

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

**Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-2 y su papel en el
crecimiento polarizado en *Neurospora crassa***

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

Presenta:

Ivan Murillo Corona

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Ivan Murillo Corona

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa R. Mouriño Pérez
Directora de tesis

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Josué Álvarez Borrego



Dra. Clara Elizabeth Galindo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la
Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ivan Murillo Corona © 2017

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

Resumen de la tesis que presenta **Ivan Murillo Corona** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-2 y su papel en el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa R. Mouriño Pérez
Directora de tesis

La asimetría de fosfolípidos de las membranas es una topología importante para la formación de vesículas en el tráfico vesicular. La producción de curvatura en la membrana parece ser una fuerza impulsora para la formación de vesículas. Las proteínas involucradas en la translocación de fosfolípidos a través de la membrana para producir la asimetría son miembros de la familia de las flipasas. Estas son proteínas ATPasas tipo P4 que producen un cambio en la carga y composición de la cara interior de la membrana. En este trabajo, se estudió DNF-2, que es una flipasa de aminofosfolípidos, presuntamente responsable del mantenimiento de la asimetría de la membrana, en *Neurospora crassa*. Se obtuvo una mutante por delección del gen *dnf-2* (NCU00352) y una cepa que expresaba la proteína quimérica DNF-2-GFP para evaluar su dinámica y localización en células de *N. crassa*. DNF-2-GFP se localizó en el núcleo del Spitzenkörper, similar a la localización de las quitina sintasas, pero estaba ausente en los septos. Mutantes $\Delta dnf-2$ presentaban una reducción del crecimiento de 42.4% en comparación con la cepa silvestre (WT). En la cepa mutante la conidiación fue afectada. Esta cepa producía solo un 50.1% de los conidios producidos por la cepa WT. Además las células de la mutante $\Delta dnf-2$ presentaron un crecimiento hifal caracterizado por periodos de polarización, intercalados con periodos de crecimiento isotrópico. Se observó que el Spitzenkörper era inestable y se dividía. La división del Spitzenkörper producía ramificaciones apicales. Estos resultados sugieren que DNF-2, no es esencial pero está involucrada en la estabilidad del Spitzenkörper y en el crecimiento celular.

Palabras clave: Flipasas, *Neurospora crassa*, membrana, secreción.

Abstract of the thesis presented by **Ivan Murillo Corona** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology

Dynamics of the flippase of phospholipids DNF-2 and its role in polarized growth in *Neurospora crassa*.

Abstract approved by:

Dr. Rosa R. Mouriño Pérez
Thesis Director

Phospholipid membrane asymmetry is an important topography feature for vesicle formation in vesicle traffic. The production of a curvature in the membrane seems to be a driving force for vesicle formation. Flippases are involved in these phospholipids translocation to the cytosolic leaflet of the membrane. These proteins are P-Type 4 ATPases that produce a shift in the charge and composition of the inner leaflet of the membrane. In this work DNF-2, a putative aminophospholipid flippase responsible for the maintenance of the asymmetry of the membrane, was studied in *Neurospora crassa*. A *dnf-2* (NCU00352) gene deletion mutant and a strain expressing the chimeric protein DNF-2-GFP to assess its dynamic and organization in living cells of *N. crassa*. DNF-2-GFP was localized in the core of the Spitzenkörper, similar to the localization of chitin synthases, but it is completely absent in septa. The $\Delta dnf-2$ mutant had a growth rate reduction of 42.34% in comparison with the wild type (WT) strain. Conidiation was affected, producing only 50.1% of the total conidia produced by WT. Cells of the $\Delta dnf-2$ mutant showed a distorted hyphal morphology with growth intercalating periods of polarized growth and periods of isotropic growth. The Spitzenkörper was unstable and divided frequently giving rise to apical branches. These results suggest that DNF-2 is not essential, but is involved in Spitzenkörper stability and cell growth.

Keywords: Flippases, *Neurospora crassa*, membrane, secretion.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis abuelos

María y Francisco

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca y el apoyo económico necesario para realizar este proyecto. Al CICESE por aceptarme en uno de sus posgrados.

A la Doctora Rosa R. Mouriño Pérez por aceptarme como su estudiante de maestría, ser la directora de mi proyecto de tesis y darme confianza cuando más lo necesitaba.

A mis sinodales, Dra. Meritxell Riquelme Pérez y Dr. Josué Álvarez Borrego por sus observaciones para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Salomón Bartnicki-García por interesarse en mi trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio Mouriño: la Doctora Olga Alicia Callejas, Ariane Ramírez, Fausto Villavicencio, a Marisela Garduño, al Doctor Fernando Lara Rojas y al Doctor “Candido” Fernando que me enseñaron todo lo que necesité saber y me guiaron durante mis experimentos sin importar qué tan obstinado fuí.

A mis compañeros de posgrado del Departamento de Microbiología: a Anayatzin Aguilar, Adriana Rico, Leonora Martínez, Pamela Ocampo, Tetoy Blancket, Rocío del Carmen Navarro, Leobardo Pérez por ser una segunda familia y hacer los días agradables.

Al Dr. Bryan Shaw del Departamento de Plant Pathology en Texas A&M y su laboratorio, Brigitte Bommer, Blake Commer, Zach Schultzhaus, a su esposa Janna Schultzhaus y a Eli James Borrego por recibirme en su equipo de trabajo durante mi estancia en College Station y dejarme ser parte de sus vidas.

A mis compañeros de generación en la Maestría en Ciencias de la Vida, especialmente a Briseida Covarrubias, Dulce Alarcón y Lupita Ruíz por ser mis compañeros durante mi estancia en CICESE.

A la Dra. Graciela Guerra Rivas y la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez de la UABC por la formación académica y la ayuda que me brindaron para seguir con mis estudios después de la carrera.

Al personal del Departamento de Microbiología: Melisa Corral, Guillermo Gonzáles y la Señora Patricia por brindarnos su apoyo en las diversas tareas del departamento y del posgrado.

A mi mamá, mi papá y mi hermana quienes estuvieron y han estado conmigo, y que hemos pasado por muchas cosas durante este último par de años.

Y finalmente a mis abuelos, María Sahara Ortiz y Francisco Corona que en paz descansen. Quienes dieron la confianza para comenzar esta maestría y a quienes dedico este trabajo.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1 Hongos filamentosos.....	3
2.2 Crecimiento polarizado y el Spitzenkörper	4
2.3 Proceso de secreción y membrana plasmática.....	5
2.3.1 Proceso de secreción	5
2.3.2 Topología de membrana	5
2.5 Flipasas	7
2.5.1 Flipasas en hongos	9
Capítulo 3. Justificación	10
Capítulo 4. Hipótesis	11
Capítulo 5. Objetivos	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 6. Metodología	13
6.1 Cepas y plásmidos utilizados.....	13
6.2 Medios de cultivo.....	15
6.3 Cuantificación de la tasa de elongación.....	16
6.4 Morfología de colonia y borde de la colonia.....	16
6.5 Cuantificación de producción de conidios	17
6.6 Cuantificación de frecuencia de ramificación	17
6.7 Cuantificación de producción de biomasa	18
6.8 Cruzas	18
6.9 Etiquetamiento de DNF-2 con GFP	19
6.10 Medición de producción de hifas aéreas	19
6.11 Microscopía confocal de escaneo láser	20
Capítulo 7. Resultados	21
7.1 Análisis bioinformático de DNF-1 y DNF-2.....	21
7.2 Localización de DNF-2-GFP.....	25
7.2.1 Localización de DNF-2-GFP en hifas maduras.....	25
7.2.2 Localización de DNF-2-GFP y CHS-1-mChFP.....	27
7.3 Fenotipo de las mutantes por delección de los genes <i>dnf-1</i> y <i>dnf-2</i>	29
7.3.1 Corroboración de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$	29

7.3.1 Morfología de las colonias y las hifas de las mutantes Δ dnf-1 y Δ dnf-2.....	30
7.3.2 Tasa de elongación y crecimiento de las mutantes Δ dnf-1 y Δ dnf-2 en <i>N. crassa</i>	32
7.3.3 Formación de ramificaciones en las mutantes Δ dnf-1 y Δ dnf-2 de <i>N. crassa</i>	33
7.3.4 Cuantificación de producción de conidios.....	35
7.3.5 Dinámica del Spitzenkörper en hifas maduras de la cepa Δ dnf-2	36
7.3.6 Comportamiento del citoesqueleto de actina en la mutante Δ dnf-2.....	39
Capítulo 8. Discusión	41
Capítulo 9. Conclusiones	44
Literatura citada	45

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diagrama del sistema de asimetría de membrana.....	7
2	Diagrama de la estructura de la flipasa Dnf1 de <i>S. cerevisiae</i>	8
3	Diagrama de los oligonucleótidos utilizados en este estudio para amplificar los genes <i>dnf-1</i> y <i>dnf-2</i>	15
4	Esquema de los dominios de la DNF-1 y DNF-2 de <i>Neurospora crassa</i>	23
5	Predicción bioinformática de la estructura tridimensional de (A) DNF-1 y (C) DNF-2, y localización hipotética de los dominios transmembranales (B) de DNF-1 y (D) de DNF-2.....	24
6	Alineamiento de la secuencia proteica de DNF-1 y DNF-2 alineadas a la secuencia de su respectiva proteína homóloga en <i>S. cerevisiae</i>	24
7	Localización de DNF-2-GFP en hifas maduras. DNF-2-GFP (verde) se localiza como un punto en el centro del Spitzenkörper teñido con FM4-64 (rojo).	26
8	Serie de tiempo de DNF-2-GFP: La cabeza de flecha denota una partícula fluorescente que se acerca al Spitzenkörper	27
9	Localización de DNF-2-GFP y CHS-1-mChFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	28
10	Corroboración del genotipo de las mutantes por delección.	29
11	Morfología de la colonia de las cepas $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ después de 12h de crecimiento.	30
12	Imagen del borde de la colonia de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y cepa WT.....	31
13	Morfología de las hifas de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT.....	32
14	Análisis de elongación y biomasa de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT.....	33
15	Producción de hifas aéreas en mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT.....	34
16	Frecuencia de ramas producidas de las mutantes $\Delta dnf-2$ y $\Delta dnf-1$	35
17	Producción de conidios de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$	36
18	Serie de tiempo del comportamiento del Spitzenkörper teñido con FM4-64 en las hifas de la mutante $\Delta dnf-2$	38
19	Trayectoria del Spitzenkörper en la cepa $\Delta dnf-2$ y WT, panel derecho corresponde a la gráfica comparativa de la posición del Spitzenkörper de una serie de tiempo....	39
20	Serie de tiempo de una hifa de la cepa $\Delta dnf-2$ expresando Lifeact etiquetada con GFP teñida con FM464.	40

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas utilizadas.	13
2	Plásmidos utilizados.	14
3	Oligonucleótidos utilizados.	14
4	Porcentaje de identidad entre las flipasas de <i>N. crassa</i> y <i>S. cerevisiae</i>	22
5	Porcentaje de identidad entre las flipasas de <i>N. crassa</i> y <i>A. nidulans</i>	22g
6	Porcentaje de identidad entre las flipasas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. nidulans</i>	22

Capítulo 1. Introducción

La unidad básica de los hongos filamentosos es una célula de forma tubular conocida como hifa. Al conjunto de hifas que forman una colonia se le denomina micelio. Para que las hifas tengan forma tubular, los hongos presentan dos estrategias de crecimiento: el crecimiento intercalar donde el material nuevo es agregado en las laterales de la hifa a cierta distancia de la punta, este tipo de crecimiento se observa en basidiomicetos y en el género *Epichloë* de ascomicetos (Jersild *et al.*, 1967; Voisey, 2010); y el crecimiento polarizado, que ocurre exclusivamente en el ápice y es el crecimiento que predomina en la mayoría de los hongos filamentosos. Para que el crecimiento polarizado sea posible, es necesario un centro suministrador de vesículas situado en el ápice de cada hifa (Bartnicki-García *et al.*, 1989, 1995). Este centro corresponde a un cúmulo de vesículas de diferentes tamaños y composiciones que se ha denominado Spitzenkörper (Girbardt, 1957; Howard, 1981). Se cree que éste tiene un papel fundamental en la dirección del crecimiento y en la morfología de las hifas (Bartnicki-García *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1998, 2011). Las vesículas dentro del Spitzenkörper están divididas en dos poblaciones: una en el núcleo que corresponde a las microvesículas que acarrean diferentes clases de quitina sintasas, mientras que en la capa que rodea este núcleo, se localizan las macrovesículas encargadas del transporte de glucano sintasas principalmente (Riquelme *et al.*, 2007; Riquelme y Sánchez-León, 2014; Sánchez-León *et al.*, 2011; Verdín *et al.*, 2009). El crecimiento polarizado depende de una secreción dirigida y constante de las vesículas para la extensión de los límites de la hifa, es decir, de la membrana plasmática y la pared celular.

La ruta de secreción así como la maquinaria molecular involucrada en el crecimiento, está conservada en hongos y animales (Ellgaard, 1999; Lord *et al.*, 2011; Seaman, 2008). En levaduras, el material es transportado desde el retículo endoplasmático (RE), a través de vesículas compuestas de membrana del organelo donador donde el material transportado o cargo, puede estar embebido en la membrana o ser acarreado en el lumen. Las vesículas se forman a partir de curvaturas de la membrana donadora, para ser escindidas y moverse a través del citoplasma, hasta llegar a la membrana receptora del aparato de Golgi y anclarse. El contenido de la vesícula progresa a través de las cisternas de Golgi, hasta llegar a las cisternas trans-Golgi, donde se forman vesículas asistidas por una cubierta de clatrina para ser transportada a su destino final, que puede ser la membrana plasmática o la vacuola (Bonifacino y Glick, 2004; Lord *et al.*, 2011; Pelham y Rothman, 2000).

Según el modelo del mosaico fluido, la membrana celular es una bicapa de fosfolípidos dispuestos de manera opuesta con proteínas embebidas. Este arreglo, puede desplazarse libremente de manera lateral, sin embargo, para que los fosfolípidos o proteínas puedan atravesar la membrana, se requiere una inversión de energía, lo cual resulta en un proceso energéticamente desfavorable poco frecuente. La conformación de la membrana (curvatura y composición química), son factores importantes en la biogénesis de las vesículas de transporte anterógrado y retrógrado. Las balsas lipídicas (esfingolípidos, fosfoinosítidos y aminofosfolípidos) son regiones con una composición distinta al resto de la membrana enriquecidas con moléculas que se aglutinan de manera autónoma y son insolubles en detergentes (Simons y Ikonen, 1997). Se ha observado que son importantes en el tráfico vesicular y clasificación de proteínas para su transporte. Existe evidencia que otro grupo de fosfolípidos conocidos como aminofosfolípidos, sirven como punto de referencia para inducir la asociación de proteínas involucradas en distintos procesos celulares; por ejemplo, la fosfatidilserina que propicia la asociación de efectores potenciales como Rab-GTPasas o Arf-GAP (Das *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). En las células los aminofosfolípidos se encuentran en concentraciones distintas en ambos lados de la membrana, generando una asimetría, debido a la acción de proteínas translocadoras llamadas flipasas, las cuales pertenecen a la superfamilia de ATPasas Tipo-P IV.

Se han identificado las flipasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se ha descrito su localización, así como los fenotipos de las mutantes por delección o condicionales de cada una de estas flipasas (Alder-Baerens *et al.*, 2006; Catty *et al.*, 1997; Gall *et al.*, 2002; Hanamatsu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2006). En hongos filamentosos se identificaron los homólogos de las flipasas de *S. cerevisiae*, DnfA, DnfB, DnfC y DnfD y se describió la localización y dinámica de DnfA y DnfB (Schultzhaus *et al.*, 2015).

Sin embargo, no existen estudios sobre las flipasas en *Neurospora crassa*. En el presente trabajo se etiquetó a la flipasa homóloga a Drs2 de *S. cerevisiae* utilizando la proteína fluorescente GFP. Se estudió su localización y dinámica con la ayuda de microscopía confocal de escaneo láser, y se observó el efecto que tiene la mutación por delección del gen de esta flipasa ($\Delta dnf-2$) en *N. crassa*. Este organismo, es un hongo filamentosos que ha sido utilizado como modelo para el crecimiento polarizado, gracias a que su manipulación genética es relativamente sencilla, crece rápidamente y su tamaño es útil para la microscopía, entre otras características.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas saprófitos o descomponedores de materia muerta. Este grupo incluye especies importantes de patógenos de plantas y animales (Sexton y Howlett, 2006; Sharon y Shlezinger, 2013). Los hongos también son utilizados en la industria textil, alimenticia y farmacéutica (Kashyap *et al.*, 2001; Schmidt, 2011). Son organismos que poseen diversas morfologías y estrategias tróficas y reproductivas. Algunos hongos tienen una morfología celular denominada hifa (Deacon, 2005), la cual es similar a la de los pelos radiculares o los tubos de polen de las plantas, siendo esta una de las principales características de los hongos filamentosos.

