

Tesis defendida por
Rosa Aurelia Fajardo Somera
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García
Miembro del Comité

Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias de la
Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Octubre del 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**Programa de Posgrado en Ciencias
de la Vida con orientación en Microbiología**

Tráfico vesicular de las proteínas quitina sintasas y ATPasa de H⁺ de
membrana plasmática durante el crecimiento de *Neurospora crassa*

Tesis

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

Presenta:

Rosa Aurelia Fajardo Somera

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Rosa Aurelia Fajardo Somera, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Tráfico vesicular de las proteínas quitina sintasas y la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática durante el crecimiento de *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Las hifas de los hongos filamentosos son células tubulares a través de las cuales viajan vesículas secretoras, que se acumulan temporalmente en el Spitzenkörper (SPK) antes de fusionarse con la membrana plasmática (MP), dónde aportan enzimas y material necesario para sintetizar la pared celular. A su vez, bombas de H⁺ membranales contribuyen a generar un potencial de membrana que es utilizado para el cotransporte de nutrientes hacia el interior de la célula. Las rutas secretoras encargadas de dirigir estas proteínas clave en la morfogénesis fúngica son prácticamente desconocidas. El objetivo de este trabajo fue elucidar el tráfico de las quitina sintasas (CHS) clases II, IV, V y VII, y de la ATPasa de H⁺, PMA-1 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Para ello las proteínas fueron etiquetadas con la proteína verde fluorescente (GFP) usando la técnica de “Split-marker”. Se observaron todas las CHS en el centro del SPK y en septos en formación. Mediante microscopía de TIRF, se observaron quitosomas conteniendo CHS-5-GFP (con un dominio motor tipo miosina amino terminal) en movimiento a lo largo de cables de actina. La Latrunculina A impidió la acumulación de CHS-4, CHS-5 y CHS-7 en el SPK, lo cual respalda la participación de los cables de actina en el transporte de CHS. Asimismo, para investigar el papel de la proteína motora miosina de clase V en el tráfico de CHS, se co-expresó CHS-1-mChFP y MYO-2Δdil-GFP. La llegada de ambas proteínas al SPK sugirió que la CHS-1 se transporta independientemente de MYO-2. La coimmunoprecipitación de CHS-1, CHS-4 y CHS-5 etiquetadas con GFP utilizando GFP-TRAP® y espectrometría de masas permitió identificar varias proteínas putativas asociadas, posiblemente con un papel en la regulación de la secreción y actividad de las CHS; éstas incluyen CSR-4, una serina proteasa, una cinasa de homoserina, y también proteínas implicadas en el tráfico vesicular, tales como SEC-10 y SEC-14. Para estudiar el papel de cada CHS durante las diferentes etapas del desarrollo se analizaron cepas mutantes con los genes *chs* delecionados. Las *chs-6* y *chs-7* tienen un papel importante en el crecimiento vegetativo; *chs-5* y *chs-7* en la reproducción asexual; y *chs-7* y *chs-3* en la formación de estructuras sexuales. Todo ello sugiere que hay diferentes poblaciones de quitosomas, cada una conteniendo una clase de CHS, con funciones específicas durante las diferentes etapas de desarrollo. Por otro lado se caracterizó el tráfico y reparto de PMA-1. En conidios la PMA-1-GFP se distribuyó de manera uniforme en la MP. En tubos germinativos, la fluorescencia se observó a lo largo del tubo germinativo y fue menos intensa o ausente en la punta. En hifas, la PMA-1-GFP se localizó en la MP en las regiones distales y en septos ya formados, pero no en la punta, indicativo de una ruta secretora distinta a la seguida por las CHS e independiente del SPK. Análisis de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sugirieron que la PMA-1-GFP que se incorpora a la MP, proviene de una fuente principalmente del citoplasma, y en mucho menor grado de la difusión lateral de las regiones adyacentes de la MP. Al añadir Brefeldina A (BFA), un inhibidor que bloquea la ruta de secreción RE-Golgi, desapareció la fluorescencia de las endomembranas tubulares localizadas en regiones apicales, sugiriendo un papel de éstas en el reciclaje de la proteína. Después de una exposición prolongada a BFA, la PMA-1-GFP se empezó a acumular en cuerpos de Brefeldina. El análisis de FRAP en vacuolas globulares en hifas tratadas con BFA reveló que el reciclaje endosomal fue bloqueado por el inhibidor BFA. Se sugiere que las CHS y la PMA-1 siguen diferentes rutas de secreción. Las vesículas que contienen PMA-1 son incorporadas directamente a la MP lejos

de la ruta de secreción principal de proteínas de MP que viajan con el torrente de vesículas que se acumulan en la SPK antes de ser fusionadas en la MP de la región apical diferencia de las CHS, las cuales se concentran en el núcleo del SPK previa incorporación a la MP.

Palabras clave: **Tráfico vesicular, rutas de secreción, quitina sintasas, PMA-1, Spitzenkörper.**

Abstract of the thesis presented by Rosa Aurelia Fajardo Somera as a partial requirement to obtain the Doctor of Science in Life Sciences degree in Microbiology.

Vesicular traffic of chitin synthases and the plasma membrane H⁺ ATPase during growth in *Neurospora crassa*.

Abstract approved by:

Meritxell Riquelme Pérez PhD.

Hyphae of filamentous fungi are tubular cells along inside which secretory vesicles travel to temporarily accumulate at the Spitzenkörper (SPK) before moving to and fusing with the plasma membrane (PM) to provide material and enzymes needed to synthesize the cell wall. Membrane H⁺ pumps generate a membrane potential used for the co-transport of nutrients into the cell. The secretory pathways responsible for sorting these key fungal morphogenesis related proteins are virtually unknown. The main goal of this study was to elucidate the vesicular traffic of CHS classes II, IV, V and VII and PMA-1, a PM H⁺-ATPase, in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. All CHS were found at the core of the SPK and in forming septa. By total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) analysis putative particles presumably chitosomes containing CHS-5-GFP were revealed moving along wavy tracks, presumably actin cables. Latrunculin A prevented the accumulation of CHS-4, CHS-5 and CHS-7 in the SPK, supporting the participation of actin cables in the transport of CHSs. In addition, to investigate whether myosin motors are involved in the traffic of CHS, CHS-1-mChFP and MYO-2 Δ dil-GFP (Class V) were co-expressed. Arrival of both proteins to the SPK suggested that CHS-1 is transported independently of MYO-2. Coimmunoprecipitation experiments using GFP-TRAP® and mass spectrometry for strains expressing GFP-tagged CHS-1, CHS-4 and CHS-5 were carried out; several putative CHS interacting proteins were identified, including CSR-4, a serine protease, a homoserine kinase, α -tubulin and also proteins involved in traffic such as SEC-10 and SEC-14. Knock out mutants for each *chs* were analyzed to study the role of each CHS during different developmental stages. Both, *chs-6* and *chs-7* exhibited an important role in vegetative growth; *chs-5* and *chs-7* were important during asexual reproduction; and *chs-7* and *chs-3* had a significant role during formation of sexual structures. These results suggest that there are different populations of chitosomes, each containing a class of CHS with specific roles during different developmental stages. Additionally, the traffic and delivery of PMA-1 were examined. In conidia, PMA-1-GFP was evenly distributed along the PM. During germ tube emergence and elongation, PMA-1-GFP was found all around the conidial PM and extended to the germ tube PM, but fluorescence was less intense or almost absent at the tip. In mature hyphae, PMA-1-GFP localized at the PM at distal regions (>120 μ m) and in completely developed septa, but not at the tip, indicative of a distinct secretory route independent of the SPK occurring behind the apex. FRAP analysis revealed that the source of PMA-1-GFP newly incorporated to the PM, comes from source primarily the cytoplasm, whereas lateral diffusion from adjacent PM regions did not contribute significantly in the recovery of fluorescence in bleached areas. Brefeldin A (BFA), an inhibitor of the classical ER-to-Golgi secretory pathway, caused the disappearance of PMA-1-GFP found at tubular endomembranes in hyphal subapical regions, suggesting a role of these tubular endomembranes in protein recycling. Upon prolonged exposure to BFA, PMA-1-GFP started to accumulate in putative Brefeldin bodies. FRAP analysis of globular vacuoles in hyphae treated with BFA indicated that the endosomal recycling route was blocked by BFA. Finally, all the results suggested that CHS and PMA-1 take different secretory pathways. PMA-1-containing vesicles are incorporated directly into the PM away from the main secretory route for plasma membrane proteins that travel with the torrent of

vesicles that accumulate in the SPK before being discharged into the apical plasma membrane, whereas CHS are concentrated in the core of the SPK before they are incorporated into the PM.

Keywords: Vesicular traffic, secretory pathway, chitin synthases, PMA-1, Spitzenkörper.

Dedicatoria

A esas personitas que no estaban cuando empecé mi doctorado, pero han sido parte de él, dando la satisfacción de su nacimiento y haciendo que la familia crezca más. A mis sobrinos hermosos, Angela, Gael y Sofía que me han alegrado los días.

Agradecimientos

La realización de este proyecto fue posible gracias a la beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; número de becario **176643**). Al consorcio Alemania-México (DFG-CONACyT), por el apoyo otorgado a mi proyecto durante mi estancia académica en Alemania. Gracias además al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE) por todo el apoyo otorgado.

Un profundo agradecimiento a los miembros de mi comité de tesis que durante todo mi doctorado me ayudaron con sus comentarios, críticas, etc., para que pudiera llevar a cabo mi formación, fue un gran honor para mí haber tenido en mi comité a grandes sinodales. Dr. Bartnicki-García, Dr. Herrera-Estrella, Dra. Mouriño-Pérez.

A mi directora de tesis Dra. Meritxell Riquelme, no tengo palabras para describir el profundo agradecimiento que tengo hacia ella. Primero por haber aceptarme como su alumna lo cual es un privilegio para mí. Por todo lo que me enseñó, cosas que nunca había visto y que siempre me motivo para seguir en esto. Por todos los momentos que se tomó para escucharme en mis momentos de crisis y guiarme para salir de ellos.

A mis Papas que toda mi vida han estado conmigo, siempre apoyándome en todas las etapas de mi vida, dándome fortaleza para seguir, gracias!!!

Liz, Diana, Adán, mis hermanos por su apoyo y comprensión, manitos!!!

A mis mejores amigas (Edith, Bren, Sandy,) que aunque estuvieron lejos, siempre nos mantuvimos muy cerca y así seguiremos.

A mis grandes compañeros y mejores amigos, Adry y Jovani que hicieron mi estancia más amena, con quienes compartí los buenos y malos momentos del lab. Sonora-Sinaloa hermanos!!

