

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

**Localización y dinámica de la proteína MZT-1 durante el
crecimiento y el desarrollo del hongo filamentoso *Neurospora
crassa***

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

Presenta:

Tonancy Carolina Rodríguez Vega

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Tonancy Carolina Rodríguez Vega

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Dr. Jonás de Dios de Basabe Delgado



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Tonancy Carolina Rodríguez Vega** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Localización y dinámica de la proteína MZT-1 durante el crecimiento y el desarrollo del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director de tesis

Los microtúbulos son polímeros citoesqueléticos compuestos por heterodímeros de α y β -tubulina. El citoesqueleto microtubular interviene en diversos procesos celulares, que incluyen la polaridad celular, el posicionamiento de organelos y la segregación cromosómica. El evento clave para el ensamblaje de los microtúbulos es una nucleación inicial a partir de organelos especializados llamados centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). En células animales, el MTOC principal es el centrosoma; su equivalente funcional en hongos es el cuerpo polar del huso (SPB). Ambos organelos se encuentran asociados a los núcleos. Adicionalmente, se han identificado MTOCs independientes del núcleo en diversos organismos. La característica en común de todos los MTOCs es su capacidad para reclutar al complejo de la γ -Tubulina; que actúa como sitio de nucleación para la polimerización de los microtúbulos. En el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, hay evidencia que sugiere la presencia de MTOCs independientes del núcleo en los septos y en el ápice de las hifas. Para validar lo anterior, se trabajó con MZT-1; una proteína altamente conservada en eucariotas, cuyos ortólogos se han visto localizados tanto en los MTOCs asociados a los núcleos como en los independientes en donde juega un papel importante en la activación del complejo de la γ -Tubulina. En este trabajo, mediante la fusión de la proteína fluorescente GFP o mChFP en el carboxilo-terminal de MZT-1, se determinó la localización subcelular de MZT-1, y su relación con los microtúbulos y las proteínas de los MTOCs. El análisis mediante microscopía confocal reveló que MZT-1 se observa como puntos fluorescentes asociados a los núcleos, durante todos los estadios del desarrollo de *N. crassa*, encontrándose ausente en los septos y el ápice de las hifas. MZT-1 co-localiza con la γ -Tubulina en los SPBs. Nuestros resultados sugieren que MZT-1 reside únicamente en la placa interna del SPB. Además, MZT-1 interactúa con los microtúbulos citoplasmáticos en interfase y con los microtúbulos del huso mitótico. Adicionalmente, se analizó el efecto de la eliminación de *mzt-1* en la morfogénesis celular, donde los resultados demostraron que la cepa que carece de este gen tiene defectos en la tasa de crecimiento, la producción de biomasa y la reproducción sexual, entre otros. Con base en las observaciones se puede decir que MZT-1 se encuentra asociada a los SPBs y está involucrada en los procesos de mitosis.

Palabras clave: MTOCs, SPBs, complejo de γ -Tubulina, *Neurospora crassa*, MZT-1

Abstract of the thesis presented by **Tonancy Carolina Rodríguez Vega** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Molecular and Cellular Microbiology

Location and dynamics of the MZT-1 protein during growth and development of the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Ph. D. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Thesis Director

Microtubules are cytoskeletal polymers composed of α and β tubulin heterodimers. The microtubule cytoskeleton is involved in a variety of cellular processes, including cell polarity, organelle positioning, and chromosome segregation. The key event for microtubule assembly is an initial nucleation from specialized organelles called microtubule-organizing centers (MTOCs). In animal cells, the main MTOC is the centrosome; its functional equivalent in fungi is the spindle pole body (SPB). Both organelles are associated with nuclei. Additionally, non-centrosomal MTOCs have been identified in various organisms. The common feature of all MTOCs is their ability to recruit the γ -Tubulin complex, which acts as a template for the polymerization of microtubules. In the filamentous fungus *Neurospora crassa*, there is evidence that suggests the presence of non-centrosomal MTOCs at septa and at the apex of hyphae. To validate this, we worked with MZT-1 a highly conserved protein in eukaryotes, whose orthologues have been localized to both non-centrosomal MTOCs and MTOCs associated with nuclei, where it plays an important role in the activation of the γ -Tubulin complex. In this work, we fused the fluorescent protein GFP or mChFP at the carboxyl-terminus of MZT-1, and the subcellular location of MZT-1, and its relationship with microtubules and MTOC proteins, was determined. Analysis by confocal microscopy revealed that MZT-1 is observed as fluorescent spots associated with nuclei, during all stages of *N. crassa* development, being absent at septa and at apex of hyphae. MZT-1 co-localizes with γ -Tubulin in SPBs. Our results also suggest that MZT-1 resides solely on the inner plate of the SPB. In addition, MZT-1 interacts with cytoplasmic microtubules during interphase and with the mitotic spindle. Additionally, the effect of *mzt-1* elimination on cell morphogenesis was analyzed, where the results showed that the strain lacking this gene has defects in growth rate, biomass production and sexual reproduction, among others. Based on the observations, it can be said that MZT-1 is associated with SPBs and is involved in mitosis processes.

Keywords: MTOCs, SPBs, γ -Tubulin complex, *Neurospora crassa*, MZT-1

Dedicatoria

A mis padres por su amor y apoyo incondicional

A mis hermanos mis cómplices en esta vida

Al universo por ser tan bueno conmigo

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (**CICESE**) y al **Departamento de Microbiología** por proporcionarme el conocimiento y el equipo necesario para el desarrollo de este trabajo.

A mi directora de tesis, la **Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez**, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de laboratorio. Por nunca perder la “chispa” que la caracteriza (incluso en las adversidades), por ayudarme a confiar más en el universo y por siempre creer en mí.

A mi comité de tesis la **Dra. Olga Alicia Callejas Negrete** y al **Dr. Jonás de Dios de Basabe Delgado** por sus consejos, sugerencias, por todo el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo y por todas sus aportaciones en el desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Diego Delgado** por su apoyo en la microscopía, por hacerme ver “más allá” en los experimentos. Por todas las pláticas de microscopio y por enseñarme a usar Photoshop.

Un segundo agradecimiento a la **Dra. Olga Alicia Callejas Negrete** por guiarme en todos los experimentos, por siempre estar dispuesta a resolver cualquier duda de laboratorio y por ese apoyo extra en mis presentaciones.

A todos los integrantes del “**Mouriño’s Lab**”, especialmente a los “**MTOCs**” y a mis compañeras de laboratorio y amigas **Rosita, Rocío y Marisela**.

A todos **mis compañeros de generación**, a quienes admiro y aprecio mucho. Me siento afortunada de haber pertenecido a una generación tan unida y empática.

A todas las hermanas que hice durante estos años, especialmente a **Jimena, Monse, Celeste, Saraf y Génesis**, y a mi hermana gemela, compañera de laboratorio, cómplice de aventuras: **Molly**. Las admiro por ser tan inteligentes, fuertes y rebeldes.

A mis mejores amigas **Adriana, Lesly, Rossana y Xóchitl**, por su amistad, apoyo y amor incondicional. Siempre las llevo en el corazón.

A **Juan Corral** por todo el cariño y el apoyo en los momentos difíciles, y a su familia por siempre “sacarme” una sonrisa.

A mis **padres** Ignacio y Carolina, por amarme y apoyarme incondicionalmente, por siempre creer en mí, y por ser mi inspiración. A mis hermanos **Alfredo, Ignacio y Jessica** por su amistad y amor incondicional. Los amo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 <i>Neurospora crassa</i>	2
1.1.2 Microtúbulos.....	4
1.1.3 Estructura y composición del SPB.....	5
1.1.4 Duplicación del SPB.....	9
1.1.5 MTOCs alternos.....	10
1.1.6 Complejos de γ -Tubulina.....	10
1.1.7 Ortólogos de MOZART1 en hongos.....	12
1.1.8 Reclutamiento del complejo de la γ -Tubulina a los MTOCs en hongos.....	13
1.2 Justificación.....	13
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Organismos y medios de cultivo.....	15
2.2 Plásmidos y oligonucleótidos	16
2.3 Análisis bioinformático.....	17
2.4 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	17
2.5 Construcción de cepas de <i>N. crassa</i>	17
2.5.1 Construcción de la cepa MZT-1-GFP.....	17
2.5.2 Construcción de la cepa MZT-1-mChFP.....	19

2.5.3 Construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	20
2.6 Purificación de los productos de PCR	21
2.7 Transformación de conidios de <i>N. crassa</i>	22
2.8 Cruzas sexuales de <i>N. crassa</i>	22
2.9 Activación y aislamiento de ascosporas.....	23
2.10 Obtención de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión.....	23
2.11 Fusiones vegetativas.....	24
2.12 Microscopia Confocal.....	24
2.12.1 Tinción con FM4-64.....	25
2.13 Microscopía estereoscópica.....	25
2.14 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	26
2.14.1 Morfología colonial.....	26
2.14.2 Tasa de crecimiento.....	26
2.14.3 Tasa de ramificación.....	26
2.14.4 Tasa de conidiación.....	27
2.14.5 Producción de biomasa.....	27
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Análisis bioinformático	28
3.2 Construcción del plásmido pMF272+ <i>mzt-1</i> (pRM99-TR-01).....	28
3.3 Construcción de los cassettes para el marcaje de MZT-1 con mChFP.....	29
3.4 Localización de MZT-1 en los diferentes estadios del desarrollo de <i>N. crassa</i>	30
3.5 Asociación de MZT-1 con los núcleos.....	32
3.6 Interacción de MZT-1 con el citoesqueleto microtubular.....	35
3.7 Asociación de MZT-1 con la γ -Tubulina.....	36
3.8 Localización de MZT-1 en el SPB.....	37
3.9 Análisis de la asociación de MZT-1 con los septos de <i>N. crassa</i>	38
3.10 Construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	39
3.10.1 Obtención de los cassettes para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	39
3.10.2 Corroboración de la sustitución de <i>mzt-1</i> por el gen <i>hph</i>	40
3.11 Fenotipo de <i>N. crassa</i> en ausencia de MZT-1.....	41
3.11.1 Morfología colonial.....	41
3.11.2 Tasa de crecimiento y producción de biomasa.....	42
3.11.3 Tasa de ramificación y conidiación.....	43

Capítulo 4 . Discusión	
4.1 Localización y dinámica de MZT-1.....	44
4.2 Efecto de la ausencia de MZT-1.....	46
Capítulo 5 . Conclusiones	47
Literatura citada.....	48
Anexos.....	56

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>N. crassa</i>	4
2	Estructura y composición de los microtúbulos.....	5
3	Estructura y composición del SPB.....	7
4	Duplicación del SPB.....	9
5	Complejos de γ -Tubulina.....	11
6	Diagrama del plásmido pMF272.....	18
7	Estrategia para la construcción de la cepa MZT-1-mChFP.....	19
8	Estrategia para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	21
9	Método del bloque de agar invertido.....	25
10	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MZT-1 y sus ortólogos en otras especies	28
11	Comprobación del constructo pMF272+mzt-1 (pRM99-TR-01).....	29
12	Obtención de cassettes para la construcción de la cepa MZT-1-mChFP.....	30
13	Localización de MZT-1-GFP en conidios y germínulas de <i>N. crassa</i>	31
14	Localización de MZT-1-GFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	32
15	Asociación de MZT-1-GFP con los núcleos en germínulas de <i>N. crassa</i>	33
16	Asociación de MZT-1-GFP con los núcleos en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	34
17	Localización de MZT-1-GFP en núcleos en mitosis.....	34
18	Interacción de MZT-1-GFP con el citoesqueleto microtubular en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	35
19	Interacción de MZT-1-mChFP con los MTs en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	36
20	Co-localización de MZT-1-mChFP con la γ -Tubulina en los SPBs.....	37
21	Análisis de co-localización de MZT-1 con las proteínas GRB y APS-2.....	38
22	Reconstrucción en 3D de un septo de la cepa heterocarión MZT-1-GFP+ dRFP-APS-2 teñida con blanco de calcoflúor.....	39

23	Cassettes obtenidos por PCR de doble unión para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$	40
24	Corroboración por PCR de la sustitución de $mzt-1$	41
25	Morfología colonial de las cepas WT y $\Delta mzt-1$ después de 16 horas de crecimiento.	42
26	Tasa de crecimiento y producción de biomasa de las cepas WT y $\Delta mzt-1$	43
27	Tasa de ramificación y conidiación de las cepas WT y $\Delta mzt-1$	43
28	Peritecios falsos.....	56

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Lista de proteínas que componen el SPB en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i>	8
2	Componentes del complejo de la γ -Tubulina en diferentes especies.....	12
3	Organismos utilizados en este estudio.....	15
4	Plásmidos utilizados en este estudio.....	16
5	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	16
6	Cepas fusionadas para la construcción de heterocariones.....	24

Capítulo 1. Introducción

Los hongos filamentosos son organismos constituidos por células tubulares conocidas como hifas, éstas pueden ser septadas o aseptadas y suelen ser multinucleadas. Las hifas se extienden por crecimiento apical; mediante el transporte polarizado de vesículas secretoras hacia el Spitzenkörper (Spk), y su posterior distribución a los sitios específicos de crecimiento, donde se fusionan para la deposición de material de membrana plasmática y de enzimas para la síntesis de pared celular (Bartnicki-García et al. 1989; Bartnicki-García, 2002; Riquelme et al. 2018). El citoesqueleto juega un papel fundamental en el crecimiento y la morfogénesis de las hifas (Bartnicki-García, 2002). Los componentes principales del citoesqueleto son los microtúbulos (MTs) y los microfilamentos de actina. Se ha propuesto que los microfilamentos de actina están involucrados en la organización de las vesículas dentro del Spk, y de su transporte a corta distancia a la membrana plasmática. En cuanto a los MTs, se cree que estos son responsables del transporte a larga distancia de vesículas secretoras; del Golgi al Spk (Howard y Aist, 1977; Howard y Aist, 1980; McKerracher y Heath, 1987; Harris et al. 2005).

El citoesqueleto microtubular además de participar en el transporte intracelular y en la polaridad celular también desempeña un papel importante en el posicionamiento de los diversos organelos y la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (Gelfand y Bershadsky, 1991). El evento clave para el ensamblaje de los MTs es una nucleación inicial, a partir de organelos especializados llamados Centros Organizadores de Microtúbulos (MTOCs, del inglés Microtubule Organizing Centres) (Alberts et al. 2014). En células animales, el principal MTOC es el centrosoma; el equivalente funcional al centrosoma en hongos es el cuerpo polar del huso (SPB, por sus siglas en inglés Spindle Pole Body). Ambos organelos se encuentran asociados a los núcleos (Alberts et al. 2014; Jaspersen y Winey, 2004). Adicionalmente a los MTOCs asociados a los núcleos, se han identificado MTOCs independientes del núcleo en diversos organismos. En plantas, los MTs son nucleados a partir de la envoltura nuclear, la corteza celular y de MTs preexistentes (Schmit, 2002; Murata et al. 2005; Ehrhardt y Shaw, 2006; Lüders y Stearns, 2007). En animales, se ha reportado polimerización de MTs a partir del aparato de Golgi, de la envoltura nuclear, de mitocondrias y de MTs preexistentes (Tassin et al. 1985; Bugnard et al. 2005; Efimov et al. 2007; Noguchi et al. 2011; Oddoux et al. 2013; Zhu et al. 2015; Sánchez-Huertas et al. 2016; Chen et al. 2017).

En hongos, algunos ejemplos de MTOCs alternos son los MTOCs de interfase (iMTOCs) y el MTOC ecuatorial (eMTOC) de *Schizosaccharomyces pombe*, el MTOC apical (aMTOC) de *Allomyces macrogynus* (McDaniel y Roberson, 1998), y los MTOCs asociados a los septos (sMTOCs) de *Aspergillus nidulans* (Zekert

et al. 2010; Zhang et al. 2017). La característica en común de todos los MTOCs es su capacidad para reclutar al complejo de la γ -Tubulina; que actúa como un sitio de nucleación para los MTs, permitiendo su polimerización a partir de estos (Teixidó-Travesa et al. 2012).

En el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se ha observado polimerización de MTs a partir del ápice de ramas laterales emergentes, lo que sugiere la presencia de MTOCs en el ápice de las hifas (Mouriño-Pérez et al. 2006). Además, la proteína de seguimiento del extremo positivo de los MTs (+ TIP) MTB-3 etiquetada con GFP se encontró en el ápice de las hifas, moviéndose de manera retrógrada (Mouriño-Pérez et al. 2013). Adicionalmente, la proteína APS-2; componente de la placa externa del SPB, se encontró localizada en los septos, sugiriendo que estos últimos actúan como MTOCs (Datos no publicados). Sin embargo, cuando se etiquetó a la γ -Tubulina; principal componente funcional de los MTOCs, ésta solo se observó en los SPBs (Ramírez-Cota, 2008). Por lo tanto, queda por establecer la presencia de MTOCs en la punta de la hifa y en los septos de este hongo.

El objetivo de este trabajo fue validar la existencia de MTOCs independientes del núcleo en *N. crassa*. Para ello, se trabajó con MZT-1; una proteína altamente conservada en células eucariotas, cuyos ortólogos en otros hongos se han visto asociados tanto a los SPBs como a los MTOCs citoplasmáticos, incluyendo los asociados a los septos en *Aspergillus nidulans* (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013; Lin et al. 2016; Gao et al. 2019).

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Neurospora crassa*

N. crassa es una de las muchas especies de hongos filamentosos que pertenecen al phylum Ascomycota. Este hongo, ha sido un organismo importante en el estudio de la biología de las células eucariotas, en temas que incluyen el ritmo circadiano, el citoesqueleto, el crecimiento polarizado, y la reparación y recombinación del DNA (Davis, 2000; Davis y Perkins, 2002; Mouriño-Pérez et al, 2006; Baker et al. 2012). Algunas de las características que han posicionado a *N. crassa* como organismo modelo son sus requerimientos mínimos para sobrevivir, su crecimiento relativamente rápido (aprox. 3mm/ h), ciclo de vida corto, genética haploide y fácil transformación con DNA exógeno (Davis, 2000; Davis y Perkins, 2002).

El ciclo asexual de *N. crassa* inicia con la germinación de una espora, ya sea sexual (ascospora) o asexual (macroconidio/microconidio), dando lugar a una hifa multinucleada; la cual continúa creciendo mediante extensión apical y se ramifica regularmente formando una red compleja de hifas conocida como micelio (Hickey et al. 2002). Las esporas germinan en condiciones adecuadas para el crecimiento (Davis, 2000). Tras el agotamiento de nutrientes se forman hifas aéreas, las cuales se ramifican y por gemación y segmentación producen macroconidios, que contienen uno o varios núcleos haploides (Springer y Yanofsky, 1989; Davis, 2000). Adicionalmente a los macroconidios, *N. crassa* produce microconidios (predominantemente uninucleados) que se diferencian a partir de microconidióforos o directamente de hifas vegetativas (Borkovich et al. 2004). El ciclo sexual requiere que las cepas parentales sean de diferente tipo de apareamiento, conocidos como mat a y mat A. En condiciones de limitación de nitrógeno y carbón, se induce un tipo de agregación hifal que conduce a la generación de órganos sexuales femeninos conocidos como protoperitecios (Davis, 2000; Borkovich et al. 2004) (**Figura 1**). A partir del protoperitecio emerge una hifa especializada llamada tricógina, la cual responde a una feromona emitida por una célula del tipo de apareamiento opuesto (generalmente un conidio), luego ambos entran contacto y ocurre fusión celular. Tras la fusión, un núcleo del conidio viaja a través de la tricógina hasta la célula ascogonial (**Figura 1**). En el peritecio, los núcleos de las células de ambos tipos de apareamiento se dividen varias veces (Davis, 2000). Los productos de estas divisiones migran a numerosas hifas ascógenas, las cuales se doblan para formar un gancho (Crozier) en su punta; en donde, los núcleos del tipo de apareamiento opuesto se emparejan y experimentan divisiones simultáneas. La fusión de los núcleos haploides completa el proceso de fertilización, produciendo la única etapa diploide del ciclo de vida. El núcleo diploide se somete inmediatamente a dos divisiones meióticas y una división mitótica, dando lugar a un asca que contiene ocho ascosporas. Las ascosporas son expulsadas del peritecio y una vez maduras, pueden germinar tras la activación por calor, completando el ciclo celular (Davis, 2000).

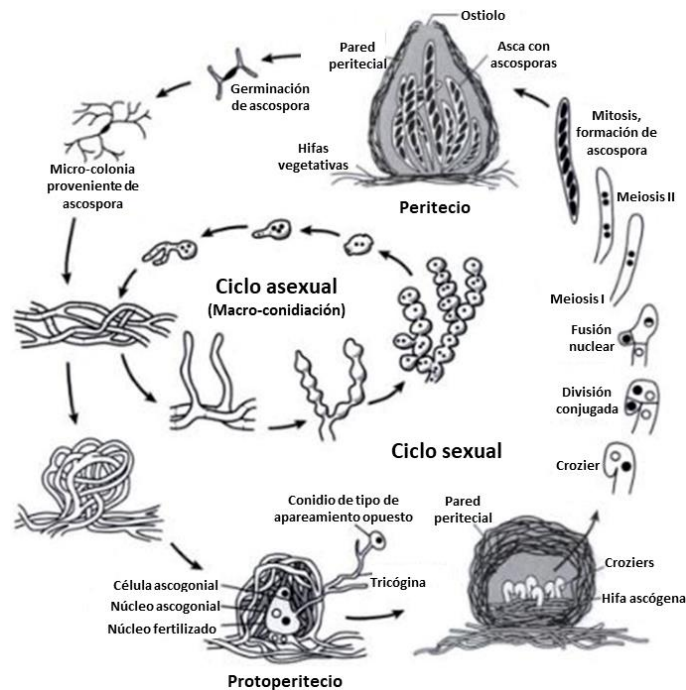


Figura 1. Ciclo de vida de *N. crassa*. El ciclo asexual inicia con la germinación de una espora (microconidio, macroconidio o ascospora), la cual da lugar a un nuevo micelio. En este esquema se muestra la formación de macroconidios a partir de hifas aéreas. El ciclo sexual, consiste en la formación de un protoperitecio, su fertilización por un conidio de tipo de apareamiento opuesto, y eventos posteriores que culminan en la formación de ascas que contienen ascoporas. A la derecha, se muestra el evento de fusión nuclear y las meiosis en un asca individual a medida que se desarrolla (Imagen adaptada Davis, 2000).

