

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**

**Dilucidando el papel de los motivos de exportación del
receptor de carga ERV-14 en el tráfico intracelular**

Tesis

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

Presenta:

Alexis Gerardo Martínez Rangel

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Alexis Gerardo Martínez Rangel

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Domingo Martínez Soto

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 **Alexis Gerardo Martínez Rangel** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida

Dilucidando el papel de los motivos de exportación del receptor de carga ERV-14 en el tráfico intracelular

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

El tráfico de proteínas es un proceso complejo que aún no se comprende completamente, especialmente en cuanto a la interacción entre múltiples señales de exportación. En *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas Erv14 y Chs7 han sido ampliamente estudiadas como receptores de carga en la ruta secretora. Sin embargo, en hongos filamentosos, el tráfico y distribución de proteínas presentan diferencias significativas debido a su crecimiento apical. En estos organismos, las proteínas involucradas en el crecimiento celular siguen la vía secretora clásica: desde el retículo endoplasmático (RE) hasta el Golgi, donde se acumulan en vesículas en el Spitzenkörper (SPK) antes de integrarse en la membrana plasmática (MP) apical. En cambio, las proteínas de transporte, como bombas de protones, canales iónicos y transportadores de aminoácidos se dirigen a la MP lateral. En *Aspergillus nidulans*, se ha observado que este transporte ocurre sin necesidad de pasar por el Golgi. Este estudio investigó los mecanismos de exportación de proteínas mediante la construcción y expresión de una proteína quimérica basada en CSE-7 de *Neurospora crassa* (homóloga de Chs7 en *S. cerevisiae*), incorporando el motivo de exportación IFRKL de ERV-14. El objetivo era responder dos interrogantes clave: ¿Qué señal domina en la clasificación de proteínas: los dominios transmembranales o los motivos de exportación citosólicos? Y ¿Cómo influyen los motivos de exportación de Erv14 en la exportación y destino final de su carga en hongos filamentosos? Los resultados indicaron una interrupción del tráfico de CHS-4 y la proteína quimérica hacia el SPK y los septos, con una aparente exportación hacia la MP apical. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para caracterizar la dinámica de la proteína quimérica y su impacto sobre CHS-4. Estos hallazgos podrían proporcionar información crucial sobre los mecanismos de tráfico y distribución de proteínas en hongos filamentosos.

Palabras clave: ERV-14, CSE-7, quitina sintasa, vía secretora, Spitzenkörper, motivo de exportación

Abstract of the thesis presented by **Alexis Gerardo Martínez Ragel** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Master of Science degree in Life Science

Elucidating the Role of ERV-14 Cargo Receptor Export Motifs in Intracellular Trafficking

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

Protein trafficking is a complex process that is not yet fully understood, particularly regarding the interaction between multiple export signals. In *Saccharomyces cerevisiae*, the Erv14 and Chs7 proteins have been extensively studied as cargo receptors in the secretory pathway. However, in filamentous fungi, protein trafficking and distribution exhibit significant differences due to their apical growth. In these organisms, proteins involved in cell growth follow the classical secretory pathway, traveling from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi, where they accumulate in vesicles within the Spitzenkörper (SPK) before being integrated into the apical plasma membrane (PM). In contrast, transport proteins, such as proton pumps, ion channels, and amino acid transporters, are directed to the lateral PM. In *Aspergillus nidulans*, this transport has been observed to occur without passing through the Golgi. This study investigated protein export mechanisms by constructing and expressing a chimeric protein based on CSE-7 from *Neurospora crassa* (homologous to Chs7 in *S. cerevisiae*), incorporating the IFRKL export motif from ERV-14. The goal was to answer two key questions: Which signal dominates protein classification: transmembrane domains or cytosolic export motifs? and How do Erv14 export motifs influence cargo export and final destination in filamentous fungi? The results indicated interrupted trafficking of CHS-4 and the chimeric protein to the SPK and septa, with an apparent export toward the apical PM. However, further studies are needed to characterize the dynamics of the chimeric protein and its impact on CHS-4. These findings could provide crucial insights into the mechanisms of protein trafficking and distribution in filamentous fungi.

Keywords: ERV-14, CSE-7, chitin synthase, secretory pathway, Spitzenkörper, export motif

Dedicatoria

A mi madre, Perla Rangel y a mi difunto abuelo

Agradecimientos

Agradezco a la Nueva Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por el apoyo económico otorgado en forma de beca de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por el desarrollo académico y profesional que me otorgó. Al personal académico y administrativo de Ciencias de la Vida, por el apoyo que me brindó cuando lo necesité.

A la Dra. Meritxell Riquelme, por recibirme en su laboratorio, por el apoyo que me brindó y estar pendiente de mí, por su enseñanza y orientación.

A mis sinodales, el Dr. Carlos Brizuela, el Dr. Domingo Martínez y el Dr. Alexei Licea por sus consejos y preguntas que me orientaron en 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 y permitirme usar los microscopios. A la Dra. Olga Callejas por ayudarme con mis dudas técnicas y prestarme enzimas de restricción. Al Dr. Edgardo Sepúlveda que también me prestó enzimas de restricción.

A la M. en C. Mónica Cante, por capacitarme en el manejo de equipos y técnicas moleculares que usé en este proyecto.

A todos los miembros del Riquelme Lab que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y por sus comentarios y recomendaciones.

Doy gracias a mis compañeros y amigos que hice en la maestría, que me apoyaron y acompañaron a lo largo de esta etapa. A mi familia, que me apoyó cuando los necesité y que sin ellos no lo hubiera conseguido.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xvi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 <i>Neurospora crassa</i> como modelo	6
1.2 Justificación	8
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2. Metodología	10
2.1 Análisis bioinformáticos	10
2.2 Recolección de conidios de <i>N. crassa</i>	11
2.3 Métodos moleculares.....	11
2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.....	11
2.3.2 Extracción del DNA genómico de <i>Neurospora crassa</i>	12
2.3.3 Construcción del plásmido VMRP-105	12
2.3.4 Construcción del casete codificante de la proteína quimérica CSE-7-ERV-14	14
2.4 Obtención de cepas.....	15
2.4.1 Cruzas sexuales.....	16

2.4.2	Obtención de cepas homocariontes	16
2.4.3	Transformación de <i>N. crassa</i>	17
2.5	Microscopía	17
Capítulo 3.	Resultados.....	19
3.1	Análisis bioinformáticos	19
3.1.1	Análisis de secuencias	19
3.1.2	Análisis de estructuras	22
3.1.3	Diseño de la proteína quimérica	30
3.2	Cruzas sexuales	33
3.2.1	Comprobación del fenotipo y genotipo de las progenies	33
3.2.2	Comprobación del tipo de apareamiento	34
3.3	Construcción del casete	34
3.3.1	Construcción de la quimera <i>cse-7Δdc2^{me-erv-14}</i>	34
3.3.2	Construcción del plásmido VMRP-105 (pGAM-4)	36
3.3.3	Etiquetado de la proteína quimérica CSE-7ΔDC2 ^{ME-ERV-14}	37
3.3.4	Nueva construcción <i>cse-7Δdc2^{me-erv-14}</i>	38
3.3.5	Etiquetado de la quimera <i>cse-7Δdc2^{me-erv-14}</i> con GFP y mCherry	40
3.4	Expresión de la quimera CSE-7ΔDC2 ^{ME-ERV-14} en <i>N. crassa</i>	41
3.4.1	Transformación de <i>N. crassa</i>	41
3.4.2	Tamizaje de las transformantes	42
3.4.3	Expresión de la CHS-4-mCherry	44
3.4.4	Obtención de la cepa <i>cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp::Δcse-7::hph⁺</i>	45
3.5	Coexpresión de la quimera CSE-7ΔDC2 ^{ME-ERV-14} y CHS-4	46
3.5.1	Fusiones.....	46
3.6	Co-expresión de las proteínas CHS-4-GFP y CSE-7ΔDC2 ^{ME-ERV-14} -mCherry	48
3.6.1	La quimera se co-localiza parcialmente con CHS-4 en la zona distal.....	48
Capítulo 4.	Discusión	53

4.1	CSE-7 y su posible participación en la exportación de CHS-4	53
4.2	Distribución y efecto de la quimera CSE-7 Δ DC2 ^{ME-ERV-14} en CHS-4	55
Capítulo 5.	Conclusiones.....	59
Literatura citada		60

Lista de figuras

- Figura 1. Estructuras tridimensionales de Erv14 y Sec24 de *S. cerevisiae*. a) Estructura tridimensional de Erv14; de color rojo se presenta la región citosólica de Erv14; dentro de la región citosólica, en color azul, se encuentra el motivo IFRLT; en verde se encuentra la región de unión a la proteína Yor1, que se conforma del motivo FLN (residuos F₆₂, L₆₃ y N₇₄) que se muestra en magenta. En b) y c) se muestra la estructura de Sec24 con sus sitios de unión; en magenta se observan los residuos que conforman el sitio A, en azul se encuentran los residuos del sitio B, en naranja los residuos pertenecientes al sitio C, y en rojo los residuos que integran el sitio D. Estructuras obtenidas de Uniprot y procesadas con Pymol con base en datos de Mancias & Goldberg, 2007; Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003; Pagant et al., 2015.4
- Figura 2. Estructura tridimensional de la chaperona Chs7 de *S. cerevisiae*. a) y b) En color amarillo se presentan los TMDs; en verde la región luminal del RE, en azul la región citosólica, en morado se encuentra la región conservada del extremo C-terminal y en rojo se encuentra el presunto motivo DxE. b) Corresponde a un acercamiento de a). Modelo obtenido de Uniprot, y procesado en Pymol.....5
- Figura 3. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. *Neurospora crassa* cuenta con un ciclo asexual y un ciclo sexual, en su ciclo asexual, el micelio haploide forma conidios (microconidios y macroconidios), que al germinar produce nuevo micelio. El ciclo sexual se origina a partir de la fertilización de un protoperitecio con la fusión de núcleos provenientes de conidios o micelio de una cepa complementaria, formando un núcleo 2N del cigoto, que realiza dos meiosis, seguidas por una mitosis, generando ascas de ocho ascosporas en el interior de un peritecio. Obtenido de Aramayo & Selker, 2013.8
- Figura 4. Modelo representativo de la distribución de CHS-4 en diferentes cepas de *N. crassa*. Cepas a) WT, b) $\Delta cse-7$ y c) cepa esperada al expresar la quimera diseñada en este trabajo. El color amarillo representa la ubicación de CHS-4 en la hifa de *N. crassa*.9
- Figura 5. Regiones de amplificación con los oligonucleótidos diseñados. Los oligonucleótidos P1-cse-7-FW y P4-cse7-RV incluyen los sitios de restricción de *Xba*I y *Xma*I, respectivamente, mientras que P2-ifrkl-RV y P3-ifrkal-FW incluyen las secuencias de solapamiento con el motivo de exportación de *erv-14*. 12
- Figura 6. Vectores utilizados para la construcción del vector VMRP-105 (pGAM-4). a) Se utilizó el vector VMRP163 para la amplificación del gen de la *tagrfp*, insertando los sitios de restricción de *Xma*I y *Eco*RI a través de los oligonucleótidos. b) El vector VMRP-13 se utilizó para subclonar el gen codificante de la TagRFP, reemplazando el gen *gfp* utilizando las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xma*I. c) El vector pGAM-4 se obtuvo a partir de la subclonación del gen *tagrfp* en el vector VMRP-13..... 13
- Figura 7. Esquema de la construcción del casete de la *cse-7 Δ dc2^{me-erv-14}-gfp*. Los oligonucleótidos P1 y P4 añaden los sitios de restricción de *Xba*I y *Xma*I, respectivamente. b) Esquema del plásmido pGAM-4; la etiqueta de GFP fue reemplazada por la etiqueta TagRFP. Esquemas de los vectores c) VMRP13 y d) VMRP-68. 15
- Figura 8. Árbol filogenético de la proteína ERV-14 en hongos. Se muestran 39 especies representativas de los Phyla Ascomycota (subdivisiones Pezizomycotina y Saccharomycotina) y Basidiomycota

- (subdivisiones Agaricomycotina, Ustilagomycotina y Taphrinomycotina) identificadas con colores. En las ramas se muestra el porcentaje de Bootstrap sobre 500 réplicas realizadas. 20
- Figura 9. Árbol filogenético de la proteína CSE-7 en hongos. Se muestran 36 especies de representativas del Phylum y sus subdivisiones identificado con colores. En las ramas se muestra el porcentaje de Bootstrap sobre 500 réplicas realizadas. 21
- Figura 10. Modelos de interacción entre ERV-14 y SEC-24. a) y b) En el modelo 1, ERV-14 (verde) interacciona con SEC-24 a través de su motivo DxE (rojo) e IFRKL (azul) con los sitios B (cian) y D (rosa) de SEC-24 (amarillo). a) Vista inferior del modelo, b) vista lateral del modelo. c) y d) En el modelo 2, ERV-14 interacciona únicamente a través de su motivo DxE (rojo) con el sitio B (cian) de SEC-24. c) Vista inferior del modelo, d) vista lateral del modelo. 23
- Figura 11. Controles negativos del acoplamiento molecular con SEC-24. Acoplamiento molecular entre SEC-24 y dos proteínas residentes del RE, las proteínas a) GET-1 y b) ERG-2. a) GET-1 y b) ERG-2 no presentaron interacción con los sitios de unión de SEC-24. 23
- Figura 12. Modelo de cargas electroestáticas de SEC-24 y ERV-14. Modelo de cargas electroestáticas de a) SEC-24 y b) y d) ERV-14 obtenido con el servidor APBS. a) Se observó la presencia de una gran cantidad de cargas positivas en la cara de SEC-24 que interacciona con ERV-14. c) Motivos de exportación de ERV-14; en rojo se encuentra el motivo DxE, ubicado en el dominio citoplasmático 1, y en azul se presenta el motivo IFRKL, ubicado en el dominio citoplasmático 2. d) Los dominios citoplasmáticos de ERV-14 presentan expuestas una mayor cantidad de cargas negativas, con algunas cargas positivas proporcionadas por el motivo IFRKL. 24
- Figura 13. Modelos de interacción SEC-24-ERV-14/Dominio citosólico. a) Modelo de interacción ERV-14-SEC-24. En magenta se encuentra la región C-terminal y en rojo la N-terminal. En b) el péptido DLECDYINPID correspondiente al dominio citoplasmático 1 de ERV-14, interacciona con el sitio B de SEC-24 en dirección opuesta a ERV-14, con el C-terminal orientado en la posición del N-terminal de ERV-14. c) El péptido DLECDYINPID interacciona con el sitio B de SEC-24 de forma idéntica a ERV-14. d) El péptido HLLDATEIFRKLNVHKKE, correspondiente al dominio citoplasmático 2 de ERV-14 interacciona con el sitio D de SEC-24 de la misma forma que lo hace en ERV-14. 25
- Figura 14. Posibles mecanismos de interacción ERV-14-SEC-24-Carga. a) En el primer mecanismo, la interacción entre ERV-14 y una proteína carga que cuenta con un motivo de exportación DxE, promueve una unión dual a SEC-24 interactúa de forma simultánea mediante el sitio D y el sitio B con el motivo IFRKL de ERV-14 y el motivo DxE de la proteína carga respectivamente. b) En el segundo mecanismo, la interacción entre ERV-14 y una proteína carga sin motivo de exportación, podría impedir el acceso a el motivo IFRKL de ERV-14, promoviendo la interacción de SEC-24 únicamente mediante su sitio D con el motivo DxE de ERV-14. c) En el tercer mecanismo, la unión de ERV-14 a una proteína carga sin motivo de exportación DxE, permite la interacción de ERV-14 mediante sus motivos de exportación DxE e IFRKL con los sitios B y D de SEC-24, respectivamente. 26
- Figura 15. a) El C-terminal y el bucle correspondiente al dominio citoplasmático 2 de CSE-7 presentaron una distancia de 17.4 Å. b) La distancia entre el motivo IFRKL de ERV-14 y el extremo más cercano de SEC-24 corresponde a 17.1 Å. 27
- Figura 16. Modelos estructurales de CHS-3 y CHS-4. a) Modelos de monómero de CHS-3 y CHS-4 de Alphafold. b) Modelo de dímero de CHS-4 obtenido a partir de la alineación de estructuras

- obtenido con PDBeFold y acoplamiento molecular en HDOCK server. c) Dominios y TMDs de CHS-3 y CHS-4 obtenidos por homología estructural. Datos obtenidos de Chen et al., 2023 y Wu et al., 2022..... 28
- Figura 17. Estructuras de Chs3-p y el componente del exómero Chs6-Chs6 en *S. cerevisiae*. Chs3p (mostrado en naranja) interactúa mediante los residuos 10-27 mostrados en verde, con el componente del exómero Chs6-Chs6 mostrado en azul. Como se observa en la figura, el complejo Chs6-Chs6 interactúa con dos monómeros de Chs3p. Datos obtenidos de Weiskoff & Fromme, 2014..... 29
- Figura 18. Modelos de interacción CHS-CSE. a) Modelo de interacción entre un dímero de CHS-3 y CSE-8 obtenido usando el servicio de HDOCK Server. En verde se encuentra el dímero de CHS-3 y en cian los monómeros de CSE-8. b) Modelo de interacción de un dímero de CHS-4, unido a 4 monómeros de CSE-7 en morado claro, obtenido con el servidor HDOCK server. 29
- Figura 19. Posible modelo de interacción de CHS-4 y CSE-7. a y b) Se plantea un modelo general de interacción CHS-CSE, en el que se forma un dímero de CHS-4 que interactúa con cuatro monómeros de CSE-7. c) Al tratarse de una imagen especular, el dímero CHS-4 cuenta con dos sitios de unión A y dos sitios de unión B en caras opuestas del dímero, que interactúan con los sitios de unión a y b de monómeros de CSE-7; cada sitio de unión de CSE-7 propuestos, a y b, se encuentran en caras contrarias o paralelas de CSE-7. 30
- Figura 20. Gráficos de Ramachandran obtenidos con el servidor web SAVE v6.0. a) El gráfico de Ramachandran de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}, mostró un valor de residuos en regiones más favorecidas del 79.6%; sin embargo, este bajo valor se atribuyó a la presencia del C-terminal que no presenta una estructura bien definida. b) La eliminación del C-terminal en la quimera, elevó el valor de residuos en regiones más favorecidas al 92.1%..... 31
- Figura 21. Quimera seleccionada para su construcción. a) Secuencia del dominio transmembrana 2 (DC2) de CSE-7 remplazada por la secuencia del motivo de exportación (ME) de ERV-14. b) Esquema de CSE-7 y la quimera; en azul se encuentra la posición y secuencia del DC2 reemplazado en CSE-7; en rojo se encuentra la posición y secuencia de ERV-14 utilizada para sustituir el DC2 de CSE-7..... 32
- Figura 22. Modelo de interacción SEC-24 – CSE-7/ CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}. a) Modelo de interacción entre CSE-7 y SEC-24. CSE-7 presenta una baja energía de interacción a SEC-24, que corresponde a -11.2 Kcal/mol. b) Modelo de interacción entre quimera y SEC-24; Al insertar la secuencia AREIFRKLVN en el dominio citoplasmático 2 de CSE-7, la quimera presentó una interacción con el sitio D de SEC-24, y aumentó su energía de interacción, correspondiendo a -22.7 Kcal/mol..... 32
- Figura 23. Comprobación genética de progenies. a) En la cepa WT, los oligonucleótidos P1-cse7-FW y P4-cse7-RV amplifican el marco abierto de lectura de *cse-7*, que corresponde a un segmento de 1148 pb; mientras que en una cepa knockout Δ*cse-7*, el marco abierto de lectura de *cse-7* se encuentra reemplazado por el gen *hph* que confiere resistencia a la higromicina, por lo que no hay amplificación con los oligonucleótidos P1 y P4. c) No se presentó amplificación de *cse-7* con los oligonucleótidos en las progenies 4, 7, 8 y 19, mientras que la cepa WT sí presentó manifestación; la banda (-) es un blanco negativo que consta de agua grado HPLC. d) Como control positivo, se realizó la amplificación del gen *Ist-1*. Las 4 progenies probadas, así como la cepa WT presentaron amplificación de *Ist-1*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs)..... 33

- Figura 24. Comprobación del tipo de apareamiento de las cepas obtenidas. a) y c) Cruza sexual de la cepa 1 con la cepa Fluffy mat *a* observada en el estereoscopio, donde se puede observar la presencia de peritecios. b) Cruza sexual de la cepa 1 con la cepa Fluffy mat A. No se desarrollaron peritecios. 34
- Figura 25. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando la comprobación de la amplificación de los fragmentos para ensamblar el casete. a) Bandas correspondientes al fragmento F1 (539 pb) y fragmento F2 (665 pb). b) Bandas correspondientes al casete de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* (quim) y el marco abierto de lectura de *cse-7*. c) Amplicón del gen de *tagrpf* amplificado del vector VMRP-163. M: marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 35
- Figura 26. Comprobación molecular de los insertos en el plásmido pGEM easy. a) Mapa del vector pGEM-T-Easy. b) Gel de agarosa al 1% mostrando la digestión de los plásmidos pGAM-1, pGAM-2 y pGAM-3 empleando la enzima *EcoRI* y dando como resultado dos bandas; una de 3 kb que corresponde al plásmido pGEM linearizado y una correspondiente al tamaño de cada inserto *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* (quim), *cse-7* y *tagrpf*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 36
- Figura 27. Gel de agarosa al 1% mostrando los elementos para la construcción del plásmido pGAM-4, a) Digestión de los vectores VMRP-13 (pMF-272) y pGAM-3 con las enzimas restricción *EcoRI* y *XmaI*. b) Plásmido pGAM-4 (VMRP-105) no linealizado, obtenido mediante la inserción del gen *tagrpf* en el vector VMRP-13, en reemplazo del gen *gfp*. c) Comprobación por PCR de la inserción del gen *tagrpf* en el vector construido, VMRP-105. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 37
- Figura 28. Construcción del plásmido pGAM-5. a) Digestión del plásmido pGAM-1 y b) pGAM-4 con las enzimas de restricción *XbaI* y *XmaI*. La construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* se recuperó del vector pGAM-1 y se insertó en el vector pGAM-4 c) para obtener el vector pGAM-5. c) Comprobación molecular de la inserción de la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* en el vector pGAM-5, mediante la digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI*, obteniendo un fragmento de aproximadamente 2 kb correspondiente a la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* y el gen *tagrpf*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 38
- Figura 29. Secuencia de la quimera obtenida por secuenciación. a) Secuenciación de la construcción quimérica en el plásmido pGAM-5, la secuencia obtenida del cromatograma se alineó con la secuencia de referencia que se diseñó. Se presentaron mutaciones en tres sitios diferentes de la construcción; en azul se muestran las inserciones que se presentaron en la construcción, mientras que en rojo se muestran las delecciones que se presentaron. b) La presencia de las mutaciones introdujeron múltiples codones de paro, representadas por asteriscos en rojo. 39
- Figura 30. Construcción del casete *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*. a) Fragmentos F1 y F2 de una nueva construcción obtenidos mediante la amplificación con Phusion high-fidelity. b) Se obtuvieron dos construcciones de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* mediante la fusión de los fragmentos mediante dos PCRs independientes con la polimerasa TaKaRa La Taq. c) Las construcciones se subclonaron en el vector pGEM y se comprobó la inserción de las construcciones mediante la digestión de los vectores obtenidos pGAM-6 y pGAM-7 con la enzima *EcoRI*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 31. Etiquetado de la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*. a) Digestión de los plásmidos pGAM-6 y pGAM-7 con las enzimas *XbaI* y *XmaI*. b) Comprobación molecular de la inserción de las

- construcciones en los plásmidos pGAM-8 y pGAM-9. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 40
- Figura 32. Digestión de los vectores pGAM-10 y pGAM-11. a) Vectores pGAM-10 y pGAM-11 digeridos con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI, y visualizados en un gel de agarosa al 1%. El producto de la digestión liberó el casete que corresponde a la construcción quimérica ligada al gen *gfp* y *mcherry*, respectivamente. Mapas de los vectores b) pGAM-10 y pGAM-11. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 41
- Figura 33. Transformantes de *N. crassa* en medio FGS. a) Transformantes de *N. crassa* con la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}::tagrfp* en medio FGS. b) Colonia observada en el estereoscopio. c) Gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas de vector pGAM8 circular y linealizado con la enzima *Ssp*I. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 42
- Figura 34. Tamizaje para la selección de cepas fluorescentes que expresen la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP. a – d) No se observó fluorescencia en SPK ni en septos. Se observó una acumulación de fluorescencia en la zona distal de la hifa, a) y b) adicionalmente se observó una acumulación de fluorescencia en posibles vacuolas señaladas por flechas en rojo. c) y d) Distribución de la proteína CSE-7-GFP en la cepa SMRP72. CSE-7 presentó una acumulación de fluorescencia en e) septos y f) SPK, así como en las zonas distales, similar a la proteína quimérica. 43
- Figura 35. Comprobación molecular del vector VMRP-159. a) Bandas del plásmido VMRP159 sin digerir y digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Bam*HI, lo que dio como producto, una banda de 3 Kb que corresponden a un segmento del gen *chs-4*. b) Como se observa en el mapa del vector, el sitio de restricción para *Bam*HI se encuentra dentro del casete de *chs-4*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). 44
- Figura 36. Distribución de la fluorescencia de la proteína CHS-4-mCherry en un fondo mutante Δ*cse-7*. a) y b) La CHS-4-mCherry expresada en un fondo mutante de CSE-7 no consigue llegar al SPK ni a septos; en su lugar, presenta una acumulación de fluorescencia en la zona distal. c) y d) Control positivo de CSE-7-mCherry. Debido a la baja intensidad de la fluorescencia, no se logró identificar el SPK. e) y f) Cepa WT utilizada como control negativo, no se observó fluorescencia en rojo. .. 45
- Figura 37. Distribución de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP en fondo mutante de Δ*cse-7*. a), b) y e) Se observa señalado por flechas, que la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP no es capaz de llegar al septo, c) y d) ni al SPK. c) y d) En su lugar, se observa una acumulación de fluorescencia en la zona distal, señalada por cuadros en rojo. f) y g) Esto contrasta con lo observado en CSE-7, que presentó una acumulación de fluorescencia en el f) SPK y g) septos. 46
- Figura 38. Heterocariones expresando *chs-4-mcherry* y *cse-7-gfp*; y *chs-4-mcherry* y *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*. a), b) y c) Fusión de la cepa VMRP361 y la cepa de genotipo *chs-4-mcherry::Δcse-7::hph⁺*. a) Se presentó una acumulación de fluorescencia de CSE-7-GFP en septos, b) sin embargo, no se observó acumulación de CHS-4 en septos. d), e) y f) Fusión de las cepas de genotipo *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp::Δcse-7::hph⁺* y *chs-4-mcherry::Δcse-7::hph⁺*; no se observó acumulación de la quimera ni de CHS-4 en el SPK. 47
- Figura 39. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. La hifa se encuentra dividida en cuatro regiones, la región I corresponde al ápice (5 μm), el subápice proximal la región II (5- 20 μm), el subápice distal o región III (20- 40 μm), y la zona distal correspondiente a la región IV (>40 μm).

Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hifa, en negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta; el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.87. 49

Figura 40. Comparación de la distribución de fluorescencia de CSE-7-GFP con CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en expresión de CSE-7-GFP. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia CSE-7. c) Superposición de las gráficas de intensidad de fluorescencia de CSE-7 y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en co-expresión con CHS-4. En azul se muestra la fluorescencia de CSE-7-GFP, en rojo la fluorescencia de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry y en verde CHS-4-GFP. Se observa un diferente comportamiento en la distribución de la intensidad de fluorescencia entre CSE-7-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en co-expresión con CHS-4, mostrando la primera, una distribución relativamente estable a lo largo de la hifa, mientras que CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry y CHS-4-GFP presentan una menor intensidad en las regiones más cercanas al ápice, dentro de los primeros 30 nm aproximadamente; mientras que presenta su mayor pico de intensidad a los 60 nm, y presentando una caída de la intensidad después de los 120 nm hasta los 180 nm, al igual que CSE-7-GFP. 50

Figura 41. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en la zona distal. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hifa; en negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta; el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.78. 51

Figura 42. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en la zona distal. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hif. En negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta, el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.77. 52

Figura 43. Modelo del complejo CHS-4-CSE-7. La adición de múltiples tetrámeros CHS-4A-CSE-7 da como resultado la formación de un complejo esférico de 354.2 Å de diámetro, en color verde se muestran los TMDs de los dímeros de CHS-4 mientras que en cian se muestran los TMDs de los monómeros de CSE-7. 55

Figura 44. Modelo propuesto de formación de quitosomas. La acumulación de tetrámeros de CHS-4A-CSE-7 inicia la formación del quitosoma, ensamblándose los tetrámeros entre si, al unirse los tetrámeros mediante la interacción de los sitios B de CHS-4 con CSE-7 de los tetrámeros CHS-4A-CSE-7, forma un complejo similar a una cubierta de aproximadamente 35 nm de diámetro. En este proceso podrían intervenir las proteínas de cubierta COPII. 56

Figura 45. Modelo propuesto de fusión de los quitosomas con la membrana celular apical. Trafico de quitosomas hasta el SPK. b) La fusión del quitosoma con la membrana plasmática (MP) apical d) cambia la curvatura de la membrana de una forma convexa en el quitosoma a una forma cóncava al integrarse a la MP apical, provocando el desmontaje del complejo, mediante la ruptura de la interacción entre los sitios B de los tetrámeros de CHS-4A-CSE-7 con CSE-7 de los tetrámeros circundantes..... 57

Lista de tablas

Tabla 1. Motivos de exportación identificados en proteínas que interaccionan con Sec24 en <i>S. cerevisiae</i>	2
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este proyecto y sus características.	13
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de la quimera <i>cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp</i> y clonación del gen <i>tagrfp</i>	14
Tabla 4. Cepas que se utilizaron en este estudio.	17
Tabla 5. Secuencia consenso de los dominios citosólicos de los homólogos de ERV-14 pertenecientes a los hongos de la subdivisión, división y subreino a los que pertenece <i>N. crassa</i> . Los motivos de exportación se muestran marcados por un recuadro rojo.	19
Tabla 6. Secuencia consenso de los dominios citosólicos 2 y 4 de los homólogos de CSE-7 pertenecientes a los hongos del subphylum, phylum y división a los que pertenece <i>N. crassa</i> . .	22

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

Después de su síntesis, las proteínas deben plegarse correctamente para ser biológicamente funcionales. El plegamiento puede tener lugar en el citosol, retículo endoplasmático (RE) y mitocondrias. Cada organelo está equipado con un conjunto específico de chaperonas y enzimas necesarias para el plegamiento de las proteínas (Anelli & Sitia, 2008). El RE es el punto de entrada a la vía secretora, y aproximadamente el 30% de todas las proteínas eucarióticas utilizan esta vía (Gemmer & Förster, 2020).

La síntesis de las proteínas de la vía secretora ocurre mayormente en la superficie del RE, donde el complejo ribosoma-péptido naciente es reclutado por el complejo translocón del RE debido al reconocimiento de una señal N-terminal hidrofóbica. El complejo translocón del RE comprende el canal conductor de proteínas Sec61, el complejo proteico asociado a translocón y el complejo oligosacaril transferasa (Gemmer & Förster, 2020).

