

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



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

**Identificación y caracterización de las cargas intracelulares
asociadas a la miosina de clase V en el hongo filamentoso
*Neurospora crassa***

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

Presenta:

Arianne Ramírez del Villar

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Arianne Ramírez del Villar

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Directora de tesis

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Robert Wayne Roberson



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Arianne Ramírez del Villar © 2019

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

Resumen de la tesis que presenta **Ariane Ramírez del Villar** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Identificación y caracterización de las cargas intracelulares asociadas a la miosina de clase V en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Directora de tesis

El crecimiento apical polarizado es una característica fundamental de los hongos filamentosos, donde el movimiento de vesículas secretoras se realiza con ayuda de proteínas motoras a través del citoesqueleto de actina y microtubular. Específicamente, las miosinas de clase V son motores moleculares asociados a actina encargadas del transporte de cargas intracelulares en diferentes organismos. La asociación con la carga es mediada por la unión a adaptadores específicos. En *Neurospora crassa* existe solo una miosina de clase V (MYO-5) pero aún no queda claro las cargas que transporta, su dinámica y posible función en la morfogénesis de las hifas. Para identificar los adaptadores asociados con MYO-5, se hizo un ensayo de CoIP con anticuerpos anti-GFP utilizando la cepa MYO-5-GFP. Las proteínas aisladas fueron identificadas por espectrometría de masas y los adaptadores fueron seleccionados por análisis bioinformático, modelaje estructural y acoplamiento molecular. Las proteínas SNA-10 y RBA-1 fueron seleccionadas y se analizaron *in silico* para corroborar su asociación con MYO-5. Encontramos que la unión con estos adaptadores producía una gran estabilidad estructural en el dominio globular de la cola (GTD) de MYO-5, sugiriendo que SNA-10 y RBA-1 podrían estar asociados a MYO-5. El marcaje de los adaptadores con GFP para corroborar su asociación *in vivo*, afectó el desarrollo normal de las hifas. Para determinar la importancia del GTD de MYO-5 en la morfología de las hifas, generamos una versión truncada del GTD completo y una versión donde eliminamos el subdominio II en el GTD, y se analizó la localización de MYO-5. A diferencia de lo reportado, la morfología fue normal y la localización distinta en las hifas. Esto podría deberse a que el casete con el que se transformó pudo integrarse en otro sitio. Para conocer el comportamiento dinámico de MYO-5 con mayor detalle, analizamos las partículas individuales por TIRFM. Las partículas de MYO-5-GFP eran de distintos tamaños y la mayor parte del tiempo no se movían. Cuando se movían mantenían una velocidad de $1.08 \mu\text{m s}^{-1}$, aunque podían alcanzar velocidades de hasta $2.7 \mu\text{m s}^{-1}$ y el movimiento podía ser anterógrado o retrogrado. La velocidad de desplazamiento de MYO-5 sugiere que se trata de un motor no procesivo, que podría requerir de más de MYO-5 para transportar las cargas. Debido al efecto, previamente reportado, que la ausencia del gen completo *myo-5* producía en la morfología de las hifas, observamos la localización y dinámica del citoesqueleto de actina. En la mutante $\Delta\text{myo-5}$, la actina estaba desorganizada en el ápice y el subápice. Observamos cables de actina gruesos en el citoplasma que parecían no perder su forma y se observó un collar endocítico subapical anormal. En los septos se observó que le tomaba más tiempo completar la formación del septo y que la actina llegaba al sitio de septación mucho antes que en la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que MYO-5 transporta adaptadores asociados con vacuolas y probablemente con ARNm, y desempeña un papel importante en la organización apical que mantiene la morfogénesis y el crecimiento.

Palabras clave: Adaptadores, miosina, cargas, actina

Abstract of the thesis presented by **Ariane Ramírez del Villar** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology

Identification and characterization of intracellular cargoes associated to class V myosin in the filamentous fungi *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Thesis Director

Polarized apical growth is a fundamental characteristic of filamentous fungi. It implies the movement of secretory vesicles, which occurs with the help of motor proteins through the actin and microtubule cytoskeleton. Specifically, class V myosins are molecular motors associated with actin responsible for transporting intracellular cargoes in different organisms. Association with the cargo is mediated by binding to specific adapters. In *Neurospora crassa* there is only one class V myosin (MYO-5) but it is still unclear the cargoes it transports, as well as its dynamics and function in the morphogenesis of the hyphae. To identify the adapters associated with MYO-5, a CoIP assay with anti-GFP antibodies using strain MYO-5-GFP were performed. The isolated proteins were identified by mass spectrometry and the adapters were selected by bioinformatic analysis, structural modeling and molecular docking. The proteins SNA-10 and RBA-1 were selected and analyzed *in silico* to corroborate their association with MYO-5. We found that the binding with these adapters produced a great structural stability in the globular tail domain (GTD) in MYO-5, suggesting that SNA-10 and RBA-1 could be associated with MYO-5. The labeling with GFP of these adapters to corroborate their association *in vivo*, affected the normal development of the hyphae. To determine the importance of the GTD in MYO-5 in the hyphal morphology, we generated a truncated version of the complete GTD and a version where the subdomain II of the GTD was eliminated, and analyzed the location of MYO-5. Unlike what has been previously reported, the morphology in the mutants was normal and the MYO-5 location different in the hyphae. This could be due to the fact that the cassette with which it was transformed could have been integrated in another site. To know the dynamic behavior of MYO-5 in better detail, we analyzed the individual particles by TIRFM. The MYO-5-GFP particles were of different sizes and most of the time they did not move. When they moved, maintained a speed of $1.08 \mu\text{m s}^{-1}$, although they could reach speeds of up to $2.7 \mu\text{m s}^{-1}$ and the movement could be anterograde or retrograde. The travel speed of MYO-5 suggests that it is a non-processive motor, which could require more than one MYO-5 to transport the cargoes. Due to the effect of absence of the complete *myo-5* gene, previously reported, produced in the morphology of the hyphae, we observed the location and dynamics of the actin cytoskeleton. In mutant $\Delta\text{myo-5}$, actin was disorganized at the apex and subapex. We observed thick actin cables in the cytoplasm that did not show changes in the shape and an abnormal subapical endocytic collar was observed. Also, we observed that it took longer to complete the formation of the septum and that the actin appears in the septation site much earlier than in the wild-type strain. These results suggest that MYO-5 transports adapters associated with vacuoles and probably with mRNA, and plays an important role in the apical organization that maintains morphogenesis and growth.

Keywords: Adapters, myosin, cargoes, actin

Dedicatoria

A los amores de mi vida: mi hermosa angelita Valeria y a mi amor Carlos.

A mi maravillosa madre Rosy y a mis hermanos Mauri y Beto.

Los amo ❤️

A mí misma por lograrlo 💪

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada. Al **DFG-CONACyT** 75306 por el financiamiento del proyecto. Al **CICESE** y al **Departamento de Microbiología** por permitirme llevar clases y realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones. Al **LNMA** por permitirme utilizar los microscopios para realizar mi trabajo.

A la **Dra. Olga Callejas-Negrete**, **Dra. Meritxell Riquelme** y al **Dr. Robert W. Roberson**, miembros de mi comité de tesis doctoral, por su disponibilidad y aportaciones durante la dirección y realización del proyecto.

A mi directora de tesis la **Dra. Rosa Mouriño** por su apoyo, tiempo (aunque a veces no me hacía caso) y paciencia en todos estos años de trabajo. También le agradezco porque siempre creyó en mi trabajo y me llevó a congresos que fueron muy enriquecedores.

A la **Dra. Riquelme** y al **Dr. Sánchez-León** por proporcionarnos la cepa MYO-5-GFP. Al **Dr. Roberson** por apoyarme con las imágenes de TEM. A la **Dra. Louise Glass** por su amabilidad y disponibilidad al recibirme en su laboratorio y en su casa. Al **Dr. Pedro Gonçalves** por sus conocimientos y por apoyarme con la elaboración de las cepas de las versiones truncadas. Al **M. en C. Joel Ricci** por su apoyo y conocimientos aportados para la realización de la parte de SDM. Al **FGSC** por proporcionarme la cepa mutante.

A la **Dra. Callejas** por su amabilidad, tiempo y dedicación para ayudarme a resolver dudas y guiarme en el laboratorio. Al personal del laboratorio de Microbiología **Guillermo González**, **Melissa Corral** y **Diego Delgado** por su apoyo en el laboratorio. A **Adriana Mejía** por su disposición de ayudar, por ser amable, muy eficiente y atenta.

A mi **mamá**, porque siempre cree en mí y en lo que hago. Le agradezco por todo su amor y el ejemplo de fuerza que me ha dado el ánimo para seguir adelante, para querer ser mejor persona. Es un honor ser su hija, jamás podré agradecer todo lo que me has dado.

A mis hermanos **Beto** y **Mauri** por siempre animarme a continuar, a no rendirme. A los **padres de Carlos (Ángeles y Juan Carlos)** por su ayuda en todo momento. A **Alan**, **Grace** y **Christian** por sus palabras de apoyo en todo momento. A mi **Tía Angélica** porque cree en mí y aunque este lejos siempre me ha apoyado.

A **Carlos**, por ser mi compañero de vida. Por estar cuando más lo necesitó, por aconsejarme (aunque a veces sea muy crudo), por no dejarme caer, por creer y sentirse orgulloso de mí. Porque me ama y comparte los momentos buenos, malos y muy malos. Te amo y admiro mucho.

A **Michel** porque después de tantos años siempre está a mi lado apoyándome, ayudándome, aconsejándome y preocupándose por mí. A **Anayatzin** por siempre escucharme, por estar en los momentos buenos y malos y, porque la distancia no impide que seamos amigas.

A las personas que se convirtieron en más que compañeros de laboratorio y con los que espero compartir muchos momentos el resto de mi vida. A **Fausto** por su apoyo y consejos, en momentos de diversión y estrés. A **Adria** porque a pesar de la distancia es una verdadera amiga que siempre se preocupa por mí, me apoya en todo momento y le agradezco por sus consejos en el laboratorio. A **Lucía** por su amistad, por ayudarme siempre y aconsejarme sabiamente. A **Lluis**, por ser mi gran amiga/ compañera de risas y lágrimas en este largo camino. A **Yesenia** por su amistad y todos los conocimientos acerca de cuyitos. A **Scarlett** por su amistad y apoyo.

Al grupo **LLA** porque puedo contar con ustedes en todo momento, por todos sus consejos, por darme tanta fuerza en los momentos buenos y malos, lo quiero mucho. A **Leobardo** y **Lolis** por ser buenos amigos, por sus consejos y por escucharme siempre. A **Paty** por ser siempre tan linda, amable y escucharme. A **Iván** y **Héctor**, por su apoyo y amistad.

A mis **compañeros del grupo Mouriño** por todo su apoyo y consejos. A **Alejandra** por los buenos momentos y su disposición a ayudarme en el laboratorio. A **Nora** por su amabilidad y apoyo en el laboratorio.

A todas las personas que siempre creyeron en mí, aun cuando yo no lo hacía, por estar siempre que necesitaba un consejo, por hacerme reír, por su amistad.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	VI
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Crecimiento polarizado.....	1
1.1.2 Citoesqueleto microtubular y citoesqueleto de actina.....	1
1.1.3 Motores moleculares.....	2
1.1.4 Miosinas.....	3
1.1.5 Estructura general de las miosinas.....	3
1.1.5.1 Región de la cabeza.....	4
1.1.5.2 Región del cuello.....	6
1.1.5.3 Región de la cola.....	6
1.1.6 Miosinas de clase V.....	7
1.1.6.1 Estructura de las miosinas de clase V.....	8
1.1.6.2 Función de las miosinas de clase V.....	9
1.1.6.3 Localización de las miosinas de clase V en diversos organismos.....	11
1.2 Justificación.....	12
1.3 Hipótesis.....	13
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo general.....	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	14
2.1.1 Medios y condiciones de cultivo para <i>N. crassa</i>	15
2.1.1.1 Obtención de conidios.....	15
2.1.1.2 Crecimiento de micelio y cosecha.....	15
2.1.1.3 Cruzas genéticas.....	16
2.1.1.4 Tasa de crecimiento radial.....	17
2.2 Métodos moleculares.....	17
2.2.1 Oligonucleótidos y vectores.....	17
2.2.2 Extracción de DNA genómico.....	19
2.2.3 Etiquetado de proteínas.....	19
2.2.3.1 Clonación de los genes <i>sna-10</i> y <i>rba-1</i> en los vectores FJ457006 y FJ457002.....	19
2.2.3.2 Generación de versiones truncadas del gen <i>myo-5</i>	23
2.2.4 Transformación de conidios de <i>N. crassa</i> por electroporación.....	25
2.3 Microscopía.....	25
2.3.1 Microscopía confocal.....	25

2.3.2	Técnica de FRAP	27
2.3.3	Microscopía TIRF	27
2.3.4	Colorantes utilizados.....	28
2.3.5	Microscopía Electrónica de Transmisión	28
2.4	Co-inmunoprecipitación.....	28
2.4.1	Extracción de proteínas totales	28
2.4.2	Western blot	29
2.4.3	Co-Inmunoprecipitación con perlas magnéticas.....	30
2.4.4	Espectrometría de masas.....	32
2.5	Acoplamiento molecular del GTD de MYO-5 y los adaptadores.....	32
2.5.1	Análisis bioinformático.....	32
2.5.2	Modelaje y preparación de las proteínas.....	32
2.5.3	Simulación del acoplamiento proteína-proteína	33
2.5.4	Reevaluación MM/GBSA de los complejos MYO-5/adaptador.....	33
2.5.5	Selección de los modelos de acoplamiento proteína-proteína	34
2.5.6	Dinámica molecular de los modelos estructurales	35
2.5.6.1	Minimización, Simulated annealing y Equilibrado.....	35
2.5.6.2	Simulación de Dinámica molecular.....	36
2.5.6.3	Análisis de las trayectorias de la dinámica molecular	36
2.5.6.4	Análisis de los componentes principales del GTD de MYO-5	37
2.5.6.5	Dinámica in vivo de los acopladores y MYO-5.....	37
Capítulo 3. Resultados	39
3.1	Proteínas asociadas a MYO-5.....	39
3.1.1	Co-IP de la proteína MYO-5	39
3.2	Simulación de acoplamiento molecular entre el dominio GTD de MYO-5 y los adaptadores.....	41
3.2.1	Modelaje estructural del dominio GTD de MYO-5 y los adaptadores	41
3.2.2	Acoplamiento molecular entre MYO-5 y los adaptadores.....	43
3.2.3	Simulación de dinámica molecular del modelo estructural del GTD de MYO-5.....	51
3.2.4	Simulación de dinámica molecular de las conformaciones de acoplamiento MYO-5/SNA-10 y MYO-5/RBA-1	53
3.3	Dinámica in vivo de las proteínas SNA-10 y RBA-1 en ausencia de la proteína MYO-5.....	55
3.4	Versiones truncadas del GTD de MYO-5 etiquetadas con GFP	57
3.5	Dinámica de la miosina de clase V	59
3.6	MYO-5 en la organización del Spitzenkörper y los septos	62
3.6.1	Organización del Spitzenkörper en la mutante $\Delta myo-5$	62
3.6.2	Organización de los septos en la mutante $\Delta myo-5$	64
3.7	El citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta myo-5$	65
Capítulo 4. Discusión	71
4.1	La estructura tridimensional del GTD de MYO-5 es similar a la de Myo2p pero no Myo4p de <i>S. cerevisiae</i>	71
4.2	El modelo estructural del GTD de MYO-5 se estabiliza en presencia de los adaptadores	72
4.3	Adaptadores asociados al GTD de MYO-5.....	72
4.4	Inhibición de la actividad de MYO-5	75
4.5	MYO-5 ^{$\Delta 1229$} -GFP y MYO-5 ^{$\Delta 1436$} -GFP se localizan a lo largo de toda la hifa.....	75

4.6 MYO-5 se mueve a distintas velocidad y direcciones en las hifas	76
4.7 El Spk está desorganizado en la mutante $\Delta myo-5$	76
4.8 MYO-5 participa en la selección del sitio de formación del septo	77
4.9 La organización del citoesqueleto de actina la mutante $\Delta myo-5$ está afectado	77
Capítulo 5. Conclusión	79
Literatura citada	80
Anexos	92

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura general de la miosina de clase V.....	4
2	Representación esquemática del procedimiento para la medición de la tasa de crecimiento radial.....	17
3	Amplificación del ORF del gen <i>sna-10</i> y <i>rba-1</i>	21
4	Esquema de los vectores recombinantes pRM-89-AV y pRM-88-AV linearizados.....	22
5	Digestión con enzimas de digestión para la corroboración de la integración de los insertos.....	23
6	Esquema de las construcciones de cada una de las versiones truncadas del gen <i>myo-5</i> etiquetado con GFP.....	24
7	Esquema del método de bloque de agar invertido.....	26
8	Detección de la MYO-5-GFP y GFP citoplasmática por Western blot.....	31
9	Modelo estructural del dominio globular de la cola de la proteína MYO-5.....	42
10	Estructura de la proteína con NCU08316.....	43
11	Modelo estructural de la proteína SNA-10 (NCU00242) asociada al GTD de MYO-5....	45
12	Modelo estructural de la proteína RCM-1 (NCU06842) asociada al GTD de MYO-5....	46
13	Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU04075 interactuando con el GTD de MYO-5.....	47
14	Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU06743 interactuando con el GTD de MYO-5.....	48
15	Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU09269 interactuando con el GTD de MYO-5.....	49
16	Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU07574 interactuando con el GTD de MYO-5.....	50
17	Modelo estructural de la proteína RBA-1 (NCU06459) interactuando con el GTD de MYO-5.....	51
18	Análisis por RMSD y RMSF del GTD de MYO-5. A) RMSD de los carbonos α ($C\alpha$) del GTD de MYO-5.....	52
19	Representación esquemática la trayectoria del GTD de MYO-5 durante la simulación de dinámica molecular.....	53
20	Análisis de RMSD y RMSF de GTD de MYO-5 asociado a los adaptadores SNA-1 y RBA-1.....	54

21	Localización de SNA-10-GFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	55
22	Localización en las hifas y crecimiento radial de la cepa GFP-RBA-1.....	56
23	Ensayo de inhibición de la miosina de clase V en hifas de la cepa MYO-5-GFP tratadas con PBP.....	57
24	Imágenes en microscopía confocal de la localización de MYO-5 en las cepas truncadas MYO-5 ^{Δ1229} -GFP y MYO-5 ^{Δ1436} -GFP.....	58
25	Análisis de la dinámica de MYO-5-GFP por TIRFM.....	60
26	Análisis de la velocidad de las partículas de MYO-5-GFP.....	61
27	Organización del ápice en la cepa silvestre y la mutante $\Delta myo-5$	62
28	Localización de la CHS-1-GFP en conidios, germínulas e hifas maduras de la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$	63
29	Formación del septo en las cepas WT y la mutante $\Delta myo-5$	64
30	Reconstrucción en 3D de conidios y germínulas de WT (panel superior) y la mutante $\Delta myo-5$ (panel inferior) mostrando cables de actina y parches marcados con Lifeact-GFP.....	65
31	Citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta myo-5$	66
32	TPM-1-GFP en hifas maduras de la mutante $\Delta myo-5$	67
33	Análisis de FRAP de Lifeact-GFP en la punta de hifas mutantes de $\Delta myo-5$	68
34	Serie de tiempo del experimento de FRAP de TPM-1-GFP en el ápice de las hifas....	69
35	Localización de la FIM-1-GFP en hifas maduras de la mutante $\Delta myo-5$	70

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Diversas funciones de las miosinas.....	7
2	Diferentes funciones de la miosina de clase V.....	10
3	Cepas utilizadas.....	14
4	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	18
5	Vectores utilizados en este estudio.....	18
6	Descripción de MYO-5 y de los adaptadores de interés asociados a MYO-5 obtenidos por secuenciación.....	40
7	Análisis de los sitios de interacción entre el GTD de MYO-5 y los adaptadores.....	44

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Crecimiento polarizado

La característica principal de los hongos filamentosos es el crecimiento apical polarizado, dando a las hifas la apariencia típica de un cilindro con una punta en forma hemisferoidal (Gierz y Bartnicki-García, 2001; Kossen, 2000). Existen varios modelos que intentan explicar cómo se genera la morfología de la hifa, dentro de los que se encuentra el modelo hifoide o del Centro Suministrador de Vesículas (VSC por sus siglas en inglés *Vesicle Supply Center*) (Bartnicki-García et al., 1989; Bartnicki-García et al., 1990). Este modelo sugiere que la forma y tamaño de la hifa es generada por el desplazamiento lineal de un VSC, localizado en el centro del domo apical y que corresponde a la ubicación del Spitzenkörper (Spk) en una hifa real (Bartnicki-García et al., 1995).

Se ha especulado que las vesículas que son transportadas hacia el VSC y luego exocitadas contienen enzimas o precursores necesarios para la formación de nueva pared celular, como las quitina sintasas (localizadas dentro de los quitosomas) que participan en la formación de microfibrillas de quitina, o las glucano sintasas encargadas de sintetizar polímeros de glucano (Bartnicki-García, 2002; Ruiz-Herrera et al., 1984; Verdín et al., 2009). Además, se cree que éste transporte intracelular de vesículas secretoras hacia el VSC es dirigido por proteínas motoras que se mueven a través del citoesqueleto de microtúbulos y de actina (Harris y Tepass, 2010; Horio y Oakley, 2004; Loubéry y Coudrier, 2008; Reck-Peterson et al., 2000; Torralba y Heath, 2002; Wu et al., 1998).

1.1.2 Citoesqueleto microtubular y citoesqueleto de actina

Los microtúbulos son tubos proteicos huecos de aproximadamente 25 nm de diámetro compuestos de un solo tipo de proteína globular, la tubulina (Alberts y Bray, 2006; Cooper y Hausman, 2000). La tubulina es un dímero que consta de dos polipéptidos de 55 kD cercanamente relacionados denominados α -tubulina y β -tubulina, que están unidas entre sí por enlaces no covalentes (Alberts y Bray, 2006). La α - y β -tubulina se polimerizan para formar la pared del microtúbulo que consiste en 13 protofilamentos paralelos, cada uno de los cuales tiene una polaridad estructural con dos terminaciones distintas: un extremo positivo y otro negativo. El extremo positivo es de rápido crecimiento y presuntamente corresponde a la β -tubulina, mientras que el extremo negativo

corresponde a la α -tubulina y es el de crecimiento lento (Alberts y Bray, 2006; Cooper y Hausman, 2000).

Por otra parte, el citoesqueleto de actina está formado por G-actina, una proteína globular constituida por 370 residuos y un peso molecular de 42 kDa aproximadamente (varía entre especies) (Collins y Elzinga, 1975). Está formada por un dominio grande y uno pequeño, separados por una hendidura formada de hélices-alfa en donde se sitúa el sitio de unión a ATP (Elzinga et al., 1973). La actina monomérica se une para formar filamentos delgados y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y de varios micrómetros de largo (Cooper y Hausman, 2000). Los filamentos de actina tienen dos extremos: un extremo positivo, en donde predomina la polimerización de actina; y un extremo negativo, donde ocurre la despolimerización. Para que ocurra la polimerización de actina se requiere de la unión a ATP, que después será hidrolizada liberando Pi y resultando en actina unida a ADP (Pollard et al., 2016). Los filamentos de actina pueden formar tres clases de estructuras en la mayoría de los eucariotas: cables, parches y anillos contráctiles de actomiosina (Alberts y Bray, 2006; Berepiki et al., 2010; Delgado-Álvarez et al., 2010; Mulholland et al., 1994; Noguchi et al., 2001). Estas estructuras de actina participan en una variedad de funciones como la citocinesis, formación del septo, tráfico vesicular, endocitosis, exocitosis y motilidad celular, resultando ser una proteína esencial para las células (Alberts y Bray, 2006; Cooper y Hausman, 2000).

1.1.3 Motores moleculares

El movimiento y transporte de vesículas secretoras, organelos y complejos de proteínas es un proceso que resulta esencial en las células y es impulsado por motores moleculares. Las cinesinas y dineína son proteínas motoras que viajan a través de los microtúbulos, y las miosinas son motores moleculares involucrados en el transporte de cargas a lo largo del citoesqueleto de actina (Ross et al., 2008). Tanto la vía exocítica como endocítica requieren que las cargas vesiculares se muevan a través del citoesqueleto de actina y microtúbulos. En un modelo ideal, los microtúbulos se originan en un centro organizador cercano al núcleo y sus extremos positivos se dirigen hacia la periferia celular. De este modo, las cargas son transportadas por las cinesinas que se desplazan hacia la corteza celular en donde alcanzan a la red de actina cortical y transfieren la carga a la miosina para que la entregue a la membrana celular (Ross et al., 2008). En la ruta contraria, la vía endocítica, las vesículas serían transportadas por las miosinas que se localizan en la actina cortical y después ser entregadas a la dineína, que se mueve hacia el extremo negativo de los microtúbulos (Ross et al., 2008). El cambio de motores y pistas durante el transporte de cargas intracelulares se ha observado *in vivo* para los

melanosomas (Kural et al., 2007), peroxisomas (Kural et al., 2005), vesículas (Snider et al., 2004) en mamíferos y puntos cuánticos endocitados (Nan et al., 2005). Sin embargo, aún se desconoce cómo es que estas proteínas motoras trabajan coordinadamente para asegurar que las cargas intracelulares lleguen a su destino.

1.1.4 Miosinas

Las miosinas son una superfamilia de proteínas motoras que utilizan la hidrólisis del ATP para poder desplazarse de manera continua a través de filamentos de actina (Loubéry y Coudrier, 2008; Reck-Peterson et al., 2000; Sellers, 1999; Wu et al., 1998). Participan en la citocinesis, el crecimiento, mantenimiento de la forma celular, contracción muscular, transporte de cargas intracelulares, entre otros (Geeves y Holmes, 2005; Scholey et al., 2003; Vale, 2003; Yumura y Uyeda, 2003). Actualmente, las miosinas se han agrupado en 35 clases con un número variable de miembros (Odrionitz y Kollmar, 2007). Sin embargo, solo algunas clases han sido caracterizadas a nivel estructural, molecular y celular. Con excepción de la miosina II “convencional” que fue la primera miosina descubierta, la nomenclatura de las clases de miosinas “no convencionales” fue asignada en el orden en que fueron siendo descubiertas (Mooseker y Foth, 2008). Las miosinas comúnmente se clasifican con base en el análisis filogenético de los dominios motores (Cheney et al., 1993), sin embargo, al analizar las proteínas completas o los dominios de la cola, generalmente muestran la misma relación (Sellers y Weisman, 2008; Soldati et al., 1999). Muchos miembros de la superfamilia de miosinas presentan un amplio rango de expresión filogenética, mientras que en otros únicamente han sido identificados en un solo organismo. Por ejemplo, en ratones (*Mus musculus*) se han identificado 26 genes de miosina distribuido en siete clases diferentes, mientras que en la levadura *S. cerevisiae* solo existen cinco genes dentro de tres clases (Hasson et al., 1996; Mermall et al., 1998).

1.1.5 Estructura general de las miosinas

Típicamente las miosinas están conformadas por tres estructuras principales: 1) la cabeza o dominio motor que está interactuando con la actina y se une a ATP, 2) el cuello asociado a calmodulina o cadenas ligeras y 3) la cola que tiene funciones variables, incluyendo la formación de estructuras diméricas (Figura 1) (Sellers, 1999).

Los tres dominios pueden observarse a través de micrografías electrónicas y la organización de cada estructura ha sido confirmada por estudios proteolíticos en la miosina de clase II (Lodish y Zipursky, 2001). La cabeza y el cuello corresponden a la región N-terminal de la cadena pesada y la cola a la región C-terminal.

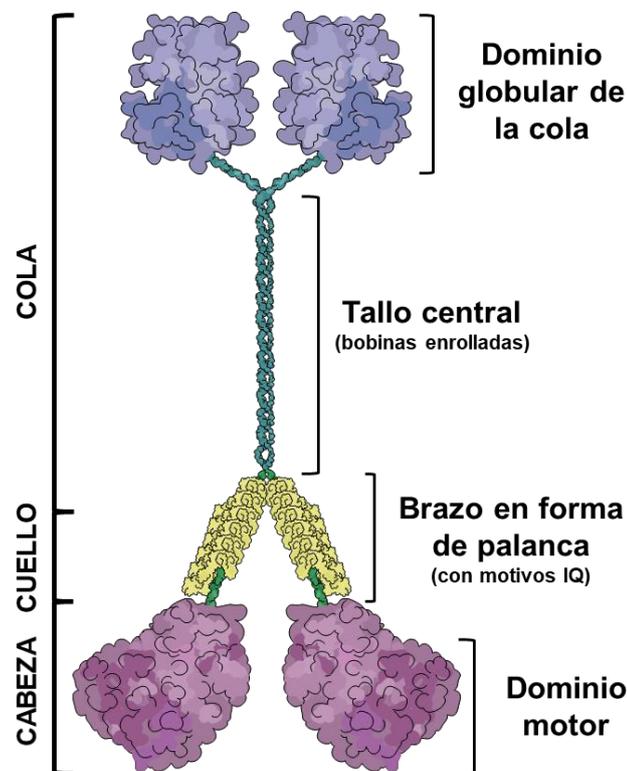


Figura 1. Estructura general de la miosina de clase V. Las miosinas de clase V están divididas en tres regiones principales: 1) la cabeza está en el amino terminal y se encuentra el dominio motor; 2) el cuello o brazo en forma de palanca que cuenta con seis motivos IQ; y 3) la cola, en el carboxilo terminal, compuesto por un tallo central y un dominio globular de la cola (GTD, por sus siglas en inglés *Globular Tail Domain*). Modificado de (Tóth et al., 2005).

1.1.5.1 Región de la cabeza

La cabeza o dominio motor se localiza en el extremo amino y está altamente conservado en todas las clases de miosinas. El modelo estructural del dominio motor ha sido determinado a partir de diversas miosinas de clase I, II, V y VI y es similar al de la cinesina (Holmes, 2008; Lodish y Zipursky, 2001; Vale, 2003). La estructura consiste en una hoja de siete cadenas de hojas- β rodeada por numerosas hélices- α . El dominio motor es una ATPasa especializada que puede hidrolizar ATP y que además cuenta con un sitio de unión a actina (Lodish y Zipursky, 2001). El sitio de unión a ATP está formado por bucles-P similar al encontrado en las proteínas Ras (Lodish y Zipursky, 2001; Mooseker y Foth, 2008; Smith y Rayment, 1996), mientras que el sitio de unión a actina está dividido por una hendidura profunda, que

se abre y se cierra dependiendo de su interacción con ATP (Holmes, 2008). Además, tiene una región “convertidora”, que gira 60° en respuesta a la unión de ATP y la liberación de ADP (Holmes, 2008). La etapa de activación con actina garantiza que la ATPasa de la miosina funciona a su velocidad máxima, solo si el dominio motor está unido a la actina (Lodish y Zipursky, 2001).

Estudios realizados principalmente en las miosinas de clase I, II y V han revelado cómo podría estar produciéndose el movimiento (Clayton et al., 2014; Mehta, 2001; Pollard y Lord, 2014; Rief et al., 2000; Uyeda et al., 1990; Uyeda et al., 1991). Se ha especulado que el movimiento en todas las miosinas se produce de manera similar, ignorando si la miosina está unida a una vesícula o se encuentra unida a un filamento largo (como en el músculo). Uno de los modelos principales, asume que la hidrólisis de una única molécula de ATP es acoplada a cada paso que da una miosina a través del filamento de actina (Lodish y Zipursky, 2001).

Durante un ciclo de movimiento de la miosina se producen tres estados conformacionales: 1) un estado de pre-hidrólisis de ATP que no está unido a actina, 2) un estado de ADP-Pi unido a actina y 3) un estado después de que el golpe de fuerza fue completado (Lodish y Zipursky, 2001). Se ha demostrado que la miosina obtiene la fuerza necesaria para moverse del grupo fosfato en el ATP y la unión a actina, que modifican estructuralmente la hendidura del sitio de unión a actina en el dominio motor manteniéndola abierta o cerrada. La presencia de ATP mantiene abierta la hendidura, produciendo la interrupción en el sitio de unión a actina en el extremo opuesto a la hendidura. Posterior a la hidrólisis de ATP, la hendidura se cierra parcialmente. Este cambio conformacional atrapa el ADP y Pi y restaura el sitio de unión a actina. El modelo sugiere que los cambios conformacionales en la cabeza y en el cuello son amplificadas a otras partes de la miosina a través de las cadenas ligeras que se unen al cuello (Lodish y Zipursky, 2001).

La velocidad a la que las moléculas de miosina se mueven a través de los filamentos de actina, depende de factores que incluyen la clase a la que pertenece o la función que está desempeñando. A partir de ensayos de filamentos deslizantes, se calculó la velocidad a la que diferentes miosinas se mueven a lo largo del filamento de actina (Kron y Spudich, 1986). Se encontró que la miosina de clase I puede moverse a una velocidad de 0.04 $\mu\text{m/s}$ en células epiteliales, mientras que la miosina de clase II, en el músculo esquelético, se mueve hasta 4.5 $\mu\text{m/s}$. Así, el movimiento rápido está asociado con la contracción muscular, mientras que un movimiento más lento estaría relacionado con el transporte en el citoplasma (Lodish y Zipursky, 2001; Mehta, 2001).

1.1.5.2 Región del cuello

Es una región que consiste en una larga hélice- α de longitud variable compuesta por uno o más motivos IQ, que son secuencias consenso (IQxxxRGxxxR) que le permiten interactuar con cadenas ligeras de calmodulina (Cheney y Mooseker, 1992; Hammer III y Sellers, 2012; Holmes, 2008). El número de motivos IQ es variable dentro los miembros de las diferentes clases de miosinas, aunque algunas clases mantienen un número constante (por ejemplo, los miembros de las miosinas de clase II presentan dos motivos IQ y los de clase V poseen seis) (Coluccio, 2007). Por lo general, todas las cadenas ligeras que se unen al cuello se han identificado como calmodulina (como en el caso de las miosinas de clase I y V) o miembros de calmodulina (como las cadenas ligeras esenciales y reguladoras de las miosinas de clase II) (Coluccio, 2007).

El cuello también es conocido como “brazo en forma de palanca”, debido a que se mueve como una estructura rígida que responde a cambios dependientes de ATP producidos en el dominio motor y que contribuye al tamaño del paso de una miosina determinada (Hammer III y Sellers, 2012; Holmes, 2008). Además, los cambios en la asociación de la cadena ligera y los cambios resultantes en la rigidez a la flexión de la hélice- α del cuello (como los que se producen por la unión de Ca^{2+} a las cadenas ligeras de calmodulina) desempeñan un papel esencial en la regulación de las propiedades mecanoquímicas de las miosinas.

1.1.5.3 Región de la cola

A pesar de que el dominio principal y conservado de las miosinas es el dominio motor, la región de la cola es la que determina la función y la localización de las miosinas. La cola es una región muy variable en su secuencia, longitud, dominios y organización. En algunas clases de miosinas la región de la cola está constituida por secuencias α -helicoidales que les permiten formar dímeros generando una estructura de bobina enrollada, como en el caso de las miosinas de clase II y V. Por el contrario, las miosinas de la clase I carecen de las regiones de bobina enrollada en la cola, por lo que la molécula es un monómero con un solo dominio motor (Holmes, 2008; Lodish y Zipursky, 2001). La región de la cola también puede estar constituida por dominios que le permiten desempeñar diferentes funciones, como la unión a membranas o receptores de carga que median interacciones específicas con diferentes cargas intracelulares (Tabla 1) (Hammer III y Sellers, 2012). Las miosinas de clase I y V se asocian a la membrana plasmática o a las membranas de organelos intracelulares, por lo que estas proteínas motoras están relacionadas con actividades en la membrana. Por el contrario, los dímeros formados por las miosinas de clase II se unen para constituir filamentos largos y gruesos que participan en la

contracción (Lodish y Zipursky, 2001). Sin embargo, en muchos casos las regiones en la cola de las miosinas consisten en segmentos de proteínas que no han sido funcionalmente descritos, cuya estructura primaria no corresponde a algún motivo de proteína conocido o cuya función no ha sido determinada bioquímicamente (Holmes, 2008). Esto sugiere que muchos aspectos relacionados con la función de las miosinas de las diversas clases aún no han sido definidos en su totalidad.

Tabla 1. Diversas funciones de las miosinas (Tomado de (Holmes, 2008))

Función	Clase de miosina
Generación de tensión	I, II, VII, VIII
Movimiento celular	
Adhesión	I, II, V, VI, VII, X, XIV
Endocitosis	
Mediada por clatrina	I, II, VI
Macropinocitosis	I, VI
Fagocitosis	I, II, VI, VII, X
Exocitosis	I, II, V, VI
Movimiento/Localización de orgánulos	V, VII, XI, VII
Localización/Transporte de ARNm	V
Comunicación cruzada en el citoesqueleto	V, X
Transducción de señales	I, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI,
Polaridad celular	I, VI
Función/transcripción nuclear	I, VI, XVIII

1.1.6 Miosinas de clase V

En eucariotas, el movimiento de organelos y vesículas resulta de gran importancia para el crecimiento celular. El transporte de diversas cargas intracelulares a través de los filamentos de actina es llevado a cabo por las miosinas de clase V. La miosina de clase V fue purificada por primera vez del cerebro y fue identificada como una proteína de unión a calmodulina con actividad ATPasa (Espindola et al., 1992; Larson et al., 1990). Posteriormente, se determinó que se trataba de una miosina “no convencional” que tenía una secuencia similar a las encontradas en *Saccharomyces cerevisiae* y en ratones (Coluccio, 2007).

Los mamíferos poseen tres isoformas de miosina de clase V (MyoVa, MyoVb y MyoVc) y cada una se localiza en diferente tipo de célula, por lo que la carga que transporta es distinta. Las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* presentan dos genes distintos codificantes de miosina de clase V denominados *MYO2* y *MYO4*, y *myo51* y *myo52*, respectivamente. Por el contrario, en *Drosophila* solo existe un miembro de las miosinas de clase V, del mismo modo que en los hongos filamentosos *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* y en los hongos dimórficos

Candida albicans y *Ustilago maydis*. Además, la estructura y las propiedades enzimáticas de las miosinas de clase V y la miosina de clase XI en plantas son similares (Coluccio, 2007). Debido a esto, algunos autores sugieren que las miosinas de clase V son una forma muy antigua de miosina que evolutivamente apareció antes que la miosina de clase II convencional (Coluccio, 2007).

