumentó la supervivencia de la cadena ligera de clatrina marcada con YFP en la superficie celular. Adicionalmente, el tratamiento con blebistatina para inactivar la MYO-2 y el tratamiento con latrunculina A, también inhibió la toma de transferrina (Chandrasekar et al., 2014).

También se ha demostrado que la MYO-2 puede participar en el proceso de la fusión de membranas, esto lo indican estudios en adipocitos donde se demostró la importancia de la miosina de clase II en la fusión de las vesículas que contienen receptores GLUT4. Al inhibir la cinasa de cadena ligera los adipocitos son incapaces de captar glucosa estimulados por insulina, la insulina estimula la fosforilación de la cadena ligera regulatoria asociada con la isoforma de la Myo-2-a activándola y como resultado se induce la fusión de los GLUT4 a la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que la MYO-2 es necesaria para la correcta fusión de las vesículas de algunas proteínas a la membrana plasmática (Fulcher et al., 2008).

Utilizando el hongo *Fusarium gramineum*, Song et al. (2013) observaron que cuando se interrumpía el gen de la MYO-2 el crecimiento micelial se disminuía en 50%, la conidiación en 76 veces y había una abolición de la reproducción sexual. Las mutantes de MYO-2 también tenían una disminución de 97% en su patogenicidad en trigo y la producción de micotoxinas disminuyó a 3.4% de su nivel normal. Además, observaron que la MYO-2 es importante para la iniciación y formación del septo. Realizaron estudios de análisis de microarreglos donde se observó que el gen para la MYO-2 es requerido para múltiples procesos en el desarrollo normal de *Fusarium gramineum*.

Cánovas et al. (2011) realizaron estudios en el hongo patógeno *Penicillium marnefei*, utilizando mutantes de *myo-2*, observando defectos en el depósito de quitina en sitios de división celular, sin perturbar la localización de la actina. Además de las hifas aberrantes, observaron defectos en los conidióforos por malformación de septos o por defectos en la división nuclear. Se demostró que a una temperatura de 37 °C (temperatura a la cual suele cambiar a una forma de levadura) las mutantes de *myo-2* son incapaces de pasar a la forma de levadura por defectos en la biogénesis de pared celular.

Taheri-Talesh et al. (2012), estudiando la función de la MYO-2 en la formación de septos y el crecimiento apical de *Aspergillus nidulans*, observaron que la mutación por delección de la *myo-2* causa defectos en el crecimiento, reproducción asexual y ramificación, concluyendo que la MYO-2 se localiza en cuerdas que coalescen en anillos contráctiles en septos en formación y por lo tanto es importante para la septación y para el depósito normal de quitina, pero no para la extensión de las hifas. En un estudio reciente Hill et al. (2015), utilizando una cepa de *A. nidulans* con una mutación en la región convertidora de la cabeza, importante para la actividad ATPasa de esta proteína, observaron en el fenotipo de la cepa la ausencia de septación y una reducción importante de la producción de esporas asexuales. En contraste con los antecedentes reportados el crecimiento micelial fue similar a la cepa WT.

Delgado-Alvarez et al. (2014) observaron la formación del septo en el hongo filamentoso *N. crassa* mediante marcajes con proteínas fluorescentes de la actina, miosina de clase II (MYO-2), tropomiosina, fimbrina y otras moléculas de unión a actina. Observaron que tanto la tropomiosina como la miosina son componentes integrales en el inicio de la formación del septo, formando la maraña de actomiosina (SAT, septal actomyosin tangle) que posteriormente se transforma en el anillo contráctil de actomiosina para permitir la formación del septo en *N. crassa*. En un estudio similar Echaury-Espinosa et al. (2013) observaron que la MYO-2, además de su localización en las etapas iniciales de la formación del septo, se localizaba en la región apical, colocalizando con el Spk y con estructuras que podrían ser Spk satélites. Esta localización apical resulta interesante por ser la primera vez que se ha descrito en un hongo filamentoso. Aunado a esto, las evidencias que se han acumulado hasta el momento sobre las funciones de las miosinas en sistemas eucarióticos, sugieren que estas proteínas versátiles pudiesen estar participando en otras funciones además de las ya identificadas en hongos filamentosos.

Capítulo 2. Justificación

Los hongos filamentosos son microorganismos importantes para la industria biotecnológica, la salud pública y la investigación, el conocimiento de los procesos celulares de los hongos es relevante para el aprovechamiento eficaz de estos microorganismos, el control de enfermedades emergentes y la investigación de la biología de hongos. *N. crassa* como hongo modelo ofrece una plataforma con diversas ventajas para el entendimiento de la biología celular de los hongos, especialmente para el desarrollo de los conocimientos en el crecimiento polarizado, presente en diversos organismos eucariotas incluyendo plantas, algas y neuronas de mamíferos. Las miosinas son una superfamilia de mecano-enzimas que proveen la capacidad de aprovechar la energía química y convertirla en movimiento en las células eucariotas desde las levaduras al humano. Esta familia de proteínas está implicada en diversas funciones incluyendo la división celular, mecano-transducción, endocitosis, exocitosis, adhesión celular, diferenciación celular, rigidez de la corteza celular, etc. La MYO-2 ha sido descrita como uno de los componentes principales del anillo de actomiosina, primordio de la formación del septo en hongos filamentosos y recientemente ha sido descrita en el ápice. Sin embargo, su función en la punta no ha sido dilucidada. Las funciones descritas en otros modelos eucarióticos, su posición apical y la localización en el Spk (estructura evidentemente importante en el crecimiento polarizado), sugiere que la MYO-2 podría ser parte de la maquinaria que permite a los hongos filamentosos el crecimiento polarizado. El estudio de esta proteína contribuirá al conocimiento que se ha desarrollado en los últimos años sobre esta familia de proteínas y permitirá profundizar en el papel que estas mecano-enzimas juegan en el crecimiento polarizado en hongos filamentosos y otras células eucariotas.

Capítulo 3. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que la miosina de clase II es parte importante de los procesos de endocitosis, migración, formación de septos, citocinesis y adhesión celular en células eucariotas (Fulcher et al., 2008, Vicente-Manzanares et al., 2009, Iwadate et al., 2013, Chandrasekar et al., 2014). Recientemente se ha identificado en el ápice del hongo filamentoso *N. crassa* (Echauri, no publicado), sin embargo, no se conoce el papel que desempeña en la organización del ápice y si está involucrada en el crecimiento polarizado.

Capítulo 4. Hipótesis

La miosina de clase II se encuentra presente en la punta de las hifas de *N. crassa*, participa en la estabilidad y movimiento del Spk y como consecuencia en la morfogénesis y crecimiento polarizado. Su ausencia causará alteraciones en la respuesta a estímulos, formación de septos, ramificaciones y en la distribución de los filamentos de actina.

Capítulo 5. Objetivos

Objetivo general

1. Identificar el papel funcional de la miosina de clase II (MYO-2) en el ápice de *N. crassa*.

Objetivos particulares

1. Observar la dinámica de la MYO-2 utilizando proteínas fluorescentes en el ápice de las hifas.
2. Evaluar el efecto que tiene la delección del gen que codifica para la proteína MYO-2 en el fenotipo de cepas de *N. crassa*.

Capítulo 6. Material y métodos

6.1 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se utilizó la secuencia de la miosina de clase II obtenida de la base de datos de *N. crassa* del Broad Institute con el NCU00551.7 www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html. Para la búsqueda de dominios se usó la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> utilizando la herramienta Blastp donde se realizaron alineamientos con el genoma de *N. crassa* y de otros organismos.

6.2. Microbiología

6.2.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
Tipo silvestre	Mat A	FGSC #4200
Tipo silvestre	Mat a	FGSC #2225
$\Delta myo-2$	Mat a $\Delta myo-2::hph+$	FGSC #11485
MYO-2-GFP	Mat a <i>myo-2::GFP</i>	Calvert et al., 2011
Lifect GFP	Mat A Abp 140	Delgado Álvarez et al., 2010

Las cepas se mantuvieron en Medio Mínimo de Vogel's (Vogel 1956) con agar y sacarosa al 1.5%, incubadas a una temperatura de 30 °C. Las cepas con genotipo *hph+* fueron cultivadas en MMV con higromicina B (0.500 mg/ml) e incubadas a 30 °C. Para los ensayos de estrés osmótico se utilizó el medio YPG que contiene extracto de levadura 2%, peptona 2% y glucosa 2%, también se usó MMV adicionado con glicerol a 2 M y blanco de calcoflúor (5 mg/ml).

6.2.2 Obtención de conidios

Se inocularon las cepas en matraces Erlenmeyer con 150 ml de MMV sólido al 1.5% y se incubaron a 30 °C, después de 3 días de incubación en oscuridad total se pasaron a una

incubadora a 25 °C con ciclos de luz y oscuridad de 12:12 h por dos días más, hasta obtener los conidios. Los conidios fueron recolectados añadiendo 50 ml de H₂O estéril agitándose vigorosamente para resuspender la mayor cantidad de conidios posible. Se recuperó la suspensión en tubos de 50 ml mediante filtración con un embudo y tela estéril, posteriormente se centrifugó por 5 min a 5000 rpm. Se hicieron dos lavados más con 15 ml de H₂O, se resuspendieron en 100 µl de sorbitol 1 M almacenándose a -20 °C para ser utilizados en pruebas subsecuentes.

6.2.3 Obtención de micelio

En un matraz con 150 ml de MMV líquido con 1.5% de sacarosa, se colocaron bloques de agar de 1 cm aproximadamente que contenían micelio de las cepas mutantes y otro con micelio de la cepa silvestre (WT). Los matraces fueron incubados a 30 °C por 5 días en agitación a 100 rpm.

Posteriormente se utilizó un matraz Kitasato con un embudo Buchner y papel filtro para colocar el micelio y por medio de una bomba de vacío se extrajo la mayor cantidad de medio de cultivo presente en el micelio. Posteriormente fue colocado en tubos de 15 ml, la boca del tubo fue cubierta con parafilm y perforada con 5 pequeños agujeros para introducirlo en un liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5 a -44 °C y 0.133 mBar por 24 h. El micelio seco fue pesado y posteriormente triturado.

6.2.4 Cruzas sexuales

La cepa heterocarión de la mutante $\Delta myo-2$ fue obtenida del FGSC, se cruzó con la cepa WT 4200, se inoculó MSC (Westergard y Mitchell, 1947) con la cepa mutante $\Delta myo-2$ y se incubó a 25 °C en oscuridad por 1 semana. Se inoculó nuevamente con la cepa WT 4200 y se incubó nuevamente en oscuridad a 25 °C por 3 semanas más. Posteriormente se recolectaron las ascosporas de la tapa de las cajas Petri con H₂O destilada estéril y se colocaron en tubos de 1.5 ml, las ascosporas obtenidas fueron incubadas en un horno de convección a 60 °C por 1 h. Se inocularon en medio FGS (fructosa, glucosa y sorbosa) con higromicina (500 µg/ml) y se incubaron a 30 °C por 24 a 36 h, pasado este lapso se aislaron colonias y se reinocularon en MMV con higromicina. La mutación fue corroborada por PCR.

6.3 Microscopía

6.3.1 Microscopía estereoscópica

Para el estudio de las colonias y el análisis microscópico de bajo aumento se utilizó un microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®) con un aumento de 90X utilizando un lente DF PLAPO 1X PF (Olympus®) y una cámara Olympus DP70.

6.3.2 Microscopía confocal

Para el análisis de microscopía de alto aumento, contraste de fases y de DIC se utilizaron los microscopios confocales de barrido laser Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japón) y LSM510 META Carl Zeiss (Göttingem, Alemania), se usó el método del bloque de agar invertido para la manipulación y visualización de las células. Se tomaron imágenes y videos utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación a 488 nm; emisión a 510 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste o de interferencia diferencial (DIC- por sus siglas en inglés Differential Interference Contrast). Se usó el objetivo de 60X (1.42 A.N.) Plan-Apocromático de inmersión en aceite. Mediante el microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000 se obtuvieron imágenes en el eje Z. Se realizó la reconstrucción 3D mediante el software del fabricante.

Se utilizó la técnica de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés Fluorescence Recovery After Photo-bleaching) con el láser de argón/2 al 100% de su potencia durante 10 segundos con la grabación subsecuente de la recuperación de la fluorescencia.

6.3.3 Gráfica de dirección del Spk

Se obtuvieron imágenes de contraste de fases y se analizaron mediante Image J con el plugin tracker (Kuhn, 2001) para seguir el comportamiento del Spk y sus coordenadas dentro de la imagen. Mediante el programa de cálculo Excel (2007) se graficó el movimiento del Spk a través de la abscisa de 16 μm entre el punto inicial de crecimiento y el punto final.

6.3.4 Tinciones

Para observar el Spk en las hifas se empleó el fluoróforo vital FM® 4-64 (*N*-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(Dietilamino fenil hexatrienil) piridinio dibromuro) (5 μ M) y se realizó una medición de dicha estructura mediante Image J (Abramoff et al., 2004).

Para observar la distribución de las mitocondrias en las hifas se utilizó fluoróforo vital SYTO® 64 Red (20 μ M) el cual tiñe el ADN mitocondrial.

La observación de vacuolas se hizo utilizando el fluoróforo vital Oregon Green 488, ácido carboxílico diacetato (10 μ M), el cual es un fluoróforo fluorado análogo de la 30 fluoresceína que tiñe el lumen de las vacuolas (Cole et al., 1997)

Para la visualización de la pared celular y septos se utilizó el colorante blanco de calcoflúor al 0.01%.

6.3.5 Ensayos con blebistatina

Para los ensayos con el inhibidor de la ATPasa de la miosina de clase II se utilizó blebistatina de Chayman Chemicals diluyendo 1 mg en 1ml de DMSO al 100% (solución stock de 3.5 mM). Para los ensayos, se utilizaron tres concentraciones: 350 μ M, 700 μ M y 1.0 mM y el control con DMSO al 100% a la misma molaridad que blebistatina.

6.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta myo-2$

6.4.1 Morfología colonial

Se inoculó MMV con la mutante $\Delta myo-2$ y la cepa WT y se incubó a 30 °C durante 24 h. Se tomaron imágenes con microscopía de bajo aumento en un microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®). Adicionalmente, se tomaron imágenes de las colonias completas con una cámara digital Nikon D3100 con un lente AF-S NIKKOR 18-55mm/1:3.5-5.6G.

6.4.2 Medición de la tasa de elongación

La tasa de elongación fue medida en cajas Petri con MMV inoculadas con un cuadro de agar de la cepa mutante $\Delta myo-2$ y la cepa WT, posteriormente se colocaron en una incubadora a 30 °C en oscuridad. La primera medición se realizó pasadas las primeras 12 h de haber sido inoculada, las mediciones posteriores se hicieron cada 6 horas hasta

que una de las dos cepas cubriera la caja completa. Se hicieron 10 mediciones en el sentido del crecimiento del micelio en 3 réplicas por cepa.

6.4.3 Medición de la tasa de ramificación

Mediante el microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®) se obtuvieron imágenes de las cepas WT y la mutante $\Delta myo-2$ en MMV y se hicieron mediciones desde la punta de la hifa a 500 μm hacia el subápice en 30 hifas por cepa.

6.4.4 Medición de biomasa

El micelio liofilizado se pesó en una balanza analítica para determinar el peso seco en gramos que producen ambas cepas en 96 h.

6.4.5 Medición de la producción de conidios

En matraces Erlenmeyer se colocaron 150 ml de MMV sólido al 1.5% de sacarosa y se colocó un bloque de agar de 1 cm con la cepa WT y la mutante $\Delta myo-2$, se colocó por tres días a 30 °C y posteriormente dos días en una incubadora a 25 °C en ciclos de luz y oscuridad (12:12). La recuperación de conidios se realizó como se describió previamente. El conteo se hizo en una cámara de hematocitómetro o de Neubauer contando 5 cuadrantes.

6.4.6 Visualización de conidióforos

Se colocó un bloque de 1 cm de MMV sólido sobre un cubreobjetos y se inoculó lateralmente con bloques de agar con micelio de las cepas en estudio y se cubrió con otro cubreobjetos, se incubó en una cámara húmeda a 30 °C por 48 h para posteriormente observarse en el microscopio (Figura 7).

6.4.7 Ensayos de lesión mecánica

Se incubaron las cepas en cajas de Petri con MMV y se observaron en el microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus®) donde se les realizó una incisión con un bisturí No. 25 en sentido perpendicular al crecimiento de las hifas.

