

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**

**Función de la proteína TEA-5 durante el crecimiento y
desarrollo de *Neurospora crassa***

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

Presenta:

Pedro Alejandro Lopez Garcia

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Pedro Alejandro Lopez Garcia

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Codirectora de tesis

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Codirectora de tesis

Dra. María del Carmen Maya Sánchez

Dr. Domingo Martínez Soto

Dra. Astrid Nalleli Espino Vázquez



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 **Pedro Alejandro Lopez Garcia** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida.

Función de la proteína TEA-5 durante el crecimiento y desarrollo de *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Codirectora de tesis

Codirectora de tesis

El citoesqueleto en células eucariotas es fundamental para el desarrollo del organismo, ya que participa en procesos clave como la división celular, proporciona rigidez estructural a la célula e interacciona con proteínas que son cruciales para su funcionamiento y crecimiento. En los hongos filamentosos, el citoesqueleto juega un papel importante en el crecimiento polarizado de las hifas. A lo largo del desarrollo fúngico, diversas proteínas interactúan con el citoesqueleto para formar complejos que permiten el transporte dirigido de otras proteínas hacia la punta de las hifas, lo cual es fundamental para su elongación y función. Las proteínas del complejo TEA (Tip Elongation Aberrant protein) se asocian tanto con el citoesqueleto de actina como con los microtúbulos en los polos de crecimiento celular de *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus nidulans*. Sin embargo, en *Neurospora crassa*, esta asociación aún no se comprende completamente. En estudios previos se han identificado tres proteínas que conforman el complejo TEA en *N. crassa*: TEA-1, TEA-4 y TEA-5. La ausencia de los genes que codifican las proteínas TEA-1 y TEA-4 no afecta de manera significativa el desarrollo del hongo; en cambio, la delección del gen *tea-5* es letal para la célula. En este trabajo, se caracterizó el fenotipo de la cepa heterocarión $\Delta tea-5$, el cual mostró una evidente disminución en la tasa de crecimiento, producción de biomasa y producción de conidios, además de observarse un incremento en la tasa de ramificación en comparación con la cepa tipo silvestre (WT). Por otra parte, mediante análisis por microscopia confocal se observó que en hifas maduras de la cepa $\Delta tea-5^{het}$ un Spitzenkörper (Spk) pequeño e inestable, y un citoesqueleto de actina y microtúbulos desorganizados. Además, se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación (Co-IP) para identificar las proteínas asociadas a este complejo, lo cual permitió determinar las principales proteínas involucradas en el reclutamiento de actina durante el crecimiento de *N. crassa*.

Palabras clave: Crecimiento polarizado, citoesqueleto, co-Inmunoprecipitación, TEA-5.

Abstract of the thesis presented by **Pedro Alejandro Lopez Garcia** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science.

Role of TEA-5 protein during growth and development of *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Thesis codirector

Thesis codirector

The cytoskeleton in eukaryotic cells is essential for development, it participates in key processes such as cell division, provides structural support, and interacts with proteins critical for cellular function and growth. In filamentous fungi, the cytoskeleton plays a major role in polarized growth of hyphae. During fungal development, various proteins interact with cytoskeletal elements to form complexes that enable targeted transport of cargo proteins to the hyphal tip—an essential mechanism for elongation and directional growth. The TEA (Tip Elongation Aberrant) complex proteins have been shown to associate with both the actin cytoskeleton and microtubules at the growth poles of *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans*. However, their role in *Neurospora crassa* remains poorly understood. Previous studies have identified three TEA complex proteins in *N. crassa*: TEA-1, TEA-4, and TEA-5. While deletion of *tea-1* or *tea-4* does not significantly impact fungal development, deletion of *tea-5* is lethal to the cell. In this study, we characterized the phenotype of a heterokaryotic strain lacking *tea-5* ($\Delta tea-5^{het}$), which exhibited a significant reduction in growth rate, biomass production, and conidiation, along with increased branching frequency compared to the wild-type (WT) strain. Confocal microscopy revealed that mature hyphae of the $\Delta tea-5^{het}$ strain displayed a small, unstable Spitzenkörper (Spk) and a disorganized actin and microtubule cytoskeleton. Additionally, co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments were conducted to identify proteins associated with TEA-5, leading to the identification of key components potentially involved in actin recruitment during hyphal growth in *N. crassa*.

Keywords: Polarized growth, cytoskeleton, Co-Immunoprecipitation, *Neurospora crassa*, TEA-5.

Dedicatoria

A mi madre, todo lo bueno de mí es por ella.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por concederme la beca de manutención que hizo posible mi dedicación a este proyecto. Su apoyo económico fue fundamental para continuar mi formación académica y científica, permitiéndome culminar esta investigación con éxito.

De igual forma, extendo mi gratitud al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por acogerme en su posgrado y proporcionarme las herramientas académicas y técnicas para mi desarrollo.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA-CICESE), por las capacitaciones proporcionadas en el uso del microscopio confocal de barrido laser.

Mi más sincero agradecimiento al Departamento de Microbiología del CICESE, todos los doctores fueron estupendos y muy amables durante mi estancia.

Un agradecimiento profundo y especial a mis codirectoras de tesis, la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete y la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, cuyo compromiso, sabiduría y apoyo constante fueron el pilar de este trabajo. Sin su guía experta, su paciencia infinita y su dedicación, esta investigación no hubiera sido posible. Muchas gracias de corazón.

También quiero agradecer a la Dra. Astrid Nalleli Espino Vázquez, por su invaluable apoyo técnico y asesoría experta durante los experimentos de Co-Inmunoprecipitación. Su paciencia para resolver mis dudas metodológicas y su rigor científico fueron determinantes para superar los desafíos experimentales de esta investigación.

A mis sinodales Dra. María del Carmen Maya Sánchez y Dr. Domingo Martínez Soto. Por las recomendaciones sobre el proyecto y su disposición.

A mi novia Yessica, que me impulsa a dar siempre más en todo.

Agradezco a todos mis compañeros de generación, fueron muy agradables los días que pasamos juntos en clases, en el gimnasio y en el laboratorio.

Por último, agradezco profundamente a la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete, quien me apoyó desde un principio cuando llegué a CICESE. Gracias por todo el conocimiento compartido, sin sus enseñanzas no podría ser lo que soy ahora. Mi crecimiento profesional es gracias a usted.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Crecimiento polarizado	2
1.1.2 Microtúbulos	3
1.1.3 Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs).....	5
1.1.4 Citoesqueleto de Actina	5
1.1.5 Complejo TEA	7
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo general	10
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología.....	11
2.1 Organismos y medios de cultivo	11
2.2 Cruzas sexuales de <i>N. crassa</i>	11
2.3 Obtención de microconidios	12
2.4 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta tea-5$	12
2.4.1 Morfología colonial	12

2.4.2	Tasa de crecimiento	13
2.4.3	Tasa de conidiación	13
2.4.4	Tasa de ramificación.....	13
2.4.5	Producción de biomasa	13
2.5	Fusiones vegetativas	14
2.6	Microscopia confocal	15
2.7	Co-inmunoprecipitación.....	16
2.8	Análisis bioinformático.....	18
Capítulo 3.	Resultados	19
3.1	Obtención de la cepa homocarión $\Delta tea-5$	19
3.2	Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta tea-5$	19
3.2.1	Morfología colonial	19
3.2.2	Tasa de crecimiento y producción de biomasa	20
3.2.3	Tasa de conidiación y ramificación.....	21
3.2.4	Dinámica del Spitzenkörper en la mutante $\Delta tea-5^{het}$	22
3.2.5	Dinámica del citoesqueleto microtubular y de actina en la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$	23
3.2.6	Dinámica de la formina BNI-1 en la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$	25
3.3	Determinación de proteínas asociadas a TEA-5 por Co-IP	26
3.3.1	Análisis bioinformático.....	27
Capítulo 4.	Discusión.....	29
Capítulo 5.	Conclusiones	32
Literatura citada		33

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Estructura y composición de los microtúbulos. Durante la polimerización, cada subunidad de tubulina se une a una molécula de GTP. En la α -tubulina, el GTP actúa estructuralmente, mientras que en la β -tubulina es hidrolizado a GDP, lo cual regula la incorporación de nuevos dímeros. Así, el GTP se hidroliza con el tiempo, de modo que, si la adición de dímeros ocurre rápidamente, se forma un casquete de β -tubulina con GTP en el extremo (+); si es lenta, lo que queda expuesto es tubulina unida a GDP. La unión de GTP o GDP determina la velocidad de crecimiento o desensamblaje del microtúbulo: un casquete con GTP en el extremo (+) facilita la elongación, mientras que uno con GDP favorece la despolimerización (Imagen adaptada de Alberts <i>et al.</i> 2015).	4
Figura 2. Estructura y ensamblado de Actina La molécula de actina posee un ion de magnesio asociado a ATP o ADP. La presencia de estos nucleótidos modifica su conformación, lo que influye en su afinidad por formar estructuras polimerizadas. Cuando el nucleótido unido es ADP, la G-actina tiende a desnaturalizarse. En condiciones adecuadas, la G-actina se une inicialmente al ATP y forma dímeros o trímeros estables, lo que permite la elongación de los filamentos mediante la adición secuencial de monómeros. Durante este proceso, la hidrólisis del ATP a ADP genera una polaridad en el filamento, distinguiéndose un extremo de crecimiento rápido (+) y otro más lento o de disociación (-). (Hohmann & Dehghani, 2019).	6
Figura 3. Modelos de la dinámica y estructura de las proteínas TEA. (A) En <i>S. pombe</i> el complejo Tea participa en el reclutamiento y soporte de proteínas que interviene en el proceso de crecimiento polarizado. (B) <i>A. nidulans</i> el complejo Tea es necesario para mantener el crecimiento polarizado a través del reclutamiento de la formina. Modificado de Fischer <i>et al.</i> , 2008, Pérez & Rincón, 2010. La imagen fue generada con Biorender.com	8
Figura 4. Esquema de las fusiones vegetativas. Se inocularon bloques de agar de las distintas cepas y se incubaron durante 12 h a 30°C. Se realizó el corte en la sección del rectángulo rojo, donde convergen ambas cepas. La imagen fue generada con Biorender.com.....	14
Figura 5. Técnica de agar invertido. La técnica de agar invertido consiste en cortar un fragmento de agar con micelio y colocarlo invertido sobre un cubreobjetos. Modificada de Hickey <i>et al.</i> (2004). La imagen fue generada con Biorender.com.....	15
Figura 6. Protocolo Co-IP. Diagrama de flujo donde se muestran los pasos seguidos en la Co-IP. Figura modificada de Espino-Vázquez <i>et al.</i> (2024) y creada en Biorender.com.	16
Figura 7. Morfología macroscópica de <i>N. crassa</i> . Morfología colonial de la cepa WT (a) y $\Delta tea-5^{het}$ (b) después de 24 h de crecimiento. Imágenes estereoscópicas que muestran el margen de la colonia de la cepa WT (c) y $\Delta tea-5^{het}$ (d). Barra de escala = 500 μ m. Hifas aéreas en WT y $\Delta tea-5^{het}$ después de cinco días de crecimiento a 30°C (e y f).	20
Figura 8. Crecimiento y producción de biomasa en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. A) Crecimiento radial medido en centímetros a lo largo de 48 horas. B) Producción promedio de biomasa en miligramos por día. Barras de error muestran el Intervalo de confianza al 95% A) y el error estándar B)	21
Figura 9. Tasa de ramificación y conidiación de las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. A) Promedio de ramas dentro de los 500 μ m n=30. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%. B) Promedio de	

conidios producidos por la cepa WT y mutante. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.	21
Figura 10. Grosor de la hifa en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. Se cuantificó el grosor de 23 hifas tanto de la cepa mutante como la silvestre, midiendo el diámetro en la región apical aproximadamente a 20 μm de la punta de la hifa. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.....	22
Figura 11. Dinámica del Spk en la mutante $\Delta tea-5^{het}$. Serie tiempo de imágenes confocales de hifas maduras que muestran la dinámica del Spk en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. Membranas teñidas con el colorante FM4-64. Las flechas indican la inestabilidad del Spk en la cepa mutante en comparación con el WT. Barra de escala = 10 μm	23
Figura 12. Micrografías confocales de las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$ con β -Tubulin-sGFP. Serie temporal de imágenes confocales de hifas maduras que expresan β -Tubulin-sGFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Barra de escala = 10 μm	24
Figura 13. Dinámica del citoesqueleto de actina. Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas maduras que expresan Lifeact-sGFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Las flechas blancas indican la inestabilidad de la actina que se encuentra en el Spk. Barra de escala = 10 μm	25
Figura 14. Dinámica de la formina BNI-1 en el fondo mutante $\Delta tea-5^{het}$. Serie tiempos de imágenes confocales de hifas maduras que expresan BNI-1-GFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Las flechas blancas nos indican la inestabilidad de BNI-1 durante el crecimiento de la hifa en la cepa mutante. Barra de escala = 10 μm	26
Figura 15. Electroforesis de los productos de co-inmunoprecipitación. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% teñido con nitrato de plata de la Co-IP de TEA-5-sGFP. M = marcador de peso molecular, WT= tipo silvestre, CYT= sGFP citoplasmática, TEA-5= TEA-5-sGFP.....	27

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.	11
Tabla 2. Fusiones vegetativas realizadas en este trabajo.	15
Tabla 3. Proteínas y sus funciones resultantes de la Co-IP de la proteína TEA-5.	28

Capítulo 1. Introducción

Los hongos filamentosos representan un claro ejemplo de organismos con crecimiento polarizado. La polarización del crecimiento se establece y se mantiene una vez que una espora fúngica germina. Este tipo de crecimiento requiere una interacción coordinada entre determinantes de polaridad molecular, síntesis de la pared celular, remodelación de la membrana, el citoesqueleto de actina y microtúbulos (Mts) (Harris & Momany, 2004; Riquelme & Sánchez-León, 2014; Riquelme *et al.*, 2018). Estos elementos del citoesqueleto presentan un arreglo espacial, funcional complementario y bien coordinado.

Los Mts están organizados a lo largo de las hifas fúngicas y se consideran principalmente responsables del transporte a larga distancia de vesículas secretoras hacia el Spitzenkörper (Spk) (Bartnicki-Garcia, 2002; Riquelme & Sánchez-León, 2014; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006).

El citoesqueleto de actina desempeña un papel crucial en el crecimiento apical al facilitar el transporte localizado y la exocitosis de componentes de la pared celular en el sitio de crecimiento activo. La dinámica de estos filamentos de actina es esencial para responder a señales ambientales y dirigir el crecimiento hifal de manera adaptativa. Las interacciones entre actina y MTs no solo son esenciales para el transporte vesicular sino también para mantener la integridad estructural y la rigidez necesarias durante el crecimiento rápido (Riquelme *et al.*, 2018; Takeshita, 2016).

La coordinación de estos sistemas de citoesqueleto es mediada por una serie de proteínas denominadas marcadores de extremo celular que vinculan los Mts y la actina, facilitando así una red de señalización compleja que regula el crecimiento y la morfogénesis de las hifas. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas del complejo TEA, que son cruciales para el mantenimiento de la polaridad celular. Estas proteínas se localizan en los extremos de las células y son responsables de señalar la dirección del crecimiento, asegurando así la orientación correcta y la elongación continua de las hifas (Fischer *et al.*, 2008). El transporte de estas proteínas al extremo de la célula está mediado por los Mts, lo que subraya la interdependencia de los sistemas de citoesqueleto en el mantenimiento de la polaridad celular. Este intrincado sistema permite a los hongos filamentosos adaptarse a diferentes condiciones ambientales y optimizar su crecimiento y patogenicidad (Harris *et al.*, 2005; Riquelme *et al.*, 2018).