1.1.6.1 Estructura de las miosinas de clase V

Las miosinas de clase V son proteínas con un peso molecular aproximado de 210 kDa y presentan la estructura básica que consiste en la cabeza, el cuello y una cola (Sellers y Weisman, 2008). La cabeza está localizada en el N-terminal de la proteína que corresponde al dominio motor, con los sitios de unión a ATP y de unión a actina, seguida de una región “convertidora” que une al dominio motor con el cuello (Coluccio, 2007; Dominguez et al., 1998; Houdusse et al., 1999; Itakura et al., 1993; Loubéry y Coudrier, 2008; Reck-Peterson et al., 2000; Wu et al., 1998).

El cuello contiene motivos IQ a los que se asocian proteínas de unión a calcio (Coluccio, 2007; Cheney et al., 1993; Reck-Peterson et al., 2000). Ésta región es más larga que en las miosinas de clase II, presentando seis cadenas ligeras unidas. Por lo general, los motivos IQ se encuentran separados entre sí por 25 y 23 aminoácidos (Sellers y Weisman, 2008).

La cola está localizada en el C-terminal y está formada por un tallo central y un dominio de la cola globular (Reck-Peterson et al., 2000; Sellers y Weisman, 2008). El tallo central consiste en secuencias largas que forman regiones con bobinas enrolladas interrumpidas por regiones con baja probabilidad para la formación de las mismas (Coluccio, 2007). Ésta región define la estructura secundaria de la miosina de clase V. La región de la cola termina en un dominio globular de la cola (GTD por sus siglas en inglés Globular tail domain) que está involucrado en el transporte de cargas intracelulares (Sellers y Weisman, 2008).

Diversos estudios han demostrado que la conformación de las miosinas de clase V puede ser regulada por los niveles de calcio y por la carga. En la miosina Va de mamíferos se pueden presentar tres estados conformacionales de la miosina de clase V (Coluccio, 2007; Hammer III y Sellers, 2012). El primer estado se da en ausencia de Ca^{2+} y de la carga: la miosina adopta una conformación doblada con el dominio motor interactuando con el dominio de unión a carga, y que es enzimáticamente y mecánicamente inactiva. El segundo estado se produce en presencia de Ca^{2+} : la miosina se extiende en una conformación que tiene una alta actividad ATPasa pero que no puede moverse sobre actina debido a que el cuello está mecánicamente debilitado por la disociación de las cadenas ligeras de calmodulina.

El tercer estado se da en presencia de Ca^{2+} y de la carga: la miosina se extiende y es mecánica y enzimáticamente activa.

1.1.6.2 Función de las miosinas de clase V

La función principal de las miosinas de clase V es el transporte de cargas intracelulares en diferentes organismos eucariotas. Pueden actuar como motores moleculares procesivos (como en mamíferos) o no procesivos (como en *S. cerevisiae*) (Reck-Peterson et al., 2001; Uyeda et al., 1990) que se mueven a lo largo de los filamentos de actina y que aseguran el transporte efectivo de las cargas a sus destinos finales.

Las miosinas de clase V han evolucionado de tal manera que han adquirido cuatro propiedades moleculares básicas para poder desempeñar su función como motor. El primero consiste en que el GTD se asocia a cargas a través de complejos de proteínas reguladoras, que pueden permitir la unión a adaptadores específicos o actuar como los adaptadores (Coluccio, 2007; Fukuda et al., 2002; Hume et al., 2002; Ishikawa et al., 2003; Wu et al., 2002a; Wu et al., 2002b). La segunda propiedad es el tallo central localizado en la cola, que le permite formar una bobina enrollada que resultará en un dímero de miosina de dos cabezas (Coluccio, 2007; Cheney et al., 1993). En tercer lugar, están los estados con alta afinidad por la actina, haciendo que al menos una de las dos cabezas permanezca unida a la actina en cualquier momento y, así, la miosina y la carga asociada no se disocian fácilmente (Enrique et al., 1999; Rosenfeld y Sweeney, 2004). La cuarta propiedad, pero no menos importante, es el largo cuello que permite que las dos cabezas puedan unirse a 36 nm de distancia cuando están unidas a la actina (Burgess et al., 2002; Walker et al., 2000). Esta distancia permite que las miosinas de clase V caminen aproximadamente en línea recta sobre el filamento de actina, y de esta manera la carga intracelular permanece por encima del citoesqueleto de actina, evitando la necesidad de girar en espiral alrededor de un filamento de actina y reduciendo el arrastre (Coluccio, 2007).

El tipo de carga intracelular que transportan las miosinas de clase V varía dependiendo del organismo (Tabla 2). En mamíferos la miosina de clase V, MyoVa, mueve cargas asociadas a membrana como melanosomas (Nascimento et al., 1997; Provance Jr et al., 2002; Rogers y Gelfand, 1998; Wei et al., 1997; Wu et al., 1998; Wu et al., 1997); retículo endoplásmico liso (Takagishi et al., 1996; Wagner et al., 2011) y vesículas membranosas (Evans et al., 1998). En *S. cerevisiae*, sus dos miosinas de clase V, Myo2p y Myo4p, llevan cargas distintas: Myo2p transporta vacuolas, peroxisomas, vesículas secretoras, Golgi tardío y mitocondrias (Boldogh et al., 2004; Catlett y Weisman, 1998; Fagarasanu et al., 2006; Hoepfner et al., 2001; Itoh et al., 2002; Lillie y Brown, 1994; Rossanese et al., 2001), mientras que Myo4p transporta ARNm (Böhl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa y Vale, 2000). Sin embargo,

Myo4p es una miosina monomérica que es estructuralmente diferente a Myo2p (Dunn et al., 2007). Además, los estudios en esta misma levadura, mostraron que el GTD de Myo2p tiene dos subdominios, I y II (Pashkova et al., 2005a; Pashkova et al., 2005b; Pashkova et al., 2006). Los estudios con mutaciones puntuales en cada uno de los subdominios mostraron que poseen cierta especificidad por la carga. En el subdominio I revelaron defectos en el transporte de vacuolas y lisosomas sin afectar el movimiento de vesículas secretoras (Catlett y Weisman, 1998; Pashkova et al., 2005a; Pashkova et al., 2005b; Pashkova et al., 2006), mientras que mutaciones puntuales en el otro subdominio afectaron el movimiento de vesículas secretoras, pero no de vacuolas (Schott et al., 1999). Estos subdominios requieren una estrecha asociación entre ambos, de manera que la unión de la carga a un subdominio inhibe la unión de la carga al segundo subdominio, y viceversa (Catlett y Weisman, 1998; Pashkova et al., 2005a; Pashkova et al., 2006).

Tabla 2. Diferentes funciones de la miosina de clase V.

Organismo	Miosina V	Función
Células animales	Myo Va	<ul style="list-style-type: none"> • Reciclaje de endosomas
	Myo Vb	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de retículo endoplásmico • Transporte de vesículas y mitocondrias
	Myo Vc	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de proteínas de unión a mRNA
Levaduras		
<i>S. cerevisiae</i>	Myo2p (esencial)	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de vesículas secretoras, vacuolas, Golgi tardío, peroxisomas, mitocondrias
	Myo4p (no esencial)	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de mRNA <i>ASH1</i>, el cual está involucrado en el cambio de tipo de apareamiento en la célula hija.
<i>S. pombe</i>	Myo52	<ul style="list-style-type: none"> • Involucrada en la deposición de la pared celular asociada con el crecimiento polarizado y citocinesis.
	Myo51	<ul style="list-style-type: none"> • Es un componente no esencial del anillo de actina formado durante la citocinesis.
Hongos dimórficos		
<i>U. maydis</i>	Myo5	<ul style="list-style-type: none"> • Es requerida para todos los estados morfológicos presentes durante su ciclo de vida
	(no esencial)	<ul style="list-style-type: none"> • Es esencial para la patogenicidad.
<i>C. albicans</i>	MYO2	<ul style="list-style-type: none"> • Participa en el cambio dimórfico y el crecimiento de forma levaduriforme.
	(no esencial)	
Hongos filamentosos		
<i>A. nidulans</i>	MyoE	<ul style="list-style-type: none"> • Participa en el mantenimiento del crecimiento polarizado.
	(no esencial)	<ul style="list-style-type: none"> • Correcta distribución de los componentes de la pared celular.
<i>N. crassa</i>	MYO-5	<ul style="list-style-type: none"> • Localizada en los sitios de crecimiento de hifas
	(no esencial)	<ul style="list-style-type: none"> • Su ausencia causa anomalías en el crecimiento de conidios, germinulas e hifas, • Su ausencia también causa deslocalización de vacuolas y desorganización del Spk.

El transporte de cargas por medio de la miosina de clase V es impulsado por la capacidad de acoplamiento/desprendimiento de su carga, que está regulado principalmente a través de adaptadores o receptores capaces de unir una carga específica a una miosina de clase V. Por ejemplo, estudios genéticos en diversos animales han ayudado a determinar los receptores específicos para los melanosomas. El complejo de adaptadores está compuesto por la miosina Va, la Slac2-a o melanofilina y la Rab GTPasa, Rab27a (Coluccio, 2007; Fukuda et al., 2002; Hume et al., 2002; Nagashima et al., 2002; Provance Jr et al., 2002; Wu et al., 2002b). En este complejo, la región media de Slac2-a se une directamente a la miosina Va y el N-terminal de la Slac-2, el dominio de unión a RAB, se une directamente a Rab27a (Kuroda et al., 2003; Nagashima et al., 2002; Strom et al., 2002; Wu et al., 2006; Wu et al., 2002a; Wu et al., 2002b).

En *S. cerevisiae* se han caracterizado una gran variedad de adaptadores para distintas cargas. Para el movimiento de vacuolas se han identificado tres proteínas necesarias: Myo2p, la miosina de clase V, Vac17p, una proteína que se une directamente al subdominio I en el GTD de Myo2p y Vac8p que se une directamente a Vac17p y el complejo Myo2p-Vac17p-Vac8p se une a la membrana de la vacuola (Ishikawa et al., 2003; Tang et al., 2003). Otros adaptadores identificados, son el adaptador Inp2 localizado en la membrana de peroxisomas y necesario para que Myo2 se asocie a los peroxisomas (Fagarasanu et al., 2006); el complejo de adaptadores Kar9p, una proteína que se une a núcleos, y Bim1/EB1, necesarios para la unión de Myo2 a microtúbulos (Beach et al., 2000; Liakopoulos et al., 2003; Yin et al., 2000). Myo2p también se une a un adaptador denominado Mmr1p (por sus siglas en inglés *mitochondrial Myo2p receptor-related 1*) y Ypt11p (GTPasa tipo Rab) para poder distribuir correctamente las mitocondrias (Boldogh et al., 2004; Itoh et al., 2004; Itoh et al., 2002). Asimismo, para que Myo4p pueda transportar ARNm, forma un complejo compuesto de tres proteínas en donde Myo4 se une directamente al N-terminal del adaptador She3p, cuyo C-terminal se asocia con el ARNm *ASH1*, mientras la proteína She2p, otra proteína de unión a RNA, facilita una interacción específica entre She3p y la secuencia del ARNm *AHS1* (Böhl et al., 2000; Dunn et al., 2007; Hodges et al., 2008; Jansen et al., 1996; Long et al., 2000).

1.1.6.3 Localización de las miosinas de clase V en diversos organismos

La organización del transporte de cargas realizado por la miosina de clase V es sumamente importante, y los defectos en ésta pueden generar daños significativos en el crecimiento celular. Diversos estudios muestran que la miosina de clase V se localiza en sitios de crecimiento en neuronas y células germinales. La ausencia de la miosina Va en neuronas de ratones genera un color de pelaje más tenue

o de color cenizo, además de diversos problemas neurológicos que llevan al organismo a una muerte temprana (Evans et al., 1998; Tabb et al., 1998; Wagner et al., 2011; Wu et al., 1998). En la levadura *S. cerevisiae*, Myo2p y Myo4p, se localizan en sitios de polarización durante la formación de la célula hija (Govindan et al., 1995; Karpova et al., 2000; Lillie y Brown, 1994; Motegi et al., 2001; Reck-Peterson et al., 2000; Sellers y Weisman, 2008). Estudios en *U. maydis*, en donde se analizaron mutantes por eliminación completa del gen *myo5*, mostraron que es requerida para los estados morfológicos de todo el ciclo de vida (Weber et al., 2003). En hongos filamentosos son pocos los estudios que se han realizado acerca del papel que desempeña la miosina de clase V durante el crecimiento celular. En *A. nidulans* y *A. fumigatus*, la única miosina de clase V, MyoE, se localiza en el ápice y en los septos, y se ha encontrado que su ausencia produce defectos en la morfogénesis y el desarrollo de las hifas (Renshaw et al., 2018; Renshaw et al., 2016; Taheri-Talesh et al., 2012; Zhang et al., 2011). Del mismo modo, en *N. crassa* un estudio reciente mostró que la miosina de clase V, MYO-5, se localiza en el ápice y en el septo de germínulas e hifas maduras (Ramírez-del Villar et al., 2019). Además, la eliminación del gen *myo-5* causó anormalidades en el crecimiento, deslocalización de vacuolas y desorganización del Spk (Ramírez-del Villar et al., 2019).

1.2 Justificación

Durante el crecimiento polarizado se produce el movimiento hacia el ápice de las hifas de componentes celulares, los cuales son transportados por proteínas motoras a través del citoesqueleto. En diversos organismos, las miosinas de clase V son las encargadas del movimiento de cargas intracelulares hacia los sitios de crecimiento. En un estudio reciente se mostró que en *N. crassa*, MYO-5 se encuentra localizada en los sitios de crecimiento de hifas (Ramírez-del Villar et al., 2019; Sánchez-León y Riquelme, 2015) y que su ausencia causa anormalidades en el crecimiento de conidios, germínulas e hifas, así como una deslocalización de vacuolas y desorganización del Spk (Ramírez-del Villar et al., 2019). Lo anterior sugiere una función relevante de MYO-5 como proteína motora. Sin embargo, aún no queda claro cuáles son las cargas intracelulares que transporta ni su papel en el transporte de éstas, así como la posible función estructural que está desempeñando en el Spk.

1.3 Hipótesis

La MYO-5 está involucrada en el transporte de vesículas secretoras específicas desde la región subapical hacia el ápice, así como en el posicionamiento de vacuolas tubulares y globulares; además tiene un papel estructural en el mantenimiento y estabilidad del Spk.

Del mismo modo que en otros organismos, la asociación de la MYO-5 con la carga no es directa, sino que existen adaptadores específicos para cada tipo de carga.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

1. Identificar las cargas intracelulares asociadas a la MYO-5, así como los adaptadores involucrados en su asociación con cada una de sus cargas.
2. Determinar la función de la MYO-5 en la integridad del Spk.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar las cargas intracelulares asociadas a la MYO-5 así como sus adaptadores.
2. Confirmar la relación proteína-proteína de las cargas identificadas con la MYO-5.
3. Identificar la dinámica de las cargas intracelulares en relación a la MYO-5.
4. Establecer el efecto de versiones truncadas del dominio globular de la cola de MYO-5 para estudiar su asociación a las cargas intracelulares.
5. Describir la asociación dinámica de la MYO-5 con el citoesqueleto de actina y sus componentes en el domo apical, el Spk y los septos.
6. Determinar la dinámica del citoesqueleto de actina en la mutante por eliminación del gen $\Delta myo-5$.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de hongos y bacterias utilizadas se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas utilizadas

<i>N. crassa</i>		
Cepa	Genotipo	Referencia
Tipo silvestre (WT) 4200	<i>mat a; ORS-SL6a</i>	FGSC#4200
11442	<i>mat A; Δmyo-5::hph⁺</i>	FGSC #11442
XRM116-ARV01	<i>mat a; Δmyo-5::hph⁺</i>	Este estudio
SMRP309	<i>mat A; Pmyo-5::myo-5::Gly10x::sgfp⁺::hph⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	(Sánchez-León y Riquelme, 2015)
<i>fluffy</i>	<i>mat A</i>	FGSC #4317
<i>fluffy</i>	<i>mat a</i>	FGSC #4347
TRM117-OC51	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::lifeact::egfp⁺</i>	(Delgado-Álvarez et al., 2010)
TRM123-OC52	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::tpm-1::sgfp⁺</i>	(Delgado-Álvarez et al., 2010)
TRM122-DD07	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::fim-1::sgfp⁺</i>	(Delgado-Álvarez et al., 2010)
NES1-15	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::chs-1::sgfp⁺</i>	(Sánchez-León et al., 2011)
<i>GFP citoplasmática</i>	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::sgfp⁺</i>	M. Freitag, USA
XRM118-ARV02	<i>mat A; Δmyo-5::hph⁺; his-3⁺::Pccg-1::lifeact::egfp⁺</i>	Este estudio
XRM119-ARV03	<i>mat A; Δmyo-5; his-3⁺::Pccg-1::chs-1::sgfp⁺</i>	Este estudio
XRM120-ARV04	<i>mat A; Δmyo-5; his-3⁺::Pccg-1::fim-1::sgfp⁺</i>	Este estudio
XRM121-ARV05	<i>mat A; Δmyo-5::hph⁺; his-3⁺::Pccg-1::tpm-1::sgfp⁺</i>	Este estudio
TRM-124-ARV06	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::sgfp⁺::Gly7x::rba-1⁺</i>	Este estudio
TRM-125-ARV07	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::sna-10⁺::Gly10x::sgfp⁺</i>	Este estudio
TRM-126-PG01	<i>Pmyo-5::myo-5^{Δ1229}::Gly10x::sgfp⁺::hph⁺; Δmus-51</i>	Este estudio
TRM-127-PG02	<i>Pmyo-5::myo-5^{Δ1436}::Gly10x::sgfp⁺::hph⁺; Δmus-51</i>	Este estudio
9717	<i>mat A; Δmus-51::bar⁺::his-3</i>	FGSC9717
9718	<i>mat a; Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC9718

FGSC, Fungal Genetics Stock Center

GFP: Proteína Verde Fluorescente por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*.

2.1.1 Medios y condiciones de cultivo para *N. crassa*

Todas las cepas de *N. crassa* se mantuvieron en Medio Mínimo de Vogel (MMV) que contiene agar al 1.5%, sacarosa al 1.5% y sales de Vogel 1X (Vogel, 1956) y se incubaron a una temperatura de 30°C. Las cepas con genotipo *hph*⁺ fueron cultivadas en MMV adicionado con el antimicótico higromicina B (0.15 mg ml⁻¹) a 30°C. Para la cepa FGSC#9717 que es auxótrofa a histidina, el medio fue suplementado con L-histidina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 mg ml⁻¹, previamente esterilizada por filtración.

2.1.1.1 Obtención de conidios

Se inoculó micelio de las diferentes cepas de *N. crassa* (ver Tabla 2) en matraces Erlenmeyer que contenían 150 ml de MMV. Para las cepas con fenotipo silvestre, se incubaron a 30°C durante dos días, y se dejaron en luz a temperatura ambiente durante 5 días. Para las cepas con genotipo *hph*⁺, se incubaron a 30°C durante 3 días, y se dejaron en luz a temperatura ambiente durante 7 días. Los conidios se cosecharon bajo condiciones de esterilidad, añadiendo 50 ml de agua destilada estéril para lavar las paredes del matraz, agitando vigorosamente hasta desprender el micelio y los conidios. Se recuperó la suspensión de conidios en tubos de 50 ml mediante filtración con un embudo con una tela (Magitel®) estéril, eliminando los restos de micelio y agar. Se centrifugó por 10 min a 9,000 rpm. Se hizo un lavado con 15 ml de agua destilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones, eliminando el sobrenadante. Los conidios fueron resuspendidos en 1 ml de sorbitol 1M y se almacenaron en tubos de microcentrifuga de 1.7 ml estériles a -20°C. Los conidios se cuantificaron en la cámara de Neubauer para los experimentos en los que fuera requerido.

2.1.1.2 Crecimiento de micelio y cosecha

Para la obtención de micelio de las cepas MYO-5-GFP y GFP citoplasmática, se usaron matraces Erlenmeyer de 1 L con 250 ml de MMV líquido y se inocularon 10 µl de conidios con la misma concentración. Se incubaron a 30°C por 2 días en agitación constante a 150 rpm. El micelio se cosechó por filtración, utilizando un embudo Büchner cubierto con papel filtro (Whatman® No. 9) y se lavó con agua destilada estéril.

Para la obtención de micelio de las cepas FGSC#4200 y todas las cepas con fondo mutante $\Delta myo-5$, se usaron matraces de 250 ml con 100 ml de MMV líquido suplementado con higromicina B (0.15 mg ml^{-1}), para las mutantes. Se inocularon $10 \mu\text{l}$ de conidios y se incubaron a 30°C en agitación constante a 150 rpm por 2 días, para la cepa FGSC#4200 y 3 días para las mutantes. El micelio se cosechó por filtración, utilizando un embudo Büchner cubierto con papel filtro (Whatman® No. 9) y se lavó con agua destilada estéril.

2.1.1.3 Cruzas genéticas

Se sembraron $10 \mu\text{l}$ de conidios de las cepas FGSC#4200 (tipo de apareamiento *mat a*), Lifeact-GFP (*mat A*), TPM-1-GFP (*mat A*), CHS-1-GFP (*mat A*), FIM-1-GFP (*mat A*) en placas con medio sintético de cruzas (MSC) (Westergaard y Mitchell, 1947) y se incubaron a 30°C por 24 h. Posteriormente, se esparcieron sobre la placa con micelio 6 gotas de $20 \mu\text{l}$ de conidios de las cepas mutantes $\Delta myo-5 \text{ mat A}$ y *mat a*, respectivamente. Las placas se incubaron por 60 días a 25°C en condiciones de oscuridad. Debido a que los peritecios mutantes no liberan ascosporas, con una espátula se recuperaron cuidadosamente los peritecios completos de la placa. Los peritecios se pusieron en un tubo de microcentrifuga de 1.7 ml con 1 ml de agua destilada estéril y se indujo la liberación de las ascosporas dando vortex vigorosamente.

Las ascosporas se activaron sometiénolas a un choque térmico a 60°C durante una hora. Se sembraron en placas con MMV sólido adicionada con higromicina B (0.15 mg ml^{-1}) y se incubaron a 30°C hasta observar germinación de las ascosporas. Se recuperaron alrededor de 50 ascosporas con ayuda de una espátula, se inocularon en tubos de cultivo con MMV inclinado y se incubaron a 30°C hasta que formaron micelio, para su posterior selección por análisis de expresión de fluorescencia y análisis por PCR (corroborando la eliminación completa del gen *myo-5*).

Para determinar el tipo de apareamiento de cada cepa, el micelio obtenido a partir de cada ascospora se sembró en placas con MSC que tenían micelio de las cepas *fluffy mat a* o *fluffy mat A*. Las placas se incubaron durante 5 días a 25°C hasta que formaron peritecios en alguna de las placas.

2.1.1.4 Tasa de crecimiento radial

Para medir el crecimiento radial de las cepas FGSC#4200, FGSC#9718, FGSC#9717, MYO-5 Δ^{1229} -GFP, MYO-5 Δ^{1436} -GFP MYO-5-GFP, GFP-RBA-1 y SNA-10-GFP se sembraron los conidios de las cepas en placas con MMV 1.5%, adicionadas con L-histidina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 mg ml⁻¹ para las cepas que lo requirieran, y se incubaron a 30°C por 20 h. Con ayuda de un sacabocados de 0.4 cm de diámetro se tomó micelio de cada cepa y se colocó en el borde de placas de 150x15 mm. Las placas se incubaron a 30°C por 13 h y después se hicieron mediciones cada 3 h hasta que una de las cepas llenara la placa. Se marcaron 10 transectos verticales y se midió el crecimiento en cada tiempo para cada transecto (Figura 2).

Los datos fueron analizados y procesados en Excel® 2010 (Microsoft®, Redmond, WA).

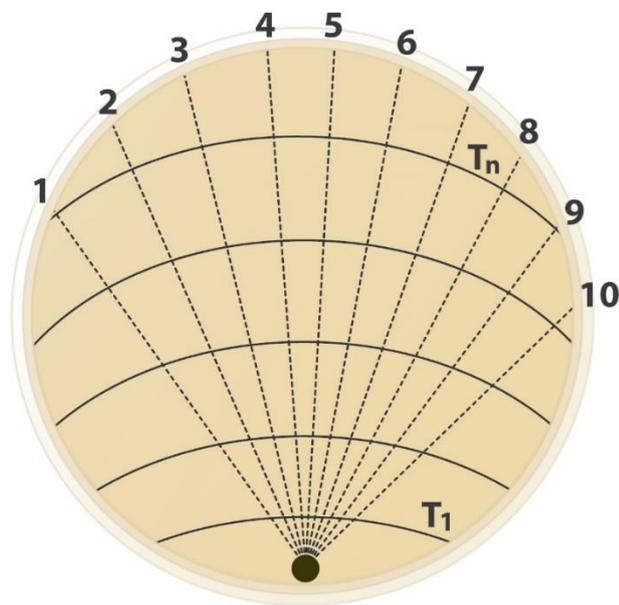


Figura 2. Representación esquemática del procedimiento para la medición de la tasa de crecimiento radial. Se marcó el borde de la colonia cada 3 h (línea continua) durante 28 h, se trazaron 10 transectos verticales (línea punteada) y se midió el crecimiento.

2.2 Métodos moleculares

2.2.1 Oligonucleótidos y vectores

Los oligonucleótidos y vectores utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 4 y 5.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Número	Nombre	Secuencia	Referencia
395	Myo-5 Fw	GAGTGTAGACTTGGACATCG	FGSC
396	Myo-5 Rv	GGTTGACAGTAGCAGAGAGC	FGSC
472	PacI-242-Rv	ccTTAATTAACCAAATGACTCCGAAGG	Este estudio
588	XbaI-242-Fw	gcTCTAGAATGGCCCCCAGCCG	Este estudio
605	PacI-6459-Fw	CCTTAATTAAGATGCAAGACTACTCAGGCCACC	Este estudio
606	XbaI-6459-Rv	GCTCTAGATTAGTTAGCGACCTCCTCCTCAACC	Este estudio
	Ped_myo-5_p1ORF-F	GCCTTGATTAGAGCAAACAAAGC	Este estudio
	Ped_myo5_p2mut1-R	gcctccgccctccgccCAGGAAGCGTTCTGACTC	Este estudio
	Ped_myo-5_p3GlyGFP-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGC	Este estudio
	Ped_myo-5_p4hph-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGT	Este estudio
	Ped_myo5_p53UTR-F	aagttatggatccgagctcgGTTGCACCCCGCAACCATC	Este estudio
	Ped_myo5_p63UTR-R	CGTCTCAACCATGTGCGAATTAA	Este estudio
	Ped_myo-5_p7nested-F	AAGGCTGCAATCACGATTCA	Este estudio
	Ped_myo5_p8nested-R	AACCACCCTGCTTTATTGCA	Este estudio
	Ped_myo5_p9mut3-R	gcctccgccctccgccATGCTCAAGCTGGAGCGT	Este estudio

Tabla 5. Vectores utilizados en este estudio

Número	Nombre	Genotipo	Referencia
06	FJ457002	<i>Pccg::N::GFP</i>	Honda and Selker, 2009
07	FJ457006	<i>Pccg-1::C-Gly::GFP</i>	Honda and Selker, 2009
21	pRM-89-AV	<i>Pccg1::sna-10::Gly10x::gfp</i>	En este estudio
25	pRM-88-AV	<i>Pccg-1::gfp::Gly7x::rba-1</i>	En este estudio
	FJ457011	<i>10xGly::gfp::hph::loxP</i>	Honda and Selker, 2009

La corroboración de la eliminación del gen completo *myo-5* se hizo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como template DNA genómico de las cepas FGSC#4200 (como control positivo), $\Delta myo-5 mat A$ (como control negativo), $\Delta myo-5 mat a$, $\Delta myo-5/ Lifeact-GFP$, $\Delta myo-5/ TPM-1-GFP$, $\Delta myo-5/ CHS-1-GFP$ y $\Delta myo-5/ FIM-1-GFP$. Se usaron los oligonucleótidos del FGSC, los cuales se localizan 1452 pb (pares de bases) río arriba y 1122 pb río abajo del gen *myo-5* de *N. crassa*. La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD® Modelo C1000 Touch™ Thermal Cycler, utilizando una enzima polimerasa DreamTaq Thermo Scientific™ (5 U μL^{-1}). La desnaturalización se hizo a 94°C por 2 min seguida de 34 ciclos de extensión a 98°C por 30s, 57°C por 45 s, 72°C por 4 min, y una

extensión final a 72°C por 10 min. El producto de la reacción se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% adicionado con Bromuro de Etidio (0.1%) en un equipo BIO-RAD™ durante 40 min a 80V. El gel se visualizó con luz UV utilizando un transiluminador BIO-RAD™.

2.2.2 Extracción de DNA genómico

El micelio que se obtuvo por filtración se trituró en un mortero pre-enfriado 30 min a -80°C, añadiendo nitrógeno líquido y moliendo hasta obtener un polvo fino. El polvo se mezcló por vortex con 600 µl de una solución amortiguadora de extracción que contenía 10% de EDTA [0.5 M, pH 8.0], 2% de SDS [10%] y 0.1% de DEPC, y se incubó a 65°C por 45 min. La mezcla se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. En un tubo de microcentrifuga se recuperó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de acetato de potasio [3 M, pH 5.2] mezclando vigorosamente. Se incubó durante 8 min sobre hielo y se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo. Se precipitó con 600 µl de isopropanol frío y se centrifugó 10 min por 12,000 rpm desechando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 300 µl de TE 1X durante 1 h a 65°C y se agregaron 2 µl de RNAasa [4 mM/ ml] y se incubó 20 min a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 800 µl de etanol absoluto frío y 15 µl de cloruro de litio (10 M) mezclando por inversión e incubando en hielo por 5 min. Se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm desechando el sobrenadante y lavando la pastilla con 600 µl de etanol frío al 70%. Se centrifugó nuevamente 5 min a 12,000 rpm y se dejó secar la pastilla por 10 min a 55°C. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 80 µl de TE 1X por 1 h a 60°C.

2.2.3 Etiquetado de proteínas

2.2.3.1 Clonación de los genes *sna-10* y *rba-1* en los vectores FJ457006 y FJ457002

La amplificación del gen *sna-10* (NCU00242) se hizo mediante una PCR usando como template ADN genómico de la cepa FGSC#4200. Se usaron los oligonucleótidos XbaI-242-Fw y PaeI-242-Rv que incluyen 22 pb de la región 5' del ORF y 26 pb de la región 3' del ORF sin el codón de paro y sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción XbaI y PaeI. (Figura 3A). La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD® Modelo C1000 Touch™ Thermal Cycler, utilizando una enzima polimerasa TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase (Mg²⁺ free buffer) (5 U µL⁻¹). La desnaturalización se hizo a 98°C por 3 min seguida de 34 ciclos de extensión a 98°C por 30s, 65°C por 30 s, 72°C por 2:20 min, y una extensión final a 72°C por 10 min.

Para la amplificación del gen *rba-1* (NCU06459) se hizo una PCR usando como templete ADN genómico de la cepa FGSC#4200. Se usaron los oligonucleótidos Pacl-6459-Fw y Xbal-6459-Rv que incluyen 22 pb de la región 5' del ORF y de la región 3' del ORF sin el codón de paro y sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Pacl y Xbal (Figura 3A). La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD® Modelo C1000 Touch™ Thermal Cycler, utilizando una enzima polimerasa Plantinum®Taq DNA polymerase HF (5 U μL^{-1}). La desnaturalización se hizo a 94°C por 2 min seguida de 34 ciclos de extensión a 94°C por 30s, 60°C por 30 s, 72°C por 3 min, y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de la reacción de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio al 0.1% en un equipo BIO-RAD™ durante 40 min a 80V. Las bandas de amplificación de 1763 pb y 2414 pb correspondientes al ORF de *sna-10* y *rba-1* respectivamente (Figura 3B), se purificaron mediante el kit de purificación de gel Zymoclean™ siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración final se midió en un equipo NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™). La concentración final fue de 107 ng μL^{-1} y 118.4 ng μL^{-1} para los fragmentos *sna-10* y *rba-1* respectivamente.

Posteriormente se llevó a cabo una digestión de los fragmentos amplificados y de los vectores FJ457006 (Pccg-1::C-Gly::GFP) y FJ457002 (Pccg::N::GFP) con las enzimas de restricción Xbal y Pacl y se incubó 20 h a 37°C. Después de la incubación, los vectores fueron sometidos a un tratamiento con fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C. Se hizo una electroforesis de los fragmentos y vectores en un gel de agarosa al 1%, se purificaron y se midió la concentración (Figura 2C). La concentración del fragmento fue de 85.6 ng μL^{-1} y 115.4 ng μL^{-1} para *sna-10* y *rba-1* respectivamente y de los vectores fue de 115.4 ng μL^{-1} y 377.1 ng μL^{-1} para FJ457006 y FJ457002. Los fragmentos y vectores se ligaron con la enzima T4 Ligasa (New England Biolabs®) durante 18 h a 16°C. El fragmento *sna-10* fue ligado con el vector FJ457006 y *rba-1* con el vector FJ457002.

Se llevó a cabo una transformación en células competentes de *E. coli* para cada uno de los productos de la ligación. Células de la cepa DH5- α de *E. coli* y 12 μL del producto de ligación se incubaron en hielo por 30 min. Se aplicó un choque térmico a una temperatura de 42°C por 2 min y en hielo otros 2 min. La recuperación de las células se hizo añadiendo 300 μL de medio LB líquido e incubando por 1 h a 37°C en agitación a 150 rpm. Posterior a la incubación, se centrifugó 1 min a 5000 rpm para precipitar las células y se eliminaron 200 μL del sobrenadante.

El resto se inoculó en una placa de medio LB (Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl al 1% y agar al 2%), adicionada con ampicilina (0.1 mg/ml). Las placas fueron incubadas durante 16 h

a 37°C. Las colonias de *E. coli* obtenidas se pasaron a tubos con medio líquido LB adicionado con ampicilina y se incubaron 18 h a 37°C en agitación a 150 rpm.

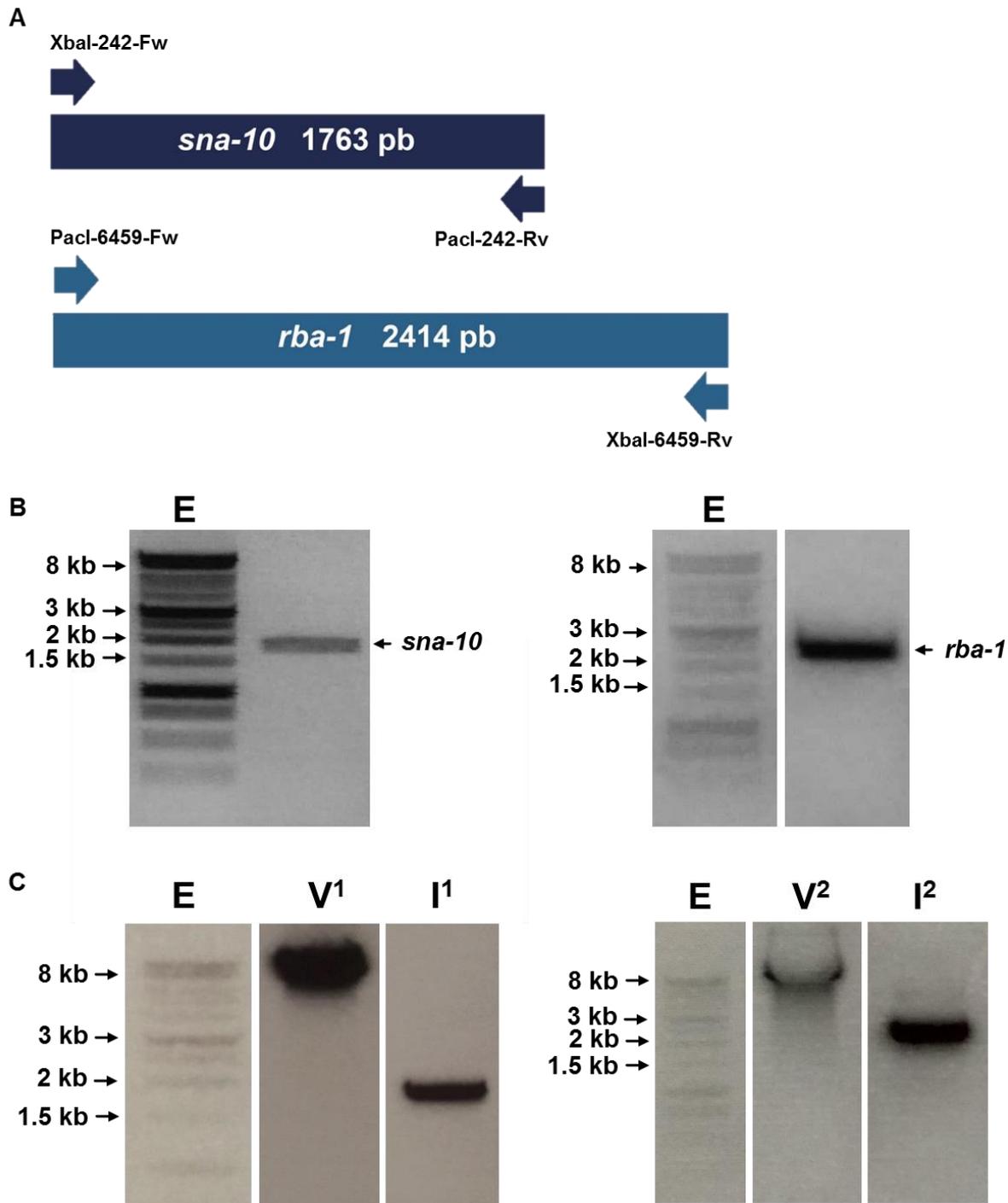


Figura 3. Amplificación del ORF del gen *sna-10* y *rba-1*. A) Esquema del ORF de los genes *sna-10* y *rba-1* y la localización de los oligonucleótidos que flanquean los ORFs. B) Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio mostrando la amplificación del fragmento correspondiente al ORF de *sna-10* y *rba-1*. C) Digestión de los fragmentos *sna-10* (I^1), *rba-1* (I^2) y los vectores FJ457006 (V^1) y FJ457002 (V^2). E= marcador de peso molecular 1 Kb (Promega). Esquema realizado utilizando el Illustrator for Biological Sequences IBS 1.0.1. y Adobe Illustrator CS6.