A todos mis compañeros del grupo de Riquelme, que han sido varios durante toda mi etapa del doctorado, de los cuales aprendí muchísimo y todavía sigo aprendiendo gracias. Eddy, Adry, Jovani, Leonora, Lluvia, Adria, Rebeca, Yazmint.

Al grupito selecto de niñas (Leonora, Lluvia, Adria), que han hecho pasar momentos muy agradables, hasta cuando no estoy con ellas seguimos estando juntas (Whatsup), por eso nunca me sentí sola.

A mi roomie de toda mi vida de posgrado, Olga Callejas, por su compañía y apoyo durante todos estos años.

Al técnico Guillermo González, por el apoyo con los equipos cuando estos no funcionaban y regañarme por no usar la bata.

A todo el Departamento de Microbiología, con los que compartí clases, lab y horas de relax (Diego Delgado).

A los guardias de seguridad, Don Pedro y Don Manuel, por su apoyo con los experimentos nocturnos.

Contenido

Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
Capítulo1 Introducción	1
1.1 Hongos filamentosos.....	1
1.1.1 Rutas secretoras en hongos.....	2
1.1.1.1 Tráfico vesicular.....	2
1.1.1.2 Ruta de secreción convencional.....	4
1.1.1.3 Rutas de secreción no convencional.....	4
1.2 Crecimiento apical.....	6
1.2.1 Pared celular en hongos.....	6
1.2.1.1 Modelos de la incorporación de nuevo material a la pared celular (modelos Bartnicki-García y Wessels).....	7
1.2.1.2 Un componente primordial en la pared celular de hongos: “Quitina”.....	7
1.2.2 Síntesis de quitina.....	8
1.2.3 Quitina sintasas.....	9
1.2.3.1 Estructura y clasificación.....	9
1.2.3.2 Función y localización de las quitinas sintasas.....	11
1.2.3.3 Tráfico y regulación de las CHS en hongos.....	13
1.3 Obtención de nutrientes en células fúngicas.....	15
1.3.1 Corrientes eléctricas y gradientes electroquímicos.....	15
1.3.2 La familia de ATPasas tipo P.....	16
1.3.2.1 La ATPasa-H ⁺ de membrana plasmática (PMA-1) en hongos.....	17
1.3.2.1.1 Estructura de la PMA-1.....	17
1.3.2.1.2 Localización de la PMA-1 en hongos.....	18
1.3.2.1.3 Tráfico de la PMA-1.....	19
Capítulo 2. Justificación.....	20
Capítulo 3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo General.....	22
3.2 Objetivos Particulares.....	22
Capítulo 4. Hipotesis.....	23
Capítulo 5 Materiales y métodos.....	24
5.1 Cepas, vectores, y oligonucleótidos.....	24
5.1.1 Cepas.....	24
5.1.2 Plásmidos.....	25
5.1.3 Oligonucleótidos.....	25
5.2 Medios de cultivo.....	27
5.2.1 Medios para <i>Neurospora crassa</i>	27
5.2.3 Medios para <i>Escherichia coli</i>	28
5.3 Condiciones de crecimiento para <i>Neurospora crassa</i>	28
5.3.1 Condiciones para el crecimiento de conidios.....	28

5.3.1.1 Condiciones para obtener conidios.....	28
5.3.1.2 Condiciones para el análisis de conidiación.....	28
5.3.2 Condiciones para el crecimiento de micelio.....	28
5.3.2.1 Crecimiento de micelio para la extracción de ADN.....	28
5.3.2.2 Crecimiento de micelio para extracción y análisis de proteínas, contenido de quitina.....	29
5.3.3 Condiciones para observar crecimiento colonial.....	29
5.3.4 Condiciones para observar germinación.....	29
5.4 Colecta de células de <i>Neurospora crassa</i>	29
5.4.1 Conidios.....	29
5.4.2 Micelio.....	30
5.5 Análisis bioinformático.....	30
5.5.1 Diseño de oligonucleótidos.....	30
5.5.2 Análisis de secuencias de nucleótidos.....	31
5.5.3 Análisis de secuencias de aminoácidos.....	32
5.6 Métodos para la manipulación de ADN.....	32
5.6.2 Extracción de ADN genómico.....	32
5.6.2.1 Extracción de ADN genómico de micelio.....	32
5.6.2.2 Extracción de ADN genómico de conidios.....	32
5.6.3 Etiquetamiento de genes.....	33
5.6.3.1 PCR de fusión.....	33
5.6.4 Recuperación de fragmentos de ADN de un gel de agarosa.....	35
5.6.5 Extracción de ADN plasmídico.....	35
5.6.6 Transformación por electroporación para introducción de ADN de <i>Neurospora crassa</i>	35
5.6.6.1 Plaqueo para los conidios transformados con fragmentos resultado de PCR de fusión.....	36
5.6.7 Comprobación de la integración de los fragmentos etiquetados y de las cepas mutantes.....	36
5.6.7.1 Integración de plásmidos.....	36
5.6.7.2 Integración de fusiones.....	37
5.6.7.3 Cepas mutantes.....	38
5.7 Métodos genéticos en <i>Neurospora crassa</i>	38
5.7.1 Cepas homocariones.....	38
5.7.2 Cepa doble mutante.....	39
5.7.3 Análisis de formación de peritecios en cepas mutantes simples.....	39
5.8 Métodos para el análisis de proteínas.....	39
5.8.1 Centrifugación por gradiente de densidad.....	39
5.8.2 Western Blot.....	40
5.8.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
5.8.2.2 Electrotransferencia de proteínas.....	40
5.8.2.3 Bloqueo de membrana.....	40
5.8.2.4 Inmunodetección y revelado.....	41
5.8.3 Contenido de quitina.....	41
5.8.4 Coimmunoprecipitación mediante GFP-TRAP.....	42

5.8.4.1 Rompimiento celular.....	42
5.8.4.2 Co-Inmunoprecipitación con las perlas de agarosa GFP-TRAP® (Cromotek).....	42
5.8.4.3 Digestión con Tripsina para la secuenciación de proteínas.....	43
5.9. Métodos de microscopía.....	44
5.9.1 Microscopía confocal.....	44
5.9.2 Microscopía de campo evanescente (TIRFM).....	44
5.9.3 Microscopía de bajo aumento (Estereoscopio).....	44
Capítulo 6 Resultados.....	45
PARTE 1: 6.1 Quitina sintasas.....	45
6.1.1 Localización de las quitina sintasas CHS-2, CHS-4, CHS-5 y CHS-7 etiquetadas con proteínas fluorescentes.....	45
6.1.1.1 Etiquetamiento endógeno.....	45
6.1.1.1.1 Amplificaciones de fragmentos y fusiones de los genes <i>chs</i>	45
6.1.1.1.2 Amplificación y fusión de la miosina MYO-2 clase V versión truncada.....	46
6.1.1.2 Obtención de cepas expresando CHS-GFP.....	47
6.1.1.2.1 Transformantes expresando las proteínas CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP, CHS-7-GFP.....	47
6.1.1.2.2 Crecimiento colonial y comprobación de integraciones en las cepas CHS-GFP.....	49
6.1.1.2.2.1 Confirmación de las integraciones por PCR.....	49
6.1.1.2.2.2 Crecimiento colonial de las cepas que expresan las CHS-GFP.....	50
6.1.2. Análisis de microscopía de las cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes.....	51
6.1.2.1 Efecto del inhibidor Brefeldina A.....	51
6.1.2.2 Colocalización de las CHS clases III y V.....	52
6.1.2.3 Importancia del citoesqueleto en la distribución de las CHS.....	54
6.1.2.3.1 Microscopía de evanescencia (TIRFM) de la cepa CHS-5-GFP.....	54
6.1.2.3.2 Efecto del inhibidor del citoesqueleto de actina, Latrunculina A.....	55
6.1.2.3.3 Colocalización de la quitina sintasa CHS-1 (clase III) con la miosina MYO-2 (clase V) truncada en el carboxilo terminal.....	56
6.1.3 Proteínas asociadas a las CHS.....	58
6.1.3.1 Coimmunoprecipitación de las proteínas CHS-1-GFP, CHS-4-GFP y CHS-5-GFP.....	58
6.1.4 Función de las quitina sintasas en <i>N. crassa</i>	62
6.1.4.1 Obtención de la cepa mutante doble de <i>chs</i> en <i>N. crassa</i>	62
6.1.4.1.2 Comprobación de la doble mutante mediante PCR.....	62
6.1.4.2 Caracterización de las cepas mutante simples y doble en <i>N. crassa</i>	63
6.1.4.2.1 Crecimiento radial y diámetro del Spitzenkörper de las cepas mutantes simples y la doble mutante.....	63
6.1.4.2.2 Hifas aéreas y conidiación en las cepas mutantes de CHS.....	66
6.1.4.2.3 Ramificación y septación de las cepas mutantes simples y la doble mutante.....	68
6.1.4.2.4 Participación de las CHS en la formación de estructuras sexuales (peritecios).....	72

6.1.4.2.5 Contenido de quitina y biomasa de las cepas mutantes CHS.....	74
6.1.4.2.6 Crecimiento de las cepas mutantes en medio mínimo adicionado con agentes estresantes.....	76
PARTE 2: 6.2 ATPasa de MP (PMA-1).....	78
6.2.1 Obtención de cepas expresando PMA-1-GFP y PMB-GFP.....	78
6.2.1.1 Etiquetamiento endógeno de las proteínas PMA-1 y PMB con GFP.....	78
6.2.1.2 Selección de cepas que expresan PMA-1-GFP.....	78
6.2.1.3 Crecimiento colonial de las cepas que expresan PMA-1-GFP bajo los promotores <i>ccg-1</i> y el endógeno.....	80
6.2.2 Gradiente de densidad y análisis de western blot.....	81
6.2.3 Análisis de microscopía de la PMA-1.....	82
6.2.3.1 Distribución de la PMA-1-GFP en etapas tempranas e hifas maduras.....	82
6.2.3.2 La PMA-1-GFP está excluida del Spitzenkörper.....	85
6.2.3.3 Localización de la PMA-1-GFP en el septo.....	87
6.2.3.4 Análisis de la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP).....	88
6.2.3.5 Colocalización de la PMA-1-GFP con la ATPasa de membrana vacuolar VMA-1-RFP.....	90
6.2.3.6 Efecto del inhibidor Brefeldina A en la cepa PMA-1-GFP.....	91
6.2.3.7 Localización del transportador de arginina/H ⁺ (PMB).....	93
Capítulo 7 Discusión.....	95
Conclusiones.....	106
Referencias bibliográficas.....	107
Apéndices	126

