

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Análisis de LST-1 en la formación de vesículas COPII  
dependientes de ERV-14 en *Neurospora crassa***

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

Presenta:

**Monica Esther Cante Paz**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Monica Esther Cante Paz**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

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

**Dra. Patricia Juárez Camacho**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Monica Esther Cante Paz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida

### **Análisis de LST-1 en la formación de vesículas COPII dependientes de ERV-14 en *Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

---

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

El crecimiento de hongos filamentosos requiere la síntesis continua de proteínas de la pared celular y membrana plasmática (MP). Este proceso tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE), donde las proteínas recién sintetizadas se incorporan a vesículas cubiertas con proteínas de revestimiento II (COPII). Estas vesículas emergen de la membrana del RE y siguen la ruta secretora hacia su destino final. En *Neurospora crassa* se ha identificado a ERV-14 como un receptor de carga esencial del RE. En *Saccharomyces cerevisiae* Erv14p funciona como receptor de carga para algunas proteínas de MP, uniéndose simultáneamente a la proteína de carga y a Sec24p, una proteína de la capa interna de COPII. Análisis anteriores mediante microscopía confocal de barrido láser en hifas de *N. crassa* han mostrado co-localización parcial de ERV-14 y SEC-24 etiquetadas con proteínas fluorescentes dentro de una red membranosa. En *S. cerevisiae* Lst1p sustituye a Sec24p en la capa interna de vesículas COPII que exportan como cargas a determinadas proteínas de MP. Sin embargo, aún se desconoce si Lst1p interactúa con receptores de cargas de la familia de Erv14p. En este trabajo, se analizó la distribución y dinámica de LST-1, ortóloga de Lst1p, en hifas en crecimiento de *N. crassa*, mediante microscopía confocal de barrido láser y microscopía confocal de disco giratorio. Se observó a LST-1-GFP distribuida a lo largo de la célula, aunque más predominantemente en regiones subapicales y distales, en forma de puntos cerca de los núcleos. Se observaron puntos fluorescentes moviéndose a regiones corticales distales, sugiriendo que LST-1-GFP podría participar en una subpoblación de vesículas COPII que viajan directamente a la MP. Las co-expresiones de LST-1-GFP y ERV-14-mCherry mostraron ausencia de co-localización, sugiriendo que LST-1 puede estar interactuando con otros receptores de carga, pero no con ERV-14. Por otro lado, en las co-expresiones de LST-1-GFP y SEC-24-mCherry se observó un patrón de distribución diferente de ambas proteínas. LST-1 se encontró principalmente en regiones distales, mientras que SEC-24 se encontró cerca del ápice. Sin embargo, se encontró co-localización parcial en regiones cercanas al ápice, sugiriendo que ambas proteínas convergen transitoriamente en el mismo organelo.

**Palabras clave:** *Neurospora crassa*, vesículas COPII, tráfico vesicular, LST-1, ERV-14

Abstract of the thesis presented by **Monica Esther Cante Paz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science

**Role of LST-1 during formation of ERV-14 dependent COPII vesicles in *Neurospora crassa***

Abstract approved by:

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
**Thesis Director**

The growth of filamentous fungi requires continuous synthesis of proteins for the cell wall and plasma membrane (PM). This process takes place in the endoplasmic reticulum (ER), where newly synthesized proteins are incorporated into vesicles coated with COPII proteins. These vesicles emerge from the ER membrane and follow the secretory pathway to their final destination. In *Neurospora crassa*, ERV-14 has been identified as an essential cargo receptor of the ER. In *Saccharomyces cerevisiae*, Erv14p functions as a cargo receptor for some PM proteins, simultaneously binding to the cargo protein and to Sec24p, an inner coat protein of COPII. Previous analyses using laser scanning confocal microscopy in *N. crassa* hyphae have shown partial co-localization of ERV-14 and SEC-24 labeled with fluorescent proteins within a membranous network. In *S. cerevisiae*, Lst1p replaces Sec24p in the inner layer of COPII vesicles that export certain PM proteins as cargo. However, it is still unknown whether Lst1p interacts with cargo receptors of the Erv14p family. In this work, the distribution, and dynamics of LST-1, the ortholog of Lst1p, in growing *N. crassa* hyphae were analyzed using laser scanning confocal microscopy and spinning disk confocal microscopy. LST-1-GFP was observed distributed along the cell, although more predominantly in subapical and distal regions, appearing as dots near the nuclei. Fluorescent dots were observed moving to distal cortical regions, suggesting that LST-1-GFP could participate in a subpopulation of COPII vesicles that travel directly to the PM. Co-expression of LST-1-GFP and ERV-14-mCherry showed an absence of co-localization, suggesting that LST-1 may be interacting with other cargo receptors, but not with ERV-14. On the other hand, co-expression of LST-1-GFP and SEC-24-mCherry, a different distribution pattern of both proteins was observed. LST-1 was mainly found in distal regions, while SEC-24 was found near the apex. However, partial co-localization was found in regions close to the apex, suggesting that both proteins transiently converge in the same organelle.

**Keywords:** *Neurospora crassa*, vesicle trafficking, COPII vesicles, LST-1, ERV-14

## **Dedicatoria**

*A mis padres, Jesús Cante y Mónica Paz,*

*A mi hermana, Ale Cante*

*Y a mis abuelitos*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado a través de la beca de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por abrirme las puertas para seguir creciendo profesionalmente. Al personal administrativo y académico de Ciencias de la Vida, por brindarme amablemente su apoyo cada vez que lo necesité.

A la Dra. Meritxell Riquelme, por recibirme cálidamente en su equipo de trabajo, por todo el apoyo que me brindó dentro y fuera de CICESE, por sus enseñanzas e incluso “regaños”, que me orientaron e impulsaron a seguirme esforzando. Gracias por confiar en mí. La admiro y estimo mucho.

A mis sinodales, la Dra. Patricia Juárez y el Dr. Carlos Brizuela, por sus preguntas, consejos y observaciones, que fueron sumamente valiosos para este proyecto.

Al personal técnico del departamento de microbiología, en especial al Dr. Diego Delgado y al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) por capacitarme, permitirme usar los microscopios, y por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas. A la Dra. Olga Callejas, por ayudarme en cuestiones técnicas cada vez que solicité su apoyo. A la Dra. Astrid Espino, por sus muy valiosos consejos sobre WBs. Y al Dr. Daniel Salgado, por enseñarme a hacer SDS-PAGES.

Al M. en C. Juan Manuel Martínez, por capacitarme en el laboratorio de microbiología y en la mayoría de las técnicas moleculares que usé en este proyecto. Gracias por estar siempre al pendiente de mí, y por brindarme tu amistad.

A todos los miembros del inigualable Riquelme Lab (Sam, Lolis, Juanpi, Paulette, Alexis, Vianey y Daniel), el mejor team de laboratorio. Muchas gracias por estar siempre dispuestos a apoyarme con la infinidad de dudas que tenía, por cooperar siempre para mantener la unidad del equipo, y por sus muy valiosas aportaciones.

Por último, gracias a mis amigos, por ser un soporte fundamental durante la maestría. A mis viejos amigos y colegas veracruzanos; Javier Jacques, Gustavo Rodríguez y Ely González, por su increíble amistad a pesar de los años y la distancia. A mis dos lindas amigas de Sonora, Caty y Andrea, porque a pesar de la distancia, aún siento su cariño en cada mensaje. A mi prima Itzel Vera, gracias prima por

estar siempre echándome porras, TQM. A mi amiga y doctora en ciencias, Karen Ramos, por tu maravillosa amistad, tú sabes. A los nuevos amigos que hice durante la maestría; Paul Montaña, gracias por los consejos, asesorías y divertidos momentos. Y a Richi, Fer, Roberto y Javier, disfruté cada café y margarita que tomamos juntos.



# Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	2
1.1.1 Retículo Endoplasmático.....	2
1.1.2 Formación de vesículas COPII .....	6
1.1.3 SEC-24 y LST-1, proteínas de cubierta de vesículas COPII.....	8
1.1.4 Receptor de cargas ERV-14 .....	11
1.2 Justificación .....	13
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos .....	14
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>15</b>
2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	15
2.1.1 Recuperación de conidios .....	16
2.1.2 Cruzas sexuales .....	16
2.2 Análisis bioinformáticos .....	17

2.2.1	Alineamiento de secuencias.....	17
2.2.2	Árbol filogenético.....	17
2.2.3	Diseño de oligonucleótidos.....	17
2.3	Etiquetamiento del C-terminal de LST-1 en <i>Neurospora crassa</i> .....	18
2.3.1	Transformación por electroporación de <i>N. crassa</i> .....	21
2.3.2	Fusiones celulares.....	21
2.3.3	Comprobación de fluorescencia por microscopía confocal.....	22
2.4	Western blot de ERV-14-GFP.....	22
2.4.1	Extracción de ERV-14-GFP.....	22
2.4.2	SDS-PAGE e inmunodetección de ERV-14-GFP.....	23
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>24</b>
3.1	Análisis bioinformáticos.....	24
3.1.1	Porcentaje de identidad de las proteínas de cubierta, LST-1 y SEC-24 de <i>N. crassa</i> , comparado con sus ortólogos de otros hongos modelo.....	24
3.1.2	Relación filogenética de LST-1 de <i>N. crassa</i> con otras especies de hongos.....	28
3.2	Análisis de la localización y dinámica intracelular de LST-1-GFP.....	29
3.2.1	Localización intracelular de LST-1-GFP.....	29
3.3	Caracterización de la localización intracelular de LST-1 durante la formación de vesículas COPII.....	33
3.3.1	LST-1 y SEC-24 co-localizan parcialmente en regiones subapicales.....	33
3.3.2	LST-1 no co-localiza con NCA-1.....	34
3.4	Elucidación de la ruta de tráfico vesicular de LST-1 en <i>N. crassa</i> .....	35
3.4.1	LST-1 no co-localiza con el marcador de cisternas de Golgi, mCHFP-YPT-1.....	35
3.5	Localización de LST-1 y ERV-14 durante la formación de vesículas COPII.....	37
3.5.1	LST-1 no co-localiza con el receptor de cargas ERV-14.....	37
3.5.2	Comprobación de ERV-14-GFP en <i>N. crassa</i> por Western-blot.....	39

<b>Capítulo 4.      Discusión .....</b>	<b>41</b>
4.1.1 LST-1, una proteína conservada en ascomicetos, que se concentra en los sitios de salida del retículo endoplasmático .....	41
4.1.2 ERV-14 y LST-1 viajan en diferentes sub-poblaciones de vesículas COPII .....	43
4.1.3 LST-1 podría estar siguiendo una ruta de tráfico vesicular no convencional .....	43
4.1.4 ERV-14-GFP, residente del RE en <i>N. crassa</i> .....	45
<b>Capítulo 5.      Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
Perspectivas.....	46
<b>Literatura citada.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos           .....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Esquema general de la estructura y composición del RE.....	3
Figura 2. Esquema general del transporte vesicular en la célula.....	5
Figura 3. Representación del ensamblaje de las vesículas COPII.....	7
Figura 4. Esquema de la estrategia de etiquetamiento de LST-1 con GFP en <i>N. crassa</i> . ....	19
Figura 5. Imágenes de los geles de agarosa con los amplicones esperados para el etiquetamiento de LST-1.....	20
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de LST-1 de <i>N. crassa</i> y sus ortólogos de otras especies.....	26
Figura 7. Conservación de LST-1 y sus ortólogas, en hongos.....	27
Figura 8. Árbol filogenético de la proteína LST-1 en hongos.....	28
Figura 9. Distribución de LST-1-GFP en una hifa de <i>N. crassa</i> .....	30
Figura 10. Serie de tiempo de la dinámica intracelular de LST-1-GFP en una hifa de <i>N. crassa</i> .....	31
Figura 11. Comprobación molecular de LST-1-GFP.....	32
Figura 12. Co-expresión por fusión de LST-1-GFP con SEC-24-mCherry.....	33
Figura 13. Co-expresión de LST-1-GFP y dsRED-NCA-1.....	35
Figura 14. Co-expresión de LST-1-GFP y YPT-1-mChFP.....	36
Figura 15. Análisis de la co-expresión de LST-1-GFP y ERV-14-mCherry.....	38
Figura 16. Western blot de ERV-14-GFP.....	40

## Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Lista de cargas y sus respectivos receptores para su incorporación en vesículas COPII, en hongos, reportados en la literatura. ....	12
Tabla 2. Lista de cepas con las que se trabajó en este proyecto y mantenidas en stock. ....	15
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados.....	18
Tabla 4. Porcentaje de identidad de LST-1 de <i>N. crassa</i> comparado con sus ortólogos de otros organismos modelo.....	24

## Capítulo 1. Introducción

---

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, que se nutren por absorción y se caracterizan por tener una pared celular. Morfológicamente las células de los hongos pueden ser levaduriformes o filamentosas. En las levaduras convencionales la unidad celular básica unicelular se reproduce generando una célula hija por gemación o por fisión binaria, dependiendo de la especie. En cambio, en los hongos filamentosos, la hifa es la unidad básica celular vegetativa, con un crecimiento polarizado a partir de la punta, conocido como crecimiento apical polarizado. Durante el crecimiento, las hifas pueden ir ramificando, dando como resultado una gran red hifal llamada micelio.

Las hifas tienen una forma muy característica, y es que son células largas y cilíndricas, con un ápice ligeramente cónico (Deacon, 1997). Las hifas del hongo modelo *Neurospora crassa* se dividen en tres regiones a partir del ápice; la región del subápice proximal que va de 5 a 20  $\mu\text{m}$ , la región del subápice distal (20 – 40  $\mu\text{m}$ ), y por último la región distal, que inicia a partir de los 40  $\mu\text{m}$  (Riquelme et al., 2007). La organización intracelular de la hifa es diferente en cada región. La zona apical contiene principalmente al Spitzenkörper (SPK), aunque también se han visualizado mitocondrias y cisternas de Golgi. En la región del subápice generalmente se localizan cisternas de Golgi, mitocondrias y retículo endoplasmático (RE). Por último, a partir de la región del distal, se encuentran principalmente núcleos, cuerpos lipídicos, cuerpos multivesiculares y vacuolas, pero también se puede encontrar el RE, Golgi, y mitocondrias (Rico-Ramírez et al., 2018).

Durante el crecimiento hifal, la polaridad es un factor esencial que requiere la síntesis continua y selectiva de proteínas, lípidos y otros componentes de la pared celular, que eventualmente son transportados polarizadamente al sitio de crecimiento, es decir, hacia la membrana plasmática (MP) y la pared celular en la punta de la hifa (Verdín et al., 2009). En los últimos años, se ha determinado gracias a diversos estudios que el SPK de varios hongos filamentosos posee una estructura estratificada compuesta por un núcleo de microvesículas que está rodeado de macrovesículas secretoras (Riquelme et al., 2018; Verdín et al., 2009).

El SPK funciona como un centro suministrador de vesículas, las cuales transportan a los componentes necesarios para la síntesis de la pared celular y MP, por lo que el SPK es fundamental para el mantenimiento de la morfología y dirección de crecimiento de la hifa (Bartnicki-Garcia et al., 1989; Riquelme, 2013).

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Retículo Endoplasmático

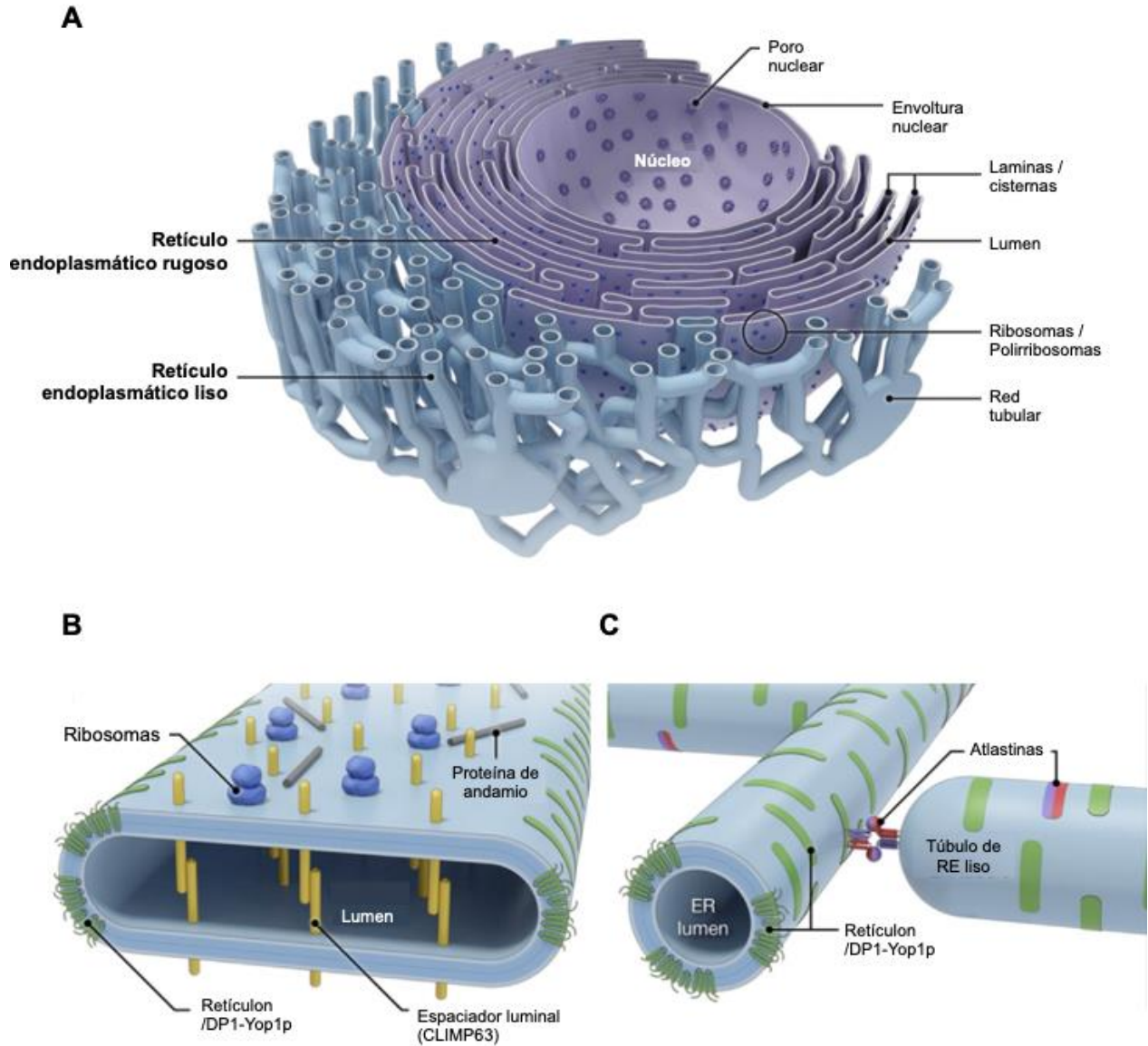
El retículo endoplasmático (RE) es uno de los organelos más grandes y dinámicos de la célula, interaccionando constantemente con otros sitios componentes celulares, como el citoesqueleto y la MP (Goyal & Blackstone, 2013; Westrate et al., 2015). Fue definido por Alberts y colaboradores (Alberts et al., 2019) como “un laberinto irregular de espacios interconectados y rodeados por una membrana”. El RE fue descrito por primera vez en 1902 por Emilio Veratti, en un estudio con células de tejido muscular de diferentes organismos, donde describió la observación de estructuras reticuladas (Veratti, 1961), pero no fue hasta 1951 cuando George Palade confirmó su existencia con ayuda de la microscopía electrónica de transmisión (Palade, 1955). A partir de entonces, el RE ha sido estudiado estructuralmente.

El RE cumple varias funciones vitales para la célula, entre las que se encuentran el almacenamiento de calcio, síntesis de lípidos y proteínas, transporte vesicular, y el control de calidad para la exportación de proteínas, entre otras. Cada una se lleva a cabo en los diferentes dominios o regiones que componen al RE (Goyal & Blackstone, 2013; Schwarz & Blower, 2016). Estructuralmente, el RE está formado por dos regiones que se encuentran interconectadas por cisternas; la envoltura nuclear (EN) y la región periférica, que a su vez está conformada por el RE rugoso y liso (Schwarz & Blower, 2016; Westrate et al., 2015).

El RE rugoso se caracteriza por estar formado por láminas, es decir, una bicapa de membranas planas extendidas, pero con poca curvatura, y separadas entre sí por un espacio conocido como lumen, mientras que, en la superficie citosólica, están saturadas de ribosomas y polirribosomas, que se ha sugerido que ayudan a regular la estructura de esta región del RE (Shibata et al., 2006, 2010; West et al., 2011). El RE liso es una red de túbulos interconectados entre sí, pleomórfica y altamente curvada, que se extiende a lo largo del citoplasma, y es muy dinámica, ya que constantemente se está formando y reordenándose, pero carente de ribosomas (Du et al., 2004; Shibata et al., 2006; Westrate et al., 2015).