Los plásmidos recombinantes fueron extraídos utilizando el siguiente protocolo de extracción de ADN plasmídico: La suspensión bacteriana se pasó a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm para recuperar la pastilla celular. Se descartó el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 100 μ l de una solución de Tris-HCl a 50 mM, se mezcló por vortex. Posteriormente, se adicionaron 150 μ l de una solución de SDS al 1% y NaOH 0.2 N y se mezcló por inversión suave. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 μ l de una solución de acetato de potasio al 3 M, pH 5.5 y se mezcló por inversión e incubó en hielo por 10 min. Se hizo una centrifugación de 15 min a 13 rpm y se recuperó el sobrenadante. Al sobrenadante se adicionaron 2 μ l de RNAasa a una concentración de 4 μ g ml⁻¹ para eliminar el ARN y se incubó 15 min a 37°C. Para precipitar el ADN se adicionaron 800 μ l de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se incubó a -20°C durante 30 min. La pastilla de ADN se lavó con 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó 15 min a 13000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y se dejó secar la pastilla 10 min a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido a 55°C en 80 μ l de TE al 1X. Las construcciones generadas se denominaron: pRM-89-AV (*sna-10* + FJ457006) y pRM-88-AV (FJ457002 + *rba-1*) (Figura 4).

pRM-89-AV (FJ457006 + *sna-10*)



pRM-88-AV (FJ457002 + *rba-1*)



Figura 4. Esquema de los vectores recombinantes pRM-89-AV y pRM-88-AV linealizados. La secuencia de ambos vectores codifica para una β -lactamasa (*β -lac*), zonas flanqueantes que permitirán la recombinación del vector en el locus de histidina en el genoma de *N. crassa* (rosa) y un promotor *Pccg1* que mediera la expresión de la proteína de interés (azul turquesa). Además, cada vector incluye una secuencia que codifica 10 o 7 glicinas, respectivamente (amarillo). Esquema realizado utilizando el Illustrator for Biological Sequences IBS 1.0.1. y Adobe Illustrator CS6.

Con el fin de corroborar la integración del gen *sna-10* y *rba-1* en los vectores FJ457006 y FJ457002, respectivamente, los plásmidos recombinantes fueron digeridos con enzimas de restricción. Para el plásmido recombinante pRM-89-AV se usó la enzima *NheI* y para el plásmido pRM-88-AV se utilizaron las enzimas *NotI* HF y *AscI*. La digestión del pRM-89-AV liberó tres fragmentos de 7553 pb, 1777 pb y 911 pb (Figura 5A), mientras que la digestión del pRM-88-AV liberó dos bandas de 9820 pb y 937 pb (Figura 5B).

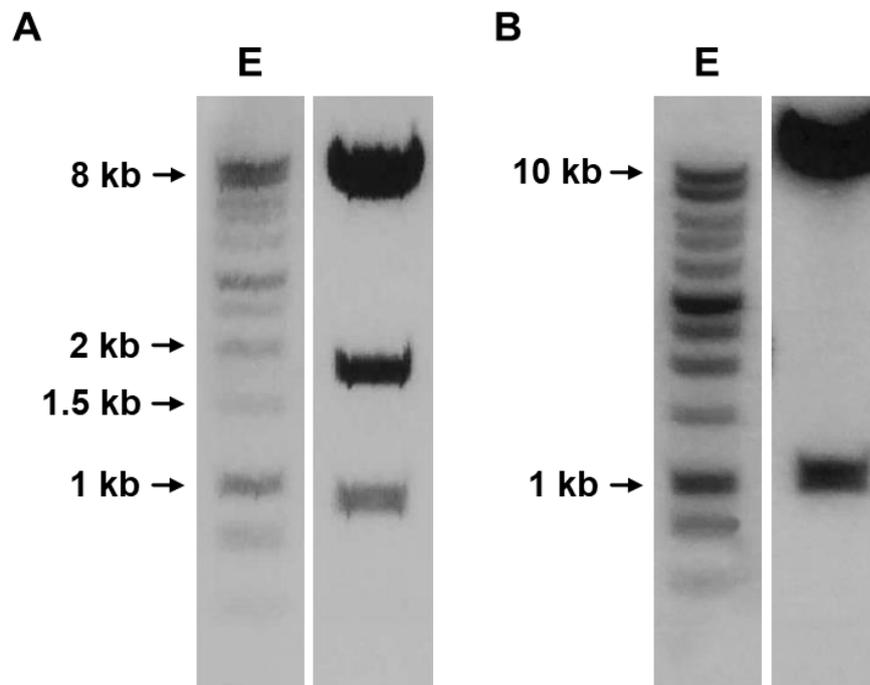


Figura 5. Digestión con enzimas de digestión para la corroboración de la integración de los insertos. A) pRM-89-AV digerido con *NheI* libera tres bandas de 7553 pb, 1777 pb y 911 pb. B) pRM-88-AV digerido con *NotI* HF y *AscI* libera dos bandas de 9820 pb y 937 pb. E= marcador de peso molecular 1 Kb (Promega).

2.2.3.2 Generación de versiones truncadas del gen *myo-5*

Para el diseño de las versiones truncadas del GTD y del subdominio II se empleó la estrategia de remplazamiento de gen (Split Marker Gene Replacement)(Smith et al., 2011). Ambas versiones se construyeron con base en la cepa MYO-5-GFP (Sánchez-León y Riquelme, 2015).

Para ambas versiones truncadas se diseñaron oligonucleótidos necesarios para la generación del fragmento en común 10xGly-GFP-HPH y los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho. Para la amplificación del fragmento GFP-HPH mediante PCR (2281 pb) se usaron los oligonucleótidos Ped_myo-5_p3GlyGFP-F y Ped_myo-5_p4hph-R (Figura 5) y se utilizó como molde el vector FJ457011 (pGFP::hph::loxP). Para la generación del fragmento izquierdo de la versión con el GTD truncado se diseñaron los oligonucleótidos Ped_myo-5_p1ORF-F y Ped_myo5_p2mut1-R, que amplificaban una región 2708 pb río abajo del codón de inicio del gen *myo-5* y excluían el GTD (Figura 6). Para el fragmento izquierdo de la versión con el subdominio II truncado se utilizaron los oligonucleótidos Ped_myo-5_p1ORF-F y Ped_myo5_p9mut3-R, que amplificaban la misma región del gen *myo-5* pero excluían el subdominio II (Figura 6). De la misma manera, para la generación del fragmento derecho se amplificó 1179 pb de la región río abajo del marco abierto de lectura del gen *myo-5*, utilizando los oligonucleótidos Ped_myo5_p53UTR-F y Ped_myo5_p63UTR-R (Figura 6). Para la amplificación de los

fragmentos izquierdo y derecho, de ambas versiones, se utilizó como molde el ADN genómico de la cepa MYO-5-GFP (Sánchez-León y Riquelme, 2015). Todas las PCRs se hicieron utilizando la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England®) y se purificaron directamente de la reacción de PCR.

Para la construcción del casete completo para cada una de las versiones truncadas, se fusionaron los tres fragmentos correspondientes en una sola reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos Ped_myo-5_p7nested-F y Ped_myo5_p8nested-R. El tamaño del casete completo de cada versión truncada se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó a partir de este.

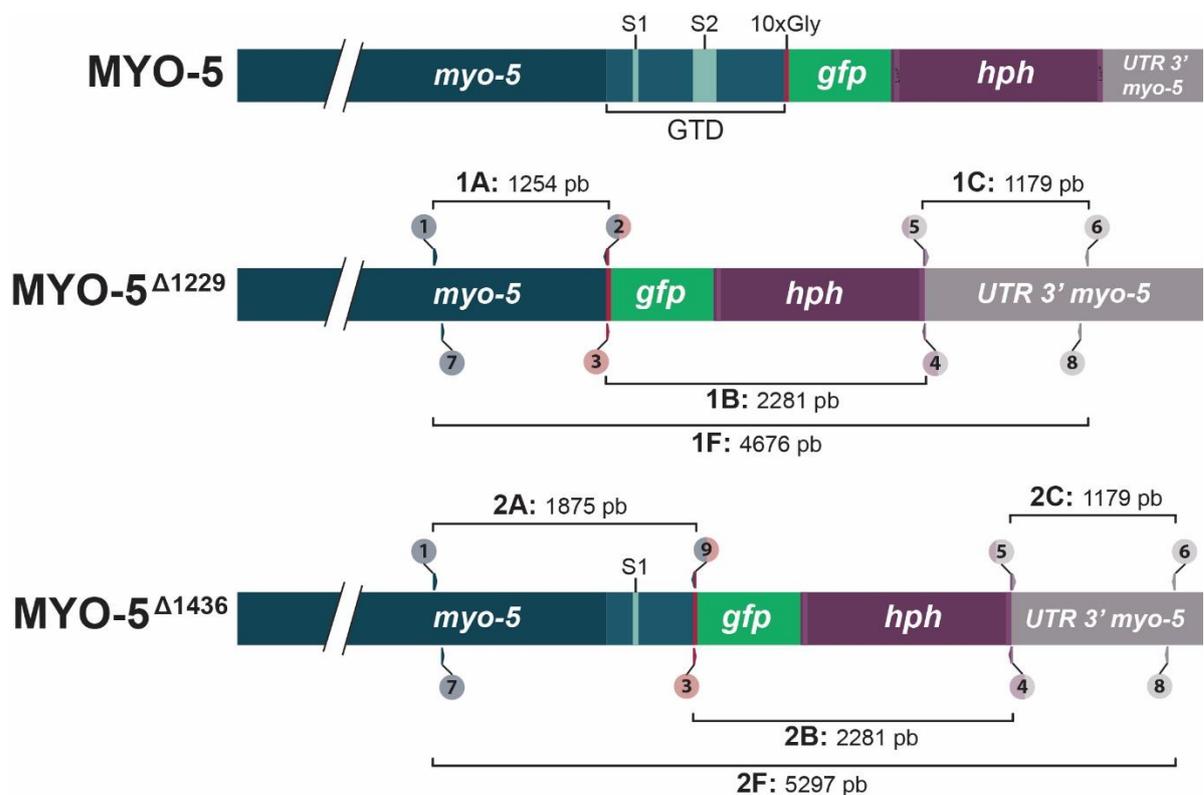


Figura 6. Esquema de las construcciones de cada una de las versiones truncadas del gen *myo-5* etiquetado con GFP. Se muestra las regiones de la cepa MYO-5-GFP como se construyó por Sánchez-León y Riquelme, 2015. La versión truncada *myo-5*^{Δ1229} que carece del dominio GTD y fue construida utilizando los oligonucleótidos 1 y 2 que amplifican la región 1A que corresponde al fragmento izquierdo de 1254 pb; los oligonucleótidos 3 y 4 que amplifican el fragmento 1B GFP-HPH de 2281 pb; los oligonucleótidos 5 y 6 que amplifican la región 1C que corresponde al fragmento derecho de 1179 pb. Para la versión truncada *myo-5*^{Δ1436} que no presenta el subdominio II se utilizaron los oligonucleótidos 1 y 9 que amplifican la región 2A que corresponde al fragmento izquierdo de 1875 pb; los oligonucleótidos 3 y 4 que amplifican el fragmento 2B GFP-HPH de 2281 pb; los oligonucleótidos 5 y 6 que amplifican la región 2C que corresponde al fragmento derecho de 1179 pb. Para ambas versiones truncadas, la fusión por PCR se hizo utilizando los oligonucleótidos 7 y 8. Esquema realizado utilizando el Illustrator for Biological Sequences IBS 1.0.1. y Adobe Illustrator CS6.

2.2.4 Transformación de conidios de *N. crassa* por electroporación

Para la transformación de conidios se mezclaron 1 µg de ADN con 90 µl de una suspensión de conidios (4.5×10^9 /ml) de la cepa FGSC#9717 (para los vectores pRM-88-AV y pRM-89-AV) y FGSC#9718 (para los casetes endógenos). La mezcla se transfirió a una celda de electroporación estéril y se incubó por 15 min en hielo. Con ayuda de un electroporador Bio-Rad Gene Pulser se dio un pulso eléctrico a la mezcla (voltaje 1.5 Kv, capacitancia 25 µF y resistencia 600 Ω) como se describe en (Margolin et al., 2000). Inmediatamente después del pulso eléctrico, se añadieron 900 µl de sorbitol 1M estéril y se mezcló delicadamente manteniendo en hielo. En tubo de centrifuga de 50 ml, se mezcló la solución de conidios transformados con 5 ml de medio de recuperación (Sales de Vogel 1X) y se incubó por 3 h a 30 °C en oscuridad en un hibridizador UVP HL-2000 HybriLinker™. La mezcla se centrifugó a 3,000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Los conidios transformados se resuspendieron en el volumen restante, se extendieron en placas de Petri con medio agar FGS que contenía sales de Vogel 1X, agar al 1% y una solución FGS al 1X (sorbosa al 20%, fructosa al 0.5% y glucosa al 0.5%). Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 a 5 días hasta que se obtuvieron colonias. Las transformantes obtenidas fueron analizadas por microscopía confocal láser con el fin de seleccionar aquellas que presentaran fluorescencia.

2.3 Microscopía

2.3.1 Microscopía confocal

Para las observaciones que requerían microscopía confocal, las células fueron crecidas en MMV (agar al 1.5% o 3%, sacarosa al 1.5%, sales de Vogel 1X). Para la manipulación de las muestras se utilizó el método del bloque de agar invertido (Figura 7) (Hickey et al., 2004).

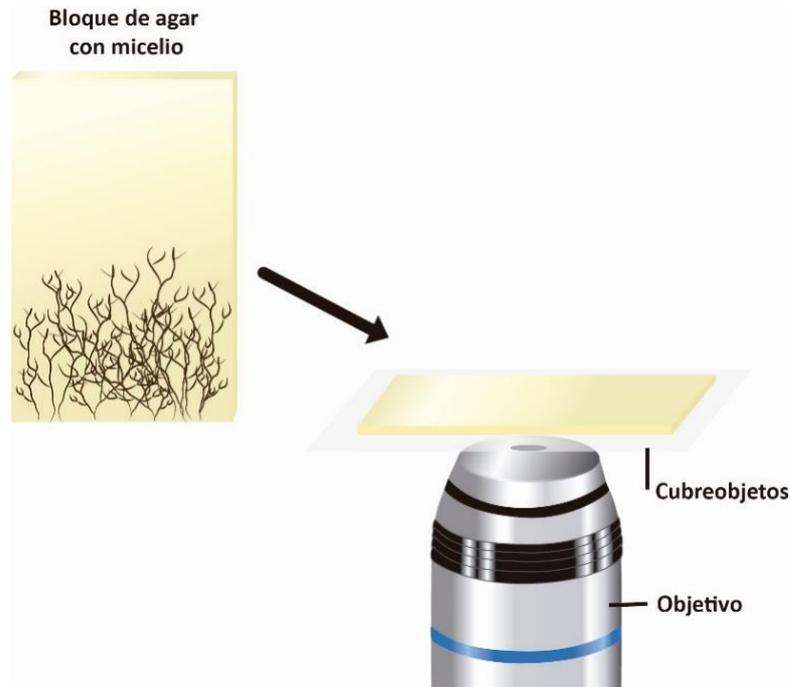


Figura 7. Esquema del método de bloque de agar invertido. El método consiste en cortar un bloque de agar de la placa que contenga la muestra y ponerlo sobre un cubreobjetos de tal manera que la muestra quede en contacto con éste. Modificado (Hickey et al., 2004).

Para la observación de conidios y germínulas, se extendieron 20 μl de conidios en una placa. Los conidios se observaron inmediatamente y las germínulas se incubaron durante 2 h y 3 h a 30°C para las cepas con fenotipo silvestre y mutante, respectivamente. Las observaciones de hifas maduras de las cepas con fenotipo silvestre y mutante se hicieron inoculando 10 μl y 1 μl de conidios, respectivamente, en una orilla de la placa y se incubaron durante 18 h a 30°C.

La visualización de GFP y el fluoróforo FM[®]4-64 se llevó a cabo en un microscopio confocal invertido de barrido láser Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan) equipado con un láser de argón/2 (filtro EGFP: excitación, 488 nm; emisión 505-525 nm) y un láser de estado sólido de bomba de iodo (DPSS, Melles Griot, Carlsbad, CA; filtro Texas Red: excitación 543 nm; emisión 612 nm). Se usó un objetivo de aceite de inmersión (AN 1.42) 60x PlanApoN (Olympus). Los datos, imágenes y videos fueron obtenidos utilizando el software FV10-ASW versión 04.02.02.09 (2003-2015, Olympus).

Para la visualización en tiempo real de las proteínas marcadas con proteínas fluorescentes se utilizó un microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-E Ti-E/B Spinning Disk (SDLCM, por sus siglas en inglés *Spinning Disk Laser Confocal Microscopy*) Confocal Scanner Unit CSU-X1 Yokogawa, equipado

con una cámara ANDOR iXon Ultra. Se usó un objetivo Apo TIRF 60x de inmersión en aceite (A.N. 1.49 aceite $\infty/0.13-0.21$ WD 0.12).

Las imágenes fueron procesadas en Adobe Photoshop CC 2014.1.0 y PowerPoint 2010 y los videos editados con los softwares Vegas Pro versión 13.0 (Build 290) y Camtasia Studio 8.1.2.

2.3.2 Técnica de FRAP

Para conocer el comportamiento dinámico de MYO-5-GFP y de Lifeact-GFP y TPM-1-GFP en un fondo mutante $\Delta myo-5$, se usaron las técnicas de microscopía de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) y de pérdida de fluorescencia durante el fotoblanqueamiento (FLIP, por sus siglas en inglés *Fluorescence Loss in Photobleaching*) utilizando el microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan). El tiempo de fotoblanqueamiento en todos los casos fue de 4s con una exposición del 100% del láser.

Los datos fueron analizados en Excel® 2010 (Microsoft®, Redmond, WA), las imágenes procesadas en Adobe Photoshop CC 2014.1.0 y PowerPoint 2010 y los videos editados con los softwares Vegas Pro versión 13.0 (Build 290) y Camtasia Studio 8.1.2.

2.3.3 Microscopía TIRF

Para visualizar la dinámica de MYO-5 etiquetada con GFP en tiempo real se utilizó el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-E Ti-E/B con microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM, por sus siglas en inglés *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*). El microscopio estaba equipado con una cámara Hamamatsu C11440 ORCA Flash 4.0 CMOS con 100 fps y con un módulo 6D Apo TIRF 60X Total Internal oil-immersion objective (NA 1.49 oil $\infty/0.13-0.21$ WD 0.12), utilizando en conjunto el software NisElements AR. Las velocidades y los kimogramas de movimiento de las partículas fluorescentes fueron obtenidos de series de tiempo usando el mismo software y los datos fueron procesados en Excel® 2010 (Microsoft®, Redmond, WA).

2.3.4 Colorantes utilizados

Para la visualización de estructuras membranosas (Fischer-Parton et al., 2000) se utilizó el fluoróforo vital N-(3-Triethylammopropyl)-4-(6-(4-diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM[®]4-64) a una concentración de 7 μ M en MMV líquido.

2.3.5 Microscopía Electrónica de Transmisión

Hifas de las cepas silvestre y la mutante $\Delta myo-5$ fueron crecidas sobre membranas de diálisis estériles y desionizadas en placas con MMV 1.5% a 23°C por 24 h. Posteriormente, fueron crio-fijadas mediante la inmersión rápida en propano líquido enfriado a -186°C con nitrógeno líquido. Se reemplazó con acetona que contenía tetraóxido de osmio al 2% y acetato de uranilo al 0.05% durante 48 h a 85°C. Se lavaron en acetona al 100%, se infiltraron en resina epoxi y se embebieron en dos capas de Teflón. Se polimerizaron a 60°C por 24 h. Después de la polimerización, las células fueron cortadas en un Ultramicrotomo Leica (Leica Mycrosystems Inc., Bannockburn, IL, USA) y después se tiñeron por 10 min con acetato de uranilo al 2% en etanol al 50% y durante 5 min en citrato de plomo. Los cortes se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés *Transmission electron microscopy*) FEI CM12S (FEI Electronics Instruments, Co., Mahwah, NJ) a 100 kV acoplado a una cámara digital Gatan 689 CCD (1024x1024 pixeles; Gatan Inc., Pleasanton, CA).

El procedimiento anteriormente descrito fue realizado en el laboratorio del Dr. Robert W. Roberson de la Universidad Estatal de Arizona (ASU) en Tempe, AZ.

2.4 Co-inmunoprecipitación

2.4.1 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteína, el micelio se trituró en un mortero preenfriado 24 h a 2°C añadiendo nitrógeno líquido y moliendo hasta obtener un polvo fino. El polvo se resuspendió en 2.5 ml de una solución amortiguadora de lisis que contenía 10 mM de Tris/ HCl [500 mM, pH 7.5], 150 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA y 0.5% de NP-40 adicionada en el momento con 1% de PMSF [100 mM], 0.26% de Benzamidina [0.5 mM] y 0.2% de un coctel de inhibidores de proteasas [500X] (BioVision) resuspendido en DMSO y se centrifugó a 4°C por 30 min a 15,000 rpm, recuperando el sobrenadante. Para cada una

de las muestras se midió la concentración de proteínas totales utilizando el reactivo de Bradford Sigma-Aldrich® siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.2 Western blot

Los ensayos de detección de la proteína MYO-5 etiquetada con GFP y la GFP citoplasmática, se hicieron por triplicado.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) utilizando un equipo para electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra (BIO-RAD®) extracto proteico a una concentración de 72.4 µg y los lavados. Los geles de 1 mm se prepararon a una concentración de 6% de poliacrilamida en placas de vidrio, por duplicado. La electroforesis se hizo a un voltaje constante de 80 V por 15 min, seguido de 120 V por 45-50 min. Posteriormente, uno de los geles se incubó con el colorante azul de Coomassie al 1% por 1 h. Las proteínas del gel no teñido se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés *Polyvinylidene fluoride*) (Immobilon de 0.45 µm, Millipore®) mediante electrotransferencia húmeda a 60 V por 2 h a 4°C, utilizando dos capas de papel filtro para Western Blotting (Thermo Scientific). La transferencia se hizo usando un equipo Mini Trans-Blot® Cell BIO-RAD®. Después, las membranas de PVDF se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante en una solución de bloqueo que contenía PBS-Tween 20 [1X] y 5% de leche descremada en polvo con 0% de grasa. Se hizo un lavado con una solución de PBS por 10 min. Para la inmunodetección con el primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo primario anti-GFP de ratón (Pierce® GFP Tag (GF28R) Mouse Monoclonal Antibody) a una concentración de 1:4000 en la solución de bloqueo. Se incubó toda la noche a 4°C en rotación constante. Se hicieron dos lavados de 5 min con PBS-T [1X] y se añadió el anticuerpo secundario contra IgG de ratón acoplado a HRP (Pierce® Goat Anti-Mouse Poly-HRP) diluido a 1:1000 en la solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Después de hacer 4 lavados de 10 min con PBS-T las membranas se revelaron utilizando el Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Inc.). Para la detección se utilizó un fotodocumentador para quimioluminiscencia BIO-RAD®.

2.4.3 Co-Imunoprecipitación con perlas magnéticas

Para conocer los adaptadores asociados a la proteína MYO-5-GFP se realizó un ensayo de Co-Imunoprecipitación (Co-IP) utilizando perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-GFP (GFP-Trap®_M, ChromoTek). Se utilizó la GFP citoplasmática como control. A 600 µl de extracto de proteínas a una concentración de 4.81 mg/µl se añadieron 30 µl de perlas magnéticas previamente equilibradas. Las perlas se equilibraron con 500 µl de una solución de dilución que contenía 10 mM de Tris/HCl [500 mM, pH 7.5], 150 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA, añadiendo en el momento 1% de PMSF [100 mM], 0.26% de Benzamidina [0.5 mM] y 0.2% de un coctel de inhibidores de proteasas [500X] (BioVision) resuspendido en DMSO. Las perlas se separaron magnéticamente del líquido utilizando un equipo SureBeads™ Magnetic Rack BIO RAD®, desechando el sobrenadante y se repitió el lavado con la solución de dilución. Las perlas se incubaron con el extracto de proteínas en un dispositivo de rotación constante (360°) a una velocidad de 10 rpm durante 3 h a 4°C. Al finalizar la incubación, las perlas se separaron magnéticamente del sobrenadante, el cual se colectó aparte. Las perlas se resuspendieron en 500 µl de la solución de dilución adicionada con los inhibidores de proteasas, se separaron magnéticamente, se colectó el sobrenadante y se repitió el lavado. Las perlas se resuspendieron en una solución de bicarbonato de amonio [25 mM], se separaron magnéticamente, se colectó el sobrenadante y se repitió el lavado con bicarbonato de amonio. Las perlas se preservaron en 300 µl de la solución de bicarbonato de amonio [25 mM] a -70°C para su posterior análisis en espectrometría de masas.

Se realizó un análisis por Western blot del extracto proteico de cada muestra, de los sobrenadantes colectados y de las perlas resuspendidas en la solución de bicarbonato de amonio para confirmar la presencia o ausencia de MYO-5-GFP o de GFP (Figura 8).

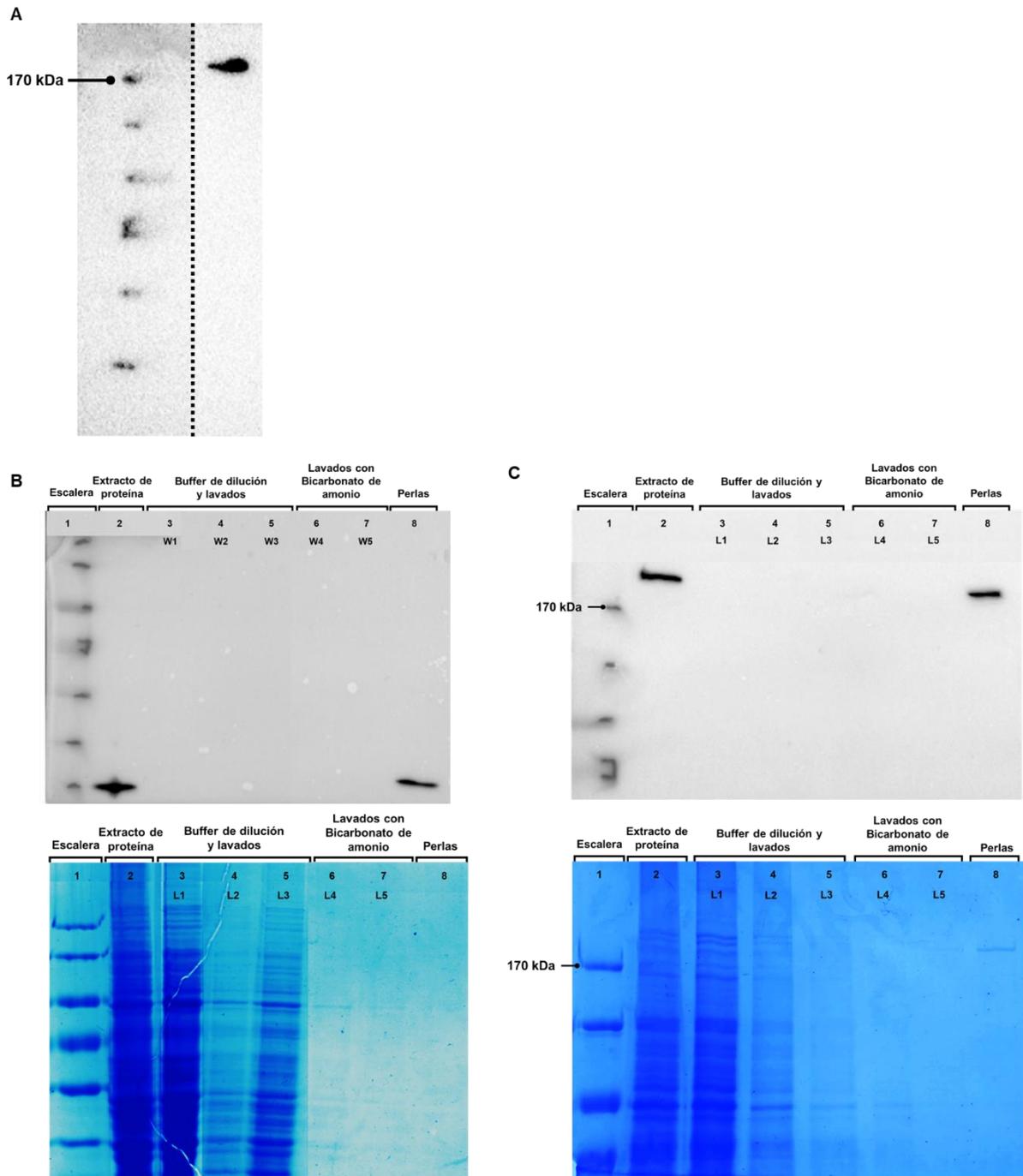


Figura 8. Detección de la MYO-5-GFP y GFP citoplasmática por Western blot. A) La banda de la izquierda corresponde a la escalera y la banda de la derecha a la proteína MYO-5-etiquetada con GFP (234 kDa). B) Membrana de PVDF revelada (panel superior) en donde se observa la banda correspondiente a la GFP (27 kDa) en la columna del extracto proteico y en la columna correspondiente al precipitado con las perlas. En el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (panel inferior) se observan todas las bandas de proteínas que van disminuyendo en intensidad conforme se hacen los lavados. C) En la membrana de PVDF revelada (Panel superior) se observa la banda de la MYO-5-GFP tanto en la columna del extracto proteico como en la del precipitado con las perlas. En el gel de poliacrilamida (panel inferior) se observa como disminuye la cantidad de proteína conforme se hacen los lavados. Se observa una banda en la columna del precipitado con las perlas que corresponde a la MYO-5-GFP.

2.4.4 Espectrometría de masas

Se sometieron a secuenciación por espectrometría de masas cinco réplicas de la Co-IP de MYO-5-GFP y tres réplicas de GFP citoplasmática. Primero, las muestras fueron evaporadas utilizando un SpeedVac y se disolvieron en una solución amortiguadora de muestra. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE de una una dimensión y se visualizaron por tinción RuBPS (por sus siglas en inglés *Ruthenium (tris(bathophenanthrolinedisulfonate), tetrasodium salt)*). Cada carril fue cortado en cuatro pedazos. Las proteínas se digirieron trópticamente, se separaron mediante nanoUPLC y se midieron en modo MSE utilizando un espectrómetro de masas Synapt G2-S. Se hizo una búsqueda en la base de datos de *N. crassa* en NCBI que incluía a todas las proteínas codificadas tanto cromosómica como mitocondrialmente. Se hizo una estimación aproximada de las abundancias de las proteínas y los datos fueron normalizados para MYO-5-GFP y GFP citoplasmática.

La espectrometría de masas fue realizada en la Universidad de Bochum, Alemania en el laboratorio del Dr. Ulrich Kuck.

2.5 Acoplamiento molecular del GTD de MYO-5 y los adaptadores

2.5.1 Análisis bioinformático

Se utilizó la base de datos FungiDB (Stajich et al., 2011) para hacer una búsqueda de las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas arrojadas por la secuenciación. Para la búsqueda de ortólogos se hizo un alineamiento de las secuencias proteicas utilizando BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). El análisis de dominios se realizó usando los programas UniProt (Consortium, 2018) y Expasy.

2.5.2 Modelaje y preparación de las proteínas

Los modelos tridimensionales del GTD de la proteína MYO-5 y de los siete posibles adaptadores fueron generados usando el servidor *I-TASSER* (por sus siglas en inglés *Iterative Threading ASSEmbly Refinement* (Yang y Zhang, 2015), una plataforma en línea para la predicción de la estructura de proteínas que utiliza alineamiento múltiple de enhebrado y simulación iterativa de ensamblaje de fragmentos del templete. Para cada proteína, el servidor *I-TASSER* mostró los cinco mejores modelos

estructurales que correspondían a los centroides de los clústeres conformacionales más grandes generados para la proteína dada (Yang y Zhang, 2015). Se hizo una inspección visual utilizando *UCSF Chimera* (Pettersen et al.) para descartar los modelos con regiones largas sin estructura secundaria definida que en su lugar mostraban secciones de bobinas aleatorias. De los modelos restantes, el modelo con el valor de *C-score* más alto se seleccionó como el mejor modelo estructural de la proteína correspondiente. El archivo de PDB de cada modelo seleccionado se procesó a través del servidor *PDB2PQR* (v2.1.0) (Dolinsky et al., 2007) para estandarizar los nombres de los átomos y residuos, y con *PROPKA* (Olsson et al., 2011) se estimaron los estados de protonación de los residuos ionizables a un pH de 7.0.

2.5.3 Simulación del acoplamiento proteína-proteína

Para predecir el modo de unión estructural entre el GTD de MYO-5 y los siete posibles adaptadores se llevó a cabo una simulación de acoplamiento. Se usaron los servidores *ZDOCK* (Pierce et al., 2014) y *FRODOCK* (por sus siglas en inglés *Fast Rotational DOCKing*) (Ramírez-Aportela et al., 2016a; Ramírez-Aportela et al., 2016b) para generar el complejo de acoplamiento. Ambos programas efectúan un acoplamiento molecular de cuerpo rígido proteína-proteína a través de la búsqueda de una complementariedad de superficie favorable y el empleo de funciones de puntuación basadas en potenciales energéticos para clasificar las conformaciones de acoplamiento identificadas (Pagadala et al., 2017). Cada programa devolvió las diez mejores conformaciones de acoplamiento para cada par de proteínas (MYO-5 y cada uno de las siete proteínas adaptadoras), generando en total 20 conformaciones de acoplamiento para cada uno de los siete complejos.

2.5.4 Reevaluación MM/GBSA de los complejos MYO-5/adaptador

Los diez mejores complejos MYO-5/adaptadores generados por ambos programas fueron reevaluados por el método MM/GBSA (por sus siglas en inglés *molecular mechanics [MM] with generalized Born [GB] model and surface area solvation [SA]*), un método preciso y riguroso basado en el campo de fuerza que combina la mecánica molecular con modelos de solventes implícitos para calcular la energía libre de unión o BFE (por sus siglas en inglés *binding free energy*) entre dos moléculas acopladas (Chen et al., 2016; Massova y Kollman, 2000). Con este método se calculó la BFE relativa de las 20 conformaciones de acoplamiento siguiendo la ecuación

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{complejo} - (\Delta G_{proteína-receptora} - \Delta G_{proteína-ligando}) \quad (1)$$

donde se definió al GTD de MYO-5 y a cada proteína adaptadora como proteína receptora y ligando, respectivamente. El ΔG de cada molécula se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta G_{molécula} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (2)$$

donde ΔE_{MM} es el cambio de las energías mecánicas moleculares, ΔG_{solv} es la suma de las energías de solvatación polar y apolar, y $T\Delta S$ es la contribución de la entropía conformacional de la BFE. La energía de solvatación polar es estimada usando el modelo de solvatación implícita generalizada de Borh (GB), mientras el termino apolar es determinado como una función lineal del área superficial accesible al solvente (Massova y Kollman, 2000).

Previo al cálculo de BFE, cada complejo MYO-5-adaptador fue sometido a minimización explícita de energía de solvatación utilizando el módulo LEaP de AmberTools (Cerutti et al., 2016), para solvatar cada complejo en una caja de agua TIP3P con 10 Å relleno en las tres dimensiones, y neutralizarlo con iones de Cl⁻ o Na⁺. Posteriormente, se realizó una etapa de minimización de energía empleando la versión CUDA de pmemd of Amber16 (Cerutti et al., 2016).

La evaluación por MM/GBSA de cada acoplamiento se llevó a cabo a través del programa *MMPBSA.py* (Miller III et al., 2012), usando el modelo OBC (Onufriev et al., 2004) (igb=2) con una concentración de 0.15 M, manteniendo los parámetros por defecto. La estimación de la entropía fue omitida, por lo que se asumió que el termino ($T\Delta S$) era similar a través de las diferentes conformaciones de acoplamiento del mismo complejo MYO-5-adaptador. Por lo tanto, la evaluación de ΔG no representó un valor absoluto de BFE, pero si un valor relativo de BFE.

Finalmente, se eligió la conformación de acoplamiento con el valor de ΔG más bajo de cada complejo MYO-5/adaptador y se identificaron los residuos que estaban interactuando formando contactos ≤ 4 Å en el programa Edu PyMOL™ versión 1.7.4.5 (Schrödinger, LLC).

2.5.5 Selección de los modelos de acoplamiento proteína-proteína

Antes de realizar la simulación de dinámica molecular, se hizo un análisis en el programa de visualización Edu PyMOL™ versión 1.7.4.5 (Schrödinger, LLC) para seleccionar solo las proteínas cuyas conformaciones de acoplamiento tuvieran residuos que no estuvieran interrumpiendo dominios

importantes y/o se localizaran en sitios o subdominios reportados en la literatura cuando estaban formando la interacción con el GTD de MYO-5.

2.5.6 Dinámica molecular de los modelos estructurales

2.5.6.1 Minimización, *Simulated annealing* y Equilibrado

Para cada modelo seleccionado, se minimizó la energía potencial del sistema por un proceso de 12 000 ciclos de refinamiento. Utilizando el método de *Simulated Annealing* (SA) se llevó a cabo la relajación del sistema para favorecer el equilibrio termodinámico a 310 K.

Durante el SA se utilizó un colectivo NVT con condiciones de frontera periódicas. El método de *Langenvin dynamics* fue empleado como termostato, el tiempo de integración fue de 2 fs por paso. Para el cálculo de las interacciones electrostáticas se utilizó el método de Particle Mesh Ewald con un cutoff de 10 Å. Por último, los enlaces que implicaban una interacción covalente con hidrógeno se mantuvieron rígidos utilizando el algoritmo SHAKE.

