

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



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

**Identificación del homólogo a Cornichon/Erv14 y su papel en
la regulación del crecimiento del hongo filamentoso
*Neurospora crassa***

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

Presenta:

Luis Enrique Sastré Velásquez

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Luis Enrique Sastré Velásquez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Luis Enrique Sastré Velásquez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Microbiología.

Identificación del homólogo a Cornichon/Erv14 y su papel en la regulación del crecimiento del hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Las hifas de los hongos filamentosos se extienden por crecimiento polarizado apical. Este fenómeno se sustenta por el transporte de vesículas secretoras dirigidas al ápice, donde la acumulación de macro y microvesículas dan lugar al Spitzenkörper (SPK). Estas vesículas proporcionan a la membrana plasmática y a la pared celular todos los componentes moleculares necesarios para su expansión. Las rutas secretoras aseguran el tráfico de moléculas a diferentes destinos celulares. El complejo Coat Protein II (COPII) está involucrado en la formación de vesículas secretoras con cubierta COPII derivadas del retículo endoplásmico (RE). Algunas de las proteínas involucradas en la formación de vesículas con cubierta COPII incluyen activadores de este complejo, proteínas de cubierta interna y externa de la vesícula y también a diferentes adaptadores cargo, como las proteínas transmembranales que pertenecen a la familia Cornichon (Cni/Erv14p). Cni de *Drosophila melanogaster* es requerida para la exportación eficiente del factor de crecimiento TGF α Gurken (Grk) involucrado en la ovogénesis. Erv14p de *Saccharomyces cerevisiae* es el adaptador cargo específico para algunas proteínas, tales como la Axl2p, necesaria para establecer el crecimiento polarizado y el brote axial de la levadura. En este trabajo identificamos un ortólogo putativo de Cni/Erv14p en *Neurospora crassa* (CNI; NCU06922) y analizamos su esencialidad y su localización subcelular en hifas en crecimiento. Para evaluar la esencialidad de *cni* se realizó el Knock Out (KO) de este gen y se analizó el fenotipo de la cepa mutante resultante. Δcni en estado homocarión no fue viable, indicando que este gen es esencial para *N. crassa*. Se etiquetó a CNI con las proteínas fluorescentes GFP y mChFP, observándose que la proteína se distribuye en una red endomembranosa a lo largo de las hifas y cerca de la punta. Los ensayos de co-expresión entre CNI-GFP y dsRED-NCA-1, una ATPasa de tipo SERCA asociada al RE perinuclear, revelaron una co-localización parcial entre ambas proteínas en el RE cercano a la membrana nuclear. La co-expresión de CNI-GFP y CSE-7-mChFP, previamente identificada como un adaptador cargo para la quitina sintasa CHS-4, reveló una co-localización parcial de ambas proteínas en algunas regiones distintas de la Red de Cisternas Elongadas (NEC). CNI-GFP y mChFP-YPT-1, una Rab GTPasa previamente identificada en cisternas de Golgi tempranas y tardías y en el núcleo del SPK, co-localizaron parcialmente en algunas cisternas de Golgi. Se etiquetaron dos marcadores putativos del complejo COPII, las proteínas SEC-16 y SEC-24, y se realizaron co-expresiones entre estos y las diferentes versiones fluorescentes de CNI, donde CNI co-localizó parcialmente con estos marcadores COPII putativos. Para verificar la participación de CNI en el complejo COPII de *N. crassa* se realizó una co-expresión entre CNI-GFP y mChFP-YPT-1 bajo el efecto de brefeldina A (BFA). La acumulación de CNI en los cuerpos de BFA sugiere la participación de CNI en el complejo COPII de este hongo filamentoso. Este trabajo proporciona información novedosa acerca del estudio de los adaptadores cargo de los hongos filamentosos.

Palabras clave: *Neurospora crassa*, Knock Out (KO), Retículo Endoplásmico (RE), cisternas de Golgi, complejo Coat Protein II (COPII), adaptador cargo, brefeldina A (BFA).

Abstract of the thesis presented by **Luis Enrique Sastré Velásquez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Identification of the homolog of Cornichon/Erv14 and its role in the regulation of growth in the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Meritxell Riquelme Pérez, Ph. D.
Thesis Director

Hyphae of filamentous fungi extend by apical polarized growth. This phenomenon is supported by the transport of secretory vesicles directed to the apex, where the accumulation of macro and microvesicles gives rise to the Spitzenkörper (SPK). These vesicles provide the plasma membrane and the cell wall with all the molecular components necessary for cell expansion. The secretory pathways ensure the traffic of molecules to different cellular destinations. The Coat Protein complex II (COPII) is involved in the formation of COPII secretory vesicles at the endoplasmic reticulum (ER). Some of the proteins involved in COPII vesicles formation include activators of this complex, the inner and outer vesicle coat proteins and different cargo adaptors, such as the transmembrane proteins belonging to the Cornichon (Cni/Erv14p) family. *Drosophila melanogaster* Cni is required for the efficient export of the growth factor TGF α Gurken (Grk), involved in oogenesis. *Saccharomyces cerevisiae* Erv14p is the specific cargo adaptor for some proteins, such as Axl2p, required to establish polarized growth and axial budding. In this work, we identified a putative orthologue of Cni/Erv14p in *Neurospora crassa* (CNI; NCU06922) and analyzed its essentiality and its subcellular localization in growing hyphae. To evaluate the essentiality of *cni*, the phenotype of the corresponding Knock Out (KO) strain was analyzed. Δcni strains in homokaryon state were not viable, proving that this gene is essential for *N. crassa*. CNI tagged with GFP and mChFP was distributed as an endomembranous network along the hyphae and close to the tip. Co-expression assays between CNI-GFP and dsRED-NCA-1, a SERCA type ATPase associated with the perinuclear ER, showed a partial co-localization of both proteins at the ER close to the nuclear membrane. Co-expression of CNI-GFP and CSE-7-mChFP, previously identified as a putative cargo adaptor for chitin synthase CHS-4, revealed a partial co-localization of both proteins in some distinct regions of the Network of Elongated Cisternae (NEC). CNI-GFP and mChFP-YPT-1, a Rab GTPase previously identified at early and late Golgi cisternae and at the core of the SPK, co-localized partially at some of the Golgi cisternae. In addition, we tagged two COPII putative markers, SEC-16 and SEC-24. Co-expression of these markers and the different versions of CNI showed partial co-localization of CNI with these putative COPII markers. To verify the participation of CNI in COPII complex assembly of *N. crassa* the effect of brefeldin A (BFA) in a heterokaryon co-expressing CNI-GFP and mChFP-YPT-1 was analyzed. The accumulation of CNI in BFA bodies suggested the participation of CNI in COPII complex of this fungus. This study provides some light onto the study of cargo adaptors in filamentous fungi.

Keywords: *Neurospora crassa*, Knock Out (KO), Endoplasmic Reticulum (ER), Golgi cisternae, Coat Protein complex II (COPII), cargo adaptor, brefeldin A (BFA).

Dedicatoria

A mi mayor fuente de inspiración, mi familia.

Agradecimientos

En primera instancia quiero reconocer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo a los jóvenes científicos como yo en nuestra formación profesional; en particular agradezco el financiamiento brindado al proyecto CB-222375 del cual surgió este trabajo y a la beca que me fue otorgada (N. 613448), muchas gracias por permitirme estudiar un posgrado de calidad.

Quiero agradecer al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por haberme dado la oportunidad de formar parte de una institución tan reconocida a nivel nacional e internacional y permitirme realizar mis estudios de maestría. También agradezco a todas las personas que conforman al posgrado en Ciencias de la Vida y al departamento de Microbiología, fue increíble trabajar con personas tan eficientes y me es grato haber hecho tan excelentes amistades. Aprovechando este segmento quisiera reconocer al cuerpo técnico del Departamento de Microbiología y del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (Olga Callejas, Memo González y Diego Delgado) por mantener las instalaciones y los equipos en estado óptimo y por todo el apoyo técnico brindado a lo largo de mi trabajo.

Por otro lado quiero agradecer a mi comité de tesis de maestría, integrado por la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, el Dr. Israel Rocha Mendoza y el Dr. Omar Homero Pantoja Ayala, por sus excelentes aportaciones al desarrollo de este estudio y por toda su paciencia, muchas gracias.

Quiero dar un especial agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Meritxell Riquelme Pérez, por darme la oportunidad de integrarme a su excelente equipo de trabajo y por siempre estar en la mejor disposición para el apoyo a los estudiantes, sin duda alguna una de las mejores decisiones que he tomado a nivel profesional ha sido el contactarla para lograr ser su estudiante. Muchas gracias por cada corrección, consejo, “regaño”, por su infinita paciencia, por hacerme dar más de mí (aun cuando yo pensaba que ya no podría dar más) y por brindarme su amistad tanto dentro como fuera del laboratorio, se lleva todo mi humilde respeto y admiración por su gran calidad humana y profesional Dra.

Me gustaría agradecer a mi grupo de trabajo, el grupo Riquelme, por todos sus comentarios y aportaciones a mi trabajo de tesis; fue un placer trabajar y aprender de ustedes. Quiero aprovechar este segmento para agradecer especialmente a la Dra. Adriana María Rico Ramírez por todo el entrenamiento y apoyo que amablemente me brindó en todo este tiempo, aunque en realidad lo más invaluable que me llevo de todo esto es su amistad, muchas gracias por todo Adria.

También quiero agradecer a todas las personas con las que la ciencia me permitió coincidir en el transcurso de mis estudios, sin duda alguna cada uno de ustedes contribuyó muy a su manera a mi formación personal y profesional. Muchas gracias a mis compañeros y amigos de la generación: Daniel Fernández, Tere Ibarra, Mitzu Fajardo, Arturo Hernández, Brenda Iduarte, Julián Cota, Manuel Carballo, Caro Delgado, Cristina Díaz, entre otros (no me culpen, son muchos). Muchas gracias a mis amigos que hicieron mis días más amenos en el laboratorio y que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme: Lluvia Vargas, Lucía Romero, Arianne Del Villar, Yesenia Tamayo, Fausto Villavicencio, Marisela Garduño, Lolis Camacho, Alejandra Hernández, Liz Medina, Scarlett Alonso, entre otros (no me culpen, siguen siendo muchos). Algo de lo que me siento muy satisfecho es de haber tenido estudiantes en el transcurso del posgrado, personas

excelentes que conocí gracias a la ciencia y de las cuales logré aprender bastante y me quedé con su excelente amistad: Carmen Telser, Pilar Campuzano, Yaneli Hipólito y Juan Ramos. Me siento muy afortunado de haber hecho tantas amistades, les agradezco mucho por todo.

Por último, y en este caso más importante, quiero agradecer a lo máspreciado que tengo en la vida: mi familia. Inicialmente quiero agradecer a mi madre debido a que ella es de mis mayores fuentes de inspiración, tanto profesional como personal, siempre ha dado todo por nosotros y espero algún día lograr compensarle por ello, muchas gracias por todo madre. Muchas gracias a mi hermano Carlos Daniel por todo el apoyo que me ha dado a lo largo de mis años, somos muy distintos pero eso mismo es lo que nos permite aprender tanto de uno como del otro, gracias por apoyar a nuestra madre en mi ausencia. Quiero agradecer a mi hermano Sergio David por todo el apoyo personal y profesional a lo largo de mi vida, más que un ejemplo a seguir te has convertido en un reto a superar hermano, espero algún día poder compensar todo el apoyo que me has dado. También quiero reconocer el apoyo incondicional que me ha brindado mi cuñada, Connie, que a pesar de la distancia siempre ha encontrado la manera de apoyarnos, muchas gracias por todo. Finalmente quisiera agradecer a otra de mis mayores fuentes de inspiración, mi padre, que a pesar de todos sus desarreglos y complejos siempre buscó y esperó lo mejor de mí brindándome todo su apoyo y confianza, muy a tu manera fuiste el mejor padre que pude pedir y no hay día en el que deje de pensar en ti, gracias por todo papá.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	lii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
 Capítulo 1. Introducción.....	 1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Crecimiento polarizado: mediado por el tráfico vesicular al ápice.....	2
1.1.2 El sistema secretor fúngico.....	3
1.1.3 Complejo Coat Protein II: revistiendo vesículas para la ruta RE-Golgi.....	5
1.1.4 Receptores de proteínas cargo: proteínas especializadas de membrana celular..	7
1.1.5 Los receptores de proteínas cargo de la familia Cornichon Cni/Erv-14p.....	9
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos.....	11
1.4.1 Objetivo general	11
1.4.2 Objetivos específico.....	11
 Capítulo 2. Metodología.....	 12
2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	12
2.1.1 Cepas.....	12
2.1.2 Medios de cultivo.....	13
2.1.2.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	13
2.1.2.2 Medios de cultivo para <i>N. crassa</i>	13
2.1.3 Condiciones de cultivo.....	14
2.1.3.1 Obtención de conidios.....	14
2.1.3.2 Producción de micelio.....	14
2.1.3.3 Cruzas sexuales.....	14

2.2 Análisis bioinformático.....	15
2.3 Knock out del homólogo a Cni/Erv14 en <i>N. crassa</i>	17
2.4 Etiquetado endógeno C-terminal: CNI-GFP, CNI-mChFP, SEC-24-mChFP y SEC-16-GFP.....	19
2.5 Generación, selección y comprobación de transformantes.....	25
2.5.1 Transformantes de <i>E. coli</i>	25
2.5.2 Transformación de <i>N. crassa</i>	25
2.5.3 Comprobación de la correcta integración de las construcciones génicas.....	26
2.6 Análisis de microscopía y procesamiento de datos.....	27
2.6.1 Microscopía confocal.....	27
2.6.2 Procesamiento de datos.....	28
2.7 Uso del fluorocromo FM4-64 y del inhibidor brefeldina A.....	29
Capítulo 3. Resultados.....	30
3.1 Determinación de la esencialidad del gen <i>cni</i> de <i>N. crassa</i>	30
3.1.1 La viabilidad de Δcni solo es posible en estado heterocarión.....	30
3.1.2 Promoviendo el fenotipo aberrante.....	31
3.1.3 Analizando el fenotipo aberrante.....	32
3.2 Análisis de la distribución y localización subcelular de CNI de <i>N. crassa</i>	34
3.2.1 CNI se distribuye en una red endomembranal a lo largo de la hifa.....	34
3.2.2 CNI co-localiza parcialmente con dos marcadores del retículo endoplásmico...	35
3.2.3 Asociación entre CNI y las cisternas de Golgi.....	37
3.3 CNI y su relación con el complejo COPII en hifas de <i>N. crassa</i>	39
3.3.1 CNI co-localiza parcialmente con intermediarios putativos de COPII.....	39
3.3.2 CNI se acumula en cuerpos de BFA.....	44
Capítulo 4. Discusión.....	46
4.1 CNI cumple un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de <i>N. crassa</i>	46
4.2 CNI se localiza en el RE y en cisternas de Golgi.....	47
4.3 CNI de <i>N. crassa</i> es una proteína asociada al complejo COPII.....	48
4.4 La compleja organización de los organelos asociados a COPII en <i>N. crassa</i>	50
4.5 Perspectivas.....	50

Capítulo 5. Conclusiones.....	52
Literatura citada.....	53
Anexos.....	59

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación de un ápice de <i>Neurospora crassa</i> con algunos de los componentes implicados en el crecimiento polarizado.....	2
2	Representación general de las rutas de secreción convencional para el transporte vesicular.....	5
3	Esquema mostrando la interacción de los componentes COPII para la formación y revestimiento de vesículas.....	6
4	Alineamiento de aminoácidos de <i>N. crassa</i> CNI y sus ortólogos en diferentes organismos modelo.....	17
5	Representación de la técnica utilizada para la substitución de <i>cni</i> por un gen de resistencia a un antibiótico.....	18
6	Amplicones obtenidos para substituir la secuencia codificante a CNI por el gen <i>hph</i>	18
7	Representación de la estrategia utilizada para el etiquetamiento endógeno de CNI (1) y SEC-16 (2) con GFP.....	20
8	Amplicones obtenidos para el marcaje de <i>cni</i> y <i>sec-16</i> con la proteína fluorescente GFP.....	21
9	Representación de las estrategias utilizadas para la generación del fragmento común <i>8xgly/mchfp/natR</i> (1) y para el etiquetamiento endógeno de CNI (2) y SEC-24 (3) con mChFP.....	23
10	Amplicones obtenidos para el marcaje de <i>cni</i> y <i>sec-24</i> con la proteína fluorescente mChFP.....	24
11	Comprobación de la correcta integración de las construcciones moleculares en el locus específico de <i>cni</i> , <i>sec-24</i> y <i>sec-16</i>	26
12	Micrografía de ascosporas con núcleos mutantes y silvestres.....	29
13	Representación y gel de electroforesis de los productos de PCR para la comprobación de la reducción de núcleos silvestres en TESV2-4 con respecto a la TESV7.....	31
14	Medición de la tasa de elongación de la cepa silvestre (FGSC #988), la parental (FGSC #9718) y las distintas mutantes Δcni	32
15	Morfología de las colonias e hifas de las mutantes Δcni en contraste con la cepa silvestre y la cepa parental.....	33

16	Distribución subcelular de CNI expresada bajo control de su promotor endógeno en <i>N. crassa</i>	34
17	Co-expresión de CNI-GFP y dsRED-NCA-1.....	35
18	Co-expresión de CNI-GFP y CSE-7-mChFP.....	36
19	Co-expresión de CNI-GFP y mChFP-YPT-1.....	37
20	Co-expresión de USO-1-GFP y CNI-mChFP.....	38
21	Comparación de la morfología colonial de las cepas silvestre y parental contra las etiquetadas fluorescentemente en este estudio.....	39
22	Distribución subcelular de SEC-16 y SEC-24 regulados bajo su propio promotor en <i>N. crassa</i>	40
23	Co-expresión de SEC-16-GFP y dsRED-NCA-1.....	41
24	Co-expresión de SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP.....	42
25	Co-expresiones de las distintas versiones de CNI y los intermediarios putativos de COPII.....	43
26	Efecto de BFA sobre la distribución y organización de CNI-GFP.....	44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Receptores cargo estudiados en <i>S. cerevisiae</i> y carga sugerida transportada en vesículas con revestimiento COPII en la ruta RE-Golgi.....	8
2	Cepas utilizadas en este estudio.....	12
3	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	16
4	Porcentajes de identidad de CNI e <i>N. crassa</i> con ortólogos de diferentes organismos modelo.....	17

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, y en su mayoría carentes de movilidad. Estructuralmente cuentan con una arquitectura única en la naturaleza, determinada principalmente por la presencia de una pared celular compuesta de varias biomoléculas de origen glúcido y proteico, donde destaca la quitina. La función principal de las células fúngicas en el ecosistema es la descomposición de materia orgánica (Curtis et al., 2008). La mayoría de los hongos son saprófitos, que absorben nutrientes de desechos orgánicos y organismos muertos (Solomon y Ville, 1998). Los hongos degradan materia, liberan agua, carbono y componentes minerales de los compuestos orgánicos participando en el reciclaje biológico; por otro lado, algunos hongos establecen relaciones simbióticas de diversos tipos, como las relaciones mutualistas de micorrizas (asociación entre un hongo y una raíz; Herrera y Ulloa, 1990), y de líquenes (asociación entre un hongo y un alga unicelular o cianobacteria).

Los hongos presentan dos tipos de crecimiento/morfologías principales: levaduriforme y filamentosa. Las formas levaduriformes (unicelulares) se reproducen por gemación o por producción de esporas sexuales (Deacon, 2006). Las formas filamentosas desarrollan unas células tubulares denominadas “hifas” que pueden medir de 3 a 30 μm de diámetro según la especie de hongo y que se extienden mediante crecimiento apical (Deacon, 2006). En muchas especies según su estadio de desarrollo las hifas pueden segmentarse, mediante la formación de septos, dando lugar a diferentes compartimentos, sin embargo éstos permanecen unidos y ramifican de manera continua generando una red denominada “micelio”, el cual se extiende para colonizar el sustrato.

Las hifas maduras se subdividen en cuatro regiones: la región I, conformada por el ápice hifal, abarca los primeros 2 – 3 μm , y contiene el Spitzenkörper (SPK) o cuerpo apical; la región II (también conocida como región subapical), se ubica de 20 – 30 μm detrás de la región I; en esta región se encuentran pequeñas vesículas, mitocondrias y algunos núcleos y vacuolas; la región III, localizada de 30 – 40 μm después de la región II, es donde se encuentra una mayor cantidad de núcleos; y por último, la región IV, la cual se extiende hasta el primer septo, se caracteriza por tener un incremento de mitocondrias, núcleos y vesículas en comparación con la región III, apareciendo aquí la red de vacuolas tubulares (Riquelme et al., 2002).

1.1.1 Crecimiento polarizado: mediado por el tráfico vesicular al ápice

El crecimiento celular polarizado es un fenómeno extendido tanto en el mundo procariota como eucariota, no obstante, los mecanismos que rigen este fenómeno son aún bastante incomprendidos (Gow, 1995; Bartnicki-Garcia, 1996; Dworkin, 2009). Las hifas de los hongos filamentosos están entre los tipos celulares con mayor grado de crecimiento polarizado, el cual está mediado por el transporte vesicular hacia la punta, donde se acumulan las vesículas en el SPK (Riquelme et al., 2014). En la Figura 1 se representan algunos de los compartimentos que componen la maquinaria secretora y el citoesqueleto requeridos para llevar a cabo el crecimiento polarizado de *N. crassa*.

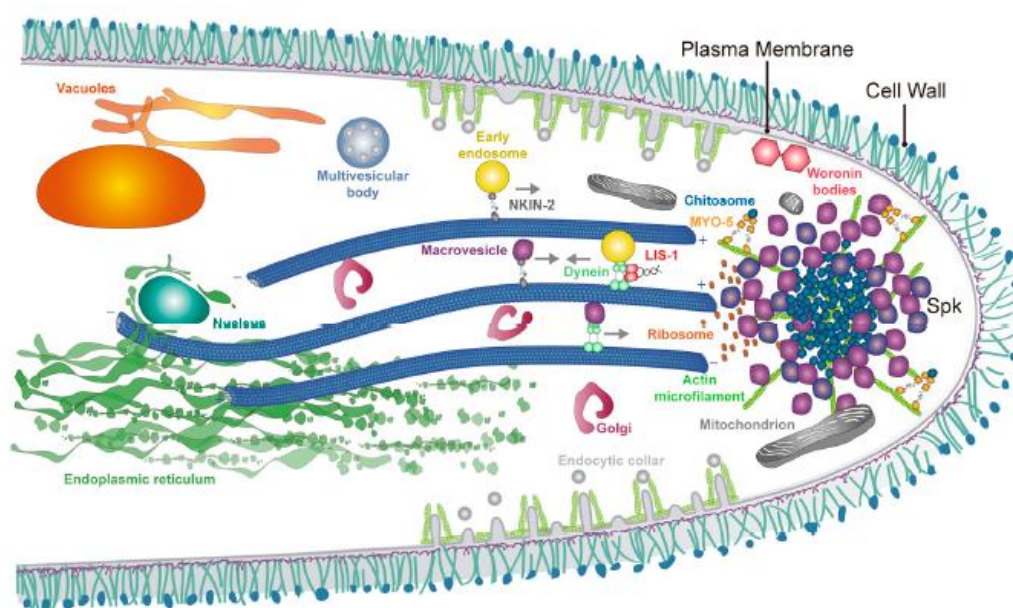


Figura 1. Representación de un ápice de *Neurospora crassa* con algunos de los componentes implicados en el crecimiento polarizado. Tomado de Riquelme y Martínez-Nuñez, 2016.