6.4.8 Medición del diámetro de las hifas

Se utilizó el microscopio confocal de barrido laser LSM510 META Carl Zeiss invertido (Göttingem, Alemania) utilizando el objetivo de 100X (1.3 A.N.) Ph3 Plan-Apocromático

de inmersión en aceite para obtener imágenes de las hifas. Para conocer el diámetro se midieron de forma perpendicular 30 hifas cada 10 μm a partir de la punta (hasta una distancia de 50 μm).

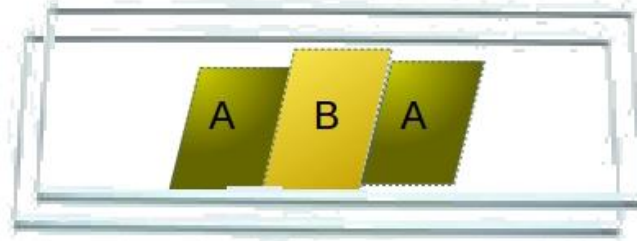


Figura 7. Técnica para visualizar conidióforos. La cepa de interés se coloca mediante dos cuadros pequeños de agar (A) rodeando un trozo de agar sin inocular (B), ésta se encuentra en contacto con el cubreobjetos donde se desarrollarán los conidióforos que serán visualizados.

6.4.9 Cuantificación de quitina

Se utilizó el micelio liofilizado como previamente ha sido descrito y posteriormente se siguió el método de Elson-Morgan modificado, descrito por Chen y Johnson (1983).

6.5 Biología molecular

6.5.1 Análisis de la mutante

Utilizando micelio triturado y el Kit de extracción DNAeasy miniplant de Quiagen y según indicaciones del fabricante se obtuvo DNA genómico de la cepa WT y de la mutante $\Delta myo-2$. Se realizó una PCR con el DNA genómico obtenido para corroborar la mutación del gen *myo-2*. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la tabla 2 para amplificar el marco de lectura abierto del gen en la cepa WT y la mutante $\Delta myo-2$. Se realizó una electroforesis de los amplicones en un gel de agarosa al 1%, los parámetros utilizados fueron 80 V y 400 mA.

Tabla 2. Oligonucleótidos y sus secuencias utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia
N-Myo-2 XBA rev	GCTCTAGATCAAATAAACCCCTTCG
N-Myo-2 SpeI Fw	GGACTAGTATGTCGGAGAGCTATG
Myo-2-Mut-Conf-Rev	GCACATTATCATAGAGA
Myo-2-Mut-Conf-Rev	TTGTTTGGTTTGCTTCGGCC

Capítulo 7. Resultados

7.1 Análisis bioinformático

7.1.1 Alineamiento local en el genoma de *N. crassa*

Utilizando la secuencia de la *myo-2*, obtenida de la base de datos de *N. crassa*, se realizó el alineamiento local con el genoma, como resultado se obtuvo que existen tres proteínas similares a la proteína MYO-2, una miosina de clase V (*myo-5*) NCU02111, una miosina de clase I (*myo-1*) NCU01440 y una quitinsintasa con un dominio motor (tipo miosina) NCU04352.

Del análisis anterior se determinó que el gen NCU00551 codifica para la MYO-2, la secuencia *in silico* de aminoácidos de la proteína codificada fue alineada con las secuencias de proteínas homólogas en otros hongos. Los alineamientos muestran que las especies que tienen una mayor homología a la secuencia de MYO-2 son otros hongos filamentosos de la división ascomicota como: *Sordaria macrospora*, *Magnaporthe spp.*, *Colletotrichum gramineum*, *Podospora anserina* y *Madurella mycetomatis* (Figura 8).

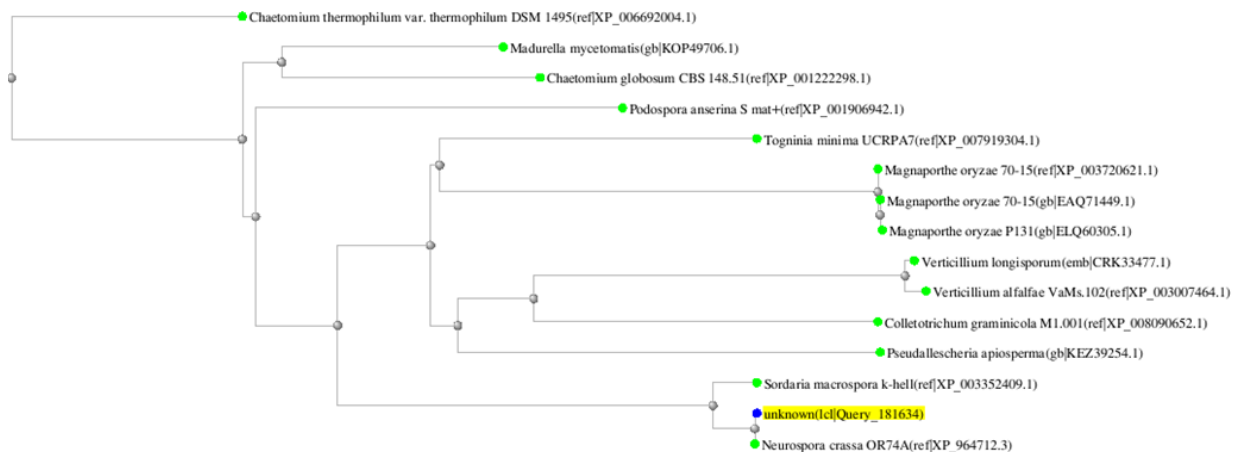


Figura 8. Alineamiento local de secuencias aminoacídicas de la MYO-2. La *myo-2* (marcada en amarillo) tiene una alta identidad entre ascomicetos incluyendo especies fitopatógenicas y antropatógenicas.

7.1.2 Análisis de dominios

Como seguimiento a lo obtenido de la información de los dominios de la *myo-2*, obtenida de la base de datos de *N. crassa*, se hizo un análisis con la herramienta Blastp de NCBI

para determinar los dominios presentes en la secuencia de la MYO-2, el análisis muestra la presencia de cuatro dominios principales en esta proteína. De la región amino-terminal a la carboxilo-terminal se encuentra: el dominio SH3, la cabeza y su región con actividad ATPasa, un dominio de unión a calmodulina con secuencias de isoleucina y glutamina (IQ) y la cola (Figura 9).

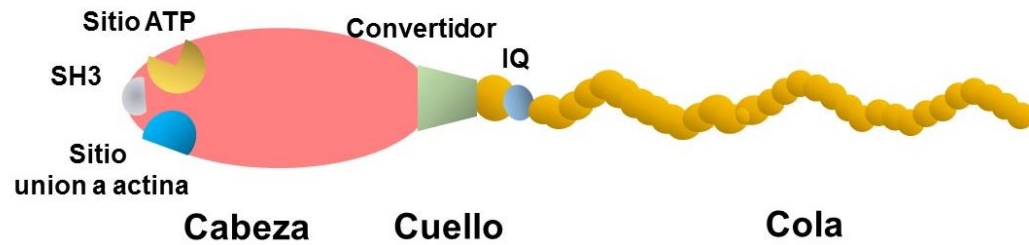


Figura 9. Dominios de la MYO-2. Esquema de los dominios de la MYO-2 obtenido de NCBI. Se aprecia la conformación típica del dominio de la cabeza, cuello y cola de las miosinas y los subdominios incluyendo el sitio IQ, sitio convertidor, sitio de unión a ATP y SH3.

Utilizando la secuencia del dominio motor se obtuvieron similitudes con hongos filamentosos del reino ascomicota, con algunas variaciones respecto al análisis con la secuencia completa. Se observó una mayor cercanía con *Sordaria macrospora*, *Podospora anserina*, *Madurella micetomatis*, *Miceliophthora termopila* y el género *Neonectria* entre otros (Figura 10).

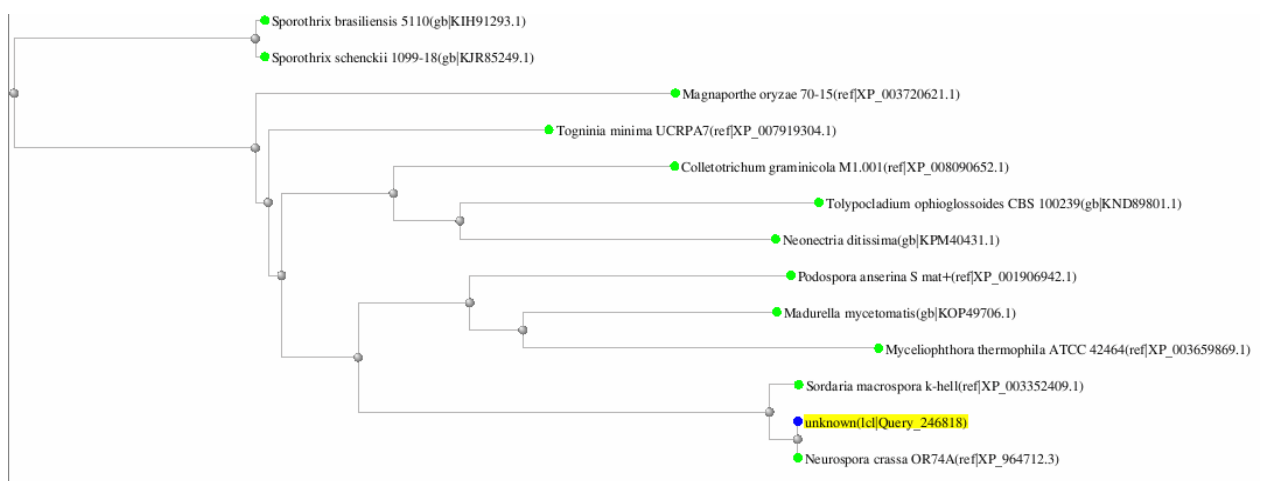


Figura 10. Alineamiento local con secuencias aminoacídicas del dominio motor de la MYO-2. Árbol de alineamiento de la MYO-2, el dominio motor mantiene su alta identidad con el de *Sordaria macrospora*, *Podospora anserina* y con patógenos como *Madurella micetomatis*.

7.2 Microscopía con proteínas fluorescentes

7.2.1 Dinámica y localización de la MYO-2

Para conocer la localización y comportamiento de la MYO-2 se observó, mediante microscopía confocal, durante el crecimiento y desarrollo de hifas de *N. crassa*.

La MYO-2-GFP se observó en la formación de los septos como previamente había sido descrita (Calvert et al., 2011; Delgado-Alvarez et al., 2014), formando una estructura dinámica que avanza centrípetamente hasta desaparecer en el centro de la hifa. En los macroconidios se encuentra en distintos sitios sin tener aparentemente una distribución específica y finalmente en la hifa en crecimiento como una acumulación cerca del polo apical (Figura 11).

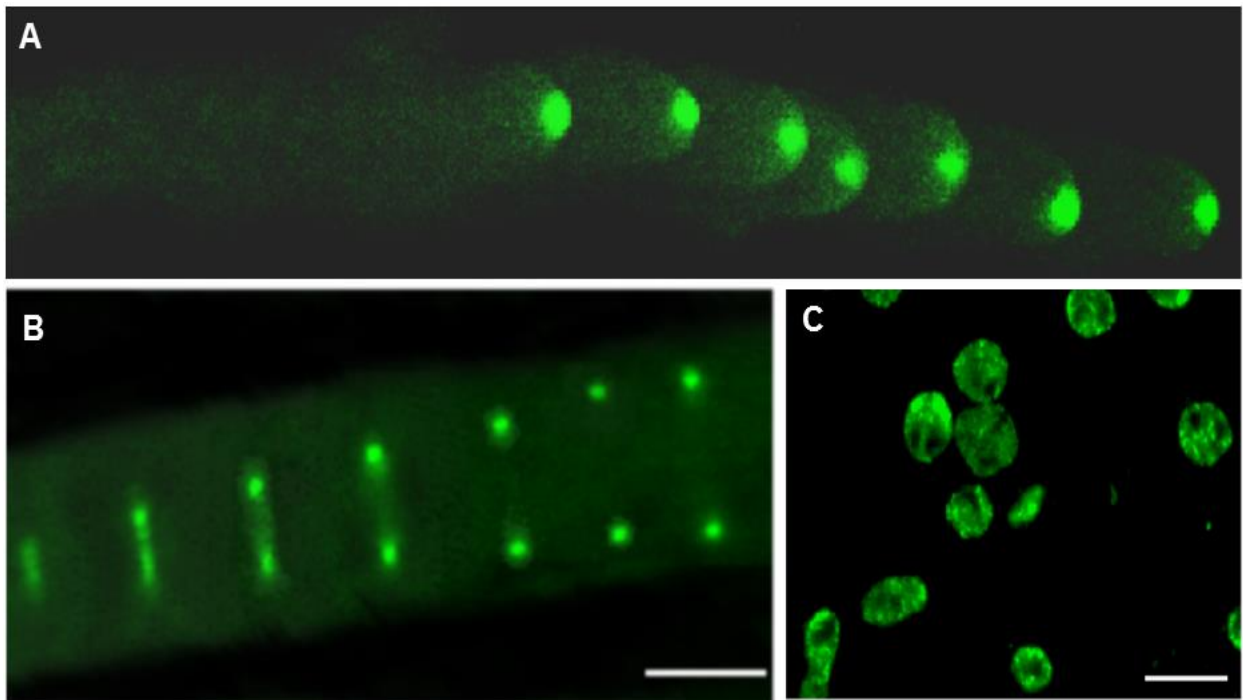


Figura 11. Localización de la MYO-2-GFP en hifas y macroconidios de *N. crassa*. (A) Serie de tiempo donde se observa la localización de la MYO-2-GFP en el ápice, (B) Serie de tiempo de la formación del anillo de actomiosina en el proceso de septación, (C) MYO-2-GFP en macroconidios. Escala (A) y (B)= 10 μm y (C) = 20 μm .

7.2.2 Localización de la MYO-2-GFP y el Spk

La MYO-2-GFP fue localizada mediante microscopía confocal en la región del ápice de la hifa (Figura 12A), además colocaliza con el Spk (Figura 12B-12D y Figura 13).

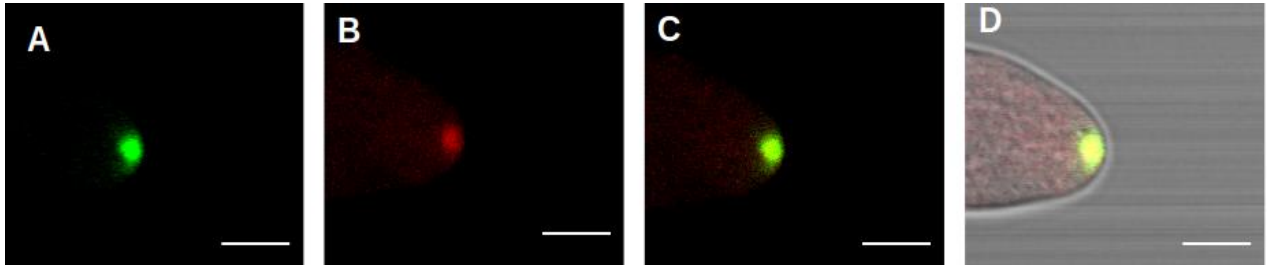


Figura 12. La MYO-2-GFP colocaliza con el Spk. Microscopía confocal, (A) localización de la MYO-2-GFP en la región apical, (B) Spk teñido con FM4-64, (C) colocalización de ambas señales y (D) localización de las señales con DIC. Escala = 5 μ m.

