

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



---

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

---

**El papel del extremo carboxilo terminal de SEC-10 en el  
ensamble del exocisto en *Neurospora crassa***

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

Presenta:

**Alfredo Figueroa Meléndez**

Ensenada, Baja California, México  
2019

Tesis defendida por  
**Alfredo Figueroa Meléndez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Meritxell Riquelme Pérez**  
Directora de tesis

Miembros del comité  
**Dr. Sergio Andrés Águila Puentes**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**



---

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

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Alfredo Figueroa Meléndez © 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 **Alfredo Figueroa Meléndez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular

El papel del extremo carboxilo terminal de SEC-10 en el ensamble del exocisto en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
**Director de tesis**

El exocisto es un complejo octamérico evolutivamente conservado que se encarga de anclar vesículas secretoras a la membrana plasmática diana previo a su fusión. Mutaciones en las subunidades de este complejo resulta en efectos severos en la exocitosis y causa una acumulación irregular de macrovesículas en el subápice de hifas de *Neurospora crassa*. Las subunidades del exocisto se localizan en el domo apical de las hifas, algunas muy cercanas a la membrana plasmática (SEC-3, SEC-5, SEC-6, SEC-8, SEC-10 y SEC-15) y otras en la periferia frontal del Spitzenkörper (SEC-3, EXO-70 y EXO-84). En *Magnaporthe oryzae* el etiquetamiento endógeno de SEC-10 con GFP no ha sido exitoso y en *N. crassa* la adición de una etiqueta GFP en el extremo carboxilo terminal resulta en una cepa de fenotipo aberrante, lo que sugiere que la GFP representa un impedimento en el ensamble del exocisto. En este estudio se analizaron las secuencias de las subunidades del exocisto de *N. crassa* en distintos servidores y se identificaron motivos y dominios que no habían sido aún reportados. Se detectó un dominio de unión a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en SEC-3, un motivo de unión a calcio en SEC-8 y dominios 'repeat-like' de culina en EXO-70 y EXO-84. Con estos resultados se sugiere que el exocisto puede ser regulado por calcio, ubiquitina y contiene dominios que interactúan con membranas. Se generaron modelados tridimensionales en SWISS-Model a partir de las secuencias de aminoácidos de las subunidades y se realizó una búsqueda de los motivos CorEx de *S. cerevisiae* en la estructura predicha de las proteínas del exocisto. Los motivos CorEx solamente fueron detectados en SEC-3, SEC-8 y SEC-10. Se sometieron los modelos tridimensionales bajo simulaciones de acoplamiento molecular en el servidor ClusPro por pares. En la simulación las subunidades del exocisto se acoplaron entre sí en el haz de hélices que está en el extremo N-terminal de cada subunidad justo después de la cola N-terminal característico de estas proteínas. La orientación invertida de SEC-10 vista en el acoplamiento molecular con SEC-15 sugiere que al igual que en *S. cerevisiae* SEC-10 pudiera estar orientado hacia el centro del complejo. Sin embargo, en este estudio se reveló que, aunque el haz de hélices N-terminal de SEC-10 se acopla con el haz de hélices N-terminal de SEC-15 ambos extremos C-terminal se orientan en sentidos opuestos. Se etiquetó el extremo N-terminal de SEC-10 con GFP y no hubo efectos severos en el crecimiento en contraste a lo que se había observado con el etiquetado C-terminal. La eliminación del gen *sec-10* causa un fenotipo aberrante con crecimiento lento y escasa conidiación. Esta cepa mutante solamente es viable en estado heterocarión lo que confirma que *sec-10* es un gen esencial. Se eliminaron los últimos 120 nucleótidos del extremo C-terminal de SEC-10 lo que resultó en 12% de disminución en la tasa de crecimiento. Los resultados descritos en este trabajo indican que SEC-10 es esencial y su extremo C-terminal es un sitio importante para una exocitosis eficiente.

**Palabras clave:** Exocisto, exocitosis, GFP, *Neurospora crassa*, SEC-10

Abstract of the thesis presented by **Alfredo Figueroa Meléndez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Molecular and Cell Microbiology.

### **The role of the carboxy terminus of SEC-10 in exocyst assembly in *Neurospora crassa***

Abstract approved by:

---

Ph. D. Meritxell Riquelme Pérez  
Thesis Director

The exocyst is a highly conserved octameric protein complex known to tether secretory vesicles to the plasma membrane before the fusion between the two membranes. Mutations in some of the subunits result in severe defects in exocytosis and cause an irregular accumulation of macrovesicles in the subapical region of *Neurospora crassa* hyphae. In *N. crassa* some subunits localize at the apical dome of hyphal tips near the plasma membrane (SEC-3, -5, -6, -8 and SEC-15), while others occupy the frontal outer layer of the Spitzenkörper (SEC-3, EXO-70 and EXO-84). Previous attempts to, C-terminally tag SEC-10 with GFP in *N. crassa* allowed localization of this subunit at the hyphal apical plasma membrane, but cells presented an aberrant phenotype, and growth defects, which suggests that the GFP tag represents an impediment to the exocyst assembly. In this study, we analyzed the sequences of *N. crassa* exocyst subunits in different servers and identified domains and motifs that have not been previously reported. A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding domain was detected in SEC-3, a calcium binding motif in SEC-8 and 'repeat-like' cullin domains in EXO-70 and EXO-84. These results suggest that the exocyst can be regulated by calcium, ubiquitin and contains domains that interact with membranes. The amino acid sequences of the subunits were used to generate three-dimensional models in SWISS-Model. A search of the CorEx motifs of *S. cerevisiae* was performed in the predicted structure of the modeled exocyst proteins. CorEx motifs were only detected in SEC-3, SEC-8 and SEC-10. Three-dimensional models were submitted under molecular docking simulations on the ClusPro server. In the simulation, the exocyst subunit pairs dock with each other via the N-terminal helical bundles just after the characteristic N-terminal tail of these proteins. However, we reveal in this study that although the N-terminal helical bundle of SEC-10 docks with the N-terminal helical bundle of SEC-15 both C-terminal ends were oriented in opposite directions. The inverted orientation of SEC-10 seen in the molecular docking with SEC-15 suggests that as in *S. cerevisiae* SEC-10 could be oriented towards the center of the complex. The N-terminal end of SEC-10 was tagged with GFP and unlike for the C-terminally tagged version, there were no hyphal growth defects observed in the corresponding hyphae. Elimination of *sec-10* caused an aberrant phenotype with slow growth and poor conidiation in heterokaryon strains, the only viable form of the mutation. These results confirm that *sec-10* is an essential gene. A 3' truncated version of *sec-10* (lacking 120 nucleotides) resulted in a strain with 12% decrease in growth rate. The results described in this work indicate that SEC-10 is essential and its C-terminal end is an important site for efficient exocytosis.

**Keywords:** Exocyst, exocytosis, GFP, *Neurospora crassa*, SEC-10

## Dedicatoria

A mis padres Deyanira y Jesús Alfredo  
A mis hermanos Ana Daniela y Diego Figueroa

## Agradecimientos

Estoy agradecido con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo que ha brindado al proyecto CB-222375 del cual pertenece este trabajo y del cual proporcionó la beca con la que conté durante los dos años de Maestría (N. 638116). También estoy sumamente agradecido con el Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores en Ensenada (CICESE) por su excelente trabajo en proveer la infraestructura científica para poder realizar este trabajo. Quiero también agradecer a los profesores que me dieron clases durante este tiempo y especialmente a mi asesora y directora de tesis Dra. Meritxell Riquelme Pérez por su esfuerzo y dedicación que tiene con nosotros los estudiantes. Por otra parte me gustaría agradecer a mis compañeros, amigos y colegas con los que conviví durante este tiempo especialmente a Erica Regina Garcia quien me acompañó y brindó mucho apoyo.

Al Departamento de Microbiología por sus excelencia, calidad y ambiente agradable para trabajar. A todos los estudiantes, maestros, investigadores, técnicos y empleados que forman parte del departamento por su asombroso trabajo. Sin ellos no se pudo haber hecho este trabajo con seguridad y calidad.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia por apoyarme durante los primeros meses difíciles de la carrera. Mi familia es mi infraestructura como individuo y les agradezco por ser la mejor familia que uno pudiera pedir. A pesar de todo lo que ha pasado durante los años siguen firmes y brindan ese soporte que es una bendición y un privilegio.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación.....	10
1.4 Hipótesis.....	10
1.5 Objetivos.....	10
1.5.1 Objetivo general .....	10
1.5.2 Objetivos específico.....	10
1.5.3 Preguntas de investigación.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Medios y cepas que se utilizaron.....	12
2.1.1 Plásmidos y oligonucleótidos.....	13
2.2 Análisis <i>in silico</i> del exocisto.....	13
2.2.1 Modelaje de la estructura tridimensional de las subunidades.....	14
2.2.2 Detección de motivos CorEx.....	15
2.2.3 Dominios funcionales en la secuencia de aminoácidos.....	15
2.2.4 Acoplamiento molecular de las subunidades del exocisto.....	16
2.3 Extracción de ADN genómico.....	17
2.4 Transformación de <i>N. crassa</i> .....	17
2.5 Selección de transformantes.....	18
2.6 Microscopía confocal de escaneo por láser.....	18
2.7 Microscopía confocal de disco giratorio.....	19
2.8 Generación de mutantes <i>sec-10</i> .....	19
2.9 Etiquetamiento de SEC-10 con GFP en el extremo amino terminal.....	21
2.10 Etiquetamiento de SEC-15 con GFP y una señal de localización nuclear.....	22

2.11 Obtención de homocariones por microconidios.....	23
2.12 Cruzas para la obtención de homocariones.....	24
2.13 Activación y aislamiento de ascosporas.....	25
2.14 Análisis fenotípico de las mutantes <i>sec-10</i> .....	25
2.15 Tinción de endomembranas celulares con FM4-64.....	26
2.16 Ensayos de co-expresión de proteínas.....	27
2.17 Análisis de la cepa GFP-SEC-10.....	27
2.18 Procesamiento de imágenes.....	28
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	
3.1 Características de las subunidades del exocisto <i>in silico</i> .....	29
3.1.1 Motivos CorEx en <i>N. crassa</i> .....	30
3.1.2 Dominios detectados en las subunidades.....	31
3.1.3 Acoplamiento molecular entre las subunidades.....	34
3.2 Elucidar el papel que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el crecimiento.....	38
3.2.1 Productos de la PCR de fusión para el reemplazo de <i>sec-10</i> .....	39
3.2.2 Análisis de la mutante $\Delta sec-10$ .....	40
3.2.3 Amplificación de fragmentos de ADN para la cepa <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del</sup> .....	45
3.2.4 Amplificación de fragmentos de ADN para la cepa GFP-SEC-10.....	47
3.3 Probar la fidelidad del exocisto ante el cambio de localización de una subunidad.....	53
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....	57
<b>Capítulo 5. Conclusión</b> .....	61
<b>Capítulo 6. Perspectivas</b> .....	62
<b>Literatura citada</b> .....	63



## Lista de figuras

	Página	
1	Esquema de la exocitosis de vesículas secretoras y la liberación de material hacia el espacio extracelular.....	2
2	Distribución de los componentes del exocisto contrastados con el colorante lipofílico FM4-64.....	3
3	Microscopía confocal de barrido de la cepa de <i>N. crassa</i> que expresa SEC-10-GFP....	4
4	Series de tiempo de LSCM de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado heterocarión y homocarión.....	5
5	Comparación cualitativa del crecimiento y morfología de la cepa que SEC-10-GFP y la parental 9718.....	6
6	Microscopía electrónica de transmisión de un corte criofijado de una mutante $\Delta sec-5$ .....	7
7	Reconstrucción tridimensional del exocisto y el arreglo de las subunidades.....	8
8	Interacciones por pares de las subunidades del exocisto a través de los motivos CorEx.....	9
9	Ensamblaje de los subcomplejos centrales y el holocomplejo.....	9
10	Esquema de las reacciones en cadena de polimerasa para producir la cepa <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del</sup> .....	20
11	PCRs que se realizaron en la técnica "Split Marker" para el reemplazo del gen <i>sec-10</i> por el gen <i>hph</i> .....	21
12	Esquema de las PCRs y oligos utilizados en la construcción de <i>Pccg-1::gfp::sec-10</i> ....	22
13	Esquema de las PCRs requeridas en la técnica "Split Marker" que fusiona el cassette que contiene <i>gfp</i> , la NLS de <i>frq</i> y <i>hph</i> al gen <i>sec-15</i> .....	23
14	Esquema del método de fertilización por conidios que se utilizó para las cruzas genéticas.....	25
15	Modelo de la estructura tridimensional de las subunidades del exocisto.....	30
16	Modelo tridimensional de SEC-3, SEC-5, SEC-6, SEC-8, SEC-10, SEC-15, EXO-70 y EXO-84 con sus respectivas secuencias identificadas como homólogas a los motivos CorEx de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
17	Componentes del exocisto de <i>N. crassa</i> .....	33
18	Acoplamiento molecular entre SEC-3 y SEC-5 simulado en el servidor ClusPro.....	34
19	Acoplamiento molecular entre SEC-6 y SEC-8 simulado en el servidor ClusPro.....	35
20	Acoplamiento molecular entre SEC-10 y SEC-15 simulado en el servidor ClusPro.....	36
21	Acoplamiento molecular entre EXO-70 y EXO-84 simulado en el servidor ClusPro.....	36
22	Acoplamiento molecular entre los heterodímeros SEC-3/SEC-5 y SEC-6/SEC-8 simulado en el servidor ClusPro.....	37
23	Acoplamiento molecular entre los heterodímeros SEC-10/SEC-15 y EXO-70/EXO-84 simulado en el servidor ClusPro.....	38

24	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR utilizados para la construcción de los fragmentos 'knock out' .....	38
25	Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR <i>hph</i> .....	39
26	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la PCR de fusión con <i>hph</i> .....	39
27	Colonias provenientes de macroconidios y microconidios cultivados en medio FGS con solución FGS.....	40
28	Cajas de Petri preparadas con FGS agar y sembradas con una suspensión de microconidios de la cepa $\Delta$ <i>sec-10</i> .....	41
29	Comparación del desarrollo de las colonias FGSC #9718 (SMRP25) y $\Delta$ <i>sec-10</i> en el tiempo.....	42
30	Comparación del crecimiento de hifas aéreas entre la cepa parental y $\Delta$ <i>sec-10</i> en tubos con medio inclinado.....	43
31	Serie de tiempo de LSCM de la mutante de <i>N. crassa</i> $\Delta$ <i>sec-10</i> en estado heterocarión teñida con FM4-4.....	44
32	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del</sup> .....	45
33	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR de fusión para generar la cepa <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del</sup> .....	45
34	Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones que corresponden a la última kb del gen <i>sec-10</i> .....	46
35	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del</sup> .....	47
36	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR para generar la cepa GFP-SEC-10.....	48
37	Electroforesis en gel de agarosa del amplicón <i>hph-Pccg-1::gfp::sec-10</i> de 3,786 pb	48
38	LSCM de transformantes en estado heterocarión que expresan GFP-SEC-10 bajo el control del promotor <i>ccg-1</i> .....	49
39	LSCM de transformantes en estado heterocarión homocarión que expresan GFP-SEC-10 bajo el control del promotor <i>ccg-1</i> .....	50
40	LSCM de las cepas que expresan SEC-10-GFP en estado homocarión bajo el control del promotor <i>Pccg-1</i> y GFP-SEC-10 bajo el control del promotor nativo <i>Psec-10</i> teñidas con FM4-64.....	51
41	LSCM de transformantes en estado homocarión que expresan SEC-10-GFP bajo el control del promotor <i>sec-10</i> .....	52
42	Modelado tridimensional de la estructura de GFP generado por el servidor I-TASSER.....	52
43	Comparación de la tasa de crecimiento entre las cepas 9718, $\Delta$ <i>sec-10</i> , <i>sec-10</i> , N-GFP y C-GFP.....	53
44	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa SEC-15-GFP-NLS.....	54

45	Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de fusión para etiquetar a SEC-15 con GFP-NLS.....	54
46	LSCM de transformantes en estado heterocarión que expresan SEC-15-GFP-NLS bajo el control de su propio promotor.....	55
47	Perfil de fluorescencia de transformante que expresan SEC-15-GFP-NLS en estado homocarión.....	56
48	LSCM de la cepa SEC-15-GFP-NLS en estado homocarión.....	56

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas de <i>N. crassa</i> que se utilizaron y generaron en este trabajo.....	12
2	Plásmidos utilizados en este estudio.....	13
3	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	13
4	Parámetros usados para identificar el mejor modelo generado por SWISS-MODEL...	29

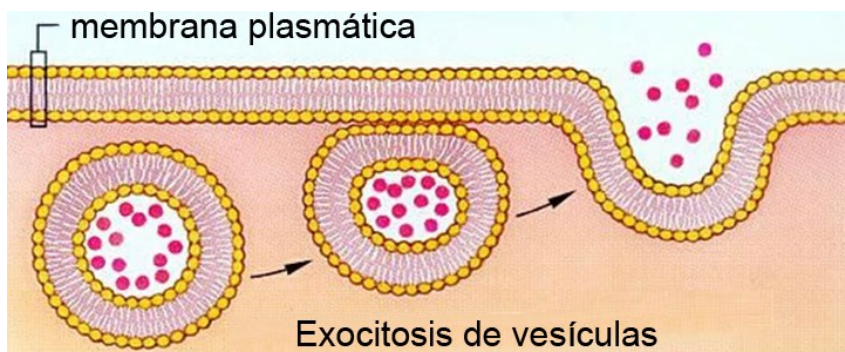
# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Introducción

Los hongos son organismos eucariotas que tienen un estado de Reino al igual que los animales y las plantas. El metabolismo fúngico es característicamente heterotrófico y su alimentación se da por absorción. La mayoría de los hongos son haploides y su reproducción puede ser tanto sexual como asexual mediante la formación de esporas (Howard & Gow 2007). Además, éstos organismos tienen un amplio espectro de actividades como patógenos de plantas o animales, como descomponedores, como organismos modelo para estudios genéticos y de biología celular, y como productores de metabolitos importantes. En este trabajo se utilizó el organismo *Neurospora crassa*, un ascomiceto filamentoso con un ciclo de vida heterotálico (Dodge & Shear 1927). Esto significa que requiere de dos tipos de apareamiento distintos para la reproducción sexual. Este hongo es un modelo de estudio excelente para estudios bioquímicos, genéticos y de biología celular debido a su facilidad de cultivo, crecimiento rápido, el grosor de la célula y por su susceptibilidad a la mutagénesis (Davis, 2000). Cabe destacar, que al utilizar este organismo como modelo, Beadle y Tatum propusieron la hipótesis de “un gen-una enzima” que fue fundamental para el Dogma Central de la biología molecular en donde un gen codifica para una proteína (Beadle & Tatum, 1941).

Por lo general los hongos crecen como filamentos denominados hifas que se extienden por las puntas; este crecimiento se conoce como crecimiento apical (Deacon 2006). Este crecimiento también se conoce como crecimiento polarizado y depende de la ruta secretora de vesículas. En esta ruta las vesículas secretoras son transportadas hacia la membrana plasmática (MP) diana en donde se fusiona la membrana de la vesícula y la de la célula, que resulta en la liberación del contenido de la vesícula hacia el espacio extracelular (Figura 1; Rizzoli & Jahn, 2007). Algunos componentes importantes transportados en vesículas secretoras son las enzimas sintetizadoras de pared celular, tales como la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, que están embebidas en la membrana de la vesícula (Klis et al., 2006). Las enzimas sintetizadoras de pared cumplen su función hasta que la membrana es endocitada en la zona donde se encuentran los parches subapicales de actina (Kaksonen et al., 2005). Estos parches de actina contribuyen con la forma de una hifa y mantiene el balance entre exocitosis y endocitosis (Shaw et al., 2011). Este proceso de secreción es un mecanismo molecular conocido como exocitosis e involucra la participación de varios complejos proteicos que están altamente conservados en eucariotas (Novick et al., 1980). El exocisto es uno de los complejos esenciales para la vitalidad, el cual está involucrado en el último paso de la exocitosis.



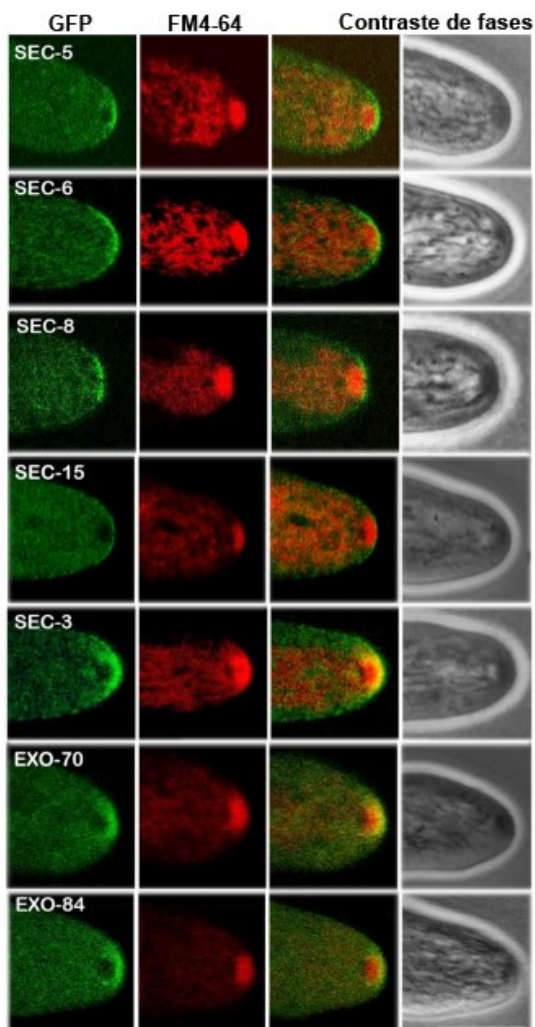
**Figura 1.** Esquema de la exocitosis de vesículas secretoras y la liberación de material hacia el espacio extracelular. Tomado de © 2007 Thompson Higher Education.

## 1.2 Antecedentes

El exocisto es un complejo octamérico evolutivamente conservado en eucariotas (Terbush et al., 1996). Este complejo está ligado a numerosas enfermedades y es esencial para la sobrevivencia en hongos y animales, y está involucrado en la maduración de fagosomas, en la patogenicidad, en la fusión de compartimentos celulares y en la exocitosis regulada por iones de calcio (Martin-Urdiroz et al., 2016). Las mutaciones en las subunidades del exocisto producen la acumulación irregular de vesículas secretoras en el citoplasma, lo que sugiere que el exocisto une las vesículas secretoras con la MP previa a la fusión mediada por los complejos SNARE (Novick et al., 1980; Heider & Munson, 2012). Las vesículas secretoras se acumulan en un cuerpo apical que se piensa que funciona como un centro suministrador de vesículas que contiene microvesículas en el interior y macrovesículas en la periferia (Bartinicki-Garcia et al., 1989). Estas vesículas se fusionan con la punta de hifas a una velocidad determinada por la densidad local de los componentes del exocisto (Caballero-Lima et al., 2013).

La localización del Spk depende de los cables de actina que mantiene la densidad de vesículas mediante la regulación de la entrada y salida de vesículas secretoras, y su distribución es espacialmente distinto a los componentes del exocisto (Jones & Sudbery, 2010). En *N. crassa*, se ha visto que las subunidades del exocisto se acumulan en la punta (Riquelme et al., 2014). Las subunidades SEC-5, SEC-6, SEC-8 y SEC-15 se acumulan en el domo apical de hifas, próximo a la MP en forma de luna creciente o lúnula (Riquelme et al., 2014). Las otras subunidades EXO-70 y EXO-84 se acumulan en la parte frontal de la capa externa de macrovesículas del Spk. SEC-3 es la única subunidad que presenta ambas distribuciones tanto en el Spk como la MP (Figura 2). Estas proteínas son esenciales con la excepción de SEC-5 cuya

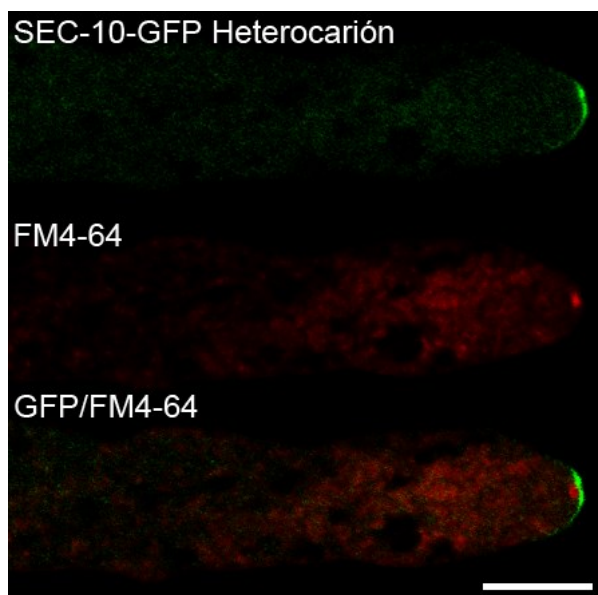
ausencia afecta severamente la morfogénesis celular y la localización de macrovesículas, pero la cepa es viable.



**Figura 2.** Distribución de los componentes del exocisto contrastados con el colorante lipofílico FM4-64 (Color rojo). La columna de la derecha corresponde a imágenes in vivo de contraste de fase. Barra de escala = 10  $\mu$ m. Figura modificada de Riquelme et al., 2014.