1.1.2 Microtúbulos

Los MTs son polímeros citoesqueléticos compuestos por heterodímeros de α y β -tubulina. Estas proteínas globulares se ensamblan alternadamente para formar un protofilamento lineal, y 13 protofilamentos, a su vez se asocian lateralmente para dar lugar a un microtúbulo cilíndrico, hueco, de aproximadamente 24 nm de diámetro (**Figura 2**) (Alberts et al. 2014). La orientación longitudinal y las distintas propiedades biofísicas de la α y β -tubulina dan lugar a una polaridad intrínseca de los MTs, con la proteína α -tubulina orientada hacia la terminal negativa y la β -tubulina orientada hacia la terminal positiva (Desai y Mitchison, 1997; Nogales, 2000). El extremo negativo es relativamente estable, mientras que el extremo positivo es altamente dinámico ya que a partir de este ocurre la polimerización y despolimerización de los MTs (Jiang y Akhmanova, 2011). El evento clave para el ensamblaje de los MTs es una nucleación inicial, a partir de los MTOCs, que se asocian a los MTs a partir del extremo negativo.

En células animales, el MTOC principal es el centrosoma, que se encuentra típicamente asociado al núcleo cuando la célula está en interfase (Alberts et al. 2014). El centrosoma consiste en un par de centriolos rodeados por una matriz de proteínas conocida como material pericentriolar (Conduit et al. 2015; Petry y Vale, 2015). En hongos el equivalente funcional al centrosoma es el SPB.

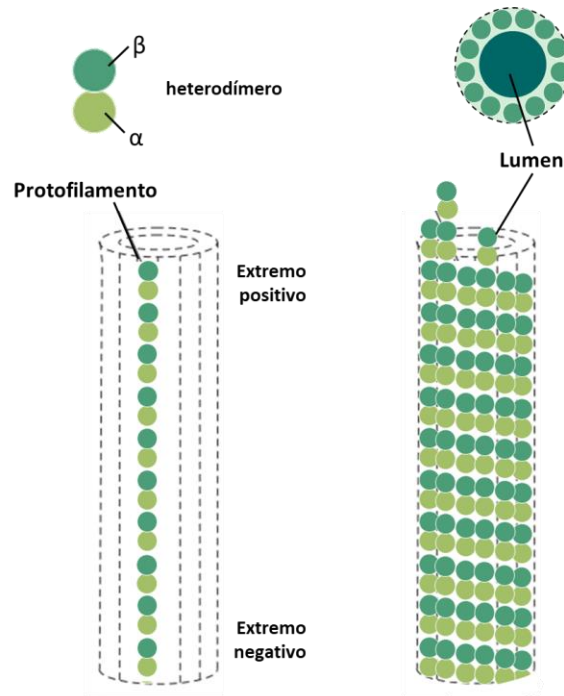


Figura 2. Estructura y composición de los microtúbulos. Los MTs son polímeros citoesqueléticos constituidos por heterodímeros de α y β - tubulina. Estas proteínas globulares se ensamblan alternadamente para formar un protofilamento. Trece protofilamentos se asocian lateralmente para dar lugar a un MT cilíndrico. (Imagen adaptada de Alberts et al. 2014).

1.1.3 Estructura y composición del SPB

Aunque el SPB se ha identificado en hongos filamentosos, su estructura y composición solo ha sido ampliamente descrita en levaduras, principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Jaspersen y Winey, 2004; Bestul et al. 2017). Mediante análisis por microscopía electrónica, en la levadura de gemación, se determinó que el SPB es una estructura cilíndrica que consta de tres placas: una placa externa orientada hacia el citoplasma que se asocia con los MTs citoplasmáticos (cMTs), una placa central que se encuentra extendida en la envoltura nuclear y una placa interna orientada hacia el nucleoplasma que se asocia con los MTs mitóticos (nMTs). Adicionalmente, el SPB consta de dos capas

intermedias (IL1 e IL2) que se localizan entre la placa externa y la placa central (**Figura 3**) (Robinow y Marak, 1966; Moens y Rapport, 1971; Byers y Goetsch, 1974, 1975; Bullitt et al. 1997; O'Toole et al. 1999- de la revisión de Jaspersen y Winey, 2004). Un extremo de la placa central se asocia a una estructura denominada puente-medio, en donde se acumulan los elementos para formar el SPB hijo (Byers y Goetsch 1974, 1975; Adams y Kilmartin, 1999).

De acuerdo con Jaspersen y Winey (2004) los componentes del SPB son aquellas proteínas requeridas para mantener la integridad de dicha estructura. Es decir, la mutación de estas proteínas resulta en un defecto dramático en la función y estructura del SPB (**Tabla I**). En *S. cerevisiae*, el núcleo central del SPB está conformado por la proteína coiled-coil Spc42 (Donaldson y Kilmartin, 1996). La región N-terminal de Spc42 se asocia con las proteínas coiled-coil Spc110 y Spc29, las cuales se localizan en la cara nuclear del SPB (Adams y Kilmartin 1999; Elliott et al. 1999). Hay evidencia que sugiere que la región C-terminal de Spc110, que se localiza en la placa central, se une a Spc29 y a la calmodulina (Cmd1) a través de sitios de unión únicos, pero parcialmente superpuestos (Stirling et al. 1994; Sundberg et al. 1996; Spang et al. 1996; Kilmartin y Goh 1996; Elliot et al. 1999). La longitud de los dominios coiled-coil de Spc110 determina la distancia entre la placa central y la placa interna (Kilmartin et al. 1993; O'Toole et al. 1999). La región N-terminal de Spc110 se localiza en la placa interna e interactúa directamente con Spc98, una de las dos proteínas de unión a la γ -Tubulina requerida para la nucleación de los MTs (Kilmartin y Goh 1996; Knop y Schiebel 1997; Sundberg y Davis 1997; Nguyen et al. 1998; Vinh et al. 2002). La región C-terminal de Spc42 se encuentra orientada hacia el citoplasma y se une a la región C-terminal de Cnm67 (Adams y Kilmartin 1999). Similar a Spc110, una región coiled-coil de Cnm67 facilita su dimerización y funciona como espaciador entre las capas IL2 e IL1 (Schaerer et al. 2001). La región N-terminal de Cnm67 se une a la proteína de la placa externa Nud1 (Adams y Kilmartin 1999). La región C-terminal de Nud1 se une a la región C-terminal de la proteína coiled-coil Spc72, mientras que la región N-terminal de Spc72 se une a los componentes del complejo de la γ -Tubulina y a la proteína asociada a los MTs Stud2 (Knop y Schiebel 1998; Gruneberg et al. 2000; Usui et al. 2003).

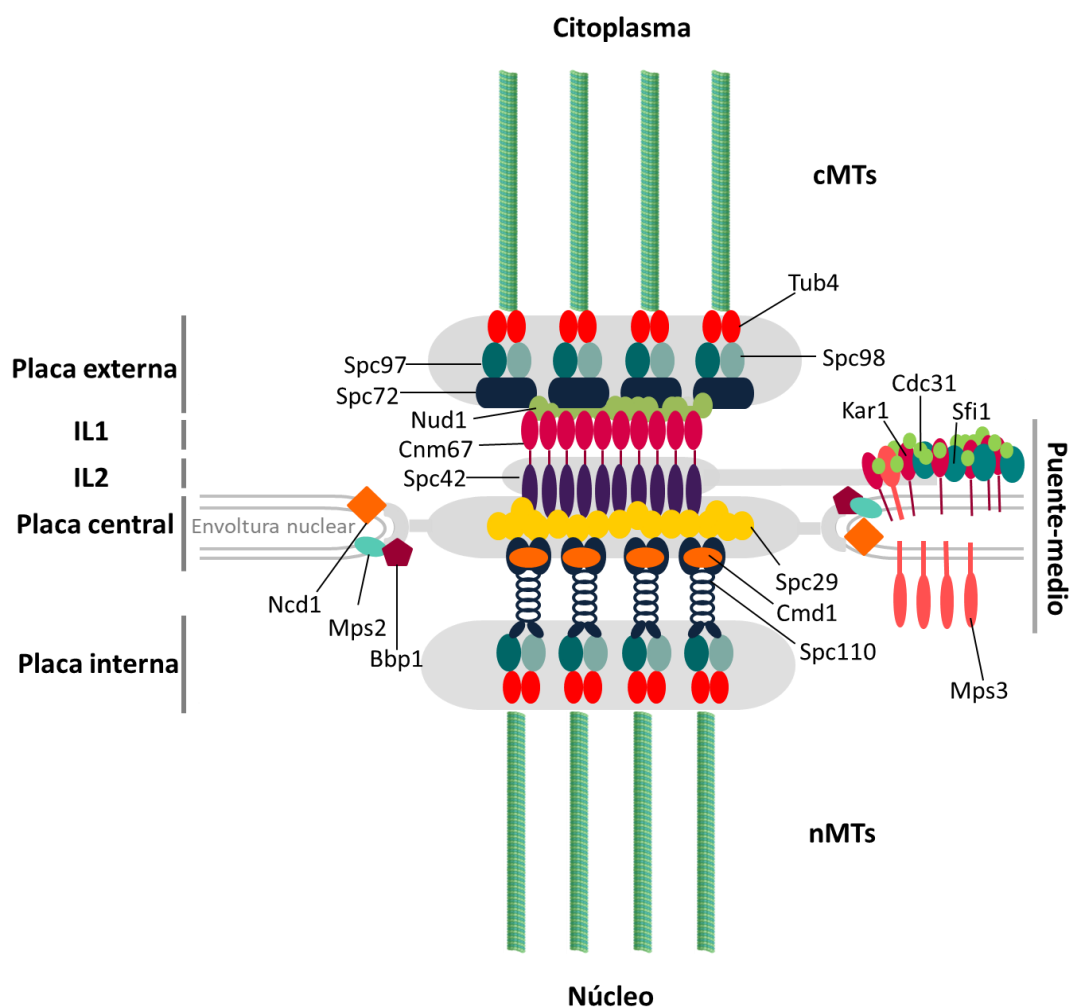


Figura 3. Estructura y composición del SPB. El SPB consta de una placa externa que se encuentra en contacto con el citoplasma y los cMTs, una placa central embebida en la envoltura nuclear, y una placa interna en contacto con el nucleoplasma y los nMTs. La placa central se asocia con las proteínas Mps2, Ndc1 y Bbp1. Las capas IL1 e IL2 se encuentran entre las placas central y externa. El puente medio conformado por varias proteínas es el sitio de ensamblaje del SPB hijo (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004).

Las proteínas que componen al SPB carecen de dominios transmembranales, por lo tanto, la inserción del SPB a la envoltura nuclear depende de las proteínas Mps2, Ndc1 y Bbp1. Mps2 y Ndc1 son proteínas integrales de membrana que se localizan en los extremos del SPB, en la unión entre la placa central y la envoltura nuclear (Winey et al. 1993; Chial et al. 1998; Muñoz-Centeno et al. 1999). La delección de los genes que codifican para dichas proteínas impide la inserción del SPB recién duplicado en la membrana nuclear (Winey et al. 1991; 1993). Bbp1, aunque no es una proteína de membrana en sí, se une a Mps2, a la proteína de la placa central Spc29 y a la proteína del puente-medio Kar1, proporcionando así un modelo de como el SPB está embebido en la envoltura nuclear y unido al puente-medio (Schramm et al. 2000).

El ensamblaje del SPB hijo, también llamado satélite, ocurre exclusivamente en la cara citoplasmática del puente-medio (Byers y Goetsch, 1975). Las proteínas transmembranales Kar1 y Mps3 se localizan en el puente-medio y son requeridas para el mantenimiento de este (Rose y Fink 1987; Vallen et al. 1992; Spang et al. 1995; Jaspersen et al. 2002). Ambas proteínas se unen a la proteína Cdc31, el homólogo de la centrina, la cual a su vez se asocia a la proteína Sfi1; necesaria para la duplicación del SPB (Byers, 1981; Baum et al. 1986; Spang et al. 1993, 1995; Biggins y Rose, 1994; Vallen et al. 1994; Jaspersen et al. 2002; Kilmartin, 2003; Li et al. 2006).

En la **Tabla 1**, se presenta una lista de los componentes del SPB en *S. cerevisiae* y sus homólogos conocidos o predichos en *S. pombe*. La letra X, indica que no se conoce homólogo; y el símbolo *, indica que las proteínas no son homologas en secuencia aminoacídica, pero llevan a cabo una función similar. La principal diferencia en los SPBs de ambas especies es que en *S. cerevisiae* el SPB se encuentra embebido en la envoltura nuclear durante todo el ciclo celular, mientras que en *S. pombe* el SPB solo se incrusta en la envoltura nuclear antes de la mitosis (Ding et al. 1997).

Tabla 1. Lista de proteínas que componen el SPB en *S. cerevisiae* y *S. pombe*

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Tub4	Gtb1/Tug1
Spc97	Alp4
Spc98	Alp6
X	Gfh1
X	Mod21
X	Alp16
X	Mzt1
Spc72	Mto1
X	Mto2
Nud1	Cdc11
Cnm67	Sid4
Spc42	Ppc89*
Spc29	X
Cmd1	Cam1
Spc110	Pcp1
Cdc31	Cdc31
Kar1	X
Sfi1	Sfi1
Mps3	Sad1
Mps2	Kms2*
Ndc1	Cut11
Bbp1	X
X	Cut12

Adaptada de Bestul, Unruh y Jaspersen (2017).

*Proteínas con la misma función, pero secuencia aminoacídica diferente.

X homólogos no conocidos.

1.1.4 Duplicación del SPB

La duplicación del SPB puede dividirse en tres etapas (**Figura 4**). La primera etapa ocurre durante la fase G1 temprana del ciclo celular, consiste en la elongación del puente medio y en la deposición de material para la formación del SPB satélite en la cara citoplasmática del puente medio (Byers y Goetsch, 1974; 1975). La función de las proteínas Cdc31, Kar1, Mps3 y Sfi1 es requerida durante esta primera etapa de la duplicación del SPB (Byers, 1981; Rose y Fink, 1987; Winey et al.1991; Jaspersen et al. 2002; Kilmartin, 2003). En la segunda etapa, el satélite se expande formando una estructura en capas similar a la mitad citoplasmática del SPB maduro (Adams y Kilmartin, 1999; Byers y Goetsch 1974, 1975). Durante esta etapa se ensamblan las proteínas Spc42, Spc29, Cnm67, Nud1 y Spc72 (Brachat et al. 1998; Chen et al. 1998; Soues y Adams, 1998; Adams y Kilmartin, 1999; Elliott et al.1999; Gruneberg et al. 2000). También ocurre la elongación del puente medio y la fusión de su cara citoplasmática y nuclear para formar un puente completo (Adamas y Kilmartin, 1999). La tercera etapa de la duplicación del SPB consiste de la inserción del satélite en la envoltura nuclear y del ensamblaje de la placa interna del SPB (Byers y Goetsch 1974; 1975). La fusión del puente medio y el reclutamiento de proteínas de membrana asociadas al SPB, forman un poro en la envoltura nuclear que permite la inserción del SPB recién duplicado (Jaspersen y Winey, 2004). Finalmente, ocurre la ruptura del puente medio, y la migración del SPB hijo en dirección opuesta al SPB madre. La migración de los SPBs es dependiente de los MTs y las cinesinas Cin8 y Kip1 (Jacobs et al. 1988; Roof et al. 1992).

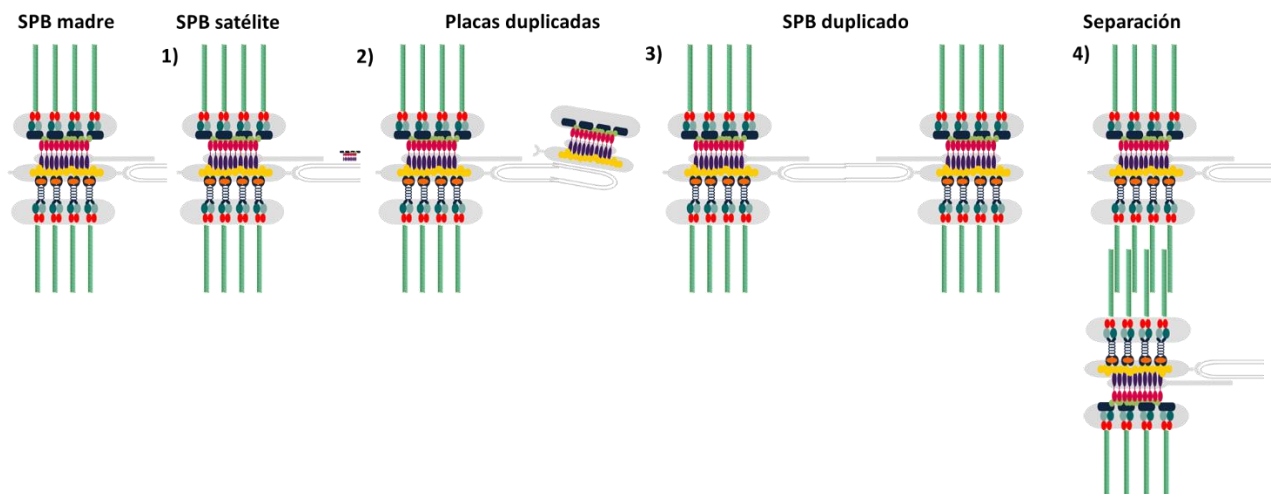


Figura 4. Duplicación del SPB. 1) La duplicación del SPB inicia con la elongación del puente medio y la acumulación de materiales que forman el SPB satélite. **2)** Continúa con la expansión del SPB satélite formando una estructura en capas similar a la mitad citoplasmática del SPB maduro **3)** Posteriormente, ocurre la inserción del SPB a la envoltura nuclear y la formación de la placa interna **4)** seguida por la migración de los SPBs a extremos opuestos del núcleo. (Imagen adaptada de Jaspersen y Winey, 2004).

1.1.5 MTOCs alternos

Adicionalmente a los MTOCs asociados a los núcleos (centrosomas y SPBs), se ha reportado polimerización de MTs a partir de MTOCs alternos o independientes del núcleo. La primera evidencia de polimerización de MTs a partir de estructuras no centrosomales provino de las plantas. Las células vegetales carecen de centrosomas, y en su lugar los MTs son nucleados a partir de la envoltura nuclear, de la corteza celular y de MTs preexistentes (Schmit, 2002; Murata et al. 2005; Ehrhardt y Shaw, 2006; Lüders y Stearns, 2007).

En animales también se ha reportado polimerización de MTs a partir de MTOCs alternos. En ciertos tipos de células de mamíferos, como las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR), y en células diferenciadas; como las células musculares y las células β del páncreas, se ha reportado polimerización de MTs a partir del aparato de Golgi (Efimov et al. 2007; Oddoux et al. 2013; Zhu et al. 2015). En células musculares, adicionalmente al aparato de Golgi, la envoltura nuclear también actúa como MTOC (Tassin et al. 1985; Bugnard et al. 2005). En espermátides de la mosca *Drosophila melanogaster*, las mitocondrias actúan como MTOCs (Noguchi et al. 2011; Chen et al. 2017). Adicionalmente, en células animales, MTs preexistentes también pueden nuclear nuevos MTs, este proceso depende del complejo de augmina (Sánchez-Huertas et al. 2016).

En hongos, algunos ejemplos de MTOCs alternos son los MTOCs de interfase (iMTOCs) y el MTOC ecuatorial (eMTOC) de *S. pombe*, el MTOC apical (aMTOC) de *A. macrogynus* (McDaniel y Roberson, 1998), y los MTOCs asociados a los septos (sMTOCs) de *A. nidulans* (Zekert et al. 2010; Zhang et al. 2017). Durante la interfase, los iMTOCs nuclean MTs a partir de la envoltura nuclear, del citoplasma y de MTs citoplasmáticos preexistentes. En la mitosis, estas estructuras desaparecen y los MTs son nucleados por el SPB. Al final de la división celular, el eMTOC organiza un haz de MTs alrededor del sitio de división celular (Horio et al. 1991; Sawin et al. 2004; Zimmerman y Chang, 2005; Sawin y Tran, 2006).

1.1.6 Complejos de γ -Tubulina

El principal componente funcional de los MTOCs es la γ -Tubulina; una proteína altamente conservada en eucariotas, cuyo descubrimiento surgió a partir de un tamizaje genético en el hongo *A. nidulans*, diseñado para identificar genes importantes en la función de los MTs (Weil et al. 1986; Oakley y Oakley. 1989).

La γ -Tubulina se asocia con las proteínas designadas generalmente como GCPs (Del inglés, γ -Tubulin Complex Proteins) o GRIPs (Del inglés, γ -Tubulin Ring Proteins), para formar el complejo pequeño de la γ -Tubulina (γ -TuSC) (Del inglés, γ Tubulin Small Complex) o el complejo en anillo de la γ -Tubulina (γ -TuRC) (Del inglés, γ -Tubulin Ring Complex) (Oakley et al. 2015) (**Figura 5**). El γ -TuSC está conformado por la γ -Tubulina y las proteínas GCP2 y GCP3 (Kollman et al. 2010; Knop y Schiebel, 1997) (**Figura 5A**), mientras que el γ -TuRC consiste de la γ -Tubulina (GCP1) y de cinco proteínas GCPs (GCP2-GCP6) (De las revisiones- Oakley et al. 2015; Moritz y Agard, 2001) (**Figura 5B**). Ambos complejos actúan como sitios de nucleación para los MTs, permitiendo la polimerización de estos a partir de los MTOCs.

Recientemente, se identificaron las proteínas pequeñas (sin homología con la familia GCP); MOZART1 (Del inglés, Mitotic-spindle organizing protein associated with a ring of γ -Tubulin 1 o GCP9) y MOZART2A/2B (GCP8A/GCP8B), las cuales se describieron como componentes integrales del γ -TuRC en líneas celulares humanas (Hutchins et al. 2010). MOZART1 y MOZART2A/B participan en el reclutamiento del γ -TuRC a los centrosomas en mitosis e interfase, respectivamente (Hutchins et al. 2010; Teixidó-Travesa et al. 2010). MOZART2A/B está presente solo en los deuterostomados, mientras que MOZART1 se encuentra altamente conservada en eucariotas (**Tabla 2**), con excepción de *S. cerevisiae*.

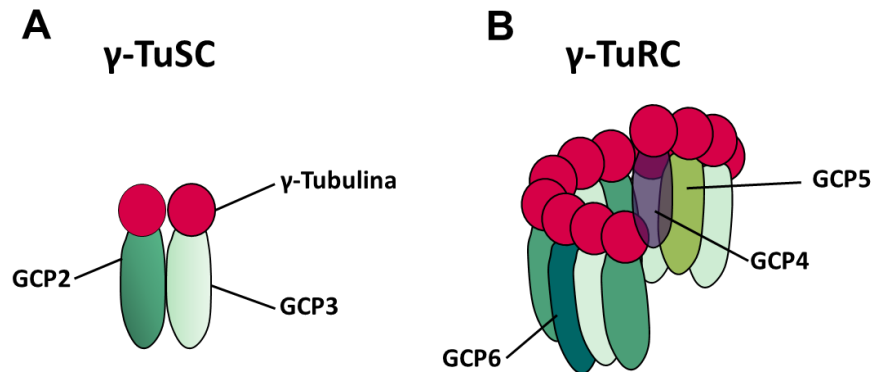


Figura 5. Complejos de γ -Tubulina. (A) El complejo pequeño de la γ -tubulina (γ -TuSC) está conformado por la γ -Tubulina y las proteínas GCP2 y GCP3. La levadura de gemación *S. cerevisiae* solo contiene γ -TuSCs. (B) El complejo en anillo de la γ -Tubulina (γ -TuRC) consiste de la γ -Tubulina (GCP1) y de cinco proteínas GCPs (GCP2-GCP6). Ambos complejos actúan como sitios de nucleación para la polimerización de los MTs a partir de los MTOCs. (Imagen adaptada de Oakley et al. 2015).