En la levadura *S. pombe*, se ha identificado una proteína denominada Tea1, que se mueve activamente hacia el extremo positivo de los Mts y se concentra en la región de crecimiento polarizado. Se postula que Tea1 forma un complejo con otras proteínas como Tea4 y Mod5, contribuyendo así a la localización de la

formina (proteína que induce la polimerización de los filamentos de actina) en la misma. Además, en el hongo filamentoso *A. nidulans*, se han identificado genes ortólogos que codifican para proteínas similares, entre ellas TeaA (ortóloga de Tea1). Al igual que Tea1, TeaA se mueve hacia el extremo positivo de los Mts y se acumula en la región apical, donde forma un complejo similar. Este complejo, compuesto por las proteínas TEA, desempeña un papel crucial en el reclutamiento y la localización de la formina, así como en el anclaje de los Mts en el ápice (Takeshita *et al.*, 2013; Mata & Nurse, 1997).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Crecimiento polarizado

El crecimiento polarizado es un proceso fundamental que implica la expansión o desarrollo de una célula, tejido o estructura en una dirección específica en respuesta a estímulos internos o externos. Este fenómeno se observa en una amplia gama de contextos biológicos y físicos, desde el desarrollo celular en organismos multicelulares hasta la formación de cristales en materiales sólidos (Fletcher & Mullins, 2010). En biología, el crecimiento polarizado es esencial para diversas funciones, como la morfogénesis, la migración celular, la cicatrización de heridas y el desarrollo de tejidos (Schwamborn & Püschel, 2004). Es común en organismos tan diversos como plantas, hongos, levaduras y animales, donde permite la organización y el crecimiento ordenado de estructuras (Friml, 2003).

En plantas, el crecimiento polarizado es evidente en la expansión de raíces y brotes, que responden a estímulos ambientales como la luz (fototropismo) y la gravedad (gravitropismo), permitiendo a las plantas maximizar su acceso a los recursos necesarios para la fotosíntesis y la absorción de nutrientes (Friml, 2003). En animales, este tipo de crecimiento es crucial para la formación de estructuras complejas como los axones y dendritas en las neuronas, y también desempeña un papel vital en la migración celular durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas (Schwamborn & Püschel, 2004).

En los hongos filamentosos, el crecimiento polarizado es un proceso característico y esencial para su desarrollo y supervivencia. Los hongos filamentosos, como los mohos, crecen a través de la formación de hifas, que son estructuras tubulares que se extienden en la punta mediante un crecimiento altamente polarizado (Harris, 2006; Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Este crecimiento permite a los hongos explorar y colonizar rápidamente nuevos ambientes, facilitando la absorción de nutrientes y la invasión del sustrato.

(Momany, 2002). Las hifas crecen exclusivamente en sus extremos, en un proceso impulsado por la acumulación de vesículas de transporte y materiales de construcción en la punta, coordinado por el Spk (Riquelme *et al.*, 2014).

El Spk es un complejo de vesículas y proteínas localizado en la punta de la hifa que actúa como un centro de organización para el crecimiento polarizado (Riquelme *et al.*, 1998). Este complejo regula el tráfico de membranas y los componentes de la pared celular hacia la región de expansión, permitiendo un crecimiento dirigido y eficiente (Harris, 2006). El Spk no solo asegura la entrega continua de enzimas hidrolíticas y otros materiales necesarios para la extensión de la hifa, sino que también adapta el crecimiento en respuesta a señales ambientales, como la presencia de nutrientes o barreras físicas (Riquelme *et al.*, 1998; Verdín *et al.*, 2009).

Además, en los hongos filamentosos, el citoesqueleto desempeña un papel central en el crecimiento polarizado. Los Mts y filamentos de actina dirigen el transporte de vesículas y orgánulos hacia la punta de la hifa, donde se fusionan con la membrana plasmática, facilitando la incorporación de nuevos componentes y la expansión continua de la célula (Harris, 2006). Este proceso de crecimiento polarizado no sólo es crucial para la nutrición y supervivencia del hongo, sino que también permite la diferenciación de estructuras especializadas para la reproducción, como esporangios o cuerpos fructíferos (Momany, 2002).

1.1.2 Microtúbulos

Los Mts son componentes fundamentales del citoesqueleto en hongos filamentosos, desempeñando roles esenciales en la organización celular, el transporte intracelular y la división celular. Estas estructuras están formadas por polímeros de tubulina, compuestos por heterodímeros de las proteínas α -tubulina y β -tubulina, que se ensamblan en protofilamentos. Estos protofilamentos se agrupan en un arreglo de trece para formar un cilindro hueco. Una característica destacable de los Mts es su polaridad estructural, resultante de la adición de heterodímeros en uniones cabeza con cola. Esta polaridad da lugar a un extremo positivo (+), en el cual la adición (polimerización) y separación (despolimerización) de dímeros es más activa y rápida durante el crecimiento de los Mts. En el extremo negativo (-), que presenta un anillo de γ -tubulina, estos procesos ocurren de manera más lenta (**Figura 1A**) (Jiang & Akhmanova, 2011).

El ensamblaje de los Mts es regulado dinámicamente por proteínas asociadas a Mts (MAPs) y la hidrólisis de GTP, lo que permite que los Mts alternen entre fases de crecimiento y acortamiento, un fenómeno conocido como "inestabilidad dinámica" (**Figura 1B**) (Mitchison & Kirschner, 1984; Desai & Mitchison, 1997; Howard & Hyman, 2003; Akhmanova & Steinmetz, 2008). Esta regulación es crucial para la organización del huso mitótico durante la mitosis, asegurando la correcta segregación de los cromosomas hacia las células hijas (Steinberg, 2014; Ramos-García *et al.*, 2009). En los hongos filamentosos, el citoesqueleto microtubular participa en varios procesos celulares esenciales, como la división celular, la distribución de los núcleos y el transporte de orgánulos. Además, facilita el transporte intracelular a lo largo de las largas células hifales, un proceso crítico para mantener la polaridad celular y el crecimiento direccional (Harris, 2006).

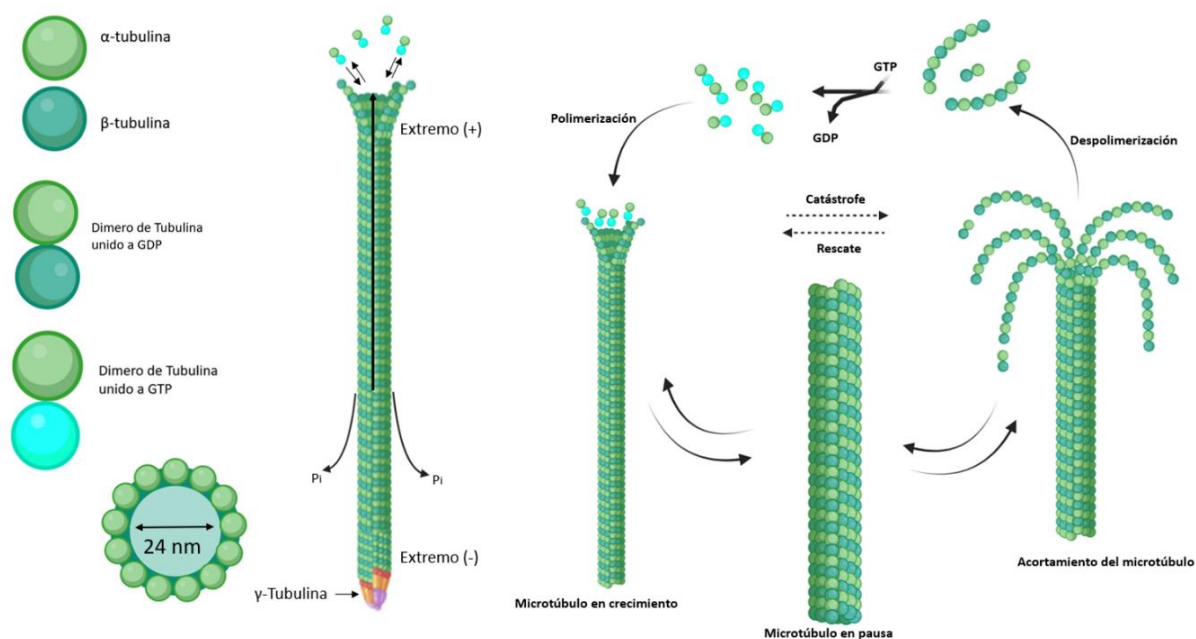


Figura 1. Estructura y composición de los microtúbulos. Durante la polimerización, cada subunidad de tubulina se une a una molécula de GTP. En la α -tubulina, el GTP actúa estructuralmente, mientras que en la β -tubulina es hidrolizado a GDP, lo cual regula la incorporación de nuevos dímeros. Así, el GTP se hidroliza con el tiempo, de modo que, si la adición de dímeros ocurre rápidamente, se forma un casquete de β -tubulina con GTP en el extremo (+); si es lenta, lo que queda expuesto es tubulina unida a GDP. La unión de GTP o GDP determina la velocidad de crecimiento o desensamblaje del microtúbulo: un casquete con GTP en el extremo (+) facilita la elongación, mientras que uno con GDP favorece la despolimerización (Imagen adaptada de Alberts *et al.* 2015).

El transporte intracelular a lo largo de los Mts es mediado por motores moleculares como las cinesinas y las dineínas. Las cinesinas se desplazan hacia el extremo positivo (+) de los Mts, mientras que las dineínas se mueven hacia el extremo negativo (-), llevando consigo diversas cargas intracelulares, como vesículas, organelos y partículas de RNA a lo largo del citoplasma (Alberts *et al.*, 2015; Vale, 2003). Las proteínas motoras como las dineínas facilitan el transporte a largas distancias de vesículas, organelos y otros

elementos necesarios, contribuyendo al mantenimiento de la organización celular y la expansión de la hifa (Xiang & Oakley, 2014).

1.1.3 Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs)

Las MAPs incluyen tanto proteínas motoras como no motoras que se encuentran ampliamente en distintos tipos celulares. Estas proteínas pueden unirse temporalmente a los Mts, modificando sus propiedades regulatorias, funcionales y de motilidad (Maiato *et al.*, 2004). Algunas, como XMAP215, tau y MAP4, promueven el ensamblaje de MTs, mientras que otras, como las de la familia KinI, Op/Stathmin o kataninas, lo inhiben (van Breugel *et al.*, 2003). Los mecanismos de estabilización o desestabilización varían entre MAPs. Por ejemplo, tau, MAP1 y MAP2 estabilizan los MTs al entrecruzar subunidades de tubulina, evitando su desensamblaje (van Breugel *et al.*, 2003; Desai & Mitchison, 1997). En cambio, proteínas como EB1 y los CLIPs se unen al extremo positivo de los MTs, actuando como factores anti-catástrofe que promueven su estabilidad (van Breugel *et al.*, 2003). Las MAPs que se localizan en el extremo positivo de los MTs se conocen como +TIPs y se dividen en dos grupos: aquellas que promueven el crecimiento de los MTs y las que favorecen su desestabilización (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005). En el primer grupo se incluyen proteínas como EB1 y CLIPs, que se acumulan en el extremo positivo y permanecen allí durante la fase de elongación, participando activamente en el proceso de copolimerización. También forman parte de este grupo proteínas que son transportadas hasta el extremo positivo mediante cinesinas, como es el caso de Tea1p, una proteína con dominios kelch identificada en hongos (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005 Wu y Xiang, 2006).

1.1.4 Citoesqueleto de Actina

La actina es un componente esencial del citoesqueleto en los hongos filamentosos, donde desempeña funciones críticas en la organización y dinámica celular. Los filamentos de actina (F-actina) se forman mediante la polimerización de monómeros de actina globular (G-actina), un polipéptido de 375 aminoácidos que contiene una molécula de ATP o ADP. Estos filamentos, organizados en estructuras helicoidales, presentan polaridad con un extremo positivo (+) de crecimiento rápido y un extremo negativo (-) de crecimiento más lento, similar a la polaridad observada en los Mts (**Figura 2**). La actina es una de las proteínas más conservadas entre los eucariotas, y ligeras variaciones en su secuencia de aminoácidos pueden resultar en diferencias funcionales significativas, lo que subraya su importancia evolutiva y su rol

fundamental en la célula (Alberts *et al.*, 2015; Hasek & Bartnicki-Garcia, 1994; Hohmann & Dehghani, 2019).

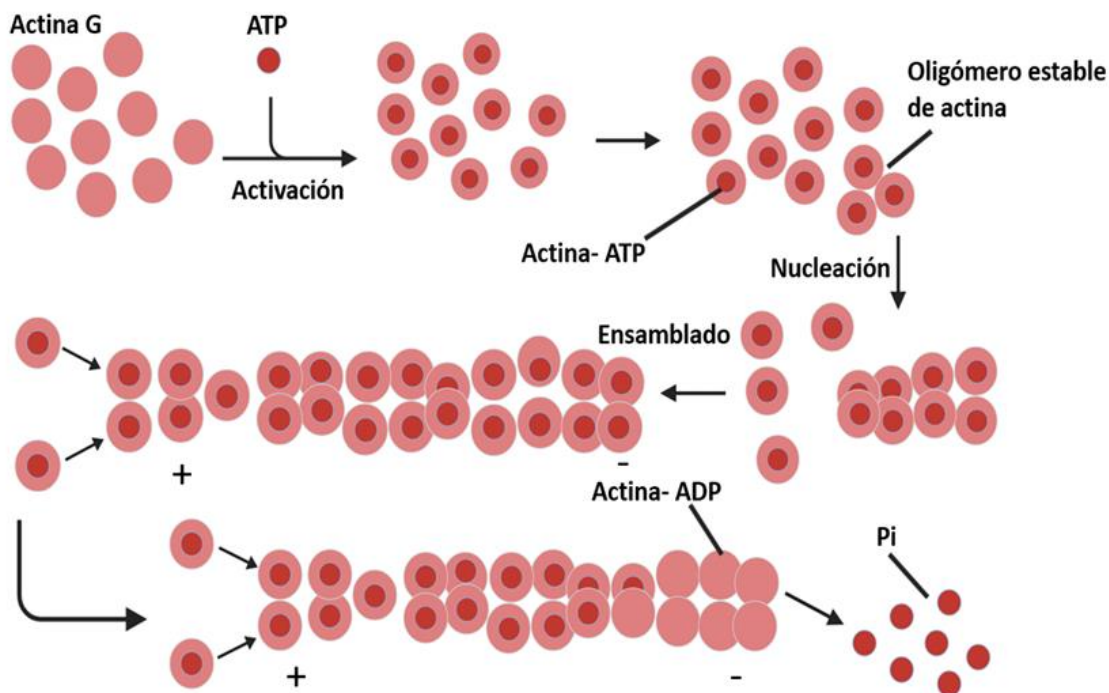


Figura 2. Estructura y ensamblado de Actina La molécula de actina posee un ion de magnesio asociado a ATP o ADP. La presencia de estos nucleótidos modifica su conformación, lo que influye en su afinidad por formar estructuras polimerizadas. Cuando el nucleótido unido es ADP, la G-actina tiende a desnaturalizarse. En condiciones adecuadas, la G-actina se une inicialmente al ATP y forma dímeros o trímeros estables, lo que permite la elongación de los filamentos mediante la adición secuencial de monómeros. Durante este proceso, la hidrólisis del ATP a ADP genera una polaridad en el filamento, distinguiéndose un extremo de crecimiento rápido (+) y otro más lento o de disociación (-). (Hohmann & Dehghani, 2019).