Algunas proteínas politópicas (Proteínas con más de dos dominios transmembrana) requieren de chaperonas especializadas asociadas a la membrana del RE para lograr su conformación nativa. Estas chaperonas suelen ser heterogéneas y específicas para un pequeño número de proteínas. Muchas de estas chaperonas se unen a los dominios transmembrana (TMD; del inglés “transmembrane domain”) a medida que las proteínas salen del translocón para evitar la agregación hasta que el sustrato haya alcanzado su conformación nativa (Dharwada et al., 2018).

Las proteínas de la vía secretora se transportan entre organelos en vesículas que son generadas en el RE, mediante un proceso que requiere la partición de proteínas de recubrimiento citoplasmático (Malkus et al., 2002). Aunque algunas proteínas pueden salir del RE estocásticamente en el flujo masivo, la inclusión selectiva de proteínas en las vesículas de transporte es el mecanismo principal que restringe el tipo de proteínas que se dirige a cada organelo, dado que la salida más eficiente del RE es mediada por señales de clasificación que interactúan con Sec24, una subunidad del complejo de proteínas de cubierta II (COPII, del inglés coat protein complex II) (Malkus et al., 2002; Pagant et al., 2015).

Se han descrito múltiples motivos de exportación que interactúan con Sec24 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (sitios A, B, C y D) (Tabla 1). Algunas proteínas no pueden interactuar directamente con Sec24 y dependen de receptores de carga para ser reclutadas a las vesículas COPII (Pagant et al., 2015). Las dos señales de clasificación interactúan con un solo adaptador de cubierta y se cree que esta interacción dual podría reforzar la interacción a Sec24, debido a las afinidades relativamente débiles de Sec24 y su carga, además de ayudar a garantizar un control de calidad de las proteínas al reconocer específicamente los TMD correctamente ensamblados (Pagant et al., 2015). Las chaperonas específicas de cliente (o específicas a una proteína) pueden también promover la salida del RE y acompañar al sustrato fuera del RE y regresar al RE por vesículas COPI o transportar al sustrato a su destino final (Dharwada et al., 2018).

Tabla 1. Motivos de exportación identificados en proteínas que interaccionan con Sec24 en *S. cerevisiae*.

Proteína de unión a Sec24	Motivo de exportación	Referencias
Erv14	IFRTL	Pagant et al., 2015
Yor1p, Sys1p	DxE	Pagant et al., 2007; Miller et al., 2003
Sed5p	Señal bipartita: YNNSNPF (Señal primaria) y LxxME (señal secundaria)	Theos et al., 2005; Mossessova et al., 2003
Bet1p	LxxLE	Mossessova et al., 2003
Complejo Erv41p-Erv46p	Motivos dihidrofóbicos (IL en Erv41p y FY en Erv46p), necesarios juntos para la exportación del complejo	Otte & Barlowe, 2002

En *S. cerevisiae* se han identificado múltiples proteínas carga del receptor de carga Erv14 (del inglés, ER-derived vesicles protein) (Herzig et al., 2012). Estas proteínas corresponden principalmente a proteínas de transporte y proteínas politópicas. Entre ellas se encuentran los sistemas de transporte de membrana plasmática (MP) específicos de K⁺, Tok1 (canal de K⁺) y Trk1 (importador de K⁺), la ATPasa transportadora de fosfolípidos DNF1 y DNF2, el antiportador Na⁺/H⁺ Nha1, el transportador de unión a ATP, Yor1, que actúa como una bomba de fármacos que elimina sustancias tóxicas del citoplasma de la levadura, o la proteína reguladora de respuesta al pH (Pall) en *Aspergillus nidulans*, entre otros (Dimou et al., 2022; Herzig et al., 2012; Katzmann et al., 1999; Rosas-Santiago et al., 2015; Zimmermannová et al., 2019). Cabe destacar que las proteínas carga que requieren de Erv14 como receptor de proteína carga no comparten motivos de secuencia conservados aparentes que medien la interacción con Erv14. Sin embargo, todas las

proteínas carga de Erv14 tienen en común que presentan TMD largos, y se ha sugerido que estas proteínas carga son reconocidas por Erv14 a partir de la longitud de sus TMD (Herzig et al., 2012).

El receptor de proteínas carga Erv14 es capaz de interactuar tanto con la proteína carga como con la cubierta COPII (Pagant et al., 2015). En *S. cerevisiae* el motivo citosólico IFRTL de Erv14 le permite reconocer el sitio de unión D de Sec24 que corresponde a los aminoácidos Ser₄₉₁, Phe₅₇₆, y Arg₅₇₈ de Sec24, adyacente al sitio B, como se muestra en la Figura 1 (Pagant et al., 2015).

Otra proteína que actúa como receptor es la chaperona exportadora de quitina sintasa Chs7 de *S. cerevisiae*, necesaria para el plegamiento y transporte de la quitina sintasa (CHS) Chs3 (clase IV), pero no necesaria para el transporte de las otras dos CHS en *S. cerevisiae* Chs1 y Chs2. Anteriormente se creía que Chs7 era una proteína residente del RE (Dharwada et al., 2018; Trilla et al., 1999). Sin embargo, se ha observado que Chs7 forma un complejo con Chs3, y co-localizan en la superficie celular, en el RE y en cisternas de Golgi. Si bien Chs7 es indispensable tanto para el transporte y función de Chs3, actuando también como un cofactor que regula la actividad enzimática de Chs3, Chs7 no depende de Chs3 para su salida del RE, pero depende de su asociación con Chs3 para su tráfico en pasos posteriores (Dharwada et al., 2018).

La chaperona Chs7 presenta una región conservada que abarca desde el residuo 287 al 301 ubicada en el extremo C-terminal. Esta región conservada es importante para la interacción entre Chs7 y Chs3 e incluye un supuesto motivo DxE (DLE) de unión al sitio B de Sec24. Sin embargo, este motivo DxE no es necesario para la exportación de Chs7 en vesículas COPII. Se ha sugerido que la secuencia DxE en Chs7 podría contribuir al plegamiento de Chs3 (Dharwada et al., 2018). El mecanismo mediante el cual Chs7 contribuye en la salida del RE de Chs3 es desconocido, pero se ha hipotetizado que Chs7 podría dirigir el complejo Chs3-Chs7 hacia las vesículas COPII utilizando motivos redundantes. También se ha sugerido que Chs3 porta las señales de exportación de RE, pero se encuentran enmascaradas por su estado conformacional, y solo cuando está unido Chs7 se vuelven accesibles estos sitios (Dharwada et al., 2018).

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* cuenta con siete CHS, que se localizan en el núcleo del Spitzenkörper (SPK) y en septos en formación, y que son transportadas en diferentes poblaciones de quitosomas que cumplen diferentes funciones durante su desarrollo asexual y sexual (Fajardo-Somera et al., 2015; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011). Se ha observado que la CHS-4 (clase IV), homóloga de Chs3 de *S. cerevisiae*, requiere de la chaperona CSE-7, homóloga de Chs7 en *S. cerevisiae*,

para su correcto transporte al ápice y septos (Rico-Ramírez et al., 2018).

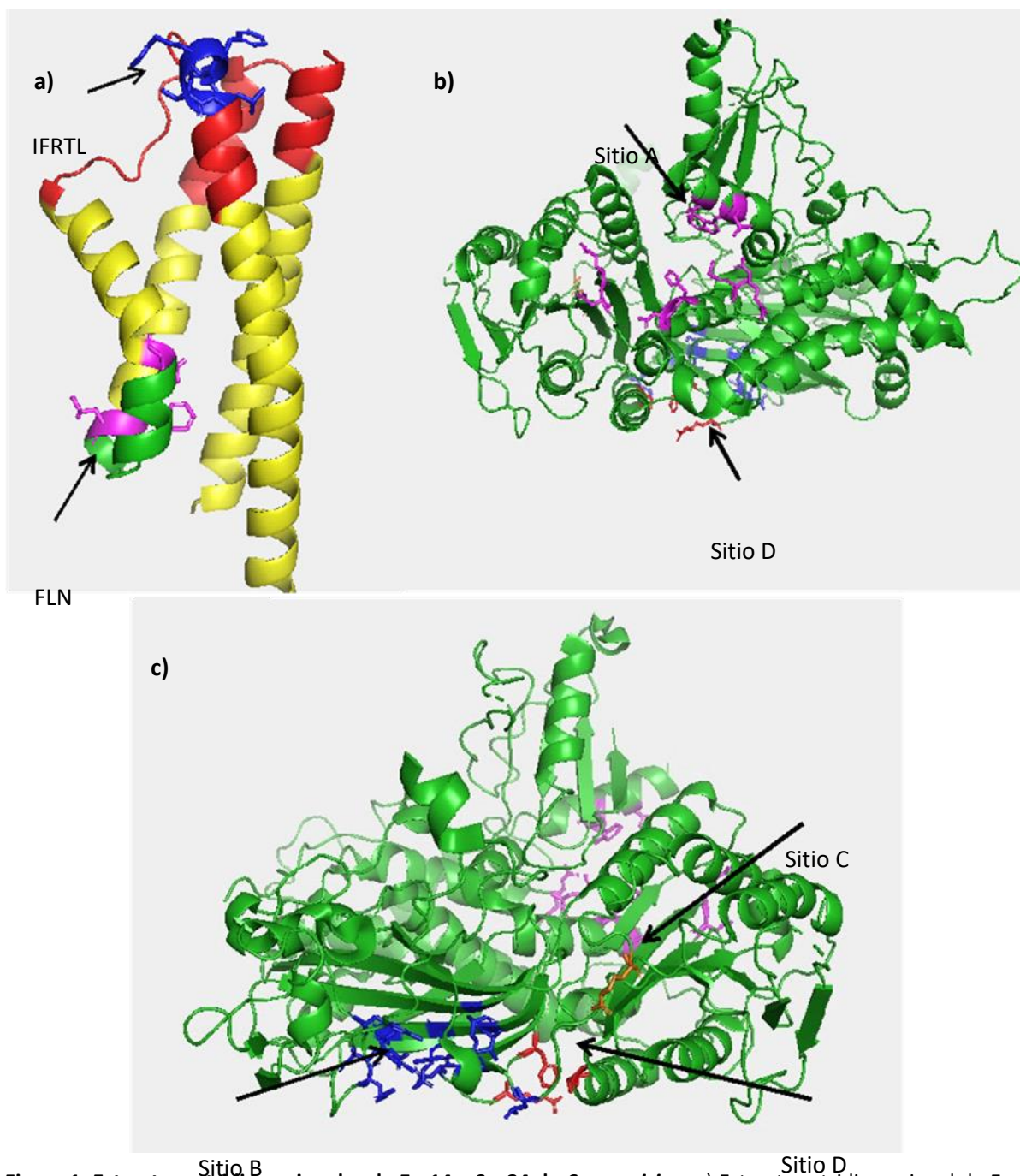


Figura 1. Estructuras tridimensionales de Erv14 y Sec24 de *S. cerevisiae*. a) Estructura tridimensional de Erv14; de color rojo se presenta la región citosólica de Erv14; dentro de la región citosólica, en color azul, se encuentra el motivo IFRTL; en verde se encuentra la región de unión a la proteína Yor1, que se conforma del motivo FLN (residuos F₆₂, L₆₃ y N₇₄) que se muestra en magenta. En b) y c) se muestra la estructura de Sec24 con sus sitios de unión; en magenta se observan los residuos que conforman el sitio A, en azul se encuentran los residuos del sitio B, en naranja los residuos pertenecientes al sitio C, y en rojo los residuos que integran el sitio D. Estructuras obtenidas de Uniprot y procesadas con Pymol con base en datos de Mancias & Goldberg, 2007; Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003; Pagant et al., 2015.

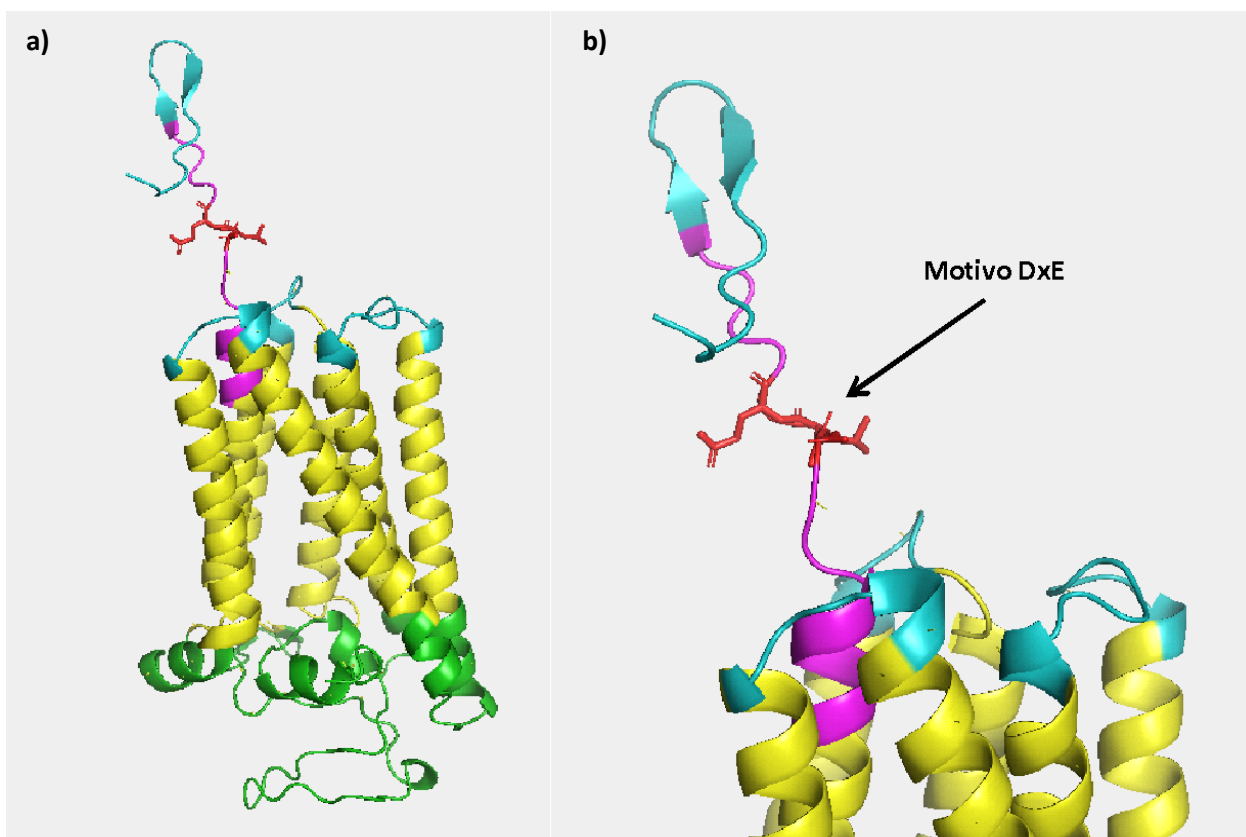


Figura 2. Estructura tridimensional de la chaperona Chs7 de *S. cerevisiae*. a) y b) En color amarillo se presentan los TMDs; en verde la región luminal del RE, en azul la región citosólica, en morado se encuentra la región conservada del extremo C-terminal y en rojo se encuentra el presunto motivo DxE. b) Corresponde a un acercamiento de a). Modelo obtenido de Uniprot, y procesado en Pymol.

En la vía secretora clásica, las proteínas sintetizadas en el RE van a Golgi, donde al igual que los lípidos, se procesan, clasifican y empaquetan en vesículas y transportadores para su entrega a sus destinos finales (Zhang & Wang, 2016). Una de las características distintivas de los hongos filamentosos es su modo de crecimiento apical, donde el crecimiento de la pared celular y la exocitosis son procesos vinculados. El tráfico de vesículas secretoras al ápice es un proceso altamente polarizado. Las vesículas se dirigen y acumulan temporalmente en el SPK que actúa como un centro de suministro de vesículas localizado en el ápice de la hifa (Bartnicki-Garcia et al., 1989).

Mientras que las proteínas necesarias para el crecimiento polarizado de los hongos siguen una ruta secretora para su localización apical (Martzoukou et al., 2018), como ocurre con las CHS de *N. crassa* (Fajardo-Somera et al., 2015; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011), los transportadores de MP que median la absorción celular selectiva o el flujo de salida no siguen las rutas clásicas dependientes de

Golgi. La proteína UapA de *Aspergillus nidulans* depende de vesículas COPII para su transporte, pero presenta un tráfico independiente de Golgi y no presenta una localización apical, sino que se localiza a lo largo de la hifa, lo que significa que UapA debe ser transportada en una subpoblación de vesículas COPII (Dimou et al., 2020).

En *S. cerevisiae*, la bomba de protones ATPasa Pma1 se entrega a la superficie celular a través de la vía secretora clásica, desde el RE al Golgi y posteriormente a la MP. La exportación fuera del RE de Pma1 depende de Sec24 y Lst1 para su empaquetamiento en vesículas COPII (Roberg et al., 1999). Por otro lado, en *N. crassa*, se ha observado que PMA-1 (el homólogo de Pma1 de *S. cerevisiae*) presenta una localización en la MP en la región distal y en septos completamente desarrollados, y no se acumula en el ápice (Fajardo-Somera et al., 2013). En estudios posteriores, se ha observado que en *A. nidulans* el componente de señalización de pH Pall y PmaA se translocan a la MP en las regiones distales, al igual que en *N. crassa*. Sin embargo, el tráfico de Pall y PmaA se lleva a cabo sin pasar por Golgi y sin la necesidad de polimerización de microtúbulos. Tanto PmaA y Pall de *A. nidulans* dependen de COPII para su salida del RE. Sin embargo, PmaA requiere de la subunidad de recubrimiento COPII alternativa LstA (homóloga de Lst1 de *S. cerevisiae*) en lugar de Sec24, mientras que Pall requiere del receptor carga Erv14 (Dimou et al., 2022). Esto puede indicar que, en los hongos filamentosos el tráfico de diversas proteínas transportadoras presenta una vía de secreción diferente a la que presentan las levaduras, diferente a la vía secretora clásica e independiente de Golgi y el SPK. En *N. crassa* se ha observado que ERV-14 etiquetada con proteínas fluorescentes se localiza en el RE (Sastré-Velásquez, 2018). También se ha observado co-localización parcial de ERV-14 y la Rab GTPasa YPT-1 (ortóloga de Rab1), en cisternas de Golgi. Sin embargo, no se ha observado co-localización con la proteína USO-1, una proteína necesaria para el anclaje inicial de vesículas derivadas del RE que se dirigen al Golgi temprano (Velásquez, 2018). Una posible interpretación a la presencia de ERV-14 en el Golgi pese a la ausencia de co-localización de ERV-14 con USO-1, junto a lo que se sabe del tráfico de proteínas de transporte en hongos filamentosos, es que ERV-14 junto a sus cargas se dirijan a la MP distal sin pasar por el Golgi. Sin embargo, debido a que ERV-14 es una proteína residente del RE, es posible que ERV-14 tenga que pasar por el Golgi para ser empaquetados en vesículas COPI que las lleven de regreso al RE.

1.1.1 Neurospora crassa como modelo

El primer genoma eucariota que se analizó fue el de *S. cerevisiae*, proporcionando la base para el estudio

de las funciones celulares centrales eucariotas (Goffeau et al., 1996). Sin embargo, *S. cerevisiae* tiene limitaciones como modelo incluso para el estudio de hongos, por esta razón fue relevante que *N. crassa* fuera el primer hongo filamentoso con genoma secuenciado (Galagan et al., 2003; Mannhaupt et al., 2003; Hynes, 2003)

Neurospora crassa ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de la genética moderna. Fue el organismo con el que Edward Tatum y George Beadle desarrollaron el concepto de “un gen, una enzima”. Esto fue posible gracias a que *N. crassa* es un organismo que podía cultivarse en medio mínimo simple que contenía sales inorgánicas, sacarosa y una sola vitamina, con características genéticas bien conocidas y un organismo haploide; esto permitió la obtención de los primeros mutantes auxótrofos (Davis & Perkins, 2002; Hynes, 2003).

El ciclo de vida de *N. crassa* presenta una etapa sexual y una etapa asexual. Se presentan dos tipos de esporas asexuales en *N. crassa*, macroconidios y microconidios. Las cepas silvestres (WT, del inglés wild type) de uso habitual en el laboratorio producen una gran cantidad de macroconidios, que se presentan como esporas multinucleadas de color naranja, producidas por tabicación de hifas. Por otro lado, los microconidios solo poseen un núcleo que se producen a partir de las hifas vegetativas como esporas individuales, y aparecen en la fase estacionaria tardía en cultivos de agar y cuentan con una viabilidad muy baja en comparación con los macroconidios (Schmit & Brody, 1976).

Neurospora crassa es una especie heterotálica, con dos tipos de apareamiento (*mat A* y *mat a*) determinados por un solo locus. El ciclo sexual inicia cuando un protoperitecio de un tipo de apareamiento es fertilizado por microconidios, macroconidios o fragmentos de micelio del tipo de apareamiento complementario. Los protoperitecios fertilizados se convierten en peritecios, en los que se forman las ascas. En cada asca inmadura se fusionan dos núcleos haploides de tipos de apareamiento complementarios; el cigoto que se forma sufre dos divisiones meióticas, seguidas de una mitosis postmeiótica. En cada asca se producen ocho ascosporas homocarióticas, haploides (Raju, 1992). El ciclo de vida de *N. crassa* se resume en la figura 3.

En este proyecto se diseñó una construcción génica (*cse-7Δdc2^{me-erv-14}-mCherry*), usando como andamio la chaperona CSE-7, a la que se le insertó las señales de exportación de ERV-14 y una etiqueta mCherry en el extremo C-terminal, y se expresó la proteína quimérica en *N. crassa*. La construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-mCherry* se co-expresó con *chs-4::gfp* para determinar las alteraciones en el tráfico de las proteínas CHS-

4 y CSE-7. Se espera que esta proteína quimérica ayude a comprender el proceso de reparto y clasificación de ERV-14 y CSE-7, así como sus respectivas cargas en hongos filamentosos, además de dilucidar el papel que desempeñan tanto los TMDs como los motivos de exportación citosólicos en los procesos de reparto y tráfico de proteínas.

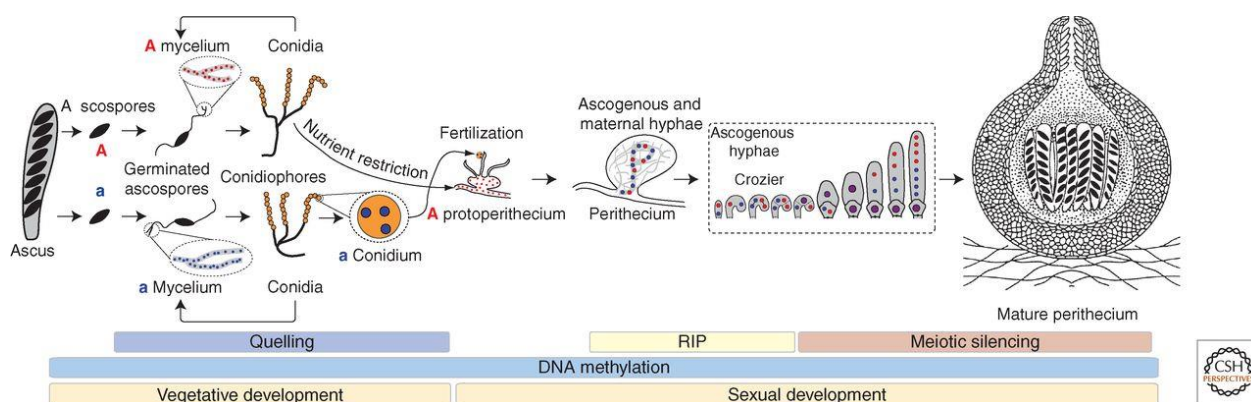


Figura 3. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. *Neurospora crassa* cuenta con un ciclo asexual y un ciclo sexual, en su ciclo asexual, el micelio haploide forma conidios (microconidios y macroconidios), que al germinar produce nuevo micelio. El ciclo sexual se origina a partir de la fertilización de un protoperithecio con la fusión de núcleos provenientes de conidios o micelio de una cepa complementaria, formando un núcleo 2N del cigoto, que realiza dos meiosis, seguidas por una mitosis, generando ascas de ocho ascosporas en el interior de un perithecio. Obtenido de Aramayo & Selker, 2013.

1.2 Justificación

El receptor de proteínas carga ERV-14/Cornichon es una proteína conservada en todos los organismos eucariotas, desempeñando un papel esencial en el tráfico de una gran diversidad de proteínas a través de la vía secretora. Sin embargo, los mecanismos que rigen el tráfico y reparto de las proteínas de la vía secretora no han sido dilucidados por completo. Se desconoce aún cómo trabajan las múltiples señales de clasificación para determinar la ruta de tráfico de una proteína y hasta qué punto los receptores de proteínas carga son capaces de determinar este proceso. Por esta razón, este estudio pretende comprender como los dominios de exportación de ERV-14 de *N. crassa* son capaces de mediar la exportación de sus proteínas carga y la ruta que sigue hasta llegar a su destino final.

1.3 Hipótesis

El sitio de exportación IFRKL de ERV-14 determinará que la proteína *CSE-7*Δ*DC2*^{ME-ERV-14} y su carga CHS-4

no se localicen en septos y Spitzenkörper, y que en cambio se localicen en la MP distal (Figura 4c).

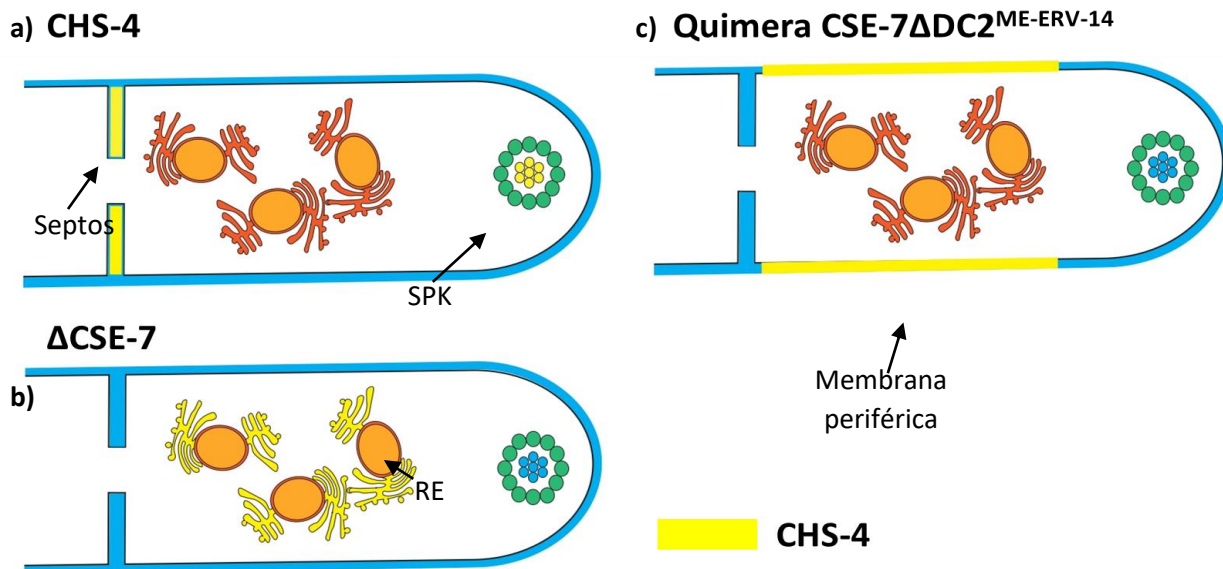


Figura 4. Modelo representativo de la distribución de CHS-4 en diferentes cepas de *N. crassa*. Cepas a) WT, b) $\Delta cse-7$ y c) cepa esperada al expresar la quimera diseñada en este trabajo. El color amarillo representa la ubicación de CHS-4 en la hifa de *N. crassa*.

*RE: Retículo endoplasmático

*SPK: Spitzenkörper

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el comportamiento del sitio de exportación IFRKL de ERV-14, y el papel que desempeñan en el tráfico intracelular los sitios de exportación citosólicos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar las secuencias de exportación del receptor ERV-14 de *N. crassa*
- Identificar los posibles sitios de exportación de la chaperona CSE-7
- Determinar el efecto del sitio de exportación IFRKL en CSE-7 y su carga CHS-4

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de los genes *cse-7* (NCU05720), *chs-4* (NCU09324) y *erv-14* (NCU06922) se obtuvieron de la base de datos FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app/>).

Empleando la herramienta BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se buscaron las proteínas ortólogas en *N. crassa* de las proteínas identificadas en la búsqueda bibliográfica y se recolectaron las secuencias y estructuras en la base de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>). Para las proteínas que no se encuentren estructuras tridimensionales, se obtuvieron los modelos tridimensionales utilizando el servidor Alphafold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) utilizando un modelo de alineamiento múltiple “unpaired_paired” o MSA combinado, dado que combina los enfoques de los MSA emparejados y no emparejados utilizando 3 ciclos, parámetros utilizados en el modelado de todas las estructuras generadas en esta investigación.

Se utilizó el servicio web HDock Server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) y ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/>) para la obtención de modelos de interacción CSE-7-CHS-4, ERV-14-SEC-24, CSE-7-SEC-24 y las proteínas GET-1 y ERG-2 con SEC-24 como control negativo. Utilizando los modelos de interacción obtenidos mediante el acoplamiento molecular, se determinaron los posibles sitios de unión del receptor a la carga y ERV-14-SEC-24, utilizando Pymol 2.5.4 para el análisis *in silico* y edición de las estructuras. Para ello se usó también como base motivos de ERV-14 que median la interacción con SEC-24 y las proteínas carga que fueron identificados en la búsqueda bibliográfica.

El diseño *in silico* de la proteína quimérica CSE-7-ERV-14 que sea capaz de reconocer a CHS-4 de *N. crassa*, pero actúe como ERV-14, se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos del modelo de interacción receptor-carga. La construcción de la proteína quimérica empleó como andamio la proteína CSE-7, a la que se le insertó las secuencias de exportación de ERV-14.

El modelado de la estructura tridimensional de la proteína quimérica se obtuvo utilizando el servidor web Alphafold2. Para evaluar la calidad del modelo se obtuvieron los gráficos de Ramachandran utilizando la

herramienta web SAVE v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

2.2 Recolección de conidios de *N. crassa*

Para la recolección de los conidios de las cepas utilizadas en el estudio, se inocularon 20 μ L del stock de conidios de cada cepa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1956) con 1.5% de sacarosa, suplementado con L-histidina (500 μ L/mL) en el caso de las cepas auxótrofas. Los matraces se incubaron a 30°C en condiciones de oscuridad por 48 h, seguido de 48 h de incubación a temperatura ambiente en exposición a la luz. Una vez hubo conidiación, se añadieron 50 mL de agua destilada estéril en el matraz y se desprendió el micelio mediante agitación constante. La suspensión de micelio y conidios se filtró usando una tela estéril. El filtrado se recuperó en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los conidios con 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión se centrifugó de nuevo a 3500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de conidios se resuspendió en 1 mL de sorbitol al 1 M y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL para su conservación a -20°C.