Tabla 2. Componentes del complejo de la γ -Tubulina en diferentes especies

<i>H. sapiens</i>	<i>X. laevis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GCP1	TUBG1,2	Y _{Tub} 23C, CD	TUBG1, 2	MIPA	Gtb1/Tug1	Tub4
GCP2	Xgrip110	Dgrip84	GCP2	GCPB	Alp4	Spc97
GCP3	Xgrip109	Dgrip91	GCP3	GCPC	Alp6	Spc98
GCP4	Xgrip75	Dgrip75	GCP4	GCPD	Gfh1	
GCP5	Xgrip133	Dgrip128	GCP5	GCPE	Mod21	
GCP6	Xgrip210	Dgrip163	GCP6	GCPF	Alp16	
MOZART1	MOZART1	MOZART1	GIP1 _{a, b}	MztA	Mzt1	

Adaptada de Oakley et al. 2015.

1.1.7 Ortólogos de MOZART1 en hongos

En hongos, la proteína ortóloga de MOZART1 ha sido identificada y caracterizada en *S. pombe* (Tam4/Mzt1) (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013), *Candida albicans* (CaMzt1) (Lin et al. 2016) y *A. nidulans* (MztA) (Gao et al. 2019). En *S. pombe*, se encontró que Mzt1 es un componente del γ -TuRC y se localiza en los SPBs; en donde juega un papel esencial en la nucleación de los MTs mediante el reclutamiento del complejo de la γ -Tubulina (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013). Adicionalmente, Mzt1 se localiza en los MTOCs de interfase (iMTOCs), y en el MTOC ecuatorial (eMTOC) (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013). En *C. albicans* se demostró que CaMzt1 interactúa con los receptores CaSpc110/CaSpc72, a través del dominio conservado CM1, y juntos promueven y dirigen la oligomerización del γ -TuSC, para convertirlos en anillos competentes para la nucleación de los MTs (Lin et al. 2016). En *A. nidulans* MztA reside solo en la placa interna de los SPBs, por lo tanto, ha perdido su función esencial en el reclutamiento y activación del complejo de la γ -Tubulina en el SPB (Gao et al. 2019). Sin embargo, MztA conserva su función esencial en los MTOCs asociados a los septos (sMTOCs) (Gao et al. 2019). El reclutamiento de MztA a los sMTOCs depende estrictamente de las proteínas ApsB, Spa18 y Spa10 (Gao et al. 2019).

En *S. pombe* y *C. albicans*, la delección de *mzt1/MZT1* causa letalidad celular (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013; Lin et al. 2016). A diferencia de *S. pombe* y *C. albicans*, *mztA* de *A. nidulans* no es esencial, sin embargo, la delección de este gen genera defectos graves en la esporulación (Gao et al. 2019). En la levadura de fisión, mediante la construcción y el análisis de mutantes sensibles a la temperatura de *mzt1*,

se observó una reducción en el número de haces de MTs de interfase en comparación con la WT, incluso cuando las cepas se cultivaron a temperaturas permisivas (Masuda et al. 2013). También se observaron defectos en la formación del huso mitótico y en la segregación cromosómica (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013). En *A. nidulans* y *C. albicans* las proteínas MztA/CaMzt1, también son requeridas para el ensamblaje y la integridad del huso mitótico (Lin et al. 2016; Gao et al. 2019).

1.1.8 Reclutamiento del complejo de la γ -Tubulina a los MTOCs en hongos

En *S. pombe*, Mto1 (ortólogo de Spc72 de *S. cerevisiae*) actúa en conjunto con la proteína Mto2, formando un complejo y promoviendo la asociación del γ -TuRC a la placa externa del SPB y a los MTOCs citoplasmáticos (Sawin et al. 2004; Venkatram et al. 2004; Zimmerman y Chang, 2005; Samejima et al. 2008). En este mismo organismo, el γ -TuRC es reclutado a la placa interna del SPB por la proteína Pcp1 (ortóloga de Spc110 de *S. cerevisiae*) (Flory et al. 2002). En *A. nidulans*, las proteínas ApsB y Spa18 (ortólogas de Mto1 y Mto2, respectivamente) reclutan al γ -TuRC a la placa externa del SPB y a los MTOCs asociados a los septos. La proteína Spa10 no recluta al complejo de la γ -Tubulina, pero se requiere para el reclutamiento de ApsB y Spa18 a los sMTOCs, por lo tanto, Spa10 actúa como plataforma para los sMTOCs (Zhang et al. 2017). El γ -TuRC es reclutado a la placa interna del SPB por la proteína PcpA (ortóloga de Pcp1 de *S. pombe*) (Zhang et al. 2017).

En nuestro laboratorio, se encontró que en *N. crassa* el SPB se encuentra embebido en la envoltura nuclear, con las proteínas PCP-1^{Pcp1/PcpA} y APS-2^{Mto1/ApsB} ubicadas en la placa interna y externa del SPB, respectivamente. Ambas proteínas co-localizan con la γ -Tubulina en los SPBs. Adicionalmente a los SPBs, APS-2 también está presente en el poro septal. Sin embargo, la γ -Tubulina solo se detectó en los núcleos. (Ramírez-Cota, 2008; Ramírez-Cota, 2010).

1.2 Justificación

Hay evidencia que sugiere la existencia de MTOCs independientes del núcleo en la punta de las hifas de *Neurospora crassa*, ya que se ha observado polimerización de MTs a partir de estos sitios. Sin embargo, cuando se realizó el marcaje de la proteína γ -Tubulina, principal componente funcional de los MTOCs, ésta solo se observó en los SPBs. Esto contradice la idea de la existencia de MTOCs alternos en *N. crassa*.

Recientemente, se observó la localización de la APS-2 en los núcleos y en los septos, sugiriendo que estos últimos actúan como MTOCs en *N. crassa*, sin embargo, esto no se ha probado.

En hongos, los ortólogos de MZT-1 se encuentran asociados tanto a los SPBs como a los MTOCs alternos, incluidos los sMTOCs en *A. nidulans*. Por lo tanto, MZT-1 al ser una proteína altamente conservada en células eucariotas, es una fuerte candidata para validar la existencia de MTOCs alternos en *N. crassa*.

1.3 Hipótesis

MZT-1 se localiza en los SPBs y en los MTOCs independientes del núcleo. La delección del gen *mzt-1* no es esencial, pero su ausencia produce alteraciones en el crecimiento y desarrollo de *Neurospora crassa*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar la localización y dinámica de la proteína MZT-1 durante el crecimiento y desarrollo del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la localización y dinámica de MZT-1 en diferentes estadios del desarrollo de *Neurospora crassa*.
2. Identificar la relación espacial y temporal de la proteína MZT-1 con los MTs y las proteínas de los MTOCs.
3. Describir el efecto de la mutación de *mzt-1* en el crecimiento y desarrollo de *Neurospora crassa*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Organismos y medios de cultivo

Los organismos utilizados en este trabajo se enlistan en la **Tabla 3**. Las células de *Escherichia coli* JM109 se cultivaron en medio Luria Bertani (LB). Para la selección de células de *E. coli* transformantes se utilizó medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ mL). Las cepas de *N. crassa* se cultivaron y mantuvieron en Medio Mínimo de Vogel (MMV) con sacarosa (1.5%) y agar (1.5%) a una temperatura de 30°C. Las cepas de *N. crassa* con genotipo *his⁻³ hph⁺* se cultivaron en MMV enriquecido con histidina (500 µg/ µL) e higromicina (300 µg/ µL). Los conidios electroporados se cultivaron en medio FIGS (MMV+ fructosa 0.05%, glucosa 0.05%, sorbosa 2%) a 30°C hasta observar crecimiento de las colonias transformantes. Para la obtención de homocariones las cepas se crecieron en medio sintético de cruzas (SCM) (Westergaard y Mitchel, 1947) con 1% de agar a 25°C en oscuridad, hasta la obtención y maduración de los peritecios. Los microconidios, se obtuvieron utilizando el medio Westergaard preparado con sacarosa (5 mg/ mL), biotina (5 ng/ mL), agar (2 %) y sales de Westergaard 5X al 2% (KNO₃ 5 mg/ mL KH₂PO₄ 5 mg/ mL, MgSO₄ 7H₂O 2.5 mg/ mL, NaCl 0.5 mg/ mL, CaCl₂ 0.5 mg/ mL y elementos traza 0.05%).

Tabla 3. Organismos utilizados en este estudio.

ORGANISMO	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqI^qZΔM15].</i>	Promega®
<i>Neurospora crassa</i>		
Tipo silvestre	<i>mat a</i>	FGSC# 4200
9718	<i>Δmus-51::bar + mat a</i>	FGSC# 9718
9717	<i>Δmus-51::bar +; his3⁺, mat A</i>	FGSC# 9717
NMF138 (dRFP-H1)	<i>drfp:: h1 mat A</i>	Freitag et al. 2005
BML-GFP	<i>Pccg-1-bml::sgfp+his-3⁺, mat A</i>	Freitag et al. 2004
BML-mChFP	<i>Pccg-1-bml::mchfp his-3⁺, mat A</i>	Callejas-Negrete et al. 2015
TRM01-RR01 (γ-Tubulina-GFP)	<i>Pccg-1-tbg::sgfp his-3⁺, mat A</i>	Ramírez-Cota, 2008
TRM61-RR04 (GRB-GFP)	<i>Pccg-1-grb::sgfp his-3⁺, mat A</i>	Ramírez-Cota, 2010
TRM-128-RR10 (dRFP-APS-2)	<i>Pccg-1-drfp::aps-2 his-3⁺, mat A</i>	Ramírez-Cota, 2018
(MZT-1-GFP)	<i>Pccg-1-mzt-1::sgfp his-3⁺, mat A</i>	Este trabajo
(MZT-1-mChFP)	<i>mzt-1::mchfp his-3 hph⁺ mat A</i>	Este trabajo
(Mutante <i>Δmzt-1</i>)	<i>Δmzt-1::hph +; his-3⁺, mat A</i>	Este trabajo

2.2 Plásmidos y oligonucleótidos

En la **Tabla 4** se muestran los plásmidos utilizados en este estudio. Los plásmidos pMF272 y pMF272 + *mzt-1* (pRM99-TR-01) se utilizaron para la construcción de la cepa MZT-1-GFP. Los plásmidos pRR1_0mCherry y pZero_pMF357_pPP43 se utilizaron para la construcción de las cepas MZT-1-mChFP y mutante $\Delta mzt-1$, respectivamente (Para mayor detalle ir a las secciones 2.5.1, 2.5.2 y 2.5.3). Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pMF272	<i>N. crassa his-3, ccg-1</i> , sitio de clonación múltiple (Xba I, Spe I, Bam HI, Xma I y Pac I), <i>sgfp</i> carboxi terminal; amp ^R	Freitag et al. 2004.
pRR1_0mCherry	kan; <i>mChFP</i> ; 10xgly; <i>hph</i> ; loxp	Ramirez-Cota, 2010.
pZero_pMF357_pPP43	kan; <i>gfp</i> ; 10xgly; <i>hph</i> ; loxp	Pathale et al.
pMF272 + <i>mzt-1</i> (pRM99-TR-01)	<i>N. crassa his-3, ccg1</i> , sitio de clonación múltiple (Xba I, Spe I, Bam HI, Xma I y Pac I), <i>mzt-1::sgfp</i> ; amp ^R	Este trabajo

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

OLIGONUCLEÓTIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
MztXbaIF	5'CTCTAGAATGGAGAAGAGCGAAAAACAGG 3'	Este trabajo
MztPacIR	5'CTTAATTAATTTTCGGCGAGCTGCACTGG 3'	Este trabajo
rcdMZT1-fgsc-5F	5'AGGAGAGGAACCAAGTTTAGG 3'	Este trabajo
rcMZT1gly_5'R	5'CTCCGCTCCGCTCCGCCGCTCCGCTTTTCGGCGAGCTGCACTG G 3'	Este trabajo
rc-MZT1_5'F	5'CCAACACCTACCAACAGACCATG 3'	Este trabajo
rcMZT1pJET_3'R	5'AGGAGATCTTCTAGAAAGATGCCAGATCTAACTGCTACTG 3'	Este trabajo
mzt1_FP_F5'	5'GTGCTGGAGGAGAGGAACCAAGTTTAGG 3'	Este trabajo
mzt1_RP_F5'	5'TCCAGCCAAGCCCCAAAAAATGCTCCTTCAAGGTAACGATAGTATG TCCT 3'	Este trabajo
mzt1_NFP_F5'	5'AACCAACACCTACCAACAGACCATG 3'	Este trabajo
mzt1_RP_F3'	5'AGTTGGAGCCAGATCTAACTGCTACTG 3'	Este trabajo
rcMZT1loxp_3'F	5'TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGATGATCGGCGGGGAGA GGGT 3'	Este trabajo
mzt1_NRP_F3'	5'CGCTGAATCCATCTTTTCCACGTCTTC 3'	Este trabajo
rcp0hphF	5'TTGAAGGAGCATTTCCTGGGCTTGCTG 3'	Este trabajo
GlyF	5'GGCGGAGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAG 3'	Michael Freitag
hph SMR	5'TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC 3'	Freitag et al. 2018
hph SMF	5'AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG 3'	Freitag et al. 2018
LoxpR	5' CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA 3'	Michael Freitag

2.3 Análisis bioinformático

La búsqueda de la proteína ortóloga de Mzt1 (P0CF96.3) de *S. pombe* y MztA (XP_658965.1) de *A. nidulans* en *N. crassa* se realizó utilizando el programa blastp (protein-protein BLAST). Una vez identificada la proteína y el gen ortólogo en *N. crassa*, se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos con el programa ApE (A plasmid Editor). Para comparar las secuencias aminoacídicas de los ortólogos de MZT-1 en diferentes especies, se realizó un alineamiento utilizando el programa CLC Genomics Workbench (QIAGEN).

2.4 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*

La extracción de DNA genómico de las cepas de interés se realizó a partir de micelio cultivado en MMV líquido durante 3 días a 30°C. Posteriormente, el micelio se filtró y lavó con agua destilada estéril para su almacenamiento a -80°C por 48 horas. El micelio congelado se colocó en un mortero frío, al cual se le agregó nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo fino. El polvo se procesó con el Mini Kit DNeasy Plant (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.5 Construcción de cepas de *N. crassa*

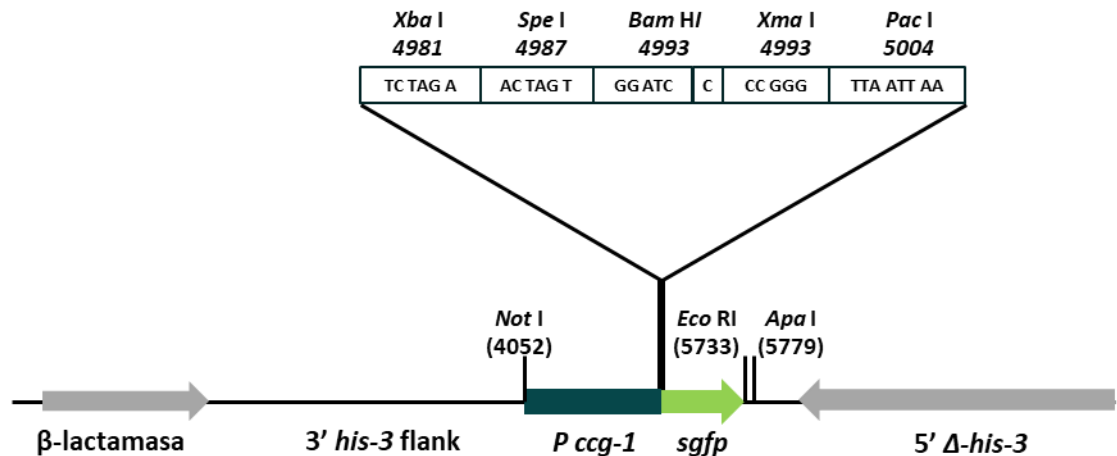
2.5.1 Construcción de la cepa MZT-1-GFP

Para la construcción de la cepa que expresa la proteína MZT-1 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el carboxilo terminal, se utilizó como vector de clonación el plásmido pMF272 (Freitag et al. 2004) (**Figura 6A**). El marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés Open Reading Frame) del gen *mzt-1* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *N. crassa* (FGSC #4200). Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos MztXbaIF y MztPacIR, los cuales incluyen los sitios de restricción de las enzimas *XbaI* y *PacI*, en los extremos 5' y 3', respectivamente. La PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad utilizando la enzima TaKaRa LA Taq® (Takara Bio, USA, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de PCR amplificado y purificado se digirió con las enzimas *XbaI* y *PacI* y se ligó en el plásmido pMF272, previamente digerido con las mismas enzimas (**Figura 6B**). La ligación se llevó a cabo con la

enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con el producto de la ligación, se transformaron células competentes de la cepa JM109 de *E. coli* por choque térmico. Para corroborar la inserción de *mzt-1* en el plásmido pMF272 se llevó a cabo una PCR de colonia, en donde se amplificó el gen *mzt-1* a partir de una suspensión bacteriana de las distintas clonas transformadas. Una vez extraído el plásmido de las bacterias (mediante el protocolo descrito por Sambrook et al. 1989), se digirió con las enzimas *Xba*I y *Pac*I para corroborar la integridad del gen *mzt-1*. Finalmente, el plásmido extraído se transformó en conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*, como se describe en la sección 2.6.

A pMF272 (*Pccg-1-sgfp*) 8479 pb



B pMF272 + *mzt-1*

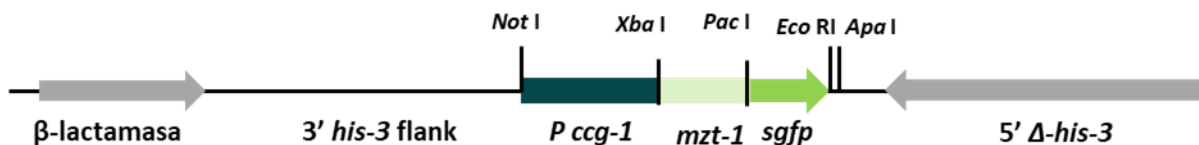


Figura 6. Diagrama del plásmido pMF272. (A) El plásmido pMF272 contiene el gen *sgfp* que codifica para la proteína fluorescente GFP, la expresión de *sgfp* está regulada por el promotor *ccg-1* de *N. crassa*. Las regiones 5' Δ -*his-3* y 3' *his-3* flank hacen posible la recombinación homóloga en el locus del gen *his-3* de *N. crassa*. El gen β -lactamasa confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* que lo contienen. Además, el plásmido contiene un sitio de clonación múltiple que incluye los sitios de restricción de las enzimas *Pac*I y *Xba*I. **(B)** Se utilizó restricción y ligación como estrategia de clonación de *mzt-1* en el vector pMF272. Las enzimas de restricción utilizadas para la doble digestión tanto del gen como del vector corresponden a *Pac*I y *Xba*I.

2.5.2 Construcción de la cepa MZT-1-mChFP

Los cassettes para la construcción de la cepa que expresa a MZT-1 fusionada a la proteína roja fluorescente (mChFP) en el carboxilo terminal, se obtuvieron mediante la técnica de PCR de doble unión (Yu et al. 2004). Para ello se amplificaron el fragmento 5' (que corresponde a 1,683 pb de la región terminal del ORF de *mzt-1* excluyendo el codón de paro) y el fragmento 3' (que corresponde a 1,186 pb río abajo del ORF de *mzt-1*) (**Figura 7A**). También se amplificó el cassette *10xgly_mChFP_hph* que consiste de una secuencia que codifica para 10 glicinas (*10xgly*), seguida del ORF de la proteína roja fluorescente (mChFP) y del gen de resistencia a higromicina (**Figura 7A**).

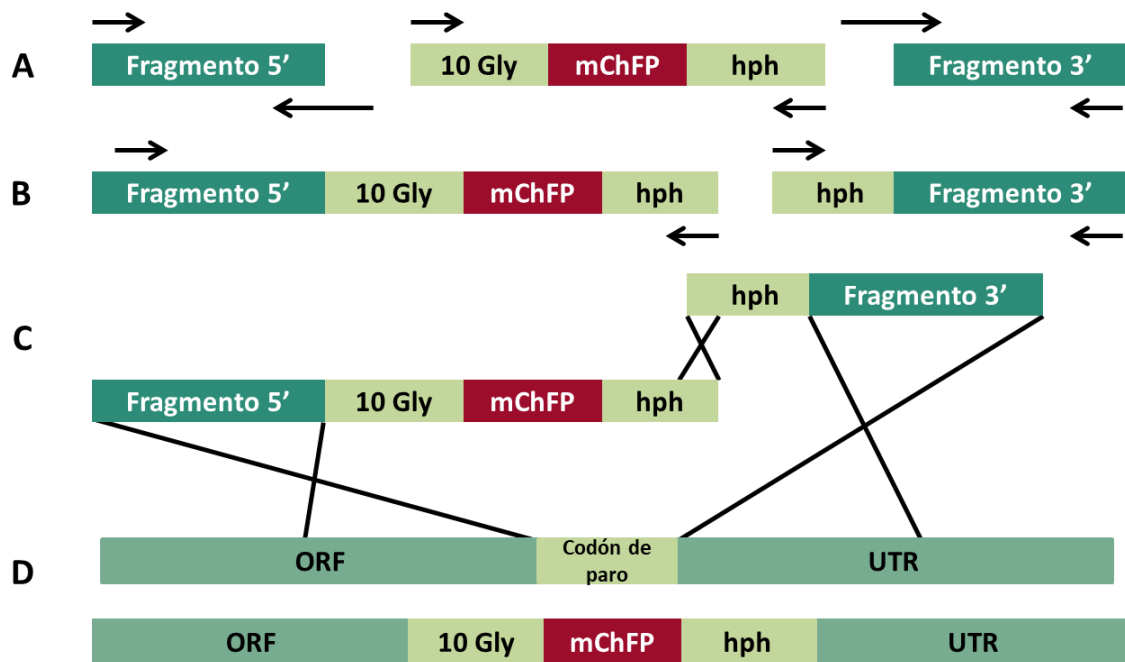


Figura 7. Estrategia para la construcción de la cepa MZT-1-mChFP. (A) Amplificación de los fragmentos 5' y 3' del gen *mzt-1*, y del cassette *10xgly_mChFP_hph*, que consiste de una secuencia que codifica para 10 glicinas (*10xgly*), seguida del ORF de la proteína roja fluorescente (mChFP) y del gen de resistencia a higromicina (*hph*) (B) PCR de fusión para la obtención de los cassettes 5' y 3'. (C) Los dos cassettes construidos se utilizan para la transformación de DNA genómico de *N. crassa*. (D) Finalmente, por doble recombinación homóloga se sustituye el codón de paro por el cassette *10xgly_mChFP_hph*, dando lugar a una cepa que expresa a MZT-1 fusionada a mChFP, regulada por el promotor nativo del gen *mzt-1*. Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados. Las cruces indican las regiones que se recombinan homológamente.