Lista de figuras

Figura		Página
1	Descripción general de los organelos, citoesqueleto y factores del polarisoma, basado en la localización de las proteínas en la punta de la hifa de <i>N. crassa</i>	2
2	Rutas de secreción no convencionales.....	5
3	Estructura de la quitina.....	8
4	Ruta de la síntesis de quitina.....	9
5	Estructura y clasificación de las quitina sintasas en <i>N. crassa</i>	10
6	Modelo del gradiente electroquímico generado por ATPasa de H ⁺ ..	16
7	Estructura de la proteína PMA-1.....	18
8	Representación esquemática de la técnica de PCR de fusión.....	34
9	Esquema de la comprobación de la integración por medio de los oligonucleótidos pMR10, pMR11, pMR12 y pMR13.	37
10	Esquema de la comprobación de la integración de las fusiones en el genoma de <i>N. crassa</i>	38
11	Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados, el cassette y las fusiones.....	45
12	Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados y fusiones de la MYO-2 clase V.....	46
13	Localización de las CHS clases II, IV, V y VII.....	48
14	Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos de la correcta integración de las fusiones.....	49
15	Crecimiento radial de las cepas expresando CHS etiquetadas con GFP.....	50
16	Efecto del inhibidor Brefeldina A en las CHS clase II, IV y V.....	51
17	Colocalización de CHS-1-mChFP y CHS-5-GFP.....	53
18	Imágenes de TIRFM de las vesículas con CHS-5-GFP.....	54
19	Efecto del inhibidor Latrunculina A en las CHS clase II, IV y V...	55
20	Localización de MYO-2-GFP y CHS-1-mChFP.....	57
21	Interacciones <i>in silico</i> de las proteínas CHS-1, CHS-4 y CHS-5...	59
22	Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrando los fragmentos de la <i>chs-1</i> , <i>chs-3</i> cassette de delección de la cepa doble mutante <i>chs-1Δ;chs-3Δ</i>	62
23	Diámetro de la colonia después de 24 horas de las cepas mutantes de <i>chs</i>	63
24	Morfología de las colonias e hifas de las cepas mutantes de <i>chs</i> ...	65
25	Hifas aéreas de las cepas mutantes de <i>chs</i>	66
26	Grafica de conidiación de las cepas mutantes de <i>chs</i>	67
27	Gráfica del número de ramas en 500 μm, en las cepas mutantes simples y en la doble mutante.....	68
28	Ramificación en las cepas mutantes <i>chs</i>	69
29	Septación en las cepas mutantes <i>chs</i> de <i>N. crassa</i>	71

30	Peritecios de cepas mutantes a los 30 días.....	73
31	Gráficas de biomasa y contenido de quitina en cepas mutantes de <i>chs</i>	75
32	Crecimiento radial de las cepas mutantes en MMV-adicionado con agentes estresantes.....	77
33	Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados, fusiones y comprobación de PMA-1 y PMB.....	79
34	Crecimiento colonial de las cepas expresando PMA-1-GFP bajo el promotor <i>ccg-1</i> y el promotor endógeno.....	80
35	Gradiente de densidad de sacarosa y Western blot de las fracciones de la cepa PMA-1-GFP.....	81
36	Localización de la Pccg-1-PMA-1-GFP y PMA-1-GFP en conidios y germínulas.....	83
37	Localización de la PMA-1-GFP bajo el promotor <i>ccg-1</i> y el promotor endógeno en hifas maduras.....	84
38	Efecto de los inhibidores del citoesqueleto en la localización de PMA-1-GFP.....	86
39	La PMA-1-GFP se localiza en la MP del septo completamente formado.....	87
40	Análisis de FRAP de la PMA-1-GFP en la MP.....	89
41	Colocalización de la PMA-1-GFP y VMA-1-RFP.....	97
42	Efecto de la Brefeldina A sobre la expresión de la PMA-1-GFP en hifas maduras.....	90
43	Análisis de FRAP en vacuolas globulares cercanas a la región apical de las hifas tratadas con BFA.....	92
44	Localización de la PMB-GFP en germínulas e hifas maduras.....	94
45	Modelo de secreción de la PMA y CHS.....	97
46	Modelo de la localización de las CHS durante la formación del septo....	99

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas usadas y obtenidas en este estudio.....	24
2	Plásmidos usados en este estudio.....	25
3	Oligonucleótidos empleados en este estudio.....	25
4	Número de acceso de los genes usados en este estudio.....	31
5	Condiciones para la PCR de fusión.....	34
6	Resumen de proteínas obtenidas por secuenciación.....	59
7	Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-1-GFP.....	60
8	Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-4-GFP.....	61
9	Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-5-GFP.....	61
10	Diámetro del Spitzenkörper en las cepas mutantes <i>chs</i> en <i>N. crassa</i>	64
11	Número de septos en las cepas mutantes <i>chs</i> en <i>N. crassa</i>	70

Capítulo 1

Introducción

1.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son un grupo de organismos eucariotas de gran importancia ecológica como recicladores de materia orgánica, además de que son probablemente el grupo de organismos más útil biotecnológicamente, ya que son usados para sintetizar un amplio rango de compuestos económicamente importantes, tales como enzimas, metabolitos secundarios incluyendo antibióticos y otros fármacos. También tienen un gran impacto en nuestra economía ya que muchos hongos son patógenos de humanos y plantas.

La unidad vegetativa básica de crecimiento de los hongos filamentosos es la hifa, la cual consiste de una célula elongada que se expande por el ápice y que está rodeada por una pared celular. La pared celular es una estructura destacable de los hongos filamentosos por su continua síntesis en la punta (Bartnicki-García y Lippman, 1969). Mientras el crecimiento polarizado está presente solamente durante un corto tiempo en el ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la forma principal de crecimiento en las hifas de los hongos filamentosos. Brunswick en 1924 observó una estructura apical en los puntas de hifas de *Coprinus* spp. tras una tinción con hematoxilina de hierro., usando microscopía de contraste de fases. Esta estructura fue llamada en alemán con la palabra Spitzkörper (=cuerpo apical; SPK; Brunswick, 1924), al cual se le ha atribuido la función de centro suministrador de vesículas (VSC; Bartnicki-García et al., 1989; 1990). El VSC funcionaría como una estación de tránsito para vesículas del cuerpo hifal a la membrana plasmática (MP) apical (Bartnicki-García et al., 1989; 1995 y Bartnicki-García 2000). La posición del Spitzkörper determina la dirección del crecimiento (Girbardt, 1957; Riquelme et al., 1998). S. Bartnicki-García y C. Bracker demostraron la importancia de esta estructura para el crecimiento apical (Bartnicki-García et al., 1995; Grove y Bracker 1970). En las últimas décadas, gracias a la secuenciación de genomas de hongos filamentosos como *Neurospora crassa*, se han descrito muchos componentes involucrados en el crecimiento apical (Fig. 1, Riquelme et al., 2011).

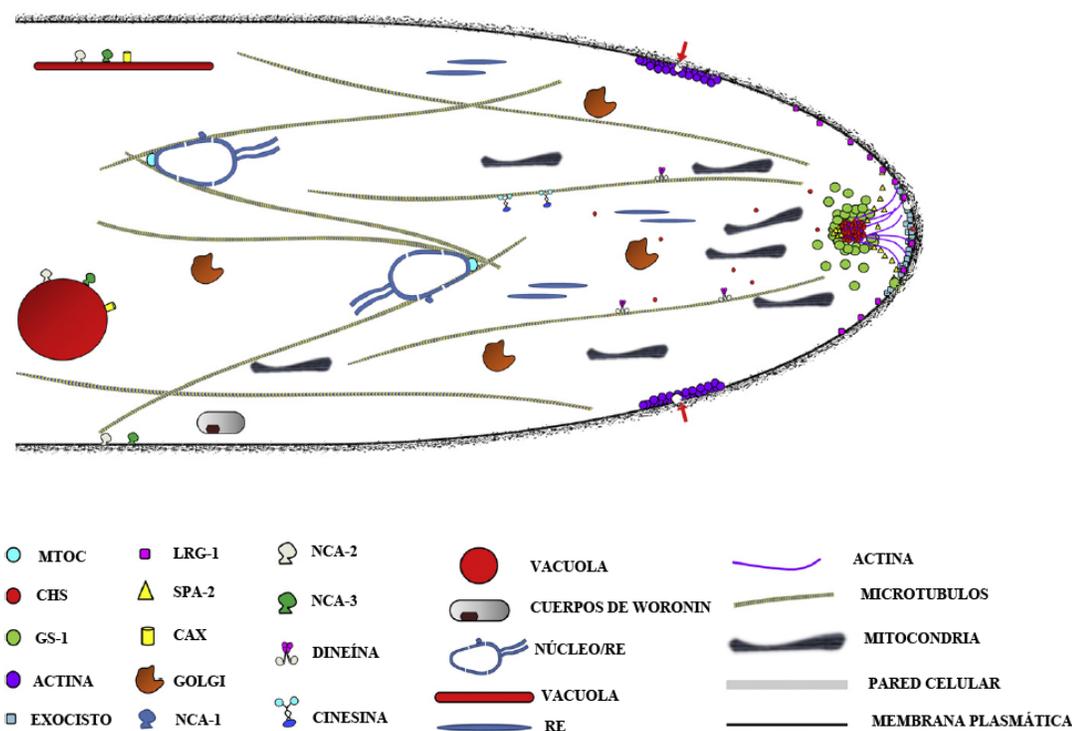


Figura 1. Descripción general de los organelos, citoesqueleto y factores de polaridad y exocitosis, basado en la localización de las proteínas en la punta de la hifa de *N. crassa*. Tomado de Riquelme et al., 2011, p. 465.

1.1.1 Rutas secretoras en hongos

1.1.1.1 Tráfico vesicular

Las células eucariotas tienen abundantes compartimentos intracelulares delimitados por membranas, entre los cuales existe tráfico de proteínas, lípidos y otros materiales. Gran parte de este tráfico está mediado por vesículas u otros acarreadores de membrana que surgen de un compartimento y se fusionan con otro (Bonifacino y Glick 2004). Las vesículas con carga son formadas a partir de la escisión de la membrana de un compartimento y son cubiertas por un complejo de proteínas. Para entregar sus cargas, las vesículas deben transitar hasta su destino donde perderán sus cubiertas y se fusionan con la membrana del compartimento de destino. La mayor información sobre la ruta de secreción y tráfico de proteínas en hongos proviene de la levadura modelo *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que durante el tráfico de retículo endoplásmico (RE) a Golgi las vesículas necesitan la cubierta COPII, que contiene tres componentes: la pequeña proteína de unión a GTP (Sar1), el complejo Sec23/Sec24, y el complejo Sec13/Sec31 (Barlowe et al., 1994; Schekman 2002). La cubierta COPII reconoce a las proteínas de cargo

que contienen señales de entrega di-acídicas (Asp-X-Glu) o hidrofóbicas; esta señal se une a Sec24 para su transporte selectivo de RE-Golgi (Nishimura y Balch 1997; Votsmeier and Gallwitz, 2001; Kappeler et al., et al., 1997; Nakamura et al., 1998).