2.3 Métodos moleculares

2.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la fusión de los genes *cse-7* y *erv-14* como se describe en la Figura 5. Los oligonucleótidos P1-*cse-7*-FW y P2-*ifrkl*-RV se diseñaron para la amplificación desde el marco abierto de lectura (ORF) del gen *cse-7*, hasta la región en donde se insertó el motivo de exportación de *erv-14*, añadiendo el sitio de restricción de *Xba*I en el extremo 5'. Los oligonucleótidos P3-*ifrkl*-FW y P4-*cse7*-FW se diseñaron para la amplificación desde el extremo 5' donde se insertó el motivo de exportación de *erv-14* y el codón anterior al codón de paro de *cse-7*, añadiendo el sitio de restricción de *Xma*I.

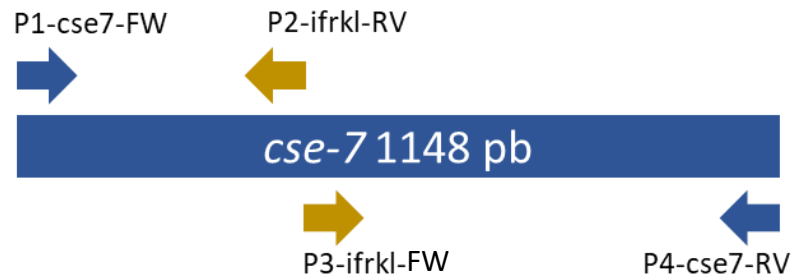


Figura 5. Regiones de amplificación con los oligonucleótidos diseñados. Los oligonucleótidos P1-cse-7-FW y P4-cse7-RV incluyen los sitios de restricción de *Xba*I y *Xma*I, respectivamente, mientras que P2-ifrkl-RV y P3-ifrkl-FW incluyen las secuencias de solapamiento con el motivo de exportación de *erv-14*.

2.3.2 Extracción del DNA genómico de *Neurospora crassa*

Se inocularon 1×10^6 conidios de la cepa SMRP13 de *N. crassa* en un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de MMV líquido y se incubaron a 30°C por 2 días o 3 días en oscuridad. Cuando hubo crecido suficiente micelio, éste se recuperó por filtración al vacío, y se lavó con agua destilada. El micelio se transfirió a un tubo Eppendorf para sumergirlo en nitrógeno líquido, y se liofilizó durante toda la noche. Una vez liofilizado, el micelio se pulverizó en un mortero y pistilo estéril. Para la extracción del DNA genómico se utilizó el kit DNeasy Plant mini kit de Qiagen de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

2.3.3 Construcción del plásmido VMRP-105

La secuencia de tagrfp se amplificó del vector VMRP-163, utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 2. El oligonucleótido O1 añadió el sitio de restricción de *Xba*I en el extremo 5' de la secuencia de tagrfp, y el oligonucleótido O2 añadió el sitio de restricción de *Eco*RI en el extremo 3'. El amplicón de tagrfp se digirió con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI, y se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, recuperando la banda correspondiente al segmento tagrfp para posteriormente extraer y purificar el fragmento empleando el QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen®. El plásmido VMRP-13 (pMF272) se digirió usando también las enzimas *Eco*RI y *Xba*I para eliminar la secuencia codificante de GFP, y mediante electroforesis en gel de agarosa se recuperó el plásmido linealizado (7759 pb) empleando nuevamente el kit de extracción Qiagen®. El segmento purificado de tagrfp se subclonó en el vector VMRP-13 para reemplazar la secuencia codificante de GFP, realizando la ligación con la T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific). Las características de los plásmidos se presentan en la Figura 6 y Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este proyecto y sus características.

Plásmidos	Genotipo	Selección	Tamaño (pb)	Origen
VMRP-13	<i>3'his-3 flank::Pccg1::sgfp+::5'Δhis-3</i>	Amp /His	8479	Freitag et al., 2004
VMRP-68	<i>3'his-3 flank::Pccg1::mcherry+::5'Δhis-3</i>	Amp/His	9036	Verdin, J. 2009.
VMRP-163	<i>3'his-3 Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR:: 5'Δhis-3</i>	Amp/His/NCT	9460	Ramos-Pulido, J 2020
VMRP-105	<i>3'his-3 flank::Pccg1::tagrfp+::5'Δhis-3</i>	Amp /His	8458	Martinez, A. Este estudio
VMRP-159	<i>Pccg-1::chs-4-8xGly-mchfp</i>	Amp	12827	Riquelme, M. 2013

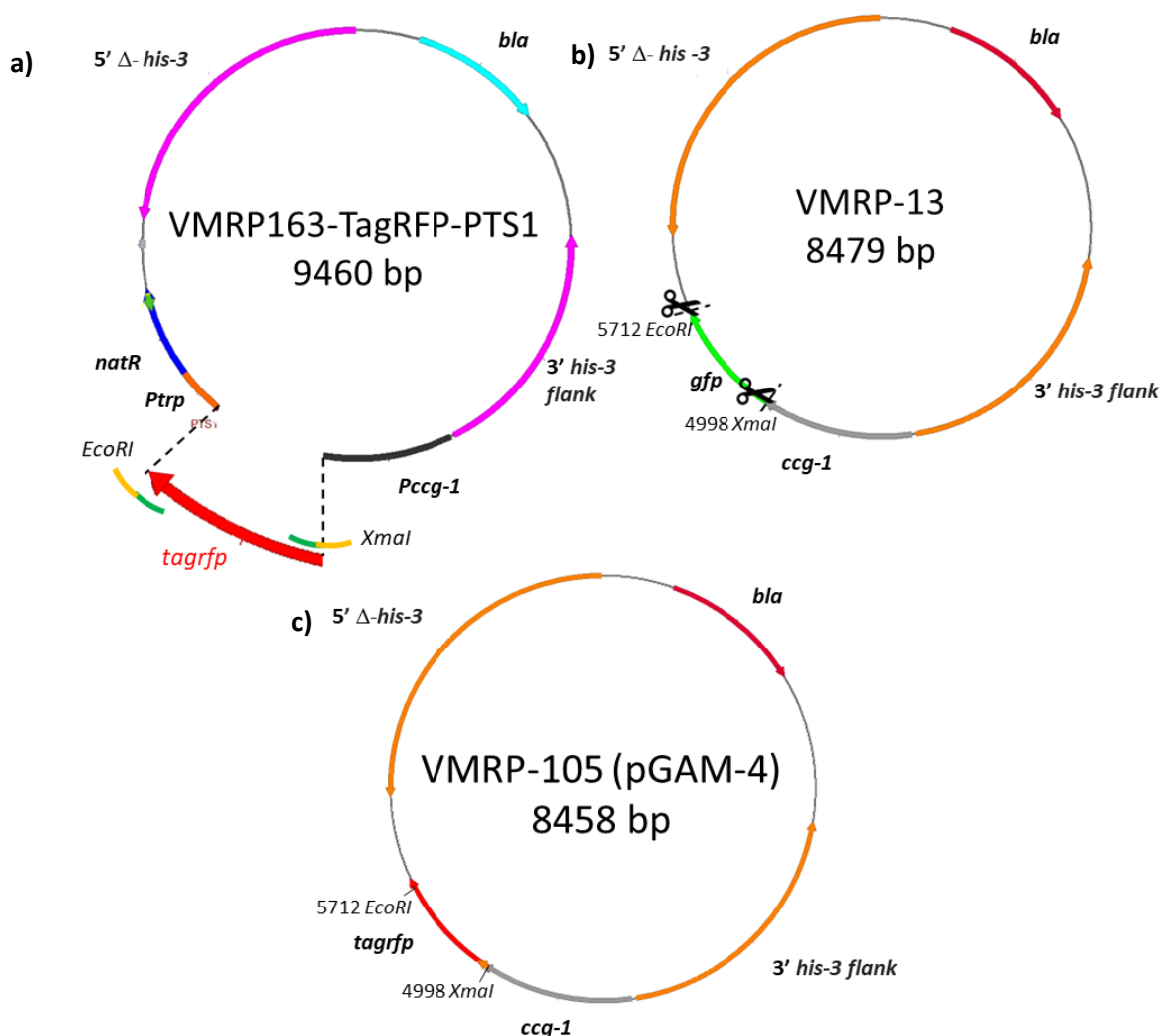


Figura 6. Vectores utilizados para la construcción del vector VMRP-105 (pGAM-4). a) Se utilizó el vector VMRP163 para la amplificación del gen de la *tagrfp*, insertando los sitios de restricción de *XmaI* y *EcoRI* a través de los oligonucleótidos. b) El vector VMRP-13 se utilizó para subclonar el gen codificante de la TagRFP, reemplazando el gen *gfp* utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *XmaI*. C) El vector pGAM-4 se obtuvo a partir de la subclonación del gen *tagrfp* en el vector VMRP-13.

2.3.4 Construcción del casete codificante de la proteína quimérica CSE-7-ERV-14

La construcción del casete codificante de la proteína quimérica se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos diseñados que se encuentran en la Tabla 3 y ADN genómico de *N. crassa* como templado. Para la obtención del fragmento 1 (F1) se realizó la amplificación directa del gen *cse-7* (NCU05720) con el oligonucleótido P1 que añadió el sitio de restricción de *Xba*I en el extremo 5' y el oligonucleótido P2 que interrumpió el gen y añadió en extremo 3' una región complementaria al extremo 5' del sitio de exportación IFRKL de *erv-14*. Para la obtención del fragmento 2 (F2), el oligonucleótido P3 amplificó el resto del gen *cse-7*, añadiendo en el extremo 5' una secuencia complementaria al extremo 3' del sitio de exportación de *erv-14*, y el oligonucleótido P4 añadió el sitio de restricción de *Xma*I en el extremo 3' del segmento de *cse-7*. Los fragmentos F1 y F2 se ligaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos P1 y P4, generando el fragmento 3 (F3), como se muestra en la Figura 7a.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp* y clonación del gen *tagRFP*.

Proteína	Fragmento	Oligonucleótidos	Tm	GC	pb
Quimera	1	P1-cse7-FW 5' gctctagaATGGGCAAATTCGGAGATTCAGCAGCATATGTC 3'	76°C	45%	42
		P2-ifrkl-RV 5' taagcttgccgaagatctcagtggcGAAGCCGACGAAGCCGTTAATC 3'	82°C	53%	47
	2	P3- ifrkl-FW 5' tgagatcttccgcaagcttaatgtcCTCTCGTTATGGATGCTCCGCCTC 3'	81°C	51%	49
		P4-cse8-RV 5' tccccgggATACCTCAAGGACTGCCTGTTG 3'	80°C	61%	31
TagRFP	NA	O1- Sentido 5' tccccgggATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG 3'	80°C	63%	30
	NA	O2- Antisentido 5' ccggaattcttaTTTGTGCCCCAGTTTGCTAGGGAGGTC 3'	78°C	51%	39
LST-1	NA	LST1Fw-Sentido 5' GCGCTGCATCAACGTCATCGCCGGC 3'	70°C	68%	25
	NA	LST1Rv-Antisentido 5' CCTCCGCCGCTCCGCCCAATACGCAGGCCTCAACCCCGTAAAGC 3'	81°C	70%	46

Los nucleótidos en mayúsculas corresponden a las secuencias de los insertos, mientras que los nucleótidos en minúsculas corresponden a los sitios de restricción.

Se realizó el etiquetado C-terminal de la proteína quimérica con 3 etiquetas diferentes, TagRFP, GFP y mCherry. Para ello se insertó el casete de la proteína quimérica en tres vectores, el vector pGAM-4, VMRP-13 y VMRP-68. El mapa y características de los vectores se muestran en la Figura 7b y la Tabla 2. Para ello, tanto el casete como los vectores fueron digeridos con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I. Tanto el plásmido como el vector se corrieron en un gel de agarosa y se recuperaron las bandas correspondientes al plásmido linealizado y el casete digerido, para posteriormente extraerlos y purificarlos empleando el kit de extracción Qiagen®. El casete y el plásmido recuperado se ligaron con la T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific).

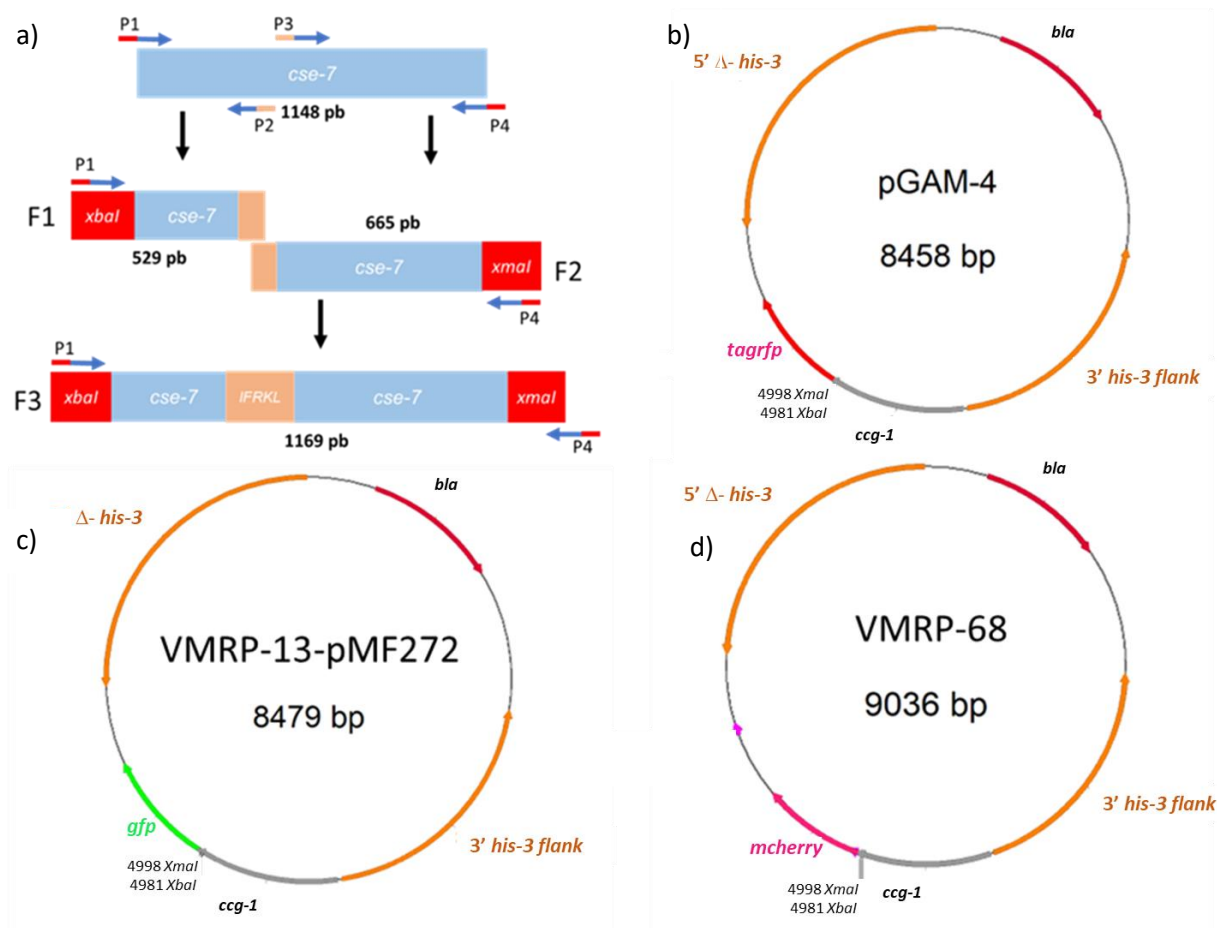


Figura 7. Esquema de la construcción del casete de la *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp*. Los oligonucleótidos P1 y P4 añaden los sitios de restricción de *Xba*I y *Xma*I, respectivamente. b) Esquema del plásmido pGAM-4; la etiqueta de GFP fue reemplazada por la etiqueta TagRFP. Esquemas de los vectores c) VMRP13 y d) VMRP-68.

2.4 Obtención de cepas

2.4.1 Cruzas sexuales

Para la obtención de una cepa SMRP532 que fuera knock out de *cse-7* y auxótrofa a histidina (*his-3*⁻), se realizó la cruce sexual de la cepa SMRP72 y la cepa SMRP8. Las características de las cepas se muestran en la tabla 4. Para ello, se inocularon en una placa de medio sintético de cruces (MSC) (sacarosa al 2%, agar al 1.5% y sales de MSC 2X compuesto por 2g KNO₃, 1.4 g de K₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄, 2 g de MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g de NaCl, 0.2 g de CaCl₂, 10 mg de biotina y 0.2 mL de solución de elementos traza) (Westergaard & Mitchell, 1947) aproximadamente 8 x 10⁶ conidios de la cepa SMRP72 y se dejó incubar durante 24 h a 25°C en condiciones de oscuridad. Pasadas 24 h de incubación se inoculó sobre el micelio la misma concentración de conidios de la cepa SMRP235 y se dejó incubar durante 15 días a 25°C, hasta observar la presencia de peritecios.

2.4.2 Obtención de cepas homocariontes

Se recuperaron las ascosporas de las tapas de los cultivos de cruces sexuales, para ello se realizaron lavados de las tapas con agua destilada estéril. Para activar las ascosporas, se sometieron a choque térmico a 60°C durante 1 h. Las ascosporas activadas se sembraron en placas de MMV suplementadas con L-histidina (500 µL/mL) y se incubaron a 25°C por 18 h. Empleando un estereoscopio, se transfirieron las ascosporas germinadas a tubos con 1 mL de MMV suplementado con L-histidina y se incubaron a 30°C por 48 h. Se seleccionó la progenie con las mutaciones $\Delta cse-7$ e *his-3*⁻; para ello, los cultivos obtenidos se inocularon en placas con MMV con y sin histidina, y se seleccionaron las placas que no presenten crecimiento en las placas no suplementadas con histidina. Las cepas que resultaron ser auxótrofas para histidina, se inocularon en tubos con medio MMV suplementadas con histidina, con y sin higromicina, seleccionando aquellas que crecieron en presencia de higromicina. Las cepas seleccionadas se caracterizaron molecularmente mediante PCR, amplificando el gen de *cse-7* con los oligonucleótidos P1 y P4, donde se seleccionaron las cepas que no presentaron amplificación del gen *cse-7*. Como control positivo, para confirmar el estado del DNA de las progenies, se realizó la amplificación del gen de *lst1*, utilizando los oligonucleótidos LST1Fw y LST1Rw. Ya que se determinaron las cepas auxótrofas a histidina y que presentaron el genotipo $\Delta cse-7$, se seleccionaron las cepas *mat A* y *mat a*; para ello se realizó la cruce sexual con las cepas fluffy.

2.4.3 Transformación de *N. crassa*

Se transformaron conidios de *N. crassa* de la cepa SMRP24 (FGSC # 9717), SMRP532 y SMRP395 mediante electroporación. Para ello se añadió 2000 ng del plásmido pGAM-8 y pGAM-9 linearizados con la enzima de restricción *SspI*, a aproximadamente 1×10^8 conidios previamente lavados tres veces en sorbitol al 1M. La transformación de la cepa se realizó en un electroporador Gene Pulser Xcell de Biorad empleando 1.5kV, 25µFD y 600Ω en un pulso constante de 12-14 ms. Después de someter los conidios a un choque eléctrico, se agregó 1 mL de sorbitol al 1M y se sembraron 350 µL en placas de medio Fructosa, Glucosa, Sorbosa (FGS) (sales de Vogel al 2%, agar al 1% y solución FGS al 10%, compuesta por fructosa 0.5%, glucosa 0.5%, y sorbosa 20%) y se incubaron por 4-5 días a 30°C. Dado que los vectores pGAM-8 y pGAM-9 cuentan con regiones homólogas a *his-3*, el plásmido permite la integración del casete por recombinación homóloga dirigida a *his-3* y eliminar la auxotrofia a histidina.

Tabla 4. Cepas que se utilizaron en este estudio.

Cepa	Genotipo	Tipo de apareamiento	Condición nuclear
SMRP13	WT	<i>Mat a</i>	Homocarión
SMRP17	fluffy	<i>Mat a</i>	Homocarión
SMRP18	fluffy	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP72	$\Delta cse-7$	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP8	WT <i>his-3</i>	<i>Mat a</i>	Homocarión
SMRP24	<i>his-3</i> Δ <i>mus-51::bar⁺</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP395	<i>Pchs-4::chs-4-10xGly-gfp::nat⁺; <math>\Delta cse-7::hph⁺; his3⁻; <math>\Delta mus51::bar⁺</math></math></i>	<i>Mat a</i>	Homocarión
SMRP408	<i>Pcse-7::cse-7-10xGly-gfp::hph⁺; <math>\Delta mus51::bar⁺</math></i>	<i>Mat a</i>	Heterocarión

2.5 Microscopía

Para el tamizaje de las cepas transformantes se realizó microscopía confocal de barrido laser empleando

un microscopio invertido Olympus FluoviewTM FV1000 con un láser de estado sólido bombeado por diodos (TagRFP y mCherry: 543 nm de excitación, 583 nm de emisión) y un laser de argon (GFP: 488 nm de excitación, 505-525 nm de emisión), empleando un objetivo de 60X, con una NA de 1.42.

Para observar la distribución y comportamiento de la proteína quimérica CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}::TagRFP, se realizó un análisis empleando microscopía confocal de barrido laser, empleando un microscopio invertido Olympus FluoviewTM FV1000. Las imágenes fueron obtenidas con el software FLUOVIEW FV1000 4.0.2.9, Olympus y se analizaron con el software Fiji ImageJ.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis bioinformáticos

3.1.1 Análisis de secuencias

La secuencia de nucleótidos del gen de *cse-7* (NCU05720) se obtuvo de la base de datos de NCBI. Este gen se encuentra en el cromosoma III y consta de 2395 pb, de los cuales 1148 pb corresponden al marco abierto de lectura (ORF). El gen de *cse-7* está conformado por 3 intrones y 2 exones, y codifica una proteína de 358 aminoácidos. La proteína CSE-7 posee 7 TMD y 4 dominios citoplasmáticos. Se realizó la alineación de secuencias de las proteínas homólogas de CSE-7 y ERV-14 de los hongos pertenecientes a la subdivisión, división y subreino de *N. crassa*, y se determinaron las secuencias consenso de los dominios citoplasmáticos de las proteínas ERV-14 y CSE-7, que se presentan en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5. Secuencia consenso de los dominios citosólicos de los homólogos de ERV-14 pertenecientes a los hongos de la subdivisión, división y subreino a los que pertenece *N. crassa*. Los motivos de exportación se muestran marcados por un recuadro rojo.

Dominio citosólico 1	Dominio citosólico 2
Pezizomycotina Ascomycota Eumycota	Pezizomycotina Ascomycota Eumycota

Usando las secuencias utilizadas para el análisis de secuencias, se obtuvieron árboles filogenéticos de las proteínas CSE-7 y ERV-14. Utilizado el software MEGA12 se construyó un árbol Neighbor-Joining usando un Bootstrap con 500 réplicas, y utilizando un modelo de Jones-Taylor-Thornton con un parámetro Gamma de 1.33 y 0.87, respectivamente (Fig. 8 y Fig. 9).

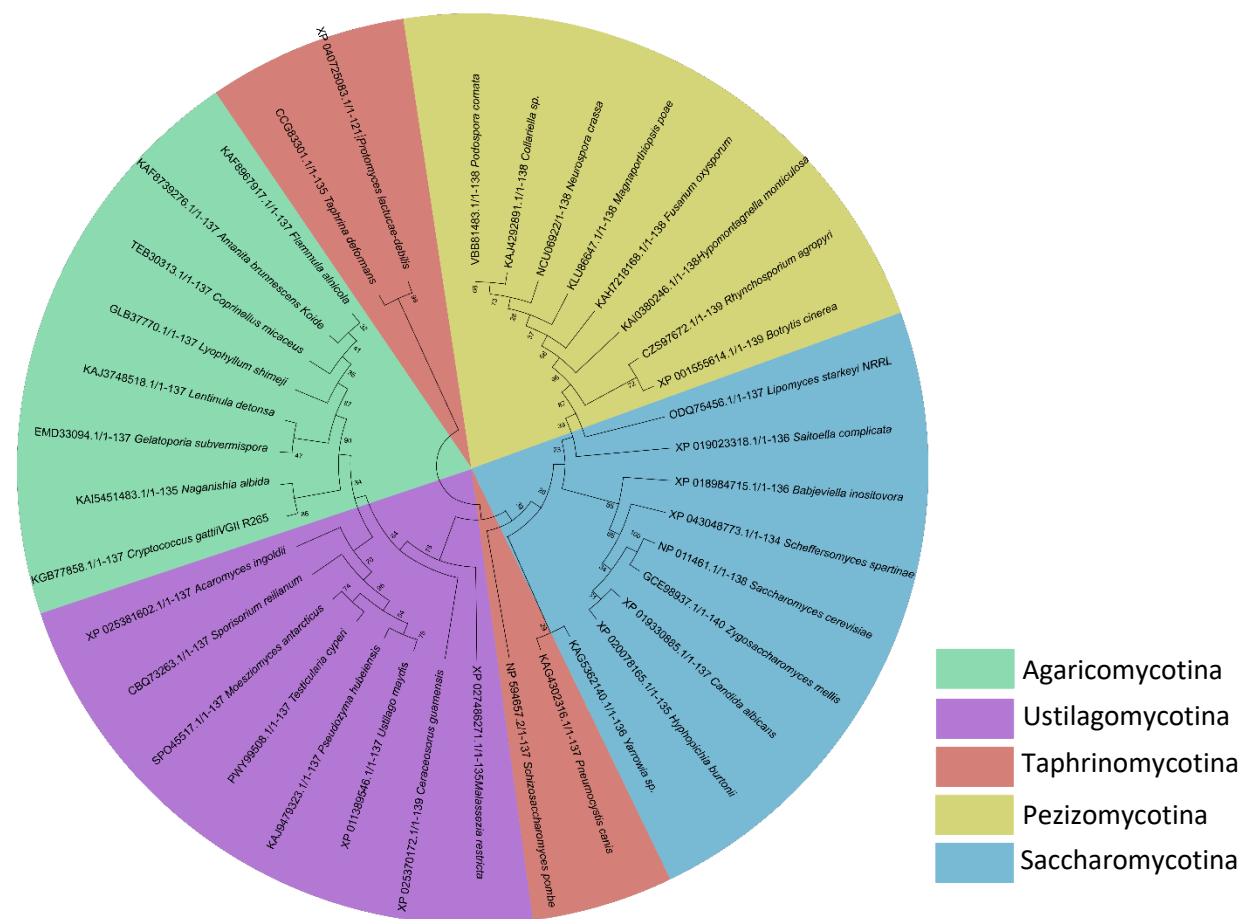


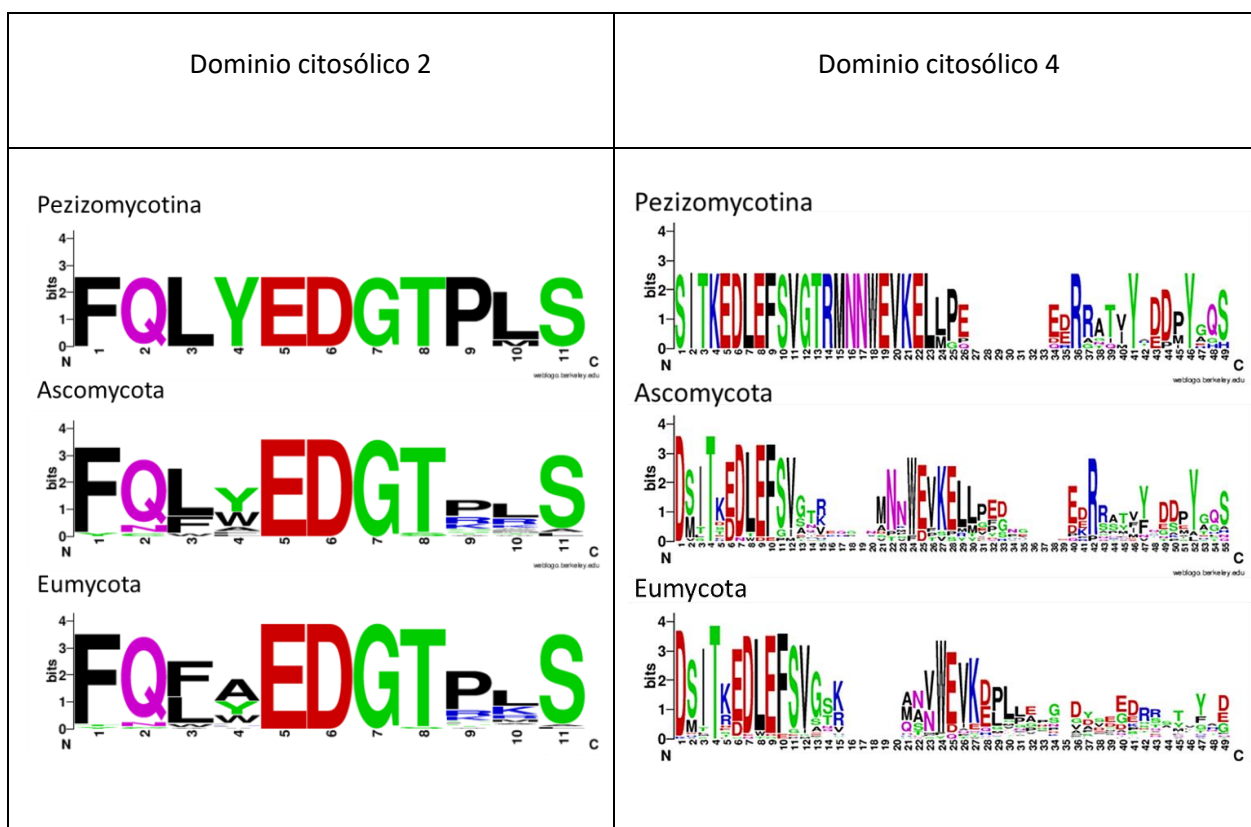
Figura 8. Árbol filogenético de la proteína ERV-14 en hongos. Se muestran 39 especies representativas de los Phyla Ascomycota (subdivisiones Pezizomycotina y Saccharomycotina) y Basidiomycota (subdivisiones Agaricomycotina, Ustilagomycotina y Taphrinomycotina) identificadas con colores. En las ramas se muestra el porcentaje de Bootstrap sobre 500 réplicas realizadas.

Se observó la presencia de una secuencia conservada “DLEXD” en el dominio citosólico 1 de ERV-14 en los Eumycota. La secuencia DxE es un motivo de exportación conocido, que interacciona con el sitio B de Sec24. Por otro lado, en el dominio citosólico 2, los hongos pertenecientes a la subdivisión Pezizomycotina, la subdivisión a la que pertenece *N. crassa*, se presentó la secuencia conservada “DATEIFRKL”, mientras que en el resto de los Eumycota se presentó una secuencia conservada similar, pero con una treonina en

[illegible]

Figura 9. Árbol filogenético de la proteína CSE-7 en hongos. Se muestran 36 especies de representativas del Phylum y sus subdivisiones identificado con colores. En las ramas se muestra el porcentaje de Bootstrap sobre 500 réplicas realizadas.