Posteriormente, utilizando los oligonucleótidos rc-MZT1_5'F y hph SMR se fusionó el fragmento 5' con el cassette que codifica para 10 glicinas (*10xgly*), seguido del ORF de la proteína fluorescente mChFP y de la

secuencia interrumpida del gen *hph*, dando lugar al cassette 5' (**Figura 7B**). Para la construcción del cassette 3' que consiste de la secuencia interrumpida del gen *hph* fusionada al fragmento 3' se utilizaron los oligonucleótidos *hph* SMF y rcMZT1pJET_3'R (**Figura 7B**).

Los fragmentos 5' y 3' se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *N. crassa* (FGSC #4200). Los oligonucleótidos rcdMZT1-fgsc-5F y rcMZT1gly_5'R se utilizaron para amplificar el fragmento 5' y los oligonucleótidos rcMZT1loxp_3'F y rcMZT1pJET_3'R para el fragmento 3'. El cassette *10xgly_mChFP_hph* se amplificó a partir de DNA plasmídico (pRR1_0mCherry) con los oligonucleótidos GlyF y LoxpR.

Todas las amplificaciones para la construcción de la cepa MZT-1-mChFP, se realizaron en un termociclador Bio-Rad utilizando la enzima Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados los cassettes 5' y 3', se transformaron en conidios de la cepa 9717 de *N. crassa* como se describe en la sección 2.6. Por doble recombinación homóloga se sustituyó el codón de paro por el cassette *10xgly_mChFP_hph* (**Figura 7C**). Se obtuvo una cepa resistente a higromicina con el marcaje de MZT-1 con mChFP, cuya expresión está regulada bajo promotor nativo del gen *mzt-1* (**Figura 7D**).

2.5.3 Construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$

Los cassettes para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ se obtuvieron mediante la técnica de PCR de doble unión (Yu et al. 2004). Para ello, se amplificó el ORF del gen de resistencia a higromicina *hph* contenido en el plásmido pZero_pMF357_pPP43, y se fusionó a las regiones flanqueantes del ORF de *mzt-1* (**Figura 8**). Las regiones flanqueantes de *mzt-1* se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *N. crassa* (FGSC #4200). Los oligonucleótidos *mzt1_FP_F5'* y *mzt1_RP_F5'* se utilizaron para amplificar la región flanqueante 5', que corresponde a aproximadamente 1 kb río arriba del ORF de *mzt-1*. Mientras que los oligonucleótidos rcMZT1loxp_3'F y *mzt1_RP_F3'* se utilizaron para amplificar la región flanqueante 3', que corresponde a aproximadamente 1 kb río abajo del ORF de *mzt-1*. El gen *hph* se amplificó con los oligonucleótidos rcp0hphF y rLoxpR (**Tabla 5**). Para la construcción del cassette RF 5'+ *hph* que consiste en la región flanqueante 5' unida a la secuencia interrumpida del gen *hph*, se utilizaron los oligonucleótidos *mzt1_NFP_F5'* y *hph* SMR. Para la construcción del cassette *hph* + RF 3' que consiste en la secuencia interrumpida del gen *hph* unida a la región flanqueante 3', se utilizaron los oligonucleótidos *hph* SMF y *mzt1_NRP_F3'*. Todas las amplificaciones para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ se realizaron en

un termociclador Bio-Rad utilizando la enzima Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cassetes RF 5'+ hph y hph + RF 3' se transformaron en conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*, como se describe en la sección 2.6; y por doble recombinación homóloga se sustituyó el ORF del gen *mzt-1* por el de *hph* (Figura 8D).

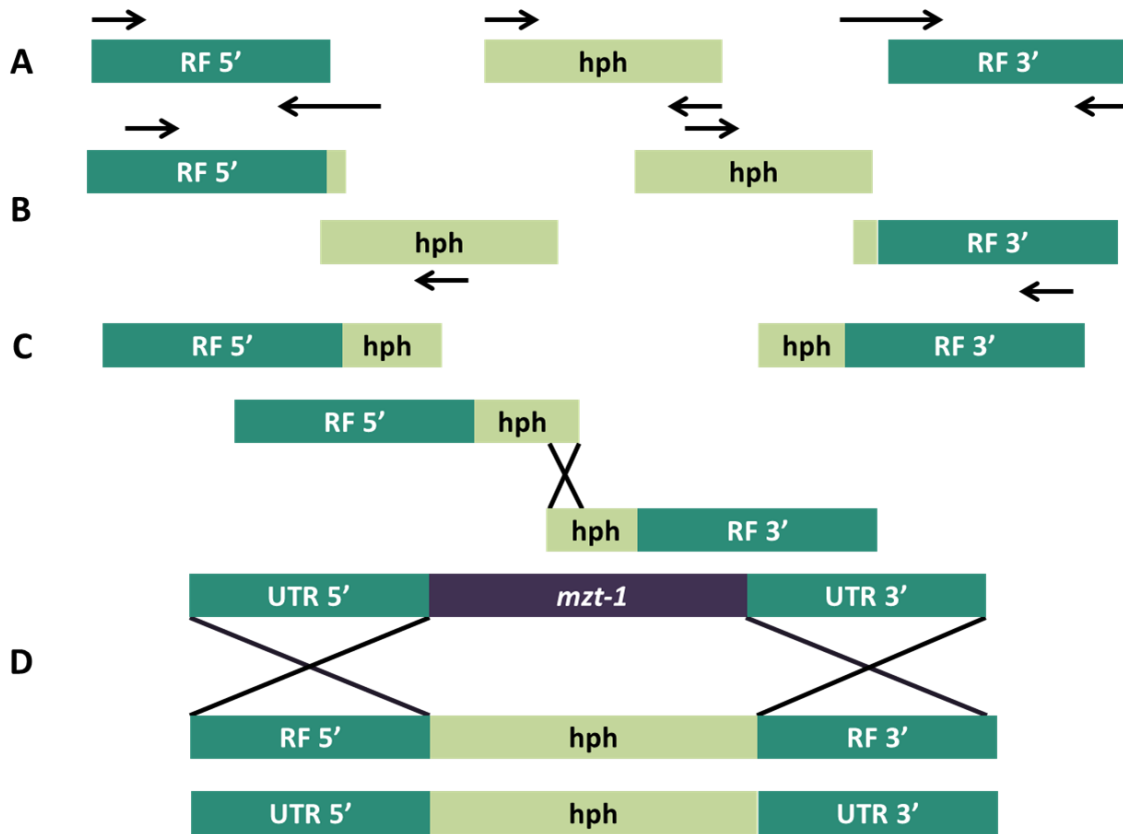


Figura 8. Estrategia para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$. (A) Amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3'; que corresponden a aproximadamente 1kb río arriba y río abajo del ORF de *mzt-1* respectivamente. Amplificación del gen de resistencia a higromicina (*hph*). (B) Fusión de la región flanqueante 5' (RF 5') con la secuencia interrumpida del gen *hph* y fusión de la secuencia interrumpida del gen *hph* con la región flanqueante 3' dando lugar a los cassetes RF 5' + hph y hph + RF 3' ilustrados en (C). (D) Finalmente, por doble recombinación homóloga se sustituye el gen *mzt-1* por el gen de resistencia a higromicina.

2.6 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR para la construcción del plásmido pMF272+mzt-1 y para la construcción de las cepas MZT-1-mChFP y mutante $\Delta mzt-1$ se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (bromuro de

etidio al 0.1%) a 75 V durante 40-50 minutos. Las bandas amplificadas de interés se purificaron mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymoclean), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

2.7 Transformación de conidios de *N. crassa*

La transformación de conidios de la cepa FGSC #9717 de *N. crassa* con los cassettes para la construcción de las cepas MZT-1-mChFP y mutante $\Delta mzt-1$, y con el constructo pMF272+mzt-1, se llevaron a cabo mediante electroporación. Para ello, tres alícuotas de conidios se lavaron tres veces con sorbitol 1M estéril, centrifugándolos a 6,000 rpm durante 5 minutos y desechando el sobrenadante. El precipitado de conidios se resuspendió en 90 μ L de sorbitol 1M y se mezcló con 1 μ g de cada cassette. Cada una de las mezclas fue transferida a una celda de electroporación estéril, y se les aplicó un pulso eléctrico (resistencia 600 Ω , capacitancia 25 μ F y voltaje de 1.5 KV) en un electroporador Bio-rad Gene Pulser (BIO-RAD®). Después del pulso eléctrico, los conidios se mezclaron con 1 mL de sorbitol 1M, y se transfirieron a tres tubos falcón™ con 2 mL de sorbitol 1M. Se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación constante (5 rpm) y oscuridad. Transcurrida la incubación, los conidios se sembraron en medio FIGS y se incubaron a 30°C hasta observar crecimiento de colonias.

Los conidios transformados con el constructo pMF272+mzt-1 se seleccionaron por crecimiento en ausencia de histidina. Los conidios transformados con los cassettes para la construcción de las cepas MZT-1-mChFP y mutante $\Delta mzt-1$ se seleccionaron por crecimiento en presencia de higromicina (300 μ g/ml).

Finalmente, se realizó un tamizaje de las colonias transformantes, mediante microscopia confocal, para seleccionar aquellas que tuvieran expresión de GFP o mChFP. La comprobación de la sustitución del gen *mzt-1* por el de *hph* en la cepa mutante $\Delta mzt-1$ (heterocarión) se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos mzt1_NFP_F5' y mzt1_NRP_F3' (Tabla 5).

2.8 Cruzas sexuales de *N. crassa*

Para la obtención de homocariones, la cepa heterocarión seleccionada de cada transformación se cruzó con la cepa homocarión FGSC #9718 (mat a). Primero, se inoculó micelio de las cepas transformantes en

placas con Medio Sintético de Cruzas o MSC + histidina, y se incubaron en oscuridad a 25°C durante un día. Posteriormente se re-inoculó el cultivo con micelio de la cepa FGSC #9718 y se incubaron nuevamente a 25°C hasta la aparición y maduración de peritecios.

2.9 Activación y aislamiento de ascosporas

Una vez maduros los peritecios, se recuperaron ascosporas con agua destilada estéril, se colocaron en un tubo de 1.5 mL y se sometieron a un choque térmico a 60°C durante 1 hora para activarlas. Posteriormente se sembraron en placas con MMV o MMV +his+ higromicina, y se incubaron a 30°C toda la noche. Las colonias individuales se aislaron en tubos de 5mL con MMV o MMV +his+ higromicina. Finalmente, las ascosporas aisladas se observaron bajo microscopía de fluorescencia para seleccionar aquellas que expresaran a la GFP o a la mChFP. No se obtuvieron ascosporas homocariotes con el marcaje de MZT-1 con mChFP, por lo tanto, la cepa MZT-1-mChFP se analizó en estado heterocarión.

2.10 Obtención de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión

La cepa mutante $\Delta mzt-1$ heterocarión fue incapaz de producir ascosporas al cruzarse sexualmente, por lo tanto, se utilizó la estrategia de inducción de microconidios para la obtención de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión, ya que estos conidios son predominantemente uninucleados. Para ello, se cultivó la cepa mutante $\Delta mzt-1$ heterocarión en tubos de vidrio con 7mL de medio Westergaard agar suplementado con yodoacetato de sodio 0.1 M (de forma inclinada), durante 12 días a 25°C. Transcurrida la incubación, los conidios de cada tubo se suspendieron con 3mL de agua destilada estéril y se filtraron utilizando un filtro de 5 μ m. El filtrado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y los conidios se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril. De la solución de conidios se tomaron 50 μ L y 100 μ L y se sembraron en placas de cultivo con medio FIGS + Histidina + Higromicina (300 μ g/ mL). Las placas se incubaron durante dos días a 30°C. Transcurrida la incubación, con ayuda del microscopio estereoscópico Olympus SZX12, se seleccionaron las colonias más pequeñas, que corresponden a las originadas por microconidios. La comprobación de la mutante homocarión se realizó a partir de extracción de DNA genómico y PCR utilizando los oligonucleótidos *mzt1_NFP_F5'* y *mzt1_NRP_F3'* (Tabla 5).

2.11 Fusiones vegetativas

Para observar la relación de MZT-1 con los núcleos, el citoesqueleto microtubular, y las proteínas γ -Tubulina, GRB y APS-2 se construyeron seis cepas heterocariones. Para ello, se realizó la fusión de la cepa MZT-1-GFP o MZT-1-mChFP con cada una de las cepas con el marcaje de interés, todas con tipo de apareamiento mat A (**Tabla VI**). Primero, se inoculó micelio de cada par de cepas en una placa de Petri con MMV al 3% y se incubó durante 12 horas a 30°C. Posteriormente, se examinó el margen de las colonias en busca de hifas que tuvieran ambos marcajes fluorescentes. Finalmente, se tomaron imágenes siguiendo el protocolo descrito para microscopía confocal de barrido láser o de disco giratorio.

Tabla 6. Cepas fusionadas para la construcción de heterocariones

CEPA A	CEPA B	ANÁLISIS MICROSCÓPICO
MZT-1-GFP	dRFP-H1	Microscopia confocal de barrido láser y de disco giratorio
MZT-1-GFP	BML-mChFP	Microscopia confocal de disco giratorio
MZT-1-mChFP	BML-GFP	Microscopia confocal de disco giratorio
MZT-1-mChFP	γ -Tubulina-GFP	Microscopia confocal de disco giratorio
MZT-1-GFP	dRFP-APS-2	Microscopia confocal de barrido láser
MZT-1-mChFP	GRB-GFP	Microscopia confocal de barrido láser

2.12 Microscopía Confocal

Los conidios, germínulas e hifas maduras de la cepa que expresa a MZT-1 fusionada a la GFP y las cepas con el doble marcaje (**Tabla VI**), se observaron por microscopia confocal, utilizando el método de bloque de agar invertido para la manipulación de las muestras (Hickey et al. 2004) (**Figura 9**).

Las imágenes obtenidas por microscopia confocal de barrido láser se adquirieron utilizando el microscopio Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japón), con un objetivo plan apocromático 60X (1.42 N. A.) y aceite de inmersión. La GFP se observó utilizando un láser de estado sólido de 488nm y un filtro de emisión BA505-525. El fluoróforo FM4-64, la mChFP y la dRFP se observaron utilizando un láser de Helio Neón de 543 nm y un filtro de emisión BA560-660, además se obtuvieron imágenes de contraste de interferencia diferencial. Las imágenes fueron capturadas usando el software FV-10 ASW y analizadas con el programa FV-10 ASW viewer (versión 4.1).

Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse Ti-E acoplado a la unidad de disco giratorio CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Japón), para la obtención de imágenes por microscopía confocal de disco giratorio utilizando el objetivo plan apocromático 60X (1.49 N.A.) con aceite de inmersión. La GFP se observó utilizando un láser de 488 nm y un filtro de emisión ET525/36m. La mChFP y la dRFP se observaron utilizando un láser de 561 nm y un filtro de emisión ET605/70m. Las imágenes se capturaron con una cámara iXon Ultra (Andor). Se empleó el software NISElements (versión 4.5) integrado al microscopio para la recuperación y análisis de las imágenes. Las figuras se crearon con el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc.).

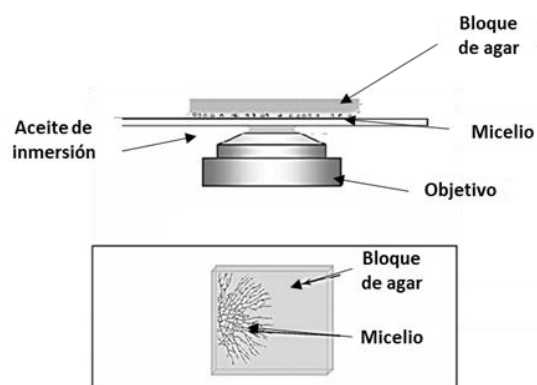


Figura 9. Método del bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un fragmento del agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos (Modificada de Hickey et al. 2004).

2.12.1 Tinción con FM4-64

El colorante vital FM4-64® se internaliza por endocitosis y tiñe membranas. Este colorante fue utilizado en el análisis microscópico de conidios y germínulas de la cepa MZT-1-GFP. Para ello, las cepas fueron incubadas con 10 μ L (5 μ M) de FM4-64® durante 5 minutos.

2.13 Microscopía estereoscópica

Las imágenes del margen de las colonias para la caracterización de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ se obtuvieron por microscopía estereoscópica utilizando el microscopio Olympus SXZ12 con un lente DF PLAPO 1X PF y la cámara AxioCam ERc 5s de Zeiss, con un aumento de 7X.

2.14 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta mzt-1$

2.14.1 Morfología colonial

Para observar las características de la morfología colonial, se inocularon 7×10^6 conidios de las cepas mutante $\Delta mzt-1$ y WT en el centro de una placa de cultivo de 10 cm de diámetro con MMV sólido, cada una. Las placas se incubaron a 30°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a tomar fotografías de las colonias con la cámara D3100 de Nikon.

2.14.2 Tasa de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento de la cepa mutante $\Delta mzt-1$, se inocularon 7×10^6 conidios de las cepas tipo silvestre (WT) y $\Delta mzt-1$; en la periferia de tres placas de cultivo de 15 cm de diámetro con MMV sólido, por cada una de las cepas a analizar. Las placas con el inóculo se incubaron a 30°C. A las 12 horas de incubación se trazó el margen, sobre la placa, de cada una de las colonias y se volvieron a incubar. A partir de las 12 horas se trazó el margen de las colonias cada 6 horas. La última medición se realizó a las 36 horas. Se trazaron 10 transectos verticales y se midió el crecimiento en cada tiempo para cada transecto.

2.14.3 Tasa de ramificación

Para calcular la tasa de ramificación, se inocularon 7×10^6 conidios de la cepa $\Delta mzt-1$ y WT en el centro de placas de cultivo de 10 cm de diámetro con MMV sólido, por triplicado. Posteriormente se incubaron durante 18 horas a 30°C. Se tomaron imágenes del margen de la colonia, hasta obtener 30 ramas principales, utilizando el microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus, Japón) equipado con la cámara DP70 (Olympus, Japón). De las fotografías obtenidas, se cuantificó el número de ramas de cada hifa principal dentro de una distancia de 500 μm desde la punta de la hifa hasta la región distal de la misma, para ambas cepas.

2.13.4 Tasa de conidiación

Para comparar la producción de conidios entre la cepa silvestre y la mutante de *mzt1*, se inoculó la misma cantidad de conidios utilizados en los ensayos anteriores en tubos de vidrio para cultivo con 5 mL de MMV líquido y se incubaron durante 2 días a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se expusieron a luz durante 8 días a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la extracción de conidios transfiriendo el MMV, que contiene el micelio y los conidios, a un tubo falcón de 15 mL, y se centrifugó durante 3 minutos a 3000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril. Posteriormente, los conidios se resuspendieron en 200 µL de sorbitol (1M) y se realizó el conteo de estos utilizando la técnica de cuenta directa en cámara de Neubauer.

2.14.5 Producción de biomasa

En matraces de 250 mL con 50 mL de MMV líquido se inocularon 7×10^6 conidios de la cepa $\Delta mzt-1$ y WT, por triplicado. Los matraces con el inóculo se incubaron durante 61 horas a 30°C en oscuridad y agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se pesaron seis membranas de Whatman. Luego se filtró al vacío el micelio sobre la membrana de Whatman y se colocó a 37°C durante 1 hora. Se pesó la membrana con el micelio y se incubó por media hora a 37°C. Posteriormente, se pesó la membrana con el micelio cada media hora hasta que el peso fue constante. Para determinar el peso de la biomasa se restó el peso de la membrana al peso final de la membrana con micelio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis Bioinformático

La búsqueda de la proteína ortóloga de Mzt1 (POCF96.3) de *S. pombe* y MztA (XP_658965.1) de *A. nidulans* en *N. crassa* se realizó utilizando el programa Blastp. Se identificó una proteína hipotética (KHE87685.1) de 80 aminoácidos, a la cual se le denominó MZT-1. Esta proteína mostró 44% de identidad con Mzt1 (*S. pombe*), 57.63% de identidad con MztA (*A. nidulans*) y 47.37% de identidad con MOZART1 (*H. sapiens*). Los resultados del alineamiento de las secuencias aminoacídicas, mostraron que la región central (40-69) de MZT-1 tiene mayor porcentaje de similitud con sus ortólogos en otras especies (**Figura 10**).

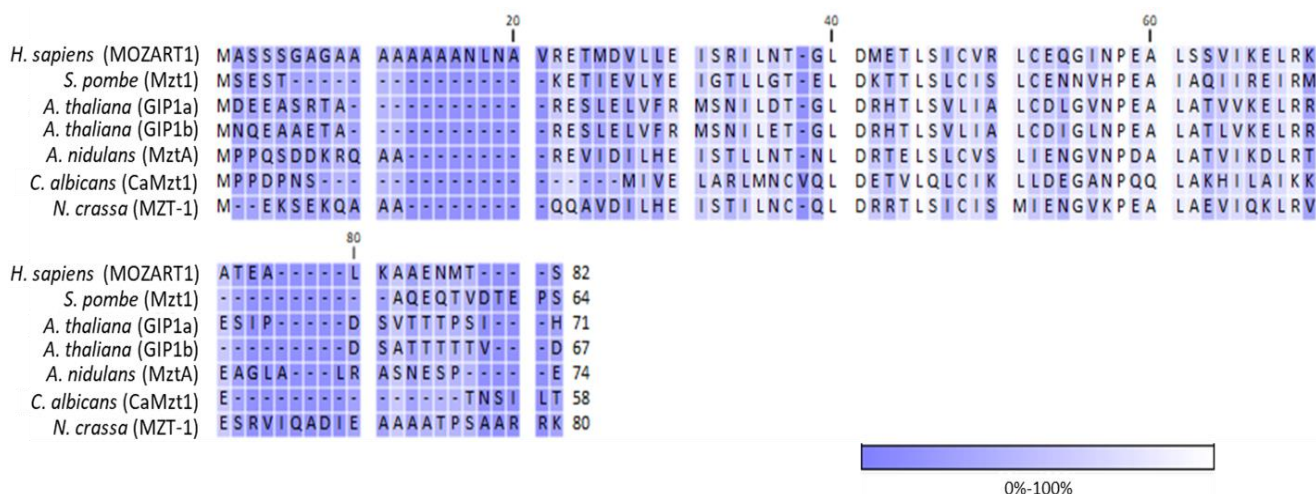


Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MZT-1 y sus ortólogos en otras especies. Alineamiento de MZT-1 y sus ortólogos en *H. sapiens* (MOZART1), *S. pombe* (Mzt1), *A. thaliana* (GIP1a y GIP1b), *A. nidulans* (MztA) y *C. albicans* (CaMzt1). El alineamiento se realizó con el programa Genomics Workbench (QIAGEN). El color de fondo indica el porcentaje de conservación como se muestra en la barra de colores.