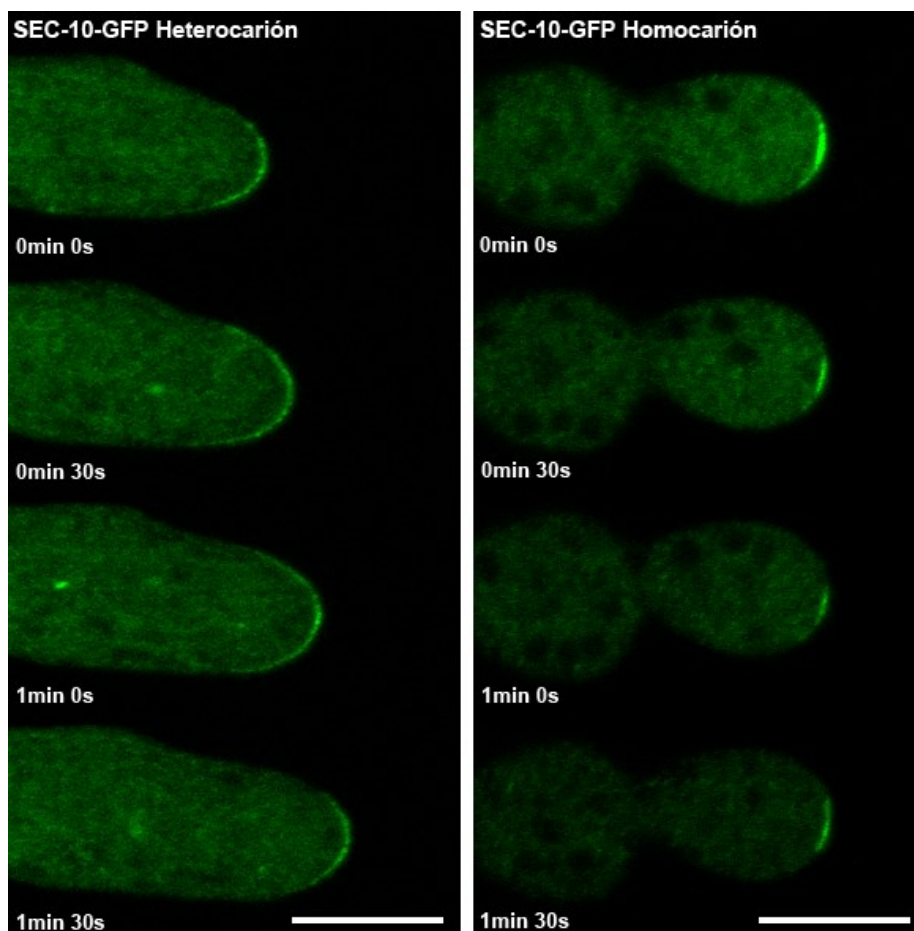
En estudios previos la subunidad SEC-10 fue la única que no pudo ser etiquetada con GFP en *N. crassa* (Riquelme et al., 2014). En *Magnaporthe oryzae*, que al igual que *N. crassa* es un hongo de la clase de los Sordariomycetes, ocurrió lo mismo (Gupta et al., 2015). Se pudieron etiquetar los componentes del exocisto en el C-terminal excepto SEC-10. Los autores discutieron que podría haber un impedimento estructural en la expresión correcta de la proteína etiquetada con GFP. SEC-10 forma parte del exocisto de *N. crassa* y *M. oryzae*, tal como se comprobó por inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas (Riquelme et al., 2014; Gupta et al., 2015). En un trabajo reciente en *N. crassa* se consiguió etiquetar

exitosamente con GFP la subunidad SEC-10 en el extremo carboxilo terminal (Figuroa-Meléndez, 2017). SEC-10 se localizó en el domo apical al igual que las subunidades SEC-5, SEC-6, SEC-8 y SEC-15, sin co-localizar con las vesículas del Spk teñidas con FM4-64 (Figura 3). La proteína se veía acumulada, principalmente, en el ápice y se encontraba en zonas subapicales como puntos y dispersa en el citoplasma. Microscopía confocal de la cepa homocarión reveló que a pesar de estar muy afectada, la proteína SEC-10 aún se localizaba en el domo apical (Figura 4).



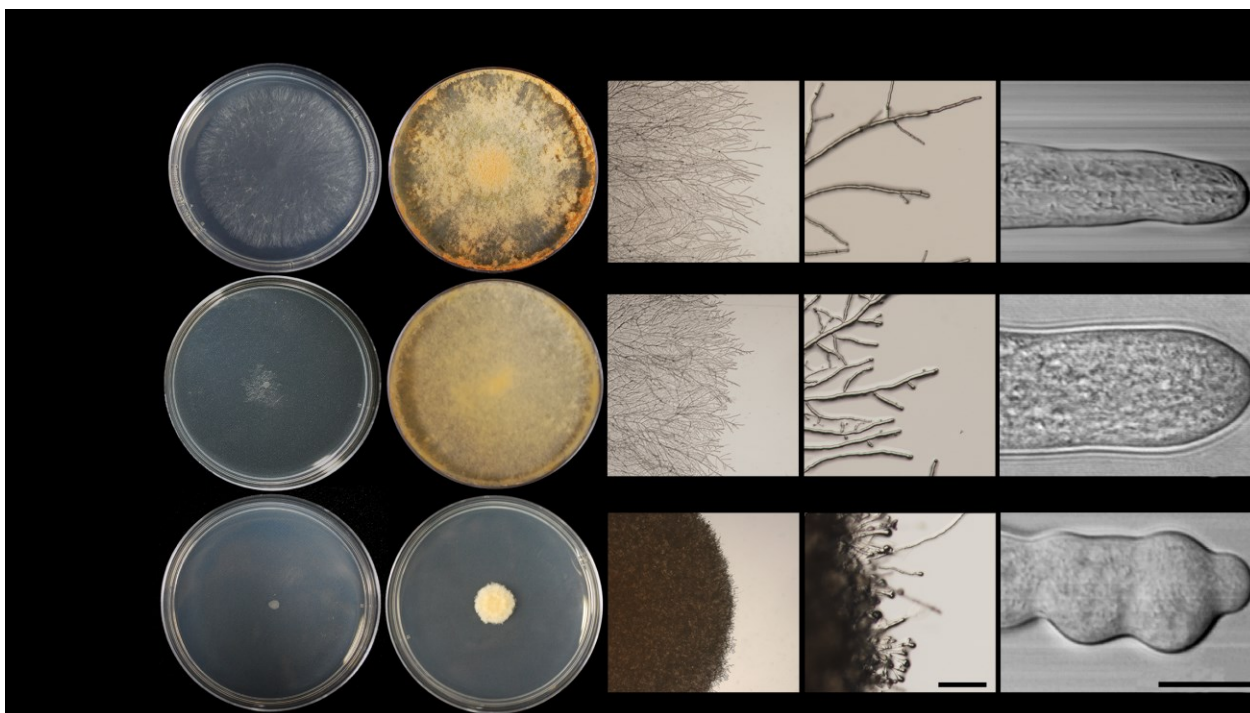
**Figura 3.** Microscopía confocal de barrido con láser de la cepa de *N. crassa* que expresa SEC-10-GFP en estado heterocarión. La imagen de arriba muestra la localización de SEC-10-GFP, la del centro muestra la localización de FM4-64 en el Spk y la imagen de abajo es el conjunto de ambas señales fluorescentes. Barra de escala = 10  $\mu$ m.





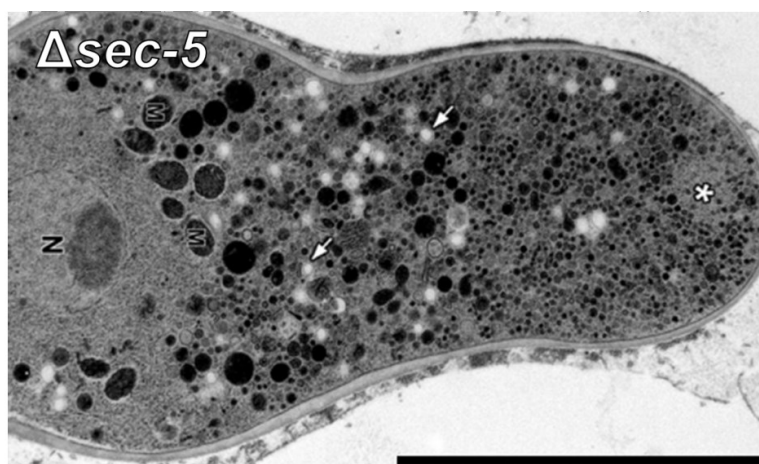
**Figura 4.** Microscopía confocal de barrido de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado heterocarión y homocarión. La imagen muestra la distribución de SEC-10-GFP en las cepas transformantes en estado heterocarión (panel izquierdo) y homocarión (panel derecho). Barra de escala = 10  $\mu$ m

Sin embargo, la etiqueta GFP en el extremo carboxilo terminal pareció causar efectos severos en el fenotipo de esta cepa en estado homocarión. La cepa heterocarión no presentó un fenotipo afectado destacable, pero al verla a un mayor aumento en el microscopio. La cepa en estado homocarión creció como un pequeño botón compacto (Figura 5). Al comparar la tasa de crecimiento de las cepas que expresan SEC-10-GFP con la cepa parental se vio que el crecimiento de la cepa heterocarión está reducido un 60% y el de la homocarión hasta un 83 %. Esto sugirió que la etiqueta, aún con una bisagra de glicinas, afecta la función del exocisto y se concluyó que el extremo carboxilo terminal de SEC-10 es importante para el ensamble correcto del complejo.



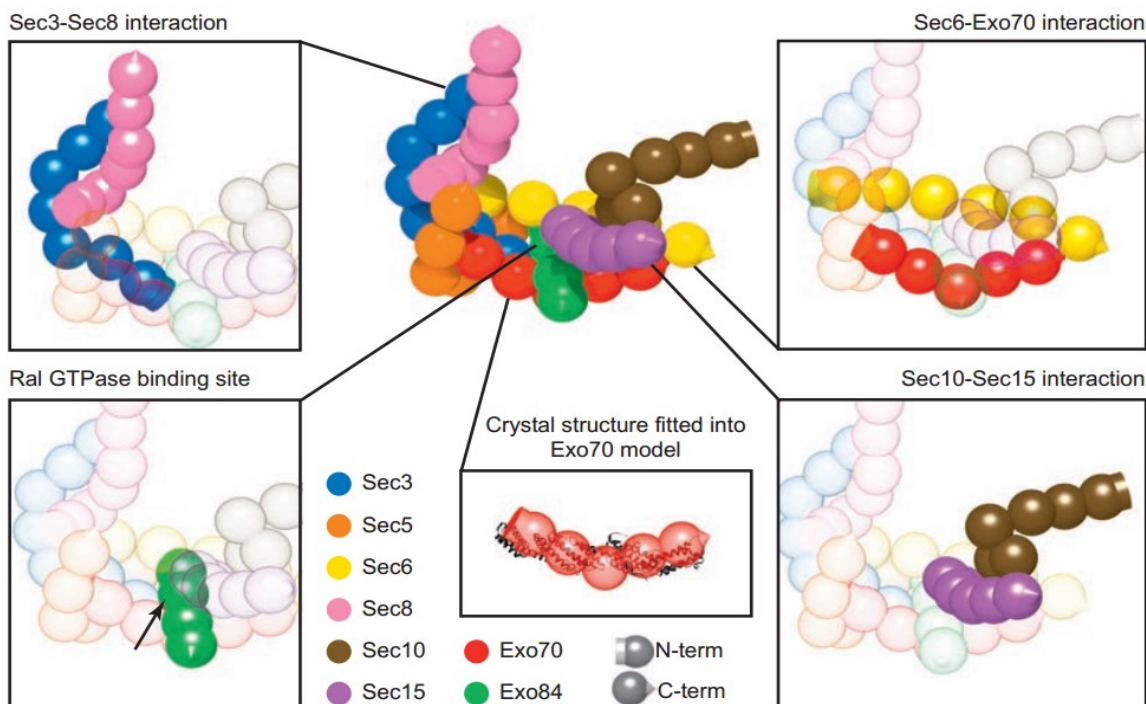
**Figura 5.** Comparación cualitativa del crecimiento y morfología de la cepa que expresa SEC-10-GFP heterocarión/homocarión y la cepa parental 9718. A) Fenotipo de las diferentes cepas de *N. crassa* cultivadas en MMV e incubado durante 24 horas a 30 °C. B) Fenotipo de las cepas después de haberse incubado una semana a 30 °C. Morfología de las colonias vistas a un aumento de 7x por estereomicroscopía. C) Estereomicrografías de la morfología de las colonias a un aumento de 63x. . DIC = Contraste por interferencia diferencial. Barra de escala del panel a 63x = 200  $\mu$ m. Barra de escala de DIC = 10  $\mu$ m.

La morfología aberrante de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión es parecida a la que presenta la mutante  $\Delta$ sec-5 en estado homocarión. Al eliminar SEC-5 se obtuvieron células viables, pero con morfología y crecimiento altamente afectados, en donde las macrovesículas se encuentran dispersas en el citosol mientras que las microvesículas se mantienen en el núcleo del Spk (Figura 6).



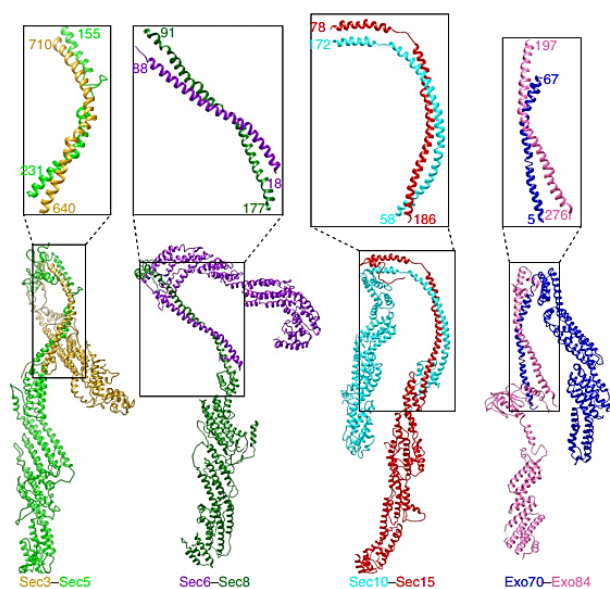
**Figura 6.** Microscopía electrónica de transmisión de un corte criofijado de una mutante  $\Delta sec-5$ . Barra de escala = 5  $\mu m$ . De Riquelme et al., 2014

Este resultado sugiere que la localización correcta de las macrovesículas en *N. crassa* depende del exocisto. En levaduras se observó algo parecido, aunque en ese caso la eliminación de la subunidad del exocisto *EXO70* es la que genera una acumulación anormal de vesículas secretoras en el citoplasma (He et al., 2007). Esta información y lo observado en *N. crassa* apoya la idea que el crecimiento y la localización de las vesículas secretoras depende de un exocisto intacto (Figuroa-Meléndez, 2017; Riquelme et al., 2014; He et al., 2007; Beltrán-Aguilar, 2009). En estudios realizados en *S. cerevisiae* se ha reportado que el exocisto es un complejo muy estable, tal como lo indicaron los experimentos de FRAP, donde el 75% del complejo no se disocia durante el tiempo de recuperación analizado (Heider et al., 2016; Gallego et al., 2013). La reconstrucción 3D de la arquitectura del exocisto en *S. cerevisiae* ha revelado que las subunidades del exocisto tienen forma de bastón con sus terminaciones carboxilo y amino en los extremos de sus estructuras. Cada subunidad tiene su extremo N-terminal orientado hacia el centro del exocisto y sus extremos C-terminal orientados hacia afuera del complejo. La única excepción es la mutante *Sec10*, que tiene una orientación invertida respecto a las otras subunidades. El extremo N-terminal de *Sec10* se encuentra orientado hacia afuera del complejo mientras que su C-terminal está orientada hacia el centro del exocisto (Picco et al., 2017; Figura 7).



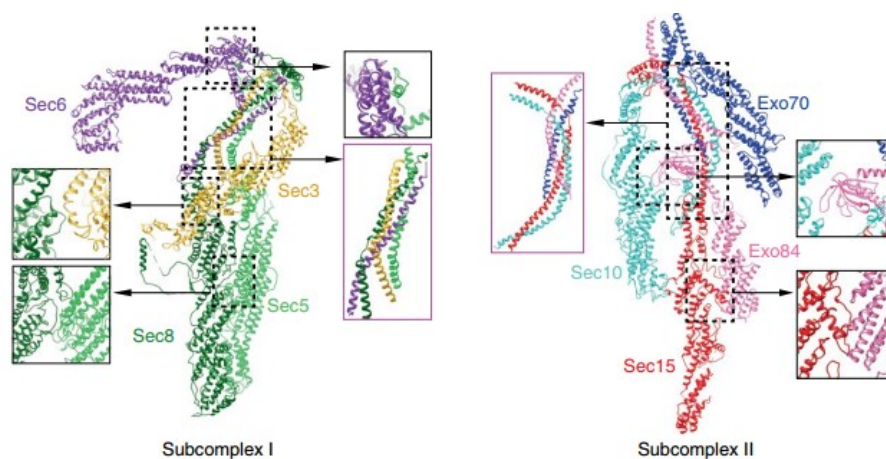
**Figura 7.** Representación tridimensional del exocisto y el arreglo de las subunidades. El color indica qué subunidad es. Las terminaciones C-terminal se representan como una terminación redonda y la N-terminal como un extremo plano. Sec10 visto en color marrón tiene su extremo N-terminal orientado hacia afuera del complejo. Tomado de Picco et al., 2017.

También se observó que las subunidades se unen fuertemente por pares e interactúan, en promedio, con otros tres componentes para formar un complejo entrelazado y reforzado. Mediante ensayos de doble híbrido en levadura se confirmó que el extremo C-terminal de Sec10 se une al extremo N-terminal de Sec15 y que ambos forman un subcomplejo que está menos entrelazado con el resto del complejo y se une a la vesícula secretora (Guo et al., 1999; Roth et al., 1998; Wiederkehr et al., 2004). En un estudio de Picco et al. observaron que este subcomplejo Sec10-Sec15 solamente se encontraba próximo a las subunidades Exo70, Sec6 y Exo84 (Picco et al., 2017). Sin embargo, un estudio posterior de criomicroscopía electrónica reveló que el exocisto se ensamblaba jerárquicamente en 4 pares de subcomplejos: Sec3-Sec5, Sec6-Sec8, Sec10-Sec15 y Exo70-Exo84 (Figura 8; Mei et al., 2018).



**Figura 8.** Representación de las Interacciones por pares de las subunidades del exocisto a través de los motivos CorEx. Los cuatro pares de subunidades de exocisto, Sec3-Sec5 (Amarillo-Verde limón), Sec6-Sec8 (Morado-Verde), Sec10-Sec15 (Azul cielo-Rojo) y Exo70-Exo84 (Azul-Rosa), forman interacciones tipo cremallera a través de los motivos CorEx. Los emparejamientos de los motivos CorEx se indican en recuadros.

Los dímeros Sec10-Sec15 y Exo70-Exo84 se unen como un tetrámero (subcomplejo I) mediante sus motivos CorEx (Core of the Exocist) que forman un orden superior de cuatro hélices denominado CorEx II. De igual manera los dímeros Sec3-Sec5 y Sec6-Sec8 se unen mediante el CorEx I, que resulta en un tetrámero llamado subcomplejo II. Estos dos subcomplejos se unen como un holocomplejo que conocemos como el exocisto (Figura 9; Mei et al., 2018).



**Figura 9.** Representación del ensamblaje de los subcomplejos centrales y el holocomplejo. Sec3, Sec5, Sec6 y Sec8 forman el subcomplejo I. Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84 forman el subcomplejo II. Las interacciones de las subunidades en el subcomplejo I y el subcomplejo II se muestran en inserciones, con los paquetes de cuatro hélices indicados por cuadros magenta.

### 1.3 Justificación

*N. crassa* es el único hongo filamentoso en el que se ha podido etiquetar SEC-10 en el C-terminal, pero su crecimiento y morfogénesis están muy afectados, lo que sugiere un papel importante de esta subunidad del exocisto en la exocitosis. En *S. cerevisiae* el extremo C-terminal de Sec10 está orientado hacia el centro del exocisto, y bajo la premisa que el complejo es evolutivamente conservado podemos explorar si también es conservada la manera en la que se ensambla en *N. crassa* (Picco et al., 2017). Además, no se ha estudiado el papel que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el ensamble del exocisto en *N. crassa*. Conocer cómo interactúa SEC-10 con las otras subunidades aportará información sobre la arquitectura del complejo y las bases para su caracterización.

### 1.4 Hipótesis

El gen *sec-10* es fundamental para el crecimiento y morfogénesis en hifas de *Neurospora crassa*.

### 1.5 Objetivos

#### 1.5.1 Objetivo general

- Determinar la importancia que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el crecimiento de *N. crassa*.

#### 1.5.2. Objetivos específicos

1. Describir las características de las subunidades del exocisto *in silico*.
2. Elucidar el papel que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el crecimiento de *N. crassa*

3. Probar la fidelidad del exocisto ante el cambio de localización de una subunidad.

### 1.5.3. Preguntas de investigación

- ¿Qué dominios estructurales y funciones tienen los componentes del exocisto?
- ¿Cuál es el posible orden de ensamblaje de los componentes y en qué regiones pudieran interactúan entre sí?
- ¿El extremo carboxilo terminal de SEC-10 es esencial para el crecimiento?
- ¿Sí una subunidad es dirigida hacia un orgánulo, el resto del complejo lo sigue?

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Medios y cepas que se utilizaron

Para obtener el material genético de la cepa N1 se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios en medio completo de Vogel (MCV; 2 % sales de Vogel 50X, 1.5 % sacarosa, 0.5 % extracto de levadura y 0.5 % N-Z casaminoácidos). Las cepas transformadas genéticamente se cultivaron en placas de agar que contiene medio FGS (2 % sales de Vogel 50X, 1 % agar y 10 % de solución FGS). La solución FGS está compuesta de 0.5 % fructosa, 0.5 % glucosa y 20 % sorbosa disuelta en agua destilada, la cual fue esterilizada por filtración en jeringa (Filtro VWR® con 0.45  $\mu\text{m}$  de acetato de celulosa). Todos los medios mencionados previamente fueron esterilizados a 121 °C y 15 psi (Libra-fuerza por pulgada cuadrada) en una autoclave durante 15 minutos (Marker Forge, Sterilmatic®). Las cepas que se utilizaron en este trabajo se cultivaron en medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel 1956), se solidificaron con 1.5 % de agar (AGARMEX, S.A. dE C.V) y se incubaron a 30 °C.

**Tabla 1.** Cepas de *N. crassa* que se utilizaron y generaron en este trabajo

Número de referencia	Genotipo	Referencia
N1	<i>mat a</i> ; WT	FGSC988
N150	<i>mat A</i> ; WT	FGSC9013
SMRP24	<i>Mat A</i> ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$ ; <i>his-3</i>	FGSC9717
SMRP25	<i>Mat a</i> ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$	FGSC9718
SMRP294	<i>mat A</i> ; <i>his-3</i> <sup>+</sup> ; <i>sec-6::mchfp</i> <sup>+</sup>	Riquelme et al., 2014
SMRP295	<i>mat A</i> ; <i>his-3</i> <sup>+</sup> ; <i>exo-70::mchfp</i> <sup>+</sup>	Riquelme et al., 2014
SMRP487	<i>Mat a</i> ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$ ; <i>sec-10</i> <sup>2523_2640del::hph<sup>+</sup></sup>	Este estudio
SMRP488	<i>Mat a</i> ; $\Delta\text{sec-10::hph}^+$ ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$	Este estudio
SMRP489	<i>Mat a</i> ; <i>hph</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1::gfp::sec-10</i> ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$	Este estudio
SMRP490	<i>Psec-15::sec-15::gfp::frqNLS::hph</i> ; $\Delta\text{mus-51::bar}^+$	Este estudio



## 2.1.1 Plásmidos y oligonucleótidos

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este estudio

Número	Vector	Genotipo	Referencia
VMRP-48	pGFP::hph::loxP	<i>10xGly::gfp</i>	Honda & Selker 2009
VMRP-73	pCCG::N-GFP	<i>Pccg1::8xGly::gfp</i>	Honda & Selker 2009

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Número del Lab	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
260	hph SM-R	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC
261	hph SM-F	AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
298	loxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA
299	10XGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
421	sec10GlyF	CGATTCGTCCAGACCTTACGCCAC
422	sec10loxF	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGAAGATATTGCGAGTTTTGGTGGGG
423	sec10loxR	GGTCTGGGTCTGGGTTTGCGACTG
720	sec10UT5R F	AGACGTACCTTGAGCAGCCTTATCC
721	sec10UT5R hph R	TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGCGGCGTGTGTACCTGGCAGGGAG
722	hph Pccg-1 F	ATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGTAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC
723	Gly8x sec10 F	GGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCATGGAACGCGGCGGACCCGGCACCAC
724	orf sec10 R	CTCGTCAACAAGAGATTGCAGACTG
725	gfp 8xGly R	GCCGCCTCCGCCCTCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATG
726	sec10 120ntKO R	ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCAAGCGGCACCACCGCCACCACCACCTC
727	sec15 F	CGCCTAAACTCCCAATATTTGGGTC
728	sec15 10xGly R	CGCCTCCGCCTCCGCCCTCCGCCTCAGCGCAAACCGAAGCGCGATCCG
729	gfp NSL hph R	TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTTATTTCCGCTTCTTCTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC GAGAG
730	hph sec15UT3R F	ATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGTGTCTCGGTTCGAGAATTAATAGTAT
731	sec15 UT3R R	TCTACATCCCACCTGTCACGAACTT
	vmrp48-tfpF-HDclo	GAATTCGATATCAAGCTTATCG

## 2.2 Análisis *in silico* del exocisto

Para cumplir con el primer objetivo, que es describir las características de las subunidades del exocisto *in silico*, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de las subunidades del exocisto de *N. crassa* en la base de datos de proteínas de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) y se descargaron en formato FASTA. Después se modeló la estructura tridimensional de cada subunidad con SWISS-MODEL

(Waterhouse et al., 2018). Se identificaron los motivos CorEx en las secuencias de aminoácidos de cada subunidad mediante alineación con Blastp (BLAST de proteína-proteína) en NCBI que utilizó como cebo la secuencia del motivo CorEx en los componentes del exocisto de *Saccharomyces cerevisiae* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.2.1 Modelaje de la estructura tridimensional de las subunidades

Para generar modelos de la estructura tridimensional de cada subunidad se ingresaron las secuencias individualmente en SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). SWISS-MODEL es un servidor para el modelaje comparativo de estructuras tridimensionales de proteínas. Se utilizó el modo *'first approach'* cuya interfaz solo requiere la secuencia de aminoácidos y el servidor selecciona automáticamente los moldes estructurales (Schwede et al., 2003). El servidor realizó la búsqueda de moldes con BLAST y HHBlits contra la librería de moldes de SWISS-MODEL (Camacho et al., 2009; Remmert et al., 2012). La secuencia de interés se buscó con BLAST al ser comparadas con las secuencias de aminoácidos contenidas en la biblioteca de SWISS-MODEL. La calidad de cada molde se identificó de acuerdo a las características de la alineación entre moldes y la secuencia de interés. Cuando la búsqueda de moldes se completó, el molde y los alineamientos se filtraron para eliminar las redundancias. Se seleccionaron los mejores 50 moldes que consideran la cobertura de la secuencia y la similitud. Los mejores moldes y alineamientos fueron analizados aún más y se organizaron en una lista de acuerdo a la calidad esperada de los modelos resultantes, lo cual se estima con el valor GMQE. La estimación GMQE (Global Model Quality Estimation) es una estimación de calidad que combina las propiedades del alineamiento moldes -secuencia y el método de búsqueda de los moldes. El valor GMQE resultante se expresa de 0 a 1, que indica la precisión calculada del modelo construido con la alineación y la cobertura de la secuencia de interés. Números con mayor valor indican mayor confiabilidad en el modelo. Los modelos se crearon en función de la alineación entre molde y secuencia mediante ProMod3 (Biasini et al., 2013). Las coordenadas que se conservaron entre la secuencia y los moldes se copiaron al modelo mientras las inserciones y eliminaciones se remodelaron mediante el uso de una biblioteca de fragmentos (<https://swissmodel.expasy.org/docs/help>). En el caso de que el modelado de *'loops'* o bucles con ProMod3 fallaron, se construyó un modelo alternativo con PROMOD-II (Guex et al., 2009). La estimación de la calidad de modelo tanto global como por cada residuo se evaluó usando la función de puntaje de QMEAN. Esta función identifica el modelo con el mejor consenso entre la estructura secundaria calculada y el área de superficie accesible a solventes (SASA) (Benkert et al., 2010).