Tabla 6. Secuencia consenso de los dominios citosólicos 2 y 4 de los homólogos de CSE-7 pertenecientes a los hongos del subphylum, phylum y división a los que pertenece *N. crassa*.



3.1.2 Análisis de estructuras

Se obtuvieron dos modelos de interacción entre ERV-14 y SEC-24 que se muestran en la Figura 10. En el modelo 1, ERV-14 es capaz de interactuar a través de su motivo DxE y motivo IFRKL con los sitios B y D de SEC-24, respectivamente. Mientras que en el modelo 2, ERV-14 interactúa únicamente a través de su motivo IFRKL con el sitio B de SEC-24. Para garantizar la fiabilidad de los modelos, se realizó un acoplamiento molecular entre SEC-24 y dos proteínas residentes del RE como control, las proteínas GET-1 (NCU10034), necesaria para la entrega postraduccional de proteínas ancladas en la cola en el RE y ERG-2 (NCU04156), implicada en la síntesis de esteroides. No se observó la interacción entre las proteínas control y los sitios de unión de SEC-24. En la Figura 11 se observan dos modelos representativos del acoplamiento molecular entre SEC-24 y las proteínas GET-1 y ERG-2.

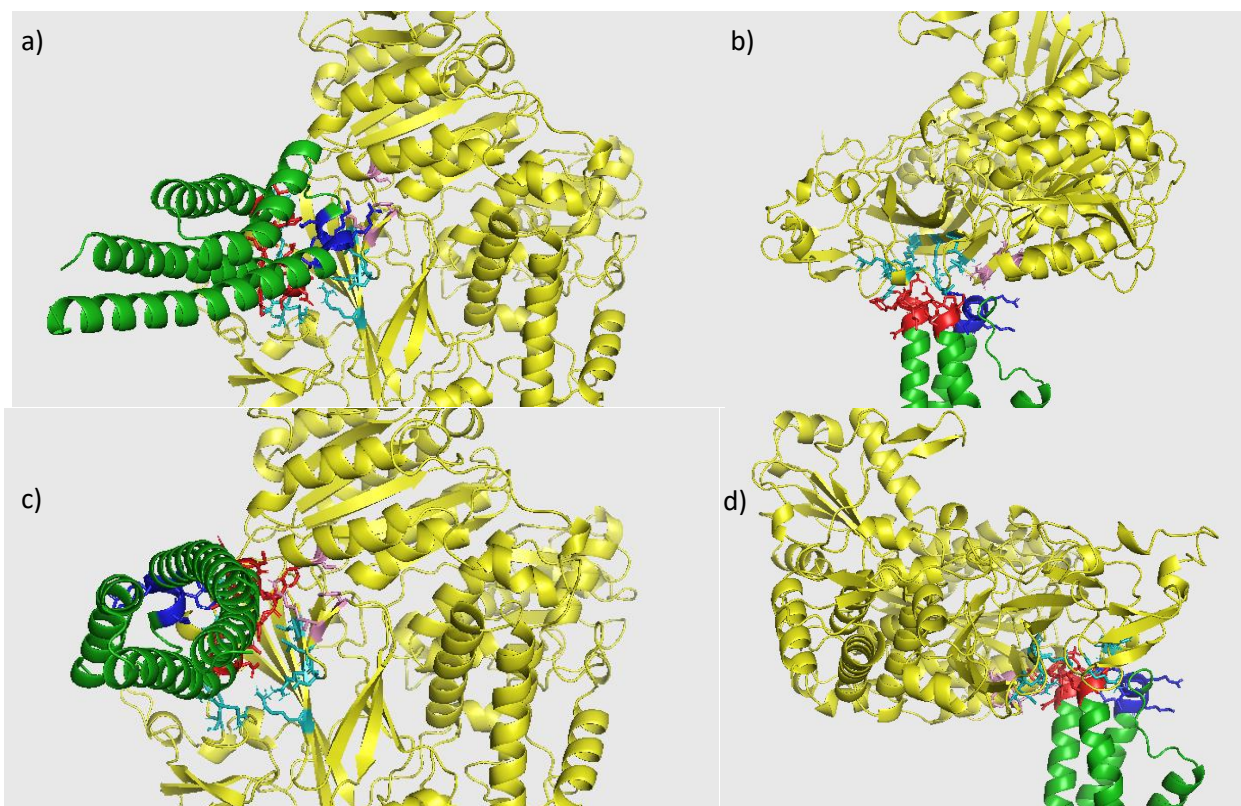


Figura 10. Modelos de interacción entre ERV-14 y SEC-24. a) y b) En el modelo 1, ERV-14 (verde) interacciona con SEC-24 a través de su motivo DxE (rojo) e IFRKL (azul) con los sitios B (cian) y D (rosa) de SEC-24 (amarillo). a) Vista inferior del modelo, b) vista lateral del modelo. c) y d) En el modelo 2, ERV-14 interacciona únicamente a través de su motivo DxE (rojo) con el sitio B (cian) de SEC-24. c) Vista inferior del modelo, d) vista lateral del modelo.

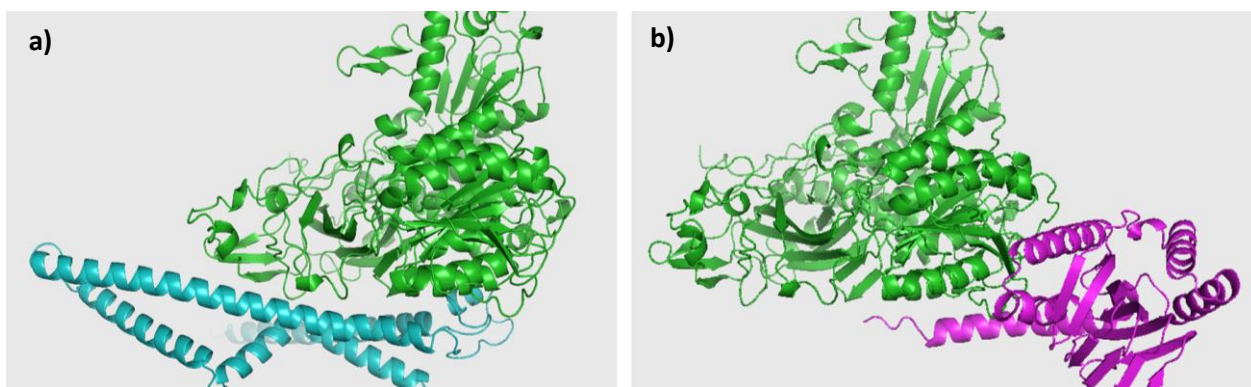


Figura 11. Controles negativos del acoplamiento molecular con SEC-24. Acoplamiento molecular entre SEC-24 y dos proteínas residentes del RE, las proteínas a) GET-1 y b) ERG-2. a) GET-1 y b) ERG-2 no presentaron interacción con los sitios de unión de SEC-24.

Empleando el servidor APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/>) se obtuvo el modelo de cargas electrostáticas de las proteínas ERV-14 y Sec24 (Figura 12), donde se observó la presencia de una gran cantidad de cargas positivas en la cara de SEC-24 orientadas hacia la membrana, incluyendo el sitio B. Por

otro lado, se observó la presencia de cargas negativas en el sitio D. Esto se corresponde con las cargas de los sitios citosólicos de ERV-14, que presentan una carga opuesta a su sitio de interacción.

Para determinar si la secuencia de un solo dominio citosólico de ERV-14 por sí solo es capaz de interactuar con su sitio de unión correcto, se realizó un acoplamiento molecular entre SEC-24 y dos péptidos conformados por los dominios citosólicos de ERV-14. El dominio citosólico 1 (DLECDYINPID) que incluye el motivo DxE mostró ser capaz de interactuar de dos formas diferentes con el sitio B de SEC-24, de la misma forma que lo hace la proteína completa, y de forma opuesta a como lo hace ERV-14. Por otro lado, el dominio citosólico 2 (HLLDATEIFRKLNVHKKE), interacciona con el sitio D de SEC-24 únicamente de forma idéntica a como lo hace la proteína completa (Figura 13).

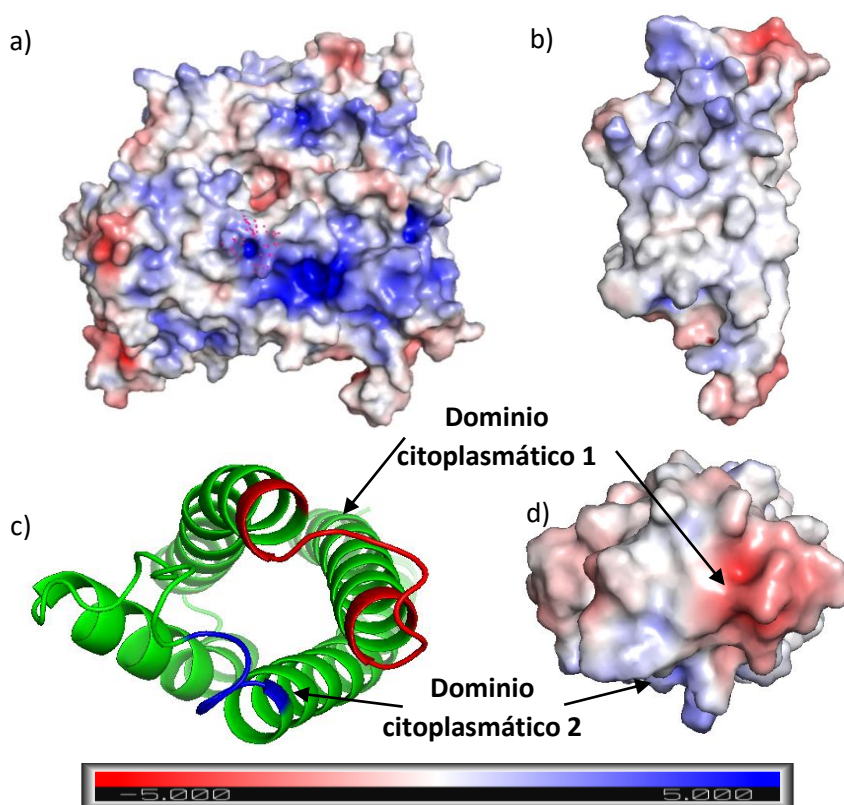


Figura 12. Modelo de cargas electroestáticas de SEC-24 y ERV-14. Modelo de cargas electroestáticas de a) SEC-24 y b) y d) ERV-14 obtenido con el servidor APBS. a) Se observó la presencia de una gran cantidad de cargas positivas en la cara de SEC-24 que interacciona con ERV-14. c) Motivos de exportación de ERV-14; en rojo se encuentra el motivo DxE, ubicado en el dominio citoplasmático 1, y en azul se presenta el motivo IFRKL, ubicado en el dominio citoplasmático 2. d) Los dominios citoplasmáticos de ERV-14 presentan expuestas una mayor cantidad de cargas negativas, con algunas cargas positivas proporcionadas por el motivo IFRKL.

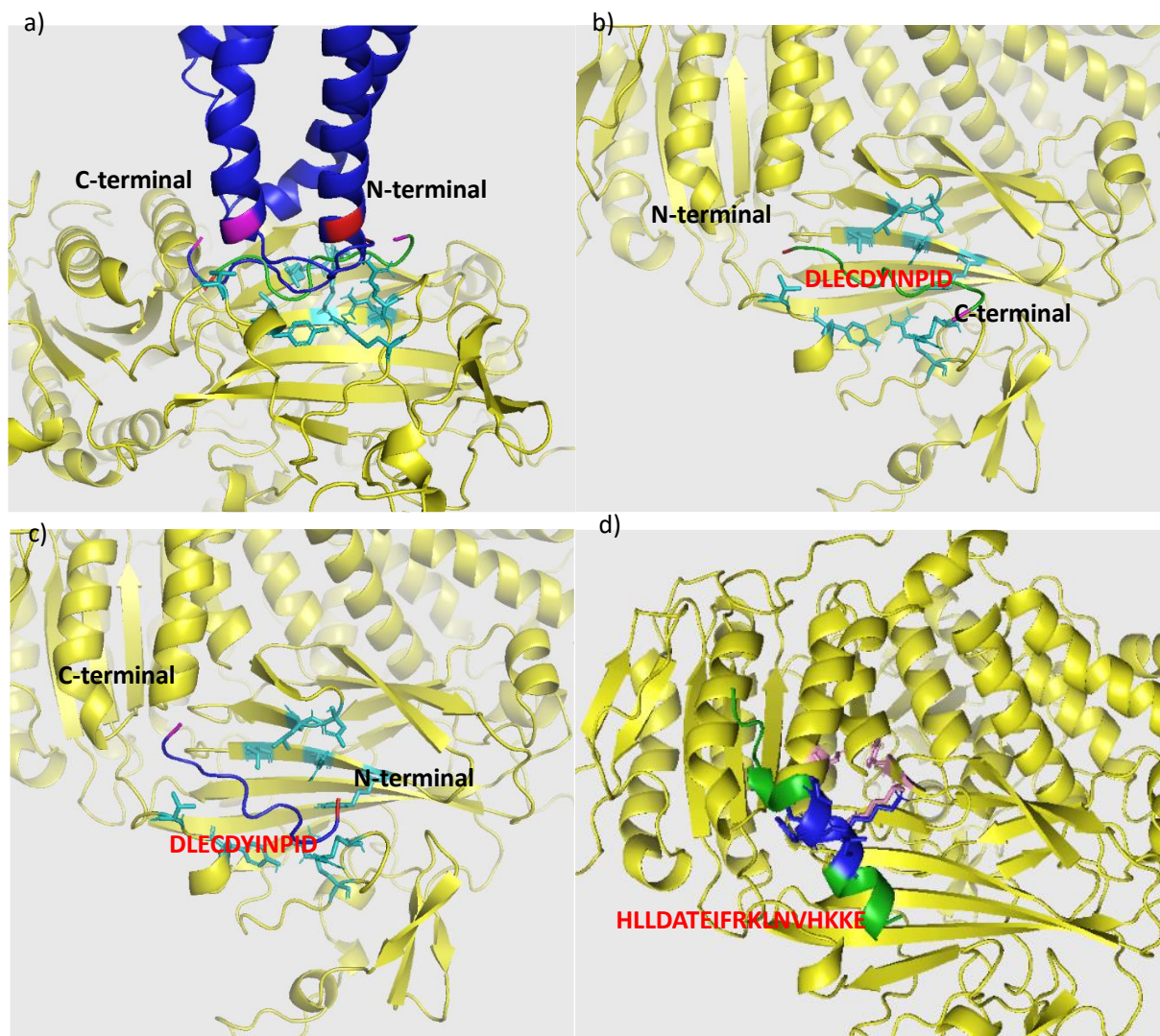


Figura 13. Modelos de interacción SEC-24-ERV-14/Dominio citosólico. a) Modelo de interacción ERV-14-SEC-24. En magenta se encuentra la región C-terminal y en rojo la N-terminal. En b) el péptido DLECDYINPID correspondiente al dominio citoplasmático 1 de ERV-14, interacciona con el sitio B de SEC-24 en dirección opuesta a ERV-14, con el C-terminal orientado en la posición del N-terminal de ERV-14. c) El péptido DLECDYINPID interacciona con el sitio B de SEC-24 de forma idéntica a ERV-14. d) El péptido HLLDATEIFRKLN/VHKKE, correspondiente al dominio citoplasmático 2 de ERV-14 interacciona con el sitio D de SEC-24 de la misma forma que lo hace en ERV-14.

Con base en los resultados del acoplamiento molecular, se plantean 3 mecanismos de interacción entre ERV-14 y SEC-24, en función de la proteína carga (Figura 14). El primer mecanismo sugerido podría ocurrir en presencia de una proteína carga que cuenta con un motivo de exportación, en donde ERV-14 interaccione mediante su motivo IFRKL con el sitio D de SEC-24, y de forma simultánea, la proteína carga interacciona mediante su motivo DxE con el sitio B de SEC-24. En el segundo mecanismo, una proteína carga sin motivo de exportación, le impide el acceso al motivo IFRKL a SEC-24, por lo que ERV-14

interacciona únicamente con el sitio B de SEC-24 mediante su motivo DxE. En el tercer mecanismo, ERV-14 interacciona con los sitios B y D de SEC-4, mientras ERV-14 interacciona con una proteína carga sin motivo de exportación.

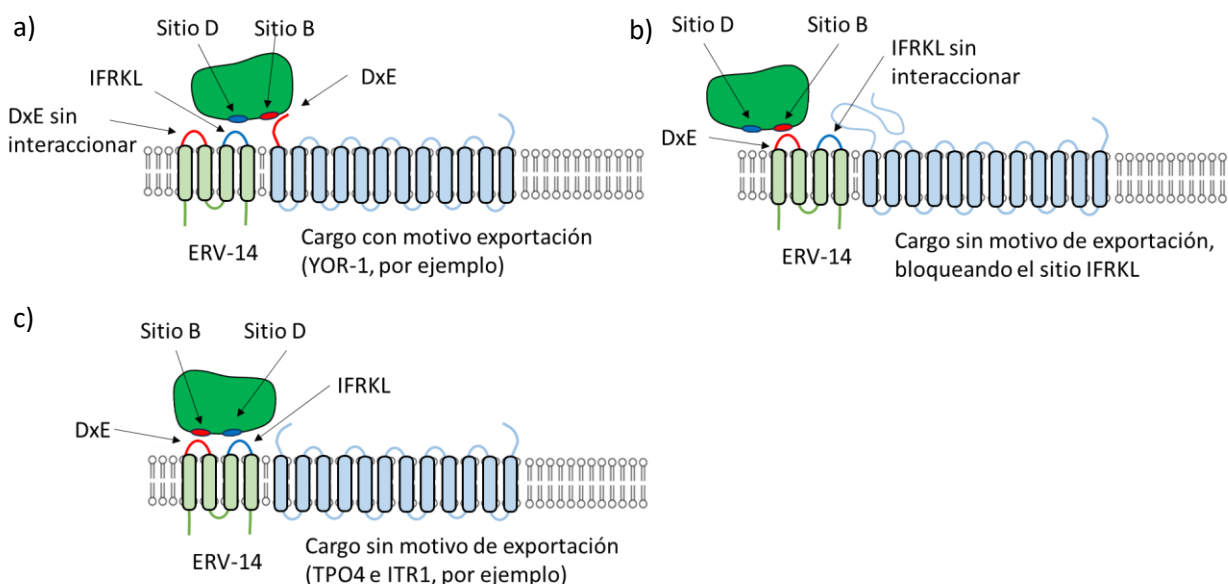


Figura 14. Posibles mecanismos de interacción ERV-14-SEC-24-Carga. a) En el primer mecanismo, la interacción entre ERV-14 y una proteína carga que cuenta con un motivo de exportación DxE, promueve una unión dual a SEC-24 interactúa de forma simultánea mediante el sitio D y el sitio B con el motivo IFRKL de ERV-14 y el motivo DxE de la proteína carga respectivamente. b) En el segundo mecanismo, la interacción entre ERV-14 y una proteína carga sin motivo de exportación, podría impedir el acceso a el motivo IFRKL de ERV-14, promoviendo la interacción de SEC-24 únicamente mediante su sitio D con el motivo DxE de ERV-14. c) En el tercer mecanismo, la unión de ERV-14 a una proteína carga sin motivo de exportación DxE, permite la interacción de ERV-14 mediante sus motivos de exportación DxE e IFRKL con los sitios B y D de SEC-24, respectivamente.

Para determinar el lugar apropiado para insertar en motivo IFRKL en CSE-7, se midió la distancia entre el motivo IFRKL y el extremo más cercano SEC-24 en un modelo de interacción ERV14-SEC-24, donde se obtuvo una distancia de 17.1 Å. También se midió la distancia entre el C-terminal de CSE-7 y los bucles que conforman los dominios citosólicos, donde se determinó que solo el dominio citosólico 2 se encuentra a la distancia adecuada (17.4 Å) para tener acceso al sitio D de SEC-24 (Figura 15). Debido a que la Chs1 de *S. cerevisiae* forma dímeros (Chen et al., 2023), se realizó un acoplamiento molecular entre dos monómeros de CHS-4, la ortóloga en *N. crassa* de Chs3p. Aunque se obtuvieron modelos de interacción en los que se formaban dímeros de CHS-4, debido a malos plegamientos en los modelos tridimensionales de CHS-4, no se obtuvieron buenos modelos de interacción.

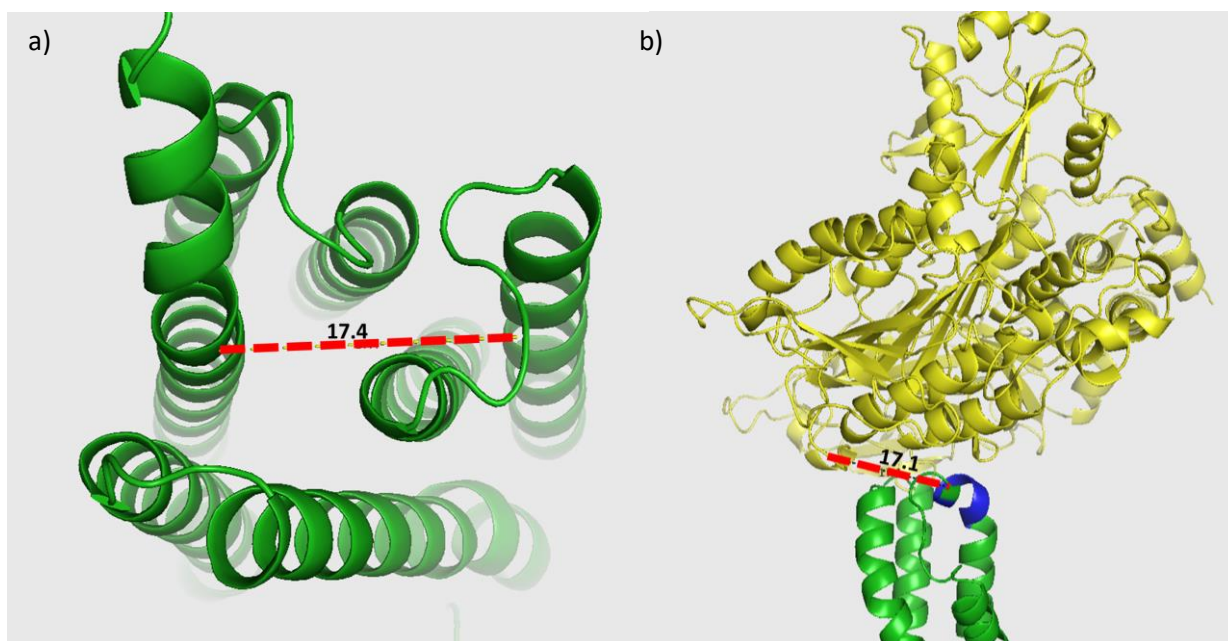


Figura 15. a) El C-terminal y el bucle correspondiente al dominio citoplasmático 2 de CSE-7 presentaron una distancia de 17.4 Å. b) La distancia entre el motivo IFRKL de ERV-14 y el extremo más cercano de SEC-24 corresponde a 17.1 Å.

Por lo que se optó por utilizar el servidor PDBeFold (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) para encontrar similitudes estructurales entre la CHS-3 y CHS-4, encontrándose similitudes en los sitios de dimerización y en los sitios de unión a las proteínas CSE observados en los modelos de interacción. Sin embargo, el modelo de CHS-4 generado por Alphafold carece de dos TMDs homólogos que se encuentran en CHS-3, los TMD 2 y 3, de los cuales, el TMD 2 es necesario para la formación de dímeros. El modelo de CHS-4 de Alphafold cuenta con una zona desorganizada que abarca los primeros 230 residuos en los que podrían encontrarse los dos TMDs ausentes en CHS-4. Se eliminaron los primeros 230 residuos del modelo de CHS-4 y se realizó un acoplamiento molecular entre CHS-4 Δ 1-230 y diversos péptidos de entre 30 y 45 residuos conformados por segmentos de los primeros 230 residuos de CHS-4, buscando identificar una posible TMD homólogo al TMD 2 de CHS-3, se identificó una secuencia conformada por los residuos 188-231 que interaccionó con CHS-4 Δ 1-230 formando un TMD de manera idéntica al TMD 2 de CHS-3 (Figura 16c).

Dichas similitudes estructurales se utilizaron para la construcción de un modelo de dímeros de CHS-4 (Figura 14). La posible capacidad de CHS-4 para formar dímeros se ve reforzada debido a que estructuras de cristalografía del complejo del exómero en *S. cerevisiae* revela su interacción con dos monómeros de Chs3p (Figura 17).

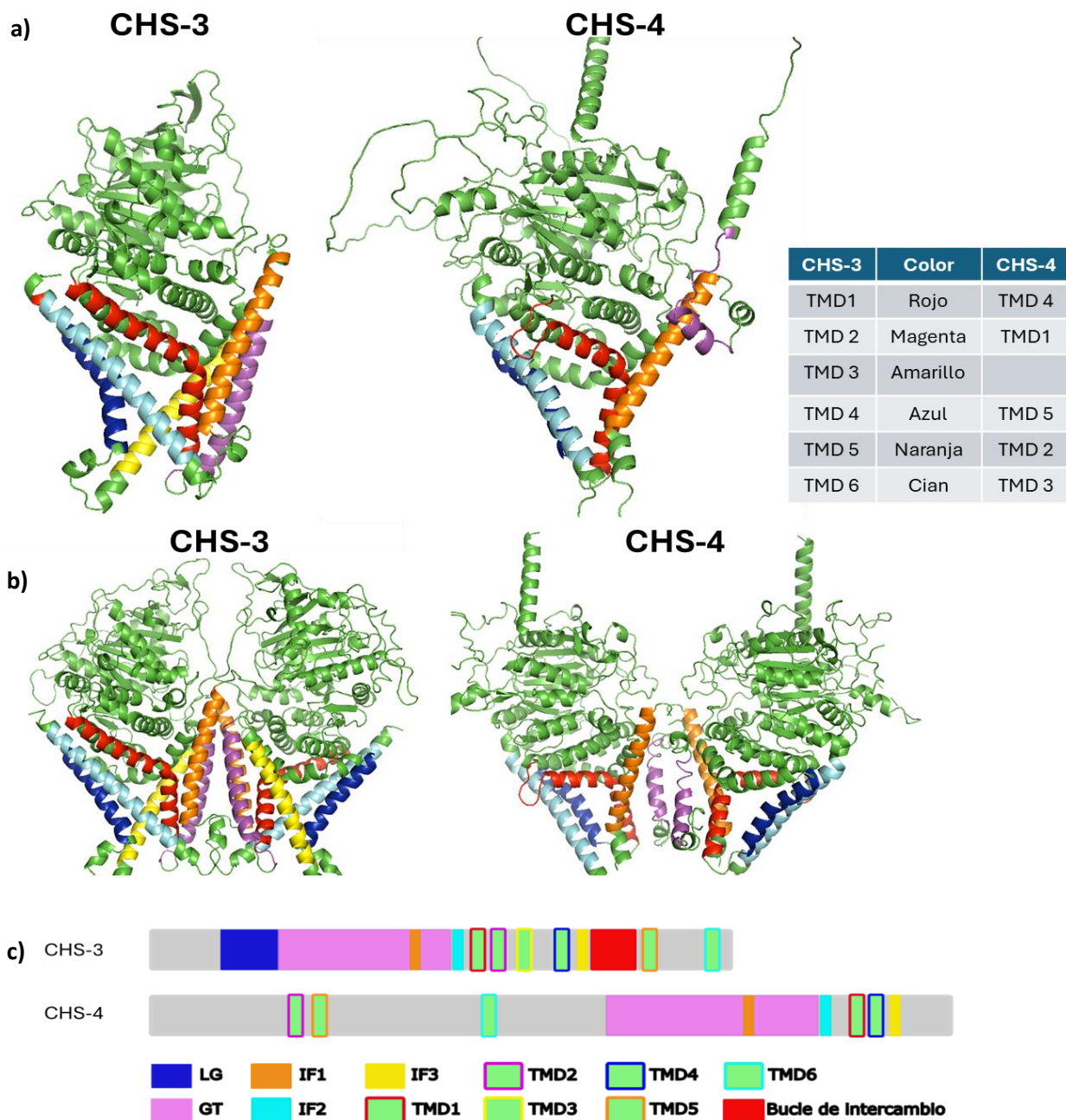


Figura 16. Modelos estructurales de CHS-3 y CHS-4. a) Modelos de monómero de CHS-3 y CHS-4 de AlphaFold. b) Modelo de dímero de CHS-4 obtenido a partir de la alineación de estructuras obtenido con PDBeFold y acoplamiento molecular en HDOCK server. c) Dominios y TMDs de CHS-3 y CHS-4 obtenidos por homología estructural. Datos obtenidos de Chen et al., 2023 y Wu et al., 2022.

Cabe mencionar que, aunque AlphaFold ha dado grandes avances y nos permite obtener modelos de cualquier proteína, aun presenta problemas para modelar algunas proteínas, y hasta ahora solo se han obtenido modelos de baja calidad de CHS-4, principalmente debido a la presencia de zonas desorganizadas.

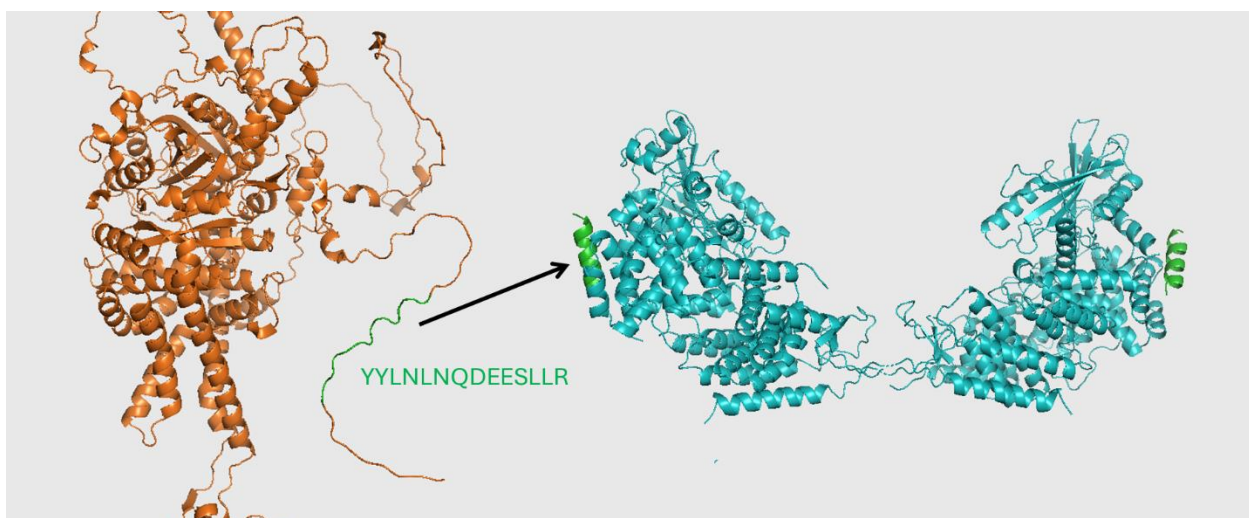


Figura 17. Estructuras de Chs3-p y el componente del exómero Chs6-Chs6 en *S. cerevisiae*. Chs3p (mostrado en naranja) interactúa mediante los residuos 10-27 mostrados en verde, con el componente del exómero Chs6-Chs6 mostrado en azul. Como se observa en la figura, el complejo Chs6-Chs6 interactúa con dos monómeros de Chs3p. Datos obtenidos de Weiskoff & Fromme, 2014.