3.2 Construcción del plásmido pMF272+mzt-1 (pRM99-TR-01)

La construcción del plásmido pMF272+mzt-1 (pRM99-TR-01), se generó a partir de la ligación del ORF del gen *mzt-1* en el sitio de clonación múltiple del vector pMF272. El PCR de colonia de las clonas de *E. coli* que se transformaron con este plásmido se muestran en la **Figura 11A**, las clonas 1, 2, 3 y 4 contienen el ORF de *mzt-1* correspondiente a 361 pb. Además, se muestran los resultados de la liberación de los fragmentos, que corresponden a *mzt-1*, posterior a la digestión enzimática de pRM99-TR-01 con *Xba*I y

PacI (**Figura 11B**). El plásmido pRM99-TR-01 se transformó en conidios de la cepa 9717 de *N. crassa*, y mediante microscopía confocal, se llevó a cabo un tamizaje de las colonias transformantes; seleccionándose aquellas con expresión de GFP. La cepa MZT-1-GFP homocarión se utilizó en los análisis de localización y en los ensayos de coexpresión.

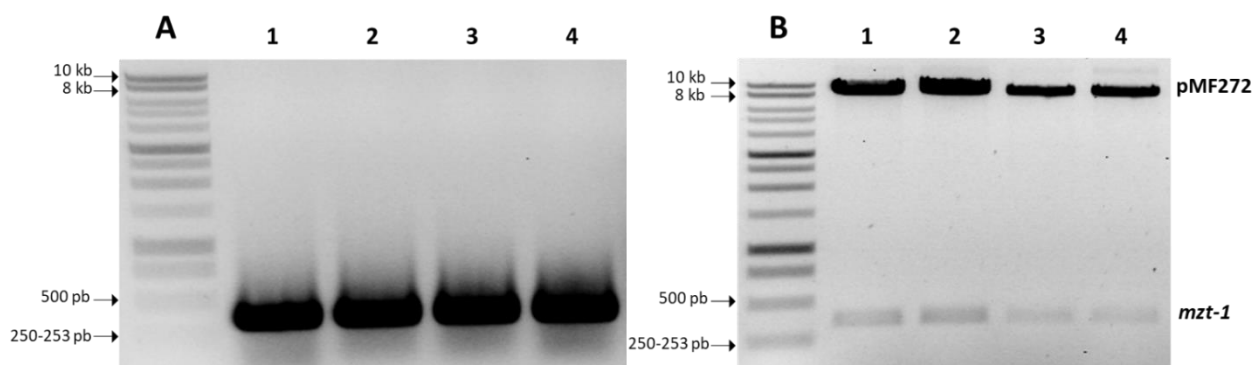


Figura 11. Comprobación del constructo pMF272+mzt-1 (pRM99-TR-01). (A) PCR de colonia de las clonas de *E. coli* transformadas con el plásmido pRM99-TR-01. (B) Digestión enzimática del constructo pRM99-TR-01 con *XbaI* y *PacI*.

3.3 Construcción de los cassettes para el marcaje de MZT-1 con mChFP

Los cassettes 5' y 3' para la construcción de la cepa que expresa a MZT-1 fusionada a la proteína roja fluorescente (mChFP) en el carboxilo terminal, se obtuvieron mediante la técnica de PCR de doble unión (Yu et al. 2004). En la **Figura 12A** se muestran las amplificaciones de los fragmentos 5' (1,683 pb), 3' (1,186 pb), y del cassette *10xgly_mChFP_hph* (2,266 pb).

La amplificación del cassette 5', que consiste del fragmento 5' unido a la secuencia que codifica para 10 glicinas, seguida del ORF de la proteína roja fluorescente y de la secuencia interrumpida del gen *hph* (3,362 pb), y la amplificación del cassette 3', que consiste de la secuencia interrumpida del gen *hph* unida al fragmento 3' (2,273 pb), se muestran en la **Figura 12B** (Flechas). Los cassettes 5' y 3' se transformaron en conidios de *N. crassa* (FGSC #9717). Posteriormente, mediante microscopía confocal, se llevó a cabo un tamizaje de las colonias transformantes; seleccionándose aquellas con expresión de mChFP. La cepa MZT-1-mChFP heterocarión se utilizó en los ensayos de coexpresión.

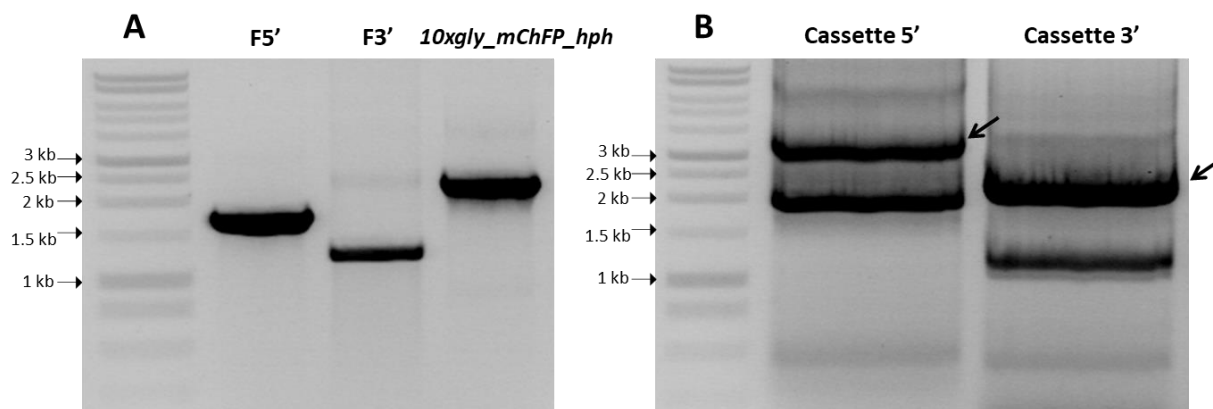


Figura 12. Obtención de cassettes para la construcción de la cepa MZT-1-mChFP (A) Amplificación del fragmento 5' (F5'), del fragmento 3' (F3') y del cassette *10xgly_mChFP_hph*. **(B)** Productos obtenidos por PCR de fusión, las bandas correspondientes a los cassettes 5' (3,362 pb) y 3' (2,273 pb) se encuentran señaladas con flechas.

3.4 Localización de MZT-1 en los diferentes estadios del desarrollo de *N. crassa*

Para determinar la localización y la dinámica de la proteína MZT-1 en los diferentes estadios del desarrollo de *N. crassa*, se hicieron observaciones de la cepa que expresa a MZT-1 fusionada a la GFP, mediante microscopia confocal. En conidios, MZT-1-GFP se observó como un punto fluorescente asociado a los núcleos (**Figura 13A**). La fluorescencia se encontró, además, alrededor del núcleo de manera muy tenue, similar a lo reportado previamente para la γ -Tubulina en este mismo organismo (Ramírez-Cota, 2008). En germínulas, MZT-1-GFP conservó el mismo patrón de distribución, viéndose también como un punto fluorescente asociado a los núcleos (**Figura 13B**). Los conidios y germínulas se tiñeron con el colorante FM4-64 el cual se internaliza por endocitosis y tiñe membranas, esto permitió observar a los núcleos en tinción negativa.

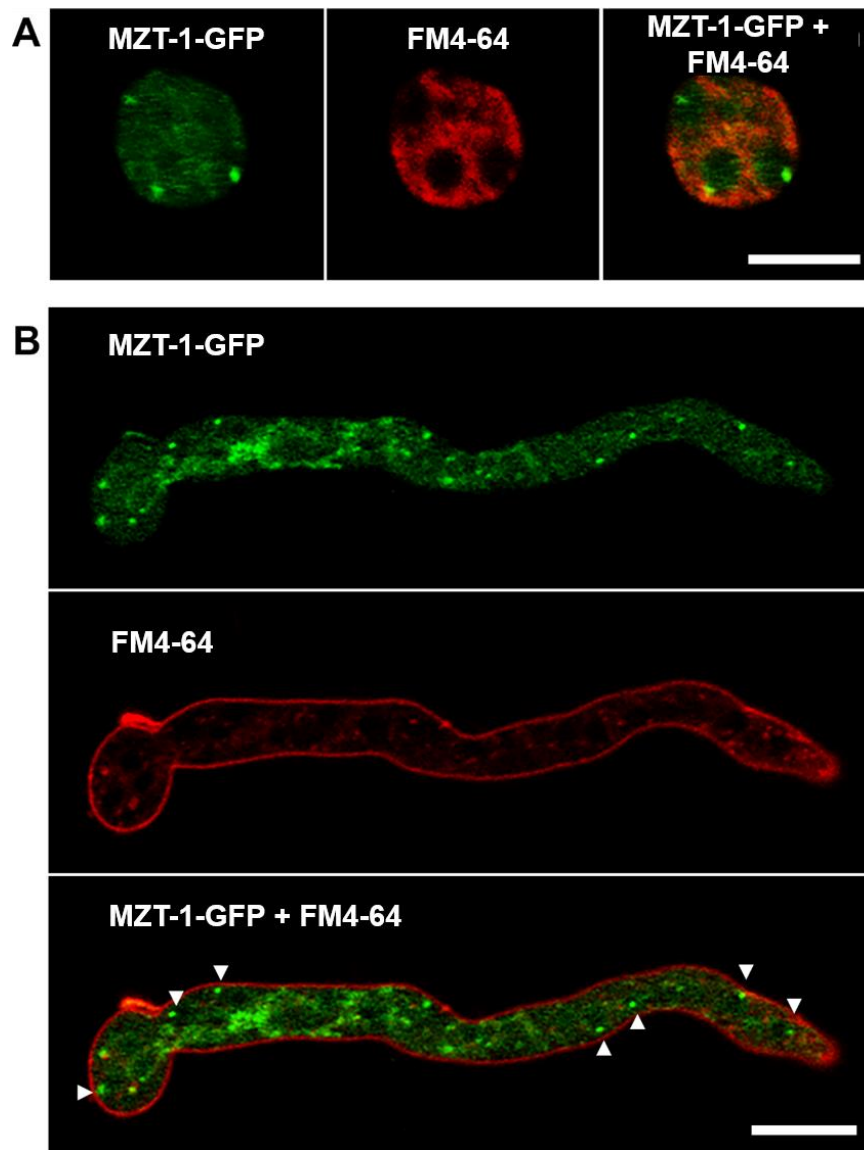


Figura 13. Localización de MZT-1-GFP en conidios y germínulas de *N. crassa*. (A) En conidios, MZT-1-GFP se observó como un punto fluorescente asociado a los núcleos. Barra de escala de 5 μm . (B) En germínulas, MZT-1-GFP conservó el mismo patrón de distribución. Las cabezas de flecha señalan puntos fluorescentes asociados a los núcleos. Barra de escala de 10 μm . Imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser.

En hifas maduras, al igual que en conidios y germínulas, MZT-1 se observó como puntos fluorescentes asociados a los núcleos, los cuales siguen el movimiento nuclear en dirección anterógrada y retrógrada. MZT-1-GFP se distribuye de forma homogénea a lo largo de la hifa, pero se encuentra ausente en el ápice (primeros 20-25 μm) (Figura 14).

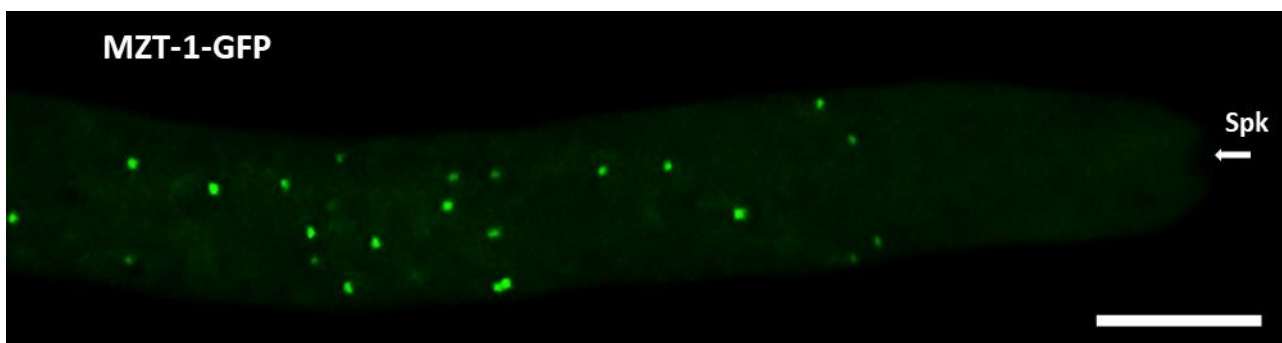


Figura 14. Localización de MZT-1-GFP en hifas maduras de *N. crassa*. MZT-1-GFP se distribuye de forma homogénea a lo largo de la hifa asociada a los núcleos, encontrándose ausente en los primeros 20-25 μm del ápice. La posición del Spk en el ápice de la hifa se muestra en tinción negativa. Barra de escala de 10 μm . Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

3.5 Asociación de MZT-1 con los núcleos

En *A. nidulans*, *S. pombe* y *C. albicans* los ortólogos de MZT-1 se localizan en los SPBs, los cuales se encuentran asociados a los núcleos. Para corroborar la asociación de MZT-1 con los núcleos en *N. crassa* se realizó la fusión vegetativa de las cepas MZT-1-GFP y dRFP-H1. El producto de esta fusión es una cepa heterocarión que expresa a la proteína MZT-1 fusionada a la GFP (MZT-1-GFP) y a la histona H1 fusionada a la dRFP (dRFP-H1). El análisis de la cepa heterocarión, mediante microscopía confocal, hizo evidente la asociación de MZT-1-GFP con los núcleos. En germínulas e hifas maduras, la mayoría de los núcleos mostraron un punto verde fluorescente (MZT-1) asociado (**Figura 15 y 16**). Ocasionalmente se observaron núcleos con dos puntos fluorescentes en sus extremos, estos corresponden a núcleos en mitosis (**Figura 17**). MZT-1-GFP co-localiza con la señal fluorescente de dRFP-H1 rojo brillante en la punta de los núcleos; región que se ha predicho que contiene al SPB (Freitag et al. 2004). Esto sugiere que MZT-1 se encuentra asociada a los SPBs.

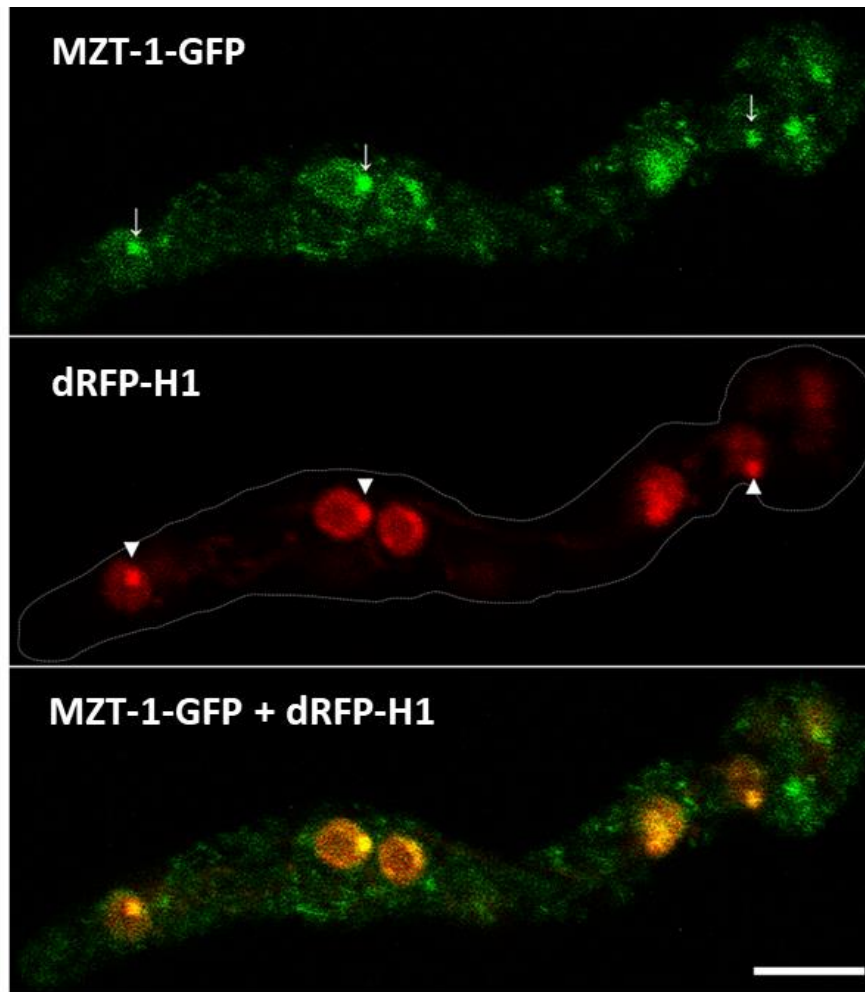


Figura 15. Asociación de MZT-1-GFP con los núcleos en germinulas de *N. crassa*. En germinulas, MZT-1-GFP se observó como un punto verde fluorescente (flechas) que co-localiza con un foco rojo fluorescente en la punta de los núcleos (cabezas de flecha); región que se ha predicho que contiene al SPB. Barra de escala de 5 μm . Imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser.

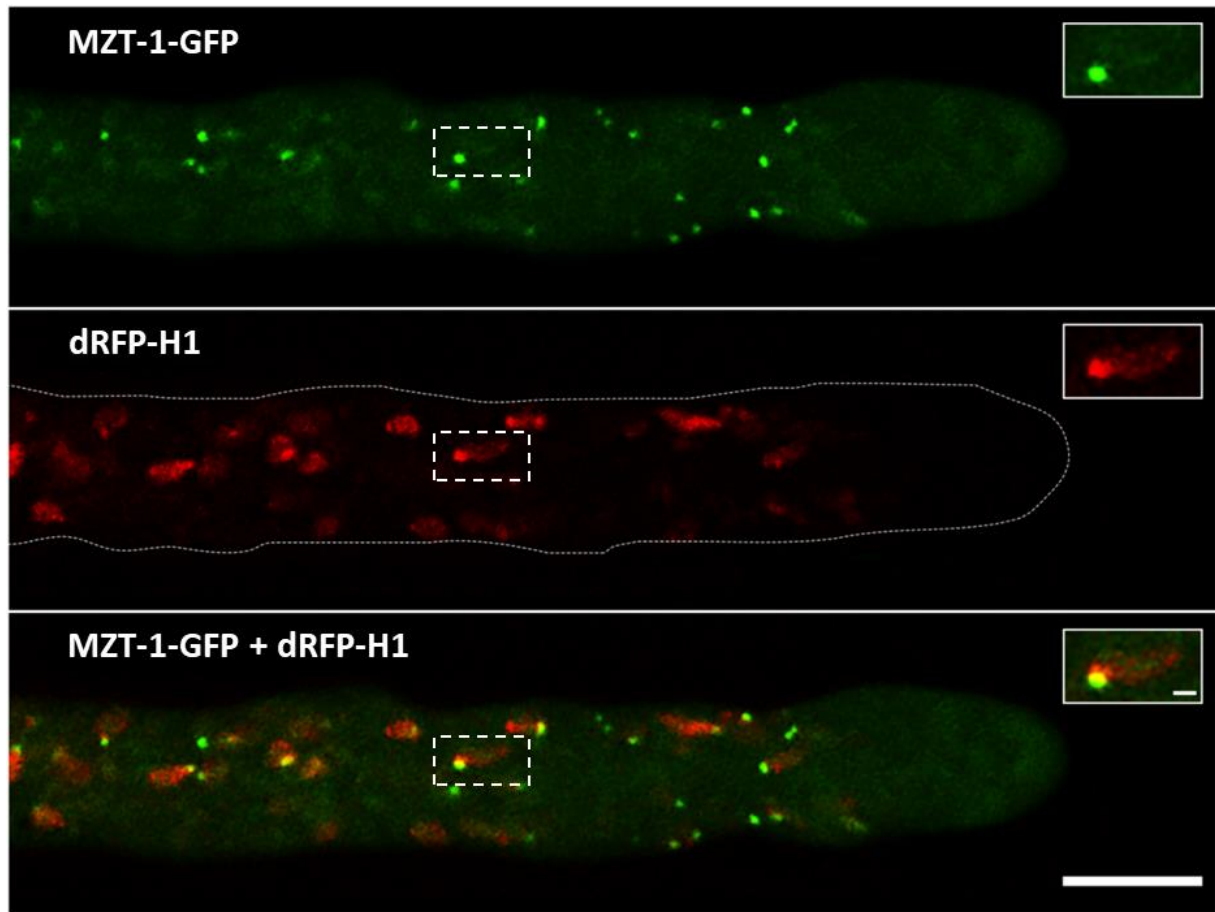


Figura 16. Asociación de MZT-1-GFP con los núcleos en hifas maduras de *N. crassa*. En hifas maduras, MZT-1-GFP se observó como un punto verde fluorescente asociado a los núcleos. En la esquina superior derecha de cada panel, se muestra un acercamiento de un núcleo, en el recuadro del panel inferior, se ve claramente la co-localización de MZT-1-GFP con la fluorescencia de dRPF-H1. Barra de escala de 10 μm , barra de escala en el recuadro de 1 μm . Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

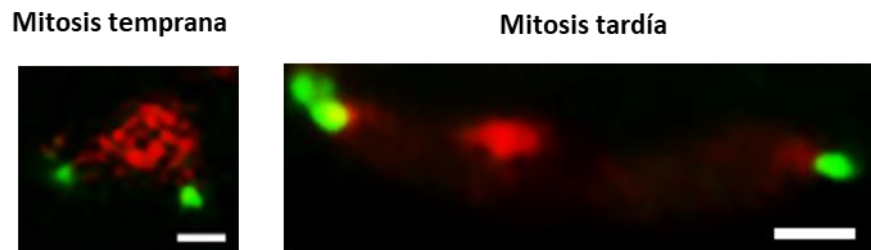


Figura 17. Localización de MZT-1-GFP en núcleos en mitosis. Acercamiento de núcleos en mitosis temprana y tardía, en donde se observó la localización de MZT-1-GFP en polos opuestos del núcleo. Barra de escala de 1 μm (izquierda) y 2 μm (derecha). Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

3.6 Interacción de MZT-1 con el citoesqueleto microtubular

Para conocer la relación de MZT-1 con los MTs citoplasmáticos y mitóticos, se llevó a cabo la fusión vegetativa de las cepas MZT-1-GFP con BML-mChFP, y MZT-1-mChFP con BML-GFP. Los heterocariones fueron analizados por microscopía confocal de disco giratorio.