Las hifas son estructuras celulares alargadas de forma tubular que se extienden polarizadamente desde la punta, ramificando de manera lateral ocasionalmente (Reinhardt, 1892; Riquelme, 2013). Pueden estar segmentadas por barreras celulares transversales llamadas septos, que varían en distribución y morfología según el phylum. Como en el caso de los hongos ascomicetos *A. nidulans* y *N. crassa*, donde los septos se distribuyen en intervalos regulares a lo largo de la hifa (Clutterbuck, 1970; Shatkin y Tatum, 1959). Por otro lado, existen hongos filamentosos, como los anteriormente clasificados como Zygomycota, que tienen un micelio cenocítico (carecen de septos).

El extremo anterior de los hongos filamentosos conocido como ápice, es una terminal semielipsoidal donde se observa una gran actividad biológica. En el organismo *Mucor rouxii*, demostraron con experimentos autoradiográficos (Bartnicki-García y Lippman, 1969), que la síntesis de pared nueva en hongos filamentosos se concentra en el ápice en un gradiente hacia las zonas más antiguas de la hifa (Peberdy *et al.*, 2001; Wösten *et al.*, 1991). También se ha observado que la maquinaria asociada a la endocitosis, se localiza en una zona llamada collar endocítico en la región subapical muy cercana al ápice (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Berepiki *et al.*, 2010; Echauri-Espinosa *et al.*, 2012; Peñalva, 2010).

2.2 Crecimiento polarizado y el Spitzenkörper

El crecimiento polarizado es a la extensión de una zona específica en la célula, al contrario del crecimiento isotrópico, en el cual la célula se expande en todas direcciones. En la mayoría de los hongos filamentosos, el crecimiento polarizado confiere la forma tubular a la hifa. Los hongos filamentosos crecen polarizadamente desde el momento en el que la unidad reproductiva (espora) determina uno o más sitios para iniciar la extensión de la célula, romper la simetría y continuar el crecimiento durante el desarrollo vegetativo, para formar lo que se conoce como micelio. El crecimiento polarizado es promovido por un suministro constante de vesículas, en las que se transporta material que llega al sitio de crecimiento para formar nueva pared. La evidencia señala, que estas vesículas son transportadas desde la zona posterior hacia el ápice de las hifas por las proteínas motoras que transitan por el citoesqueleto de microtúbulos (McDaniel y Roberson, 2000; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006; Riquelme, 2013), para después ser acumuladas en una estructura, muy cercana al ápice denominada Spitzenkörper (del alemán: Spitzen=apical, körper=cuerpo). El Spitzenkörper, fue descrito y nombrado por primera vez en el basidiomiceto *Coprinus* sp. (Brunswick, 1924) y posteriormente observado y descrito en diversas especies de hongos filamentosos superiores (ascomicetos y basidiomicetos) (Girbardt, 1957; Grove y Bracker, 1970). Esta estructura es un cúmulo de vesículas localizado en el domo apical. Observaciones por microscopía electrónica de transmisión demuestran que el Spitzenkörper está integrado por estratos de distinta naturaleza en contenido; su núcleo o centro es ocupado por un grupo de vesículas denominadas microvesículas, ribosomas y una red entretejida de filamentos de actina. Este núcleo de microvesículas está rodeado por una nube difusa de vesículas de mayor diámetro llamadas macrovesículas (Grove y Bracker, 1970; Harris *et al.*, 2005; Howard, 1981; Verdín *et al.*, 2009). Las quitinas sintasas y glucano sintasas se han localizado específicamente en las microvesículas y macrovesículas respectivamente (Riquelme *et al.*, 2007; Sánchez-León *et al.*, 2011; Verdín *et al.*, 2009). Lo que sugiere que el Spitzenkörper juega un papel importante en la organización y reparto del material formador de pared celular y por tanto, también en el crecimiento polarizado.

Según el modelo del Vesicle Supply Center (VSC) o centro suministrador de vesículas, el Spitzenkörper actúa como un nodo central de abasto, donde las vesículas y su contenido son acumulados y redistribuidos en todas direcciones, mientras éste se desplaza junto con el ápice manteniendo una estrecha relación el uno con el otro (Bartnicki-García *et al.*, 1989). En los ápices de las hifas maduras y en sus ramificaciones, el Spitzenkörper rige la dirección y velocidad del crecimiento polarizado (Girbardt, 1957; Reynaga-Peña *et*

al., 1997; Riquelme *et al.*, 1998). Las hifas de cepas con mutaciones o creciendo bajo estrés físico presentan un Spitzenkörper inestable, lo que se ha relacionado con un crecimiento polarizado deficiente (Girbardt, 1957; Reynaga-Peña *et al.*, 1997). Adicionalmente, por medio del uso de pinzas láser, se ha demostrado que la posición del Spitzenkörper en el ápice, dicta la dirección del crecimiento polarizado (Bracker y Lopez-Franco, 1997; Wright *et al.*, 2007). De acuerdo a toda la evidencia, se ha establecido al Spitzenkörper como uno de los orquestadores centrales de esta forma de crecimiento.

2.3 Proceso de secreción y membrana plasmática.

2.3.1 Proceso de secreción

En la llamada ruta clásica de secreción descrita en *S. cerevisiae*, las proteínas son sintetizadas y translocadas al retículo endoplasmático (RE). Algunas quedan en el lumen y otras embebidas en la membrana plasmática. Desde el RE, ambos grupos de proteínas son transportados hacia las cisternas del aparato de Golgi, a través de vesículas compuestas de membrana del RE con las proteínas embebidas y su contenido. Las vesículas se originan de la membrana donadora por la curvatura producida por las proteínas de cubierta COPII, Sar1+GTP, Sec23+Sec24 y Sec13+Sec31 (Bonifacino y Glick, 2004). Una vez formadas, las vesículas se separan de la membrana del RE y se mueven a través del citoplasma hasta llegar al aparato de Golgi. La vesícula es anclada a la membrana del aparato de Golgi, por las proteínas Uso1 y Ypt1 y se fusiona a través de la SNARE Sec22 (Lord *et al.*, 2011). En el aparato de Golgi, nuevamente se forman vesículas con la intervención de la cubierta del complejo COPI, para trasladar entre sus cisternas, el contenido del lumen así como la carga de la membrana (Pelham y Rothman, 2000). Finalmente, las cargas son transportadas de las cisternas trans-Golgi a su destino final en la membrana plasmática/exterior de la célula o a la vacuola, a través de vesículas que utilizan una cubierta de clatrina para ser escindidas de aparato de Golgi.

2.3.2 Topología de membrana

El direccionamiento del tráfico vesicular, así como la clasificación de proteínas transportadas son importantes en el crecimiento polarizado, ya que este depende de la correcta localización de los materiales necesarios para la extensión del ápice en hongos filamentosos. Se ha identificado la importancia de la

composición de la membrana plasmática en zonas específicas, como la existencia de regiones definidas de membrana, formadas por una población químicamente distinta al resto, como es el caso de las balsas lipídicas (Simons y Ikonen, 1997), que son importantes en las funciones de tráfico y clasificación de proteínas. El fosfatidilinositol 4,5-fosfato, es necesario para la clasificación de tráfico vacuolar en *S. cerevisiae*, por medio de la fosfatidilinositol 3-fosfato cinasa, Vps34 (Schu *et al.*, 1993). La SNX1 (sorting nexin-1) en mamíferos, reconoce los 3-fosfoinosítidos como punto de anclaje, lo que propicia la formación de vesículas para la endocitosis de receptores de membrana (Carlton *et al.*, 2004).

Recientemente, se ha demostrado que otras poblaciones de fosfolípidos, como los aminofosfolípidos, pueden también servir como punto de referencia para inducir la asociación de proteínas que desencadenarán distintos procesos celulares. La presencia de un aminofosfolípido, la fosfatidilserina (PS), promueve la asociación de la ArfGAP Gcs1 a la membrana, por medio de su dominio APSL+ (Xu *et al.*, 2013). La fosfatidilserina también induce la asociación de la GTPasa Cdc42 a la membrana, al competir con su inhibidor de disociación de nucleótido de guanina (Das *et al.*, 2012). Los aminofosfolípidos, son fosfolípidos formados por ácidos grasos, una molécula de glicerol que conecta el ácido graso a un grupo amino o amida, y su distribución en la membrana depende de su translocación a través de la misma por medio de proteínas transmembranales. El movimiento de los fosfolípidos de una cara de la membrana a la otra, es un proceso energéticamente desfavorable, que implica vencer las fuerzas que mantienen a las moléculas hidrofílicas separadas de la matriz hidrofóbica, lo cual lo hace un evento poco frecuente; sin embargo, en seres vivos las membranas presentan una composición desigual entre ambas caras. El índice de translocación de fosfatidilcolina en vesículas, es de $0.017 \mu\text{mol}/(\text{cm}^2/\text{s})$ (Kornberg y McConnell, 1971). Aun así, este transporte aleatorio es suficiente para equilibrar la composición de ambos lados de la membrana, en ausencia de la actividad de las proteínas responsables de la asimetría. Las proteínas que realizan este transporte, pertenecen a distintas familias de proteínas y cada una tiene una función específica: Las ATPasas de la familia Tipo-P IV transportan fosfolípidos de la cara exterior de la membrana a la cara citosólica y son conocidas como flipasas (**Figura 1**). Una familia de transportadores ABC (del inglés ATP Binding Cassette), las flopasas, produce el transporte contrario, de una subpoblación de aminofosfolípidos, y por último, las escramblasas que permiten el transporte a favor del gradiente de concentración y no utilizan energía para su función (**Figura 1**).

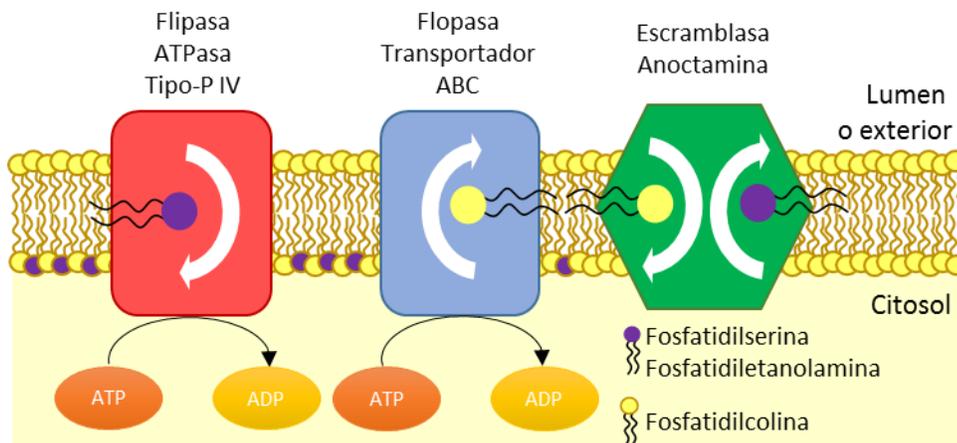


Figura 1. Diagrama de las proteínas del sistema de asimetría de membrana.

2.5 Flipasas

Las flipasas son proteínas transmembranales clasificadas en la superfamilia de proteínas ATPasas tipo P, de la subclase IV (Tang *et al.*, 1996). La mayoría está formada por una subunidad catalítica (α) y una subunidad no catalítica (β). Su papel como translocadoras selectivas de fosfolípidos, fue descubierta por primera vez en eritrocitos de humano (Seigneuret y Devaux, 1984) y más tarde fueron propiamente descritas en *S. cerevisiae* (Catty *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1996). Las flipasas son transportadas desde el RE a los organelos de la vía secretora y endocítica y a la membrana plasmática. La subunidad catalítica α de estas proteínas, está formada por un dominio actuador (A), un dominio de fosforilación (P), y un dominio de unión a nucleótido (N) (**Figura 2**). En el dominio A, ocurre el cambio de conformación, mientras que en el dominio P, es donde se encuentra el motivo de fosforilación DKTGTLT. Finalmente, el dominio N está formado por 6-11 estructuras α -hélices transmembranales, y es el lugar en donde se posiciona el ATP. Los segmentos transmembranales 3 y 4 (en algunos casos también los segmentos 5 y 6) forman un canal polar, por donde se transporta la cabeza polar del fosfolípido; el residuo hidrofóbico se reorienta en la matriz lipídica de la membrana y nunca se expone al exterior. El sitio que reconoce el sustrato, fosfatidilserina o

fosfatidiletanolamina, se conforma por la región citosólica que se encuentra entre los dominios transmembranales 3 y 4 (Baldrige y Graham, 2012; Bublitz *et al.*, 2011; Palmgren y Nissen, 2011).

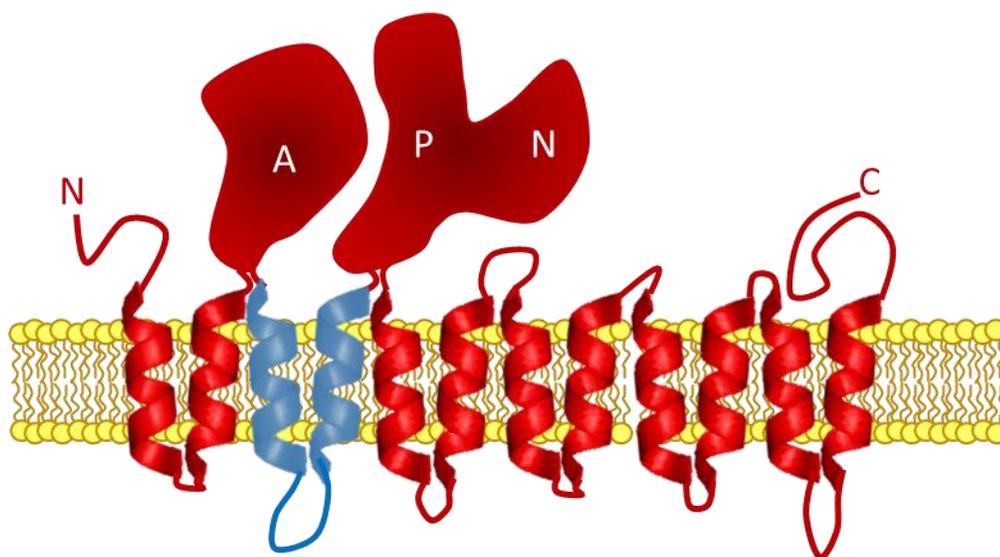


Figura 2. Diagrama de la estructura de la flipasa Dnf1 de *S. cerevisiae* (A: dominio actuador, P: dominio de fosforilación, N: dominio de unión a nucleótido) (Modificado de Baldrige R., 2012).

En animales se han detectado consistentemente, proteínas pertenecientes a la familia de las flipasas, en humanos se han identificados 14 flipasas, en ratón 15 y en *Caenorhabditis elegans* 12. La actividad de las flipasas, se ha vinculado a distintos procesos celulares, en el nemátodo *C. elegans* es necesaria la translocación de fosfatidilserina por su flipasa TAT-1 y su respectiva subunidad CHAT-1, para la formación de dominios tubulares en los endosomas, para la regulación del tráfico del material entre estos y la membrana plasmática. Además, el correcto reciclaje de GLUT-4, importador de glucosa, depende de la formación de estos subdominios tubulares en los endosomas, para ser reciclado a la membrana plasmática

correctamente. En mamíferos se ha observado, en eritrocitos, que la pérdida de la asimetría de membrana o bien la acumulación de fosfatidilserina en el exterior de la membrana plasmática, es un señalizador importante en la formación de coágulos, además de ser una señal de apoptosis y la eliminación de la célula por macrófagos (Fadeel y Xue, 2009).