Para obtener los modelos de interacción de CHS-4 y CSE-7, se realizó un acoplamiento molecular entre CSE-7 y el modelo de dímero obtenido de CHS-4, del mismo modo, se realizó un acoplamiento molecular entre el dímero de CHS-3 y CSE-8, la paróloga de CSE-7. Se obtuvieron modelos de interacción similares entre CHS-4-CSE-7 y CHS3-CSE-8, donde cada dímero de CHS interactúa con 4 chaperonas CSE (Figuras 18 y 19). En los modelos de interacción obtenidos con CHS-3-CSE-8 y CHS-4-CSE-7, se observaron en los dímeros de CHS cuatro posibles sitios de unión a CSE, dos sitios designados como B y dos designados como C, los sitios B y C interactúan con sitios en posiciones opuestas de CSE.

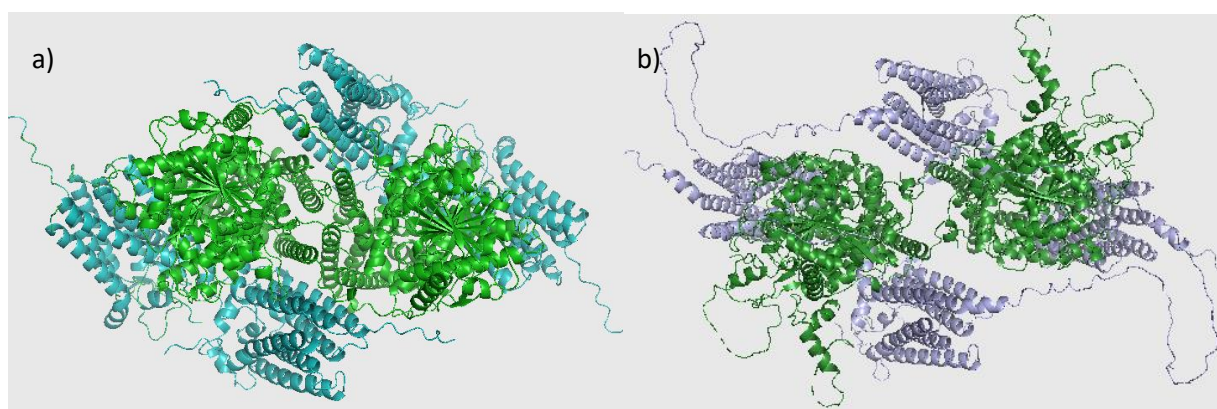


Figura 18. Modelos de interacción CHS-CSE. a) Modelo de interacción entre un dímero de CHS-3 y CSE-8 obtenido usando el servidor de HDOCK Server. En verde se encuentra el dímero de CHS-3 y en cian los monómeros de CSE-8. b) Modelo de interacción de un dímero de CHS-4, unido a 4 monómeros de CSE-7 en morado claro, obtenido con el servidor HDOCK server.

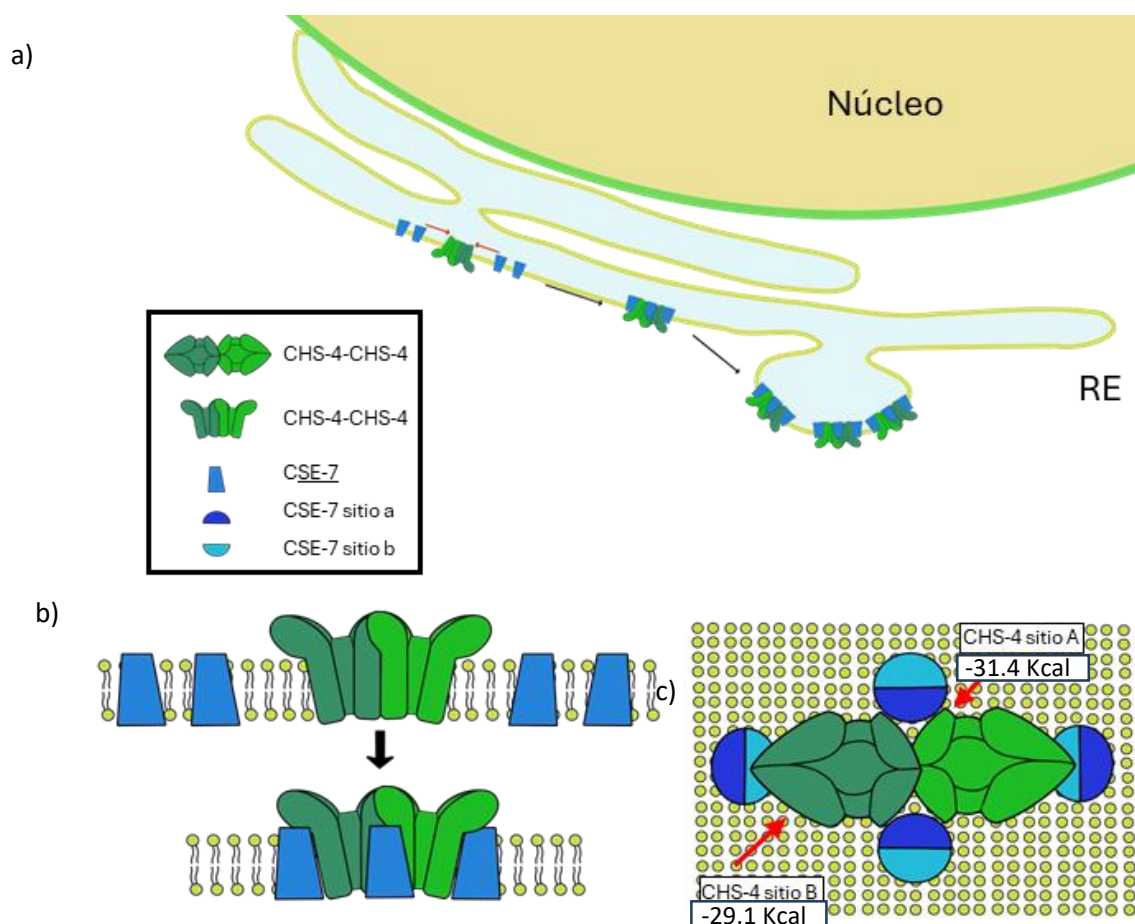


Figura 19. Posible modelo de interacción de CHS-4 y CSE-7. a y b) Se plantea un modelo general de interacción CHS-CSE, en el que se forma un dímero de CHS-4 que interactúa con cuatro monómeros de CSE-7. c) Al tratarse de una imagen especular, el dímero CHS-4 cuenta con dos sitios de unión A y dos sitios de unión B en caras opuestas del dímero, que interactúan con los sitios de unión a y b de monómeros de CSE-7; cada sitio de unión de CSE-7 propuestos, a y b, se encuentran en caras contrarias o paralelas de CSE-7.

3.1.3 Diseño de la proteína quimérica

Se diseñaron 16 quimeras en las que se insertaron los motivos de exportación de ERV-14 en dos lugares diferentes de la secuencia de CSE-7, el dominio citoplasmático 2 y el extremo C-terminal, y se modeló la estructura tridimensional de las quimeras utilizando el servidor de AlphaFold. La calidad de los modelos se estimó utilizando el servidor web SAVE v6.0. Para la obtención de los gráficos de Ramachandran (Figura 20), inicialmente se obtuvo un valor del 79.6% de residuos en regiones más favorecidas para la quimera seleccionada, lo que se considera un valor bajo (los valores mínimos aceptables para un buen modelo son de 90% de residuos en regiones más favorecidas). Sin embargo, debido a la presencia de un largo C-terminal que suele presentar una estructura variable, se sospechó que el bajo valor se debía al C-terminal.

Al eliminar el C-terminal, dejando los primeros 287 residuos de los 360 residuos de los que se compone la quimera, el valor de los residuos en regiones más favorecidas se elevó al 92.1%, considerando aceptable el modelo.

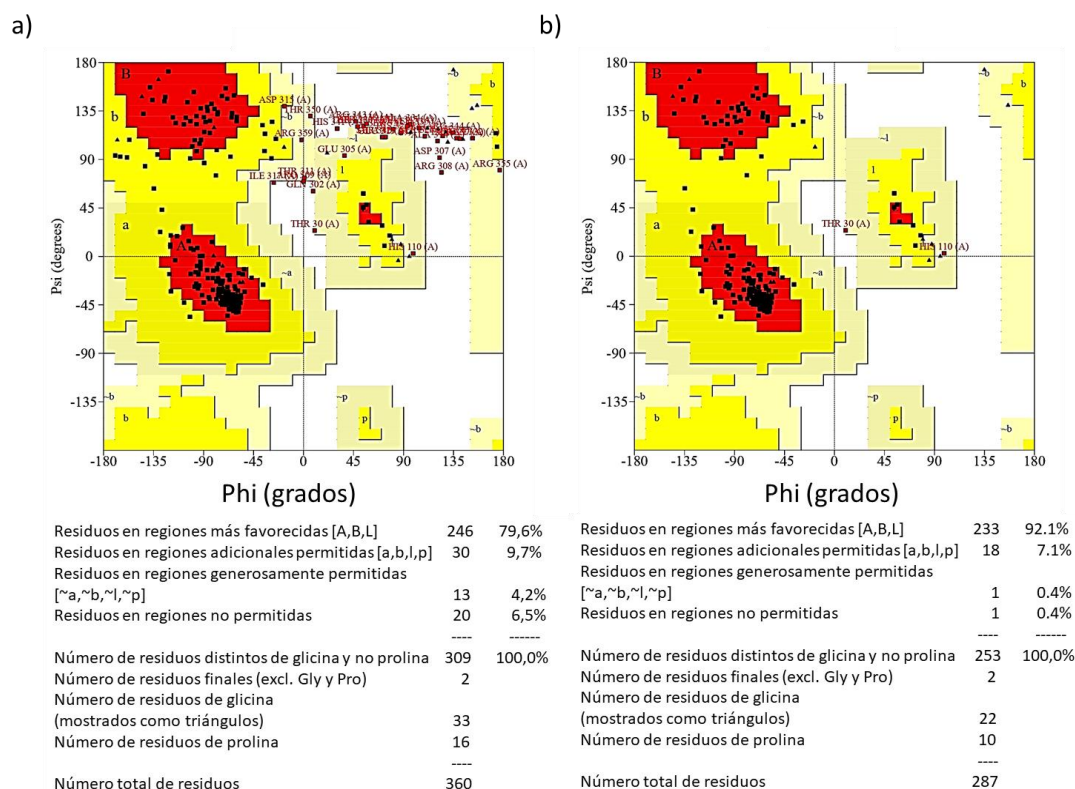


Figura 20. Gráficos de Ramachandran obtenidos con el servidor web SAVE v6.0. a) El gráfico de Ramachandran de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}, mostró un valor de residuos en regiones más favorecidas del 79.6%; sin embargo, este bajo valor se atribuyó a la presencia del C-terminal que no presenta una estructura bien definida. b) La eliminación del C-terminal en la quimera, elevó el valor de residuos en regiones más favorecidas al 92.1%.

Los modelos se utilizaron para realizar un acoplamiento molecular entre las 16 quimeras diseñadas y SEC-24. Buscando una interacción similar a la de ERV-14/SEC-24, también se realizó el acoplamiento molecular entre CSE-7 y SEC-24. Se obtuvieron 4 quimeras que interaccionaron con SEC-24 de forma similar a ERV-14. Se seleccionó la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}, la cual interaccionó con el sitio D. El diagrama de la quimera se muestra en la Figura 21. Para realizar la construcción, el modelo de interacción se muestra en la Figura 22. En uno de los modelos de interacción que se obtuvo entre CSE-7 y SEC-24, CSE-7 se unió al sitio B de SEC-24, con una baja afinidad. La energía de interacción de los modelos se obtuvo utilizando el servidor PRODIGY (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>). Se observó un aumento en la afinidad a SEC-24

de la quimera (-22.7 kcal/mol) respecto a CSE-7 WT (-11.2 Kcal/mol).

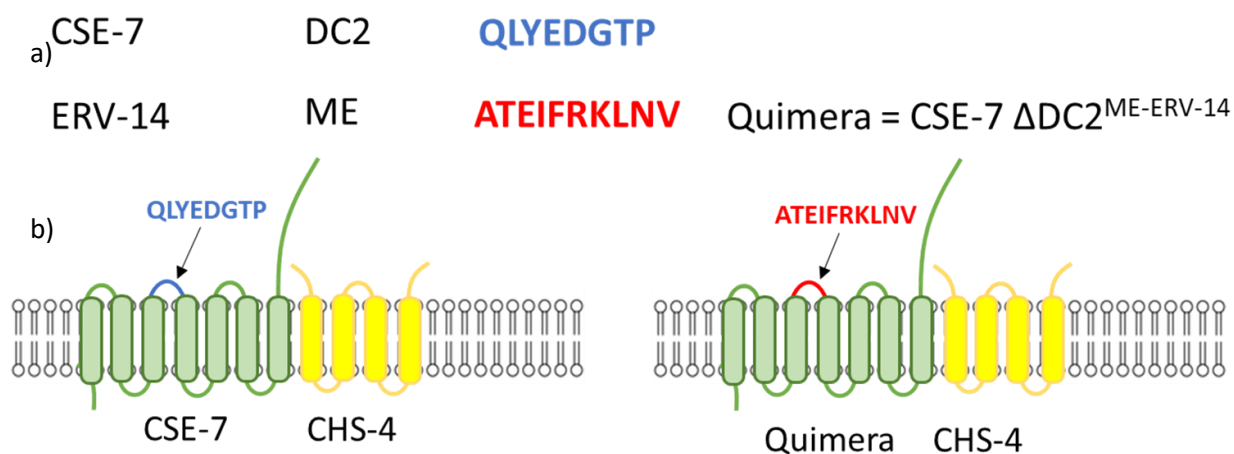


Figura 21. Quimera seleccionada para su construcción. a) Secuencia del dominio transmembrana 2 (DC2) de CSE-7 remplazada por la secuencia del motivo de exportación (ME) de ERV-14. b) Esquema de CSE-7 y la quimera; en azul se encuentra la posición y secuencia del DC2 reemplazado en CSE-7; en rojo se encuentra la posición y secuencia de ERV-14 utilizada para sustituir el DC2 de CSE-7.

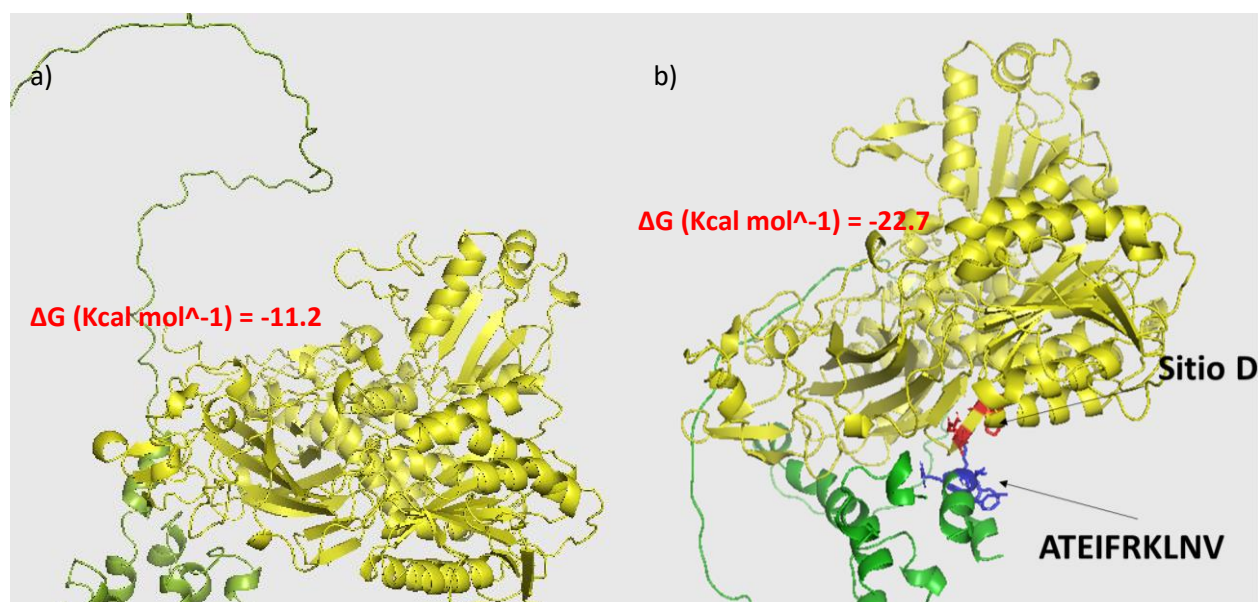


Figura 22. Modelo de interacción SEC-24 – CSE-7/ CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}. a) Modelo de interacción entre CSE-7 y SEC-24. CSE-7 presenta una baja energía de interacción a SEC-24, que corresponde a -11.2 Kcal/mol. b) Modelo de interacción entre quimera y SEC-24; Al insertar la secuencia AREIFRKLVN en el dominio citoplasmático 2 de CSE-7, la quimera presentó una interacción con el sitio D de SEC-24, y aumentó su energía de interacción, correspondiendo a -22.7 Kcal/mol.

3.2 Cruzas sexuales

3.2.1 Comprobación del fenotipo y genotipo de las progenies

Para la obtención de la cepa que se utilizó para la expresión de la quimera, se realizó la cruce sexual de la cepa SMRP72 y SMRP8. De la progenie resultante, se seleccionaron 20 ascosporas. Tras activarse, 11 fueron auxótrofas a histidina, y de ellas, 7 fueron además resistentes a higromicina. Se seleccionaron 4 cepas auxótrofas a histidina y resistentes a higromicina y se llevó a cabo la comprobación molecular por PCR, utilizando los oligonucleótidos P1 y P4. Las 4 cepas no mostraron amplificación del gen de *cse-7*, confirmándolas como Knock out $\Delta cse-7$ (Figura 23).

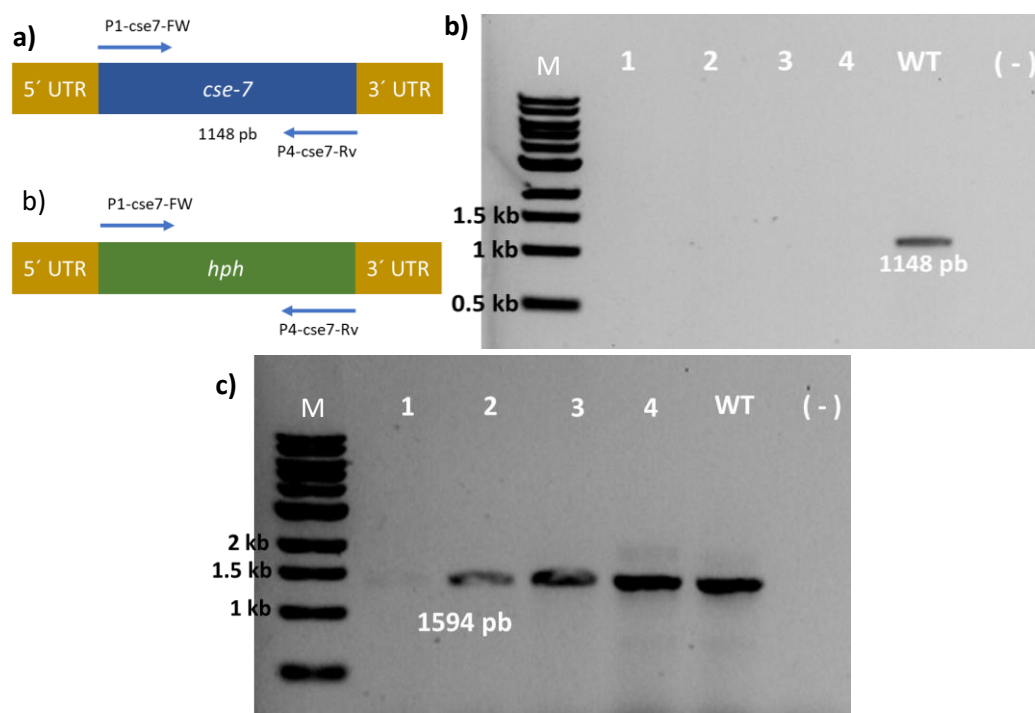


Figura 23. Comprobación genética de progenies. a) En la cepa WT, los oligonucleótidos P1-cse7-FW y P4-cse7-RV amplifican el marco abierto de lectura de *cse-7*, que corresponde a un segmento de 1148 pb; mientras que en una cepa knockout $\Delta cse-7$, el marco abierto de lectura de *cse-7* se encuentra reemplazado por el gen *hph* que confiere resistencia a la higromicina, por lo que no hay amplificación con los oligonucleótidos P1 y P4. c) No se presentó amplificación de *cse-7* con los oligonucleótidos en las progenies 4, 7, 8 y 19, mientras que la cepa WT si presentó manifestación; la banda (-) es un blanco negativo que consta de agua grado HPLC. d) Como control positivo, se realizó la amplificación del gen *lst-1*. Las 4 progenies probadas, así como la cepa WT presentaron amplificación de *lst-1*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.2.2 Comprobación del tipo de apareamiento

Se realizó la comprobación del tipo de apareamiento de siete cepas obtenidas de la cruce sexual de las cepas SMRP72 y SMRP8. Para ello se cruzaron las cepas obtenidas con las cepas Fluffy de los tipos de apareamiento Mat α (FGSC# 4347) y Mat A (FGSC# 4317), y se designó el tipo de apareamiento de las cepas como el tipo de apareamiento complementario de las cepas de Fluffy con las que se indujo la formación de peritecios (Figura 22). Cuatro cepas resultaron ser Mat A, formando peritecios en la cruce con la cepa Fluffy Mat α . Sin embargo, las tres cepas restantes no formaron peritecios con ninguna de las dos cepas de Fluffy.

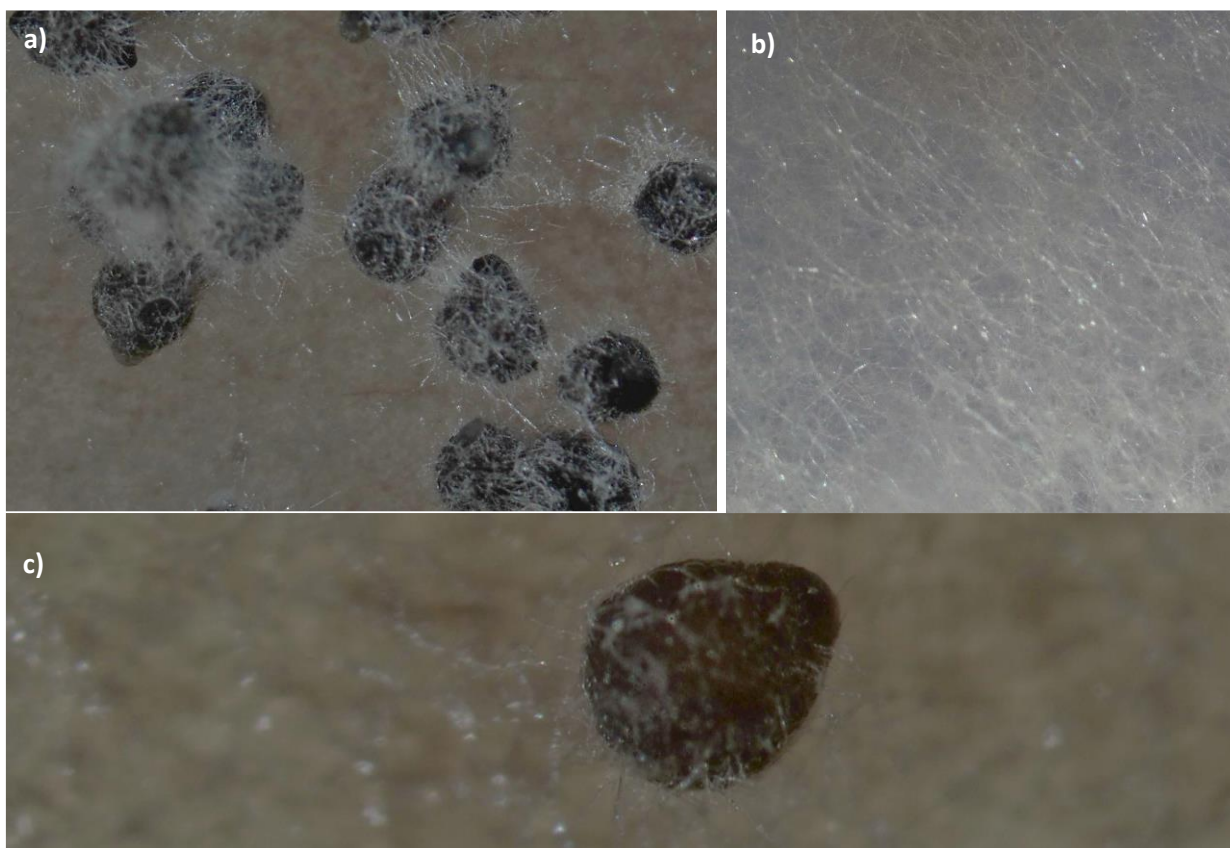


Figura 24. Comprobación del tipo de apareamiento de las cepas obtenidas. a) y c) Cruza sexual de la cepa 1 con la cepa Fluffy mat α observada en el estereoscopio, donde se puede observar la presencia de peritecios. b) Cruza sexual de la cepa 1 con la cepa Fluffy mat A. No se desarrollaron peritecios.

3.3 Construcción del casete

3.3.1 Construcción de la quimera *cse-7 Δ dc2^{me-erv-14}*

La construcción del fragmento F1 realizada con los oligonucleótidos P1 y P2, y del fragmento F2 con los oligonucleótidos P3 y P4 se llevó a cabo siguiendo las especificaciones de la enzima TaKaRa, con una temperatura de alineación de 65°C y un tiempo de extensión de 41 s, obteniendo los fragmentos F1 de 529 pb y F2 de 665 pb (Figura 25a). Mientras que para la fusión de los fragmentos y amplificación del gen de *CSE-7* se emplearon los oligonucleótidos P1 y P4, y una temperatura de alineación de 65°C y un tiempo de extensión de 71 s, obteniendo una construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* de aproximadamente 1169 pb y el marco abierto de lectura de *cse-7* de 1148 pb (Figura 24b). El gen de *tagrfp* se obtuvo a partir del vector VMRP-163 mediante PCR empleando los oligonucleótidos O1 y O2. Se obtuvo un amplicón de 729 pb (Figura 23c). Debido a que el vector VMRP-163 expresa *tagrfp* con la etiqueta PST1, se diseñó el oligonucleótido P2 para solo amplificar la secuencia correspondiente a *tagrfp* y añadir un codón de paro en el extremo 3' de la secuencia de *tagrfp*.

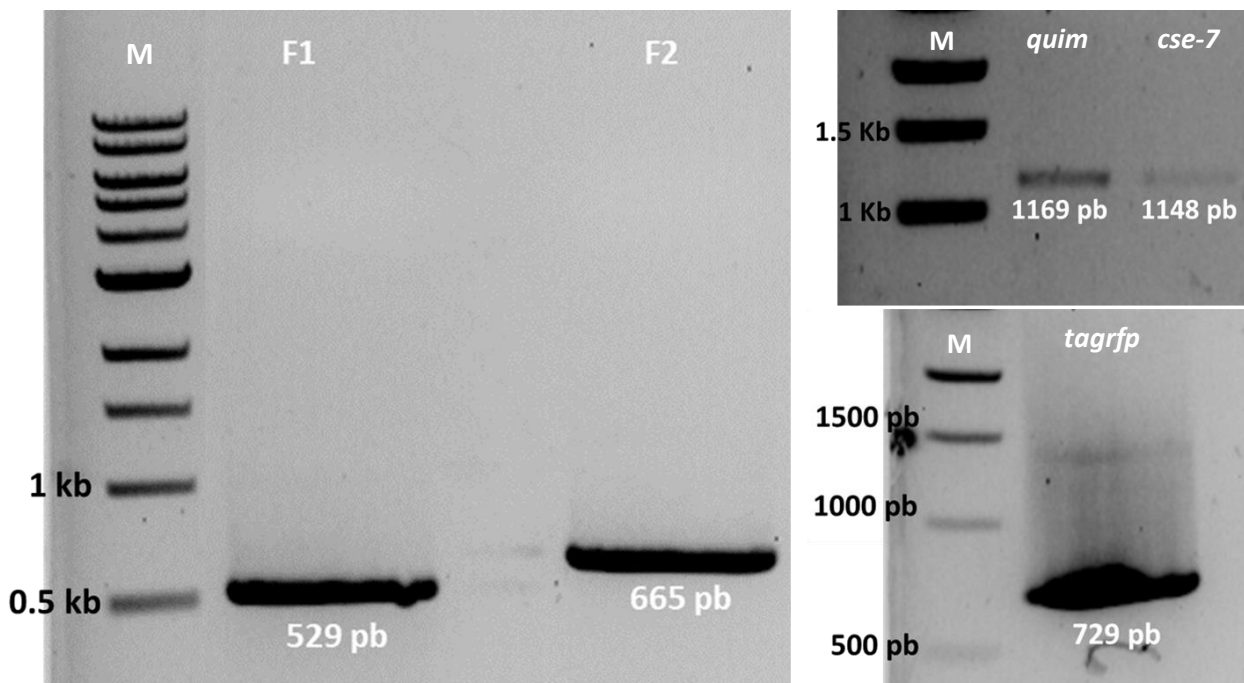


Figura 25. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando la comprobación de la amplificación de los fragmentos para ensamblar el casete. a) Bandas correspondientes al fragmento F1 (529 pb) y fragmento F2 (665 pb). b) Bandas correspondientes al casete de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* (quim) y el marco abierto de lectura de *cse-7*. c) Amplicón del gen de *tagrfp* amplificado del vector VMRP-163. M: marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

Los amplicones de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*, *cse-7* y *tagrfp* se subclonaron en el plásmido pGEM T Easy, siguiendo las indicaciones del proveedor, y se replicó el plásmido en células químicamente competentes

de *E. coli* DH5 α . Los vectores fueron recuperados mediante una miniprep, obteniendo tres plásmidos, pGAM-1 (pGEM + *cse-7* Δ *dc2*^{me-erv-14}), pGAM-2 (pGEM + *cse-7*) y pGAM-3 (pGEM + *tagrfp*) y se comprobó la integración de los amplicones mediante la digestión con la enzima *EcoRI* (Figura 26b).