En los hongos filamentosos, los filamentos de actina se organizan en anillos, cables y parches que regulan procesos clave como el crecimiento apical, la citocinesis y el transporte de vesículas hacia las puntas de las hifas, permitiendo así un crecimiento polarizado efectivo. Este crecimiento polarizado es facilitado por la regulación dinámica de la actina mediante proteínas específicas como las forminas, que promueven la nucleación y el alargamiento de los filamentos, y las cofilinas, que facilitan su despolimerización. Además, el citoesqueleto de actina participa en el transporte de membranas y componentes de la pared celular en las zonas de crecimiento de las puntas de las hifas y los septos, así como en el posicionamiento de organelos como las mitocondrias y el aparato de Golgi (Chesarone & Goode, 2009; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Heath, 1990; Suelmann & Fischer, 2000; Hubbard & Kaminskyj, 2008). La interacción entre la actina y los Mts es esencial para coordinar eficientemente procesos celulares clave, como la exocitosis y la endocitosis, que son vitales para mantener la polaridad celular y la distribución correcta de orgánulos y

vesículas en la célula fúngica. Los Mts sirven como vías de transporte, guiando vesículas y proteínas hacia los extremos celulares, donde los filamentos de actina facilitan la expansión de la membrana y la pared celular. Esta colaboración es crucial para la organización espacial y funcionalidad de la célula, permitiendo que los hongos filamentosos mantengan su morfología y se adapten eficazmente a su entorno a lo largo de diferentes condiciones de crecimiento. Un claro ejemplo de esta interdependencia es el complejo de proteínas TEA, que desempeña un papel crítico en la señalización de la dirección del crecimiento. Transportadas por los Mts hasta la punta de las hifas, las proteínas TEA coordinan la organización de los filamentos de actina, asegurando el mantenimiento de la polaridad celular y el crecimiento continuo y orientado. La constante reorganización del citoesqueleto de actina, en conjunto con los Mts, permite a los hongos filamentosos adaptarse y optimizar su crecimiento en diversos ambientes (Fischer *et al.*, 2008; Steinberg, 2014).

1.1.5 Complejo TEA

Las proteínas TEA están localizadas en los sitios de crecimiento de la punta y se denominan marcadores de extremo celular. En *S. pombe*, una levadura de fisión, y *A. nidulans*, un hongo filamentos, existe evidencia del establecimiento de sitios de crecimiento polarizados mediante la entrega a través de los Mts de Tea1 y TeaA (proteínas con repeticiones kelch) (Chang & Martin, 2009; Chang & Peter, 2003; Fischer *et al.*, 2008; Riquelme *et al.*, 2018; Takeshita & Fischer, 2011; Takeshita *et al.*, 2013; Tay *et al.*, 2018). En *A. nidulans*, TeaA, es transportada hacia la punta de las hifas. Los Mts interactúan con la proteína prenitada TeaR en la membrana mediante interacciones con TeaC, una proteína con un dominio SH3 en la región N-terminal (**Figura 3**) (Higashitsuji *et al.*, 2009; Takeshita *et al.*, 2008). La interacción de las proteínas TEA en la membrana plasmática apical recluta entre otras, a la formina SepA, responsable de la polimerización y dirección de la actina. La delección del gen que codifica para *teaC* ocasionó un defecto en el crecimiento celular, manifestando un fenotipo de hifas en zig-zag y que difiere en algunos aspectos al observado en el mutante resultante de la eliminación del gen de *teaA*. Los análisis de interacción indicaron que TeaC interacciona con TeaA y SepA en la región apical de las hifas. La función de TeaC en las puntas de las hifas es similar a la de Tea4 en *S. pombe*, específicamente, el reclutamiento de SepA en la región de crecimiento, implicando así la polarización del citoesqueleto de actina (Higashitsuji *et al.*, 2009; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Takeshita *et al.*, 2013). De manera similar, MoTea4 en *Magnaporthe oryzae* parece ser necesaria para la organización adecuada de la actina durante el crecimiento polarizado de las hifas aéreas, durante el desarrollo asexual y la formación de apresorios durante el crecimiento (Patkar *et al.*, 2010). Los hallazgos de marcadores de extremo celular fueron descritos originalmente en *S. pombe*, donde Tea1, Tea3p y

Pom1p contribuyen a determinar los extremos celulares, permitiendo que la célula reubique a los Mts y el citoesqueleto de actina para mantener el orden espacial general (Chang & Martin, 2009; Chang & Peter, 2003; Niccoli *et al.*, 2003).

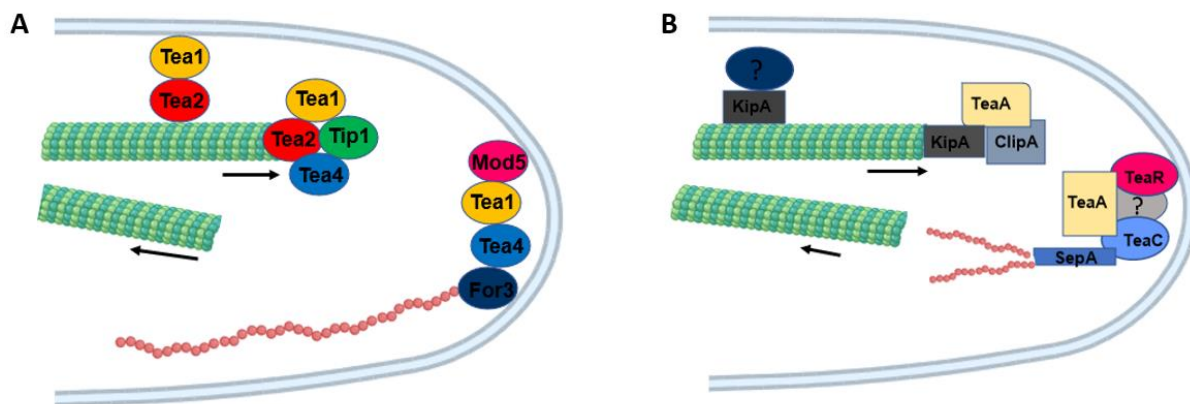


Figura 3. Modelos de la dinámica y estructura de las proteínas TEA. (A) En *S. pombe* el complejo Tea participa en el reclutamiento y soporte de proteínas que intervienen en el proceso de crecimiento polarizado. (B) *A. nidulans* el complejo Tea es necesario para mantener el crecimiento polarizado a través del reclutamiento de la formina. Modificado de Fischer *et al.*, 2008, Pérez & Rincón, 2010. La imagen fue generada con Biorender.com

En *N. crassa* se identificaron los ortólogos de las proteínas TEA, entre las que se encuentran TEA-1, homóloga de TeaA en *A. nidulans* y Tea1p en *S. pombe*; TEA-4, correspondiente a la homóloga de TeaC en *A. nidulans* y Tea4p en *S. pombe*; y TEA-5, ortóloga de TeaR en *A. nidulans* y de Mod5p en *S. pombe*. Las proteínas TEA-1-GFP y TEA-4-GFP se localizaron inicialmente como puntos brillantes en la región donde emerge el tubo germinativo y posteriormente se acumularon en la región apical de hifas maduras, evitando específicamente el Spk. Ambas proteínas también se detectaron en sitios de septación aproximadamente 2.3 minutos antes del inicio de la invaginación de la membrana plasmática, formando estructuras de doble anillo flanqueando el septo. La localización de TEA-1-GFP y TEA-4-GFP en el ápice no se vio afectada por la exposición a Benomilo y Latrunculina A, lo que sugiere un transporte independiente de Mts y actina. Por otro lado, GFP-TEA-5 mostró un patrón distinto de localización, localizando con el Spk y con vesículas marcadas con CHS-1-mCherry, lo que sugiere su transporte a través quitosomas. Además, GFP-TEA-5 se observó de forma transitoria en la membrana plasmática apical, consistente con su motivo de prenilación (sitio para el anclaje de proteínas a la membrana celular para facilitar la interacción proteína-proteína). Durante la formación del septo, GFP-TEA-5 apareció aproximadamente 4.3 minutos antes del inicio de la invaginación de la membrana y se organizó como una capa simple en el centro del

septo. A diferencia de TEA-1-GFP y TEA-4-GFP, el transporte de GFP-TEA-5 es dependiente de los Mts, ya que su acumulación apical se desorganizó en presencia de Benomilo. Las mutantes homocarión $\Delta tea-1$ y $\Delta tea-4$ fueron viables y mostraron alteraciones moderadas en su desarrollo comparadas con la cepa silvestre. Ambas presentaron una ligera reducción en la tasa de elongación y producción de biomasa. Aunque la morfología general de las hifas no se vio comprometida, se observó un incremento en la frecuencia de ramificación lateral, lo que contribuyó a la apariencia más densa de las colonias. En $\Delta tea-4$, además, se registró un aumento discreto en el diámetro de la hifa. Un efecto destacado fue la marcada reducción en la conidiación en ambas mutantes, con una disminución superior al 80%, lo que indica que TEA-1 y TEA-4 juegan un papel importante en la esporulación. En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque no son esenciales para la viabilidad, TEA-1 y TEA-4 contribuyen significativamente a la regulación del crecimiento y la morfogénesis conidial en *N. crassa*. Al realizar el análisis de la mutante $\Delta tea-5$, se determinó que fue letal en estado homocarión, no logrando su caracterización en este estado (Villavicencio *et al.*, en preparación).

1.2 Justificación

El crecimiento apical polarizado es una característica esencial de los hongos filamentosos y requiere una coordinación precisa entre el citoesqueleto, la síntesis de la pared celular, el tráfico vesicular y las proteínas que determinan la polaridad. En modelos como *S. pombe* y *A. nidulans*, el complejo TEA ha sido identificado como un marcador del extremo celular que regula tanto la organización del citoesqueleto como el crecimiento direccional. No obstante, en *N. crassa*, organismo modelo clásico en biología fúngica, el papel y la dinámica de este complejo no han sido completamente caracterizados, y aún quedan elementos clave por estudiar. Previos estudios han reportado que la pérdida de la función de proteínas ortólogas a TEA-5 no es letal en *A. nidulans* ni en *S. pombe*. Sin embargo, en *N. crassa*, el silenciamiento completo del gen impide la formación de colonias a partir de ascosporas, lo que sugiere diferencias en la organización y función entre especies. En este contexto, el presente estudio evalúa el fenotipo de la cepa $\Delta tea-5$ heterocariónica (con silenciamiento parcial) de *N. crassa*, con el objetivo de caracterizar su morfología, analizar la dinámica de proteínas asociadas al crecimiento polarizado y determinar las posibles interacciones de TEA-5 con otros complejos proteicos o proteínas esenciales para el desarrollo del hongo. Esta investigación aporta una nueva perspectiva sobre la función del complejo TEA en *N. crassa*, destacando su papel como organizador clave de la polaridad celular, más allá de su función como marcador direccional.

1.3 Hipótesis

TEA-5 es una proteína que participa en la organización apical, el mantenimiento de la polaridad y la dirección del crecimiento. Su silenciamiento parcial modifica la organización del citoesqueleto en *N. crassa*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar la función de TEA-5 en la organización apical, el mantenimiento de la polaridad, la dirección del crecimiento, así como la organización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos en *N. crassa*.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Describir el efecto de la mutación del gen *tea-5* ($\Delta tea-5^{het}$) durante el crecimiento polarizado de *N. crassa*.
- 2.- Determinar la localización y dinámica de los microtúbulos, la actina y la formina BNI-1 en la cepa $\Delta tea-5^{het}$.
- 3.- Identificar las principales proteínas asociadas a TEA-5 in vitro.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Organismos y medios de cultivo

Los organismos que se utilizaron en el presente trabajo se enlistan en la **Tabla 1**. Las cepas de *N. crassa* para su mantenimiento se cultivaron en Medio Mínimo de Vogel (MMV) con sacarosa 1.5% (p/v) y agar 1.5% (p/v) a una temperatura de 30 °C. Las cepas de *N. crassa* con genotipo *his-3 hph⁺* se crecieron en medio MMV suplementado con histidina (500 µg/mL) e higromicina (300 µg/mL).

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Organismo	Genotipo	Referencia
<i>Neurospora crassa</i>		
Tipo silvestre	<i>Mat a</i>	FGSC# 4200
9717	<i>his-3; Δmus-51:: bar⁺ mat A</i>	FGSC# 9717
9718	<i>Δmus-51:: bar⁺ mat a</i>	FGSC# 9718
<i>Δtea-5</i>	<i>mat A; Δtea-5::hph⁺::Δmus-51::bar⁺</i>	Villavicencio-Aguilar <i>et al.</i> , 2018
TEA-5-GFP	<i>his-3+; pccg-1-egfp+ tea-5; Δmus51::bar⁺</i>	Villavicencio-Aguilar <i>et al.</i> , 2018
β-Tub-GFP	<i>mat A; his-3+ pccg-1-bml-sgfp+</i>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
Cyt-GFP	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::sgfp⁺</i>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
Lifect-GFP	<i>his-3+::Pccg-1-lifect-egfp+</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010

2.2 Cruzas sexuales de *N. crassa*

Para la obtención de la cepa homocarión se realizaron cruzas sexuales de la cepa heterocarión *Δtea-5* (mat a) con la cepa FSG9717 (mat A). Para lo anterior, primero se inoculó la cepa *Δtea-5* en medio sintético de cruzas (MSC) (sacarosa al 2%, sales de MSC 1X y agar al 1.5%, Westergaard M. & K., 1947), suplementado con histidina (500 µg/mL) y se incubaron 24 h a 25 °C en oscuridad. Después se inoculó en la misma placa con conidios de la cepa FSG9717, se volvió a incubar a 25°C en oscuridad hasta notar la formación de peritecios.

2.3 Obtención de microconidios

La cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ no fue capaz de formar una colonia durante el cruce sexual. Por esta razón, se implementó una estrategia de inducción de microconidios para obtener la cepa mutante $\Delta tea-5$ homocarión, ya que estos conidios son predominantemente uninucleados. Se cultivó la cepa $\Delta tea-5^{het}$ en tubos de vidrio con 7 mL de medio Westergaard agar (KNO_3 2 g, K_2HPO_4 1.4 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1 g, NaCl 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g, 0.1 mL biotina, 0.2 mL elementos traza) suplementado con 0.1 M de yodoacetato de sodio ($C_2H_2I NaO_2$), colocados de forma inclinada, durante 12 días a 25°C. Tras la incubación, los conidios de cada tubo se suspendieron en 3 mL de agua destilada estéril y se filtraron a través de un filtro de 5 μm . El filtrado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, y los conidios se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión de conidios, se tomaron alícuotas de 50 μL y 100 μL , las cuales se sembraron en placas de cultivo con medio FIGS. Las placas se incubaron a 30°C durante dos días. Finalmente, utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12, se seleccionaron las colonias más pequeñas.

2.4 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta tea-5$

Para la caracterización de la mutante $\Delta tea-5^{het}$ se midieron los siguientes parámetros: Morfología colonial, tasa de crecimiento, tasa de ramificación, tasa de esporulación y biomasa. Todos los experimentos se realizarán por triplicado.

Para comparar los fenotipos de las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$, se utilizaron desviación estándar e intervalos de confianza del 95% como medidas de variabilidad y precisión. La desviación estándar cuantificó la dispersión de los datos dentro de cada réplica ($n=3$), mientras que los intervalos de confianza 95% determinaron la fiabilidad de las diferencias observadas entre cepas. Este enfoque garantizó robustez y claridad en la interpretación de los datos fenotípicos.