En el transporte retrógrado de Golgi *cis*-Golgi *trans*-RE, las vesículas requieren de la cubierta COPI, compuesta de la GTPasa pequeña Ras (ARF1) y el coatómero (complejo proteico de 700 kDa que se compone de siete subunidades estequiométricas α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ), cuyos componentes están muy conservados desde mamíferos hasta levaduras (Serafini et al., 1991; Waters et al., 1991; Hosobuchi et al., 1992). El coatómero identifica un motivo dilisina que se encuentra en el carboxilo de la proteína de carga para llevar a cabo su transporte, y COPI identifica el motivo KDEL que contienen las proteínas residentes de RE (Pelham, 1995; Teasdale et al., 1996).

Los complejos AP (proteína adaptadora) junto con la proteína clatrina (proteína formada por tres cadenas pesadas y tres ligeras llamada “trisqueliones”) participan como cubiertas de vesículas que emergen del Golgi-*tardío*, y también de vesículas endocíticas. En *S. cerevisiae* se han sido descritos tres complejos AP que intervienen en el tráfico de proteínas. La cubierta clatrina/AP1 participa en el tráfico de vesículas de Golgi-*tardío* a vacuolas pasando por la ruta endosomal (Hanners y Tooze 2003). La cubierta clatrina/AP2 es requerida en las vesículas que se invaginan de la MP durante la endocitosis (Owen, 2004). Durante el tráfico de Golgi-*tardío*-vacuolas, la vesícula requiere de la cubierta clatrina/AP3 (Newell-Litwa et al., 2007). Todas estas cubiertas reconocen proteínas transmembranales con el motivo Tyr-XX- Φ , donde Φ corresponde a un aminoácido hidrofóbico voluminoso.

Al final del tránsito, la vesícula se despoja de su capa, y se dirige hacia el compartimento aceptor. El paso final en la existencia de una vesícula es la fusión con la membrana aceptor. La especificidad hacia la membrana blanco requiere de la existencia de marcadores de superficie en las vesículas como las proteínas SNAREs (por sus siglas en inglés N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), las cuales intervienen en la especificidad de reconocimiento y catalizan la fusión de la vesícula (Bonifacio y Glick, 2004). Las Rab GTPasas actúan como interruptores moleculares, donde sus formas inactivas (Rab citosólica unida a GDP) y activas (Rab en membrana unida a GTP)

coordinan el tráfico de las vesículas junto con proteínas del citoesqueleto (Gould y Lippincott-Schwartz, 2009)

1.1.1.2 Ruta de secreción convencional

Todas las células eucariotas desde levaduras hasta mamíferos se caracterizan por tener una maquinaria secretora muy elaborada, que ayuda a transportar proteínas a través de la membrana del RE. El transporte de vesículas es necesario para la expansión de la pared celular, MP, endocitosis y secreción de proteínas y otras moléculas en la ruta de exocitosis (Valkonen, 2003). En hongos filamentosos, el crecimiento micelial se da por la extensión apical de la hifa, que requiere de un transporte altamente polarizado del material involucrado en la formación de la MP y de la pared celular. La secreción ocurre en regiones apicales o subapicales de la hifa (Wösten et al., 1991).

Las proteínas que siguen la ruta secretora convencional, primero son transportadas al lumen del RE, donde son plegadas en su conformación final. Del RE, las proteínas son transportadas hacia el complejo de Golgi (en hongos filamentosos se denominan equivalente de Golgi), donde sufren modificaciones post-traduccionales donde las proteínas maduran. El reparto de las proteínas en hongos sucede en Golgi tardío, donde las proteínas según sus dominios son destinadas a la ruta vacuolar/endosomal o de secreción hacia la MP. Después las proteínas son transportadas a través de la ruta secretora por vesículas y éstas salen de una membrana donadora y se fusionan a una membrana blanco de una forma muy organizada. Para mantener la integridad de los diferentes compartimentos, las proteínas que no son destinadas para la secreción experimentan un transporte retrógrado al organelo donador (Valkonen, 2003).

1.1.1.3 Rutas de secreción no convencional

Se han descrito rutas adicionales a la ruta de secreción clásica, tanto para proteínas que no tienen péptido señal, como para proteínas con péptido señal que no son sustrato para la maquinaria de translocación en la membrana del RE. Estas rutas se pueden clasificar en mecanismos no vesiculares y mecanismos vesiculares. Los mecanismos no vesiculares se basan en la translocación directa de las proteínas citoplasmáticas a través de la MP, seguida por la incorporación en las superficies celulares o por una liberación en el espacio

extracelular. Algunas de las proteínas que se han encontrado que viajan por esta ruta, son proteínas de importancia biomédica en células de mamíferos (Leucinas, interleucinas-1 β , etc.; Nickel, 2005; Fig. 2A). De entre los mecanismos vesiculares se describen cuatro rutas no convencionales para exportación de proteínas con péptido señal. El primero involucra la secreción de proteínas empaquetadas en vesículas cubiertas con el complejo COPII y éstas se fusionan directamente a la MP. En el segundo mecanismo la vesícula tiene la cubierta COPII, pero esta vesícula se fusiona a compartimentos endosomales o lisosomales para después fusionarse con la MP. En el tercero las proteínas son empaquetadas en vesículas sin cubierta y se fusionan directamente a la MP. En el último mecanismo las proteínas son empaquetadas en vesículas sin cubierta y pasan por Golgi antes de llegar a la MP (Nickel y Rabouille, 2008; Fig. 2B). Como es que se lleva a cabo el tráfico vesicular de proteínas requeridas para importantes procesos como la síntesis de la pared celular y obtención de nutrientes gracias a la cual se lleva a cabo la elongación de la punta de la hifa es una incógnita que hasta la fecha no ha sido descifrada en su totalidad.

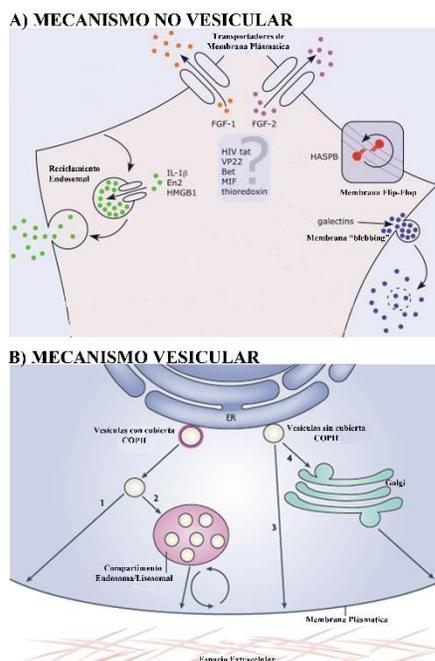


Figura 2. Rutas de secreción no convencionales. A) Mecanismos no vesiculares de secreción no convencional; B) Mecanismos vesiculares de secreción no convencional para proteínas con péptido señal. Modificado Nickel y Rabouille, 2008, p. 3-4.

1.2 Crecimiento apical

Este modo de crecimiento es una marca distintiva de los hongos filamentosos, donde la extensión de la punta de la hifa es continua, lo que conlleva a una continua liberación de enzimas, así como la síntesis de nuevo material para la expansión de la pared. El crecimiento apical también es característico en una variedad de células de diferentes organismos, tales como células de algas, pelos radiculares raíces y tubos de polen de plantas y neuronas de mamíferos; aunque en estas células el crecimiento apical es finito. La velocidad de extensión puede llegar a ser extremadamente rápida, arriba de 40 $\mu\text{m}/\text{min}$ como se ha observado en el hongo *N. crassa*.

1.2.1 Pared celular en hongos

La pared celular es una estructura importante que provee de una resistencia mecánica para soportar la presión osmótica del interior de la célula. Simultáneamente la pared celular debe de mantener la plasticidad adecuada para permitir el crecimiento de la célula, la división celular y la formación de una gran variedad de tipos de células durante el ciclo de vida del hongo. Además mantiene la forma e integridad ante el estrés ambiental y permite a la célula interactuar con sus alrededores. La pared celular media la adhesión de la célula a sustratos, y sirve como un centro de señalización para activar las rutas de transducción de señales dentro de la célula (Gooday 1994; Bowman and Free 2006; Latgé y Calderone 2006).

La pared celular en hongos es una matriz extracelular compuesta de dos componentes mayoritarios, polisacáridos y glicoproteínas. Aunque los componentes básicos de la pared celular son similares en levaduras y hongos filamentosos, estos difieren en cuanto a su proporción relativa. Las glicoproteínas presentes en la pared celular son extensivamente modificadas con carbohidratos ligados en O y N; además algunas proteínas contienen un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Bowman y Free, 2006). Los polisacáridos que se encuentran en la pared celular son glucanos, quitina, y otros carbohidratos menos frecuentes. Los glucanos son el componente mayoritario de la pared celular; constituyen el 50-60 % del total de los polisacáridos de la pared celular por peso seco (Fleet, 1991; Kapteyn et al., 1999). La quitina constituye el 1-2 % de la pared celular en levaduras (Klis, 1994; Klis et al., 2002)

mientras que en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y *N. crassa* constituye el 10 al 20% (De Nobel et al., 2000; Bartnicki-García, 1968).

1.2.1.1 Modelos de la incorporación de nuevo material a la pared celular (modelos Bartnicki-García y Wessels).

El crecimiento apical requiere de la expansión de la pared celular en la zona del ápice. Se han propuesto dos modelos principales acerca de cómo ocurre este proceso. Uno de ellos es el propuesto por Bartnicki-García (1973), el cual describe que el crecimiento en extensión de la pared es el resultado de un delicado balance entre lisis y síntesis controlada de quitina, donde diferentes vesículas que contienen proteínas de síntesis y de degradación son descargadas en el ápice para plastificar la pared, y así poder adicionar nuevos monómeros que contribuyen a que se lleve a cabo la expansión de la pared celular (Bartnicki-García, 2006; Gooday 1990). Por otro lado el modelo postulado por Wessels (1986) propone un modelo de crecimiento donde las enzimas líticas no son necesarias. De acuerdo a su modelo, los nuevos polímeros son formados en el ápice sugiriendo un tipo de plasticidad por la ausencia de enlace entrecruzados. Después la pared se rigidifica progresivamente por la formación de enlaces extras en las regiones subapicales (Wessels 1986; Sietsma y Wessels 1994).