## 2.2.2 Detección de motivos CorEx

Para detectar los motivos CorEx caracterizados en *S. cerevisiae*, primero se identificaron los motivos en las secuencias FASTA de las subunidades del exocisto en el software BioEdit Sequence Alignment Editor que usó como referencia el artículo que caracterizó estos motivos (Mei et al., 2018). Estos motivos CorEx de *S. cerevisiae* se buscaron en las secuencias aminoacídicas de sus correspondientes ortólogos en *N. crassa* mediante BlastP de NCBI. El BLAST identificó los posibles motivos CorEx en el alineamiento y se buscaron estas secuencias en los modelos tridimensionales generados en la sección 2.2.1. Estas secuencias que potencialmente están conservadas en *N. crassa* se buscaron en los archivos con formato .pdb de los modelos en el visualizador tridimensional DeepView SWISS-PDBviewer y se capturaron las imágenes generadas.

## 2.2.3 Dominios funcionales en la secuencia de aminoácidos

Se buscó la información funcional que tienen estas proteínas mediante el código de identificación de las proteínas de UniProt para *Neurospora crassa* SEC-3 (V5IM27\_NEURCR), SEC-5 (Q7S9K7\_NEURCR), SEC-6 (Q1K527\_NEURCR), SEC-8 (Q9HE88\_NEURCR), SEC-10 (Q7SD81\_NEURCR), SEC-15 (Q7RYL2\_NEURCR), EXO-70 (Q6MFS1\_NEURCR) y EXO-84 (Q7S8B6\_NEURCR) en los diferentes servidores para su análisis. Se identificaron los diferentes dominios funcionales que tienen estas proteínas mediante el uso de la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Se identificaron los motivos que contienen estas secuencias utilizando ScanProsite (<https://prosite.expasy.org>) y los dominios de superfamilias en el servidor de InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). También se analizó el grado de desorden en la estructura de las subunidades en el software MobiDB (<http://mobidb.bio.unipd.it/>). Con estos datos se diseñó un esquema que muestra a escala las características detectadas en las secuencias de cada subunidad del complejo del exocisto con el software Adobe Illustrator CC 2015.

## 2.2.4 Acoplamiento molecular de las subunidades del exocisto

El acoplamiento molecular o en inglés 'molecular docking' fue realizado en la supercomputadora del servidor ClusPro en Stony Brook University mediante su sitio (<https://cluspro.org>; Kozakov et al., 2017). Este método es ampliamente utilizado para simular el acoplamiento entre proteínas, anticuerpo-péptido o entre péptidos. En este estudio se utilizó el modo proteína-proteína que usa el acoplamiento directo que intenta encontrar la estructura del complejo de ambas proteínas localizado en su mínimo de energía libre de Gibbs, por lo que se requiere una evaluación computacional termodinámica que implementa algoritmos de minimización (Vajda & Kozakov 2009). Este servidor sigue tres pasos computacionales: (1) acoplamiento de estructuras rígidas mediante el muestreo de miles de millones de conformaciones, (2) desviación de la raíz media cuadrática (RMSD) basado en la conglomeración de 1000 estructuras con las estructuras con la menor energía, (3) el refinado de las estructuras que usa la minimización de energía. En el primer paso se utiliza PIPER, un programa de acoplamiento que está basado en la correlación de Transformación Rápida de Fourier (FFT) (Kozakov et al., 2006). Para poder iniciar este proceso se debe ingresar la proteína receptora y la proteína blanco, las cuales deben estar en formato PDB. En este estudio se utilizaron los archivos PDB producidos mediante el método descrito en la sección 2.2.1. Después, de haber ingresado estos datos se seleccionó el método proteína-proteína y se esperó a que el servidor realizara el siguiente procedimiento en la supercomputadora del servidor ClusPro: (1) La rotación de la proteína "ligando" o blanco con 70,000 rotaciones. Para cada rotación se ajustan los ligandos o "blancos" en los ejes x, y, z respecto a la proteína receptora en una matriz. Después el servidor selecciona el ajuste con la mejor puntuación para cada rotación. (2) 1000 rotaciones ajustadas son seleccionadas de las 70,000 rotaciones iniciales con la menor puntuación. (3) Finalmente, el programa junta 1000 posiciones de las proteínas-ligando que tienen un radio de 9 Å C-alfa RMSD. Lo que significa que se busca la posición de ligando con mayor número de "vecinos" en un radio de 9 Å. Estos "vecinos" son eliminados y se repite el procedimiento para remover aquellos datos del conjunto que fue calculado en los pasos anteriores. El servidor envía un correo electrónico con un enlace en donde se pueden consultar los resultados del experimento. En ese enlace se incluyen los datos de puntuación. Sin embargo, se recomienda no juzgar los modelos generados basados en el sistema de puntuación que utilizan ya que no es la intención de ClusPro seleccionar el mejor modelo de entre 10-30 modelos generados. El resultado final también es un archivo tridimensional PDB que se puede visualizar en DeepView o en algún otro software de visualización molecular. De esta manera, se utilizaron las visualizaciones generadas por el servidor ClusPro. En este trabajo se aplicó el acoplamiento molecular entre la proteínas SEC-3 y SEC-5, SEC-6 y SEC-8, SEC-10 y SEC-15, y entre EXO-70 y EXO-84.

## 2.3 Extracción de ADN genómico

Para llevar a cabo el etiquetado de las proteínas de interés (SEC-10 y SEC-15) y la generación de mutantes *sec-10* se extrajo el ADN genómico de la cepa tipo silvestre N1 (Tabla 1). Se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios en un matraz de 1 L con 300 mL de MCV y se incubaron a 30 °C (Environ Shaker®, Lab line) con agitación lenta (150 rpm) durante 16 horas. Posteriormente el micelio se filtró al vacío con una bomba (felisa™ Modelo FE-1500) en un embudo sujeto a un matraz Kitasato de 2 L. El micelio se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta quedar como un polvo fino. Después se continuó con la extracción del ADN genómico mediante el Kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen N.V), que se llevó a cabo tal y como lo describe la casa comercial.

## 2.4 Transformación de *N. crassa*

Previo a la transformación, se lavaron alícuotas de  $1.25 \times 10^8$  de conidios de la cepa 9718 (SMRP25) con 100 µL de sorbitol 1M (Previamente esterilizado por autoclave); se centrifugó en una centrífuga de mesa (Galaxy Mini Centrifuge de VWR) por 10 segundos y se desechó el sobrenadante de sorbitol. Esto se repitió dos veces más y la pastilla de conidios se resuspendió con 70 µL de sorbitol 1M. Las dos construcciones de ADN generadas por PCRs de fusión se mezclaron con la suspensión de conidios lavados y se transfirieron a una celda de electroporación previamente expuesta a rayos UV durante 30 minutos en el equipo UV Crosslinker de UVP®, y enfriada en hielo. Se aplicó un pulso eléctrico en la electroporadora GenePulser Xcell™ (BIO-RAD®). Justo después del pulso eléctrico (1 500 Volts, 25 microFarads, 600 Ohms) los conidios se mezclaron con 1 mL de sorbitol 1M y se transfirieron rápidamente a un tubo estéril con rosca de 15 mL. Los conidios restantes dentro de la celda se mezclaron con 1 mL de Solución de Recuperación estéril (2 % Sales de Vogel en agua destilada) y se pasaron al mismo tubo. Se utilizó la misma metodología de transformación, que utiliza el mismo volumen de agua en vez de ADN como control negativo. Se selló la tapa de ambos tubos con rosca de 15 mL con parafilm y se cubrieron los tubos con aluminio para ser incubados a 30 °C con 5 rpm de agitación horizontal durante tres horas. Los tubos con conidios se centrifugaron a 5 000 rpm durante 3 minutos en la centrífuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Scientific). Se desechó 1.8 mL del sobrenadante; el botón se resuspendió con los 200 µL restantes y se usaron 100 µL de la suspensión en dos cajas petri con 25 mL de FGS Agar con Solución FGS e higromicina a una concentración final de 300 µg/mL.

## 2.5 Selección de transformantes

Después de su incubación a 30 °C durante 4 a 5 días se seleccionaron colonias individuales bajo condiciones de esterilidad y fueron colectadas en tubos de cultivo (VWR® 10 x 75 mm de borosilicato) con 1.5 mL de MMV sólido al 1.5 % de agar con higromicina a una concentración final de 300 µg/mL. Los tubos se incubaron durante 3 o 4 días a 30 °C. Las colonias que crecieron en el medio con antibiótico fueron indicadores de una transformación exitosa con los fragmentos recombinantes de interés.

## 2.6 Microscopía confocal de escaneo por láser

Se colectaron conidios congelados con un palillo estéril y se inocularon en el extremo de una caja preparada con MMV solidificado con 1.5 % de agar. La caja se incubó durante 16 horas a 30 °C y con una espátula flameada se cortó un rectángulo de agar para transferirlo a un cubreobjetos (VWR VistaVision™ Cover Glasses 16004-096, No. 1, 24 x 60 mm) con la cara de la colonia hacia la laminilla. Las laminillas se dejaron a temperatura ambiente por 15 min para que las hifas de *N. crassa* se recuperaran del daño. La muestra de agar con hifas en crecimiento pasó a ser montada al microscopio confocal con aceite de inmersión entre el objetivo y el cubreobjetos. El microscopio que se utilizó es un microscopio confocal Olympus fluoview™ FV1000 con un objetivo de 60X, un equipo de escaneo por láser con los objetivos invertidos. Este equipo consiste de un sistema de escaneo SIM que combina dos dispositivos de escaneo: un espejo dicróico compuesto de un par de espejos galvanométricos y una fuente de iluminación con láser. Para excitar a la proteína GFP, la cual se fusionó a las subunidades de interés, se utilizó un láser de argón que emite una longitud de onda máxima de 488 nm. En el caso de las proteínas etiquetadas con la proteína fluorescente mCherry (mChFP) o teñidas con FM4-64, se utilizó un láser de Helio-Neón que emite una longitud de onda máxima de 543 nm. Los parámetros del uso de láser, los filtros de excitación, la apertura del pin hole y el enfoque se configuraron dentro del software del equipo fluoview. Se seleccionó una hifa bajo luz transmitida con un objetivo de 60X, se enfocó con los tornillos macro y micrométricos y se encendió el láser para excitar la muestra. Dentro del programa se recortó el área de campo para mostrar solamente la región de interés, la punta de la hifa. Se capturaron videos de las hifas en crecimiento y se guardaron en el formato de video OIB.

## 2.7 Microscopía confocal de disco giratorio

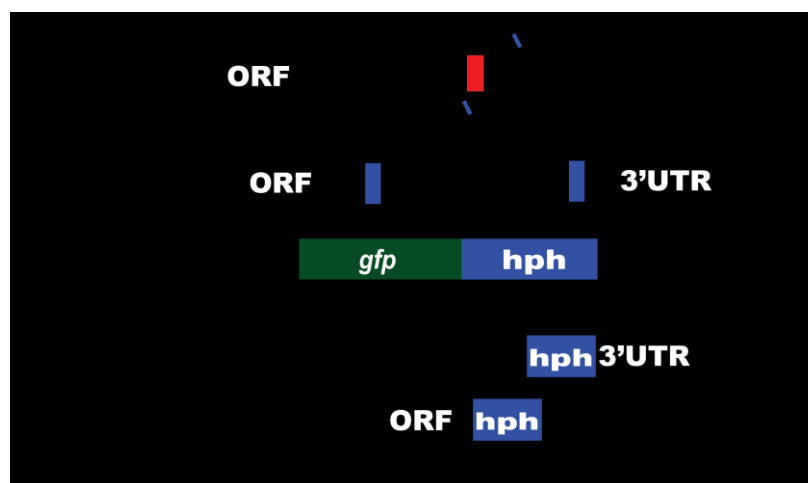
Para la observación de muestras en el microscopio de disco giratorio se procedió de la misma manera en la que se prepara y monta la muestra, tal como se describe en la sección anterior. La ventaja de utilizar este equipo sobre el microscopio confocal convencional es que la fluorescencia emitida por la muestra es capturada y procesada simultáneamente y no por secciones bidimensionales como ocurre en la microscopía confocal de barrido con láser. Este tipo de microscopía es útil para observar con mayor resolución temporal la dinámica de las partículas fluorescentes en el plano focal de la muestra. El equipo Nikon (Eclipse Ti-E) usa objetivos invertidos al igual que el microscopio confocal y está acoplado a una cámara EMCCD iXon Ultra de Andor Oxford Instruments, Reino Unido) y la unidad de disco giratorio CSU (Yokogawa Electric Corporation, Japón). La microscopía confocal de disco giratorio supera el problema de desviación temporal que tiene el microscopio confocal explotando el principio múltiple en la que la iluminación se detecta en múltiples puntos simultáneamente. Los agujeros de alfiler (y las microlentes) están dispuestos en un patrón, que escanea un campo de visión definido por el tamaño de apertura de la matriz y la ampliación del objetivo del microscopio. Los rayos láser de barrido excitan etiquetas fluorescentes en la muestra y la emisión de fluorescencia será más intensa en el plano focal. Un espejo dicróico, que refleja las longitudes de onda de emisión, se encuentra entre los dos discos giratorios. Esto separa la emisión del láser de cualquier luz de excitación reflejada o dispersada desde la óptica del microscopio. La geometría de la ruta de emisión da como resultado una señal de fluorescencia confocal con ruido de fondo bajo (Tomado de andor.com). Las configuraciones de la toma de imágenes y la selección del módulo de discos giratorios se realizaron dentro del software Nikon Elements. En este software se seleccionaron los filtros apropiados para la excitación de los fluoróforos.

## 2.8 Generación de mutantes *sec-10*

Para cumplir el segundo objetivo se generaron mutantes de *sec-10* (NCU09313) y se etiquetó SEC-10 en el extremo amino terminal con el fin de elucidar el papel que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el exocisto. Se generaron dos mutantes de *sec-10*. La cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> cuyo superíndice indica que se realizó la delección de los últimos 120 nucleótidos del gen *sec-10* y la cepa  $\Delta$ *sec-10* en la que se eliminó el gen por completo (Nomenclatura basada en Antonarakis y den Dunnen, 2001). En la generación de mutantes fue fundamental diseñar oligonucleótidos para la construcción de los fragmentos recombinantes

que se utilizaron en la técnica de reemplazo de gen "Split Marker" (Smith et al., 2011). Se realizaron PCRs con los oligos, el ADN genómico de *N. crassa* y los productos se usaron para transformar conidios de la cepa de *N. crassa* FGSC#9718 mediante electroporación.

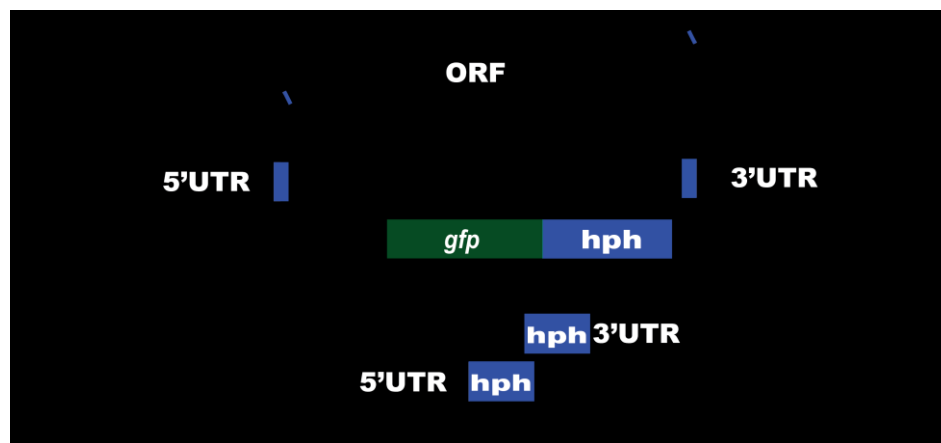
Para la mutante *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> se diseñaron dos pares de oligonucleótidos. Se diseñó un oligonucleótido directo A1 de 25 pares de bases (pb), que flanquea 1,000 pb río arriba del codón de paro de *sec-10* y un oligonucleótido reverso A2 de 50 pb con una extensión 3' de 25 pb que flanquea las primeras bases del gen *hph*. El segundo par de oligonucleótidos incluye uno directo A3 (422) que tiene una extensión 5' con los últimos 25 pb del gen *hph* y un oligonucleótido reverso A4 (423) que se ubica 1,000 pb río abajo del primer oligo. Estos fragmentos iniciales de ADN se fusionaron a fracciones del gen *hph* que usó como templado el cassette *gfp::loxP::hph::loxP* que se amplificó a partir del plásmido VMRP-48 mediante el uso de los oligonucleótidos 10XGly-F (299) y loxP-R (298). A pesar de que el cassette *gfp::loxP::hph::loxP* contiene la secuencia de *gfp*, solamente se fusionaron fracciones del gen *hph* y la secuencia de *gfp* se pierde durante la PCR de fusión. Las dos PCRs de fusión se llevaron a cabo utilizando los oligos SM-F (261) y SM-R (260) respectivamente para cada fragmento inicial (Figura 10). Se realizaron las PCRs iniciales (98 °C x 3 min, 98 °C x 30 s, 58 °C x 40 s, 72 °C x 2 min y 35 ciclos) con los oligos mencionados usando el ADN genómico de *N. crassa* y los productos finales se usaron para transformar conidios de la cepa de *N. crassa* FGSC#9718 mediante electroporación.



**Figura 10.** Esquema de las reacciones en cadena de polimerasa (PCR) requeridas para la producción de los fragmentos "Split Marker" utilizados para producir la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup>.



Para generar el primer fragmento recombinante en la eliminación del gen *sec-10* se utilizó el oligo directo B1 (720) situado una kilo base (kb) rio arriba del codón de inicio de *sec-10* y el oligo reverso B2 (721) que tiene una extensión 5' con secuencias *hph*. Para el segundo fragmento se usó el mismo par de oligos A3 y A4 utilizados para la mutante *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> (Figura 10). Estos amplicones iniciales se fusionaron a fracciones del gen *hph*, el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* como templado y los oligos SM-F (261) y SM-R (260) (Figura 11). Los productos de PCR se utilizaron en la transformación de conidios de *N. crassa* para la eliminación del gen *sec-10*. La mutante  $\Delta sec-10$  se comprobó mediante PCR y la mutante *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> mediante secuenciación.

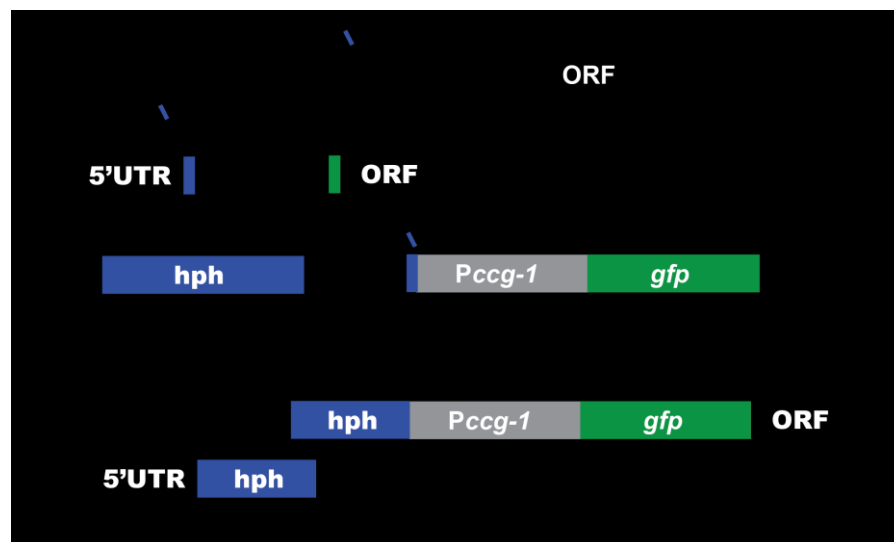


**Figura 11.** PCRs que se realizaron en la técnica "Split Marker" para el reemplazo del gen *sec-10* por el gen *hph*.

## 2.10 Etiquetamiento de SEC-10 con GFP en el extremo amino terminal

Como parte del primer objetivo se corroboró la localización SEC-10 con la proteína fluorescente GFP fusionada en el extremo amino terminal. La fusión se realizó con el mismo método "Split Marker" y se reemplazó el promotor endógeno por el promotor *ccg-1* y el gen *hph*. Esto se llevó a cabo mediante la amplificación de una kb de la región 5' no traducida (UTR) rio arriba del promotor de *sec-10* con una extensión 3' de secuencias del gen *hph* que fue generado con un par de oligonucleótidos diseñados C1 (720) y C2 (721) los mismos que fueron utilizados para generar la cepa  $\Delta sec-10$ . Se diseñó otro par de oligos C3 (723) y C4 (724) que amplifican la primer Kb del marco abierto de lectura del gen que incluye una extensión 5' que contiene 25 pb del final de la secuencia del gen *gfp*. A partir del templado plasmídico de *Pccg-1::N-GFP* se amplificó el promotor *ccg-1* con *gfp* y una extensión 5' de 25 pb del final de la secuencia

de *hph* con un oligo directo C5 (722) y uno reverso C6 (725) que flanquea las últimas 25 pb del gen *gfp*. Por otro lado, se amplificó el cassette de resistencia *hph* a partir del plásmido VMRP-48, los oligonucleótidos *vmrp48-tfpF-HDclo* y *loxP-R* (298) del cual se usaron para las PCRs de fusión. A continuación se realizó una PCR de fusión entre la primera Kb de *sec-10* y el cassette *Pccg-1::gfp* para producir el fragmento *Pccg-1::gfp::sec-10* que posteriormente se fusionó con una fracción de *hph* con los oligonucleótidos *hph SM-F* (261) y *C4* (724). Se realizó otra PCR de fusión con la Kb de la región 5' UTR y el cassette *hph* (Figura 12). Los dos fragmentos obtenidos por la PCR de fusión se usaron para transformar a *N. crassa* mediante electroporación.

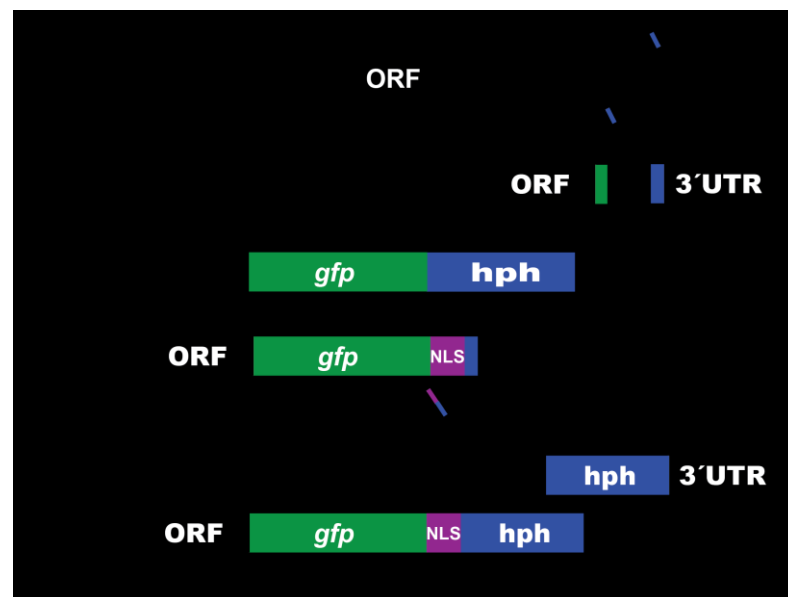


**Figura 12.** Esquema de las PCRs y oligonucleótidos que fueron utilizados en la construcción del cassette *Pccg-1::gfp::sec-10* en el cual se reemplazó el promotor *sec-10* por el promotor *ccg-1* unido a *gfp*.