Con el fin de asegurar el equilibrio termodinámico a 310 K del sistema, se verificó que las energías cinéticas (E_k) de los átomos se ajustaran a la distribución Maxwell-Boltzmann para energías cinéticas. La ecuación es la siguiente:

$$f(E_k) = \sqrt{\frac{E_k}{\pi}} \left(\frac{1}{k_B T}\right)^{3/4} \cdot \exp\left(\frac{-E_k}{k_B T}\right) \quad (3)$$

Donde E_k es la energía cinética de cada uno de los átomos, T es la temperatura del sistema, k_B es la constante de Boltzmann que equivale a $0.00198657 \text{ kcal} = \text{mol}$, y $f(E_k)$ es la densidad de probabilidad de las energías cinéticas a una temperatura T (Phillips et al., 2005; Satoh, 2010).

Para evaluar el ajuste con la probabilidad distribución E_k a una T determinada, se hizo el cálculo del error total que corresponde a la suma del cuadrado de las diferencias entre los rangos numéricos de las frecuencias esperadas menos las observadas.

2.5.6.2 Simulación de Dinámica molecular

Para evaluar la estabilidad conformacional del modelo del GTD de MYO-5 y de las conformaciones de acoplamiento, se llevó a cabo una simulación de Dinámica molecular. Para ello se utilizaron los archivos que contenían las coordenadas de los átomos y las velocidades correspondientes al último paso de equilibrado. El intervalo de integración utilizado fue de 2 fs, con el colectivo NPT, manteniendo la temperatura del sistema a $T \approx 310$ K, y la presión a $P \approx 1$ atm. El tiempo total de simulación fue de 5 ns para el modelo del GTD de MYO-5 y de 2.5 ns para los dos modelos de acoplamiento seleccionados. Para todos los casos, se hicieron 3 réplicas del experimento.

2.5.6.3 Análisis de las trayectorias de la dinámica molecular

Utilizando los programas VMD 1.9.3 (Visual molecular dynamics) (Humphrey et al., 1996) y Excel® 2010 (Microsoft®, Redmond, WA) se hizo un análisis de las trayectorias de la dinámica molecular.

2.5.6.3.1 RMSD

El análisis conformacional se hizo utilizando la medida RMSD que mide la distancia media entre los átomos de dos estructuras moleculares previamente superpuestas mediante el algoritmo de Kabsch (Grant et al., 2006). El RMSD para el modelo de GTD de MYO-5 y las conformaciones de acoplamiento considero únicamente los carbonos α ($C\alpha$) y se evaluó cada *frame* t a lo largo del tiempo de la trayectoria frente al frame de referencia $t = 0$, el cual corresponde a la estructura inicial de los modelos. La ecuación de RMSD es la siguiente:

$$RMSD_{t,0} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \| r_i(t) - r_i(0) \|^2} \quad (4)$$

donde $RMSD_{t,0}$ es el valor de RMSD en Å entre una estructura en el instante t y una estructura de referencia en el instante 0. N es el número de átomos ($C\alpha$) en la proteína; $r_i(t)$ y $r_i(0)$ son los vectores de coordenadas del átomo i en los frames t y 0, respectivamente.

2.5.6.3.2 RMSF

Para evaluar la flexibilidad estructural de los residuos o regiones en la proteína se utilizó la medida de RMSF, en el que se evalúa de forma independiente cada $C\alpha$ de cada residuo y se usa como estructura de referencia la media de todas las coordenadas (x, y, z) que este átomo tiene a lo largo de la trayectoria. La ecuación es la siguiente:

$$RMSF_j = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \|\alpha_{ij} - \bar{\alpha}\|^2} \quad (5) \quad \bar{\alpha} = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \alpha_i \quad (6)$$

donde $RMSF_j$ es el valor de RMSF en Å del $C\alpha$ de un residuo j de la proteína. T es el número de *frames* en la trayectoria; α_{ij} es el vector de coordenadas de α en el *frame* i del residuo j ; y $\bar{\alpha}$ es el vector de la media de las coordenadas de α en el residuo j tomando en cuenta todos los *frames*.

2.5.6.4 Análisis de los componentes principales del GTD de MYO-5

Se realizó un ensayo de análisis de los componentes principales (ACP) del modelo del GTD de MYO-5, el cual permite hacer un análisis de la “dinámica esencial” de las conformaciones de acoplamiento y el GTD de MYO-5 y describe los principales cambios conformacionales asociados a las fluctuaciones estructurales más relevantes durante la trayectoria de la dinámica molecular (Skjærven et al., 2014; Stein et al., 2006). El ACP se llevó a cabo empleando la función `pca.xyz()` del paquete *Bio3D* (Grant et al., 2006), la cual presenta los datos de la trayectoria en una matriz con columnas que corresponden a coordenadas cartesianas de los átomos y filas que representan los *frames* de la etapa de producción de la Simulación de dinámica molecular.

El modelo de dinámica esencial fue generado utilizando el software de visualización UCSF Chimera (Pettersen et al.).

2.5.6.5 Dinámica *in vivo* de los acopladores y MYO-5

Para inhibir la actividad de la proteína miosina de clase V en la cepa control MYO-5-GFP, placas con MMV 1.5% fueron adicionadas con diferentes concentraciones de Pentabromopseudilina (2,4-Dibromo-6-(3,4,5-tribromo-1H-pyrrol-2-yl)phenol) (BioViotica) diluido en DMSO que iban de 0.002 μ M a 2 μ M. La cepa MYO-5-GFP fue incubada a 30 °C por 18 h.

Se hicieron observaciones en el microscopio confocal Olympus. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software FV10-ASW versión 04.02.02.09 (2003-2015, Olympus), Adobe Photoshop CC 2014.1.0 y PowerPoint 2010.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Proteínas asociadas a MYO-5

3.1.1 Co-IP de la proteína MYO-5

Debido a que la unión de las miosinas de clase V a las cargas requiere de la asociación con adaptadores específicos, primero se identificaron los adaptadores asociados a MYO-5 mediante un ensayo de Co-IP con perlas magnéticas GFP_TRAP® y secuenciación por espectrometría de masas.

Los resultados de la secuenciación mostraron 187 proteínas aisladas (Anexo A). A los datos correspondientes a MYO-5-GFP se le asignó un valor de 100, y se obtuvo una razón para las otras proteínas para establecer la abundancia relativa con respecto a esta proteína. Se obtuvo el promedio de la abundancia de las réplicas del experimento y únicamente se consideraron las proteínas que tuvieran valores arriba de 0 (Anexo A). Los datos fueron comparados con la cepa control que expresaba GFP citoplasmática, para solo incluir las que se asociaban a la MYO-5. De esta manera, de las 187 proteínas que fueron aisladas de la Co-IP quedaron 146.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis bioinformático y bibliográfico, para determinar funciones y dominios de estas proteínas y determinar cuáles podían ser de interés (Anexo A). Se encontraron 59 proteínas que eran componentes o participaban en el ensamblaje de los núcleos, mitocondrias, proteosomas y ribosomas, o estaban involucrados en el proceso de división nuclear y/o transcripción; 41 proteínas estaban involucradas en la biosíntesis de compuestos celulares como aminoácidos, vitaminas, nucleósidos y azúcares; seis proteínas estaban involucradas en diferentes procesos como la destrucción de radicales libres; tres proteínas participaban en la respuesta a estrés o la represión de metabolitos como el nitrógeno; en 20 proteínas no se encontraron dominios o funciones conocidas y 17 proteínas tenían funciones que podrían ser de nuestro interés de acuerdo a los estudios previos en relación a la miosina de clase V (Anexo A).

Dentro de las 17 proteínas de interés encontramos: la proteína actina (NCU04173), la cual forma filamentos a través de los cuales presuntamente se mueve la MYO-5; CDC4 (NCU06617) y CDM (NCU04120), que son proteínas reguladoras del dominio motor de la miosina de clase V (Borkovich et al., 2004; Galagan et al., 2003; McCollum et al., 1995; Mouriño-Pérez, 2013; Mouriño-Pérez y Riquelme, 2013; Naqvi et al., 1999; Tamuli et al., 2013); SNA-10 (NCU00242) una proteína que tiene un dominio PX y un dominio SNARE, que podría estar involucrada en el tráfico de vesículas o vacuolas ; RHO-1 (NCU01484), una Rho-GTPasa pequeña involucrada en la regulación del crecimiento de hifas y la polarización celular (Kwon et al., 2011; Smith et al., 2011; Vogt, 2008); YPT-31 (NCU01523), una Rab-GTPasa pequeña homóloga a la Rab11a de mamíferos y Ypt31/32p de *S. cerevisiae*, que participa

en el tráfico de vesículas (Jedd et al., 1997; Pantazopoulou et al., 2014; Sánchez-León et al., 2015); la proteína hipotética NCU03062, que tiene dominios de unión a formina; la proteína clatrina (NCU04115) y una posible proteína reguladora de la formación de las vesículas recubiertas de clatrina (NCU01883); cinco proteínas (NCU04075, NCU06743, NCU09269, NCU07574, NCU06459) con dominios y/o motivos de unión a RNA como el dominio RRM, RBD, Plectina/s10, RAN, factor-2 de transporte nuclear, similar a Rsm1 o un motivo similar a dedos de zinc, cuya importancia radica en que en *N. crassa* no se ha reportado que su única miosina de clase V este transportando mRNA; la proteína RCM-1 (NCU06842) se ha reportado que es importante para la fusión de las hifas, la morfología normal y el desarrollo sexual y asexual (Roca et al., 2010); CPC-2 (NCU05810), se reportó que era requerida para la activación general del control de aminoácidos bajo condiciones de estrés en *N. crassa* (Müller et al., 1995); y una proteína hipotética (NCU08316), cuyos dominios sugieren que podría estar involucrada en el transporte de vesículas.

Finalmente, se eligieron únicamente ocho proteínas de interés para los análisis posteriores (Tabla 6). Las proteínas seleccionadas fueron: SNA-10 (NCU00242), RCM-1 (NCU06842), a las cinco proteínas de unión a RNA (NCU04075, NCU06743, NCU09269, NCU07574, NCU06459) y la proteína con NCU08316.

Tabla 6. Descripción de MYO-5 y de los adaptadores de interés asociados a MYO-5 obtenidos por secuenciación

#NCU	Proteína	Tamaño	Dominios
NCU01440	MYO-5	1594 aa (GTD: 440 aa)	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio GTD (1155-1594) • Subdominio I (1155-1304 y 1513-1552) • Subdominio II (1317-1302) • Sitio hipotético de unión a vacuolas (1292-1302) • Sitio hipotético de unión a vesículas (1436-1488)
NCU00242	SNARE complex-10 (SNA-10)	562 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio PX (14-121) • Dominio SNARE (320-391)
NCU06842	RCM-1	917 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio perfil de repetición TPR (40-528)
NCU04075	Proteína hipotética	598 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Motivo similar a dedos de zinc C3HC (131-259) • Dominio similar a Rsm1 (327-430)
NCU06743	Proteína hipotética (CRP-1)	163 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio Plectina/s10 (3-95)
NCU09269	RAN	215 aa	<ul style="list-style-type: none"> • GTPasa pequeña RAN (2-165)
NCU07574	Proteína hipotética	527 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio Nuclear transport factor 2 (NTF2) (43-158) • Motivo RRM (RNA recognition motif) (378-471)
NCU06459	RBA-1	789 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio RRM (80-124) • Dominio RBD (RNA-binding domain) (201-352 y 426-572) • Peptido señal (1-37) • Dominio RSN1_TM (87-251)
NCU08316	Proteína hipotética	1305 aa	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio RSN1 con 7 dominios transmembrana (715-1042) • Dominio PHM7_ext (1221-1297) • 10 dominios transmembrana

3.2 Simulación de acoplamiento molecular entre el dominio GTD de MYO-5 y los adaptadores

3.2.1 Modelaje estructural del dominio GTD de MYO-5 y los adaptadores

Primeramente, se hizo una simulación de acoplamiento para determinar la manera en que MYO-5 y los ocho adaptadores seleccionados estaban asociándose.

Se generaron modelos estructurales de MYO-5 y los ocho adaptadores utilizando la plataforma en línea *I-TASSER* (Yang y Zhang, 2015). Debido a que la plataforma *I-TASSER* solo permite el modelaje de 1500 aminoácidos totales y que estábamos interesados en las interacciones entre el GTD de MYO-5 y los adaptadores hipotéticos, únicamente modelamos 440 aminoácidos correspondientes a esta región.

El modelo tridimensional del GTD de MYO-5 nos permitió identificar que el dominio está conformado por 15 hélices- α que se encuentran conectadas por bucles de diferentes tamaños (Figuras 9). Las hélices 1-5 conforman el subdominio I, seguidas de la hélice más larga, 6 (45 residuos) que conecta al subdominio I con el subdominio II. Las hélices 7-13 forman el subdominio II de donde emerge un bucle C-terminal largo que se extiende por las hélices 6, 3, 2 y 1, de donde se forma una hélice 14 (que también conforma al subdominio I) y finaliza con una hélice 15 corta (Figura 9). Los residuos que conforman el GTD de MYO-5 en *N. crassa* fueron identificados mediante un *BLASTp* con la secuencia proteica del GTD de Myo2p de *S. cerevisiae*, así como cada uno de los subdominios y sitios que lo conforman (Pashkova et al., 2006).

Por otra parte, el análisis de los modelos estructurales de los ocho adaptadores mostró que la proteína NCU08316 de 1305 aa está conformada por 12 hojas- β y 36 hélices- α conectados por bucles de diversos tamaños (Figura 10); SNA-10 (NCU00242) de 562 aa está formada por 5 hojas- β y 16 hélices- α (Figura 11A); la RCM-1 (NCU06842) de 917 aa es una proteína compuesta por 33 hélices- α (Figura 12A); la proteína NCU04075 de 598 aa está integrada por 17 hélices- α y 4 hojas- β (Figura 13A); la proteína NCU06743 de 163 aa está formada por 5 hélices- α y 4 hojas- β (Figura 14A); la proteína NCU09269 de 215 aa está compuesta por 8 hélices- α y 6 hojas- β (Figura 15A); la proteína NCU07574 de 527 aa tiene 6 hélices- α y 11 hojas- β (Figura 16A); y la proteína RBA-1 (NCU06459) con 798 aa se encuentra integrada por 16 hélices- α y 18 hojas- β (Figura 17A). Aunque el modelo estructural de la proteína NCU08316 fue generado, el posterior ensayo de simulación de acoplamiento molecular no pudo llevarse a cabo debido al tamaño de la proteína.

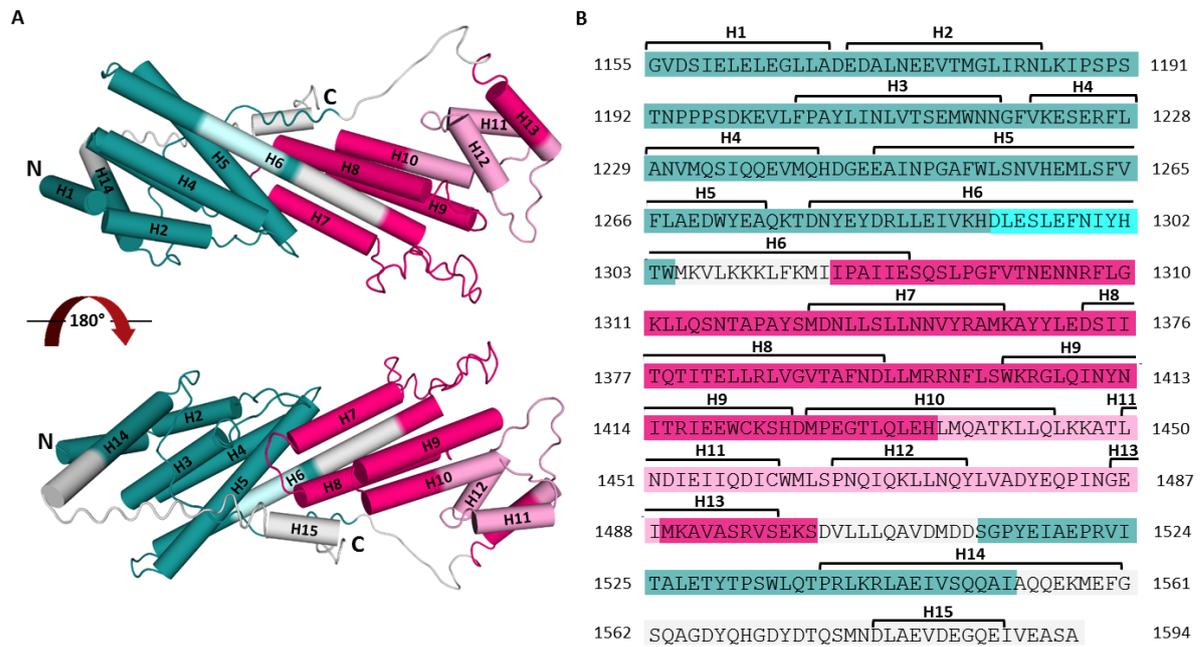


Figura 9. Modelo estructural del dominio globular de la cola de la proteína MYO-5. A) Representación de la estructura y localización de los subdominios en dos orientaciones. Las estructuras cilíndricas representan a cada una de las 15 hélices- α que conforman a la proteína, unidas a través de bucles de diferentes tamaños. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Secuencia proteica del GTD de MYO-5. Se muestran los aminoácidos que conforman a los subdominios, sitios de unión y las hélices- α . Cian oscuro: Subdominio I; Cian: Sitio hipotético de unión a vacuolas; Rosa intenso: Subdominio II; Rosa: Sitio hipotético de unión a vesículas; Blanco o gris: zonas que no son parte de los subdominios.

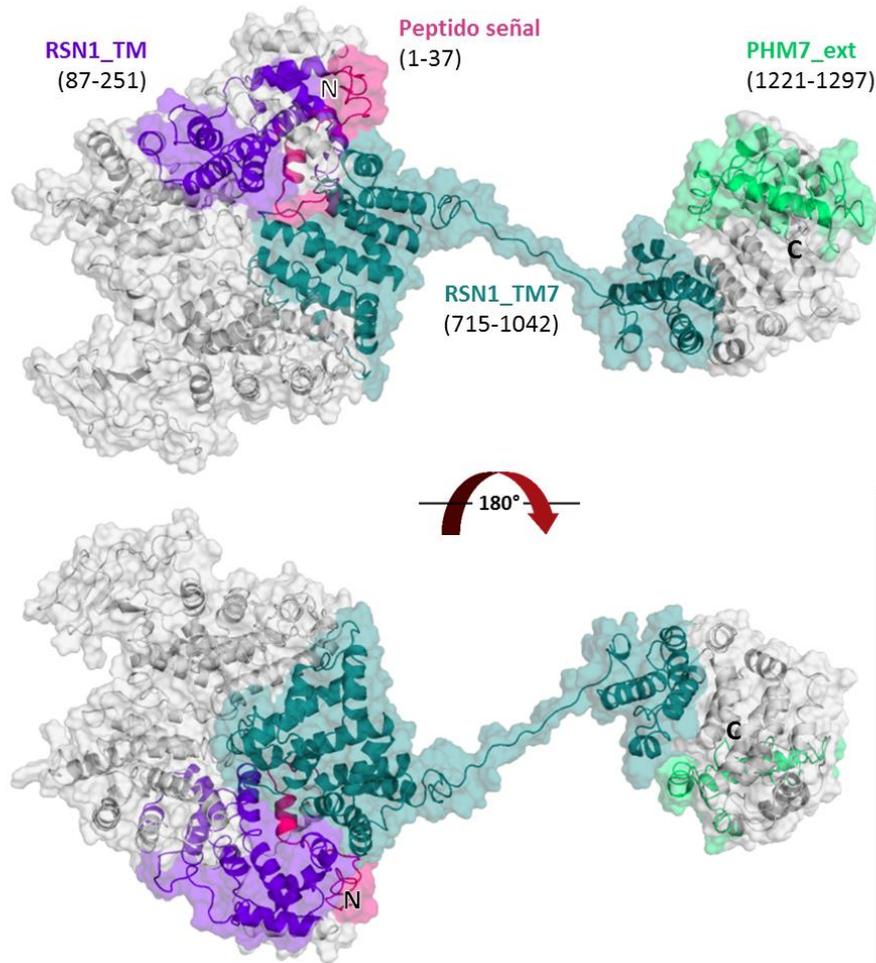


Figura 10. Estructura de la proteína con NCU08316. Representación superficial y en cintas de la estructura en dos orientaciones. El péptido señal está en rosa intenso, el dominio RNS1_TM está en azul morado, el dominio RSN1 con 7 dominios transmembranales está en cian oscuro y el dominio PHM7_ext está en verde lima. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente.

3.2.2 Acoplamiento molecular entre MYO-5 y los adaptadores

Los modelos de acoplamiento molecular entre el GTD de MYO-5 y los siete adaptadores se generaron y seleccionaron utilizando los servidores *ZDOCK* y *FRODOCK*.

Basados en los modelos de acoplamiento, se identificaron los residuos en el GTD de MYO-5 que estaban formando contactos ≤ 4 Å con los adaptadores y viceversa (Tabla 6 y Figuras 11-17). Encontramos que el GTD de MYO-5 interactúa con la proteína SNA-10 (NCU00242) principalmente entre los residuos que van del 1229-1291 y 1516-1579 correspondientes al subdominio I y los residuos del 1292-1299 que incluyen parte del sitio de unión a vacuolas (Figura 11C). A su vez, SNA-10 interactúa con el GTD de MYO-5 en los residuos 425-516 y 552-556 de la región C-terminal, sin interrumpir

ninguno de sus dominios (Figura 11C). Del mismo modo, el GTD de MYO-5 interactúa con la proteína RCM-1 (NCU06842) en los residuos 1238-1254 y 1527-1537 que corresponden al subdominio I, con los residuos 1325-1328 y 1364-1416 correspondientes al subdominio II, y con los residuos 1560-1579, sin embargo, ninguna de estos corresponde a algún sitio hipotético de unión en el GTD (Figura 12C). A su vez, RCM-1 interactúa con el GTD de MYO-5 en los residuos 253-337, 497-500 y 528-532 que en su mayoría forman parte de su dominio TPR (Figura 12C). Por otra parte, la interacción del GTD de MYO-5 con la mayoría de las proteínas de unión a RNA se da en sitios variables dentro de todo el dominio y no presentan un patrón particular. Además, en casi todas las proteínas de unión a RNA los residuos que interactúan con el GTD de MYO-5 forman parte de los dominios de unión a RNA (Figura 13-17). Únicamente en la proteína con NCU06459, los dominios o motivos de unión a RNA no están interrumpidos por la unión de GTD de MYO-5 y los residuos que participan en la interacción se localizan principalmente en la región C-terminal de la proteína (4-11, 511-517, 563-614 y 675-691) (Figura 17C). Interesantemente, los residuos del GTD de MYO-5 que interactúan con el adaptador NCU06459 corresponden al subdominio II (residuos 1322-1423) y a una sección del sitio hipotético de unión a vesículas (residuos 1444-1446 y 1478-1482), y no se localizan en sitios variables a lo largo de todo el dominio como el caso de los demás adaptadores con dominios de unión a RNA (Figura 17C).

Con base en los análisis anteriores, se seleccionaron algunos de los modelos de acoplamiento para los análisis posteriores. La selección se llevó a cabo estableciendo una prioridad para cada adaptador (Tabla 7). Una prioridad alta significó que los residuos que estaban formando la interacción entre el GTD de MYO-5 y los adaptadores no interrumpían dominios importantes y/o se localizaban en sitios en particular. Se designaron con prioridad alta a los complejos formados por el GTD de MYO-5 y SNA-10 y al formando con la proteína RBA-1 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de los sitios de interacción entre el GTD de MYO-5 y los adaptadores

Proteína	NCU	Dominio globular de la cola (GTD) de MYO-5 (1155-1594)				Otros sitios	Prioridad
		Subdominio I (1155-1304 y 1513-1552)		Subdominio II (1317-1500)			
		Sitio hipotético de unión a vacuolas (1292-1302)	Otros sitios	Sitio hipotético de unión a vesículas (1436-1488)	Otros sitios		
SNA-10	242	✓	✓		✓		Alta
RCM-1	6842		✓		✓	✓	Baja
Proteínas de unión a RNA	4075		✓			✓	Media
	6743		✓		✓	✓	Baja
	9269		✓		✓	✓	Baja
	7574			✓	✓		Media
	6459			✓	✓		Alta

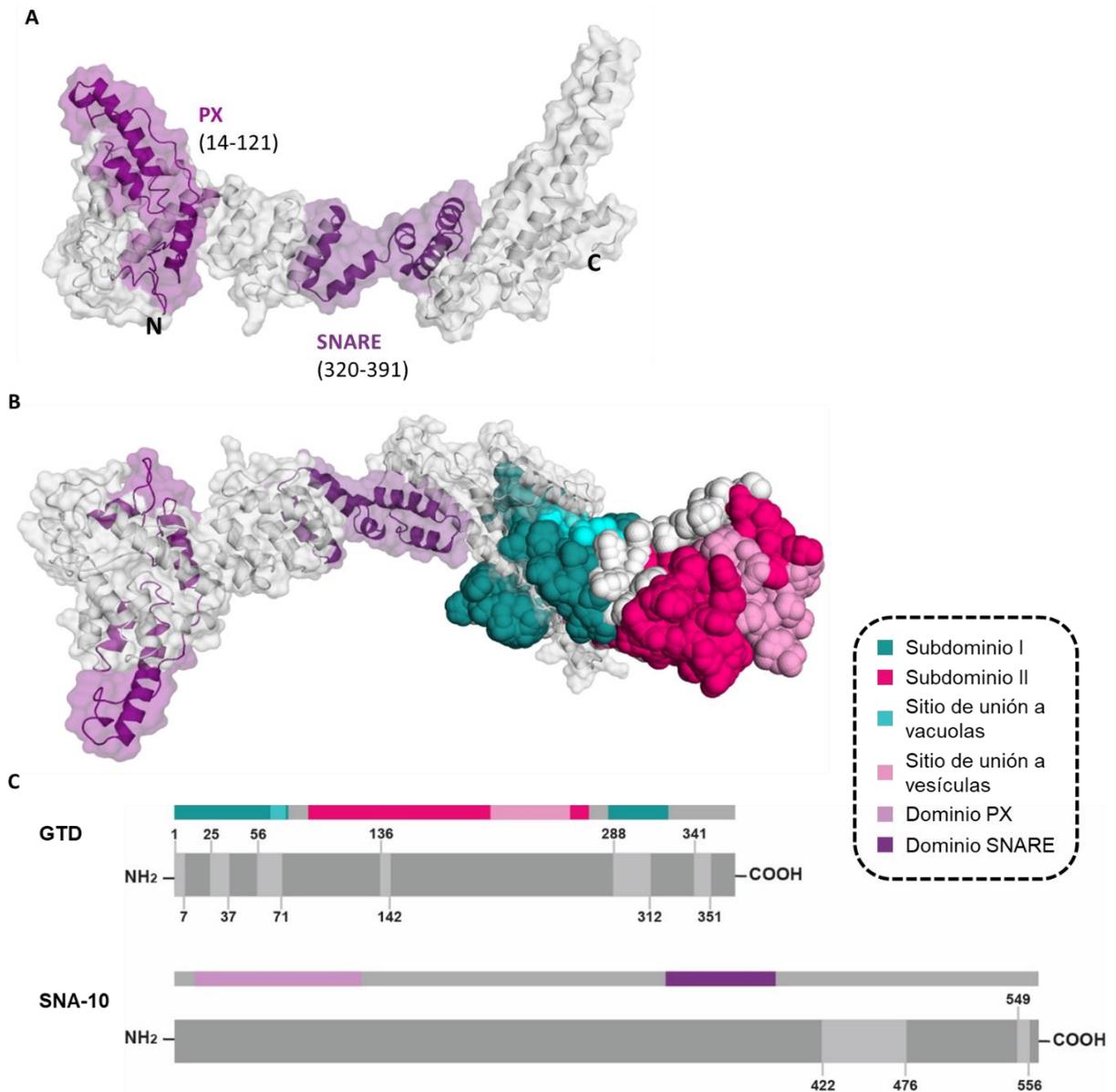


Figura 11. Modelo estructural de la proteína SNA-10 (NCU00242) asociada al GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de SNA-10. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína SNA-10 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa a SNA-10 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos ≤ 4 Å dentro del complejo formado por SNA-10 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

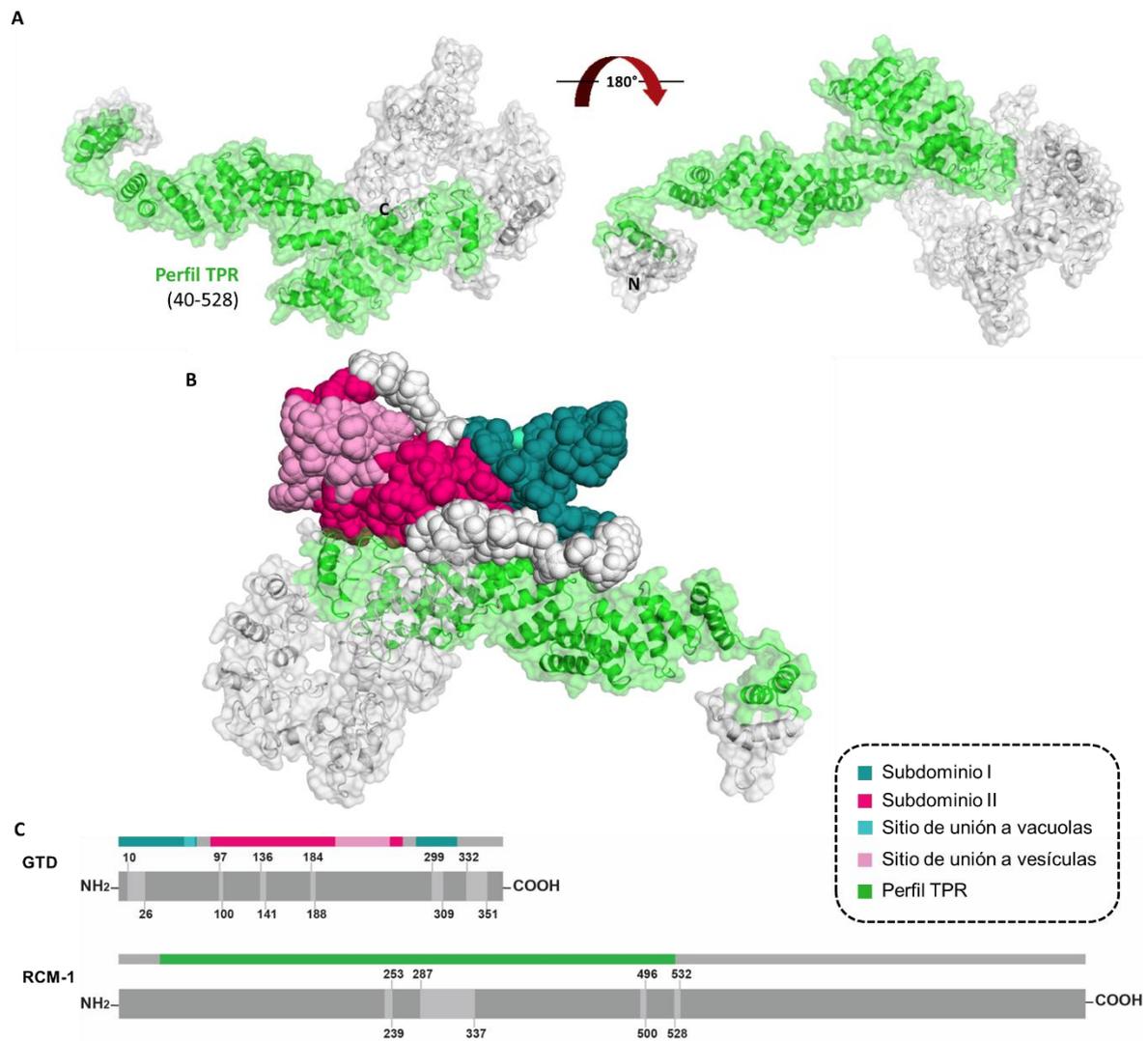


Figura 12. Modelo estructural de la proteína RCM-1 (NCU06842) asociada al GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína RCM-1. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína RCM-1 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa a RCM-1 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos $\leq 4 \text{ \AA}$ dentro del complejo formado por RCM-1 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

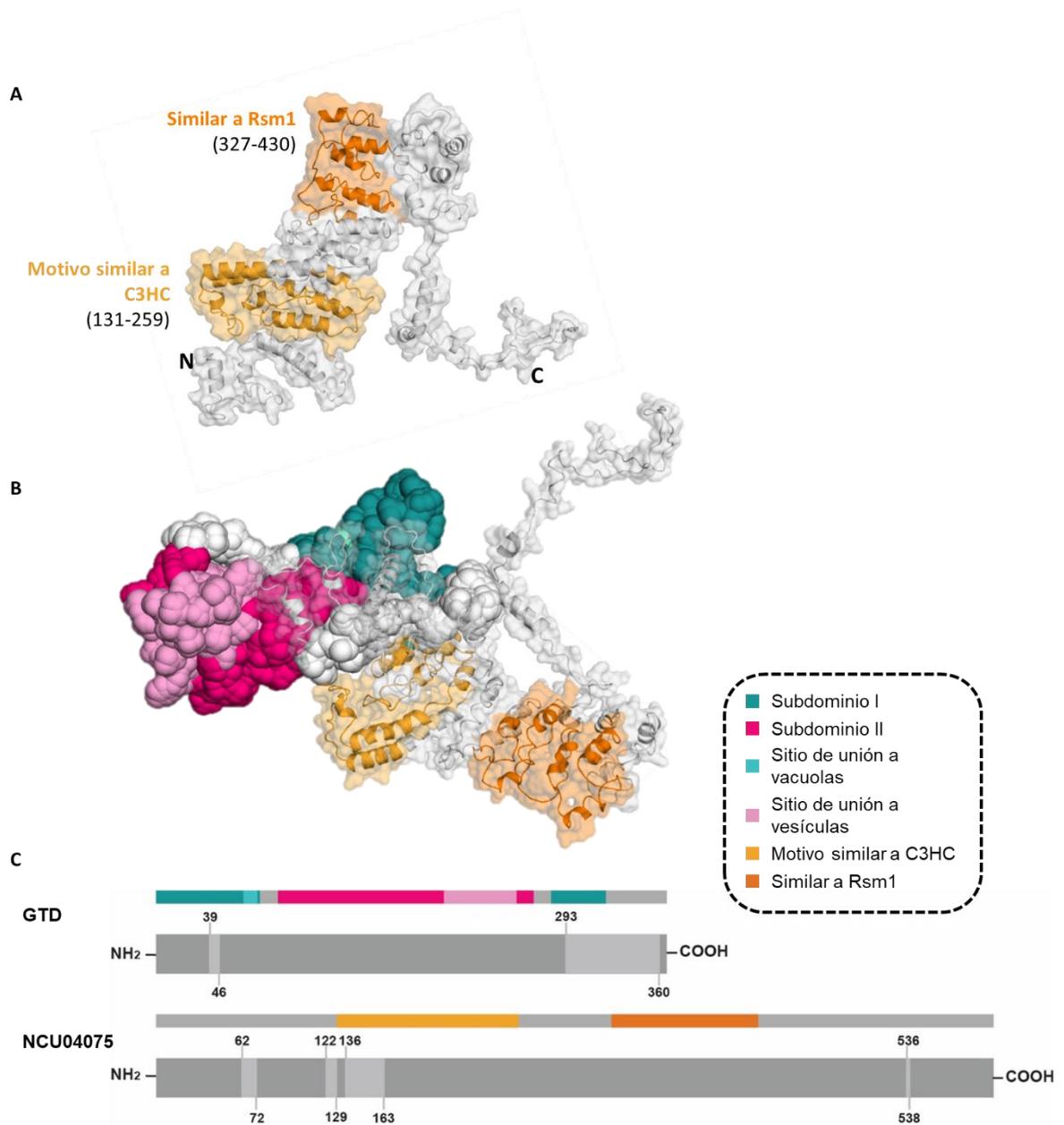


Figura 13. Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU04075 interactuando con el GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína NCU04075. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína con NCU04075 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa al NCU04075 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos $\leq 4 \text{ \AA}$ dentro del complejo formado por el NCU04075 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

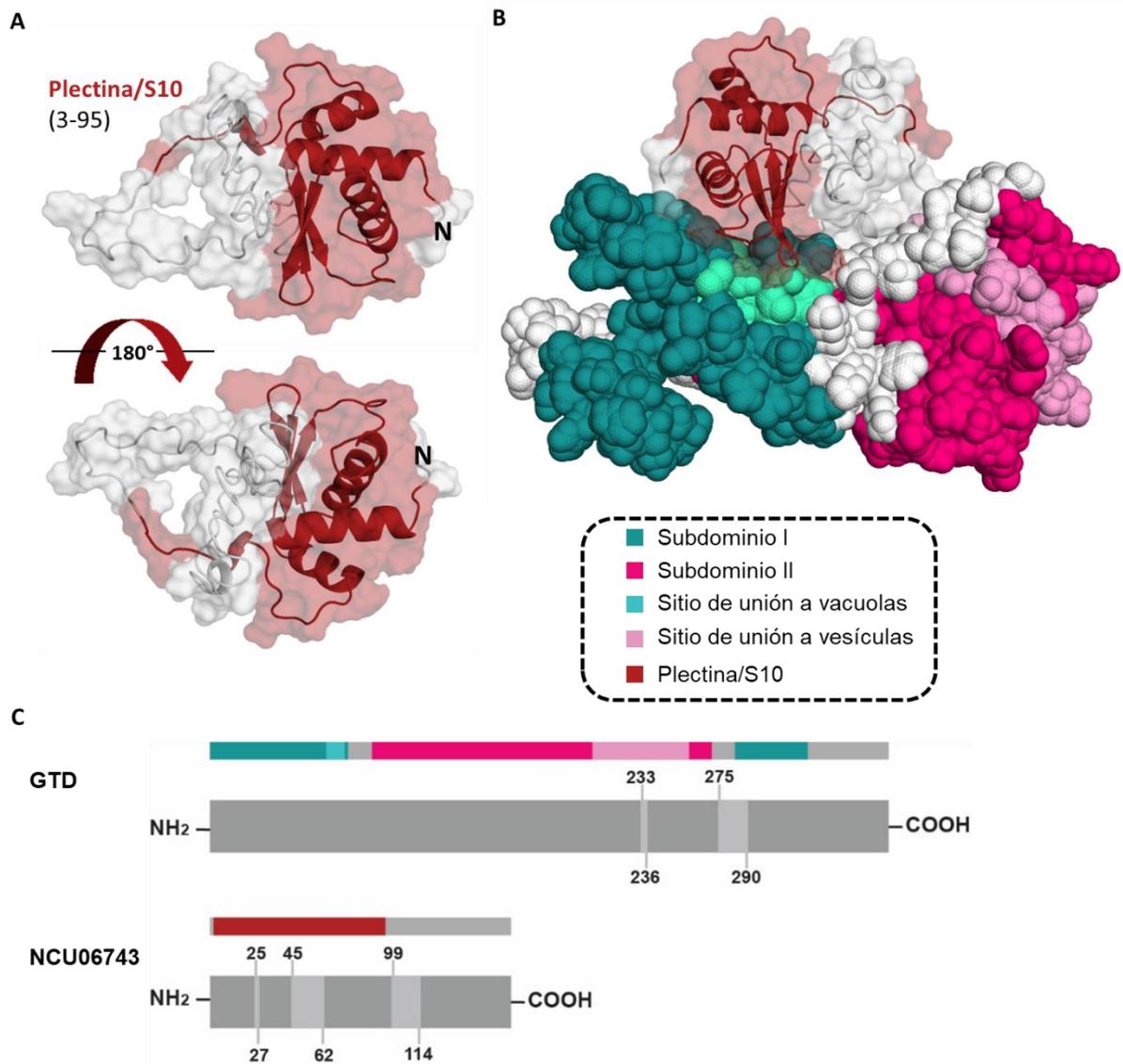


Figura 14. Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU06743 interactuando con el GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína NCU06743. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína con NCU06743 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa al NCU06743 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos ≤ 4 Å dentro del complejo formado por el NCU06743 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