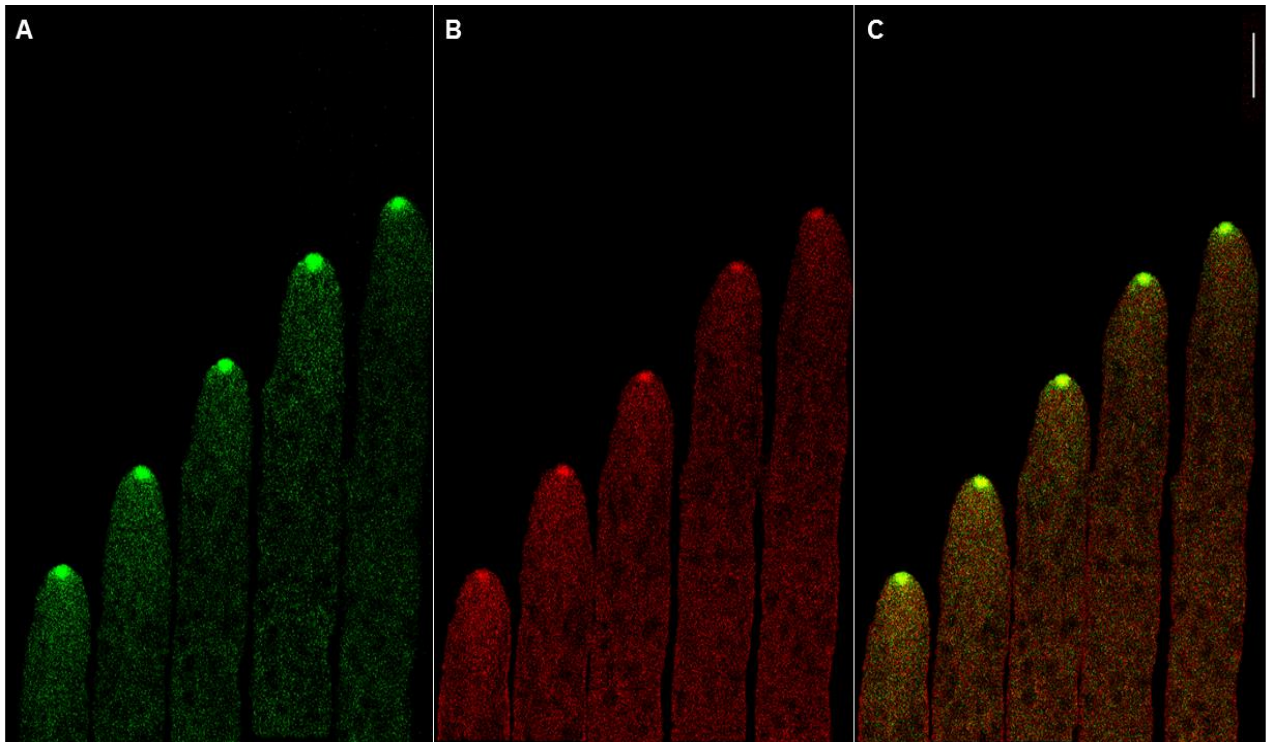


Figura 13. La MYO-2-GFP se localiza en el Spk. Microscopía confocal, serie de tiempo, (A) se observa la localización de la MYO-2-GFP y en (B) el Spk teñido con FM4-64, (C) imágenes (A) y (B) traslapadas. Escala = 10 μ m.

7.2.3 FRAP apical

Para conocer la dinámica que sigue la MYO-2 realizamos un análisis tipo FRAP de la región apical. El análisis FRAP muestra que la recuperación del 50% de la fluorescencia ocurre aproximadamente a los 51 segundos y tiene una recuperación cercana al 100% a los 150 segundos aproximadamente (Figura 14).

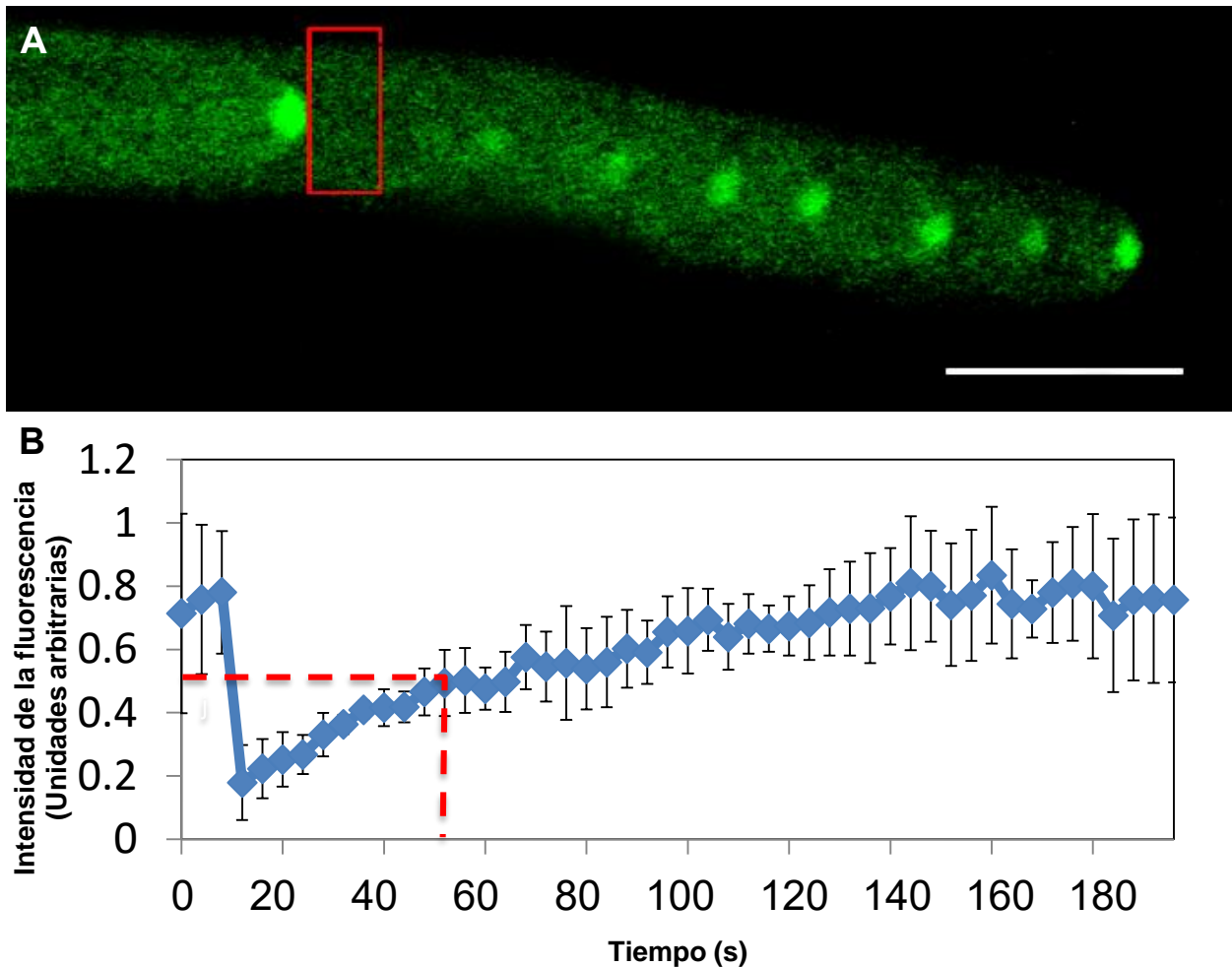


Figura 14. La MYO-2 tiene una alta tasa de recambio en la punta. Microscopía confocal, (A) serie de tiempo donde se observa la pérdida de fluorescencia después del fotoblanqueamiento (el sitio está señalado por el rectángulo rojo), se observa una relocalización paulatina de la fluorescencia. (B) Gráfica del análisis de la fluorescencia, los datos muestran que aproximadamente a los 51 segundos del fotoblanqueamiento se relocaliza el 50% de la fluorescencia y cercano a los 2 minutos se obtiene una fluorescencia similar a la observada previa al fotoblanqueamiento. Escala = 10 μm .

7.2.4 Ensayos con blebistatina

Para conocer si la localización de la MYO-2-GFP en el ápice es dependiente de la función del dominio motor se utilizó un inhibidor específico de la MYO-2 llamado blebistatina, este fármaco inhibe la actividad ATPasa localizada en la región de la cabeza. Cuando la blebistatina fue administrada a una concentración de 1 mM, se observó una deslocalización de la fluorescencia en la punta formándose una nube difusa en la región apical (Figura 15).

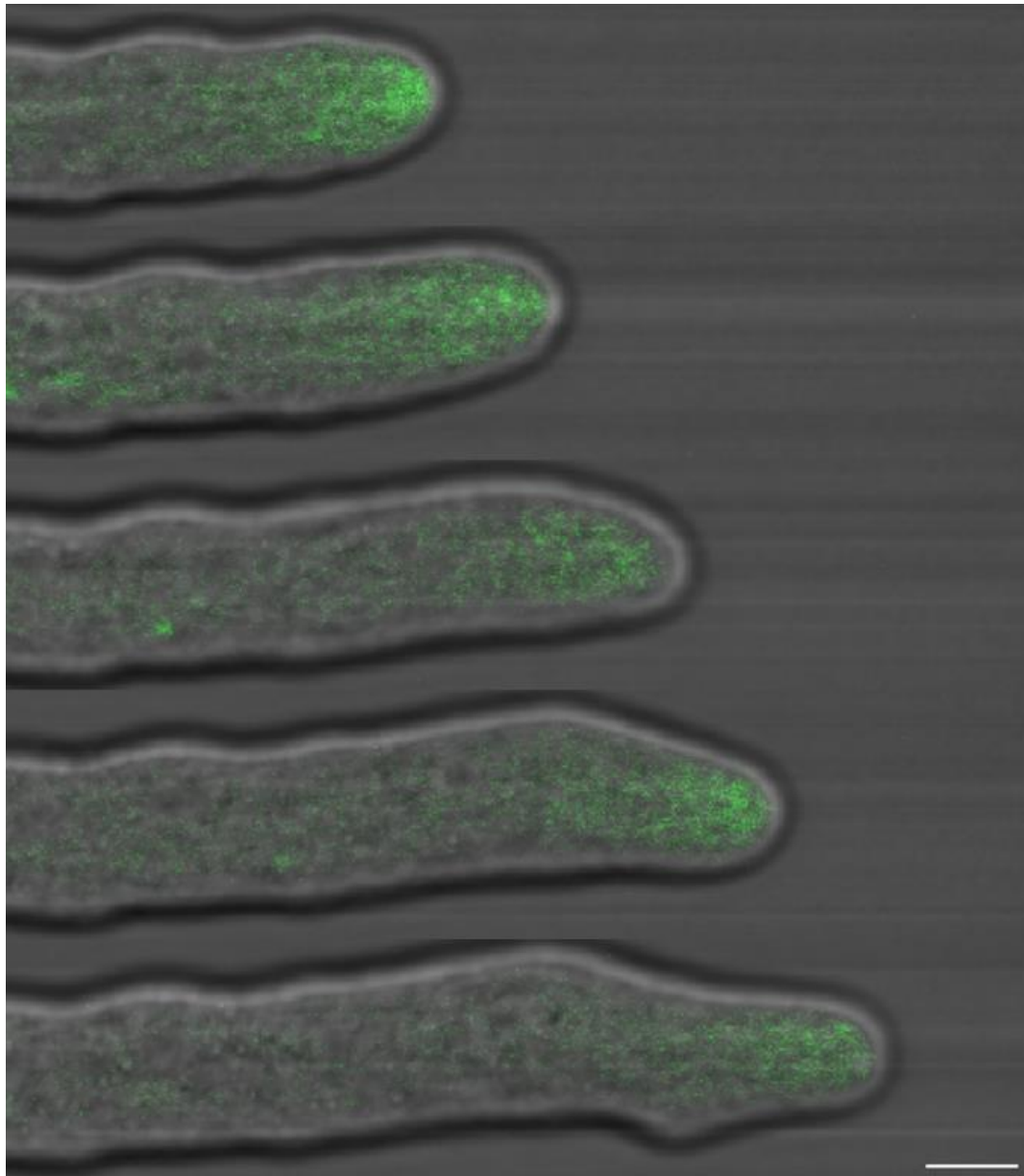


Figura 15. La localización de la MYO-2-GFP en el ápice depende de su actividad ATPasa. Microscopía confocal, (A) Deslocalización de la MYO-2-GFP después de la aplicación de blebistatina 1 mM. Escala = 10 μ m.

Otro fenómeno observado fue la alteración en la morfología de la hifa, el tratamiento con blebistatina causó un crecimiento isotrópico y deslocalización de la señal. Cuando la fluorescencia de la MYO-2-GFP se relocalizó en el Spk el crecimiento volvió a su normalidad (Figura 16).

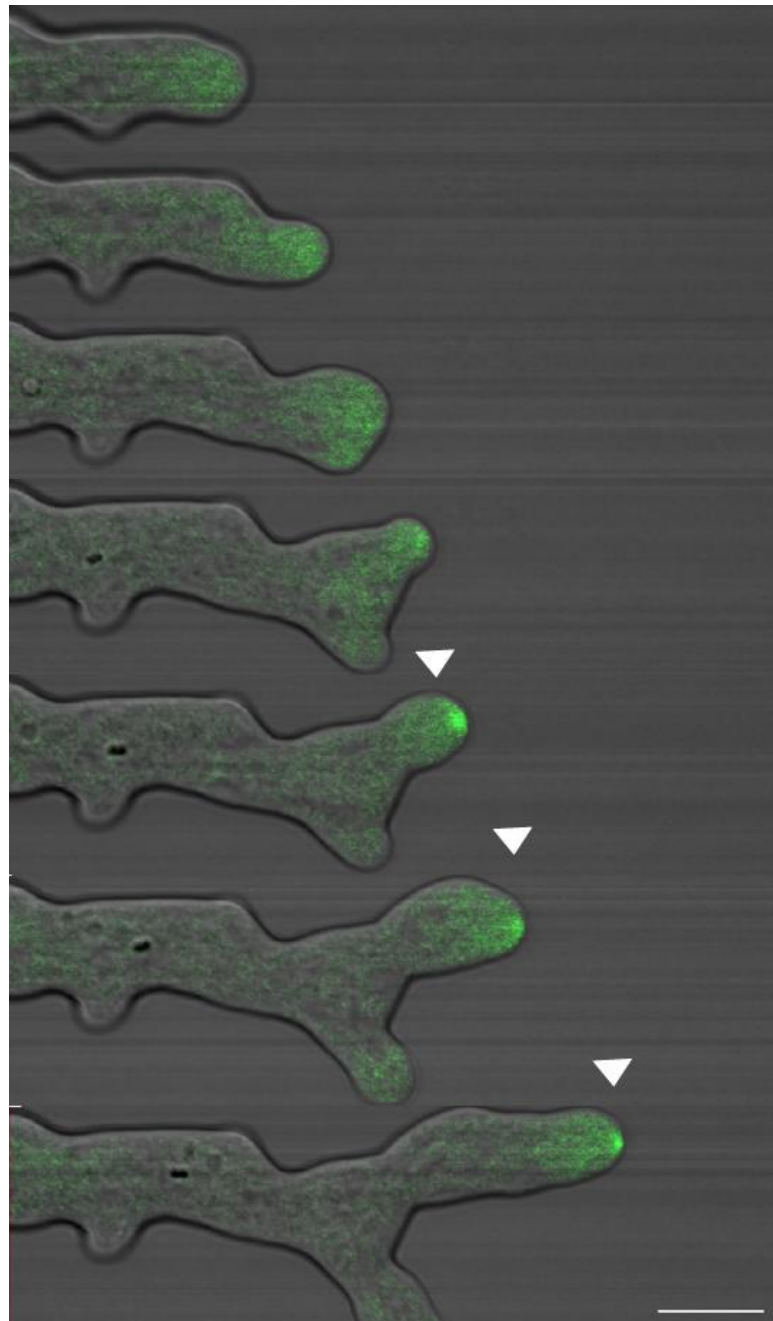


Figura 16. El inhibidor blebistatina afecta la morfología de la hifa en crecimiento. Microscopía confocal, serie de tiempo donde se observa la MYO-2-GFP después del tratamiento con blebistatina y su deslocalización fuera del Spk causando un crecimiento irregular y por momentos isotrópico. Cuando el Spk se recupera (señalado por cabezas de flecha) se observa un crecimiento polarizado normal. Escala = 10 μ m.

7.3 Caracterización de la $\Delta myo-2$

7.3.1 Comprobación de la mutación por delección de la *myo-2*

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos complementarios a los UTR 5' y a 1000 pb río arriba dentro del marco abierto de lectura de la *myo-2*, así como oligonucleótidos que amplifican el gen de la higromicina fosfotransferasa para confirmar la mutación del gen *myo-2*. En la cepa $\Delta myo-2$ se obtuvo una banda de 1500 pb utilizando el oligonucleótido en el UTR 5' y el oligonucleótido reverso de la Hph (Figura 17A). En la cepa $\Delta myo-2$ se obtuvo una banda de 1500 pb utilizando ambos oligonucleótidos de la Hph (Figura 17B) y en la cepa WT utilizando los oligonucleótidos en el UTR 5' y el que se encuentra dentro del marco abierto de lectura se obtuvo una banda de 1000 pb (Figura 17C).