## 2.11 Etiquetamiento de SEC-15 con GFP y una señal de localización nuclear

Para abordar el tercer objetivo que consiste en probar la fidelidad del exocisto, se añadió una señal de localización nuclear (NLS) a GFP. Se usó la NLS del gen *frq* (NCU02265) del ciclo circadiano, en el extremo C-terminal. Para realizar esto se amplificó la última Kb (fragmento I) del marco abierto de lectura de *sec-15* (NCU00117) con un oligo directo D1 (727) 1 Kb río arriba del codón de paro y un oligo reverso D2 (728) que excluye el codón de paro con una extensión 3' que flanquea los primeros 25 nucleótidos (nt) del gen *gfp*. Se amplificó también una Kb (fragmento II) de la región 3' UTR de *sec-15* mediante el uso de un oligo directo D3 (730) que tiene una extensión 5' que incluye los últimos 25 nucleótidos de *hph* y un oligo

reverso D4 (731) que estaría 1 Kb río abajo del oligo D3. Para generar el fragmento izquierdo se realizó una PCR para fusionar el fragmento I con el gen *gfp* mediante el uso de los oligos D1 y un oligonucleótido reverso D5 (729) que incluye de 5'-3' los últimos 25 nucleótidos de *gfp*, la secuencia NLS de 15 nt, codón de paro y los primeros 25 nt del gen *hph*. Después se realizó otra PCR de fusión con el producto anterior y el cassette de *hph* con los oligos D1 y *hph* SM-R. Para la generación del fragmento derecho se hizo una PCR de fusión con el oligo directo (*hph* SM-F) y el oligo D4 usando el fragmento II y el templado "Knock in vector" (Figura 13). Se usaron estos dos fragmentos recombinantes para transformar conidios de *N. crassa* (FGSC9718) mediante electroporación. La cepa que expresa SEC-15-GFP-NLS se cruzó con la tipo silvestre (N150) para obtener una cepa homocarión de tipo de apareamiento *mat A* que se fusionó con las cepas que expresan SEC-6-mChFP (SMRP294) y EXO-70-mChFP (SMRP295). La descendencia fue cribada con higromicina y con el medio sin histidina. Una vez seleccionadas las cepas positivas se observaron en el microscopio confocal.



**Figura 13.** Esquema de las PCRs requeridas en la técnica "Split Marker" que fusiona el cassette que contiene *gfp*, la NLS de *frq* y *hph* al gen *sec-15*.

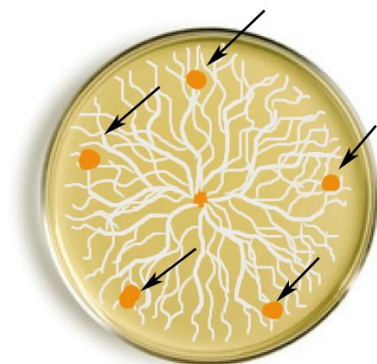
## 2.12 Obtención de homocariotes por microconidios

En el caso de las cepas mutantes de genes esenciales como *sec-10* se optó por obtener microconidios, como estrategia alternativa a las cruces. Debido a que los microconidios son uninucleados, las colonias que crezcan a partir de éstos serán homocariotes. Para obtener microconidios se indujo a que

*N. crassa* produjera principalmente microconidios en vez de macroconidios. Esto se llevó a cabo con el medio Westergaard agar preparado con 5 ng/ml de biotina, 20 mg/ml agar, 5 mg/ml sacarosa y 2 ml de sales de Westergaard 5X aforado a 100 ml (Sales de Westergaard: KNO<sub>3</sub> 5 mg/ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mg/ml, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 mg/ml, NaCl 0.5 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mg/ml y 500 µl de elementos traza utilizados para medio mínimo de Vogel). El medio se esterilizó y se le añadió 1 ml de yodoacetato de sodio 0.1 M esterilizado por un filtro de 0.45 µm. Se vertieron 7 ml del medio en tubos de borosilicato (10 x 75 mm) y se dejaron solidificar de manera inclinada. Una vez solidificado el medio se inocularon conidios de la cepa de interés en tubos con medio Westergaard y se cultivaron a 25 °C durante 10 días. Después de los 10 días se lavaron los conidios con 2 ml de agua estéril y se pasó la solución de agua con conidios por un filtro de 5 micrómetros. La suspensión de conidios se centrifugó en una centrifuga de mesa a 6,000 rpm por 1 minuto y se suspendieron los conidios en 200 µl de agua estéril de los cuales se tomaron 50 µl para sembrar en cajas con FGS con solución FGS y en cajas con FGS, solución FGS e higromicina (300 µg/mL). Se cultivaron las cajas durante dos días a 30 °C y después se seleccionaron las colonias más pequeñas que se originan de microconidios.

## 2.13 Cruzas para la obtención de homocariones

Las cepas transformantes que se generaron en este estudio están en estado heterocarión ya que posiblemente no todos los núcleos fueron transformados. Entonces para obtener cepas en estado homocarión se cruzaron las heterocariones con la cepa tipo silvestre N150 que es de tipo de apareamiento opuesto a la FGSC9718 (Sección 2.1; Tabla 1). Primero se inocularon conidios de la cepa de tipo de apareamiento *mat A* en el centro de una caja de Petri con medio sintético de cruza (2 % sacarosa, 2 % agar y 50% del volumen con la solución 2X para cruza de Westergaard & Mitchell, 1947). La caja se cubrió con papel de aluminio y se incubó a 30 °C toda la noche. Posteriormente se le agregaron conidios de la mutante heterocarión en cinco diferentes puntos, como indican las flechas negras en la Figura 14. La caja se cubrió con papel de aluminio y se incubó a 25 °C durante dos semanas. Durante este tiempo se producen los cuerpos fructíferos sexuales (peritecios) conteniendo ascas que a su vez contienen las esporas sexuales conocidas como ascosporas.



**Figura 14.** Esquema del método de fertilización por conidios que se utilizó para las cruzas genéticas. Las flechas negras son los sitios en donde se agregaron los conidios.

## 2.14 Activación y aislamiento de ascosporas

Después de las dos semanas de incubación se formaron los peritecios, los cuales liberaron ascosporas hacia la tapa de la caja de Petri. Las ascosporas situadas en la tapa se recuperaron con la ayuda de una pipeta, se mezclaron las esporas con agua destilada estéril y se transfirieron en un tubo de microcentrífuga aforado a 1 mL de agua destilada estéril. La suspensión se mezcló por inversión, se tomaron 70  $\mu$ L con una pipeta y se distribuyeron con una espátula sobre una caja de Petri con MMV sólido al 1.5 % de agar. Se le aplicó un choque térmico de 60 °C a la caja de Petri durante una hora en una incubadora, para activar las ascosporas. Después la caja de Petri se incubó a 30 °C durante 6 horas para que las ascosporas germinaran y se recuperaron delicadamente del agar con una espátula flameada. Se cortó alrededor de la ascospora germinada con la ayuda de un estereomicroscopio Olympus SXZ12 y se transfirió el cubo recortado de agar en un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) con MMV sólido al 1.5 % agar conteniendo higromicina (300  $\mu$ g por mL de medio). Los tubos se incubaron a 30 °C de 3 – 5 días; aquellos tubos que crecieron son las transformantes homocariones candidatas.

## 2.15 Análisis fenotípico de las mutantes *sec-10*

Las mutantes de *sec-10* y la tipo parental (FGSC9718) se cultivaron individualmente en cajas de Petri con MMV al 1.5% agar y se incubaron durante 20 horas a 30° C. Se tomaron fotografías de dichas colonias sin aumento y a un aumento de 63X en un microscopio estereoscópico (Olympus Optical Co., Ltd.

Modelo SZX-ILLB2-100). Por otra parte, se realizó un ensayo de crecimiento con conidios de las cepas en estado homocarión y 9718 en tubos individuales de borosilicato con MVV solidificado al 1.5% e incubado durante una semana a 37 °C. Posteriormente se tomaron fotografías (Nikon Digital Camera D33697, Nikon Corp., Japan) de dichos tubos en un fondo oscuro para comparar el fenotipo colonial entre las mutantes y la parental. Para el análisis cuantitativo de las diferencias en la tasa de crecimiento de las cepas mutantes y la parental las cepas se cultivaron durante 12 horas. Se inocularon conidios en cada placa de MMV solidificado al 1.5% y se prepararon 4 réplicas de cada cepa. Las placas se incubaron a 30 °C durante 16 horas y al día siguiente se marcó con plumón permanente el margen de cada colonia cada 3 horas durante el transcurso de 12 horas. Se dibujaron 3 líneas en cada caja desde el punto de inoculación hasta la última línea marcada. En cada una de estas tres líneas se midió la distancia en milímetros que avanzó el margen de las colonias cada tres horas de crecimiento. Cada placa tuvo un total de 12 mediciones que corresponde a las 4 réplicas que fueron promediadas, convertidas a mm/hr y calculada su desviación estándar en Excel. Estos datos fueron analizados en el programa STATISTICA de StatSoft para obtener la tasa de crecimiento promedio de cada cepa y los intervalos de confianza.

## **2.16 Tinción de endomembranas celulares con FM4-64**

FM4-64 es un colorante que se usa ampliamente para seguir el tráfico vesicular dentro de una célula. La internalización del colorante en la célula es rápida y se trabajó con rapidez para poder observar con facilidad las estructuras endomembranosas, particularmente el Spk. Dentro del software fluoview FV1000 se seleccionaron las opciones de laser EGFP y Texas Red, y se activó el canal de láser de 543 nm ya que FM4-64 es excitable a esa longitud de onda. El colorante FM4-64 se preparó a una concentración final de 7  $\mu$ M y se conservó en hielo en un tubo de PCR cubierto con papel de aluminio, debido a la inestabilidad de la molécula al exponerse a la luz y temperatura. Se crecieron las cepas mutantes *sec-10* y se montaron sobre la platina del microscopio confocal como es descrito el protocolo de la sección 2.6, seguido por la inyección de 5  $\mu$ L de FM4-64 entre la muestra y el cubreobjetos, y se tomaron videos para su posterior análisis.

## 2.18 Ensayos de co-expresión de proteínas

Con el fin de conocer si el cambio de localización de SEC-15 era suficiente para reclutar el resto del exocisto se cruzó la cepa SEC-15-GFP-NLS con FGSC #9717 tal como se describe en la sección 2.11. La descendencia fue cribada por su capacidad de resistir el antibiótico higromicina como se describe en la sección 2.12 y por su auxotrofia a histidina. Aquellas cepas que no crecieron sin histidina y son resistentes a higromicina fueron cribadas por microscopía confocal. Una vez verificado el genotipo se procedió a transformar la cepa seleccionada con un vector de expresión que contiene el componente SEC-6 o EXO-70 etiquetados con mChFP. De este modo se buscó la señal fluorescente de mChFP en las hifas con el fin de ubicar aquellas cepas que tienen el genotipo de ambas cepas parentales, es decir, que expresen SEC-15-GFP-NLS y la mChFP de las cepas SMRP294 o SMRP295. Por otra parte, se transformó la cepa auxótrofa a histidina con un vector que contiene la proteína del núcleo H1 etiquetado con RFP con fin de verificar la localización de SEC-15-GFP-NLS en los núcleos. Según la hipótesis planteada en este estudio se esperaba encontrar la señal mChFP en los núcleos debido a la fuerte interacción de los subcomplejos que se piensa que tiene el exocisto. Una vez ubicada la señal mChFP se encendió el láser de argón para la excitación de SEC-15-GFP-NLS simultáneamente para observar la co-expresión de ambas proteínas etiquetadas. Se tomó video de lo observado y se realizó un análisis cuantitativo de la colocalización, mediante un perfil de intensidad de la fluorescencia observada en ambos canales en el mismo espacio. Esta cepa que se encuentra en estado homocarión va a tener, seguramente, un defecto en el crecimiento ya que todas sus copias de SEC-15 fueron dirigidas hacia el núcleo y se esperaba observar afectaciones en su morfogénesis y en su localización de macrovesículas.

## 2.19 Análisis de la cepa GFP-SEC-10

Se buscó la cepa homocarión (Ver sección 2.11) que expresa la proteína GFP-SEC-10 bajo el control del promotor *ccg-1* en el locus endógeno de *sec-10* y se observó mediante los microscopios confocal de escaneo y de disco giratorio como se describe en las secciones 2.6 y 2.7. Se buscó la señal en el domo apical de las hifas y las células se tiñieron con FM4-64 para contrastar la localización de GFP-SEC-10 con el Spk. Con el fin de averiguar si la etiqueta GFP en el extremo amino terminal tiene efectos en el crecimiento se realizó un ensayo de crecimiento en paralelo con las cepas mutantes, la cepa parental 9718 y la cepa SEC-10-GFP como se ha descrito en la sección 2.15.

## 2.20 Procesamiento de imágenes

Cada video capturado en los programas fluoview FV1000 o Nikon Elements se guardaron dentro de una carpeta ubicada en la dirección FTP Institucional del Laboratorio de Microbiología (<ftp://ftp.cicese.mx/pub/divBEA/microbiologia>). Los videos guardados en la carpeta del directorio se descargaron en un equipo personal y se abrieron individualmente en el software FV10-ASW Viewer o Nikon Elements. Se le agregó una barra de escala de 10  $\mu\text{m}$  y un indicador de tiempo real. El video se exportó en formato .TIFF o .PNG para ser importado y mejorado en software Adobe Photoshop CS5.1



## Capítulo 3. Resultados

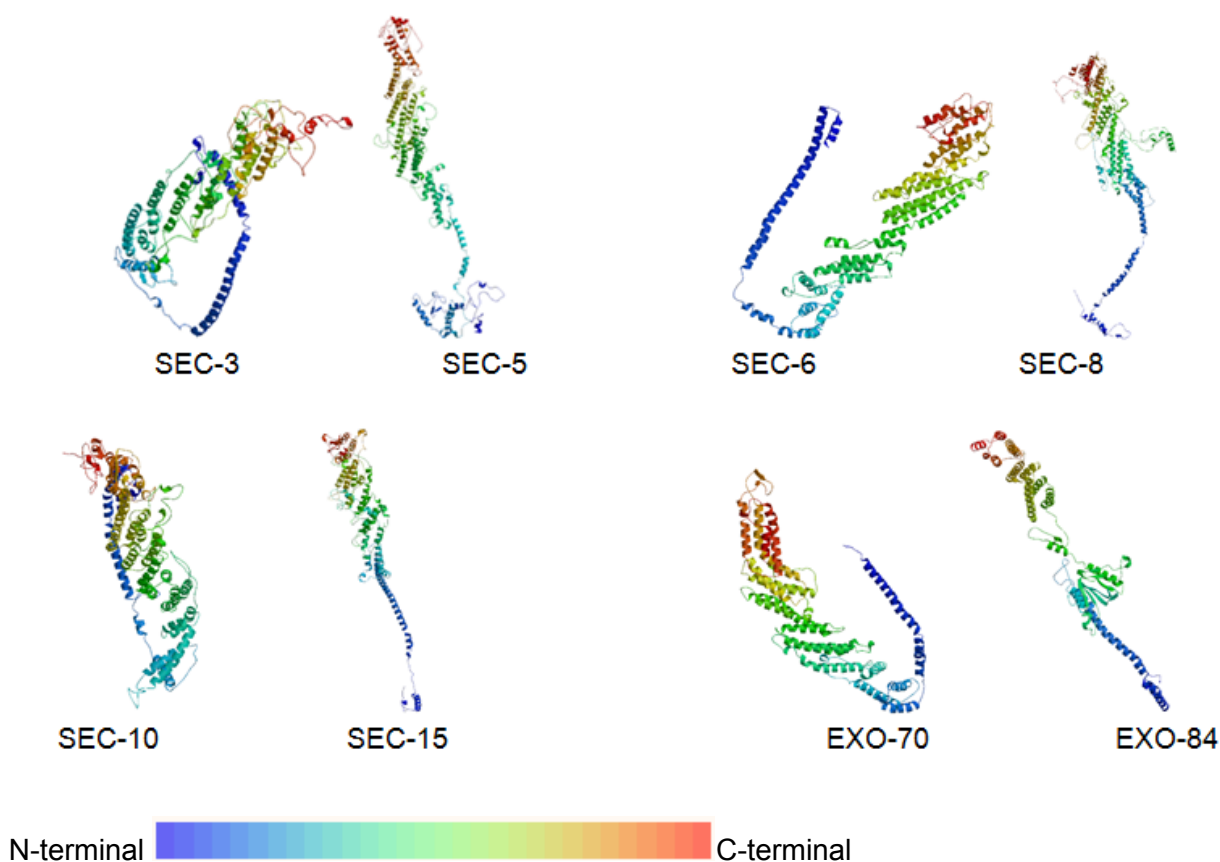
### 3.1 Características de las subunidades del exocisto *in silico*

En servidor realizó la búsqueda de modelos en la biblioteca de moldes de SWISS-MODEL (SMTL versión 2018-11-08, PDB 2018-10-26) con BLAST (Camacho et al., 2009) y HHBlits (Remmert et al., 2012). Los mejores modelos fueron seleccionados entre docenas de posibles estructuras. Los siguientes modelos tridimensionales son los que obtuvieron mayor puntaje QMEAN. En promedio los modelos tenían 22% de identidad; SEC-3 siendo el más bajo con 17.59% y SEC-10 el más alto con 27.45%. La similitud no varió mucho entre el más bajo de 29% de SEC-3 y el más alto de 34% de SEC-10 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Parámetros usados para identificar el mejor modelo generado por SWISS-MODEL.

	Molde	Identidad	Similitud	Cobertura	GMQE	QMEAN
<b>SEC-3</b>	5yfp.1.A	17.59	0.29	0.47	0.24	-9.50
<b>SEC-5</b>	5yfp.1.B	20.97	0.31	0.81	0.50	-7.61
<b>SEC-6</b>	5yfp.1.C	21.90	0.33	0.97	0.62	-6.11
<b>SEC-8</b>	5yfp.1.D	19.41	0.31	0.86	0.50	-8.27
<b>SEC-10</b>	5yfp.1.E	27.45	0.34	0.89	0.53	-7.22
<b>SEC-15</b>	5yfp.1.F	21.91	0.32	0.93	0.57	-7.99
<b>EXO-70</b>	5yfp.1.G	23.49	0.33	0.93	0.61	-4.91
<b>EXO-84</b>	5yfp.1.H	22.40	0.32	0.84	0.47	-4.60

El servidor seleccionó moldes tridimensionales de los ocho componentes del exocisto PDB-5yfp en *S. cerevisiae*. Debido a que las subunidades se unen por los pares Sec3-Sec5, Sec6-Sec8, Sec10-Sec15 y Exo70-Exo84 en *S. cerevisiae* se espera que esta relación se conserve en *N. crassa*. Sin embargo, cabe la posibilidad de que haya diferencias (Guo et al., 1999; Mei et al., 2018). Al realizar este procedimiento se puede observar, claramente, un patrón en los pares de subunidades. Las subunidades SEC-3, SEC-6, SEC-10 y EXO-70 se ve que tienen su cola N-terminal de manera doblada y orientada hacia su extremo C-terminal, en cambio las subunidades SEC-5, SEC-8, SEC-15 y EXO-84 tienen una conformación recta en su estructura (Figura 15).

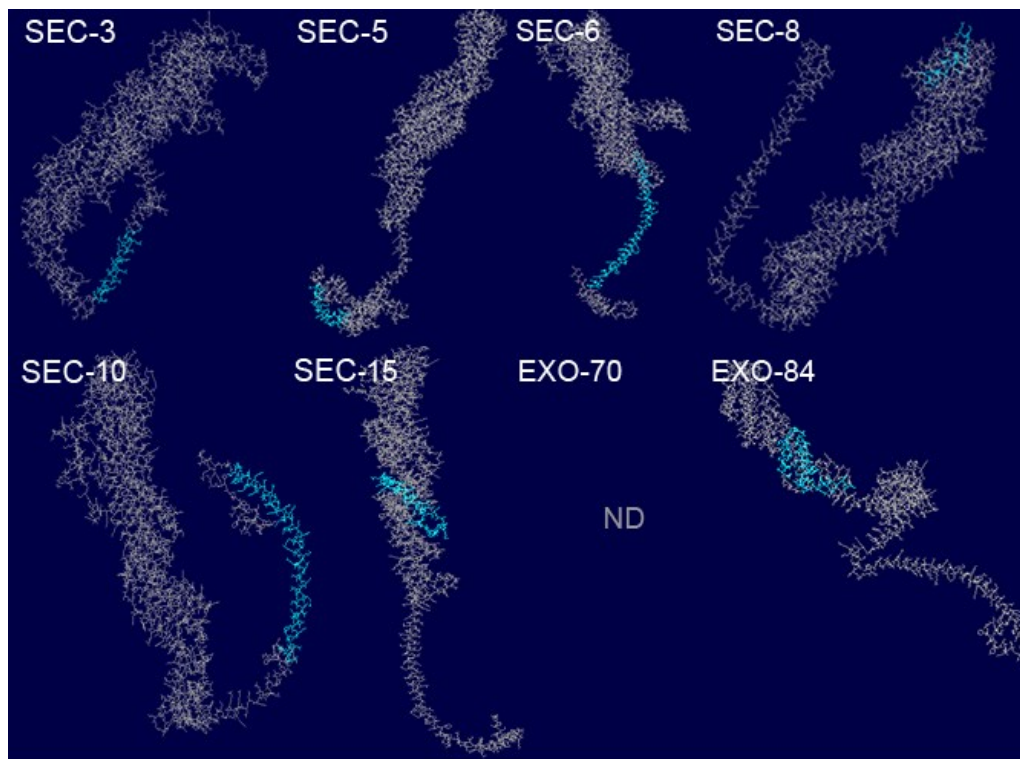


**Figura 15.** Modelo de la estructura tridimensional de las subunidades del exocisto de *N. crassa*. La coloración indica la ubicación desde los extremos N-terminal (Azul) y C-terminal (Rojo).

### 3.1.1 Motivos CorEx en *N. crassa*

Se identificaron los motivos de las subunidades del exocisto de *N. crassa* que potencialmente corresponden al motivo CorEx de *S. cerevisiae* para cada subunidad del exocisto. En este análisis se pudo observar que las proteínas SEC-6, SEC-15 y EXO-84 no tienen la ubicación del motivo CorEx en la cola N-terminal como es descrito en *S. cerevisiae*. Sin embargo, las subunidades SEC-3, SEC-5, SEC-8 y SEC-10 conservaron el motivo en la cola N-terminal de la proteína. El motivo detectado por BLAST abarcó la segunda mitad de la cola N-terminal de SEC-3 y en SEC-5 abarcó solamente un segmento del extremo N-terminal. La secuencia detectada en SEC-6 se ubicó en la región del extremo C-terminal de la proteína mientras SEC-8 conservó su motivo CorEx a lo largo de la cola N-terminal de la proteína. En el caso de SEC-10, la secuencia detectada como CorEx abarcó casi toda la cola N-terminal como en *S. cerevisiae* y en SEC-15, la secuencia se ubica en la mitad de la estructura de la proteína en uno de sus hélices. En EXO-70 no

fue posible encontrar el motivo mediante BLAST, mientras tanto la secuencia identificada en EXO-84 fue ubicada cercano al extremo C-terminal de la proteína (Figura 16).

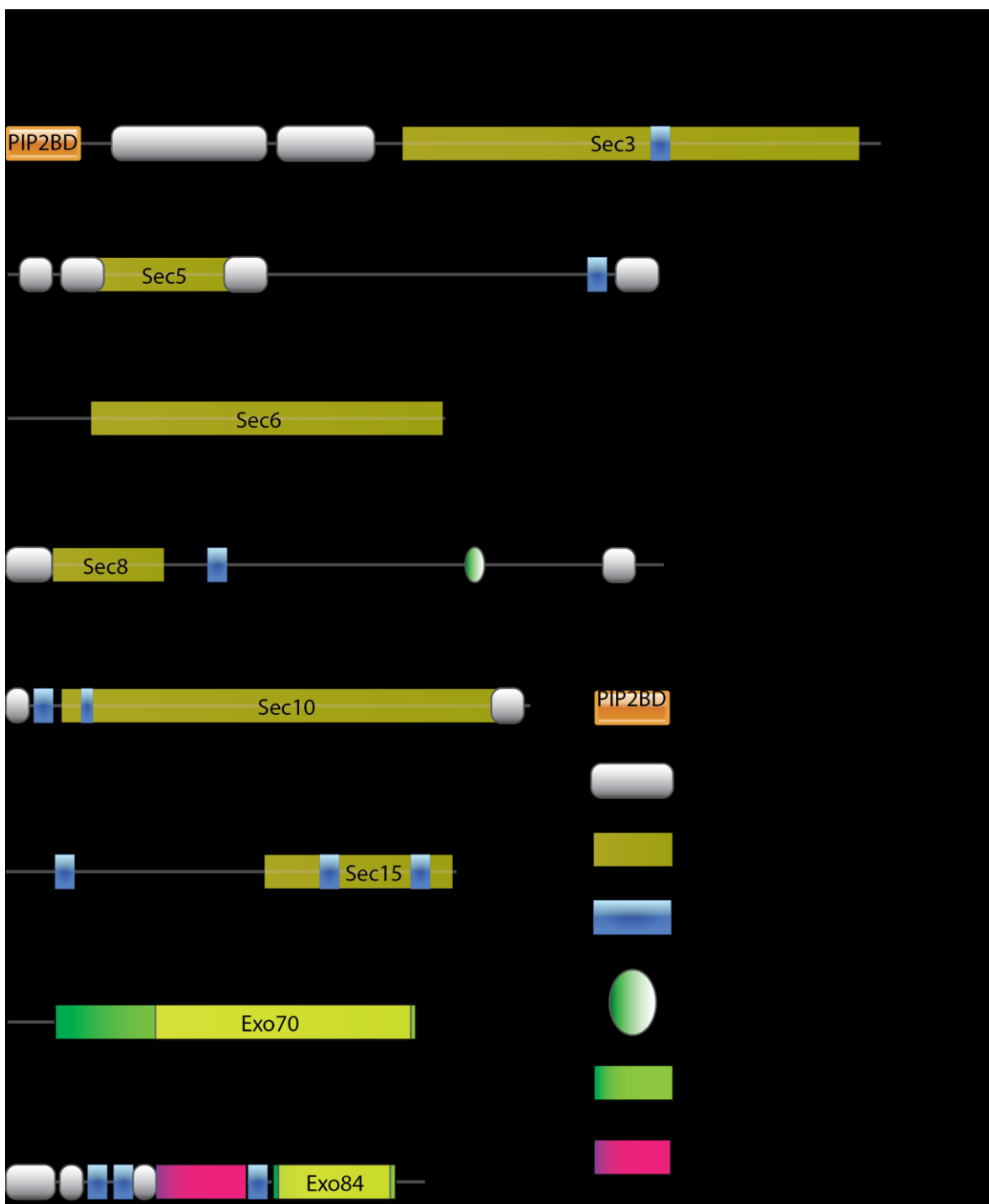


**Figura 16.** Modelo tridimensional de SEC-3, SEC-5, SEC-6, SEC-8, SEC-10, SEC-15, EXO-70 y EXO-84 con sus respectivas secuencias identificadas como homólogas a los motivos CorEx de *S. cerevisiae*. Los paneles azules muestran el modelo tridimensional de cada proteína y los motivos CorEx putativos se muestran en coloración azul cielo.