2.4.1 Morfología colonial

Las características morfológicas fueron medidas inoculando 1×10^6 conidios de las cepas $\Delta tea-5^{het}$ y el tipo silvestre (WT) FSG4200 en el centro de una caja Petri con MMV-Agar al 1.5%. Se incubaron a 30°C durante 12 y 24 horas, posteriormente se tomaron fotografías de la colonia de ambas cepas con una cámara

fotográfica CANON EOS REBEL T6.

2.4.2 Tasa de crecimiento

Para evaluar la tasa de crecimiento de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ en comparación con la WT, se llevó a cabo en cajas Petri de 150 mm con MMV-Agar al 1.5 %, se inocularon de cada cepa 1×10^6 conidios en la periferia de la caja y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Se marcó la circunferencia de la colonia cada 6 horas iniciando a las 12 horas de incubación. Se trazaron 10 transectos verticales y se midió el crecimiento en cada tiempo para cada transecto.

2.4.3 Tasa de conidiación

La tasa de conidiación se evaluó en matraces de 250 mL con 50 mL de MMV-Agar al 1.5 %, inoculando 1×10^6 conidios de las cepas $\Delta tea-5^{het}$ y WT, se incubaron a 30 °C durante 72 horas, después se expusieron a luz durante 72 horas. Posteriormente, se colectaron los conidios con sorbitol 1M en un tubo de 50 mL y se lavaron con la misma solución tres veces centrifugando a 4000 rpm durante 10 min en cada lavado. Los conidios fueron contabilizados en una cámara de Neubauer, usando diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .

2.4.4 Tasa de ramificación

Se inocularon 1×10^6 conidios de las cepas mutante $\Delta tea-5^{het}$ y WT en un extremo de cajas Petri de 90 mm x 15 mm con MMV-Agar al 1.5% y se incubaron durante 12 horas a 30 °C. Posteriormente, se tomaron fotografías del margen de la colonia con la ayuda del microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus, Japón) equipado con la cámara Optika Microscopes Italy. Se tomaron 30 hifas principales y se cuantificaron el número de ramas en una distancia de 500 μ m desde la punta de la hifa.

2.4.5 Producción de biomasa

Se inocularon 1×10^6 conidios tanto de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ como la WT en matraces de 250 mL con 50 mL de MMV líquido, se incubaron durante 72 horas a 30 °C en oscuridad y en agitación constante (150 rpm). Después de la incubación, el micelio obtenido de cada cepa se filtró al vacío con un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato y una bomba de vacío. Se utilizaron filtros de 90 mm de papel Whatman®

No. 3 previamente pesado. Los filtros con la biomasa se secaron a 37 °C y se pesaron cada hora hasta que el peso fue constante. Para determinar la biomasa en peso seco se restó el peso final menos el peso del filtro.

2.5 Fusiones vegetativas

Para poder visualizar si existen alteraciones en la dinámica del citoesqueleto microtubular (β -Tub-sGFP), de actina (Lifeact-sGFP), y la formina (BNI1-sGFP) en la cepa $\Delta tea-5^{het}$, se realizaron fusiones vegetativas. Las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente (sGFP) se recuperaron y crecieron en MMV 1.5%. Una vez recuperadas, en la periferia de una caja Petri con MMV-Agar al 1.5% se inoculó micelio de ambas cepas y se incubaron a 30°C durante 12 h. Posteriormente, por microscopía confocal se revisó el margen de la colonia hasta encontrar hifas donde la cepa mutante tuviera la expresión de fluorescencia de interés (**Figura 4**). En la **Tabla 2**, se muestran las fusiones vegetativas que se realizaron para observar la localización de proteínas fluorescentes en la cepa $\Delta tea-5^{het}$.

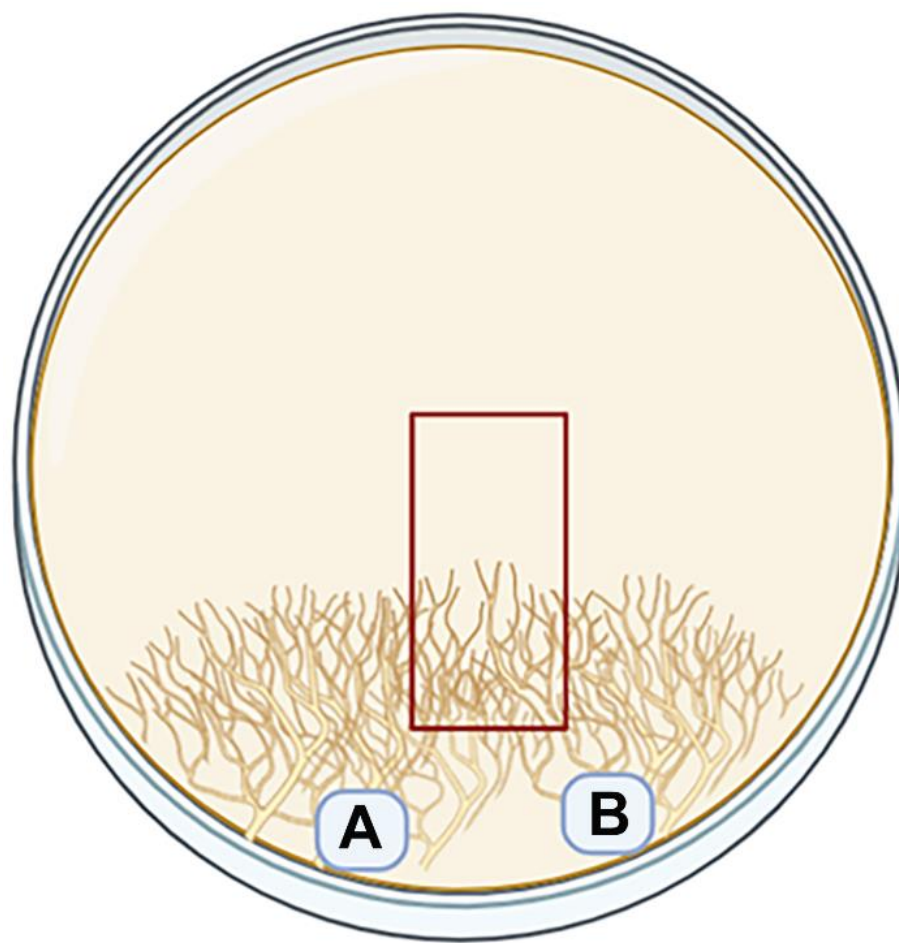


Figura 4. Esquema de las fusiones vegetativas. Se inocularon bloques de agar de las distintas cepas y se incubaron durante 12 h a 30°C. Se realizó el corte en la sección del rectángulo rojo, donde convergen ambas cepas. La imagen fue generada con Biorender.com

Tabla 2. Fusiones vegetativas realizadas en este trabajo.

Cepa A	Cepa B
$\Delta tea-5^{het}$	Lifeact-GFP
$\Delta tea-5^{het}$	β -Tub-GFP
$\Delta tea-5^{het}$	BNI-1-GFP

2.6 Microscopía confocal

Se llevo a cabo observaciones de hifas maduras de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$, WT y fusiones vegetativas utilizando microscopía confocal. Las muestras fueron manipuladas utilizando el método de bloque de agar invertido (**Figura 5**) descrito por Hickey *et al.* (2004).

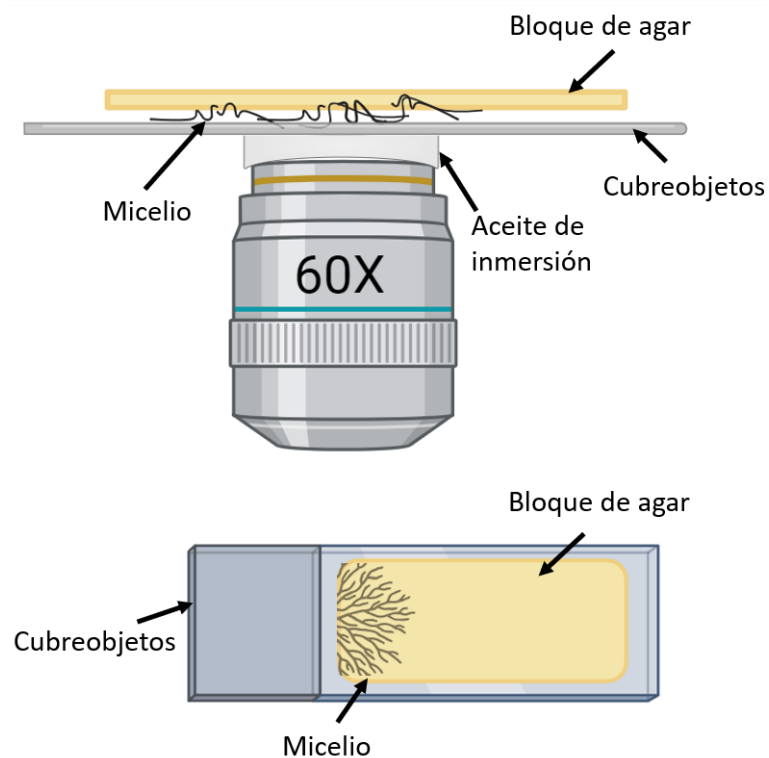


Figura 5. Técnica de agar invertido. La técnica de agar invertido consiste en cortar un fragmento de agar con micelio y colocarlo invertido sobre un cubreobjetos. Modificada de Hickey *et al.* (2004). La imagen fue generada con Biorender.com.

Las imágenes de microscopía confocal de barrido láser se adquirieron utilizando un microscopio Olympus FluoView TM FV1000 (Olympus, Japón). Para las proteínas etiquetadas con GFP, se tomaron imágenes y videos utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación a 488 nm; emisión a 520 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC), por sus siglas en inglés (Differential Interference Contrast). Se usó el objetivo 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.42 A.N.). Por otra parte, para la obtención de imágenes y videos de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ y WT tratadas con 5 μ M de FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR), colorante lipofílico que tiñe específicamente membranas, se utilizó el filtro Texas Red (excitación 543 nm; emisión 519 nm). Las imágenes fueron analizadas mediante el programa FV-10 ASW viewer (versión 4.2).

2.7 Co-inmunoprecipitación

El ensayo de Co-IP se realizó con el kit agarosa magnética de Chromotek GFP-Trap siguiendo las especificaciones del proveedor. Se utilizó como control negativo la cepa WT FSG4200 y como control positivo la cepa que expresa GFP en el citosol (Cyt-GFP). El protocolo que se utilizó fue el descrito por Espino-Vázquez *et al.* (2024) (**Figura 6**).

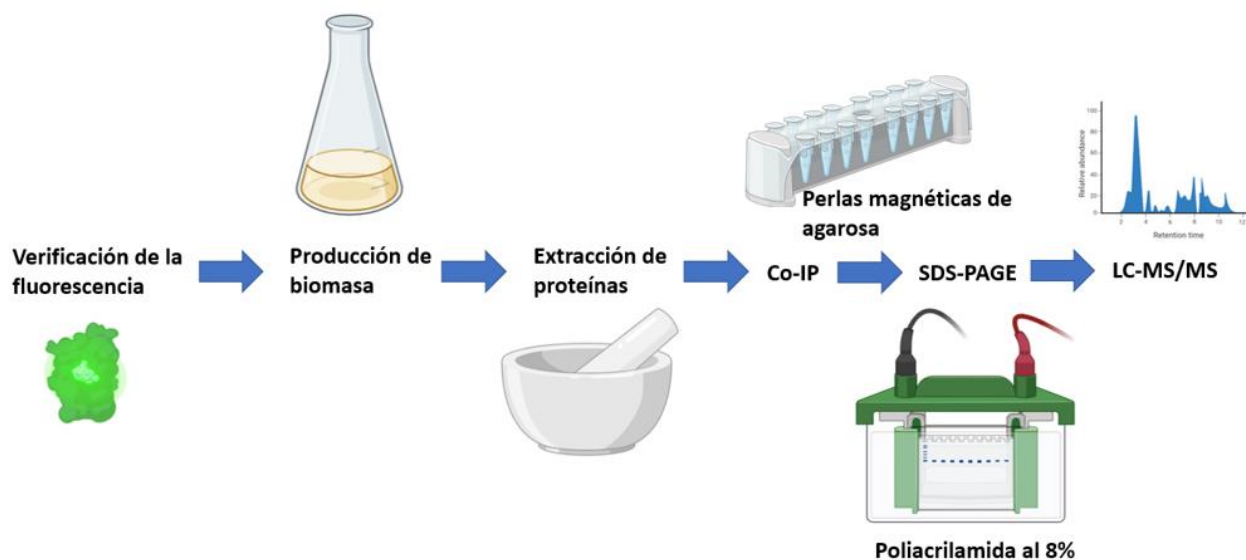


Figura 6. Protocolo Co-IP. Diagrama de flujo donde se muestran los pasos seguidos en la Co-IP. Figura modificada de Espino-Vázquez *et al.* (2024) y creada en Biorender.com.

Se verificó la fluorescencia de las distintas cepas mediante microscopía confocal. Posteriormente, se inocularon 1×10^6 de conidios en 50 mL de medio VMM líquido en matraces de 250 mL, los cuales fueron cubiertos con papel de aluminio e incubados durante tres días a 30 °C bajo agitación constante a 150 rpm. Después de la incubación, la biomasa se recolectó por filtración sobre papel de filtro Whatman® No. 3 con un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato y una bomba de vacío, sin realizar lavados, y los micelios se almacenaron a -80 °C durante 24 horas.

Los micelios fueron macerados con nitrógeno líquido en morteros estériles hasta obtener un polvo fino. La biomasa triturada se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 mL limpio y se pesó. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente al peso de la biomasa de buffer de extracción de proteínas frío (pH 7.5: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 30% glicerol, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina y cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific™). La suspensión se mezcló suavemente mediante pipeteo para minimizar el daño mecánico. El material insoluble se separó por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó con una jeringa y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.22 µm. Se prepararon alícuotas de 100 µL para evaluar la calidad y cantidad de proteínas, y los extractos crudos se almacenaron a -20 °C.

La cuantificación total de proteínas extraídas se realizó mediante el método de Bradford (Fig. 2A), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Para el análisis, se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 10%, con 1.5 mL de una solución al 40% de acrilamida/bisacrilamida, 2.6 mL de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 10 µL de APS al 10%, 10 µL de SDS al 10% y 8 µL de TEMED. Los perfiles proteicos fueron evaluados mediante electroforesis nativa (PAGE al 10%) siguiendo el protocolo descrito en (Brunelle & Green, 2014). Se mezclaron 10 µL de cada muestra con 10 µL de tampón de carga 2X para condiciones nativas, y se cargaron en el gel junto con un marcador de proteínas preteñido. Los geles fueron inicialmente revelados utilizando un filtro de fluorescencia verde (490–520 nm) para comprobar la presencia de fluorescencia. Posteriormente, se tiñeron con azul de Coomassie y se visualizaron mediante iluminación Epi-LED blanca (455–485 nm) en un sistema iBright™ CL1500.