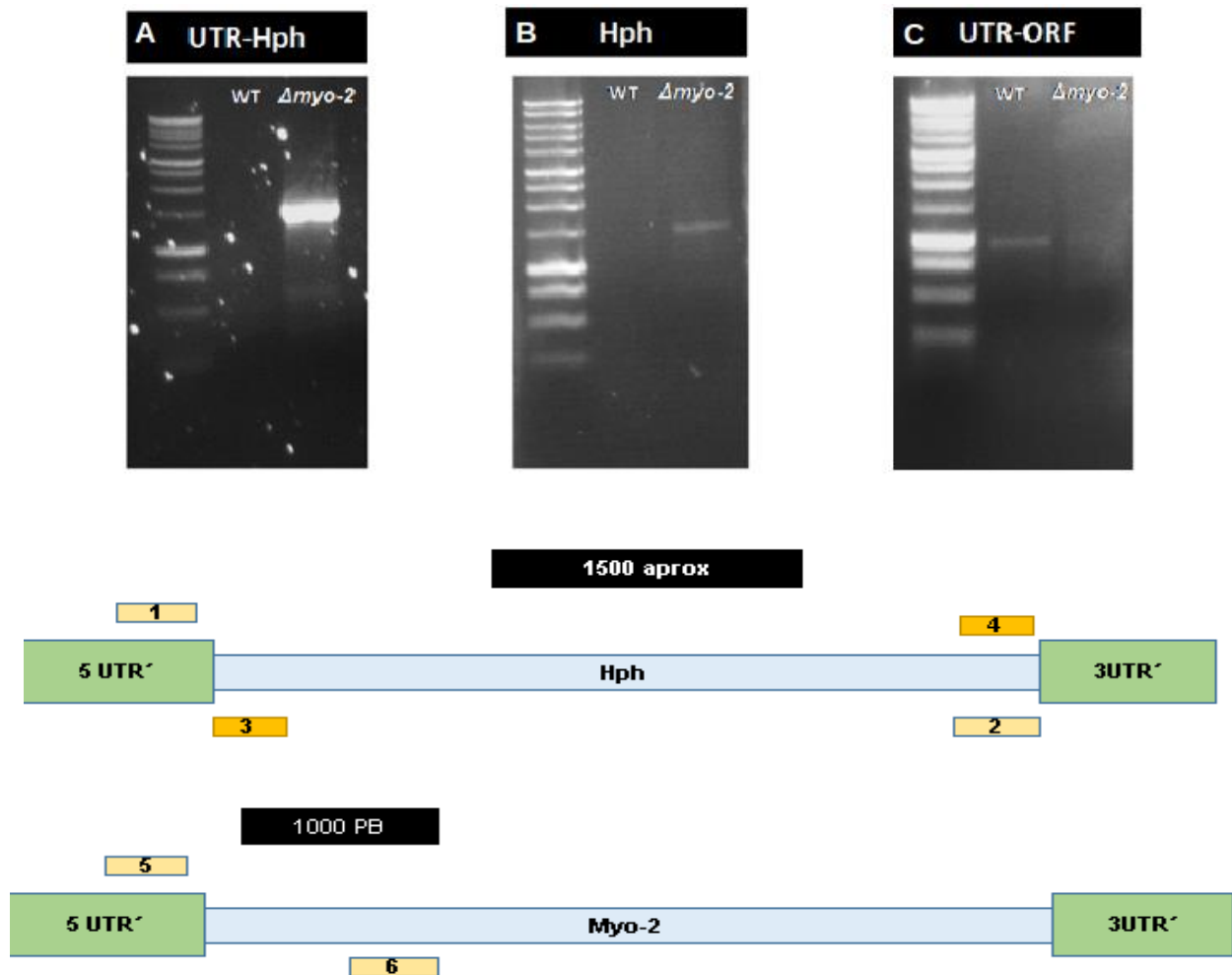


Figura 17. Corroboración mediante PCR de la delección del gen de la MYO-2. (A) Amplificación de un fragmento de 1500 pb en la cepa $\Delta myo-2$ (1-2), (B) Amplificación de un fragmento de 1500 pb en la cepa $\Delta myo-2$ (3-4), (C) Amplificación de un fragmento de 1000 pb en la cepa WT (5-6).

7.3.2 Tasa de crecimiento

Se realizó la medición del crecimiento colonial en 3 replicas por cepa con una medición de 10 transectos y se observó que la cepa mutante $\Delta myo-2$ tiene una tasa de crecimiento de 0.06 cm/h mientras que la cepa WT tiene un crecimiento de 0.2 cm/h (Figura 18), la cepa mutante no forma hifas aéreas, sin embargo, conserva un crecimiento radial y bordes regulares.

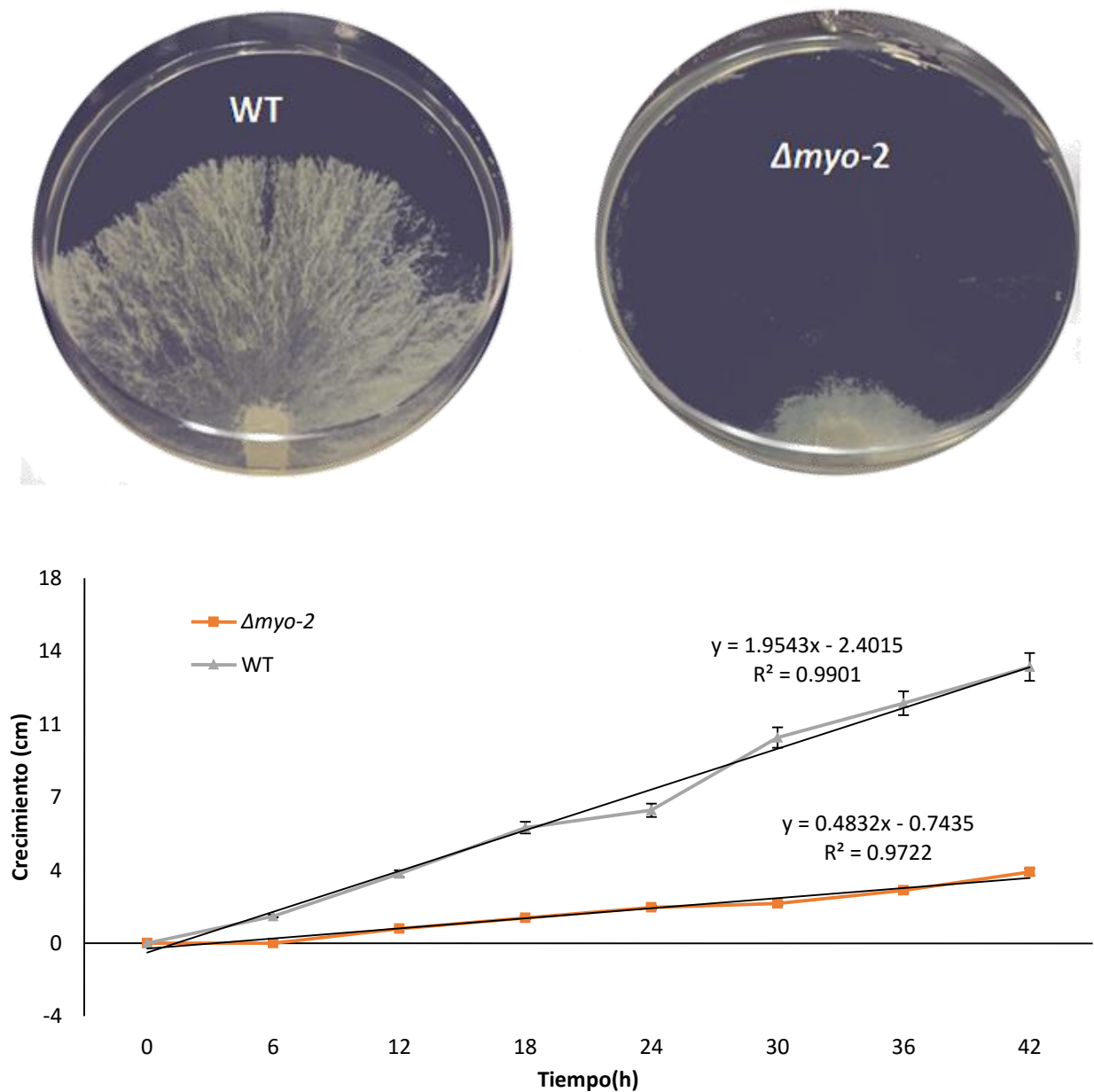


Figura 18. La cepa $\Delta myo-2$ presenta una reducción en el crecimiento colonial comparada con la WT. Gráfica de la medición de la tasa de crecimiento de las cepas WT y $\Delta myo-2$ en un lapso de 42 horas, la cepa mutante $\Delta myo-2$ crece 77% menos que la cepa WT.

7.3.3 Biomasa

Se realizó la medición de biomasa observándose que la cepa $\Delta myo-2$ tiene una reducción de la biomasa de 45 % comparada con la cepa WT.

7.3.4 Ramificación

Se cuantificó la cantidad de ramas presentes en 30 hifas parentales de las cepas WT y $\Delta myo-2$ y se observó que la cepa WT genera hasta seis ramas en 500 μm con un promedio de 2.3 ramas, mientras que la cepa mutante $\Delta myo-2$ desarrolla hasta dos ramas en 500 μm con un promedio de 1.2 ramas, en promedio la reducción observada en la cepa $\Delta myo-2$ es de 54% (Figura 19).

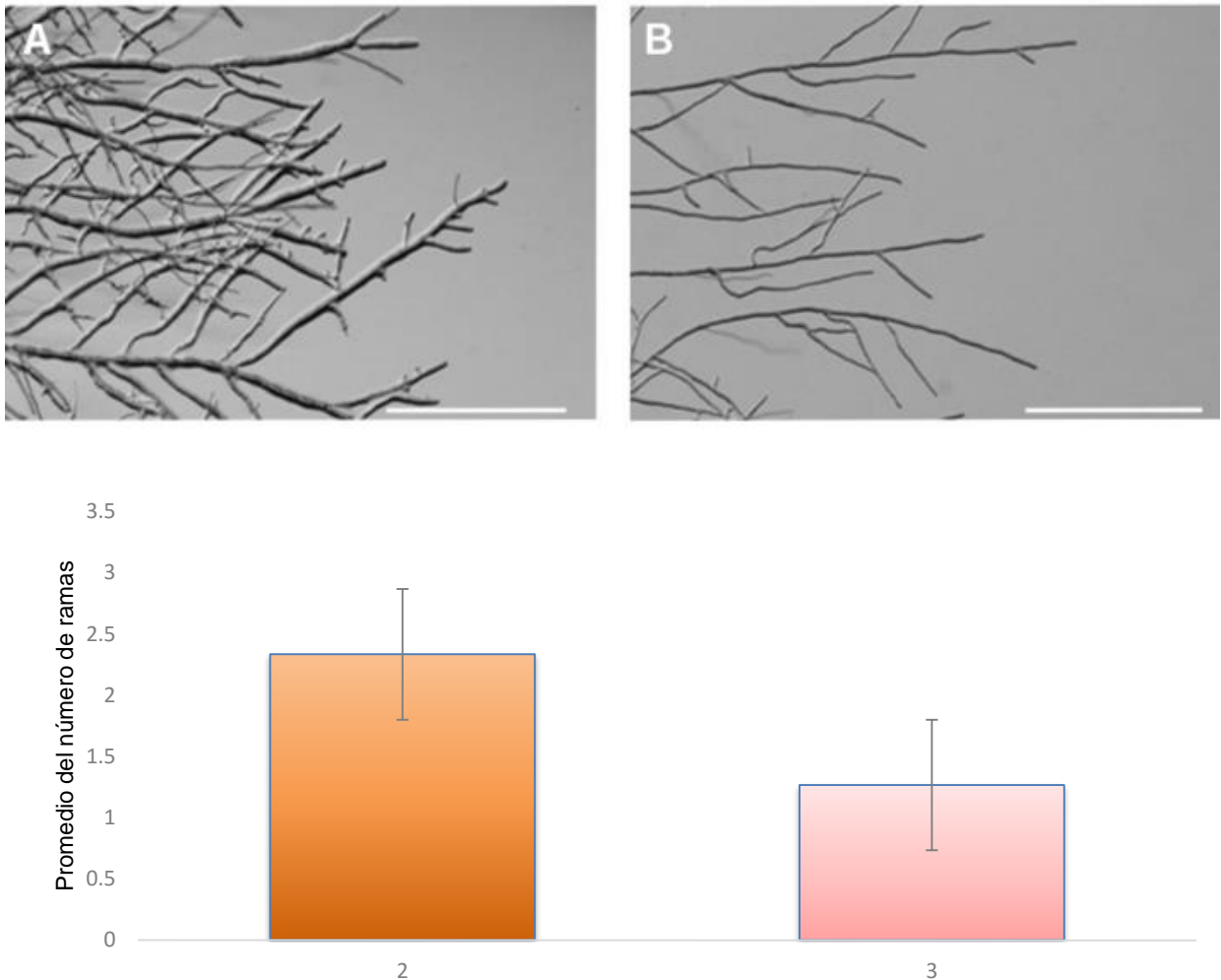


Figura 19. La cepa $\Delta myo-2$ tiene una menor cantidad de ramas comparada con la cepa WT. Microscopía estereoscópica, (A) la cepa WT tiene una mayor cantidad de ramas comparada con la cepa $\Delta myo-2$ (B). La gráfica muestra en la cepa WT promedio de 2.3 ramas y la cepa $\Delta myo-2$ un promedio de 1.2 ramas. Escala=500 μm .

7.3.5 Diámetro de las hifas

Mediante microscopía de alto aumento se realizaron mediciones del diámetro de las hifas en una longitud de 50 μm a partir de la punta de la hifa, las mediciones muestran que la cepa mutante $\Delta myo-2$ tiene una alta variabilidad en su diámetro, sin embargo, se observa que en promedio la cepa $\Delta myo-2$ tiene un diámetro 53% menor que la cepa WT (Figura 20).

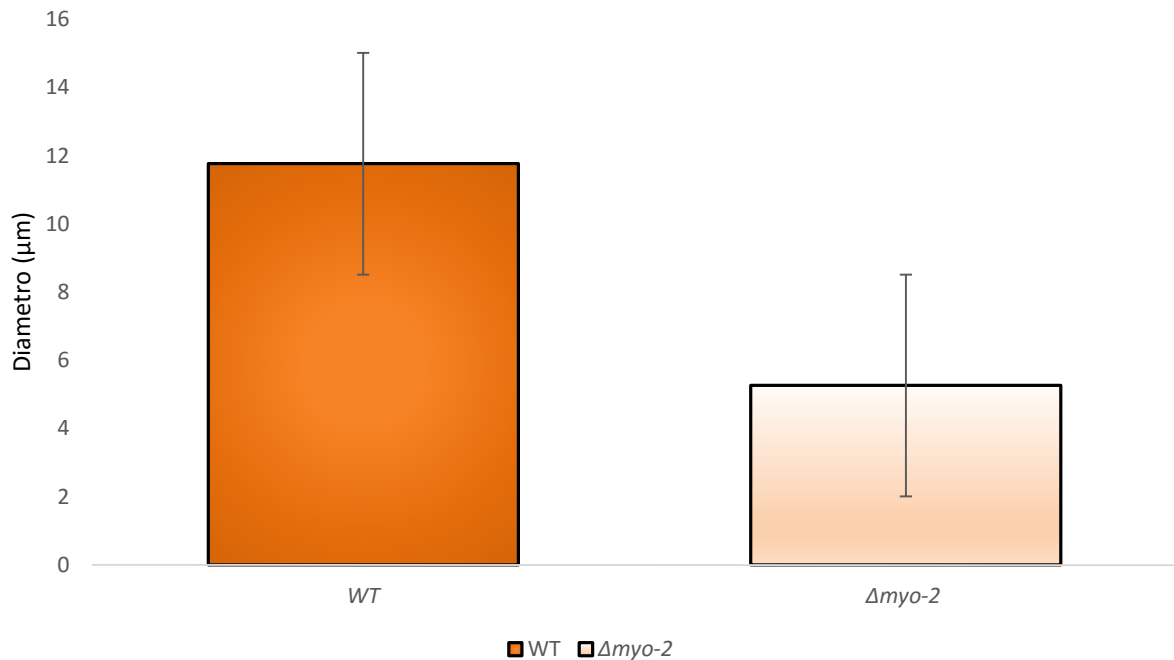


Figura 20. Las hifas de la cepa $\Delta myo-2$ tienen un menor diámetro en comparación con la cepa WT. (A) y (C) imagen de las hifas de la cepa WT donde se observan las mediciones realizadas al diámetro de la hifa y (B) y (D) imagen de las hifas de la cepa mutante $\Delta myo-2$. (E) Gráfico del diámetro de las hifas de ambas cepas mostrando una reducción del diámetro promedio del 57%. (A) a (D) escala=10 μm .