### 3.1.2 Dominios detectados en las subunidades

Se analizaron las secuencias de las subunidades en los servidores mencionados en la sección 2.2.3 y se diseñó un modelo representativo de los dominios de las subunidades del exocisto (Figura 17). En SEC-3 se detectó un dominio en el extremo N-terminal que se ha encontrado en las proteínas Sec3 de hongos y eucariotas. Este dominio del extremo N-terminal contiene un doblez de homología de pleckstrina (PH) críptica, y se conservan todas las lisinas y argininas cargadas positivamente en este dominio que se predice que tiene unión a la cabeza fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) (Bendezu et al., 2012). SEC-3 tiene dos dominios desorganizados cercano al extremo N-terminal, uno de más de 200 residuos y otro de casi 100 residuos. También, se detectó un dominio de hélice súper enrollada dentro del dominio Sec3. En SEC-5 se detectó un dominio de hélice súper enrollada y 4 dominios desordenados, dos en cada extremo de la proteína y otros dos en el extremo del dominio Sec5. En el caso de SEC-6 no se pudo detectar algún

dominio, excepto el dominio conservado del exocisto Sec6 que se encuentra en el extremo C-terminal. SEC-8 tiene un dominio desordenado en el extremo N-terminal y uno cercano al extremo C-terminal. Se encontró un dominio Sec8 de 200 residuos en la secuencia, un dominio hélice súper enrollada en la posición 400 y una mano EF en la posición 800 de la secuencia. La mano EF encontrada en SEC-8 es un dominio de unión a calcio y consiste en un bucle de doce residuos flanqueado en ambos lados por un dominio  $\alpha$ -helicoidal de doce residuos. Muchas proteínas de unión a calcio pertenecen a la misma familia evolutiva y comparten un dominio de unión a calcio que se conoce como la mano EF. La unidad estructural y funcional básica de las proteínas de la mano EF suele ser un par de motivos de la mano EF que juntas forman un dominio estable conformado de un haz de cuatro hélices. El emparejamiento de la mano EF permite la unión de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Kawasaki & Kretsinger, 1994; Moncrief et al., 1990; Heizmann & Hunziker, 1991). En SEC-10 se encontraron dos dominios desordenados en cada extremo de la secuencia y dos dominios hélice súper enrollada uno de ellos ubicado dentro del dominio Sec10. Cabe destacar que al comparar todos los dominios del exocisto en sus respectivas subunidades, el dominio Sec10 abarca casi toda la proteína SEC-10. En SEC-15 el dominio Sec15 se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína que contiene dos hélices súper enrolladas y una tercera hélice en la posición 100 de la secuencia. EXO-70 tiene su dominio Exo70 en el extremo C-terminal de la secuencia y tiene un dominio 'repeat-like' de culina de 500 residuos que abarca casi toda la secuencia incluyendo la región del dominio Exo70. Este dominio corresponde a una familia que contiene repeticiones del dominio culina. Las culininas son una familia de proteínas hidrofóbicas que actúan como andamios para ubiquitina ligasas (E3) (Kipreos et al., 1996). Estas repeticiones de culina forman un dominio con una estructura multi-helicoidal de 2 capas alfa / alfa, que a su vez se pliega en un superhélice (Goldenberg et al., 2004). En la secuencia de EXO-84 se detectó el dominio 'repeat-like' de culina que abarca casi 200 residuos que incluyen el dominio conservado Exo84 dentro de esta región. EXO-84 contiene un dominio desordenado en su extremo N-terminal seguido por otro dominio desordenado, dos hélices súper enrolladas, un dominio desordenado en el margen del dominio 'PH-like' y una hélice súper enrollada justo después del dominio 'PH-like'. El dominio 'PH-like' se refiere a los dominios con homología a pleckstrina (PH). Estos dominios PH son pequeños dominios modulares que ocurren en una variedad de proteínas de señalización y funcionan como blancos para la unión con lípidos (Cozier et al., 2004; Lemmon, 2003; Gallego et al., 2010). Los dominios PH tienen una topología de barril-beta parcialmente abierta que está limitada por una hélice alfa. La estructura de los dominios PH son similares a los dominios de unión a fosfotirosina (PTB) encontrados en los sustratos de receptores de insulina (IRS) (Eck et al., 1996).

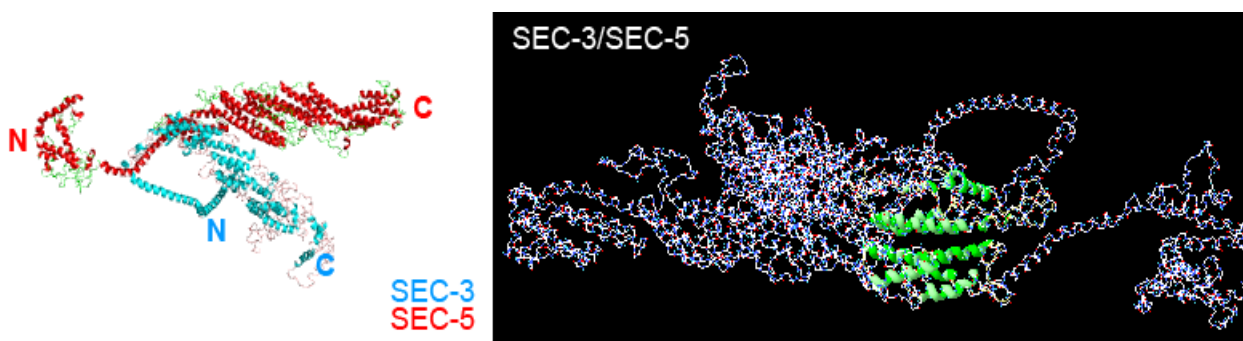


**Figura 17.** Componentes del exocisto de *N. crassa*. Los dominios del exocisto denominados Sec o Exo, el dominio de unión Sec3-PIP2 y las hélices superenrolladas fueron identificados en UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Las superfamilias de los dominios 'repeat-like' de culina y el dominio 'PH-like' se encontraron utilizando el servidor InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). La mano EF de unión a calcio fue detectado en ScanProsite (<https://prosite.expasy.org>).

### 3.1.3 Acoplamiento molecular entre las subunidades

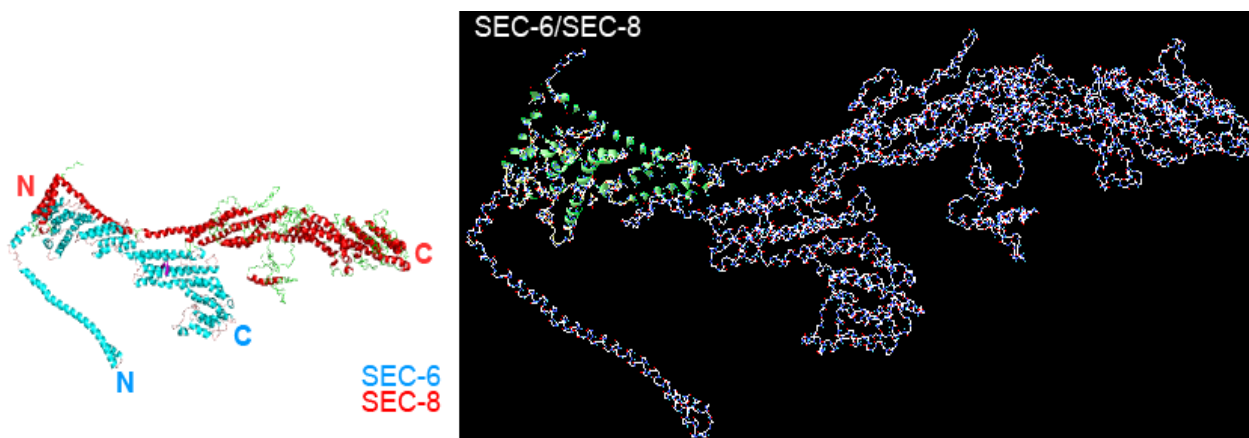
Los resultados del acoplamiento molecular descrito en la sección 2.2.4 arrojaron un gran número de modelos que iban desde 10-30 modelos por cada acoplamiento. Se seleccionaron los primeros 5 modelos con mayor puntuación y se ordenaron por su favorecimiento hidrofóbico, ya que el complejo del exocisto tiene interacciones putativas con las membranas. De esta lista de modelos se seleccionó el primer modelo con estas características mencionadas. Cabe destacar que los primeros 5 modelos seleccionados no variaban mucho en cuanto a su sitio de acoplamiento o de orientación de las proteínas. También, es importante mencionar que de ninguna manera se debería de tomar estos resultados como la realidad ya que esto corresponde a una simulación de acoplamiento entre estructuras generadas por homología que, hipotéticamente, están acoplándose de una manera similar a las subunidades estudiadas en *S. cerevisiae*. Sin embargo, estas aproximaciones pueden dar información sobre las posibles conformaciones que toman las subunidades al estar en contacto el uno con el otro.

En el acoplamiento entre las subunidades SEC-3 y SEC-5 se pudo visualizar que ambas proteínas se orientaron de la misma manera con sus C- y N-terminal orientados hacia el mismo lado con un ángulo de aproximadamente 45° entre los dos extremos C-terminal. Para tener una mejor idea de dónde ocurrió el acoplamiento entre estas subunidades se visualizó este acoplamiento en DeepView, que señala solamente las regiones en las que hay contacto. En esta visualización se observó que el acoplamiento sucede entre las hélices que conforman la primera sección N-terminal que corresponde a la sección en forma de bastón de la estructura de ambas proteínas. En ambos casos esta sección está compuesta de 4 hélices empaquetados que forman la estructura de bastón o bastiforme característica de las subunidades de exocisto (Figura 18).



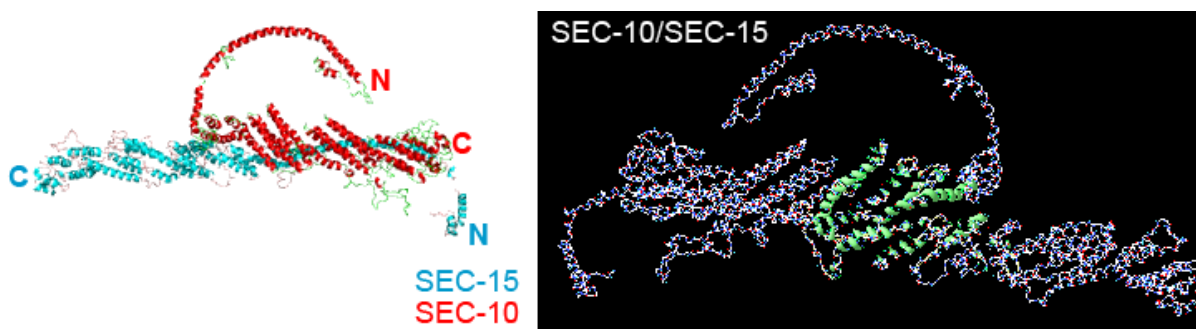
**Figura 18.** Acoplamiento molecular entre SEC-3 y SEC-5 simulado en el servidor ClusPro. En el panel izquierdo el color indica a que subunidad corresponde cada estructura y las letras N y C corresponden a los extremos N- y C-terminal. El panel derecho muestra la visualización del acoplamiento entre la proteína SEC-3 y SEC-5 en DeepView.

Este mismo procedimiento se aplicó para todas las subunidades y en el acoplamiento entre las subunidades SEC-6 y SEC-8 se observó que al igual que las subunidades SEC-3 y SEC-5 sus extremos C- y N-terminal están orientados hacia el mismo lado respecto a sus estructuras generales. Sin embargo, se observó que el acoplamiento ocurrió entre la sección de la hélice del extremo más N-terminal de la proteína SEC-8 y la sección de hélices empaquetadas más N-terminal de la región bastiforme de SEC-6 justo antes de que inicie la cola N-terminal de la misma (Figura 19).



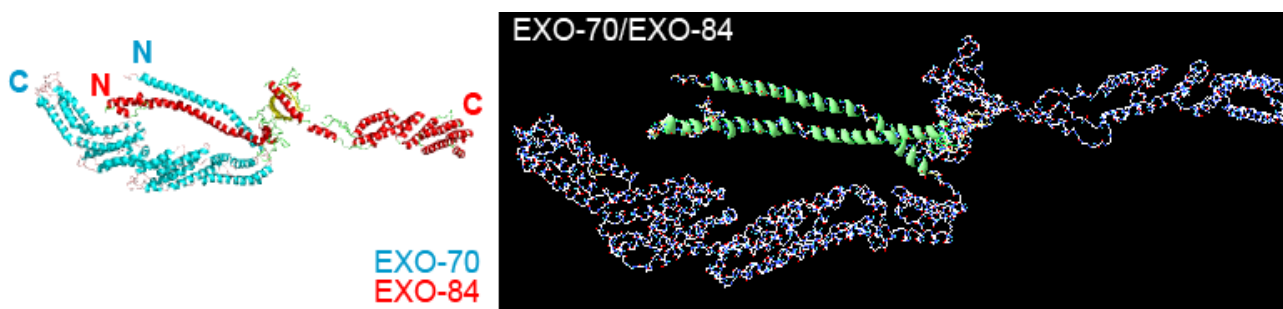
**Figura 19.** Acoplamiento molecular entre SEC-6 y SEC-8 simulado en el servidor ClusPro. El panel izquierdo muestra el modelo generado por el servidor ClusPro. El panel derecho muestra la visualización del acoplamiento entre la proteína SEC-6 y SEC-8 en DeepView.

A diferencia de los acoplamientos SEC-3/SEC-5 y SEC-6/SEC-8, el acoplamiento entre SEC-10 y SEC-15 nos reveló que la orientación de estas dos subunidades está invertida respecto así mismas. Es decir, el extremo C-terminal de SEC-10 está orientado hacia el mismo lado que el extremo N-terminal de SEC-15. Al observar en DeepView las regiones donde ocurre el acoplamiento entre SEC-10 y SEC-15 se pudo apreciar que, a pesar de parecer que ocurre en toda la sección bastiforme de SEC-10 y en toda la cola N-terminal de SEC-15, el acoplamiento solamente sucede en el extremo más N-terminal de la sección bastiforme de SEC-10 y de SEC-15 (Figura 20). Este mismo tipo de acoplamiento ocurrió en SEC-3/SEC-6 pero en este caso la proteína SEC-10 está invertida.



**Figura 20.** Acoplamiento molecular entre SEC-10 y SEC-15 simulado en el servidor ClusPro. El panel izquierdo muestra el modelo generado por el servidor ClusPro. El panel derecho muestra la visualización del acoplamiento entre la proteína SEC-10 y SEC-15 en DeepView.

Por otro lado, se revisó el resultado del acoplamiento entre las proteínas EXO-70 y EXO-84, y se pudo apreciar que a diferencia del resto de los pares del exocisto el acoplamiento ocurrió en las colas N-terminal de ambas proteínas. El acoplamiento ocurrió a lo largo de estas colas N-terminal que corresponden a los motivos CorEx, tal como que se ha observado en *S. cerevisiae*. Sin embargo, sus extremos C-terminal se orientaron en sentidos opuestos, mientras que sus extremos N-terminal se orientaron hacia el mismo lado. Al observar estas regiones en DeepView se pudo apreciar exactamente en qué sección de las regiones N-terminal ocurrió el acoplamiento (Figura 21).

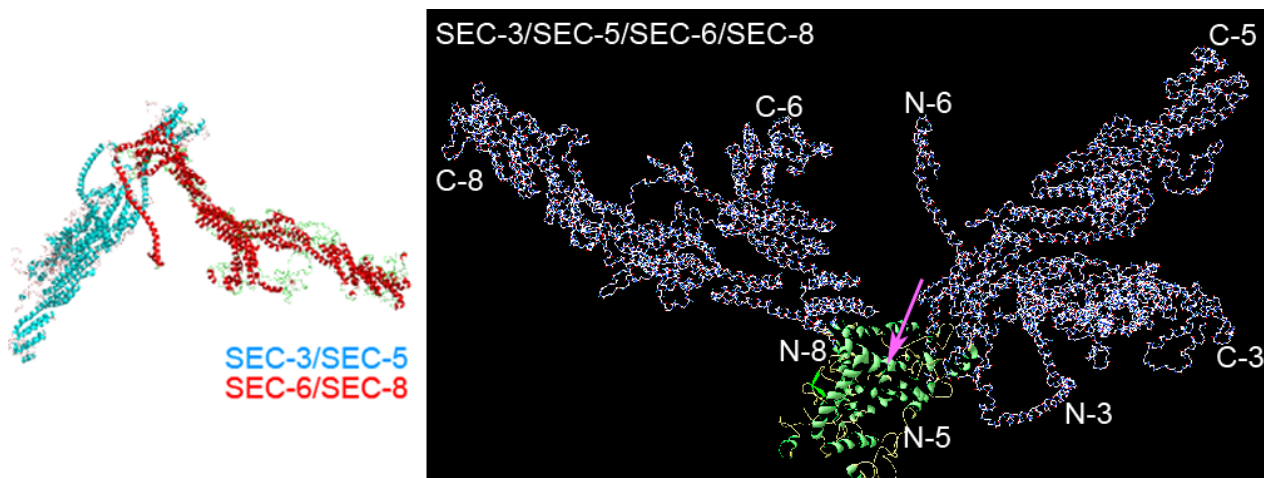


**Figura 21.** Acoplamiento molecular entre EXO-70 y EXO-84 simulado en el servidor ClusPro. El panel izquierdo muestra el modelo generado por el servidor ClusPro. El panel derecho muestra la visualización del acoplamiento entre la proteína EXO-70 y EXO-84 en DeepView.

Los dos heterodímeros SEC-3/SEC-5 y SEC-6/SEC-8 se acoplaron en el servidor ClusPro usando los resultados. PDB del acoplamiento entre los heterodímeros iniciales. El extremo del heterodímero SEC-

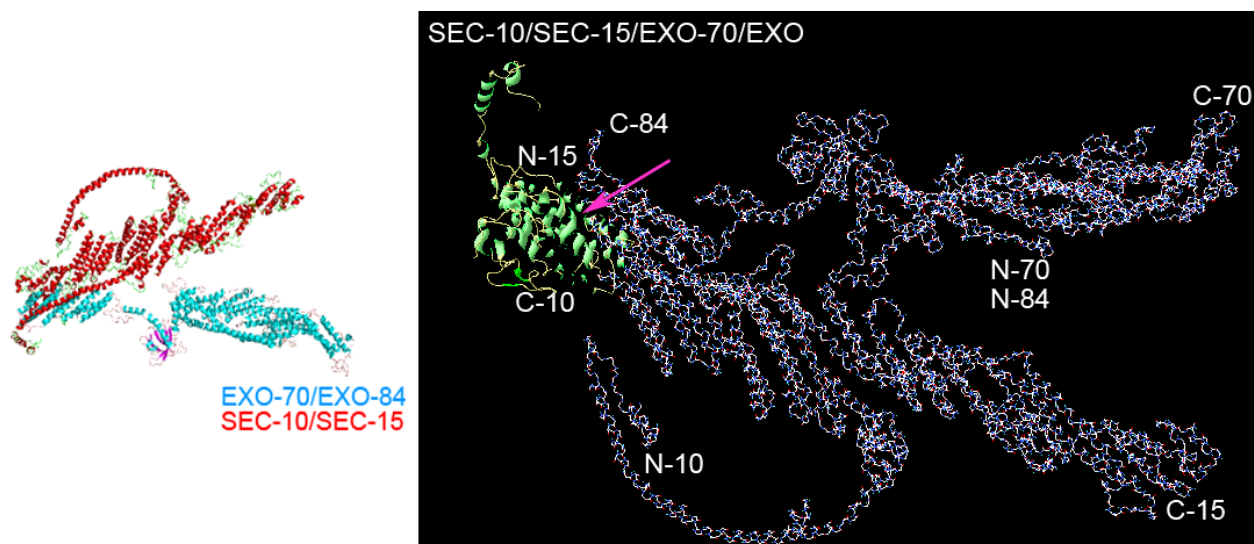


6/SEC-8 se acopla con el otro heterodímero mediante el haz de hélices del extremo N-terminal de SEC-6 y la cola N-terminal de SEC-8. El extremo del heterodímero SEC-3/SEC-5 que se acopló corresponde al haz de hélices del extremo N-terminal de SEC-3 y la cola N-terminal de SEC-5. En conjunto los sitios de acoplamiento fueron los extremos N-terminal de SEC-5 y SEC-8 y el haz de hélices N-terminal de SEC-3 (Figura 22).



**Figura 22.** Acoplamiento molecular entre los heterodímeros SEC-3/SEC-5 y SEC-6/SEC-8 simulado en el servidor ClusPro. La flecha magenta muestra la región donde se acoplan los heterodímeros SEC-3/SEC-5 y SEC-6/SEC-8. Las letras C y N representan el extremo C-terminal y N-terminal, respectivamente. Los números hacen referencia al número del componente del exocisto.

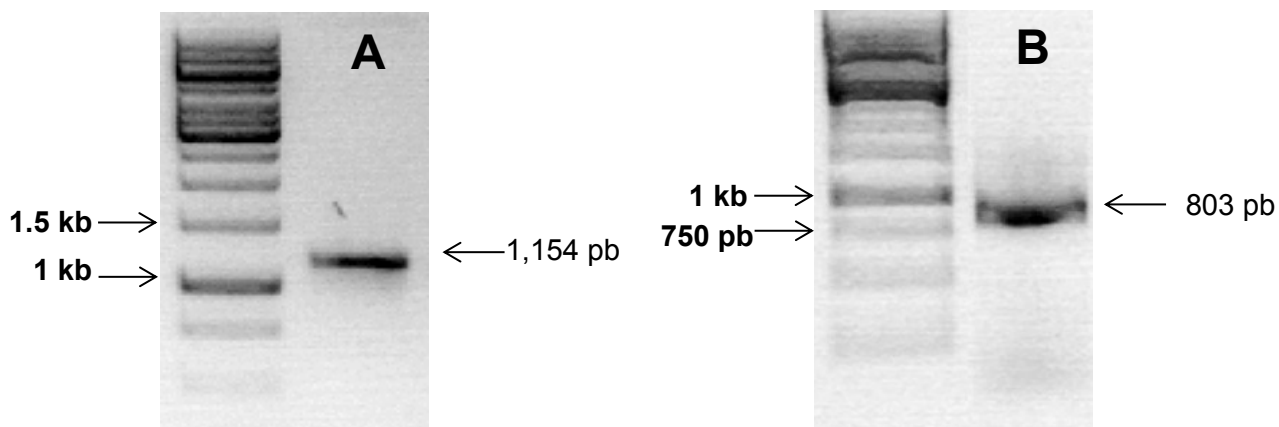
Al igual que el acoplamiento SEC-3/SEC-5/SEC-6/SEC-8, el acoplamiento molecular entre los heterodímeros SEC-10/SEC-15 y EXO-70/EXO-84 ocurrió entre unas regiones de hélices de ambas estructuras. El extremo del heterodímero SEC-10/SEC-15 se acopló con el otro heterodímero mediante el haz de hélices C-terminal de SEC-10 y el extremo N-terminal de SEC-15. En el caso del heterodímero EXO-70/EXO-84 el acoplamiento ocurrió mediante el haz de hélice del extremo C-terminal de EXO-84. Cabe destacar que el haz de hélices C-terminal de EXO-84 se acopló con el haz de las hélice del extremo C-terminal de SEC-10, mientras que la hélice N-terminal de SEC-15 se acopló en otra región del haz de las hélices del extremo C-terminal de EXO-84 (Figura 23).



**Figura 23.** Acoplamiento molecular entre los heterodímeros SEC-10/SEC-15 y EXO-70/EXO-84 simulado en el servidor ClusPro. La flecha magenta muestra la región donde se acoplan los heterodímeros SEC-10/SEC-15 y EXO-70/EXO-84.

### 3.2 Elucidar el papel que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el ensamblaje del complejo

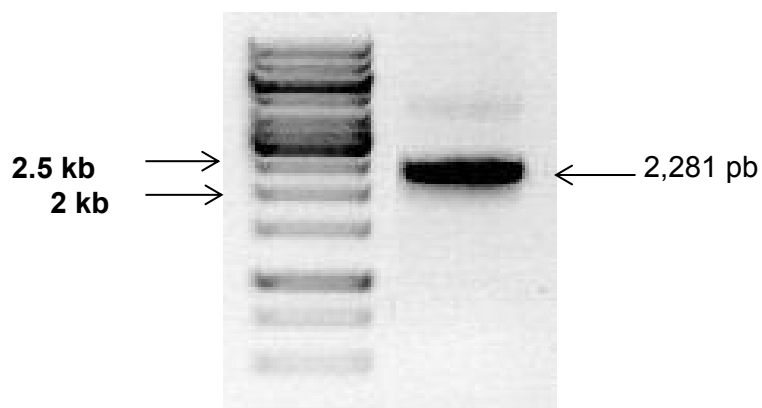
Para la eliminación del gen *sec-10* se amplificaron los fragmentos de ADN requeridos a partir del ADN genómico de *N. crassa* como es descrito en la sección 2.8 (Figura 11). Se lograron amplificar los fragmentos necesarios para construir los brazos 'knock out' utilizados en la técnica de reemplazo de gen que usa los oligonucleótidos 720 y 721 para el fragmento A y los oligos 422 y 423 para el fragmento B (Figura 24).