2.5.1 Flipasas en hongos

En *S. cerevisiae* se han identificado 5 flipasas, Dnf1 y Dnf2, con su subunidad no-catalítica Lem3, Drs2 con su subunidad no-catalítica Cdc50, Dnf3 con su subunidad no-catalítica Crf1, y Neo1 que carece de una subunidad adicional. Desde que se descubrió su papel como translocadoras de aminofosfolípidos, se han vinculado con funciones dependientes del tráfico vesicular. Mutantes por delección de *drs2* son deficientes en la producción de vesículas dirigidas a la membrana (Gall *et al.*, 2002). La asimetría de membrana producida por Drs2 es necesaria para la entrega correcta del factor alfa a la membrana plasmática (Sartorel *et al.*, 2015). Esto puede deberse a defectos en la formación de subdominios de la membrana del endosoma, que propician la clasificación de proteínas de membrana, ya sea en la ruta clásica de Rcy1 dependiente de clatrina o por una ruta alternativa independiente de clatrina (Gall *et al.*, 2002; Hanamatsu *et al.*, 2014; Hankins *et al.*, 2015).

En el hongo filamentoso *A. nidulans*, se ha observado que las flipasas DnfA y DnfB se encuentran localizadas en la región apical del hongo, principalmente en el Spitzenkörper, además de algunos organelos (Schultzhaus *et al.*, 2015). Las mutantes por delección de DnfA y DnfB tienen un crecimiento deficiente y una tasa de conidiación baja. Existe la posibilidad de que los fenotipos deficientes presentes en las mutantes de las flipasas, sean consecuencia de la pérdida en la asimetría de los fosfolípidos en la membrana plasmática, así como en la membrana de organelos. Sin embargo, hace falta información sobre estas proteínas, su localización y sus efectos en el crecimiento de hongos filamentosos, para determinar su importancia en el crecimiento polarizado.

Capítulo 3. Justificación

Las flipasas tienen un papel importante en la creación de asimetría entre las capas de las diferentes membranas celulares, con el propósito de establecer señales para las diferentes cargas y destinos de las vesículas que son secretadas o endocitadas en las células. Por ejemplo, en *C. elegans* se ha identificado que la asimetría de membrana generada por las flipasas, está involucrada en el reconocimiento de sitios de endocitosis (Chen *et al.*, 2010). Por otro lado, en *S. cerevisiae*, hay evidencia de que las flipasas están implicadas en el crecimiento polarizado durante la formación del shmoo, en la respuesta hormonal de apareamiento y durante la gemación, así como, en la generación y clasificación de vesículas en el tráfico vesicular (Hankins *et al.*, 2015; Hua, 2002; Saito *et al.*, 2004; Sartorel *et al.*, 2015;). En el hongo filamentoso *A. nidulans* se ha encontrado que cada flipasa pertenece a distintas poblaciones de vesículas, que tienen una localización diferente en el Spitzenkörper (Schultzhaus *et al.*, 2015). Sin embargo no se ha podido establecer cuál es el papel que estas proteínas tienen en el tráfico de membranas y su impacto en el crecimiento polarizado y organización celular de hongos filamentosos.

Capítulo 4. Hipótesis

- La flipasa DNF-2 se transporta hacia la membrana plasmática, a través de vesículas secretoras para localizarse en la región apical y subapical.
- La deleción de *dnf-2* tendrá repercusiones sobre el crecimiento polarizado de *N. crassa*.

Capítulo 5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar la dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-2 y su papel en el crecimiento polarizado de *Neurospora crassa*.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la localización y dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-2.
- Determinar el efecto que tienen las mutaciones por delección de los genes *dnf-2* y *dnf-1* sobre el crecimiento polarizado.

Capítulo 6. Metodología

6.1 Cepas y plásmidos utilizados

Se utilizaron las cepas descritas en la siguiente tabla:

Tabla 1. Cepas utilizadas

<i>Escherichia coli</i>		
DH5αTM™	M F- Φ80ΔlacZΔM15 Δ(lacZYA–argF) U169recA1 endA1 hsdR17 + (r, m) PhoA supE44 λ-thi-1 Kk gyrA96 relA1	Invitrogen™
<i>Neurospora crassa</i>		
WT	<i>mat a</i> , tipo WT	FGSC #4200
9717	<i>mat A</i> , Δ <i>mus-51::bar+</i> ; <i>his-3</i> ⁻	FGSC #9717
Δ <i>dnf-2</i>	<i>mat a</i> , Δ <i>dnf-2</i>	FGSC #16377
Δ <i>dnf-1</i> *	<i>mat a</i> Δ <i>dnf-1</i> , Δ <i>mus-51</i>	FGSC #11620
Δ <i>dnf-1</i>	<i>mat a</i> Δ <i>dnf-1</i> , Δ <i>mus-51</i>	Este estudio
Δ <i>dnf-2</i> , <i>his-3</i>	<i>mat a</i> , Δ <i>dnf-2</i> , <i>his-3</i>	Este estudio
Δ <i>dnf-2</i> , L. Act::sGFP*	<i>mat a</i> , Δ <i>dnf-2</i> , <i>Lifect::sgfp</i>	Este estudio
TJV12-1a	<i>mat A</i> ; <i>chs-1::mchfp⁺::hph⁺</i>	(Verdín <i>et al.</i> , 2009)
<i>dnf-2::sgfp</i> *	<i>mat A</i> , <i>dnf-2::sgfp</i>	Este estudio

*Cepa en estado heterocarión.

Se obtuvieron conidios de la cepa WT y de las cepas mutantes Δ*dnf-2* y Δ*dnf-1*. Se prepararon soluciones de conidios con una concentración de 2.59 x 10⁶ conidios/ ml para cada cepa, las cuales fueron utilizadas para experimentos posteriores.

Se utilizaron los plásmidos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 2. Plásmidos utilizados

Plasmido	Genotipo	Fuente
pMF272	<i>Pccg-1::sgfp+</i>	Freitag, M., <i>et al</i> 2004
pGEM®-T Easy Vector	Vector de clonación	Promega Corporation
pGEM®-T Easy Vector + <i>dnf-2</i>	pGEM(<i>dnf-2</i>)	Este estudio
pRM49	<i>Pccg-1::Lifeact::sgfp+</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010
pRM84	<i>Pccg-1::dnf-2::sgfp+</i>	Este estudio

Todos los plásmidos fueron almacenados en buffer EB del kit de Extracción de Gel (Qiagen N.V.)

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias de interés de los genes encontrados en la base de datos de fungiDB (Gottlieb *et al.*, 2016) y analizados en OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®) para predecir y evitar estructuras secundarias, heterómeros y otras estructuras no deseadas. Posteriormente, los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies®) y el liofilizado recibido fue disuelto Buffer EB de Qiagen N.V. a una concentración de 200 mM (20X) (Figura 3).

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleotido	Secuencia	Características
<i>dnf-1</i> ORF3' For	TCCTCATGGGTGTCTT GGATC	Oligonucleótido que hibrida a aproximadamente 1100 bases del codón de paro del gen con anotación NCU07443.
<i>dnf-1</i> (PacI) Rev	CCTTAATTAATTGTTGA CTATCCCGCCTTTCGTC	Oligonucleótido que hibrida justo antes del codón de paro del gen con anotación NCU07443, además agrega un sitio de restricción PacI.
<i>dnf-2</i> ORF3' For	CCATATTGGTGTCGGT ATCAGC	Oligonucleótido que hibrida a aproximadamente 1100 bases del codón de paro del gen con anotación NCU00352.
(SpeI) <i>dnf-2</i> For	GGACTAGTATGGCGGC TGGCCGCC	Oligonucleótido que hibrida en el inicio del gen con anotación NCU00352 además de agregar un sitio de restricción SpeI.
<i>dnf-2</i> (PacI) Rev	CCTTAATTAATTGATTTCG GTCTTGAAGTGGCCATC	Oligonucleótido que hibrida justo antes del codón de paro del gen con anotación NCU00, además agrega un sitio de restricción PacI.

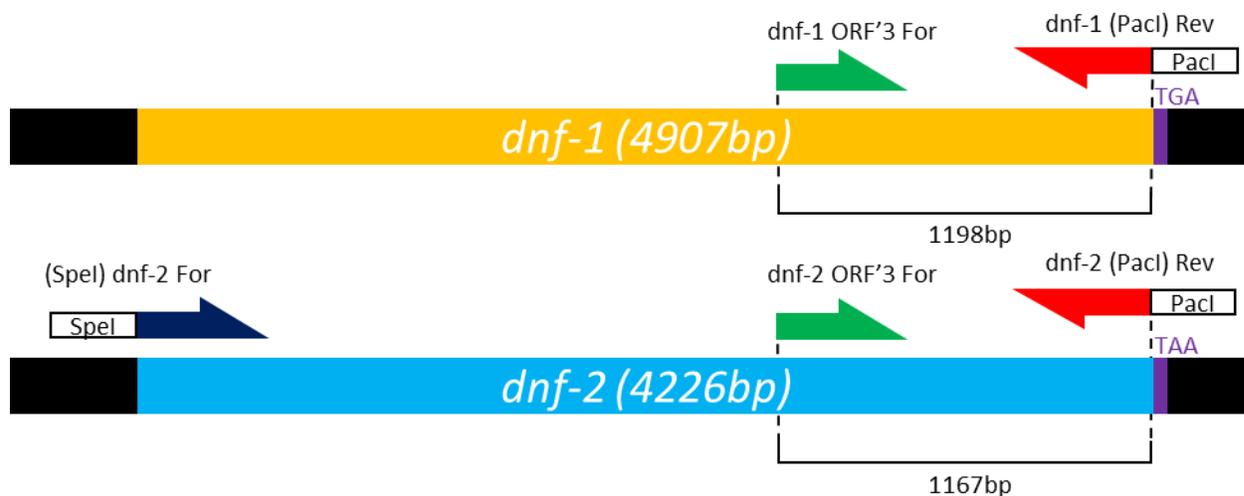


Figura 3. Diagrama de los oligonucleótidos utilizados en este estudio para amplificar los genes *dnf-1* y *dnf-2*.

6.2 Medios de cultivo

Para crecer *N. crassa*, se utilizó el Medio Mínimo de Vogel (MMV) preparado a partir de una solución 50X de sales de Vogel que contienen 250 g/L de fosfato de potasio monobásico monohidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 125 g/L de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100 g/L de nitrato de amonio (NH_4NO_3), 5 g/L de sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), 3.8 g/L cloruro de calcio (CaCl_2), 5 mL de solución de elementos traza, 0.25 g/L de Biotina y 15 g/L de sacarosa como fuente de carbono (Vogel, 1956). Para solidificar el medio se agregó 15 g/L de agar a la solución de MMV antes de esterilizar. Los medios para cultivos con requerimiento de histidina, fueron preparados agregando 2 ml de una solución de almacenamiento, esterilizada previamente por filtración con un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.2 μm , a una concentración de 25 mg/ml en 50 ml de MMV agar o líquido ya estéril, dependiendo de lo requerido. Los medios de selección de resistencia a Higromicina B fueron preparados de una manera similar agregando 150 μL de una solución de almacenamiento a una concentración de 50 mg/ml en 50 ml de medio MMV ya estéril.

Para inducir la fase sexual y realizar las cruces de cepas con distintos tipos de apareamiento se utilizó el Medio Sintético de Cruzas (MSC), utilizando sales sintéticas de cruce 2X (SSC) las cuales contienen 0.1% de

KH_2PO_4 , 0.2% de nitrato de potasio (KNO_3), 0.14% de fosfato de potasio dibásico ($\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), 0.2% de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.02% de cloruro de sodio (NaCl) y 0.02% de cloruro de calcio (CaCl), 0.5% de sacarosa como fuente de carbono y 2% de agar (Westergaard y Mitchell, 1947). Para hacer la selección de conidios transformados de *N. crassa*, se utilizó el medio de FGS, preparado con agar al 1.5%, sales de Vogel y como fuente de carbono una mezcla de carbohidratos preparados en un stock 10X: 20 g de sorbosa, 0.5 g de glucosa y 5 g de fructosa en 200 ml de agua destilada, la cual es posteriormente esterilizada por filtración y agregada al medio con agar justo antes de utilizarse.

Escherichia coli fue cultivada en medio LB: triptona (Bacto™ tryptone) 1%, extracto de levadura (Bacto™ yeast extract) 0.5%, y cloruro de sodio (NaCl) 1% agregando agar al 2% para los medios sólidos. Para las selecciones de transformantes se agregó ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.3 Cuantificación de la tasa de elongación

Se midió por triplicado la tasa de elongación de las cepas mutantes $\Delta\text{dnf-1}$ y $\Delta\text{dnf-2}$ y la cepa WT. Para esto se prepararon cajas de Petri de 160 mm con 50 mL de MMV-solidificado con agar al 1.5%. Después se inocularon con una suspensión de conidios de 15 μL a una concentración de 2.59×10^6 conidios/mL (38,850 conidios) en la periferia de la caja. Posteriormente se marcó la circunferencia de la colonia cada 3 h durante 42 h. El primer registro se realizó a las 18 h después de la inoculación. Cuando el micelio de la cepa WT llegó al borde de la caja, estas fueron fotografiadas con una cámara D3100 de Nikon, con un lente DX SWM VR esférica ∞ - 028m/0.92ftØ52 montada en un tripie. La distancia de crecimiento de cada marca fue cuantificada en el software Piximètre 5.9 R1520, calibrado con una regla graduada en milímetros.

6.4 Morfología de colonia y borde de la colonia

Para observar las características de las colonias, se inocularon 5 μL de la solución de conidios en el centro de una caja Petri de 100 mm de diámetro con MMV y se incubó durante 12 h a 30°C. Una vez concluido el periodo de incubación, las cajas fueron fotografiadas. El borde de la colonia se observó después de 18 h de incubación a 30°C, utilizando un estereoscopio SZX12 (Olympus®) con una cámara DP70 (Olympus®) en el software DPManager v1.1.1.71 OLUMPUS OPTICAL CO, calibrado con una regla graduada en milímetros. Las observaciones fueron realizadas en el borde de la colonia durante no más de 20 min por colonia para

minimizar los efectos del cambio de temperatura y la exposición a la luz. Las fotografías de la colonia fueron tomadas con una cámara D3100 de Nikon, con un lente DX SWM VR esférica ∞ - 028m/0.92ft ϕ 52 montada en un tripie. La distancia de crecimiento de cada marca fue cuantificada en el software Piximètre 5.9 R1520, calibrado con una regla graduada en milímetros.

6.5 Cuantificación de producción de conidios

Para obtener una comparación de la producción de conidios entre la cepa WT y las cepas $\Delta dnf-2$ y $\Delta dnf-1$, se sembraron 15 μ L de solución conidios [2.59×10^6 conidios/mL] en matraces de 250 mL con 50 mL de MMV-Agar 1.5%, lo más cercano posible a la parte media del agar. Se incubaron en obscuridad a 30°C durante 24 h y posteriormente a 25°C en luz blanca durante 72 h. Los conidios fueron recuperados utilizando embudos con filtros de tela (Corporación Magitel, C.A.), primero lavando el micelio del cultivo con 50 mL de sorbitol estéril al 1 M agitando vigorosamente y posteriormente, pasando la solución por el filtro y centrifugando a 5,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue cuidadosamente retirado por pipeteo y el precipitado fue enjuagado con 30 mL de agua destilada estéril, para después ser nuevamente centrifugado a 5,000 rpm por 5 min para retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla de conidios en 2 mL de sorbitol estéril al 1 M. Por último, se tomaron 10 μ L de cada muestra para ser diluidas 1:10 y contadas en cámara de Neubauer, cada repetición por duplicado.

6.6 Cuantificación de frecuencia de ramificación

Para el conteo de ramificaciones, se inocularon 15 μ L de solución de conidios a una concentración de 2.59×10^6 conidios/ml en un extremo de la caja y se incubaron durante 18 h a 30°C. Después los bordes fueron observados al estereoscopio a una amplificación de 90X y se obtuvieron imágenes para análisis posteriores. Como en los ensayos de observación de morfología del borde de colonia, las muestras eran observadas durante no más de 20 min para minimizar el efecto de la exposición a condiciones ambientales. La tasa de ramificación se obtuvo, realizando conteos de las hifas de las cepas WT (n=69), $\Delta dnf-2$ (n=88) y $\Delta dnf-1$ (n=96), contando las ramas de cada hifa en los primeros 500 μ m desde el ápice hacía la región posterior de la hifa. Los 500 μ m fueron determinados utilizando el programa Piximètre 5.9 R1520 calibrado con la escala proporcionada por el software del estereoscopio SZX12 (Olympus®).