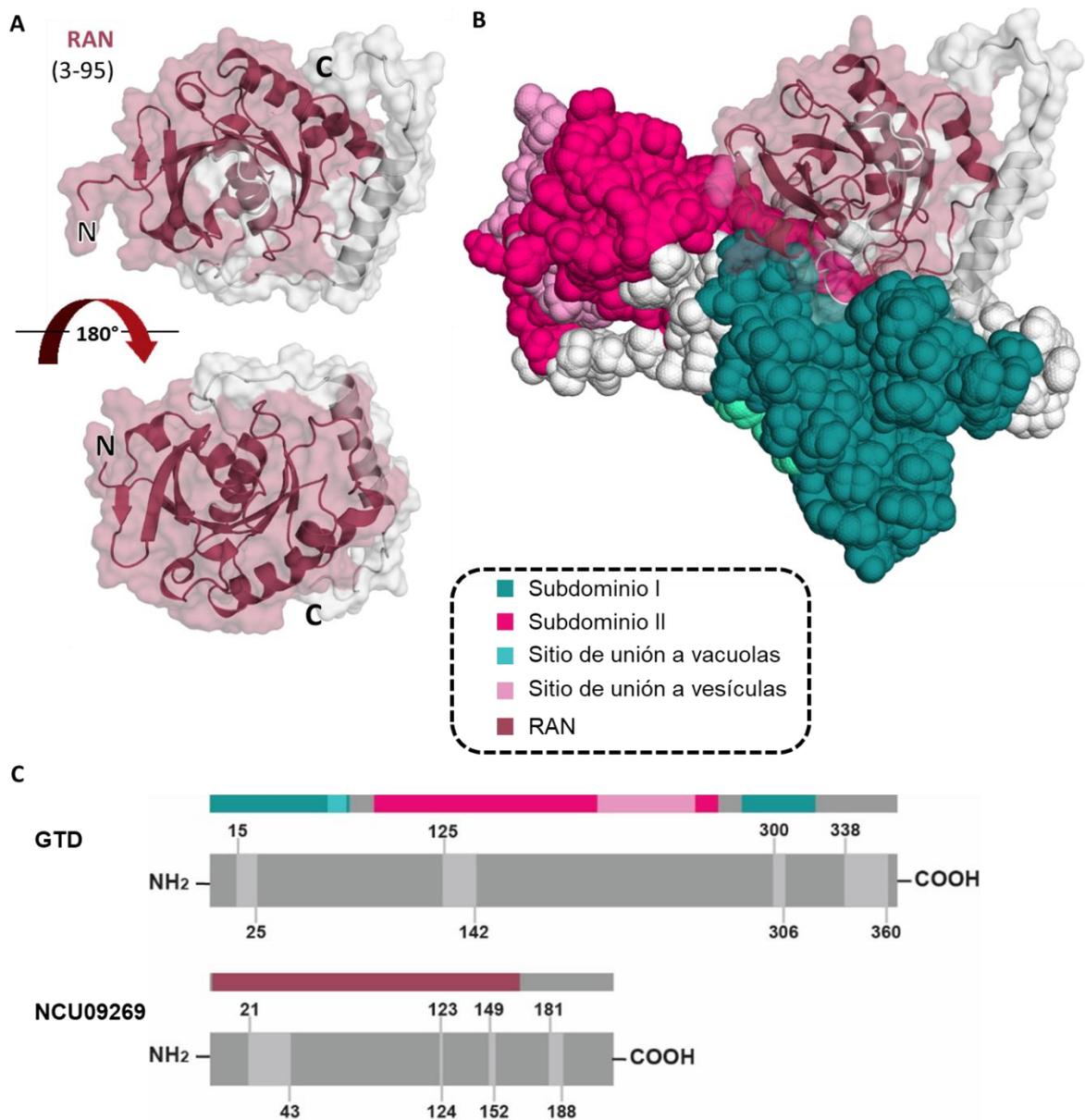


Figura 15. Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU09269 interactuando con el GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína NCU09269. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína con NCU09269 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa al NCU09269 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos ≤ 4 Å dentro del complejo formado por el NCU09269 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

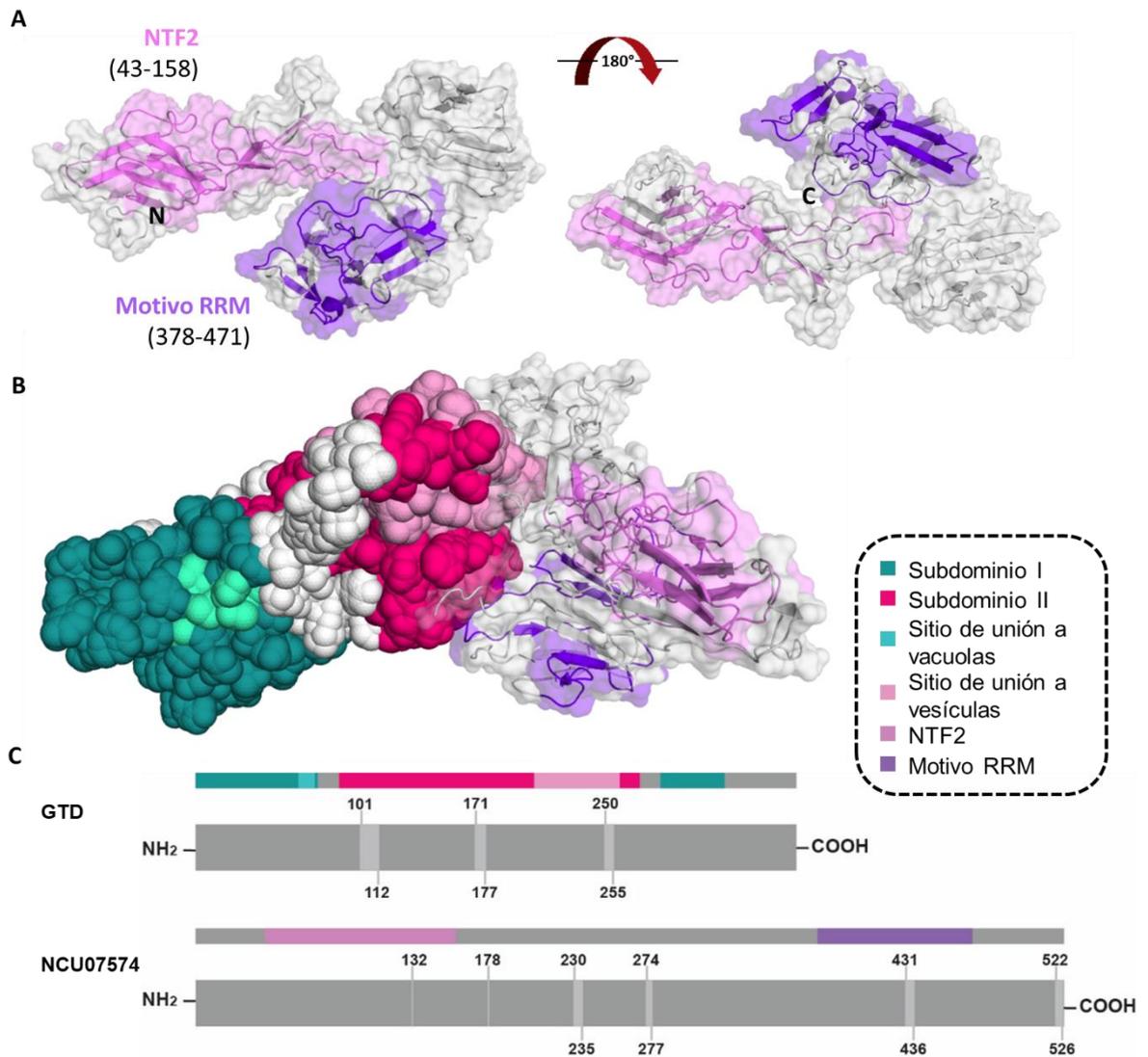


Figura 16. Modelo estructural de la proteína de unión a RNA con NCU07574 interactuando con el GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína NCU07574. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína con NCU07574 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa al NCU07574 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos ≤ 4 Å dentro del complejo formado por el NCU07574 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

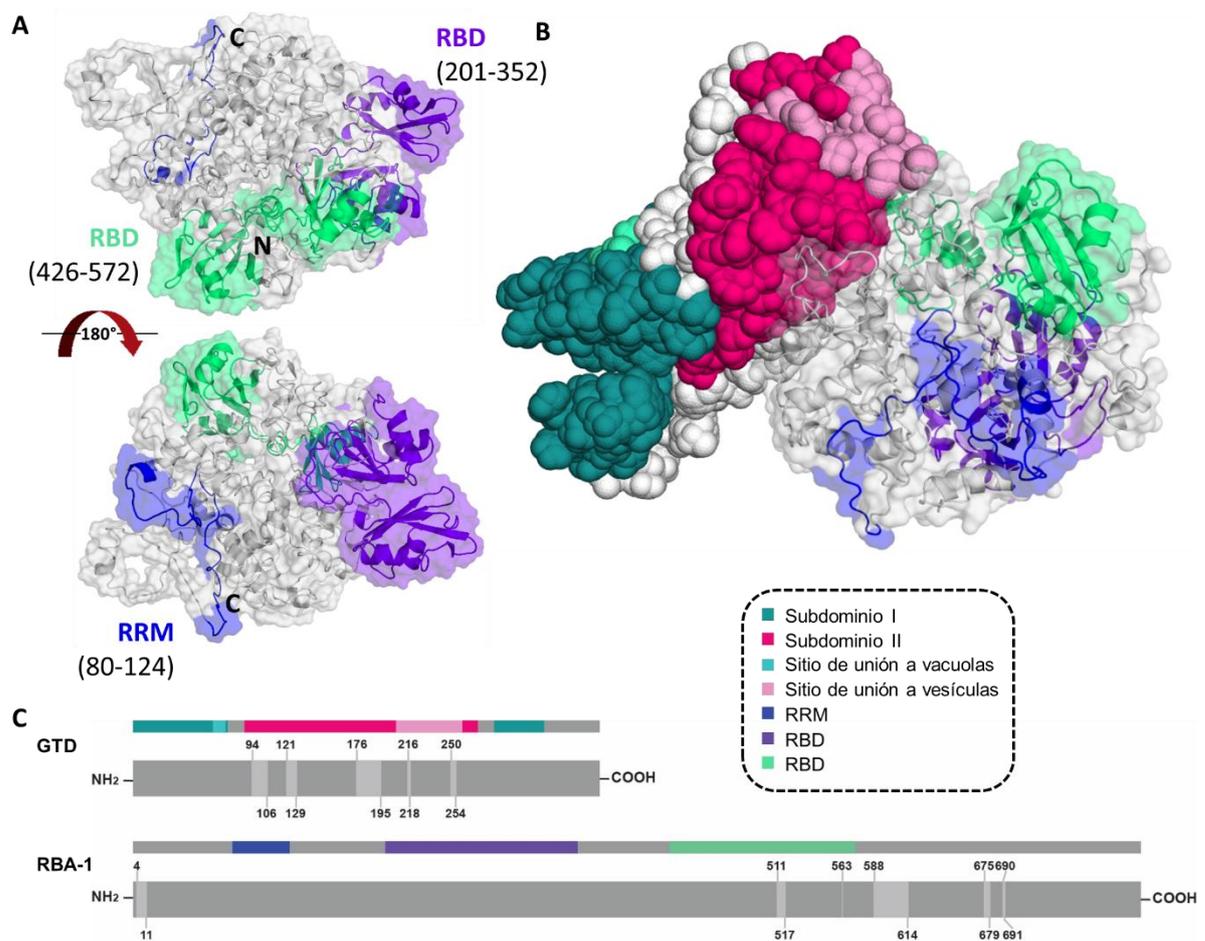


Figura 17. Modelo estructural de la proteína RBA-1 (NCU06459) interactuando con el GTD de MYO-5. A) Representación superficial y en cintas de la estructura de la proteína NCU06459. Las letras N y C señalan el amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Modelo de acoplamiento entre la proteína con NCU06459 y el GTD de MYO-5. La estructura superficial representa al NCU06459 y la estructura en puntos muestra al GTD de MYO-5. C) Residuos que forman contactos ≤ 4 Å dentro del complejo formado por el NCU06459 y el GTD de MYO-5. Gris: zonas que no pertenecen a ningún dominio o subdominio.

3.2.3 Simulación de dinámica molecular del modelo estructural del GTD de MYO-5

Para evaluar la estabilidad conformacional del modelo del GTD de MYO-5, se llevó a cabo una Simulación de Dinámica molecular. El tiempo total de simulación fue de 5 ns y se hicieron tres réplicas del experimento. Para analizar la trayectoria de dinámica molecular del GTD de MYO-5 se usaron las medidas RMSD y RMSF. La medida RMSD mide la distancia media entre los átomos de dos estructuras moleculares previamente superpuestas mediante el algoritmo de Kabsch (Grant et al., 2006), mientras que la medida RMSF evalúa de forma independiente cada $C\alpha$ de cada residuo y utilizando como referencia la media de todas las coordenadas (x, y, z) que este átomo tiene a lo largo de la trayectoria.

El RMSD mostró que, durante el tiempo de la simulación de dinámica molecular, el GTD de MYO-5 permaneció estable en dos (Figura 18A, línea verde y azul) de los tres ensayos.

La flexibilidad estructural de los residuos de la proteína se evaluó por medio de un análisis por RMSF. Se observó que la flexibilidad del modelo GTD de MYO-5 es mayor en la región carboxilo terminal (Figura 18B). Las regiones correspondientes a la porción amino terminal del subdominio I y la región del subdominio II son más estables comparados con la porción carboxilo terminal del GTD (donde también se localiza la segunda porción del subdominio I) (Figura 18B).

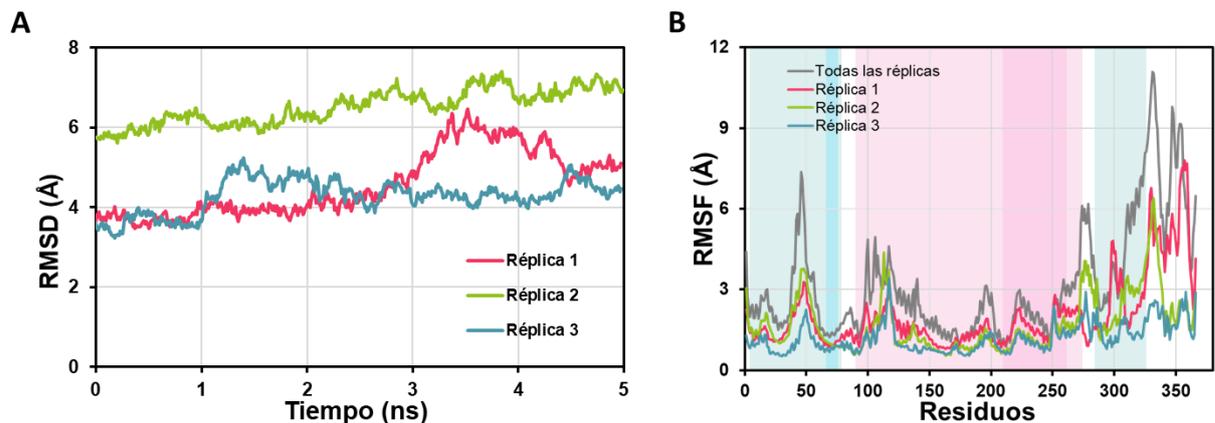


Figura 18. Análisis por RMSD y RMSF del GTD de MYO-5. A) RMSD de los carbonos α ($C\alpha$) del GTD de MYO-5. Las réplicas 2 y 3 (línea verde y azul, respectivamente) permanecen estables, mientras que la réplica 1 (línea rosa) muestra un incremento progresivo en el tiempo (trayectoria). B) Gráfica de RMSF de cada residuo de las tres replicas individuales y concatenadas del GTD de MYO-5. Las columnas del fondo indican la posición de los residuos que forman el subdominio I (azul claro), subdominio II (rosa claro), sitio de unión a vacuolas (azul más intenso) y sitio de unión a vesículas (rosa más intenso).

Posteriormente, para analizar y obtener las principales conformaciones de la trayectoria de la dinámica del GTD de MYO-5, se hizo un Análisis de Componentes Principales utilizando las trayectorias de los tres ensayos del GTD de MYO-5 solo. La Figura 19 muestra un esquema de los principales movimientos durante la trayectoria de la dinámica o “dinámica esencial”, en donde podemos observar que la región más dinámica es el Carboxilo terminal del GTD. La trayectoria completa consistió en 1500 conformaciones.

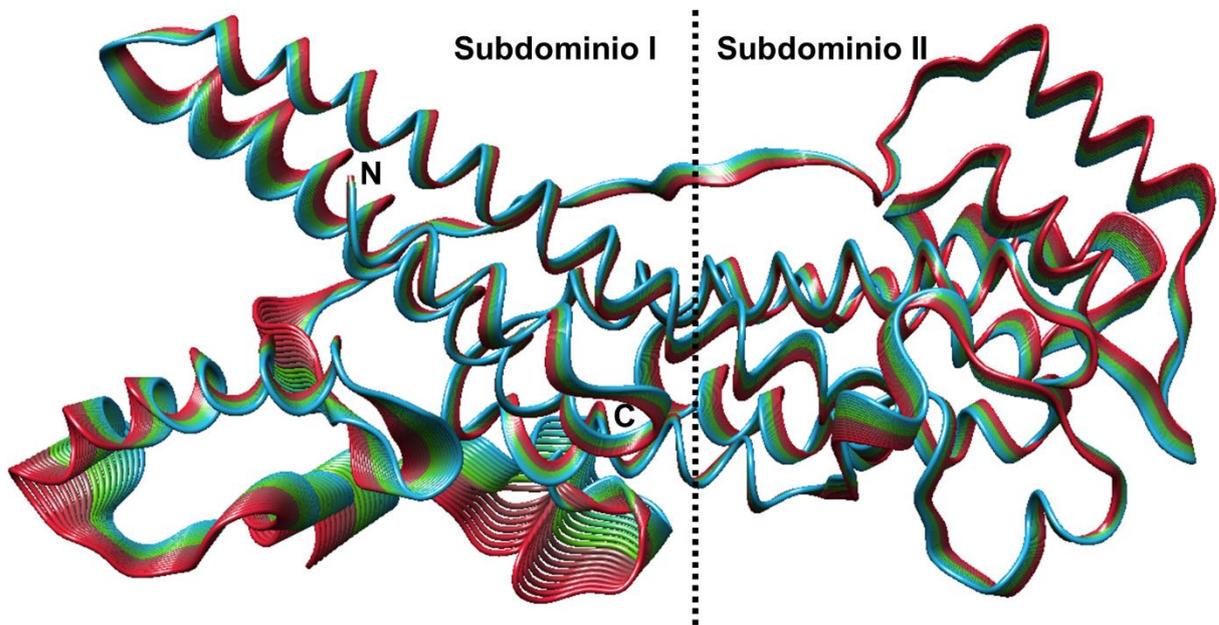


Figura 19. Representación esquemática la trayectoria del GTD de MYO-5 durante la simulación de dinámica molecular. La trayectoria completa consistió en 1500 conformaciones. La apertura de las cadenas muestra las regiones con mayor movimiento en la proteína.

3.2.4 Simulación de dinámica molecular de las conformaciones de acoplamiento MYO-5/SNA-10 y MYO-5/RBA-1

Se llevó a cabo una Simulación de Dinámica molecular para evaluar la estabilidad conformacional del modelo del GTD de MYO-5 cuando se encontraba asociado a los modelos estructurales de los posibles adaptadores SNA-10 y RBA-1. En estos ensayos, el tiempo total de simulación fue de 2.5 ns y se hizo una sola réplica del experimento. Para analizar la trayectoria de dinámica molecular del GTD de MYO-5 se usaron las medidas RMSD y RMSF.

La medida de RMSD mostró que el GTD de MYO-5 es más estable cuando se encuentra acoplado a cualquiera de los dos adaptadores (Figura 20A y B). Del mismo modo se observó que los adaptadores también son estables conformacionalmente cuando se encuentran interactuando con el GTD de MYO-5 (Figura 20A y B).

En el análisis por RMSF se observa que cuando el GTD de MYO-5 interactúa con RBA-1 es menos flexible en la región del carboxilo terminal, en comparación que cuando el GTD está solo o acoplado a SNA-10 (Figura 20C-E).

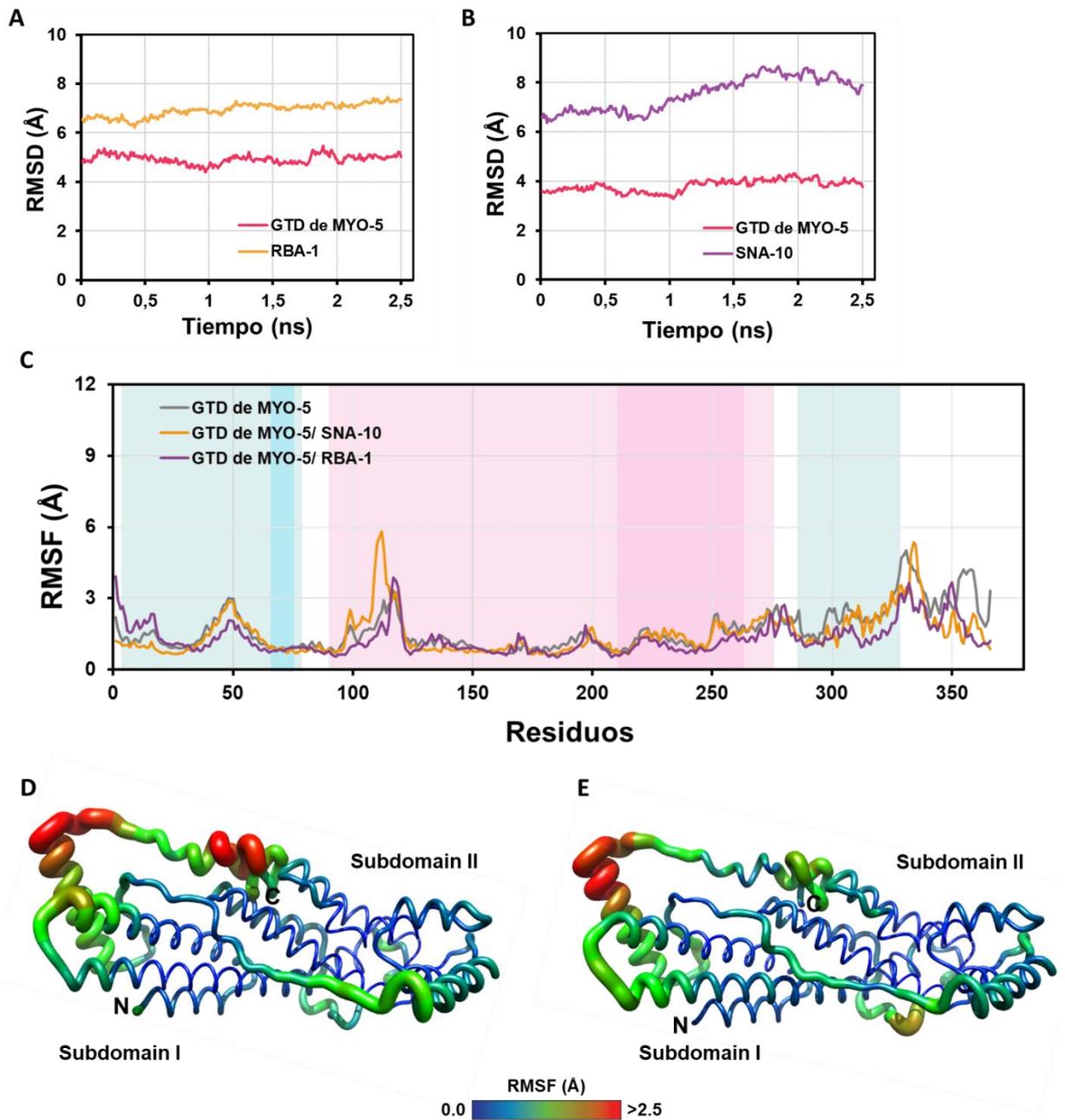


Figura 20. Análisis de RMSD y RMSF de GTD de MYO-5 asociado a los adaptadores SNA-1 y RBA-1. A) y B) RMSD de los $C\alpha$ del GTD de MYO-5 y los adaptadores cuando se encuentran asociados. C) RMSF del GTD de MYO-5 solo y asociado a los adaptadores. D) y E) Representación estructural de la cadena principal del GTD de MYO-5 cuando no se encuentra interactuando con ninguno de los dos adaptadores (d) e interactuando con ellos (e). Los valores más bajos a más altos de RMSF van de azul a rojo.

3.3 Dinámica *in vivo* de las proteínas SNA-10 y RBA-1 en ausencia de la proteína MYO-5

Para conocer el comportamiento *in vivo* de los adaptadores SNA-10 y RBA-1, se generaron cepas heterocariones con los adaptadores marcados con GFP. Las observaciones realizadas en el microscopio confocal mostraron que las hifas de la cepa SNA-10-GFP tenían poca fluorescencia dentro de los primeros 50 μm desde la punta; entre los 50 a 100 μm , se observó fluorescencia dentro de una red densa de estructuras circulares y tubulares desorganizadas (Figura 21), no obstante, la fluorescencia rápidamente se perdía al exponerse al láser del microscopio. Además, las hifas se observaban delgadas y tenían crecimiento anormal. Las colonias de la cepa SNA-10-GFP crecían lentamente cuando recién fueron transformadas y observadas al microscopio, sin embargo, cuando se quiso medir la tasa de elongación radial las hifas crecieron 6 mm y posteriormente dejaron de crecer. La transformación se repitió y el resultado fue el mismo, por lo que se puede decir que el marcaje con GFP afecta al funcionamiento de SNA-10.

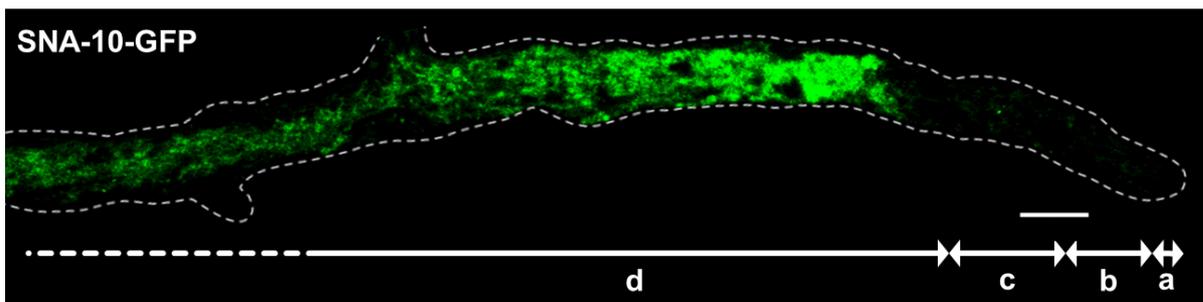


Figura 21. Localización de SNA-10-GFP en hifas maduras de *N. crassa*. Dentro de los primeros 50 μm desde la punta, se observa poca fluorescencia de SNA-10-GFP. A partir de los 50 μm , SNA-10-GFP se localiza formando una red densa de estructuras circulares y tubulares desorganizadas. a, ápice (2 a 5 μm); b, subápice proximal (5 a 20 μm); c, subápice distal (20 a 40 μm); y d, región distal (>40 μm). Barra de escala= 10 μm .

En la cepa GFP-RBA-1, no hubo diferencias en el crecimiento radial de las colonias en comparación con la cepa FGSC#4200 y la parental FGSC#9717 (Figura 22A). GFP-RBA-1 se localizó en estructuras alargadas o tubulares en la región apical y en estructuras puntiformes en la región distal (Figura 22B).

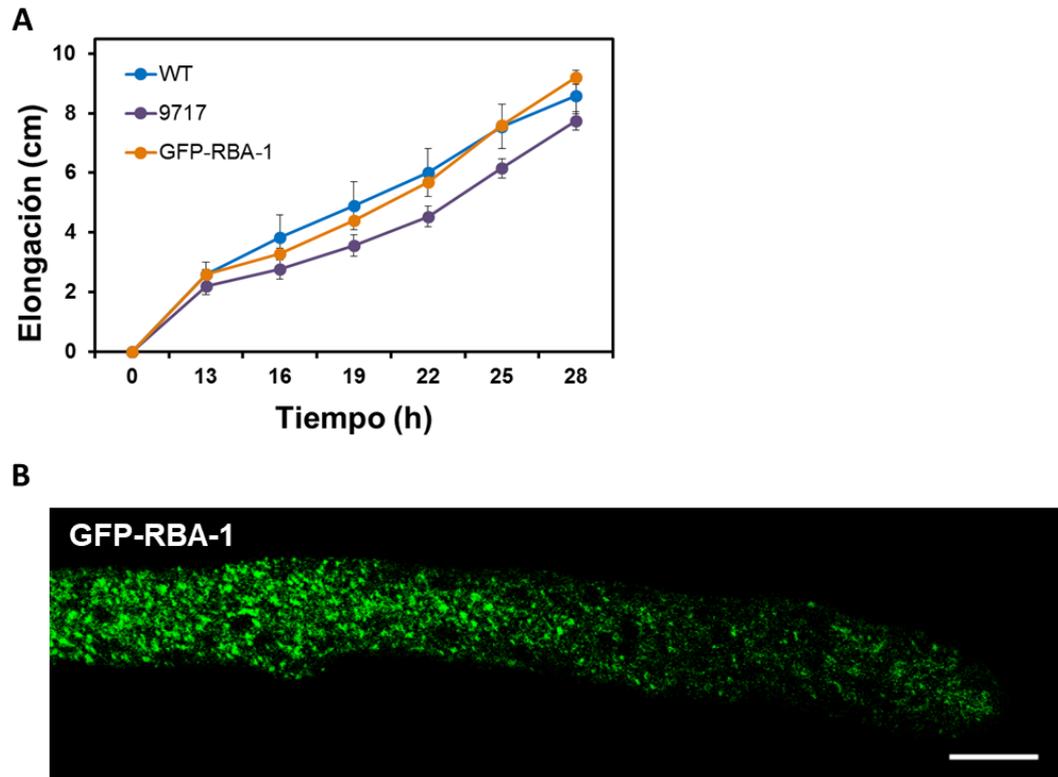


Figura 22. Localización en las hifas y crecimiento radial de la cepa GFP-RBA-1. A) Tasa de crecimiento radial medida en 28 h. GFP-RBA-1 crece igual que la cepa cepa silvestre (FGSC#4200) y la cepa parental (FGSC#9717). Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%. B) GFP-RBA-1 en hifas se localizaba en estructuras puntiformes en la región distal. Barra de escala= 10 μ m.

Para inhibir la actividad de la proteína MYO-5, las células fueron tratadas con el inhibidor Pentabromopseudilina (PBP) (BioViotica). Del mismo modo que en *S. pombe* (Li et al., 2018), se considera que el inhibidor PBP mimetiza el efecto de la mutación de $\Delta myo-5$. Debido a que el inhibidor no había sido probado en ninguna especie de hongo filamentoso, se estandarizaron las concentraciones para *N. crassa* utilizando la cepa MYO-5-GFP sin tratamiento como control. La Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) reportada es de 1.2 μ M (Bond et al., 2013). Se probaron concentraciones entre 0.002 μ M y 2 μ M y se observó el crecimiento de las hifas y la localización de MYO-5-GFP. Observamos que a una concentración de 0.2 μ M (menor a la CI_{50} reportada), el crecimiento de la colonia estaba severamente reducido en comparación con la cepa MYO-5-GFP (Figura 23A). A pesar de que en la cepa tratada con cualquier concentración de PBP el crecimiento se veía comprometido, MYO-5-GFP se localizaba en el ápice (Figura 23B). Observaciones preliminares mostraron que con el tiempo la fluorescencia de MYO-5-GFP se fotoblanqueaba y no se observaba recuperación (Figura 23C).

Los ensayos para inhibir la miosina de clase V en las cepas con los adaptadores SNA-10 y RBA-1 marcados con GFP no fueron realizados debido a los problemas del marcaje con la proteína fluorescente GFP.

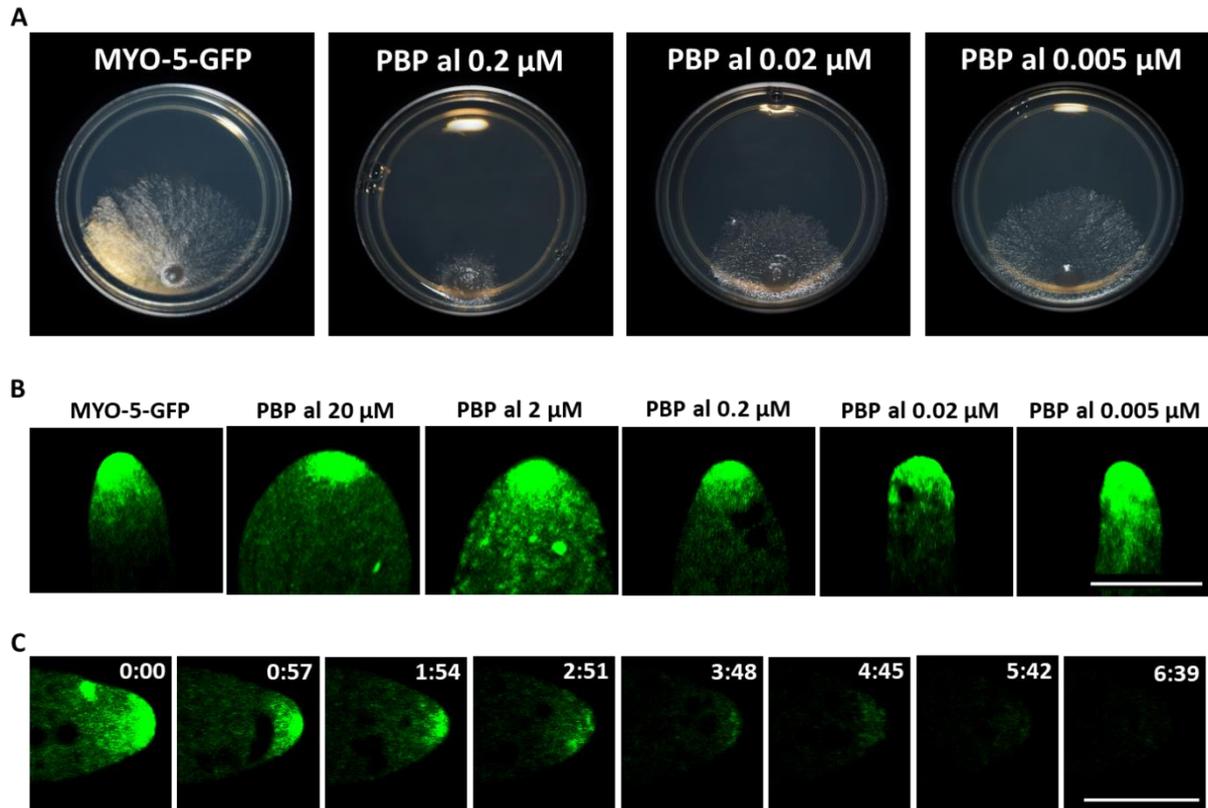


Figura 22. Ensayo de inhibición de la miosina de clase V en hifas de la cepa MYO-5-GFP tratadas con PBP. A) Crecimiento colonial de la cepa MYO-5-GFP en medio MMV al 1.5% adicionado con el inhibidor PBP a diferentes concentraciones. B) Localización de MYO-5-GFP en hifas que crecieron en el medio adicionado con PBP a diferentes concentraciones. C) Series de tiempo de una hifa que crecía en MMV al 1.5 % adicionado con 0.2 μM de PBP. Se muestra la pérdida de fluorescencia en el tiempo. Barra de escala= 10 μm. El tiempo transcurrido (min: s) se muestra en la esquina superior derecha de cada panel.

3.4 Versiones truncadas del GTD de MYO-5 etiquetadas con GFP

Para determinar la importancia en la función de MYO-5 del dominio de la cola y de los subdominios que lo conforman, se generaron versiones truncadas del GTD completo (MYO-5^{Δ1229}) y del subdominio II (MYO-5^{Δ1436}) etiquetadas con GFP y se analizó la localización de esas versiones de MYO-5 en la punta de hifas maduras.