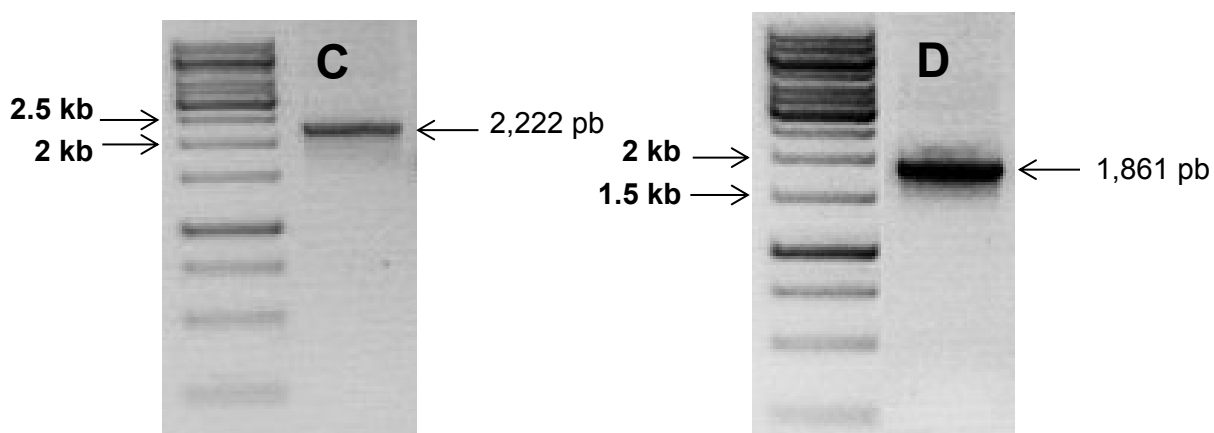
**Figura 24.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR utilizados para la construcción de los fragmentos 'knock out' (ver figura 11). A) Amplicón UTR-5' de 1,154 pb. B) Amplicón loxP-UTR-3' de 803 pb.

### 3.2.1 Productos de la PCR de fusión para el reemplazo de *sec-10*

Para fusionar los amplicones iniciales al gen *hph* se amplificó un fragmento del vector VMRP-48 que contiene *gfp::loxP::hph::loxP* por medio del uso de los oligonucleótidos 298 y 299 (Tabla 3; Figura 25). Se utilizaron los oligonucleótidos 720 y 261 (*hph* SM-R) para amplificar el brazo izquierdo C al usar el amplicón A de la sección anterior y el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* y los oligonucleótidos 260 (*hph* SM-F) y 423 para el brazo derecho a través del uso del producto B de la sección anterior y el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* (Figura 11).



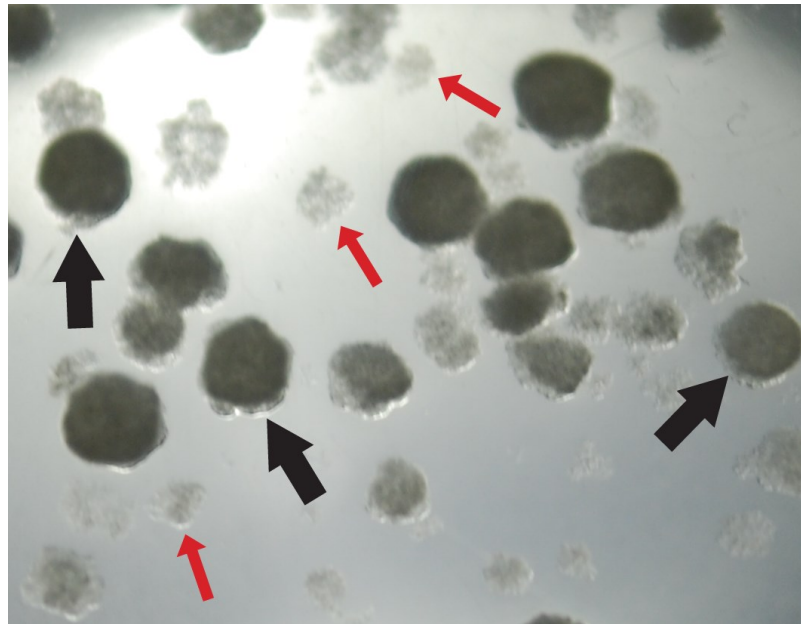
**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR que contiene el cassette de resistencia a higromicina. El producto corresponde al amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* de 2,281 pb.



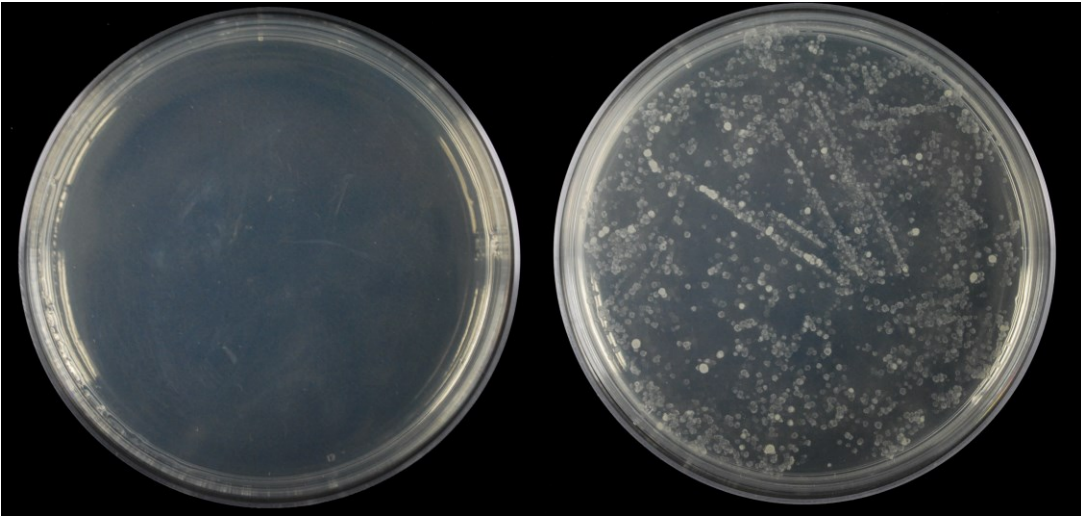
**Figura 26.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la PCR de fusión. C) El producto fusionado UTR-5'-*hph* de 2,222 pb. D) Amplicón *hph-loxP-UTR-3'* de 1,861 pb.

### 3.2.2 Análisis de la mutante $\Delta sec-10$

Se transformaron conidios de la cepa FGSC#9718 con los productos de la PCR de fusión mediante electroporación. De los 125 millones de conidios utilizados en la transformación, solamente crecieron 5 colonias resistentes a higromicina, de las cuales 2 de ellas presentaron un crecimiento más lento y poca conidiación. La cepa que parecía estar más afectada tanto en crecimiento como conidiación se cultivó para obtener microconidios, tal como se describe en la sección 2.7. Los microconidios se diferencian de los macroconidios por el tamaño de colonia, los microconidios dan lugar a colonias pequeñas y los macroconidios a colonias más grandes (Figura 27). La suspensión de microconidios se sembró en dos cajas una con medio FGS con solución FGS y otra caja con FGS, solución FGS e higromicina (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En las cajas que fueron preparadas con higromicina no creció ninguna colonia de microconidios mientras tanto en la caja que fue preparada sin higromicina creció un exceso de colonias de microconidios (Figura 28).

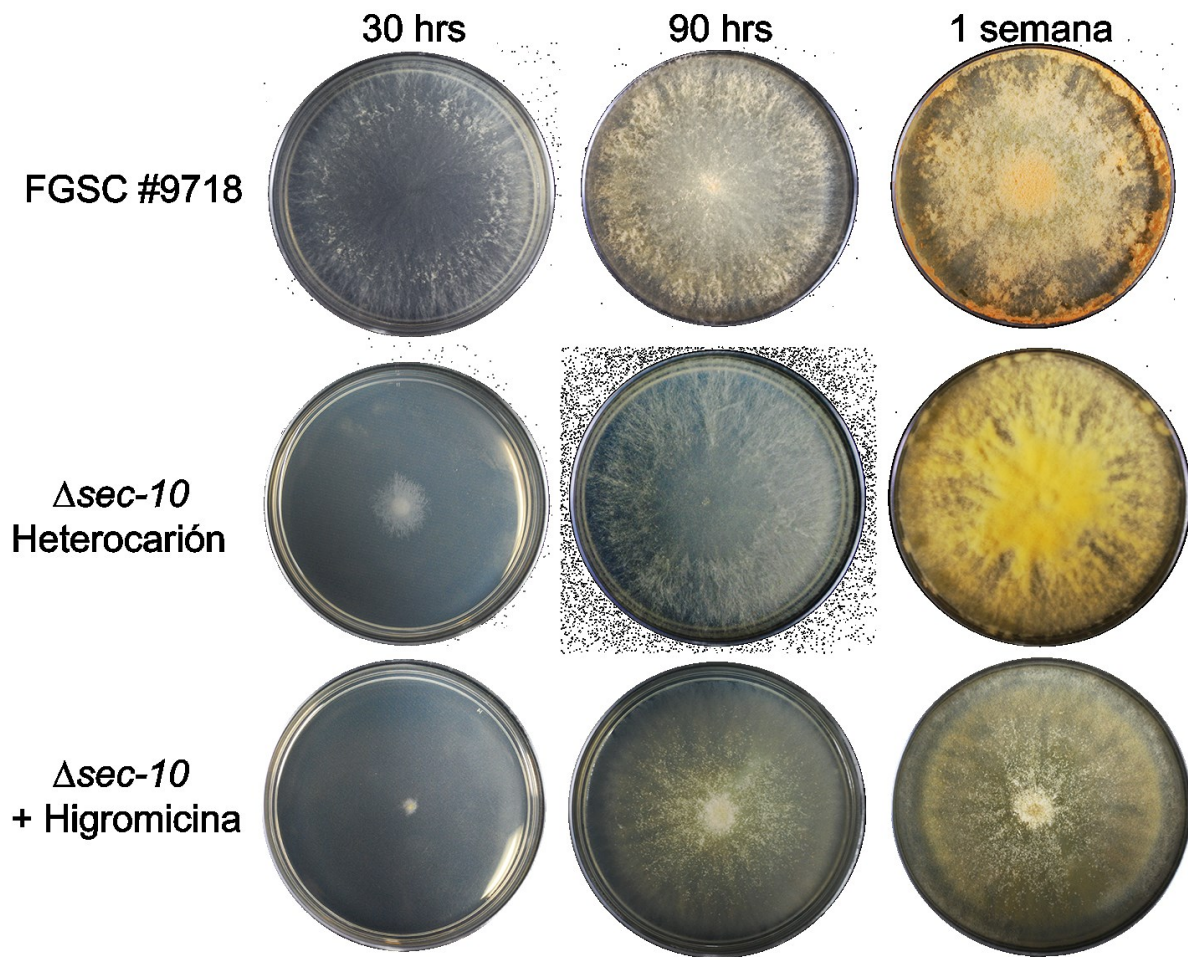


**Figura 27.** Colonias provenientes de macroconidios y microconidios cultivados en medio FGS con solución FGS. Flechas negras muestran las colonias que crecieron a partir de macroconidios y las flechas rojas muestran colonias que crecieron de microconidios.



**Figura 28.** Cajas de Petri preparadas con FGS agar y sembradas con una suspensión de microconidios de la cepa  $\Delta sec-10$ . La caja de la izquierda corresponde al medio preparado con higromicina y la caja de la derecha corresponde al medio preparado sin higromicina. Ambas cajas fueron inoculadas con 50  $\mu$ l de la misma suspensión de microconidios.

A pesar de que no se pudo obtener esta cepa mutante en estado homocarión se comparó el fenotipo de la cepa mutante en estado heterocarión con la cepa FGSC #9718 (SMRP25). La mutante  $\Delta sec-10$  en estado heterocarión presentó un fenotipo distinto a la cepa parental (SMRP25). La colonia de  $\Delta sec-10$  creció más lento y tardó más en producir macroconidios. Esta cepa mutante no formaba grandes cúmulos de conidios como lo hace normalmente *N. crassa* y al madurar, la superficie de la colonia tiene un aspecto algodonoso de color amarillento. La producción de conidios es mínima en la mutante  $\Delta sec-10$  en estado heterocarión como se puede apreciar en la Figura 29. Se cuantificó la cantidad de conidios que produce esta mutante y se observó que la cepa tiene una disminución del 99% en la producción de conidios. En el conteo de conidios se vio que 95% de los conidios son microconidios y el resto son macroconidios. La eliminación del gen *sec-10* tiene efectos severos en el desarrollo de *N. crassa*. La disminución en el crecimiento y en la producción de conidios en la mutante es evidencia de la importancia que tiene *sec-10* en el desarrollo.



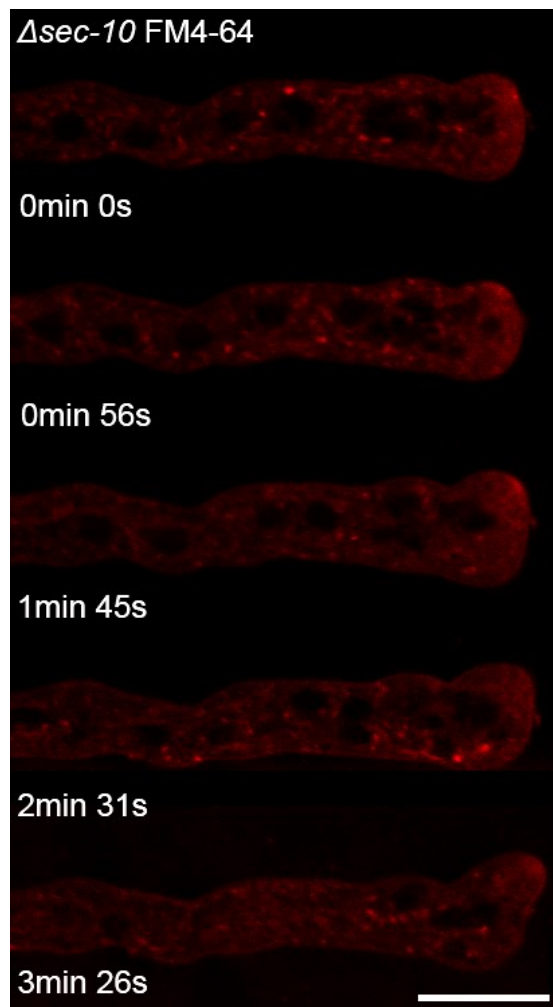
**Figura 29.** Comparación del desarrollo de las colonias FGSC #9718 (SMRP25) y  $\Delta sec-10$  en el tiempo. Las cajas con MMV fueron incubadas a 30 °C y se tomaron fotografías a 1, 4 y 7 días.

La cepa  $\Delta sec-10$  tiene defectos en la formación de hifas aéreas, tal como se puede ver en el ensayo de crecimiento en tubos de cultivo. La cepa parental SMRP25 produjo conidios hasta la parte más alta del tubo, mientras que la cepa  $\Delta sec-10$  creció solamente en la superficie del agar con una escasa producción de conidios (Figura 30).



**Figura 30.** Comparación del crecimiento de hifas aéreas entre la cepa parental y  $\Delta sec-10$  en tubos con medio inclinado. Las fotografías fueron tomadas una semana después de inoculación.

La mutante  $\Delta sec-10$  se observó bajo el microscopio confocal mediante el uso del marcador de endomembranas FM4-64. En el microscopio se pudo apreciar con mayor detalle las malformaciones que pueden tener las hifas de esta mutante. Las hifas crecían lentamente, tenían irregularidades a lo largo de la célula y en muchos casos, se presentaba un hinchamiento en las puntas. Se observó que la dirección de crecimiento es muy cambiante y en momentos se perdía de enfoque el Spk. El colorante FM4-64 fue internalizado y después de 3 minutos aún se veía teñida la membrana plasmática. Se pudieron observar varios puntos fluorescentes a lo largo de la hifa (Figura 31).



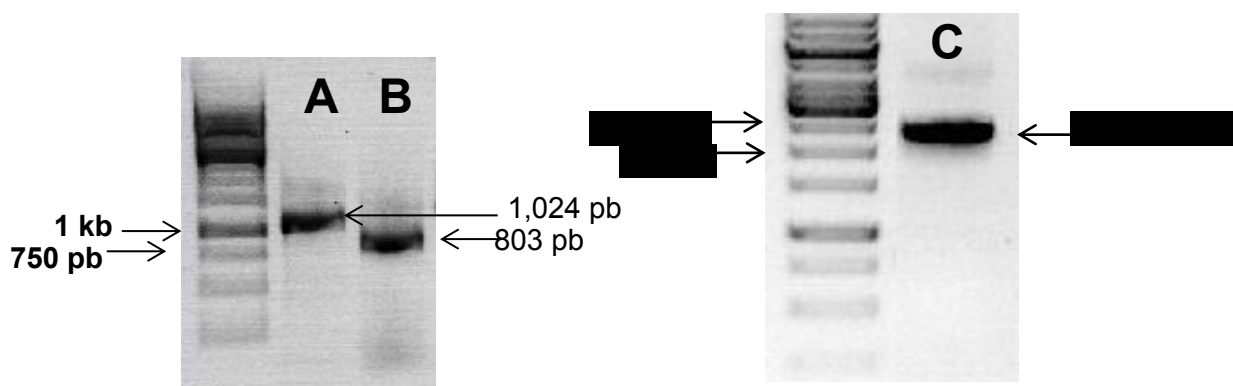
**Figura 31.** Serie de tiempo de LSCM de la mutante de *N. crassa*  $\Delta sec-10$  en estado heterocarión teñida con FM4-4. La microscopía muestra la morfología de una hifa afectada y organización vesicular del ápice revelada por la tinción FM4-64 en una serie de tiempo. Barra de escala = 10  $\mu$ m

Posteriormente se realizó un ensayo de tasa de crecimiento al comparar todas las cepas que abarcan los primeros dos objetivos del proyecto. En este ensayo se observó que la cepa  $\Delta sec-10$  tiene una disminución del 62% en la tasa de crecimiento respecto a la cepa parental (Figura 43). A pesar que esta cepa es heterocarión, esta tiene una gran disminución en la tasa de crecimiento, lo que confirma la importancia de la proteína SEC-10 para la exocitosis de vesículas y posiblemente para la función del excisto.



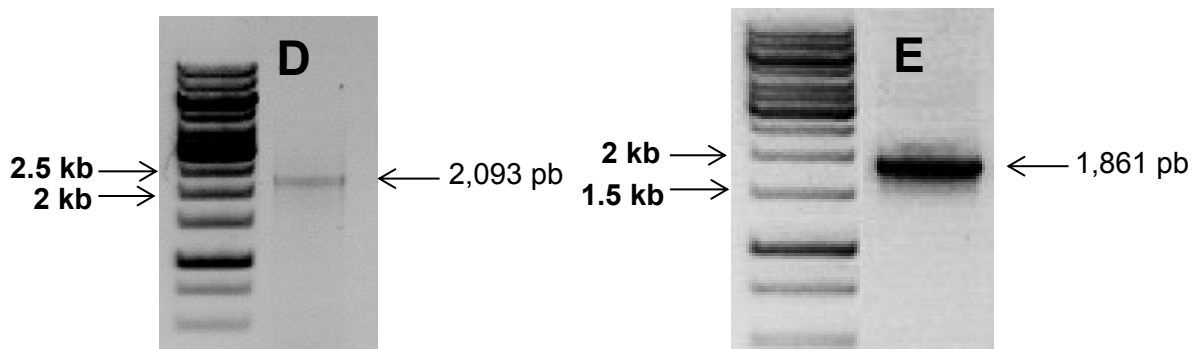
### 3.2.3 Amplificación de fragmentos de ADN para la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup>

Para producir la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> se amplificaron dos fragmentos iniciales a partir del ADN genómico de *N. crassa* tal como se describe en la sección 2.9 (Figura 11). Se amplificó el fragmento A utilizando los oligonucleótidos 421 y 726 en una PCR y los oligos 422 y 423 para amplificar el fragmento B (Figura 32AB).



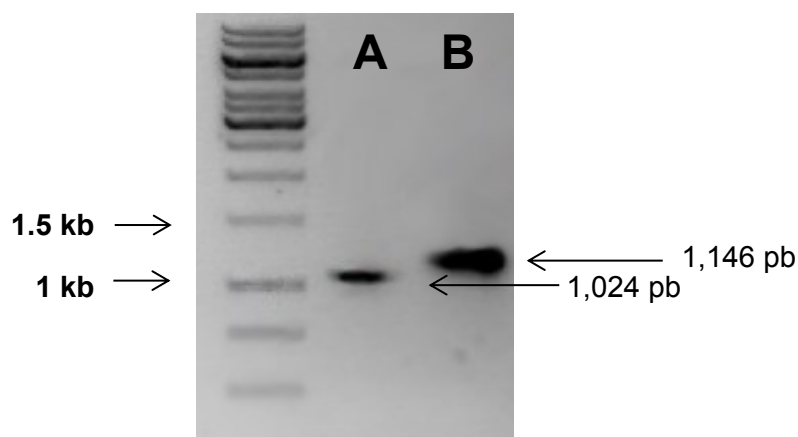
**Figura 32.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup>. A) Ampliación ORF-120nt de 1,024 pb. B) Ampliación loxP-UTR-3' de 803 pb. C) Ampliación *gfp::loxP::hph::loxP* de 2,281 pb.

Se utilizaron los fragmentos iniciales de la sección anterior para fusionarlas a fracciones del gen *hph*. Se utilizó el amplicón A de la sección anterior y el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* (Figura 32C) como plantillas para su fusión, por medio del uso de los oligonucleótidos 421 y 260 (Figura 33D). Se obtuvo el amplicón E *hph*-UTR-3' como resultado de la fusión del amplicón B y C al utilizar los oligonucleótidos 261 y 423 (Figura 33E).



**Figura 33.** Electroforesis en gels de agarosa de los productos de PCR de fusión para generar la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup>. D) Ampliación ORF-120nt-*hph* de 2,093 pb. E) Ampliación *hph*-UTR-3' de 1,861 pb.

La transformación con el cassette que carece de 120 nucleótidos del marco de lectura de *sec-10* resultó en 2 transformantes resistentes a higromicina que a simple vista no mostraron algún fenotipo distinto a la parental. Se obtuvieron las cepas en estado homocarión mediante la producción de microconidios descrita en la sección 2.7. Se realizó la comprobación de la eliminación de los últimos 120 nucleótidos del gen al usar oligonucleótidos que amplifican los últimos 1,000 nucleótidos para el ADN de la cepa N1 y la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> mediante el uso de los oligonucleótidos A1-A2 (Figura 11). El amplicón generado con estos oligonucleótidos y el ADN de la cepa N1 produce un amplicón de 1,146 pb, mientras que la reacción con el ADN de la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> dio un amplicón de 1,024 pb, lo que corresponde a 120 pb de diferencia. La electroforesis en gel de agarosa de estas muestras reveló que hay una diferencia de tamaño entre ambos amplicones, lo que sugiere que se han eliminado exitosamente las últimas 120 bases de la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> (Figura 34A-B).



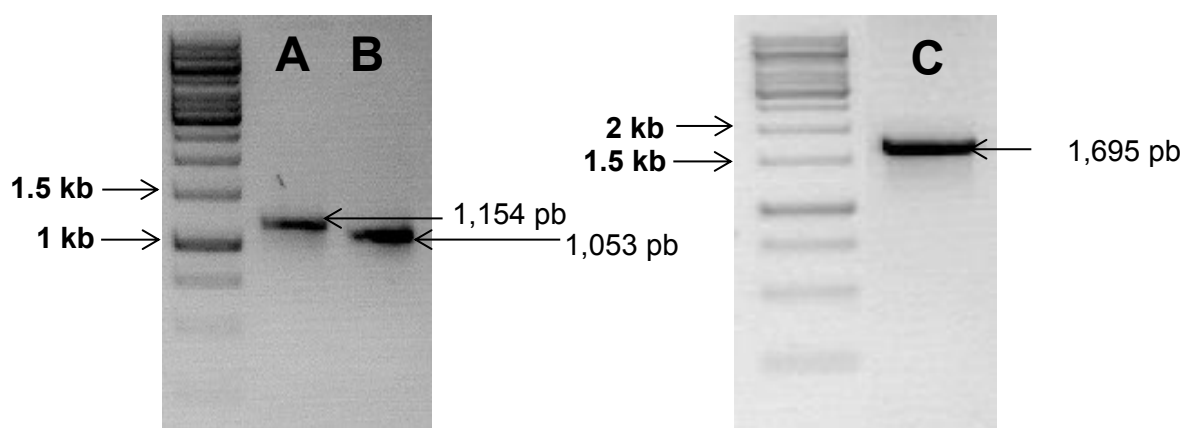
**Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones que corresponden a la última kb del gen *sec-10*. A) Amplicón ORF- *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> de 1,024 D) Amplicón ORF- *sec-10* de 1,146 pb.

Para averiguar si la eliminación de 120 nucleótidos tuvo por consecuencia defectos en el crecimiento se realizó un ensayo de tasa de crecimiento al comparar todas las cepas involucradas en el objetivo 1 y 2. En este ensayo se vio que la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup> en estado homocarión tiene una disminución del 12% en la tasa de crecimiento (Figura 43). Esta disminución estadísticamente significativa sugiere que la eliminación de los últimos 120 nucleótidos de *sec-10* disminuye la eficiencia en la que trabaja el exocisto y por lo tanto apoya la idea que el extremo C-terminal de SEC-10 tiene alguna función importante para la exocitosis. Sin

embargo, al considerar que solamente hubo una reducción del 12% de la tasa de crecimiento no se le puede atribuir con certeza que esa región eliminada es fundamental para la función de SEC-10.