6.7 Cuantificación de producción de biomasa

Para la medición de biomasa se agregaron 45 μL de solución de conidios [2.59×10^6 conidios/ml] de la cepa WT como control y las cepas mutantes $\Delta dnf-2$ y $\Delta dnf-1$ en 100 ml de MMV líquido, por triplicado y se incubaron a 30°C por 48 h en oscuridad. Posteriormente, fueron filtrados por vacío en filtros (Whatman®) #1 de 90 mm de diámetro (previamente pesados) en un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato y una bomba de vacío y secados posteriormente. Las muestras fueron secadas a 60°C durante 2 h y fueron pesadas inmediatamente (al peso obtenido se sustrajo de la masa del filtro previamente obtenida).

6.8 Cruzas

Para obtener la mutante homocarión de la cepa $\Delta dnf-1$ y la mutante auxotrófica de histidina de $\Delta dnf-2$, se procedió a realizar cruas inoculando uno de los pares de cepas en una caja de Petri de 60 mm con MSC y posteriormente se incubó a 30°C durante 2 días (d). Después se agregaron gotas de una suspensión concentrada de los conidios del tipo de apareamiento complementario y se incubó a 25°C en oscuridad; una vez transcurridas 3 semanas se recuperaron las ascosporas adheridas a la tapa de la caja de Petri con agua destilada estéril. Las alícuotas con las ascosporas en agua estéril, fueron dejadas a temperatura ambiente durante 5 d. Transcurrido este periodo, las alícuotas se extendieron en una placa de MMV selectivo (conteniendo higromicina) y fueron activadas por calor a 60°C durante 1 h y después incubadas a 30°C durante 5h. La placa fue observada cada hora al estereoscopio en busca de ascosporas germinadas. Las colonias fueron cortadas y transferidas a tubos con medio selectivo. Para identificar las cepas $his-3^-$ (auxótrofas de histidina), se inoculó un fragmento de micelio de las colonias resultantes de una sola ascospora, en placas con MMV+histidina y placas con MMV. Se observó el crecimiento de cada colonia y se clasificaron las colonias carentes de crecimiento en placas con MMV como cepas $his-3^-$. La corroboración del genotipo fue realizada mediante la extracción de DNA genómico y amplificando por PCR con los oligonucleótidos *dnf-1* ORF'3 For, *dnf-1(PacI)* Rev para la cepa $\Delta dnf-1$ y *dnf-2* ORF'3 For, *dnf-2(PacI)* para la cepa $\Delta dnf-2$.

6.9 Etiquetamiento de DNF-2 con GFP

El marcaje de DNF-2 con GFP, se realizó amplificando el marco abierto de lectura del DNA genómico de la cepa WT, utilizando los oligonucleótidos (***SpeI***) **dnf-2 For** y **dnf-2 (*PacI*) Rev**, que añaden los sitios de restricción *SpeI* y *PacI* al inicio y final del amplicón respectivamente, y se utilizó el plásmido pMF272 (Freitag *et al.* 2004). El plásmido y el inserto fueron digeridos con las enzimas de restricción *SpeI* y *PacI* (New England Biolabs® *Inc.*) durante 12 h en una doble digestión para después ser ligados con la DNA Ligasa T4 (New England Biolabs® *Inc.*) durante 18 h a una temperatura de 16°C, en una reacción con una relación 1:3 (vector:inserto). Tras la reacción de ligación, se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5α™™ (Invitrogen™) por el método de shock térmico; se mezclaron 10 µL de la reacción de ligación con 50 µL de células frescas y se incubaron en hielo durante 1 h, después de la incubación las células se pusieron a 42°C por un minuto e inmediatamente se pusieron en hielo. Posteriormente, fueron incubadas durante 1 h en medio LB líquido a 37°C y se sembraron en placas de agar con medio selectivo LB con ampicilina y se incubaron durante 14 h a 37°C. Las colonias resultantes fueron transferidas a medio LB con ampicilina y de los cultivos resultantes se extrajo el plásmido según el protocolo de lisis alcalina del Molecular Cloning A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, 2006). Los plásmidos fueron corroborados, utilizando las enzimas de restricción correspondientes a los sitios agregados por los oligonucleótidos, incubando una alícuota durante 12 h a 37°C. Una vez obtenida la corroboración del plásmido deseado, se transformó la cepa de *N. crassa* FGSC#9717 agregando 20 µL de solución del plásmido a una concentración de 500 ng/µL y 90 µL de una solución de conidios frescos (sorbitol 1 M). La mezcla fue incubada en hielo durante 30 min y posteriormente sometida a un shock eléctrico para inducir transformación por electroporación bajo las condiciones: Voltaje 1500 V, Capacitancia: 25 µF, Resistencia 600 ohm en el electroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en una cubeta de electroporación con pozo de 2 mm de ancho. Tras la electroporación, inmediatamente se agregó 1 mL de Sorbitol 1M estéril, se extendieron los conidios en placas de medio FGS y se incubaron a 30°C durante 4 d. Las colonias resultantes fueron aisladas en tubos de cultivo con MMV y se cribaron en el microscopio confocal de escaneo láser en busca de patrones de fluorescencia.

6.10 Medición de producción de hifas aéreas

La producción de hifas aéreas se comparó por duplicado preparando tubos de cultivo de 10 mm de diámetro x 75 mm de alto (VWR®) con 1.5 mL de MMV, agregando 5 µL de solución de conidios en el

centro del agar e incubando durante 48 h a 30°C. Pasado el periodo de incubación, los cultivos fueron fotografiados y las imágenes obtenidas fueron procesadas para alinearlas en el software Adobe® Photoshop® CS6 (Versión 13.0). Finalmente las fotografías fueron analizadas en el programa Piximètre 5.9 R1520 calibrado con una regla graduada en milímetros.

6.11 Microscopía confocal de escaneo láser

Toda la microscopía confocal se realizó utilizando el microscopio confocal Olympus FluoViewWTM FV1000 (Olympus, Japan). Se usó un objetivo UPlanFLN de una amplificación de 60X N.A. 1.42 de inmersión de aceite. Como fuente de luz se utilizó un láser de Argón, para las muestras etiquetadas con la proteína fluorescente GFP y un láser de Helio-Neón para las muestras teñidas con FM4-64 (FM® Lipophilic Styryl Dyes) o etiquetadas con mCherry. Las cepas fueron inoculadas en medio MMV 1.5% y puestas a crecer durante 12 h para la WT, 20 h para la cepa mutante *Δdnf-2*, y 40 h para la cepa *Δdnf-1*. Posteriormente, las muestras se prepararon siguiendo el método del bloque de agar invertido (Hickey *et al.*, 2004): **1)** cortando un rectángulo cerca del borde de la colonia de aproximadamente 1cm x 4cm, **2)** colocando el agar con micelio boca abajo y dejándolo caer suavemente sobre un cubreobjetos VWR® Micro Cover Glasses, Rectangular No. 1 ½, **3)** permitiendo un tiempo de recuperación mínimo de 30 min. Para las observaciones con el marcador lipofílico N-(3-triethylamonio)propil)-4-(6-[4-dietilaminofenil] hexatrienil) dibromuro de piridinio (FM4-64) se colocaron 10 µL del fluoróforo a una concentración de 5 µM en el cubreobjetos previo a la colocación del bloque de agar.

Capítulo 7. Resultados

7.1 Análisis bioinformático de DNF-1 y DNF-2

Para estudiar los translocadores de fosfolípidos en *N. crassa*, hizo una búsqueda bioinformática de las secuencias codificantes de las proteínas de interés en el organismo de estudio. Se realizó un Blast a nivel de secuencia de aminoácidos de las proteínas correspondientes a los genes *dnfA* y *dnfB* de *A. nidulans* y de *dnf1* y *drs2* de *S. cerevisiae*, y se identificaron sus homólogos correspondientes en *N. crassa*. Para *dnfA/dnf1* se identificó el gen NCU07443, cuya secuencia proteica tiene un porcentaje de identidad de 43%, comparada con Dnf1 de *S. cerevisiae* y de 52% comparada con DnfA de *A. nidulans*. Para *dnfB/drs2*, se identificó el gen NCU00352, cuya secuencia proteica tiene un porcentaje de identidad de 50% comparada con Drs2 de *S. cerevisiae* y 69% comparada con *A. nidulans*. (Tabla 4, 5 y 6). De acuerdo a la nomenclatura para *N. crassa*, los genes fueron nombrados *dnf-1* y *dnf-2* respectivamente. En las tablas 4, 5 y 6, se muestra además, la comparación de las proteínas correspondientes a *dnf2*, *dnf3* y *neo1* de *S. cerevisiae*, de *dnfC* y *dnfD* de *A. nidulans* y la comparación entre los genes que codifican para las flipasas en *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, con la finalidad de mostrar el panorama completo de las flipasas en *N. crassa*, aunque para este estudio solo se tomaron en cuenta *dnf-1* y *dnf-2*.

Tabla 4 Porcentaje de identidad entre las flipasas de *N. crassa* y *S. cerevisiae*

		<i>Neurospora crassa</i>			
		<u>Dnf-1</u> NCU07443	<u>Dnf-2</u> NCU00352	<u>Dnf-3</u> NCU03592	<u>Dnf-4</u> NCU03818
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<u>Dnf1</u> YER166W	42.976%	26.418%	23.714%	20.035%
	<u>Dnf2</u> YDR093W	42.46%	26.937%	23.532%	18.75%
	<u>Dnf3</u> YMR162C	22.347%	22.161%	30.534%	18.681%
	<u>Drs2</u> YAL026C	25.919%	49.895%	23.549%	21.287%
	Neo1 YIL048W	19.219%	24.275%	18.521%	46.086%

Tabla 5 Porcentaje de identidad entre las flipasas de *N. crassa* y *A. nidulans*.

		<i>Neurospora crassa</i>			
		<u>Dnf-1</u> NCU07443	<u>Dnf-2</u> NCU00352	<u>Dnf-3</u> NCU03592	<u>Dnf-4</u> NCU03818
<i>Aspergillus nidulans</i>	<u>DnfA</u> AN8672	52.665%	25.09%	22.65%	19.365%
	<u>DnfB</u> AN6112	25.512%	68.736%	23.98%	23.572%
	<u>DnfC</u> AN2011	21.157%	24.887%	40.603%	18.385%
	<u>DnfD</u> AN6614	18.366%	22.724%	17.448%	59.21%

Tabla 6 Porcentaje de identidad entre las flipasas de *S. cerevisiae* y *A. nidulans*.

		<i>Aspergillus nidulans</i>			
		<u>DnfA</u> AN8672	<u>DnfB</u> AN6112	<u>DnfC</u> AN2011	<u>DnfD</u> AN6614
<i>S. cerevisiae</i>	<u>Dnf1</u> YER166W	44.7%	27.9%	22.7%	19.1%
	<u>Dnf2</u> YDR093W	43.7%	27.4%	22.7%	19.4%
	<u>Dnf3</u> YMR162C	23.0%	23.0%	36.7%	18.7%
	<u>Drs2</u> YAL026C	27.2%	52.3%	25.4%	21.6%
	Neo1 YIL048W	20.266%	24.466%	18.928%	46.172%

Una vez identificados los genes, se modeló la estructura a nivel de proteína. En primer lugar se buscó la predicción de dominios, encontrando que DNF-1 tiene 1,562 aminoácidos, con un dominio de hidrolasa, nueve dominios transmembranales y siete motivos de unión a sitios de endocitosis NPFxD (**Figura 4**). Por otra parte, DNF-2 tiene 1,360 aminoácidos, presentando el mismo dominio de hidrolasa, siete dominios transmembranales, 11 motivos de unión a sitios de endocitosis NPFxD y adicionalmente, tres dominios SH3 de interacción proteína-proteína (**Figura 4**).

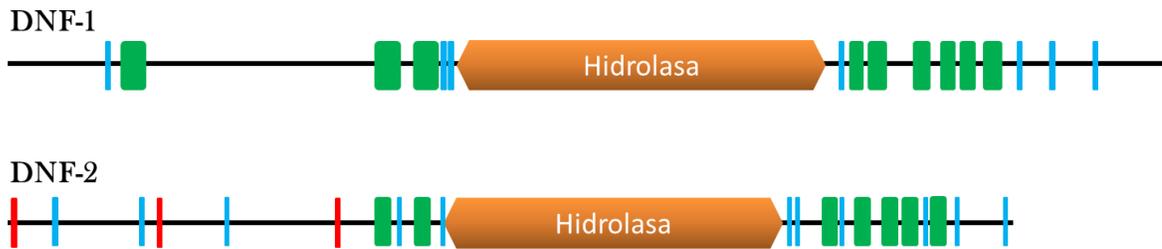


Figura 4. Esquema de los dominios de la DNF-1 y DNF-2 de *Neurospora crassa*. Los dominios naranjas corresponden a la hidrolasa, los verdes a dominios transmembranales, los azules son motivos de unión a sitios de endocitosis y los rojos corresponden a dominios SH3 de interacción proteína-proteína.

Además se realizó la modelación tridimensional de las proteínas con el software POV-Ray 3.7 para Windows. En la **Figura 5**, se observan ambas estructuras y la localización de los dominios transmembranales.

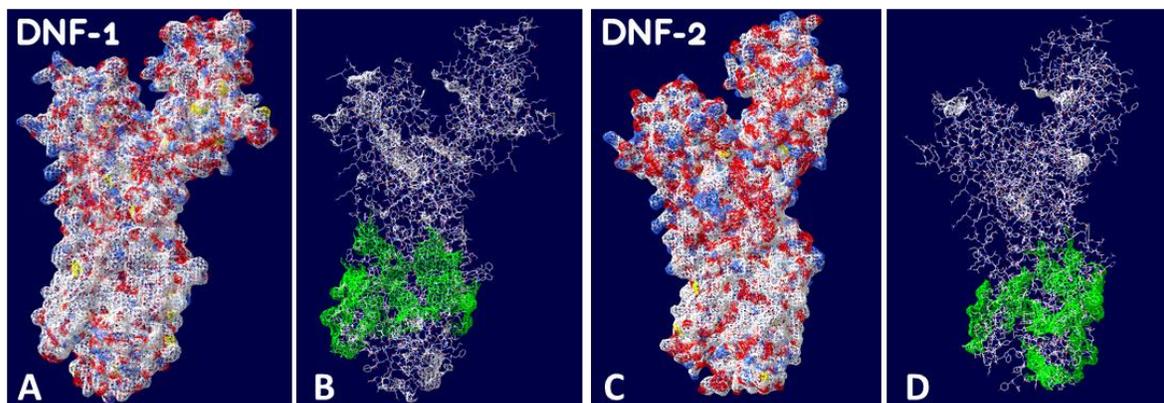


Figura 5. Predicción bioinformática de la estructura tridimensional de (A) DNF-1 y (C) DNF-2, y localización hipotética de los dominios transmembranales (B) de DNF-1 y (D) de DNF-2. Modelos elaborados con POV-Ray 3.7 para Windows.

Para corroborar la especificidad en el sustrato (tipo de fosfolípidos) para cada una de las flipasas DNF-1 y DNF-2, se compararon sus secuencias proteicas con sus homólogos en *S. cerevisiae*, Dnf1 y Drs2 (**Figura 6**). Las secuencias de los sitios responsables de la especificidad de la flipasa descritos por Baldrige y Graham (2012) fueron alineadas utilizando la herramienta de alineamiento de UniProt (EMBL-EBI, PIR, y SIB, 2016).

DNF-1 483	GHDTKIMMAGVTPSKRARIARELNINVVYNTILLIMCLIAAANGVAWAKTDASSYWF	542
Dnf1 571	GDDTKIMINAGVTPTKKSRISRELNFSVILNLFVLLFILCFTAGIVNGVYKQKPRSRDYF	630
DNF-2 526	EGLAYLFLDPMNGASAVARIFIKDMVTYVWLFSAALVPISLFTVTIEMVKYWHGILLINDDL	585
Drs2 475	KHLSYLYLEGTN----KAGLFFKDFLTFWILFSLNLPISLFTVVELIKYYQAFMIGSDLD	530

Figura 6. Alineamiento de la secuencia proteica de DNF-1 y DNF-2 alineadas a la secuencia de su respectiva proteína homóloga en *S. cerevisiae*.: Los recuadros rojos señala los aminoácidos involucrados en la especificidad del fosfolípido translocado por la flipasa.