Una vez confirmada la cantidad y calidad de los extractos, las proteínas nativas se incubaron con agarosa magnética-GFP (nanoanticuerpo monoclonal anti-GFP/VHH conjugado a perlas magnéticas de agarosa). Las perlas fueron previamente lavadas y equilibradas en el buffer de extracción, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La incubación se realizó en tubos de 1.5 mL, utilizando 1 mL de suspensión proteica (4-6 mg de proteína total) y 10-15 µL de perlas de agarosa. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche, con agitación constante en un rotador. Al finalizar, las perlas se separaron en un soporte

magnético, se retiró el sobrenadante, que fue almacenado a -20 °C, y las perlas se lavaron cuatro veces con 500 µL de buffer de lavado frío. Se guardaron alícuotas de cada lavado a 4 °C. Posteriormente, las perlas se suspendieron en 500 µL de buffer de lavado frío y se transfirieron a un tubo nuevo de 1.5 mL, seguido de una separación magnética adicional y descarte del sobrenadante. El material unido se resuspendió en 50 µL de buffer de muestra SDS 2x y se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Finalmente, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, y la elución se almacenó a 4 °C.

Se realizaron dos réplicas de los experimentos de Co-IP, que fueron analizadas en un gel SDS-PAGE al 8% y teñidas con nitrato de plata de acuerdo con el protocolo de Texas Children's Hospital (Pati, 2008). El análisis de las proteínas unidas se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, utilizando soluciones estériles y recién preparadas, así como cristales estériles para la electroforesis de gel de poliacrilamida. Las bandas del gel que contenían las muestras unidas (dos por experimento) se cortaron de manera aséptica con un bisturí y se transfirieron a tubos de centrifuga nuevos de 15 mL, con 5 mL de agua destilada estéril y se mandaron identificar por Cromatografía líquida en fase nano acoplada a espectrometría de masas en tándem (nano-LC MS/MS) a la compañía Creative Proteomics (EUA).

2.8 Análisis bioinformático

Se realizó un análisis bioinformático para establecer la ontología génica de las proteínas de *N. crassa* que interactúan físicamente con TEA-5 (NCU03667), resultantes de la Co-IP. Para lo anterior, se usó la Base de datos universal de proteínas UniProt ([The UniProt Consortium](#), 2025) para buscar las anotaciones de las proteínas identificadas. Además, se usó el análisis de enriquecimiento funcional de redes de interacción proteína-proteína String (STRING Consortium, 2025) para realizar una red de interacciones entre las distintas secuencias de proteínas (Paysan-Lafosse *et al.*, 2022).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de la cepa homocarión $\Delta tea-5$

El uso de una cepa homocarión permite evaluar con mayor precisión el efecto de la delección de un gen en el hongo, ya que todos sus núcleos contienen dicha delección. Sin embargo, estudios previos en este grupo no tuvieron éxito, debido a que la eliminación completa del gen impide la formación de colonias a partir de ascosporas. En este estudio, se intentó generar la cepa mutante homocarión $\Delta tea-5$ a partir de microconidios; no obstante, estos no lograron crecer en medio suplementado con o sin nourseotricina, antibiótico utilizado como marcador de selección para la cepa mutante. Como resultado, no fue posible obtener la cepa homocarión $\Delta tea-5$, lo que sugiere que el gen *tea-5* es esencial para *N. crassa*.

3.2 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta tea-5$

Considerando que los resultados revelaron que el gen *tea-5* es esencial para el crecimiento de *N. crassa* y que la cepa heterocarión exhibe un fenotipo alterado, se optó por analizar la morfología de la cepa mutante heterocarión con el fin de evaluar el nivel de impacto en su desarrollo. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ en comparación con WT, evaluando morfología colonial, tasa de crecimiento, producción de biomasa, esporulación y frecuencia de ramificaciones.

3.2.1 Morfología colonial

La morfología colonial de *N. crassa* se caracteriza por la formación de colonias radiales y algodonosas, cuyo patrón de crecimiento depende de la elongación polarizada de las hifas, la ramificación lateral y la diferenciación de estructuras aéreas especializadas, como los conidióforos y las hifas aéreas. Con el fin de evaluar las diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre y la cepa heterocariónica $\Delta tea-5$ ($\Delta tea-5^{het}$), se analizaron tres parámetros: morfología colonial, patrón de ramificación y formación de hifas aéreas. Tras 24 horas de incubación, la cepa $\Delta tea-5^{het}$ presentó una morfología colonial asimétrica en comparación con la cepa WT, además de una reducción en el crecimiento (**Figura 7a y b**). En el margen de la colonia se

observó un mayor número de hifas, las cuales mostraban un patrón más compacto y ondulado respecto a la cepa WT (**Figura 7c y d**). Asimismo, la cepa $\Delta tea-5^{het}$ mostró una disminución del 37% en la formación de hifas aéreas, acompañada de una reducción evidente en la esporulación (**Figura 7e y f**).

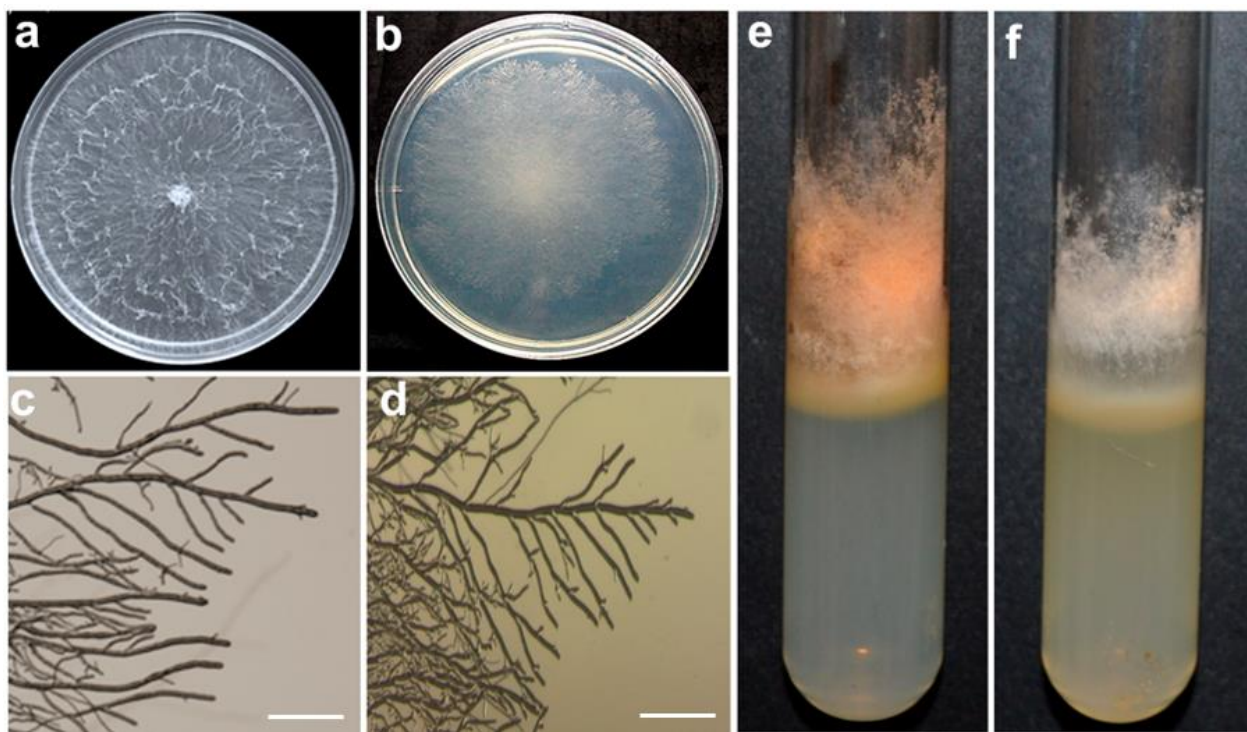


Figura 7. Morfología macroscópica de *N. crassa*. Morfología colonial de la cepa WT (a) y $\Delta tea-5^{het}$ (b) después de 24 h de crecimiento. Imágenes estereoscópicas que muestran el margen de la colonia de la cepa WT (c) y $\Delta tea-5^{het}$ (d). Barra de escala = 500 μ m. Hifas aéreas en WT y $\Delta tea-5^{het}$ después de cinco días de crecimiento a 30°C (e y f).

3.2.2 Tasa de crecimiento y producción de biomasa

En hongos filamentosos, la tasa de crecimiento (generalmente medida como la expansión diaria del frente de la colonia en medios sólidos) refleja la capacidad de las hifas para elongarse y ramificarse, procesos dependientes de la síntesis coordinada de pared celular, transporte vesicular y disponibilidad de nutrientes. Después de observar que la cepa $\Delta tea-5^{het}$ mostró una diferencia en la morfología colonial en comparación con la cepa WT, se evaluó el crecimiento radial y la producción de biomasa. La cepa $\Delta tea-5^{het}$ tuvo una disminución del 42% en la tasa crecimiento en comparación con la cepa WT (**Figura 8 A**). Aunado a esto, también se observó en la cepa mutante una disminución en la producción de biomasa de aproximadamente un 57% en comparación con la cepa WT después de 72 h de crecimiento en medio líquido (**Figura 8 B**).

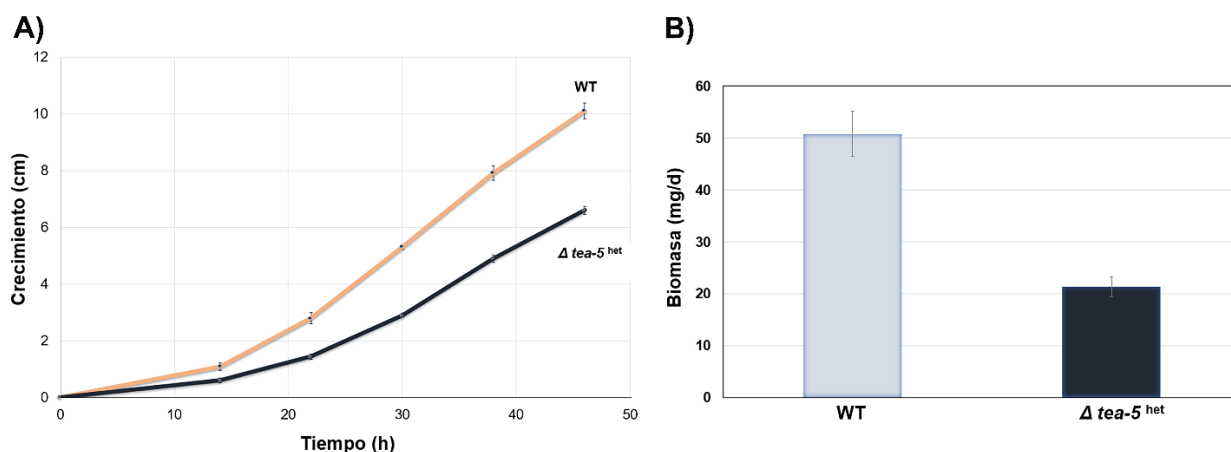


Figura 8. Crecimiento y producción de biomasa en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. A) Crecimiento radial medido en centímetros a lo largo de 48 horas. B) Producción promedio de biomasa en miligramos por día. Barras de error muestran el Intervalo de confianza al 95% A) y el error estándar B)

3.2.3 Tasa de conidiación y ramificación

La tasa de conidiación representa la capacidad del hongo para reproducirse asexualmente y colonizar nuevos sustratos, y está determinada por la diferenciación de estructuras especializadas conocidas como conidióforos. Por su parte, la ramificación hifal define la arquitectura del micelio, así como su eficiencia para explorar el entorno y absorber nutrientes. Con el fin de analizar con mayor detalle cómo la pérdida parcial del gen *tea-5* afecta el desarrollo fúngico, se evaluaron, además de los parámetros previamente descritos, la conidiación y la ramificación de las hifas. La cepa $\Delta tea-5^{het}$ presentó una disminución del 68 % en la producción de conidios en comparación con la cepa WT (**Figura 9A**). Asimismo, se observó un incremento de 1.6 veces en la ramificación apical dentro de los primeros 500 μm de hifa en la cepa $\Delta tea-5^{het}$, en comparación con la cepa WT (**Figura 9B**).

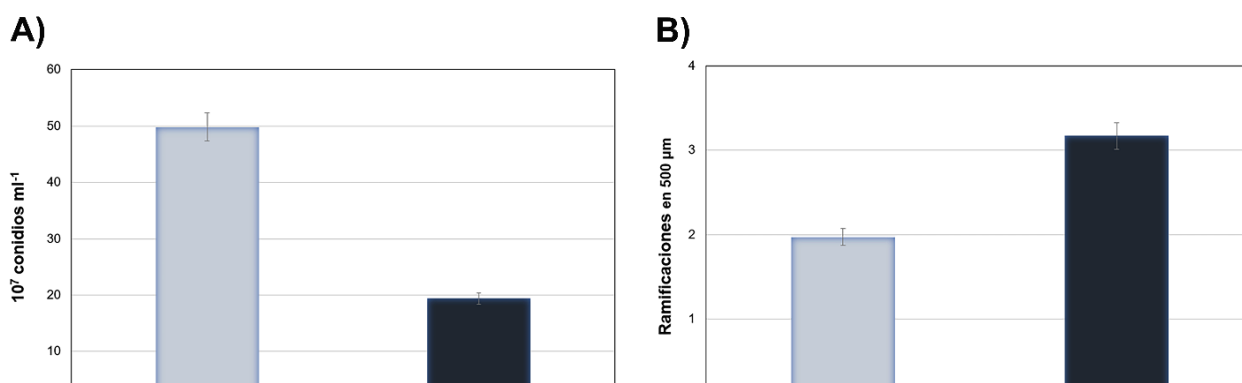


Figura 9. Tasa de ramificación y conidiación de las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. A) Promedio de ramas dentro de los 500 μm n=30. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%. B) Promedio de conidios producidos por la cepa WT y mutante. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

Otro efecto notable observado en los análisis microscópicos de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$ fue que sus hifas presentaban un grosor ligeramente menor en comparación con la cepa silvestre. Para confirmar esta diferencia, se midieron los diámetros de 23 hifas de cada cepa. La comparación entre ambas cepas (**Figura 10**) reveló que la mutante $\Delta tea-5^{het}$ presentaba un diámetro promedio de 8.2 μm , mientras que la cepa WT alcanzó un promedio de 11.4 μm , lo que representa una reducción del 28% en el grosor de las hifas de la mutante.