Las hifas poseen mecanismos de secreción con los que logran establecer el crecimiento polarizado y por tanto su extensión. Uno de los componentes principales de estos mecanismos es el SPK, el cual ha sido ampliamente estudiado y se plantea que actúa como un centro suministrador de vesículas (VSC) a diversas regiones de la superficie hifal (Bartnicki-Garcia et al, 1989). *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso que ha sido ampliamente utilizado como organismo modelo para el estudio de las rutas de secreción. Análisis previos han determinado que el SPK de este organismo está compuesto por al menos dos

poblaciones distintas de vesículas: las macrovesículas, también conocidas como vesículas apicales, y las microvesículas o quitosomas (Verdín et al., 2009; Sánchez-León et al., 2011).

El proceso de secreción y crecimiento polarizado aparenta ser muy sencillo. Básicamente consiste en proveer a las membranas diana con todos aquellos componentes requeridos para la síntesis y extensión de la célula (Cole y Fowler, 2006). Sin embargo todos estos eventos están mediados por una amplia gama de mecanismos celulares muy complejos, que se llevan a cabo a lo largo de toda la célula y que hasta hoy en día son en gran parte incomprendidos.

1.1.2 El sistema secretor fúngico

El sistema secretor de los hongos se encuentra dentro del sistema endomembranal, el cual comprende también el sistema de tráfico endocítico (Bourett et al., 2007). El modelo de secreción convencional se encuentra principalmente constituido por el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. El RE es un organelo que participa en la biosíntesis de lípidos, en el plegamiento proteico y en la formación de vesículas para la exportación de material celular a otros compartimentos, además de caracterizarse también por ser el sitio donde algunas proteínas solubles y de membrana son internalizadas de manera co-traducciona (Levine y Rabouille, 2005). El RE es por lo tanto uno de los organelos más complejos de la célula eucariota, y presenta muchos subdominios que ejercen diferentes funciones (Lynes y Simmen, 2011). Uno de estos subdominios del RE es conocido como “ERES” (del inglés Endoplasmic Reticulum Exit Sites), y participa como un centro de formación de vesículas con revestimiento COPII (Watanabe y Riezman, 2004). El RE de *Saccharomyces cerevisiae* se distingue por ser una red interconectada de sacos aplanados con túbulos, asociados a la membrana plasmática (Preuss et al., 1991). Estudios previos han demostrado la importancia del citoesqueleto en la organización y dinámica del RE en esta levadura (Prinz et al., 2000). En el caso de los hongos filamentosos el RE se observa como estructuras reticuladas o cisternas agrupadas en paralelo distribuidas en regiones subapicales en las inmediaciones de los núcleos (Bowman et al., 2009; Markina-Iñarrairaegui et al., 2013; Rico-Ramírez et al., 2018). Por medio del marcaje con moléculas fluorescentes de proteínas residentes de RE o la incorporación a moléculas de señales de retención el RE (K/HDEL y HVEL), se ha identificado al RE de células fúngicas como una estructura altamente dinámica y que puede estar sujeta a cambios estructurales en respuesta a señales externas (Wedlich-Söldner et al., 2002; Rico-Ramírez et al., 2018). Los ERES han sido descritos en *S. cerevisiae* (Feyder et al., 2015) y en *Aspergillus nidulans* (Pantazapoulou y Peñalva, 2009), aun así se sabe poco de

este complejo en células fúngicas. En la mayoría de las células eucariotas el aparato de Golgi se describe como un conjunto de cisternas aplanadas y apiladas de forma organizada. Esta organización se mantiene mediante la progresión de cisternas en sentido anterógrado desde el RE y el flujo bidireccional de vesículas secretoras para el mantenimiento de distintos compartimentos mediado por la exportación de material celular a membranas diana. Este tipo de estructuras son comunes en células animales y vegetales. En células fúngicas se han encontrado variaciones estructurales de Golgi importantes (Mowbrey y Dacks, 2009; Suda y Nakano, 2012). Observaciones de hifas por microscopía electrónica de transmisión revelaron la presencia de cisternas dispersas o no apiladas del aparato de Golgi, a las que se les denominó “Equivalentes de Golgi”; estas cisternas se presentan como sacos perforados con extensiones tubulares (Howard, 1981). Análisis de microscopía de fluorescencia de proteínas residentes del complejo de Golgi han permitido validar la presencia de la morfología general del aparato de Golgi y de los equivalentes de Golgi como cisternas dispersas en hifas de *A. nidulans* y *N. crassa* (Bowman et al., 2009; Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Sánchez-León et al., 2015).

El aparato de Golgi está compuesto por cisternas bioquímicamente diferentes, denominadas como cisternas tempranas y/o tardías (Glick y Malhotra, 1998; Pelham y Rothman, 2000; Rabouille y Klumperman, 2005). Una de las ideas propuestas para explicar estas diferencias bioquímicas y el cómo las proteínas se transportan entre los diferentes tipos de cisternas es que existen mecanismos de maduración del aparato de Golgi (Bonfanti et al., 1998; Wooding y Pelham, 1998; Volchuk et al., 2000; Mironov et al., 2001; Losev et al., 2006) donde el modelo de “maduración cisternal” es hoy en día ampliamente aceptado (Glick y Nakano, 2009; Nakano y Luini, 2010; Glick y Luini, 2011). Este modelo está basado en que la maduración de las cisternas de Golgi es un proceso que ocurre gradualmente: se parte de vesículas derivadas del RE que mediante su transporte anterógrado se fusionan, dando origen al cis-Golgi (Golgi temprano); estas cisternas serán desplazadas por la síntesis de nuevo cis-Golgi, alejándose más del RE para dar lugar al trans-Golgi (Golgi tardío), el cual se desensambla en vesículas que transportan material celular hacia la membrana plasmática y/o vacuolas (Glick et al., 1997; Bonfanti et al., 1998; Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006; Luini, 2011).

Se han descrito tres estructuras vesiculares principales presentes en los eucariotas que corresponden a proteínas de cubierta evolutivamente conservadas y llevan a cabo las rutas de secreción convencional (Figura 2): las vesículas de cubierta COPI, que transportan carga en dirección retrógrada (desde el aparato de Golgi hasta el RE) y entre cisternas de Golgi; las vesículas revestidas de Clatrina, que viajan desde el aparato de Golgi a lisosomas o endosomas o de la membrana plasmática a Golgi; y por último las vesículas

de cubierta COPII (Gomez-Navarro y Miller, 2016), que transportan carga en dirección anterógrada (del RE hasta el aparato de Golgi).

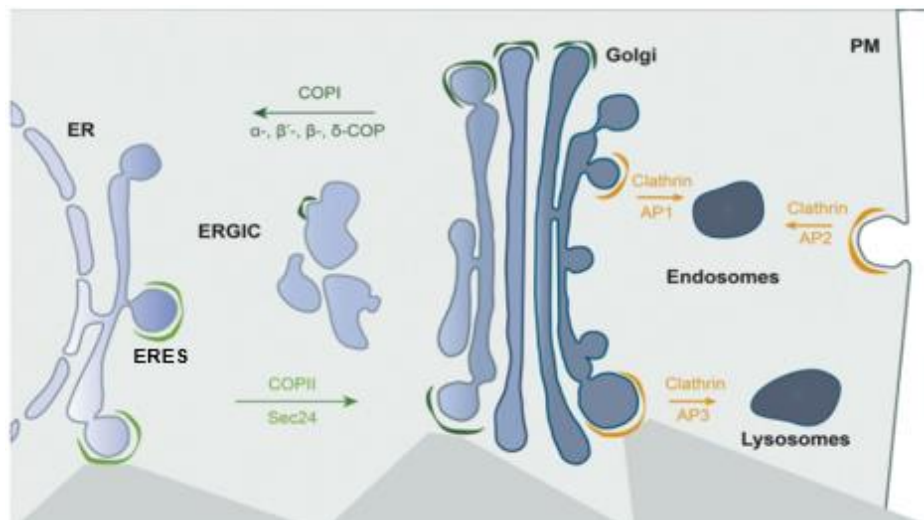


Figura 2. Representación general de las rutas de secreción convencional para el transporte vesicular. Modificado de Gomez-Navarro, 2016.

1.1.3 Complejo Coat Protein II: revistiendo vesículas para la ruta RE – Golgi

Una vez que el material celular a ser secretado ha sufrido las modificaciones necesarias para obtener su estructura final y ser funcional se vuelve competente para el tráfico directo a través de la ruta secretora. Este proceso está mediado por una serie de vesículas de transporte que emergen de un compartimento, atraviesan el citoplasma y se fusionan con un organelo receptor. Las vesículas originadas en el RE se revisten con las proteínas del sistema COPII (Coat Protein II), el cual participa activamente en el transporte anterógrado de material celular desde el RE como parte de la vía secretora. Se sabe que en *S. cerevisiae* el complejo COPII requiere un mínimo de seis proteínas (Sar1p, Sec12p, Sec23p, Sec24p, Sec13p y Sec31p) para llevar a cabo su papel (Barlowe y Miller, 2013).

El sistema COPII inicia con el reclutamiento de una proteína G pequeña llamada Sar1p (Nakano y Muramatsu, 1989; Barlowe et al., 1993), la cual es activada al intercambiar su GDP por GTP, reacción catalizada por la proteína Sec12p (Nakano et al., 1988; d'Enfert et al., 1991). La activación de Sar1p induce la curvatura inicial de la membrana y a la integración de esta proteína a la membrana del RE (Lee et al., 2005). La asociación Sar1p/GTP recluta al complejo heterodimérico de Sec23p/Sec24p (Matsuoka et al.,

1998), donde Sec23p interactúa con Sar1p/GTP (Yoshihisa et al., 1993) mientras que Sec24p provee el enlace con el receptor para proteínas cargo, requerido para el tráfico eficiente de material celular específico, cabe resaltar que Sec24p posee múltiples dominios independientes, los cuales interactúan con señales de clasificación o “sorting signals” de distintos receptores para proteínas cargo (Millet et al., 2003; Mossessova et al., 2003). El revestimiento interior (complejo Sar1p/Sec23p/Sec24p) recluta al complejo heterotetrámero Sec13p/Sec31p (Matsuoka et al., 2001), donde Sec31p contribuye a la actividad GTPasa de la cubierta mediante la estimulación de la actividad GAP de Sec23p; el complejo Sec13p/Sec31p actúa como el revestimiento exterior y contribuye también al mantenimiento de la curvatura de la vesícula (Antonny et al., 2001). Una vez que la vesícula se ha formado ocurre el desensamblaje de las proteínas COPII, mediado por la hidrólisis de Sar1p/GTP. Las vesículas son transportadas por proteínas motoras a través de los microtúbulos para su posterior fusión al complejo receptor (Barlowe y Miller, 2013). En la Figura 3 se muestra un modelo de formación de vesículas con revestimiento COPII.

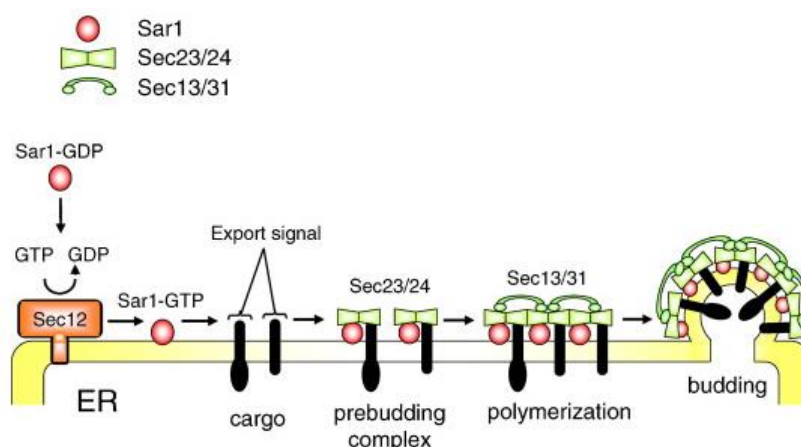


Figura 3. Esquema mostrando la interacción de los componentes COPII para la formación y revestimiento de vesículas. Tomado de Sato y Nakano, 2007.

Existen otras proteínas que participan en la organización vesicular, ya sea en la regulación del número de sitios de salida o en la interconexión entre las vesículas con las membranas diana; estas son Uso1p y Sec16p. Los análisis de la proteína Uso1p de *S. cerevisiae* han propuesto que esta proteína es lo suficientemente larga como para participar en la interconexión entre vesículas con revestimiento COPII y Golgi temprano (Beard et al., 2005); por otro lado Sánchez-León y colaboradores (2015) estudiaron la proteína USO-1 de *N. crassa*, ortólogo a Uso1p de *S. cerevisiae*, y sugieren que esta proteína pudiera compartir el mismo papel que cumple en la levadura. La proteína Sec16p en levaduras se piensa que

funciona como un andamio para las proteínas del complejo COPII. Mutantes de *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*) carentes de Sec16p exhibieron un aumento en el número de ERES además de una disminución del tamaño de esos sitios; esto sugiere que Sec16p está involucrada en la organización de aquellas regiones donde se forman las vesículas derivadas del revestimiento COPII (Montegna et al., 2012; Glick, 2014).

Para caracterizar las proteínas reguladoras de ERES de hongos filamentosos Hernández-González y colaboradores (2015) analizaron mutantes de *A. nidulans* carentes de *sarA* (el ortólogo a Sar1). Solamente obtuvieron mutantes en estado heterocarión, las cuales no fueron capaces de establecer la polaridad; además se hicieron análisis a temperaturas restrictivas de las distintas mutantes de *sarA* que revelaron que al exponer a las mutantes *sarA6* y *sarA8* a altas temperaturas la proteína Sec23 se acumulaba en el citosol, además de presentar una reducción de los ERES. La inviabilidad de la mutante carente del gen *sarA* en estado homocarión sugiere que el producto de este gen es esencial para *A. nidulans* (Hernández-González et al., 2015).

La generación de vesículas originadas en el organelo donador está mediada por la polimerización de complejos proteicos que forman una cubierta sobre la membrana del organelo; estas cubiertas proteicas interaccionan, por medio de proteínas adaptadoras también conocidas como “receptores de proteínas cargo”, con los dominios citosólicos de proteínas de membrana, que sirven como receptores participando en la selección de proteínas que serán transportadas en vesículas específicas (Bonifacino, 2014).

1.1.4 Receptores de proteínas cargo: proteínas especializadas de membrana celular

Las membranas biológicas encierran y compartimentan las células y organelos de todos los organismos eucariotas, actuando como aislantes eficaces y filtros selectivos entre el citoplasma y el medio externo. Cada membrana contiene proteínas o complejos proteicos que proporcionan canales de comunicación específicos entre los distintos compartimentos intra y extracelulares. Las proteínas de membrana a menudo están implicadas en actividades celulares básicas, tales como el transporte de iones y solutos, transducción de energía en sistemas respiratorios y fotosintéticos o transducción de estímulos sensoriales, por ello son blancos muy importantes de fármacos (Engel y Gaub, 2008).

Las técnicas de secuenciación masiva aplicadas a la caracterización de genomas han revelado que entre un 20 a un 30% de las proteínas totales poseen por lo menos un dominio transmembranal (Krogh, 2001), lo cual sugiere que estas proteínas se anclan a membranas celulares, donde podrían contribuir al transporte o funcionar como receptores de proteínas cargo. Algunos de estos receptores están fuertemente involucrados en el establecimiento de la polarización celular de epitelios (Roman-Fernandez et al., 2016) y en la gemación de levaduras (Shivas et al., 2010). En la Tabla 1 se mencionan algunos adaptadores cargo de *S. cerevisiae* y la carga específica que transportan.

Tabla 1. Receptores cargo estudiados en *S. cerevisiae* y carga sugerida transportada en vesículas con revestimiento COPII en la ruta RE-Golgi. Modificado de Herzig, 2012.

Receptor cargo	Carga sugerida	Referencias
Erv14p	Axl2p, Sma2p, Gap1p, Hxt1p, Hxt2p, Mid2p	(Nakanishi et al., 2007) (Powers y Barlowe, 1998, 2002) (Castillon et al., 2009)
Erv26p	Fosfatasa pro-alcalina, Golgi Manosiltransferasas	(Bue et al., 2006) (Inadome et al., 2005; Noda y Yoda, 2010)
Erv29p	Carboxipeptidasa Y, Proteinasa A y gpaf	(Belden y Barlowe, 2001; Caldwell et al., 2001)
Complejo p24 (Emp24p, Erv25p, Erp1p, Erp2p)	Proteínas ancladas GPI	(Castillon et al., 2009; Muniz et al., 2000; Schimmoller et al., 1995)
Emp46p, Emp47p	Glicoproteínas	(Sato y Nakano, 2002)
Shr3p	Permeasas de aminoácidos	(Kota et al., 2007; Kuehn et al., 1996; Ljungdahl et al., 1992)
Chs7p	Chs3p	(Trilla et al., 1999)
Gsf2p	Determinadas permeasas de azúcar (Gal2p, Hxt1p)	(Sherwood y Carlson, 1999)
Pho86p	Pho84p	(Lau et al., 2000)

En distintos organismos modelo han sido caracterizados múltiples adaptadores cargo y se les ha propuesto su carga específica (Powers y Barlowe, 1998, 2002; Bokel et al., 2006; Rosas-Santiago et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2016; Wudick et al., 2018), pero este no es el caso de estos adaptadores en los hongos filamentosos, donde el estudio de estas proteínas receptoras es relativamente novedoso. Recientemente se ha estudiado a dos homólogos de *S. cerevisiae* en *N. crassa* y su relación en el tráfico de enzimas

lignocelulolíticas CBH-1 y CBH-2: mutantes del complejo p24 (conformado por los homólogos a Erv25p, Emp24p, Erp1p y Erp3p de *S. cerevisiae*) y del homólogo a Erv29p de *S. cerevisiae* (*N. crassa* ERV-29) exhibieron un fenotipo aberrante y presentaron una disminución en la producción de las proteínas CBH-1 y CBH-2, resultando en deficiencias en la degradación de la celulosa (Starr et al., 2018). Mediante diversos ensayos de microscopía y bioquímica de proteínas se reveló la relación entre el complejo p24 y ERV-29 con estas celulasas, determinando una dependencia de CBH-1 por p24 y de CBH-2 por ERV-29. Esto sugiere que el complejo p24 y la proteína ERV-29 actúan como los adaptadores cargo específicos para la exportación del RE al Golgi de las proteínas CBH-1 y CBH-2, respectivamente (Starr et al., 2018). En contraste, Rico-Ramírez y colaboradores (2018) analizaron la distribución de las proteínas CSE-7 y CHS-4 de *N. crassa*. Análisis de CHS-4-GFP en un fondo mutante $\Delta cse-7$ revelaron que la CHS-4 es retenida en una extensa red de cisternas elongadas (NEC) en lugar de localizarse en el SPK y en los septos. Esto proporcionó evidencia para concluir que la CHS-4 depende de CSE-7 para su llegada a estos compartimentos, proponiendo a CSE-7 como el adaptador cargo putativo para la salida eficiente de la CHS-4 del RE.

1.1.5 Los receptores de proteínas cargo de la familia Cornichon Cni/Erv14p

Los miembros de la familia Cornichon (Cni/Erv14) son proteínas con dominios transmembranales a las cuales se les acuña un papel importante en la exportación eficiente de numerosas proteínas y material celular en la ruta RE-Golgi de distintos organismos (Pagant et al., 2015). Estos receptores de proteínas cargo fueron inicialmente identificados en *Drosophila melanogaster* (Cornichon, Cni) (Roth et al., 1995). La proteína Cni de la mosca de la fruta es requerida para establecer la polarización del embrión, debido a que este adaptador cargo es necesario para que el factor de crecimiento TGF α Gurken (Grk), requerido durante la ovogénesis, salga de forma eficiente del RE (Bokel et al., 2006).

Existen algunos estudios de los homólogos a Cni/Erv14 en la planta del arroz (*Oryza sativa*) y en *Arabidopsis thaliana*. Los análisis de la proteína OsCNIH1 de la planta del arroz confirmaron una interacción física y funcional con la proteína OsHKT1;3, la cual funciona como un transportador altamente selectivo de iones de sodio en la membrana del aparato de Golgi (Rosas-Santiago et al., 2015). Extrapolando algunos resultados obtenidos de los homólogos de OsCNIH1 y OsHKT1;3 en *Xenopus laevis* y en *S. cerevisiae* se propone a OsCNIH1 como un posible adaptador cargo requerido para que el transportador de sodio OsHKT1;3 llegue al aparato de Golgi de forma efectiva (Rosas-Santiago et al., 2015).

Recientemente se estudiaron los canales receptores de glutamato (GLRs) en *Arabidopsis thaliana* y su posible relación con las proteínas homólogas a Cni/Erv14, AtCNIHs: se consultó la base de datos “Interactome” para las AtCNIHs debido a que sus homólogos en células animales median el tráfico de los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs). Este análisis sugirió la interacción entre AtCNIHs con AtGLRs, lo cual llevó al diseño y análisis de mutantes para comprobar la correlación entre estos posibles adaptadores cargo y los receptores de glutamato. Los análisis revelaron una dependencia de los receptores de glutamato con AtCNIHs, concluyendo que AtCNIHs son necesarios para el correcto tráfico, distribución y localización de AtGLRs de esta planta (Wudick et al., 2018).

La proteína Erv14p de *S. cerevisiae* ha sido propuesta como el receptor de proteínas cargo específico para el transporte efectivo de distintas proteínas de membrana (Powers y Barlowe, 1998, 2002; Rosas-Santiago et al., 2016). Cepas carentes de Erv14p exhibieron un fenotipo aberrante con notables defectos en su crecimiento, además de presentar una deslocalización de la proteína Axl2p, determinando que esta proteína desempeña un papel fundamental en el establecimiento del crecimiento polarizado y del brote axial de la levadura (Powers y Barlowe, 1998, 2002); por otro lado estas mutantes también mostraron una baja tolerancia al sodio y al potasio extracelular y una pérdida de la localización de la proteína intercambiadora Nha1p, la cual está involucrada en el transporte de iones de sodio y potasio (Rosas-Santiago et al., 2016); ambos estudios proponen a Erv14p como el adaptador cargo requerido para el tráfico efectivo de Axl2p y de Nha1p.

1.2 Justificación

Estudios de interacción proteína-proteína llevados a cabo en plantas y en levaduras han revelado que la proteína Cni/Erv14p interactúa con un gran número de proteínas dirigidas a la membrana plasmática (Herzig et al., 2012 y Rosas-Santiago et al., 2015); esto sugiere que este receptor cargo posee un papel fundamental en la localización de las proteínas de membrana, lo cual es muy importante para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. En hongos filamentosos se desconoce el papel de este receptor cargo en la formación de vesículas COPII transportadoras de proteínas de membrana.