MZT-1 se observó asociada a un extremo de los MTs citoplasmáticos (**Figura 18A y 18B**). En núcleos en mitosis, MZT-1 se encontró localizada en los extremos opuestos del huso mitótico, que corresponden a los sitios en donde se encuentran los SPBs (**Figura 19, recuadro superior**). Además, se observó que en núcleos que aparentemente van a iniciar la formación del huso mitótico MZT-1 se encuentra asociada en ambos polos. (**Figura 19, recuadro punteado**)

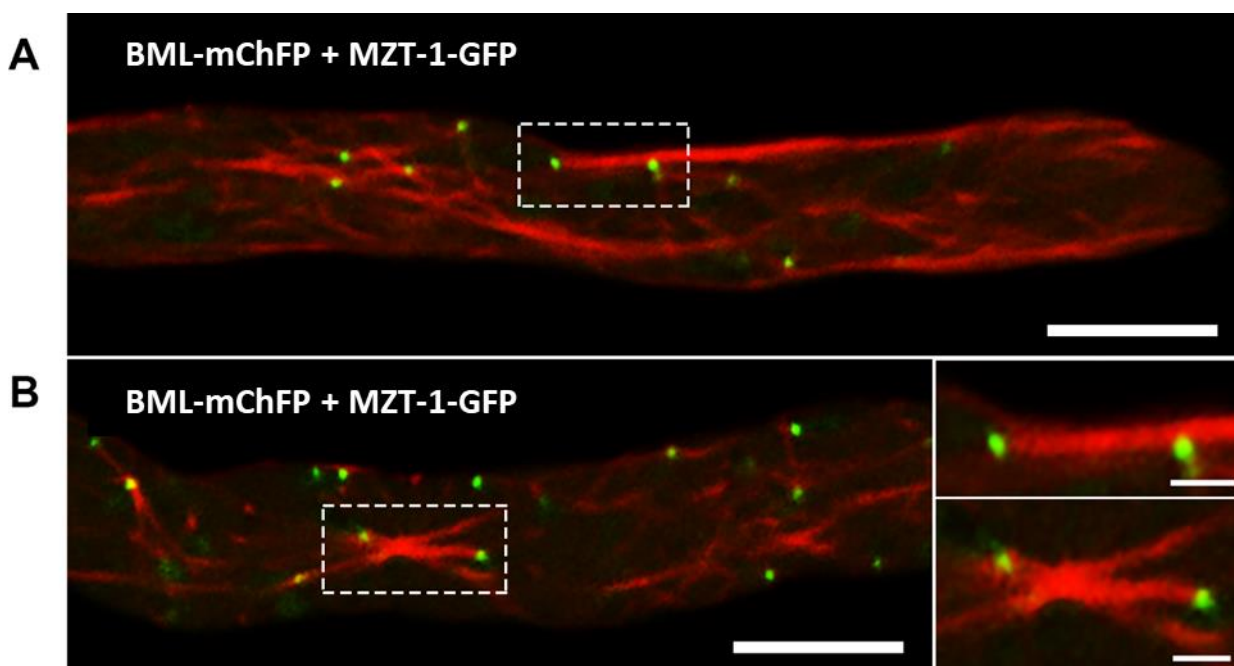


Figura 18. Interacción de MZT-1-GFP con el citoesqueleto microtubular en hifas maduras de *N. crassa* (A) Hifa madura que muestra la relación de MZT-1 con los MTs. Barra de escala de 10 μ m. (B). MTs pasando de un compartimento a otro a través del poro septal. Barra de escala 10 μ m. Acercamiento de dos MTs citoplasmáticos, que muestran la asociación de MZT-1 a uno de sus extremos. Barra de escala 2 μ m. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

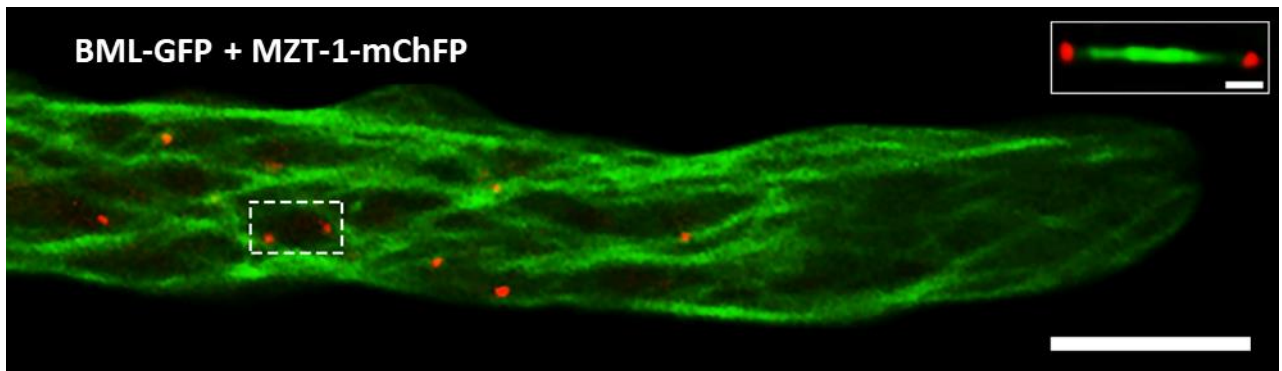


Figura 19. Interacción de MZT-1-mChFP con los MTs en hifas maduras de *N. crassa*. Hifa madura que muestra la asociación de MZT-1 con los MTs. Barra de escala 10 μ m. Núcleo con MZT-1-mChFP localizada en sus extremos opuestos, previo a la formación del huso (Recuadro punteado). Huso mitótico que muestra la asociación de MZT-1-mChFP a ambos polos; región donde se localizan los SPBs. Barra de escala 1 μ m. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

3.7 Asociación de MZT-1 con la γ -Tubulina

Previamente en nuestro laboratorio, se demostró la asociación de la γ -Tubulina con los SPBs en *N. crassa* (Ramírez-Cota, 2008). Para corroborar la hipótesis de que MZT-1 se localiza en los SPBs, se llevó a cabo la fusión vegetativa de las cepas γ -Tubulina-GFP y MZT-1-mChFP. El análisis de la cepa heterocarión, mediante microscopía confocal de disco giratorio, hizo evidente la co-localización de MZT-1-mChFP con la γ -Tubulina en núcleos de hifas maduras de *N. crassa* (**Figura 20**). En núcleos en mitosis, ambas proteínas se observan como dos puntos fluorescentes que co-localizan en los polos de los núcleos. Estos resultados confirman la asociación de MZT-1 con los SPBs.

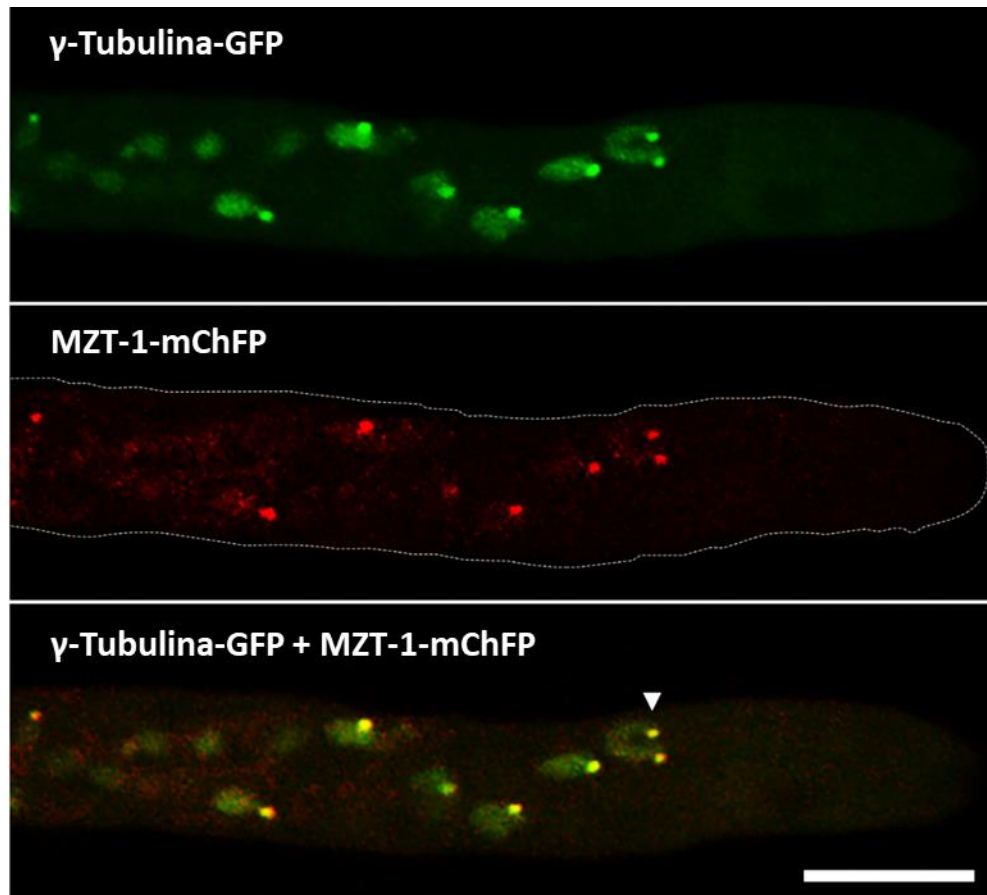


Figura 20. Co-localización de MZT-1-mChFP con la γ -tubulina en los SPBs. Hifa madura que muestra la relación de MZT-1 con la γ -tubulina. Núcleo en mitosis (cabeza de flecha). Barra de escala de 10 μ m. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio.

3.8 Localización de MZT-1 en el SPB

En *A. nidulans*, el ortólogo de MZT-1 (MztA) reside y funciona solo en la placa interna del SPB (Gao et al. 2019). Para determinar si MZT-1 se localiza en la placa interna y/o externa del SPB en *N. crassa*, se evaluó la co-localización de MZT-1 con las proteínas GRB y APS-2. La GRB reside en la placa interna del SPB, mientras que la APS-2 se localiza en la placa externa del SPB. En la cepa heterocarión GRB-GFP + MZT-1-mChFP, se observó co-localización total de GRB y MZT-1 en el 100% de los SPBs analizados (n=50) (**Figura 21A**). Sin embargo, en la cepa heterocarión que expresa a MZT-1 y APS-2 etiquetadas con GFP y dRFP respectivamente, se observó co-localización parcial en el 86% de los casos (n=50) (**Figura 21B**). Como control, se evaluó la co-localización de las proteínas GRB y APS-2, se observó co-localización parcial en el 84% de los SPBs analizados (n=50) (**Figura 21C**). Estos resultados sugieren que MZT-1 reside únicamente

en la placa interna de los SPBs de *N. crassa*. Adicionalmente, la proteína APS-2 se localiza en los septos (Figura 21B y 21C, cabezas de flechas); en donde MZT-1 parece estar ausente.

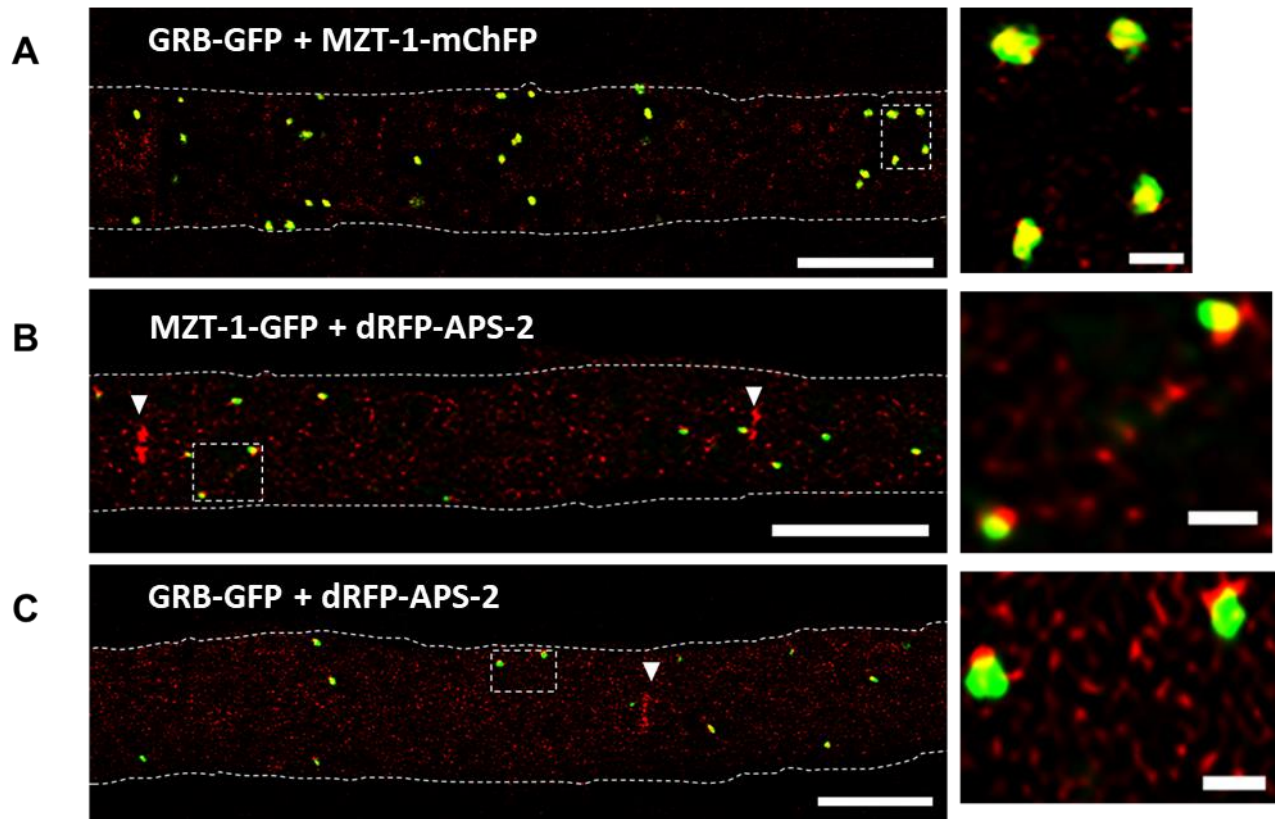


Figura 21. Análisis de co-localización de MZT-1 con las proteínas GRB y APS-2. (A) Análisis de co-localización entre MZT-1-mChFP y GRB-GFP. Barra de escala de 10 μ m. Acercamiento de cuatro SPBs en donde se observa la co-localización total entre MZT-1-mChFP y GRB-GFP. Barra de escala de 1 μ m. (B) Análisis de co-localización entre MZT-1-GFP y dRFP-APS-2. Barra de escala de 10 μ m. Acercamiento de dos SPBs en donde se observa la co-localización parcial entre MZT-1-GFP y dRFP-APS-2. Barra de escala de 1 μ m. (C) Análisis de co-localización entre GRB-GFP y dRFP-APS-2 (Control). Barra de escala de 10 μ m. Acercamiento de dos SPBs en donde se observa la co-localización parcial entre GRB-GFP y dRFP-APS-2. Barra de escala de 1 μ m. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser.

3.9 Análisis de la asociación de MZT-1 con los septos de *N. crassa*

Para corroborar la ausencia de MZT-1-GFP en los septos, se hicieron reconstrucciones tridimensionales de septos de la cepa heterocarión MZT-1-GFP+ dRFP-APS-2 teñida con CFW. El CFW es un fluorocromo que se une a la celulosa y a la quitina en las paredes celulares, por lo tanto, permitió observar a los septos como se muestra en las Figuras 22A y 22B. Las imágenes en 3D obtenidas mediante microscopía confocal mostraron que MZT-1-GFP co-localiza con la dRFP-APS-2 en los SPBs (Figura 22A). Sin embargo, no se

observó co-localización de estas proteínas en los septos. Por lo tanto, MZT-1-GFP se encuentra ausente en estas estructuras (**Figura 22A y 22B**).

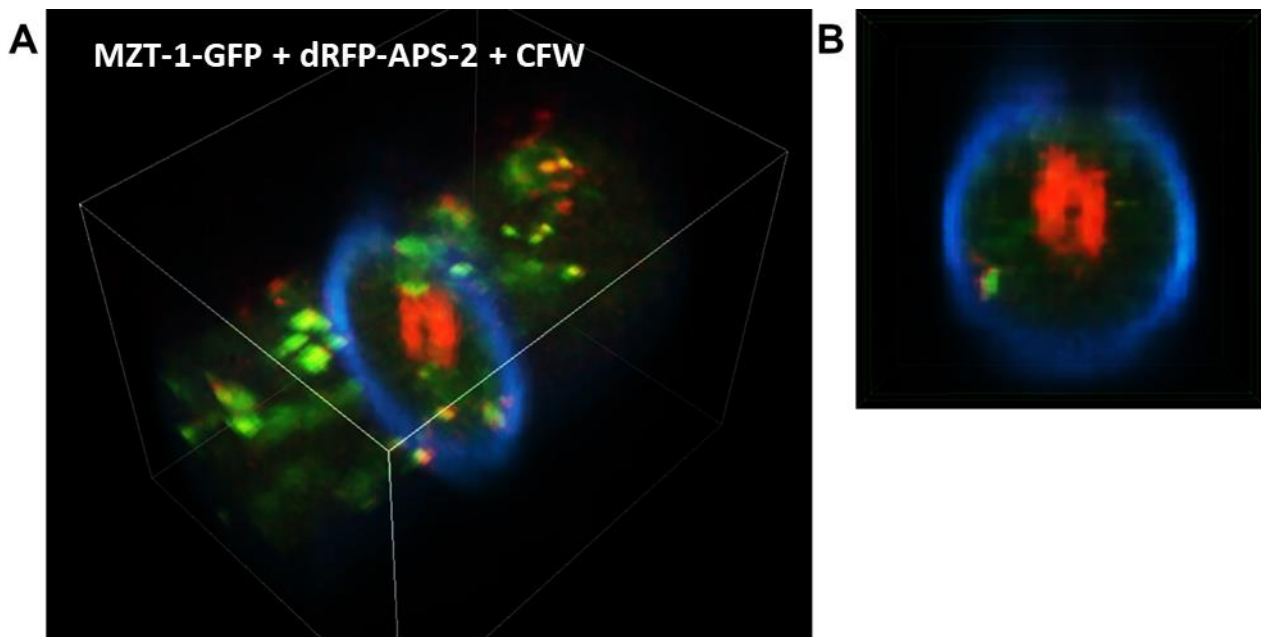


Figura 22. Reconstrucción en 3D de un septo de la cepa heterocarión MZT-1-GFP+ dRFP-APS-2 teñida con blanco de calcoflúor. Se observa la falta de co-localización de MZT-1-GFP con dRFP-APS-2 en un septo ya formado.

3.10 Construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$

3.10.1 Obtención de los cassettes para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$

Los cassettes para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ se obtuvieron a partir de dos rondas de PCR. En la primera ronda, se amplificaron la región flanqueante 5' (RF 5'), que corresponde a 1,332 pb río arriba del ORF de *mzt-1*, la región flanqueante 3' (RF 3'), que corresponde a 1,193 pb río abajo del ORF de *mzt-1*, y el gen de resistencia a higromicina *hph* (1,443 pb) (**Figura 23A**). En la segunda ronda, se obtuvieron los cassettes RF 5'+*hph*, que consiste de la región flanqueante RF 5' unida a la secuencia interrumpida del gen *hph* (2,183 pb), y *hph*+ R F3', que consiste de la secuencia interrumpida del gen *hph* unida a la región flanqueante RF 3' (2,161 pb) (**Figura 23B**).

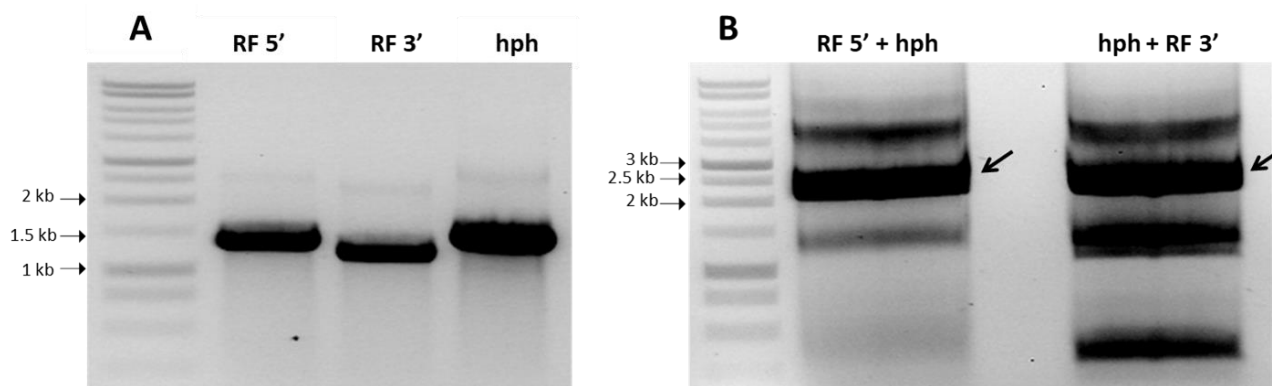


Figura 23. Cassettes obtenidos por PCR de doble unión para la construcción de la cepa mutante $\Delta mzt-1$. (A) Fragmentos amplificados de las regiones flanqueantes 5' (1,332 pb), y 3' (1,193 pb), y del gen *hph* (1,443 pb). (B) Cassette (R F5' + *hph*) de 2,183 pb y Cassette 3' (R F3' + *hph*) de 2,161 pb. Las flechas indican las bandas de interés.

3.10.2 Corroboración de la sustitución de *mzt-1* por el gen *hph*

Los cassettes R F5' + *hph* y *hph* + R F3' se transformaron en conidios de la cepa FGSC #9717 de *N. crassa*, generando la cepa mutante $\Delta mzt-1$ heterocarión. Posteriormente, mediante la técnica de inducción de microconidios se obtuvo la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión. Para corroborar la mutación, se llevó a cabo una amplificación por PCR con los oligonucleótidos *mzt1_NFP_F5'* y *mzt1_NRP_F3'*. En la cepa WT se amplificó un solo fragmento de 2,604 pb que corresponden a las dos regiones flanqueantes más el ORF del gen *mzt-1*. En la cepa mutante $\Delta mzt-1$ heterocarión, además del fragmento anteriormente descrito, se obtuvo una banda de 3,686 pb procedentes de las dos regiones flanqueantes más el gen de resistencia a higromicina (*hph*). En la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión se obtuvo una sola banda de 3,686 pb, lo que corrobora la correcta sustitución de *mzt-1* por el gen de *hph*, y el estado homocarión de esta cepa (Figura 24).