En cada región, el conjunto de proteínas que la conforman es diferente. Las láminas del RE rugoso están formadas por una gran variedad de proteínas de membrana. Estructuralmente hay tres proteínas que cabe destacar: Climp63, p180 y kinectina (Oertle et al., 2003). Climp63 tiene un dominio largo en forma de hélice superenrollada (Coiled-coil domain), que atraviesa el lumen del RE, formando un andamio entre ambas membranas, y controlando así el grosor y forma de las láminas del RE (Klopfenstein et al., 2001; Lin

et al., 2012), mientras que p180 y kinectina, tienen el dominio coiled-coil unido a la superficie citosólica, sugiriéndose que funcionan como andamio para mantener la superficie plana de las láminas (Figura 1) (Klopfenstein et al., 2001; Lin et al., 2012).



**Figura 1.** Esquema general de la estructura y composición del RE. A) Esquema de la distribución de las diferentes regiones del RE. B) Forma típica del RE rugoso, con los ribosomas y proteínas que lo integran. C) RE liso, formado por túbulos los cuales, a su vez, están conformados por proteínas estructurales diferentes a las que componen al RE rugoso (Modificado de Goyal & Blackstone, 2013).

El RE liso es regulado principalmente por dos familias de proteínas integrales de membrana: los reticulones y DP1/Yop1p, esenciales para dar soporte, principalmente en las zonas de curvatura (Palade, 1955). Ambas



proteínas, en conjunto forman oligómeros en la membrana en forma de arco, que influyen en el diámetro y abundancia de la red tubular (Figura 1) (Lin et al., 2012; Shibata et al., 2008)

Como ya se mencionó, el RE es el principal sitio de síntesis de proteínas, principalmente de proteínas de membrana (Jan et al., 2014). En el RE también se lleva a cabo el plegamiento de estas proteínas recién sintetizadas como parte de su proceso de maduración y para ser eventualmente exportadas a su sitio diana dentro o fuera de la célula (Barlowe et al., 1994; Tang et al., 2005). Por lo tanto, el RE se considera el primer paso de la ruta secretora de proteínas, siendo las cisternas de Golgi, vacuolas, la MP y el espacio extracelular, los siguientes pasos de la ruta (Herzig et al., 2012; Kurihara et al., 2000a).

Este proceso no es simple. Después de que el ARNm es traducido en los ribosomas, el polipéptido recién sintetizado es translocado por señalización a un canal asociado a la membrana del RE (Jan et al., 2014; Reid & Nicchitta, 2015), que es reconocida por la “sequence recognition particle” (SRP), una ribonucleoproteína que se une al péptido que va emergiendo del ribosoma; entonces, el polipéptido se une a la membrana del RE, por medio de la interacción entre la SRP y un receptor SRP de membrana (Rapoport, 2007; Saraogi & Shan, 2011). Para que las proteínas se transloquen al RE, tienen que cruzar a través de un canal conocido como canal de translocación, formado por el complejo heterotrimérico Sec61, integrado por Sec62/Sec63 y BiP, una ATPasa chaperona, y que permite el paso de polipéptidos solubles, como transmembranales (Rapoport, 2007). Las proteínas solubles atraviesan la membrana ya que contienen un péptido-señal hidrofóbico que se escinde al llegar al canal, mientras que para las proteínas de membrana, sólo las regiones hidrofóbicas de la secuencia pueden entrar a la bicapa de la membrana y quedar anclados como dominios transmembrana, y las regiones hidrofílicas permanecen en el citosol o atraviesan completamente la membrana hasta el lumen del RE (Rapoport, 2007; Schwarz & Blower, 2016).

Una vez que las proteínas son translocadas, aquellas que entran al lumen del RE y que serán secretadas, tienen que someterse a ciertas modificaciones, tales como plegamiento para adquirir su estructura terciaria, todo con ayuda de proteínas chaperonas (Schwarz & Blower, 2016). Las proteínas de carga que serán exportadas se acumulan en los sitios de salida del RE, para ser empaquetadas en vesículas que saldrán del RE (Herzig et al., 2012).

La secreción de proteínas destinadas a diferentes organelos como el Golgi y vacuolas, entre otros, así como a la MP, o incluso al espacio extracelular, a través de la ruta secretora, es un proceso esencial para la célula que garantiza que las proteínas sean entregadas correctamente y a tiempo a su destino final (D’Arcangelo et al., 2013). En el caso de hongos filamentosos, como *N. crassa*, cuyas células tienen crecimiento

polarizado y SPK, el reparto de proteínas a través de la ruta secretora es fundamental para mantener la polaridad durante el crecimiento. El mecanismo por el cual las vesículas llegan al SPK se basa en un modelo de secreción y transporte, donde las vesículas son las encargadas de dirigir el crecimiento, ya sea transitando a través del citoesqueleto de manera direccional, o por difusión pasiva a través del citoplasma (Gomez-Navarro & Miller, 2016).

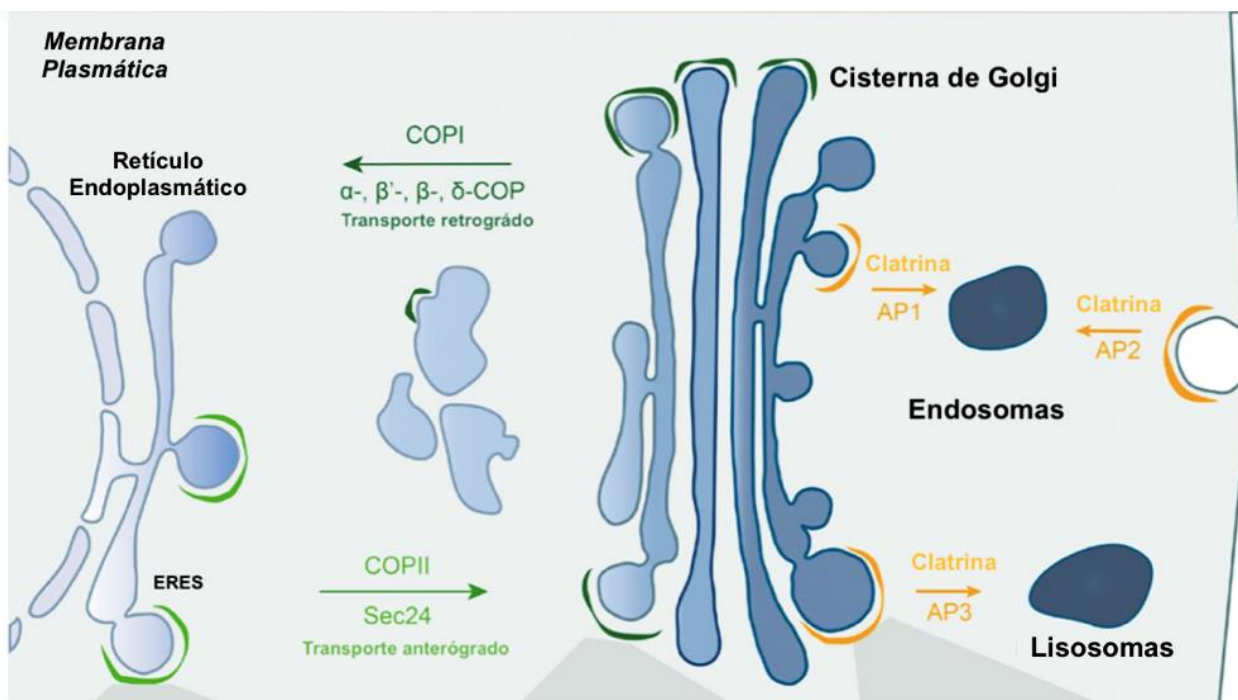


Figura 2. Esquema general del transporte vesicular en la célula. Modificado de Gomez-Navarro & Miller, 2016.

Las vesículas que transportan a las proteínas de carga del RE son conocidas como vesículas COPII (en inglés "Coat Protein II"), y están formadas por proteínas citoplasmáticas, que en conjunto, forman una especie de jaula poliédrica, que tiene la capacidad de deformar la membrana del RE para generar la vesícula (Bonifacino & Glick, 2004; Gomez-Navarro & Miller, 2016).

Los sitios donde sucede la biogénesis de estas vesículas se conocen como sitios de salida del RE (ERES, por sus siglas en inglés), y son regiones tubulares del RE, o regiones donde no hay ribosomas asociados (Weigel et al., 2021; Yang et al., 2021). Aunque en *S. cerevisiae* se ha demostrado que la formación de vesículas COPII ocurre de manera estocástica, en cualquier región del RE (Hughes & Stephens, 2008; Rossanese et al., 1999), en *Pichia pastoris* y mamíferos se ha demostrado que el ensamblaje de las vesículas COPII ocurre específicamente en los sitios ERES (Orci et al., 1991; Rossanese et al., 1999).

Durante la biogénesis de una vesícula, proteínas o lípidos carga se van incorporando adentro de manera muy selectiva (Bonifacino & Glick, 2004). Posteriormente las vesículas se transportan hacia un sitio diana, en el que estas cargas son entregadas al fusionarse las membranas de la vesícula y del organelo receptor. En el caso de las vesículas COPII, la mayoría viajan a las cisternas de Golgi, en sentido anterógrado (Kurihara et al., 2000) (Figura 2) dando inicio a su trayecto por la ruta secretora.

La biogénesis y reparto de estas vesículas a sus sitios diana consiste, inicialmente en la gemación desde una membrana donadora, seguido del transporte, el anclaje a una membrana diana y finalmente, la fusión vesicular. Cabe destacar que en cada paso es indispensable la participación de: 1) complejos de cubierta, que promueven la formación de las vesículas; 2) complejos de unión, que interactúan con las proteínas de cubierta y median el acoplamiento de las vesículas; y 3) SNAREs (Receptores de proteínas de unión-NSF (factor sensible a la N-etilmaleimida)), que facilitan la fusión entre la membrana donadora y la membrana diana (Bonifacino & Glick, 2004).

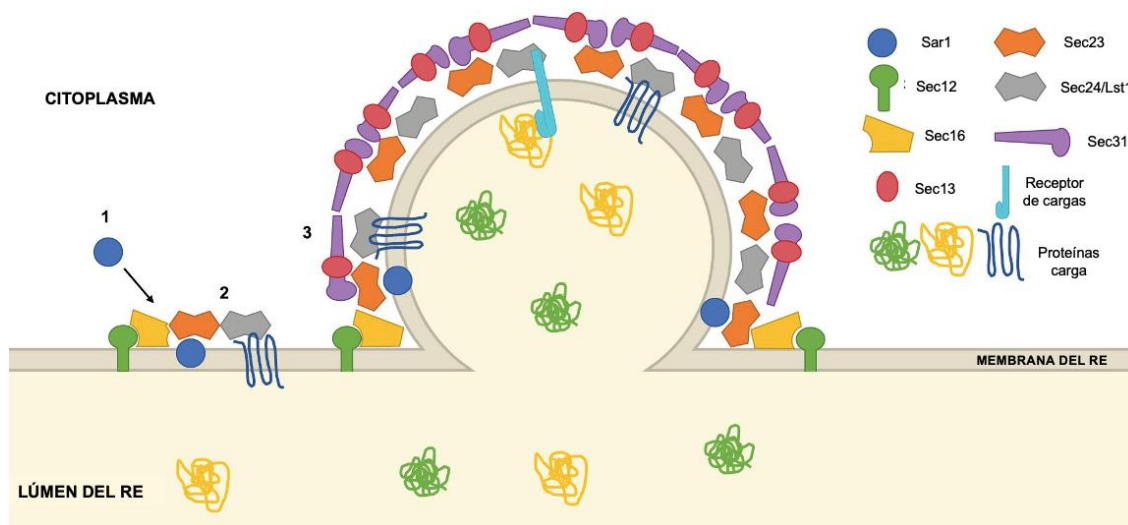
### 1.1.2 Formación de vesículas COPII

Como ya se mencionó anteriormente, las vesículas COPII son fundamentales para el transporte de las cargas sintetizadas en el RE. Estas vesículas están formadas principalmente por un conjunto de cinco proteínas: Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 y Sec31 (Barlowe et al., 1994). Sin embargo, durante el proceso de biogénesis, se requiere de la participación de proteínas reguladoras adicionales, tales como Sec12 y Sec16 (Barlowe et al., 1994). Las vesículas están formadas por una doble capa; la capa interna la integran Sar1, una pequeña Ras-GTPasa, y Sec24 unida a Sec23, mientras que la capa externa está formada por Sec13 unida a Sec31 (Gomez-Navarro et al., 2020). La selección de las cargas que tienen que ser empaquetadas dentro de la vesícula es un proceso cuidadoso, regulado por las proteínas de la cubierta de las vesículas COPII, principalmente Sec24, que interactúa con las señales de exportación del RE (Gomez-Navarro et al., 2020; Miller et al., 2003).

El proceso de biogénesis de las vesículas COPII (Figura 3), inicia con Sec16, una proteína citosólica, que se asocia a la membrana del RE para definir y mantener los sitios ERES mientras se forman las vesículas, además de que se ha sugerido que regula la función de Sar1 (Watson et al., 2006). A su vez, Sar1 es reclutada por Sec12, una proteína residente de la membrana del RE y factor de intercambio de guaninas (GEF, por sus siglas en inglés), que cataliza la conversión de GDP a GTP en Sar1 (Montegna et al., 2012). A continuación, el extremo N-terminal hidrofóbico de Sar1-GTP, se asocia a la membrana del RE, y recluta al

complejo heterodimérico de Sec23/Sec24, por medio de la región “switch” de la proteína, una región característica de la familia de proteínas Ras (Bonifacino & Glick, 2004; Huang et al., 2001). Posteriormente, los integrantes de la capa interna se encargan de reclutar al segundo complejo heterodimérico de Sec13/Sec31, que al autoensamblarse forman la capa externa, complementando de esta manera la estructura de la vesícula (Bi et al., 2007; Hughes & Stephens, 2008). Se ha sugerido que la principal función de Sec13/Sec31 es la de regular la curvatura de la membrana del RE, durante la formación de la vesícula, y además dar soporte y rigidez a la vesícula, con la finalidad de garantizar la entrega eficiente de las cargas (Čopič et al., 2012; D’Arcangelo et al., 2013).

Mientras se forma la vesícula, las cargas que serán empaquetadas en la vesícula comienzan a acumularse en los ERES. Sec24 es el principal receptor de cargas dentro de la vesícula, gracias a sus múltiples sitios de unión en su secuencia. Por lo tanto, las cargas que reconozcan estos sitios entrarán a la vesícula (Miller et al., 2002; Mossessova et al., 2003). Sin embargo, hay otros factores que determinarán qué cargas entrarán en la vesícula. Por ejemplo, las señales de exportación, que son secuencias motivos citosólicos de algunas proteínas transmembranales de carga (Barlowe, 2003). Esta pequeña secuencia motivo, es una señal de exportación diacidica y dihidrofóbica, compuesta de Asp-X-Glu (X puede ser cualquier aminoácido), que se encuentra en el extremo citosólico de determinadas proteínas transmembranales de carga, y que es reconocida por componentes de la cubierta COPII (Barlowe, 2003).



**Figura 3. Representación del ensamblaje de las vesículas COPII. Modificado de Bisnett et al., 2021.**

Asimismo, se ha sugerido que la orientación de Sec23/Sec24 puede determinar el tamaño de la vesícula, y esto a su vez, permite la incorporación, particularmente de cargas grandes (Bhattacharya et al., 2012;

Gomez-Navarro & Miller, 2016). También hay proteínas solubles, como las proteasas vacuolares, que no tienen la capacidad de unirse a la cubierta de COPII por sí mismas, pero logran entrar a las vesículas por el flujo a granel, donde estas cargas de manera no selectiva son incorporadas a la vesícula, o por la participación de proteínas transmembranales, conocidas como receptores de carga (Barlowe, 2003; Hughes & Stephens, 2008).

### 1.1.3 SEC-24 y LST-1, proteínas de cubierta de vesículas COPII

El estudio de Sec24 a nivel estructural, genético y bioquímico ha permitido determinar que ésta presenta una variedad de dominios independientes de unión a proteínas carga, que le permiten reconocer a la mayoría de las señales de reparto (Miller et al., 2002; Mossessova et al., 2003). Además, en mamíferos (Tang et al., 1999), levaduras (Roberg et al., 1999) y hongos filamentosos (Dimou et al., 2022; Qian et al., 2023), se han identificado parálogos de Sec24p, y se ha demostrado que la existencia de estas proteínas amplía el nivel de reconocimiento de las señales de reparto (Gomez-Navarro & Miller, 2016).

En mamíferos, se han identificado a cuatro homólogos de Sec24; Sec24A, Sec24B, Sec24C y Sec24D, que son clasificados en dos subclases según su homología; Sec24A/B y Sec24C/D (Adams et al., 2014; Tang et al., 1999). Cada parálogo tiene una función única, es decir, cada uno tiene la capacidad de reconocer a un set de proteínas de carga diferente para incorporarlas en vesículas COPII (Adams et al., 2014).

Roberg y colaboradores (1999) investigaron más a fondo el papel de las diferentes subunidades de la cubierta de COPII en el proceso de reclutamiento de proteínas carga para formar las vesículas y su interacción entre ellas, identificando diez genes que fueron letales con la mutación *sec13-1*, en *S. cerevisiae*. A este conjunto de genes los identificaron como genes LST (Lethal with *sec-thirteen*) (Roberg et al., 1999). Particularmente el gen LST1 fue de interés porque mostró que puede codificar para una proteína con una función-aún no descubierta- en vesículas COPII. LST1 codifica para Lst1p, una proteína membranal del RE, que comparte un 23% de identidad con Sec24p, y que también se puede unir a Sec23p para formar el sub-complejo heterodimérico Sec23p/Lst1p, sugiriendo así su participación en la formación de las vesículas del RE. Además, identificaron a LST1 como un gen no esencial pero cuya mutación afectaba la exportación de Pma1p (ATPasa esencial de la MP), y su acumulación en el RE, lo cual sugiere que hay un tipo de ensamblaje de la cubierta de las vesículas COPII que está especializado para poder reclutar y exportar específicamente a Pma1. Dada esta evidencia, los autores proponen que Lst1p pudiera tomar el lugar de Sec24p en el ensamblaje de la cubierta COPII, aunque no está del todo claro (Roberg et al., 1999).

En 2000, se comprobó que en *S. cerevisiae* Lst1p participa en la incorporación de Pma1p, ya que esta última puede unirse directa o indirectamente como proteína carga al complejo Sec23p/Sec24p y al Sec23p/Lst1p en la misma vesícula, incrementando la cantidad de las proteínas de carga en una misma vesícula, eficientizando el transporte de cargas (Shimoni et al., 2000). En este sentido, se confirmó que Lst1p no sustituye a Sec24p al formar el complejo proteico con Sec23p. Análisis *in vitro* reportaron que una deficiencia o desequilibrio de los dos heterodímeros puede afectar la gemación de la vesícula (Shimoni et al., 2000).

Eventualmente, también se observó que las vesículas formadas con Sec24p y Lst1p tenían tamaños diferentes, aunque con una densidad y apariencia morfológica similar, siendo aproximadamente un 15% de mayor tamaño las vesículas que contenían en su cubierta una combinación de complejos con Lst1p y Sec24p simultáneamente, lo cual también demostraría que posiblemente Lst1p tiene afinidad por proteínas de carga de mayor volumen, como se sugirió anteriormente (Miller et al., 2002). Con esta información se fortaleció la idea de que las proteínas carga más grandes, como la proteína H<sup>+</sup>-ATPasa de MP ó Pma1p, tienen afinidad por Lst1p, debido a que posiblemente se necesiten vesículas más grandes para la exportación de estas proteínas de carga.

Adicionalmente, Lst1p puede viajar de manera independiente a Sec24p, en una subpoblación de vesículas, con una capa interna conformada únicamente por el complejo Lst1p/Sec23p, haciendo de la exportación de cargas un proceso más complejo pero eficiente, al mismo tiempo (Miller et al., 2002).

Gomez-Navarro y colaboradores (2020), también contribuyeron en determinar el papel de Lst1p en levaduras, por medio del análisis con microscopía electrónica y de luz correlativa (CLEM) de mutantes de Lst1p, donde pudieron concluir que Lst1p está involucrado en la formación de la vesícula, principalmente la capa interna, ya que en ausencia del gen LST1 observaron reducción del volumen de las vesículas, y sugirieron que posiblemente contribuye a la generación de la curvatura de la vesícula para formar una de mayor tamaño (Gomez-Navarro et al., 2020).

Además de Lst1, en *S. cerevisiae*, se ha identificado a un segundo parálogo de Sec24p, Lss1p, que también tiene la capacidad de unirse a Sec23p para formar el heterodímero en COPII (Roberg et al., 1999), aumentando así la cantidad de señales de reparto y, por ende, las proteínas de carga que pueden ser transportadas. Cabe destacar, que a diferencia de Lst1p, Lss1p tiene un porcentaje de identidad de 55% con Sec24p, lo que significa que su secuencia de aminoácidos es más parecida a Sec24p, que Lst1p (Kurihara et al., 2000b).