1.3 Hipótesis

La proteína homóloga a Cni/Erv14p en *Neurospora crassa*, CNI, se localiza en el retículo endoplásmico y en cisternas de Golgi; además su ausencia provoca defectos en la morfogénesis y desarrollo del hongo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar al homólogo a Cni/Erv14p en *Neurospora crassa* y determinar su localización y papel en la ruta secretora RE-Golgi y en la morfogénesis de las hifas.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la esencialidad de CNI en la morfogénesis y desarrollo de *N. crassa*.
2. Determinar la localización subcelular de CNI en *N. crassa*.
3. Validar la presencia de CNI en el sistema COPII de *N. crassa*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

2.1.1 Cepas

Las cepas enlistadas en la siguiente tabla corresponden a aquellas que fueron generadas y/o utilizadas en este estudio.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 α TM	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk+) <i>phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	Invitrogen TM
SMRP13	<i>mat a</i> ; wild type	FGSC #988
SMRP14	<i>mat A</i> ; wild type	FGSC #9013
SMRP24	<i>mat A</i> ; <i>his-3</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	FGSC #9717
SMRP25	<i>mat a</i> ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	FGSC #9718
SMRP279	<i>mat a</i> ; <i>Puso-1::uso-1::gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺	Sánchez-León et al., 2015
SMRP302	<i>mat A</i> ; <i>his-3</i> ⁺ :: <i>Pccg-1::mchfp</i> ⁺ :: <i>ypt-1</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Sánchez-León et al., 2015
SMRP317	<i>mat A</i> ; <i>Pccg-1::t-dimer2</i> (12)- <i>nca-1::his-3</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Bowman et al., 2009
SMRP364	<i>mat A</i> ; <i>Pccg-1::cse-7-8xgly-mchfp</i> ⁺ :: <i>his-3</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Rico-Ramírez et al., 2018
SMRP430	<i>mat a</i> ; <i>Psec-63::sec-63-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Rico-Ramírez et al., 2018
SMRP431	<i>mat a</i> ; <i>Pcni::cni-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP432	<i>mat A</i> ; <i>Pcni::cni-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP433	<i>mat a</i> ; <i>Psec-24::sec-24-8xgly-mchfp</i> ⁺ :: <i>natR</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP435	<i>mat a</i> ; Δ <i>cni::hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP436	<i>mat a</i> ; Δ <i>cni::hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP442	<i>mat A</i> ; <i>Psec-16::sec-16-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP443	<i>mat a</i> ; <i>Psec-16::sec-16-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP444	<i>mat A</i> ; <i>Pcni::cni-8xgly-mchfp</i> ⁺ :: <i>natR</i> ⁺ ; <i>his-3</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP445	<i>mat A</i> ; <i>Psec-16::sec-16-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; <i>his-3</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP446	<i>mat a</i> ; <i>Psec-16::sec-16-10xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>hph</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio
SMRP447	<i>mat a</i> ; <i>Pcni::cni-8xgly-gfp</i> ⁺ :: <i>natR</i> ⁺ ; Δ <i>mus-51::bar</i> ⁺	Este estudio

2.1.2 Medios de cultivo

2.1.2.1 Medios de cultivo para *E. coli*

Los plásmidos utilizados para la obtención de los cassettes comunes utilizados en este estudio fueron propagados en células competentes de *E. coli* DH5 α^{tm} , inoculadas en medio Luria-Bertani (LB) el cual contiene Bacto-Triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%. Para la recuperación de colonias portadoras de los plásmidos recombinantes se adicionó agar bacteriológico al 2% al medio LB y el respectivo antibiótico como marcador de selección (ampicilina a 100 mg/mL o kanamicina a 30 mg/mL).

2.1.2.2 Medios de cultivo para *N. crassa*

Para el análisis de *N. crassa* se utilizó medio mínimo de Vogel (MMV), el cual está compuesto por sales de Vogel 1x (Anexo 1) (Vogel, 1956), sacarosa al 1.5% y agar bacteriológico a 1.5%. Para los experimentos de la cepa SMRP436 se adicionó sorbosa al 20% al MMV. Se utilizó una temperatura de incubación de 30°C variando el margen del tiempo según la cepa en cuestión. Para el crecimiento de la cepa #9717 (FGSC) se suplementó el MMV con L-histidina (Sigma Aldrich, 0.5 mg/mL, esterilizado por filtración), debido a que esta cepa es auxótrofa a histidina. Para realizar las cruas se inocularon cepas de *N. crassa* con distinto tipo de apareamiento en medio sintético de cruas (MSC) (sacarosa al 2%, sales de MSC 1X [Anexo 1] y agar al 1.5%) (Westergaard M. y K., 1947). Los conidios utilizados en los eventos de transformación en *N. crassa* fueron inoculados en medio FGS, compuesto por sales de Vogel al 2%, agar al 1% y solución FGS al 10% (compuesta por sorbosa al 20%, fructosa al 0.5% y glucosa al 0.5%, esterilizada por filtración). Para la obtención de ADN genómico de *N. crassa* se creció micelio en medio completo de Vogel (MCV), compuesto por sales de Vogel 1x, sacarosa 1.5%, extracto de levadura al 0.5% y N-Z casaminoácidos a 0.5%). Eventualmente se les adicionó a los medios higromicina B (InvivoGen, concentración final a 300 mg/mL) o sulfato de nourseotricina (Sigma, concentración final a 35 $\mu\text{g/mL}$) como marcadores de selección. Todos los medios fueron esterilizados por 15 minutos a 120°C en una autoclave Sterilmatic Market Forge Industries Inc., USA.

2.1.3 Condiciones de cultivo

2.1.3.1 Obtención de conidios

Las cepas de *N. crassa* fueron cultivadas en 100 mL de MMV en matraces de 250 mL; posteriormente fueron incubadas a 30°C por aproximadamente siete días y después se expusieron por cinco días a luz blanca, a temperatura ambiente. Se dispersaron los conidios agregando 50 mL de agua estéril al matraz y agitando vigorosamente. La solución obtenida fue filtrada a través de tela “Magitel®” estéril para descartar el micelio y los restos del medio de cultivo. Para concentrar los conidios se centrifugó el tubo con la suspensión de conidios por 5 minutos a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante. El pellet con los conidios fue lavado con 50 mL de agua estéril, después se repitió la centrifugación y se volvió a descartar el sobrenadante. Después de los lavados los conidios fueron resuspendidos en 1 mL de sorbitol 1 M y almacenados a -20°C en tubos eppendorf estériles. Los conidios de las cepas requeridas para las transformaciones en *N. crassa* fueron contabilizados utilizando una cámara de Neubauer.

2.1.3.2 Producción de micelio

Para la producción de micelio de *N. crassa* se utilizaron tubos de cultivo de 15 mL con 5 mL de MMV, tubos de borosilicato de 5 mL con 1.5 mL de MMV y placas de Petri con MMV suficiente como para cubrir el área de la placa. Se inocularon conidios, ascosporas o micelio dependiendo del experimento en cuestión. En algunos casos se suplementaron los medios con L-histidina (0.5 mg/mL) y/o el marcador de selección requerido (higromicina [300 mg/mL] ó sulfato de nourseotricina [35 µg/mL]). Todos estos procesos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad.

2.1.3.3 Cruzas sexuales

Los conidios utilizados en estos ensayos fueron colectados utilizando agua desionizada estéril y lavados con 1 mL de sorbitol 1 M. En un extremo de una placa con MSC se agregaron aproximadamente 8×10^6 conidios de la cepa silvestre y se dejó en incubación por 24 horas a 25°C. Posteriormente se colocó la misma concentración de conidios con tipo de apareamiento complementario al de la cepa silvestre

previamente inoculada en el otro extremo de la placa, para después incubar los cultivos a 25°C durante 15 días o hasta observar la presencia de peritecios y así obtener ascosporas. A partir del primer inóculo las placas se mantuvieron en condiciones de oscuridad en todo momento, recubriéndose con aluminio. Con ayuda de un estereoscopio se determinó la presencia de ascosporas acumuladas en la tapa de la placa Petri, las cuales fueron recolectadas con agua destilada estéril. Las ascosporas fueron expuestas a un choque térmico a 60°C durante una hora y después fueron sembradas en placas con MMV e incubadas a 30°C por 12 horas o hasta observar germinación de las ascosporas. Las ascosporas germinadas fueron colectadas con ayuda de una punta de jeringa para insulina y cada una de estas fue inoculada en tubos de borosilicato con 1.5 mL de MMV suplementado con su respectivo marcador de selección, para su posterior selección mediante análisis moleculares y fenotípicos. Se colectaron entre 50 a 60 ascosporas por cruza.

2.2 Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda de la secuencia codificante de ERV14 (YGL054C) en *S. cerevisiae* con la finalidad de encontrar su ortólogo en *N. crassa*, utilizando la herramienta bioinformática “Homologene” del National Center for Biotechnology Information (NCBI). A esta secuencia se le nombró *cni* (NCU06922). También se realizó una búsqueda de las secuencias codificantes de SEC-24 (NCU02391) y SEC-16 (NCU03819) en *N. crassa* con base en sus secuencias ortólogas presentes en la base de datos de *S. cerevisiae* (YIL109C y YPL085W, respectivamente). Una vez que se obtuvieron estas secuencias se realizó un análisis general a nivel de gen y proteína con la finalidad de seleccionar el método a emplear para el etiquetado de estas proteínas y también para el diseño de los oligonucleótidos necesarios para su etiquetamiento:

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

# Stock	Etiqueta	Secuencia
600	KOnestFw	CTGGAATGACCTTCACTATCGAAC
598	KOcnfFw	CTGGACGGATATTCTGGAAGATTC
599	KOcnfRv	TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGTTTGCTTATCGGATGATAGC
682	GFPcnfFw	CTACCAACTGAACCTCCAGCTGTC
683	GFPcnfRv	GCCTCCGCCTCCGCCGCTCCGCCATGAGCCTCGTCCCGAATGAG
684	Br2cnfFw	TATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGGAAATGGCCGTCGCTCGCTAAGTTG
685	Br2cnfRv	GGAACAGTGGAACCTCAAATTCAGAG
686	hphFw	GAATTCGATATCAAGCTTATCG
298	Loxp-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATA
299	10xGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGC
261	hphSM-f	AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
260	hphSM-r	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC
691	Br1nestFw	CTCAGGGCAGGTCATAAGCTTATC
687	Br1sec24Fw1	GTCGTCGAGGTTGCTATTGATGAG
688	Br1sec24Rv	TCCGCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCCTGCACAACCTGTTTGCAAGTCTG
689	Br2sec24Fw	GCTCTACATGAGCATGCCCTGCCCTGATCGCATTACACCATCCTAGCCGGC
692	Br2sec24Rv2	CTCCATCATAGTGCAAGCAGGCGC
493	mCh-natD	GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGTTTTTGGGCTTGGCTGGAGCT
491	Nat-R2	TCAGGGGCAGGGCATGCTCATGTAGAGC
445	Gly-mCherry	GGCGGCGGAGGCGGAGGCGGCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT
446	mCh-R	CTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
701	iNat-NewD2	GACACGGCTTACCGGTACCGCACC
702	iNat-NewR2	CACCTCTGGCTGGAGGTCACCAACG
706	FP1sec16nestFw	CGGTCTAATATGTTCTCTCTCTCC
707	FP1sec16Rv	GCCTCCGCCTCCGCCGCTCCGCCCTTCTGCATAACATCCACATACCTAGC
708	Br1sec16Fw	CAAATGATGAGCCCTCTAACGAAC
709	FP2sec16Fw	TATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGGAATGAGTTAAGGGATGAGGGAATG
710	FP2/Br2sec16Rv	GACCCATCGACAAAATATTGAGTG
711	mChFPcnfRv	TCCGCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCATGAGCCTCGTCCCGAATGAG
748	Br2cnimChFPFw	GCTCTACATGAGCATGCCCTGCCCTGAGAAATGGCCGTCGCTCGCTAAGTTG

Se realizó también una alineación de las secuencias aminoácidas correspondientes a Cornichon/Erv14 de *N. crassa* y otros organismos modelo, además de someter a estas secuencias a un BLAST y contrastar el porcentaje de identidad de las distintas versiones de Cornichon/Erv14 por cada organismo modelo versus la versión de *N. crassa*:

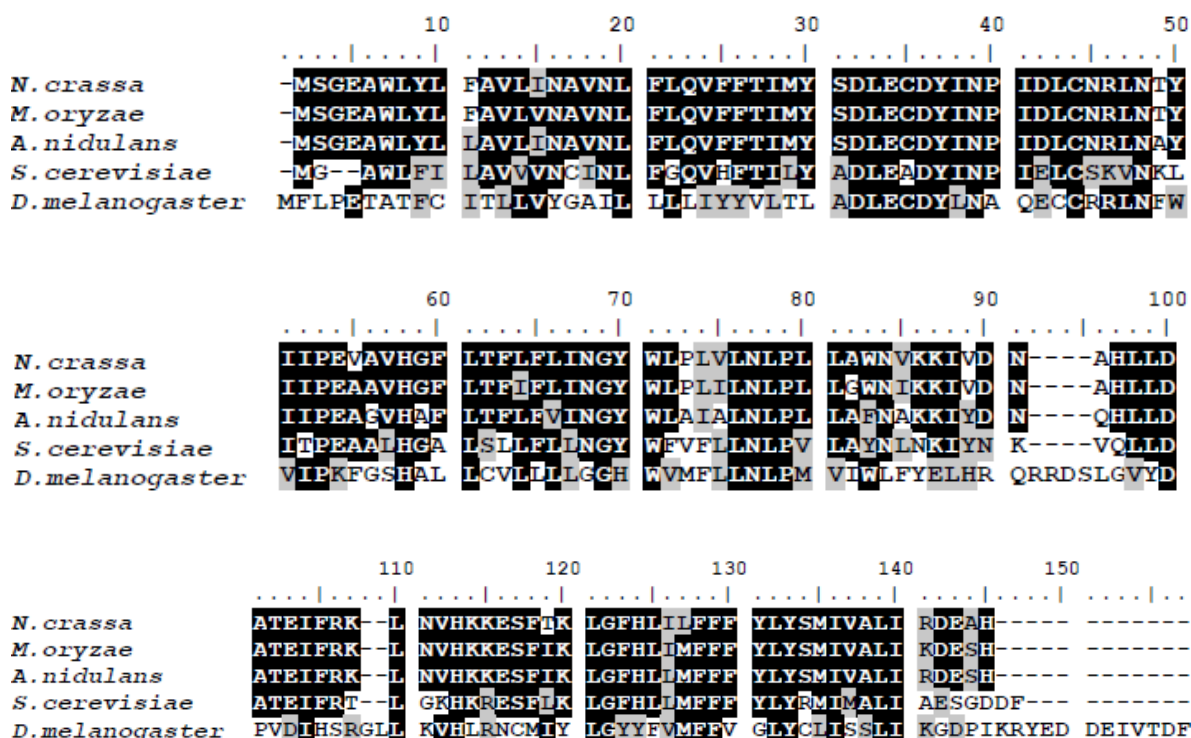


Figura 4. Alineamiento de aminoácidos de *N. crassa* CNI y sus ortólogos en diferentes organismos modelo.

Tabla 4. Porcentajes de identidad de CNI e *N. crassa* con ortólogos de diferentes organismos modelo.

	<i>M. oryzae</i> MGG_08132	<i>A. nidulans</i> AN5195	<i>S. cerevisiae</i> YGL054C	<i>D. melanogaster</i> Dmel_CG17262
<i>N. crassa</i> NCU06922	93%	88%	62%	34%

2.3 Knock out del homólogo a Cni/Erv14 en *N. crassa*

Se utilizó una estrategia de eliminación basada en el reemplazamiento del gen a eliminar por el gen *hph*, el cual codifica a la higromicina-B-fosfotransferasa (confiriendo la resistencia a la higromicina B). Para ello se utilizaron los fragmentos flanqueantes del gen de interés localizados en los UTR río arriba y río abajo de los extremos 5' y 3' del gen. Primeramente se amplificó el gen *hph*, el cual se utilizó como fragmento común, utilizando los respectivos oligonucleótidos específicos y empleando como templado ADN plasmídico del vector pGFP::hph:loxP (VMRP48). Posteriormente a partir de reacciones de PCR se

generaron dos fragmentos parciales: uno conteniendo aproximadamente 1kb del 5'-UTR de *cni* más una fracción del gen de *hph* y otro correspondiente a la fracción final del gen *hph* más aproximadamente 1kb del 3'-UTR de *cni*. Los fragmentos parciales y el fragmento común fueron utilizados como plantados para llevar a cabo reacciones de PCR independientes, donde se utilizaron oligonucleótidos para fusionar una fracción del gen de resistencia a higromicina a cada fragmento parcial, generando así los brazos recombinantes que se utilizaron para transformar a *N. crassa* y obtener la mutante Δcni . En la Figura 5 se representa la estrategia empleada para el Knock out de *cni*, mientras que en la Figura 6 se muestran las bandas correspondientes a los productos de PCR requeridos para este reemplazamiento.

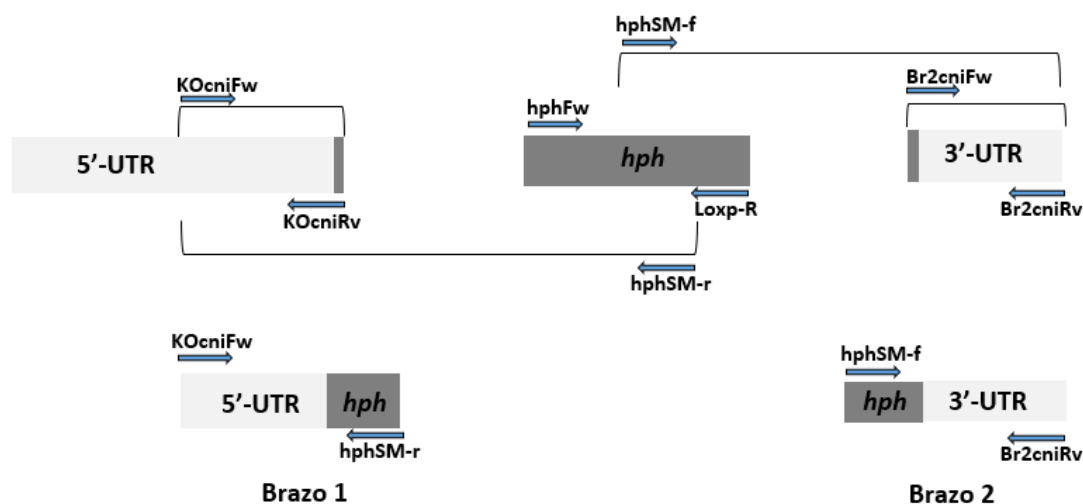


Figura 5. Representación de la técnica utilizada para la substitución de *cni* por un gen de resistencia a un antibiótico.

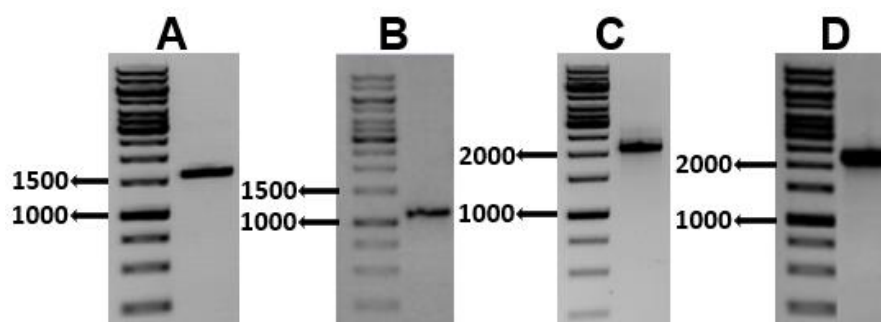


Figura 6. Amplicones obtenidos para substituir la secuencia codificante a CNI por el gen *hph*. Todos los fragmentos parciales fueron amplificados a partir de ADN_g de la cepa silvestre N1 (FGSC #988) de *N. crassa*. A: producto de 1,540 pb correspondiente al fragmento parcial 5', utilizando los oligonucleótidos KOnestFw y KOcniRv. B: producto de 1,042 pb correspondiente al fragmento parcial 3', utilizando los oligonucleótidos Br2cniFw y Br2cniRv. C: producto de 2,086 pb correspondiente al brazo recombinante 5' (#1), amplificado a partir del fragmento parcial 5' y del fragmento común "*hph*" utilizando los oligonucleótidos KOcniFw y hphSM-R. D: producto de 2,129 pb correspondiente al brazo recombinante 3' (#2), amplificado a partir del fragmento parcial 3' y del fragmento común "*hph*" utilizando los oligonucleótidos hphSM-F y Br2cniRv.

2.4 Etiquetado endógeno C-terminal: CNI-GFP, CNI-mChFP, SEC-24-mChFP y SEC-16-GFP

Para realizar el etiquetamiento endógeno de estas proteínas se utilizó la técnica de reemplazamiento de genes con marcador de selección partido (Split Marker Gene Replacement) (Smith et al., 2011). Para el caso de los genes *cni* y *sec-16* se utilizaron oligonucleótidos necesarios para la generación del fragmento común “10xGly-GFP-*hph*” y los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho. Para la amplificación del fragmento común por PCR se utilizó como templado ADN plasmídico del vector pGFP::*hph*::*loxP* (VMRP48), usando los oligonucleótidos 10xGly-F y *loxP*-R; el amplicón correspondiente se purificó previo a su utilización en las siguientes etapas de PCR de fusión. Para la generación parcial del fragmento izquierdo se amplificaron por PCR aproximadamente 1,500 pares de bases que parten desde el 5'-UTR del gen en cuestión hasta llegar al codón de paro, el cual es excluido para que la fluorescencia esté regulada bajo el promotor endógeno. Para la generación del fragmento derecho se amplificaron por PCR aproximadamente 1,000 pares de bases del 3'-UTR del respectivo gen. Mediante el patrón de bandeo de una electroforesis se determinó el tamaño esperado de los amplicones, los cuales posteriormente fueron purificados utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Para completar los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho se fusionó cada fragmento parcial con una fracción del fragmento común; para ello se realizó otra ronda de PCR combinando los oligonucleótidos específicos utilizados para cada fragmento parcial con otro set de oligonucleótidos específicos para fraccionar el gen *hph*. La determinación del tamaño de los fragmentos de recombinación y su purificación se realizaron de la misma forma mencionada previamente. En la Figura 7 se representa la estrategia utilizada para la generación de los productos de PCR requeridos para llevar a cabo el etiquetado de estas proteínas, mientras que en la Figura 8 se muestran las bandas correspondientes a estos amplicones.