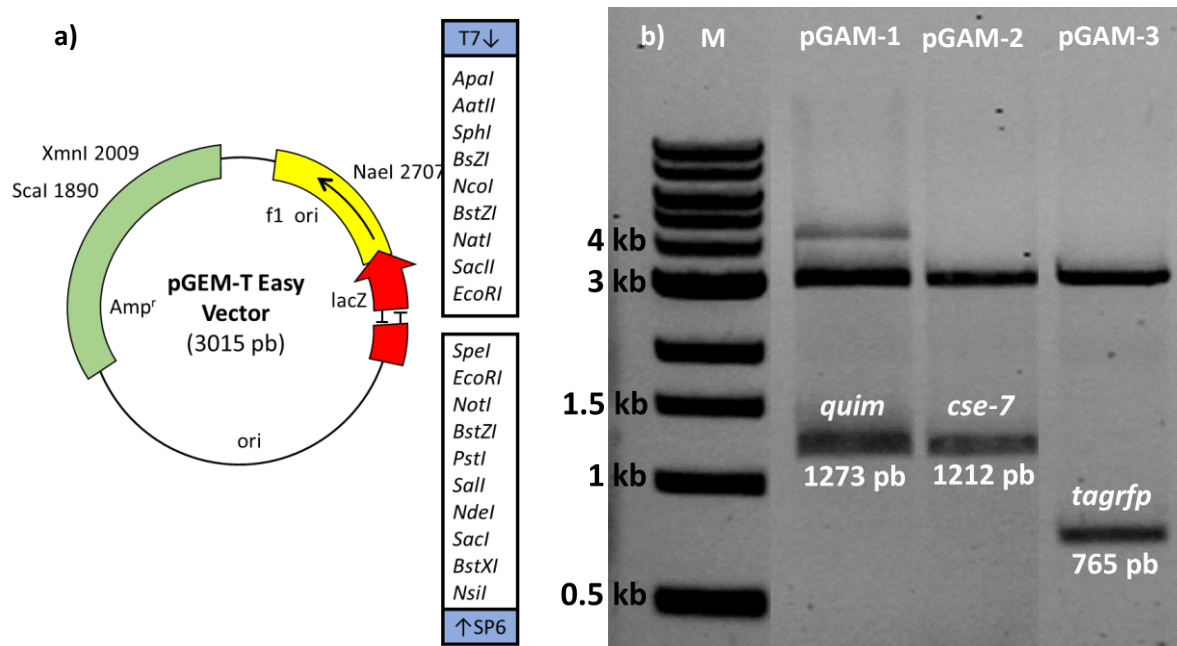


Figura 26. Comprobación molecular de los insertos en el plásmido pGEM easy. a) Mapa del vector pGEM-T-Easy. b) Gel de agarosa al 1% mostrando la digestión de los plásmidos pGAM-1, pGAM-2 y pGAM-3 empleando la enzima *EcoRI* y dando como resultado dos bandas; una de 3 kb que corresponde al plásmido pGEM linearizado y una correspondiente al tamaño de cada inserto *cse-7* Δ *dc2*^{me-erv-14} (*quim*), *cse-7* y *tagrfp*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.3.2 Construcción del plásmido VMRP-105 (pGAM-4)

La digestión del plásmido VMRP-13 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XmaI* resultó en dos fragmentos, uno de 796 pb correspondiente al gen *gfp*, y otro de 8189 pb. Mientras que la digestión del plásmido pGAM-3 utilizando las mismas enzimas produjo dos fragmentos, uno de 770 pb correspondiente al gen *tagrfp* y uno de 3062 pb que corresponden al plásmido pGEM linearizado (Figura 27a). Se recuperaron el fragmento de 8189 pb obtenido de la digestión del vector VMRP-13 y el fragmento de 770 pb de la digestión de pGAM-3, utilizando el kit de extracción Qiagen® para la purificación. Se ligaron ambos fragmentos para la obtención del plásmido pGAM-4, el cual fue replicado en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α . El plásmido fue recuperado mediante miniprep. Debido al tamaño similar que presentan los genes de *gfp* y *tagrfp*, se realizó la comprobación molecular de la integración de *tagrfp*

en el plásmido mediante PCR. El plásmido pGAM-4 fue enviado a Eton Bioscience para su secuenciación en la región codificante de *tagrfp*, los resultados de la secuenciación presentaron un 100% de identidad, con una cobertura del 100% con la secuencia de referencia.

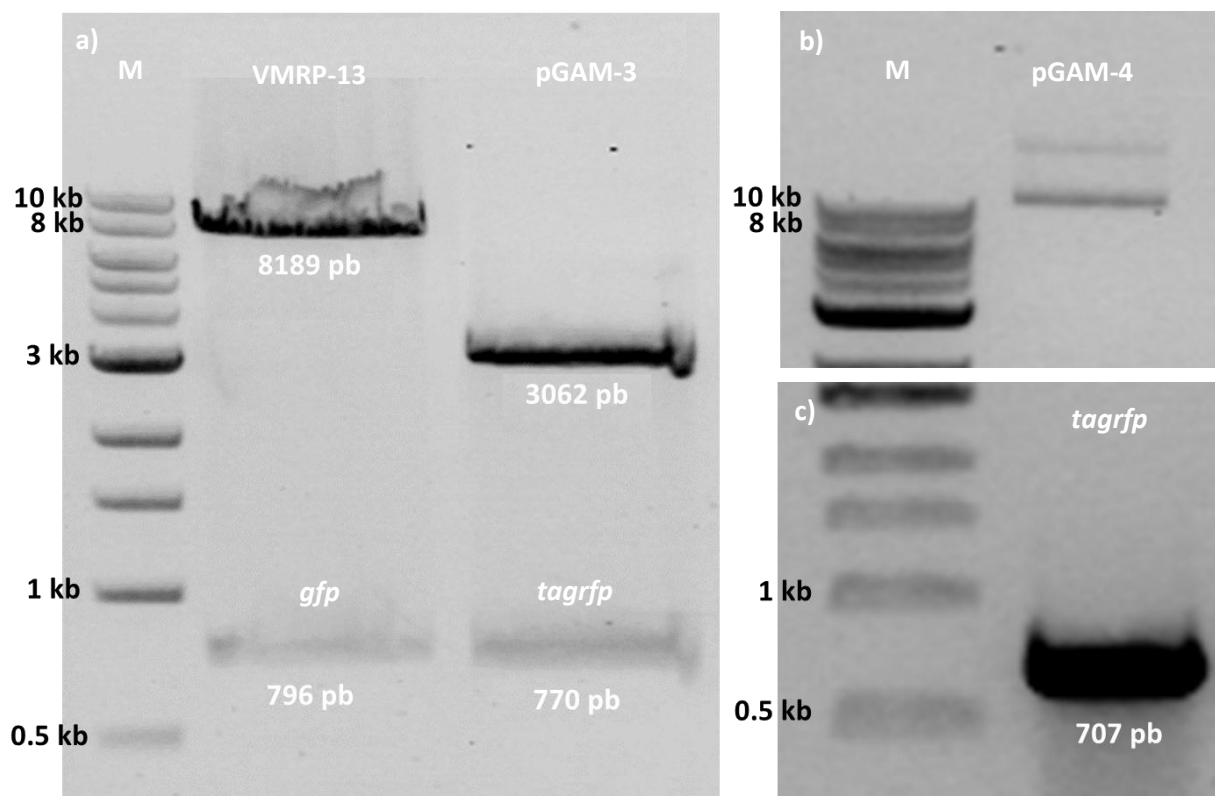


Figura 27. Gel de agarosa al 1% mostrando los elementos para la construcción del plásmido pGAM-4, a) Digestión de los vectores VMRP-13 (pMF-272) y pGAM-3 con las enzimas restricción *EcoRI* y *XmaI*. b) Plásmido pGAM-4 (VMRP-105) no linealizado, obtenido mediante la inserción del gen *tagrfp* en el vector VMRP-13, en reemplazo del gen *gfp*. c) Comprobación por PCR de la inserción del gen *tagrfp* en el vector construido, VMRP-105. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.3.3 Etiquetado de la proteína quimérica CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}

El etiquetado de la proteína quimérica CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14} se realizó mediante la clonación de la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* en el vector pGAM-4. Para ello se digirieron los plásmidos pGAM-1 y pGAM-4 con las enzimas de restricción *XmaI* y *XbaI*, y se recuperó una banda de 1160 pb obtenida de la digestión del vector pGAM-1 y una banda de 8834 pb obtenida de la digestión del vector pGAM-4. Ambos fragmentos se ligaron para la obtención del vector pGAM-5 y se replicó en células químicamente competentes de *E. coli* DH5α, para posteriormente ser recuperado por miniprep. La comprobación molecular de la integración del fragmento se realizó mediante la digestión con las enzimas *XbaI* y *EcoRI*,

obteniendo un fragmento de aproximadamente 2 kb, que corresponde a la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* y *tagrfp* (Figura 28c).

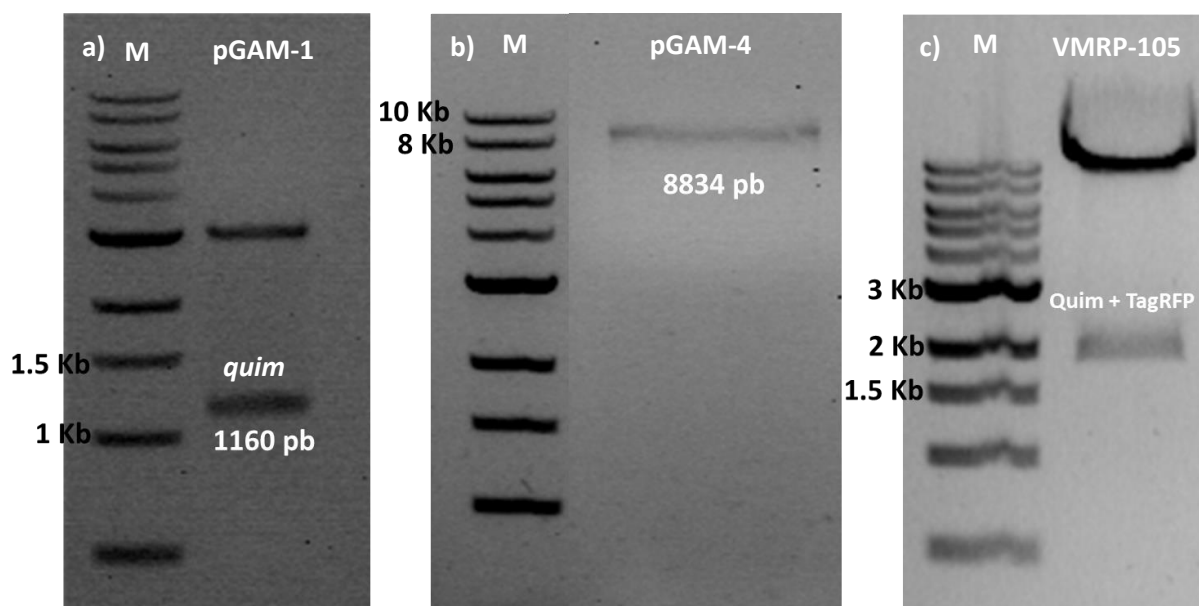


Figura 28. Construcción del plásmido pGAM-5. a) Digestión del plásmido pGAM-1 y b) pGAM-4 con las enzimas de restricción *XbaI* y *XmaI*. La construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* se recuperó del vector pGAM-1 y se insertó en el vector pGAM-4 c) para obtener el vector pGAM-5. c) Comprobación molecular de la inserción de la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* en el vector pGAM-5, mediante la digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI*, obteniendo un fragmento de aproximadamente 2 kb correspondiente a la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* y el gen *tagrfp*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

El plásmido pGAM-5 fue enviado a Eton Bioscience para su secuenciación en la región codificante de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}. Tras revisar la secuencia se encontraron mutaciones en la construcción que introdujeron cambios en el marco de lectura (Figura 29).

3.3.4 Nueva construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*

Debido a la presencia de mutaciones en la primera construcción, se realizó la construcción de los fragmentos, utilizando la polimerasa Phusion high-fidelity y se fusionaron mediante PCR utilizando la polimerasa TaKaRa La Taq y se subclonó en el vector pGEM, obteniendo los vectores pGAM-6 y pGAM-7 (Figura 31c).



Figura 29. Secuencia de la quimera obtenida por secuenciación. a) Secuenciación de la construcción quimérica en el plásmido pGAM-5, la secuencia obtenida del cromatograma se alineó con la secuencia de referencia que se diseñó. Se presentaron mutaciones en tres sitios diferentes de la construcción; en azul se muestran las inserciones que se presentaron en la construcción, mientras que en rojo se muestran las deleciones que se presentaron. b) La presencia de las mutaciones introdujeron múltiples codones de paro, representadas por asteriscos en rojo.

Las nuevas construcciones se etiquetaron mediante la clonación en el vector pGAM-4. Se recuperaron las construcciones mediante la digestión de los vectores pGAM-6 y pGAM-7 utilizando las enzimas *Xma*I y *Xba*I (Figura 31a), mismas que se utilizaron para digerir el vector pGAM-4. Las construcciones se insertaron en el vector pGAM-4, obteniendo los vectores pGAM-8 y pGAM-9 y se replicaron en células químicamente competentes de *E. coli* DH5α. Los vectores se recuperaron mediante miniprep y se realizó la comprobación molecular de la inserción mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos P1 y O2, obteniendo amplicones de aproximadamente 2 kb (Figura 31b).

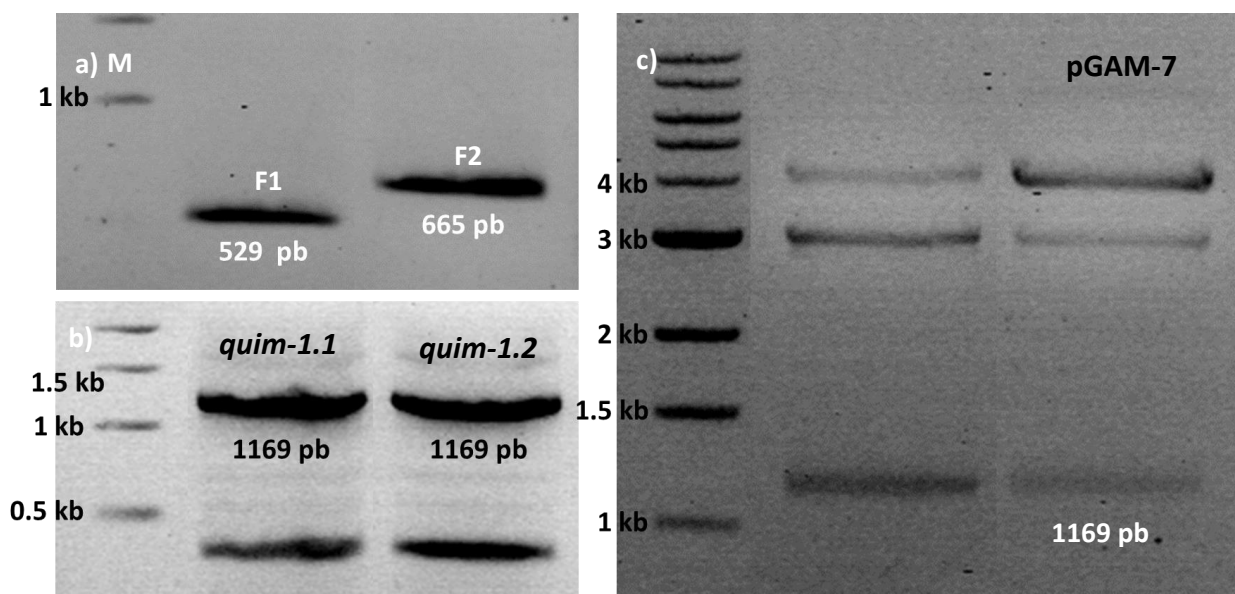


Figura 30. Construcción del casete *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*. a) Fragmentos F1 y F2 de una nueva construcción obtenidos mediante la amplificación con Phusion high-fidelity. b) Se obtuvieron dos construcciones de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* mediante la fusión de los fragmentos mediante dos PCRs independientes con la polimerasa TaKaRa La Taq. c) Las construcciones se subclonaron en el vector pGEM y se comprobó la inserción de las construcciones mediante la digestión de los vectores obtenidos pGAM-6 y pGAM-7 con la enzima *EcoRI*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

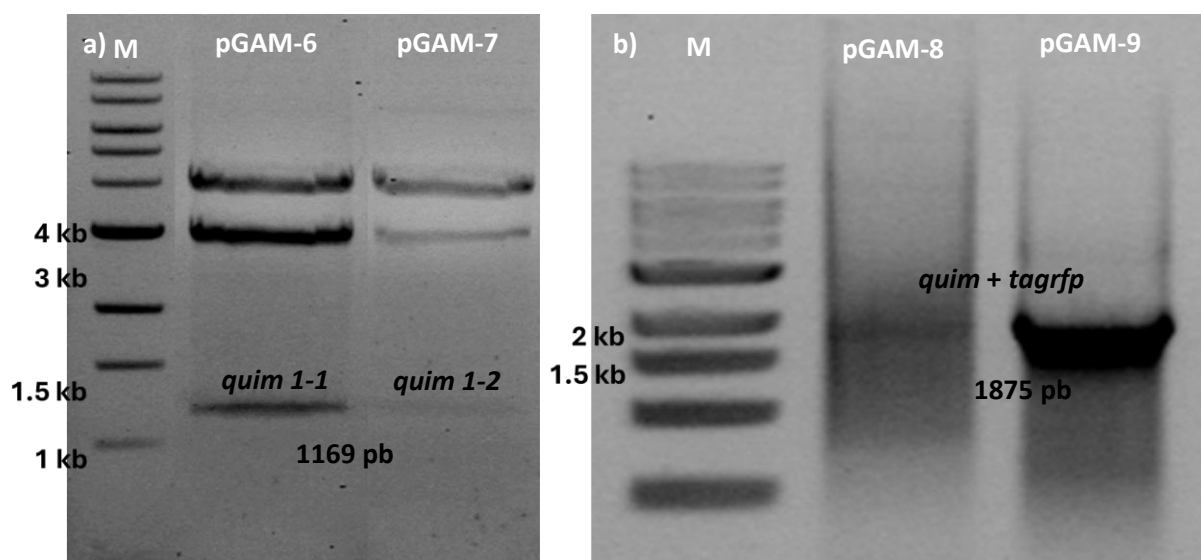


Figura 31. Etiquetado de la construcción *cse-7Δdc2^{me-erv-14}*. a) Digestión de los plásmidos pGAM-6 y pGAM-7 con las enzimas *XbaI* y *XmaI*. b) Comprobación molecular de la inserción de las construcciones en los plásmidos pGAM-8 y pGAM-9. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.3.5 Etiquetado de la quimera *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* con GFP y mCherry

El etiquetado de la proteína quimérica *cse-7Δdc2^{me-erv-14}* con GFP y mCherry se realizó mediante la clonación del casete en los vectores VMRP13 y VMRP68, respectivamente. Para ello, se digirieron ambos vectores y casete con las enzimas de restricción *Xma*I y *Xba*I y se ligó el casete digerido en los vectores VMRP-13 y VMRP-68 linealizados, obteniendo los vectores pGAM-10 y pGAM-11, respectivamente, que posteriormente fueron replicados en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α. La comprobación de la integración del casete en los vectores se comprobó mediante la digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI (Figura 32).

a)

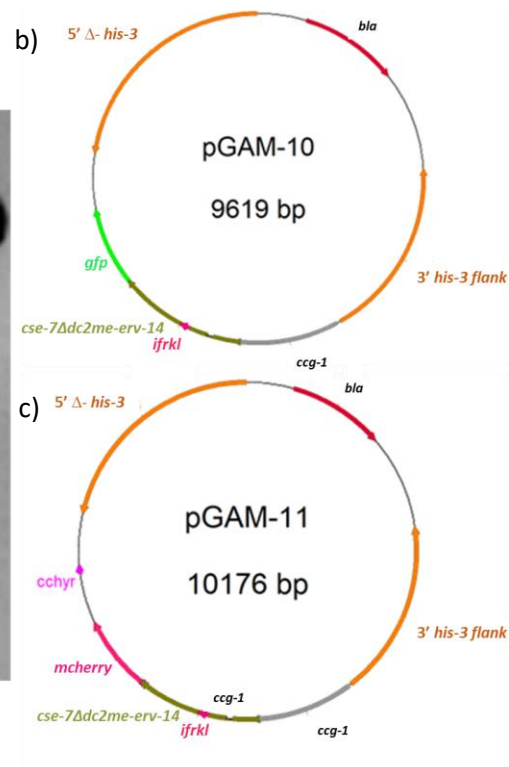
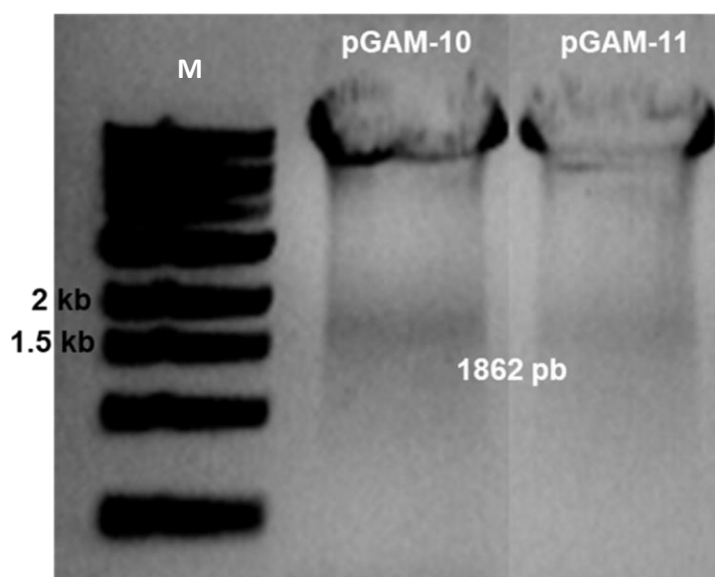


Figura 32. Digestión de los vectores pGAM-10 y pGAM-11. a) Vectores pGAM-10 y pGAM-11 digeridos con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI, y visualizados en un gel de agarosa al 1%. El producto de la digestión liberó el casete que corresponde a la construcción quimérica ligada al gen *gfp* y *mcherry*, respectivamente. Mapas de los vectores b) pGAM-10 y pGAM-11. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.4 Expresión de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14} en *N. crassa*

3.4.1 Transformación de *N. crassa*

Se transformaron conidios de las cepas SMRP24 y SMRP532 con los vectores pGAM-8, pGAM-9, pGAM-10 y pGAM-11 previamente linealizados con la enzima de restricción *Ssp*I. Los conidios transformados se

inocularon en placas de medio FGS, y después de cuatro días de incubación, se recuperaron 32 colonias de las cepas transformadas para la selección de las transformantes mediante microscopía confocal de barrido láser, seleccionando aquellas cepas que presentaban fluorescencia.

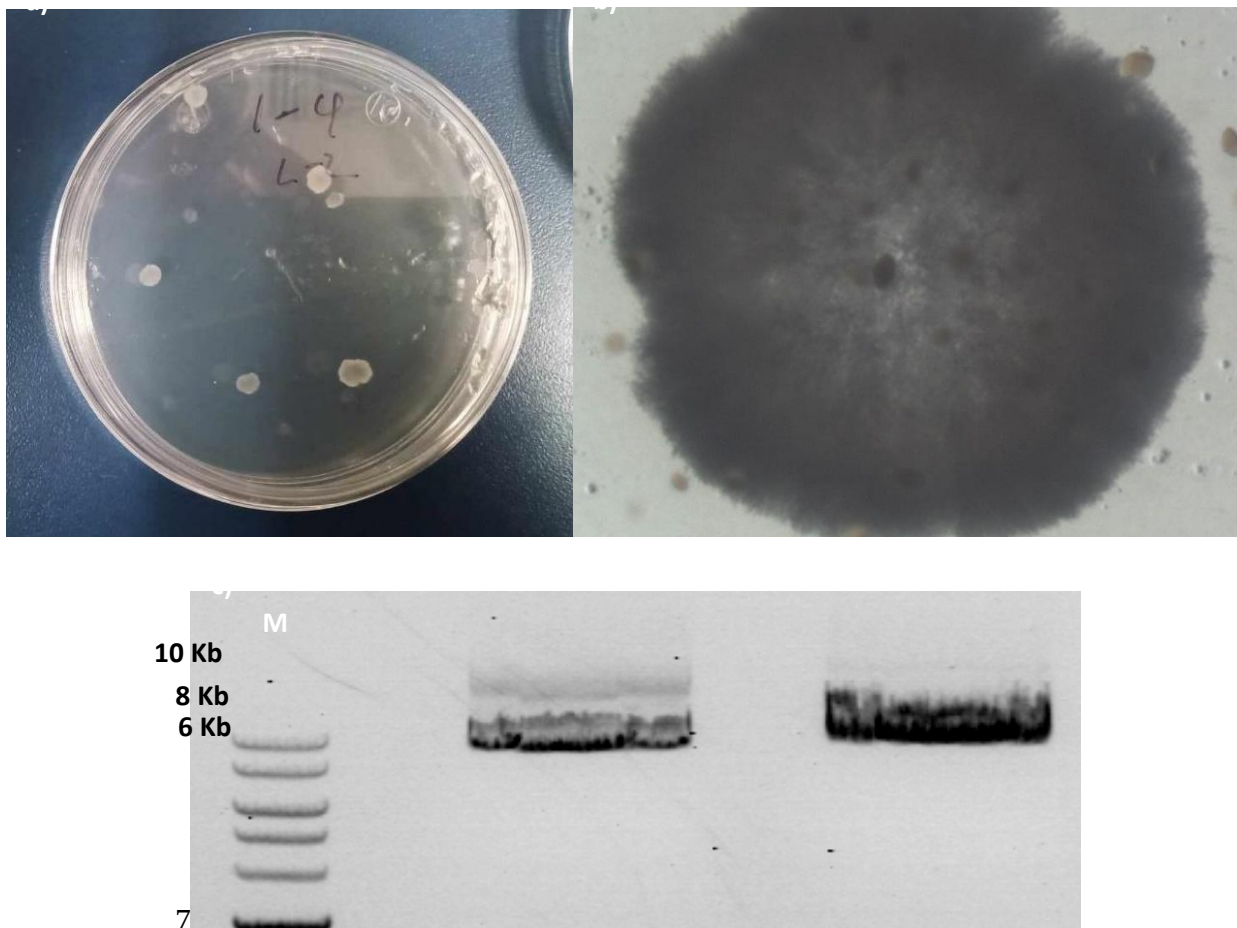


Figura 33. Transformantes de *N. crassa* en medio FGS. a) Transformantes de *N. crassa* con la construcción cse-7Δdc2^{me-erv-14}::tagrpf en medio FGS. b) Colonia observada en el estereoscopio. c) Gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas de vector pGAM8 circular y linealizado con la enzima *SspI*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.4.2 Tamizaje de las transformantes

El tamizaje de las cepas transformantes se realizó mediante microscopía confocal de barrido laser, seleccionando las transformantes potencialmente fluorescentes para un análisis posterior más detallado. No se obtuvieron cepas positivas en fluorescencia de CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-TagRFP. Sin embargo, se obtuvieron dos cepas positivas en fluorescencia de GFP (Figura 34).

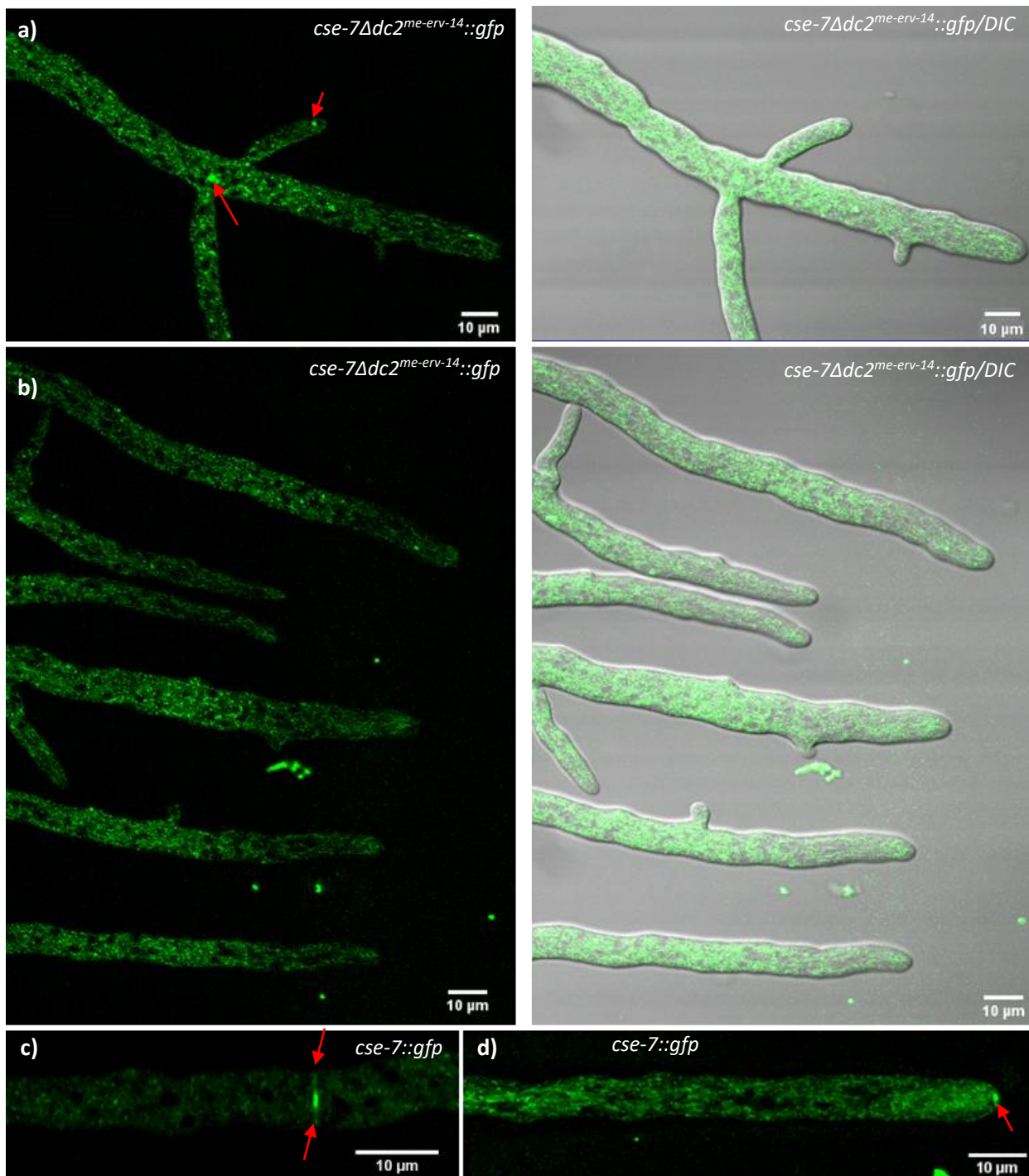


Figura 34. Tamizaje para la selección de cepas fluorescentes que expresen la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP. a – d) No se observó fluorescencia en SPK ni en septos. Se observó una acumulación de fluorescencia en la zona distal de la hifa, a) y b) adicionalmente se observó una acumulación de fluorescencia en posibles vacuolas señaladas por flechas en rojo. c) y d) Distribución de la proteína CSE-7-GFP en la cepa SMRP72. CSE-7 presentó una acumulación de fluorescencia en e) septos y f) SPK, así como en las zonas distales, similar a la proteína quimérica.

3.4.3 Expresión de la CHS-4-mCherry

Para obtener una cepa de *N. crassa* que expresara CHS-4-mCherry, se transformaron mediante electroporación las cepas de *N. crassa* SMRP24 y SMRP532, con el vector VMRP159, que contiene el casete *chs-4-mcherry*. Para confirmar la presencia del casete de CHS-4 en el vector, se digirió el vector con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, obteniendo un fragmento de aproximadamente 3 Kb como se muestra en la figura 35.