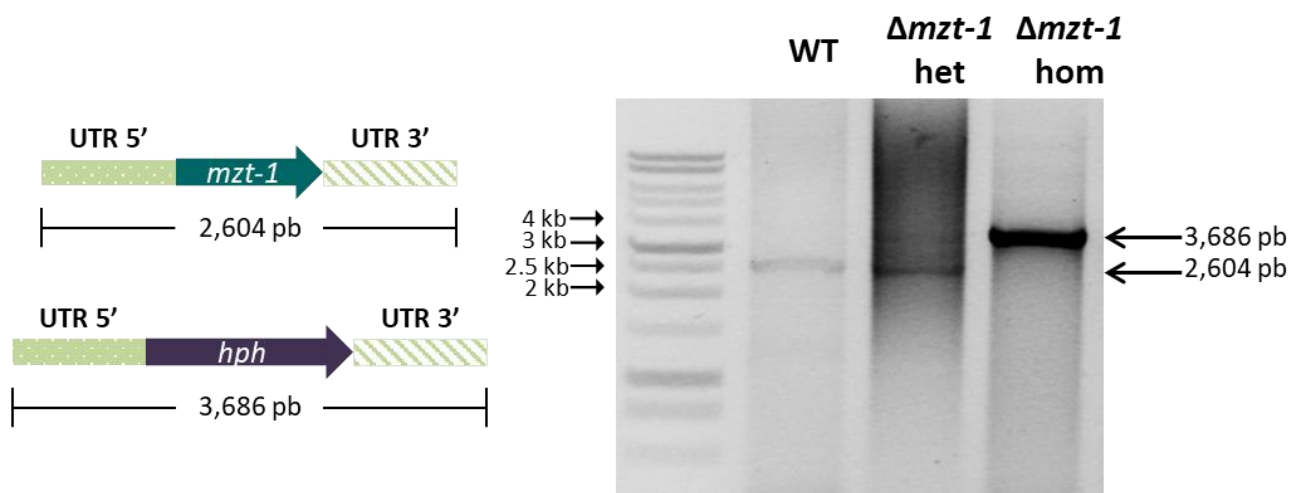


Figura 24. Corroboración por PCR de la sustitución de *mzt-1*. En el carril correspondiente a la WT se observa una banda de 2,604 pb que consiste del ORF de *mzt-1* más las dos regiones flanqueantes, mientras que en el carril de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ homocarión se observa una banda de 3,686 pb que corresponde al gen *hph* más las regiones flanqueantes. Para la cepa mutante heterocarión ($\Delta mzt-1^{het}$) se observan los dos fragmentos.

3.11 Fenotipo de *N. crassa* en ausencia de MZT-1

Con la finalidad de determinar si la ausencia del gen *mzt-1* afecta la morfología y el crecimiento vegetativo de *N. crassa*, se hicieron observaciones macroscópicas y microscópicas de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ y la WT, evaluándose la tasa de crecimiento, la producción de biomasa, la esporulación y la formación de ramificaciones.

3.11.1 Morfología colonial

Al observar la morfología macroscópica se encontró que las colonias de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ son más compactas y de menor tamaño en comparación con la cepa WT, después de 16 horas de crecimiento a 30°C (**Figura 25A**). Además, el margen de la colonia mostró que las hifas de la cepa mutante $\Delta mzt-1$, crecen de forma más ondulada y densa que las hifas de la cepa WT (**Figura 25B**).

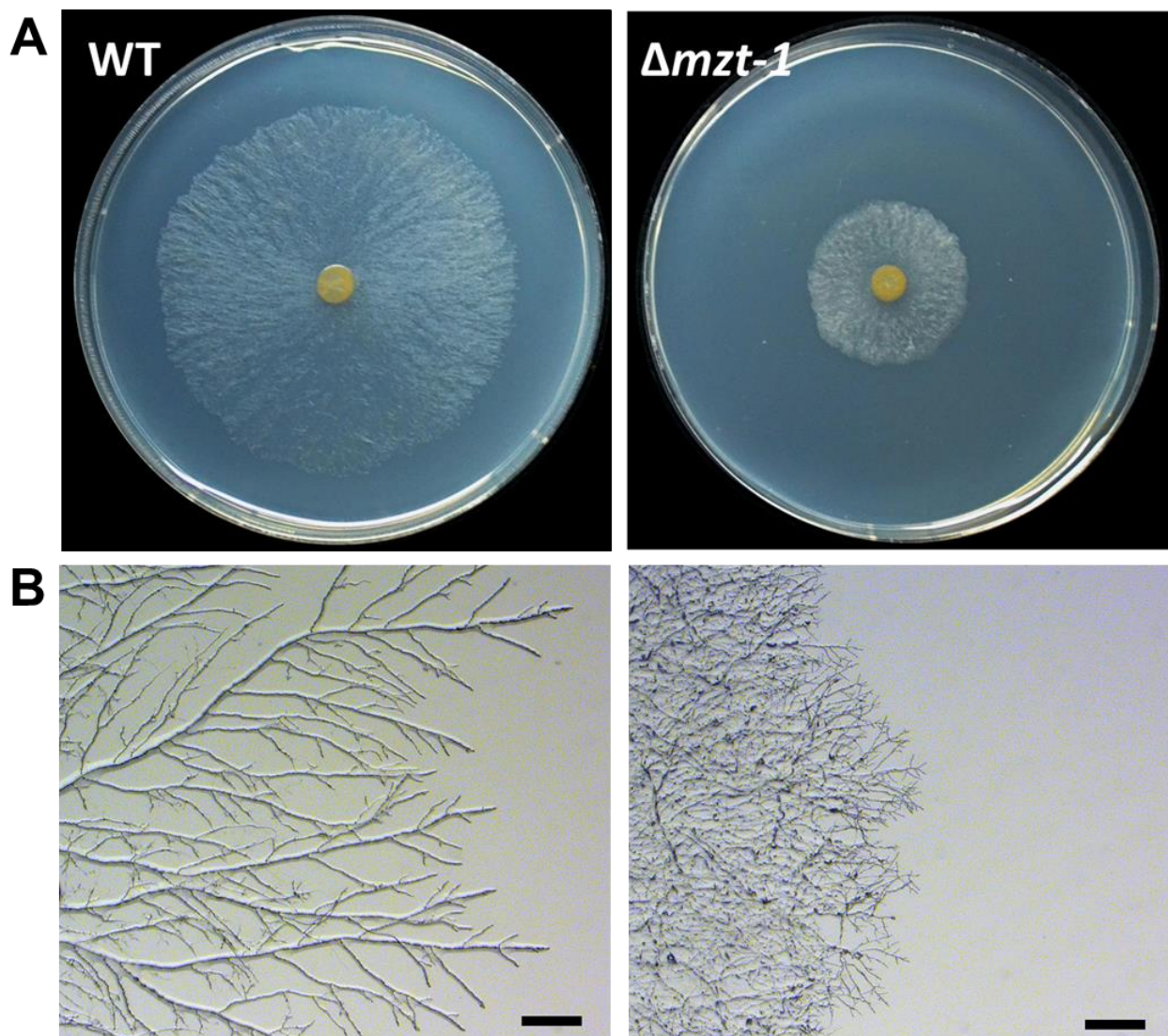


Figura 25. Morfología colonial de la cepa WT y la cepa mutante $\Delta mzt-1$. (A) Morfología colonial de las cepas WT y mutante $\Delta mzt-1$ después de 16 horas de crecimiento. (B) Margen de colonia de la cepa WT y mutante $\Delta mzt-1$. Barra de escala 500 μm .

3.11.2 Tasa de crecimiento y producción de biomasa

En la mutante $\Delta mzt-1$ la velocidad promedio de crecimiento fue de .10 cm/h, mientras que en la cepa WT fue de aproximadamente .3 cm/h, esto representa una disminución del 60.9% de la velocidad de crecimiento de la cepa mutante $\Delta mzt-1$ en comparación con la WT (**Figura 26A**). La cantidad de biomasa producida de la mutante $\Delta mzt-1$ durante 36 horas de cultivo fue de 93.7 mg mientras que la de la WT fue de 175.2 mg lo que indica que la mutante produce 46.5% menos biomasa que la WT (**Figura 26B**).

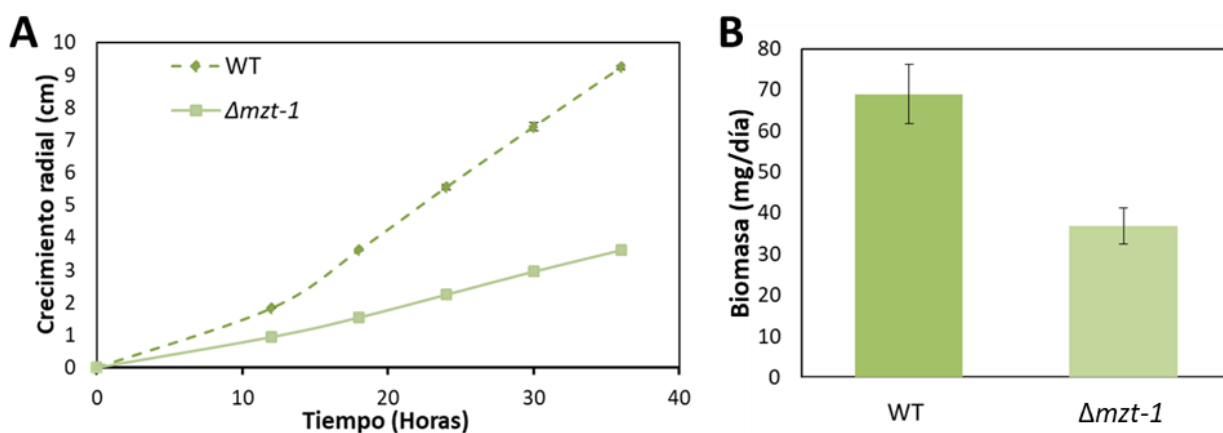


Figura 26. Tasa de crecimiento y producción de biomasa de las cepas WT y $\Delta mzt-1$. (A) Medición del crecimiento radial (cm) durante 36 horas. (B) Promedio de la producción de Biomasa (mg/día). Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

3.11.3 Tasa de ramificación y conidiación

El promedio del número de ramas dentro de los 500 μm de 30 hifas de la cepa WT fue de dos, mientras que en la cepa $\Delta mzt-1$ el promedio fueron cuatro ramas; que de acuerdo con las barras del intervalo de confianza al 95%, la diferencia fue significativa (**Figura 27A**). El promedio de conidios producidos por la cepa WT fue de 131×10^6 células/ mL, mientras que la cepa mutante $\Delta mzt-1$ produjo 91×10^6 células/ mL, después de 8 días de exposición a la luz (**Figura 27B**).

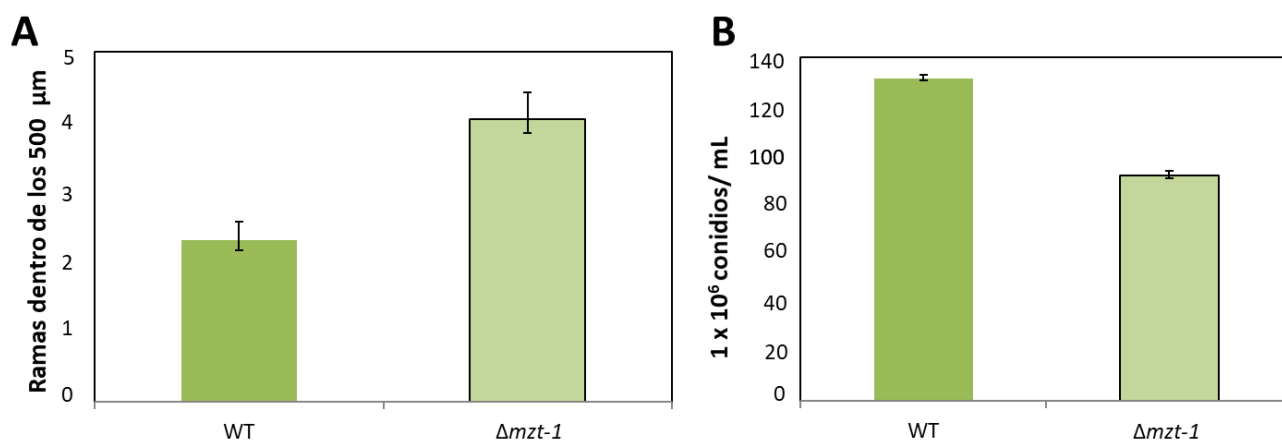


Figura 27. Tasa de ramificación y conidiación de las cepas WT y $\Delta mzt-1$. (A) Promedio de ramas dentro de los 500 μm $n=30$. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%. (B) Promedio de conidios producidos por la cepa WT y mutante $\Delta mzt-1$. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

Capítulo 4. Discusión

La composición y el funcionamiento de los MTOCs es un campo de investigación con muchas interrogantes, donde gracias al estudio en eucariotas como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, y el hongo filamentoso *A. nidulans* se han podido resolver muchas de las cuestiones más importantes (Oakley y Oakley, 1989; Jaspersen y Winey, 2004; Bestul et al. 2017) En este estudio se determinó la localización y la dinámica de la proteína de los MTOCs MZT-1 en los diferentes estadios del desarrollo de *N. crassa*. También se identificó la relación de MZT-1 con los núcleos, los MTs, la γ -Tubulina, y los componentes de la placa interna y externa del SPB (GRB y APS-2, respectivamente). Finalmente, se describió el efecto de la eliminación del gen *mzt-1* en el crecimiento y desarrollo de *N. crassa*.

4.1 Localización y dinámica de MZT-1

En la búsqueda de los ortólogos de Mzt1 de *S. pombe* y MztA de *A. nidulans* en *N. crassa*, se encontraron dos posibles candidatos, uno que consta de 80 (KHE87685.1) aminoácidos y otro de 325 aminoácidos (CAD70392.1), esto fue similar a las predicciones en *S. pombe* y *A. nidulans* en las que inicialmente se encontraron dos posibles proteínas (Masuda et al. 2013; Gao et al. 2019). En este estudio, se decidió trabajar con la versión corta, debido a que las secuencias de las proteínas ortólogas en *H. sapiens* (MOZART1), *S. pombe* (Mzt1), *A. thaliana* (GIP1a y GIP1b), *A. nidulans* (MztA) y *C. albicans* (CaMzt1) constan de 58-82 aminoácidos; además la versión corta (80 aa) mostró mayor porcentaje de identidad con sus ortólogos, y la dinámica y localización de esta versión de la proteína es similar a lo reportado previamente en sus ortólogos en otros organismos. En este trabajo se demostró que no hubo diferencia en la localización o la dinámica de MZT-1 cuando su expresión está regulada por el promotor *ccg-1* o por el promotor nativo. Además, se puede inferir que el etiquetado con la proteína mChFP o GFP no interfirió con la función de MZT-1, ya que las cepas que expresan a MZT-1-mChFP o MZT-1-GFP crecen como la cepa parental no etiquetada.

En todos los estadios del desarrollo de *N. crassa*, MZT-1-GFP se encontró localizada en los núcleos asociada a los SPBs; aquellos que mostraron un punto fluorescente, corresponden a núcleos en interfase, mientras que los que mostraron dos puntos fluorescentes, corresponden a núcleos en mitosis. La co-localización de MZT-1 con la γ -Tubulina en los núcleos y la localización de MZT-1 en los polos del huso mitótico,

corroboraron la asociación de MZT-1 con los SPBs en *N. crassa*. Este patrón de distribución es consistente con lo reportado previamente en sus ortólogos en *S. pombe*, *C. albicans* y *A. nidulans* (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013; Lin et al. 2016; Gao et al. 2019). Esto mismo se observó en líneas celulares HeLa de humanos, en donde MOZART1 (ortólogo de MZT-1) se asocia a los centrosomas, el equivalente funcional al SPB en animales, localizándose también en los polos del huso mitótico (Hutchins et al. 2010). Aunque las células vegetales carecen de un equivalente funcional al centrosoma/SPB, forman cuatro haces prominentes de MTs durante su ciclo celular; los MTs corticales, la banda preprofase, el huso mitótico y el fragmoplasma (Hamada, 2014). En *A. thaliana*, GIP1 (ortólogo de MZT-1) se acumula en la membrana nuclear durante la interfase, previo a la profase GIP1 marca débilmente la banda preprofase. Durante la anafase, al igual que MZT-1; GIP1 se distribuye hacia los polos del huso mitótico y en la telofase, esta proteína se localiza hacia los bordes distales del fragmoplasma (Nakamura et al. 2012). La distribución de GIP1 en este organismo es en su mayoría consistente con la localización de los componentes del complejo de la γ -Tubulina (Liu et al. 1994; Kong et al. 2010; Nakamura et al. 2010).

Adicionalmente a los SPBs, en *S. pombe*, Mzt1 se localiza en los iMTOCs durante la interfase y en el eMTOC durante la telofase, esta distribución es consistente con la localización de la γ -Tubulina y de las proteínas Alp4^{GCP2}, Alp6^{GCP3}, Gfh1^{GCP4}, Mob1p^{GCP5} y Alp16^{GCP6} (Horio et al. 1991; Venkatram et al. 2004; Vardy y Toda, 2000). En *A. nidulans*, MztA, se localiza en los SPBs y en los MTOCs asociados a los septos (Xiong y Oakley, 2009; Gao et al. 2019). En este hongo, las proteínas ApsB y Spa18, receptores del complejo de la γ -Tubulina en la cara citoplasmática del SPB, también se localizan en los sMTOCs. En *N. crassa*, al igual que en *A. nidulans*; APS-2 (ortólogo de ApsB) y SPA-18 (ortólogo de Spa18), se encuentran en los SPBs y los septos, lo que sugiere que estas estructuras están actuando como MTOCs en *N. crassa*. Sin embargo, cuando se realizó el marcaje de la γ -Tubulina con GFP esta solo se encontró localizada en los SPBs (Ramírez-Cota, 2008). En este trabajo, para validar la existencia de MTOCs independientes del núcleo en *N. crassa* se determinó la localización de MZT-1, una proteína altamente conservada que juega un papel importante en la activación del complejo de la γ -Tubulina (Lin et al. 2016). La ausencia de MZT-1 en el ápice de las hifas y los septos de *N. crassa*, sugiere que estos sitios no están actuando como MTOCs.

El SPB consiste de tres placas; una placa externa orientada hacia el citoplasma que polimeriza MTs citoplasmáticos y MTs astrales; una placa central embebida en la envoltura nuclear, y una placa interna orientada hacia el nucleoplasma que forma el huso mitótico (Jaspersen y Winey, 2004). En *A. nidulans*, MztA reside únicamente en la placa interna del SPB, en donde interactúa con el receptor PcpA. Curiosamente, solo la γ -Tubulina y las proteínas GCPB y GCPC se localizan en la placa externa, mientras que la γ -Tubulina y las proteínas GCPB-GCPF se han detectado en la placa interna de este hongo (Gao et

al. 2019). En este trabajo, para determinar la localización de MZT-1 en el SPB de *N. crassa*, se evaluó la co-localización de esta proteína con la GRB y la APS-2. Los resultados obtenidos sugieren que en *N. crassa*; al igual que en *A. nidulans*, MZT-1 reside únicamente en la placa interna del SPB. La localización diferencial de MZT-1/MztA en el SPB, podría deberse a un mayor requerimiento de MTs nucleares en comparación con MTs citoplasmáticos, ya que se ha propuesto que Mozart facilita el reclutamiento y la oligomerización del complejo de la γ -Tubulina (Lin et al. 2016; Dhani et al. 2013). La localización del γ -TuRC, únicamente en la placa interna del SPB en *A. nidulans*, apoya esta idea; ya que se demostró que el γ -TuRC posee una actividad de nucleación de MTs más potente que el γ -TuSC (Oegema et al. 1999). Sin embargo, la localización de los ortólogos de GCPB-GCPF de *A. nidulans* queda por establecerse en *N. crassa*.

4.2 Efecto de la ausencia de *mzt-1* en *N. crassa*

En *S. pombe* y *C. albicans*, la delección del gen *mzt1/MZT1* causa letalidad celular (Dhani et al. 2013; Masuda et al. 2013; Lin et al. 2016). En *A. nidulans*, *mztA* no es esencial, sin embargo, la delección de este gen genera defectos graves en la esporulación (Gao et al. 2019). En este estudio, para obtener mayor información sobre las funciones de MZT-1, se eliminó el ORF del gen *mzt-1* mediante recombinación homóloga, y se demostró que a diferencia de *S. pombe* y *C. albicans*, en *N. crassa* *mzt-1* no es esencial. Esto podría deberse a que otra(s) proteína(s) estén compensando la falta de MZT-1, es decir que tengan funciones redundantes. Aunque la ausencia de MZT-1 no es esencial, su eliminación causa defectos en la tasa de crecimiento, la producción de biomasa, la conidiación, la tasa de ramificación y la morfología colonial. La cepa mutante $\Delta mzt-1$ produce colonias de menor tamaño en comparación con la cepa WT. También presenta hifas más onduladas y compactas; las cuales tienen mayor cantidad de ramificaciones. Se vio afectada la producción de biomasa y el crecimiento radial. Además de afectar el desarrollo vegetativo, se demostró que la eliminación de MZT-1 produce defectos en la reproducción sexual, ya que la cepa mutante $\Delta mzt-1$ fue incapaz de producir ascosporas. Las cruces sexuales se realizaron utilizando a la cepa mutante $\Delta mzt-1$ como receptora y donadora, en ambos casos no hubo producción de ascas ni ascosporas. Esta es la primera evidencia en hongos filamentosos en la que se reporta que hay afecciones en la reproducción sexual en la ausencia de MZT-1.

Capítulo 5. Conclusiones

- Durante todos los estadios del desarrollo de *N. crassa* MZT-1 se encuentra asociada a los SPBs en donde co-localiza con la γ -Tubulina.
- En núcleos en mitosis, MZT-1 se localiza en los extremos del huso mitótico, corroborando su asociación con los SPBs y su función en la nucleación de los MTs.
- MZT-1 se encuentra ausente en el ápice y los septos de *N. crassa*, lo que sugiere la ausencia de MTOCs en estos sitios.
- *mzt-1* no es esencial, pero su ausencia causa defectos en el crecimiento de *N. crassa*.
- MZT-1 es esencial para el desarrollo sexual de *N. crassa*.