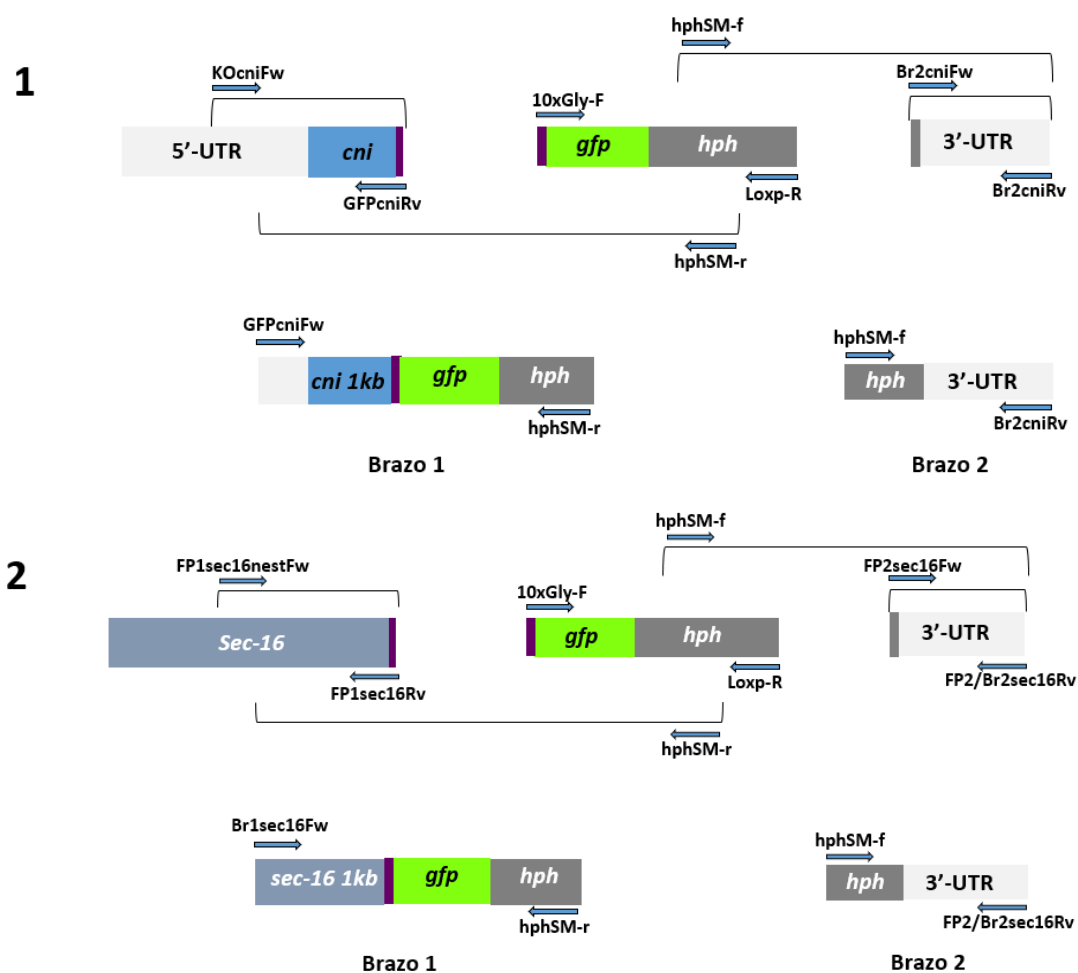


Figura 7. Representación de la estrategia utilizada para el etiquetamiento endógeno de CNI (1) y SEC-16 (2) con GFP.

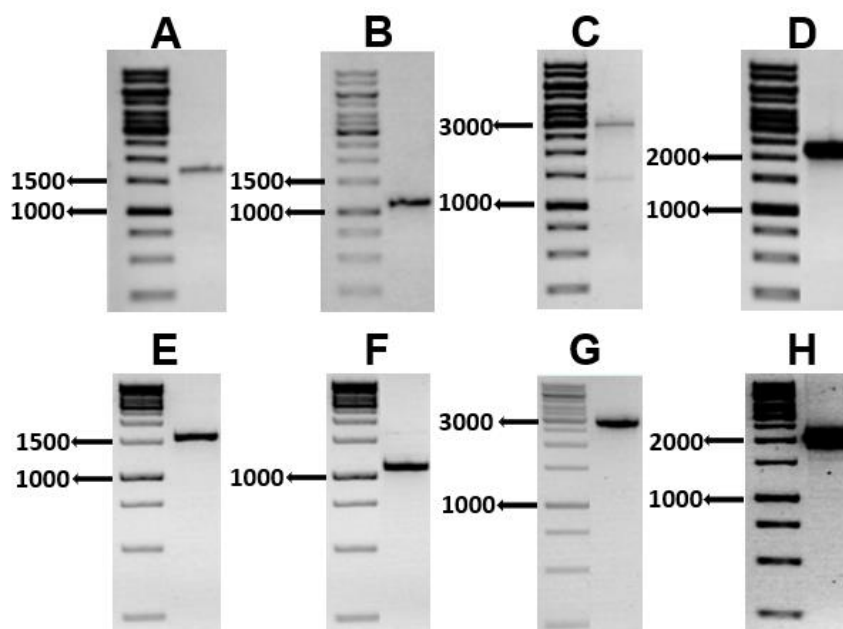


Figura 8. Amplicones obtenidos para el marcaje de *cni* y *sec-16* con la proteína fluorescente GFP. Todos los fragmentos parciales fueron amplificados a partir de ADNg de la cepa silvestre N1 (FGSC #988) de *N. crassa*. A: producto de 1,691 pb correspondiente al fragmento parcial 5' del marco de lectura abierto de *cni*, utilizando los oligonucleótidos KOcniFw y GFPcniRv. B: producto de 1,042 pb correspondiente al fragmento parcial 3' del marco de lectura abierto de *cni*, utilizando los oligonucleótidos Br2cniFw y Br2cniRv. C: producto de 2,951 pb correspondiente al brazo recombinante 5' (#1) de *cni*, amplificado a partir del fragmento parcial 5' de *cni* y del fragmento común "10xgly/gfp/hph" utilizando los oligonucleótidos GFPcniFw y hphSM-R. D: producto de 2,129 pb correspondiente al brazo recombinante 3' (#2) de *cni*, amplificado a partir del fragmento parcial 3' de *cni* y del fragmento común "10xgly/gfp/hph" utilizando los oligonucleótidos hphSM-F y Br2cniRv. E: producto de 1,566 pb correspondiente al fragmento parcial 5' del marco de lectura abierto de *sec-16*, utilizando los oligonucleótidos FP1sec16nestFw y FP1sec16Rv. F: producto de 1,049 pb correspondiente al fragmento parcial 3' del marco de lectura abierto de *sec-16*, utilizando los oligonucleótidos FP2sec16Fw y FP2/Br2sec16Rv. G: producto de 3,004 pb correspondiente al brazo recombinante 5' (#1) de *sec-16*, amplificado a partir del fragmento parcial 5' de *sec-16* y del fragmento común "10xgly/gfp/hph" utilizando los oligonucleótidos Br1sec16Fw y hphSM-R. H: producto de 2,111 pb correspondiente al brazo recombinante 3' (#2) de *sec-16*, amplificado a partir del fragmento parcial 3' de *sec-16* y del fragmento común "10xgly/gfp/hph" utilizando los oligonucleótidos hphSM-F y FP2/Br2sec16Rv.

Para llevar a cabo el etiquetado de CNI y SEC-24 con mChFP primeramente se realizó la construcción del casete común, que contiene al gen que codifica a la proteína roja fluorescente mChFP además de un gen *natR* que codifica a una Nourseotricin-N-acetil transferasa, otorgando resistencia al sulfato de nourseotricina. Para amplificar la secuencia de *mchfp* contenida en el vector pJV18 (VMRP60) se utilizaron los oligonucleótidos "Gly-mCherry" (#445 en stock) y "mCh-R" (#446 en stock), los cuales añaden río arriba una bisagra de ocho glicinas. Para amplificar el gen *natR* contenido en el vector pEHNat (VMRP94) se utilizaron los oligonucleótidos "mCh-natD" (#493 en stock) y "Nat-R2" (#446 en stock), el amplicón de esta reacción contiene una región flanqueante al final de la secuencia de *mchfp*, permitiendo su fusión al utilizar

como moldes a este amplicón y al casete *8xgly-mchfp* al combinar los oligonucleótidos “Gly-mCherry” como sentido y “Nat-R2” como antisentido, dando origen al casete común *8xgly-mchfp-natR*. Posteriormente se realizaron los procesos previamente descritos para el etiquetado con GFP: amplificación de fragmentos parciales, extracción y purificación de estos amplicones y la generación de los brazos recombinantes por PCR de fusión utilizando un set de oligonucleótidos que permitan incluir secuencias del gen *natR* a cada amplicón. En la Figura 9 se muestra la estrategia para la amplificación de los productos necesarios para llevar a cabo la generación del casete común y posteriormente el etiquetado de estas proteínas, mientras que en la Figura 10 se muestran las bandas correspondientes a estos amplicones.

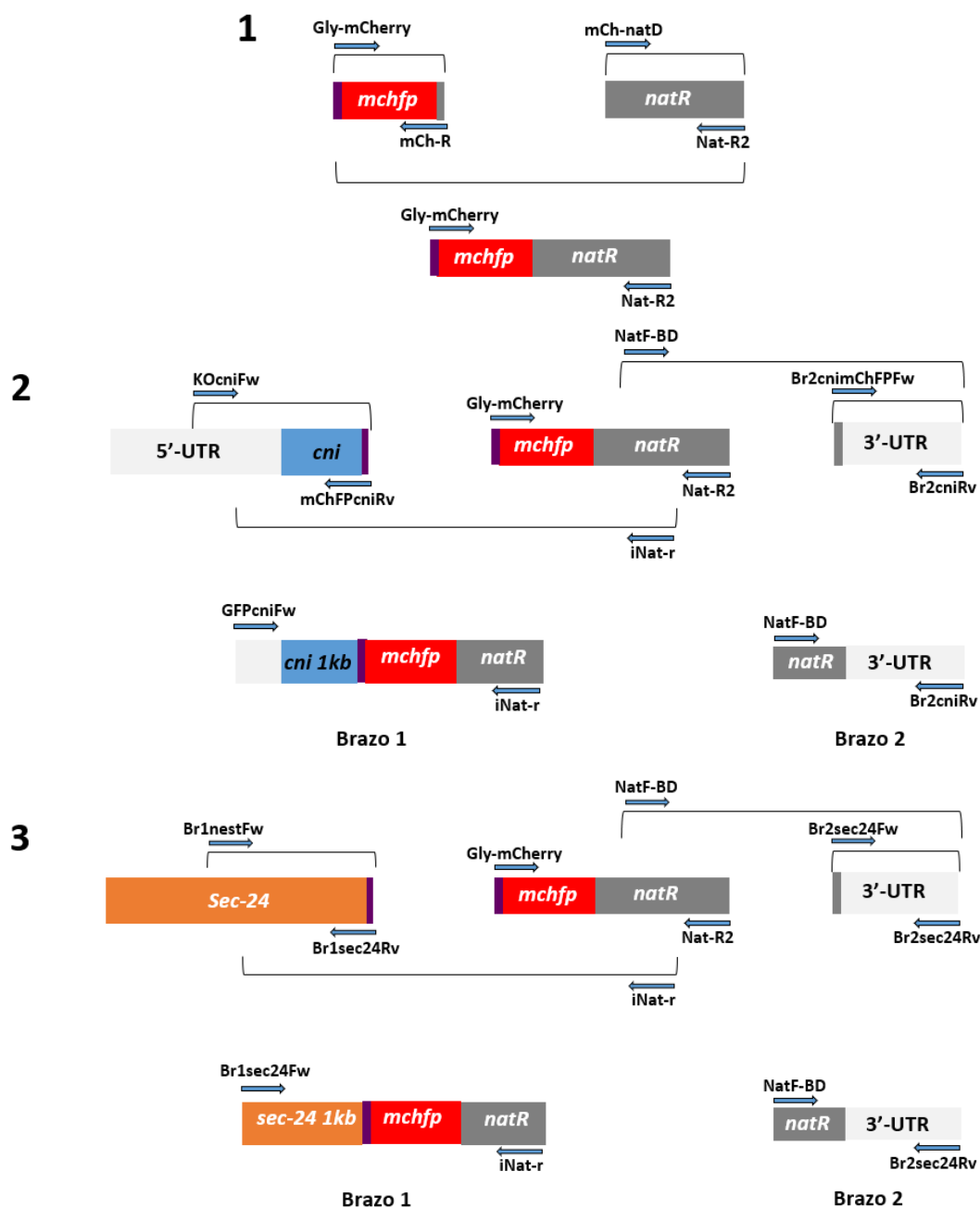


Figura 9. Representación de las estrategias utilizadas para la generación del fragmento común *8xgly/mchfp/natR* (1) y para el etiquetamiento endógeno de CNI (2) y SEC-24 (3) con mChFP.

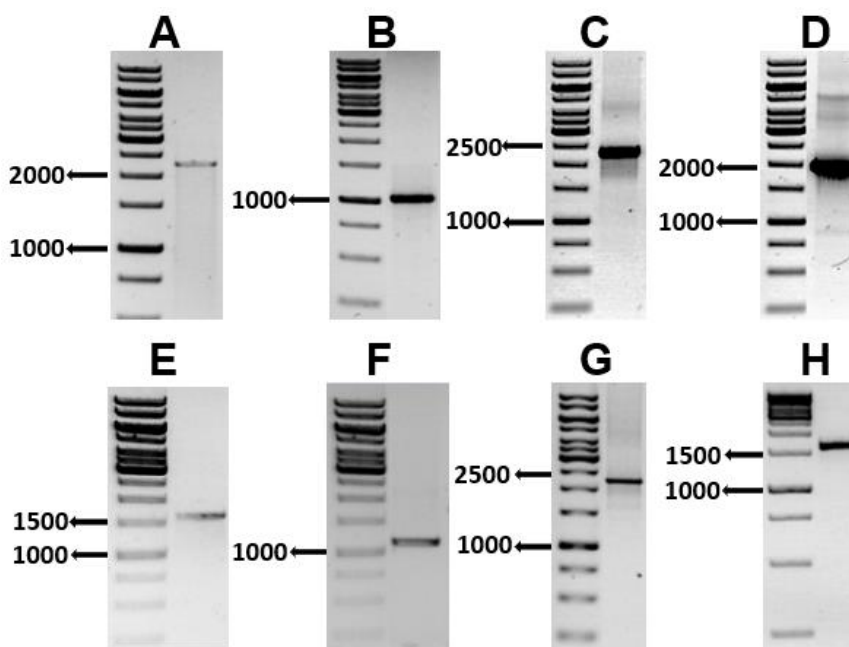


Figura 10. Amplicones obtenidos para el marcaje de *cni* y *sec-24* con la proteína fluorescente mChFP. Todos los fragmentos parciales fueron amplificados a partir de ADNg de la cepa silvestre N1 (FGSC #988) de *N. crassa*. A: producto de 2,238 pb correspondiente al fragmento parcial 5' del marco de lectura abierto de *cni*, utilizando los oligonucleótidos KOnestFw y mChFPcniRv. B: producto de 1,091 pb correspondiente al fragmento parcial 3' del marco de lectura abierto de *cni*, utilizando los oligonucleótidos Br2cnimChFPFw y Br2cniRv. C: producto de 2,384 pb correspondiente al brazo recombinante 5' (#1) de *cni*, amplificado a partir del fragmento parcial 5' de *cni* y del fragmento común "*8xgly/mchfp/natR*" utilizando los oligonucleótidos GFPcniFw y iNat-R. D: producto de 1,860 pb correspondiente al brazo recombinante 3' (#2) de *cni*, amplificado a partir del fragmento parcial 3' de *cni* y del fragmento común "*8xgly/mchfp/natR*" utilizando los oligonucleótidos NatF-BD y Br2cniRv. E: producto de 1,579 pb correspondiente al fragmento parcial 5' del marco de lectura abierto de *sec-24*, utilizando los oligonucleótidos Br1nestFw y Br1sec24Rv. F: producto de 1,091 pb correspondiente al fragmento parcial 3' del marco de lectura abierto de *sec-24*, utilizando los oligonucleótidos Br2sec24Fw y Br2sec24Rv. G: producto de 2,605 pb correspondiente al brazo recombinante 5' (#1) de *sec-24*, amplificado a partir del fragmento parcial 5' de *sec-24* y del fragmento común "*8xgly/mchfp/natR*" utilizando los oligonucleótidos Br1sec24Fw y iNat-NewR2. H: producto de 1,646 pb correspondiente al brazo recombinante 3' (#2) de *sec-24*, amplificado a partir del fragmento parcial 3' de *sec-24* y del fragmento común "*8xgly/mchfp/natR*" utilizando los oligonucleótidos iNat-NewD2 y Br2sec24Rv.

2.5 Generación, selección y comprobación de transformantes

2.5.1 Transformantes de *E. coli*

Las transformaciones de células competentes DH5 α de *E. coli* se realizaron por choque térmico. Las células se encontraban conservadas a -80°C, por lo que se descongelaron en hielo y se mezclaron con 75 μ L de KCM 5x (Anexo 1) frío. Posteriormente se añadieron 2 μ L del vector purificado a recuperar. Se mezcló suavemente la solución y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente se produjo el choque térmico por 2 minutos a una temperatura de 42°C. Se introdujo el tubo de nuevo en hielo por 2 minutos y se añadieron 300 μ L de medio LB precalentado a 37°C para posteriormente incubar con agitación constante (200 rpm) por 1 hora a la misma temperatura. El cultivo fue sembrado en placas con LB sólido adicionado con ampicilina o kanamicina (según el marcador de selección del vector) y se incubó a 37°C por aproximadamente 16 horas. Se seleccionaron transformantes aisladas (sin satélites) y se re-inocularon en LB líquido adicionado con el antibiótico correspondiente según el vector a recuperar. Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) y se verificó su integridad mediante electroforesis en agarosa.

2.5.2 Transformación de *N. crassa*

Las transformaciones se realizaron por electroporación utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell (BioRad) con la siguiente configuración: 600 Ohms, 25 μ FD y 1.5kV, para obtener un pulso constante de 12 – 14 milisegundos. Se agregaron 500 ng de cada brazo recombinante generado previamente por PCR a una cantidad aproximada de 125×10^6 conidios de la cepa de *N. crassa* mencionada anteriormente. Inmediatamente después de someter a los conidios al choque eléctrico se les agregó 1 mL de sorbitol 1M además de 1 mL de solución de recuperación (sales de Vogel 1x) para posteriormente dejarse en incubación con la rotación mínima de un hibridizador HL-2000 HybriLinker por un lapso de 3 horas a una temperatura de 30°C. Los conidios se precipitaron por centrifugación a una velocidad de 3,000 rpm por 2 minutos, eliminando aproximadamente 900 μ L del sorbitol 1M y resuspendiendo los conidios en el sorbitol 1M restante. Se sembraron aproximadamente 100 μ L en placas con medio FGS (Fructosa-Glucosa-Sorbosa) adicionadas con el marcador de selección correspondiente para posteriormente incubar a 30°C por 3 días o hasta observar colonias. Se recuperaron entre 20 a 30 colonias por transformación realizada;

éstas fueron re-inoculadas en 1.5 mL de MMV suplementado con su respectivo marcador de selección. La selección de transformantes de *N. crassa* se realizó por medio de un tamizaje, seleccionando aquellas que expresaran mayor intensidad de fluorescencia de la etiqueta molecular (casos de las cepas CNI-GFP y SEC-24-mChFP) y aquellas que expresaran un fenotipo aberrante (en el caso de la cepa Δcni).

2.5.3 Comprobación de la correcta integración de las construcciones génicas

Con la finalidad de determinar que los insertos se hubieran integrado en el locus específico se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como templado ADN genómico de cada cepa mutada y oligonucleótidos capaces de flanquear dentro y/o fuera del casete recombinante, extraído y purificado con el kit de extracción DNAeasy Plant MiniKit de QIAgen.

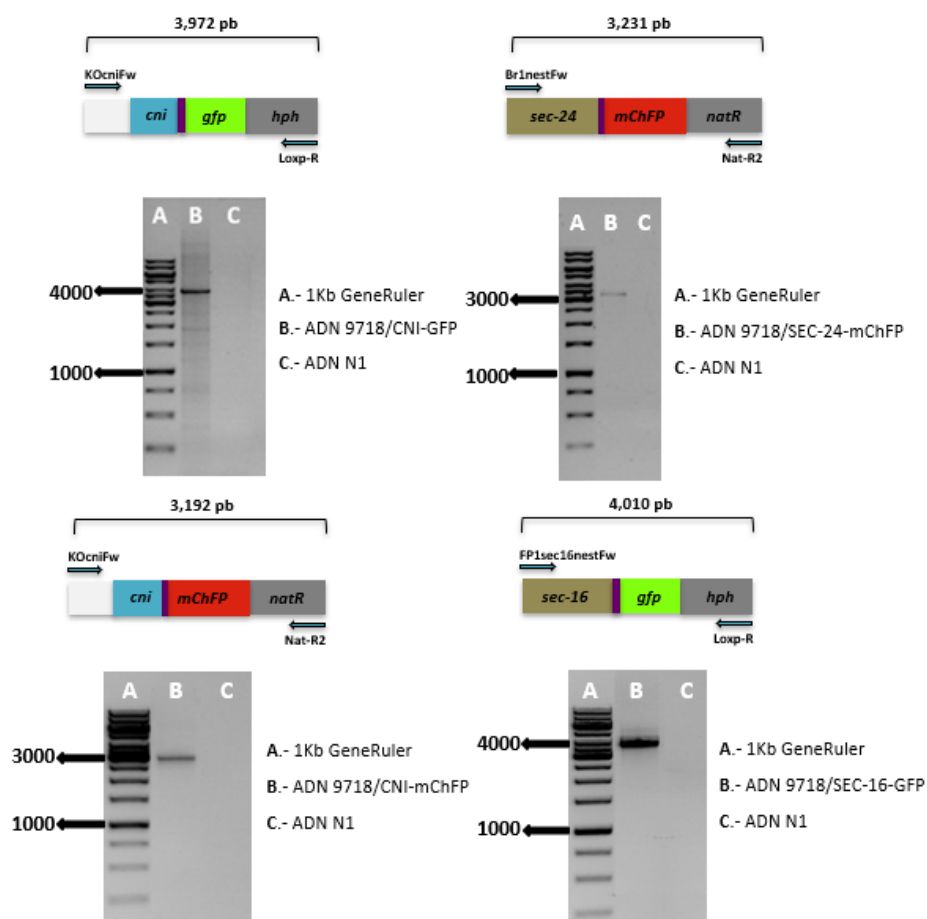


Figura 11. Comprobación de la correcta integración de las construcciones moleculares en el locus específico de *cni*, *sec-24* y *sec-16*.

2.6 Análisis de microscopía y procesamiento de datos

2.6.1 Microscopía confocal

Los análisis por microscopía confocal se llevaron a cabo en dos equipos diferentes: 1) un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview™ FV1000 con láser de argón (GFP: excitación a 488nm, emisión a intervalo de 505-525nm) para los tamizajes de CNI-GFP y SEC-16-GFP; y 2) un microscopio confocal invertido Nikon Eclipse Ti-E Ti-E/B que posee un sistema de disco giratorio, un láser de cuarzo en estado sólido y una cámara Andor iXon Ultra, para los tamizajes de CNI-mChFP y SEC-24-mChFP (mCherry: excitación 543 – 561nm, emisión de 575 – 615nm) y para visualizar la dinámica y organización de los organelos marcados con proteínas fluorescentes. En ambos equipos se utilizó el método del agar invertido (Hickey et al., 2004) y el objetivo de 60X plan apocromático, mientras que el objetivo de 100X solo se utilizó en la microscopía confocal de disco giratorio. El objetivo de 60x fue utilizado en los tamizajes de las transformantes y en algunos ensayos de co-expresión entre CNI-GFP y mChFP-YPT-1, mientras que el de 100x fue utilizado en el todas las co-expresiones.