1.2.1.2 Un componente primordial en la pared celular de hongos: “Quitina”

La quitina fue aislada por primera vez en 1811 por Braconnot de algunos hongos superiores como una fracción resistente al álcali a la que llamó fungina. En 1823 Odier aisló un residuo insoluble a soluciones de KOH del élitro de un escarabajo y le dio el nombre de quitina, del griego chiton, túnica o cobertura. Odier identificó la quitina del caparazón desmineralizado del cangrejo y sugirió que es el material base del exoesqueleto de todos los insectos y posiblemente de los arácnidos (Khoushab y Yamabhai, 2010). La quitina, es un homopolímero no ramificado de residuos β -1-,4-N-acetilglucosamina. Es el segundo polímero orgánico más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Gooday 1990). En la naturaleza podemos encontrar dos tipos de estructuras de quitina, las cuales se caracterizan por su arreglo antiparalelo (α -quitina) o paralelo (β -quitina) de las cadenas de

N-acetilglucosamina (Rudall, 1963, Fig 3). Las microfibrillas de quitina son un componente estructural importante de la pared celular de los hongos (Foster, 1949; Kent y Whitehouse, 1955), así como el principal componente del exoesqueleto de invertebrados (Rudall, 1955).

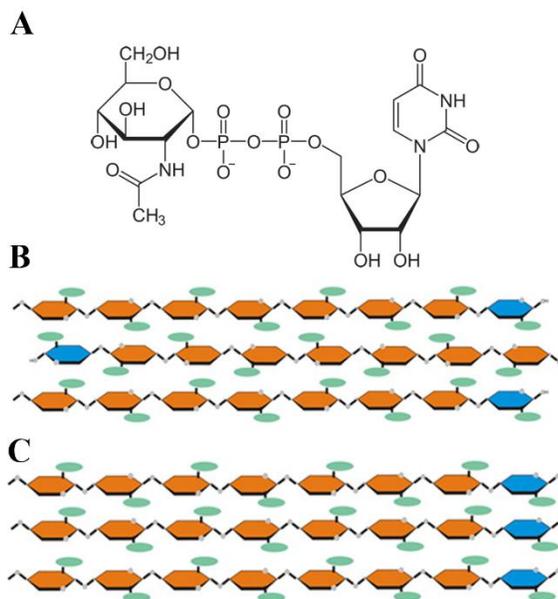


Figura 3. Estructura de la quitina. A) Molécula de UDP-N-acetilglucosamina. B) α -Quitina, dónde las cadenas de N-acetilglucosamina se encuentran de forma antiparalela. C) β -Quitina, dónde las cadenas de N-acetilglucosamina se encuentran de forma paralela. Tomado de Seidl, 2008, p. 37.

1.2.2 Síntesis de quitina

La síntesis de quitina es un proceso altamente conservado desde hongos a insectos. Comienza con los dos primeros pasos de la ruta de Leloir; el primer paso es la fosforilación de glucosa por la enzima glucosa-6-fosfatasa, obteniendo como resultado la glucosa-6-fosfato; el segundo paso es la isomerización a fructosa-6-fosfato, mediante la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa. En este punto la fructosa-6-fosfato es aminada por la primera enzima específica de la ruta de la síntesis de quitina, la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, convirtiendo la fructosa-6-fosfato en la glucosamina-6-fosfato por la transferencia de un grupo amonio del co-sustrato glutamina. Seguido un grupo acetilo de la coenzima A es adicionado por la glucosamina-6-P acetiltransfererasa para obtener la N-acetilglucosamina-6-P; el fosfato de este sustrato es transferido de la posición carbono-6 a la posición carbono-1 por la enzima fosfoacetilglucosamina mutasa resultando en la N-

acetilglucosamina-1-P, donde finalmente es uridinilado por la UDP-acetilglucosamina pirofosforilasa produciendo la UDP-N-acetilglucosamina, la cual sirve como sustrato para la última enzima de la ruta, la quitina sintasa, una glucosiltransferasa cuya función es transferir la porción de azúcar del UDP-N-acetilglucosamina a una cadena creciente de quitina. La quitina es degradada por quitinasas y N-acetylglucosaminidasas produciendo N-acetilglucosamina, la cual puede ser reusada para la biosíntesis de quitina (Revisión en Merzendorf, 2011) (Fig.4).

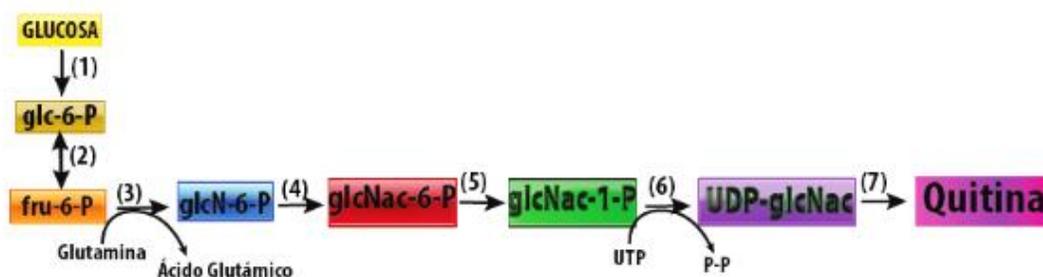


Figura 4. Ruta de la síntesis de quitina. Las enzimas involucradas en la síntesis son (1) glucosa-6-fosfatasa, (2) glucosa-6-fosfato isomerasa, (3) glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, (4) glucosamina-6-P acetiltransfererasa, (5) fosfoacetilglucosamina mutasa, (6) UDP-acetilglucosamina pirofosforilasa, (7) Quitina sintasa. Modificado de Merzendorf, 2011, p. 760.

1.2.3 Quitina sintasas

Las quitina sintasas (EC 2.4.1.16) son enzimas pertenecientes a la familia de las glucosilhidrolasas 2, específicamente a las hexosiltransferasas. La función de estas enzimas es transferir un grupo de N-acetilglucosamina a una cadena de quitina, y son por lo tanto las enzimas principales en el crecimiento de la pared celular en hongos. En los genomas de los hongos se pueden llegar a encontrar más de 10 secuencias que codifican para este tipo de proteínas.

1.2.3.1 Estructura y clasificación

Las quitina sintasas (CHS) han sido clasificadas en siete clases (I-VII), según su secuencia de aminoácidos (Choquer et al., 2004; Mandel et al., 2006) y estas clases han sido agrupadas en tres divisiones (1-3). Las clases I, II y III pertenecen a la división 1, caracterizada por tener un carboxilo terminal hidrofóbico, un subdominio catalítico

conservado pfam01644 y una región amino terminal hidrofílica (Bowen et al., 1992). La división 2 contiene las clases IV, V y VII las cuales tienen característicamente un dominio catalítico precedido por un dominio de unión a citocromo b5 (pfma00173). Las clases V (=Va) y la VII (=Vb) además tienen un dominio conservado tipo motor de miosina (clase V) en su amino terminal (Fujiwara et al., 1997). Se observan diferencias en las dos versiones con dominio miosina; la clase V (=Va) tiene un versión grande del dominio miosina, y un sitio de unión a ATP; en la clase VII (=Vb) el dominio miosina es más pequeño y carece de un sitio de unión a ATP (Amnuaykanjanasin y Epstein, 2003). La clase VI fue identificada más recientemente (Mandel et al., 2006), pero no tiene las características que la califiquen para la división 1 o 2, y por lo tanto se propuso un nueva división 3 (Fig.5) (Riquelme y Bartnicki-García, 2008). En este estudio análisis bioinformáticos han indicado la presencia de un péptido señal en las CHS clase VI, el cual está ausente en las demás clases (datos no publicados). Las CHS contienen de 4 a 7 dominios transmembranales; otra característica de este grupo de proteínas es la secuencia peptídica QRRRW, un motivo que se cree está involucrado en la unión del producto (Merzendorfer, 2006).

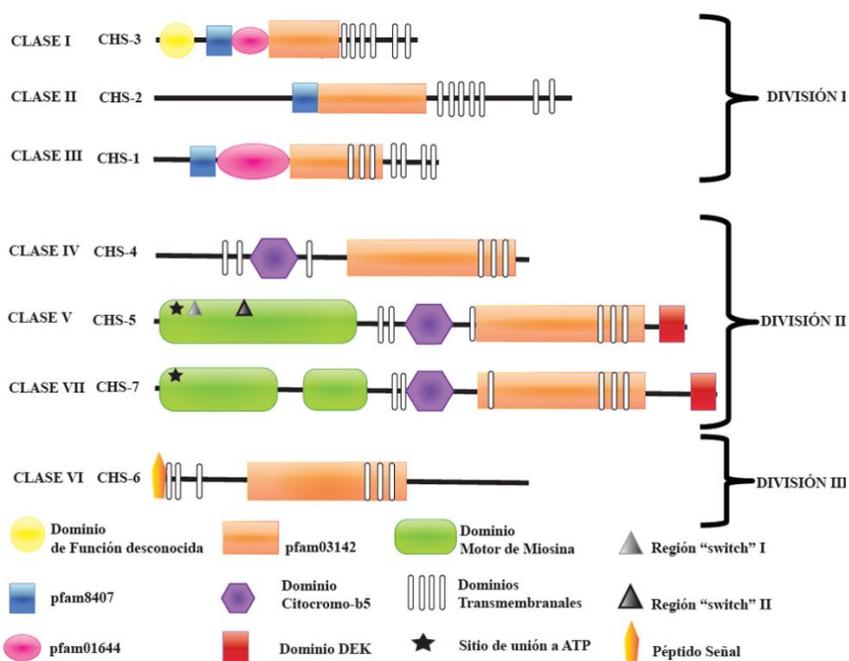


Figura 5. Estructura y clasificación de las quitina sintasas en *N. crassa*.

1.2.3.2 Función y localización de las quitinas sintasas

Estudios previos han sugerido que las CHS tienen papeles específicos en la síntesis de la pared celular que son dependientes de espacio y tiempo (Riquelme et al., 2007).

En la levadura *S. cerevisiae* se han encontrado tres CHS con diferentes funciones en la expansión de la pared celular, formación del septo y gemación (Silverman et al., 1988; Bulawa et al., 1986; Valdivieso et al., 1991; Bulawa et al., 1992). Se ha especulado que la Chs1p tiene la función de reparar la pared celular débil de la célula hija después de su separación (Cabib et al., 1989; Cabib et al., 1992). La Chs2p se localiza en el septo primario, y además es esencial tanto para la formación septo como para la división celular (Silverman et al., 1988; Shaw et al., 1991; Chuang y Scheckman et al., 1996; Bulawa., et al 1990). El papel más importante lo tiene la Chs3p, pues es requerida para la formación del anillo de quitina en la base de la célula hija durante la gemación y también para sintetizar la pared celular lateral (Valdivieso et al., 1991; Bulawa et al., 1992).