A la fecha, hay poca información sobre homólogos/parálogos de Sec24p en hongos filamentosos. En 2022, Dimou y colaboradores, identificaron en *Aspergillus nidulans*, un hongo modelo, la existencia de dos subpoblaciones de vesículas COPII, que evaden la entrega de cargas en Golgi (Dimou et al., 2022). Una está compuesta por el homólogo de Sec24; LstA, y la segunda, está integrada por Sec24 y el receptor de cargas, Erv14. Sus resultados sugieren que las vesículas que evaden la entrega de cargas en Golgi son vesículas que contienen cargas transmembranales de grandes tamaños, y que son necesarias para el mantenimiento de la MP y la pared celular del hongo. Al igual que lo reportado en *S. cerevisiae*, sus resultados confirmaron que la bomba de protones ATPasa, PmaA, es reconocida por LstA y transportada directamente a la MP (Dimou et al., 2022) .

En *Magnaporthe oryzae*, un hongo fitopatógeno, se identificó a MoSec24B, como órtologo de LstA y Lst1p (Qian et al., 2023). Interesantemente, además de que lo identificaron y caracterizaron como parte de la cubierta de COPII, los autores también pudieron caracterizar otras funciones importantes de esta proteína. La delección del gen que codifica para MoSec24B, afecta el crecimiento del hongo, reduce la tasa de conidiación, afecta la pared celular, la polarización y presión de turgencia del apresorio, que al final resulta en la disminución de la patogenicidad del hongo. Además, lograron identificar otros procesos de señalización intracelular relacionados con la autofagia, en los que está involucrada, concluyendo que MoSec24B juega un papel muy importante en funciones vitales para el hongo (Qian et al., 2023).

En *N. crassa*, aún no hay trabajos sobre la caracterización de las vesículas COPII, ni de su biogénesis, cargas, y ruta intracelular. Apenas en 2018, se identificó a *sec-24*, el gen que codifica para SEC-24 (Sastré-Velásquez, 2018), y se etiquetó con un marcador fluorescente, con la finalidad de usarse como marcador putativo de las vesículas COPII, para evaluar co-localización con el receptor de cargas ERV-14.

Como se mencionó con anterioridad, durante la formación de las vesículas COPII, se van incorporando las cargas que serán exportadas y transportadas a su destino. Sin embargo, no todas contienen la señal de exportación que las vincule directamente con las proteínas de cubierta, por lo que requieren de la participación de proteínas receptoras de cargas, que funcionan como un andamio entre la proteína de cubierta y la proteína de carga. La asistencia de estas proteínas accesorias aumenta la especificidad de captura de cargas, contribuyendo a la eficiencia del proceso (Tang et al., 2005).

La realidad es que aún se tiene poco conocimiento sobre la variedad de estas proteínas en hongos, así como sobre su interacción con receptores de cargas. En hongos se han propuestos algunas interacciones entre proteína de cubierta, receptor de cargas y cargas (Tabla 1), y se ha sugerido que Lst1p podría estar

incorporando cargas con ayuda de receptores de carga de la familia p24p principalmente (Castillon et al., 2011; D’Arcangelo et al., 2015; Miller et al., 2003)

#### 1.1.4 Receptor de cargas ERV-14

Los receptores de carga son proteínas que facilitan la incorporación de proteínas carga, al interactuar simultáneamente con la proteína carga y con la proteína de cubierta, aunque también se ha sugerido que pudieran estimular la salida de las vesículas, desde el RE (Gomez-Navarro et al., 2020; Pagant et al., 2015; Starr et al., 2018).

La proteína Erv14p (ER-vesicle protein of 14 kD) pertenece a la familia cornichon, una familia de proteínas transmembranales conservadas, que ha sido caracterizada en diferentes especies eucariotas incluyendo levaduras (Erv14p), *Drosophila* (cornichon), plantas (CNIH) y mamíferos (CNIH). Se ha demostrado que participa como receptor de carga en el reclutamiento de proteínas integrales de membrana (Axl2p, PmaA, Mid2p, Gap1p, Hxt1p, atGLR) dentro de vesículas COPII en la ruta RE-Golgi, esto debido a que en ausencia de cornichon, la exportación de estas proteínas carga fue deficiente (Castillon et al., 2009; D’Arcangelo et al., 2015; Dimou et al., 2022; Herzig et al., 2012; Pagant et al., 2015; Rosas-Santiago et al., 2015; Wudick et al., 2018).

Asimismo, también en *S. cerevisiae* se determinó que Erv14p funge como un receptor de carga clásico, por su capacidad de unirse a la proteína carga y a la cubierta de COPII, elevando así la calidad de la exportación, gracias a su motivo-señal de unión afín a Sec24p (Pagant et al., 2015). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de Erv14 en compartimentos del Golgi, por lo que se ha inferido que viaja cíclicamente entre el RE y Golgi (Powers & Barlowe, 1998, 2002).

En el trabajo de Roberg y colaboradores (1999), también se planteó la posibilidad de que, además de Lst1p otros componentes del RE estuvieran participando directamente sobre el reclutamiento de Pma1p, debido a que para el transporte de otras proteínas de membrana se había documentado este sistema. Esto basado en el trabajo de Powers & Barlowe (1994), donde Erv14p es necesaria para la exportación de Axl2p, una proteína integral de la MP en *S. cerevisiae*, la cual es fundamental para el establecimiento del sitio de brote axial. Esto generó la sospecha de que Erv14p podría tener algún papel directamente en el reclutamiento de proteínas de membrana para exportarlas dentro de vesículas COPII (Roberg et al., 1999)



En hongos filamentosos, particularmente en *A. nidulans*, Erv14, homólogo de la familia cornichon, mostró ser crucial para el transporte de la proteína de membrana Pall en la formación de vesículas COPII (Dimou et al., 2022). Además, se identificó al ortólogo putativo de Lst1p, LstA (AN3080), confirmando la interacción con PmaA (homóloga a Pma1 de *S. cerevisiae*), y concluyendo que las vesículas COPII que deben transportar a PmaA están conformadas mayoritariamente por LstA (Dimou et al., 2022).

**Tabla 1. Lista de cargas y sus respectivos receptores para su incorporación en vesículas COPII, en hongos, reportados en la literatura.**

Proteína de cubierta	Receptor de carga	Carga	Especie	Referencia
	Proteínas p24 (Emp24p y Erv25p)	GPI-Aps	<i>S. cerevisiae</i>	(D’Arcangelo et al., 2015; Manzano-Lopez et al., 2015; Miller et al., 2002)
Lst1p/Sfb3p	-	Pma1p	<i>S. cerevisiae</i>	(D’Arcangelo et al., 2015)
	Erv29p	$\alpha$ -factor (feromona de apareamiento)	<i>S. cerevisiae</i>	(Miller et al., 2002)
	Proteínas p24 (Emp24p y Erp1p)	-	<i>S. cerevisiae</i>	(Miller et al., 2003)
	Erv46p			
Sec24p	Erv14p	Axl2p	<i>S. cerevisiae</i>	(Powers & Barlowe, 2002)
	Emp24p	Cwp2p		
-	Erv14p	Mid2p, Gap1p, Hxt1p, Hxt2p, Cdc50p, Dnf1p, Dnf2p, Nha1p, Qdr2p, Rsn1p	<i>S. cerevisiae</i>	(Castillon et al., 2009; Herzig et al., 2012)
	Erv14p	Sma2p	<i>S. cerevisiae</i>	(Nakanishi et al., 2007)
	Erv14p	Yor1p	<i>S. cerevisiae</i>	(Pagant et al., 2015)
-	Erv14	Pall	<i>A. nidulans</i>	(Dimou et al., 2022)
LstA	-	PmaA	<i>A. nidulans</i>	

En *N. crassa*, se identificó al ortólogo putativo de la familia cornichon, ERV-14 (NCU06922). Intentos fallidos para obtener homocarriones con el gen *erv-14* eliminado permitieron determinar que, en *N. crassa*, esta proteína es esencial ya que cumple una función en el desarrollo y mantenimiento de las hifas (Sastré-Velásquez, 2018). Además, se determinó una posible asociación entre ERV-14 y proteínas involucradas en el sistema COPII, por medio de ensayos de co-expresión entre ERV-14 y los marcadores putativos del RE, SEC-16 y SEC-24. Los resultados de estos ensayos mostraron una co-localización parcial entre éstas y una distribución especialmente en regiones distales al ápice. Finalmente, para verificar si ERV-14 participa en

el sistema COPII, también se llevaron a cabo ensayos de co-expresión entre ERV-14 y YPT-1 (GTPasa que regula el tráfico de vesículas secretoras desde el RE al Golgi) bajo el efecto de brefeldina A (BFA), un inhibidor del Golgi. Los resultados de estos ensayos comprobaron la presencia de ERV-14 en COPII, ya que también co-localizó parcialmente con YPT-1, siendo visualizada en las cisternas de Golgi (Sastré-Velásquez, 2018)

La co-localización parcial de ERV-14 con SEC-24 dejó abierta la interrogante sobre si es posible que en *N. crassa*, este receptor de carga tenga mayor afinidad hacia una de las isoformas de SEC-24, como LST-1, y que, por lo tanto, la interacción directa entre ambas sea mayor (Sastré-Velásquez, 2018; Starr et al., 2018), tal como se ha reportado en *S. cerevisiae*.

## 1.2 Justificación

El estudio del tráfico vesicular en organismos eucariotas complejos, como algunos mamíferos, y en organismos eucariotas simples, como las levaduras, ha revelado ser un proceso esencial para el correcto funcionamiento de las células. El destino de cada proteína se determina desde su exportación como cargas desde el RE, marcando el inicio del proceso con la formación de vesículas COPII, las cuales transportan selectivamente proteínas de carga en su interior. Sin embargo, se ha evidenciado que en cada organismo pueden existir variaciones en el conjunto de proteínas que conforman la cubierta de la vesícula, lo que define su contenido.

A pesar de la investigación sobre el papel del tráfico vesicular en la polaridad celular en el hongo filamentoso modelo *N. crassa*, todavía queda por dilucidar el proceso de formación de las vesículas COPII y la selección de sus cargas. Estudios realizados con *A. nidulans*, otro hongo filamentoso filogenéticamente más cercano a *N. crassa* que *S. cerevisiae*, sugieren que la composición de la cubierta de las vesículas COPII puede variar, lo que probablemente influya en la ruta seguida por cada vesícula.

Además, las diferencias en el patrón de crecimiento entre hongos filamentosos y levaduras sugieren disparidades en la formación de vesículas COPII. Por ende, es crucial investigar la composición y exportación selectiva de las vesículas COPII en *N. crassa*, ya que son responsables de transportar proteínas neo-sintetizadas, esenciales tanto para el crecimiento adecuado de las hifas como para el mantenimiento de la MP y la pared celular.

### 1.3 Hipótesis

La proteína LST-1, homóloga a la proteína SEC-24, se acumula en los sitios de salida del RE con la finalidad de formar la cubierta de algunas vesículas COPII. Además, la proteína ERV-14 actúa como receptor de cargas para las vesículas COPII compuestas por LST-1 en *N. crassa*.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Determinar si ERV-14 se transporta en vesículas COPII formadas por LST-1, y caracterizar a LST-1 durante la formación de vesículas COPII en *N. crassa*.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar *in silico* la estructura de LST-1 (NCU06868) en *N. crassa* y su conservación en diferentes especies fúngicas de distintos grupos taxonómicos.
2. Elucidar la localización intracelular de LST-1 en hifas de *N. crassa*.
3. Determinar si LST-1 está presente en los sitios ERES.
4. Examinar si LST-1 sigue la ruta secreción convencional RE-Golgi.
5. Determinar la localización de ERV-14 y LST-1 durante la formación de las vesículas COPII.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Con la finalidad de contar con la suficiente cantidad de conidios para la realización de los diferentes experimentos planteados para este proyecto, se creó un stock de cepas de *Escherichia coli* y de *N. crassa*, las cuales se encuentran enlistadas en la Tabla 2.

**Tabla 2. Lista de cepas con las que se trabajó en este proyecto y mantenidas en stock.**

Nombre	Genotipo	Procedencia
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> ;mk <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>	Invitrogen <sup>TM</sup>
SMRP7	<i>mat A; wild type; his-3<sup>-</sup></i>	M. Freitag
SMRP8	<i>mat a; wild type; his-3<sup>-</sup></i>	M. Freitag
SMRP13	<i>mat a; wild type</i>	M. Freitag
SMRP14	<i>mat A; wild type</i>	M. Freitag
SMRP24	<i>mat A; <math>\Delta</math> mus-51::bar<sup>+</sup>; his-3<sup>-</sup></i>	knock-out kit
SMRP25	<i>mat a; <math>\Delta</math> mus-51::bar<sup>+</sup></i>	knock-out kit
SMRP302	<i>mat A his-3<sup>+</sup>::Pccg-1::mchfp<sup>+</sup>::ypt-1<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	E. Sanchez
SMRP317	<i>mat A; Pccg-1::t-dimer2(12)-nca-1::his-3<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	B. Bowman
SMRP431	<i>mat a; Pcni::cni-10xgly-gfp<sup>+</sup>::hph<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	E. Sastré
SMRP432	<i>mat A; Pcni::cni-10xgly-gfp<sup>+</sup>::hph<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	E. Sastré
SMRP433	<i>mat a; Psec-24::sec-24-8xgly-mchfp<sup>+</sup>::natR<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	E. Sastré
SMRP495	<i>mat A; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup>; his-3<sup>+</sup>::Pccg-1::gfp</i>	J. R. Pulido
SMRP535	<i>mat a; Plst-1::lst-1-10xgly-gfp<sup>+</sup>::hph<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup></i>	Este estudio
SMRP536	<i>mat A; Plst-1::lst-1-10xgly-gfp<sup>+</sup>::hph<sup>+</sup>; <math>\Delta</math>mus-51::bar<sup>+</sup>; his-3<sup>-</sup></i>	Este estudio

Para el crecimiento de cepas de *N. crassa* se utilizó Medio Mínimo de Vogel (MMV), compuesto por sales de Vogel 1X y sacarosa al 1.5% (Vogel, 1956). Para preparar medio sólido, al MMV se le adicionó agar al 1.5%, y para las cepas auxótrofas a histidina, el medio fue suplementado con L-histidina a una

concentración de 0.25 mg/mL (esterilizado por filtración). Para la obtención de ADN genómico de *N. crassa* se inocularon conidios en medio completo de Vogel (Sales de Vogel 1X, sacarosa 1.5%, extracto de levadura 0.5%, y N-Z casaminoácidos 0.5%).

### 2.1.1 Recuperación de conidios

Bajo condiciones de esterilidad, en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de MMV sólido, se inocularon  $8 \times 10^6$  conidios de las cepas de *N. crassa*. Se incubaron a 30°C durante tres días y posteriormente se expusieron a la luz a temperatura ambiente (TA) durante siete días. La recuperación de los conidios generados consistió en añadir a cada matraz 50 mL de agua destilada estéril y agitar fuertemente. Todo lo recuperado en el agua se filtró vaciando el matraz en tubos Falcon de 50 mL y utilizando embudos cubiertos con tela "magitel" estéril, la cual atrapa el micelio, pero permite el paso de conidios. Se centrifugó el filtrado a 5000 rpm por 5 min. Para lavar el pellet de conidios, se descartó el sobrenadante cuidadosamente, se agregaron 50 mL de agua destilada estéril y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones repitiendo el proceso. Una vez lavados, los conidios fueron resuspendidos en 1 mL de sorbitol 1M y transferidos a tubos Eppendorf estériles, que finalmente se almacenaron a -20°C.

### 2.1.2 Cruzas sexuales

En placas Petri que contenían medio sintético de cruza (MSC; Sacarosa al 2%, sales MSC 1X y agar al 1.5%), se inocularon  $9 \times 10^6$  conidios de la cepa receptora en un extremo. Se incubaron a 25°C por 24 horas en condiciones de oscuridad. Después, se agregó la misma cantidad de conidios de la cepa emisora, con el tipo de apareamiento opuesto y complementario al de la cepa receptora, sobre el micelio de la cepa receptora. Se incubaron nuevamente a 25°C durante 15 días o hasta observar el desarrollo de peritecios, en condiciones de oscuridad.

Posteriormente, se recuperaron las ascosporas de las tapas de las placas Petri con 1 mL de agua destilada estéril, en un tubo Eppendorf para almacenamiento. Se sembraron ascosporas en placas Petri con MMV, fueron activadas con calor (60°C) durante una hora, y posteriormente se incubaron a 30°C entre 8-10 horas aproximadamente, con la finalidad de colectarlas en cuanto comenzaran a germinar. La colecta se realizó en tubos de borosilicato conteniendo 1 mL de MMV sólido suplementado con el marcador de selección.

## 2.2 Análisis bioinformáticos

### 2.2.1 Alineamiento de secuencias

Tomando como referencia el trabajo de (Starr et al., 2018), se consideró el número de acceso NCU06868, como el correspondiente a la secuencia de LST-1 de *N. crassa*. Para confirmar, se hizo un análisis de la secuencia de aminoácidos por medio de un BLAST desde el servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI), filtrando la búsqueda para obtener las secuencias ortólogas, tanto de LST-1 como de SEC-24, de tres diferentes organismos modelo (*S. cerevisiae*, *A. nidulans* y *M. oryzae*). Por último, por medio del programa MEGA 11 y el algoritmo de MUSCLE, se hizo el alineamiento múltiple de secuencias (AMS, con las secuencias ortólogas recuperadas del BLAST. Finalmente, el análisis se complementó con el programa Jalview, donde se obtuvo el porcentaje de identidad entre LST-1 y SEC-24 de *N. crassa* con respecto a sus ortólogas.

### 2.2.2 Árbol filogenético

Se utilizó la plataforma virtual de HMMR para obtener todas las secuencias homólogas a LST-1 de *N. crassa*. Este software utiliza el modelo probabilístico llamado “modelos ocultos de Markov” (por sus siglas en inglés HMMs) para buscar secuencias proteicas homólogas en diferentes bases de datos como Pfam. Posteriormente, se identificaron las secuencias correspondientes únicamente al reino Fungi ingresando cada número de acceso a la base de Uniprot. Se seleccionaron 75 secuencias en total, de especies representativas de cada phylum y, utilizando el algoritmo MUSCLE (Multiple, Sequence Alignment) en el programa MEGA (utilizando los parámetros por omisión del software), se hizo un alineamiento múltiple. Finalmente, utilizando el método de inferencia filogenética “The Neighbor-Joining method” se construyó el árbol filogenético. El árbol, con sus correspondientes valores de Bootstrap, se exportó en formato Newick y se editó en la plataforma virtual iTOL.

### 2.2.3 Diseño de oligonucleótidos

De NCBI se obtuvo la secuencia codificante de LST-1, la cual se analizó cuidadosamente para poder diseñar los oligonucleótidos específicos con base en la estrategia de etiquetamiento de la proteína (Tabla 3). Se utilizó el programa ApE, el cual permite editar *in silico* la secuencia del gen codificante de la proteína diana

e insertar la secuencia del cassette “10xGly-GFP-Hph”. Para cada oligonucleótido generado se tomó en cuenta la temperatura de fusión (Tm), el porcentaje de guaninas y citosinas, y la longitud de cada oligonucleótido.

**Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados.**

Stock	Nombre	Secuencia
*895	LST1Fw	GCGCTGCATCAACGTCATCGCCGGC
*896	LST1Rv	CCTCCGCCGCCTCCGCCCAATACGCAGGCCTCAACCCCGTAAAGC
897	Br2LST1Fw	GTTATGGATCCGAGCTCGAGGCGCGCACATAATAACGGATGG
898	Br2LST1Rv	CGATAGCGGAGTATTTGCTCATAACTCGTTGG
899	5'UTRFw	GCCGCCCAAGCACTCCATCAGACCG
902	5'LST1Fw-2	ACCAAGCTCTCCTTGGAGATCCACC
903	5'LST1Fw-3	TGCTACGATTGGCCATGTCTCTTCG
904	LST1-5'Rv2	GCCGCCTCCGCCCAATACGCAGGCCTCAACCCCGTAAAGC
299	Fw - 10xGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGC
298	Rv - loxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATA
261	HphSM-Fw	AAAAAGCCTGAACTACCCGCGACG
260	HphSM-Rv	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC

*\* Oligonucleótidos diseñados para este proyecto pero que no fueron funcionales.  
Los oligonucleótidos 299, 298, 261 y 260 fueron diseñados anterior a este proyecto, por lo que ya se encontraban en stock.*

### 2.3 Etiquetamiento del C-terminal de LST-1 en *Neurospora crassa*

El etiquetamiento de LST-1 con la proteína fluorescente verde (GFP) se realizó siguiendo una estrategia basada en la técnica de reemplazamiento de genes con marcadores de selección (Split Marker Gene Replacement; Figura 4) (Smith et al., 2011). Se amplificó por PCR el fragmento que contiene el cassette “10xGly-GFP-hph” de 2281 pb, usando como templado ADN plasmídico del vector pGFP::hph::loxP (Honda & Selker, 2009), y los oligonucleótidos 10xGly-F y loxP-R que habían sido diseñados anteriormente (Riquelme et al., 2014). Después, se amplificó el fragmento izquierdo que consiste en 1400 pb que van desde una región 5' del marco abierto de lectura (ORF) de *lst-1* hasta el codón de paro, el cual se elimina para que la polimerasa pueda seguir transcribiendo sin truncarse. Para este fragmento se utilizaron los

oligonucleótidos 5'LST1Fw-3 y LST1-5'Rv2. Por último, se amplificó el fragmento derecho, que consiste en 1033 pb, y que corresponde a la región flanqueante 3' del gen *lst-1*. Los oligonucleótidos para este fragmento fueron Br2LST-1Fw y Br2LST1Rv. Para la amplificación de ambos fragmentos se utilizó como templado ADN genómico de *N. crassa*. Para confirmar la integridad y tamaño de cada fragmento amplificado, se hizo una electroforesis de cada producto de PCR. Después, se purificó cada amplicón individualmente utilizando el kit "QIAquick Gel Extraction Kit"

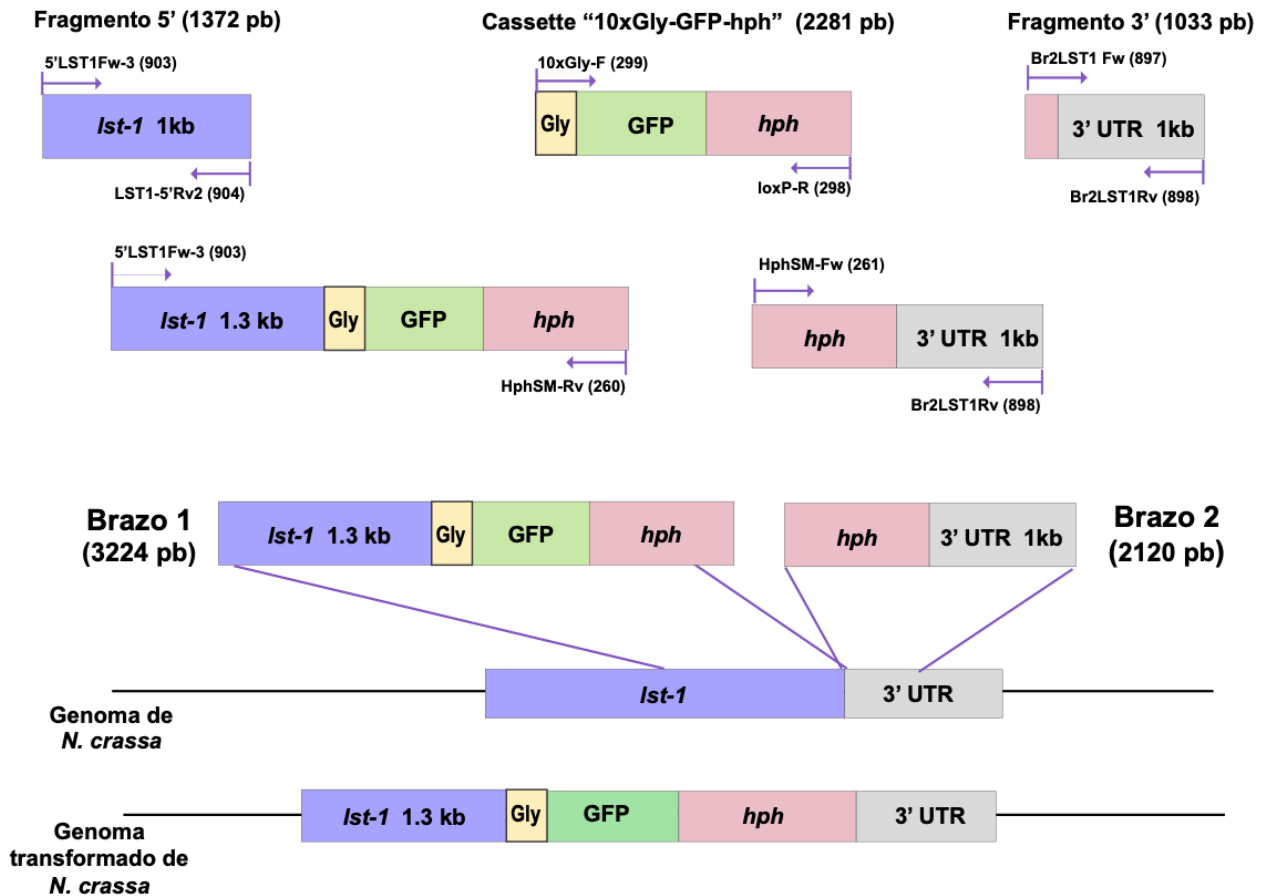


Figura 4. Esquema de la estrategia de etiquetamiento de LST-1 con GFP en *N. crassa*.

Cabe resaltar que, durante el proceso de amplificación de los fragmentos individuales, el fragmento 5' de *lst-1* no amplificó utilizando los oligonucleótidos diseñados originalmente (Stock: 895, 896; Tabla 3), esto seguramente debido al alto porcentaje de GC en la secuencia de ambos oligonucleótidos. Por lo tanto, se diseñaron nuevos oligonucleótidos (Stock: 902, 903; Tabla 3), los cuales contaban con menos porcentaje de GC, reduciendo la temperatura de alineamiento y facilitando la amplificación del fragmento.



Finalmente, siguiendo la estrategia de etiquetamiento, para generar dos brazos recombinantes, primero se fusionó, por medio de PCR de fusión, el fragmento 5' que contenía el ORF de LST-1 de 1371 pb con una fracción del cassette "10xGly-GFP-hph", que abarcaba hasta el nucleótido 1371, que era parte de la secuencia del gen de la higromicina, dando un brazo de 3224 pb. Para el brazo 1 se utilizaron los oligonucleótidos 5'LST1Fw-3 y HphSM-Rv. Para el brazo 2, se fusionó parte del cassette "10xGly-GFP-hph" que iba desde una parte de la secuencia que codifica para el marcador de selección hasta el fragmento 3'UTR, resultando en un fragmento de 2120 pb. Finalmente, después de confirmar la integridad del amplicón por electroforesis, cada brazo recombinante se purificó utilizando nuevamente el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (marca), y se cuantificó para conocer la concentración obtenida para llevar a cabo la transformación por electroporación.

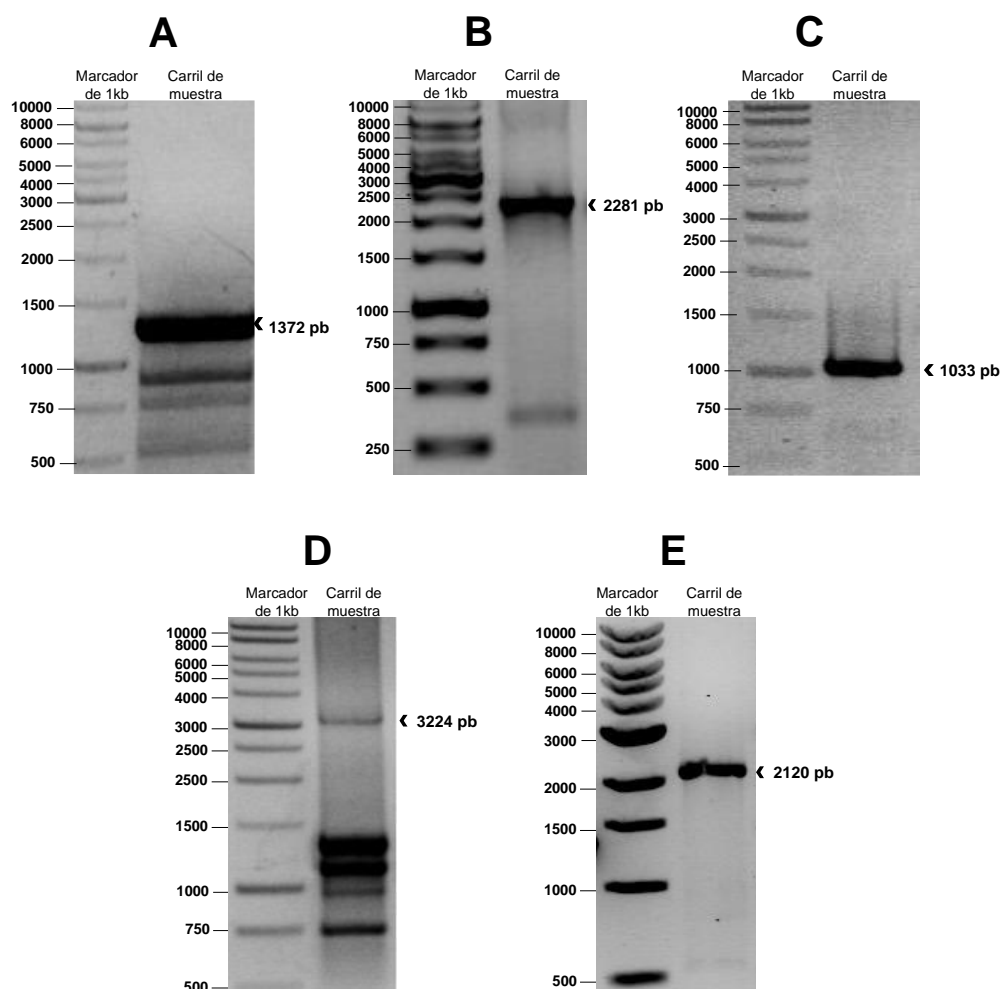


Figura 5. Imágenes de los geles de agarosa con los amplicones esperados para el etiquetamiento de LST-1. A) Fragmento 5' de *lst-1*, de 1372 pb. B) Cassete "10xGly-GFP-hph" de 2281 pb. C) Fragmento de región flanqueante 3' de *lst-1* de 1033 pb. D) Fusión del fragmento 5' de *lst-1* con un fragmento parcial del casete "10xGly-GFP-hph", que genera un brazo recombinante de 3224 pb. E) Fusión de un fragmento parcial del casete "10xGly-GFP-hph", con el fragmento 3' de *lst-1*, que genera un brazo recombinante de 2120 pb. En cada pocillo del gel se cargaron de 3-50  $\mu$ L de muestra.

### 2.3.1 Transformación por electroporación de *N. crassa*

Se utilizaron  $29 \times 10^6$  conidios de la cepa SMRP24, que fueron previamente lavados cuatro veces con sorbitol 1 M, y finalmente resuspendidos en 60  $\mu$ L. Posteriormente, se añadieron 10  $\mu$ L del ADN recombinante (400 ng de cada brazo obtenido por PCR de fusión) a la suspensión de conidios mezclando suavemente sobre la superficie. Se depositó toda la suspensión de conidios en una celda de electroporación, estéril, con ranura de 2 mm, de 1 mL de volumen (fue previamente enfriada en hielo). Se colocó la celda en la cámara de pulso del electroporador (Gene Pulser Xcell Electroporation Systems) para ejecutar el pulso eléctrico con la configuración siguiente: 600 Ohms, 25  $\mu$ FD y 1.5kV, esperando un pulso de 12-14 milisegundos. Inmediatamente después del pulso, se agregó 1 mL de sorbitol 1 M y se incubó a 30°C en rotación suave durante 3 horas.

Se realizó el mismo procedimiento para la cepa WT (SMRP13) que se utilizó como C-, y a la cual se le agregaron 10  $\mu$ L de agua HPLC en lugar de ADN recombinante. Después del tiempo de recuperación, se sembró la suspensión de conidios transformados en placas con medio FGS (Fructosa-glucosa-sorbosa) adicionado con higromicina (0.5 mg/mL) como marcador de selección, y con histidina (0.25 mg/mL) debido a que la cepa parental era auxótrofa, es decir, que requiere histidina en el medio para crecer debido a que no es capaz de sintetizarla porque el gen *his-3*, que codifica la enzima necesaria para la síntesis de histidina, está mutado. Se incubaron a 30°C por 3 días, que fue el tiempo tras el cual se observó crecimiento de colonias.

Finalmente, se seleccionaron un total de 30 colonias en tubos que contenían 500  $\mu$ L de MMV sólido adicionado con el marcador de selección e histidina y se incubaron a 30°C hasta obtener conidios. Por último, se sembraron en placas Petri inóculos de los conidios transformados resistentes a higromicina para realizar la selección por microscopía confocal de barrido láser de aquellas cepas con fluorescencia.

### 2.3.2 Fusiones celulares

Para los ensayos de co-expresión, en matraces con 50 mL de MMV líquido, se inocularon en una relación 1:5, conidios de dos cepas etiquetadas con marcadores fluorescentes que se excitan a diferentes longitudes de onda (GFP/mCherry), pero con el mismo tipo de apareamiento. Se incubaron durante 24 horas a 150 rpm en oscuridad a 30°C. Pasado el tiempo de incubación, una porción del micelio generado se colocó en una placa Petri con MMV sólido al 1.5%, y se incubó a 30°C durante 12 horas. Finalmente, se realizó el análisis de la co-expresión por microscopía confocal de barrido láser.

### 2.3.3 Comprobación de fluorescencia por microscopía confocal

Para la selección de muestras por microscopía, se utilizó un microscopio invertido Olympus Fluoview FV1000 equipado con láser de argón para excitar a la proteína GFP (Excitación: 488 nm, emisión: 507), y por medio de la técnica de agar invertido (Hickey et al., 2004) se montaron las muestras a observar. Se utilizó el objetivo 60x plan apocromático. Para la obtención de imágenes se utilizó el software FLUOVIEW FV10-ASW (versión 4.0.2.9) y el programa Fiji Image J version 2.1.0/1.53c para el procesamiento y análisis.

## 2.4 Western blot de ERV-14-GFP

### 2.4.1 Extracción de ERV-14-GFP

Para verificar la expresión de ERV-14-GFP, se analizaron por Western blot (WB) el lisado de la cepa SMRP432 (cepa homocarión), así como de la cepa WT (SMRP13) como control negativo (C-) y de la cepa expresando GFP citosólica (SMRP495) como control positivo (C+). Se inocularon  $8 \times 10^6$  conidios de una suspensión de conidios concentrada de cada cepa, en matraces que contenían 100 mL de MMV líquido, y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 16 horas a 150 rpm de agitación. El micelio se recuperó por filtración al vacío, utilizando filtro Whatman de 1 mm. Posteriormente, el micelio recuperado se congeló con nitrógeno líquido, y se pulverizó con ayuda de un mortero, hasta obtener un polvo muy fino. En un tubo Falcon se depositó el micelio pulverizado y se agregó buffer de lisis frío (5.0 mM Tris-HCl p.H. 7.4, 2.0 mM EDTA, e inhibidores de proteasas (Thermo Scientific™ Pierce™, EDTA free, 1 pastilla para 50 ml de buffer), 1 mL por mL de micelio pulverizado.

La mezcla se homogeneizó por agitación suave a 4°C por 30 minutos, y se verificó la ruptura celular en un microscopio óptico. Para obtener el lisado total, se centrifugó el homogenizado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Falcon utilizando una pipeta de vidrio. Posteriormente, con la finalidad de obtener la fracción microsomal, una parte del lisado total se centrifugó a 20,000 x g por 30 minutos a 4°C. El pellet se almacenó a -20°C. El sobrenadante se centrifugó a 100,000 x g a 4°C durante 45 minutos. El sobrenadante y el pellet se colectaron por separado y se almacenaron a -20°C. El pellet que se obtuvo de la última centrifugación corresponde a la fracción microsomal. Todas las muestras obtenidas de la centrifugación diferencial se cuantificaron por el método de BSA utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce de Thermo Scientific.

#### 2.4.2 SDS-PAGE e inmunodetección de ERV-14-GFP

Para la electroforesis, se hicieron geles de poliacrilamida al 12%. Se utilizó el buffer de corrida 1x (Tris base, glicina, SDS, pH 8.3) para el corrimiento en la cámara, y buffer de carga Laemmli 2X adicionado con  $\beta$ -mercaptoetanol, como buffer de carga desnaturizante para las muestras. La preparación de las muestras consistió en mezclar 30-50  $\mu$ g de cada muestra, con el buffer de carga en relación 1:1 en volumen, e incubar por 15 minutos a 55°C. En cada pocillo del gel se cargaron 25  $\mu$ L de muestra y las condiciones de corrida de los geles fue de 200 V por 45 minutos o hasta que las marcas del buffer llegaron al extremo inferior del gel. Después de cada electroforesis, los geles corridos fueron enjuagados con agua destilada por 5 minutos en agitación suave. En cada electroforesis se cargaron dos geles, uno posteriormente fue teñido con 50 mL de colorante Azul de Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250), durante 1 hora en agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con agua destilada por 5 minutos, para finalmente ser observado en el fotodocumentador (Sistema de imágenes iBright FL1500). Por otra parte, el otro gel fue transferido una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual se caracteriza por ser altamente eficiente para la retención de proteínas- La membrana fue previamente activada en metanol durante 1 minuto y 15 minutos en buffer de corrida 1x. La transferencia a la membrana se llevó a cabo utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo de Bio-rad, con los siguientes ajustes: 2.0 A, 20 V, y 20 minutos.

Una vez realizada la transferencia, se bloqueó la membrana con 20 mL de la solución bloqueadora (1 g de leche "Non Fat Dry", en buffer TBS-T (Buffer salino con Tris, 0.1% Tween 20) 1X) durante 1 hora en agitación suave. La membrana se lavó tres veces con 20 mL de TBS-T 1X en agitación, durante 5 minutos cada lavado. Para la inmunodetección, se incubó la membrana con 10 mL de la solución que contenía el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 (10  $\mu$ L de anticuerpo Mouse monoclonal IgG2a Anti-GFP 200  $\mu$ g/mL de Santa Cruz Biotechnology, 0.5 g de BSA, y TBS-T 1X), durante 12 horas a 4°C en agitación suave. Nuevamente se realizaron tres lavados con 20 mL de TBS-T 1X. A continuación, se incubó la membrana con 10 mL de la solución que contenía el anticuerpo secundario diluido 1:5000 (2  $\mu$ L de anticuerpo Anti-Mouse-HRP 0.8 mg/mL de Invitrogen, y TBS-T 1X). Por último, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X.

Para la detección luminiscente, se utilizó el kit "Thermo Scientific Supersignal™ West Pico Plus" como sustrato quimioluminiscente, mezclando 2 mL del reactivo A con 2 mL del reactivo B, en condiciones de oscuridad. Se incubó la membrana en la solución durante 5 minutos, y se reveló en el fotodocumentador (Sistema de imágenes iBright FL1500).

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Análisis bioinformáticos

#### 3.1.1 Porcentaje de identidad de las proteínas de cubierta, LST-1 y SEC-24 de *N. crassa*, comparado con sus ortólogas de otros hongos modelo.

LST-1 de *N. crassa* consiste en una secuencia predicha de 1052 aminoácidos. El BLAST realizado en el servidor de NCBI, arrojó que sus ortólogos con los que se comparó son similares en longitud; además, la proteína Sec24B de *M. oryzae*, es con la que comparte mayor porcentaje de identidad (Tabla 4). Este valor no toma en cuenta similitudes fisicoquímicas. Los porcentajes de identidad fueron confirmados con los datos proporcionados por el programa Jalview, al analizar el AMS (Figura 6).

El AMS mostró regiones altamente conservadas (Figura 6) entre las siete secuencias alineadas. Al analizar los dominios de todas las secuencias, se confirmó que las nueve contienen 4 de 5 dominios iguales en cada proteína, que las caracterizan como proteínas de la cubierta de COPII (Figura 7A). Cabe mencionar que, LST-1, MoSec24B y LstA, proteínas ortólogas de hongos filamentosos, contienen un dominio que es ligeramente diferente, el dominio Sec23/Sec24 trunk domain, mientras que las proteínas ortólogas de SEC24 contienen el Sec-24 like domain. La diferencia radica en que Sec24-like domain contiene un motivo conocido como MIDAS, el cual ayuda a la estabilización en la unión a otras proteínas (Craig et al., 2004).

Finalmente, los modelos tridimensionales de la estructura terciaria LST-1 y SEC-24 de *N. crassa* (Figura 7B), mostraron dos proteínas que estructuralmente tienen notables diferencias. La característica más importante es la presencia de mayor cantidad de láminas beta en la estructura de LST-1, mientras que en SEC-24 abundan los espirales alfa hélice. Este tipo de conformación está relacionado con la estabilidad de la proteína. Sin embargo, lo que cabe destacar es que la diferencia estructural de ambas proteínas coincide con el porcentaje de identidad obtenido en la Tabla 4.