Observaciones preliminares mostraron que tanto en las hifas homocariones de la cepa expresando MYO-5^{Δ1229}-GFP como en la cepa expresando MYO-5^{Δ1436}-GFP, la fluorescencia se observó a lo largo de

toda la hifa en forma de estructuras puntiformes y tubulares (Figura 24A), pero no se observó en los septos (Figura 24B). Además, la tasa de elongación indicó que ambas cepas con la proteína MYO-5 truncada crecían igual que la cepa silvestre y la cepa parental 9718 (Figura 24C).

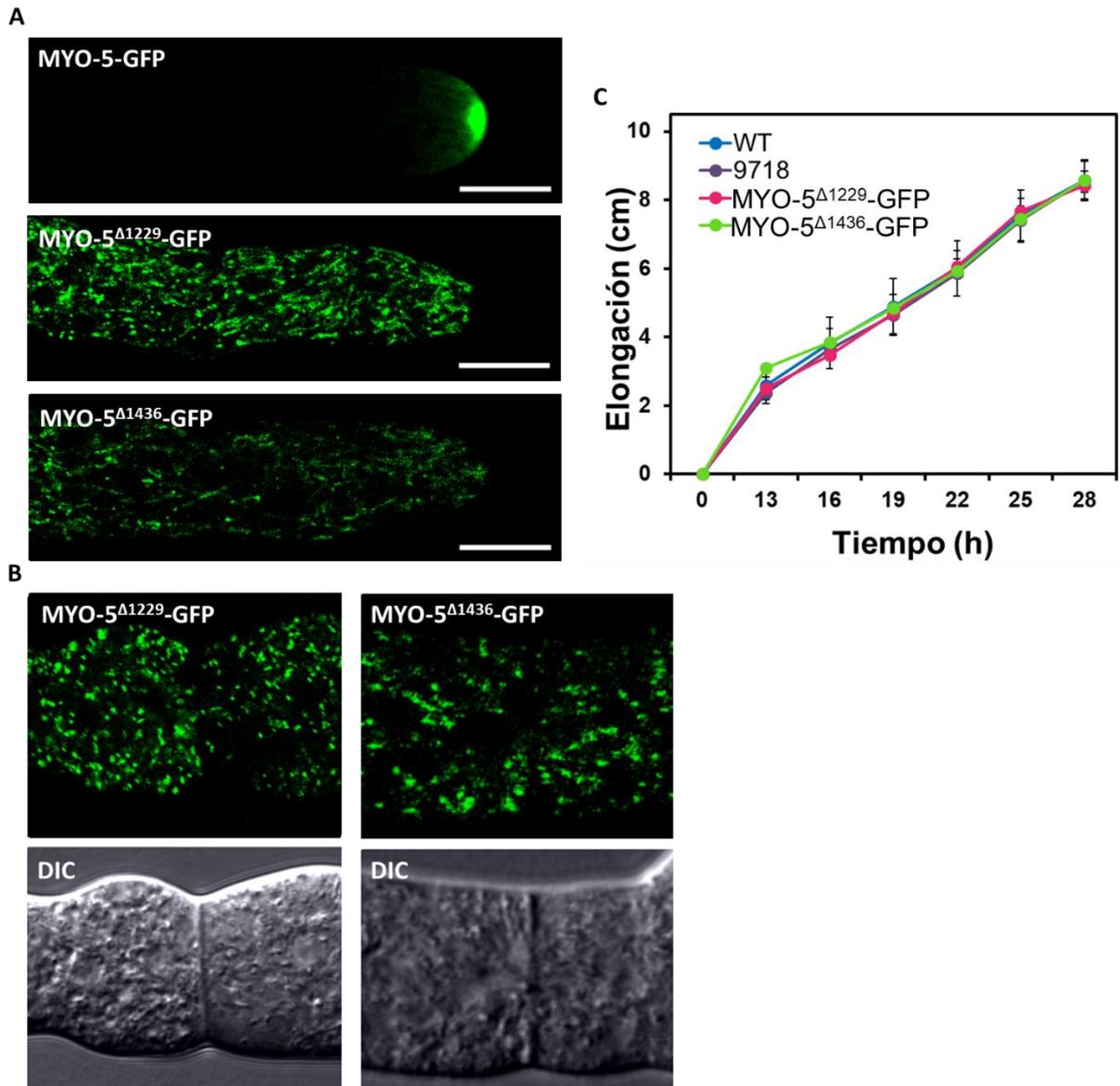


Figura 24. Imágenes en microscopía confocal de la localización de MYO-5 en las cepas expresando MYO-5 Δ 1229-GFP y MYO-5 Δ 1436-GFP. A) MYO-5-GFP se localiza en el ápice de la hifa formando un domo, mientras que en las cepas expresando versiones de MYO-5 truncadas del dominio globular de la cola, se localiza como estructuras puntiformes y alargadas a lo largo de toda la hifa. Barra de escala= 10 μ m. B) En ninguna de las cepas expresando versiones truncadas se observó que MYO-5 se localizará en los septos. C) Tasa de elongación radial medida durante 28 h. Ambas cepas truncadas crecen igual que la cepa silvestre (FGSC#4200) y la cepa parental (FGSC#9718). Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

3.5 Dinámica de la miosina de clase V

Con el fin de conocer el comportamiento de la proteína MYO-5 en la región subapical de hifas maduras, se hizo un análisis de cinco partículas por TIRFM. Se encontró que las partículas fluorescentes mostraron movimientos anterógrados y retrógrados, siendo los movimientos anterógrados los más comunes (Figura 25). Además, se observó que la velocidad de las partículas fluorescentes cambiaba durante la trayectoria. En general, el 51% del tiempo las partículas permanecían a una velocidad $0 \mu\text{m s}^{-1}$, es decir que no se movían (Figura 26A). La velocidad a la que las partículas se movían constantemente fue de $1.08 \mu\text{m s}^{-1}$, (26% del tiempo observado) (Figura 26A). La distancia mínima a la que se desplazaban fue de $0.01 \mu\text{m}$, y la distancia máxima fue de $0.11 \mu\text{m}$ y fue independiente del si el movimiento era en sentido anterógrado o retrógrado. Las velocidades máximas que pudieron alcanzar las partículas estaban entre $1.81 \mu\text{m s}^{-1}$ a $2.7 \mu\text{m s}^{-1}$ (Figura 26A y B).

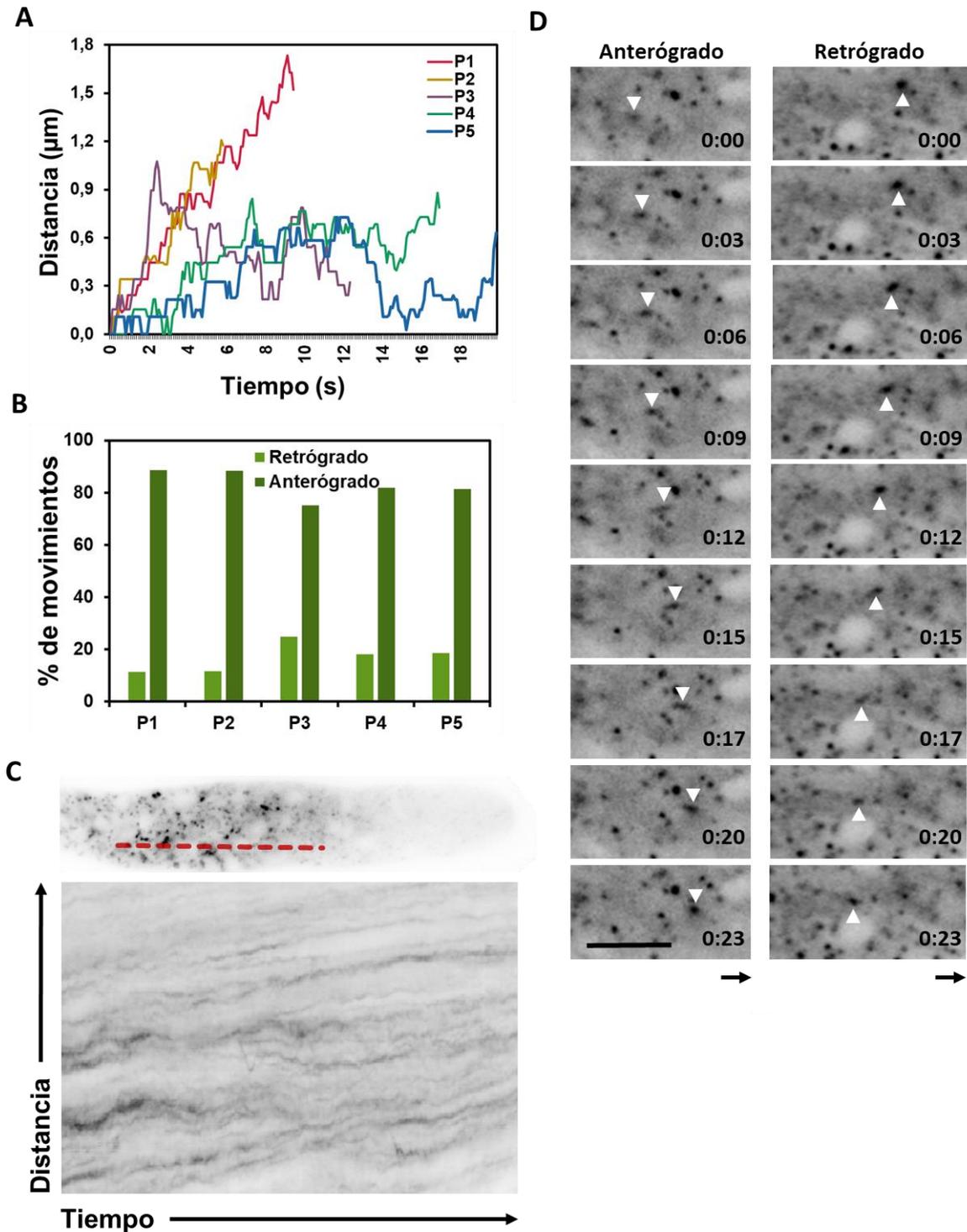


Figura 25. Análisis de la dinámica de MYO-5-GFP por TIRFM. A) Gráfica del movimiento de cinco partículas. Las partículas muestran movimientos anterógrados y retrógrados alternados durante la trayectoria total. B) Gráfica del porcentaje que las partículas se mueven en sentido anterógrado o retrógrado. La mayor parte del tiempo las partículas se mueven en sentido anterógrado. C) Kimograma de la línea punteada. Se puede observar el movimiento anterógrado y retrógrado de las partículas de MYO-5-GFP. D) Serie de tiempo del movimiento de una partícula de MYO-5-GFP en sentido anterógrado y retrógrada. La flecha señala la dirección de crecimiento de la hifa. Las cabezas de flecha muestran el movimiento de las partículas. Barra de escala= 5 μm . El tiempo transcurrido (s: ms) se muestra en la esquina inferior derecha de cada panel.

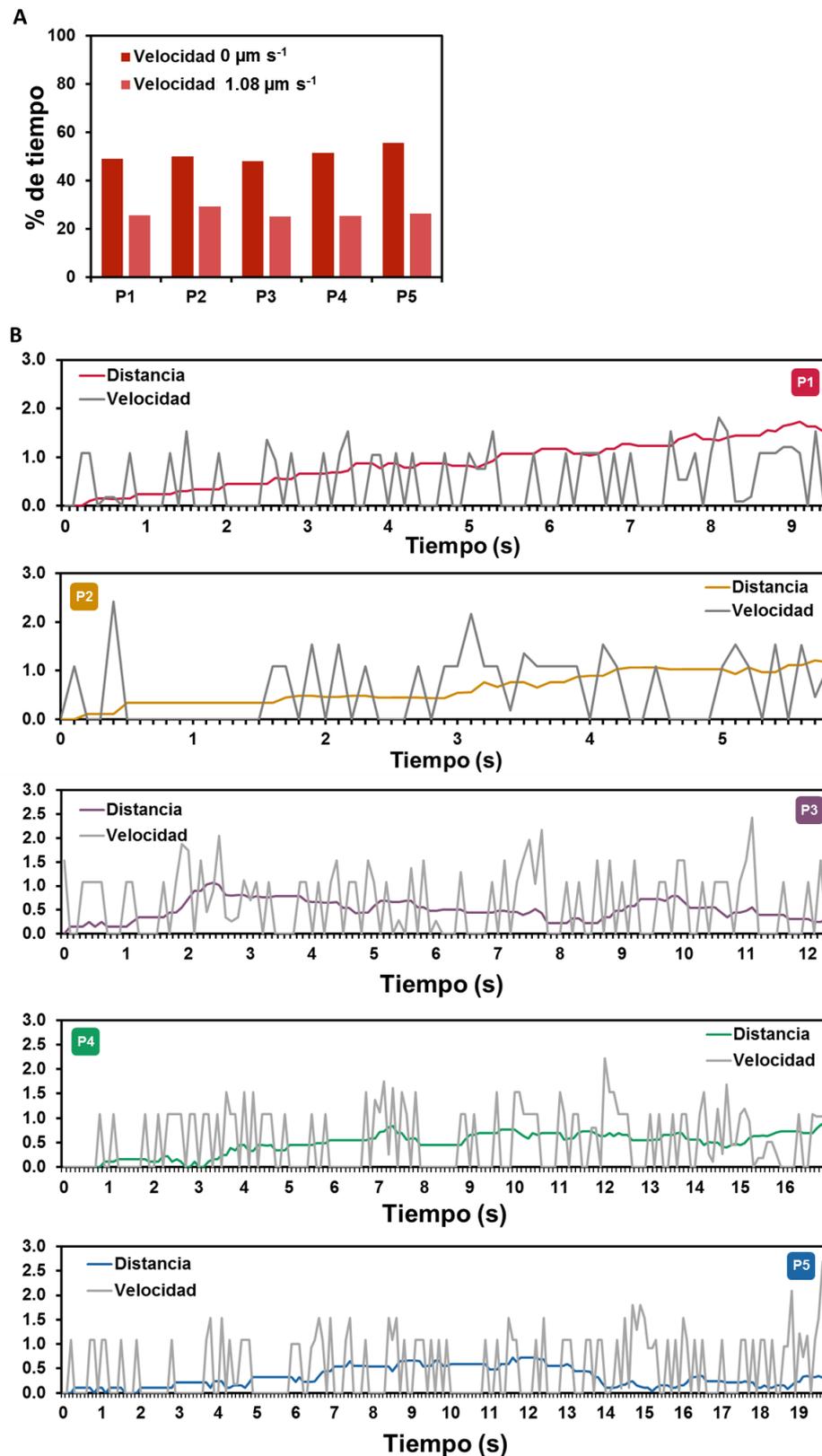


Figura 26. Análisis de la velocidad de las partículas de MYO-5-GFP. A) Gráfica de comparación entre las dos velocidades más comunes presentadas por las partículas. En promedio las partículas pasan el mayor tiempo de su trayectoria sin moverse, y en menos medida a la velocidad de $1.08 \mu\text{m s}^{-1}$. B) Gráfica de comparación de la distancia y la velocidad a la que se mueven las partículas durante la trayectoria total. Las partículas se mueven a velocidades distintas, independientemente de si la dirección de movimiento es anterógrada o retrograda. P1 = Partícula 1, P2 = Partícula 2; P3 = Partícula 3; P4 = Partícula 4; P5 = Partícula 5.

3.6 MYO-5 en la organización del Spitzenkörper y los septos

3.6.1 Organización del Spitzenkörper en la mutante $\Delta myo-5$

En estudios anteriores se observó que en ausencia del gen completo de *myo-5*, el Spk teñido con el fluoróforo vital FM[®]4-64 se encontraba desorganizado y en su lugar se formaba una nube difusa en el ápice y subápice (Ramírez-del Villar et al., 2019). Con micrografías por MET se observó de forma detallada la organización en el ápice de hifas maduras de la cepa mutante $\Delta myo-5$ en comparación con la cepa silvestre que mostró que el Spk estaba formado principalmente por macrovesículas localizadas en la región externa (Figura 27, flechas) y por microvesículas en el interior (Figura 27, cabezas de flecha) (Sánchez-León y Riquelme, 2015). Las mitocondrias se encontraron distribuidas muy cercanamente al Spk (Figura 27, asteriscos) y se observaron algunas macrovesículas en el subápice. Sin embargo, en la mutante $\Delta myo-5$, las macrovesículas se encontraron distribuidas tanto en el ápice como en el subápice (Figura 27, flechas) y se observaron mitocondrias distribuidas en el área apical y subapical (Figura 27, asteriscos). A pesar de que las macrovesículas podían distinguirse con claridad, las microvesículas fueron difíciles de localizar.

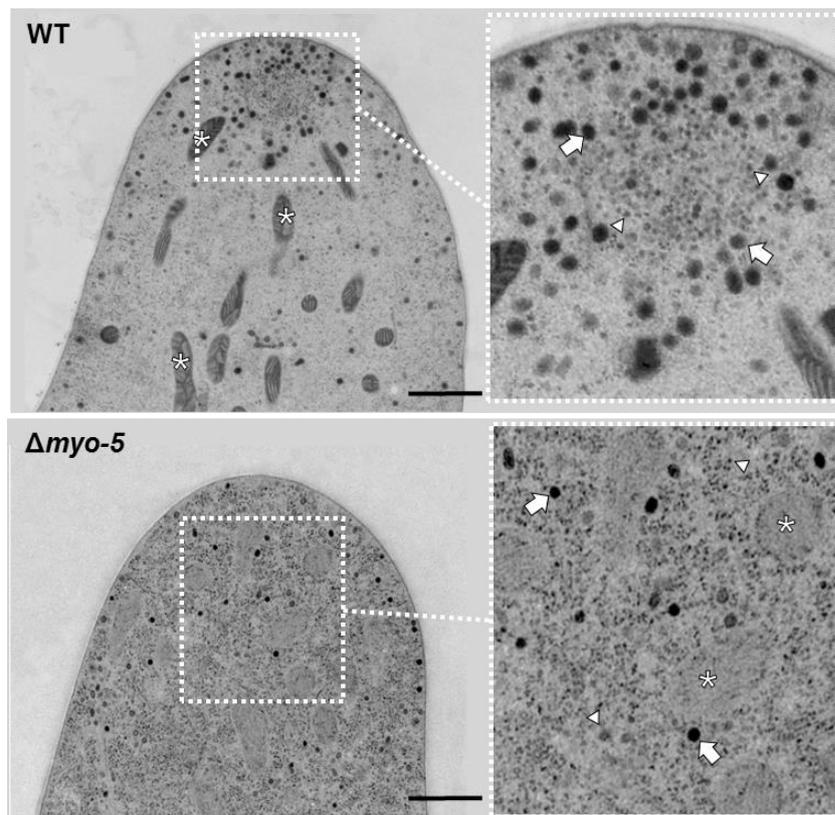


Figura 27. Organización del ápice en la cepa silvestre y la mutante $\Delta myo-5$. En la cepa silvestre se observa un Spk organizado con macrovesículas (flechas) en el exterior y microvesículas en el interior (cabeza de flecha), con mitocondrias a pocos nanómetros del Spk (asteriscos). En la cepa mutante $\Delta myo-5$ se observan macrovesículas (flechas) y algunas microvesículas (cabezas de flecha), así como mitocondrias, todo distribuido en el ápice y subápice. Barra de escala de 1 nm.

Debido a que las microvesículas son candidatas como elementos cargo de la MYO-5, se utilizó la quitina sintasa 1 (CHS-1) etiquetada con GFP, para observar la localización de este tipo de vesículas en ausencia de la miosina de clase V. En conidios y germínulas, la localización de la CHS-1-GFP es similar a la que se observa en la WT. En conidios de la mutante $\Delta myo-5$ se observaron puntos distribuidos en el citoplasma un poco más grandes que en la WT (Figura 28A, cabezas de flecha). En las germínulas de ambas cepas, la fluorescencia se encontró en el citoplasma del tubo germinal (Figura 28A, cabezas de flecha) pero solo en la WT se observó en la esfera germinal. En las hifas mutantes de $\Delta myo-5$, la CHS-1-GFP coincide con la nube difusa de vesículas marcadas con FM4-64 (Figura 28B).

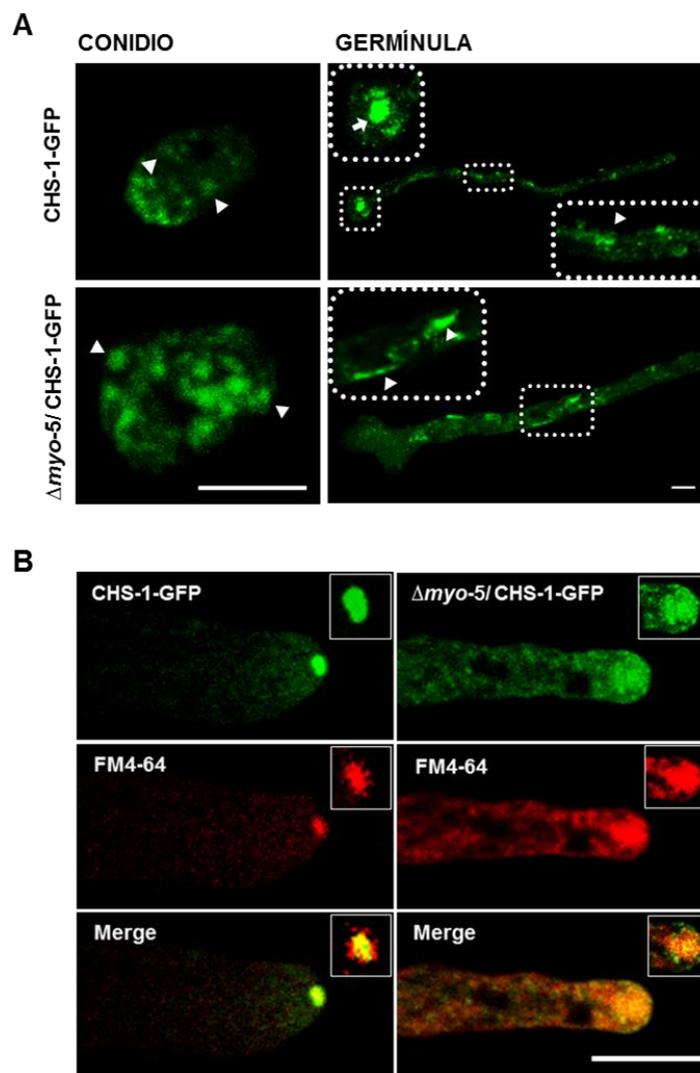


Figura 28. Localización de la CHS-1-GFP en conidios, germínulas e hifas maduras de la cepa WT y mutante $\Delta myo-5$. A) En conidios de ambas cepas, la CHS-1-GFP se observa como puntos en el citoplasma (cabezas de flecha). En germínulas de la cepa WT, se localiza en el citoplasma de la esfera germinal y en el tubo germinal, mientras que en $\Delta myo-5$ se localiza solo en el tubo germinal. B) En la cepa WT, la CHS-1-GFP se observa como un punto en el ápice que colocaliza con el núcleo del Spk (teñido con FM4-64), mientras que en la mutante $\Delta myo-5$ se forma una nube de fluorescencia que ocupa el domo apical y que colocaliza con la nube teñida con FM4-64. Barra de escala de 10 μm

3.6.2 Organización de los septos en la mutante $\Delta myo-5$

En estudios anteriores en hifas maduras se había observado que la MYO-5-GFP se localiza en los septos formando un anillo de fluorescencia débil que coincidía con el crecimiento de la membrana plasmática, además de que en la cepa mutante $\Delta myo-5$ se vio que, aunque la forma es similar, el tamaño de los compartimentos era menor comparado con la WT (Ramírez-del Villar et al., 2019). Debido a este antecedente, se decidió observar la formación de septos en ausencia de la miosina de clase V. Se observó que en la mutante $\Delta myo-5$ todas las estructuras de actina el Septal-Actomyosin Tangle (SAT), proto-Contractil Actomyosin Ring (CAR) y el CAR, se formaron antes del crecimiento de la membrana plasmática (Figura 29C). Sin embargo, en la mutante $\Delta myo-5$, le tomó 11 minutos completar la formación del septo, es decir 4 minutos más que en la cepa WT (Figura 29A). Además, la actina llegó al sitio de septación 33 minutos antes que cualquier señal de crecimiento de la membrana plasmática (Figura 29B).

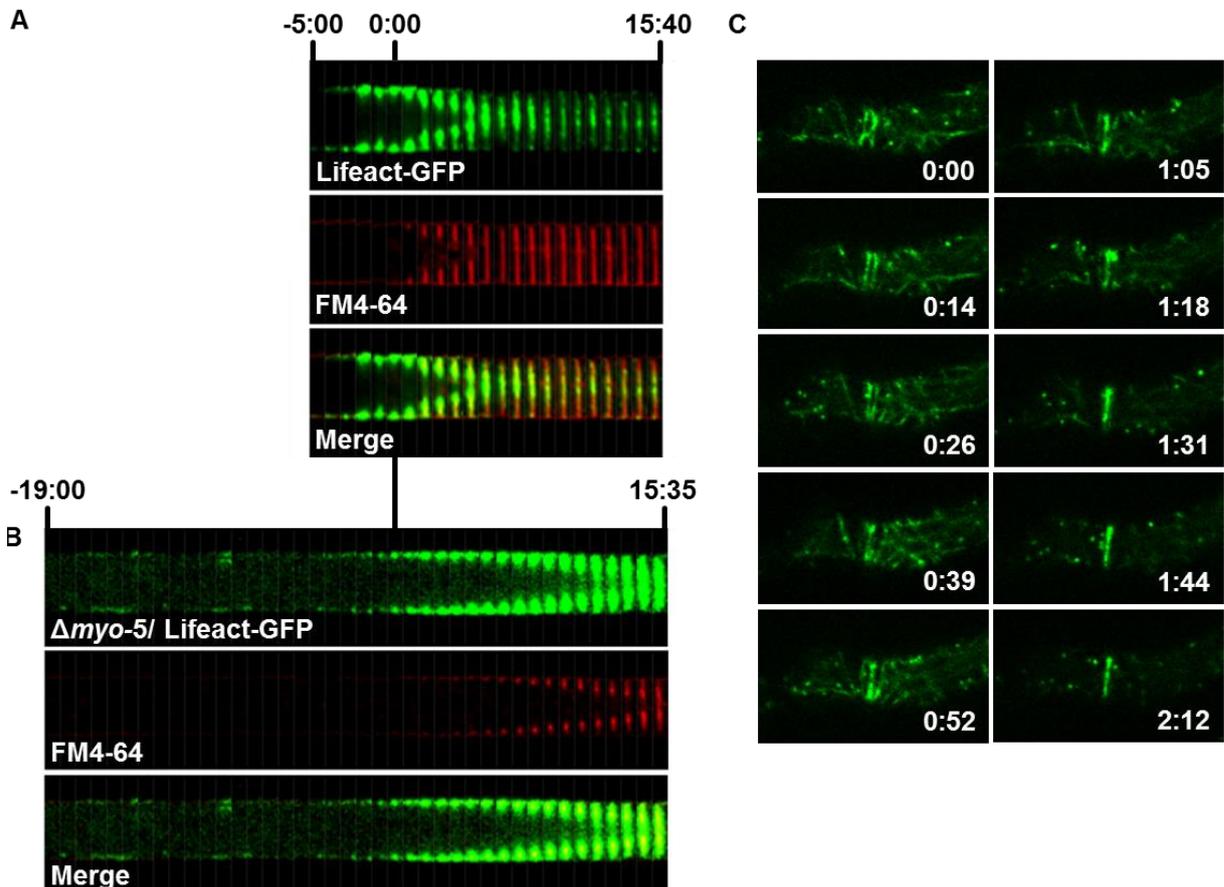


Figura 29. Formación del septo en las cepas WT y la mutante $\Delta myo-5$. A) y B) Cronología de la aparición de la actina durante la septación en la WT y $\Delta myo-5$, respectivamente. Series kimográficas de imágenes confocal del plano medio tomadas en intervalos de 52 s. El colorante FM4-64 fue usado para monitorear el inicio del crecimiento de la membrana plasmática y fue definido como el tiempo 0:00 (min:s). C) Series de tiempo de imágenes de microscopía confocal de disco giratorio del desarrollo del septo en la mutante $\Delta myo-5$ expresando Lifact-GFP. Cada imagen representa un solo plano focal. Las estructuras de actina se forman antes de que el crecimiento de la membrana plasmática sea observado. El tiempo transcurrido (min:s) se muestra en la esquina inferior derecha de cada panel.

3.7 El citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta myo-5$

Debido a que la actina es un componente importante del Spk y a que se ha observado que este se encuentra desorganizado en la mutante $\Delta myo-5$, se analizó la localización y dinámica del citoesqueleto de actina en ausencia de MYO-5, utilizando los marcadores generales de actina Lifact-GFP, tropomiosina (TPM-1-GFP) y fimbrina (FIM-1-GFP). En conidios de la cepa silvestre, la actina marcada con Lifact-GFP se encontró distribuida en puntos o parches en el citoplasma (Figura 30, cabezas de flecha), mientras que en la mutante $\Delta myo-5$ se observaron parches más pequeños (Figura 30, cabezas de flecha) y filamentos gruesos formando un denso haz circular que rodea la célula (Figura 30, flecha). De manera similar, en germínulas de la cepa silvestre se observaron filamentos delgados que se localizan en la célula completa y algunos parches de fluorescencia (Figura 30, cabezas de flecha). Por el contrario, en la mutante $\Delta myo-5$ se observaron filamentos gruesos restringidos a los polos de la célula y aparentemente también se observaron más parches (Figura 30, cabezas de flecha y flechas respectivamente).

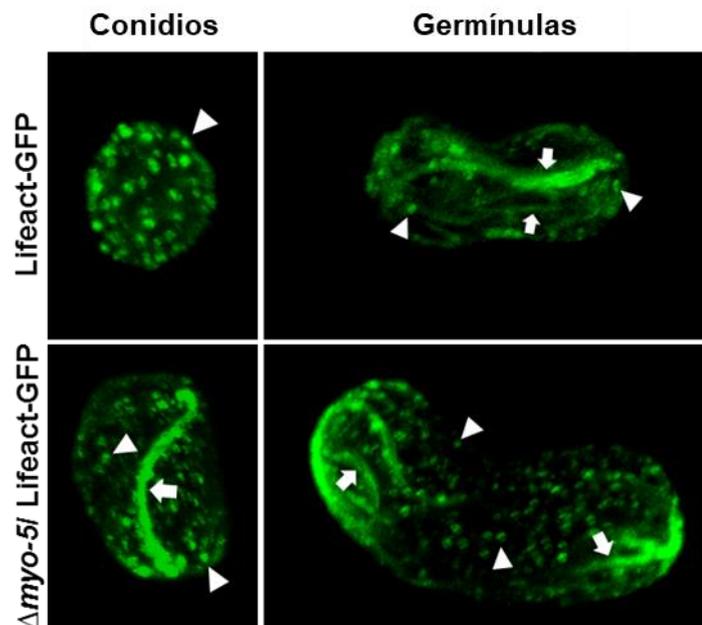


Figura 30. Reconstrucción en 3D de conidios y germínulas de WT (panel superior) y la mutante $\Delta myo-5$ (panel inferior) mostrando cables de actina y parches marcados con Lifact-GFP. Las cabezas de flecha señalan los parches de actina y las flechas señalan los cables de actina. Barra de escala de 10 μm .

En hifas de la cepa silvestre tanto con Lifact-GFP o con TPM-1-GFP, la actina se observó acumulada en el ápice co-localizando con el Spk (Figura 31A, flecha y Figura 31) y también parches que corresponden al collar endocítico subapical (Figura 31A, cabezas de flechas) (Delgado-Álvarez et al., 2010). Sin embargo, en la mutante $\Delta myo-5$ se observó en la punta una acumulación de filamentos

gruesos y largos que co-localizaban en algunas áreas con la nube teñida con FM4-64 (Figura 31A y B, flecha y cabezas de flecha; Figura 32). Apparently estos filamentos se movían sin perder su forma (Figura 31C, cabeza de flecha). Ocasionalmente se observaron algunos parches en el citoplasma, pero no se logró ver el collar subapical.

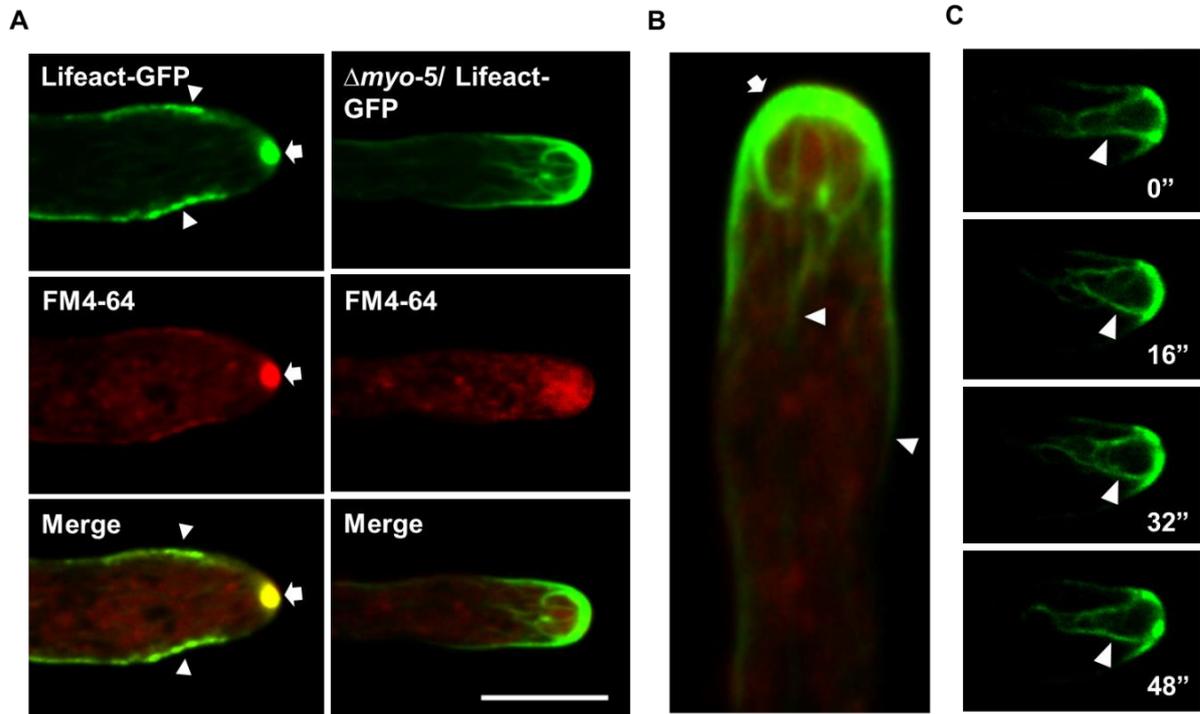


Figura 31. Citoesqueleto de actina en la mutante $\Delta myo-5$. A) En la cepa WT, Lifect-GFP se concentra en un punto en el ápice que co-localiza con el Spk (flecha) y en parches que forman un anillo endocítico subapical (cabezas de flecha). Por el contrario, en la mutante $\Delta myo-5$ se forman filamentos largos y gruesos que co-localizan parcialmente con la nube teñida por FM4-64. Barra de escala de 10 μm . B) Detalle de la distribución de la Lifect en la mutante $\Delta myo-5$. Se observa acumulación en la punta de la hifa (flecha) y parece que a partir de este sitio comienzan a emerger filamentos largos y gruesos que abarcan la región apical y subapical. C) Dinámica de los filamentos en la mutante $\Delta myo-5$. Los filamentos aparentemente no pierden su tamaño mientras la hifa crece.

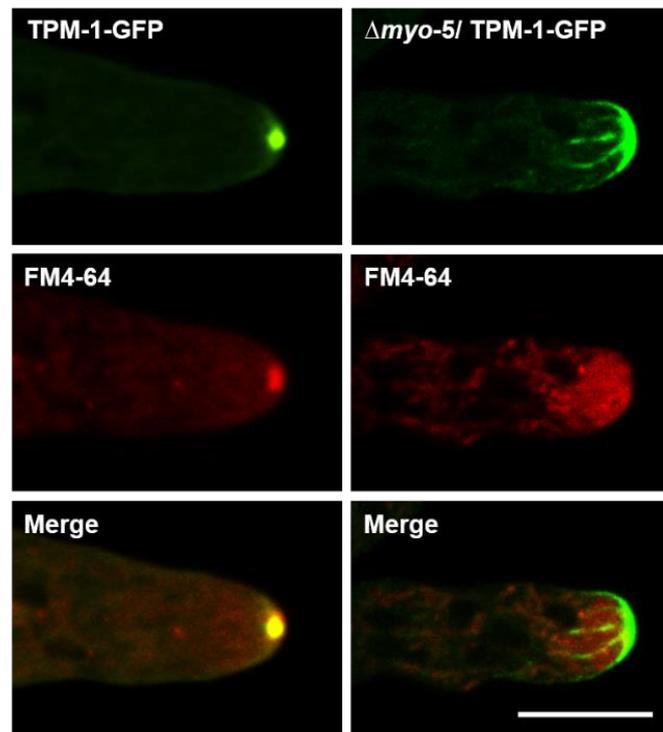


Figura 32. TPM-1-GFP en hifas maduras de la mutante $\Delta myo-5$. Imagen confocal mostrando el marcador de actina TPM-1 etiquetado con GFP y el colorante de membrana FM4-64 en la WT (paneles izquierdos) y $\Delta myo-5$ (paneles derechos). Barra de escala= 10 μm

Adicionalmente a la observación de la localización y dinámica de la actina, se realizó un ensayo utilizando la técnica de FRAP. La técnica consistió en fotoblanquear por 4s un área específica de interés y observar la recuperación de la fluorescencia. En hifas de la cepa silvestre utilizando los marcadores de actina Lifeact-GFP y TPM-1-GFP, se observó que les llevaba 1 min recuperar el 50% de la fluorescencia (Figura 33A y C y Figura 34), mientras que en la cepa mutante $\Delta myo-5$, la fluorescencia se recuperó solo un 30% en 3 minutos (Figura 33B y D y Figura 34).