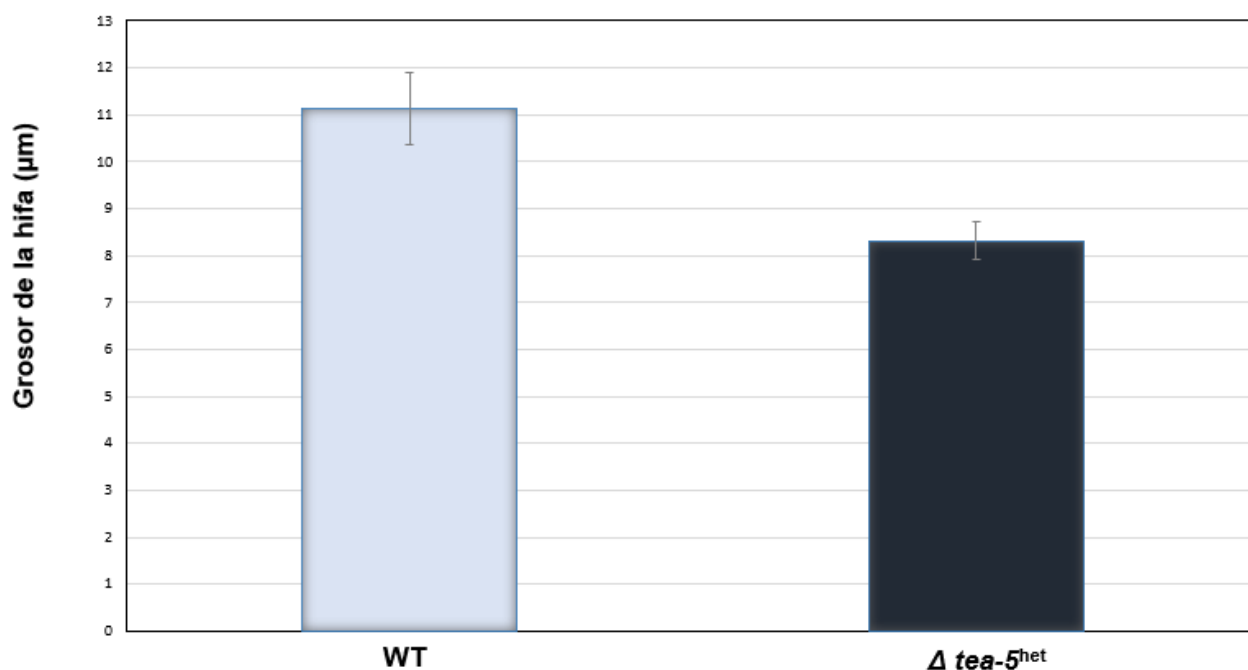


Figura 10. Grosor de la hifa en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. Se cuantificó el grosor de 23 hifas tanto de la cepa mutante como la silvestre, midiendo el diámetro en la región apical aproximadamente a 20 μm de la punta de la hifa. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

3.2.4 Dinámica del Spitzenkörper en la mutante $\Delta tea-5^{het}$.

Para analizar con mayor detalle el crecimiento polarizado en hifas maduras de la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$, se evaluó la organización apical mediante la tinción del Spk con el fluoróforo FM4-64, un colorante lipofílico fluorescente que se une selectivamente a las membranas celulares debido a su afinidad por los lípidos. Este fluoróforo marca inicialmente la membrana plasmática y, posteriormente, es internalizado por endocitosis, permitiendo la visualización de macro y microvesículas que conforman el Spk. A través de series de tiempo obtenidas por microscopía confocal de barrido láser, se observó que las hifas de la cepa $\Delta tea-5^{het}$ presentaban una morfología aberrante, caracterizada por una forma más curvada y un diámetro reducido en comparación con la WT. Durante la extensión de la hifa, el Spk mostró variaciones

notables en su posición apical, lo que resultó en cambios en la dirección del crecimiento. Además, se detectó un ensanchamiento en la región apical que precedía a eventos de ramificación (Figura 11). Estos resultados sugieren que la interrupción parcial de la función del gen *tea-5* compromete la estabilidad del Spk, provocando alteraciones en la trayectoria del crecimiento apical de la hifa.

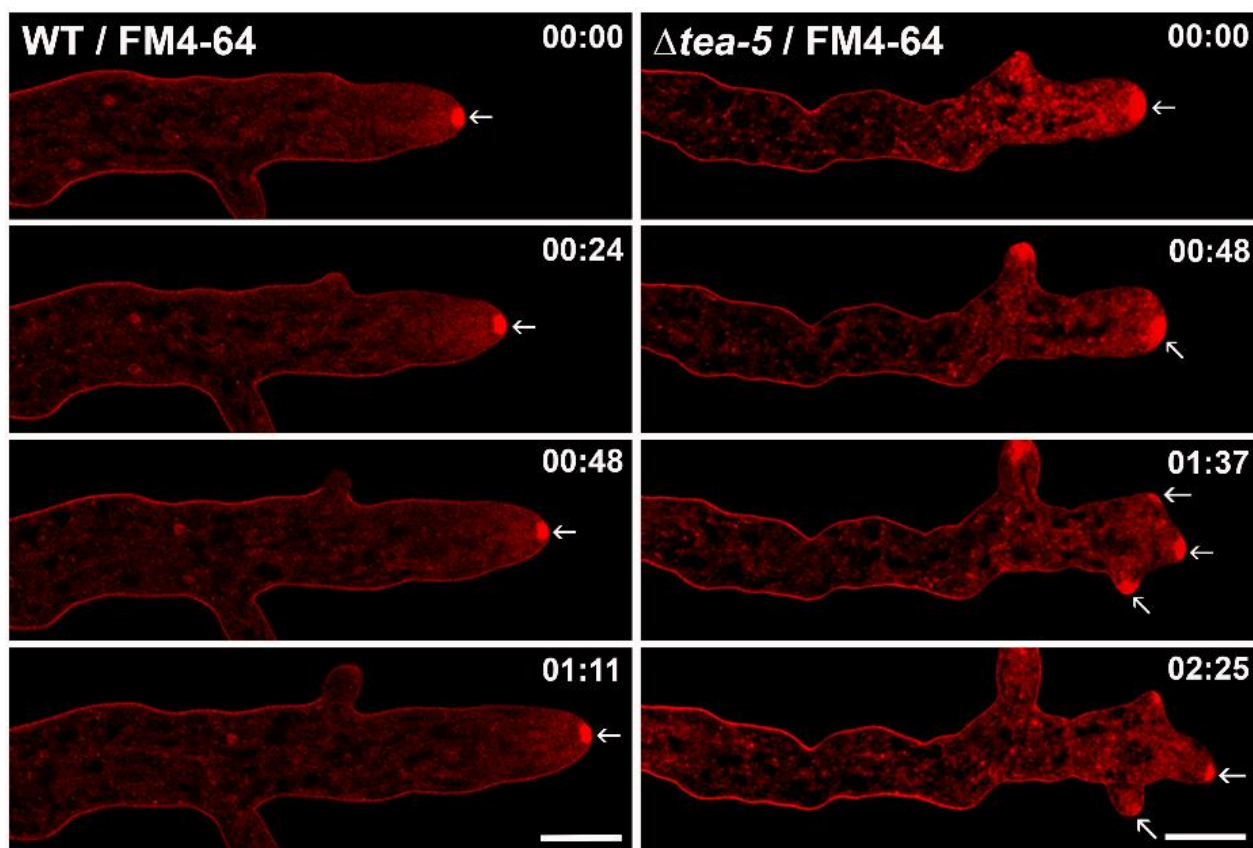


Figura 11. Dinámica del Spk en la mutante $\Delta tea-5^{het}$. Serie tiempo de imágenes confocales de hifas maduras que muestran la dinámica del Spk en las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$. Membranas teñidas con el colorante FM4-64. Las flechas indican la inestabilidad del Spk en la cepa mutante en comparación con el WT. Barra de escala = 10 μ m.

3.2.5 Dinámica del citoesqueleto microtubular y de actina en la cepa mutante

$\Delta tea-5^{het}$

Se sabe que el transporte de componentes celulares a larga distancia es mediado por los Mts, los cuales, al igual que los filamentos de actina, son esenciales para el crecimiento polarizado. En *S. pombe*, se ha descrito que una de las proteínas transportadas por esta vía hacia la región apical de la célula es Tea1p, una reguladora clave de la polaridad y la forma celular. Posteriormente, Mod5p, homólogo de TEA-5 en *N. crassa* y proteína de membrana, interactúa con Tea1p para mantenerla localizada en la membrana apical.

Tea1p forma además un complejo con Tea4p, y finalmente, el complejo Mod5p–Tea1p–Tea4p interactúa con la formina For3, estabilizándola y promoviendo así la polimerización de los filamentos de actina.

Para evaluar si la delección parcial del gen *tea-5* afecta la organización del citoesqueleto, se realizaron ensayos de microscopia confocal en cepas de *N. crassa* que expresan proteínas fluorescentes específicas. Para analizar los Mts, se utilizó una cepa que expresa β -Tubulin-sGFP, la cual fue fusionada vegetativamente con la mutante $\Delta tea-5^{het}$. Las imágenes de series de tiempo revelaron que la delección parcial de *tea-5* induce alteraciones leves en la arquitectura microtubular, observándose cúmulos de haces de Mts más gruesos en ciertas regiones de la hifa, así como una dirección de crecimiento alterada y un desplazamiento más lento en comparación con la cepa silvestre (Figura 12).

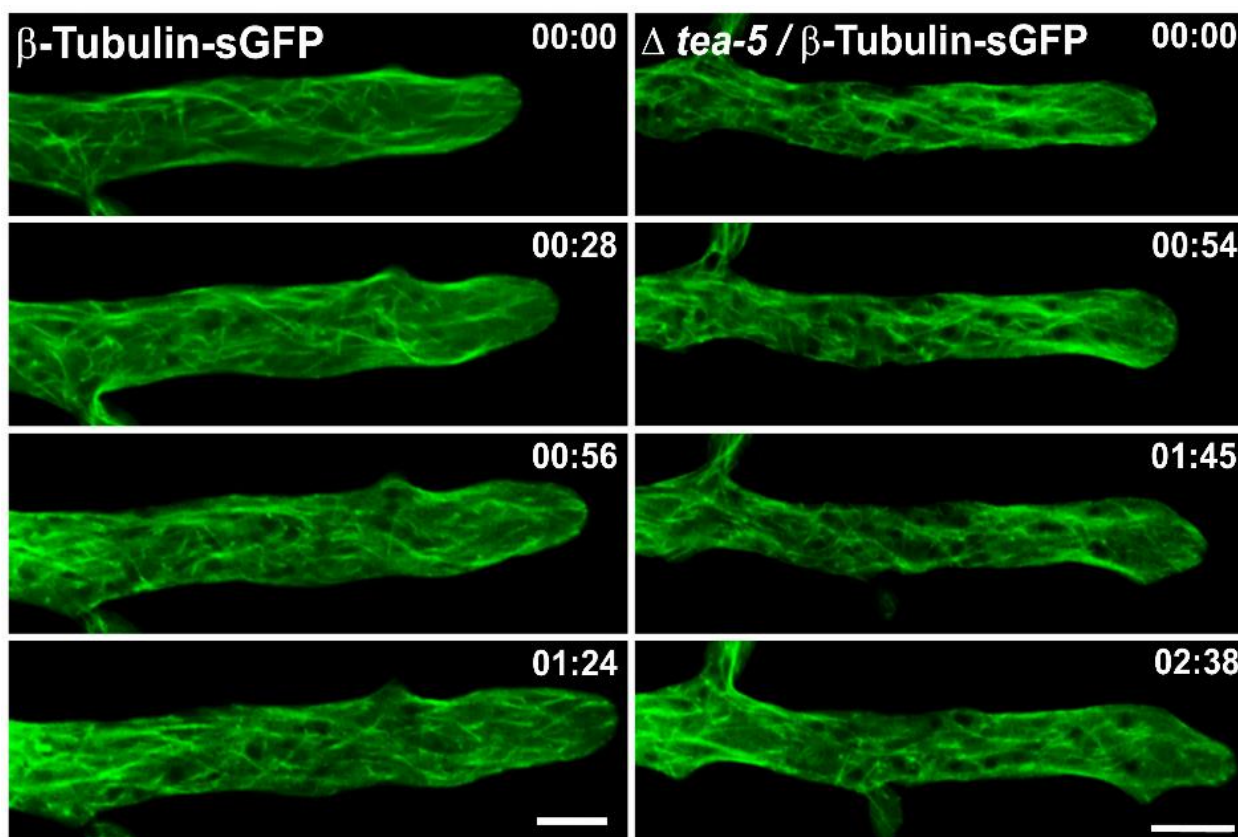


Figura 12. Micrografías confocales de las cepas WT y $\Delta tea-5^{het}$ con β -Tubulin-sGFP. Serie temporal de imágenes confocales de hifas maduras que expresan β -Tubulin-sGFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Barra de escala = 10 μ m.

Por otra parte, para analizar la organización de la actina, se empleó la cepa Lifeact-sGFP, la cual expresa un reportero que decora los filamentos de actina. Esta cepa fue igualmente fusionada vegetativamente con la mutante $\Delta tea-5^{het}$ y analizada mediante microscopía confocal. Se observaron defectos en la dinámica de la actina en la cepa mutante, particularmente en el Spk, donde la señal de actina aparecía y desaparecía de forma intermitente. Además, tanto los filamentos como los parches de actina mostraron

una posición inestable a lo largo del tiempo (Figura 13), lo que sugiere un impacto en la organización y mantenimiento del citoesqueleto de actina debido a la alteración del complejo TEA.

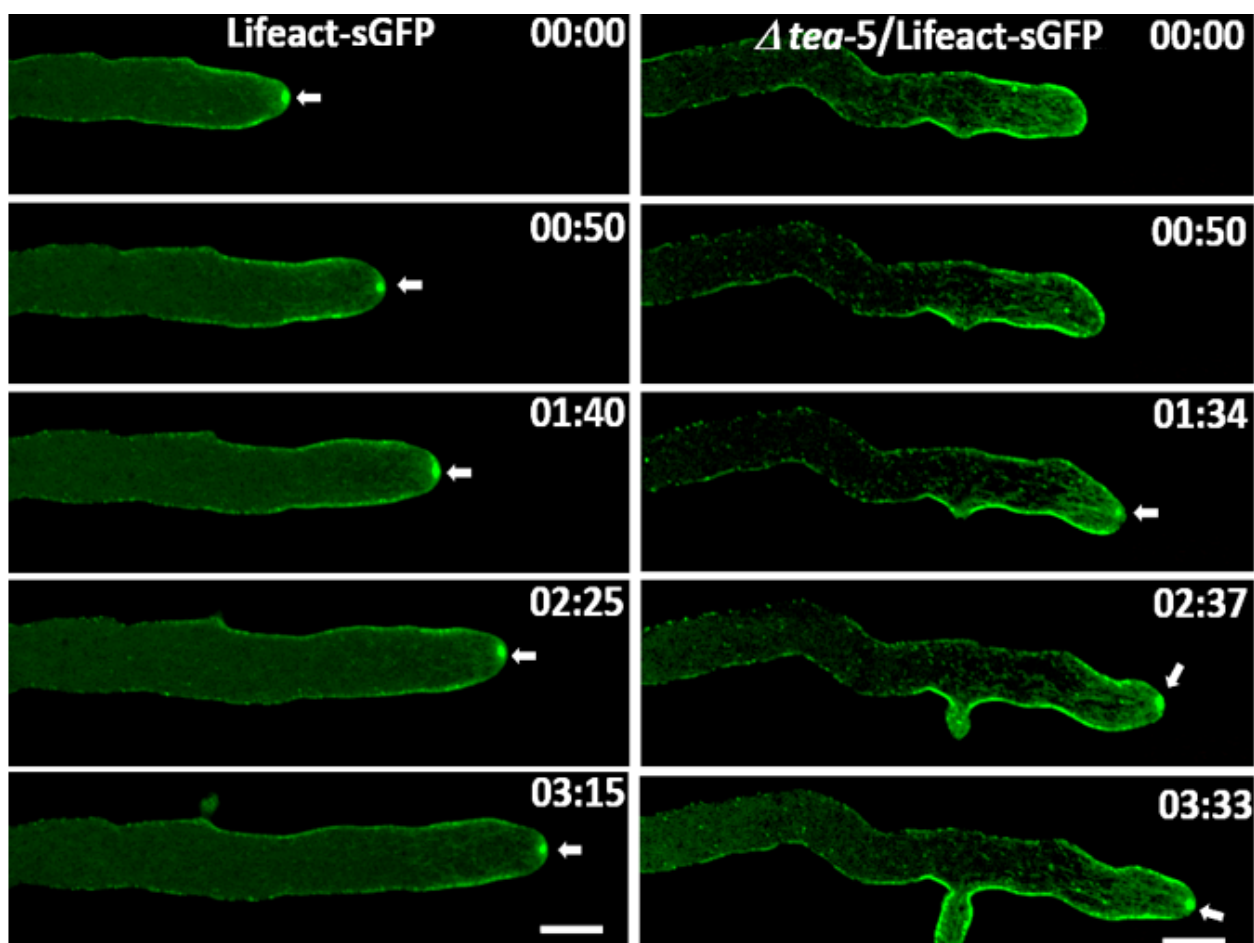


Figura 13. Dinámica del citoesqueleto de actina. Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas maduras que expresan Lifeact-sGFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Las flechas blancas indican la inestabilidad de la actina que se encuentra en el Spk. Barra de escala = 10 μ m.