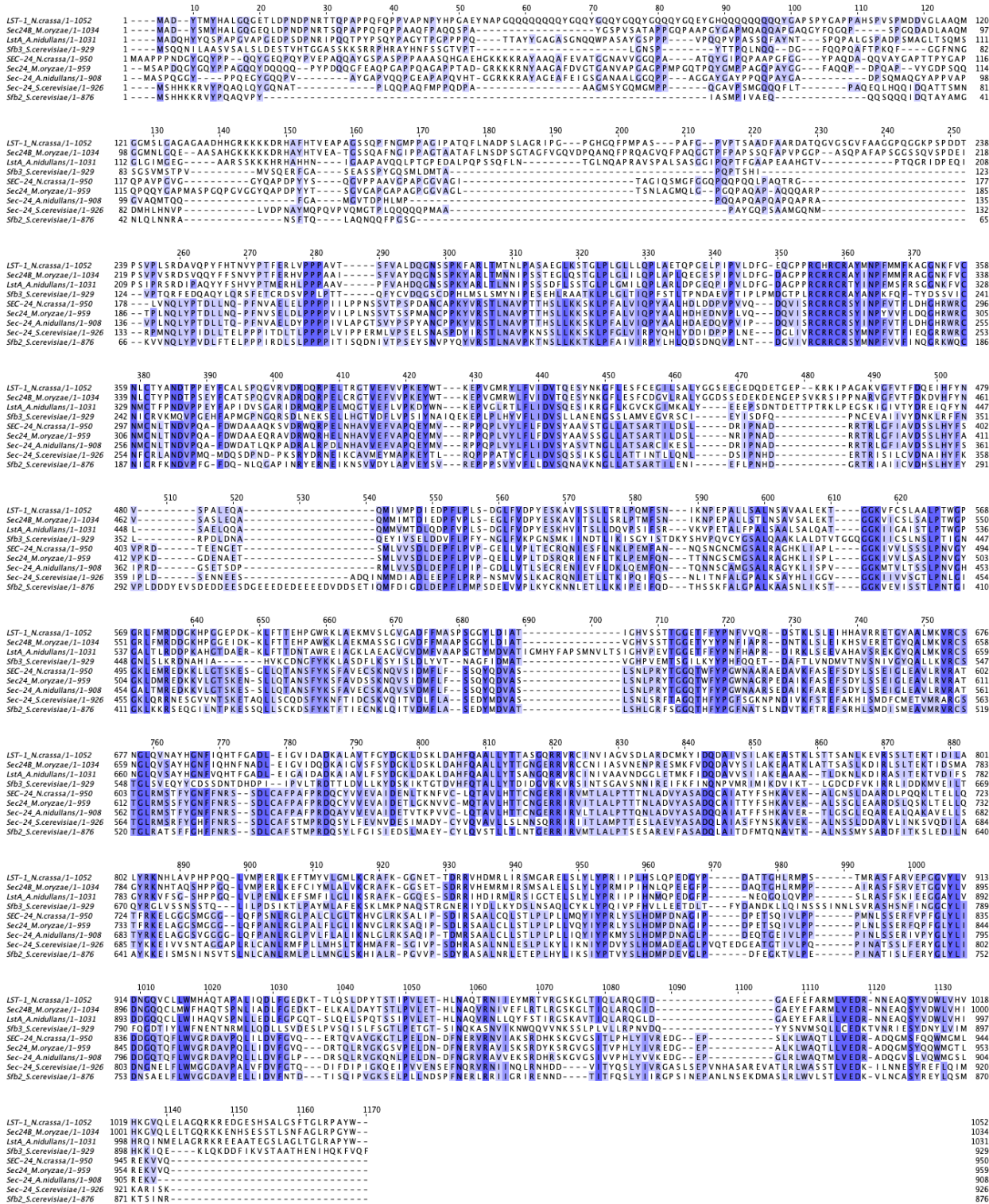
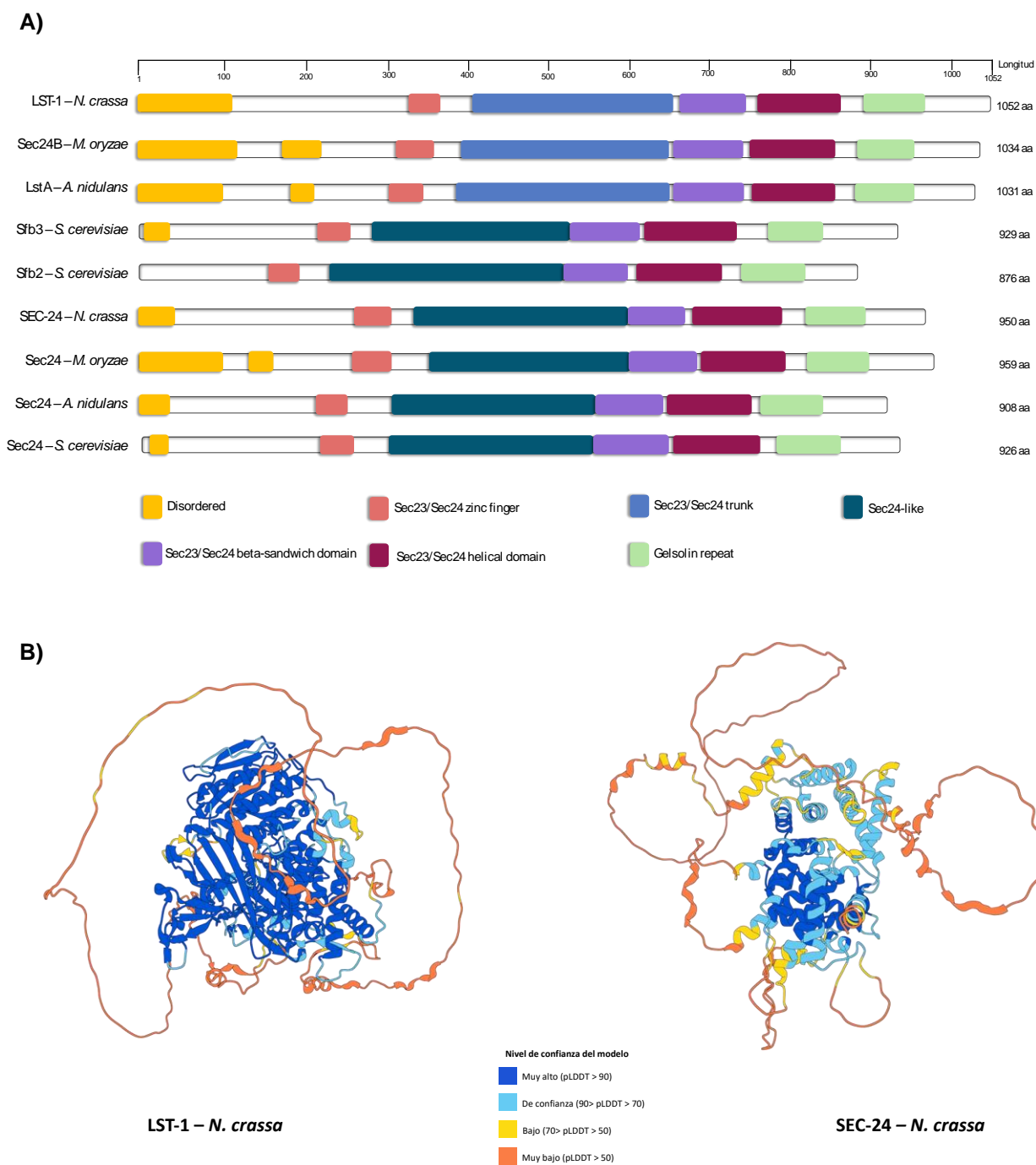


Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de LST-1 de *N. crassa* y sus ortólogos de otras especies. Regiones marcadas en azul hacen referencia a un porcentaje de conservación por encima del 40%.



**Figura 7. Conservación de LST-1 y sus ortólogas, en hongos. A) Representación esquemática de los dominios de LST-1 y sus ortólogas en *S. cerevisiae* y *A. nidulans* B) Modelo de la estructura tridimensional de LST-1 y SEC-24 de *N. crassa*, obtenido de la base de datos de UniProt, generado con AlphaFold. pLDDT es la medida del valor de confianza por residuo generado por AlphaFold, que va de 0 a 100, representado con los códigos de colores.**



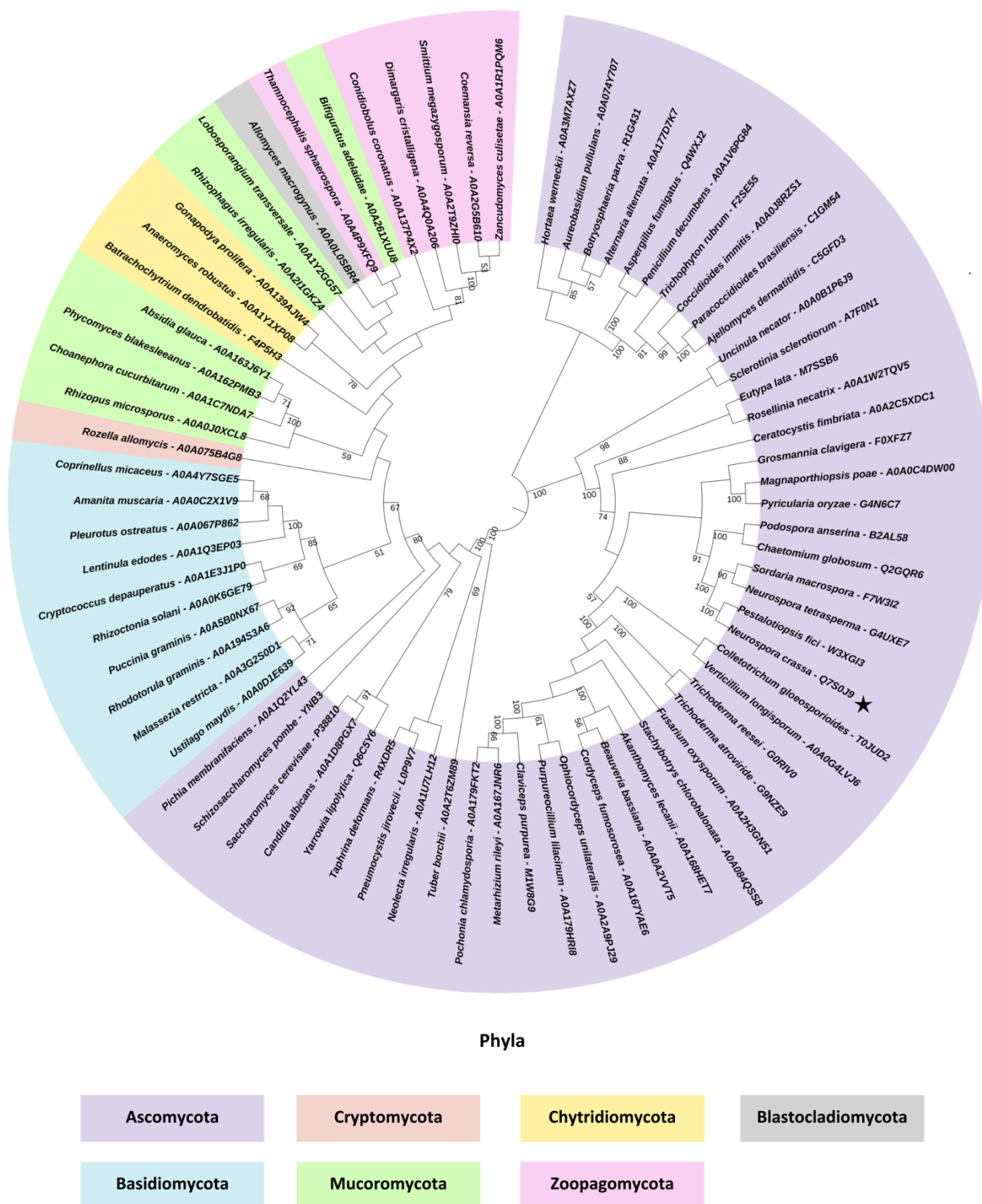
3.1.2 Relación filogenética de LST-1 de *N. crassa* con otras especies de hongos

Figura 8. Árbol filogenético de la proteína LST-1 en hongos. Se muestran 75 especies representativas del reino, y su respectivo Phylum, identificado con color. En las ramas del árbol se muestran los valores en porcentaje de bootstrap, con base en las 1000 replicas realizadas. La estrella señala la ubicación de *N. crassa*.

El alineamiento realizado previamente fue introducido en el servidor de HMMR en busca de las secuencias homólogas a LST-1 dentro del reino fungi. Se encontraron un total de 547 secuencias pertenecientes a 7 Phyla diferentes; Ascomycota, Basidiomycota, Cryptomycota, Mucoromycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota y Blastocladiomycota (Figura 8).

Todas las proteínas encontradas cuentan con el dominio conservado “Sec23/Sec24 beta-sandwich domain” (Pfam PF08033). Con base a InterPro, es un dominio conservado en proteínas que conforman la cubierta de las vesículas COPII, y está formado por 180 residuos, aproximadamente.

El análisis filogenético mostró los valores de Bootstrap mayores al 50% para la mayor parte de Ascomicetos y Basidiomicetos, proporcionando un alto grado de confianza a los datos obtenidos. La ramificación del árbol filogenético (Figura 8) y el alineamiento múltiple de secuencias (Figura 6) sugieren que la secuencia de LST-1 de *N. crassa* está conservada entre hongos ascomicetos filamentosos, principalmente.

Sin embargo, para los grupos basales los valores de Bootstrap no fueron altos, lo que sugiere que la brecha evolutiva reduce considerablemente el nivel de conservación de la estructura de las proteínas homólogas a LST-1.

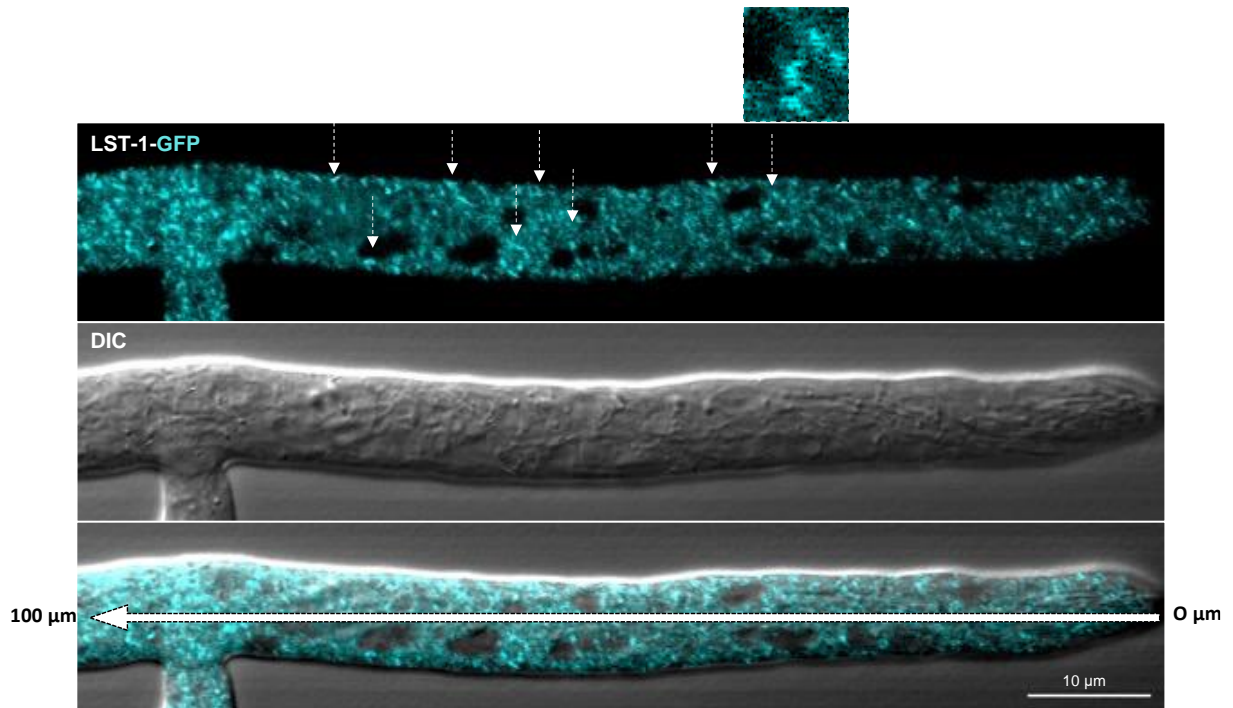
## **3.2 Análisis de la localización y dinámica intracelular de LST-1-GFP**

### **3.2.1 Localización intracelular de LST-1-GFP**

Previo a los análisis por microscopía, se obtuvo una cepa homocarión de LST-1-GFP. Para esto se realizaron cruza sexuales entre la cepa SMRP535 (*mat a; Plst-1::lst-1-10xgly-gfp<sup>+</sup>::hph<sup>+</sup>;Δmus-51::bar<sup>+</sup>*) y la cepa silvestre auxotrófa a histidina SMRP7 (*mat A; wild type; his-3<sup>-</sup>*), siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.1.2.

El análisis por microscopía confocal de barrido laser mostró un patrón de distribución de fluorescencia citoplasmática punteada, con una particular acumulación de puntos cerca a los núcleos, ausencia de señal en el Spitzenkörper y con una mayor señal fluorescente en zonas distales, correspondientes a las regiones II y III de la hifa (Figura 9).

A)



B)

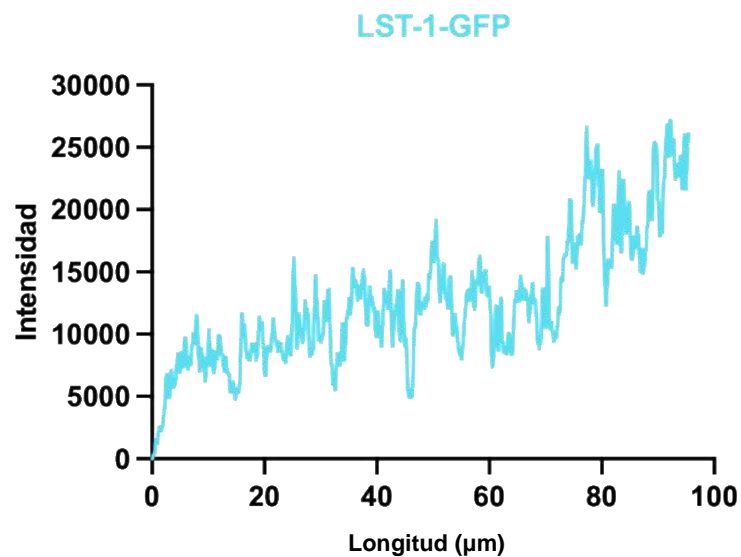
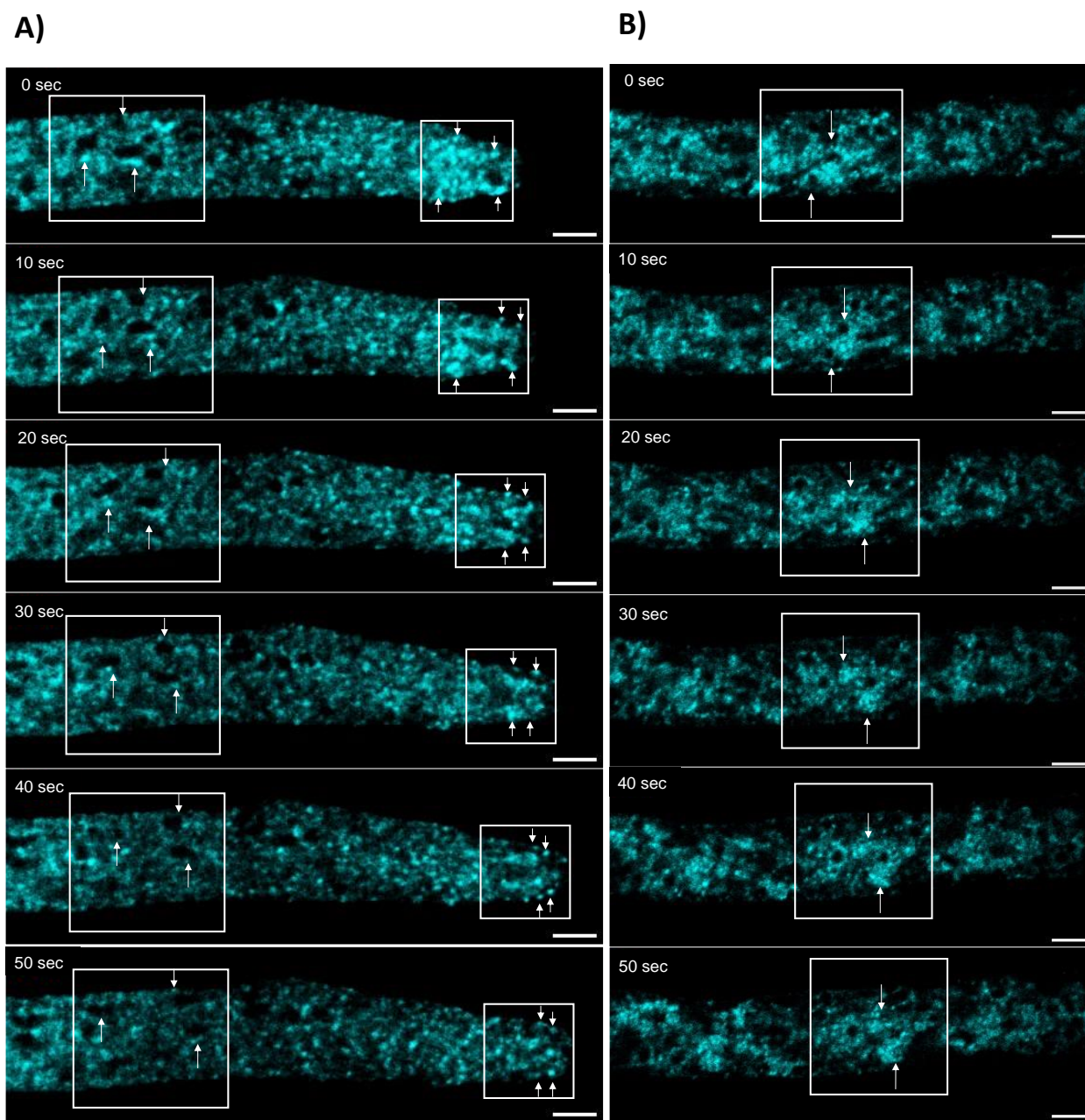


Figura 9. Distribución de LST-1-GFP en una hifa de *N. crassa*. A) Arriba- Micrografía de microscopía confocal de barrido láser, mostrando la distribución intracelular de LST-1-GFP en *N. crassa*. Las flechas indican los puntos con mayor expresión de señal fluorescente, cerca de los núcleos, y que podrían corresponder a acumulación de LST-1-GFP en sitios de salida del RE. Cuadro flotante muestra un acercamiento a unas de las regiones señaladas con flechas. En medio- Micrografía de microscopía de contraste de inferencia diferencial (DIC), donde se pueden observar estructuras intracelulares de la hifa, sin un marcador fluorescente. Abajo- Traslape de DIC con la fluorescencia de LST-1-GFP para contrastar con los núcleos de la célula, principalmente. La flecha sobre la hifa muestra la región que se midió y la dirección del valor de intensidad de fluorescencia B) Gráfica de la intensidad de la señal de LST-1-GFP a lo largo de una hifa, donde se observa aumento de la intensidad de la señal a partir de los 20  $\mu\text{m}$ , que corresponde a la región II.