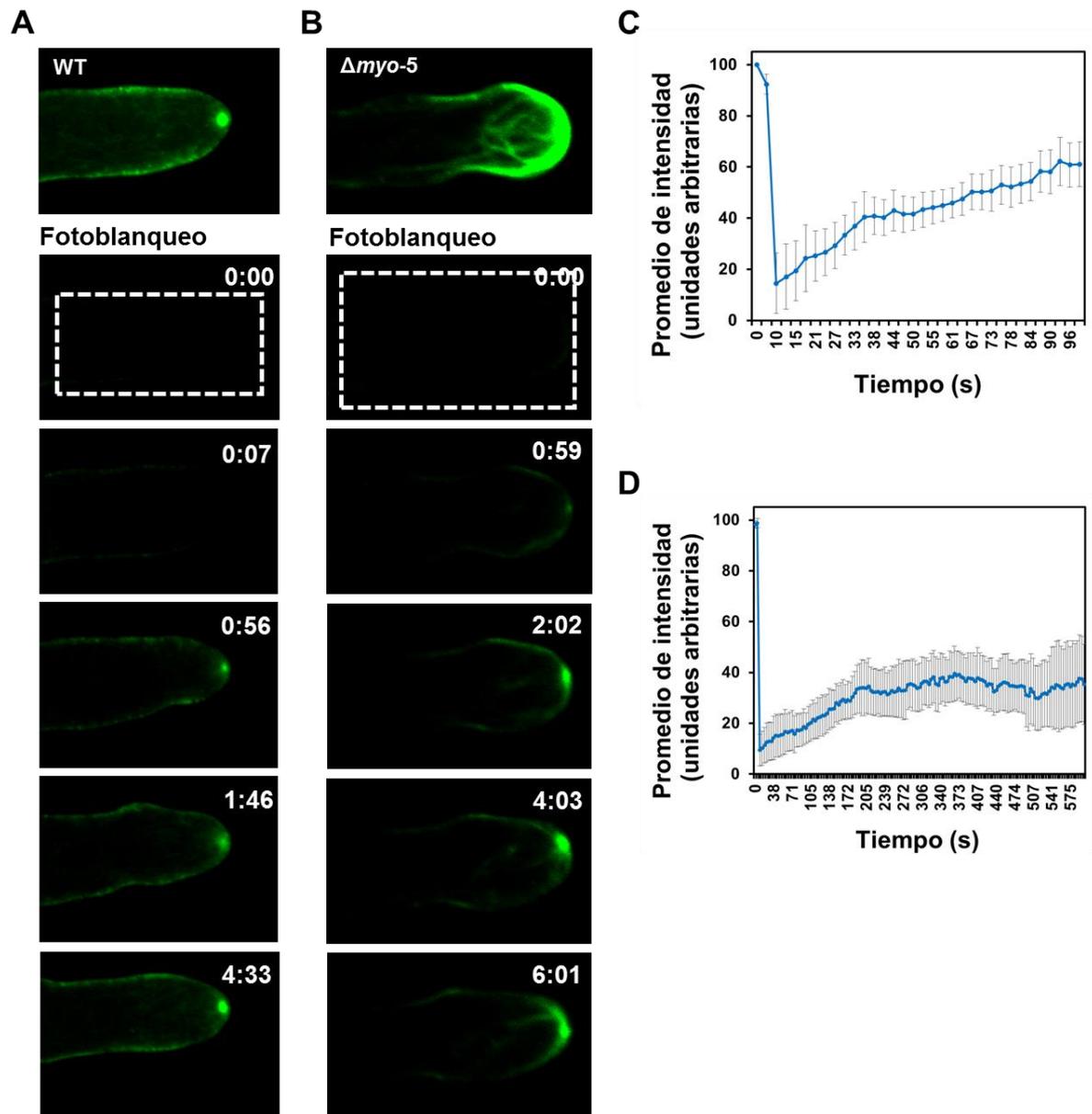


Figura 33. Análisis de FRAP de Lifeact-GFP en la punta de hifas mutantes de $\Delta myo-5$. El fotoblanqueamiento se hizo en el área indicada por un rectángulo punteado. A) En hifas de la cepa silvestre, recuperar el 50% de fluorescencia le lleva 1 min. B) En hifas mutantes se observa que la recuperación de solo el 30% de la fluorescencia en la punta ocurre en 3 min. C y D) Gráfica de la recuperación de la fluorescencia en el tiempo de la cepa silvestre y la mutante $\Delta myo-5$, respectivamente. Intervalo de confianza del 95%.

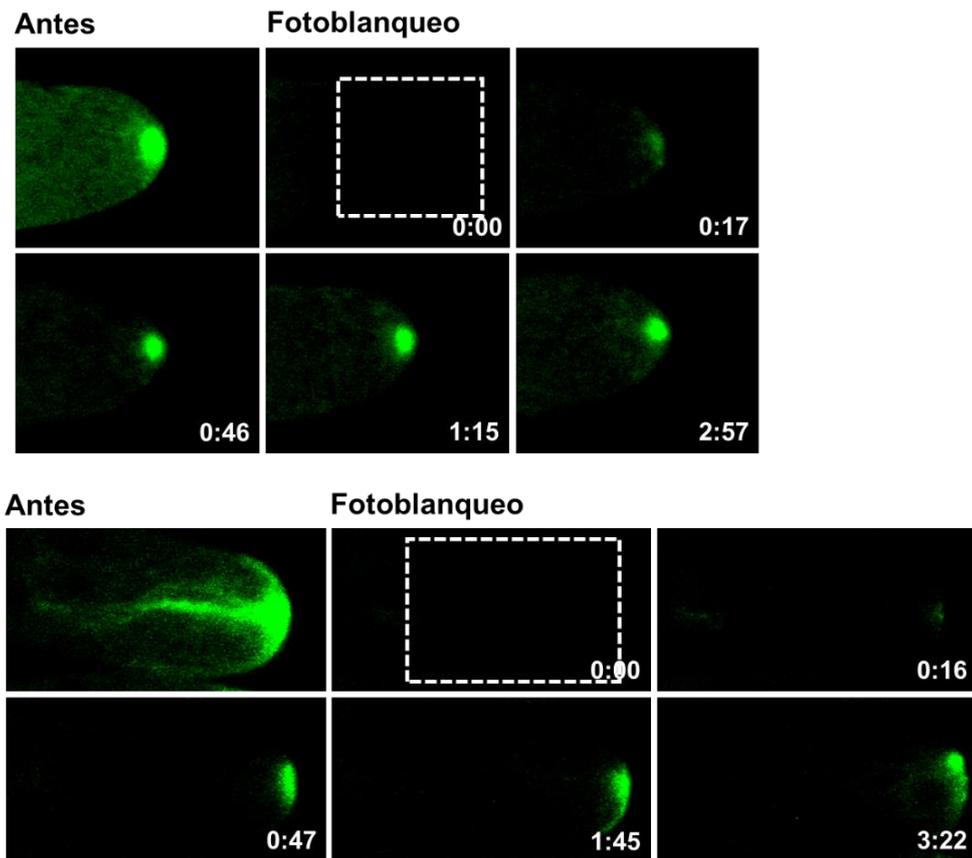


Figura 34. Series de tiempo del experimento de FRAP de TPM-1-GFP en el ápice de las hifas. El primer panel corresponde al pre-fotoblanqueo de la hifa y el tiempo 0:00 (min:s) corresponde al momento del fotoblanqueamiento. El rectángulo punteado señala el área fotoblanqueada.

Debido a que solo ocasionalmente se visualizaron parches de actina en el subápice de las hifas maduras de la mutante $\Delta myo-5$, se observó la proteína fimbrina etiquetada con GFP, FIM-1-GFP, para corroborar la localización de éstos. La proteína fimbrina es una ABP que se asocia exclusivamente a los parches de actina. En la cepa WT, FIM-1-GFP se encontró formando un collar de parches en el subápice (Figura 35B) y ocasionalmente se observaron parches en la periferia después del collar (Figura 35A, cabezas de flecha). Por el contrario, en la mutante $\Delta myo-5$ los parches de fimbrina se encontraron en toda la hifa, tanto en la periferia como en el citoplasma (Figura 35A, cabezas de flecha), y formaban un collar anormal muy cercano al ápice (Figura 35B).

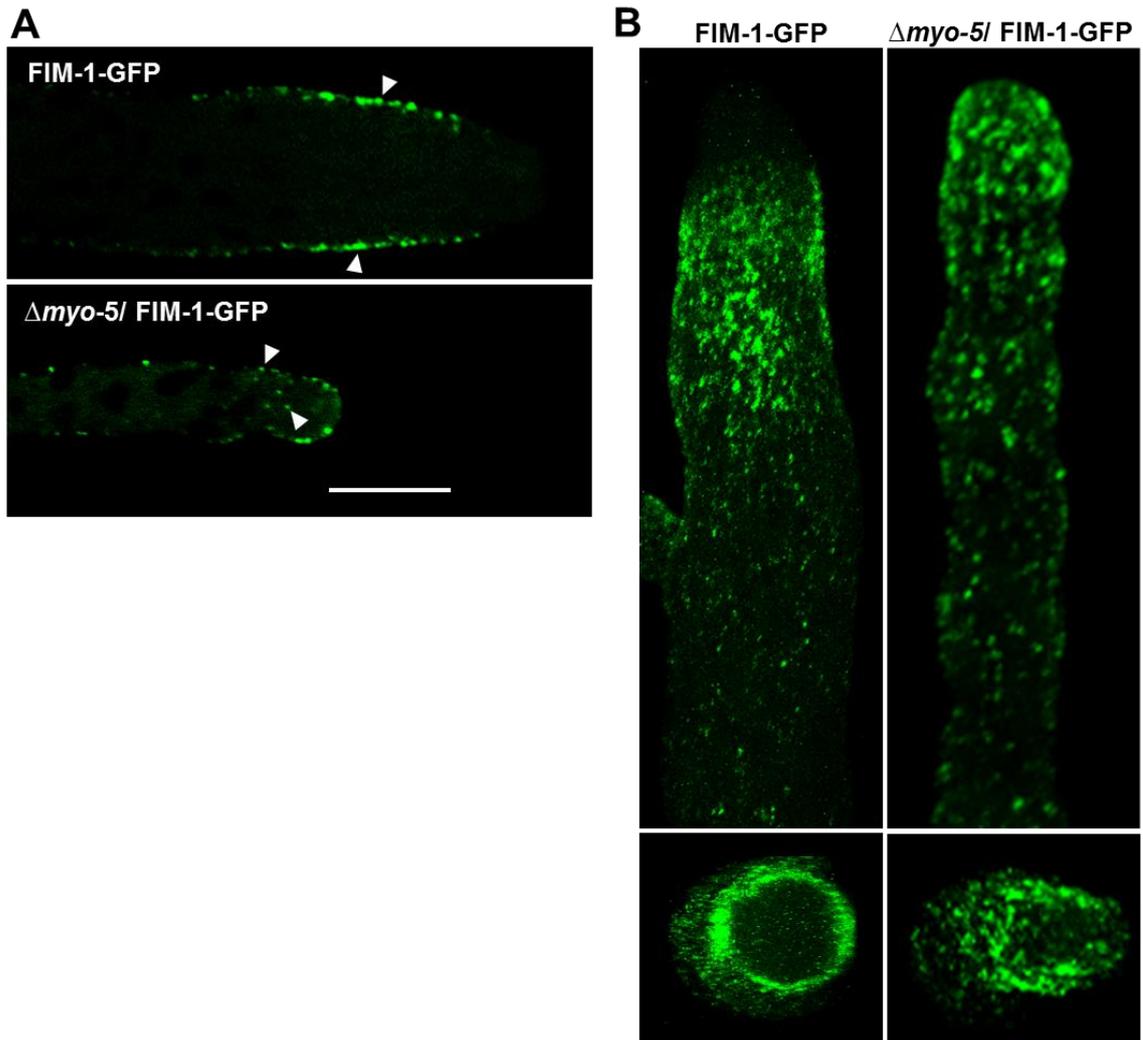


Figura 35. Localización de la FIM-1-GFP en hifas maduras de la mutante $\Delta myo-5$. A) Imagen confocal de FIM-1-GFP mostrando la acumulación de parches de actina en WT y la mutante $\Delta myo-5$. B) Reconstrucción en 3D mostrando parches de actina. Panel superior: Vista lateral mostrando la distribución de los parches de actina a lo largo de la hifa en la WT (panel izquierdo) y la mutante $\Delta myo-5$ (panel derecho). Panel inferior: Vista frontal de la hifa del panel superior mostrando un collar endocítico normal y anormal en WT y la mutante $\Delta myo-5$, respectivamente. Barra de escala= 10 μm .

Capítulo 4. Discusión

Las miosinas de clase V son proteínas motoras asociadas a los microfilamentos de actina involucrados en el movimiento de una amplia variedad de cargas intracelulares en células eucariotas. El tipo de carga que transportan depende de cada organismo, y no siempre es el mismo. Se ha reportado que son necesarios adaptadores específicos para que las cargas intracelulares se acoplen/desprendan del dominio globular de la cola de las miosinas de clase V. En organismos como mamíferos y levaduras se han identificado los adaptadores de diferentes cargas necesarios para la unión a la miosina de clase V, sin embargo, en hongos filamentosos aún se desconocen. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las probables cargas intracelulares que son transportadas por la única miosina de clase V de *N. crassa*, por medio de la identificación de los adaptadores asociados mediante el estudio detallado de la estructura tridimensional *in situ* y la dinámica *in vivo*. Además, de acuerdo a los estudios previos también se evaluó con mayor detalle la dinámica de la miosina de clase V y su relación con el citoesqueleto de actina, para poder determinar su papel en la integridad del Spitzenkörper.

4.1 La estructura tridimensional del GTD de MYO-5 es similar a la de Myo2p pero no Myo4p de *S. cerevisiae*.

La miosina de clase V de *N. crassa*, MYO-5, es una proteína de 1594 aminoácidos resultando ser ligeramente más grande que las miosinas de la misma clase reportadas para hongos como *A. nidulans* (MyoE; 1570 aa), *C. albicans* (Myo2; 1561 aa), *S. cerevisiae* (Myo2p, 1574 aa; Myo4p, 1471 aa) pero es más pequeña que las miosinas de mamíferos como *Mus musculus* (MyoVa; 1853 aa).

En las miosinas de clase V la región de la cola es el dominio involucrado en el transporte de cargas intracelulares. Previamente llevaron a cabo un análisis detallado de la estructura cristalográfica del dominio globular de la cola de las dos miosinas de clase V de *S. cerevisiae*, Myo2p y Myo4p (Heuck et al., 2010; Pashkova et al., 2006). Se encontró que la estructura de MYO-5 de *N. crassa* es muy similar a la reportada para Myo2p, pero difiere de la de Myo4p. Esto concuerda con el hecho de que el GTD de MYO-5 tiene un porcentaje de identidad mayor con Myo2p que con Myo4p. En *S. cerevisiae* también se han identificado los aminoácidos esenciales para la unión de vacuolas y vesículas secretoras (Pashkova et al., 2006), y en este estudio se observó que estos residuos se encuentran presentes en el GTD de MYO-5, sugiriendo que además MYO-5 podría ser funcionalmente similar a Myo2p.

4.2 El modelo estructural del GTD de MYO-5 se estabiliza en presencia de los adaptadores

Los ensayos de simulación de dinámica molecular, mostraron que los valores de RMSD del modelo tridimensional de MYO-5 en uno de los tres ensayos aumentaron durante la trayectoria. Este cambio en la estabilidad de la proteína podría ser debida a la flexibilidad de la región del carboxilo terminal del GTD, como se observó en el análisis por RMSF. La inestabilidad en esta región, puede afectar la conformación completa del GTD. La región del carboxilo terminal corresponde a la zona del subdominio I que no tiene el sitio de unión a vacuolas. Se observó que cuando los adaptadores se asociaban al GTD de MYO-5, los valores de RMSD y RMSF mostraban que éste era más estable en comparación que cuando no estaba asociado a con ningún adaptador. Estos cambios en el GTD de MYO-5, sugieren que la flexibilidad está relacionada con su capacidad para permitir que el adaptador pueda asociarse y una vez que lo hace, ocurre un cambio conformacional en el GTD que hace que se estabilice. Esto también podría estar relacionado con el hecho de que el GTD no puede asociarse a dos cargas intracelulares al mismo tiempo como se ha reportado en *S. cerevisiae* (Pashkova et al., 2006), haciendo que GTD se vuelva menos flexible al unirse al adaptador e impidiendo que otro pueda unirse.

4.3 Adaptadores asociados al GTD de MYO-5

En una variedad de organismos eucariotas, principalmente levaduras y mamíferos, se ha reportado que son necesarios adaptadores específicos para que la miosina de clase V pueda cumplir su papel de transporte. Para determinar las cargas que son transportadas por MYO-5, se identificaron los adaptadores que se asociaban a esta mediante un ensayo de CoIP. El ensayo mostró que 189 proteínas se asociaban con la miosina de clase V, pero se seleccionaron solo ocho probables adaptadores basándonos en estudios previos: se eligieron proteínas que estuvieran relacionados con el transporte de vacuolas, vesículas o que estuvieran involucradas en el desarrollo de *N. crassa*. Posteriormente se hizo un análisis de la estructura y de su asociación con el GTD de MYO-5 por medio de la generación de modelos tridimensionales, lo cual nos permitió elegir candidatos para un estudio más detallado. Se descartaron seis de los ocho adaptadores seleccionados inicialmente. El probable adaptador RCM-1 y cuatro de las cinco proteínas de unión a ARN fueron descartadas debido a que las interacciones que tienen con el GTD de MYO-5 podían comprometer la función/asociación de cualquiera cuando se etiquetaran con GFP. La proteína NCU08316, aunque resultaba un buen candidato por su posible papel en el transporte vesicular, fue descartada desde el inicio debido a que es una proteína de gran tamaño (1305 aa, casi el tamaño del GTD de MYO-5) que resultaba costosa computacionalmente si se intentaba

acoplar con el GTD de MYO-5. Las proteínas SNA-10 (*snare complex-10*) y la proteína NCU06459, denominada en este trabajo como RBA-1 (*RNA-binding adaptor*), fueron los candidatos seleccionados.

SNA-10 es una proteína de 562 aa con un dominio PX en el amino terminal y un dominio SNARE en el carboxilo terminal. La presencia de estos dos dominios sugería que SNA-10 podía ser un adaptador de vesículas o vacuolas, lo que resultaba importante ya que anteriormente se había reportado que la distribución de vesículas y vacuolas se veía comprometida en la mutante $\Delta myo-5$ en *N. crassa* (Ramírez-del Villar et al., 2019). El acoplamiento molecular del adaptador con el GTD de MYO-5 mostro que se asociaba con el subdominio I incluyendo el sitio de unión a vacuolas y la mayoría de los residuos importantes para la unión a vacuolas (Pashkova et al., 2005a; Pashkova et al., 2005b; Pashkova et al., 2006). La región donde interactúan sugiere que SNA-10 es una proteína involucrada en el transporte de vacuolas y no de vesículas secretoras.

En *S. cerevisiae* se han identificado los adaptadores necesarios para la asociación de Myo2p con las vacuolas. En este organismo el adaptador Vac17p se une a Myo2p seguido por la unión de Vac8p que se asocia a la vacuola (Ishikawa et al., 2003; Tang et al., 2003). No se encontraron ortólogos de estos adaptadores en *N. crassa*, y el BLASTp de SNA-10 con estos adaptadores mostro un porcentaje de identidad muy bajo. Esto sugiere que en *N. crassa* los adaptadores para vacuolas podrían ser distintos de los reportados para otros hongos como las levaduras. Además del BLAST con estos adaptadores, se hizo un BLASTp para buscar si SNA-10 tenía ortólogos en *S. cerevisiae*. Se encontró que presentaba dos ortólogos, Snx4p y Vam7p, de los cuales Vam7p resulto ser una t-SNARE involucrada en el tráfico vacuolar (Ungermann y Wickner, 1998). Sin embargo, ninguna de estas proteínas ha sido reportada hasta el momento como un adaptador de la miosina de clase V.

Además de los ensayos *in silico* para el adaptador, se hicieron observaciones in vivo donde se etiquetó SNA-10 con la proteína GFP en el extremo carboxilo terminal. SNA-10-GFP se localizaba como estructuras circulares y tubulares en la región distal de las hifas, localización similar a la que se observa con la proteína SNARE asociada a vacuolas VAM-3 (Bowman et al., 2009) y el fluoróforo Oregon Green 488 (Bowman et al., 2015). Esto corrobora que SNA-10 es una proteína relacionada a vacuolas. Sin embargo, aunque la localización aparentemente era correcta, SNA-10-GFP estaba afectada en su función porque estaba etiquetada en una región que podría interferir en la interacción entre MYO-5 y SNA-10. De acuerdo al modelo de acoplamiento molecular realizado, la interacción entre el GTD de MYO-5 y SNA-10 se produce en el carboxilo terminal de la proteína SNA-10. A pesar de esto, se marcó con GFP en esta región ya que en el amino terminal se encuentra el dominio PX involucrado en la unión a las vacuolas. De acuerdo al modelo de acoplamiento molecular y a la distancia que se encuentra el

dominio PX del inicio del amino terminal, se puede sugerir que en el futuro se marque la proteína SNA-10 en el amino terminal.

En *S. cerevisiae* se ha reportado que una de sus dos miosinas de clase V, Myo4p está relacionada exclusivamente con el transporte de ARNm (Böhl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa y Vale, 2000). Como se comentó anteriormente, MYO-5 es una miosina cuya secuencia proteica y estructura tridimensional está más relacionada con Myo2p que con Myo4p. Inclusive los residuos en Myo4p que han sido reportados como necesarios para la unión con el adaptador de unión a ARNm (Dunn et al., 2007) no son encontrados en MYO-5. Sin embargo, en el ensayo de ColP se encontraron proteínas con dominios de unión a ARN. El modelo de acoplamiento molecular con el GTD de MYO-5 mostró que cuatro de las cinco proteínas que tenían dominios de unión a ARN, no se asociaban en una región específica del GTD de MYO-5. Además, los sitios en los que el GTD de MYO-5 se asociaba eran parte de los dominios de unión a ARN. Estos resultados en cuatro de las cinco proteínas quizás podrían deberse a que las proteínas con dominios de unión a ARN son muy pequeñas (<400 aminoácidos) haciendo que el espacio de interacción también se reduzca, por lo que puede parecer que las interacciones estén en todas partes y que se estén interrumpiendo dominios importantes, aunque realmente esto no esté pasando. Por el contrario, la proteína RBA-1 fue la única que no tenía dominios que estaban siendo interrumpidos por el GTD de MYO-5 y su asociación con éste se producía en una región específica (el subdominio II). RBA-1 es una proteína de 789 aminoácidos (más grande que las otras cuatro proteínas de unión a ARN analizadas) con tres dominios de unión ARN. El análisis de BLASTp entre RBA-1 y el adaptador She3p importante para la unión de Myo4p al ARNm (Böhl et al., 2000; Dunn et al., 2007; Hodges et al., 2008; Jansen et al., 1996; Long et al., 2000) mostró un porcentaje de identidad muy bajo (33%; query cover 9%), sugiriendo que RBA-1 no está relacionado con este adaptador. La búsqueda de ortólogos en *S. cerevisiae* reveló que Mrn1p tenía un porcentaje alto de identidad con RBA-1 (55%, query cover 61%). Se ha reportado que Mrn1p es una proteína que interactúa con 378 ARNs y que parece estar involucrado en la maduración del pre-ARNm (Düring et al., 2012; Li et al., 2010). A pesar del alto porcentaje de identidad y que parecen estar relacionados funcionalmente, no se ha reportado que Mrn1p sea un adaptador de Myo4p en *S. cerevisiae*. Estos resultados sugieren que MYO-5 podría estar transportando ARN, sin embargo, los residuos en el GTD de MYO-5 que estén participando en la asociación y la naturaleza del ARN que pueda estar transportando aún no pueden ser definidas.

Del mismo modo que para SNA-10, RBA-1 también se etiquetó con la proteína fluorescente GFP, pero en el amino terminal debido a que la asociación con el GTD de MYO-5 se estaba produciendo principalmente en el carboxilo terminal. A pesar de que no observamos diferencias en el crecimiento radial de las colonias de la cepa GFP-RBA-1, observamos que GFP-RBA-1 se localizó en estructuras puntiformes en la región distal.

4.4 Inhibición de la actividad de MYO-5

Estudios anteriores han reportado que la ausencia de MYO-5 en *N. crassa* produce anomalías en el crecimiento y en la conidiación (Ramírez-del Villar et al., 2019). Debido a esto se utilizó el inhibidor Pentabromopseudilina (PBP). PBP es una molécula no competitiva que reduce la disociación del ADP, la hidrólisis/unión de ATP y el acoplamiento entre actina en los sitios de unión a nucleótidos, y que tiene un mayor efecto global sobre la dinámica del ATP que el inhibidor MyoVin-1 (Bond et al., 2013). Se ha reportado que a la CI_{50} de 1.2 μ M, PBP es un inhibidor exclusivo de la miosina de clase V que se une al bolsillo cercano a la punta de fisura de 50 kDa en el dominio motor (Bond et al., 2013). Sin embargo, a concentraciones superiores a 1.2 μ M podría provocar la pérdida de la especificidad afectando la actividad del resto de las miosinas (Bond et al., 2013; Fedorov et al., 2009). En *S. cerevisiae*, las células tratadas con 500 nM de PBP muestran un fenotipo de fragmentación mitocondrial similar a lo observado en las mutantes con defectos en la expresión de Myo2p (Fedorov et al., 2009). En *S. pombe*, se observó que la actividad de Myo52p se inhibe a una concentración de 2 μ M (Li et al., 2018). En *N. crassa* MYO-5-GFP, a concentraciones mayores de 0.2 μ M no se observó crecimiento de las colonias después de 24 h, por lo que se asumió que PBP estaba inhibiendo la actividad de todas las miosinas. A la concentración de 0.2 μ M, el crecimiento de la colonia era lento, sugiriendo que MYO-5 era inhibida pero no el resto de las miosinas. A concentraciones \leq 0.2 μ M las hifas crecían con normalidad, indicando que ninguna miosina estaba siendo inhibida, ni siquiera MYO-5. A pesar de que a 0.2 μ M de PBP se observa una disminución del crecimiento significativo, no se obtuvo el fenotipo de la mutante $\Delta myo-5$ (Ramírez-del Villar et al., 2019). Además de la morfología macroscópica de las colonias con el inhibidor, se hicieron observaciones de la localización de MYO-5. A todas las concentraciones probadas de PBP, la localización de MYO-5-GFP era la misma que la reportada anteriormente (Ramírez-del Villar et al., 2019; Sánchez-León et al., 2015). Probablemente esto puede deberse a que PBP, al interrumpir el intercambio de ATP/ADP en el dominio motor, hace que MYO-5 permanezca unida a los filamentos de actina. Además, se observó que a concentraciones \geq 0.2 μ M la fluorescencia de MYO-5-GFP se blanqueaba rápidamente y no se recuperaba, reafirmando el hecho de que la actividad de MYO-5 está siendo inhibida a esa concentración.

4.5 MYO-5 ^{Δ 1229}-GFP y MYO-5 ^{Δ 1436}-GFP se localizan a lo largo de toda la hifa.

En *A. fumigatus* se ha reportado que la eliminación total o parcial del GTD de la miosina de clase V, MyoE, resulta en anomalías en el crecimiento similares a las observadas cuando se elimina el gen completo (Renshaw et al., 2018). Además, en *N. crassa* se observó que la eliminación de los residuos

Q1378-E1481, localizados en el GTD, afecta gravemente el crecimiento (Fajardo-Somera, 2013). Sin embargo, observamos que en las mutantes MYO-5^{Δ1229}-GFP y MYO-5^{Δ1436}-GFP, el crecimiento radial era el mismo que la cepa silvestre y la cepa parental. Del mismo modo, se observó que en ambas versiones de MYO-5 truncada, MYO-5 se localizaba en estructuras tubulares y circulares a lo largo de toda la hifa a diferencia de la localización apical observada en las mutantes truncadas en *N. crassa* (Fajardo-Somera, 2013) o *A. fumigatus* (Renshaw et al., 2018). Se cree que la morfología de las colonias y la localización de MYO-5 en las versiones truncadas MYO-5^{Δ1229}-GFP y MYO-5^{Δ1436}-GFP puede deberse a que el casete con el que se transformó pudo haberse integrado en otro sitio, de modo que aún existe la versión de MYO-5 completa, sin embargo, se requiere corroborar lo anterior.

4.6 MYO-5 se mueve a distintas velocidad y direcciones en las hifas

Los estudios en los que se describe la dinámica de las partículas de las miosinas de clase V en hongos son pocos. En *S. cerevisiae*, se encontró que tanto Myo2p como Myo4p eran motores activos que alcanzaban velocidades máximas de $4.5 \mu\text{m s}^{-1}$ y $1.1 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente (Reck-Peterson et al., 2001). En este mismo estudio, se concluyó que ambas miosinas de clase V tenían propiedades de un motor no procesivo, a diferencia de MyoVa (Hammer III y Sellers, 2012). Además, Myo2p presentaba baja afinidad a la actina en presencia de ATP y Ca^{2+} a diferencia de Myo5a, sugiriendo que al menos 5 moléculas de Myo2p debían estar presentes por organelo para poder promover el movimiento directo (Reck-Peterson et al., 2001). También se demostró que la velocidad de movimiento de Myo2p, una vez que estaba asociada a las cargas, era de $3 \mu\text{m s}^{-1}$ y $1.5 \mu\text{m s}^{-1}$ (Beach et al., 2000; Schott et al., 1999) y de $0.5 \mu\text{m s}^{-1}$ para Myo4p. En este estudio se encontró que MYO-5, en general, hace varias pausas ($0 \mu\text{m s}^{-1}$) moviéndose hacia adelante y atrás (ocasionalmente) a una velocidad de $1.08 \mu\text{m s}^{-1}$ (máxima $2.7 \mu\text{m s}^{-1}$). Estas velocidades son similares a las reportadas para Myo2p cuando está asociada a la carga (Beach et al., 2000; Schott et al., 1999).

4.7 El Spk está desorganizado en la mutante $\Delta myo-5$.

Se sabe que el crecimiento polarizado en las hifas es generado por la exocitosis masiva de vesículas secretoras en el ápice gracias al Spk (Bartnicki-García, 2002; Bartnicki-García et al., 1989). Anteriormente se reportó que en la mutante $\Delta myo-5$ el Spk no estaba presente, y en su lugar había una nube difusa de vesículas ocupando el domo apical (Ramírez-del Villar, et al., 2019). A nivel

ultraestructural, se corroboró que las macrovesículas estaban dispersas en el citoplasma abarcando la región apical y subapical, al igual que las microvesículas que observamos con CHS-1-GFP.

En *U. maydis* se observó que la ausencia de kinesina-1 no inhibía la movilidad anterógrada de los Vac (vesículas que contienen CHS). Sin embargo, la afectación de F-actina y la miosina de clase V inhibía la movilidad de Vacs, lo que sugiere que tanto la actina como los microtúbulos están involucrados en la secreción de Vacs (Schuster et al., 2012). Sin embargo, en este estudio se observó que el transporte de las microvesículas que contienen CHS-1 era independiente de MYO-5 y microtúbulos, como sugiere su presencia en el ápice de las hifas (Sánchez-León et al., 2011).

4.8 MYO-5 participa en la selección del sitio de formación del septo

Anteriormente, se observó que MYO-5-GFP estaba localizada en los septos formando un anillo de fluorescencia débil y que la presencia de la proteína no resultaba esencial para la construcción de la pared celular, aunque la frecuencia septal y la distancia interseptal estaban afectadas (Ramírez-del Villar et al., 2019). Además de estos hechos, se comprobó que MYO-5 también estaba involucrada en la selección del sitio de septación. En *A. fumigatus* se ha reportado que MyoE parece mantener la frecuencia regular de la septación, pero mencionan que sirve como un punto de referencia para que los septos completamente formados puedan regular la frecuencia de la septación (Renshaw et al., 2016), mismo que podría estar ocurriendo en *N. crassa*.

4.9 La organización del citoesqueleto de actina la mutante $\Delta myo-5$ está afectado

Estudios previos revelaron que la mutante $\Delta myo-5$ produce constantemente ramas apicales y forma colonias pequeñas y compactas (Ramírez-del Villar et al., 2019), fenotipo que también se observa en la mutante del gen *act1* y en hifas con tratamiento anti-actina (Renshaw et al., 2016; Taheri-Talesh et al., 2012; Torralba y Heath, 2002; Virag y Griffiths, 2004). En este estudio se observó que, en la mutante, los cables de actina son largos, gruesos y estables. Además, el intercambio de actina era más lento que en la cepa WT. Estos datos apoyan el papel de que MYO-5 participa en el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado. En *S. pombe*, la ausencia de Myo52 produce una desorganización de los cables de actina, ya que induce una fuerza de tensión que aumenta el rango de polimerización de actina y, por lo tanto, la actividad de la formina 3 (Presti

et al., 2012). En *S. cerevisiae*, Myo2 y la formina Bnr1 participan en el movimiento rápido de actina a través de la corteza en células no polarizadas (Yu y Wedlich-Söldner, 2011), una vez que las células se polarizan, Bnr1 polimeriza la actina hacia el cuello de la yema. Mientras tanto, Myo2 se agota de la corteza celular y se dirige hacia la gema para el transporte de organelos a los sitios de polarización. Además, se ha encontrado que la proteína pasajera miosina similar a kinesina Smy1, que interactúa con el dominio FH2 de la formina Bnr1, es una carga de la miosina de clase V. De esta manera, la miosina de clase V transporta vesículas secretoras y Smy1 sobre los cables de actina hacia el cuello de la gema. Smy1 interactúa de forma transitoria con Bnr1 para retardar la extensión de los cables de actina y evitar así su sobrecrecimiento (Chesarone-Cataldo et al., 2011; Eskin et al., 2016). Además de los cables, la localización de los parches de actina endocítico está afectada como se muestra en *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2012). Los parches de actina se acumularon en el domo apical y no en el collar subapical. Sin embargo, no se observó que la internalización del marcador endocítico FM4-64 estuviera afectada, lo que sugiere que MYO-5 no está involucrado en la endocitosis en *N. crassa*.

Capítulo 5. Conclusión

- El GTD de MYO-5 se une a adaptadores asociados al transporte de vacuolas y probablemente de ARNm.
- El acoplamiento entre el GTD de MYO-5 y los adaptadores le da estabilidad estructural al dominio.
- El GTD de MYO-5 es importante para la función de transporte de cargas intracelulares en *N. crassa*.
- MYO-5 podría ser un motor no procesivo que requiere más de una proteína para transportar las cargas intracelulares.
- MYO-5 requiere una concentración menor del inhibidor PBP que la CI_{50} reportada para poder ser inhibida, arriba de esas concentraciones las hifas dejan de crecer.
- MYO-5 no está involucrada en la endocitosis en *N. crassa*.
- MYO-5 participa en el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado, lo que mantiene la correcta organización del Spitzenkörper.
- MYO-5 está involucrada en la selección del sitio de septación.

Literatura citada

- Alberts, B., Bray, D. 2006. Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana.
- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: outstanding questions. *Mycology Series*. 15, 29-58.
- Bartnicki-García, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R. a., Bracker, C. E. 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: A test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*. 19(2), 153-159. doi:<https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1017>
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153(1), 46-57. doi:10.1007/bf01322464
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., Gierz, G. 1990. A novel computer model for generating cell shape: application to fungal morphogenesis. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 43-60.
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E., Bloom, K. 2000. The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Current Biology*. 10(23), 1497-1506.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.-Y., Tilsner, J., Read, N. D. 2010. F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*. 9(4), 547-557.
- Böhl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., Jansen, R. P. 2000. She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The European Molecular Biology Organization journal*. 19(20), 5514-5524.
- Boldogh, I. R., Ramcharan, S. L., Yang, H.-C., Pon, L. A. 2004. A type V myosin (Myo2p) and a Rab-like G-protein (Ypt11p) are required for retention of newly inherited mitochondria in yeast cells during cell division. *Molecular Biology of the Cell*. 15(9), 3994-4002.
- Bond, L. M., Tumbarello, D. A., Kendrick-Jones, J., Buss, F. 2013. Small-molecule inhibitors of myosin proteins. *Future medicinal chemistry*. 5(1), 41-52.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(1), 1-108.
- 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*. *Eukaryotic cell*. 8(12), 1845-1855.
- Bowman, B. J., Draskovic, M., Schnittker, R. R., El-Mellouki, T., Plamann, M. D., Sánchez-León, E., Riquelme, M., Bowman, E. J. 2015. Characterization of a novel prevacuolar compartment in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*. 14(12), 1253-1263.
- Burgess, S., Walker, M., Wang, F., Sellers, J. R., White, H. D., Knight, P. J., Trinick, J. 2002. The prepower stroke conformation of myosin V. *The Journal of Cell Biology*. 159(6), 983-991.
- Catlett, N. L., Weisman, L. S. 1998. The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(25), 14799-14804.

- Cerutti, D., Cheatham III, T., Darden, T., Duke, R., Giese, T., Gohlke, H., Goetz, A., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P. 2016. Amber 2016. University of California, San Francisco.
- Clayton, J. E., Pollard, L. W., Skolnick, M., Bookwalter, C. S., Hodges, A. R., Trybus, K. M., Lord, M. 2014. Fission yeast tropomyosin specifies directed transport of myosin-V along actin cables. *Molecular Biology of the Cell*. 25(1), 66-75.
- Coluccio, L. M. 2007. Myosins: a superfamily of molecular motors. Springer Science & Business Media.
- Consortium, U. 2018. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 46(5), 2699.
- Cooper, G. M., Hausman, R. 2000. The cell: a molecular approach. American Society for Microbiology press, Washington, DC.
- Chen, F., Liu, H., Sun, H., Pan, P., Li, Y., Li, D., Hou, T. 2016. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein–protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein–protein docking. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 18(32), 22129-22139.
- Cheney, R. E., Mooseker, M. S. 1992. Unconventional myosins. *Current opinion in cell biology*. 4(1), 27-35.
- Cheney, R. E., Riley, M. A., Mooseker, M. S. 1993. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell motility and the cytoskeleton*. 24(4), 215-223.
- Chesarone-Cataldo, M., Guérin, C., Jerry, H. Y., Wedlich-Soldner, R., Blanchoin, L., Goode, B. L. 2011. The myosin passenger protein Smy1 controls actin cable structure and dynamics by acting as a formin damper. *Developmental Cell*. 21(2), 217-230.
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., Mouriño-Pérez, R. R. 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 47(7), 573-586.
- Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., Baker, N. A. 2007. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic acids research*. 35, W522-W525.
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., Cohen, C. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: Visualization of the pre–power stroke state. *Cell*. 94(5), 559-571. doi:10.1016/s0092-8674(00)81598-6
- Dunn, B. D., Sakamoto, T., Hong, M.-S. S., Sellers, J. R., Takizawa, P. A. 2007. Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mRNA. *The Journal of Cell Biology*. 178(7), 1193-1206. doi:10.1083/jcb.200707080
- Düring, L., Thorsen, M., Petersen, D. S. N., Køster, B., Jensen, T. H., Holmberg, S. 2012. MRN1 implicates chromatin remodeling complexes and architectural factors in mRNA maturation. *PLOS ONE*. 7(9), e44373.
- Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M., Adelstein, R. S. 1973. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70(9), 2687-2691.
- Enrique, M., Wells, A. L., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M., Sweeney, H. L. 1999. The kinetic mechanism of myosin V. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(24), 13726-13731.