Literatura citada

- Adams, I. R., y Kilmartin, J. V. 1999. Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 809-823. doi: 10.1083/jcb.145.4.809
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., y Walter, P. 2014. *Essential cell biology*. Garland Science, New York.
- Baker, C. L., Loros, J. J., y Dunlap, J. C. 2012. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *Federation of European Microbiological Microbiology Reviews*, 36(1), 95-110.
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., y Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 153(1-2), 46-57. doi: 10.1007/BF01322464
- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: Outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. (pp. 29-58).
- Baum, P., Furlong, C., y Byers, B. 1986. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca²⁺-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(15), 5512-5516. doi:10.1073/pnas.83.15.5512
- Bestul, A. J., Yu, Z., Unruh, J. R., y Jaspersen, S. L. 2017. Molecular model of fission yeast centrosome assembly determined by superresolution imaging. *Journal of Cell Biology*, 216(8), 2409-2424. doi: 10.1083/jcb.201701041
- Biggins, S., y Rose, M. D. 1994. Direct interaction between yeast spindle pole body components: Kar1p is required for Cdc31p localization to the spindle pole body. *The Journal of Cell Biology*, 125(4), 843-852. doi: 10.1083/jcb.125.4.843
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., ... Pratt, R. 2004. Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-108. doi: 10.1128/mubr.68.1.1-108.2004
- Brachat, A., Kilmartin, J. V., Wach, A., y Philippsen, P. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* cells with defective spindle pole body outer plaques accomplish nuclear migration via half-bridge-organized microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 9(5), 977-991. doi: 10.1091/mbc.9.5.977
- Bugnard, E., Zaal, K. J., y Ralston, E. 2005. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 60(1), 1-13. doi: 10.1002/cm.20042
- Bullitt, E., Rout, M. P., Kilmartin, J. V., y Akey, C. W. 1997. The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell*, 89(7), 1077-1086. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80295-0
- Byers, B., y Goetsch, L. 1974. Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 38, 123-131. doi:10.1101/SQB.1974.038.01.016
- Byers, B., y Goetsch, L. 1975. Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 124(1), 511-523.
- Byers, B. 1981. Multiple roles of the spindle pole bodies in the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics in Yeast*, 16, 119-133
- Chen, X. P., Yin, H., y Huffaker, T. C. 1998. The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly. *The Journal of Cell biology*, 141(5), 1169-1179. doi: 10.1083/jcb.141.5.1169

- Chen, J. V., Buchwalter, R. A., Kao, L. R., y Megraw, T. L. 2017. A splice variant of centrosomin converts mitochondria to microtubule-organizing centers. *Current Biology*, 27(13), 1928-1940. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.090
- Chial, H. J., Rout, M. P., Giddings Jr, T. H., y Winey, M. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* Ndc1p is a shared component of nuclear pore complexes and spindle pole bodies. *The Journal of Cell Biology*, 143(7), 1789-1800. doi: 10.1083/jcb.143.7.1789
- Conduit, P. T., Wainman, A., y Raff, J. W. 2015. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(10), 611-624. doi: 10.1038/nrm4062
- Cota, R. R., Teixidó-Travesa, N., Ezquerra, A., Eibes, S., Lacasa, C., Roig, J., y Lüders, J. 2017. MZT1 regulates microtubule nucleation by linking γ TuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. *Journal of Cell Science*, 130(2), 406-419.
- Davis, R. H. 2000. *Neurospora*. Contributions of a Model Organism. O. U. Press, New York.
- Davis, R. H., Perkins, D. D. 2002. *Neurospora*: A model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3, 397-403. doi: 10.1038/nrg797
- Desai, A., y Mitchison, T. J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 83-117. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83
- Dhani, D. K., Goult, B. T., George, G. M., Rogerson, D. T., Bitton, D. A., Miller, C. J., Schwabe, J. W., y Tanaka, K. 2013. Mzt1/Tam4, a fission yeast MOZART1 homologue, is an essential component of the γ -tubulin complex and directly interacts with GCP3Alp6. *Molecular Biology of the Cell*, 24(21), 3337-3349. doi: 10.1091/mbc.e13-05-0253
- Ding, R., West, R. R., Morphew, D. M., Oakley, B. R., y McIntosh, J. R. 1997. The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Molecular biology of the cell*, 8(8), 1461-1479. doi: 10.1091/mbc.8.8.1461
- Donaldson, A. D., y Kilmartin, J. V. 1996. Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *The Journal of Cell Biology*, 132(5), 887-901. doi: 10.1083/jcb.132.5.887
- Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P. M., Andreyeva, N., ... y Yates III, J. R. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Developmental Cell*, 12(6), 917-930. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.002
- Ehrhardt, D. W., y Shaw, S. L. 2006. Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 859-875. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105329
- Elliott, S., Knop, M., Schlenstedt, G., y Schiebel, E. 1999. Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6205-6210. doi: 10.1073/pnas.96.11.6205
- Flory, M. R., Morphew, M., Joseph, J. D., Means, A. R., y Davis, T. N. 2002. Pcp1p, an Spc110p-related calmodulin target at the centrosome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 13(2), 47-58.
- Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U., y Read, N. D. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(10), 897-910. doi: 10.1016/j.fgb.2004.06.008
- Freitag, M., y Selker, E. U. 2005. Expression and visualization of red fluorescent protein (RFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter*, 52, 14.

- Gao, X., Schmid, M., Zhang, Y., Fukuda, S., Takeshita, N., y Fischer, R. 2019. The spindle pole body of *Aspergillus nidulans* is asymmetrical and contains changing numbers of γ -tubulin complexes. *Journal of Cell Science*, 132(24). doi: 10.1242/jcs.234799
- Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J., y Schiebel, E. 2000. Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 19(23), 6475-6488. doi: 10.1093/emboj/19.23.6475
- Hamada, T. 2014. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. In *International Review of Cell and Molecular Biology*. 312, pp. 1-52. Academic Press.
- Hickey, P. C., Jacobson, D. J., Read, N. D., y Glass, N. L. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 37(1), 109-119. doi: 10.1016/S1087-1845(02)00035-X
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., y Read, N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63-87.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K., y Yanagida, M. 1991. The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *Journal of Cell Science*, 99(4), 693-700.
- Howard, R. J., y Aist, J. R. 1977. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D 2 O. *Protoplasma*, 92(3-4), 195-210. doi: 10.1007/BF01279458
- Howard, R. J., y Aist, J. R. 1980. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *The Journal of cell biology*, 87(1), 55-64. doi: 10.1083/jcb.87.1.55
- Hutchins, J. R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Hériché, J. K., Sykora, M. M., Augsburg, M., Hudecz, O., Buschhorn, B. A., Bulkescher, J., Conrad, C., Comartin, D., Schleiffer, A., Sarov, M., Pozniakovsky, A., Slabicki, M. M., Schloissnig, S., Steinmacher, I., Leuschner, M., Ssykor, A., Lawo, S., Pelletier, L., Stark, H., Nasmyth, K., Ellenberg, J., Durbin, R., Buchholz, F., Mechtler, K., Hyman, A. A., Peters, M. 2010. Systematic Analysis of Human Protein Complexes Identifies Chromosome Segregation Proteins. *Science*, 328(5978), 593-599. doi: 10.1126/science.1181348
- Jacobs, C. W., Adams, A. E., Szaniszló, P. J., y Pringle, J. R. 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *The Journal of Cell Biology*, 107(4), 1409-1426. doi: 10.1083/jcb.107.4.1409
- Jaspersen, S. L., Giddings Jr, T. H., y Winey, M. 2002. Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *The Journal of Cell Biology*, 159(6), 945-956. doi.org/10.1083/jcb.200208169
- Jaspersen, S. L., y Winey, M. 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 1-28. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.022003.114106
- Jiang, K., y Akhmanova, A. 2011. Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(1), 94-101. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.008
- Kilmartin, J. V., Dyos, S. L., Kershaw, D., y Finch, J. T. 1993. A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body whose transcript is cell cycle-regulated. *The Journal of Cell Biology*, 123(5), 1175-1184. doi: 10.1083/jcb.123.5.1175

- Kilmartin, J. V., y Goh, P. Y. 1996. Spc110p: assembly properties and role in the connection of nuclear microtubules to the yeast spindle pole body. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 15(17), 4592-4602. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00837.x
- Kilmartin, J. V. 2003. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *The Journal of Cell Biology*, 162(7), 1211-1221. doi:10.1083/jcb.200307064
- Knop, M., y Schiebel, E. 1997. Spc98p and Spc97p of the yeast γ -tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 16(23), 6985-6995. doi: 10.1093/emboj/16.23.6985
- Knop, M., y Schiebel, E. 1998. Receptors determine the cellular localization of a γ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 17(14), 3952-3967. doi: 10.1093/emboj/17.14.3952
- Kollman, J. M., Polka, J. K., Zelter, A., Davis, T. N., y Agard, D. A. 2010. Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*, 466(7308), 879-882. doi: 10.1038/nature09207
- Li, S., Sandercock, A. M., Conduit, P., Robinson, C. V., Williams, R. L., y Kilmartin, J. V. 2006. Structural role of Sfi1p-centrin filaments in budding yeast spindle pole body duplication. *The Journal of Cell Biology*, 173(6), 867-877. doi: 10.1083/jcb.200603153
- Lin, T. C., Neuner, A., Flemming, D., Liu, P., Chinen, T., Jäkle, U., Arkowitz, R., y Schiebel, E. 2016. MOZART1 and γ -tubulin complex receptors are both required to turn γ -TuSC into an active microtubule nucleation template. *Journal of Cell Biology*, 215(6), 823-840. doi: 10.1083/jcb.201606092
- Lüders, J., y Stearns, T. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature reviews molecular cell biology*, 8(2), 161-167. doi: 10.1038/nrm2100
- Masuda, H., Mori, R., Yukawa, M., y Toda, T. 2013. Fission yeast MOZART1/Mzt1 is an essential γ -tubulin complex component required for complex recruitment to the microtubule organizing center, but not its assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 24(18), 2894-2906. doi: 10.1091/mbc.e13-05-0235
- McDaniel, D. P., y Roberson, R. W. 1998. γ -Tubulin is a component of the Spitzenkörper and centrosomes in hyphal-tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*, 203(1-2), 118-123. doi: 10.1007/BF01280594
- McKerracher, L. J., y Heath, I. B. 1987. Cytoplasmic migration and intracellular organelle movements during tip growth of fungal hyphae. *Experimental Mycology*, 11(2), 79-100. doi: 10.1016/0147-5975(87)90041-7
- Moens, P. B., y Rapport, E. 1971. Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *The Journal of Cell Biology*, 50(2), 344-361. doi: 10.1083/jcb.50.2.344
- Moritz, M., y Agard, D. A. 2001. γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), 174-181. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00187-1
- Mouriño-Pérez, R. R., Roberson, R. W., y Bartnicki-García, S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(6), 389-400. doi: 10.1016/j.fgb.2005.10.007
- Mouriño-Pérez, R. R., Linacre-Rojas, L. P., Román-Gavilanes, A. I., Lew, T. K., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., y Freitag, M. 2013. MTB-3, a Microtubule Plus-End Tracking Protein (+ TIP) of *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*, 8(8), e70655. doi: 10.1371/journal.pone.0070655

- Muñoz-Centeno, M. D. L. C., McBratney, S., Monterrosa, A., Byers, B., Mann, C., y Winey, M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* MPS2 encodes a membrane protein localized at the spindle pole body and the nuclear envelope. *Molecular Biology of the Cell*, 10(7), 2393-2406. doi: 10.1091/mbc.10.7.2393
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., y Hasebe, M. 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nature Cell Biology*, 7(10), 961-968. doi: 10.1038/ncb1306
- Nakamura, M., Yagi, N., Kato, T., Fujita, S., Kawashima, N., Ehrhardt, D. W., y Hashimoto, T. 2012. Arabidopsis GCP3-interacting protein 1/MOZART 1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *The Plant Journal*, 71(2), 216-225.
- Nguyen, T., Vinh, D. B., Crawford, D. K., y Davis, T. N. 1998. A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast γ -tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*, 9(8), 2201-2216. doi: 10.1091/mbc.9.8.2201
- Nogales, E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 277-302. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.277
- Noguchi, T., Koizumi, M., y Hayashi, S. 2012. Mitochondria-driven cell elongation mechanism for competing sperms. *Fly*, 6(2), 113-116. doi: 10.4161/fly.19862
- Oakley, C. E., y Oakley, B. R. 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338(6217), 662-664
- Oakley, B. R., Paolillo, V., y Zheng, Y. 2015. γ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Molecular Biology of the Cell*, 26(17), 2957-2962. doi: 10.1091/mbc.E14-11-1514
- Oddoux, S., Zaal, K. J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S. A., Reid, E., y Ralston, E. 2013. Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *Journal of Cell Biology*, 203(2), 205-213. doi: 10.1083/jcb.201304063
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O. C., Milligan, R. A., Iwamatsu, A., Mitchison, T. J., y Zheng, Y. 1999. Characterization of two related *Drosophila* γ -tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology*, 144(4), 721-733.
- O'Toole, E. T., Winey, M., y McIntosh, J. R. 1999. High-voltage electron tomography of spindle pole bodies and early mitotic spindles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(6), 2017-2031. doi: 10.1091/mbc.10.6.2017
- Petry, S., y Vale, R. D. 2015. Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nature Cell Biology*, 17(9), 1089-1093. doi: 10.1038/ncb3220
- Ramírez-Cota, R. M. 2008. Análisis funcional y dinámica de la proteína γ -Tubulina en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Baja California. 63 pp.
- Ramírez-Cota, R. M. 2010. Localización y dinámica de las proteínas GRB y APS-1 durante la división nuclear en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Maestría en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 99 pp.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R., Takeshita, N., y Fischer, R. 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2). doi: 10.1128/MMBR.00068-17
- Robinow, C. F., y Marak, J. 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *Journal of Cell Biology*, 29(1), 129-151. doi: 10.1083/jcb.29.1.129

- Roche, C. M., Loros, J. J., McCluskey, K., y Glass, N. L. 2014. *Neurospora crassa*: looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany*, 101(12), 2022-2035. doi: 10.3732/ajb.1400377
- Roof, D. M., Meluh, P. B., y Rose, M. D. 1992. Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, 118(1), 95-108. doi: 10.1083/jcb.118.1.95
- Rose, M. D., y Fink, G. R. 1987. KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell*, 48(6), 1047-1060. doi:10.1016/0092-8674(87)90712-4
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Samejima, I., Miller, V. J., Groocock, L. M., y Sawin, K. E. 2008. Two distinct regions of Mto1 are required for normal microtubule nucleation and efficient association with the γ -tubulin complex in vivo. *Journal of Cell Science*, 121(23), 3971-3980. doi: 10.1242/jcs.038414
- Sánchez-Huertas, C., Freixo, F., Viais, R., Lacasa, C., Soriano, E., y Lüders, J. 2016. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nature communications*, 7(1), 1-14. Doi:
- Sawin, K. E., Lourenco, P. C., y Snaith, H. A. 2004. Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-Related Protein mod20p. *Current Biology*, 14(9), 763-775. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.042
- Sawin, K. E., y Tran, P. T. 2006. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast*, 23(13), 1001-1014. doi: 10.1002/yea.1404
- Schaerer, F., Morgan, G., Winey, M., y Philippsen, P. 2001. Cnm67p is a spacer protein of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body outer plaque. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2519-2533. doi: 10.1091/mbc.12.8.2519
- Schmit, A. C. 2002. Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *International Review of Cytology*, 220, 257-289. Academic Press. doi: 10.1016/S0074-7696(02)20008-X
- Schramm, C., Elliott, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., y Schiebel, E. 2000. The Bbp1p–Mps2p complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication. *The European Molecular Biology Organization journal*, 19(3), 421-433. doi:10.1093/emboj/19.3.421
- Soues, S., y Adams, I. R. 1998. SPC72: a spindle pole component required for spindle orientation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 111(18), 2809-2818.
- Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M., y Schiebel, E. 1993. The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *The Journal of Cell Biology*, 123(2), 405-416. doi: 10.1083/jcb.123.2.405
- Spang, A., Courtney, I., Grein, K., Matzner, M., y Schiebel, E. 1995. The Cdc31p-binding protein Kar1p is a component of the half bridge of the yeast spindle pole body. *The Journal of Cell Biology*, 128(5), 863-877. doi: 10.1083/jcb.128.5.863
- Spang, A., Grein, K., y Schiebel, E. 1996. The spacer protein Spc110p targets calmodulin to the central plaque of the yeast spindle pole body. *Journal of Cell Science*, 109(9), 2229-2237.
- Springer, M. L., y Yanofsky, C. 1989. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes and Development*, 3(4), 559-571.
- Stirling, D. A., Welch, K. A., y Stark, M. J. 1994. Interaction with calmodulin is required for the function of Spc110p, an essential component of the yeast spindle pole body. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 13(18), 4329-4342. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06753.x

- Sundberg, H. A., Goetsch, L., Byers, B., y Davis, T. N. 1996. Role of calmodulin and Spc110p interaction in the proper assembly of spindle pole body components. *The Journal of Cell Biology*, 133(1), 111-124. doi: 10.1083/jcb.133.1.111
- Sundberg, H. A., y Davis, T. N. 1997. A mutational analysis identifies three functional regions of the spindle pole component Spc110p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 8(12), 2575-2590. doi: 10.1091/mbc.8.12.2575
- Tassin, A. M., Paintrand, M., Berger, E. G., y Bornens, M. 1985. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 101(2), 630-638. doi: 10.1083/jcb.101.2.630
- Teixidó-Travesa, N., Villén, J., Lacasa, C., Bertran, M. T., Archinti, M., Gygi, S. P., Caelles, C., Roig, J., y Lüders, J. 2010. The γ TuRC Revisited: A comparative analysis of interphase and mitotic human γ TuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8. *Molecular Biology of the Cell*, 21(22), 3963-3972. doi: 10.1091/mbc.e10-05-0408
- Teixidó-Travesa, N., Roig, J., y Lüders, J. 2012. The where, when and how of microtubule nucleation—one ring to rule them all. *Journal of Cell Science*, 125(19), 4445-4456. doi: 10.1242/jcs.106971
- Usui, T., Maekawa, H., Pereira, G., y Schiebel, E. 2003. The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 22(18), 4779-4793. doi: 10.1093/emboj/cdg459
- Vallen, E. A., Scherson, T. Y., Roberts, T., van Zee, K., y Rose, M. D. 1992. Asymmetric mitotic segregation of the yeast spindle pole body. *Cell*, 69(3), 505-515. doi: 10.1016/0092-8674(92)90451-H
- Vallen, E. A., Ho, W., Winey, M., y Rose, M. D. 1994. Genetic interactions between CDC31 and KAR1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 137(2), 407-422.
- Vardy, L., y Toda, T. 2000. The fission yeast γ -tubulin complex is required in G1 phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *The European Molecular Biology Organization journal*, 19(22), 6098-6111.
- Venkatram, S., Tasto, J. J., Feoktistova, A., Jennings, J. L., Link, A. J., y Gould, K. L. 2004. Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast γ -tubulin complex function. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2287-2301. doi: 10.1091/mbc.e03-10-0728
- Vinh, D. B., Kern, J. W., Hancock, W. O., Howard, J., y Davis, T. N. 2002. Reconstitution and characterization of budding yeast γ -tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1144-1157. doi: 10.1091/mbc.02-01-0607
- Gelfand, V. I., y Bershinsky, A. D. 1991. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annual review of cell biology*, 7(1), 93-116.
- Weil, C. F., Oakley, C. E., y Oakley, B. R. 1986. Isolation of mip (microtubule-interacting protein) mutations of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 6(8), 2963-2968. doi: 10.1128/MCB.6.8.2963
- Westergaard, M., y Mitchell, H. K. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10), 573-577.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., y Byers, B. 1991. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *The Journal of Cell Biology*, 114(4), 745-754. doi: 10.1083/jcb.114.4.745

- Winey, M., Hoyt, M. A., Chan, C., Goetsch, L., Botstein, D., y Byers, B. 1993. NDC1: a nuclear periphery component required for yeast spindle pole body duplication. *The Journal of Cell Biology*, 122(4), 743-751. doi: 10.1083/jcb.122.4.743
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., y Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973-981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001
- Zekert, N., Veith, D., y Fischer, R. 2010. Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryotic cell*, 9(5), 795-805. doi: 10.1128/EC.00058-10
- Zhang, Y., Gao, X., Manck, R., Schmid, M., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Osmani, S., Takeshita, N., y Fischer, R. 2017. Microtubule-organizing centers of *Aspergillus nidulans* are anchored at septa by a disordered protein. *Molecular Microbiology*, 106(2), 285-303. doi: 10.1111/mmi.13763
- Zhu, X., Hu, R., Brissova, M., Stein, R. W., Powers, A. C., Gu, G., y Kaverina, I. 2015. Microtubules negatively regulate insulin secretion in pancreatic β cells. *Developmental Cell*, 34(6), 656-668. doi: 10.1016/j.devcel.2015.08.020
- Zimmerman, S., y Chang, F. 2005. Effects of γ -Tubulin complex proteins on microtubule nucleation and catastrophe in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 16(6), 2719-2733. doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0676

Anexos

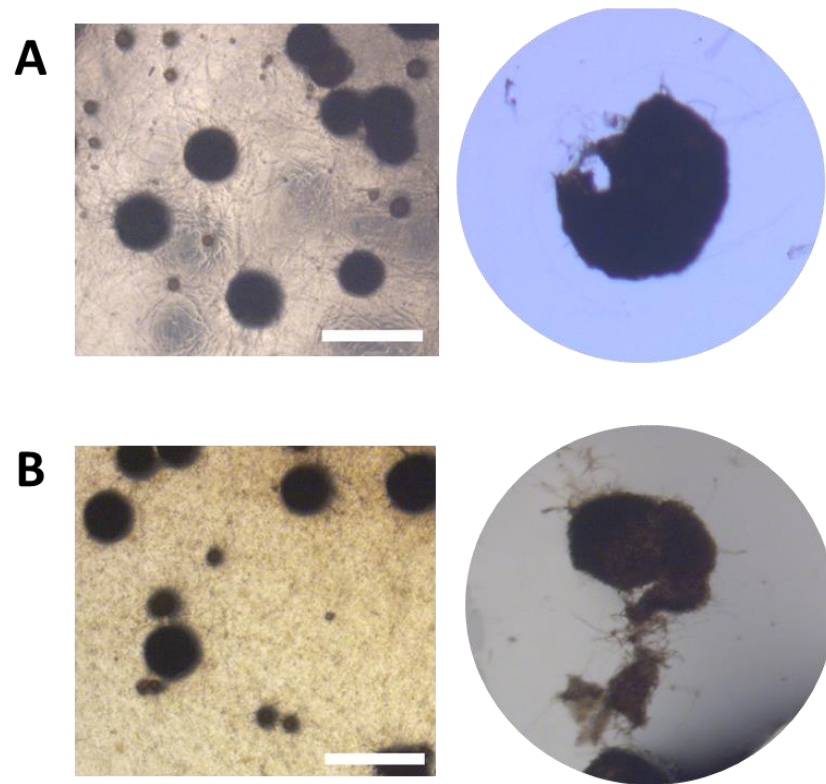


Figura 28. Peritecios falsos. (A) Protoperitecios derivados de la cruza sexual donde se utilizó a la cepa mutante $\Delta mzt-1$ como donadora. **(B)** Protoperitecios derivados de la cruza sexual donde se utilizó a la cepa mutante $\Delta mzt-1$ como receptora. En ambos casos los peritecios no contenían ascosporas. Barra de escala 1 mm.