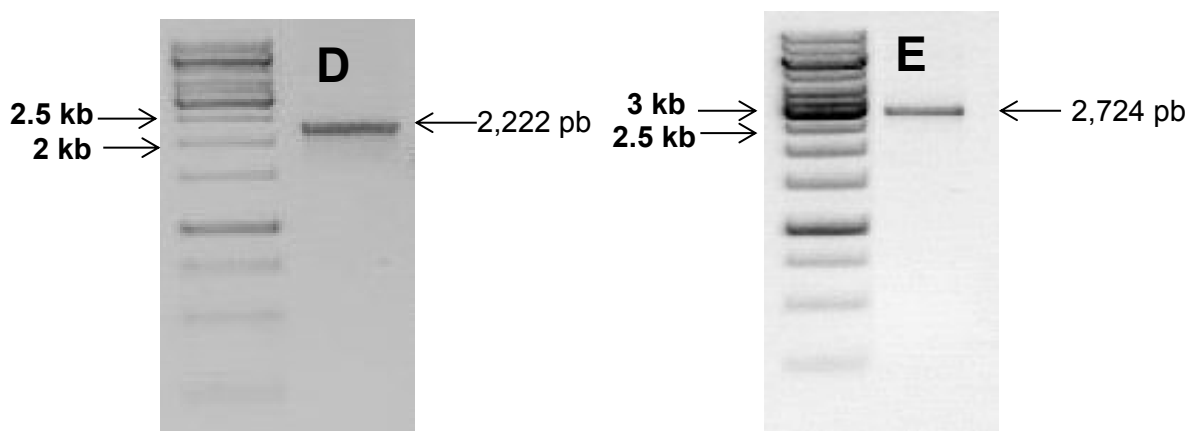
### 3.2.4 Amplificación de fragmentos de ADN para la cepa GFP-SEC-10

Para producir la cepa que expresa GFP en el extremo N-terminal de SEC-10 se amplificó la región 5' no traducida con los oligonucleótidos y el inicio del marco abierto de lectura de *sec-10* como es descrito en la sección 2.10. El amplicón A fue generado a través de los mismos oligonucleótidos mencionados en la sección 3.2, ya que es el mismo amplicón y para amplificar el fragmento B se utilizaron los oligonucleótidos 723 y 724 (35A-B). El cassette *Pccg::gfp* se amplificó con el plásmido VMRP-48 y los oligonucleótidos 722 y 725 (Figura 35C).



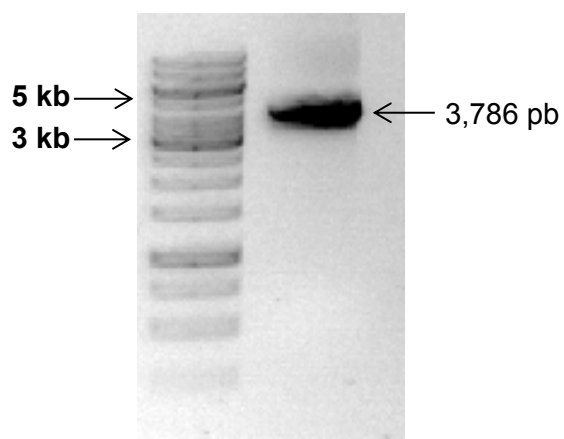
**Figura 35.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa *sec-10*<sup>2523\_2640del</sup>. A) Amplicón UTR 5' de 1,154 pb. B) Amplicón ORF *sec-10* de 1,053 pb. C) Amplicón *Pccg::gfp* de 1,695 pb.

Para amplificar el brazo izquierdo D se utilizó el fragmento A de la sección anterior y el templado *gfp::loxP::hph::loxP* como es descrito en la sección 3.2.1, ya que es el mismo amplicón (Figura 26C). Se fusionaron los fragmentos B y C de la sección anterior para generar el fragmento *Pccg::gfp::sec-10* a través del uso de los oligonucleótidos 722 y 725 (Figura 36E).



**Figura 36.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR para generar la cepa GFP-SEC-10. D) Amplicón UTR-5'-hph de 2,222 pb. E) Amplicón *Pccg::gfp::sec-10* de 2,724 pb.

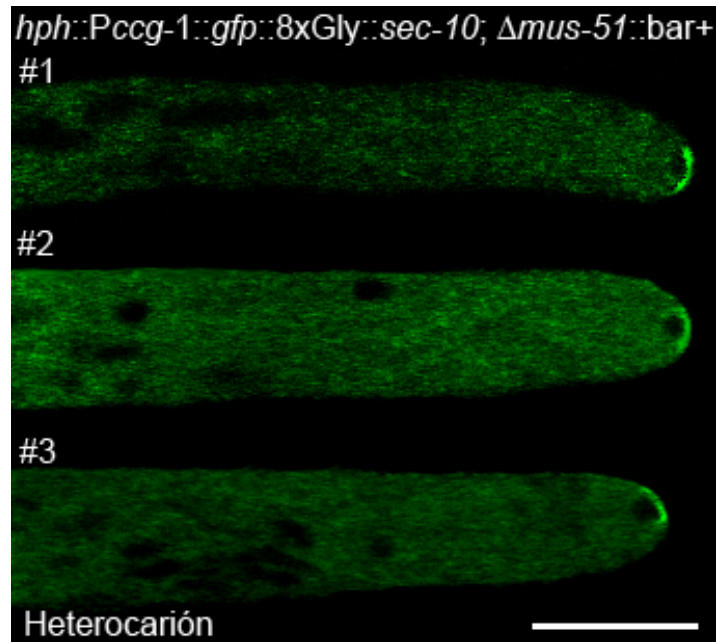
Para generar el brazo derecho de 3,786 pb se usó el amplicón *Pccg::gfp::sec-10* y el fragmento D en una reacción con los oligonucleótidos 261 y 724 (Figura 37). Este producto final se utilizó en conjunto con el amplicón UTR-5' para transformar conidios de *N. crassa* SMRP25.



**Figura 37.** Electroforesis en gel de agarosa del amplicón *hph-Pccg-1::gfp::sec-10* de 3,786 pb. La fusión de *hph-Pccg-1::gfp::sec-10*.

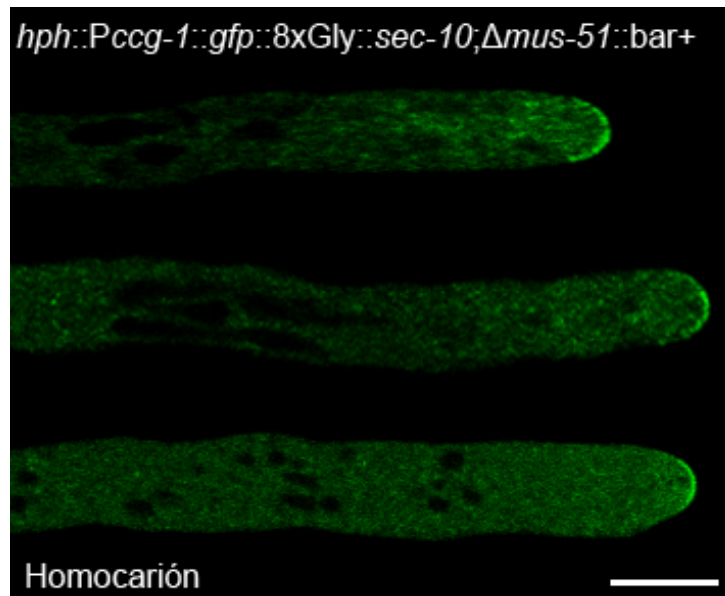
De las 54 transformantes, muchas presentaban fluorescencia, pero no todas tenían una alta intensidad. Por esa razón, se seleccionaron 3 cepas transformantes que tenían mayor señal de fluorescencia. Mediante microscopía confocal por barrido de láser se observó la localización de GFP-SEC-10. La proteína GFP-SEC-10 se localiza principalmente en la membrana plasmática en el centro del domo apical (Figura

38). A diferencia de la cepa que produce la proteína SEC-10-GFP, la cepa mencionada aquí tiene mayor fluorescencia citoplasmática y abarca menos rango del domo apical, parecido a las cepas EXO-70-GFP y EXO-84-GFP. Es importante destacar que la fluorescencia de esta proteína se perdía conforme pasaba el tiempo por foto blanqueamiento. De estas cepas se seleccionó la cepa #1 para obtener sus microconidios y generar una cepa en estado homocarión.



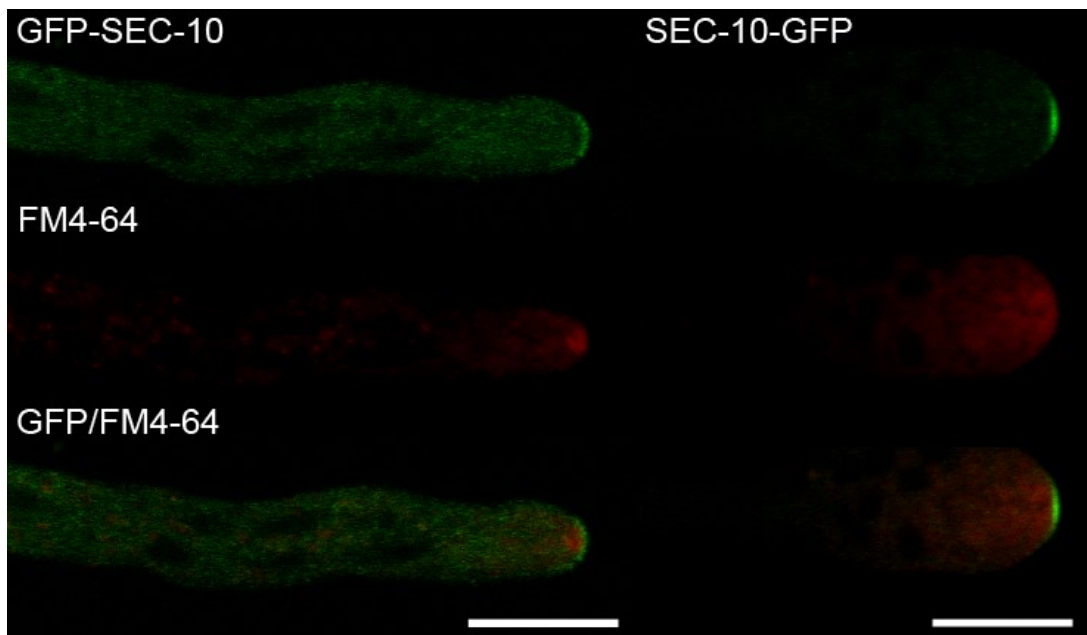
**Figura 38.** LSCM de transformantes en estado heterocarión que expresan GFP-SEC-10 bajo el control del promotor *ccg-1*. Las imágenes muestran la intensidad de fluorescencia observada en la punta de las hifas de las cepas GFP-SEC-10 #1,2 y 3.. Barra de escala = 10  $\mu$ m

En estado homocarión la cepa #1 expresó la proteína GFP-SEC-10 con mayor intensidad en la punta y con baja fluorescencia citoplasmática a diferencia de la cepa en estado heterocarión. Sin embargo, el fotoblanqueamiento siguió siendo un problema al realizar la grabación durante la microscopía. La localización de esta proteína expresada en estado homocarión abarcó mayor periferia del domo apical de la hifa, mientras que la cepa heterocarión solo mostró intensidad de fluorescencia en la zona justo enfrente del Spk (Figura 39).



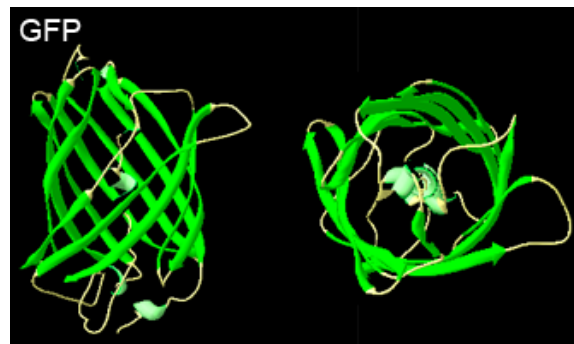
**Figura 39.** LSCM de diferentes hifas de la transformante en estado homocarión que expresa GFP-SEC-10 bajo el control del promotor *ccg-1*. Las imágenes muestran la localización de la proteína GFP-SEC-10 expresada en estado homocarión. Barra de escala = 10  $\mu$ m

Por otra parte, se realizó la microscopía confocal de barrido de esta cepa que expresa GFP-SEC-10 en estado homocarión, a través de la tinción de endomembranas FM4-64, tal como se describe en la sección 2.16. Cabe recordar que la proteína GFP está etiquetando en el extremo N-terminal de SEC-10 en esta cepa. La tinción reveló la localización del Spk en la célula y al observar el conjunto de las señales de los canales correspondientes a GFP y a FM4-64 se vió que no hay colocalización entre ambas señales (Figura 40). Esto sugiere que al igual que las otras proteínas SEC, excepto SEC-3, EXO-70 y EXO-84, la proteína SEC-10 se encuentra próxima a la membrana plasmática. En el caso de la cepa que expresa GFP en el extremo C-terminal de SEC-10 en estado homocarión podemos ver algo distinto. Vemos en el canal de FM4-64 que no se ve un Spk definido y hay fluorescencia citoplasmática en la zona de la punta de manera difusa. Sin embargo, a pesar que es conocido que la cepa presenta defectos de crecimiento, esta cepa aún mantiene la localización y la fluorescencia de SEC-10-GFP por foto blanqueamiento (Figura 40).

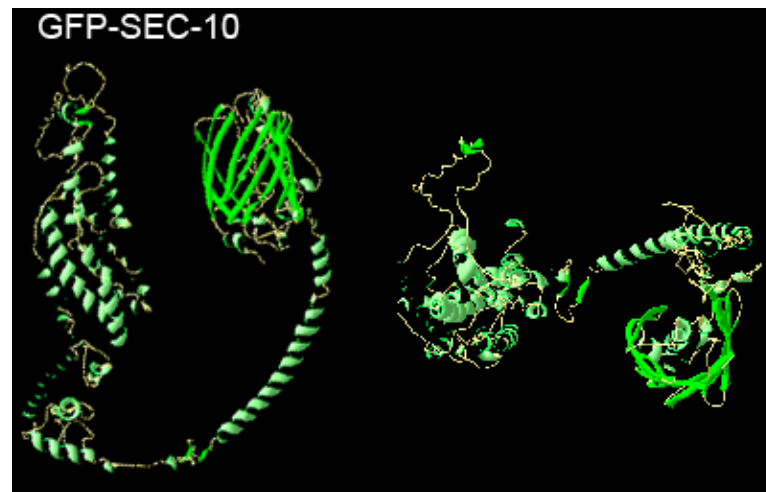


**Figura 40.** LSCM de las cepas que expresan SEC-10-GFP en estado homocarión bajo el control del promotor *Pccg-1* y GFP-SEC-10 bajo el control del promotor nativo *Psec-10* teñidas con FM4-64. El lado izquierdo muestra la localización de GFP-SEC-10, la fluorescencia emitida por la tinción FM4-64 y el conjunto de ambas señales fluorescentes. El lado derecho muestra la localización de la proteína SEC-10-GFP que corresponde a la etiqueta C-terminal. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Fue algo inesperado que la fluorescencia de la proteína GFP-SEC-10 se perdiera tan fácilmente después de 5-10 tomas individuales. Mientras que en la cepa que expresa SEC-10-GFP la fluorescencia no se perdía rápidamente a través de la técnica de fotoblanqueamiento. No hay ninguna razón preliminar que nos haga pensar que la proteína GFP-SEC-10 no mantenga su señal fluorescente durante la toma de videos en el LSCM. Para averiguar esto se realizó un modelado tridimensional de las secuencias aminoacídicas de las proteínas GFP y GFP-SEC-10, con el objeto de poder contrastarlas. En una proteína GFP intacta, las hojas beta forman un barril o cilindro que rodean la región que tiene las propiedades fluorescentes (Figura 41). Este modelado nos reveló que la proteína GFP en el extremo N-terminal de SEC-10 tiene cambios conformacionales en las hojas beta que conforman el barril de hojas beta característico de las proteínas fluorescentes de la familia de GFP (Figura 42).



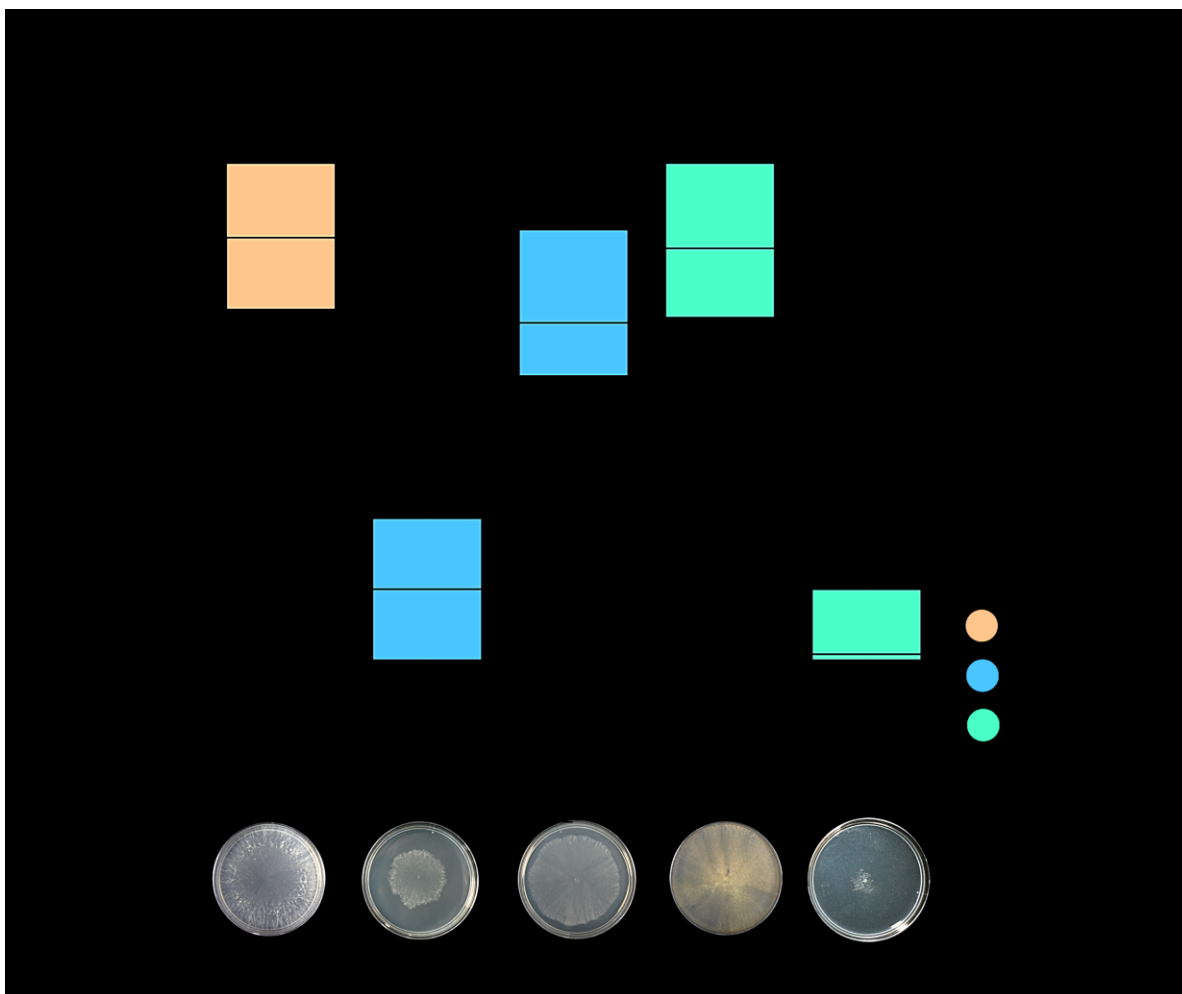
**Figura 41.** Modelado tridimensional de la estructura de GFP generado por el servidor I-TASSER. Lado izquierdo muestra la vista de lado de la proteína. Lado derecho muestra una vista desde arriba de la proteína.



**Figura 42.** Modelado tridimensional de la estructura de GFP-SEC-10 generado por el servidor I-TASSER. Lado izquierdo muestra la vista de lado de la proteína. Lado derecho muestra la proteína desde una perspectiva de encima.

Se comparó la tasa de crecimiento de esa cepa en estado homocarión y se observó que la etiqueta GFP en el extremo amino terminal tiene una disminución de 1% en la tasa de crecimiento respecto a la cepa parental (Figura 43). La diferencia entre la cepa parental y la cepa que expresa GFP-SEC-10 es despreciable y significativamente diferente a la tasa de crecimiento de la cepa que expresa SEC-10-GFP. Esta diferencia entre las etiquetas C-terminal y N-terminal nos sugiere que solamente la etiqueta C-terminal es nociva para la aptitud de la célula mientras que la etiqueta N-terminal no causa alguna alteración en el crecimiento.

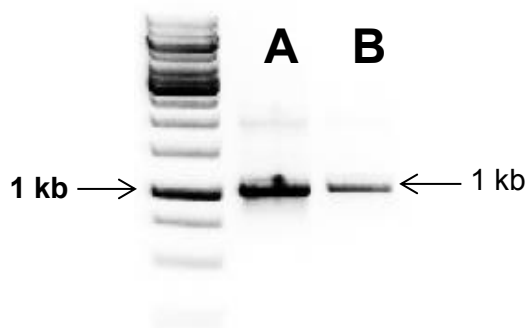




**Figura 43.** Comparación de la tasa de crecimiento entre las cepas 9718,  $\Delta sec-10$ , *sec-10*, N-GFP y C-GFP. La tasa de crecimiento esta expresado en mm/hr y cada barra tiene una fotografía de la cepa en la parte inferior de la figura con el % de disminución en la tasa de crecimiento respecto a la parental. Las barras de color azul corresponde a las cepas mutantes generadas, las barras color verde a las cepas etiquetadas tanto en el N- como el C-terminal de SEC-10 y la barra naranja corresponde al control o cepa parental 9718.

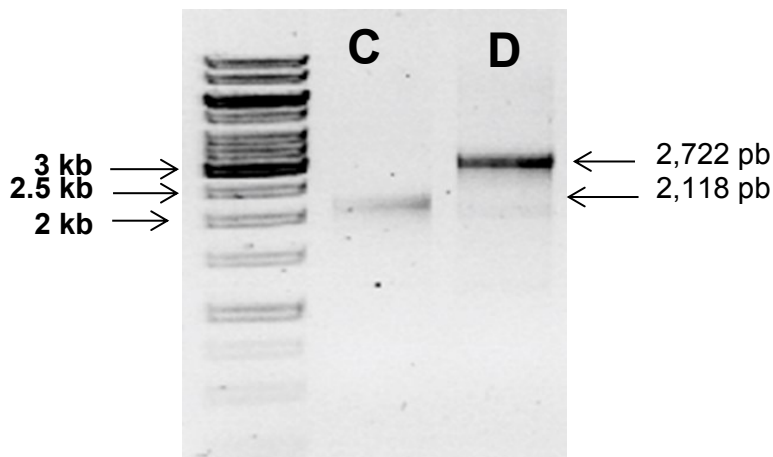
### 3.3 Probar la fidelidad del exocisto ante el cambio de localización de una subunidad

Para cumplir con el tercer objetivo se etiquetó SEC-15 en el C-terminal con una señal de localización nuclear. Para realizar estos ensayos, se amplificaron los fragmentos iniciales por medio los oligonucleótidos 727 y 728 para el fragmento A y 730 y 731 para el fragmento B (Figura 44).



**Figura 44.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR iniciales para generar la cepa SEC-15-GFP-NLS. A) Amplicón ORF *sec-15* de 1,034 pb. B) Amplicón UTR 3' de 1,056 pb.

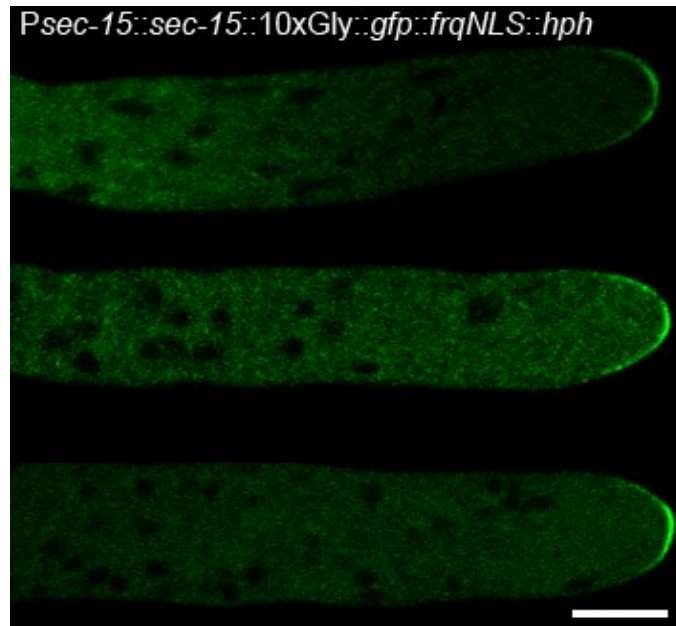
Se logró amplificar el brazo derecho con el amplicón B de la sección anterior y el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* mediante el uso de los oligonucleótidos 261 y 731 (Figura 45C). Se amplificó el brazo recombinante izquierdo mediante la fusión entre el amplicón *gfp::loxP::hph::loxP* y el amplicón A con los oligonucleótidos 727 y 260 (Figura 45D).



**Figura 45.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de fusión para etiquetar a SEC-15 con GFP-NLS. C) Amplicón *hph*-UTR 3' de 2,118 pb. D) Amplicón ORF *sec-15-gfp-NLS-hph* de 2,722 pb.