**Figura 10.** Serie de tiempo de la dinámica intracelular de LST-1-GFP en una hifa de *N. crassa*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de disco giratorio (Spinning disk). A) Zona apical: se observa expresión en forma de puntos en estructuras apicales y dinámicas, que rodean el SPK. B) Zona distal: se observan fluorescencia en forma de puntos en estructuras que rodean los núcleos de la hifa. Barra de 10  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, se analizó la dinámica intracelular de LST-1-GFP con microscopía confocal de disco giratorio (Figura 10, Anexos A y B). Al igual que en la microscopía confocal de barrido láser, LST-1-GFP se observó con una distribución citoplasmática a lo largo de la hifa, pero expresándose con mayor intensidad punteada en zonas muy cercanas a los núcleos, y moviéndose en sincronía con ellos, conforme crecía la

hifa. Sin embargo, a diferencia de la microscopía de barrido láser, se pudo observar señal intensa de LST-1-GFP en zonas cercanas a la zona de crecimiento, dentro de estructuras que rodeaban el ápice (Figura 10A). También se analizó a LST-1-GFP en zonas distales, y se observó con mayor claridad, gracias a la mejor resolución temporal del microscopio, el movimiento de estructuras que rodean a los núcleos, y en ellas puntos fluorescentes muy dinámicos, que también se movían siguiendo a los núcleos (Figura 10B, Anexo B), y algunos puntos eventualmente se movían hacia diferentes regiones dentro de la hifa. Algunos viajaban a zonas corticales, y algunos hacía zonas más distales, aunque también se observó que algunos otros viajaban hacia adelante.

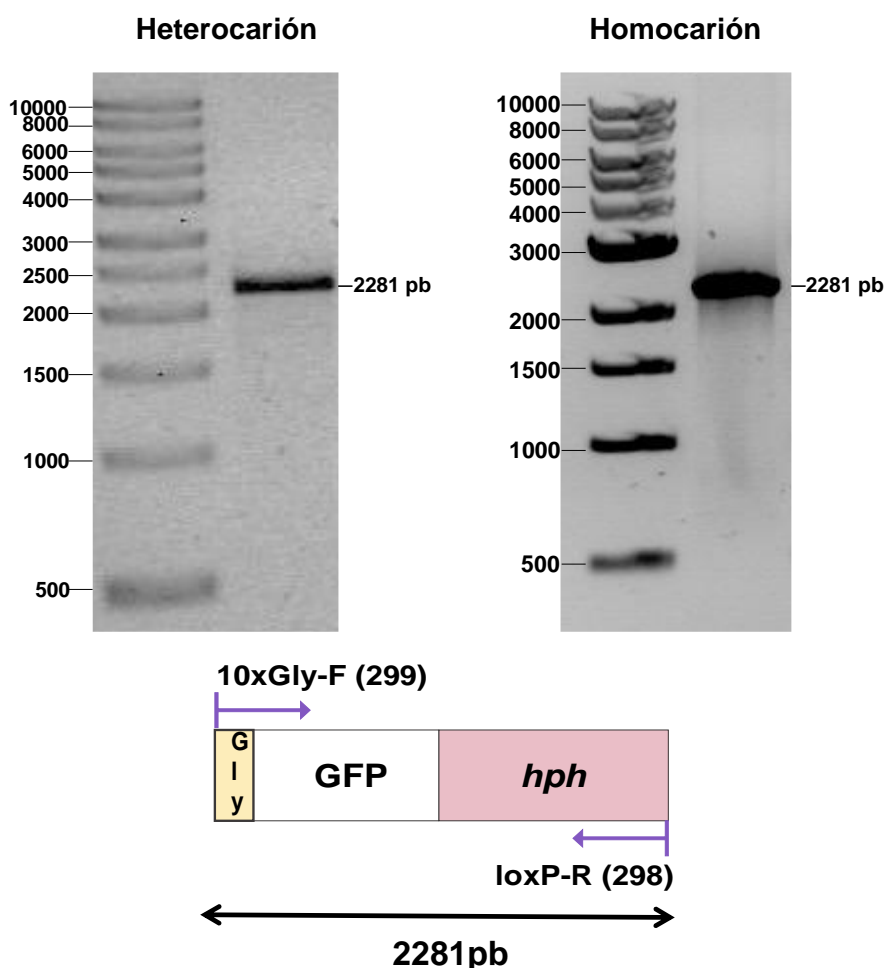


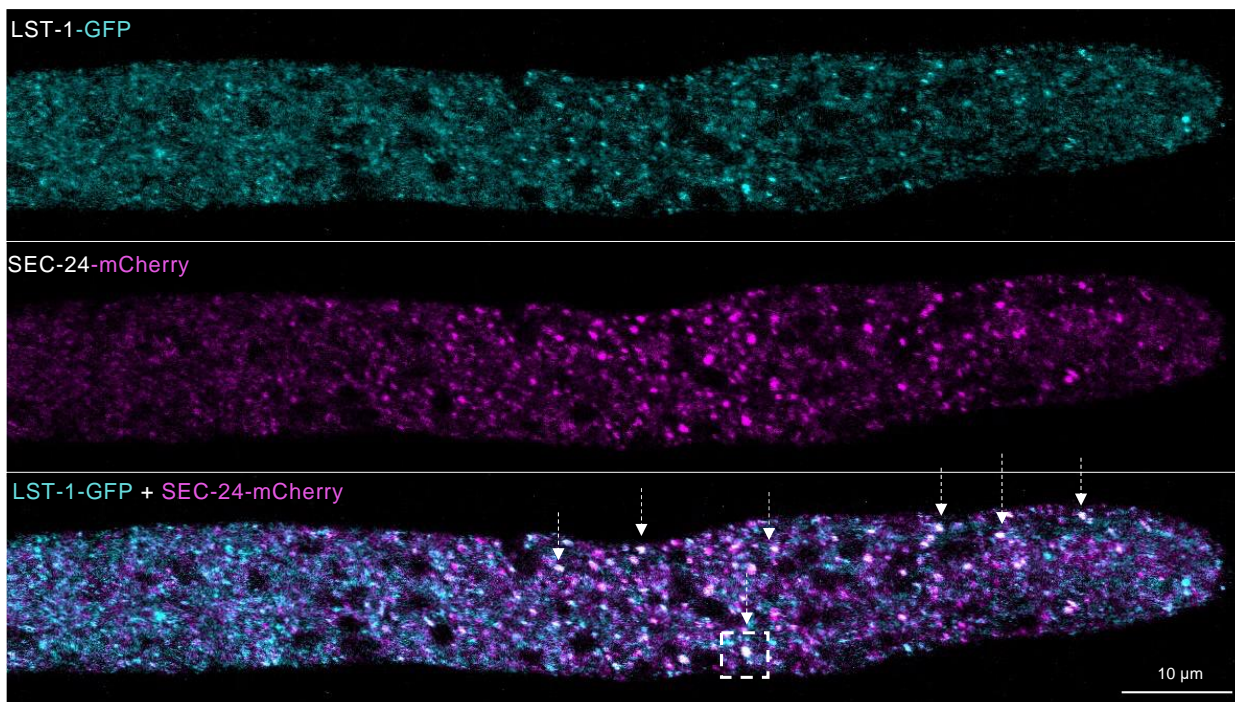
Figura 11. Comprobación molecular de LST-1-GFP. Imágenes de los amplicones de la comprobación por PCR del fragmento recombinante que corresponde al cassette completo de GFP-hph en el genoma de *N. crassa* de las dos cepas de LST-1-GFP. El tamaño del fragmento es de 2281 pb.

Se realizó la comprobación molecular por PCR de ambas cepas para confirmar la correcta inserción del gen *lst-1* unido a *gfp-hph*, en el genoma de *N. crassa*. En la figura 11 se muestran los geles de electroforesis con las bandas que corresponden a las 2281 pb del cassette completo “10xGly-GFP-hph”.

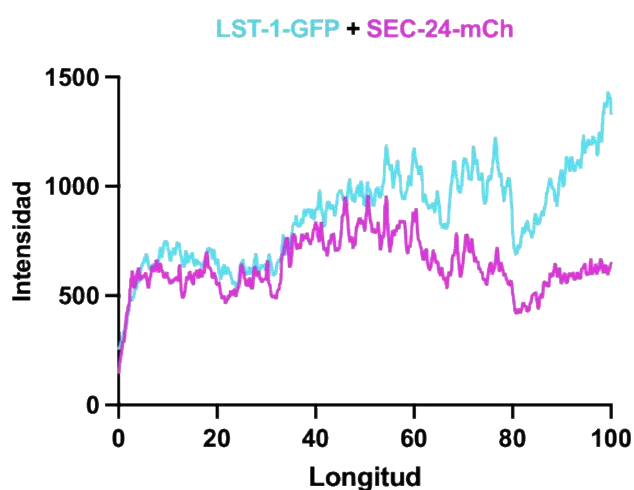
### 3.3 Caracterización de la localización intracelular de LST-1 durante la formación de vesículas COPII

#### 3.3.1 LST-1 y SEC-24 co-localizan parcialmente en regiones subapicales

A)



B)



C)

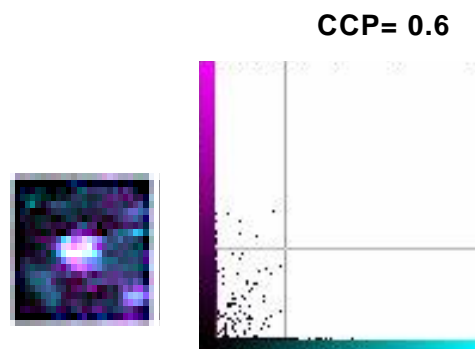


Figura 12. Co-expresión por fusión de LST-1-GFP con SEC-24-mCherry. A) Micrografía de microscopía confocal de barrido láser de la co-expresión de LST-1-GFP y SEC-24-mCherryFP. Las flechas indican las zonas donde se observó co-localización entre ambos marcadores. El cuadro blanco indica la región donde se midió el Coeficiente de Correlación de Pearson. B) Gráfica de la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas con su respectivo fluoróforo, a lo largo de la hifa. C) Análisis del Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 indica co-localización absoluta.

Con la finalidad de determinar si LST-1 se localiza en los sitios ERES del RE, se co-expresó a LST-1-GFP con el marcador putativo de COPII, SEC-24-mChFP fusionando la cepa heterocarión de LST-1-GFP con la cepa heterocarión de SEC-24-mChFP. SEC-24 mostró un patrón de fluorescencia similar a LST-1, es decir, fluorescencia citoplasmática con acumulación en puntos más cercanos a núcleos (Figura 12A).

Además, tanto SEC-24-mChFP como LST-1-GFP mostraron acumulación de fluorescencia en regiones subapicales, aunque se observó mayor cantidad de puntos fluorescentes subapicales de SEC-24 que de LST-1.

Por lo tanto, el traslape de expresión mostró co-localización en zonas correspondientes al sub-ápice distal de la hifa, donde hay mayor acumulación de fluorescencia en forma de puntos más grandes (Figura 12B, Anexo D).

Las regiones de co-localización se caracterizan por estar muy cerca de núcleos acumulados en esa región, lo cual sugiere que la acumulación de fluorescencia corresponde a sitios de salida de vesículas del RE, y que la co-localización puede corresponder a vesículas formadas por ambas proteínas de cubierta, o por una exportación “masiva” de vesículas debido a la cantidad de núcleos y RE colindando en esa región.

### 3.3.2 LST-1 no co-localiza con NCA-1

Con el objetivo de caracterizar si LST-1-GFP co-localiza con el RE en hifas de *N. crassa*, se co-expresó LST-1-GFP con una cepa de *N. crassa* que expresa a NCA-1 etiquetada con dsRED (Bowman et al., 2009). NCA-1 es una ATPasa del tipo SERCA, transportadora de iones de calcio y residente del RE y de la envoltura nuclear (Bowman et al., 2009).

Se analizó la co-expresión de LST-1-GFP y dsRED-NCA-1 por medio de microscopía confocal de barrido láser, resultado de las cruza sexuales entre ambas cepas. En cuanto a la distribución de la señal, ambos fluoróforos se expresaron con mayor intensidad a partir de la región subapical, NCA-1 rodeando a los núcleos, como parte de la envoltura nuclear, mientras que LST-1 se acumulaba en regiones cercanas a NCA-1 pero sin co-localizar (Figura 13).

Esto se confirmó con la gráfica de la intensidad de la fluorescencia (Figura 13B), que muestra un aumento de la intensidad a partir de los 60  $\mu\text{m}$ . Finalmente, al realizar el análisis de correlación de Pearson para verificar co-localización, el valor obtenido de 0.1 indico la ausencia de co-localización (Figura 13C).

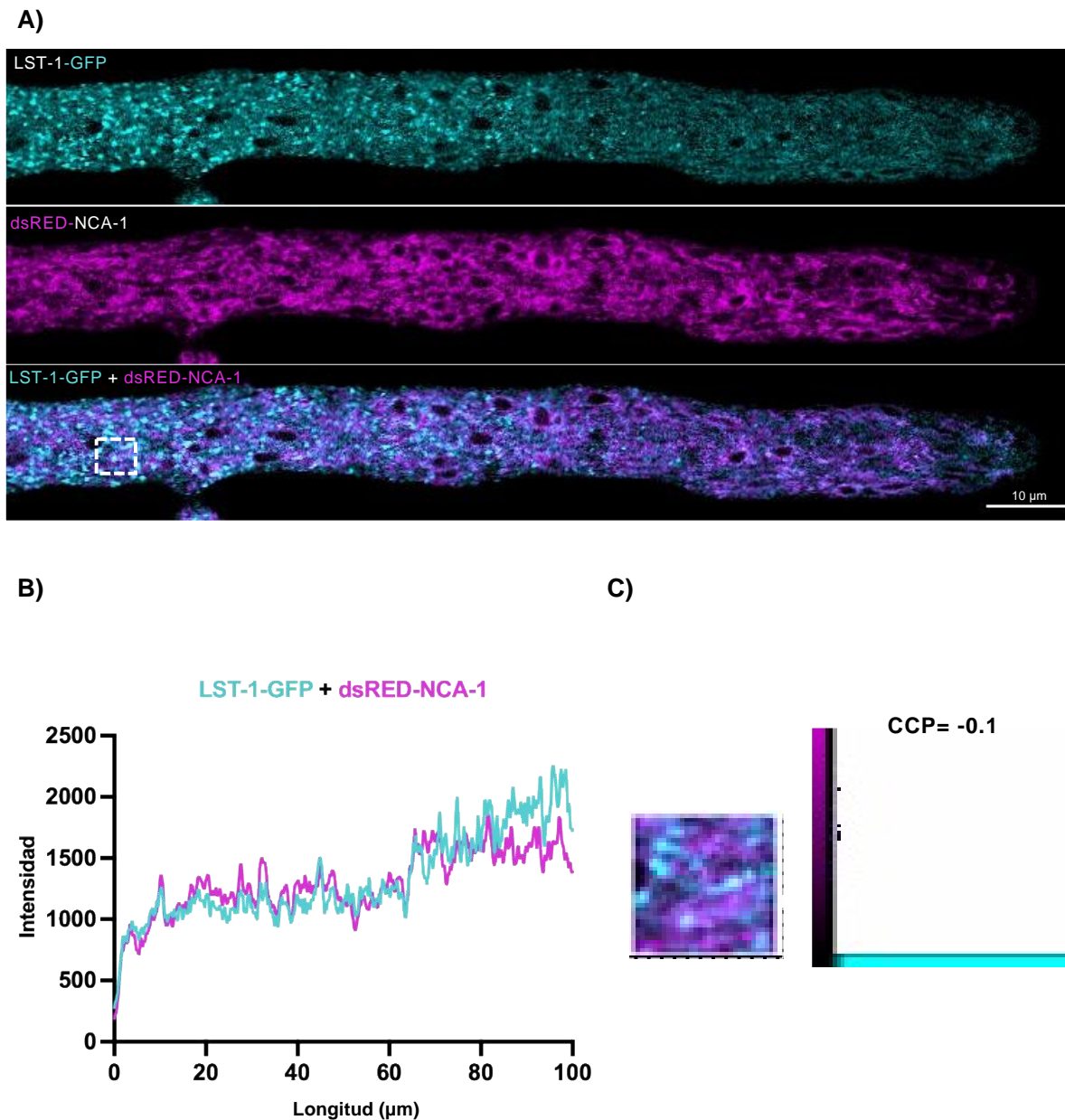


Figura 13. Co-expresión de LST-1-GFP y dsRED-NCA-1. A) Micrografía de microscopía confocal de barrido laser de la co-expresión de LST-1-GFP y dsRED-NCA-1. El cuadro con línea discontinua blanca indica la región donde se midió el Coeficiente de Correlación de Pearson. B) Gráfica de la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas con su respectivo fluoróforo, a lo largo de la hifa. C) Análisis del Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 indicaría co-localización absoluta.

### 3.4 Elucidación de la ruta de tráfico vesicular de LST-1 en *N. crassa*

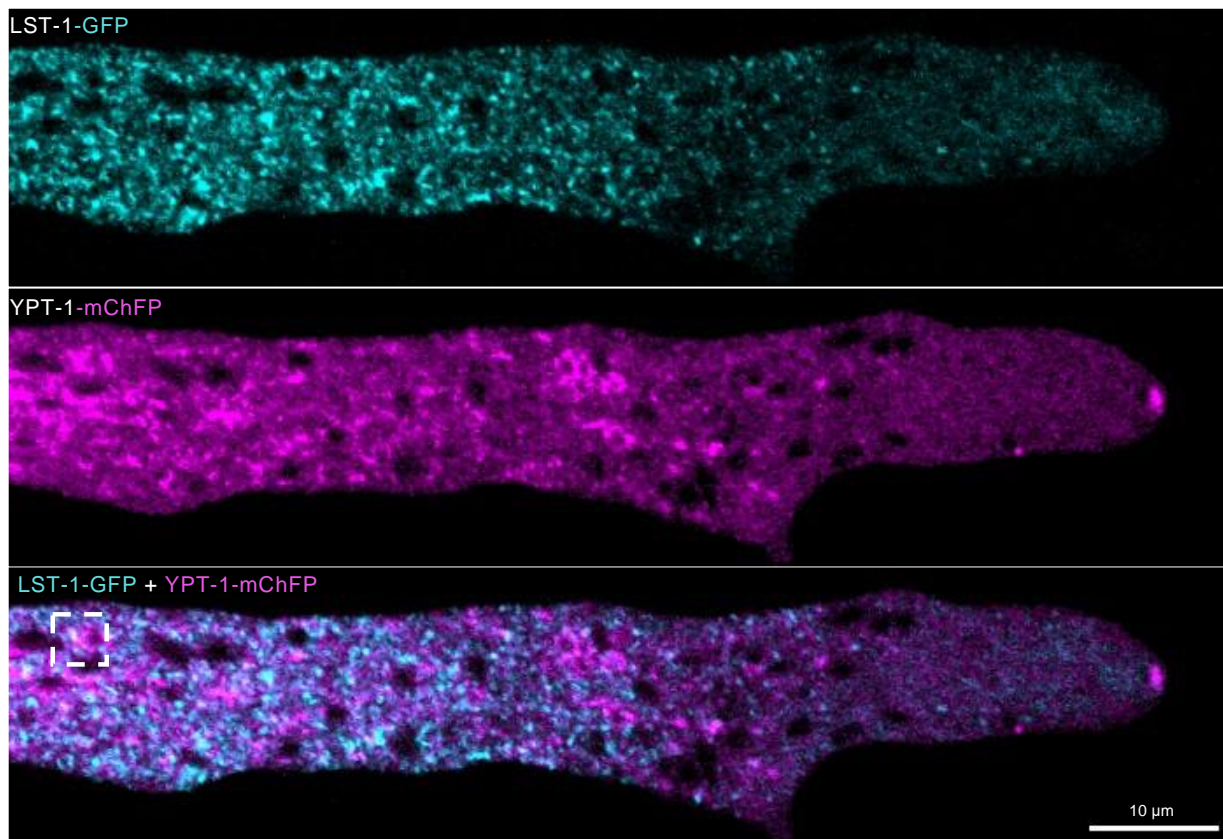
#### 3.4.1 LST-1 no co-localiza con el marcador de cisternas de Golgi, mCHFP-YPT-1

Con la finalidad de caracterizar la ruta de transporte que siguen las vesículas COPII que contienen en su

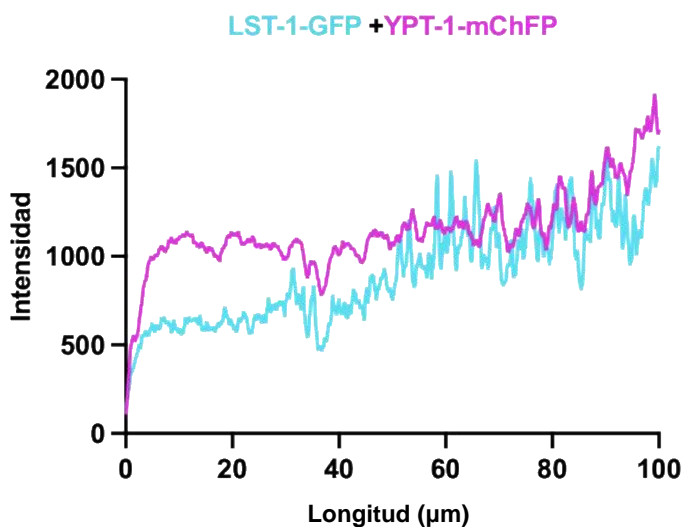


cubierta a LST-1, se llevaron a cabo ensayos de co-expresión entre LST-1-GFP y mCherry-YPT-1.