El porcentaje de identidad entre DNF-1 y Dnf1 en las regiones correspondientes a la especificidad de sustrato (TM3-LL3-4-TM4) fue de 40%, el aminoácido triptófano en la posición W618 está sustituido en DNF-1 por tirosina. DNF-2 y Drs2 mostraron un porcentaje de identidad de 61.1% en las regiones involucradas en su especificidad, una fenilalanina en la posición 574 es la que le confiere el reconocimiento de un fosfolípido específico.

7.2 Localización de DNF-2-GFP

7.2.1 Localización de DNF-2-GFP en hifas maduras

Para conocer la distribución y dinámica de la proteína DNF-2 en hifas maduras de *N. crassa*, se observó en el microscopio confocal láser una cepa que expresaba la proteína etiquetada con GFP. La DNF-2-GFP se observó como un punto fluorescente en la región central del Spitzenkörper (**Figura 7**). En la **figura 7** se muestra como DNF-2-GFP ocupa la región del núcleo del Spitzenkörper teñido con FM4-64. Adicionalmente, se observaron algunos puntos difusos en el citoplasma que no colocalizan con el FM4-64. Estos puntos fluorescentes de DNF-2-GFP se mueven hacia la zona apical y se fusionan con la acumulación en el ápice (**Figura 7-8**; cabeza de flecha).

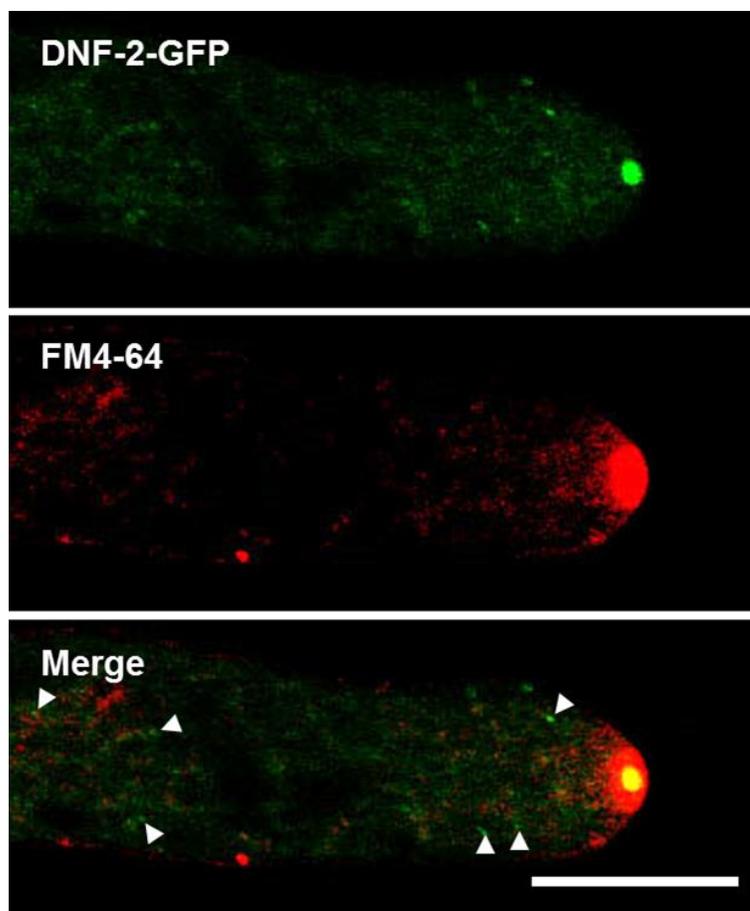


Figura 7. Localización de DNF-2-GFP en hifas maduras. DNF-2-GFP (verde) se localiza como un punto en el centro del Spitzenkörper teñido con FM4-64 (rojo). Ocasionalmente se observan puntos de fluorescencia (cabezas de flecha) en el subápice que no colocalizan con el FM4-64. Barra de escala: 10 μ m.

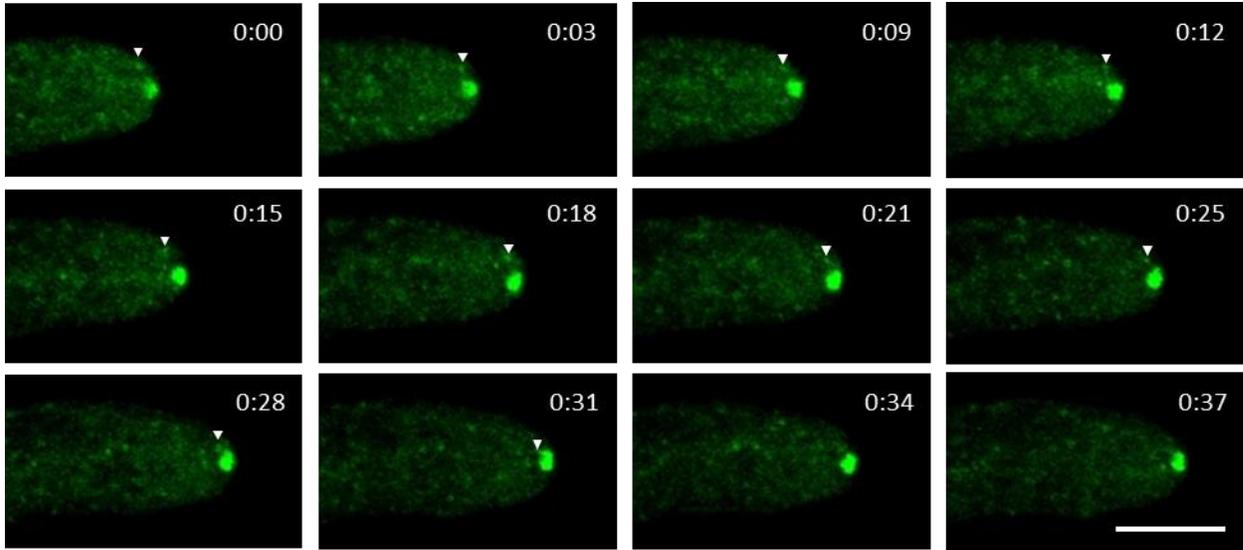


Figura 8. Serie de tiempo de DNF-2-GFP: La cabeza de flecha denota una partícula fluorescente que se acerca al Spitzenkörper.(m:s) Barra de escala 10 μ m

7.2.2 Localización de DNF-2-GFP y CHS-1-mChFP

Con el antecedente de *A. nidulans*, donde encontraron que DnfB se observa en la región del Spitzenkörper donde se acumulan las microvesículas, se llevó a cabo un experimento de coexpresión de DNF-2-GFP y la proteína quitina sintasa-1, CHS-1 etiquetada con mChFP. Se observó que tanto la DNF-2-GFP como la CHS-1-mChFP colocalizan en el ápice de la hifa (**Figura 9**). Sin embargo, no en todas las vesículas que viajan hacia el Spitzenkörper se ve la señal fluorescente de ambas proteínas. La CHS-1-mChFP se observa en los septos, pero la DNF-2-GFP no se localiza ahí.

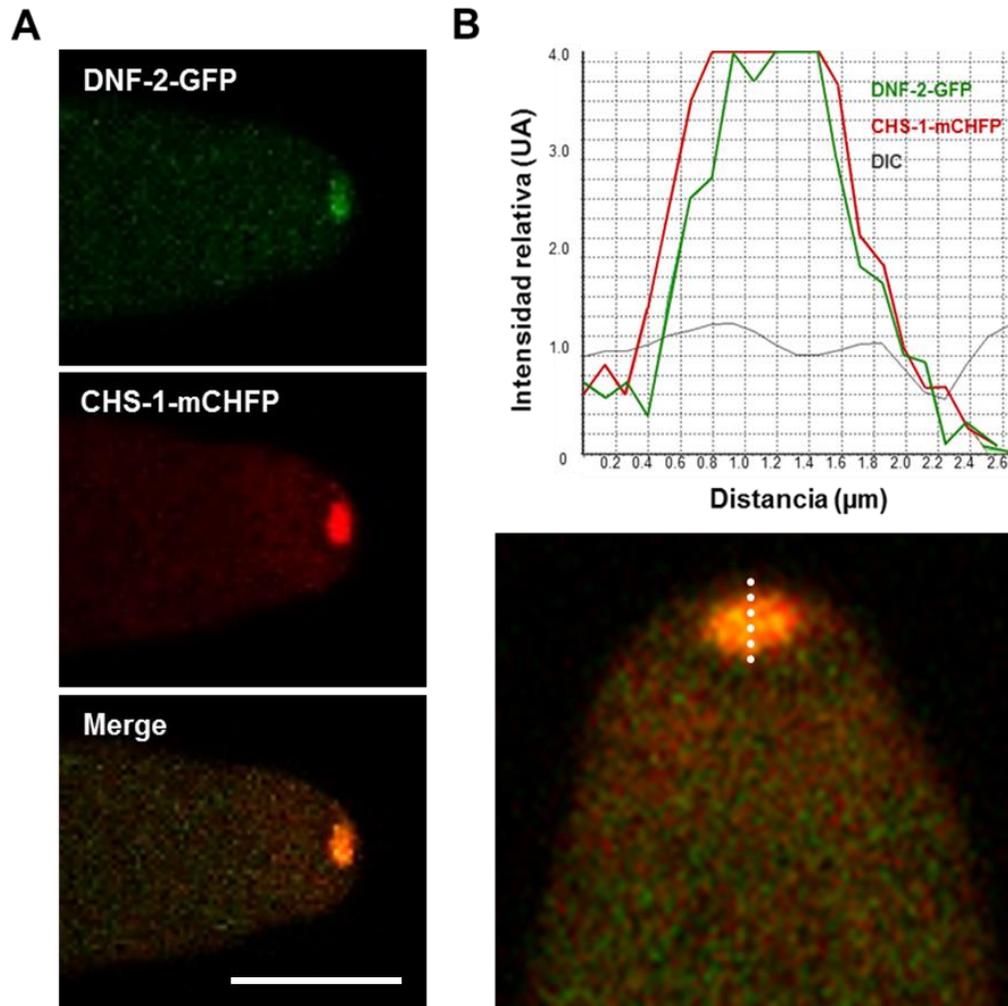


Figura 9. Localización de DNF-2-GFP y CHS-1-mChFP en hifas maduras de *N. crassa*. (A) DNF-2-GFP, CHS-1-mChFP y el traslape de ambas. (B) Gráfica de la intensidad de fluorescencia de la región marcada con puntos discontinuos, que muestra que ambas señales se encuentran colocalizando, el panel inferior, muestra un acercamiento de la región subapical que hace evidente la colocalización en el ápice de las hifas maduras. Barra de escala: $10\mu\text{m}$.

7.3 Fenotipo de las mutantes por delección de los genes *dnf-1* y *dnf-2*.

Para determinar el efecto de la delección de los genes *dnf-1* y *dnf-2* en la morfología y crecimiento de *N. crassa*, se observaron las colonias de las mutantes y se evaluó la morfología colonial e hifal, así como la tasa de elongación vegetativa, la producción de biomasa, la formación de ramificaciones y producción de conidios.

7.3.1 Corroboración de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$

Se obtuvieron mutantes heterocariones de los genes *dnf-1* y *dnf-2* del Fungal Genetics Stock Center. Se hicieron cruza con una cepa WT *mat A* y la mutante $\Delta dnf-1$ *mat a* (*het*) y las cepas FGSC #9717 y $\Delta dnf-2$. Se obtuvieron 5 ascosporas viables de la cruce $WT \times \Delta dnf-1$, de las cuales solo una creció en el tubo de cultivo. De la cruce FGSC #9717 $\times \Delta dnf-2$ se obtuvieron 9 ascosporas viables, de las cuales solo una fue auxótrofa de histidina. Las cepas obtenidas se sometieron a corroboración por PCR. Se obtuvo el DNA de las cepas WT, $WT \times \Delta dnf-1$ y FGSC #9717 $\times \Delta dnf-2$. Se llevó a cabo una PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento de los últimos 1100~pares de base del marco abierto de lectura de los genes *dnf-1* y *dnf-2*. Se confirmó la ausencia de amplicones de *dnf-1* y *dnf-2* en las mutantes respectivas, solo en el control positivo se observó la banda correspondiente a los genes (**Figura 10**). Para corroborar la calidad del DNA de las cepas mutantes, se amplificó como control el marco abierto de lectura del gen *tea-2*.

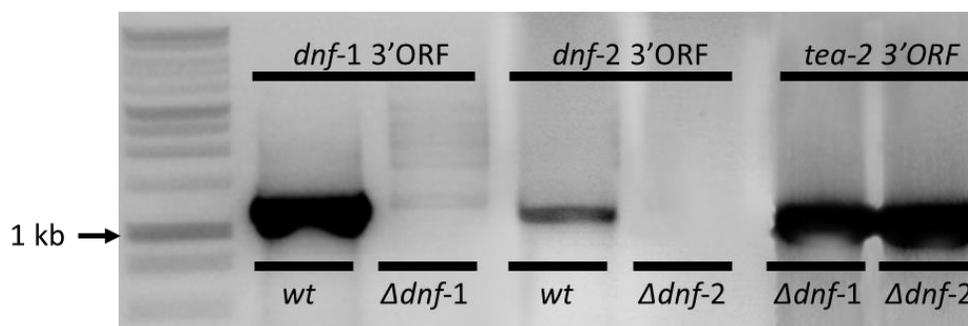


Figura 10. Corroboración del genotipo de las mutantes por delección

7.3.1 Morfología de las colonias y las hifas de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$

La morfología de la colonia, se estableció mediante la observación del micelio después de 12 a 24 h de incubación. En la cepa mutante de $\Delta dnf-1$, se observaron colonias planas y de menor densidad a diferencia de las de la cepa WT (**Figura 11**). Las colonias de $\Delta dnf-2$ fueron más elevadas y con una mayor densidad de hifas a diferencias de cepa WT y de la cepa mutante $\Delta dnf-1$ (**Figura 11 y 12**).

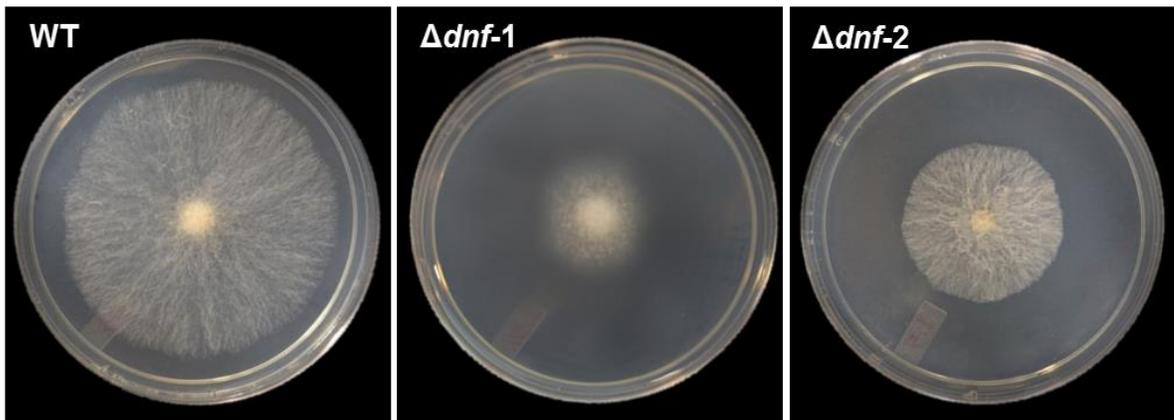


Figura 11. Morfología de la colonia de las cepas $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ después de 12h de crecimiento.