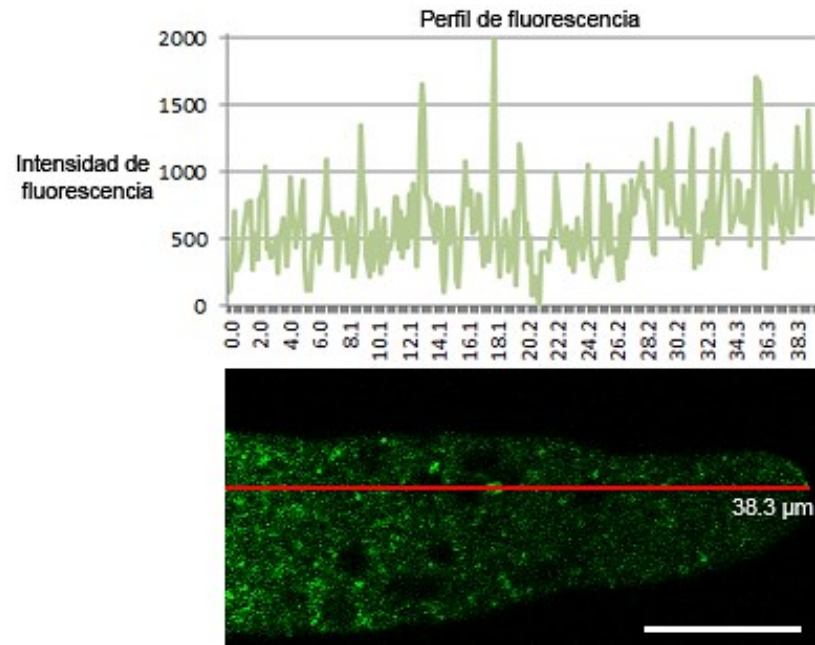
A continuación, se utilizó el amplicón *hph*-UTR 3' y el amplicón ORF *sec-15-gfp-NLS-hph* (Figura 45C-D) para la transformación. Fue posible el etiquetado de la proteína SEC-15 con la proteína GFP y la señal de localización nuclear (NLS). De las 9 transformantes solamente 3 presentaron una intensidad de la fluorescencia suficientemente alta. Estas cepas se analizaron mediante LSCM y se observó que la proteína

SEC-15-GFP-NLS localiza en el domo apical de las hifas y difusamente a lo largo del citoplasma. En esta cepa, la cual encuentra en estado heterocarión, no se pudo observar la localización de SEC-15-GFP-NLS en los núcleos (Figura 46).



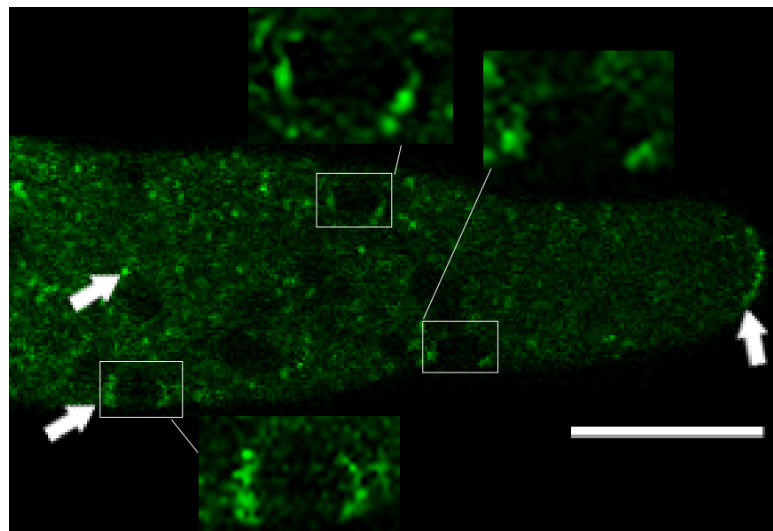
**Figura 46.** LSCM de transformantes en estado heterocarión que expresan SEC-15-GFP-NLS bajo el control de su propio promotor. Las imágenes muestran la intensidad de fluorescencia observada en la punta de las hifas. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

Fue posible obtener una cepa transformante que expresara SEC-15-GFP con la señal de localización nuclear en estado homocarión. Mediante microscopía confocal por barrido de láser se observó que la proteína SEC-15-GFP-NLS aún se localizaba en el ápice, aunque en menor intensidad respecto al resto del citoplasma. Al realizar un análisis del perfil de fluorescencia a lo largo de 38  $\mu$ m de una hifa se pudo observar que en promedio la intensidad de la fluorescencia vista en la punta no es mayor a la vista en el citoplasma (Figura 53).



**Figura 47.** LSCM de transformantes en estado heterocarión que expresan SEC-15-GFP-NLS bajo el control de su propio promotor. Las imágenes muestran la intensidad de fluorescencia observada en la punta de las hifas. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

A diferencia de la heterocarión, también la proteína SEC-15-GFP-NLS de la cepa homocarión se localizaba en el citoplasma como puntos que estaban rodeando los cuerpos oscuros (presumiblemente núcleos) en regiones subapicales (Figura 54A-B). Estos puntos tenían movimientos tanto anterógrados como retrógrados.



**Figura 48.** LSCM de la cepa SEC-15-GFP-NLS en estado homocarión. Las flechas muestran los sitios donde se localiza la proteína SEC-15-GFP-NLS alrededor de núcleos putativos. Los cuadros marcan las zonas donde la proteína SEC-15-GFP-NLS localiza rodeando cuerpos oscuro vistos en la microscopía. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 4. Discusión

---

El modelaje tridimensional en SWISS-MODEL generó modelos que comparten más del 80% de cobertura y 30% de similitud respecto a sus homólogos en *S. cerevisiae*, con excepción de SEC-3 que tiene 47% de cobertura. Este tipo de modelaje por homología resultó ser una excelente manera de generar estructuras tridimensionales al usar solamente secuencias de aminoácidos, ya que no contaba con la información cristalográfica de las subunidades del exocisto en *N. crassa*. Comparando las estructuras generadas en este estudio con las descritas en *S. cerevisiae* puede observarse que las estructuras de las subunidades del exocisto tienen características generales que se conservan en *N. crassa*, lo que indica que complejos involucrados en la excitosis se conservan tanto en secuencia como en estructura. Las subunidades del exocisto tienen una estructura de bastón compuesta de varillas helicoidales desde el extremo C-terminal. Cada dímero de subunidades está conformado de una proteína con una cola N-terminal que se dobla hacia su extremo C-terminal y otra proteína con una cola N-terminal recta. Este patrón se vio en cada par de subunidades y quizás proporcione pistas sobre cómo se ensambla el complejo a nivel de estructura. Es posible que a nivel estructural se requieran estas diferencias dentro de cada dímero para formar dos subcomplejos tetraméricos estables que puedan unirse entre sí. Debido a lo anterior surge la siguiente pregunta: ¿Por qué las subunidades no son intercambiables entre sí? No obstante, las diferencias a nivel de dominio quizás sean las responsables en dirigir cuáles subunidades se van a unir en un par. La búsqueda que se realizó para encontrar las características de las subunidades a nivel de dominios resultó poco diferente a aquellas descritas en un estudio previo (Riquelme et al., 2014). Sin embargo, se encontraron unos dominios nuevos como el PIP2BD visto en el extremo N-terminal de SEC-3, la mano EF en SEC-8, los dominios ‘repeat-like’ de culina en EXO-70 y EXO-84, el dominio ‘PH-like’ en EXO-84 y el dominio conservado EXO-84. A diferencia del estudio previo, aquí se utilizaron 4 servidores distintos para encontrar los dominios, motivos, dominios desordenados y los dominios de superfamilias. El dominio de unión a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2BD) en SEC-3 nos da evidencia de que el extremo N-terminal de SEC-3 se une a la membrana plasmática mediante su interacción con PIP2 tal como se ha visto en Sec3 de *S. cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2008; Bloch et al., 2016). Es posible que el extremo N-terminal de la subunidad SEC-3 de *N. crassa* se une a las membranas plasmáticas del ápice y de macrovesículas mediante su interacción con PIP2, lo cual pudiera explicar por qué SEC-3 se localiza tanto en el domo apical como en la periferia frontal del Spk (Riquelme et al., 2014). Los dominios “repeat-like” de culina identificados en EXO-70 y EXO-84 pueden servir como andamios a ligasas de ubiquitina que posiblemente regulen el tráfico de las mismas y/o tengan alguna función que desconocemos, en dado caso que estas proteínas sean monoubiquitinadas en estos dominios (Haglund et al., 2003). El dominio mano EF de unión a calcio encontrado en la secuencia de SEC-8 nos pudiera estar indicando alguna función de

regulación involucrada en la exocitosis. Se sabe que existen pulsos de iones de calcio que están correlacionados con el ensamble de actina y la exocitosis en *Aspergillus nidulans*, y el dominio de unión a calcio en SEC-8 identificado en *N. crassa* puede estar involucrado en estos procesos de una manera que aún no sabemos (Takeshita et al., 2017). Respecto al dominio 'PH-like' encontrado en la secuencia de la subunidad EXO-84 se puede deducir que, debido a su homología a pleckstrina, su función puede estar relacionada con la unión a la membrana plasmática. La localización de EXO-84 en la periferia frontal del Spk quizás nos indique que la unión de esta subunidad a las macrovesículas puede estar siendo mediada por su dominio 'PH-like' (Riquelme et al., 2014).

El análisis del acoplamiento molecular realizado en este trabajo se basa en las siguientes suposiciones: (1) Las estructuras generadas por homología de las proteínas del exocisto en *N. crassa* son parecidas a las de *S. cerevisiae*. (2) El acoplamiento ocurre por pares que forman heterodímeros y esos dímeros se acoplan con otro par específico (SEC-3/SEC-5 con SEC-6/SEC-8 y SEC-10/SEC-15 con EXO-70/EXO-84). Es importante destacar que las estructuras tridimensionales generadas por homología no representan la estructura real de las proteínas en *N. crassa*, lo que nos lleva a suponer que el acoplamiento entre las subunidades no debería tomarse como una realidad ya que las estructuras utilizadas en el acoplamiento son rígidas. Es decir, estos resultados no son tan confiables si lo comparamos con experimentos bioquímicos como precipitación de proteínas y espectrofotometría de masas. Es probable que en la célula estas proteínas sean flexibles y formen complejos transitorios que son altamente dinámicos. Por esta razón debemos tomar estos resultados como un apoyo que nos daría pistas sobre las posibles regiones en las que las subunidades pudieran estar siendo acopladas y no como una realidad de cómo se ensambla el complejo. Sin embargo, los resultados del acoplamiento molecular nos verificaron algunos aspectos de las suposiciones con las que basamos este análisis. En el caso del acoplamiento entre SEC-10 y SEC-15 vimos que, al igual que en *S. cerevisiae*, el extremo C-terminal de SEC-10 tiene una orientación opuesta al extremo C-terminal de SEC-15. Otro aspecto que puede hacer pensar que las suposiciones son correctas es que en el acoplamiento entre EXO-70 y EXO-84 el sitio de unión de ambas proteínas corresponde exactamente a los motivos CorEx de *S. cerevisiae*. Cabe destacar que estos motivos CorEx no fueron detectados en las estructuras de EXO-70 y EXO-84 de *N. crassa*. No obstante, esto no quiere decir que el motivo CorEx no exista en estas proteínas sino quizás este motivo haya evolucionado mediante sustituciones pero su función y estructura se ha conservado. Un patrón que se puede apreciar en los resultados es que la mayoría de las interacciones implicadas en el acoplamiento ocurren entre las hélices empaquetadas justo después de la cola N-terminal de las subunidades. Este patrón se observó en SEC-3/SEC-5, en SEC-10/SEC-15 y parcialmente en SEC-6/SEC-8 donde el extremo N-terminal de SEC-6 se acopla con la primera región de hélices de SEC-8. En los antecedentes de este trabajo se ha visto que la

etiqueta GFP en el extremo C-terminal de SEC-10 causa defectos en la exocitosis. Es posible que en *N. crassa* el componente SEC-10 tenga orientado su extremo C-terminal hacia el centro del complejo lo que puede sugerir que el extremo C-terminal de SEC-10 es importante para que se ensamblen otros componentes al complejo.

La transformación de conidios con el cassette 'knock out' de *sec-10* resultó en colonias resistentes a higromicina. Se intentó obtener una cepa mutante en estado homocarión mediante la producción de microconidios uninucleados. Al sembrar los microconidios en medio FGS con higromicina ninguna colonia creció, mientras tanto en el medio sin higromicina crecieron numerosas colonias. Esto puede indicar que es imposible obtener una cepa  $\Delta sec-10$  en estado homocarión debido a la esencialidad del producto de este gen en *N. crassa*. Se ha intentado obtener mutantes  $\Delta sec-10$  en estado homocarión en estudios previos, pero no ha sido posible. La eliminación del gen *sec-10* en *N. crassa* tiene efectos severos en el desarrollo, en el crecimiento y en la producción de conidios. La microscopía confocal de barrido con FM4-64 mostró que hay una acumulación citoplasmática del colorante dentro de la célula y que el Spk se ve reducido en tamaño. Esta acumulación de FM4-64 en el citoplasma es evidencia del atasco de tráfico vesicular que presenta esta cepa mutante. Otra evidencia de lo previamente mencionado es que la intensidad de la fluorescencia del colorante no disminuía conforme pasaba el tiempo, lo que sugiere que la exocitosis era menor que la tasa de internalización de FM4-64. La disminución del 62% en la tasa de crecimiento en la cepa  $\Delta sec-10$  heterocarión es indicador de la ineficiencia del complejo del exocisto al tener menos copias de la subunidad *sec-10* en la célula. Por lo tanto, esto puede sugerir que *sec-10* es un gen cuyo producto está involucrado en el crecimiento de las células y es importante para la función complejo del exocisto que regula el anclaje de vesículas a la membrana plasmática.

El etiquetado de SEC-10 con GFP en el extremo amino terminal expresado bajo el control del promotor *ccg-1* resultó exitoso. En esta cepa se le insertó un cassette que incluye *hph*, el promotor *ccg-1* y *gfp* en el extremo 5' del gen *sec-10*. La localización de la proteína GFP-SEC-10 resultó igual que la SEC-10-GFP pero sin un defecto notable en el crecimiento ya que solamente hubo una disminución del 1% en la tasa de crecimiento lo que sugiere que la etiqueta en el extremo N terminal no interfiere en la función o ensamble del exocisto. Sin embargo, en esta cepa la intensidad de la fluorescencia se perdía rápidamente lo que hizo pensar que se estaba fotoblanqueando. El hecho de que la transformante GFP-SEC-10 no haya presentado un fenotipo como la que expresa la cepa SEC-10-GFP nos da una mejor idea de cómo actúa la proteína SEC-10 respecto a las otras subunidades. Con base a estos resultados se sugiere que la proteína SEC-10 actúa en el exocisto desde su extremo carboxilo terminal. Es posible que al igual que la proteína Sec10 en *S. cerevisiae* el extremo carboxilo terminal de SEC-10 en *N. crassa* esté orientado hacia el centro

del complejo del exocisto. Quizás en ese extremo se ensamble el resto de las subunidades para formar el complejo y ejecutar una exocitosis eficiente. En presencia de un impedimento espacial como la proteína GFP en ese extremo C terminal resulta en una disminución en la eficiencia de la exocitosis. Otra observación que cabe destacar es que la acumulación de FM4-64 en las células de la mutante  $\Delta sec-10$  es diferente a la cepa que expresa SEC-10 etiquetada con GFP en el carboxilo terminal. Aunque ambas cepas están severamente afectadas en el crecimiento, la cepa  $\Delta sec-10$  tenía una acumulación citoplasmática de la tinción mientras que la cepa SEC-10-GFP en estado homocarión no mostraba alguna acumulación citoplasmática pero fue visible ligeramente en el Spk y difusamente en la zona de la punta. Esto puede sugerir que la formación del Spk depende de un exocisto intacto.

En la cepa que expresa SEC-15 con GFP y la señal de localización nuclear en el extremo carboxilo terminal se esperaba ver una localización de la proteína en los núcleos. Sin embargo, no fue posible ver dicha localización en la cepa heterocarión. Se observaron muchos puntos subapicales y en algunos casos estos puntos rodeaban lo que posiblemente fueran núcleos en la cepa homocarión. En la homocarión aún estaba presente la localización en la punta, pero con menor intensidad, lo que significa que la señal de localización quizás esté reteniendo la proteína SEC-15 cercana a los núcleos. Esto sugiere que la señal NLS está funcionando para reclutar la proteína SEC-15 en regiones subapicales. Cabe destacar que la falta de fluorescencia dentro de los núcleos nos puede estar diciendo que no fue posible importar la proteína desde el citosol a través del poro nuclear, cuyo diámetro es de aproximadamente 32 nm de diámetro (Aitchison et al., 2012). Una explicación puede ser que no es posible la entrada de SEC-15-GFP-NLS debido a su interacción con las otras subunidades del exocisto, lo cual no permitirían la entrada al núcleo debido a las dimensiones del complejo formado que es aproximadamente 31.8 nm de largo y 12.8 nm de ancho, muy cercano al tamaño aproximado del diámetro de un poro nuclear (Mei et al., 2018; Aitchison et al., 2012).



## Capítulo 5. Conclusión

---

En el presente trabajo se identificaron nuevos dominios y motivos en las secuencias de las subunidades del complejo del exocisto como es el dominio de unión a PIP2 en SEC-3, el motivo de unión a calcio en SEC-8 y los dominios de andamio con ubiquitina en EXO-70 y EXO-84. Estos dominios y motivos hablan de un complejo que puede ser regulado con diferentes moléculas que actúan a nivel de subunidades individuales.

Se describe por primera vez el acoplamiento molecular entre las subunidades del exocisto de *N. crassa*. Al igual que las subunidades de *S. cerevisiae* los pares de subunidades se acoplan en sus extremos N-terminal. Sin embargo, lo que resultó diferente fue que el acoplamiento ocurrió en una región N-terminal con una conformación de haz de hélices y no en la cola N-terminal como es sugerido en *S. cerevisiae*. Lo que destaca de este análisis es que la orientación invertida de SEC-10 sugerida en *S. cerevisiae* también se pudo observar en el acoplamiento entre SEC-10 y SEC-15 de *N. crassa*. Por otra parte el subcomplejo SEC-10/SEC-15/EXO-70/EXO-84 visto en el acoplamiento mostró que el extremo C-terminal de SEC-10 y el extremo N-terminal de SEC-15 se acoplan con el extremo C-terminal de EXO-84. Esto sugiere que EXO-84 también pudiera tener su extremo C-terminal orientado de manera invertida. La diferencia en la tasa de crecimiento y en el fenotipo entre las cepas que expresan GFP-SEC-10 (N-terminal) y SEC-10-GFP (C-terminal) provee valiosa información sobre la importancia que tiene el extremo C-terminal de SEC-10 en el crecimiento. De acuerdo al acoplamiento molecular y a la diferencia vista entre estas dos cepas se confirma que el extremo C-terminal de SEC-10 es un sitio importante para que el exocisto funcione y por ende que ocurra la exocitosis correctamente.

## Capítulo 6. Perspectivas

---

Para poder aclarar estas nuevas preguntas que surgen de este trabajo se tiene como perspectiva a futuro realizar experimentos que darán información específica sobre cuáles subunidades se une entre sí. En este trabajo la información dada por el acoplamiento es solamente una sugerencia de que es lo que está pasando al momento que las subunidades se empiezan a unir entre sí. Sin embargo, se requieren unos métodos experimentales para poner a prueba estas ideas. Lo que se piensa hacer a futuro es realizar experimentos de co-inmunoprecipitación y análisis de los precipitados con espectrofotometría de masas. Con estas herramientas se puede comparar los resultados entre las proteínas GFP-SEC-10 y SEC-10-GFP y averiguar cuáles son las subunidades que no logran unirse a la proteína SEC-10-GFP.

## Literatura citada

---

- Aitchison, J. D., & Rout, M. P. (2012). The yeast nuclear pore complex and transport through it. *Genetics*, 190(3), 855-883.
- Bartnicki-García S, Hergert F, Gierz G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*.153, 46-57.
- Beadle, G. W., & Tatum, E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *proceedings of the National Academy of Sciences*, 27(11), 499-506.
- Bendezu, F. O., Vincenzetti, V., & Martin, S. G. (2012). Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One*, 7(6), e40248.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2010). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Benkert, P., Tosatto, S. C., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1), 261-277.
- Biasini, M., Schmidt, T., Bienert, S., Mariani, V., Studer, G., Haas, J., & Schwede, T. (2013). OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(5), 701-709.
- Bloch, D., Pleskot, R., Pejchar, P., Potocký, M., Trpkošová, P., Cwiklik, L., & Žárský, V. (2016). Exocyst SEC3 and phosphoinositides define sites of exocytosis in pollen tube initiation and growth. *Plant physiology*, pp-00690.
- Caballero-Lima, D., Kaneva, I., Watton, S., Sudbery, P. E., & Craven, C. J. (2013). The spatial distribution of the exocyst and actin cortical patches is sufficient to organize hyphal tip growth. *Eukaryotic cell*, EC-00085.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.
- Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D., & Cullen, P. J. (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. In *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation* (pp. 49-88). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Davis, R. H. (2000). *Neurospora: contributions of a model organism*. Oxford University Press.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology*. Malden, US.
- Dunnen, J. T. D., & Antonarakis, S. E. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation*, 15(1), 7-12.

- Eck, M. J., Dhe-Paganon, S., Trüb, T., Nolte, R. T., & Shoelson, S. E. (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell*, 85(5), 695-705.
- Gallego, O., Betts, M. J., Gvozdenovic-Jeremic, J., Maeda, K., Matetzki, C., Aguilar-Gurreri, C., ... & Kuhn, M. (2010). A systematic screen for protein–lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular systems biology*, 6(1), 430.
- Gallego, O., Specht, T., Brach, T., Kumar, A., Gavin, A. C., & Kaksonen, M. (2013). Detection and characterization of protein interactions in vivo by a simple live-cell imaging method. *PLoS one*, 8(5), e62195.
- Goldenberg, S. J., Cascio, T. C., Shumway, S. D., Garbutt, K. C., Liu, J., Xiong, Y., & Zheng, N. (2004). Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell*, 119(4), 517-528.
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(S1), S162-S173.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO journal*, 18(4), 1071-1080.
- Gupta, Y. K., Dagdas, Y. F., Martinez-Rocha, A. L., Kershaw, M. J., Littlejohn, G. R., Ryder, L. S., & Talbot, N. J. (2015). Septin-dependent assembly of the exocyst is essential for plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, tpc-15.
- Haglund, K., Di Fiore, P. P., & Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in biochemical sciences*, 28(11), 598-604.
- He, B., Xi, F., Zhang, J., TerBush, D., Zhang, X., & Guo, W. (2007). Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *The Journal of cell biology*, 176(6), 771-777.
- Heizmann, C. W., & Hunziker, W. (1991). Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends in biochemical sciences*, 16, 98-103.
- Howard, R. J., & Gow, N. A. (Eds.). (2007). *Biology of the fungal cell* (Vol. 8). Springer Science & Business Media.
- Heider, M. R., & Munson, M. (2012). Exorcising the exocyst complex. *Traffic*, 13(7), 898-907.
- Heider, M. R., Gu, M., Duffy, C. M., Mirza, A. M., Marcotte, L. L., Walls, A. C., & Frost, A. (2016). Subunit connectivity, assembly determinants and architecture of the yeast exocyst complex. *Nature structural & molecular biology*, 23(1), 59.

- Jones, L. A., & Sudbery, P. E. (2010). Spitzenkörper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryotic cell*, 9(10), 1455-1465.
- Kaksonen, M., Toret, C. P., & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin-and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123(2), 305-320.
- Kawasaki, H., & Kretsinger, R. H. (1994). Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein profile*, 1(4), 343.
- Kipreos, E. T., Lander, L. E., Wing, J. P., He, W. W., & Hedgecock, E. M. (1996). *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell*, 85(6), 829-839.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185-202.
- Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(2), 392-406.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., ... & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255.
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 4(4), 201-213.
- Martin-Urdiroz, M., Deeks, M. J., Horton, C. G., Dawe, H. R., & Jourdain, I. (2016). The exocyst complex in health and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 24.
- Mei, K., Li, Y., Wang, S., Shao, G., Wang, J., Ding, Y., ... & Dong, M. Q. (2018). Cryo-EM structure of the exocyst complex. *Nature structural & molecular biology*, 25(2), 139.
- Moncrief, N. D., Kretsinger, R. H., & Goodman, M. (1990). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 30(6), 522-562.
- Novick, P., Field, C., & Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21(1), 205-215.
- Picco, A., Irastorza-Azcarate, I., Specht, T., Böke, D., Pazos, I., Rivier-Cordey, A. S., & Gallego, O. (2017). The in vivo architecture of the exocyst provides structural basis for exocytosis. *Cell*, 168(3), 400-412.
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods*, 9(2), 173.
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., & Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to

- the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular biology of the cell*, 25(8), 1312-1326.
- Rizzoli, S. O., & Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic*, 8(9), 1137-1144.
- Roth, D., Guo, W., & Novick, P. (1998). Dominant negative alleles of SEC10 reveal distinct domains involved in secretion and morphogenesis in yeast. *Molecular biology of the cell*, 9(7), 1725-1739.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381-3385.
- Shaw, B. D., Chung, D. W., Wang, C. L., Quintanilla, L. A., & Upadhyay, S. (2011). A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal biology*, 115(6), 541-546.
- Shear, C. L., & Dodge, B. O. (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *Journal of Agricultural Research*. 34: 1019-1042
- Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R., & Freitag, M. (2011). Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora* CenH3. *Molecular and cellular biology*, MCB-01285.
- Takeshita, N., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R. A., Lu, L., ... & Fischer, R. (2017). Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201700204.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., & Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 15(23), 6483-6494.
- Vajda, S., & Kozakov, D. (2009). Convergence and combination of methods in protein-protein docking. *Current opinion in structural biology*, 19(2), 164-170.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., & Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 74(5), 1044-1053.
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial genetics bulletin*, 13, 42-43.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Lepore, R. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
- Westergaard, M., & Mitchell, H. K. (1947). *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10), 573-577.

- Wiederkehr, A., De Craene, J. O., Ferro-Novick, S., & Novick, P. (2004). Functional specialization within a vesicle tethering complex: bypass of a subset of exocyst deletion mutants by Sec1p or Sec4p. *The Journal of Cell Biology*, 167(5), 875-887.
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., & Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *The Journal of cell biology*, 180(1), 145-158.