A)



B)



C)

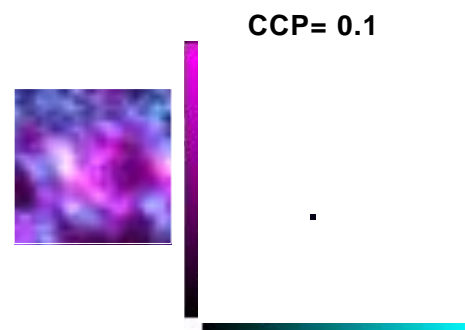


Figura 14. Co-expresión de LST-1-GFP y YPT-1-mChFP. A) Micrografía de microscopía confocal de barrido laser de la co-expresión de LST-1-GFP y mCherryFP-YPT-1. El cuadro de línea discontinua blanca indica la región donde se midió el Coeficiente de Correlación de Pearson B) Gráfica de la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas con su respectivo fluoróforo, a lo largo de la hifa. C) Análisis del Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 indica co-localización absoluta.

YPT-1 es una proteína GTPasa, ortóloga de la proteína Rab1 en mamíferos, y pertenece a la familia de proteínas Rab, las cuales están implicadas en la regulación del tráfico vesicular (Sánchez-León et al, 2015). YPT-1 en *N. crassa* ha sido reportada como una proteína asociada a las cisternas de Golgi y a las microvesículas del Spitzenkörper, y se ha confirmado su participación en el tráfico vesicular (Sánchez-León et al., 2015).

La microscopía de las co-expresiones mostró que no había co-localización entre ambas proteínas (Figura 14A), lo cual se confirmó con el análisis del CCP, donde el valor promedio entre todas las réplicas fue de 0.2 (Figura 14C). A pesar de que de manera individual ambas proteínas tienen mayor intensidad de fluorescencia en regiones distales al ápice, el traslape entre ambas muestra claramente como las regiones de acumulación de LST-1 no son las mismas regiones de acumulación de YPT-1, la cual se acumula en las regiones del Golgi temprano.

### **3.5 Localización de LST-1 y ERV-14 durante la formación de vesículas COPII**

#### **3.5.1 LST-1 no co-localiza con el receptor de cargas ERV-14**

Con la finalidad de confirmar si ERV-14 se encuentra en vesículas cubiertas por LST-1, se realizaron ensayos de co-expresión fusionando la cepa heterocarión de LST-1-GFP con la cepa heterocarión de ERV-14-mChFP (Figura 15). La microscopía confocal mostró buena señal de fluorescencia para las hifas que contenían ambos marcadores fluorescentes, lo que confirmaba que la fusión había sido exitosa.

ERV-14-mChFP, al igual que LST-1-GFP, mostró mayor acumulación en zonas distales, pero formando parte de una red endomembranosa, y ausente casi por completo en el ápice. Sin embargo, no se observó en las muestras analizadas algún patrón de co-localización entre el receptor de proteínas de carga ERV14 y la proteína de cubierta LST-1, confirmado por el coeficiente de correlación de Pearson (CCP) (Figura 15C).

Posteriormente, se analizó la dinámica intracelular de ambas proteínas por medio de microscopía confocal de disco giratorio (Anexo C), donde se pudo observar clara expresión de ambas proteínas, LST-1-GFP distribuida a lo largo de la hifa, mientras que ERV-14-mCherry permanente en regiones distales.

También se observó que LST-1-GFP parece ser más dinámica que ERV-14-mCherry, porque mientras LST-

1 en algunas regiones se desplazaba a otras regiones de la hifa, la expresión de ERV-14 se mantiene rodeando los núcleos, y avanzando conforme crece la hifa. Aunado a estas observaciones, se confirmó la carencia de co-localización, incluso en movimiento.

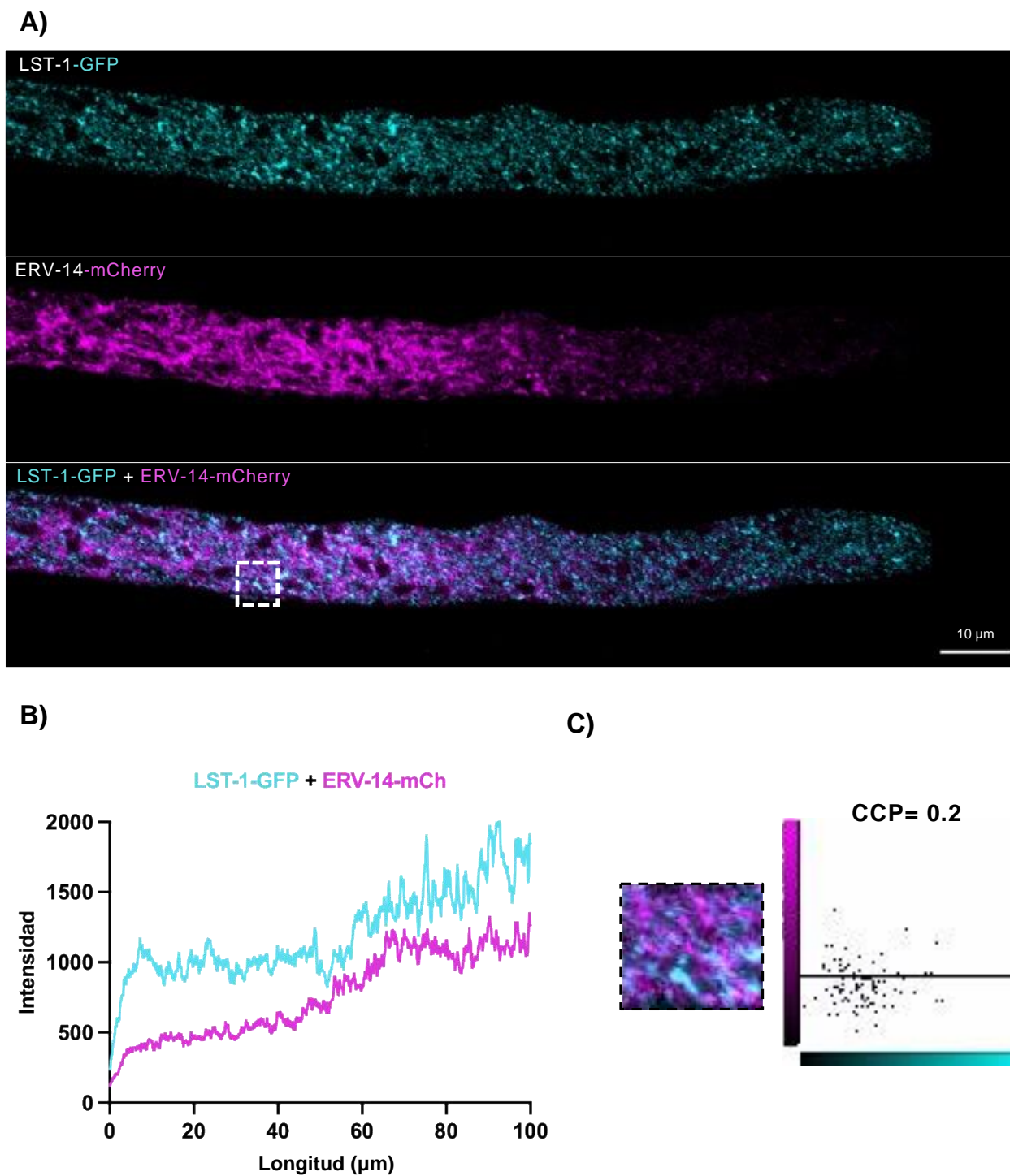


Figura 15. Análisis de la co-expresión de LST-1-GFP y ERV-14-mCherry. A) Micrografía de microscopía confocal de barrido láser de la co-expresión de LST-1-GFP y ERV-14-mChFP. B) Gráfica de la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas con su respectivo fluoróforo, a lo largo de la hifa. C) Análisis del Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 indica co-localización absoluta.

### 3.5.2 Comprobación de ERV-14-GFP en *N. crassa* por Western-blot

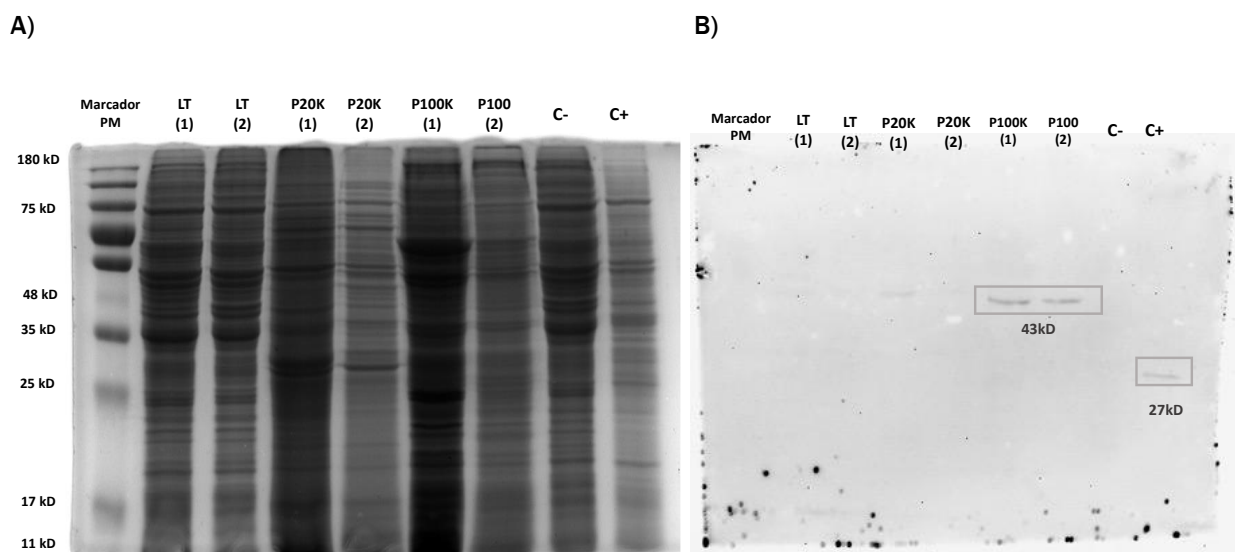
Como se describió en el apartado 2.5, mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) se corrieron las muestras del lisado total extraído de dos cepas de *N. crassa*; N1, cepa silvestre utilizada como control negativo, y la cepa SMRP432 que es homocarión que contiene a ERV-14 marcada con GFP, contrastadas con la cepa SMRP495 como control positivo (C+), dado que contiene GFP citoplasmática. El peso molecular de ERV-14 es de 16 kDa, mientras que el de la GFP es de 27 kDa, por lo que el peso molecular estimado de la proteína marcada con GFP es de 43 kDa.

Durante el proceso de estandarización, se probaron diferentes condiciones para definir el procedimiento adecuado para alcanzar el objetivo de comprobar la presencia de ERV-14-GFP en la cepa SMRP432. Entre las diferentes condiciones que se probaron fueron, dos diferentes medios de cultivos para determinar si había diferencias significativas en la concentración de proteínas extraídas entre uno y otro. También, se consideró el uso de Tritón X-114 como detergente no iónico ya que, al tratarse de una proteína membranal, se buscaba que pudiera ayudar con el rompimiento de membranas. Además, se probaron diferentes concentraciones de anticuerpos, tiempos de incubación durante la inmunodetección, y dos métodos de transferencia a membrana (húmedo y semi-húmedo). Con el uso de los controles positivos se pudo comprobar que el proceso de inmunodetección y revelado no era el problema, dado que al revelar la membrana se obtenía señal del C+, por lo que se consideró que probablemente el problema estaba durante el proceso de extracción de la proteína. Para esto, se consideró hacer un WB exclusivamente del lisado total de las cepas, dado que como se hacía centrifugación diferencial para la extracción, surgió la interrogante sobre la posibilidad de que se estuviera perdiendo a ERV-14 durante este proceso; sin embargo, al finalizar se pudo observar señal del control positivo, pero todavía sin señal de ERV-14-GFP.

Finalmente, considerando el peso molecular de ERV-14-GFP y su abundancia, se decidió triplicar la cantidad de cultivos para la obtención de biomasa. También, se tomó en cuenta el punto isoeléctrico de la proteína (5.89) para verificar si el pH usado en el buffer de extracción era el adecuado, esto con la finalidad de mantener la conformación natural de la proteína durante la extracción.

Además, se tomaron en cuenta las velocidades de centrifugación usadas por Wang y colaboradores (Wang et al., 2017), para obtener la fracción microsomal de *S. cerevisiae*, y las modificaciones al protocolo convencional de inmunodetección realizadas por Kaur & Bachhawat (Kaur & Bachhawat, 2009). Así, finalmente se pudo establecer un protocolo reproducible para poder detectar ERV-14-GFP (Figura 16), descrito en el apartado 2.4.

Para la electroforesis, se utilizó la muestra del lisado total, y el pellet y sobrenadante de cada ultra-centrifugación, tomando en cuenta que el pellet de la última ultra-centrifugación (P-100K) era el que correspondía a la fracción microsomal y lo cual fue confirmado al revelar la membrana, como se observa en la figura 16B.



**Figura 16. Western blot de ERV-14-GFP. A) Gel de la electroforesis SDS-PAGE, donde se corrieron muestras donde se usó buffer de lisis con detergente (CD) y sin detergente (SD). B) Membrana de PVDF que muestra la señal de ERV-14-GFP (43 kD), principalmente en los carriles P-100K (CD y SD), que corresponden a las muestras con la fracción microsomal de *N. crassa*. En los carriles correspondientes se cargaron: 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (Peacock™ Plus Prestained Protein Marker de Biotium) y 25  $\mu$ L de muestra.**

## Capítulo 4.      Discusión

---

El crecimiento en hongos filamentosos requiere el funcionamiento y transporte correcto de proteínas que se integran a la MP y a la pared celular. La ruta secretora es fundamental para el desarrollo de la hifa, y comienza en el RE, el cual es el responsable de sintetizar y plegar proteínas que tienen que ser transportadas a zonas de crecimiento, principalmente. Además, trabajar en conjunto con complejos proteicos como la cubierta de capa COPII, encargada de incorporar una amplia variedad de proteínas recién sintetizadas y correctamente plegadas dentro de vesículas conocidas como COPII. Hasta la fecha, las proteínas de cubierta como Sec24 y los adaptadores de cargas como Erv14 han sido estudiados más en mamíferos y levaduras; sin embargo, aún falta suficiente conocimiento en hongos filamentosos. Por lo tanto, este trabajo se enfocó en caracterizar más a fondo a LST-1, la homóloga/paróloga de SEC-24.

### 4.1.1 LST-1, una proteína conservada en ascomicetos, que se concentra en los sitios de salida del retículo endoplasmático

Se evaluó la distribución de LST-1 mediante microscopía confocal, observando una distribución citoplasmática con un marcado patrón de fluorescencia punteada en regiones cercanas a los núcleos. Este patrón de distribución ha sido previamente documentado para Sec24p en *S. cerevisiae*, por diferentes autores (D'Arcangelo et al., 2015; Iwasaki et al., 2015; Manzano-Lopez et al., 2015; Roberg et al., 1999; Tang et al., 1999), sugiriendo que esta proteína se concentra en diferentes regiones a lo largo del RE. Al analizar su dinámica intracelular con mejor resolución temporal, LST-1 se observó en estructuras que rodeaban los núcleos de la hifa. El movimiento de estas estructuras sugiere que se trata de estructuras membranosas, y que podrían corresponder a RE. Esta teoría toma sentido con lo observado en microscopía de disco giratorio entre LST-1 y ERV-14, a pesar de que no co-localizaron. ERV-14 es una proteína residente del RE, es decir, que forma parte de la membrana del RE. En la microscopía de disco giratorio, se observó a ERV-14 distribuida en estructuras tipo membranosas que rodeaban a los núcleos, lo cual coincide también con lo reportado por Sastré-Velásquez (2018).

En hongos filamentosos, solo se ha caracterizado la distribución y localización intracelular de la ortóloga MoSec24B en esporas de *M. oryzae*, utilizando un marcador del RE (Qian et al., 2023). A diferencia de lo reportado en levaduras y de lo observado en este trabajo, el patrón de distribución variaba un poco. En *M. oryzae* no se observó un patrón de puntos sino de manchas deformes fluorescentes en diferentes lugares de la célula. Pero, del mismo modo, obtuvieron un porcentaje de co-localización con el marcador

del RE muy bajo, lo cual coincide con lo observado en LST-1 en este trabajo. Cabe mencionar, que en el trabajo de Qian y colaboradores (2023), utilizaron un inhibidor del transporte de vesículas COPII vía RE-Golgi, lo que generó la acumulación de MoSec24B en el RE, y entonces así, obtuvieron co-localización significativamente con el marcador del RE.

El patrón de distribución punteado cercano a núcleos ha sido observado para SEC-24 en *N. crassa* (Sastré, 2018) y en sus ortólogos en *S. cerevisiae* (D'Arcangelo et al., 2015; Iwasaki et al., 2015). Además, en las co-expresiones realizadas con LST-1-GFP y SEC-24-mCherry en este trabajo, se observó co-localización parcial. Con esta evidencia podríamos inferir que, 1) la proteína etiquetada con GFP en este trabajo corresponde correctamente a LST-1 como posible isoforma a SEC-24 en vesículas COPII, y 2) que ambas proteínas coinciden en varias regiones cercanas a núcleos dentro de la célula. Se necesitan más experimentos para poder determinar si LST-1 y SEC-24 podrían estar viajando en la misma subpoblación de vesículas COPII, y que por eso haya co-localización sólo en algunas regiones, pero cabe destacar que esto ya ha sido demostrado en *S. cerevisiae* (D'Arcangelo et al., 2015; Shimoni et al., 2000)

Adicionalmente, algunos aspectos a considerar son, que en *A. nidulans* se demostró que LstA, desempeña un papel fundamental en el transporte de la proteína de MP y la bomba de protones PmaA hacia la MP, sin pasar por el Golgi (Dimou et al., 2022). En *S. cerevisiae* se ha demostrado que Lst1p/Sfb3 es necesaria para el transporte correcto de Pma1 (D'Arcangelo et al., 2015). A pesar de que en este trabajo no experimentamos con proteínas de carga, la falta de co-localización de LST-1 con NCA-1, la ATPasa residente de la envoltura nuclear, pero la co-localización parcial con SEC-24, nos permite sugerir que, la acumulación de fluorescencia en forma de puntos observada en la microscopía en las estructuras que rodeaban los núcleos corresponde a los sitios ERES del RE. Sin embargo, al parecer su interacción con el RE es inmediata, lo cual no permite que se observe co-localización con marcadores putativos del RE, como ERV-14.

Por último, tanto el AMS como el análisis filogenético ayudaron a confirmar que LST-1 está conservada en Ascomycetos, y es idéntica estructuralmente a MoSec24B de *M. oryzae*, comparado con los otros hongos analizados. Esto es interesante, debido a que el trabajo de Qian y colaboradores (2023), se muestra que la función de las ortólogas de LST-1, en hongos filamentosos, a lo mejor no se limita solamente al transporte de cargas, sino que indirectamente puede estar involucrada en más funciones vitales para el hongo.

Aunque se debe considerar que *M. oryzae* es un organismo fitopatógeno y *N. crassa* no, también harían falta más experimentos para caracterizar exhaustivamente la función de LST-1, como lo hicieron con *M. oryzae*. Sin embargo, su alto nivel de identidad con *N. crassa* abre la interrogante de si en hongos

filamentosos LST-1 y ortólogas pueden ser esencial para la supervivencia del hongo, lo cual es diferente en levaduras.