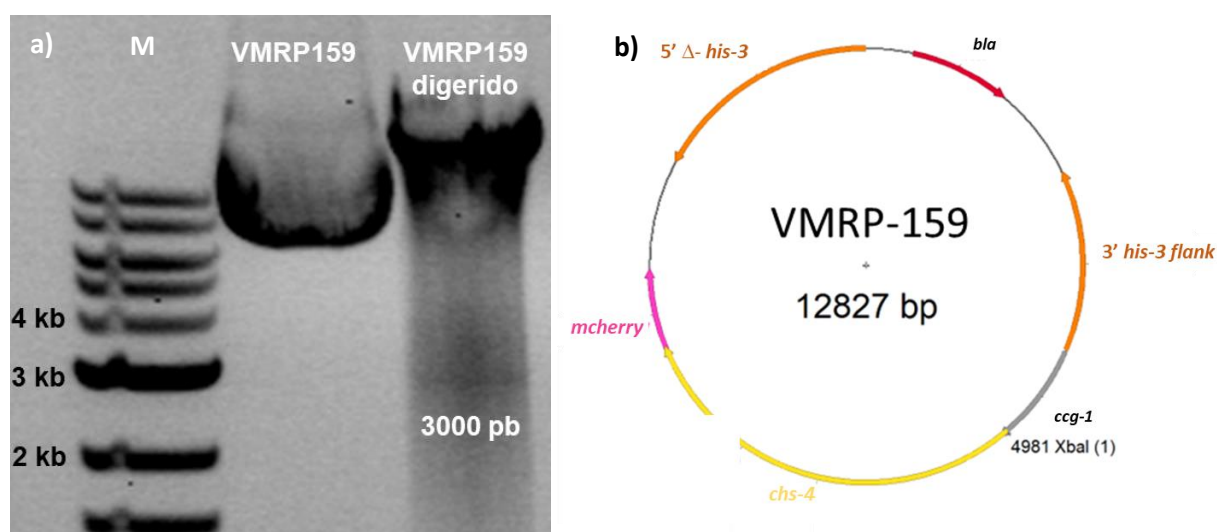


Figura 35. Comprobación molecular del vector VMRP-159. a) Bandas del plásmido VMRP159 sin digerir y digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, lo que dio como producto, una banda de 3 Kb que corresponden a un segmento del gen *chs-4*. b) Como se observa en el mapa del vector, el sitio de restricción para *BamHI* se encuentra dentro del casete de *chs-4*. M, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

Para la transformación de las cepas SMRP24 y SMRP532 con el vector VMRP159, se linearizó el vector con la enzima de restricción *SspI*. Una vez transformadas las cepas, se realizó el tamizaje de las transformantes mediante microscopía confocal de barrido laser, seleccionando aquellas que presentaban fluorescencia en rojo. Se seleccionó una cepa, derivada de la cepa SMRP532, que fue la única que presentó fluorescencia de CHS-4-mCherry como se observa en la figura 36. La CHS-4 fue expresada en un fondo mutante de CSE-7, por lo que no consiguió llegar a SPK ni Septos.

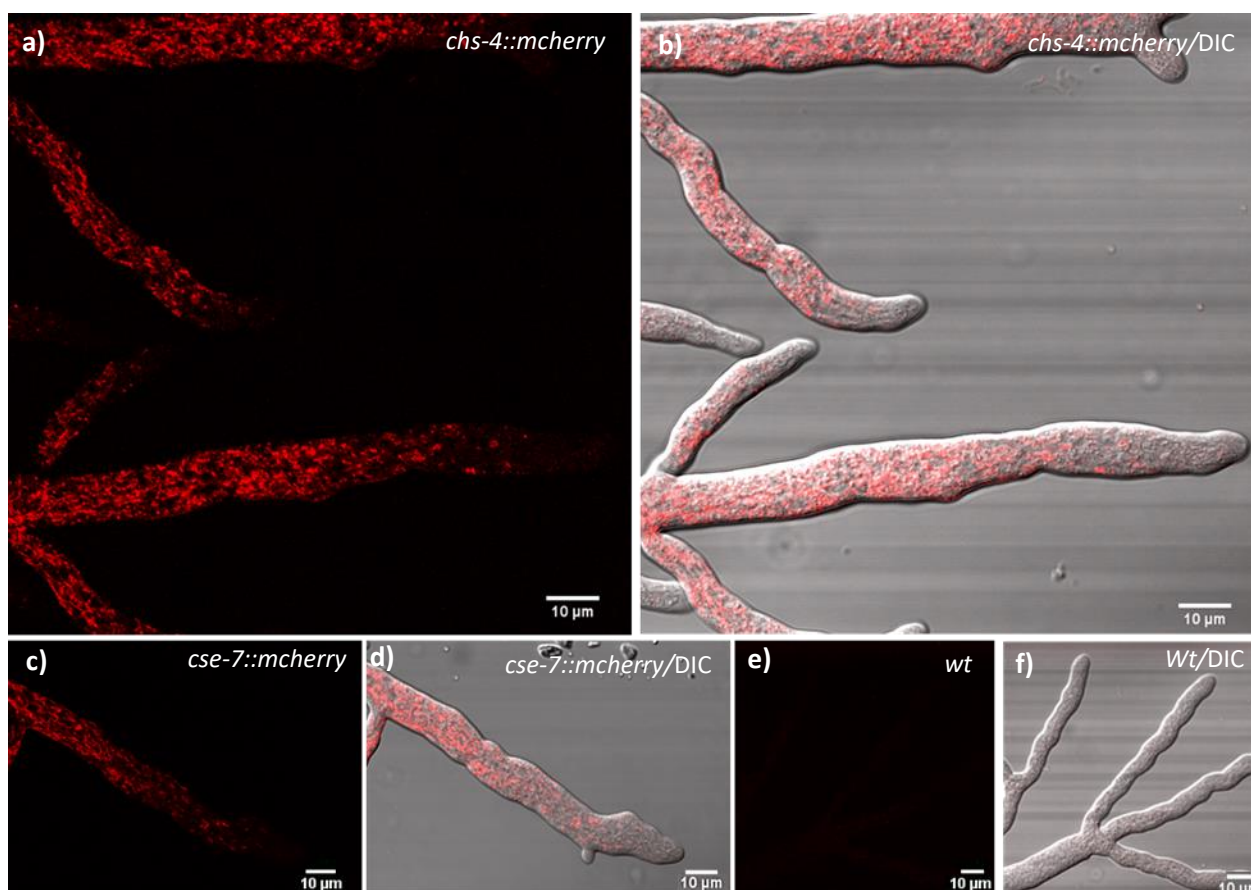


Figura 36. Distribución de la fluorescencia de la proteína CHS-4-mCherry en un fondo mutante $\Delta cse-7$. a) y b) La CHS-4-mCherry expresada en un fondo mutante de CSE-7 no consigue llegar al SPK ni a septos; en su lugar, presenta una acumulación de fluorescencia en la zona distal. c) y d) Control positivo de CSE-7-mCherry. Debido a la baja intensidad de la fluorescencia, no se logró identificar el SPK. e) y f) Cepa WT utilizada como control negativo, no se observó fluorescencia en rojo.

3.4.4 Obtención de la cepa $cse-7\Delta dc2^{me-erv-14}-gfp::\Delta cse-7::hph^+$

Se realizó una cruce sexual de la cepa con genotipo $cse-7\Delta dc2^{me-erv-14}-gfp$ con la cepa VMRP532, para la obtención de una cepa de genotipo $cse-7\Delta dc2^{me-erv-14}-gfp::\Delta cse-7::hph^+$. Se seleccionaron aquellas progenies que presentaron resistencia a higromicina y crecimiento en ausencia de histidina. Se realizó el tamizaje de las cepas seleccionadas mediante microscopía confocal de barrido laser, seleccionando las cepas que presentaron fluorescencia a 583 nm. La quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-GFP no logró llegar a septos ni al SPK, presentando una acumulación en la zona distal (Figura 37).

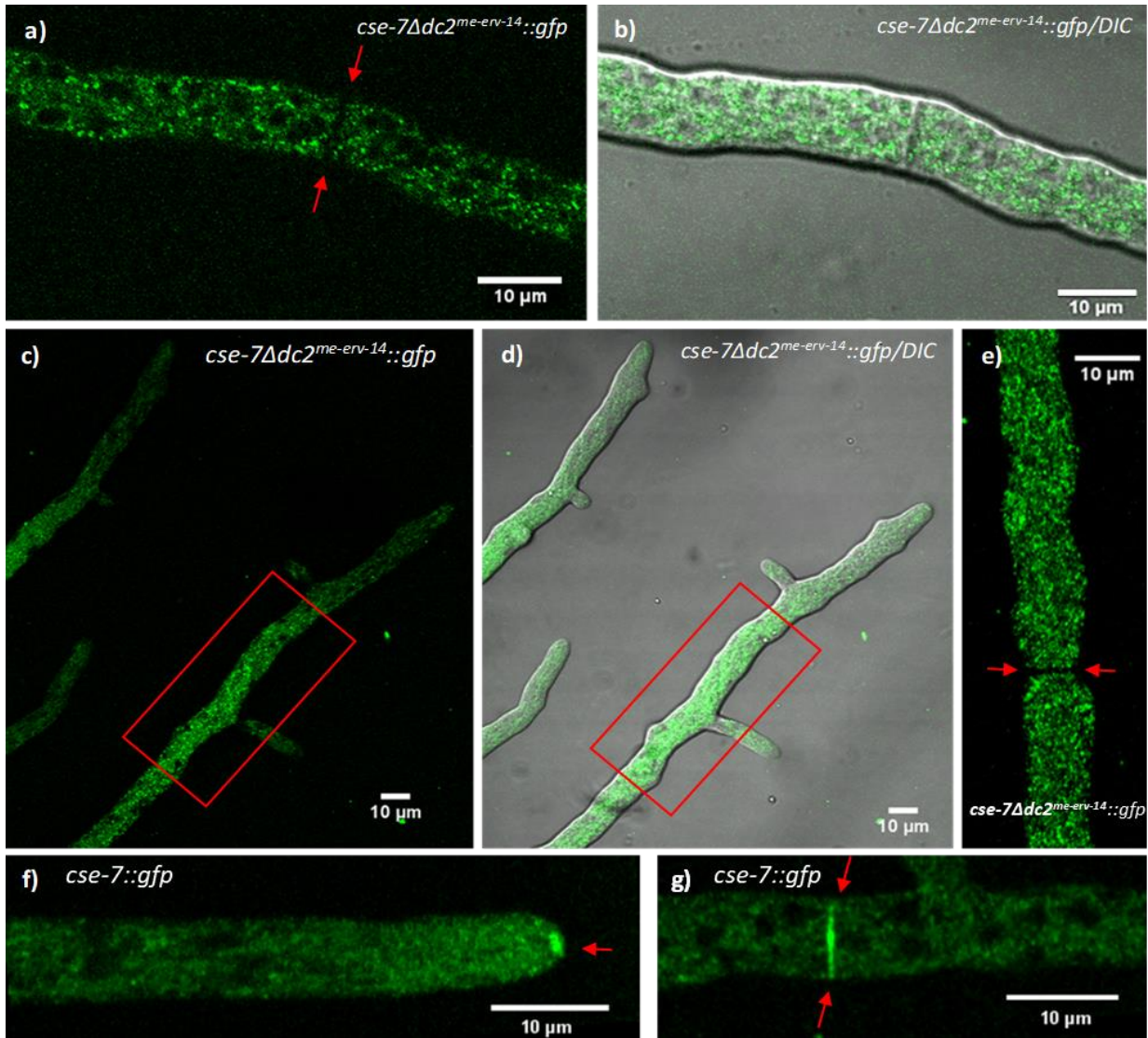


Figura 37. Distribución de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP en fondo mutante de Δcse-7. a), b) y e) Se observa señalado por flechas, que la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP no es capaz de llegar al septo, c) y d) ni al SPK. c) y d) En su lugar, se observa una acumulación de fluorescencia en la zona distal, señalada por cuadros en rojo. f) y g) Esto contrasta con lo observado en CSE-7, que presentó una acumulación de fluorescencia en el f) SPK y g) septos.

3.5 Coexpresión de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14} y CHS-4

3.5.1 Fusiones

Para determinar si la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-GFP aún era capaz de mediar la exportación de CHS-4, se realizaron dos fusiones de la cepa de genotipo *chs-4-mcherry::Δcse-7::hph⁺*. La primera fusión se realizó

con la cepa VMRP361 de genotipo *cse-7-gfp* y la segunda fusión se realizó con la cepa *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp::Δcse-7::hph⁺*. Las fusiones presentaron una baja fluorescencia, por lo que fue necesario subir los parámetros del microscopio, como el HV, para detectar la señal de GFP y mCherry. En ninguna de las dos fusiones se observó una acumulación de fluorescencia de la CHS-4-mCherry en septos y SPK (Figura 38), reflejando una posible necesidad de la presencia de ambas proteínas etiquetadas en el mismo núcleo para su interacción y fomentar la salida de la proteína CHS-4 del RE.

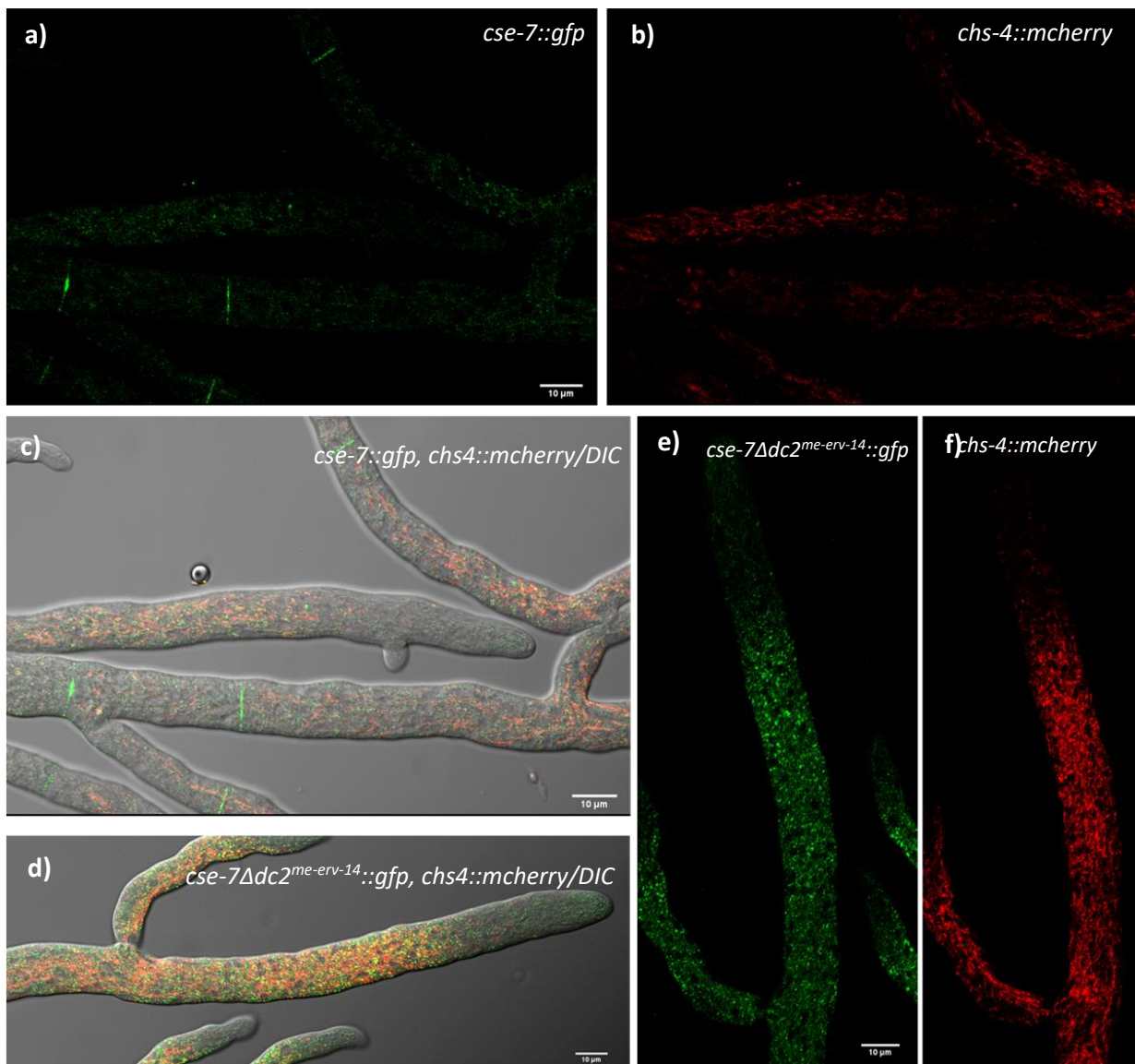


Figura 38. Heterocariones expresando *chs-4-mcherry* y *cse-7-gfp*; y *chs-4-mcherry* y *cse-7Δ^{dc2me-erv-14}*. a), b) y c) Fusión de la cepa VMRP361 y la cepa de genotipo *chs-4-mcherry::Δcse-7::hph⁺*. a) Se presentó una acumulación de fluorescencia de CSE-7-GFP en septos, b) sin embargo, no se observó acumulación de CHS-4 en septos. d), e) y f) Fusión de las cepas de genotipo *cse-7Δdc2^{me-erv-14}-gfp::Δcse-7::hph⁺* y *chs-4-mcherry::Δcse-7::hph⁺*; no se observó acumulación de la quimera ni de CHS-4 en el SPK.

Adicionalmente, debido a la falta de autofluorescencia en rojo y a la presencia de fluorescencia de CSE-7-

GFP en septos, fue posible distinguir la fluorescencia de CSE-7-GFP y CHS-4-mCherry, pese a trabajar con una alta HV.

Sin embargo, debido a la falta de fluorescencia localizada de la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-GFP, fue difícil distinguir la fluorescencia de la quimera de la autofluorescencia, por lo que se decidió optar por una cepa que exprese la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} con una etiqueta de mCherry y CHS-4 con una etiqueta de GFP en futuros análisis.

3.6 Co-expresión de las proteínas CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry

3.6.1 La quimera se co-localiza parcialmente con CHS-4 en la zona distal

Con el fin de determinar si la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} aun es capaz de interactuar con CHS-4 y redirigir la ubicación de CHS-4, se co-expresó CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Para ello se transformó la cepa VMRP395 (genotipo *chs-4-10xGly-gfp::natR+;Δcse-7::hph+; his3-*) con el vector pGAM-11.

Como se observa en la fig. 39, tanto CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry mostraron mayor acumulación de fluorescencia en las regiones distales, presentando un patrón de intensidad de fluorescencia similar, pero observándose una mayor intensidad de fluorescencia de CHS-4-GFP (Figuras 39b y 40b); esto probablemente se deba a que se trata de una cepa heterocarión.

El traslape de expresión de CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry mostró una co-localización parcial, con un coeficiente de Pearson promedio de 0.81. La co-localización se presentó en la región distal, como puntos cercanos a los núcleos y membrana distal. Esto sugiere que las zonas de co-localización corresponden a sitios de salida de vesículas del RE y posiblemente, sitios de integración de vesículas de la zona distal.

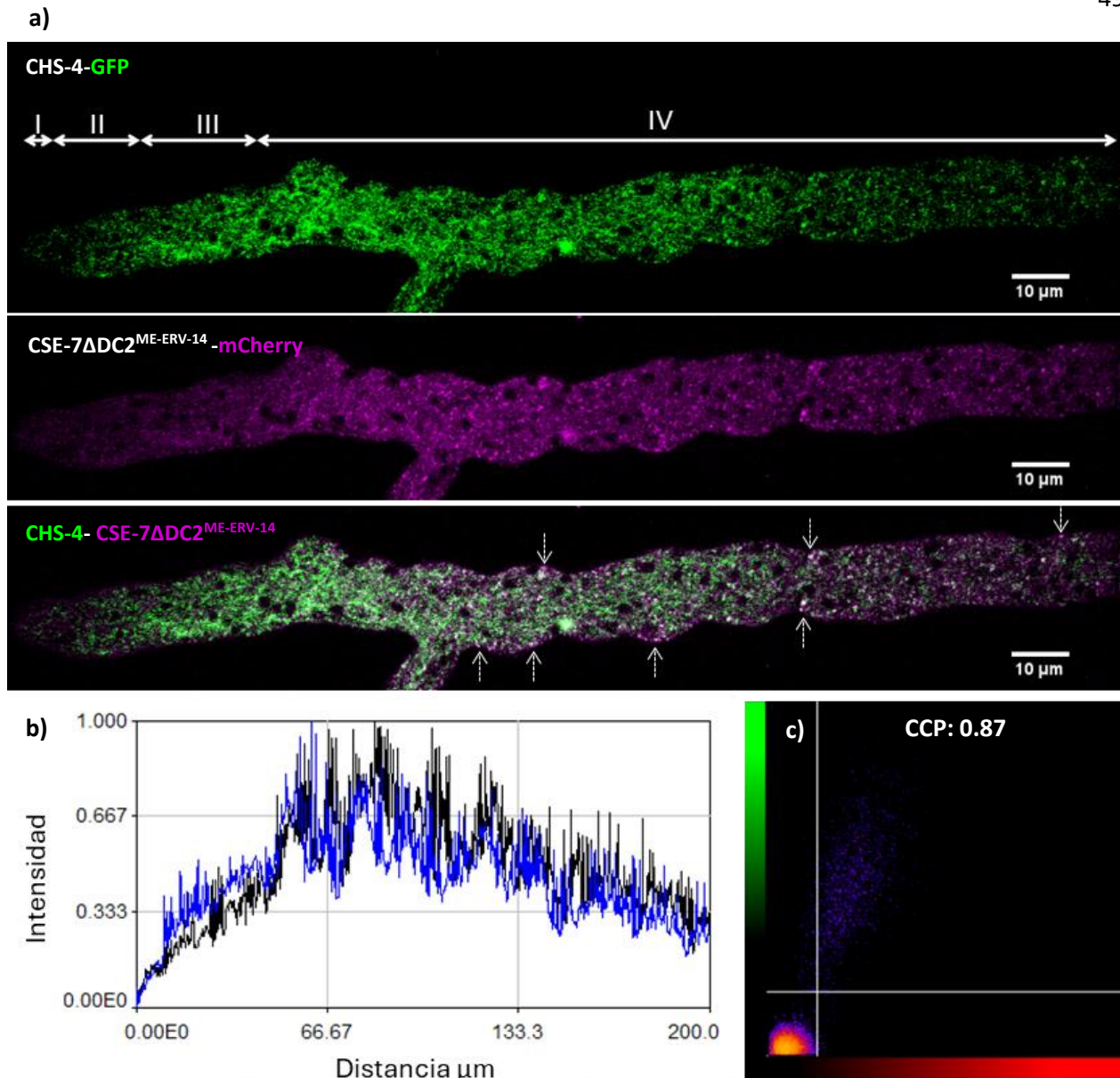


Figura 39. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. La hifa se encuentra dividida en cuatro regiones, la región I corresponde al ápice (5 μm), el subápice proximal la región II (5- 20 μm), el subápice distal o región III (20- 40 μm), y la zona distal correspondiente a la región IV (>40 μm). Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hifa, en negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta; el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.87.

Si bien se observaron puntos de co-localización en la membrana distal, no se observa acumulación de CHS-4-GFP en la membrana distal que no co-localice con CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Por otro lado, si se observa acumulación de fluorescencia de CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry que no co-localiza con CHS-4-GFP.

Una posible interpretación es que CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry y CHS-4-GFP se disocian al llegar a la MP distal, y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry se retenga en la MP distal al contener el motivo de exportación, mientras que CHS-4-GFP salga de la MP distal por endocitosis. Sin embargo, son necesario más estudios para determinar esto.

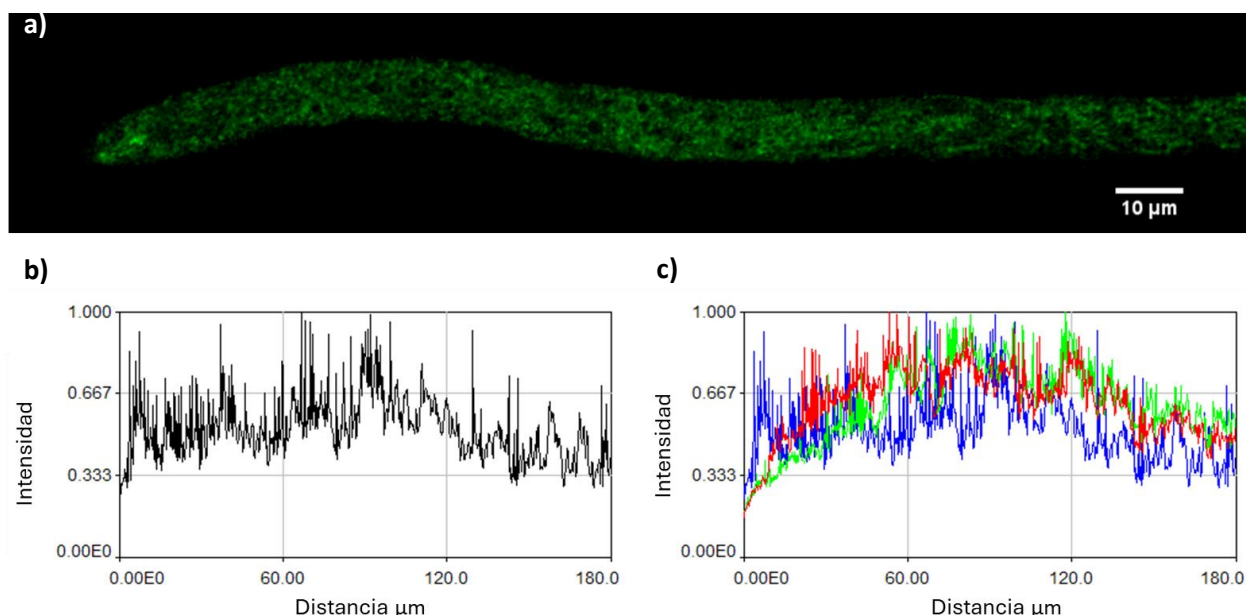


Figura 40. Comparación de la distribución de fluorescencia de CSE-7-GFP con CHS-4-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry. a) Micrografía obtenida mediante microscopia confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en expresión de CSE-7-GFP. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia CSE-7. c) Superposición de las gráficas de intensidad de fluorescencia de CSE-7 y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en co-expresión con CHS-4. En azul se muestra la fluorescencia de CSE-7-GFP, en rojo la fluorescencia de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry y en verde CHS-4-GFP. Se observa un diferente comportamiento en la distribución de la intensidad de fluorescencia entre CSE-7-GFP y CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry en co-expresión con CHS-4, mostrando la primera, una distribución relativamente estable a lo largo de la hifa, mientras que CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}-mCherry y CHS-4-GFP presentan una menor intensidad en las regiones más cercanas al ápice, dentro de los primeros 30 nm aproximadamente; mientras que presenta su mayor pico de intensidad a los 60 nm, y presentando una caída de la intensidad después de los 120 nm hasta los 180 nm, al igual que CSE-7-GFP.

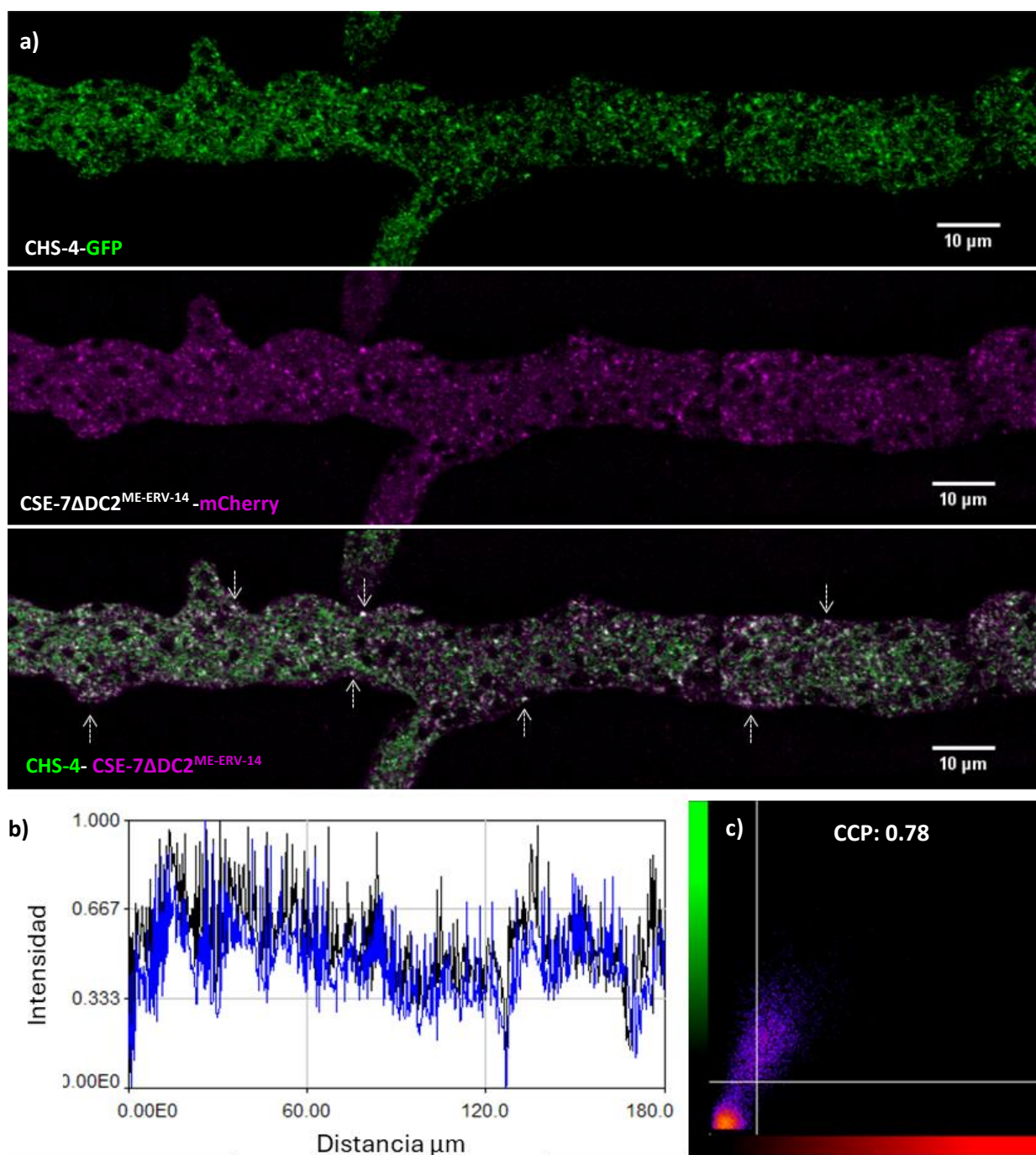


Figura 41. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry en la zona distal. a) Micrografía obtenida mediante microscopía confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hifa; en negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta; el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.78.