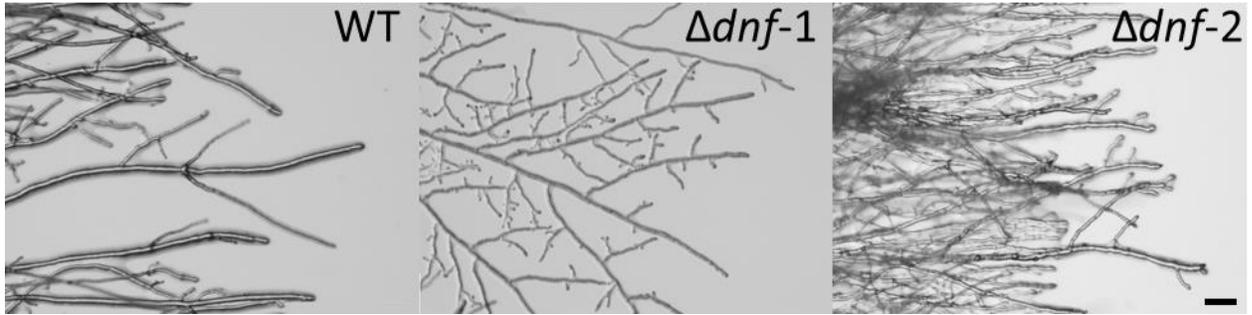


Figura 12. Imagen del borde de la colonia de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y cepa WT. Barra de escala = 100 μm

La morfología de las hifas maduras de las colonias mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ también se comparó con la cepa WT. Las hifas de la mutante $\Delta dnf-1$ tuvieron un menor diámetro ($7.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$) que la cepa silvestre ($10.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$), y presentaron un perfil crenulado, producido por la dificultad que tiene esta mutante para mantener la dirección de crecimiento (**Figura 13**). La mutante $\Delta dnf-2$ presentó hifas con un diámetro similar al de la cepa WT ($11.39 \pm 0.38 \mu\text{m}$), sin embargo, al igual que la mutante $\Delta dnf-1$, mostró problemas para mantener la dirección de crecimiento, por lo que se produjeron hifas con abultamientos (**Figura 13**).

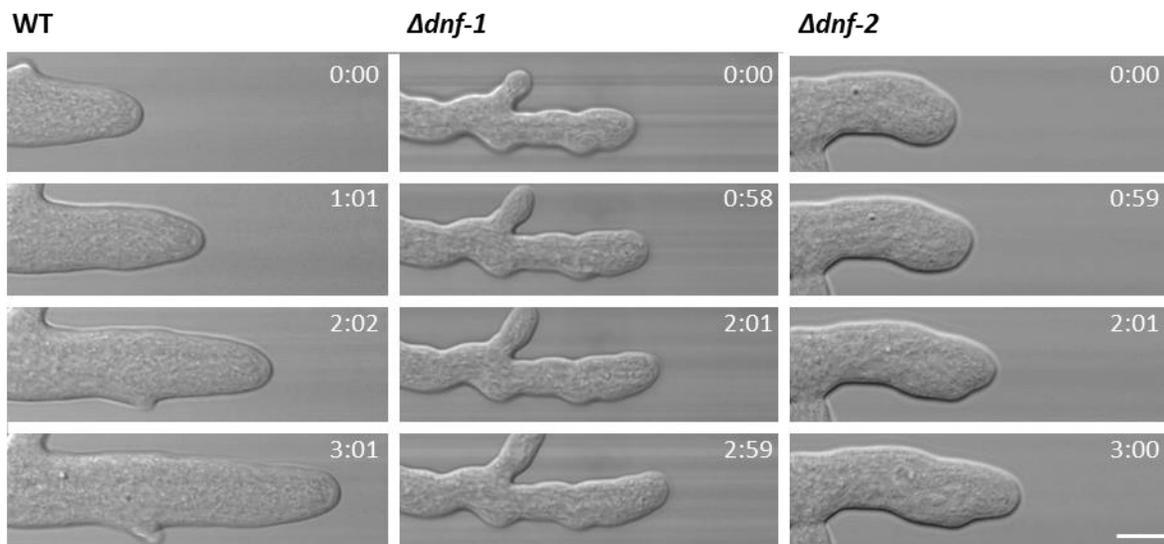


Figura 13. Morfología de las hifas de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT. A diferencias de las hifas de la cepa WT y de la mutante $\Delta dnf-2$, las hifas de la cepa mutante $\Delta dnf-1$ tienen un menor diámetro y un con dificultad para mantener la dirección de crecimiento, mientras que las de la cepa mutante $\Delta dnf-2$ tenían un diámetro parecido al de cepa WT y presentaban periodos de crecimiento isotrópico y polarizado, con eventos de pérdida de la dirección. (m:s) Barra de escala: 10 μ m.

7.3.2 Tasa de elongación y crecimiento de las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ en *N. crassa*.

El crecimiento de $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ de *N. crassa* estuvo disminuido. La tasa de elongación vegetativa de las hifas de ambas cepas, $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$, fue significativamente menor que la de la cepa WT. La mutante $\Delta dnf-1$ presentó un crecimiento del 30.6% (1.2 mm/h) con respecto a la cepa WT (**Figura 14A y 14B**), mientras que en la mutante $\Delta dnf-2$, la tasa de elongación fue el 57.7% (2.3 mm/h) con respecto a la cepa WT (**Figura 14A y 14B**). En la producción de biomasa, hubo una reducción más drástica en la mutante $\Delta dnf-1$, que solo presentó el 11.2% de crecimiento con respecto a la cepa WT (**Figura 14C**), sin embargo, la mutante $\Delta dnf-2$ no estuvo significativamente afectada (94.1%) (**Figura 14C**).

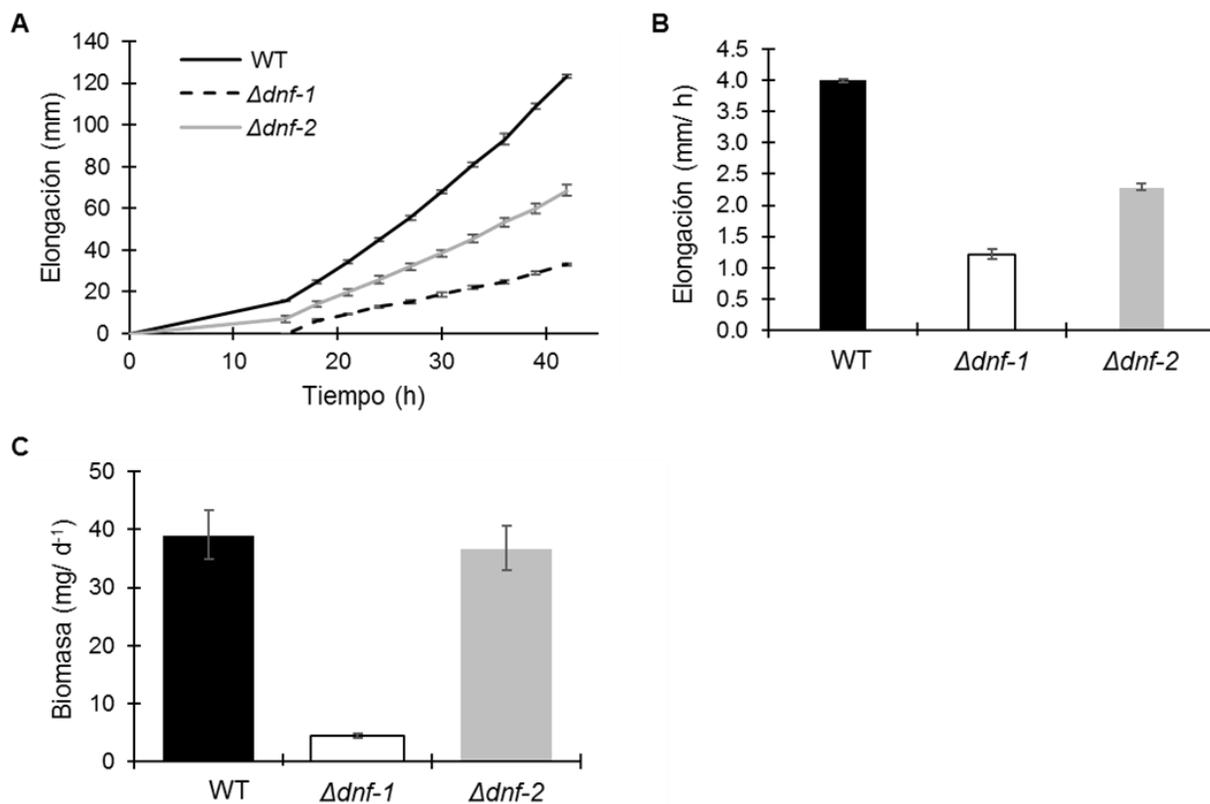


Figura 14. Análisis de elongación y biomasa de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT. (A) Gráfica de la tasa de elongación durante 42h de crecimiento. (B) Índice de elongación de las cepas mutantes y la cepa WT. En ambos casos, las cepas mutantes crecen menos que la cepa WT. (N=3) (C) Biomasa producida después de 24 h de crecimiento. Se observa que la cepa mutante $\Delta dnf-1$ produce menos biomasa que la cepa WT. Por el contrario, en la cepa mutante $\Delta dnf-2$ no se observó una diferencia significativa en la producción de biomasa con respecto a la cepa WT (N=5). Barras de error muestran el error estándar.

7.3.3 Formación de ramificaciones en las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ de *N. crassa*.

Debido a que el micelio de ambas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ tenía un relieve y densidad diferente, se evaluó cuantitativamente la producción de hifas aéreas y de formación de ramificaciones. Ambas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ produjeron hifas aéreas de tamaño significativamente menor comparado con la cepa WT, 62.0% y 74.2%, respectivamente. Comparando ambas mutantes, se observó que entre ellas también hubo una diferencia significativa, siendo la mutante $\Delta dnf-1$ la que presentó menor producción de hifas aéreas (**Figura 15**).

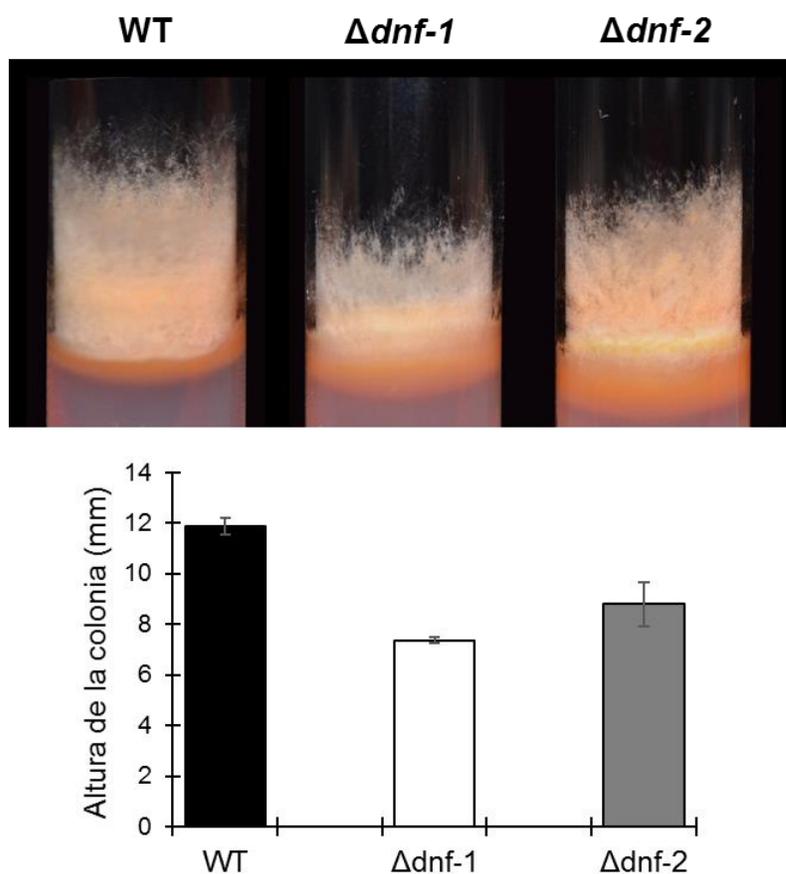


Figura 15. Producción de hifas aéreas en mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ y la cepa WT. Barra de error representan el error estándar. En ambos casos, la producción de hifas aéreas fue menor comparado con las de la cepa WT. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%. (N=3)

Por otro lado, se cuantificó la producción de ramificaciones, en la cepa mutante $\Delta dnf-1$, las ramificaciones fueron principalmente laterales. Mientras que en la mutante $\Delta dnf-2$, las ramificaciones se formaban en el ápice con una frecuencia de cuatro ramas en 500 μm , lo que representa el doble de ramificaciones de las que produjeron la cepa WT y la mutante $\Delta dnf-1$ (**Figura 16**).

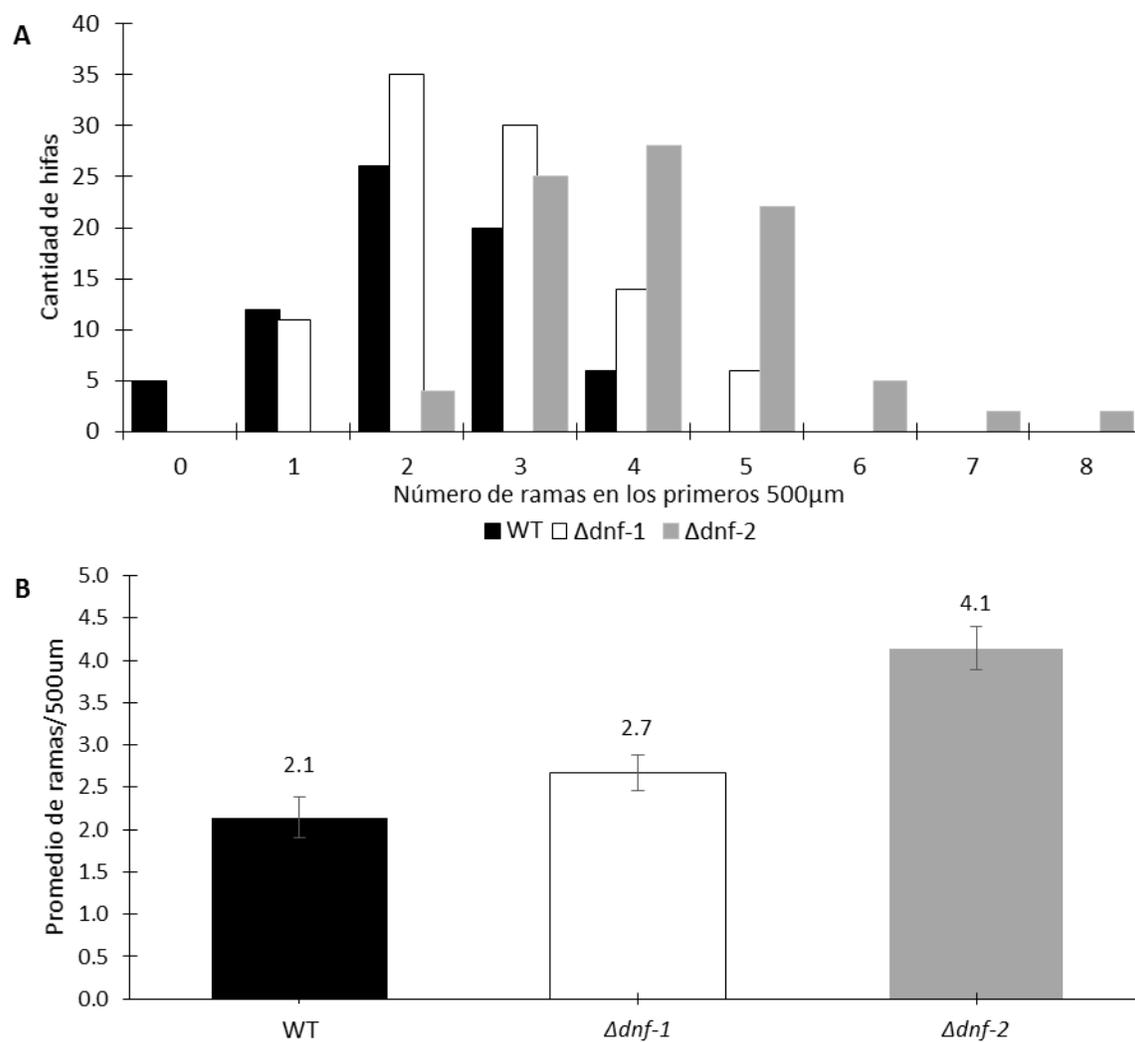


Figura 16. Frecuencia de ramas producidas de las mutantes $\Delta dnf-2$ y $\Delta dnf-1$. (A) Frecuencia absoluta de hifas principales con un número determinado de ramificaciones. (B) Promedio de ramificaciones. Barras de error = Intervalo de confianza al 95%.