En el hongo filamentoso *N. crassa* se han estudiado tres CHS correspondientes a la clase I (CHS-3), clase III (CHS-1) y clase VI (CHS-6). Estas CHS mostraron una localización similar, pero con ligeras diferencias en su distribución. La acumulación en la punta de las tres CHS coincidió con la localización del SPK. Aunque presentaron localizaciones similares, tras la eliminación de cada uno de estos genes sólo la cepa mutante *chs-6Δ* presentó una disminución en el crecimiento vegetativo a diferencia de las mutantes *chs-1Δ* y *chs-3Δ* que no mostraron un fenotipo evidente durante el crecimiento vegetativo (Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011).

En *A. nidulans* mediante la interrupción de genes que codifican para CHS, se ha podido elucidar el papel de estas enzimas en la morfogénesis (la formación de la pared celular, conidiación, y formación de fiálides y métulas) (Motoyama et al., 1996). Las CHS ChsA (clase II) y ChsD (clase IV) participan en la conidiación ya que la interrupción de estos genes, afecta la formación de conidios (Motoyama et al., 1996). También se ha sugerido que la ChsA (clase II) y la ChsC (clase I) funcionan conjuntamente en el mantenimiento de la pared celular. Mediante doble expresión de ChsA-HA y ChsC-FLAG se observó que ambas se encontraban en los sitios de formación del septo, pero sólo ChsC-FLAG se encontraba en la punta de la hifa (Ichinomiya et al., 2005). La ChsG (clase III) parece jugar un papel en la

síntesis de quitina durante el crecimiento de las hifas y la conidiación, debido a que la eliminación de este gen produce defectos muy marcados en la morfología de la hifa y una disminución de la conidiación; asimismo la ChsB se observó en la punta de la hifa, así como también en estructuras de reproducción asexual, y en tubos de germinación (Borgia et al., 1996; Ichinomiya et al., 2002; Fukuda et al., 2009)

En el hongo patógeno del maíz *Ustilago maydis*, se reportó la localización de seis CHS, Umchs3 y Umchs4 (clase I), Umchs5 (clase IV), Umchs6 (clase V), Umchs7 (clase IV) y Mcs1 (clase V). Todas ellas fueron localizadas en el septo de células de levadura e hifas, sin embargo, solo las Umchs5 (clase IV), Umchs6 (clase V), Umchs7 (clase IV) y Mcs1 (clase V) fueron localizadas en la punta de gemas y de hifas en crecimiento (Weber et al., 2006). La carencia de Umchs5 y Umchs7 (clase IV) resultó en la reducción de la velocidad de crecimiento, el contenido de quitina y la morfología de la célula de levadura así como en patogenicidad (Xoconostle-Cázares et al., 1997; Weber et al., 2006). El resto de las CHS, Umchs1 (clase III), Umchs2 (clase II), Umchs3 y Umchs4 (clase I), parece tener una menor participación durante los procesos de crecimiento y patogenicidad (Weber et al., 2006).

En la mayoría de los hongos filamentosos con el genoma secuenciado se han encontrado genes que codifican para CHS con un dominio motor tipo miosina. Sólo para el caso de las levaduras *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Shizosaccharomyces pombe* no se han reportado ortólogos para estos genes (Takeshita et al., 2005; Tsuizaki et al., 2009). La CHS con dominio miosina probablemente llegue a los lugares de síntesis de pared celular por la interacción con la citoesqueleto de actina. Estas CHS con dominio miosina parecen ejercer una función única al ser específica de hongos filamentosos. Se han localizado algunas CHS con dominio miosina, como la *CsmA* del hongo *A. nidulans* perteneciente a la clase V. Se observó que al suprimir la expresión de este gen había anormalidades notables con respecto a la integridad de la pared celular y el crecimiento polarizado. La localización de esta CHS es cercana a las estructuras de actina en la punta de la hifa y en los sitios de septación (Takeshita et al., 2005). En *Colletotrichum graminicola* el gen *chsA* codifica para una CHS de clase VII con dominio miosina. Esta se localizó en la MP tanto de conidióforos, como en el ápice del conidio naciente, y en septos nacentes, aunque no fue observada en la

punta de los tubos germinativos, ni de las hifas (Amnuaykanjanasin y Epstein, 2006). En *U. maydis* una CHS clase V con dominio miosina, la *mcs1*, es esencial para la patogenicidad de este hongo, ya que al suprimir la expresión del gen correspondiente se reduce la virulencia (Weber et al., 2006). Aunque las hifas de la cepa mutante $\Delta msc1$ entran a la planta, éstas pierden el crecimiento polarizado, empezando a crecer en forma de grandes agregados de células esféricas. La *mcs1* se localizó en los lugares de crecimiento ya fueran en la punta de las hifas o en lugares de gemación en levaduras. Este dominio miosina tiene un 22 % de identidad con la secuencia del motor de miosina clase V (Myo5) en *U. maydis* (Weber et al., 2006).

1.2.3.3 Tráfico y regulación de las CHS en hongos

Las células de los hongos tienen por lo menos dos tipos de vesículas secretoras bien definidas (Grove y Bracker, 1970; Howard, 1981). Se ha sugerido que las macrovesículas, o vesículas secretoras convencionales, llevan los componentes de la fase amorfa de la pared celular, además de cargar las enzimas extracelulares. Hay amplia evidencia que las microvesículas que llevan las CHS, son los quitosomas (Bartnicki-García, 1990). Los quitosomas son vesículas pequeñas (40-70 nm) con la habilidad de formar quitina *in vitro* y se ha sugerido, que transportan las CHS a la superficie celular en el ápice de la hifa para la síntesis de la pared celular (Bracker et al., 1976; Bartnicki-García, 1990). La regulación de la actividad de CHS ha sido clasificada como zimogénica o no zimogénica debido a los reportes que muestran que en los extractos membranales la actividad de CHS se incrementa al adicionar proteasas, por lo que se sugiere una regulación por un corte proteolítico (McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Duran et al., 1975; Leal-Morales et al., 1988; Ruiz Herrera et al., 1975), aunque a la fecha no se han reportado candidatos convincentes específicos de estas proteasas. En el hongo dimórfico *C. albicans* se ha descrito que la fosforilación en la serina139, afecta la localización de la Chs3 en las regiones apicales, sugiriendo que este proceso regula el tráfico hacia las regiones apicales, pero se desconoce que cinasa está involucrada en la fosforilación que regula a la Chs3 durante su transporte a la punta (Lenardon et al., 2010).

En *S. cerevisiae* se han descrito varias proteínas accesorias involucradas en el transporte de la Chs3p (clase IV) durante su paso por la ruta secretora. La Chs3p es palmitoilada en el RE por la proteína Pf4p para poder ser exportada, y a su vez necesita de la chaperona Chs7p para su salida del RE (Lam et al., 2006; Trilla et al., 1999). En el transporte del trans-Golgi a la MP la Chs3p se une transitoriamente al complejo exómero (Chs5p, Chs6p y las ChAPs [por sus siglas en inglés Chs5p-Arf1p-binding proteins]: Bch1p, Bch2p y Bud7p) para promover su incorporación a la vesícula de secreción (Sanchatjate y Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Por último en la MP la Chs3p interactúa con la Chs4p a la cual se le atribuyen dos funciones; una como activadora directa de la Chs3p y otra como responsable de su anclaje, con ayuda de Bni4p, al anillo de septina. La prenilación de Chs4p se ha reportado que es importante para la activación de Chs3p (Bulawa, 1993; DeMarini, et al., 1997; Grabinska, et al., 2007). Además se han identificado señales en la secuencia de Chs3p que participan en su entrega a la MP y endosomas; estas señales son reconocidas por los complejos exómero y AP-1 (complejo que media el tráfico entre Golgi-Endosomas) sugiriendo un posible mecanismo de regulación del tráfico (Starr, et al., 2012). En los hongos filamentosos se tiene poca evidencia acerca del tráfico o la ruta de secreción que siguen las CHS. La mayoría de los trabajos describen el papel del citoesqueleto durante el transporte de los quitosomas. En las CHS que contienen el dominio motor de miosina, CsmA y CsmB en *A. nidulans*, Wdchs5 en *Wangiella dermatitides* y Mcs1 en *U. maydis* se reportó que estas proteínas tienen una interacción directa con el citoesqueleto de actina (Takeshita, et al., 2005; Tsuizaki, et al., 2009; Abramzyk, et al., 2009; Treitschke, et al., 2010). En *U. maydis* se ha reportado que en la Msc1 el dominio miosina, y su unión al citoesqueleto de actina no son importantes para su movilidad, sin embargo que su transporte depende de las proteínas motoras Myo5, Kin1 y dyn2 para su transporte bidireccional (Treitschke, et al., 2010; Schuster, et al., 2012). En *N. crassa*, se reportó que el transporte de las CHS clase I, III y VI hacia el SPK requiere el citoesqueleto de actina, debido al efecto observado con los inhibidores Latrunculina A y Citocalasina A; además al parecer la ruta secretora que toman estas CHS hacia la punta de la hifa es distinta de la ruta convencional RE-Golgi (Riquelme, et al., 2007; Sánchez-León, et al., 2011).

1.3 Obtención de nutrientes en células fúngicas

Los hongos tienen requerimientos nutricionales muy simples. Necesitan de una fuente orgánica de nutrientes para obtener energía y sintetizar macromoléculas. Los hongos necesitan capturar los nutrientes de sus alrededores; esto lo hacen mediante absorción. Para ello liberan enzimas que degradan polímeros complejos y entonces absorben los nutrientes como polímeros simples (Deacon, 2005).

La MP es una barrera de selección permeable que dicta la entrada de nutrientes y la salida de metabolitos en células de hongos. Los mecanismos de transporte en la MP son importantes en la fisiología del hongo dado que ellos gobiernan la velocidad en la que las células metabolizan, crecen y se dividen. Los hongos poseen diferentes tipos de obtención de nutrientes ya sea de manera pasiva o activa en la MP: libre difusión, difusión facilitada, canales de difusión y transporte activo. El transporte activo de nutrientes tales como azúcares, aminoácidos, nitratos, amonio, sulfatos y fosfatos, en hongos filamentosos se ha sugerido que involucra a las proteínas simporter que están cercanas a la punta (Kropf, et al., 1984). La mayoría de las bombas de iones se encuentran ausentes del ápice, lo que sugiere que están creando un gradiente de protones que ayuda a la obtención de nutrientes (Slayman, 1974; Hansen y Slayman, 1978).