- Eskin, J. A., Rankova, A., Johnston, A. B., Alioto, S. L., Goode, B. L. 2016. Common formin-regulating sequences in Smy1 and Bud14 are required for the control of actin cable assembly *in vivo*. *Molecular Biology of the Cell*. 27(5), 828-837.
- Espindola, F. S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A. R., Costa, F., Mooseker, M. S., Larson, R. E. 1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *The Journal of Cell Biology*. 118(2), 359-368.
- Evans, L., Lee, A., Bridgman, P., Mooseker, M. 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *Journal of Cell Science*. 111(14), 2055-2066.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., Eitzen, G. A., Aitchison, J. D., Rachubinski, R. A. 2006. The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Cell*. 10(5), 587-600.
- Fajardo-Somera, R. A. 2013. Tráfico vesicular de las proteínas quitina sintasas y ATPasa de H⁺ de membrana plasmática durante el crecimiento de *Neurospora crassa*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 56-57 pp.
- Fedorov, R., Böhl, M., Tsiavaliaris, G., Hartmann, F. K., Taft, M. H., Baruch, P., Brenner, B., Martin, R., Knölker, H.-J., Gutzeit, H. O. 2009. The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nature structural & molecular biology*. 16(1), 80.
- Fischer-Parton, S., Parton, R., Hickey, P., Dijksterhuis, J., Atkinson, H., Read, N. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*. 198(3), 246-259.
- Fukuda, M., Kuroda, T. S., Mikoshiba, K. 2002. Slac2-a/Melanophilin, the Missing Link between Rab27 and Myosin Va. *Journal of Biological Chemistry*. 277(14), 12432-12436. doi:10.1074/jbc.C200005200
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422(6934), 859.
- Geeves, M. A., Holmes, K. C. 2005. The molecular mechanism of muscle contraction. *Advances in protein chemistry*. 71, 161-193.
- Gierz, G., Bartnicki-Garcia, S. 2001. A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center. *Journal of Theoretical Biology*. 208(2), 151-164. doi:https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2209
- Govindan, B., Bowser, R., Novick, P. 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol*. 128(6), 1055-1068.
- Grant, B. J., Rodrigues, A. P., ElSawy, K. M., McCammon, J. A., Caves, L. S. 2006. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*. 22(21), 2695-2696.
- Hammer III, J. A., Sellers, J. R. 2012. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature reviews Molecular cell biology*. 13(1), 13.
- Harris, K. P., Tepass, U. 2010. Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic*. 11(10), 1272-1279. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01102.x

- Hasson, T., Skowron, J. F., Gilbert, D. J., Avraham, K. B., Perry, W. L., Bement, W. M., Anderson, B. L., Sherr, E. H., Chen, Z.-Y., Greene, L. A. 1996. Mapping of unconventional myosins in mouse and human. *Genomics*. 36(3), 431-439.
- Heuck, A., Fetka, I., Brewer, D. N., Hüls, D., Munson, M., Jansen, R.-P., Niessing, D. 2010. The structure of the Myo4p globular tail and its function in ASH1 mRNA localization. *The Journal of Cell Biology*. 189(3), 497-510.
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., Read, N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in microbiology*. Academic Press, pp. 63-87.
- Hodges, A. R., Kremontsova, E. B., Trybus, K. M. 2008. She3p binds to the rod of yeast myosin V and prevents it from dimerizing, forming a single-headed motor complex. *Journal of Biological Chemistry*. 283(11), 6906-6914.
- Hoepfner, D., Van Den Berg, M., Philippsen, P., Tabak, H. F., Hettema, E. H. 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 155(6), 979-990. doi:10.1083/jcb.200107028
- Holmes, K. C. 2008. Myosin structure. *Myosins*. Springer, pp. 35-54.
- Horio, T., Oakley, B. R. 2004. The Role of Microtubules in Rapid Hyphal Tip Growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 16(2), 918-926. doi:10.1091/mbc.e04-09-0798
- Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C. 1999. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell*. 97(4), 459-470.
- Hume, A. N., Collinson, L. M., Hopkins, C. R., Strom, M., Barral, D. C., Bossi, G., Griffiths, G. M., Seabra, M. C. 2002. The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic*. 3(3), 193-202.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*. 14(1), 33-38.
- Ishikawa, K., Catlett, N. L., Novak, J. L., Tang, F., Nau, J. J., Weisman, L. S. 2003. Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *The Journal of Cell Biology*. 160(6), 887-897.
- Itakura, S., Yamakawa, H., Toyoshima, Y. Y., Ishijima, A., Kojima, T., Harada, Y., Yanagida, T., Wakabayashi, T., Sutoh, K. 1993. Force-generating domain of myosin motor. *Biochemical and biophysical research communications*. 196(3), 1504-1510.
- Itoh, T., Toh-e, A., Matsui, Y. 2004. Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *The European Molecular Biology Organization journal*. 23(13), 2520-2530.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh-e, A., Matsui, Y. 2002. Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 22(22), 7744-7757. doi:10.1128/MCB.22.22.7744-7757.2002
- Jansen, R.-P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., Nasmyth, K. 1996. Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell*. 84(5), 687-697.

- Jedd, G., Mulholland, J., Segev, N. 1997. Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *The Journal of Cell Biology*. 137(3), 563-580.
- Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J., Cooper, J. A. 2000. Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 11(5), 1727-1737.
- Kossen, N. W. F. 2000. The morphology of filamentous fungi. *History of Modern Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-33.
- Kron, S. J., Spudich, J. A. 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(17), 6272-6276.
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V. I., Selvin, P. R. 2005. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science*. 308(5727), 1469-1472.
- Kural, C., Serpinskaya, A. S., Chou, Y.-H., Goldman, R. D., Gelfand, V. I., Selvin, P. R. 2007. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(13), 5378-5382.
- Kuroda, T. S., Ariga, H., Fukuda, M. 2003. The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Molecular and Cellular Biology*. 23(15), 5245-5255.
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Roos, E. D., van den Hondel, C. A., Meyer, V., Ram, A. F. 2011. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Molecular Microbiology*. 79(5), 1151-1167.
- Larson, R. E., Espindola, F. S., Espreafico, E. M. 1990. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *Journal of neurochemistry*. 54(4), 1288-1294.
- Li, H., Ye, F., Ren, J.-Y., Wang, P.-Y., Du, L.-L., Liu, J.-L. 2018. Active transport of cytoophidia in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 32(11), 5891-5898.
- Li, X., Quon, G., Lipshitz, H. D., Morris, Q. 2010. Predicting in vivo binding sites of RNA-binding proteins using mRNA secondary structure. *Rna*. 16(6), 1096-1107.
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J., Barral, Y. 2003. Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell*. 112(4), 561-574.
- Lillie, S. H., Brown, S. S. 1994. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 125(4), 825-842. doi:10.1083/jcb.125.4.825
- Lodish, H., Zipursky, S. L. 2001. *Molecular cell biology*. Biochemistry and Molecular Biology Education. 29, 126-133.
- Long, R. M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R. H., Chartrand, P. 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *The European Molecular Biology Organization journal*. 19(23), 6592-6601.

- Loubéry, S., Coudrier, E. 2008. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(18), 2790-2800. doi:10.1007/s00018-008-8350-5
- Margolin, B., Freitag, M., Selker, E. 2000. Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of *Neurospora crassa* by electroporation: correction. *Fungal Genetics Reports*. 47(1), 112.
- Massova, I., Kollman, P. A. 2000. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspectives in drug discovery and design*. 18(1), 113-135.
- McCollum, D., Balasubramanian, M. K., Pelcher, L. E., Hemmingsen, S. M., Gould, K. L. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* cdc4+ gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*. 130(3), 651-660.
- Mehta, A. 2001. Myosin learns to walk. *Journal of Cell Science*. 114(11), 1981-1998.
- Mermall, V., Post, P. L., Mooseker, M. S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 279(5350), 527-533.
- Miller III, B. R., McGee Jr, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., Roitberg, A. E. 2012. MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of chemical theory and computation*. 8(9), 3314-3321.
- Mooseker, M. S., Foth, B. J. 2008. The structural and functional diversity of the myosin family of actin-based molecular motors. *Myosins*. Springer, pp. 1-34.
- Motegi, F., Arai, R., Mabuchi, I. 2001. Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Molecular Biology of the Cell*. 12(5), 1367-1380.
- Mouriño-Pérez, R. R. 2013. Septum development in filamentous ascomycetes. *Fungal Biology Reviews*. 27(1), 1-9.
- Mouriño-Pérez, R. R., Riquelme, M. 2013. Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. *Advances in genetics*. Elsevier, pp. 99-134.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., Botstein, D. 1994. Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*. 125(2), 381-391.
- Müller, F., Krüger, D., Sattlegger, E., Hoffmann, B., Ballario, P., Kanaan, M., Barthelmess, I. B. 1995. The cpc-2 gene of *Neurospora crassa* encodes a protein entirely composed of WD-repeat segments that is involved in general amino acid control and female fertility. *Molecular and General Genetics MGG*. 248(2), 162-173.
- Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., Izumi, T. 2002. Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 517(1-3), 233-238.
- Nan, X., Sims, P. A., Chen, P., Xie, X. S. 2005. Observation of individual microtubule motor steps in living cells with endocytosed quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry B*. 109(51), 24220-24224.

- Naqvi, N. I., Eng, K., Gould, K. L., Balasubramanian, M. K. 1999. Evidence for F-actin-dependent and independent mechanisms involved in assembly and stability of the medial actomyosin ring in fission yeast. *The European Molecular Biology Organization journal*. 18(4), 854-862.
- Nascimento, A. A., Amaral, R. G., Bizario, J. C., Larson, R. E., Espreafico, E. M. 1997. Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild-type cell line for the dilute gene. *Molecular Biology of the Cell*. 8(10), 1971-1988.
- Noguchi, T., Arai, R., Motegi, F., Nakano, K., Mabuchi, I. 2001. Contractile ring formation in *Xenopus* egg and fission yeast. *Cell structure and function*. 26(6), 545-554.
- Odrionitz, F., Kollmar, M. 2007. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome biology*. 8(9), R196.
- Olsson, M. H., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., Jensen, J. H. 2011. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. *Journal of chemical theory and computation*. 7(2), 525-537.
- Onufriev, A., Bashford, D., Case, D. A. 2004. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 55(2), 383-394.
- Pagadala, N. S., Syed, K., Tuszynski, J. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*. 9(2), 91-102.
- Pantazopoulou, A., Pinar, M., Xiang, X., Pe alva, M. A. 2014. Maturation of late Golgi cisternae into RabERAB11 exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Molecular Biology of the Cell*. 25(16), 2428-2443.
- Pashkova, N., Catlett, N. L., Novak, J. L., Weisman, L. S. 2005a. A point mutation in the cargo-binding domain of myosin V affects its interaction with multiple cargoes. *Eukaryotic cell*. 4(4), 787-798.
- Pashkova, N., Catlett, N. L., Novak, J. L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R. E., Weisman, L. S. 2005b. Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *The Journal of Cell Biology*. 168(3), 359-364.
- Pashkova, N., Jin, Y., Ramaswamy, S., Weisman, L. S. 2006. Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. *The European Molecular Biology Organization journal*. 25(4), 693-700.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. UCSF Chimera -- a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 1605-1612.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 26(16), 1781-1802.
- Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.-H., Vreven, T., Weng, Z. 2014. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*. 30(12), 1771-1773.
- Pollard, L. W., Lord, M. 2014. Getting myosin-V on the right track: tropomyosin sorts transport in yeast. *Bioarchitecture*. 4(1), 35-38.

- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G. 2016. Cell Biology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Presti, L. L., Chang, F., Martin, S. G., Blanchoin, L. 2012. Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 23(23), 4579-4591. doi:10.1091/mbc.e12-07-0499
- Provance Jr, D. W., James, T. L., Mercer, J. A. 2002. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic*. 3(2), 124-132.
- Ramírez-Aportela, E., López-Blanco, J., Chacón, P. 2016a. FRODOCK 2.0. *Bioinformatics*. 32(15), 2386-2388.
- Ramírez-Aportela, E., López-Blanco, J. R., Chacón, P. 2016b. FRODOCK 2.0: fast protein–protein docking server. *Bioinformatics*. 32(15), 2386-2388.
- Ramírez-del Villar, A., Roberson, R. W., Callejas-Negrete, O. A., Mouriño-Pérez, R. R. 2019. The actin motor MYO-5 effect in the intracellular organization of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 125, 13-27.
- Reck-Peterson, S. L., Provance Jr, D. W., Mooseker, M. S., Mercer, J. A. 2000. Class V myosins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1496(1), 36-51.
- Reck-Peterson, S. L., Tyska, M. J., Novick, P. J., Mooseker, M. S. 2001. The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *The Journal of Cell Biology*. 153(5), 1121-1126.
- Renshaw, H., Vargas-Muñiz, J. M., Juvvadi, P. R., Richards, A. D., Waitt, G., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Steinbach, W. J. 2018. The tail domain of the *Aspergillus fumigatus* class V myosin MyoE orchestrates septal localization and hyphal growth. *Journal of Cell Science*. 131(3).
- Renshaw, H., Vargas-Muñiz, J. M., Richards, A. D., Asfaw, Y. G., Juvvadi, P. R., Steinbach, W. J. 2016. Distinct roles of myosins in *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and pathogenesis. *Infection and Immunity*. 84(5), 1556-1564. doi:10.1128/IAI.01190-15
- Rief, M., Rock, R. S., Mehta, A. D., Mooseker, M. S., Cheney, R. E., Spudich, J. A. 2000. Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(17), 9482-9486.
- Roca, M. G., Stout, A., Huang, I.-C., Read, N. D., Free, S. J. 2010. The ham-5, rcm-1 and rco-1 genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 156(Pt 9), 2621.
- Rogers, S. L., Gelfand, V. I. 1998. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Current Biology*. 8(3), 161-164.
- Rosenfeld, S. S., Sweeney, H. L. 2004. A model of myosin V processivity. *Journal of Biological Chemistry*. 279(38), 40100-40111.
- Ross, J. L., Ali, M. Y., Warshaw, D. M. 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*. 20(1), 41-47.
- Rossanese, O. W., Reinke, C. A., Bevis, B. J., Hammond, A. T., Sears, I. B., O'Connor, J., Glick, B. S. 2001. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 153(1), 47-62. doi:10.1083/jcb.153.1.47

- Ruiz-Herrera, J., Bracker, C. E., Bartnicki-Garcia, S. 1984. Sedimentation properties of chitosomes from *Mucor rouxii*. *Protoplasma*. 122(3), 178-190.
- Sánchez-León, E., Riquelme, M. 2015. Live imaging of β -1, 3-glucan synthase FKS-1 in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*. 82, 104-107.
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. 2011. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic cell*. 10(5), 683-695.
- 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*. *Molecular Microbiology*. 95(3), 472-490.
- Sato, A. 2010. Introduction to practice of molecular simulation: molecular dynamics, Monte Carlo, Brownian dynamics, Lattice Boltzmann and dissipative particle dynamics. Elsevier.
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., Mogilner, A. 2003. Cell division. *Nature*. 422(6933), 746.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., Bretscher, A. 1999. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *The Journal of Cell Biology*. 147(4), 791-808.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N. J., Steinberg, G. 2012. Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *The European Molecular Biology Organization journal*. 31(1), 214-227. doi:10.1038/emboj.2011.361
- Sellers, J. 1999. Myosins. Oxford University Press.
- Sellers, J. R., Weisman, L. S. 2008. Myosin V. Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 289-323.
- Skjærven, L., Yao, X.-Q., Scarabelli, G., Grant, B. J. 2014. Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC bioinformatics*. 15(1), 399.
- Smith, C. A., Rayment, I. 1996. X-ray structure of the magnesium (II) ADP vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry*. 35(17), 5404-5417.
- 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. *Molecular and Cellular Biology*. 31(12), 2528-2542.
- Snider, J., Lin, F., Zahedi, N., Rodionov, V., Clare, C. Y., Gross, S. P. 2004. Intracellular actin-based transport: how far you go depends on how often you switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(36), 13204-13209.
- Soldati, T., Geissler, H., Schwarz, E. C. 1999. How many is enough? exploring the myosin repertoire in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Cell biochemistry and biophysics*. 30(3), 389-411.
- Stajich, J. E., Harris, T., Brunk, B. P., Brestelli, J., Fischer, S., Harb, O. S., Kissinger, J. C., Li, W., Nayak, V., Pinney, D. F. 2011. FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. *Nucleic acids research*. 40(D1), D675-D681.

- Stein, S. A. M., Loccisano, A. E., Firestine, S. M., Evanseck, J. D. 2006. Principal components analysis: a review of its application on molecular dynamics data. *Annual Reports in Computational Chemistry*. 2, 233-261.
- Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E., Seabra, M. C. 2002. A Family of Rab27-binding Proteins: melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *Journal of Biological Chemistry*. 277(28), 25423-25430.
- Tabb, J. S., Molyneaux, B. J., Cohen, D. L., Kuznetsov, S. A., Langford, G. M. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of Cell Science*. 111(21), 3221-3234.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y., Oakley, B. R. 2012. The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLOS ONE*. 7(2), e31218.
- Takagishi, Y., Oda, S.-i., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., Yamamura, H. 1996. The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neuroscience letters*. 215(3), 169-172.
- Takizawa, P. A., Vale, R. D. 2000. The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(10), 5273-5278.
- Tamuli, R., Kumar, R., Srivastava, D. A., Deka, R. 2013. Calcium Signalling. *Neurospora: genomics and molecular biology*. 209.
- Tang, F., Kauffman, E. J., Novak, J. L., Nau, J. J., Catlett, N. L., Weisman, L. S. 2003. Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature*. 422, 87. doi:10.1038/nature01453
- Torralba, S., Heath, I. B. 2002. Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*. 37(3), 221-232.
- Tóth, J., Kovács, M., Wang, F., Nyitray, L., Sellers, J. R. 2005. Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *Journal of Biological Chemistry*. 280(34), 30594-30603.
- Ungermann, C., Wickner, W. 1998. Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *The European Molecular Biology Organization journal*. 17(12), 3269-3276.
- Uyeda, T. Q., Kron, S. J., Spudich, J. A. 1990. Myosin step size: estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin. *Journal of molecular biology*. 214(3), 699-710.
- Uyeda, T. Q., Warrick, H. M., Kron, S. J., Spudich, J. A. 1991. Quantized velocities at low myosin densities in an in vitro motility. *Nature*. 352(6333), 307.
- Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112(4), 467-480.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*. 74(5), 1044-1053. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x
- Virag, A., Griffiths, A. J. F. 2004. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genetics and Biology*. 41(2), 213-225. doi:https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.10.010

- Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*. 13, 42-43.
- Vogt, N. 2008. Governing fungal polar cell extension: Analysis of Rho GTPase and NDR kinase signalling in *Neurospora crassa*. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek, Göttingen. 53 pp.
- Wagner, W., Brenowitz, S. D., Hammer III, J. A. 2011. Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nature cell biology*. 13(1), 40.
- Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer III, J. A., Trinick, J., Knight, P. J. 2000. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*. 405(6788), 804.
- Weber, I., Gruber, C., Steinberg, G. 2003. A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*. 15(12), 2826-2842.
- Wei, Q., Wu, X., Hammer, J. A. 1997. The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*. 18(5), 517-527.
- Westergaard, M., Mitchell, H. 1947. A synthetic medium favoring sexual reproduction in *Neurospora*. *Am. J. Bot.* 34, 573-577.
- Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J. A. 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *in vivo*. *The Journal of Cell Biology*. 143(7), 1899. doi:10.1083/jcb.143.7.1899
- Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., Hammer, J. A. 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *Journal of Cell Science*. 110(7), 847-859.
- Wu, X., Sakamoto, T., Zhang, F., Sellers, J. R., Hammer, J. A. 2006. In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 580(25), 5863-5868.
- Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J. R., Hammer III, J. A. 2002a. Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Molecular Biology of the Cell*. 13(5), 1735-1749.
- Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Hammer III, J. A. 2002b. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nature cell biology*. 4(4), 271.
- Yang, J., Zhang, Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*. 43(W1), W174-W181.
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C., Bretscher, A. 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*. 406(6799), 1013.
- Yu, H., Wedlich-Söldner, R. 2011. Cortical actin dynamics: Generating randomness by formin (g) and moving. *Bioarchitecture*. 1(4), 165-168.
- Yumura, S., Uyeda, T. Q. 2003. Myosins and cell dynamics in cellular slime molds. *International review of cytology*. 224, 173-225.

Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A., III, Xiang, X. 2011. *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. PLOS ONE. 6(12), e28575. doi:10.1371/journal.pone.0028575

Anexos

Anexo A. Proteínas asociadas a MYO-5-GFP.

Tabla A. Promedio de abundancia y descripción de las 187 proteínas aisladas de las muestras secuenciadas por espectrometría de masas (GFP citosólica y MYO-5-GFP).

	NCU	Gen	Descripción	Promedio de abundancia	
				Control (GFP citosólica)	Muestra (MYO-5-GFP)
	NA	<i>gfp</i>	GFP	100,00	0,00
	NA	<i>myo-5-gfp</i>	MYO-5-GFP	0,00	100,00
1	NCU01528	<i>gpd-1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase protein	1,31	205,78
2	NCU01438	<i>naf-1</i>	Nucleosome assembly protein	0,00	151,04
3	NCU01754	<i>adh-1</i>	Alcohol dehydrogenase I protein	4,22	147,18
4	NCU02003	<i>tef-1</i>	Elongation factor 1 alpha protein	2,86	115,86
5	NCU09345	<i>nmt-1</i>	Thiamine biosynthesis protein	2,12	114,26
6	NCU10042	<i>emp-7</i>	Enolase variant protein	1,68	114,18
7	NCU06075	<i>ace-8</i>	Pyruvate kinase protein	0,00	78,67
8	NCU04173	<i>act-1</i>	Actin protein	2,03	55,14
9	NCU07167	<i>lfr-2</i>	Isoflavone reductase protein	0,00	47,68
10	NCU09127		Hypothetical protein	0,00	47,35
11	NCU07914	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase protein	0,23	44,05
12	NCU00602	<i>ppy-3</i>	Siroheme synthase protein	0,00	43,46
13	NCU06110	<i>thi-4</i>	Thiazole biosynthetic enzyme variant 2 protein	0,98	35,86
14	NCU07550	<i>tpi-1</i>	Triosephosphate isomerase protein	0,22	26,50
15	NCU09477	<i>aac</i>	ADP/ATP carrier protein	0,22	26,34
16	NCU06617	<i>cdc4-2</i>	Myosin regulatory light chain protein	0,00	23,67
17	NCU08185		Hypothetical protein	0,21	22,97
18	NCU05430	<i>atp-2</i>	ATP synthase beta subunit protein	0,17	21,26
19	NCU05390	<i>mic-20</i>	Mitochondrial phosphate carrier protein	0,00	20,67
20	NCU04202	<i>ndk-1</i>	Nucleoside diphosphate kinase protein	0,00	20,19
21	NCU02806	<i>nfh-2</i>	14-3-3 family protein 7	0,00	18,20
22	NCU02193	<i>cfp</i>	Pyruvate decarboxylase protein	0,14	17,70
23	NCU00489	<i>crp-10</i>	Cytoplasmic ribosomal protein 10	0,00	16,77
24	NCU06512	<i>met-8</i>	Methionine synthase protein	0,27	16,37
25	NCU02514	<i>atp-1</i>	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit	0,63	15,80
26	NCU02252	<i>emp-6</i>	Phosphoglycerate mutase protein	0,00	15,20
27	NCU03757	<i>crp-38</i>	60S ribosomal protein L4-A	0,00	14,92
28	NCU04304	<i>por</i>	Mitochondrial outer membrane protein, porin	0,19	14,68
29	NCU07807	<i>fba</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	0,00	14,56
30	NCU04120	<i>cmd-1</i>	Calmodulin A protein	0,00	13,93
31	NCU00258	<i>crp-15</i>	40s ribosomal protein S7	0,00	13,55
32	NCU00726	<i>crs-1</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,00	13,12

33	NCU02136	<i>ppm-10</i>	Transaldolase protein	0,35	12,89
34	NCU02133	<i>sod-1</i>	Superoxide dismutase protein	0,00	12,85
35	NCU04075		Hypothetical protein	0,00	12,80
36	NCU01317	<i>crp-45</i>	Ribosomal protein L12	0,00	12,76
37	NCU06226	<i>crp-56</i>	60S ribosomal protein L25	0,00	12,34
38	NCU00618	<i>crp-6</i>	40S ribosomal protein S27	0,15	12,18
39	NCU02049		Hypothetical protein	0,00	12,13
40	NCU07014	<i>crp-3</i>	40S ribosomal protein S17	0,00	12,03
41	NCU02707	<i>crp-39</i>	60S ribosomal protein L6	0,00	11,47
42	NCU09996		Hypothetical protein	0,00	11,22
43	NCU07420	<i>eif4A</i>	eIF4A	0,00	11,20
44	NCU02075	<i>hsp70-2</i>	Heat shock protein 70	0,00	10,85
45	NCU07408	<i>po</i>	60S ribosomal protein P0	0,00	10,73
46	NCU00634	<i>crp-47</i>	Ribosomal protein L14	0,00	10,46
47	NCU09475	<i>crp-13</i>	40s ribosomal protein S5	0,00	10,13
48	NCU02744	<i>crp-82</i>	60S ribosomal protein L9	0,00	9,98
49	NCU07232	<i>hsp30-2</i>	Heat shock protein 30-2	0,00	9,30
50	NCU08170		Hypothetical protein	0,00	9,24
51	NCU08500	<i>crp-16</i>	40S ribosomal protein S8	0,00	9,21
52	NCU09285	<i>mig-6</i>	Zinc-containing alcohol dehydrogenase protein	0,00	9,15
53	NCU06459		Differentiation regulator protein	0,00	8,94
54	NCU04899	<i>tca-15</i>	Malate dehydrogenase protein	0,00	8,78
55	NCU07281	<i>gpi-1</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	0,00	8,14
56	NCU05554	<i>un-25</i>	60S ribosomal protein L13	0,00	7,75
57	NCU03038	<i>crp-21</i>	40S ribosomal protein S13	0,00	6,91
58	NCU07830	<i>crp-2</i>	40S ribosomal protein S14	0,00	6,79
59	NCU09602	<i>hsp70-1</i>	Heat shock protein 70	0,00	5,20
60	NCU08620	<i>crp-23</i>	40S ribosomal protein S16	0,00	4,44
61	NCU01195	<i>am</i>	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	0,00	4,37
62	NCU07439		Hypothetical protein	0,00	4,12
63	NCU07930	<i>cys-18</i>	Adenosylhomocysteinase protein	0,00	4,06
64	NCU03703	<i>crp-49</i>	60S ribosomal protein L17	0,00	4,03
65	NCU08330		Hypothetical protein	0,00	3,90
66	NCU07829	<i>crp-40</i>	60S ribosomal protein L7	0,00	3,87
67	NCU09041		L-xylulose reductase protein	0,00	3,77
68	NCU05009	<i>nuo21.3c</i>	NADH-quinone oxidoreductase chain I	0,00	3,75
69	NCU06842	<i>rcm-1</i>	RCM-1	0,00	3,51
70	NCU01948	<i>crp-53</i>	Ribosomal protein Srp1	0,00	3,32
71	NCU02509	<i>crp-44</i>	60S ribosomal protein L11	0,00	3,06
72	NCU07700	<i>cot-3</i>	Elongation factor aEF 2 protein	0,00	2,90
73	NCU07826	<i>crp-25</i>	40S ribosomal protein S19	0,00	2,84
74	NCU00629	<i>emp-3</i>	6-phosphofructokinase	0,00	2,73

75	NCU08963	<i>crp-61</i>	60S ribosomal protein L30	0,00	2,64
76	NCU03826	<i>eef1B-γ</i>	Elongation factor 1-γ	0,00	2,61
77	NCU06892	<i>crp-26</i>	40S ribosomal protein S20	0,00	2,58
78	NCU00242	<i>sna-10</i>	SNARE complex-10	0,00	2,55
79	NCU02493	<i>pca-7</i>	Proteasome component C1	0,00	2,46
80	NCU06783	<i>acu-19</i>	ATP citrate lyase	0,00	2,44
81	NCU03608	<i>ilv-2</i>	Ketol-acid reductoisomerase protein	0,00	2,23
82	NCU03062		Formin-binding protein	0,00	2,20
83	NCU01500	<i>nic-10</i>	Nicotinic acid-10	0,00	2,11
84	NCU01827	<i>crp-58</i>	60S ribosomal protein L27	0,00	2,01
85	NCU00951	<i>ipp-1</i>	Inorganic pyrophosphatase protein	0,00	1,88
86	NCU00294	<i>crp-74</i>	60S ribosomal protein L10a	0,00	1,85
87	NCU10001		Septal pore-associated protein 16	0,28	1,82
88	NCU01883		SH3 domain signaling protein	0,00	1,80
89	NCU01105		Hypothetical protein	0,00	1,79
90	NCU06743	<i>crp-18</i>	Hypothetical protein	0,00	1,67
91	NCU05810	<i>cpc-2</i>	Guanine nucleotide-binding protein subunit β-like	0,00	1,59
92	NCU05613		Hypothetical protein	0,00	1,58
93	NCU01692	<i>cit-1</i>	Mitochondrial citrate synthase	0,00	1,57
94	NCU06960	<i>ech-1</i>	Enoyl CoA hydratase/carnithine racemase	0,00	1,51
95	NCU08344	<i>crp-62</i>	60s ribosomal protein	0,00	1,49
96	NCU01484	<i>rho-1</i>	Rho-type GTPase	0,00	1,48
97	NCU03257	<i>tam-1</i>	Ammonium transporter MEP1	0,00	1,45
98	NCU06550	<i>pdx-1</i>	Pyridoxine 1	0,00	1,40
99	NCU04115	<i>clt-2</i>	Clathrin light chain protein	0,00	1,39
100	NCU02905	<i>crp-81</i>	60S ribosomal protein L23 protein	0,00	1,38
101	NCU02519		Hypothetical protein	0,00	1,35
102	NCU07555		Hypothetical protein	0,00	1,34
103	NCU06625	<i>cys-22</i>	Cysteine dioxygenase protein	0,00	1,33
104	NCU00475	<i>crp-24</i>	40S ribosomal protein S18	0,00	1,33
105	NCU09562		Hypothetical protein	0,00	1,30
106	NCU01452		40S ribosomal protein S1	0,00	1,29
107	NCU03565	<i>crp-57</i>	Ribosomal protein L26	0,00	1,29
108	NCU12052		Hypothetical protein	0,00	1,29
109	NCU03635	<i>crp-67</i>	60S ribosomal protein L38	0,00	1,26
110	NCU06880	<i>prx-1</i>	Peroxiredoxin-1	0,00	1,24
111	NCU06210		Hypothetical protein	0,00	1,23
112	NCU05290	<i>pyr-2</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	0,00	1,03
113	NCU09269	<i>ran</i>	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran	0,00	0,99
114	NCU01312	<i>rca-1</i>	myb-like DNA-binding protein myb-1	0,00	0,99
115	NCU06727	<i>spe-3</i>	Spermidine synthase	0,00	0,97
116	NCU07600		Hypothetical protein	0,00	0,96

117	NCU05677		Hypothetical protein	0,00	0,95
118	NCU02796		PHD finger domain-containing protein	0,00	0,93
119	NCU00241		Septal pore-associated protein, putative	0,00	0,82
120	NCU02435	<i>hh2b</i>	Histone H2B	0,00	0,77
121	NCU01523	<i>gtp-11</i>	GTP-binding protein ypt3	0,00	0,73
122	NCU07808		Hypothetical protein	0,00	0,70
123	NCU08946	<i>phb-1</i>	Hypothetical protein	0,00	0,67
124	NCU01257		Hypothetical protein	0,00	0,61
125	NCU06383		UPF0075 domain-containing protein	0,00	0,57
126	NCU07539		Hypothetical protein	0,00	0,56
127	NCU07574		Hypothetical protein	0,00	0,56
128	NCU09476	<i>crp-30</i>	40S ribosomal protein S25	0,00	0,55
129	NCU01829		Hypothetical protein	0,00	0,54
130	NCU09796	<i>gpr-38</i>	Integral membrane protein	0,00	0,47
131	NCU16028		Cytochrome c oxidase subunit 2	0,00	0,45
132	NCU01466	<i>spa-5</i>	Septal pore-associated protein 5	0,00	0,43
133	NCU07713		DnaJ domain-containing protein	0,00	0,40
134	NCU04845	<i>pdo-3</i>	Phytanoyl-CoA dioxygenase	0,00	0,39
135	NCU07078		Hypothetical protein	0,00	0,37
136	NCU09481		Septal pore-associated protein	0,00	0,36
137	NCU01606	<i>atp-4</i>	ATP synthase subunit 5	0,00	0,35
138	NCU05457	<i>cya-4</i>	Cytochrome c oxidase subunit IV	0,00	0,34
139	NCU03553		Hypothetical protein	0,00	0,33
140	NCU02773		Hypothetical protein	0,00	0,32
141	NCU02241	<i>drc-4</i>	DNA replication regulator sld-2	0,00	0,29
142	NCU10512		DUF895 domain membrane protein	0,00	0,22
143	NCU02309		Hypothetical protein	0,00	0,19
144	NCU09651		Hypothetical protein	0,00	0,13
145	NCU07942		Hypothetical protein	0,00	0,09
146	NCU08316		DUF221 domain-containing protein	0,00	0,00
147	NCU09477	<i>aac</i>	ADP/ATP carrier protein	0,00	0,00
148	NCU03914	<i>gh5-4</i>	Glucan 1,3-beta-glucosidase	0,00	0,00
149	NCU01984		Septal pore-associated protein, putative	0,00	0,00
150	NCU02052	<i>tif-4</i>	Transcription initiation factor-4	0,00	0,00
151	NCU02476	<i>adh-2</i>	Alcohol dehydrogenase III	0,00	0,00
152	NCU03491	<i>pad-1</i>	RNA splicing factor	0,00	0,00
153	NCU03537	<i>div-51</i>	Nuclear division-51	0,00	0,00
154	NCU07556	<i>crf8-1</i>	TBP associated factor	0,00	0,00
155	NCU03982	<i>grp78</i>	Glucose-regulated protein	0,00	0,00
156	NCU08417		Hypothetical protein	0,00	0,00
157	NCU00277		Septal pore-associated protein, putative	0,00	0,00
158	NCU04767		Hypothetical protein	0,00	0,00

159	NCU17239	<i>kpr-10</i>	Kinetochores protein-10	0,00	0,00
160	NCU00367		Septal pore-associated protein, putative	0,00	0,00
161	NCU02411		Septal pore-associated protein, putative	0,00	0,00
162	NCU06851		Septal pore-associated protein, putative	0,04	0,00
163	NCU09162		WD repeat protein	0,00	0,00
164	NCU06411	<i>vad-4</i>	VAD-4	0,00	0,00
165	NCU08391	<i>spa-7</i>	Septal pore-associated protein 7	0,00	0,00
166	NCU09502	<i>spa-4</i>	Septal pore-associated protein 4	0,00	0,00
167	NCU16770		Hypothetical protein	0,00	0,00
168	NCU06401		Hypothetical protein	0,00	0,00
169	NCU03071	<i>os-4</i>	MAP kinase kinase kinase SskB	0,00	0,00
170	NCU07412		PHD finger and BAH domain-containing protei	0,00	0,00
171	NCU01678		Amine oxidase	0,00	0,00
172	NCU03544		Hypothetical protein	0,00	0,00
173	NCU06758		Hypothetical protein	0,00	0,00
174	NCU00978		Checkpoint protein kinase	0,00	0,00
175	NCU04225	<i>mrp-29</i>	60S ribosomal protein L20	0,07	0,00
176	NCU07297		Hypothetical protein	0,04	0,00
177	NCU03156	<i>nuo10.5</i>	NUO	0,16	0,00
178	NCU06632	<i>tom20</i>	Outer mitochondrial membrane translocase 20	0,13	0,00
179	NCU04059	<i>hyp-1</i>	Hypotonic-1	0,00	0,00
180	NCU01678		Amine oxidase	0,00	0,00
181	NCU01636		2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	0,04	0,00
182	NCU06886		Hypothetical protein	0,05	0,00
183	NCU09645		Hypothetical protein	0,05	0,00
184	NCU05068		Hypothetical protein	0,20	0,00
185	NCU06025	<i>qa-3</i>	Shikimate/quinic acid 5-dehydrogenase	0,07	0,00
186	NCU05648		Hypothetical protein	0,00	0,00
187	NCU04267		Hypothetical protein	0,96	0,00

Azul: Proteínas que son componentes o participan en el ensamblaje de los núcleos, mitocondrias, proteosomas y ribosomas, o están involucradas en el proceso de división nuclear y/o transcripción (total = 59 proteínas).

Verde: Proteínas involucradas en la biosíntesis de compuestos celulares como aminoácidos, vitaminas, nucleósidos y azúcares (total = 41 proteínas).

Amarillo: Proteínas involucradas en diferentes procesos como la destrucción de radicales libres (total = 6 proteínas).

Naranja: Proteínas involucradas en la respuesta a estrés o la represión de metabolitos como el nitrógeno (total = 3 proteínas).

Morado: Proteínas sin dominios o funciones conocidas (total = 20 proteínas).

Rosa: Proteínas de interés (total = 17 proteínas).

Gris: Proteínas que no fueron consideradas por tener valores de abundancia ≤ 0 .