7.3.4 Cuantificación de producción de conidios

Para conocer si la eliminación de los genes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ causaba defectos en la reproducción asexual, se evaluó la producción de conidios. Se encontró que las cepas con la mutación $\Delta dnf-1$ producían

únicamente 3.9% conidios con respecto a la WT, mientras que la cepa mutante $\Delta dnf-2$ producía el 49.8% (Figura 17).

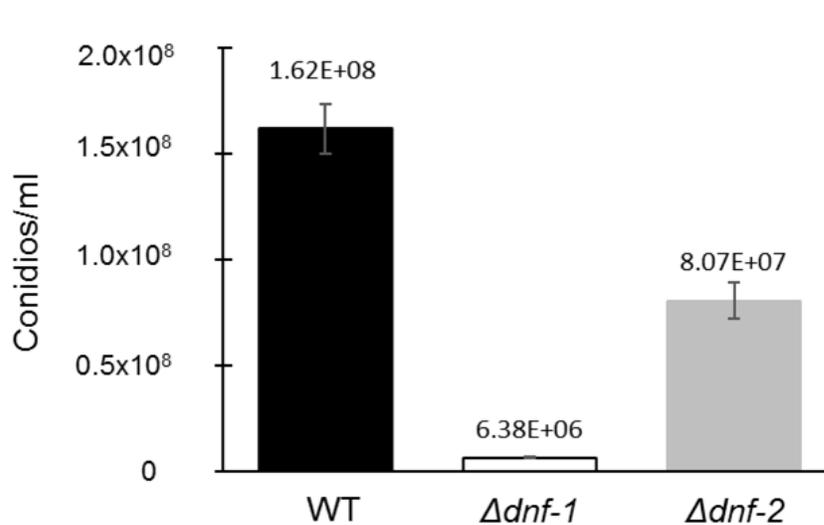


Figura 17. Producción de conidios de las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%.

7.3.5 Dinámica del Spitzenkörper en hifas maduras de la cepa $\Delta dnf-2$

Para conocer con mayor detalle el efecto de la eliminación del gen *dnf-2* en el crecimiento polarizado, se evaluó el comportamiento del Spitzenkörper teñido con el fluoróforo FM4-64. Se observó que el Spitzenkörper no seguía una trayectoria constante, continuamente se movía hacia un lado o hacia el otro en el domo apical, incluyendo en el eje z (Figura 18). También se observó que el Spitzenkörper se

desensamblaba, y se recuperaba en dos o más sitios de donde continuaba creciendo la hifa, posteriormente las fracciones del Spitzenkörper se volvían a concentrar en un solo punto y se recuperaba el crecimiento apical, estos eventos ocurrían intermitentemente, por lo que se producían hifas con protuberancias anormales (**Figura 18**). En los casos en los que no se volvían a unir las fracciones del Spitzenkörper, se generaron ramificaciones apicales (**Figura 18**). En la **figura 19** se muestra un traslape cuadro por cuadro de la posición del Spitzenkörper en la mutante $\Delta dnf-2$ y la cepa silvestre, donde se hace evidente como se divide y se vuelve a unir produciendo cambios de crecimiento isotrópico y crecimiento polarizado intercalados.

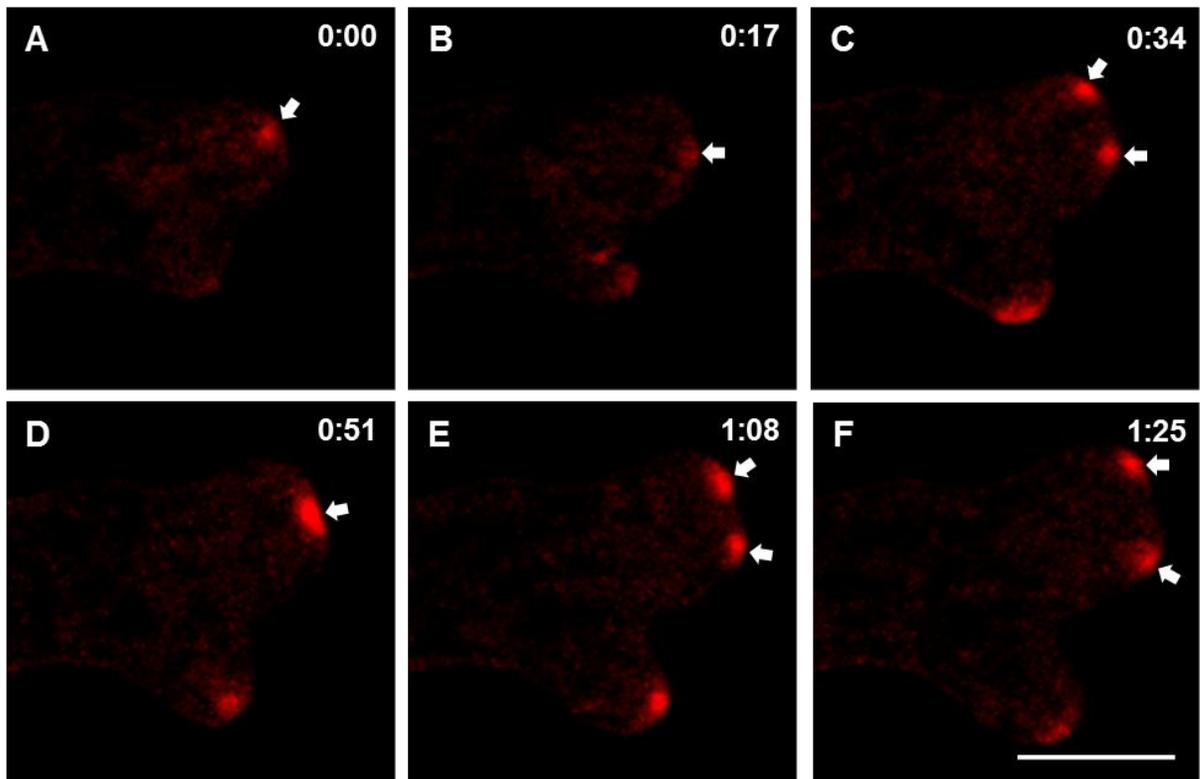


Figura 18. Serie de tiempo del comportamiento del Spitzenkörper teñido con FM4-64 en las hifas de la mutante $\Delta dnf-2$. El movimiento del Spitzenkörper es irregular (flechas) moviéndose de manera lateral. En algunas ocasiones se observa que se forma más de un Spitzenkörper a partir de uno inicial (B y C), los cuales se fusionan (D) y se vuelven a separar (E) para finalmente formar hifas individuales a partir de cada uno (F). (m:s) Barra de escala: 10 μm .

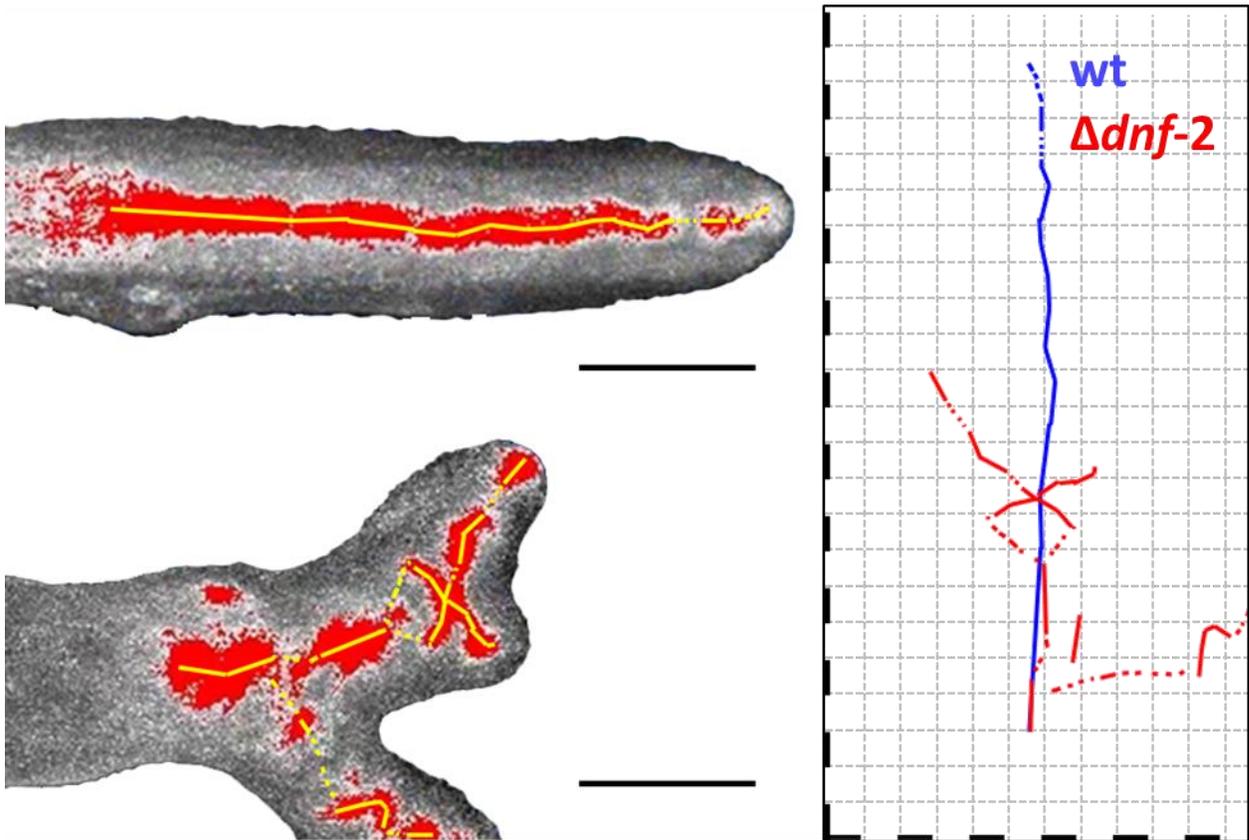


Figura 19. Trayectoria del Spitzenkörper en la cepa $\Delta dnf-2$ y WT. El panel izquierdo corresponde a un traslape de cuadro por cuadro de una serie de tiempo en color falso de hifas teñidas con FM464, Barra de escala = 10 μm . El panel derecho corresponde a la gráfica comparativa de la trayectoria del Spitzenkörper de una serie de tiempo. Cuadrante = 2 μm .

7.3.6 Comportamiento del citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta dnf-2$

Al observar la inestabilidad del Spitzenkörper teñido con FM4-64, se realizó un experimento para observar la organización y dinámica del citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta dnf-2$. Para esto se produjo una cepa con la delección del gen *dnf-2* que expresara la proteína quimérica Lifeact-GFP, que es un marcador general de la F-actina. En la **figura 20** se muestra una serie de tiempo donde se observa como la F-actina se encuentra en el Spitzenkörper en la región central pero más escasa que en la WT (ver Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Esta acumulación varía a través del tiempo, se ve que va disminuyendo la señal fluorescente, lo que puede significar que el citoesqueleto de actina en esta zona se está desensamblando para posteriormente volverse a ensamblar. Adicionalmente, se observó la actina forma el collar endocítico a una distancia constante del domo apical pero que abarca hasta la región basal de la hifa (**Figura 20**).

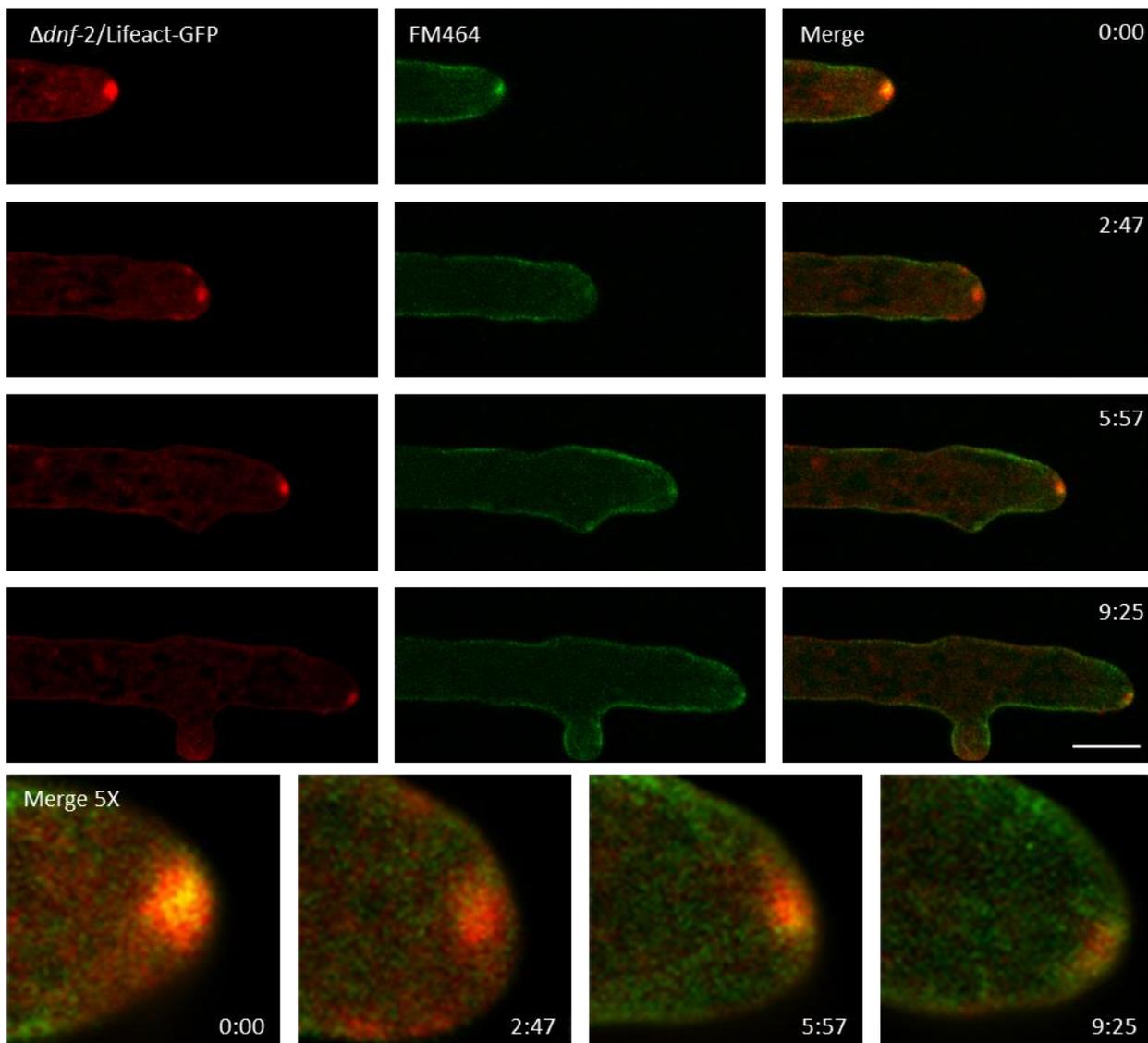


Figura 20. Serie de tiempo de una hifa de la cepa *Δdnf-2* expresando Lifeact etiquetada con GFP teñida con FM464. Barra de escala = 10 μ m.

Capítulo 8. Discusión

En hongos filamentosos hay información amplia aunque no suficiente, sobre la maquinaria de secreción y el sistema de tráfico vesicular, así como de la maquinaria de polaridad. Sin embargo, se conoce poco sobre el mecanismo de organización vesicular en el Spitzenkörper. Además no existen estudios que expliquen un mecanismo por el cual se establece la estratificación en las poblaciones de vesículas del Spitzenkörper (Riquelme, 2013; Verdín *et al.*, 2009), una probable explicación es la posibilidad de que las poblaciones de vesículas están identificadas por la composición y topología de la membrana que las forma. Las flipasas son proteínas candidatas para efectuar este tipo de “etiquetamiento”, ya que teóricamente una flipasa puede modificar cualitativa y cuantitativamente la distribución de aminofosfolípidos de la superficie de una vesícula.