#### 4.1.2 ERV-14 y LST-1 viajan en diferentes sub-poblaciones de vesículas COPII

El análisis de la co-expresión por microscopía confocal de LST-1-GFP y de ERV-14-mChFP no reveló co-localización entre ambas proteínas, a pesar de estar principalmente distribuidas en regiones subapicales. En *A. nidulans*, se ha demostrado que Erv14 es esencial como receptora de cargas para el transporte de Pall, una proteína de MP, reguladora de la respuesta al pH. En este contexto, la ausencia de LstA no afecta su transporte (Dimou et al., 2022). Además, en *S. cerevisiae* se ha evidenciado la afinidad que algunas proteínas receptoras de cargas, pertenecientes a la familia p24, tienen por las vesículas COPII formadas por Lst1p/Sec23p, para transportar cargas GPI-APs (D'Arcangelo et al., 2015; Manzano-Lopez et al., 2015; Miller et al., 2002).

Al mismo tiempo, se ha demostrado que Erv14 es un receptor de cargas para un conjunto selecto de proteínas transmembranales (Herzig et al., 2012; Powers & Barlowe, 1998, 2002). Sin embargo, aún queda abierta la interrogante sobre lo mostrado por Sastré-Velásquez, 2018, donde ERV-14 (cni) co-localizó sólo parcialmente con SEC-24.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que Lst1p puede unirse a receptores de carga de la familia p24. Por ejemplo, para la incorporación de cargas como Gas1p u otras proteínas de anclaje GPI, se requiere de proteínas de la familia p24, como Emp24p, que a su vez se une a Lst1p para incorporarlas a las vesículas COPII (Castillon et al., 2009; Miller et al., 2003). Sin embargo, aún no hay evidencia de la interacción entre LST-1 y ERV-14 y sus homólogos en *N. crassa*.

Con base en la literatura, se ha demostrado que las ortólogas de ambas proteínas LST-1 y ERV-14 están involucradas en el transporte de cargas transmembranales, pero la poca evidencia científica más los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que ambas proteínas viajan en diferentes subpoblaciones de vesículas COPII.

#### 4.1.3 LST-1 podría estar siguiendo una ruta de tráfico vesicular no convencional

Al analizar la co-expresión de LST-1-GFP y mChFP-YPT-1, la ausencia de co-localización generó sospecha



sobre la posibilidad de que LST-1 pueda estar siguiendo una ruta de tráfico no convencional. YPT-1 en *N. crassa* fue caracterizada por Sánchez-León y colaboradores (2015), como una Rab GTPasa. Las proteínas de la familia Rab, son pequeñas proteínas que actúan como reguladores de la formación, transporte, unión y fusión de vesículas en diferentes organelos, entre otras funciones (Hutagalung & Novick, 2011).

En *N. crassa*, YPT-1 está involucrada en la regulación de la ruta secretora en Golgi, ayudando en la unión de vesículas, provenientes del RE (Sánchez-León et al., 2015). Por esta razón, YPT-1 se usó como marcador de Golgi, esperando que LST-1 co-localizara con YPT-1 para inferir que LST-1 está entregando cargas en Golgi, siguiendo la ruta de tráfico vesicular convencional.

Que LST-1 evada el Golgi durante la entrega de sus cargas, no sería algo nuevo en hongos filamentosos. En *A. nidulans*, PmaA, una proteína de MP que funciona como bomba de protones ATPasa, y carga de LstA en vesículas COPII, llega eficientemente a la MP en ausencia de dos proteínas Rab (RabA y RabB), pero queda retenida en el RE en ausencia de LstA (Dimou et al., 2022). Además, aún hay poca información respecto a la ruta de transporte no convencional. En humanos y *Drosophila* es donde se ha caracterizado, y se ha reportado que existe más de una ruta no convencional para la secreción de proteínas (Rabouille, 2017), siendo la ruta tipo IV en la que diferentes proteínas transmembranales de MP, que incluso cuentan con señal de exportación, son transportadas directamente a la MP. Se ha sugerido que el principal factor que lleva a que el transporte de proteínas sea no convencional, es el estrés celular, debido a que puede afectar la integridad de la ruta secretora convencional, provocando que las vesículas sigan rutas alternas. Sin embargo, los mecanismos moleculares aún no son descritos (Gee et al., 2018; Rabouille, 2017).

A pesar de esto, no tenemos evidencia suficiente para confirmar que esto esté sucediendo con LST-1, porque aunque también se ha confirmado que en levaduras, Lst1p es necesaria para el transporte de Pma1p (Roberg et al., 1999), ortóloga de PmaA, no se ha caracterizado la ruta que siguen las vesículas COPII cargadas con Pma1p y Lst1p.

En *N. crassa*, PMA-1 ya fue caracterizada, y se observó una distribución distal, ausente en la zona apical y en el SPK, lo cual inicialmente llevó a concluir que PMA-1 estaba siendo entregada a la MP, sin pasar por el SPK. Sin embargo, al inhibir la ruta RE-Golgi, después de un tiempo expuesta al inhibidor, PMA-1 logró llegar a la MP y distribuirse, con lo que los autores sugirieron que al estar bajo el estrés del inhibidor, las vesículas cargadas con PMA-1 encontraron una ruta alterna, no convencional, para el reparto de su carga (Fajardo-Somera et al., 2013). Por lo tanto, se sugiere utilizar otros marcadores del Golgi para co-expresar

con LST-1, y también co-expresar a LST-1 con PMA-1 durante la formación de vesículas COPII en *N. crassa*, con la finalidad de elucidar con mayor profundidad la ruta de secreción que sigue LST-1.

#### 4.1.4 ERV-14-GFP, residente del RE en *N. crassa*

Con la finalidad de elucidar interactoma de ERV-14, se pretendía inicialmente realizar la co-inmunoprecipitación de ERV-14-GFP, pero por problemas técnicos, esta técnica se tuvo que desestimar de los objetivos de este trabajo. Sin embargo, se alcanzó a comprobar por WB la presencia de ERV-14-GFP, que es el paso previo a la co-inmunoprecipitación. El resultado del WB nos pudo confirmar que ERV-14-GFP se encuentra distribuida principalmente en membranas del RE, debido a que al aislar específicamente microsomas de RE se pudo obtener una señal de ERV-14-GFP. La ultracentrifugación diferencial ya ha sido utilizada anteriormente para aislar proteínas del RE para estudios de proteómica (Wang et al., 2017), así como ya se ha demostrado experimentalmente en diferentes organismos, como *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* y *A. nidulans*, que Erv14 es una proteína residente del RE, que actúa como receptor de cargas (Dimou et al., 2022; Nakanishi et al., 2007; Powers & Barlowe, 1998, 2002; Wudick et al., 2018).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

La distribución de LST-1 es a lo largo de todo el citoplasma, con mayor expresión en forma de puntos en regiones cercanas a los núcleos. Además, su co-localización parcial con SEC-24 nos permite concluir que LST-1 forma parte de la cubierta de vesículas COPII, y que se acumula en algunos sitios de salida del RE, donde converge ocasionalmente con SEC-24.

En cuanto a la ausencia de interacción entre LST-1 y ERV-14 en este trabajo, se sugiere que ambas proteínas pueden estar viajando en distintas subpoblaciones de vesículas COPII, y que cada subpoblación se puede estar formando en diferentes regiones de la hifa.

Finalmente, este trabajo permitió elucidar una parte de la primera fase del tráfico vesicular en *N. crassa*, lo cual es un avance significativo para la generación de más conocimiento sobre procesos intracelulares en hongos filamentosos. También generó preguntas que se deberán considerar en un futuro para seguir esclareciendo la complejidad de las rutas de transporte vesicular en hongos filamentosos.

### Perspectivas

- Analizar la distribución de LST-1-GFP junto con la de otros marcadores de RE, Golgi y MP para confirmar la ruta de tráfico que sigue LST-1 en *N. crassa*.
- Obtener el interactoma tanto de ERV-14 como de LST-1 para confirmar interacción entre ambas.
- Co-expresar a LST-1 con PMA-1 etiquetadas con diferentes proteínas fluorescentes para confirmar si en *N. crassa* PMA-1 es carga de LST-1.

## Literatura citada

- Adams, E. J., Chen, X.-W., O'Shea, K. S., & Ginsburg, D. (2014). Mammalian COPII coat component Sec24C is required for embryonic development in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20858-20870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566687>
- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2019). *Essential cell biology* (5th ed.). W. W. Norton & Company.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: What's the ticket out? *Trends in Cell Biology*, 13(6), 295-300. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00082-5)
- Barlowe, C., Or, L., Hosobuchi, M., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., & Schekman, R. (1994). COPII: A membrane coat formed by set proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77(6), 895-907. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90138-4)
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., & Gierz, G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 153(1-2), 46-57. <https://doi.org/10.1007/BF01322464>
- Bhattacharya, N., O'Donnell, J., & Stagg, S. M. (2012). The Structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *Journal of Molecular Biology*, 420(4-5), 324-334. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.04.024>
- Bi, X., Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23•Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Developmental Cell*, 13(5), 635-645. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.006>
- Bisnett, B. J., Condon, B. M., Lamb, C. H., Georgiou, G. R., & Boyce, M. (2021). Export control: post-transcriptional regulation of the COPII trafficking pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 618652. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.618652>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01079-1)
- Bowman, B. J., Draskovic, M., Freitag, M., & Bowman, E. J. (2009). Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1845-1855. <https://doi.org/10.1128/EC.00174-09>
- Castillon, G. A., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Epstein, S., Kajiwara, K., Funato, K., Watanabe, R., Riezman, H., & Muñiz, M. (2011). The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Molecular Biology of the Cell*, 22(16), 2924-2936. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-04-0294>
- Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M. E., & Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-Anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic*, 10(2), 186-200. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00857.x>
- Čopič, A., Latham, C. F., Horlbeck, M. A., D'Arcangelo, J. G., & Miller, E. A. (2012). ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science*, 335(6074), 1359-1362. <https://doi.org/10.1126/science.1215909>

- Craig, D., Gao, M., Schulten, K., & Vogel, V. (2004). Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure*, 12(11), 2049-2058. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.009>
- D’Arcangelo, J. G., Crissman, J., Pagant, S., Čopič, A., Latham, C. F., Snapp, E. L., & Miller, E. A. (2015). Traffic of p24 proteins and COPII coat composition mutually influence membrane scaffolding. *Current Biology*, 25(10), 1296-1305. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.029>
- D’Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R., & Miller, E. A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2464-2472. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.003>
- Deacon, J. W. (1997). *Modern Mycology* (3rd ed.). Wiley.
- Dimou, S., Dionysopoulou, M., Sagia, G. M., & Diallinas, G. (2022). Golgi-bypass is a major unconventional route for translocation to the plasma membrane of non-apical membrane cargoes in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 852028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852028>
- Du, Y., Ferro-Novick, S., & Novick, P. (2004). Dynamics and inheritance of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 117(14), 2871-2878. <https://doi.org/10.1242/jcs.01286>
- Fajardo-Somera, R. A., Bowman, B., & Riquelme, M. (2013). The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 12(8), 1097-1105. <https://doi.org/10.1128/EC.00328-12>
- Gee, H. Y., Kim, J., & Lee, M. G. (2018). Unconventional secretion of transmembrane proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 83, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.03.016>
- Gomez-Navarro, N. G., Melero, A., Li, X.-H., Boulanger, J., Kukulski, W., & Miller, E. A. (2020). Cargo crowding contributes to sorting stringency in COPII vesicles. *Journal of Cell Biology*, 219(7), e201806038. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806038>
- Gomez-Navarro, N. G., & Miller, E. A. (2016). COP-coated vesicles. *Current Biology*, 26(2), R54-R57. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.017>
- Gomez-Navarro, N., & Miller, E. (2016). Protein sorting at the ER–Golgi interface. *Journal of Cell Biology*, 215(6), 769-778. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610031>
- Goyal, U., & Blackstone, C. (2013). Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2492-2498. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.009>
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S., & Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biology*, 10(5), e1001329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001329>
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. (2004). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63-87. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34003-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34003-1)
- Honda, S., & Selker, E. U. (2009). Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for

- gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics*, 182(1), 11-23. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098707>
- Huang, M., Weissman, J. T., Béraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I. A., & Balch, W. E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *The Journal of Cell Biology*, 155(6), 937-948. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106039>
- Hughes, H., & Stephens, D. J. (2008). Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(2), 129-151. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0363-x>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 91(1), 119-149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Iwasaki, H., Yorimitsu, T., & Sato, K. (2015). Distribution of Sec24 isoforms to each ER exit site is dynamically regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 589(11), 1234-1239. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.006>
- Jan, C. H., Williams, C. C., & Weissman, J. S. (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), 1257-1261. <https://doi.org/10.1126/science.1257521>
- Kaur, J., & Bachhawat, A. K. (2009). A modified western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Analytical Biochemistry*, 384(2), 348-349. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.005>
- Klopfenstein, D. R., Klumperman, J., Lustig, A., Kammerer, R. A., Oorschot, V., & Hauri, H.-P. (2001). Subdomain-specific Localization of CLIMP-63 (p63) in the Endoplasmic Reticulum is mediated by its luminal  $\alpha$ -helical segment. *The Journal of Cell Biology*, 153 (6): 1287–1300. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1287>.
- Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R. E., Kaiser, C. A., Schekman, R., & Yoshihisa, T. (2000a). Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 983-998. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.983>
- Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R. E., Kaiser, C. A., Schekman, R., & Yoshihisa, T. (2000b). Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 983-998. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.983>
- Lin, S., Sun, S., & Hu, J. (2012). Molecular basis for sculpting the endoplasmic reticulum membrane. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1436-1443. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.013>
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A. M., Aguilera-Romero, A., Martin, M. E., Okano, T., Silva, D. V., Seeberger, P. H., Riezman, H., Funato, K., Goder, V., Wellinger, R. E., & Muñoz, M. (2015). COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Current Biology*, 25(2), 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.039>
- Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., & Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven

- by the Sec24p subunit. *The EMBO Journal*, 21(22), 6105-6113. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf605>
- Miller, E., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the copii subunit sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, 114(4), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00609-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00609-3)
- Montegna, E. A., Bhave, M., Liu, Y., Bhattacharyya, D., & Glick, B. S. (2012). Sec12 binds to Sec16 at transitional ER sites. *PLoS ONE*, 7(2), e31156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031156>
- Mossessova, E., Bickford, L. C., & Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 114(4), 483-495. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00608-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00608-1)
- Nakanishi, H., Suda, Y., & Neiman, A. M. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 120(5), 908-916. <https://doi.org/10.1242/jcs.03405>
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C. A. O., & Schwab, M. E. (2003). A reticular rhapsody: Phylogenic evolution and nomenclature of the *RTN/Nogo* gene family<sup>1</sup>. *The FASEB Journal*, 17(10), 1238-1247. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1166hyp>
- Orci, L., Ravazzola, M., Meda, P., Holcomb, C., Moore, H. P., Hicke, L., & Schekman, R. (1991). Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8611-8615. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8611>
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., & Miller, E. A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Current Biology*, 25(4), 403-412. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.070>
- Palade, G. E. (1955). Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1(6), 567-582. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.6.567>.
- Powers, J., & Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila cornichon* gene product. *The Journal of Cell Biology*, 142(5), 1209-1222. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.5.1209>
- Powers, J., & Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 880-891. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0499>
- Qian, H., Sun, L., Wu, M., Zhao, W., Liu, M., Liang, S., Zhu, X., Li, L., Su, Z., Lu, J., Lin, F., & Liu, X. (2023). The COPII subunit MoSec24B is involved in development, pathogenicity and autophagy in the rice blast fungus. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1074107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074107>
- Rabouille, C. (2017). Pathways of unconventional protein secretion. *Trends in Cell Biology*, 27(3), 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>

- Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663-669. <https://doi.org/10.1038/nature06384>
- Reid, D. W., & Nicchitta, C. V. (2015). Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), 221-231. <https://doi.org/10.1038/nrm3958>
- Rico-Ramírez, A. M., Roberson, R. W., & Riquelme, M. (2018). Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.006>
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 587-609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), e00068-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-17>
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A., & Freitag, M. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1853-1864. <https://doi.org/10.1128/EC.00088-07>
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., & Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1312-1326. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-06-0299>
- Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R. E., & Kaiser, C. A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum.pdf. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 659-672. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.659>
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gómez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermann, O., Sychrová, H., & Pantoja, O. (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *Journal of Experimental Botany*, 66(9), 2733-2748. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv069>
- Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K., & Glick, B. S. (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(1), 69-81. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.69>
- Sánchez-León, E., Bowman, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P., & Riquelme, M. (2015). The Rab GTPase YPT -1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 95(3), 472-490. <https://doi.org/10.1111/mmi.12878>
- Saraogi, I., & Shan, S. (2011). Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic*, 12(5), 535-542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01171.x>



- Sastré-Velásquez, L. E. (2018). *Identificación del homólogo a Cornichon/Erv14 y su papel en la regulación del crecimiento del hongo filamentoso Neurospora crassa*.
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*, 143(5), 774-788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., & Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), 435-439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2008). The reticulon and Dp1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18892-18904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800986200>
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., & Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane atpase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 151(5), 973-984. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.973>
- Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R., & Freitag, M. (2011). Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Molecular and Cellular Biology*, 31(12), 2528-2542. <https://doi.org/10.1128/MCB.01285-10>
- Starr, T. L., Gonçalves, A. P., Meshgin, N., & Glass, N. L. (2018). The major cellulases CBH-1 and CBH-2 of *Neurospora crassa* rely on distinct ER cargo adaptors for efficient ER-exit. *Molecular Microbiology*, 107(2), 229-248. <https://doi.org/10.1111/mmi.13879>
- Tang, B. L., Kausalya, J., Low, D. Y. H., Lock, M. L., & Hong, W. (1999). A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3), 679-684. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0574>
- Tang, B. L., Wang, Y., Ong, Y. S., & Hong, W. (2005). COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1744(3), 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.02.007>
- Veratti, E. (1961). Investigations on the fine structure of striated muscle fiber read before the Reale Istituto Lombardo, 13 March 1902. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 10(4)Suppl(4), 1-59. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.1>.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., & Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044-1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x>
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., & Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573-586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047>
- Wang, X., Li, S., Wang, H., Shui, W., & Hu, J. (2017). Quantitative proteomics reveal proteins enriched in

- tubular endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *eLife*, 6, e23816. <https://doi.org/10.7554/eLife.23816>
- Watson, P., Townley, A. K., Koka, P., Palmer, K. J., & Stephens, D. J. (2006). Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic*, 7(12), 1678-1687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00493.x>
- Weigel, A. V., Chang, C.-L., Shtengel, G., Xu, C. S., Hoffman, D. P., Freeman, M., Iyer, N., Aaron, J., Khuon, S., Bogovic, J., Qiu, W., Hess, H. F., & Lippincott-Schwartz, J. (2021). ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER. *Cell*, 184(9), 2412-2429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.035>
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., & Voeltz, G. K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *Journal of Cell Biology*, 193(2), 333-346. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011039>
- Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2015). Form follows function: The importance of endoplasmic reticulum shape. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 791-811. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-163501>
- Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Nunes, C. O., Campos, C., Santa Cruz Damineli, D., Carvalho, J. C., Lima, P. T., Pantoja, O., & Feijó, J. A. (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Science*, 360(6388), 533-536. <https://doi.org/10.1126/science.aar6464>
- Yang, K., Liu, M., Feng, Z., Rojas, M., Zhou, L., Ke, H., & Pastor-Pareja, J. C. (2021). ER exit sites in *Drosophila* display abundant ER-Golgi vesicles and pearled tubes but no megacarriers. *Cell Reports*, 36(11), 109707. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109707>

## Anexos

### Anexo A

Vídeo de la zona apical de una hifa de *N. crassa* en crecimiento, para analizar la dinámica intracelular de LST-1-GFP, obtenido por microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala de 10µm. Liga de acceso a la carpeta de anexos: <https://drive.google.com/drive/folders/1Y5nQJ1aHBdnQ-G1SxMKkIF8JuJWjhTfj?usp=sharing>

### Anexo B

Vídeo de la zona distal de una hifa de *N. crassa* en crecimiento, para analizar la dinámica intracelular de LST-1-GFP, obtenido por microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala de 10µm. Liga de acceso a la carpeta de anexos: <https://drive.google.com/drive/folders/1Y5nQJ1aHBdnQ-G1SxMKkIF8JuJWjhTfj?usp=sharing>

### Anexo C

Vídeo de la zona de crecimiento de una hifa de *N. crassa*, para analizar la interacción y dinámica intracelular de la fusión de LST-1-GFP con ERV-14-mCherry, obtenido por microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala de 10µm. Liga de acceso a la carpeta de anexos: <https://drive.google.com/drive/folders/1Y5nQJ1aHBdnQ-G1SxMKkIF8JuJWjhTfj?usp=sharing>

### Anexo D

Vídeo de una hifa en crecimiento de *N. crassa*, para analizar la interacción y dinámica intracelular de la fusión de LST-1-GFP con SEC-24-mCherry, obtenido por microscopía confocal de disco giratorio. Barra de escala de 10µm. Liga de acceso a la carpeta de anexos: <https://drive.google.com/drive/folders/1Y5nQJ1aHBdnQ-G1SxMKkIF8JuJWjhTfj?usp=sharing>