7.3.6 Septación

El septo permite generar compartimentos, confiere resistencia a la pared celular y permite en caso de lisis contener los daños a la colonia. Mediante la tinción del micelio de la cepa WT y $\Delta myo-2$ con blanco de calcoflúor se visualizó la pared celular y los septos de ambas cepas.

La cepa WT muestra septos a intervalos regulares que son teñidos por el blanco de calcoflúor (Figura 21A, 22A y 22B), mientras que la cepa mutante $\Delta myo-2$ no presenta septos detectables mediante esta tinción (Figura 21B).

Observaciones en la cepa mutante muestran la presencia de depósitos de quitina en la pared celular simulando septos en formación (Figura 22C y22F).

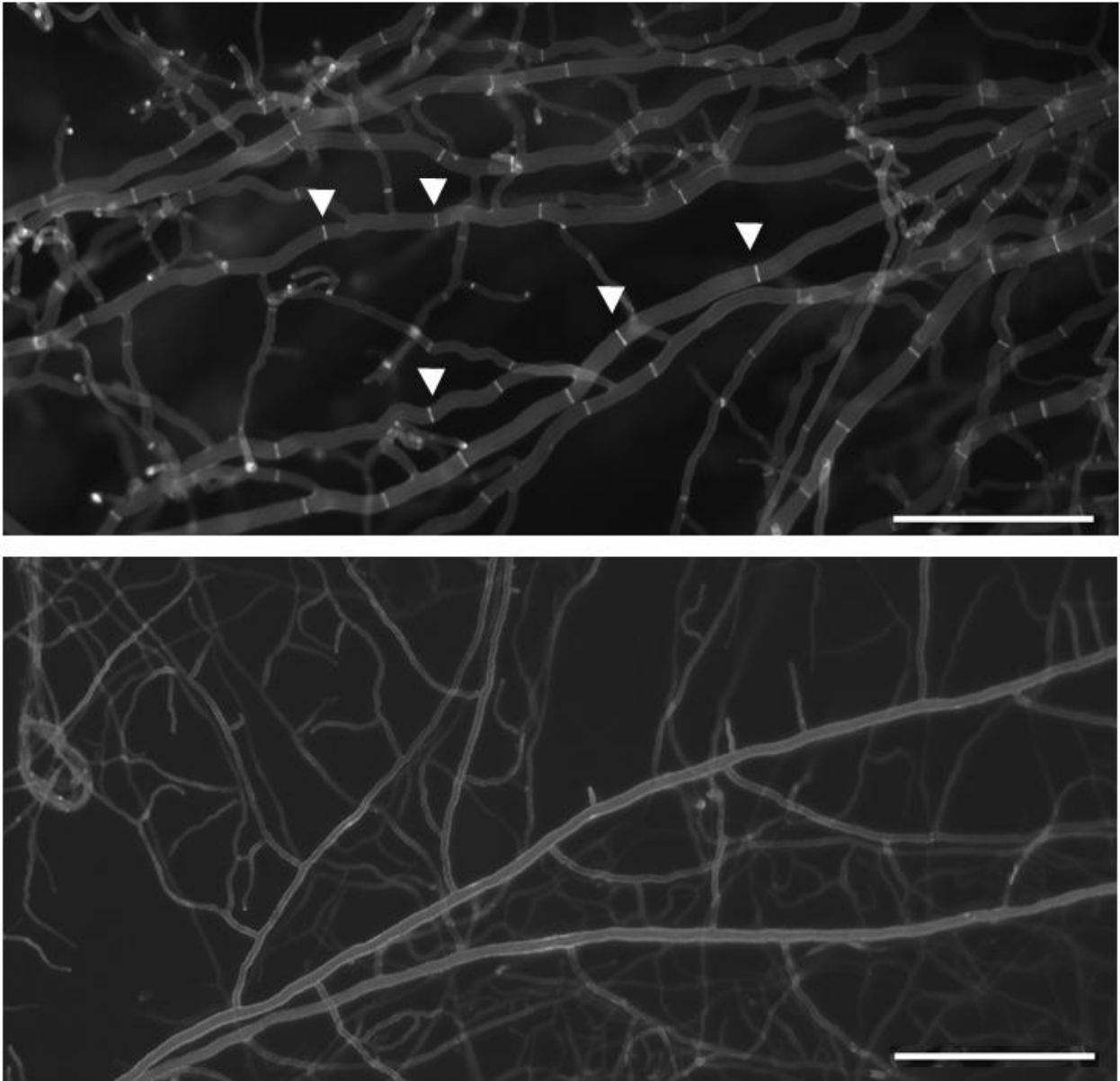


Figura 21. La cepa $\Delta myo-2$ es incapaz de formar septos. (A) Reconstrucción de una hifa parental de la cepa WT se observan septos a intervalos regulares teñidos por el colorante (cabezas de flechas blancas) y (B) una hifa parental de la cepa mutante $\Delta myo-2$ donde no se observan septos, las cepas fueron teñidas con blanco de calcofluor 0.01%.

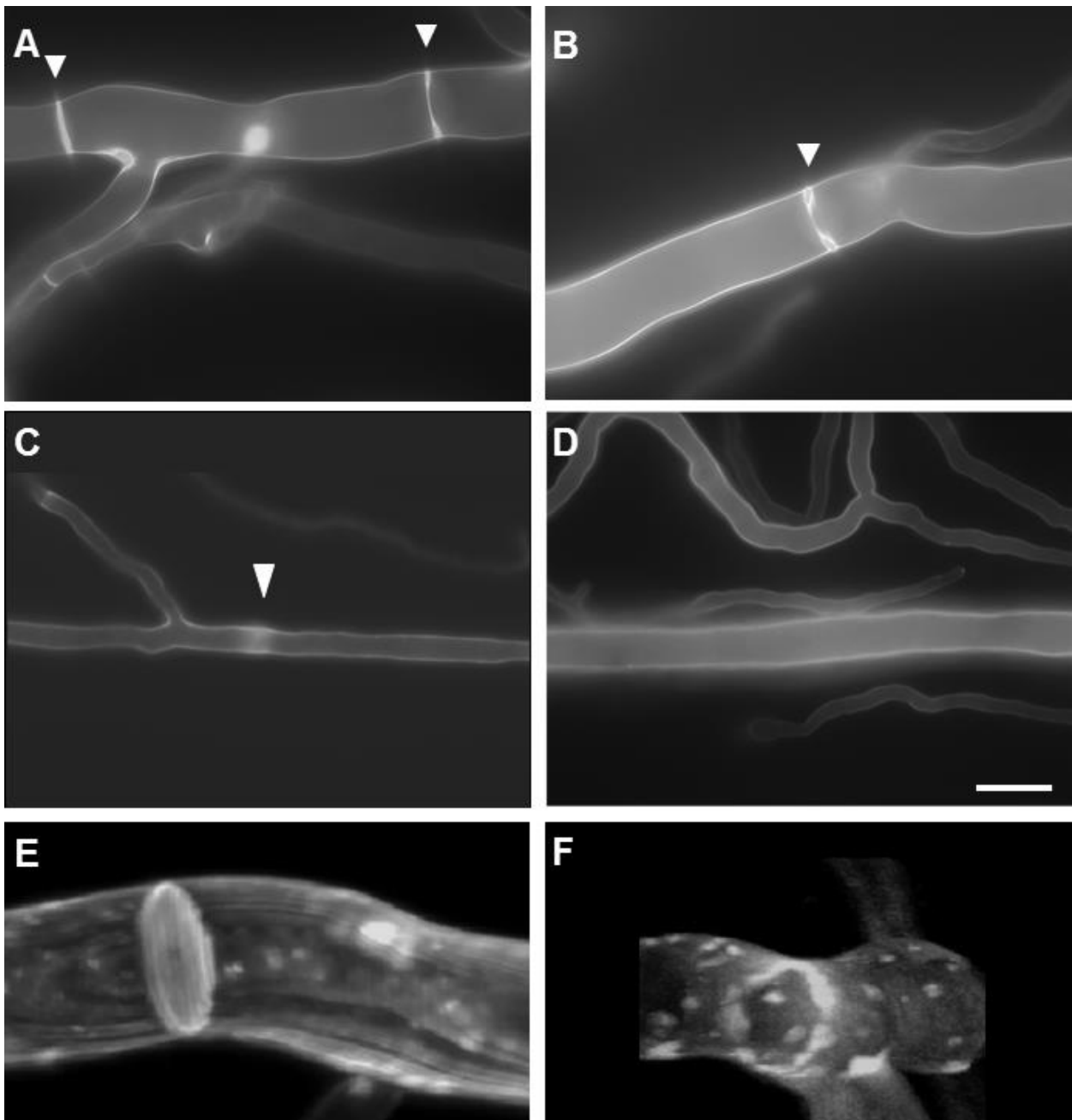


Figura 22. La cepa mutante $\Delta myo-2$ no es capaz de formar septos. Cepas teñidas con blanco de calcoflúor al 0.01%, (A) y (B) cepa WT, los septos son observados a intervalos regulares (señalados con cabezas de flechas blancas), (C) y (D) la cepa $\Delta myo-2$ no desarrolla septos, pero presenta acumulaciones de quitina en la hifa simulando septo (cabeza de flecha blanca en (C)). (E) la reconstrucción 3D de la cepa WT muestra un anillo completo de quitina, (F) la reconstrucción 3D de la cepa mutante $\Delta myo-2$ muestra acumulaciones de quitina en forma de anillo incompleto. Escala = 10 μm .

7.3.7 Esporulación

La conidiación se encuentra severamente afectada en la cepa $\Delta myo-2$, no hay desarrollo de macroconidios maduros (Figura 23), hifas aéreas (Figura 24), sin embargo, sí hay producción de β -carotenos.

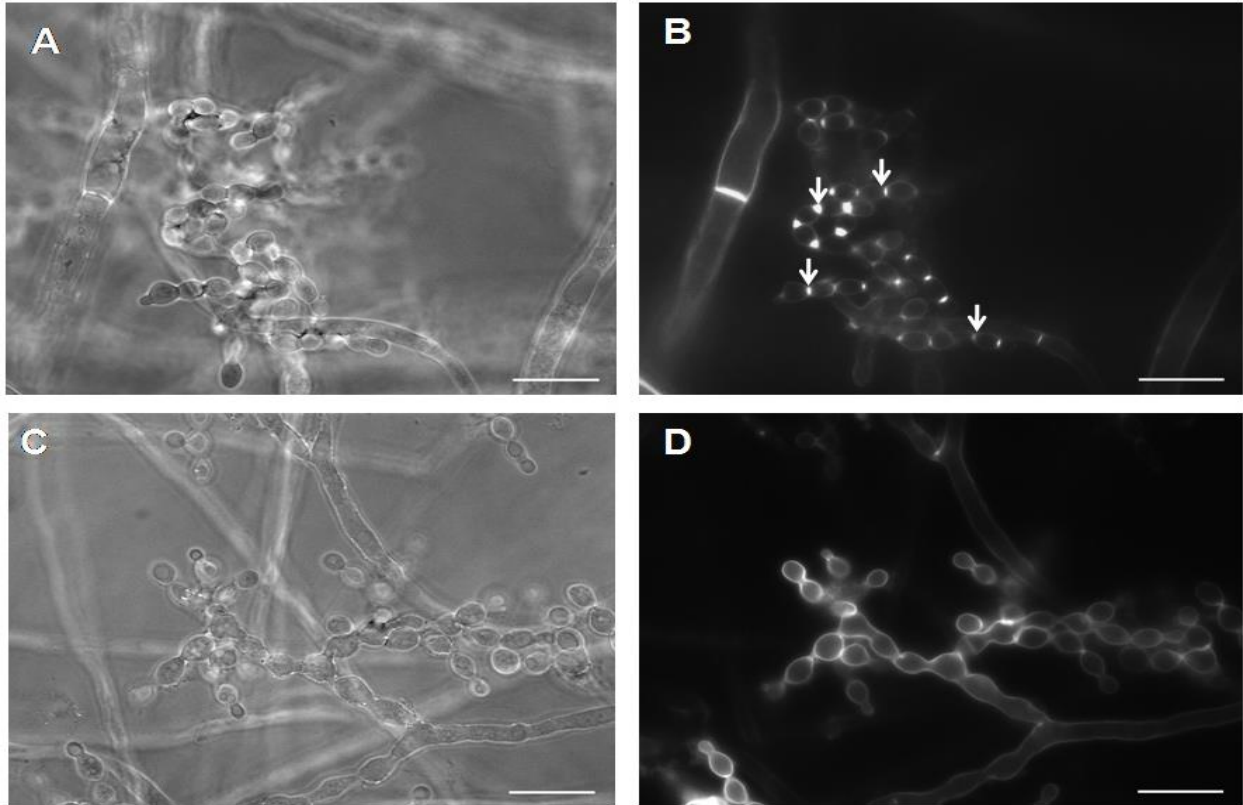


Figura 23. La cepa mutante $\Delta myo-2$ no es capaz de conidiar. Microscopía de contraste de fases y epifluorescencia para cepas teñidas con blanco de calcofluor 0.01%, A) y B) la cepa WT tiene una formación de conidióforos normal y de liberación de conidios, se forman septos entre conidios (indicado por flechas blancas), C) y D) La cepa mutante $\Delta myo-2$ a pesar de la formación de conidióforos no es capaz de liberar los conidios individuales. Escala = 20 μm .



Figura 24. La cepa $\Delta myo-2$ no es capaz de formar micelio aéreo ni separar los macroconidios del conidióforo. (A) Fotografía de tubos de ensayo con MMV, donde se observa la formación del micelio aéreo en la cepa WT (*) y la ausencia de micelio aéreo en la cepa $\Delta myo-2$ (**). (B) Reconstrucción 3D de un conidióforo teñido con blanco de calcofluor (0.01%) de la cepa mutante $\Delta myo-2$.

La cuantificación de conidios no permitió detectar conidios en la $\Delta myo-2$, se observaron conidióforos, pero no conidios individuales (Figura 23).

El micelio aéreo está notablemente reducido en la $\Delta myo-2$ se obtuvo una altura promedio de 0.1 cm mientras que la cepa WT tiene una altura promedio de 2.2 cm (Figura 24A).

7.3.8 Respuesta al daño mecánico

Durante las observaciones del crecimiento colonial de la cepa mutante se observaron pequeñas fugas de líquido citoplasmático en el margen de la colonia. Para observar este fenómeno se utilizaron métodos mecánicos y osmóticos para provocar la fuga citoplasmática y se visualizó mediante microscopía estereoscópica. Usando cortes en sentido perpendicular al micelio en crecimiento se observó que la cepa WT tiene un mecanismo de contención excelente para las pérdidas citoplasmáticas (Figura 25A-25F), mientras que por otro lado la cepa mutante $\Delta myo-2$ es incapaz de controlar las pérdidas citoplasmáticas (Figura 25G-25L).

7.3.9 Fragilidad de la pared celular

Para saber si las descargas citoplasmáticas ocurrían en sitios de debilidad de la pared celular se realizó un experimento donde se sometió a la hifa a un choque osmótico similar a lo reportado por Bartnicki y Lippman (1972). Se utilizó el medio YPG donde se inocularon las cepas WT y $\Delta myo-2$ para posteriormente agregar H₂O desionizada estéril. Se observó que la cepa WT sufría descargas citoplasmáticas en la punta de la hifa rápidamente contenidas (Figura 26A-26D), mientras que la cepa $\Delta myo-2$ sufría descargas citoplasmáticas abundantes en la punta (Figura 26E-26H). esto muestra que ambas cepas son frágiles en la región apical donde se lleva a cabo la formación de nueva pared celular.