2.6.2 Procesamiento de datos

En el caso del microscopio confocal invertido Olympus Fluoview™ FV1000 para el tamizaje de CNI-GFP y SEC-16-GFP se utilizó el software FV10-ASW (versión 4.0.2.9 Olympus) para la captura de imágenes. Para llevar a cabo los análisis de microscopía y la obtención de material multimedia con el microscopio confocal invertido Nikon Eclipse Ti se utilizó el programa “NIS-Elements AR” (versión 4.5101), el cual posee las configuraciones requeridas para realizar microscopía confocal de disco giratorio y para la edición inicial del material recabado. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS5, mientras que los videos obtenidos fueron procesados utilizando el software Camtasia Studio9, esto con la finalidad de destacar las regiones de interés y facilitar la comprensión de los resultados obtenidos.

Para examinar cuantitativamente el grado de co-localización en los distintos ensayos de co-expresión se analizó un promedio de 20 hifas por co-expresión y se determinó el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP) a partir de las imágenes de las hifas en canales independientes, utilizando el complemento JACoP (Just Another Colocalization Plugin) integrado en el software ImageJ/FIJI (Bolte y Cordelières, 2006) y

empleando el ajuste del umbral de Costes para realizar este análisis en las regiones de la imagen donde los pixeles se aprecian con mayor intensidad (Costes et al., 2004). El CCP es una medida de correlación bien establecida y su aplicación a la medición de la co-localización entre fluoróforos es relativamente reciente. Este coeficiente indica el grado de correlación entre las intensidades de dos variables. El grado de correlación va de -1 a 1, donde la co-localización es positiva a partir de 0.5 (co-localización parcial) a 1 (co-localización total). La representación gráfica del CCP es el citofluorograma de los pixeles correspondientes a los canales verde y magenta (Adler y Parmryd, 2010).

2.7 Uso del fluorocromo FM4-64 y del inhibidor brefeldina A

El fluorocromo lipofílico *N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide (mejor conocido como FM4-64, Invitrogen™, 514/670 nm absorción/emisión) fue utilizado a una concentración final de 7 μM en MMV, partiendo de una solución stock en DMSO de 300 μM , con la finalidad de apreciar las endomembranas de hifas de *N. crassa*.

El inhibidor brefeldina A (BFA; Sigma; 20 mg/mL) fue preparado en DMSO y diluido en MMV a una concentración final de 200 $\mu\text{g/mL}$; fue utilizado para los ensayos de inhibición del complejo COPI y determinación de la participación de CNI en el complejo COPII de *N. crassa*.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Determinación de la esencialidad del gen *cni* de *N. crassa*

3.1.1 La viabilidad de Δcni solo es posible en estado heterocarión

Las transformantes heterocariones recuperadas exhibieron un fenotipo afectado con respecto a la cepa silvestre y a la parental. Aun así no se logró apreciar una diferencia considerable como para determinar que el gen substituido es esencial, por ello se realizaron ensayos de obtención de homocariones Δcni . Para la obtención de la mutante en estado homocarión se seleccionaron las cinco mutantes que exhibieron el fenotipo más aberrante y se realizaron cruza sexuales entre la cepa silvestre N1 (FGSC #988) y las mutantes seleccionadas, con la finalidad de generar y recuperar ascosporas. Después de 8 horas de incubación se llevó a cabo la recuperación de ascosporas, donde solo las ascosporas conteniendo núcleos silvestres fueron capaces de germinar. Con la finalidad de determinar la viabilidad de las ascosporas se repitió el experimento suplementando con higromicina B (300 mg/mL) la placa con MMV, para reprimir el desarrollo de las ascosporas con núcleos silvestres y observar la germinación de aquellas con el gen de resistencia al antibiótico; además se aumentó el tiempo de incubación a 24 horas. Las ascosporas homocariones fueron inviables (Figura 12A), mientras que aquellas que adquirieron núcleos portadores del gen *cni* mediante fusión vegetativa con ascosporas no mutantes fueron capaces de recobrar la viabilidad y proliferar en el medio (Figura 12B).

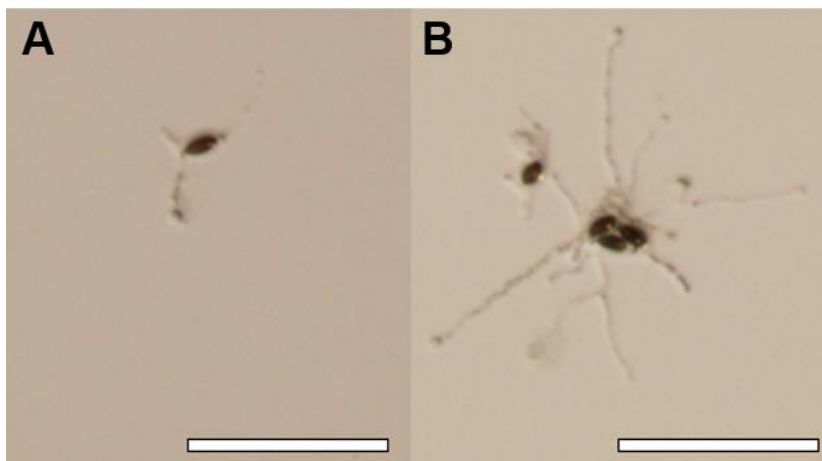


Figura 12. Micrografía de ascosporas con núcleos mutantes y silvestres. A: ascosporas mutantes Δcni en estado homocarión. B: ascosporas mutantes y silvestres realizando anastomosis. Barra de escala: 200 μm .

3.1.2 Promoviendo el fenotipo aberrante

Las conidiósporas de la transformante TESH7 previamente seleccionada como la más aberrante fueron recuperadas en 1 mL de sorbitol 1 M; posteriormente se tomó una cantidad aproximada de 125×10^6 conidios por transformante y se diluyó cada uno en 1 mL de agua estéril. Cada dilución fue esparcida sobre placas con MMV adicionado con higromicina B y L-sorbose al 20%, esto con la finalidad de restringir el crecimiento de los conidios y limitarlo a colonias aisladas (Trinci y Collinge, 1973). Algunas de las colonias recuperadas expresaron fenotipos más afectados que las mutantes heterocariones iniciales generadas en la transformación, exhibiendo una drástica disminución en biomasa y en formación de hifas aéreas, además de no ser capaces de producir conidios. De estas cepas se seleccionó la más afectada y se le denominó TESH2-4.

Para determinar que se obtuvo a una mutante heterocarión con menor cantidad de núcleos silvestres se llevó a cabo una comprobación por PCR, utilizando como templados ADN_g de la cepa silvestre N1 (FGSC #988) y las mutantes TESH7 y TESH2-4, amplificando una fracción del marco de lectura abierto de *cni* y también una fracción del marco de lectura abierto de *sec-24* como control positivo (Figura 13). El patrón de bandeo de la electroforesis reveló dos puntos importantes: 1) en todo caso se amplificó el fragmento de *sec-24* utilizado como control positivo, lo cual comprueba que el ADN_g de las mutantes generadas se extrajo adecuadamente; y 2) una disminución de la intensidad de la banda correspondiente al fragmento de *cni* en el ADN_g de TESH2-4 en comparación al resto de los templados utilizados, esto sugiere que esta cepa posee menos núcleos portadores del gen *cni* y que el fenotipo aberrante exhibido por esta cepa es causado por el carencia de la proteína CNI.

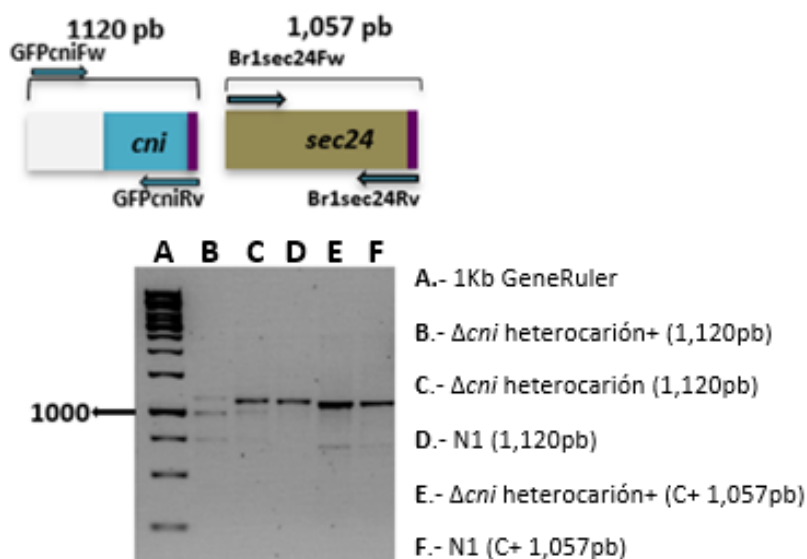


Figura 13. Representación y gel de electroforesis de los productos de PCR para la comprobación de la reducción de núcleos silvestres en TESV2-4 con respecto a la TESV7. A, B y C: reacciones correspondientes al fragmento de 1,120 pb de *cni*, los templados fueron ADNg de Δcni heterocarión+, Δcni heterocarión y N1 en ese respectivo orden. D y E: reacciones correspondientes al fragmento de 1,057 pb de *sec24*; los templados fueron ADNg de Δcni heterocarión+ y N1 en ese respectivo orden.

3.1.3 Analizando el fenotipo aberrante

Con la finalidad de determinar la importancia de CN1 en el crecimiento de *N. crassa* se comparó la velocidad de crecimiento de las distintas mutantes generadas con la de la cepa parental y la silvestre. Se inoculó una circunferencia de MMV con micelio en crecimiento de las cepas silvestre (FGSC #988), la parental (FGSC #9718), y las mutantes Δcni en el borde de placas Petri (por cuatriplicado). Estas placas se incubaron a 30°C y se trazó el crecimiento cada 4 horas hasta que estas cepas llenaran la placa. Se marcaron 5 transectos verticales y se midió el crecimiento en cada tiempo para cada transecto. Se analizaron las mediciones obtenidas y se observaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las cepas #988 (3.61 mm/h), #9718 (3.26 mm/h), TESV7 (2.56 mm/h) y TESV2-4 (0.55 mm/h); en la Figura 14 se aprecia la tasa de elongación de cada cepa en un tiempo final de 32 horas:

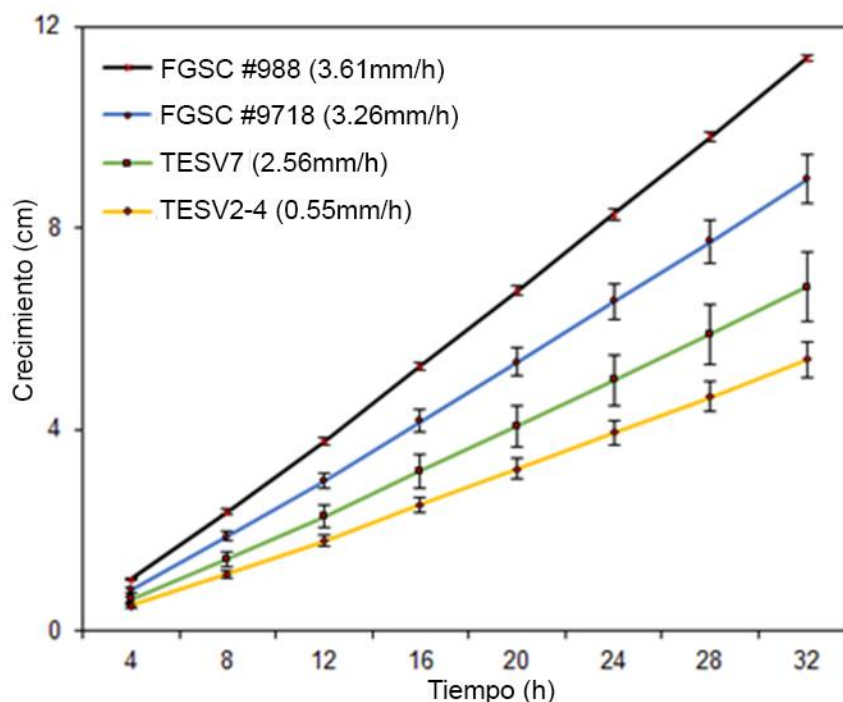


Figura 14. Medición de la tasa de elongación de la cepa silvestre (FGSC #988), la parental (FGSC #9718) y las distintas mutantes Δcni . La mutante TESV2-4 exhibió la tasa de elongación más lenta, creciendo en promedio 47% de lo que crece la cepa silvestre, mientras que la mutante TESV7 crece en promedio 59.64% de lo que crece la cepa silvestre.

La mutante TESV2-4 mostró una gran reducción de la tasa de elongación en comparación con las cepas silvestre, parental e incluso la TESV7; además exhibió un fenotipo aberrante a nivel de colonia y en la morfología de las hifas, las cuales presentan hinchazón y son ligeramente más delgadas (5-7 μm de ancho) que las de la cepa silvestre y la parental (10 μm de ancho) (Figura 15, en E y F). Otro punto interesante sobre el fenotipo aberrante es que se observó una disminución de producción de conidios en la TESV7, mientras que en la TESV2-4 la conidiación fue prácticamente nula. Se logró observar un SPK menos robusto en la TESV2-4 en comparación con las otras cepas control, pero se observaron septos aparentemente normales (Figura 15E y F).

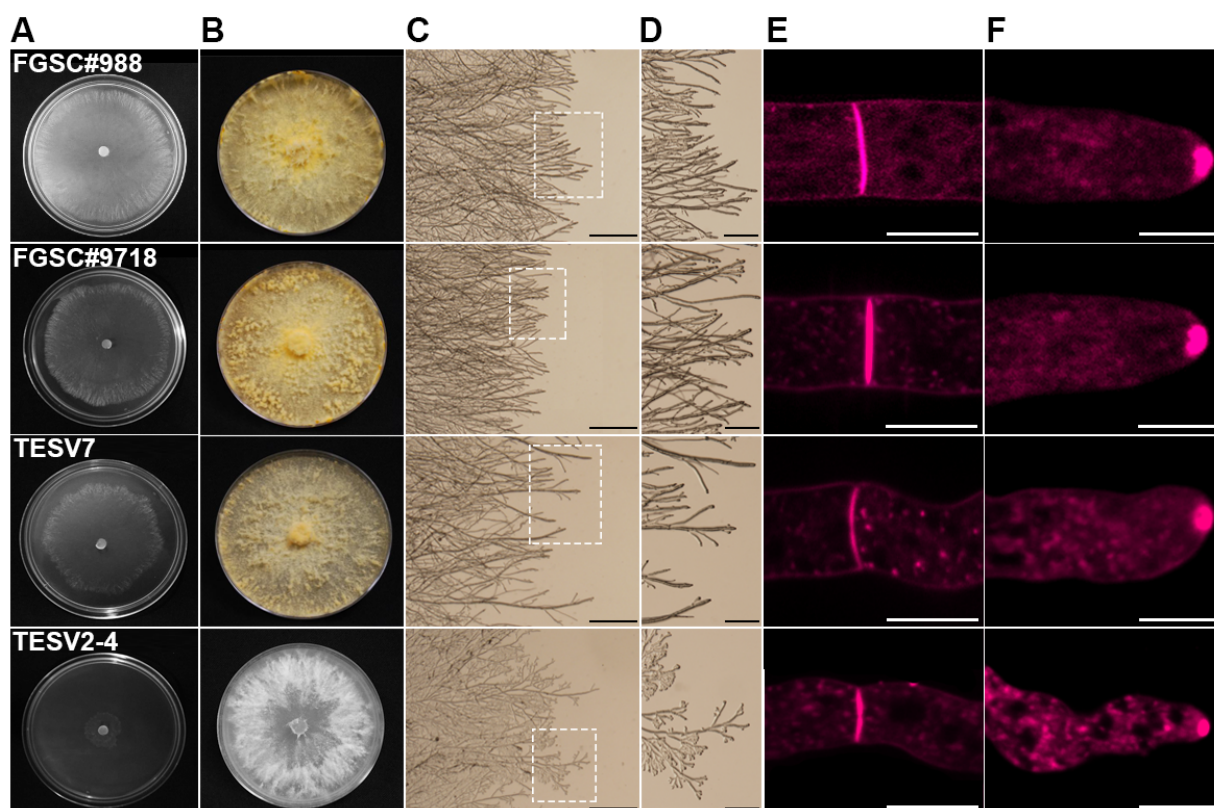


Figura 15. Morfología de las colonias e hifas de las mutantes Δcni en contraste con la cepa silvestre y la cepa parental. A: crecimiento colonial de las cepas silvestre (FGSC #988), parental (FGSC #9718), Δcni heterocarión inicial y Δcni heterocarión+ después de 28 horas de crecimiento. B: diferencias en la conidiación de las cepas en cuestión después de 5 días de exposición a luz blanca. C: crecimiento de la colonia observado bajo estereoscopia (aumento de 7x, barras de escala a 1000 μm). D: ramificación de las colonias indicadas en el recuadro punteado en C observado bajo estereoscopia (aumento de 32x, barras de escala a 200 μm). E: septos de las diferentes cepas en cuestión teñidas con el fluorocromo FM4-64 (objetivo de 60x, barras de escala a 10 μm). F: morfología de la región apical y subapical de las diferentes cepas, teñidas con el fluorocromo FM4-64 (objetivo de 60x, barras de escala a 10 μm).

3.2 Análisis de la distribución y localización subcelular de CNI de *N. crassa*

3.2.1 CNI se distribuye en una red endomembranal a lo largo de la hifa

Para caracterizar la distribución de CNI de *N. crassa* se marcó fluorescentemente a esta proteína con GFP y mChFP en su extremo C-terminal y se expresó bajo la regulación de su respectivo promotor (*Pcni*). CNI se localizó en todas las regiones de la hifa, con mayor presencia en las regiones subapicales y distales (Figura 16). Inicialmente se observó a la CNI-GFP distribuida como estructuras puntiformes a lo largo del citoplasma, sin embargo al analizar la versión de CNI etiquetada con la proteína roja fluorescente se logró

observar una interconexión entre estas estructuras puntiformes, distribuidas a lo largo del citoplasma en una red endomembranosa, siendo más evidente en regiones distales que en el subápice (Figura 16).

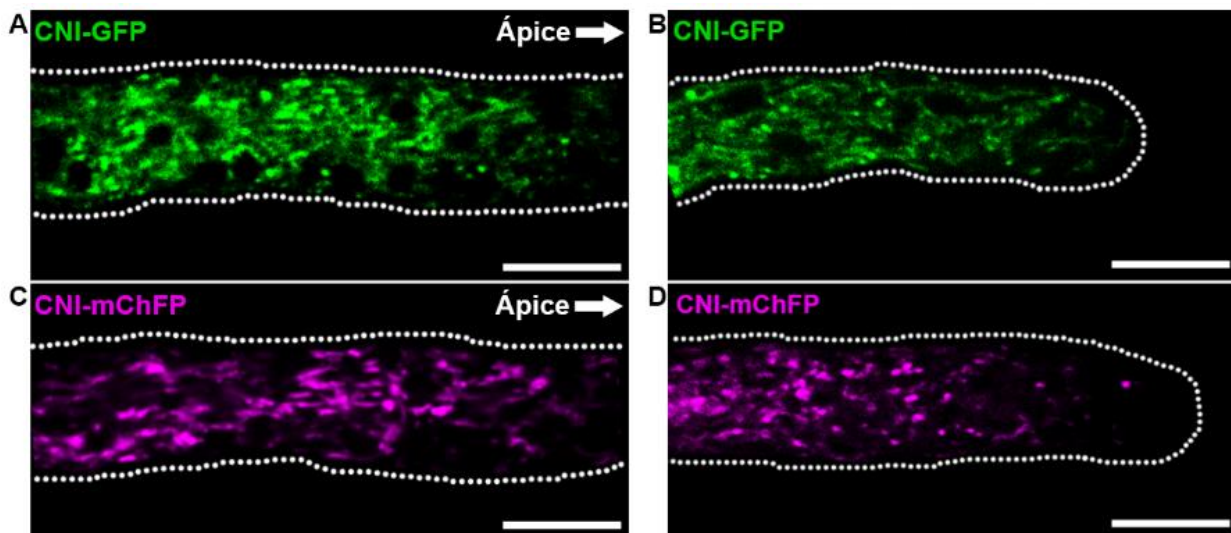


Figura 16. Distribución subcelular de CNI expresada bajo control de su promotor endógeno en *N. crassa*. A y B: distribución de CNI-GFP desde el ápice hasta regiones distales de la hifa. C y D: distribución de CNI-mChFP desde el ápice hasta regiones distales de la hifa. En cada caso se observa que CNI se distribuye en una red endomembranosa a lo largo de la hifa. Barras de escala: 10 μ m.

3.2.2 CNI co-localiza parcialmente con dos marcadores del retículo endoplásmico

Para confirmar la posible relación entre el RE y los compartimentos observados por CNI-GFP y CNI-mChFP se realizaron ensayos de co-expresión utilizando cepas expresando marcadores del RE: dsRED-NCA-1 y CSE-7-mChFP (Bowman, 2009; Rico-Ramírez, 2018).

La proteína NCA-1 es una ATPasa del tipo SERCA involucrada en el transporte de iones de calcio. Esta proteína ha sido estudiada previamente en *N. crassa* y se ha determinado que se localiza en el RE próximo a la envoltura nuclear (Bowman, 2009). Los ensayos de co-expresión entre CNI-GFP y dsRED-NCA-1 expresaron una fluorescencia muy débil (Figura 17A), no obstante se logró observar co-localización parcial en algunas membranas perinucleares y en una red endomembranosa situada en las regiones subapicales de las hifas. Se obtuvo un valor de CCP de 0.92, sugiriendo que existe co-localización parcial entre ambas proteínas (Figura 17C).