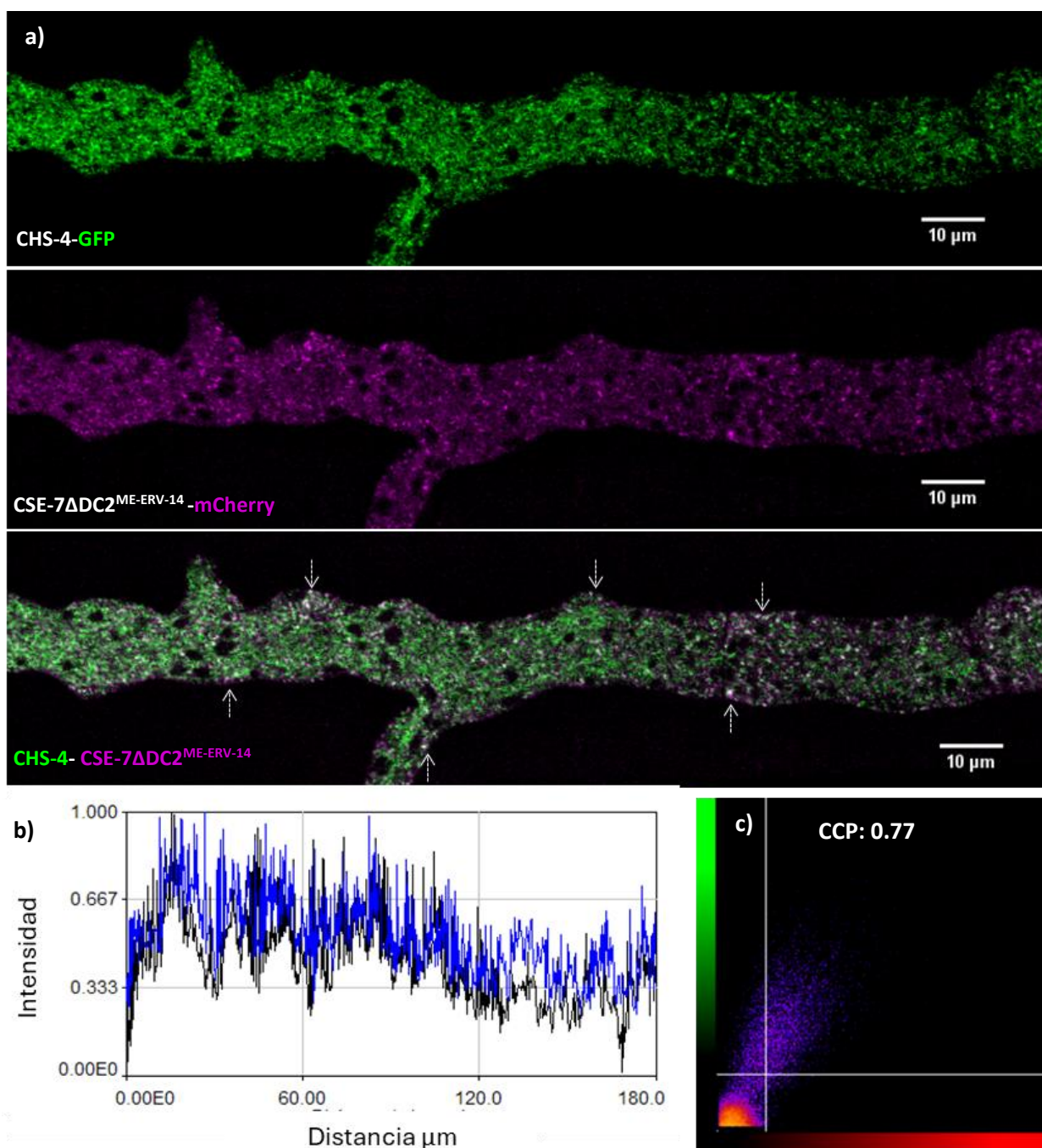


Figura 42. Co-expresión de CHS-4-GFP con CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry en la zona distal. a) Micrografía obtenida mediante microscopía confocal de barrido laser de la zona apical a distal de una hifa en co-expresión de CHS-4-GFP y CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. Las flechas blancas indican zonas donde se observó co-localización de ambos marcadores. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas y sus respectivos marcadores a lo largo de la hifa. En negro se muestra la intensidad de CHS-4-GFP y en azul la intensidad de CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}-mCherry. c) Análisis de co-localización mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP), donde 1 es la máxima puntuación e indica co-localización absoluta, el análisis de co-localización arrojó un CCP de 0.77.

Capítulo 4. Discusión

4.1 CSE-7 y su posible participación en la exportación de CHS-4

Las CHSs en forma de zimógeno son acarreadas en quitosomas. Estos quitosomas o microvesículas tienen un diámetro de entre 30 a 40 nm y son transportadas hasta el SPK (Bartnicki-Garcia et al., 1978; Verdín et al., 2009), donde forman una estructura estratificada conformada por un núcleo de quitosomas, rodeado una capa de macrovesículas (Grove & Bracker, 1970; Howard, 1981).

Se han identificado siete secuencias que codifican CHSs en el genoma de *N. crassa*. Se ha observado que todas las CHSs se localizan en el núcleo del SPK y en septos en desarrollo. Sin embargo, a pesar de presentar la misma distribución, los análisis proteómicos sugieren la existencia de diferentes subpoblaciones de quitosomas para cada CHSs, (Fajardo-Somera et al., 2015; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos que rigen el tráfico y clasificación de las CHSs siguen siendo en su mayoría desconocido. En *S. cerevisiae* la Chs3p, es responsable de la síntesis del 90 al 95% de la quitina celular, y del anillo durante la gemación (Roncero et al., 1988; Shaw et al., 1991; Valdivieso et al., 1991). La Chs3p requiere de la chaperona Chs7p para su exportación desde el RE y correcto plegamiento. Sin Chs7p, la Chs3p se agrega y retiene en el RE (Kota & Ljungdahl, 2005; Trilla et al., 1999). Contrario a lo que se creía anteriormente, Chs7p no es una proteína residente del RE, sino que forma un complejo con Chs3p, y co-localizan en la membrana celular y en los compartimientos de Golgi/endosomal, presentando una mutua dependencia para un tráfico adecuado (Dharwada et al., 2018). Se han identificado dos proteínas ortólogas a Chs7p en *N. crassa*, CSE-7 y CSE-8. El ortólogo de Chs3p en *N. crassa*, CHS-4 depende de CSE-7 para su correcta localización de SPK y septos, mientras que CHS-3 depende de CSE-8 y presentando un papel importante en el desarrollo sexual (González-Téllez & Riquelme, 2025; Rico-Ramírez et al., 2018). Pese a la importancia de Chs7p, CSE-7 y CSE-8, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual estas chaperonas promueven la salida de sus cargas del RE. Se han propuesto diferentes mecanismos, como la presencia de motivos de exportación desconocidos Chs7p, la interacción con otras proteínas que medien la exportación del complejo, como Erv14, o la presencia de motivos de exportación en Chs3p ocultos por su estado conformacional, pero accesibles al interactuar con Chs7p (Dharwada et al., 2018). En este estudio, entre muchas cosas, se propuso un posible mecanismo de interacción entre CHS-4 y CSE-7 mediante el empleo del acoplamiento molecular. Sin embargo, no se ha obtenido la estructura molecular

de ninguna CHS perteneciente a la división II. Hasta ahora, solo se ha obtenido la estructura mediante métodos experimentales de CHS de la división I, las cuales se ha observado que forman dímeros. Esto me hizo surgir la duda de si CHS-4 también forma dímeros. La estructura molecular predicha por AlphaFold muestra la ausencia de dos TMDs presentes en las CHS de la división I. Uno de esos TMDs forma parte del sitio de unión responsable de la formación de dímeros en las CHS de la división I; el TMD 2, que en conjunto con el TMD 5, forman el sitio de unión CHS-CHS (Chen et al., 2023; Wu et al., 2022). Sin embargo, el modelo predicho por AlphaFold presentó una zona desorganizada que abarca los primeros 230 aminoácidos. Al término de esta zona desorganizada se encuentra el primer TMD predicho por AlphaFold, análogo al TMD 5 de las CHS de la división 1, por lo que los TMDs ausentes en el modelo de CHS-4 podrían encontrarse en la zona desorganizada del modelo. Algo que se vio reforzado al eliminar los primeros 230 aminoácidos del modelo, y realizar un acoplamiento molecular con un péptido conformado por los aminoácidos 188-231, el cual se unió a CHS-4 formando un TMD análogo al TMD 5 de las CHS de la división 1. Cabe aclarar que hasta ahora, AlphaFold solo ha predicho modelos de baja calidad para CHS-4, dado que dichos modelos cuentan con grandes zonas desorganizadas que AlphaFold no ha logrado modelar. Sin duda, aunque AlphaFold es una potente herramienta, tiene sus limitaciones, por lo que es necesario tomar los modelos con cautela, y una buena base bibliográfica que nos permita interpretar los modelos. Aun así, puede ser una poderosa herramienta que nos ayude a plantear hipótesis, con base en la literatura. Por otro lado, se ha identificado que Chs3p de *S. cerevisiae* interacciona con el complejo del exómero mediante sus residuos 10-52, observándose la interacción de los residuos 10-27 de dos monómeros de Chs3p con el dímero Chs6-Chs6 del exómero (Weiskoff & Fromme, 2014), reforzando la idea de que CHS-4 forme dímeros.

El acoplamiento molecular de los dímeros de CHS-4 con CSE-7 sugiere la presencia de cuatro sitios de unión para CSE-7 en CHS-4, debido a que la estructura de CHS-4 presenta una imagen especular, y cuenta con dos sitios A y dos sitios B que podrían interactuar con CSE-7. Los modelos de interacción obtenidos sugieren que los sitios A y B interactúan con regiones paralelas de CSE-7, ubicadas en caras contrarias de CSE-7. Esto da origen a un efecto interesante. Al interactuar los sitios A y B con caras CSE-7 ubicadas en regiones contrarias, esto le permitiría a CHS-4 ensamblarse con CSE-7 formando grandes complejos conformados por múltiples dímeros de CHS-4 enlazados por monómeros de CSE-7, formando una estructura esférica organizada con un radio de 354 nm, comparable al tamaño reportado de los quitosomas. Con base a esto, se propone que la acumulación en el RE de tetrámeros conformados por dímeros de CHS-4 unidos mediante sus sitios A, a dos monómeros de CSE-7, que denominaremos CHS-4A-CSE-7, promueve el ensamblaje de los tetrámeros en complejos organizados similares a COPII, interactuando los tetrámeros CHS-4A-CSE-7 entre si mediante el sitio B (Figura 43), y contribuyendo en la curvatura de la membrana y

formación de los quitosomas (Figura 44). Dado que la interacción entre CSE-7 y el sitio B en el dímero de CHS-4 es más débil que la interacción con el sitio A, es posible que el complejo se desmonte desde los sitios B al fusionarse los quitosomas con la MP apical al provocar una transición en la curvatura de la membrana de una forma convexa en el quitosoma a una forma cóncava al integrarse a la MP apical (Figura 45), permaneciendo unida CSE-7 al dímero CHS-4 en sus sitios A, donde se encuentra más cerca del sitio catalítico de CHS-4, y pueden actuar como cofactor, regulando la actividad de CHS-4 como ha sido previamente descrito (Dharwada et al., 2018). A su vez, la transición de los tetrámeros CHS-4A-CSE-7 de la zona apical a subapical podrían promover el reensamblaje del complejo debido al cambio en la curvatura de la membrana, contribuyendo en la endocitosis de CHS-4.

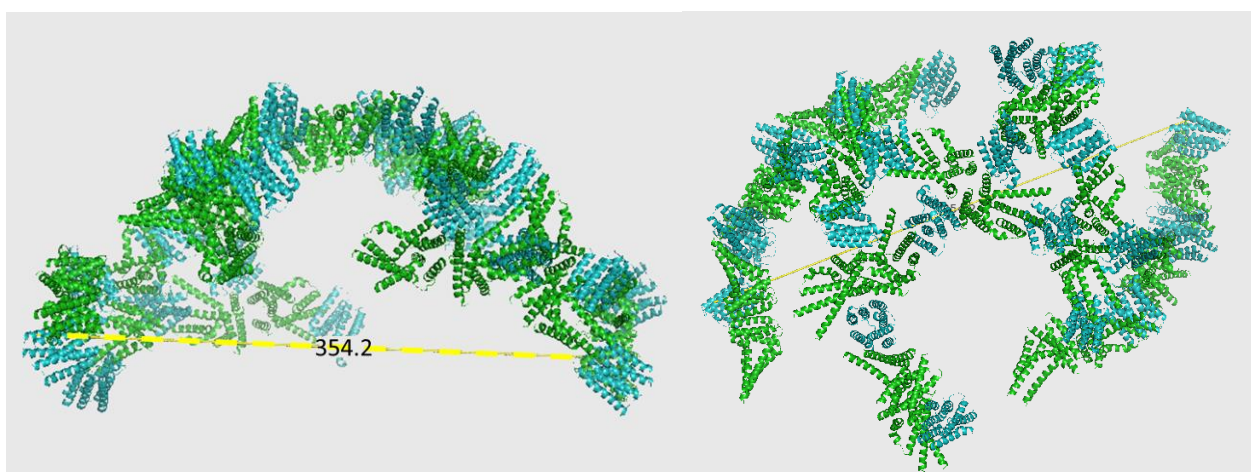


Figura 43. Modelo del complejo CHS-4-CSE-7. La adición de múltiples tetrámeros CHS-4A-CSE-7 da como resultado la formación de un complejo esférico de 354.2 Å de diámetro, en color verde se muestran los TMDs de los dímeros de CHS-4 mientras que en cian se muestran los TMDs de los monómeros de CSE-7.

4.2 Distribución y efecto de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14} en CHS-4

En trabajos anteriores se ha descrito la distribución de CSE-7, mostrando una localización principalmente ubicada en la NEC (por sus siglas en inglés, Network of Elongated Cisternae, o red de cisternas elongadas) que se localiza en el citoplasma de *N. crassa* y que se extiende desde la región III (30-40 μm) hasta la región distal (Rico-Ramírez et al., 2018). Se ha localizado a CSE-7 en un NEC que corresponde a un compartimento celular diferente al de la envoltura nuclear, estrechamente cercano a los núcleos, pero sin llegar a rodearlos, además de localizarse en septos y SPK (Rico-Ramírez et al., 2018). Dadas las limitaciones de este proyecto, no se estudió la distribución de la quimera CSE-7ΔDC2^{ME-ERV-14}, sino que nos enfocamos en los

cambios en la distribución provocados por el motivo de exportación IFRKL tanto en la quimera como en CHS-4.

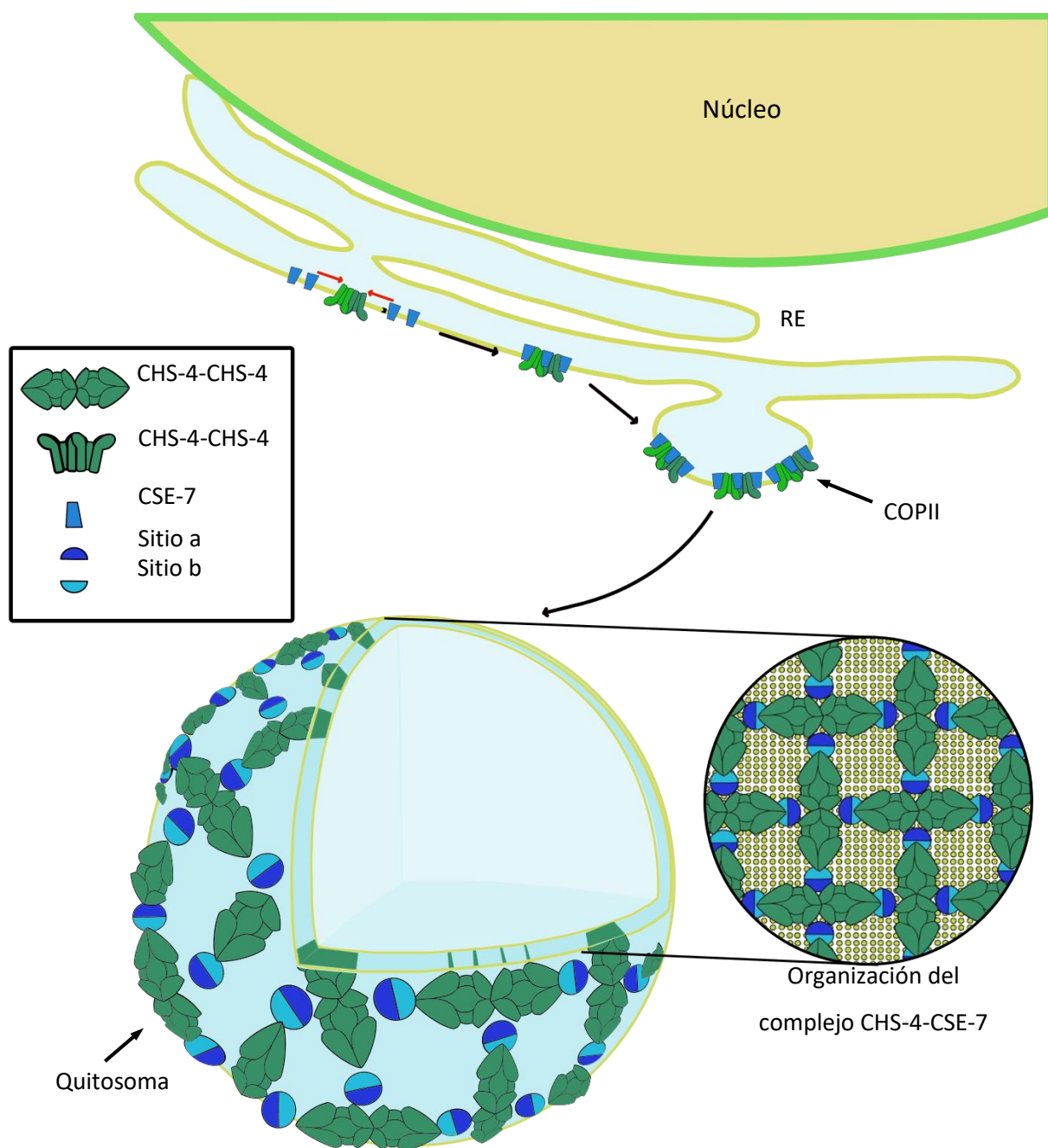


Figura 44. Modelo propuesto de formación de quitosomas. La acumulación de tetrámeros de CHS-4A-CSE-7 inicia la formación del quitosoma, ensamblándose los tetrámeros entre sí, al unirse los tetrámeros mediante la interacción de los sitios B de CHS-4 con CSE-7 de los tetrámeros CHS-4A- CSE-7, forma un complejo similar a una cubierta de aproximadamente 35 nm de diámetro. En este proceso podrían intervenir las proteínas de cubierta COPII.

Tanto la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} como CHS-4 se localizaron en la NEC, presentando una distribución

presuntamente similar a la de CSE-7 en sus etapas más tempranas dentro de la vía secretora. Sin embargo, hacen falta más estudios para corroborar esto, empleando etiquetas de múltiples comportamientos de la NEC para determinar de forma más precisa la distribución de la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} y CHS-4.

Tanto la quimera como CHS-4 presentaron destinos distintos a los de CSE-7 y CHS-4 en cepas silvestres. Ni la quimera ni CHS-4 se encontraron en SPK ni septos; en cambio se localizaron en la MP distal, aunque con una baja concentración de fluorescencia. Es posible que al tratarse de proteínas que suelen ser exportadas al ápice, no se exporten a la velocidad o cantidades necesarias para acumularse en cantidades suficientes para abarcar toda la MP distal, o bien, al ser proteínas con TMDs adaptadas para localizarse en el ápice, no sea muy estable en membranas con curvaturas distintas a las del ápice, dificultando su incorporación a la MP distal. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender los mecanismos que rigen el tráfico de esta proteína quimérica.

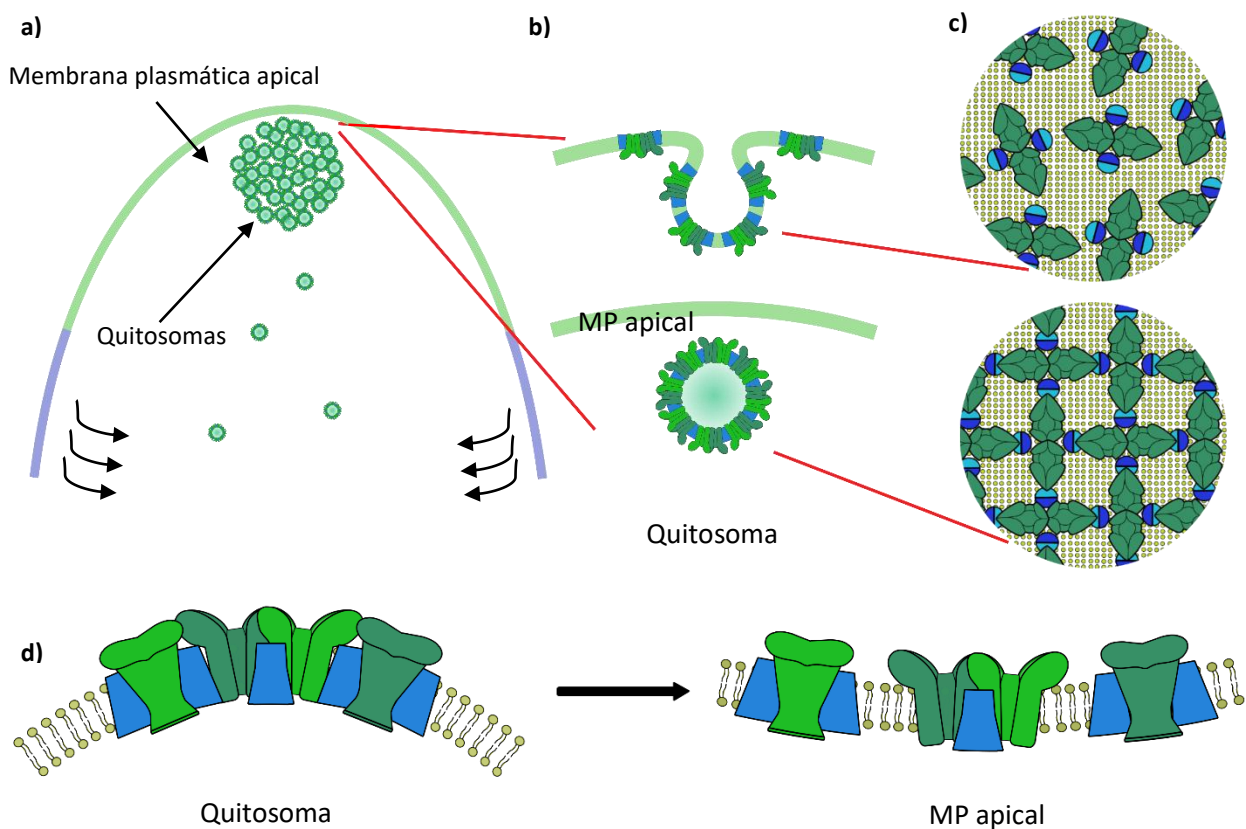


Figura 45. Modelo propuesto de fusión de los quitosomas con la membrana celular apical. Tráfico de quitosomas hasta el SPK. b) La fusión del quitosoma con la membrana plasmática (MP) apical cambia la curvatura de la membrana de una forma convexa en el quitosoma a una forma cóncava al integrarse a la MP apical, provocando el desmontaje del complejo, mediante la ruptura de la interacción entre los sitios B de los tetrámeros de CHS-4A-CSE-7 con CSE-7 de los tetrámeros circundantes.

Capítulo 5. Conclusiones

En este estudio se logró redirigir la ruta de tráfico de la CHS-4 mediante la construcción de una proteína quimérica CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14}, sentando las bases para comprender el papel de los motivos de exportación de ERV-14, en específico el motivo IFRKL y el efecto que tendría en proteínas que no son carga de ERV-14. Sin embargo, debido a las limitaciones del proyecto, se necesitan de estudios adicionales. Es necesaria la co-expresión de la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} con marcadores previamente utilizados en el estudio de CSE-7, para comprender cómo es alterado el tráfico de CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} y su carga CHS-4, así como evaluar las posibles alteraciones en el fenotipo que podría ocasionar la quimera CSE-7 Δ DC2^{ME-ERV-14} y adicionalmente evaluar los efectos que podrían tener el otro motivo de exportación ubicado en ERV-14, el motivo DxE.

Literatura citada

- Anelli, T., & Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO Journal*, 27(2), 315–327. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601974>
- Aramayo, R., & Selker, E. U. (2013). *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017921>
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C. E., Reyes, E., & Ruiz-Herrera, J. (1978). Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in Vitro. *Experimental Mycology*, 2(2), 173–192. [https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(78\)80031-0](https://doi.org/10.1016/S0147-5975(78)80031-0)
- Chen, D. D., Wang, Z. Bin, Wang, L. X., Zhao, P., Yun, C. H., & Bai, L. (2023). Structure, catalysis, chitin transport, and selective inhibition of chitin synthase. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40479-4>
- Davis, R. H., & Perkins, D. D. (2002). *Neurospora*: A model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 397–403. <https://doi.org/10.1038/nrg797>
- Dharwada, S. T., Dalton, L. E., Bean, B. D. M., Padmanabhan, N., Choi, C., Schluter, C., Davey, M., & Conibear, E. (2018). The chaperone Chs7 forms a stable complex with Chs3 and promotes its activity at the cell surface. *Traffic*, 19(4), 285–295. <https://doi.org/10.1111/tra.12553>
- Dimou, S., Dionysopoulou, M., Sagia, G. M., & Dhallinas, 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(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852028>
- Dimou, S., Martzoukou, O., Dionysopoulou, M., Bouris, V., Amillis, S., & Dhallinas, G. (2020). Translocation of nutrient transporters to cell membrane via Golgi bypass in *Aspergillus nidulans*. *EMBO Reports*, 21(7), 15–17. <https://doi.org/10.15252/embr.201949929>
- 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>
- Fajardo-Somera, R. A., Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., & Riquelme, M. (2015). Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 75, 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.01.002>
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. O., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., ... Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–868. <https://doi.org/10.1038/nature01554>
- Gemmer, M., & Förster, F. (2020). A clearer picture of the ER translocon complex. *Journal of Cell Science*, 133(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.231340>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver,

- S. G. (1996). Life with 6000 genes conveniently among the different interna- old questions and new answers the genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced *Schizosaccharomyces pombe* indicate. *Science*, 274(October), 546–567. <https://www.jstor.org/stable/2899628>
- González-Téllez, S. V., & Riquelme, M. (2025). CSE-8, a filamentous fungus-specific Shr3-like chaperone, facilitates endoplasmic reticulum exit of chitin synthase CHS-3 (class I) in *Neurospora crassa*. *Frontiers in Fungal Biology*, 5(January). <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1505388>
- Grove, S. N., & Bracker, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology*, 104(2), 989–1009. <https://doi.org/10.1128/jb.104.2.989-1009.1970>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001329>
- Howard, R. J. (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *Journal of Cell Science*, Vol. 48, 89–103. <https://doi.org/10.1242/jcs.48.1.89>
- Hynes, M. J. (2003). The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biology*, 4(6), 4–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-6-217>
- Katzmann, D. J., Epping, E. A., & Moye-Rowley, W. S. (1999). Mutational Disruption of Plasma Membrane Trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein . *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2998–3009. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.2998>
- Kota, J., & Ljungdahl, P. O. (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *Journal of Cell Biology*, 168(1), 79–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408106>
- Malkus, P., Jiang, F., & Schekman, R. (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *Journal of Cell Biology*, 159(6), 915–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208074>
- Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2007). The transport signal on sec22 for packaging into copii-coated vesicles is a conformational epitope. *Molecular Cell*, 26(3), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.017>
- Mannhaupt, G., Montrone, C., Haase, D., Mewes, W., Aign, V., Hoheisel, J. D., Fartmann, B., Nyakatura, G., Kempken, F., Maier, J., & Schulte, U. (2003). What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. *Nucleic Acids Research*, 31(7), 1944–1954. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg293>
- Martoukou, O., Dhalluin, G., & Amillis, S. (2018). Secretory vesicle polar sorting, endosome recycling and cytoskeleton organization require the ap-1 complex in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 209(4), 1121–1138.
- Miller, E. A., 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](#)

- Mossessova, E., Bickford, L. C., & Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 114(4), 483–495. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00608-1
- Otte, S., & Barlowe, C. (2002). The Erv41p-Erv46p complex: Multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO Journal*, 21(22), 6095–6104. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf598>
- 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>
- Raju, N. B. (1992). Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycological Research*, 96(4), 241–262. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80934-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80934-9)
- Ramos-Pulido, J. (2020). *Estudio de los peroxisomas y las peroxinas en el desarrollo vegetativo y sexual de Neurospora crassa*. [Tesis de Maestría, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/browse?type=author&value=Juan+Ramos+Pulido>
- 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(January), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.006>
- 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>
- Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., & Kaiser, C. A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 145(4), 659–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.659>
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., & Durán, A. (1988). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to calcofluor white. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12), 2596–2601. <https://doi.org/10.1128/aac.35.12.2596>
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gómez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermannova, 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>
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., & Riquelme, M. (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell*, 10(5), 683–695. <https://doi.org/10.1128/EC.00280-10>
- Sastré-Velásquez, L. E. (2018). *Identificación del homólogo a Cornichon/Erv14 y su papel en la regulación del crecimiento del hongo filamentoso Neurospora crassa*. [Tesis de Maestría, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California].

<http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2595>

- Schmit, J. C., & Brody, S. (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriological Reviews*, 40(1), 1–41. <https://doi.org/10.1128/membr.40.1.1-41.1976>
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A., & Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 114(1), 111–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.111>
- Theos, A. C., Martina, A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., Stewart, A., Robinson, M. S., Bennett, D. C., Cutler, D. F., Bonifacino, J. S., & Marks, M. S. (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 5356–5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>
- Trilla, J. A., Durán, A., & Roncero, C. (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 145(6), 1153–1163. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.6.1153>
- Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E., & Duran, A. (1991). CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 114(1), 101–109. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.101>
- 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>
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet. Bull.*, 13, 42–43.
- Weiskoff, A. M., & Fromme, J. C. (2014). Distinct N-terminal regions of the exomer secretory vesicle cargo Chs3 regulate its trafficking itinerary. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00047>
- Westergaard, M., & Mitchell, H. (1947). *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10), 573–577. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2437339>
- Wu, Y., Zhang, M., Yang, Y., Ding, X., Yang, P., Huang, K., Hu, X., Zhang, M., Liu, X., & Yu, H. (2022). Structures and mechanism of chitin synthase and its inhibition by antifungal drug nikkomycin Z. *Cell Discovery*, 8(1), 4–7. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00495-y>
- Zhang, X., & Wang, Y. (2016). GRASPs in Golgi structure and function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00084>
- Zimmermannová, O., Felcmanová, K., Rosas-Santiago, P., Papoušková, K., Pantoja, O., & Sychrová, H. (2019). Erv14 cargo receptor participates in regulation of plasma-membrane potential, intracellular pH and potassium homeostasis via its interaction with K⁺-specific transporters Trk1 and Tok1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(9), 1376–1388. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.05.005>