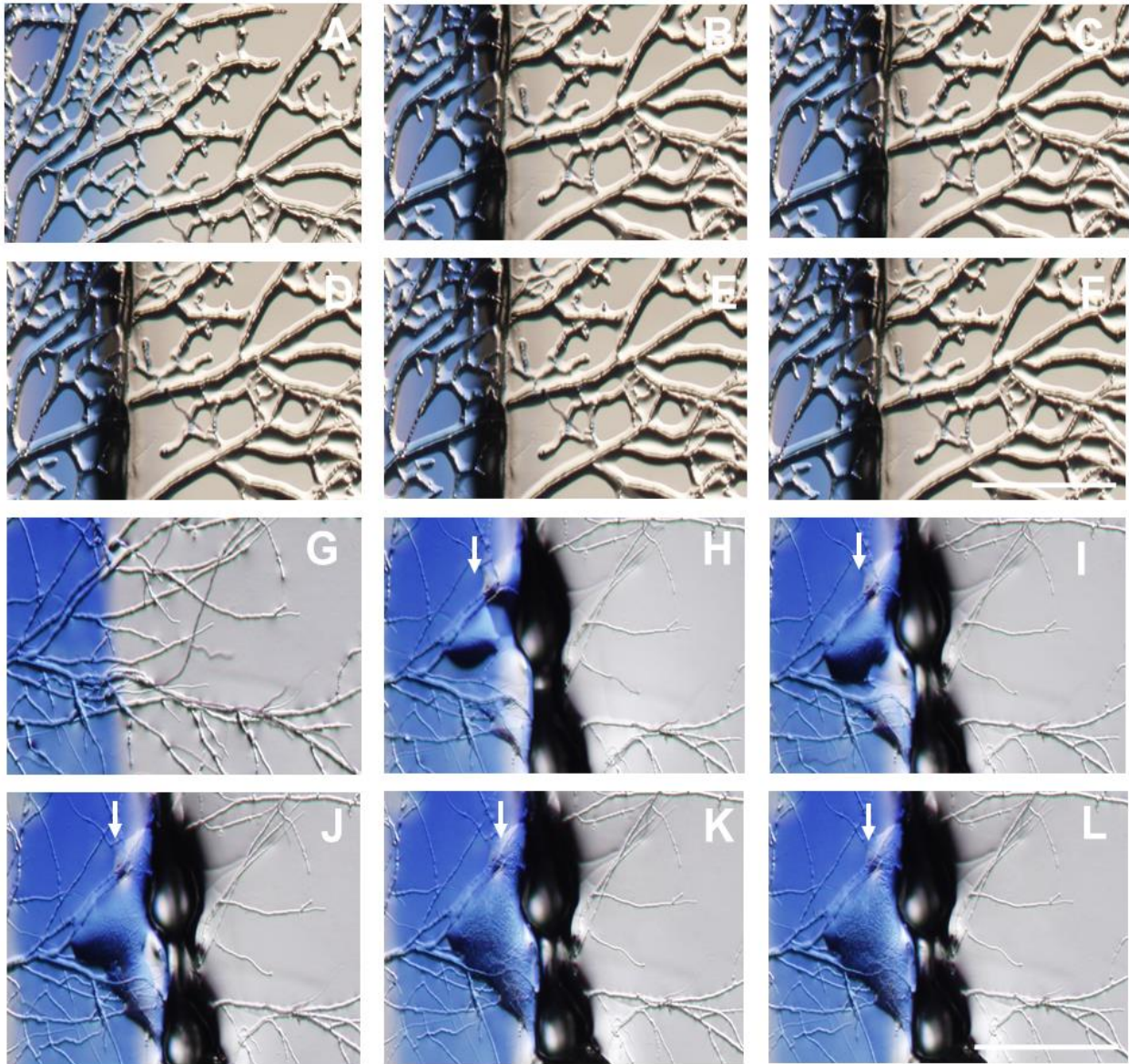


Figura 25. La cepa mutante $\Delta myo-2$ no es capaz de controlar las pérdidas citoplasmáticas secundarias a una lesión mecánica. Serie de tiempo de la cepa WT, imagen A corresponde a la cepa WT antes del corte, las imágenes B a F fueron tomadas después del corte. Serie de tiempo de la cepa $\Delta myo-2$, la imagen G corresponde a una imagen previa al corte, las imágenes H-L fueron tomadas después del corte, se observa fugas citoplasmáticas (señaladas por cabezas de flecha blanca). Escala = 250 μm .

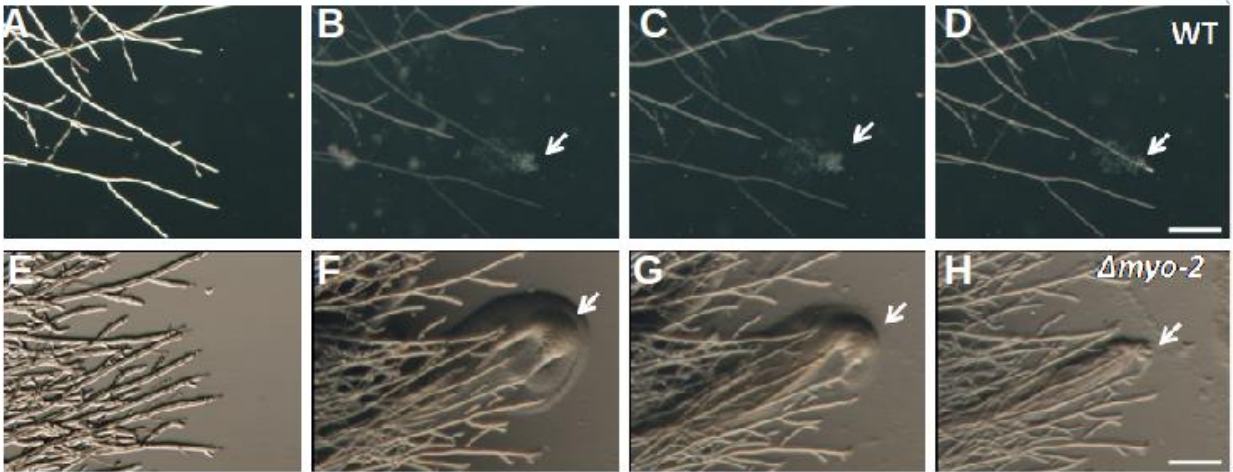


Figura 26. La cepa $\Delta myo-2$ suele tener ruptura espontánea en el ápice al igual que la cepa WT. Microscopía estereoscópica, cepa WT en medio YPG (A), administración de H_2O desionizada estéril, se observa el estallamiento en la punta (B a D, señalado por flechas blancas), la cepa mutante $\Delta myo-2$ en medio YPG (E), posterior a la administración de H_2O desionizada estéril se observa una fuga masiva de citoplasma en el ápice (F-H, señalado por flechas blancas). Escala = $50\mu m$.

Comparamos las cepas WT y $\Delta myo-2$ bajo dos condiciones estresantes. Se adicionó a MMV glicerol a una concentración final de 2 M y blanco calcoflúor 5 mg/ml. Se observó que la cepa WT tiene una reducción de su crecimiento en glicerol de un 19% y de un 4% en blanco de calcoflúor (Figura 27), en contraste la cepa mutante $\Delta myo-2$ tiene una reducción de su crecimiento de 22% y 47% respectivamente (Figura 27).

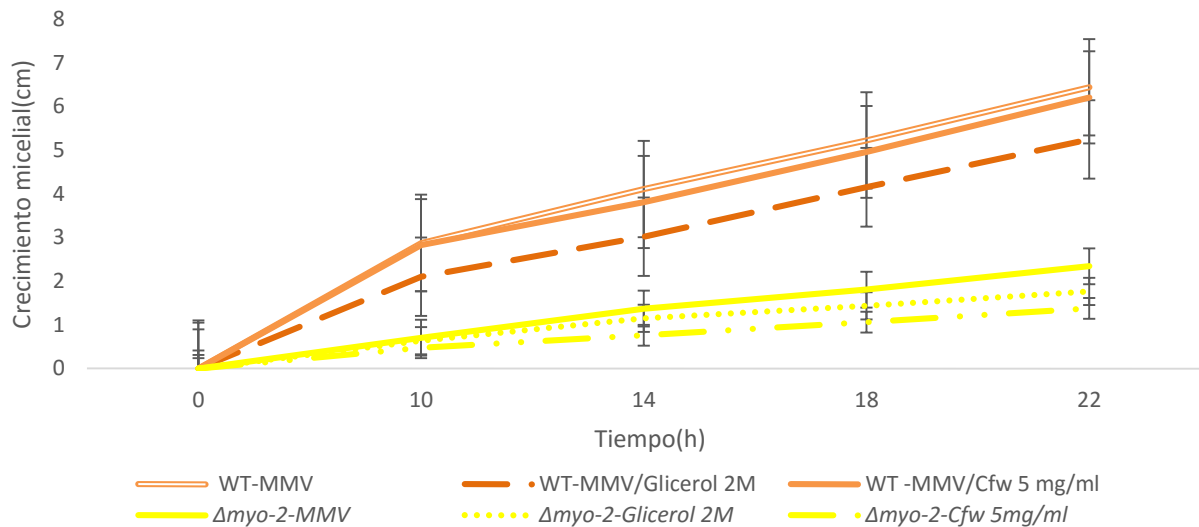


Figura 27. La cepa $\Delta myo-2$ tiene una menor susceptibilidad a los estresantes osmóticos y una mayor sensibilidad al stress de la pared celular comparada con la WT. Gráfica de la tasa de crecimiento de la cepa WT y $\Delta myo-2$ en medios con glicerol a 2 M y blanco de calcoflúor a 5 mg/ml.

7.3.10 Cuantificación de proteínas y quitina

Para conocer si la pared celular de la cepa $\Delta myo-2$ presentaba cambios en su composición determinamos la cantidad de quitina y proteínas totales en las cepas WT y $\Delta myo-2$. Se observó una reducción en la cantidad de proteínas totales y un aumento de la concentración de quitina en la cepa $\Delta myo-2$ comparada con la cepa WT (Figura 28).

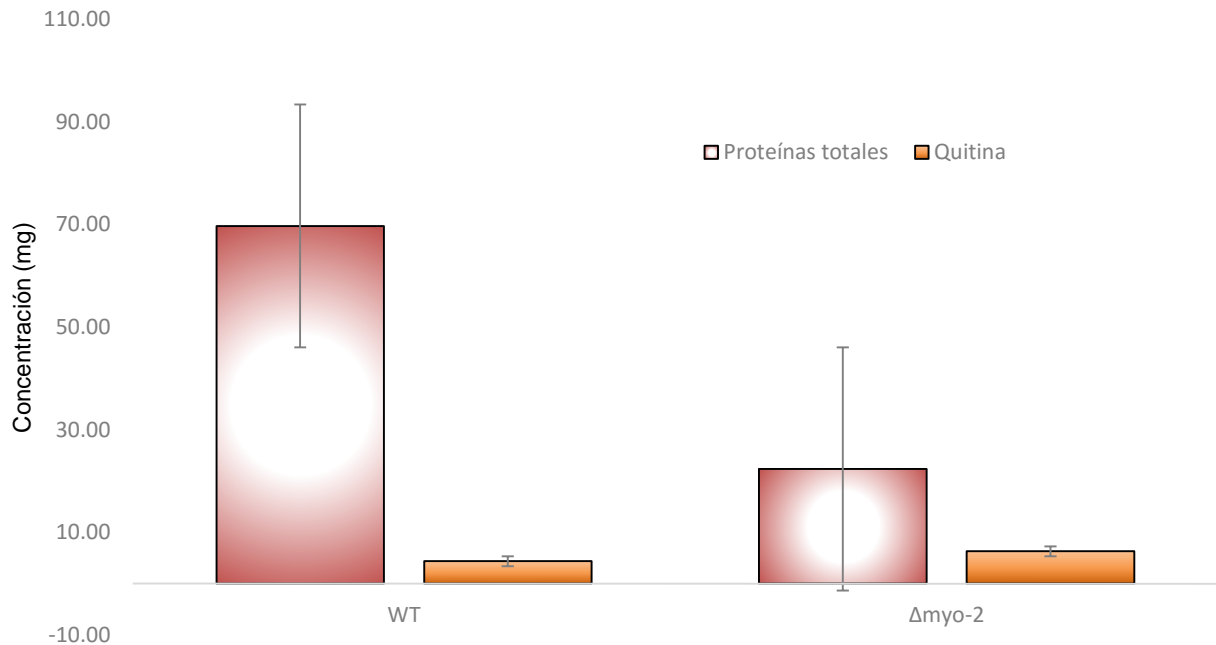


Figura 28. La cepa $\Delta myo-2$ tiene una mayor cantidad de quitina, pero menor cantidad de proteínas que la cepa WT. Gráfica de la cuantificación de quitina y proteínas totales en la cepa WT y $\Delta myo-2$.

7.3.11 Vacuolas

Durante las observaciones en la microscopía por contraste de fases en la cepa mutante $\Delta myo-2$ se observaron anomalías en los organelos, mediante la tinción con Oregon Green se determinó que se trataba de vacuolas de gran tamaño (Figura 29A y 29B). Para saber si además de la formación de vacuolas de tamaño anómalo se encontraba alterada la distribución de las vacuolas en la región subapical, se realizaron observaciones en la cepa WT y $\Delta myo-2$ teñidas con Oregon Green a 20 μM . Se observó que las zonas de restricción se encuentran respetadas y que la organización vacuolar es la misma en la cepa mutante $\Delta myo-2$ que en la WT (Figura 30A y 30B).

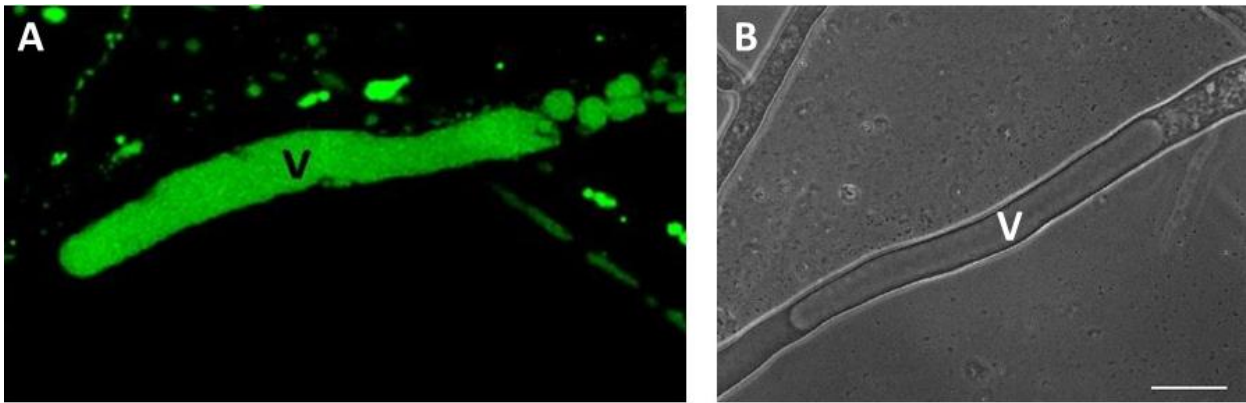


Figura 29. La cepa mutante $\Delta myo-2$ muestra vacuolas de gran tamaño. Microscopía de contraste de fases y epifluorescencia, (A) Vacuolas anormales teñidas con Oregon Green, (B) vacuolas en contraste de fases. Escala=20 μ m.

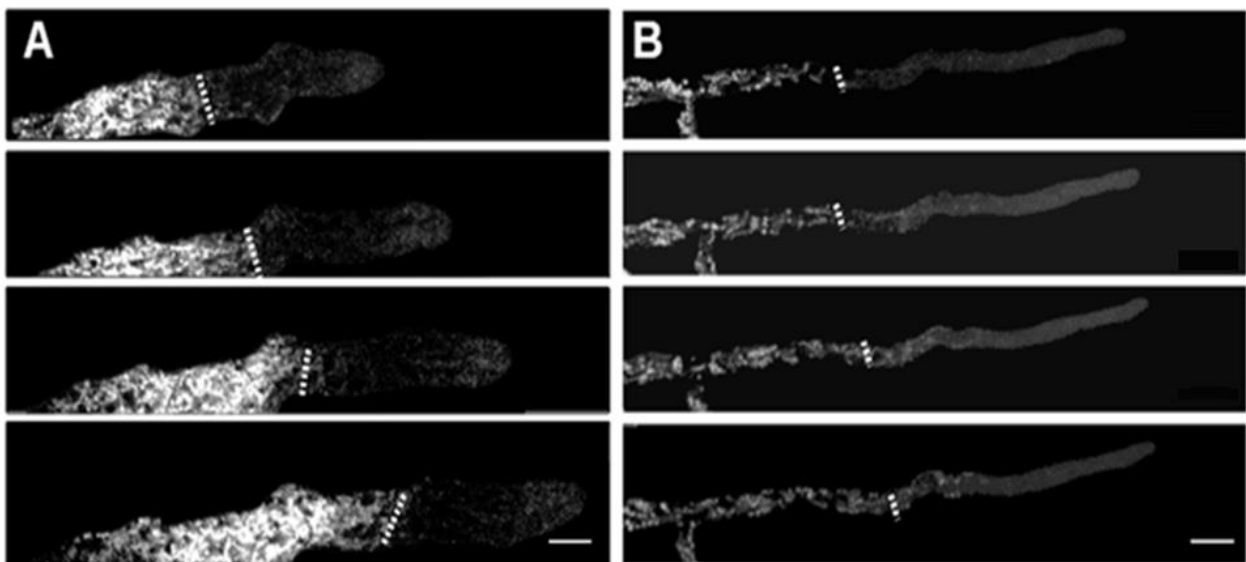


Figura 30. En la cepa $\Delta myo-2$ se mantiene la restricción de las vacuolas en la punta de la hifa. Microscopía confocal. Cepas teñidas con Oregon Green, se observa la restricción de las vacuolas a la región subapical (señaladas por líneas punteadas) en la cepa WT(A) y en la cepa $\Delta myo-2$ (B). Escala=10 μ m.