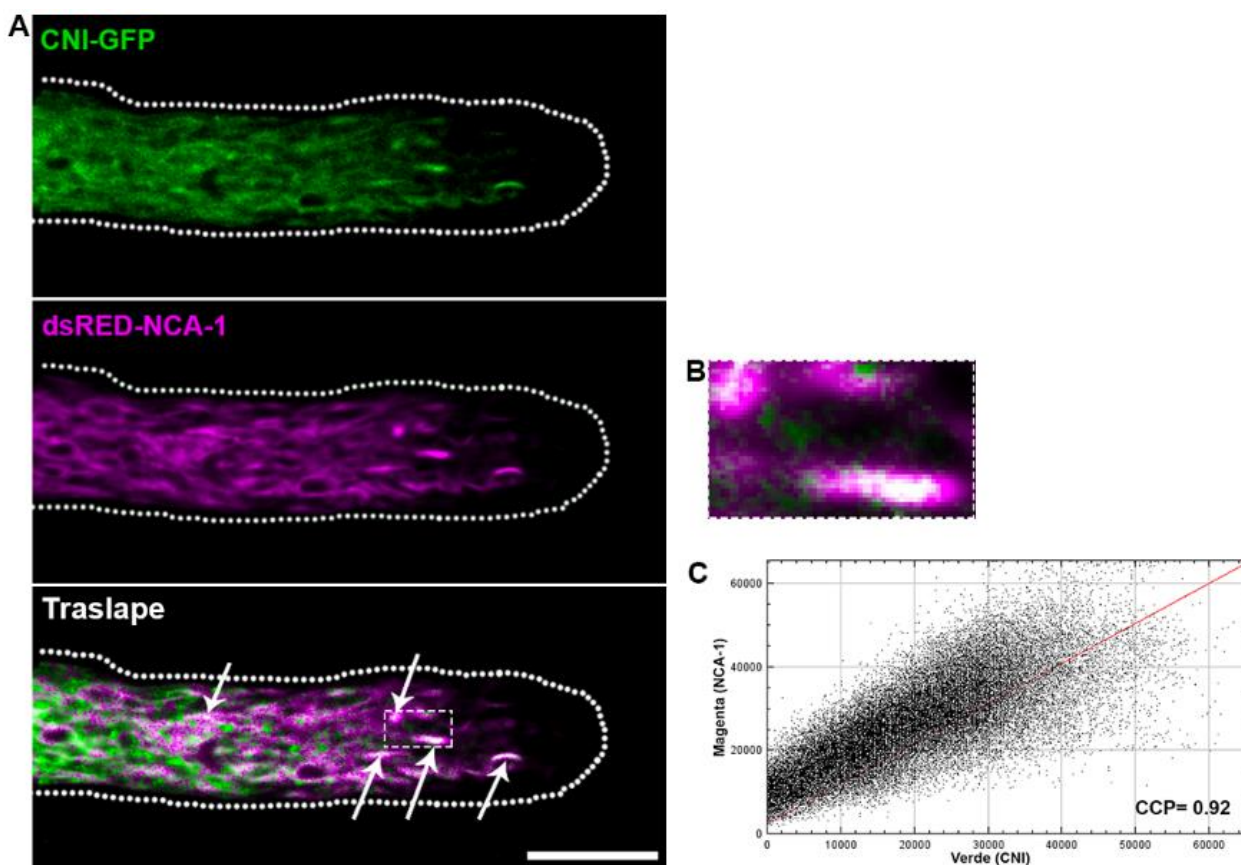


Figura 17. Co-expresión de CNI-GFP y dsRED-NCA-1. A: la co-expresión mostró una co-localización parcial en algunas regiones de la hifa, las cuales se señalan con flechas. B: magnificación de una región donde se aprecia co-localización entre ambas proteínas. C: citofluorograma de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indica el valor del CCP correspondiente. Barra de escala a 10 μ m.

Recientemente se ha estudiado la distribución y papel de la proteína CSE-7 de *N. crassa*, determinando que esta proteína funciona como el adaptador cargo específico para el tráfico de la quitina sintasa CHS-4 hacia el SPK y septos en hifas de este hongo (Rico-Ramírez et al., 2018). Además se comprobó que CSE-7 está localizada en un complejo denominado Red de Cisternas Elongadas (NEC, por sus siglas en inglés), conformado por RE y vacuolas tubulares (Rico-Ramírez et al., 2018). La co-expresión entre CNI-GFP y CSE-7-mChFP exhibió co-localización parcial entre ambas proteínas en una red endomembranosa distribuida a lo largo de la hifa, siendo más notable en las regiones distales de la hifa (Figura 18A, B, C y E). El valor de CCP obtenido tanto en zonas distales como apicales (0.78 y 0.75 respectivamente) indican una co-localización parcial entre ambas proteínas (Figura 18D y F).

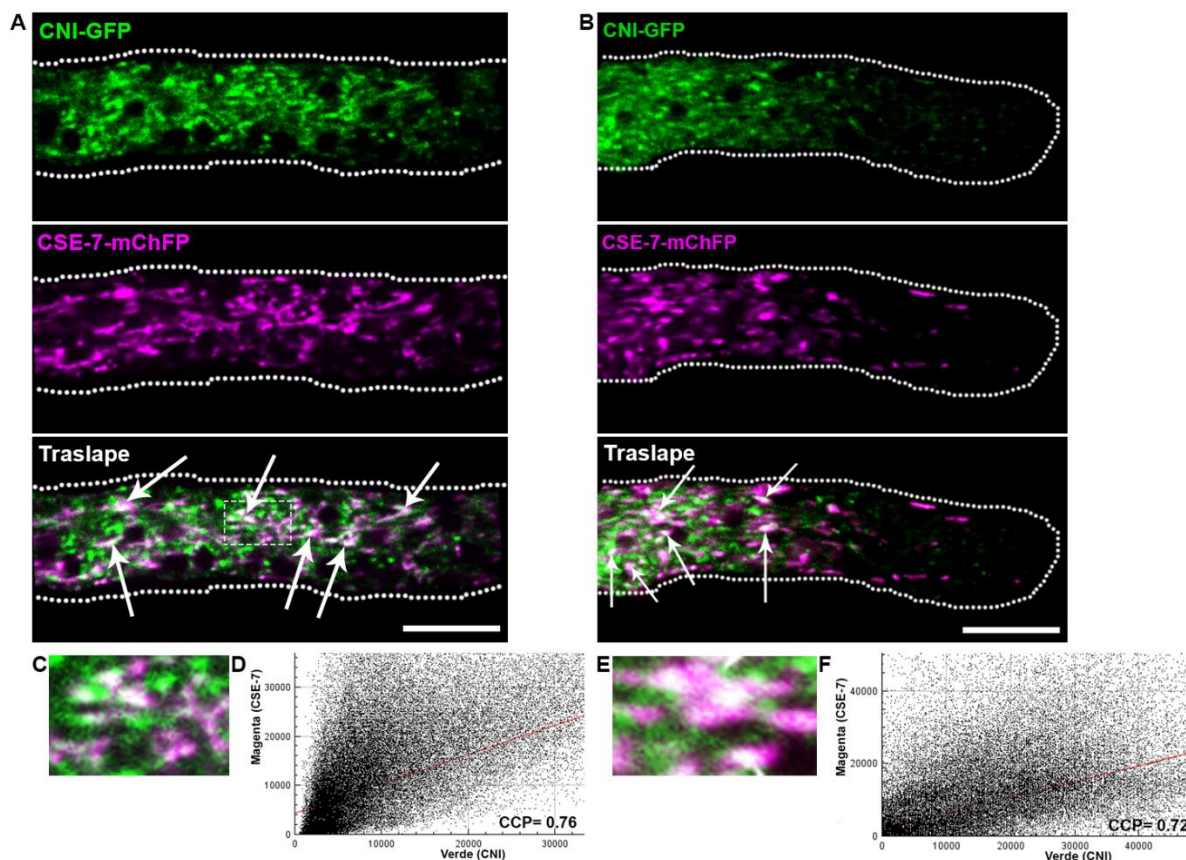


Figura 18. Co-expresión de CNI-GFP y CSE-7-mChFP. A y B: la co-expresión mostró una co-localización parcial en algunas regiones de la hifa, principalmente en regiones distales; se señalan con flechas algunos de estos puntos de co-localización. C y E: magnificación de regiones donde se aprecia co-localización entre ambas proteínas. D y F: citofluorogramas de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indican los valores del CCP correspondientes. Barras de escala: 10 μ m.

3.2.3 Asociación entre CNI y las cisternas de Golgi

Con la finalidad de determinar la posible relación entre las cisternas de Golgi y las estructuras exhibidas con las versiones fluorescentes de CNI se realizaron ensayos de co-expresión entre CNI-GFP y el marcador de Golgi y microvesículas YPT-1. La proteína Ypt1p (Rab1) es una GTPasa clave para la regulación de las distintas etapas de la ruta secretora en *S. cerevisiae* y en células de mamíferos. Estudios en *N. crassa* han sugerido que esta proteína participa en el tráfico y entrega de vesículas secretoras involucradas en la síntesis de pared celular al SPK (Sánchez-León et al., 2015). Esta proteína se encuentra asociada a las cisternas de Golgi, a las microvesículas que componen al SPK y a una red tubular altamente dinámica situada en regiones distales de la hifa (Sánchez-León et al., 2015). Los análisis de co-expresión entre CNI-GFP y mChFP-YPT-1 revelaron co-localización en dos estructuras diferentes: en estructuras puntiformes

situadas principalmente en el subápice hifal y en la red tubular situada en regiones distales (Figura 19A, B, C y E). El valor de CCP obtenido tanto en zonas distales como apicales (0.79 y 0.72, respectivamente), aunque un poco bajo, sugiere una co-localización parcial entre ambas proteínas (Figura 19D y F).

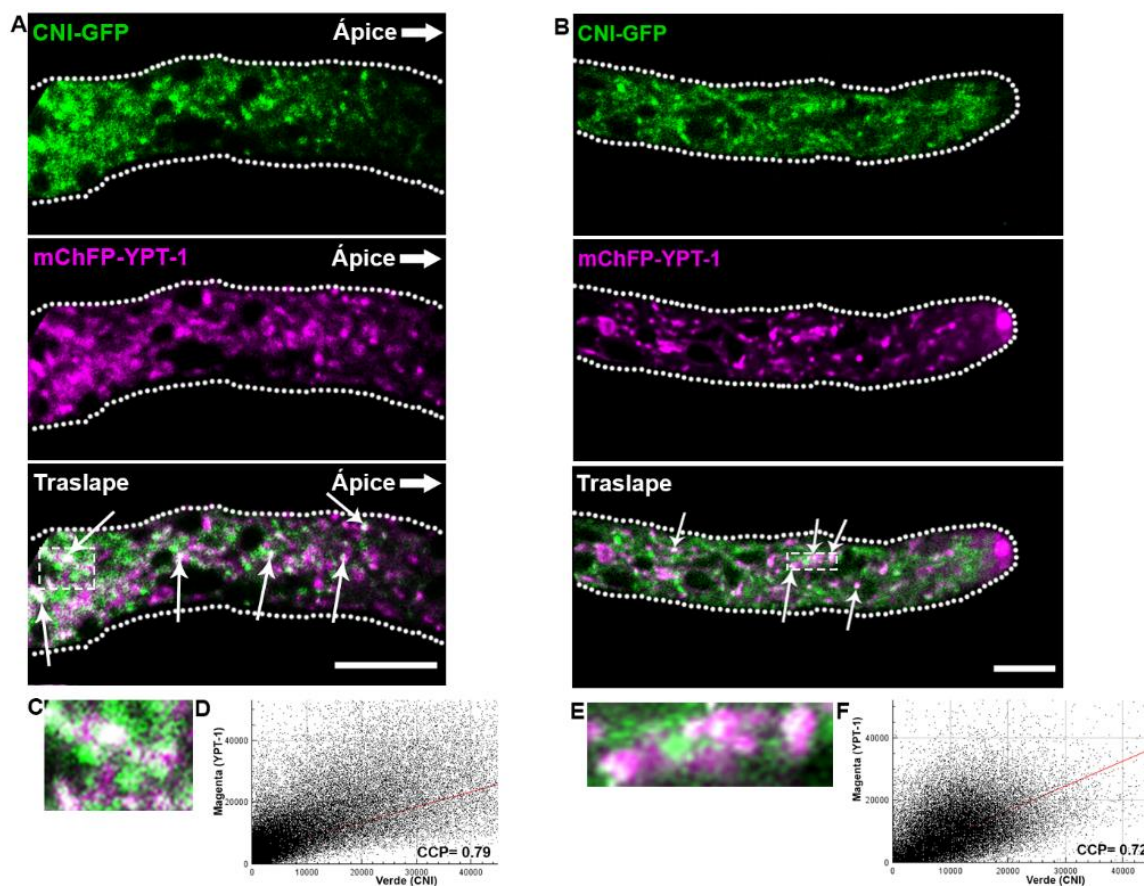


Figura 19. Co-expresión de CNI-GFP y mChFP-YPT-1. A y B: la co-expresión mostró una co-localización parcial en estructuras puntiformes situadas en regiones subapicales y en una red tubular ubicada en regiones distales, se señalan con flechas algunos de estos puntos de co-localización. C y E: magnificación de regiones donde se aprecia co-localización entre ambas proteínas. D y F: citofluorogramas de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indican los valores del CCP correspondientes. Objetivos a 100x (región distal) y 60x (región apical). Barras de escala: 10 μm.

En *S. cerevisiae* Uso1p (p115 en mamíferos) es una proteína grande de anclaje con dominio coiled-coil (Allan et al., 2000), requerida para el anclaje inicial de vesículas derivadas del RE que se dirigen al Golgi temprano (Beard et al., 2005) y estudios previos de USO-1 de *N. crassa* revelaron su asociación con el Golgi temprano de este hongo (Sánchez-León et al., 2015). Con la finalidad de analizar si CNI de *N. crassa* está vinculado al Golgi temprano se realizaron análisis de co-expresión entre CNI-mChFP y USO-1-GFP. Los análisis de microscopía revelaron que no existe co-localización entre ambas proteínas (Figura 20A). El

análisis cuantitativo arrojó un valor de CCP igual a 0.37, confirmando la falta de co-localización entre ambas proteínas (Figura 20B).

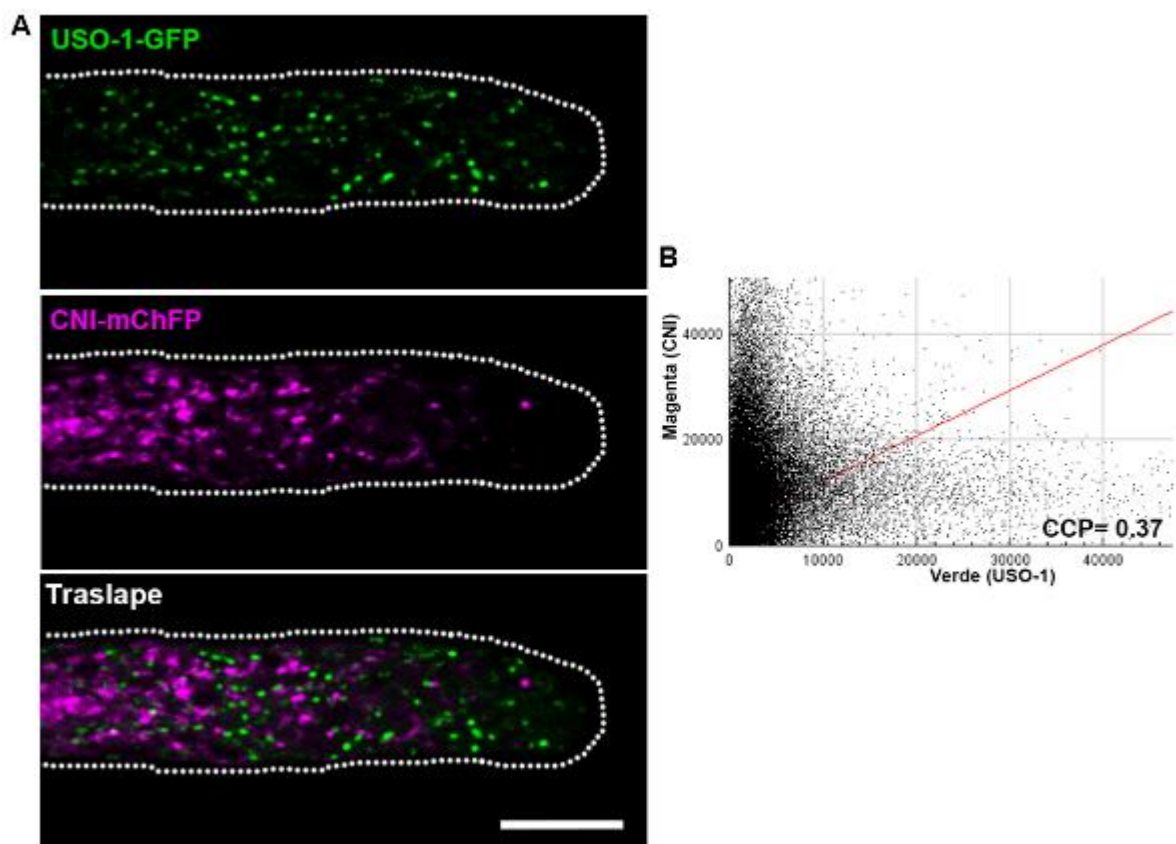


Figura 20. Co-expresión de USO-1-GFP y CNI-mChFP. Esta co-expresión no mostró co-localización entre las estructuras asociadas a CNI y las cisternas de Golgi temprano elucidadas por USO-1. Barra de escala: 10 μ m.

3.3 CNI y su relación con el complejo COPII en hifas de *N. crassa*

3.3.1 CNI co-localiza parcialmente con intermediarios putativos de COPII

Para determinar la posible asociación entre la proteína CNI con proteínas participantes del sistema COPII se realizó el etiquetado endógeno de dos proteínas posiblemente involucradas en este complejo en *N. crassa*: la proteína de andamiaje SEC-16 y la del coatómero inicial SEC-24. Estudios previos de Sec16p en *Komagataella pastoris* (antes *P. pastoris*) y en *S. cerevisiae* determinaron que esta proteína funciona como un andamio molecular para las proteínas que conforman al sistema COPII, interactuando directamente con Sec23p (Montegna et al., 2012; Yorimitsu y Sato, 2012; Glick, 2014), una proteína que junto a Sec24p

conforma el heterodímero que reviste inicialmente a la vesícula en formación; cabe destacar que Sec24p posee distintas señales de clasificación específicas para distintos adaptadores cargo (Barlowe y Miller, 2013), como el ortólogo a CNI en *S. cerevisiae* Erv14p (Pagant et al., 2015), por lo que podría existir una relación entre SEC-24 y CNI en *N. crassa*.

SEC-16-GFP exhibió una distribución un tanto similar a la de CNI, organizándose en estructuras puntiformes interconectadas en una red endomembranosa que se extiende a lo largo de la hifa (Figura 22, A y B), mientras que SEC-24-mChFP se distribuyó como estructuras puntiformes distribuidas en regiones apicales y subapicales (Figura 22C y D), observándose también una interconexión de estas estructuras puntiformes en regiones distales de la hifa (Figura 22C). Es importante destacar que ambas cepas expresaron una fluorescencia relativamente baja y un crecimiento afectado, siendo la cepa con SEC-24-mChFP aquella que expresó un fenotipo considerablemente aberrante (Figura 21).

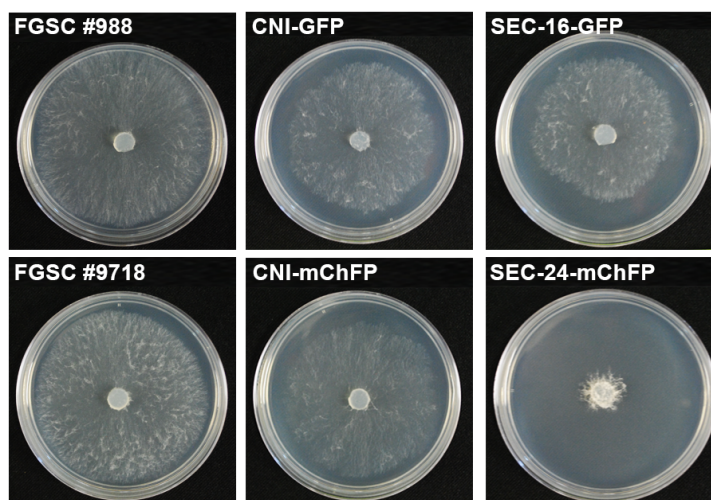


Figura 21. Comparación de la morfología colonial de las cepas silvestre y parental contra las etiquetadas fluorescentemente en este estudio.

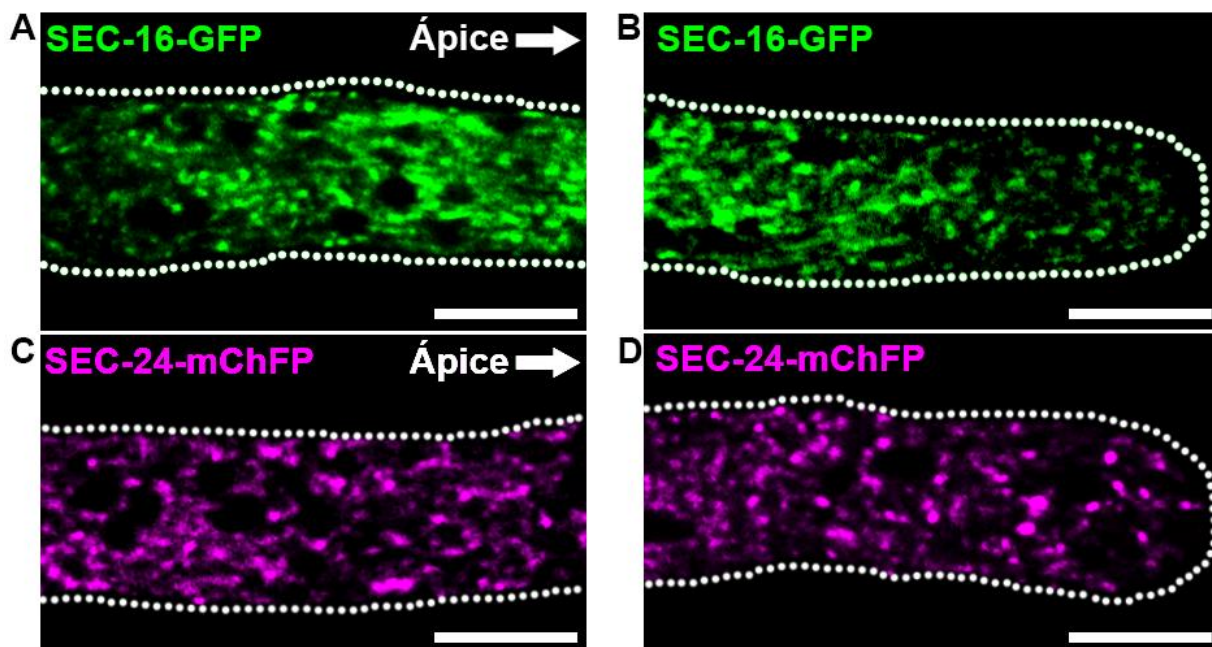


Figura 22. Distribución subcelular de SEC-16 y SEC-24 regulados bajo su propio promotor en *N. crassa*. A y B: distribución de SEC-16-GFP desde el ápice hasta regiones distales de la hifa. C y D: distribución de SEC-24-mChFP desde el ápice hasta regiones distales de la hifa. Barras de escala: 10 μ m.

Para confirmar la relación entre los compartimentos revelados por SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP con el RE se realizaron ensayos de co-expresión: uno entre SEC-16-GFP y dsRED-NCA-1 y otro entre SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP. La co-expresión entre SEC-16-GFP y dsRED-NCA-1 reveló co-localización entre ambas proteínas tanto en regiones distales como en apicales aparentemente en el RE organizado en las inmediaciones de los núcleos y en otros puntos discretos situados a lo largo de la hifa (Figura 23A, B, C y E), además los valores del CCP obtenidos de regiones distales y apicales (0.90 y 0.82 respectivamente) proveen más evidencia que sugiere la relación entre SEC-16-GFP y el RE (Figura 23D y F).