3.2.6 Dinámica de la formina BNI-1 en la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$

Las forminas son proteínas conservadas que actúan como nucleadores de actina y promueven la elongación de filamentos lineales de actina (F-actina), procesos fundamentales para el mantenimiento de la polaridad celular. En *N. crassa*, la formina BNI-1 se localiza en la región apical de las hifas, donde participa en la organización del citoesqueleto de actina en el Spk y en la zona subapical. Como se mencionó previamente, en otros organismos se ha descrito que el complejo TEA interactúa con la formina para estabilizarla. Por esta razón, se expresó BNI-1-GFP en la cepa mutante $\Delta tea-5^{het}$, observándose una ligera

alteración en su dinámica y localización (**Figura 14**). Estos resultados sugieren que BNI-1 no está siendo correctamente reclutada al ápice de la hifa, posiblemente debido a la pérdida parcial de su receptor, en este caso TEA-4. La delección parcial de *tea-5* podría estar afectando la correcta localización de TEA-4, lo que a su vez impide el posicionamiento adecuado de BNI-1.

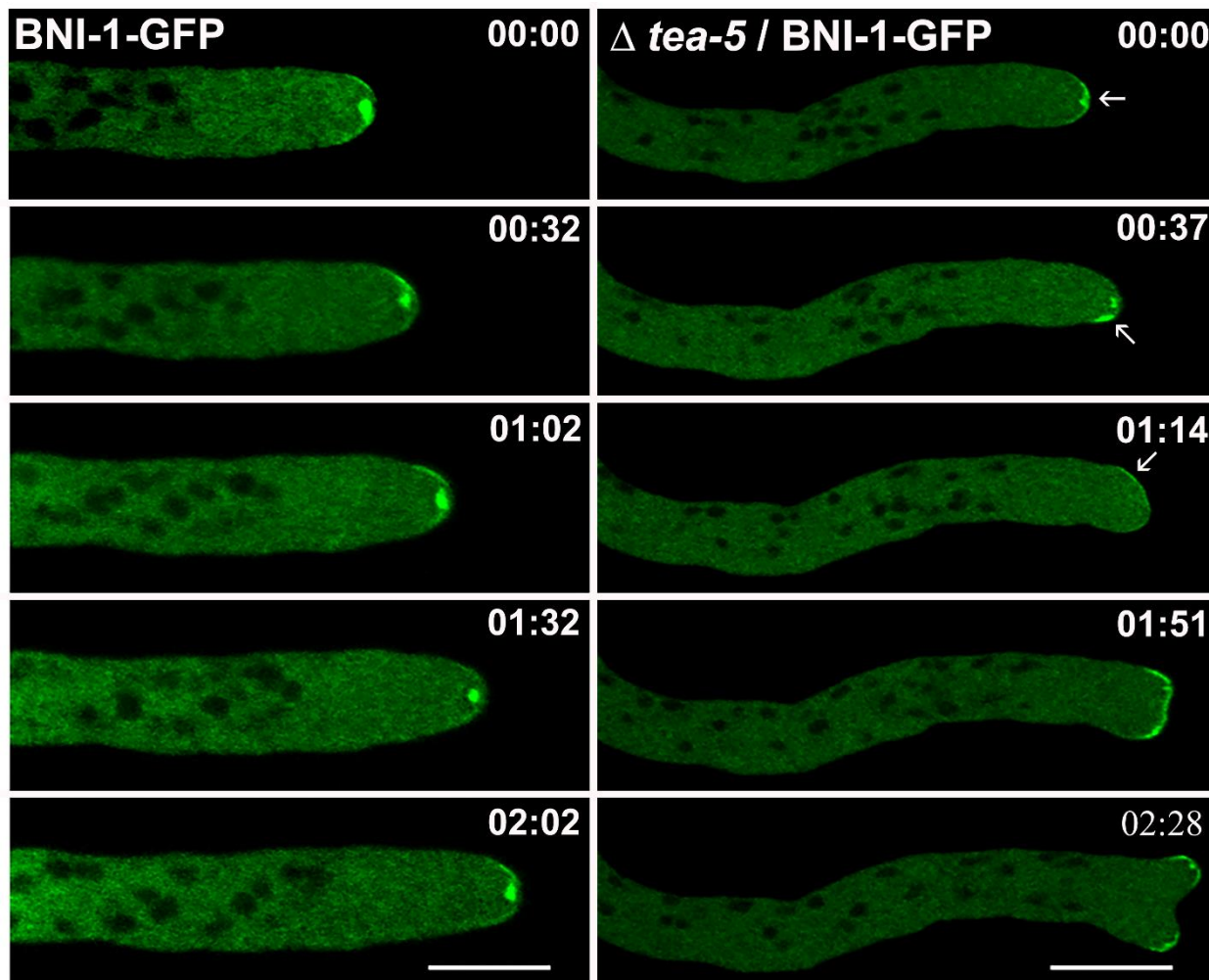


Figura 14. Dinámica de la formina BNI-1 en el fondo mutante $\Delta tea-5^{het}$. Serie tiempos de imágenes confocales de hifas maduras que expresan BNI-1-GFP en la cepa WT y $\Delta tea-5^{het}$. Las flechas blancas nos indican la inestabilidad de BNI-1 durante el crecimiento de la hifa en la cepa mutante. Barra de escala = 10 μ m.

3.3 Determinación de proteínas asociadas a TEA-5 por Co-IP

Con el objetivo de identificar las proteínas que interactúan con TEA-5 y que pudieran estar implicadas en el crecimiento polarizado de *N. crassa*, se realizaron ensayos de Co-IP utilizando cepas que expresan TEA-5 fusionada a GFP. El análisis incluyó controles positivos como la expresión citosólica de la GFP (Cyt-GFP) y negativos (cepa WT sin fusión GFP). Tras la inmunoprecipitación, las proteínas recuperadas fueron

separadas por SDS-PAGE al 8% (**Figura 15**) y posteriormente enviadas para identificación por nano-LC MS/MS.

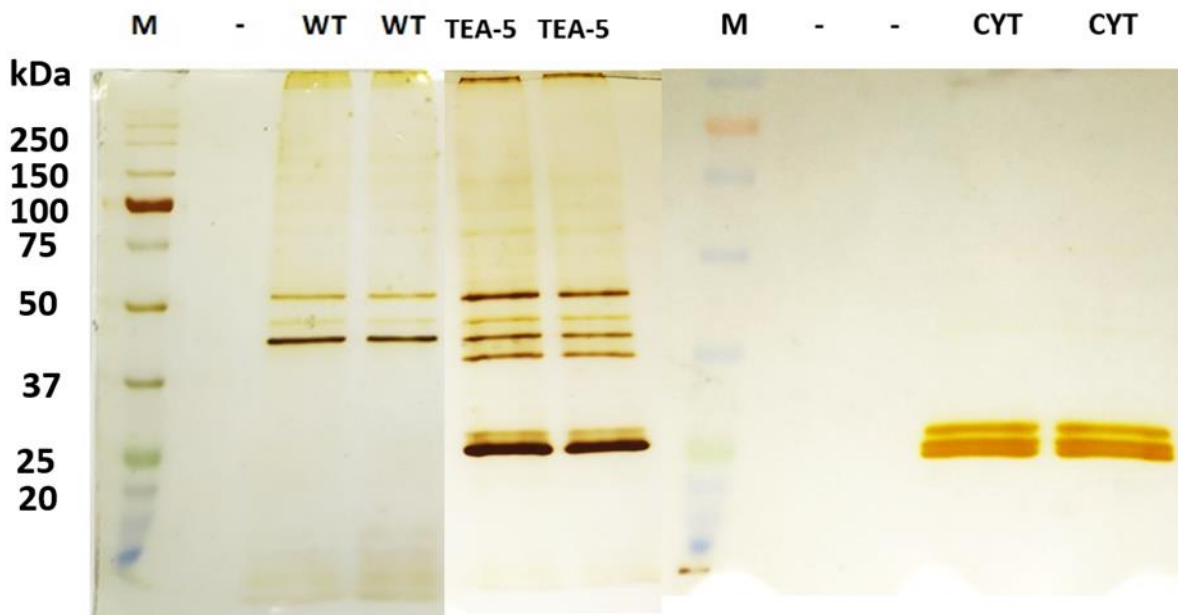


Figura 15. Electroforesis de los productos de co-inmunoprecipitación. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% teñido con nitrato de plata de la Co-IP de TEA-5-sGFP. M = marcador de peso molecular, WT= tipo silvestre, CYT= sGFP citoplasmática, TEA-5= TEA-5-sGFP.

3.3.1 Análisis bioinformático

Se encontraron un total de 339 proteínas co-inmunoprecipitadas a la GFP-TEA-5, de las cuales, después de compararlas con los controles (WT y Cyt-GFP), quedaron en total 119 proteínas candidatas, incluyendo miembros previamente descritos del complejo TEA (TEA-1, TEA-4 y TEA-5), así como proteínas involucradas en el tráfico vesicular, la organización del citoesqueleto y la síntesis de pared celular (**Tabla 3**). Del total, 58 proteínas fueron eliminadas del análisis, al detectarse tanto en las muestras experimentales como en los controles (posibles falsos positivos). Treinta y tres proteínas se consideraron presuntamente asociadas (presentes en ambos experimentos, pero en cantidades diferenciales), mientras que 7 proteínas se identificaron exclusivamente en las muestras experimentales, por lo que se clasificaron como positivos.

Entre las proteínas más relevantes detectadas se encuentra la flippasa P4-ATPasa, cuya interacción con TEA-5 sugiere un papel en el mantenimiento de la distribución asimétrica de fosfolípidos. Además, se identificó la proteína de membrana TVP-18 del aparato de Golgi y una proteína con dominio MARVEL, ambas implicadas en el tráfico vesicular y en el transporte retrógrado de endosomas al Golgi.

Asimismo, se detectó la interacción entre TEA-5 y enzimas clave en la biogénesis de la pared celular. Destacan la 1,3- β -glucano sintasa (GS-1) y múltiples quitinasas, entre ellas CHS-1, CHS-3 y CHS-5. Mientras que CHS-1 había sido previamente asociada al complejo TEA en estudios anteriores, CHS-3 y CHS-5 fueron identificadas exclusivamente en este análisis de TEA-5, lo que sugiere una posible interacción específica. Estas enzimas se localizan comúnmente en el Spk y en septos en desarrollo, lo que refuerza la idea de que TEA-5 participa en la regulación de la síntesis de la pared celular durante el crecimiento apical.

Estos hallazgos respaldan la propuesta de que TEA-5 desempeña un papel central en la coordinación del crecimiento polarizado en *N. crassa*. Su función parece integrar múltiples procesos celulares, ya que participa tanto en el reclutamiento de proteínas clave para la síntesis de la pared celular como en la regulación del tráfico vesicular y la organización del citoesqueleto. La observación de que TEA-5 se acumula en el Spk, que presenta una rápida dinámica y depende del transporte mediado por Mts, sugiere que esta proteína podría actuar como un nodo regulador que asegura la entrega precisa de componentes esenciales a la zona de crecimiento activo. Su probable transporte en vesículas tipo quitosoma refuerza la idea de que TEA-5 está directamente implicada en el direccionamiento espacial de estructuras y maquinaria asociadas al crecimiento apical en hongos filamentosos.

Tabla 3. Proteínas y sus funciones resultantes de la Co-IP de la proteína TEA-5.

UniProt ID	Proteína	Nombre	Función
P29070	CHS-1	Quitina sintasa 1	Sintetizan quitina en hifas y esporas
P30588	CHS-3	Quitina sintasa 3	Sintetizan quitina en hifas y esporas
Q01285	CHS-4	Quitina sintasa 4	participan en la formación de septos y reparación de la pared celular
Q7RVP6	CHS-5	Quitina sintasa 5	participan en la formación de septos y reparación de la pared celular
Q7S0A7	1,3-beta-glucan synthase	1,3- β -glucano sintasa	Da estructura y resistencia a la pared celular
Q7S693	TVP-18	Proteína de membrana del aparato de Golgi	Trafico vesicular
Q7RXM4	crn	Coronina	Endocitosis y regulación de los filamentos de actina en la zona apical
P33723	Ypt1	Proteína Rab Ypt1	Actúa en la formación de vacuolas autofágicas (en el RE especializado) y en el reciclado de proteínas membranales

Capítulo 4. Discusión

El crecimiento polarizado es un proceso central en hongos filamentosos, y su regulación depende de la integración entre el tráfico vesicular, el citoesqueleto y la síntesis de pared celular. En *N. crassa*, esta polaridad direccional es esencial para la elongación hifal, y su mantenimiento requiere un complejo ensamblaje de factores estructurales y reguladores (Riquelme *et al.*, 2018; Harris *et al.*, 2005). Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la proteína TEA-5 tiene un papel fundamental en la regulación de este crecimiento polarizado. La caracterización de la cepa heterocarión $\Delta tea-5$ reveló defectos fenotípicos severos, incluyendo disminución en la tasa de crecimiento, producción de biomasa, formación de conidios y alteraciones morfológicas en las hifas. Además, se observó una desorganización del citoesqueleto de actina y Mts, así como un Spk pequeño e inestable, lo que sugiere que TEA-5 es crítica para la organización del crecimiento en el ápice.

Estudios previos han demostrado que las proteínas del complejo TEA participan en la localización de forminas y otras proteínas asociadas al citoesqueleto en *S. pombe* y *A. nidulans* (Mata & Nurse, 1997; Martin *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2008; Takeshita *et al.*, 2013). En *S. pombe*, Tea1 se transporta hacia los polos de crecimiento a través de Mts y se ancla a la membrana mediante la interacción con Mod5, actuando como marcador de polaridad. Tea4, por su parte, forma parte del mismo complejo y es necesaria para la localización de la formina For3p en los sitios de crecimiento apical. En *N. crassa*, se ha reportado que TEA-5 colocaliza con el Spk y depende del sistema de Mts para su transporte, además de estar ausente en mutantes tratadas con benomilo, lo que refuerza su asociación con el citoesqueleto microtubular (Villavicencio-Aguilar *et al.*, en preparación).