7.3.12 Mitocondrias

Con el fin de determinar si la MYO-2 tiene algún papel en la organización de las mitocondrias se realizaron observaciones en ambas cepas utilizando el colorante vital Syto Red-64. Las observaciones muestran una dinámica y localización normal de las mitocondrias en la punta de la hifa (Figura 31).

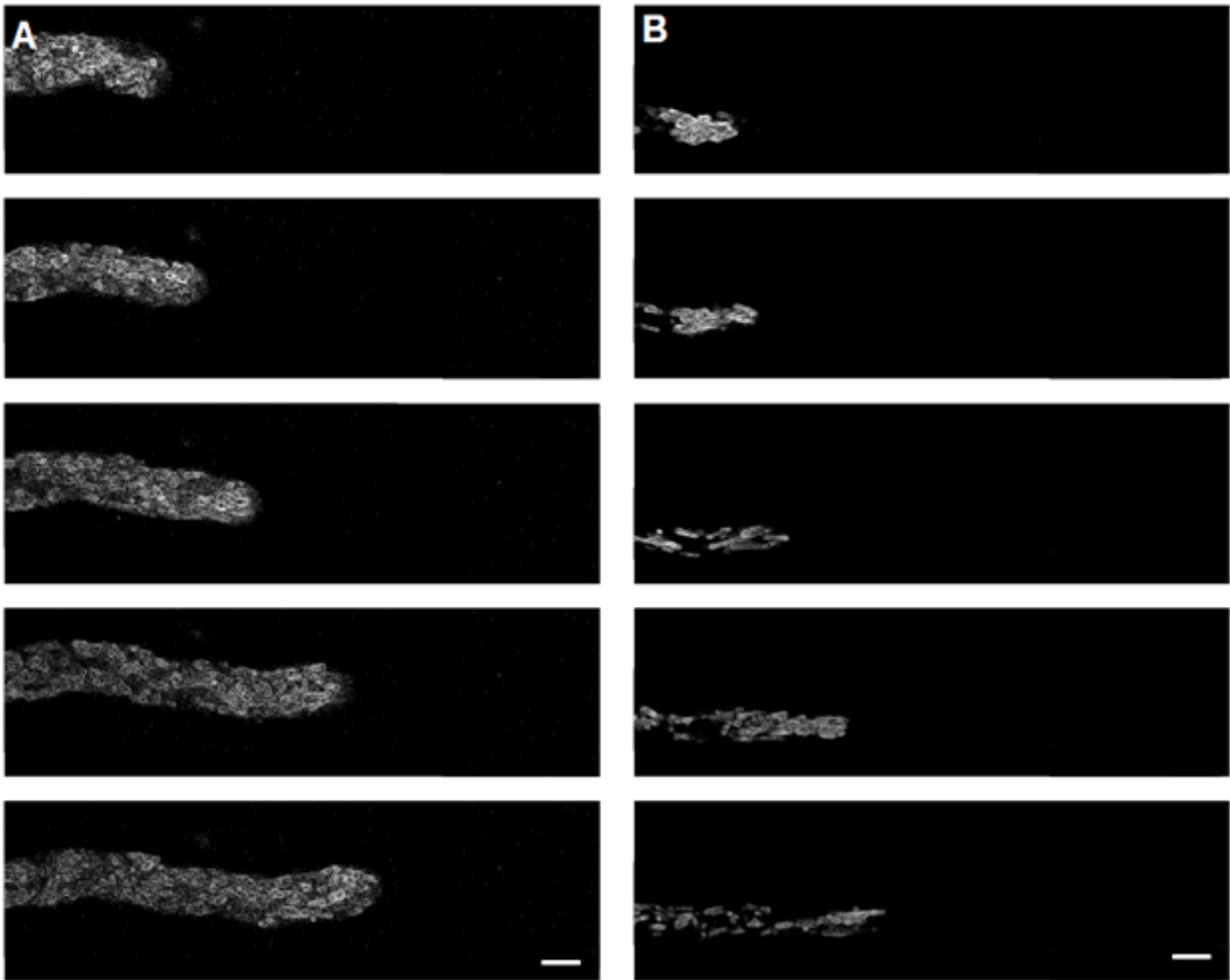


Figura 31. La localización y dinámica de las mitocondrias en la cepa $\Delta myo-2$ es igual que la WT. Microscopía confocal, cepas teñidas con Syto Red-64®, en la cepa WT (A) se encuentran las mitocondrias en toda la hifa con excepción del sitio correspondiente al Spk. La mutante $\Delta myo-2$ (B) tiene una dinámica similar a la WT. Escala = 10 μm .

7.3.13 El Spk

Para saber si la delección de la *myo-2* afecta al Spk se realizaron mediciones del tamaño de esta estructura en la cepa WT y $\Delta myo-2$ mediante la tinción con FM4-64. Los resultados muestran que, en proporción al tamaño de la hifa, los Spk tanto de la WT como de la cepa $\Delta myo-2$ son similares, aproximadamente el Spk guarda una relación de 35-40% del diámetro de la hifa en ambas cepas (Figura 32).

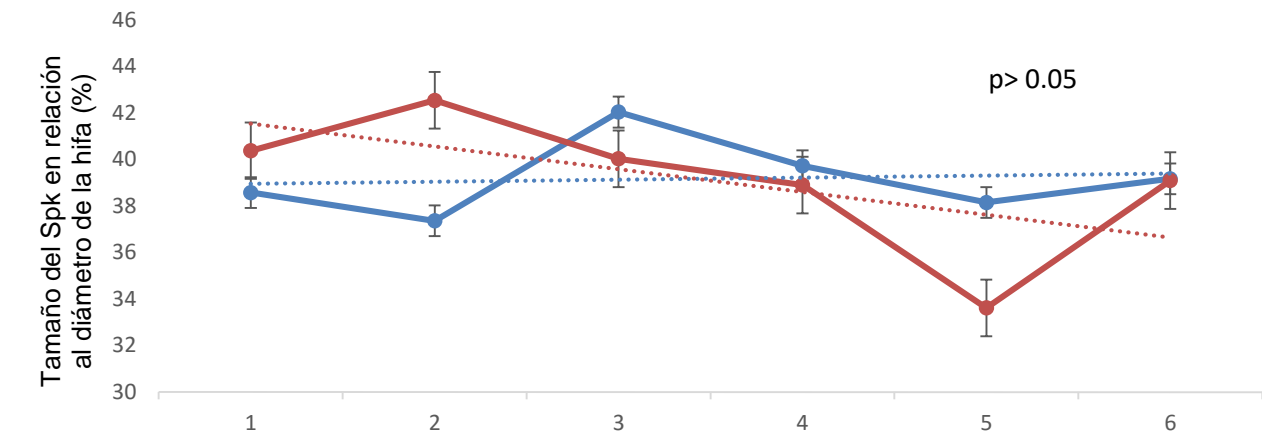
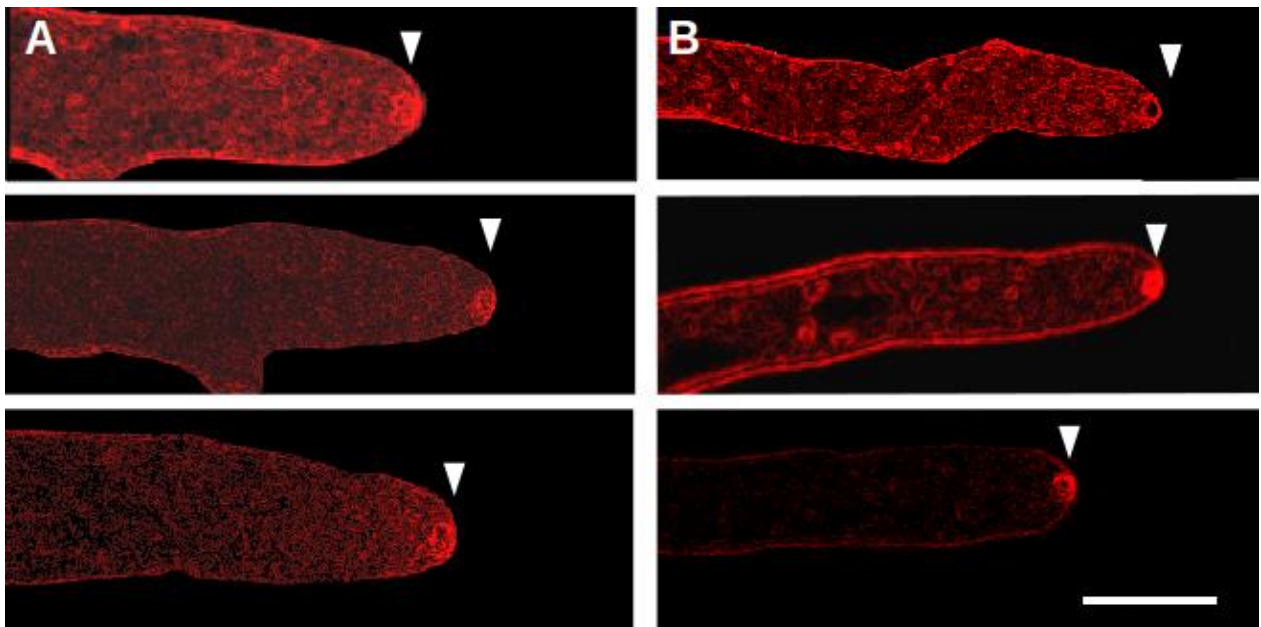


Figura 32. El Spk en la $\Delta myo-2$ tiene un tamaño similar al de la WT. Microscopía confocal. (A) La cepa WT teñida con FM4-64 tiene un Spk prominente en el ápice de las hifas (señalados por cabezas de flechas blancas). (B) La cepa $\Delta myo-2$ teñida con FM4-64 tiene un Spk comparable al de la WT (señalado por cabezas de flecha). Gráfica del tamaño del Spk mostrando en la cepa WT y $\Delta myo-2$ un Spk sin diferencias significativas. Escala = 10 μ m.

7.3.14 Dirección del crecimiento

La localización de la MYO-2-GFP en el Spk sugiere un papel de esta proteína en su dinámica. Mediante microscopía de contraste de fases y software de análisis de imágenes (Image J), observamos el comportamiento del Spk a lo largo de una trayectoria lineal.

El análisis muestra que la cepa mutante $\Delta myo-2$ suele cambiar de eje de crecimiento más a menudo que la cepa WT, el Spk es estable en sus movimientos en ambas cepas (Figura

33).

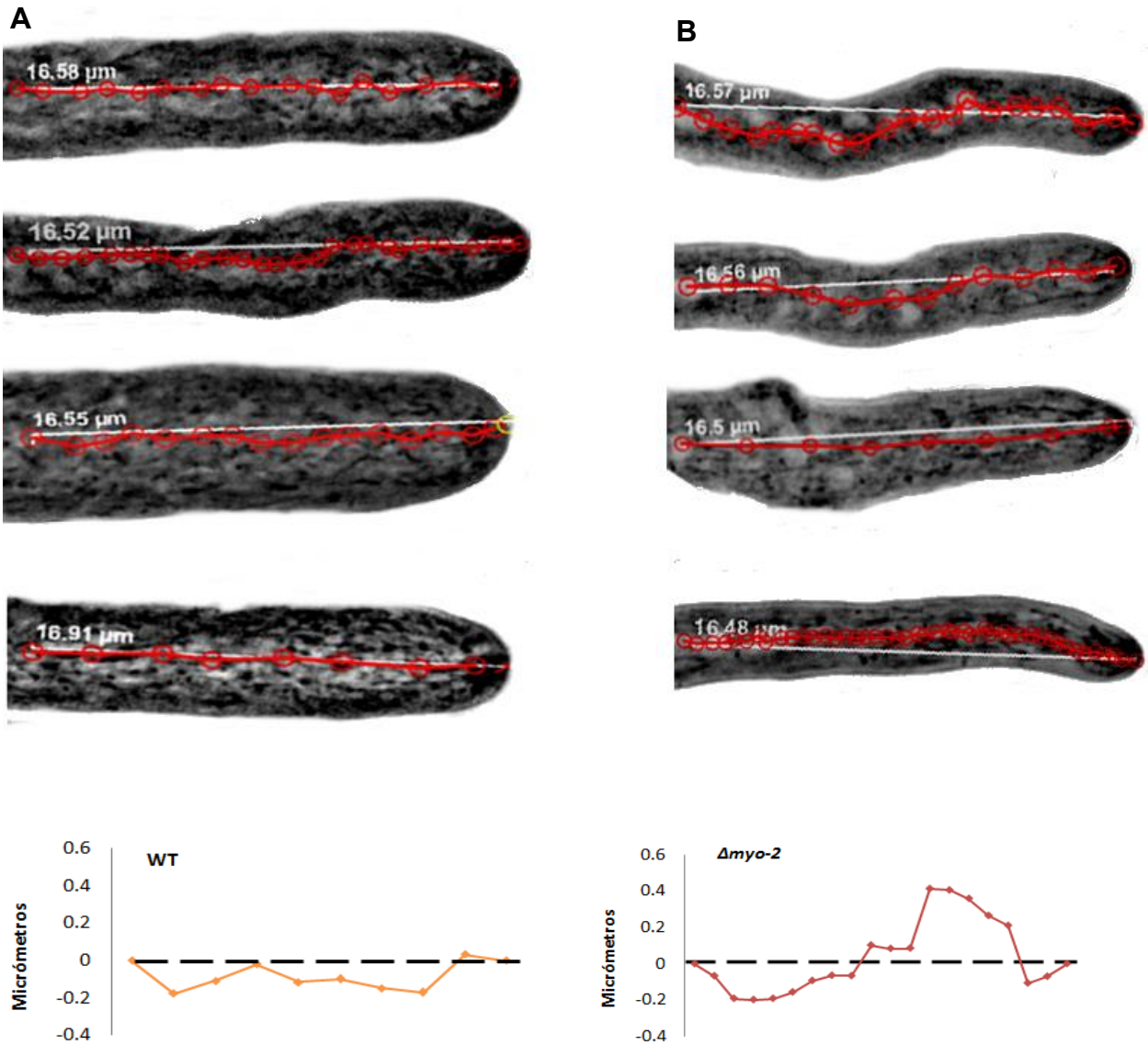


Figura 33. La cepa $\Delta myo-2$ tiene más cambios de dirección que la cepa WT. Microscopía de contraste de fases, la cepa WT tiene un eje de crecimiento estable (A), en contraste la cepa $\Delta myo-2$ tiende a cambiar de dirección más frecuentemente (B). Gráfica de la oscilación del Spk a través de un trayecto lineal, se observa un mayor cambio de dirección en la cepa $\Delta myo-2$.

Capítulo 8. Discusión

8.1 La MYO-2 y el Spk

A través del marcaje endógeno de la MYO-2 con GFP, se localizó sin lugar a dudas, esta proteína en el Spk. El análisis FRAP mostró que la MYO-2 viaja desde regiones basales de las hifas para permanecer en el Spk, aunque se ve que su recambio es acelerado y no parece estar unida a otras proteínas por tiempo prolongado. Esto indica que sí hay una relación estructural temporal entre la actina encontrada en el ápice y la MYO-2. Sobre esta relación, no se tiene ningún antecedente, esto puede deberse a que en otros organismos la cantidad de miosina clase II sea muy pequeña por lo que no haya sido posible detectarla a través de las técnicas de microscopía existentes o que la MYO-2 juegue un papel distinto en *N.crassa*. Sorpresivamente, la mutante $\Delta myo-2$ tiene un Spk bien definido, que está presente de manera constante. Sin embargo, la dirección del crecimiento está afectada, se observa un aumento en los cambios de dirección en la cepa $\Delta myo-2$ por lo que se puede decir que la MYO-2 está involucrada en la dirección del crecimiento, pero no con la integridad del Spk y el crecimiento polarizado.