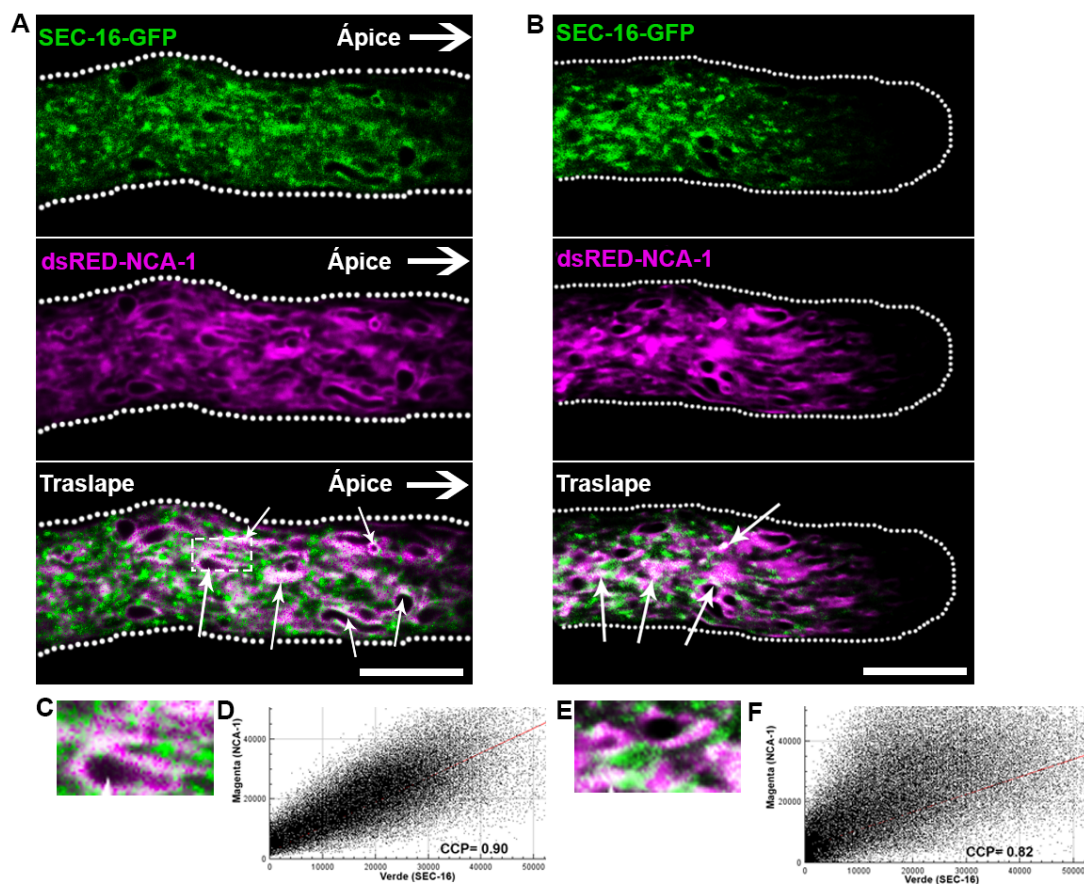


Figura 23. Co-expresión de SEC-16-GFP y dsRED-NCA-1. A y B: la co-expresión mostró una co-localización parcial en estructuras situadas en las inmediaciones de los núcleos y en algunos puntos discretos ubicados a lo largo de la hifa, se señalan con flechas algunas regiones de co-localización. C y E: magnificación de regiones donde se aprecia co-localización entre ambas proteínas. D y F: citofluorogramas de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indican los valores del CCP correspondientes. Barras de escala: 10 μ m.

Los ensayos de co-expresión entre SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP mostraron que ambas proteínas co-localizan parcialmente en algunas estructuras puntiformes situadas en regiones subapicales de la hifa (Figura 24A y B). A pesar de que visualmente se observan muy pocos sitios donde ambas proteínas co-localizan, el análisis cuantitativo de la co-localización arrojó un valor del CCP igual a 0.72, lo cual sugiere que existe co-localización entre ambas proteínas (Figura 24C).

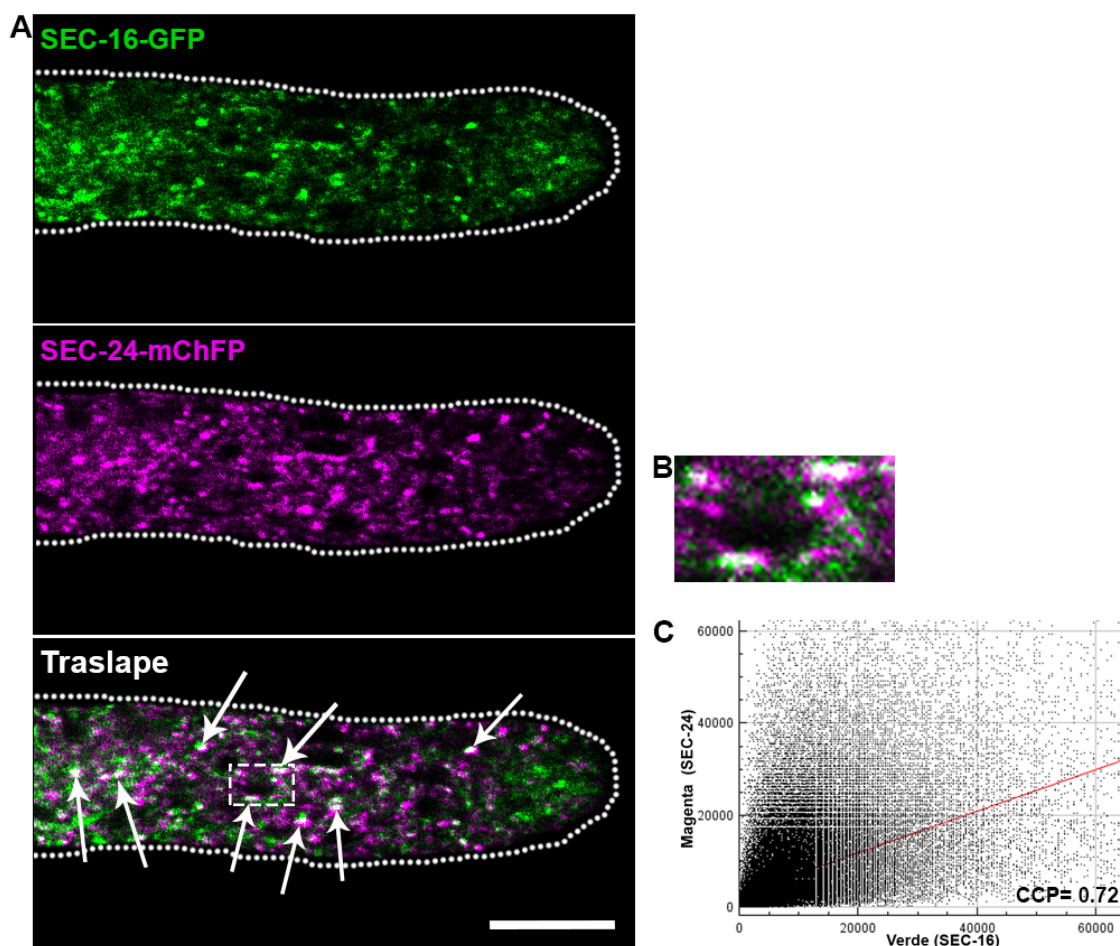


Figura 24. Co-expresión de SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP. A: la co-expresión mostró una co-localización parcial en algunas regiones de la hifa, las cuales se señalan con flechas. B: magnificación de una región donde se aprecia co-localización entre ambas proteínas. C: citofluorograma de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indica el valor del CCP correspondiente. Barra de escala a 10 μ m.

Una vez que se determinó que existe una relación entre estas proteínas se llevaron a cabo los ensayos de co-expresión de los intermediarios putativos del sistema COPII y las distintas versiones de CNI. La co-expresión de SEC-16-GFP y CNI-mChFP reveló co-localización parcial entre ambas proteínas (Figura 25A y C); además el análisis cuantitativo de la co-localización arrojó un CCP equivalente a 0.60 (Figura 25D, indicando que es probable que ambas proteínas se localicen en el mismo complejo. La co-expresión entre CNI-GFP y SEC-24-mChFP mostró co-localización parcial en diversas estructuras puntiformes situadas en regiones subapicales de la hifa (Figura 25B y E). De igual forma los análisis cuantitativos de la co-localización, con un CCP igual a 0.68 (Figura 25F), sugieren que ambas proteínas co-localizan en los distintos puntos de la hifa.

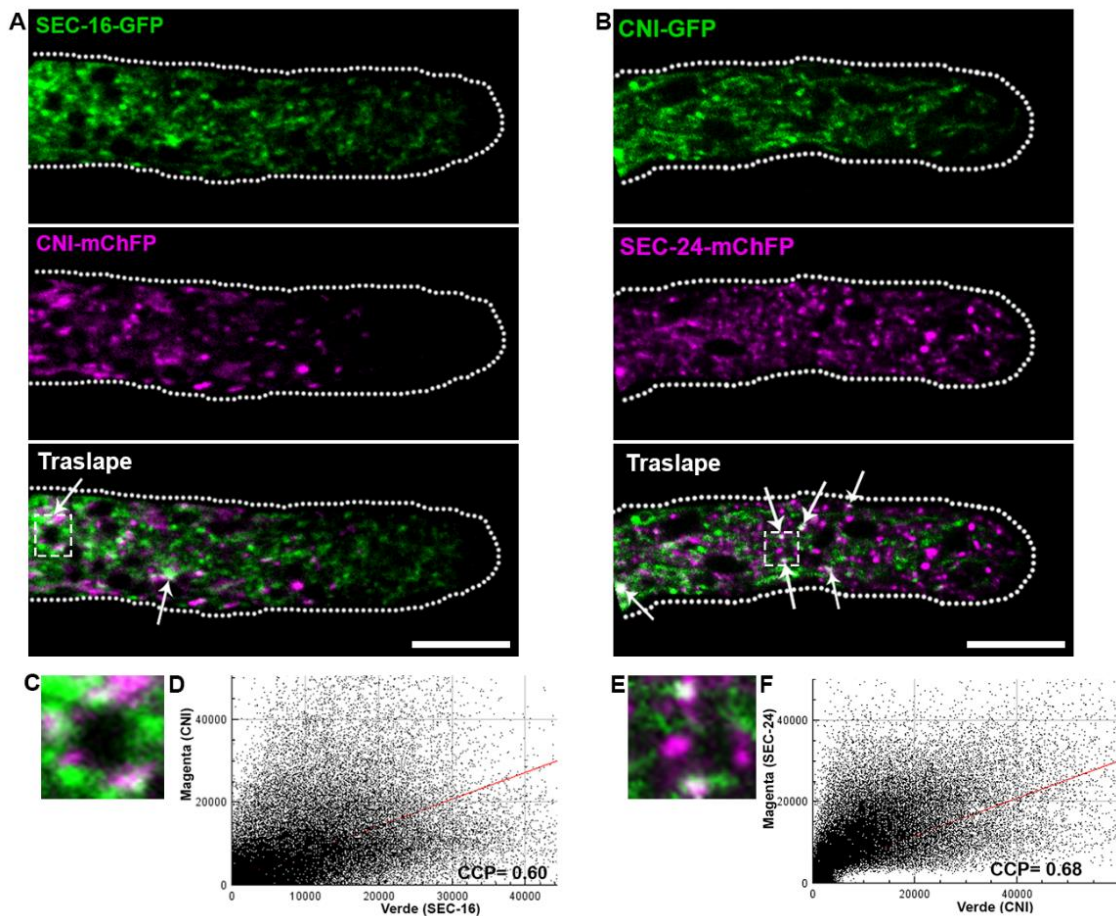


Figura 25. Co-expresiones de las distintas versiones de CNI y los intermediarios putativos de COPII. A: co-expresión entre SEC-16-GFP y CNI-mChFP. B: co-expresión entre CNI-GFP y SEC-24-mChFP. C y E: maximización de regiones donde se aprecia co-localización en los recuadros de traslape. D y F: citofluorogramas de la distribución de píxeles de los canales magenta y verde, además se indican los valores del CCP correspondientes. Barras de escala: 10 μ m.

3.3.2 CNI se acumula en cuerpos de BFA

La brefeldina A (BFA) es un inhibidor que actúa sobre Sec7, un factor de intercambio de guanosina (GEF), que cataliza la activación de Arf1 (factor de ADP-ribosilación), una pequeña GTPasa responsable de reclutar a las proteínas de la cubierta COPI implicadas en el transporte vesicular retrógrado de Golgi a RE (Scales et al., 2000; Jackson y Casanova, 2000). La fusión de vesículas con las membranas diana depende de la interacción de proteínas SNARE (Soluble NSF attachment Protein), específicamente entre una v-SNARE de la vesícula con la t-SNARE afín en la membrana receptora, por ello cuando la formación de vesículas derivadas del sistema COPI está bloqueada, en respuesta al efecto producto de la BFA, la población de proteínas v-SNARE en la membrana de Golgi aumenta temporalmente, incrementando la

probabilidad de fusión directa e incontrolada entre las membranas aledañas, tanto de Golgi como de RE (Elazar et al., 1994).

Con la finalidad de determinar si CNI tiene alguna relación con el complejo COPII se realizó un ensayo de co-expresión entre CNI y YPT-1 bajo el efecto de BFA, donde la retención de la proteína CNI en cisternas de Golgi, por la inhibición del complejo COPI, comprueba la presencia de CNI en el complejo COPII. Este análisis reveló que CNI co-localiza parcialmente con YPT-1 en los cuerpos de BFA en la región subapical de la hifa (Figura 26).

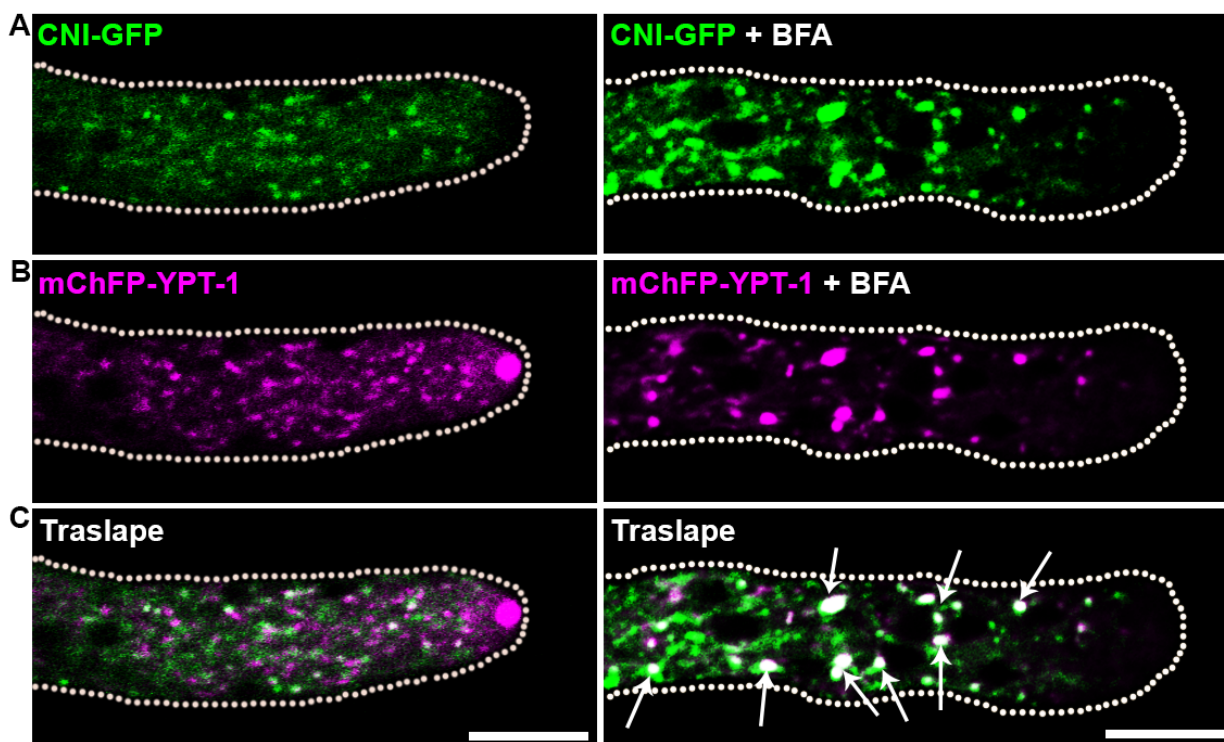


Figura 26. Efecto de BFA sobre la distribución y organización de CNI-GFP. A: distribución y organización de CNI-GFP en condiciones normales y bajo el efecto de BFA. B: distribución y organización de mChFP-YPT-1 a condiciones normales y bajo el efecto de BFA. C: traslape de canales, se observa cómo a condiciones normales CNI-GFP co-localiza con mChFP-YPT-1 en estructuras puntiformes situadas en regiones subapicales, mientras que bajo el efecto de BFA ambas proteínas co-localizan en los cuerpos de BFA, señalando con flechas blancas los más evidentes. Barras de escala: 10 μ m.

Capítulo 4. Discusión

El tráfico intracelular en hongos filamentosos es un proceso sumamente importante para el mantenimiento de los distintos organelos en los sitios donde estos son necesarios, por ejemplo, el tráfico de vesículas secretoras con material requerido para el establecimiento de la polaridad y la morfogénesis fúngica (Bartnicki-García et al., 1989). Como se ha citado previamente, las proteínas de la familia Cni/Erv14p que han sido estudiadas hasta hoy en día actúan como receptores de proteínas cargo para el transporte de material involucrado en el establecimiento de la homeostasis celular (Roth et al., 1995; Powers y Barlowe, 1998, 2002; Bokel et al., 2006; Pagant et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2016; Wudick et al., 2018). En este trabajo se estudió el papel de CNI en *N. crassa* como adaptador cargo específico del RE. Hoy en día la información acerca de los adaptadores cargo en hongos filamentosos es limitada, por lo que en este estudio se llevaron a cabo estudios exploratorios de la proteína putativa ortóloga a Cni/Erv14p en *N. crassa*.

4.1 CNI cumple un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de *N. crassa*

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la esencialidad de CNI en las hifas de *N. crassa*. Esto se evaluó analizando el fenotipo que exhiben las hifas de *N. crassa* ante la deficiencia de la proteína CNI. Para determinar si esta proteína es esencial en *N. crassa* se intentó obtener a Δcni en estado homocarión y analizar el efecto fenotípico ante una total ausencia de CNI. Las ascosporas recuperadas que fueron capaces de resistir el antibiótico mostraron un crecimiento aberrante e interrumpido después de aproximadamente 6 horas de incubación; además sólo aquellas que realizaron anastomosis con ascosporas de una cepa silvestre fueron capaz de crecer y colonizar la placa, debido a la recuperación de núcleos portadores del gen *cni*. Esto sugiere que CNI podría estar cumpliendo un papel fundamental para la viabilidad celular. Para profundizar en el papel de CNI se recurrió a una estrategia que permitió potenciar el fenotipo aberrante en la cepa heterocarión y lograr así observar más a detalle el efecto de la deficiencia de CNI en *N. crassa*. Los defectos morfológicos observados permiten concluir que la ausencia de CNI genera hifas con problemas para el mantenimiento de la polaridad y morfología. Todos los análisis sobre las mutantes obtenidas proveen evidencia que sugiere la participación fundamental de CNI en el desarrollo y mantenimiento de *N. crassa*.

4.2 CNI se localiza en el RE y en cisternas de Golgi

Uno de los objetivos principales de este estudio fue determinar la localización subcelular de CNI en hifas de *N. crassa*. Estudios previos han caracterizado la localización de los homólogos a Cornichon/Erv14p en distintos organismos modelo y han revelado que estas proteínas poseen asociación con el RE y el complejo de Golgi (Powers y Barlowe, 1998, 2002; Bokel et al., 2006; Pagant et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2016; Wudick et al., 2018). Con base en esta información se hipotetizó que CNI también podría encontrarse en estos compartimentos en *N. crassa*.

Este estudio reveló que la proteína CNI de *N. crassa* está distribuida en una red endomembranosa a lo largo de la hifa, presumiblemente el RE. Por otro lado también se observaron cúmulos de CNI interconectados en la red endomembranosa previamente mencionada ¿Cómo se explica esta distribución doble? 1) Por un lado se debe considerar que la distribución de CNI ocurre en un plano tridimensional, por lo que estos cúmulos podrían corresponder al movimiento de esta red endomembranosa en un eje de profundidad; 2) Por otro, es posible que estos cúmulos se traten de sitios de salida del RE, donde CNI se acumula en vesículas derivadas del complejo COPII para su exportación al Golgi.

En investigaciones anteriores se han identificado distintas proteínas marcadoras del RE, incluyendo NCA-1 presente en el RE situado en las inmediaciones de los núcleos y CSE-7 que se localiza en la NEC (Bowman et al., 2009; Rico-Ramírez et al., 2018). Además, estudios previos revelaron que existe co-localización entre estas proteínas tanto en el RE perinuclear como distintas regiones de la NEC, lo cual sugiere que ambas proteínas coinciden en diferentes compartimentos del RE y que el RE está más interconectado de lo que los análisis de microscopía actualmente sugieren (Rico-Ramírez et al., 2018). Al igual que CSE-7, CNI co-localizó con NCA-1 tanto en las inmediaciones de los núcleos como en otras regiones del RE. Además, el análisis de co-expresión entre CNI y CSE-7 reveló que ambas proteínas comparten localización en distintos puntos de la NEC. Estos análisis refuerzan la idea propuesta por Rico-Ramírez y colaboradores en 2018 acerca de la interconexión del RE en *N. crassa*. Otro punto importante es que estudios previos proponen que CSE-7 es el adaptador cargo específico para el tráfico eficiente de la CHS-4 hacia el SPK de las hifas de *N. crassa* (Rico-Ramírez et al., 2018), por lo que la cercanía entre CSE-7 y CNI, proteína que se cree que posee también un papel de adaptador cargo, sugiere que puede haber múltiples sitios de salida del RE (ERES) en una misma sección del RE para el tráfico de diverso material celular. Esto es de suma importancia debido a que hasta hoy en día se desconoce la presencia y/o naturaleza de los sitios de salida del RE en *N. crassa*.

En trabajos previos se ha identificado a la Rab GTPasa YPT-1 asociada a microvesículas y a cisternas de Golgi temprano y tardío, y a la proteína de anclaje USO-1 asociada a cisternas de Golgi temprano (Sánchez-León et al., 2015). La co-expresión entre CNI y YPT-1 exhibió co-localización en las cisternas de Golgi situadas en regiones subapicales y en una red tubular situada en regiones distales, lo cual sugiere que CNI se localiza en esos mismos compartimentos. Estudios recientes de los adaptadores cargo CSE-7 y el complejo p24 (ERV-25, EMP-24, ERP-1 y ERP-3) de *N. crassa* también revelaron co-localización parcial en cisternas de Golgi (Starr et al., 2018; Rico-Ramírez et al., 2018). Además algunos autores proponen que una vez que los adaptadores cargo involucrados en el complejo COPII cumplen su papel, éstos se acumulan en las cisternas Golgi para ser nuevamente transportados al RE en vesículas derivadas del sistema COPI y así nuevamente puedan llevar a cabo su función (Gommel et al., 1999; Strating et al., 2009). Por ello es probable que la co-localización entre YPT-1 y CNI en estructuras puntiformes, principalmente en zonas distales donde el Golgi temprano es abundante, corresponda a la acumulación de CNI en cisternas tempranas para ser re-transportado al RE mediante vesículas derivadas del complejo COPI. Con la finalidad de comprobar la relación entre CNI y el Golgi temprano se co-expresó CNI con USO-1, proteína marcadora de cisternas tempranas. En estos ensayos USO-1 no co-localizó con CNI. Esta falta de co-localización sugiere que: 1) CNI podría estar cumpliendo su papel de adaptador cargo llegando directamente a cisternas de Golgi tardías y acumulándose ahí; 2) CNI co-localiza en cisternas de Golgi temprano donde el anclamiento entre este compartimento y el RE, mediado por USO-1, no se ha llevado a cabo. Se requieren experimentos adicionales para resolver esta discrepancia.