Saccharomyces cerevisiae cuenta con cinco flipasas y tres subunidades regulatorias; los ortólogos Dnf1 y Dnf2 con la subunidad Lem3, Dnf3 con la subunidad Crf1, Drs2 con la subunidad Cdc50 y Neo1 (Catty *et al.*, 1997; Hua, 2002). Drs2 es una flipasa translocadora de fosfatidilserina y a menor grado fosfatidiletanolamina, requiere de la subunidad no catalítica Cdc50 para su actividad y salida del retículo endoplásmico, se localiza en los endosomas y en la red trans-Golgi circulando entre estos organelos y la membrana plasmática (Graham, 2004; Natarajan *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004; Sartorel *et al.*, 2015). Su actividad como translocador de fosfatidilserina se ha relacionado con el tráfico y la organización de proteínas a través de la red trans-Golgi y los endosomas. El hongo filamentoso *N. crassa* tiene cuatro flipasas de fosfolípidos; NCU07443 que corresponde al homólogo de Dnf1 y Dnf2, NCU00352 homólogo de Drs2, NCU03593 homólogo de Dnf3, y NCU03818 homólogo a Neo1. En este estudio se examinaron las mutantes por delección de genes correspondientes de las flipasas NCU07443 y NCU00352, denominadas como DNF-1 y DNF-2 respectivamente, para determinar su papel en el crecimiento polarizado, además de utilizar etiquetado por proteínas fluorescentes para conocer la localización y su dinámica de la proteína DNF-2.

El índice de identidad demostrado y la similitud en el sitio de especificidad (Baldrige y Graham, 2012) sugieren que tanto DNF-1 como DNF-2 tienen los mismos sustratos que sus homólogos en *S. cerevisiae*, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina para DNF-1, y fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina para DNF-2.

La tirosina en la posición 620 de Dnf1 es reemplazada por un triptófano en el amino ácido en la posición 620 de DNF-1, ambos aminoácidos cuentan con un residuo hidrofóbico de gran tamaño que de igual manera sugiere una similitud en la especificidad de sustrato entre los homólogos de la flipasa, sin embargo, la tirosina presenta un grupo hidroxilo, que propiciaría la interacción con grupos anicónicos como el de la fosfatidilserina.

Un aspecto interesante de este grupo de proteínas es la presencia del motivo NPFxD de endocitosis, que fue encontrado por primera vez en levaduras, como parte de proteínas residentes del Golgi, que aparentemente son endocitadas mediante este motivo (Tan, Howard, y Payne, 1996). NPFxD está presente tanto en DNF-1 como DNF-2 al igual que en Dnf1 y Drs2 de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2006) y en DnfA y DnfB de *A. nidulans* (Schultzhaus *et al.*, 2015). En organismos como *Penicillium* spp está ausente. Aunque P4-ATPasas están relativamente conservadas en eucariotas, solo uno de todos los motivos está presente en hongos. Por ejemplo, aunque dos secuencia NPFxD están presentes en Drs2 en levaduras, su delección no resulta en un cambio observable en su localización (Liu *et al.*, 2006). En este estudio, no se evaluó el efecto de la ausencia del motivo NPFxD en las mutaciones en DNF-1 y DNF-2 en la endocitosis directamente, sin embargo, la internalización del colorante FM4-64, es prueba de que la endocitosis se está llevando a cabo en estas mutantes, por lo que este aspecto tendrá que seguir estudiándose.

La delección de DNF-1 tuvo un efecto severo en las hifas, tanto en el crecimiento como en la formación de conidios, esto podría ser explicado por el papel que tiene esta proteína en la secreción. El decremento en la tasa de crecimiento puede deberse a que hay una alteración en el tráfico vesicular, debido a que por la distribución alterada de aminofosfolípidos, las vesículas no llegan a su destino para ser exocitadas y liberar su contenido. Asimismo, la reducción dramática de la producción de conidios puede ser el resultado de un proceso similar, en el que la falta de secreción impida su formación (Alder-Baerens *et al.*, 2006; Balhadère y Talbot, 2001). En *Magnaporthe oryzae*, el homólogo de DNF-1 es esencial para la patogenicidad (Balhadère y Talbot, 2001; Gilbert *et al.*, 2006). Estas mutantes son deficientes en la formación del apresorio y la penetración del hospedero (Balhadère y Talbot, 2001) muy probablemente por los problemas en la secreción de vesículas.

En la mutante de DNF-2 de *N. crassa* se observó un patrón errático en la dirección del Spitzenkörper, por lo que se decidió observar el efecto de la mutación de esta proteína en el citoesqueleto de actina que es el soporte principal de esta estructura. Al observar la actina con el reportero general Lifeact-GFP, se

observó que hay una desorganización intermitente de este citoesqueleto en el núcleo del Spitzenkörper pero no una desaparición completa de la nube de vesículas, esto sugiere que la ausencia de los filamentos de actina afecta fundamentalmente la organización de las microvesículas, y que de alguna manera, la falta de asimetría de membrana genera inestabilidad del citoesqueleto de actina. En *S. cerevisiae*, Arf-GAP Gcs1, involucrada en la formación de vesículas, presenta un motivo el cual se asocia a la fosfatidilserina, la mutante por delección del gen correspondiente a Gcs1 presenta un fenotipo similar a la mutante de *dnf-2* en cuanto a la organización de la actina (Blader *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2013).

El Spitzenkörper es una estructura dinámica compuesta de muchas vesículas que han sido agrupadas en al menos dos clases, un grupo de pequeñas vesículas o microvesículas que se encuentra en el centro del Spitzenkörper, y otro de vesículas de mayor tamaño que rodean a las primeras formando la capa externa de esta estructura (Grove y Bracker, 1970; Howard, 1981; Lopez-Franco y Bracker, 1996; Verdín *et al.*, 2009). En *A. nidulans*, DnfA ha sido localizada en la capa más externa del Spitzenkörper. En *N. crassa*, DNF-2 se localizó al igual que DnfB de *A. nidulans* en la región central del Spitzenkörper. Aunque las levaduras de gemación no tienen esta estructura, hay cierta analogía en que hay dos rutas secretoras reguladas por dos flipasas distintas y que transportan cargos a diferentes destinos (Harsay y Bretscher, 1995). Estas flipasas son la Drs2p y Dnf3p (Alder-Baerens *et al.*, 2006; Gall *et al.*, 2002). En *N. crassa* se demostró que las microvesículas que contienen la flipasa DNF-2, colocalizan con las microvesículas que contienen la quitina sintasa CHS-1. Y aunque en este organismo no se ha podido observar, en *A. nidulans*, DnfA está asociada en las macrovesículas que colocalizan con Gs-1 que es un componente de la 1,3 β -glucano sintasa. Esta separación espacial y funcional sugiere que la colección de vesículas en el Spitzenkörper no es un evento al azar, sino un proceso altamente regulado de secreción y crecimiento. Considerando los hallazgos en *A. nidulans* de DnfA y DnfB (Schultzhaus *et al.*, 2015) y los de DNF-2 en este trabajo, se puede decir que tienen un papel complementario en el soporte del crecimiento polarizado a través de diferentes tipos de vesículas.

Capítulo 9. Conclusiones

- La similitud en el sitio de especificidad sugieren que el sustrato de DNF-1 es fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y para DNF-2 fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.
- La tirosina en la posición 620 de Dnf1 es reemplazada por un triptófano en el amino ácido en la posición 620 de DNF-1.
- El motivo NPFxD de endocitosis está presente tanto en DNF-1 como DNF-2.
- DNF-2 se localiza exclusivamente en el núcleo del Spitzenkörper en las membranas de las microvesículas.
- DNF-2 se transporta de manera anterógrada desde regiones anteriores al subápice.
- DNF-2 colocaliza con vesículas que acarrean la quitina sintasa 1 CHS-1
- DNF-2 participa en la estratificación del Spitzenkörper modificando la composición fosfolipídica de la superficie de las vesículas.
- La mutación *dnf-1* y *dnf-2* tiene un severo efecto en el crecimiento vegetativo y producción de hifas aéreas.
- La mutación *dnf-1* y *dnf-2* afecta la reproducción sexual.
- La endocitosis no se ve notoriamente afectada en las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$
- La ausencia de DNF-2 desestabiliza el Spitzenkörper afectando el crecimiento polarizado y su dirección.
- DNF-2 está involucrada en la estabilidad del citoesqueleto de actina en el Spitzenkörper, en ausencia de esta el citoesqueleto de actina presenta eventos de inestabilidad.

Literatura citada

- Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., y Holthuis, J. C. M. (2006). Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1632–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-10-0912>
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., y Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 67(4), 891–905. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x>
- Baldrige, R. D., y Graham, T. R. (2012). Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), E290–E298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115725109>
- Balhadère, P. V., y Talbot, N. J. (2001). PDE1 encodes a P-type ATPase involved in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 13(9), 1987–2004. <https://doi.org/10.1105/TPC.010056>
- Bartnicki-García, S., Bartnicki, D. D., y Gierz, G. (1995). Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 372–378. <https://doi.org/10.1139/b95-271>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF01322464>
- Bartnicki-García, S., y Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*, 165(3890), 302–304. <https://doi.org/10.1126/science.165.3890.302>
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J. Y., Tilsner, J., y Read, N. D. (2010). F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 547–557. <https://doi.org/10.1128/EC.00253-09>
- Blader, I. J., Cope, M. J. T. V., Jackson, T. R., Profit, A. A., Greenwood, A. F., Drubin, D. G., ... Theibert, A. B. (1999). GCS1, an Arf Guanosine Triphosphatase-activating Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Is Required for Normal Actin Cytoskeletal Organization In Vivo and Stimulates Actin Polymerization In Vitro. *Molecular Biology of the Cell*, 10(3), 581–596. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.3.581>
- Bonifacino, J. S., y Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744428>
- Brunswick, H. (1924). Untersuchungen über Geschlechts und kerverhaktische bei der Hymenomyzete *Coprinus*. *Botanische Abhandlungen*, 5, 1–152.
- Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A., y Goffeau, A. (1997). The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Letters*, 409(3), 325–32. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00446-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00446-8)
- Clutterbuck, A. J. (1970). Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 60(1), 133–5. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-1-133>
- Das, A., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., Bradford, W. D., Alexander, R., Rubinstein, B., y Li, R. (2012). Flippase-

- mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity. *Nature Cell Biology*, 14(3), 304–10. <https://doi.org/10.1038/ncb2444>
- Deacon, W. J. (2005). *Fungal Biology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., y Mouriño-Pérez, R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.004>
- Echauri-Espinosa, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., y Mouriño-Pérez, R. R. (2012). Coronin is a component of the endocytic collar of hyphae of *neurospora crassa* and is necessary for normal growth and morphogenesis. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038237>
- Ellgaard, L. (1999). Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science*, 286(5446), 1882–1888. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1882>
- Gall, W. E., Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I., y Graham, T. R. (2002). Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Current Biology*, 12(18), 1623–1627. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01148-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01148-X)
- Gilbert, M. J., Thornton, C. R., Wakley, G. E., y Talbot, N. J. (2006). A P-type ATPase required for rice blast disease and induction of host resistance. *Nature*, 440(7083), 535–539. <https://doi.org/10.1038/nature04567>
- Girbardt, N. (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta*, 59(1), 47–49. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01912343>
- Gottlieb, M., Boothroyd, J., Duffy, P., Hehl, A., Petri, B., Wastling, J., ... Wortman, J. (2016). FungiDB. Retrieved from <http://fungidb.org/fungidb/>
- Graham, T. R. (2004). Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends in Cell Biology*, 14(12), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.10.008>
- Grove, S. N., y Bracker, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology*, 104(2), 989–1009.
- Hanamatsu, H., Fujimura-Kamada, K., Yamamoto, T., Furuta, N., y Tanaka, K. (2014). Interaction of the phospholipid flippase Drs2p with the F-box protein Rcy1p plays an important role in early endosome to trans-Golgi network vesicle transport in yeast. *Journal of Biochemistry*, 155(1), 51–62. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt094>
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., y Momany, M. (2005). Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 225–229. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.225-229.2005>
- Harsay, E., y Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *Journal of Cell Biology*, 131(2), 297–310. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.297>
- 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. In *Methods in Microbiology* (Vol. 34, pp. 63–87). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34003-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34003-1)
- Howard, R. J. (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *Journal of Cell Science*, 48, 89–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7196918>

- Hua, Z. (2002). An Essential Subfamily of Drs2p-related P-Type ATPases Is Required for Protein Trafficking between Golgi Complex and Endosomal/Vacuolar System. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 3162–3177. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-03-0172>
- Jersild, R., Mishkin, S., y Niederpruem, D. J. (1967). Origin and ultrastructure of complex septa in *Schizophyllum commune* development. *Archiv Für Mikrobiologie*, 57(1), 20–32. <https://doi.org/10.1007/BF00405763>
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
- Liu, K., Hua, Z., Nepute, J. A., y Graham, T. R. (2006). Yeast P4-ATPases Drs2p and Dnf1p Are Essential Cargos of the NPFxD/Sla1p Endocytic Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 18(2), 487–500. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-07-0592>
- Lopez-Franco, R., y Bracker, C. E. (1996). Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma*, 195(1–4), 90–111. <https://doi.org/doi:10.1007/bf01279189>
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., ... Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*, 473(7346), 181–6. <https://doi.org/10.1038/nature09969>
- McDaniel, D. P., y Roberson, R. W. (2000). Microtubules Are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genetics and Biology: FG y B*, 31(3), 233–44. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1249>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.10.007>
- Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z., y Graham, T. R. (2004). Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10614–10619. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404146101>
- Peberdy, J. F., Wallis, G. L., y Archer, D. B. (2001). Protein secretion by fungi. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 1, pp. 73–114). [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80006-X)
- Pelham, H. R. B., y Rothman, J. E. (2000). The Debate about Transport in the Golgi — Two Sides of the Same Coin ?, 102(1), 713–719.
- Peñalva, M. Á. (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), 684–692. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.005>
- Reinhardt, M. O. (1892). Das Wachstum der Pilzhyphen. *Jahrb Wiss Bot*, 23, 479–566.
- Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., y Bartnicki-García, S. (1997). Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17), 9096–101. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9096>
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67(June), 587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A., y Freitag, M. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green

- fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1853–1864. <https://doi.org/10.1128/EC.00088-07>
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., y Bartnicki-García, S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology: FG y B*, 24(1–2), 101–9. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1074>
- Riquelme, M., y Sánchez-León, E. (2014). The Spitzenkörper: A choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.003>
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-García, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., ... Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–474. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.008>
- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., y Kazuma, T. (2004). Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth, Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(7), 3418–3432. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-11-0829>
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2006). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. In J. Sambrook y D. Russell (Eds.), *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (4th ed., Vol. 2006, pp. 32–34). Melbourn: Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4084>
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., y Riquelme, M. (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell*, 10(5), 683–695. <https://doi.org/10.1128/EC.00280-10>
- Sartorel, E., Barrey, E., Lau, R. K., y Thorner, J. (2015). Plasma membrane aminoglycerolipid flippase function is required for signaling competence in the yeast mating pheromone response pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), 134–150. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1193>
- Schmidt, F.-R. (2011). *Industrial Applications*. (M. Hofrichter, Ed.), *The Mycota X. Industrial Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8>
- Schultzhaus, Z., Yan, H., y Shaw, B. D. (2015). *Aspergillus nidulans* flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB. *Molecular Microbiology*, 97(1), 18–32. <https://doi.org/10.1111/mmi.13019>
- Seaman, M. N. J. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(18), 2842–2858. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8354-1>
- Sexton, A. C., y Howlett, B. J. (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1941–1949. <https://doi.org/10.1128/EC.00277-06>
- Sharon, A., y Shlezinger, N. (2013). Fungi Infecting Plants and Animals: Killers, Non-Killers, and Cell Death. *PLoS Pathogens*, 9(8), 8–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003517>
- Shatkin, A. J., y Tatum, E. L. (1959). Electron Microscopy of *Neurospora crassa* Mycelia. *J. Cell Biol.*, 6(3), 423–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.6.3.423>
- Simons, K., y Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–72. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Tan, P. K., Howard, J. P., y Payne, G. S. (1996). The sequence NPF₂D defines a new class of endocytosis

- signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 135(6 II), 1789–1800. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1789>
- Verdín, J., Bartnicki-García, S., y Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x>
- Vogel, H. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull*, 13, 42–43.
- Voisey, C. R. (2010). Intercalary growth in hyphae of filamentous fungi. *Fungal Biology Reviews*, 24(3–4), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.12.001>
- Westergaard, M., y Mitchell, H. K. (1947). A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10), 573–577. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/2437339?seq=1#page_scan_tab_contents
- Wösten, H. A. B., Moukha, S. M., Sietsma, J. H., y Wessels, J. G. H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 137(8), 2017–2023. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-8-2017>
- Xu, P., Baldrige, R. D., Chi, R. J., Burd, C. G., y Graham, T. R. (2013). Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *The Journal of Cell Biology*, 202(6), 875–886. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305094>