Un aspecto interesante es que la localización y función de la MYO-2 es dependiente de su función de mecanoenzima, como lo muestran los experimentos con el inhibidor blebistatina, esto es similar a los resultados en *A. nidulans* donde se realizaron mutaciones puntuales de la región convertidora, que son incapaces de utilizar la ATPasa (Hill et al., 2015) y en amibas (Iwadate et al., 2013).

Al administrar blebistatina se observa una deslocalización de la MYO-2 formando una nube difusa en la punta de la hifa, como consecuencia la morfología de la hifa se altera e inicia un crecimiento isométrico esto es similar a lo observado por Bartnicki-Garcia, et al (1995) donde se observó que la pérdida del Spk causa alteraciones en la morfología de la hifa.

8.2 Impacto de la ausencia de *myo-2* en el crecimiento de *N. crassa*

La ausencia del gen de la *myo-2* tuvo un efecto severo en el fenotipo de *N. crassa*. El crecimiento de la colonia, la biomasa, la tasa de ramificación, la formación de hifas aéreas y la conidiación se vieron reducidas y hasta abolidas en la mutante $\Delta myo-2$, estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012), *P. marneffei* (Canovas et al., 2011) y *F. gramineum* (Song et al., 2013). Sin

embargo, como se mencionó anteriormente, en ninguno de estos hongos se ha observado a la miosina de clase II en el ápice, esto podría deberse a que la MYO-2 juegue un rol distinto en *N.crassa* o que la cantidad de proteína sea más abundante.

8.3 Formación de septos y esporas en la mutante $\Delta myo-2$

Un evento que ha sido ampliamente estudiado en diversos hongos filamentosos en relación a la miosina de clase II es la formación de septos y con esto la formación de esporas (Hill et al., 2015; Song et al., 2013; Taheri-Talesh et al., 2012; Cánovas et al., 2011). La mutante $\Delta myo-2$ es aseptada, por lo que tampoco es capaz de hacer una separación completa de las conidias, a pesar de que sí puede formar conidióforos. La septación en ascomicetos filamentosos es esencial para la diferenciación durante formación de conidios y ascosporas, sin la formación de tabiques de pared celular flanqueando los conidios no es posible su separación (Gull, 1978; Raju y Leslie 1992). Otro efecto de la falta de septos es la alta frecuencia de ruptura de las hifas con pérdidas citoplasmáticas espontáneas a lo largo de la colonia. Este fenotipo se ha observado en otras mutantes de *N. crassa* que no producen septos como la mutante de *rho4* (Rasmussen y Glass, 2005). Los septos tienen una función clave en el mantenimiento de la integridad de las hifas después de cualquier lesión o stress osmótico. El taponamiento de los poros septales previene las pérdidas citoplasmáticas excesivas, facilitando el sellado y permitiendo que emerja un nuevo eje de crecimiento en el lugar del septo (Collinge y Markham, 1985; Hunsley y Gooday, 1974; Jedd y Chua, 2000; Momany et al., 2002; Tenney et al., 2000). La miosina de clase II tiene una función esencial en la formación del anillo contráctil de actomiosina en los septos (Lord, 2010; Kee et al., 2012; Calvert et al., 2011; Delgado-Alvarez et al., 2014; Mulvihill y Hyams, 2003; Song et al., 2013). Esto se debe a que es responsable de la fuerza contráctil para dirigir el crecimiento de la membrana y la pared celular en los sitios de septación (Mouriño-Pérez, 2013; Mouriño-Pérez y Riquelme, 2013).

8.4 Mitocondrias y vacuolas en la mutante $\Delta myo2$

La cepa $\Delta myo-2$ presenta vacuolas de un tamaño considerablemente mayor a las observadas en la cepa WT, este fenómeno no ha sido descrito en otras cepas aseptadas. Esto podría indicar que la MYO-2 tiene un papel en la morfología de las vacuolas o que esta alteración en el tamaño y morfología es secundaria a la pérdida de septos. Por otro

lado, existe evidencia que la MYO-2 participa en la fisión de mitocondrias y que su ausencia causa un alargamiento de las mitocondrias (Korobova et al., 2014). En la cepa *Δmyo-2* de *N. crassa* no se pudo observar ninguna alteración en la dinámica y morfología de las mitocondrias.

Capítulo 9 Conclusiones

1. La MYO-2 es parte estructural del Spk
2. La MYO-2 tiene una función esencial en la formación de septos en hifas vegetativas y en conidióforos, sin embargo, parece no participar en la selección del sitio de formación de nuevos septos.
3. La localización de la MYO-2-GFP es dependiente de la ATPasa localizada en el dominio motor y la pérdida de la localización modifica el crecimiento polarizado de *Neurospora crassa*,

Lista de referencias bibliográficas

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004). *"Image Processing with ImageJ"*. Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36-42.
- Adams A.E and Pringle J.R. (1984). *Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant Saccharomyces cerevisiae*, The Journal of Cell Biology. 98(3):934-45.
- Allen E.A., Hoch H.C., Stavelly J.R, Steadman J.R. (1991). *Uniformity among races of Uromyces appendiculatus in response to topographical signalling for appressorium formation*. Phytopathology, 81:883-887.
- Arenas R. (2008). *Micología médica ilustrada*, editorial Mc Graw Hill, tercera edición.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews P., and Drubin, D. G. (1997). *High Rates of Actin Filament Turnover in Budding Yeast and Roles for Actin in Establishment and Maintenance of Cell Polarity Revealed Using the Actin Inhibitor Latrunculin-A*. The Journal of Cell Biology, 137(2), 399–416.
- Bartnicki-Garcia S., Bartnicki D.D., Gierz G., López-Franco R and Bracker C.E. (1995). *Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model*, Experimental Mycology. 19(2):153-9.
- Bartnicki-Garcia S., Hergert F. and Gierz. G (1989). *Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth*. Protoplasma 153:46–5
- Bartnicki-Garcia S. and Lippman Eleanor. (1972). *The bursting tendency of hyphal tips of fungi: Presumptive evidence for a delicate balance between balance wall synthesis and wall lysis in apical growth*. Journal of General Microbiology, 73:487-500
- Beach J.R., Licate L.S. and James F. C. (2011). *Analysis of the role of Ser1/Ser2/Thr9 phosphorylation on myosin II assembly and function in live cells*, Open Access BMC Cell Biology 12 :52
- Berepiki A., Lichius A. and Read N.D. (2011). *Actin organization and dynamics in filamentous fungi*, Nature reviews Microbiology, volume 9, pag 876-887
- Bracker C. E., D. J. Murphy and R. Lopez-Franco. (1997). *Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae* Proc. SPIE 2983, Functional Imaging and Optical Manipulation of Living Cells, 67. p. 67–80.
- Brand A. and Gow N. (2009) *Mechanisms of hypha orientation of fungi*, Current Opinion in Microbiology. 12(4): 350–357.
- Brunswik H. (1924). *Untersuchungen über Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomycetengattung Coprinus*. En: Goebel K, ed. *Botanische abhandlungen*. Jena, Germany: Gustav Fischer. 1–152
- Calvert M.E, Wright G.D, Leong F.Y, Chiam K.H, Chen Y, Jedd G, Balasubramanian M.K.

(2011) *Myosin concentration underlies cell size-dependent scalability of actomyosin ring constriction*, *Journal of Cell Biology*;195(5):799-813.

Cánovas D., Boyce K. J. and Adrianopoulos A (2011), *The fungal type II myosin in Penicillium marneffeii, myo B is essential for chitin deposition at nascent septation sites but not actin localization*, *Eucariotic cell*, pag 302-312.

Carreno, S., Engqvist-Goldstein, Å. E., Zhang, C. X., McDonald, K. L., and Drubin, D. G. (2004). *Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network*. *The Journal of Cell Biology*, 165(6), 781–788.

Chandrasekar I., Goeckeler Z. M, Turney S. G. and Wang P. (2014). *Non muscle Myosin II is a critical regulator of clathrin-mediated endocytosis*. *Traffic*, pag 418-432.

Chen G. and Johnson B.R. (1983). *Improved Colorimetric Determination of Cell Wall Chitin in Wood Decay Fungi*, *Applied and environmental microbiology*, p. 13-16

Chesarone M.A., DuPage A.G and Goode B.L. (2010) *Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons*. *Nature Reviews in Molecular and Cell Biology* 11: 62–74

Cole L., Hyde G.J., Ashford A. E. (1997). *Uptake and compartmentalization of fluorescent probes by Pisolithus tinctorius hyphae: evidence or and anion transport mechanism at the tonoplast but not for fluid based endocytosis*. *Protoplasma* 199, p 18-29.

Collinge, A.J. and Markham, P. (1985). *Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed Penicillium chrysogenum hyphae*. *Experimental Mycology*, 9 (1), 80–85.

Deacon J. (2006), *Fungal biology*, fourth edition, Blackwell, p. 1-15.

Delgado-Alvarez D.L., Bartnicki-Garcia S., Seiler S., Mouriño-Pérez R.R. (2014), *Septum development in Neurospora crassa: the septal actomiosin tangle*, *Plos one*, Volume 9, issue 5.

Echauri-Espinosa R.O. (2013). *Localización y dinámica de las proteínas de miosinas de clase II (MYO-2), clase V (MYO-5), miosina de cadena ligera (CDC-4) y coronina (CRN-1) en el hongo filamentoso Neurospora crassa* (no publicado).

Fulcher F. K., Smith B. T., Russ M. and Patel Y. (2008). *Dual role for myosin II in GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*, *Elsevier, Experimental cell research* 314 3264 –327.

Girbardt M. (1957), *Der Spitzenkörper Von Polystictus versicolor* (L), *Planta* 50:47-59.

Gull, K. (1978). *Form and function of septae in filamentous fungi*, , Wiley, New York. pp 78-93

Harris S., Read N. D., Roberson R. W., Shaw B., Seiler S., Plamann M. and Momany M. (2005). *Polarisome Meets Spitzenkorper: Microscopy, genetics, and genomics converge*, *Eukariotic cell*, 4(2). p. 225–229.

- Hill T. W., Jackson-Hayes L., Wang X. and Hoge B. L. (2015). *A mutation in the converter subdomain of Aspergillus nidulans MyoB blocks constriction of the actomyosin ring in cytokinesis*, Fungal Genetics and Biology 75, 72–83
- Howard R. J. (1981) *Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkorper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution*. Journal of Cell Science 48:89-103
- Hunsley, D. and Gooday, G. W. (1974). *The structure and development of septa in Neurospora crassa*. Protoplasma, 82(1),125–146
- Iwadate Y, Okimura C, Sato K, Nakashima Y, Tsujioka M, Minami K. (2013). *Myosin-II-mediated directional migration of Dictyostelium cells in response to cyclic stretching of substratum*, Biophysics Journal. 104(4): 748-58
- Jedd, G., and Chua, N.-H. (2000). *A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane*. Nature Cell Biology, 2, 226–231.
- Kee Y.S, Ren Y, Dorfman D, Iijima M, Firtel R, Iglesias PA, Robinson DN. (2012). *A mechanosensory system governs myosin II accumulation in dividing cells*, Molecular Biology of the Cell, 23(8)1510-23
- Kuhn J (2001) *Multitracker plugin. ImageJ web site*. Available: <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/multitracker.html>.
- Korobova F., Gauvin T.J. and Higgs H.N. (2014). *A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission*, Curr Biol. 24(4): 409–414
- Lodish H., Berk A, Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A, Scott M. P. (2012). *Molecular cell biology*, 7th edition, p 973.
- Lord M (2010) *Cytokinesis mechanisms in yeast*. Nature Education 3: 53
- Maiar R., Pepper M. I. L., Gerba C. P., Gentry T.J. (2009), *Environmental microbiology*, Second edition, Elsevier.
- Maravillas-Montero J., Santos-Argumedo L. (2012). *The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells*, Journal of Leukocyte Biology, 91(1), 35-46.
- Momany, M., Richardson, E. A., Van Sickle, C., and Jedd, G. (2002). *Mapping Woronin body position in Aspergillus nidulans*. Mycologia, 94(2): 260–266
- Moseley JB, Goode BL. (2006). *The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism*, Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70(3): 605-45.
- Mouriño-Pérez, R.R, Riquelme M. (2013). *Recent advances in septum biogenesis in Neurospora crassa*. Advances in Genetics. 83: 99-134
- Mouriño-Pérez, R.R. (2013). *Septum development in filamentous ascomycetes*. Fungal Biology Reviews, 27(1): 1–9

- Mishra M., Huang J., Balasubramanian M. K. and Mostowy. (2014), *The yeast actin cytoskeleton*, FEMS Microbiology Reviews 38 213–227
- Mulvihill D.P, Hyams J.S. (2003). *Myosin-cell wall interactions during cytokinesis in fission yeast: a framework for understanding plant cytokinesis?* Cell Biology International. (3): 239-40.
- Pruyne D, Legesse-Miller A, Gao L, Dong Y, Bretscher A. (2004) *Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast.*, Annual Review of Cell Developmental Biology. 20,559-91
- Raju N. B., Leslie J.F. (1992). *Cytology of recessive sexual-phase mutants from wild strains of Neurospora crassa*, Genome. 35(5): 815-26.
- Raju N. B. (2009). *Neurospora as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford*. Stanford university, Journal of Biosciences. (1):139-59
- Rasmussen C.G. and Glass N. L. (2005). *A Rho-Type GTPase, rho-4, Is Required for Septation in Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell, 4(11): 1913–1925
- Reggiani C. and Botinelli R. (2008), *Non muscular myosin II, Proteins and cell regulation* volume 7, Springer, pag 125-171
- Riquelme M., Sanchez-Leon E. (2014). *The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis*, Current Opinion in Microbiology, 20:27–33
- Roca, M. G., Arlt, J., Jeffree, C. E., Read, N. D. (2005). *Cell Biology of Conidial Anastomosis Tubes in Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell, 4(5): 911–919.
- Sekiya-Kawasaki, M., Groen, A. C., Cope, M. J. T. V., Kaksonen, M., Watson, H. A., Zhang, C., Drubin, D. G. (2003). *Dynamic phosphoregulation of the cortical actin cytoskeleton and endocytic machinery revealed by real-time chemical genetic analysis*. The Journal of Cell Biology, 162(5), 765–772.
- Shear and Dodge B.O. (1927). *Esä Bread-mold Fungi qf Monilia siiop Mla Group* Journal of Agricultural. Research., Washington 34: 1025
- Sirotkin V., Berro J., Macmillan K., Zhao L. and Pollard T.D. (2010). *Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast*. Molecular Biology of the Cell 21: 2894–2904
- Song, B. Li, H.-P., Zhang J.. and Wang J. (2013), *Type II myosin gene in fusarium gramineum is required for septation, development, mycotoxin biosynthesis and pathogenicity*, Fungal genetics and biology;54:60-70.
- Steinberg G., Schliwa M. (1993). *Organelle movements in the wild type and wall-less fz;sg;os-1 mutants of Neurospora crassa are mediated by cytoplasmic microtubules*, Journal of Cell Science.106:555-64.
- Taheri-Talesh N., Xiongyi , Oakley B. R. (2012). *The functions of myosin II and myosin V*

homologs in tip growth and septation in Aspergillus nidulans, plos one, volume 7 , e31218.

Takayuki K., Tsuyoshi K. and Akio N. (2013). *Nonmuscle myosin II folds into a 10S form via two portions of tail for dynamic subcellular localization*, Genes to Cells 18, 90–109.

Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J. I., McClain, C., Bowman, E. J. (2000). *Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores*. Fungal Genetics and Biology, 31(3), 205–217

Thomson D. D., Wehmeier S., Byfield F. J., Janmey P. A., Caballero-Lima D., Crossley A. and Brand A. C (2015). *Contact-induced apical asymmetry drives the thigmotropic responses of Candida albicans hyphae*, Cellular Microbiology 17(3), 342–354

Vicente-Manzanares M., Ma, X. and Aldestein R. S. (2009). *Non muscle myosin II takes center stage in cell adhesion and migration*, Nature Reviews in molecular cell biology, 778-790.

Virag A., Harris S. D. (2005). *The Spitzenkörper: a molecular perspective*, Elsevier, Mycological Research; 110:4-13.

Westergard, M., and H.K. Mitchell. (1947). *Neurospora. V. A syntetic medium favoring sexual reproduction*. American Journal of. Botany 34:573-577

Wloka C and Bi E (2012) *Mechanisms of cytokinesis in budding yeast*. Cytoskeleton (Hoboken) 69: 710–726