4.3 CNI de *N. crassa* es una proteína asociada al complejo COPII

Otro de los objetivos de este trabajo fue analizar la participación de CNI en el complejo COPII. Para ello se etiquetaron SEC-16 y SEC-24, dos proteínas que presumiblemente forman parte del sistema COPII en *N. crassa*. Inicialmente se analizó si una de estas proteínas estaba relacionada con alguno de los marcadores del RE previamente utilizados. Se realizó un ensayo de co-expresión entre la versión fluorescente de SEC-16 con el marcador de RE NCA-1. Este análisis reveló co-localización muy evidente entre ambas proteínas, sugiriendo una localización de SEC-16 en el RE. Los ensayos de co-expresión entre SEC-16 y SEC-24 revelaron co-localización parcial entre ambas proteínas en diversas estructuras puntiformes situadas en regiones subapicales. Esto sugiere dos puntos interesantes: 1) al igual que SEC-16, la proteína SEC-24 también interactúa con el RE; 2) ambas proteínas pudieran estar co-localizando en los sitios de salida de este compartimento.

Los análisis cualitativos y cuantitativos de la co-expresión entre CNI y SEC-16 revelaron muy poca co-localización entre ambas proteínas. Como se mencionó previamente SEC-16 es un andamio molecular de las proteínas derivadas del complejo COPII que se sitúa en los sitios de salida del RE. Esto sugiere que esta proteína reside en estos sitios de salida e interactúa con otros adaptadores cargo, no solamente con CNI. El fenotipo tan afectado exhibido por la mutante más aberrante sugiere que CNI es una proteína muy abundante en la célula, involucrada en la exportación del RE al Golgi de numeroso material celular; sin embargo la poca co-localización con SEC-16 indica que posiblemente no se trate de una cuestión de cuánto material transporta CNI, sino de la esencialidad de este material para el desarrollo y mantenimiento celular.

Como se citó previamente, Sec24p de *S. cerevisiae* posee diversos dominios de clasificación para la interacción con distintos adaptadores cargo (Barlowe y Miller, 2013), y se ha determinado que Erv14p (ortólogo a CNI de *N. crassa*) es uno de los distintos adaptadores cargo afines a Sec24p (Pagant et al., 2015). Otro resultado inesperado fue la baja co-localización entre CNI y SEC-24 que fue revelada por los análisis de microscopía y de cuantificación de la co-localización, se tienen dos ideas que podrían explicar este suceso: 1) SEC-24 de *N. crassa* también interactúe con múltiples adaptadores cargo, donde CNI podría ser solamente uno de todos los que están presentes en este hongo filamentoso; 2) estudios recientes que destacan que *N. crassa* posee dos isoformas ortólogas (NCU02391 y NCU06868) a dos proteínas (Sec24p y Lst1p) de *S. cerevisiae* con un papel en el sistema COPII y que podrían interactuar con distintos adaptadores cargo entre sí (Starr et al., 2018), por lo que existe la posibilidad de que la isoforma codificada por NCU06868 interactúe en mayor medida con CNI.

Para obtener mayor información acerca de la interacción de CNI con los compartimentos involucrados en el complejo COPII se realizaron ensayos con el inhibidor BFA, el cual es utilizado tradicionalmente para estudiar la ruta secretora convencional RE – Golgi. Los ensayos realizados en este trabajo mostraron una re-organización de los compartimentos revelados por CNI en respuesta a la exposición a BFA, distribuyéndose en agregados de RE y acumulándose en los llamados cuerpos de BFA. La presencia de CNI en los cuerpos de BFA sugiere que esta proteína cumple su papel en el sistema COPII y se acumula en los equivalentes de Golgi, reteniéndose en este compartimento debido a que BFA inhibe al sistema COPI donde CNI podría ser re-transportado al RE. Todos los análisis previamente descritos sugieren que CNI participa en el complejo COPII en *N. crassa*.

4.4 La compleja organización de los organelos asociados a COPII en *N. crassa*

Este estudio proporciona evidencias que demuestran la complejidad que existe en la distribución y organización de los complejos internos de los hongos filamentosos, haciendo principal énfasis en el RE y en las cisternas de Golgi. El análisis de la distribución subcelular de CNI y su posible participación en el complejo COPII llevó a considerar otros puntos muy importantes a lo largo de este trabajo, como las diferencias en organización y dinámica funcional de las distintas regiones observadas del RE, la posible interconexión entre las diferentes secciones del RE, la probable existencia de ERES y la interacción entre CNI y las distintas proteínas marcadoras utilizadas en este estudio. En estudios previos se menciona que el RE es el organelo más extenso en la mayoría de las células y que es en realidad un conjunto de varios dominios de membrana distintos capaces de ejecutar diversas funciones celulares estando asociado a mitocondrias, membrana celular, membrana nuclear, peroxisomas y a ERES para la exportación del material celular al Golgi (Lynes y Simmen, 2011), esto podría explicar el cómo CNI puede localizarse en diferentes secciones del RE, ya que por ser una proteína transmembranal debe ser sintetizada en el RE y conforme madura este sistema de endomembranas CNI es transportado hasta su sitio activo, situado en las regiones de formación de vesículas derivadas del complejo COPII, donde podría cumplir el papel de adaptador cargo como ocurre en otros organismos modelo.

Es evidente que aún queda mucho por descubrir sobre el tema en cuestión, por lo que se considera de suma importancia recurrir a técnicas más avanzadas para la visualización y determinación de la naturaleza de estos compartimentos. Por ejemplo existen estudios donde se analizó el complejo COPI en células de *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga con un diámetro de aproximadamente 10 μm , mediante análisis de tomografía crioelectrónica de alta resolución y se logró observar a gran detalle a todos los compartimentos involucrados en este complejo (Bykov et al., 2017).

4.5 Perspectivas

- Determinar la carga putativa de CNI y su papel en *N. crassa*.
- Analizar la relación entre CNI y las cisternas de Golgi tardío.
- Comprobar la presencia de ERES en *N. crassa*.

- Analizar la co-localización e interacción entre CSE-7 y los marcadores putativos de COPII generados en este estudio.
- Analizar la interacción entre CNI y los marcadores putativos de COPII generados en este estudio.
- Evaluar la posible co-localización e interacción entre CNI y el homólogo en *N. crassa* a la isoforma Lst1p de *S. cerevisiae*.

Capítulo 5. Conclusiones

La eliminación parcial del gen *cni* exhibió un fenotipo severo con respecto al desarrollo y mantenimiento de las hifas, además la delección total de este gen demostró un efecto letal en germínulas, por ello se concluye que el producto del gen *cni* es esencial para *N. crassa*.

Con base en los distintos ensayos de co-expresión analizados se propone que la proteína CNI se localiza en diversas secciones del RE y en equivalentes de Golgi, además se sugiere su participación en el complejo COPII de este hongo filamentoso.

Este trabajo aporta nueva información respecto al análisis de receptores de proteínas cargo de los hongos filamentosos, sentando las bases en la investigación de las proteínas pertenecientes a la familia Cornichon/Erv14 de estos hongos.

Literatura citada

- Adler, J., Parmryd, I. 2010. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A*. 77(8): 733 – 742.
- Aguilar-Romero, A. 2017. Identificación de cuerpos multivesiculares en *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada. Baja California, México. pp 1 – 2.
- Allan, B. B., Moyer, B., Balch, W. E. 2000. Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science*. 289: 444 – 448.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*. 3(6): 531 – 537.
- Appenzeller-Herzog, C., Hauri, H. P. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): In search of its identity and function. *J Cell Sci*. 119(11): 2173 – 2183.
- Barlowe, C. K., d'Enfert, C., Schekman, R. 1993. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 268(2): 873 – 879.
- Barlowe, C. K., Miller, E. A. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. 193: 383 – 410.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153(1-2), 46-57.
- Bartnicki-Garcia, S. 1996. The hypha: Unifying thread of the fungal kingdom. En: *A Century of Mycology*. Cambridge Univ. Press, UK. pp. 105 – 133.
- Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., Warren, G. 2005. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem*. 280: 25840 – 25848.
- Brandizzi, F., Barlowe, C. 2013. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 14(6): 382 – 392.
- Bolte, S., Cordelières, F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 224(Pt3): 213 – 232.
- Bonifacino, J. S. 2014. Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Bio*. 204(1): 7 – 17.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A., Martínez-Menàrguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A., Luini, A. 1998. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*. 97(7): 993 – 1003.
- Bourett, T. M., James, S. W., Howard, R. J. 2007. The endomembrane system of the fungal cell. *The Mycota*. Vol. VIII. pp. 1 – 47.
- Bowman, B. J., Draskovic, M., Freitag, M., Bowman, E. J. 2009. Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 8(12) 1845 – 1855.

- Bykov, Y. S., Schaffer, M., Dodonova, S. O., Albert, S., Plitzko, J. M., Baumeister, W., Engel, B. D., Briggs, J. A. 2017. The structure of the COPI coat determined within the cell. *Elife*. pii: e32493.
- Cole, R. A., Fowler, J. E. 2006. Polarized growth: maintaining focus on the tip. *Curr Opin Plant Biol*. 9(6): 579 – 588.
- Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., Lockett, S. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys*. 86(6): 3993 – 4003.
- Curtis, H., Barnes, A., Flores, G. 2008. *Curtis Biología*. 7^{ma} Edición. Panamericana Buenos Aires.
- d'Enfert, C., Wuestehube, L. J., Lila, T., Schekman, R. 1991. Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J Cell Biol*. 114(4): 663 – 670.
- Deacon, J. 2006. *Fungal Biology*. 4th edition. United Kingdom, Blackwell Publishing. pp 4 – 5.
- Dogic, D., Dubois, A., de Chassey, B., Lefkir, Y., Letourneur, F. 2001. ERGIC-53 KKAA signal mediates endoplasmic reticulum retrieval in yeast. *Eur J Cell Biol*. 80(2):151 – 155.
- Dworkin, J. 2009. Cellular polarity in prokaryotic organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1(6): a003368.
- Elazar, Z., Orci, L., Ostermann, J., Amherdt, M., Tanigawa, G., Rothman, J. E. 1994. ADP-ribosylation factor and coatamer couple fusion to vesicle budding. *J Cell Biol*. 124(4): 415 – 424.
- Engel, A., Gaub, H. E. 2008. Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem*. 77: 127 – 148.
- Feyder, S., De Craene, J. O., Bar, S., Bertazzi, D. L., Friant, S. 2015. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci*. 16(1):1509 – 1525.
- Glick, B. S. 2014. Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments. *Bioessays*. 36: 129 – 133.
- Glick, B. S., Elston, T., Oster, G. 1997. A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. *FEBS Lett*. 414(2): 177 – 181.
- Glick, B. S., Luini, A. 2011. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(11): a005215.
- Glick, B. S., Malhotra, V. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*. 95(7): 883 – 889.
- Glick, B. S., Nakano, A. 2009. Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25: 113 – 32.
- Gomez-Navarro, N., Miller, E. 2016. Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J Cell Biol*. 215(6): 769 – 778.
- Gommel, D., Orci, L., Emig, E. M., Hannah, M. J., Ravazzola, M., Nickel, W., et al. 1999. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett*. 447: 179 – 185.

- Gow, N. A. R. 1995. Tip growth and polarity. En: The growing fungus. Chapman and Hall, London, UK. pp. 277 – 299.
- Hernández-González, M., Peñalva, M. A., Pantazopoulou, A. 2015. Conditional inactivation of *Aspergillus nidulans* sarA^{SAR1} uncovers the morphogenetic potential of regulating endoplasmic reticulum (ER) exit. Mol Microbiol. 95(3): 491 – 508.
- Herrera, T., Ulloa, M. 1990. El Reino de los hongos. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S., Schuldiner, M. 2012. A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. PLoS Biol. 10(5): e1001329.
- Hickey, P. C., Swift, S. M., Roca, M. G., Read, N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes. Method Microbiol. 34: 63 – 87.
- Jackson, C. L., Casanova, J. E. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. Trends Cell Biol. 10(2): 60 – 67.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. J Mol Biol. 305: 567 – 580.
- Lee, M. C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., Schekman, R. 2005. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. Cell. 122(4): 605 – 617.
- Levine, T., Rabouille, C. 2005. Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. Curr Opin Cell Biol. 17(4): 362 – 368.
- Li, J., Fuchs, S., Zhang, J., Wellford, S., Schuldiner, M., Wang, X. 2016. An unrecognized function for COPII components in recruiting a viral replication protein to the perinuclear ER. J Cell Sci. 129(19): 3597 – 3608.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Martin K. C. 2016. Molecular Cell Biology. 8th Edition. W. H. Freeman and Company, United States. pp. 631 – 650.
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., Glick, B. S. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. Nature. 441(7096): 1002 – 1006.
- Luini, A. 2011. A brief history of the cisternal progression-maturation model. Cell Logist. 1(1): 6 – 11.
- Lynes, E. M., Simmen, T. 2011. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. Biochim Biophys Acta. 1813(10): 1893 – 1905.
- Markina-Iñárraigui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E. A., Peñalva, M. A. 2013. The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. PLoS One. 8: 1 – 9.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. Cell. 93(2): 263 – 275.
- Matsuoka, K., Schekman, R., Orci, L., Heuser, J. E. 2001. Surface structure of the COPII-coated vesicle. Proc Natl Acad Sci USA. 98(24): 13705 – 13709.

- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K., Nakano, A. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature*. 441(7096): 1007 – 1010.
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. 2003. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. 114(4): 497 – 509.
- Mironov, A. A., Beznoussenko, G. V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H. S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R. S., Fusella, A., Lupetti, P., Berger, E. G., Geerts, W. J., Koster, A. J., Burger, K. M., Luini, A. 2001. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J Cell Biol*. 155(7): 1225 – 1238.
- Montegna, E. A., Bhawe, M., Liu, Y., Bhattacharyya, D., Glick, B. 2012. Sec12 Binds to Sec16 at Transitional ER Sites. *PLoS One*. 7(2): e31156
- Mossessova, E., Blickford, L. C., Goldberg, J. 2003. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*. 114(4): 483 – 95.
- Mowbrey, K., Dacks, J. B. 2009. Evolution and diversity of the Golgi body. *FEBS Lett*. 583(23): 3738 – 3745.
- Nakano, A., Brada, D., Schekman, R. 1988. A membrane glycoprotein Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol*. 107(3): 851 – 863.
- Nakano, A., Luini, A. 2010. Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol*. 22(4): 471 – 478.
- Nakano, A., Muramatsu M. 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 109(6): 2677 – 2691.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(33): 12248 – 12253.
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., Miller, E. A. 2015. Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol*. 25(4): 403 – 412.
- Pantazopoulou, A., Peñalva, M. A. 2009. Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell*. 20(20): 4335 – 4347.
- Pelham, H. R., Rothman, J. E. 2000. The debate about transport in the Golgi—two sides of the same coin?. *Cell*. 102(6): 713 – 709.
- Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C. A., Orlean, P., Albright, C., Rose, M. D., Robbins, P. W., Botstein, D. 1991. Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast*. 7(9): 891 – 911.
- Prinz, W. A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J. A., Silver, P. A., Rapoport, T. A. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 150: 461 – 474.
- Powers J., Barlowe, C. 1998. Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-Vesicle protein related to the *Drosophila cornichon* gene product. *J Cell Biol*. 142(5): 1209 – 1222.

- Powers J., Barlowe, C. 2002. Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell*. 13(3): 880 – 891.
- Rabouille, C., Klumperman, J. 2005. Opinion: the maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(10): 812 – 817.
- Rico-Ramírez A. M., Roberson R. W., Riquelme M. 2018. Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. 117: 30 – 42.
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., Freitag, M. 2014. The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol Biol Cell*. 25(8): 1312 – 1326.
- Riquelme, M., Martinez-Nuñez, L. 2016. Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: a model organism for all seasons. *F1000Res*. 5:2801.
- Riquelme, M., Roberson, R., McDaniel, D., Bartnicki-Garcia, S. 2002. The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. 37(2): 171 – 179.
- Roman-Fernandez, A., Bryant, D. M. 2016. Complex polarity: Building multicellular tissues through apical membrane traffic. *Traffic*. 17(12): 1244 – 1261.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermannova, O., Sychrova, H., Pantoja, O. 2015. Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *J Exp Bot*. 66(9): 2733 – 2748.
- Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrová, H., Pantoja, O. 2016. Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta*. 1858(1): 67 – 74.
- Sánchez-León E., Bowman B., Seidel C., Fischer R., Novick P., Riquelme M. 2015. The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*. 95(3): 472 – 490.
- Sánchez-León, E., Riquelme, M., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R., Bartnicki-García, S. 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. *Eukaryot Cell*. 10: 683 – 695.
- Sato, K., Nakano, A. 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett*. 581(11): 2076 – 2082.
- Scales, S. J., Gomez, M., Kreis, T. E. 2000. Coat proteins regulating membrane traffic. *Int Rev Cytol*. 195: 67 – 144.
- Shandala, T., Kakavanos-Plew R., Ng Y. S., Bader, C., Sorvina, A., Parkinson-Lawrence E. J., Brooks, R. D., Borlace, G. N., Prodoehl, M. J., Brooks, D. A. 2012. Molecular machinery regulating exocytosis. School of Pharmacy and Medical Sciences, Sansom Institute for Health Research, University of South Australia, Australia.

- Shivas, J. M., Morrison, H. A., Bilder, D., Skop, A. R. 2010. Polarity and endocytosis: Reciprocal regulation. *Trends Cell Biol.* 20(8): 445 – 452.
- Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R., Freitag, M. 2011. Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Mol Cell Biol*, 31(12): 2528 – 2542.
- Solomon, B., Ville, C. 1998. *Biología De Ville*. (4^{ta} ed.). Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Starr, T. L., Gonçalves A. P., Meshgin N., Glass N. L. 2018. The major cellulases CBH-1 and CBH-2 of *Neurospora crassa* rely on distinct ER cargo adaptors for efficient ER-exit. *Mol Microbiol.* 107(2): 229 – 248.
- Strating, J. R., Hafmans T. G., Martens G. J. 2009. COP-binding sites in p24 δ_2 are necessary for proper secretory cargo biosynthesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 41: 1619 – 1627.
- Suda, Y., Nakano, A. 2012. The yeast Golgi apparatus. *Traffic.* 13(4): 505 – 510.
- Trinci A. P., Collinge A. 1973. Influence of L-sorbose on the growth and morphology of *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol.* 78(1): 179 – 192.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia S., Riquelme, M. 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 74(5): 1044 – 1053.
- Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull.* 13: 2 – 43.
- Volchuk, A., Amherdt, M., Ravazzola, M., Brügger, B., Rivera, V. M., Clackson, T., Perrelet, A., Söllner, T. H., Rothman, J. E., Orci, L. 2000. Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell.* 102(3): 335 – 348.
- Watanabe, R., Riezman, H. 2004. Differential ER exit in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4): 350 – 355.
- Westergaard, M., Mitchell H. K. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer J Bot.* 34: 573 – 577.
- Wooding, S., Pelham, H. R. B. 1998. The dynamics of golgi protein traffic visualized in living yeast cells. *Mol Biol Cell.* 9(9): 2667 – 2680.
- Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Oliveira, C. N., Campos, C., Santa Cruz Damineli, D., Carvalho, J. C., Lima, P. T., Pantoja, O., Feijó, J. A. 2018. CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science.* 360(6388): 533 – 536.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science.* 259(5100): 1466 – 1468.
- Yotimitsu, T., Sato, K. 2012. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell.* 23(15): 2930 – 2942.

Anexos

Medios de cultivo y suplementos

Medio Mínimo de Vogel (MMV)

- Sales de Vogel* (1X)
- Sacarosa 15 g/L
- Agar 15 g/L
- Agua desionizada

*Sales de Vogel 50X (100 mL): 12.35 g de Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de Fosfato de Potasio Monohidratado (KH_2PO_4), 10 g de Nitrato de Amonio (NH_4NO_3), 0.49 g de Sulfato de Magnesio Anhidro (MgSO_4) 0.38g de Cloruro de Calcio Anhidro (CaCl_2), 500 μL de elementos traza y 250 μL de solución de Biotina (0.1 mg/mL).

Medio Completo de Vogel (MCV)

- Sales de Vogel (1X)
- Sacarosa 15 g/L
- Extracto de levadura 0.5%
- Casaminoácidos 0.5%
- Agua desionizada

Medio Fructosa-Glucosa-Sorbosa (FGS)

- Agar bacteriológico 1%
- Solución FGS (1X)
- Agua desionizada

*Solución FGS (10X): Fructosa 0.5%, Glucosa 0.5%, Sorbosa 20%. Esterilizado por filtración.

Medio Sintético de Cruzas (MSC)

- Medio SC stock* (1X)
- Sacarosa 2%
- Agua desionizada

*Medio SC stock 5X (1 L): 5 g KNO_3 , 3.5 g K_2HPO_4 , 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NaCl , 0.5 g CaCl_2 , 25 mg Biotina, 0.5 mL elementos traza, agua destilada. Mantener a 4°C.

Medio de Caldo Lisogénico (LB):

- Triptona o Peptona 1%
- Extracto de levadura 0.5%
- Cloruro de Sodio 0.5%
- Hidróxido de Sodio 1mM
- Agar bacteriológico 1.4%
- Agua desionizada

KCM (5X)

- KCl 100 mM
- CaCl₂ 30 mM
- MgCl₂ mM
- Agua desionizada

Esterilizado por filtración, mantenimiento a 4°C.

Videos suplementarios

Video 1. Distribución subcelular de CNI-GFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 2. Co-expresión de CNI-GFP y dsRED-NCA-1 en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 3. Co-expresión de CNI-GFP y CSE-7-mChFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 4. Co-expresión de CNI-GFP y mChFP-YPT-1 en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 5. Co-expresión de CNI-mChFP y USO-1-GFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 6. Distribución subcelular de SEC-16-GFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 7. Distribución subcelular de SEC-24-mChFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 8. Co-expresión de SEC-16-GFP y dsRED-NCA-1 en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 9. Co-expresión de SEC-16-GFP y SEC-24-mChFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 10. Co-expresión de CNI-GFP y SEC-24-mChFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 11. Co-expresión de CNI-mChFP y SEC-16-GFP en hifas de *N. crassa*. Barra de escala: 10 µm.

Video 12. Co-expresión de CNI-GFP y mChFP-YPT-1 en hifas de *N. crassa* bajo el efecto de brefeldina A. Barra de escala: 10 µm.