Un hallazgo notable de nuestro estudio es que la delección del gen *tea-5* en *N. crassa* resulta letal, en contraste con lo observado en otras especies fúngicas. Por ejemplo, en *S. pombe*, la eliminación de *mod5* interfiere con la localización de proteínas de polaridad celular como Tea1p, lo que provoca defectos morfológicos, pero no afecta la viabilidad (Snaith & Sawin, 2003). De manera similar, en *A. nidulans*, la delección de *teaA* o *teaR* provoca que las hifas crezcan en patrones aberrantes, pero el organismo sigue siendo viable (Takeshita *et al.*, 2013; Takeshita & Fischer, 2011). Esta diferencia marcada sugiere que en *N. crassa*, TEA-5 desempeña un papel central y no redundante en la coordinación de procesos esenciales, específicamente en la entrega apical de vesículas, la síntesis de la pared celular y la organización del citoesqueleto. Los datos de Co-IP mostraron que TEA-5 interactúa directamente con enzimas críticas para la construcción de la pared celular (sintasas de quitina, sintasa de β -1,3-glucano) y con proteínas del

aparato de Golgi asociadas al transporte vesicular. Se propone que, a diferencia de otros hongos donde otras proteínas relacionadas podrían compensar su función, TEA-5 en *N. crassa* integra múltiples vías indispensables para el crecimiento polarizado. La interrupción simultánea del tráfico vesicular, el establecimiento de la polaridad y el remodelado de la pared celular probablemente sobrepasa un umbral de viabilidad, conduciendo a la letalidad. Esto refleja una divergencia evolutiva en la que *N. crassa* parece carecer de mecanismos redundantes para esta función, lo que convierte a TEA-5 en una proteína tanto única como esencial.

La localización de la formina BNI-1-GFP en la cepa $\Delta tea-5^{het}$ de *N. crassa* revela que la ausencia de TEA-5 provoca una pérdida de estabilidad en su distribución apical. En comparación con el patrón puntual, estable y persistente observado en la cepa silvestre (Lichius *et al.*, 2012), en $\Delta tea-5^{het}$ se evidencian fluctuaciones dinámicas, desplazamientos laterales e incluso eventos de deslocalización de BNI-1. Estos resultados sugieren que TEA-5 cumple una función esencial en el anclaje en dominios específicos de la membrana apical, facilitando la localización precisa de BNI-1 y, por ende, su actividad como nucleador de filamentos de actina durante el crecimiento polarizado. La pérdida de esta interacción funcional puede explicar algunos de los fenotipos característicos observados en la cepa $\Delta tea-5^{het}$, como el incremento en la frecuencia de ramificación, la pérdida de direccionalidad hifal y la alteración de la morfología.

En ausencia de un anclaje adecuado, BNI-1 no logra organizar eficazmente la red de actina en el ápice, lo que impacta directamente en la orientación y continuidad del crecimiento polarizado. Dado que las forminas son responsables de la nucleación y elongación de filamentos de actina en la región subapical, su localización precisa es crítica para la estabilidad del eje de crecimiento (Riquelme *et al.*, 2018). Estos hallazgos también apoyan la idea de que en *N. crassa* existe un acoplamiento más estrecho y específico entre TEA-5 y BNI-1 en comparación con otros hongos filamentosos. Por ejemplo, en *A. nidulans*, aunque la formina SepA también se localiza en la región apical, su dependencia funcional respecto a TeaR es parcial, lo que sugiere la existencia de mecanismos compensatorios o rutas paralelas que aseguran su posicionamiento (Higashitsuji *et al.*, 2009). En contraste, en *N. crassa*, la deslocalización parcial de BNI-1 en ausencia de TEA-5 indica una interacción más estricta, posiblemente resultado de una especialización evolutiva orientada a garantizar un control más fino y preciso del crecimiento polarizado.

Los ensayos de Co-IP permitieron identificar un grupo de proteínas interactuantes con TEA-5. Entre ellas, destacan componentes del tráfico vesicular, como la flippasa P4-ATPasa, involucrada en la distribución asimétrica de fosfolípidos (Pomorski *et al.*, 2003), y la proteína de membrana del Golgi TVP-18, relacionada

con el transporte retrógrado (Inadome *et al.*, 2006). También se identificaron proteínas con dominio MARVEL, que participan en la organización de membranas y tráfico intracelular ((Douglas *et al.*, 2013)

Como se mencionó antes, la interacción de TEA-5 con enzimas de síntesis de pared celular, como CHS-1, CHS-3 y CHS-5, es especialmente relevante. Estas quitinasas se localizan en el núcleo del Spk y en los septos, y son responsables de la síntesis de quitina, uno de los componentes principales de la pared celular fúngica (Fajardo-Somera *et al.*, 2015; Merzendorfer, 2011). La identificación de CHS-3 y CHS-5 exclusivamente en las muestras de TEA-5 sugiere una posible especificidad funcional en el reclutamiento de distintos tipos de quitosomas. Además, se identificaron interacciones con Ypt1, una GTPasa Rab que regula el tráfico vesicular y la autofagia (Gershon *et al.*, 1995). Esto sugiere que TEA-5 no solo participa en la entrega de vesículas, sino también en la organización de la maquinaria intracelular de crecimiento.

En conjunto, estos hallazgos posicionan a TEA-5 como un componente clave del Spk y del crecimiento polarizado. Su dinámica, su transporte dependiente de Mts y su asociación con proteínas implicadas en síntesis de pared celular y tráfico vesicular sugieren que TEA-5 actúa como un integrador funcional entre estos sistemas. Futuras investigaciones podrían centrarse en la identificación de dominios funcionales dentro de TEA-5 responsables de estas interacciones, y en explorar su conservación funcional en otros hongos filamentosos.

Capítulo 5. Conclusiones

La delección del gen *tea-5* en *N. crassa* es letal, lo que indica que TEA-5 cumple una función esencial y no redundante en esta especie, a diferencia de otros hongos filamentosos como *A. nidulans* o *S. pombe*.

El análisis del heterocarión $\Delta tea-5$ reveló alteraciones en la morfología de las hifas, disminución de la tasa de crecimiento, incremento en la frecuencia de ramificación y desorganización del Spk, indicando defecto en la polaridad celular y crecimiento.

La delección parcial de **TEA-5** compromete la organización y el mantenimiento del citoesqueleto microtubular y de actina, además de provocar la deslocalización de la formina BNI-1. Este efecto probablemente se debe a que la falta de TEA-5 altera la localización correcta de **TEA-4**, lo que impide el posicionamiento adecuado de BNI-1, dificulta la nucleación de los filamentos de actina por BNI-1.

Los experimentos de Co-IP permitieron identificar potenciales proteínas asociadas a TEA-5 involucradas en el tráfico vesicular (flippasas, proteínas de Golgi), la síntesis de pared celular (CHS-1, CHS-3, CHS-5, glucano sintasa) y el citoesqueleto (Ypt1).

La función indispensable de TEA-5 en *N. crassa* sugiere una especialización evolutiva que refuerza el control del crecimiento polarizado.

Literatura citada

- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 309-322. <https://doi.org/10.1038/nrm2369>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.
- Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., & Castro-Longoria, E. (2011). Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PLOS ONE*, 6(11), e27148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027148>
- Bartnicki-García, S. (2002). Hyphal tip growth: Outstanding questions. In H. Osiewacz (Ed.), *Molecular Biology of Fungal Development* (pp 29-58). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203910719>
- Bateman, A., Martin, M., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S., Bowler-Barnett, E. H., Bye-A-Jee, H., Carpentier, D., Denny, P., Fan, J., Garmiri, P., Da Costa Gonzales, L. J., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Joshi, V., Jyothi, D., Zhang, J. (2024). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609-D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods In Enzymology On CD-ROM/Methods In Enzymology*, 151-159. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00012-4>
- Chang, F., & Martin, S. G. (2009). Shaping Fission Yeast with Microtubules. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 1(1), a001347. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001347>
- Chang, F., & Peter, M. (2003). Yeasts make their mark. *Nature Cell Biology*, 5(4), 294-299. <https://doi.org/10.1038/ncb0403-294>
- Chesarone, M. A., & Goode, B. L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current Opinion In Cell Biology*, 21(1), 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.001>
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., & Mouriño-Pérez, R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics And Biology*, 47(7), 573-586. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.004>
- Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 13(1), 83-117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>
- Espino-Vázquez, A. N., Cota, R. R., Callejas-Negrete, O. A., Fischer, R., & Mouriño-Pérez, R. R. (2024). Protein interactors of Spindle Pole Body (SPB) components and septal proteins in fungus *Neurospora crassa*: A mass spectrometry-based dataset. *Data In Brief*, 52, 109980. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109980>

- 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>
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., & Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6963), 147-153. <https://doi.org/10.1038/nature02085>
- Fischer, R., Zekert, N., & Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, 68(4), 813-826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U., & Read, N. D. (2004). GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics And Biology*, 41(10), 897-910. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.06.008>
- Harris, S. D. (2006). Cell Polarity in Filamentous Fungi: Shaping the Mold. *International Review Of Cytology*, 41-77. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(06\)51002-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(06)51002-2)
- Harris, S. D., & Momany, M. (2003). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics And Biology*, 41(4), 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.11.007>
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., & Momany, M. (2005). Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 225-229. <https://doi.org/10.1128/ec.4.2.225-229.2005>
- Hasek, J., & Bartnicki-Garcia, S. (1994). The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Archives Of Microbiology*, 161(5), 363-369. <https://doi.org/10.1007/bf00288945>
- Tip Growth In Plant and Fungal Cells. (1990). *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-07359-8>
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N., & Fischer, R. (2009). The Cell End Marker Protein TeaC Is Involved in Growth Directionality and Septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 8(7), 957-967. <https://doi.org/10.1128/ec.00251-08>
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton—A complex interacting meshwork. *Cells*, 8(4), 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>
- Howard, J., & Hyman, A. A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933), 753-758. <https://doi.org/10.1038/nature01600>
- Hubbard, M. A., & Kaminskyj, S. G. W. (2008). Rapid tip-directed movement of Golgi equivalents in growing *Aspergillus nidulans* hyphae suggests a mechanism for delivery of growth-related materials. *Microbiology*, 154(5), 1544-1553. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014811-0>
- Jiang, K., & Akhmanova, A. (2010). Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Current Opinion In Cell Biology*, 23(1), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.008>

- Inadome, H., Noda, Y., Kamimura, Y., Adachi, H., & Yoda, K. (2006). Tvp38, Tvp23, Tvp18 and Tvp15: Novel membrane proteins in the Tlg2-containing Golgi/endosome compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research*, 313(4), 688-697. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.008>
- Lichius, A., Yáñez-Gutiérrez, M. E., Read, N. D., & Castro-Longoria, E. (2012). Comparative Live-Cell Imaging Analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* Reveal Novel Features of the Filamentous Fungal Polarisome. *PLoS ONE*, 7(1), e30372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030372>
- Maiato, H., Rieder, C. L., & Khodjakov, A. (2004). Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *The Journal Of Cell Biology*, 167(5), 831-840. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407090>
- Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R., & Chang, F. (2005). Tea4p Links Microtubule Plus Ends with the Formin For3p in the Establishment of Cell Polarity. *Developmental Cell*, 8(4), 479-491. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.008>
- Mata, J., & Nurse, P. (1997). tea1 and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell*, 89(6), 939-949. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80279-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80279-2)
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal Of Cell Biology*, 90(9), 759-769. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.014>
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., & Akhmanova, A. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal Of Cell Biology*, 168(1), 141-153. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405094>
- Mitchison, T., & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991), 237-242. <https://doi.org/10.1038/312237a0>
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion In Microbiology*, 5(6), 580-585. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00368-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00368-5)
- Mouriño-Pérez, R. R., Roberson, R. W., & Bartnicki-García, S. (2006). Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics And Biology*, 43(6), 389-400. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.10.007>
- Niccoli, T., Arellano, M., & Nurse, P. (2003). Role of TEA1P, TEA3P and POM1P in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 20(16), 1349-1358. <https://doi.org/10.1002/yea.1054>
- Pati, D. (2008). Silver staining of protein gels. Texas Children's Hospital. <https://www.texaschildrens.org/sites/default/files/pictures/departments/Cancer/pati-silver-staining.pdf>
- Patkar, R. N., Suresh, A., & Naqvi, N. I. (2010). MoTea4-Mediated Polarized Growth Is Essential for Proper Asexual Development and Pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Eukaryotic Cell*, 9(7), 1029-1038. <https://doi.org/10.1128/ec.00292-09>

- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., Bateman, A. (2022). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Perez, P., & Rincón, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochemical Journal*, 426(3), 243-253. <https://doi.org/10.1042/bj20091823>
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., Van Meer, G., & Holthuis, J. C. M. (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p Are Required for Phospholipid Translocation across the Yeast Plasma Membrane and Serve a Role in Endocytosis. *Molecular Biology Of The Cell*, 14(3), 1240-1254. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0501>
- Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., Der, C. J., & Balch, W. E. (1991). Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *The Journal Of Cell Biology*, 115(1), 31-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.31>
- Ramos-García, S. L., Roberson, R. W., Freitag, M., Bartnicki-García, S., & Mouriño-Pérez, R. R. (2009). Cytoplasmic Bulk Flow Propels Nuclei in Mature Hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1880-1890. <https://doi.org/10.1128/ec.00062-09>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 82(2), 8-17, e00068. <https://doi.org/10.1128/membr.00068-17>
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., & Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology Of The Cell*, 25(8), 1312-1326. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-06-0299>
- Riquelme, M., & Sánchez-León, E. (2014). The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion In Microbiology*, 20, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.003>
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., & Bartnicki-García, S. (1998). What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genetics And Biology*, 24(1-2), 101-109. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1074>
- Douglas, L. M., Wang, H. X., & Konopka, J. B. (2013). The MARVEL Domain Protein Nce102 Regulates Actin Organization and Invasive Growth of *Candida albicans*. *mBio*, 4(6), 3-13, e00723. <https://doi.org/10.1128/mbio.00723-13>
- Snaith, H. A., & Sawin, K. E. (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature*, 423(6940), 647-651. <https://doi.org/10.1038/nature01672>
- Schwamborn, J. C., & Püschel, A. W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience*, 7(9), 923-929. <https://doi.org/10.1038/nn1295>

- Steinberg, G. (2014). Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Current Opinion In Microbiology*, 20, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.001>
- Suelmann, R., & Fischer, R. (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motility And The Cytoskeleton*, 45(1), 42-50. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(200001\)45:1<42::AID-CM4>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(200001)45:1<42::AID-CM4>3.0.CO;2-C)
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2022). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2008). The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology Of The Cell*, 19(4), 1439-1449. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0464>
- Takeshita, N. (2016). Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, 80(9), 1693-1699. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1179092>
- Takeshita, N., & Fischer, R. (2011). On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*, 115(6), 506-517. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.009>
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S., & Fischer, R. (2007). Apical Sterol-rich Membranes Are Essential for Localizing Cell End Markers That Determine Growth Directionality in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology Of The Cell*, 19(1), 339-351. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-06-0523>
- Takeshita, N., Mania, D., De Vega, S. H., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G. U., Podolski, M., Howard, J., & Fischer, R. (2013). The cell end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* for polarity maintenance. *Journal Of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.129841>
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., De Vega, S. H., & Fischer, R. (2014). Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Current Opinion In Microbiology*, 20, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.005>
- Tay, Y. D., Leda, M., Goryachev, A. B., & Sawin, K. E. (2018). Local and global Cdc42 guanine nucleotide exchange factors for fission yeast cell polarity are coordinated by microtubules and the Tea1–Tea4–Pom1 axis. *Journal Of Cell Science*, 131(14). <https://doi.org/10.1242/jcs.216580>
- Vale, R. D. (2003). The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell*, 112(4), 467-480. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00111-9)
- 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>

- Villavicencio-Aguilar F., Callejas-Negrete O. A., Mouriño-Pérez, R. R. (2018). Role of the TEA proteins during polarized growth in *Neurospora crassa* [Manuscrito en preparación]. Departamento de microbiología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Westergaard, M., & Mitchell, H. K. (1947). *Neurospora* v. a synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal Of Botany*, 34(10), 573-577. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1947.tb13032.x>