1.3.1 Corrientes eléctricas y gradientes electroquímicos

Los campos eléctricos parecen estar íntimamente involucrados con la obtención de nutrientes. El crecimiento en la punta genera un campo eléctrico alrededor de ella y el exterior de la hifa es más electronegativo en el ápice que en regiones distales. Se observan que las corrientes entran en la punta de la hifa y salen en regiones subapicales (Turian, 1979; Gow, 1984; McGillviray and Gow, 1987; Takeuchi, et al., 1988; Potapova, et al., 1988; Belozerskaya and Potapova, 1993). En muchos hongos examinados en detalle -por ejemplo *Achlya* (Oomycota) y *Neurospora* (Ascomycota)- la corriente parece llevar protones (H^+) porque corresponde con un gradiente de pH a lo largo de la superficie de la hifa y la corriente todavía ocurre cuando otros iones candidatos son reducidos o eliminados del medio (Gow, 1984; Kropf, et al., 1984; McGillviray y Gow, 1987). Los iones (H^+) son bombeados al exterior de la célula por bombas de iones localizadas en la MP, las cuales usan energía

derivada de la disociación de ATP (Slayman, et al., 1973). Los iones entonces vuelven a entrar a la célula a través de proteínas específicas de membrana llamadas simporte, las cuales transportan simultáneamente una molécula orgánica dentro de la célula (Kropf, et al., 1984) (Fig. 6).

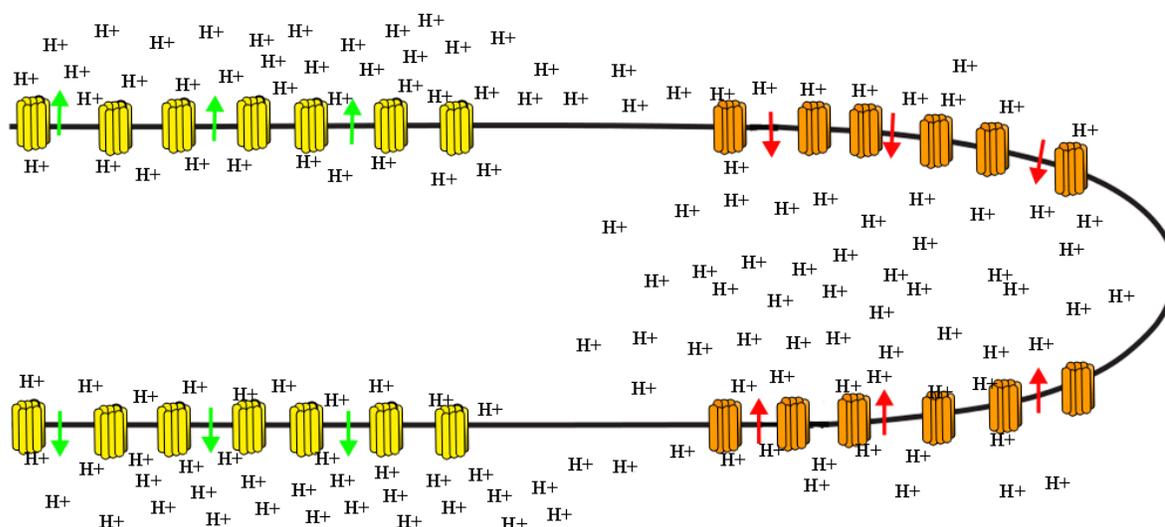


Figura 6. Modelo del gradiente electroquímico generado por las ATPasas de H^+ . Ilustración de la corriente que involucra la exportación de protones a través de una bomba de protones operada por ATP en zonas subapicales de la hifa, y la entrada de protones en la punta de la hifa a través de proteínas simporter que simultáneamente transportan aminoácidos. Modificado de Deacon, 2005, p.113.

1.3.2 La familia de ATPasas tipo P

Las E_1E_2 o ATPasas tipo P son una familia grande y fisiológicamente importante de bombas de cationes que están ampliamente distribuidas (desde procariontas hasta eucariotas). En eucariotas participan en una serie de papeles especializados: mueven iones de potasio a un medio con menor concentración de K^+ , acumulan Mg^+ , regulan las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} y Cu^{2+} , y eliminan metales pesados y tóxicos tales como Cd^{2+} y Zn^{2+} (Rao y Slayman, 1996).

En hongos, así como en otras células eucariotas, las ATPasas-P tienen la función central de crear un gradiente primario de iones que provee de energía a cotransportadores acoplados a cationes para el consumo de nutrientes. Las ATPasas- H^+ de MP de hongos utilizan casi un cuarto del ATP celular para extrudir protones eletrogénicamente (Gradmann

et al., 1978); lo que resulta en un gradiente que distribuye energía a cotransportadores de protones para importar azúcares, aminoácidos, y iones inorgánicos.

Además de esta bomba de protones de la MP, los hongos tienen otros tres miembros de esta familia: una ATPasa-Ca²⁺ en la membrana vacuolar, una ATPasa-Na⁺ en la MP y una ATPasa-Ca²⁺ en Golgi. A pesar de esta diversidad, es claro que las ATPasas-P están relacionadas estructural y mecánicamente. La estructura bioquímica de éstas incluye: i) Una subunidad catalítica de 100 kDa que es una proteína integral de membrana y se halla embebida firmemente en la bicapa lipídica; ii) Un ciclo de reacción que alterna entre dos de los mayores estados conformacionales (E₁E₂) acompañado por la formación de una estructura intermediaria covalente de β-asparatil fosfato y iii) sensibilidad a concentraciones micromolares de ortovanadato inorgánico, un estado de transición análogo de fosfato (Rao y Slayman, 1996).

1.3.2.1 La ATPasa-H⁺ de membrana plasmática (PMA-1) en hongos

1.3.2.1.1 Estructura de la PMA-1

La ATPasas-H⁺ han sido ampliamente caracterizadas en levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pombe* y en hongos filamentosos como *N. crassa*. El gen correspondiente ha sido llamado PMA-1 (Plasma Membrane ATPase-1). En *N. crassa* se ha reportado que la proteína PMA-1 constituye del 5 al 10 % de las proteínas de MP (EC 3.6.1.25) (Bowman et al., 1981). Esta proteína tiene una secuencia de 920 aminoácidos y el análisis de hidropatía de su secuencia predijo que hay 4 regiones transmembranales, en el extremo amino terminal, y es seguido por un dominio hidrofílico que contiene el sitio de fosforilación y muestra un alto grado de homología con otras ATPasas que translocan iones (Hager et al., 1986). La estructura completa de la PMA-1 de *N. crassa* fue determinada mediante criomicroscopía electrónica (Fig. 7A), lo que permitió observar que en realidad esta proteína tiene 10 regiones transmembranales y también la localización del protón para su expulsión hacia el exterior de la célula (Fig. 7B). La PMA-1 tiene 5 dominios que se localizan en el citoplasma los cuales son: dominio N, el cual es el dominio de unión al nucleótido (ATP), dominio P dominio de fosforilación, dominio R es el dominio de regulación en el extremo carboxilo, por último del dominio A el cual se desconoce su función (Kühlbrandt et al., 2002; Fig 7).

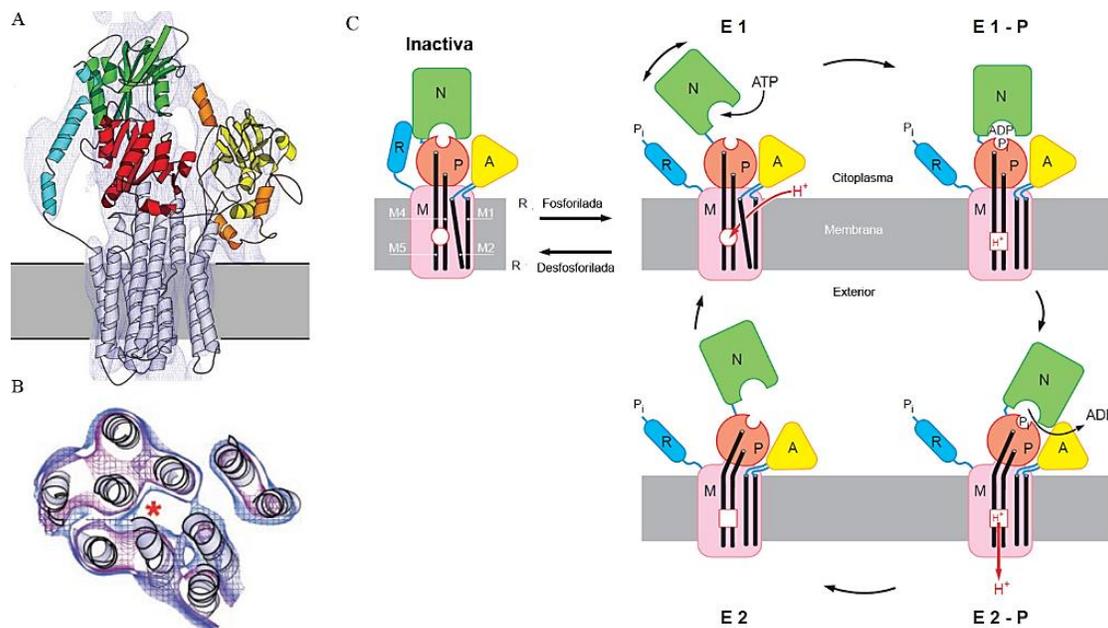


Figura 7. Estructura de la PMA-1. A) Vista de frente de la estructura de la PMA-1. B) Corte de la región transmembranal donde se muestra el sitio de unión del protón (asterisco en rojo). C) Mecanismo propuesto para la regulación y transporte de protones. Tomado de Kühlbrandt, et al., 2002, p.1693, 1695.

1.3.2.1.2 Localización de la PMA-1 en hongos

En levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pombe* la Pma1p se localiza en la MP de toda la célula (Malínská, et al., 2003; Iwaki, et al., 2008). En *S. cerevisiae* se localiza en la MP de una manera no homogénea sugiriendo una subregión llamada MCP (por sus siglas en inglés: membrane compartment occupied by Pma1), la cual cubre la mayoría de la superficie de la célula en un compartimento parecido a una red, con unos espacios ocupados por parches de MCC (por sus siglas en inglés; membrane compartment containing Can1, arginine permease) (Malínská et al., 2003). En hongos filamentosos no se tienen muchos reportes acerca la localización de la PMA-1. Solo en *Magnaphorte grisea* recientemente se ha utilizado PMA-1 como un marcador de la MP (Giraldo et al., 2013).

1.3.2.1.3 Tráfico de la PMA-1

En *S. cerevisiae* Pma1p se entrega a la superficie de la célula a través de la vía secretora clásica la cual pasa por el RE y Golgi; esta ruta está definida por los genes SEC (Brada y Schekman, 1988; Holcomb, et al., 1988; Chang y Slayman, 1991), además de otras proteínas especializadas que aseguran el transporte eficiente de Pma1p a través de la vía secretora. Por ejemplo, Lst1p (homólogo de Sec24p) está involucrada en la exportación de Pma1p del RE. Junto con Sec23p, Lst1p es necesaria para el eficiente empaquetamiento de la Pma1p en vesículas cubiertas con el complejo COPII derivadas del RE (Roberg, et al., 1999; Shimoni, et al., 2000). Además, Ast1p y Ast2p participan en el transporte de Pma1p de Golgi a la PM (Chang y Fink, 1995). A su llegada a la MP, Pma1p es muy estable (con una vida media > 12 h; Benito, et al., 1991).

Las balsas lipídicas juegan un papel importante en la entrega de Pma1p a la MP. La interrupción de genes involucrados en la síntesis de las balsas lipídicas, tiene como resultado que la Pma1p es directamente entregada a la vacuola, donde sería degradada, debido a que la Pma1p no se incorpora correctamente en la MP (Stack et al., 1995; Bagnat et al., 2001; Eisenkolb et al., 2002).

Capítulo 2

Justificación

Los hongos filamentosos son de gran importancia en diferentes ámbitos, que van desde económicos hasta ecológicos. Entender el crecimiento de estos organismos resulta de gran interés, ya que esta información nos ayudaría a encontrar soluciones a ciertos problemas provocados por hongos patógenos o en el caso de los hongos benéficos mejorarlos para obtener mayor rendimiento.

Un aspecto importante sobre el crecimiento de los hongos es que presentan un crecimiento polarizado y apical. El ensamblaje de nueva pared celular ocurre en la punta de la hifa. La quitina es uno de los principales componentes de la pared celular de los hongos filamentosos, por lo que es de gran importancia conocer el funcionamiento de la maquinaria responsable de la síntesis de nueva pared, y su transporte hacia la punta de la hifa. Algunas de las enzimas que se han reportado por estar involucradas en el ensamblaje de la nueva pared son las CHS. Se ha observado que las CHS viajan hacia la punta de la hifa en vesículas llamadas quitosomas. Se desconoce la ruta de secreción de las CHS. En el hongo filamentoso *N. crassa* se ha sugerido que tres CHS (CHS-1, 3 y 6) llegan a la punta de la hifa por una ruta alterna a la ruta secretora clásica (RE-Golgi). En *N. crassa* se han identificado además de las CHS previamente reportadas, cuatro CHS adicionales; CHS-5 y CHS-7, con un dominio miosina que sugiere una interacción con el citoesqueleto de actina, y CHS-2 y CHS-4, de las cuales se desconoce si participan en el crecimiento polarizado y como llegan a su destino final.

Otro aspecto fundamental de los hongos muy ligado al crecimiento es la obtención de nutrientes. La absorción de nutrientes necesarios para ciertos procesos fisiológicos, como la obtención de glucosa (monómero necesario para la síntesis de quitina), es mediada por las proteínas simporter que utilizan los protones que son bombeados al exterior de la hifa, los cuales generan un gradiente de pH. Este gradiente se genera en parte gracias a las bombas de protones que hay embebidas en la MP, conocidas como ATPasas de H⁺. En *S. cerevisiae* se ha descrito que la secreción de una ATPasa de H⁺ de MP, la PMA-1, sigue la ruta de secreción

convencional. En *N. crassa* se ha observado que no hay actividad de esta enzima en las regiones apicales, pero se desconoce cómo se lleva a cabo la secreción de este tipo de proteínas y si están realmente ausentes o presentes pero inactivas en la punta.

El transporte de todas estas enzimas hacia su destino final se da presuntamente a través de vesículas que se fusionan con la membrana celular de la hifa. En *N. crassa* se desconoce cuál o cuáles son las rutas secretoras de estas proteínas, algunas de ellas importantes en la síntesis de la pared celular (CHS) y otras en la generación de gradientes electroquímicos para la obtención de nutrientes (ATPasas). Descifrar estas rutas es de mayor importancia y contribuirá significativamente al avance en el campo de la biología celular de hongos filamentosos.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo General

Caracterización del tráfico vesicular en hifas de *Neurospora crassa* mediante el análisis de la distribución y papel de las quitina sintasas (CHS-2, CHS-4, CHS-5 y CHS-7), y la ATPasa de H⁺ PMA-1.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar si las diferentes quitina sintasas viajan en una sola población de quitosomas.
2. Determinar si las quitinas sintasas de clases I, IV y V forman complejos con otras proteínas.
3. Determinar la importancia del dominio miosina en la distribución de las quitinas sintasas y comparar la función del dominio motor con una miosina clase V en hifas de *N. crassa*.
4. Analizar la función de las diferentes clases de quitina sintasa mediante la caracterización de cepas mutantes Knock-out simples y múltiples.
5. Analizar la secreción de la ATPasa-H⁺ PMA-1 en *N. crassa*.
6. Analizar la microcompartimentalización de la membrana plasmática en *N. crassa*.

Capítulo 4

Hipótesis

- ❖ Las diferentes CHS viajan en diferentes poblaciones de quitosomas.
- ❖ Cada CHS tiene diferente participación durante cada etapa del desarrollo.
- ❖ La PMA-1 está ausente en la punta.
- ❖ La PMA-1 se transporta a través de la ruta secretora convencional.
- ❖ Hay una microcompartimentación de la MP en regiones distales de la hifa.

Capítulo 5

Materiales y métodos

5.1 Cepas, vectores, y oligonucleótidos

5.1.1 Cepas

Las cepas bacterianas y fúngicas utilizadas en este estudio se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas usadas y obtenidas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Procedencia	
<i>Escherichia coli</i>			
DH5 α TM	F ⁻ Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA – argF) U169recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) PhoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen®	
TOP10 TM	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen®	
<i>Neurospora crassa</i>			
Laboratorio Riquelme	Cepa	Genotipo	Procedencia
SMRP13	FGSC #988	mat a	FGSC*
SMRP14	FGSC#9013	mat A	FGSC
SMRP25	FGSC#9718	mat a; Δ mus-51::bar ⁺	FGSC
SMRP24	FGSC#9717	mat A his-3; Δ mus-51::bar ⁺	FGSC
SMRP17	FGSC #4317	mat A fl	FGSC
SMRP18	FGSC #4347	mat a fl	FGSC
SMRP51	FGSC #13408	mat A; chs-1::sgfp ⁺ ::hph ⁺	Sánchez-León et al., 2011
SMRP90	FGSC #13409	mat A his-3 ⁺ ; Pccg-1::chs-1 +::mcherryfp ⁺	Verdín et al., 2009
SMRP58	FGSC#14318	mat A; Δ chs-6::hph ⁺	FGSC
SMRP59	FGSC#14319	mat a; Δ chs-6::hph ⁺	FGSC
SMRP66	FGSC#21365	mat a; Δ chs-3::hph ⁺	FGSC
SMRP67	FGSC#21364	mat A; Δ chs-3::hph ⁺	FGSC
SMRP147	FGSC#21365	mat A; Δ chs-7::hph ⁺	FGSC
SMRP148	FGSC#21364	mat a; Δ chs-7::hph ⁺	FGSC
SMRP212	FGSC#21365	mat A; Δ chs-5::hph ⁺	FGSC
SMRP213	FGSC#21366	mat a; Δ chs-5::hph ⁺	FGSC
SMRP282	FGSC#22804	mat a; Δ chs-2::hph ⁺	FGSC
SMRP283	NRAF3d	mat a; Δ chs-1; Δ chs-3::hph ⁺	En este estudio
SMRP158	VMA-1-RFP	mat A his-3; ⁺ Pccg-1::tdimer2(12)::vma-1 ⁺	Laboratorio Bowman
SMRP93	TESM001-3	mat A his-3; Pccg-1::pma-1::sgfp ⁺	Laboratorio Riquelme

SMRP285	NRAF2	<i>mat a; Pchs-2::chs-2::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP286	NRAF4	<i>mat a; Pchs-4::chs-4::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP287	NRAF5	<i>mat a; Pchs-5::chs-5::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP89	NRAF6	<i>mat a; Ppma-1::pma-1::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP288	NRAF7	<i>mat a; Pchs-7::chs-7::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP290	NRAF8	<i>mat a; Pmyo-2::myo-2Δdil::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP291	NRAF9	<i>mat a; Ppmb::pmb::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	En este estudio
SMRP292	MYO-2-GFP	<i>mat a; Pmyo-2::myo-2::sgfp Δ mus-51::bar⁺</i>	Laboratorio Riquelme

*FGSC, Fungal Genetics Stock Center

5.1.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio.

Nombre del plásmido	Laboratorio Riquelme	Plásmido base	Genotipo	Procedencia
pGFP::hph::loxP	VMRP-48	pZErO-2	<i>gfp::hph::loxp</i>	Honda y Selker 2009

5.1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos generados y usados en este estudio se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Oligo	Nombre	Laboratorio Riquelme	SECUENCIA 5'-3'	Procedencia
hph SM-R		pMR260	TCGCTCGCTCCAGTCAATGACC	Laboratorio Freitag
hph SM-F		pMR261	AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG	Laboratorio Freitag
10XGly-F		pMR299	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG	Laboratorio Freitag
loxP-R		pMR298	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA	Laboratorio Freitag
OMF165 1		pMR456	CGGCTGAAGCACTGCACGCCG	Laboratorio Freitag
pMR10		pMR60	AGAGACAAGAAAATTACCCCTTCTT	Riquelme et al., 2007
pMR11		pMR61	AACTACAACAGCCACAACGTCTATATC	Riquelme et al., 2007
pMR12		pMR62	ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAG	Riquelme et al., 2007

pMR13		pMR63	ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAG	Riquelme et al., 2007
GFP-R		pMR226	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	Laboratorio Riquelme
ORFS1	chs5-P1	pMR151	CAGCTTTGCGGTTTCTGCTGC	En este estudio
ORFS2	chs5-P2	pMR152	cgcccttgcaccatCAGCTGGCCTGACAAGAGGGCTTC	En este estudio
ORFS3	UTR chs5-P3	pMR153	gggaaccagttaacgtcgacTTGCTGTTTGCCGTTGCTGTGATGC	En este estudio
ORFS4	UTR chs5-P4	pMR154	CGCTCTCAGCCACACTGGC	En este estudio
ORFS5	chs7-P1	pMR155	TGTACGGTCTCCAGGCGCTC	En este estudio
ORFS6	chs7-P2	pMR156	acagctctcgccttgcaccatCATGTTGCGCAACTC	En este estudio
ORFS7	UTR chs7-P3	pMR157	gggaaccagttaacgtcgacAGTGGAAACATGTGATCTGATAC	En este estudio
ORFS8	UTR chs7-P4	pMR158	CGGCATGAGCCGCGAGCCGGTC	En este estudio
ORFS21	Myo4 claseV-P1	pMR171	AAGGAGGCAAGTACCGATCAAC	En este estudio
ORFS22	Myo4 claseV-P2	pMR172	gcccttgcaccatCTTGACGATACTGACCATGAGATGC	En este estudio
ORFS23	UTR Myo4 claseV-P3	pMR173	gggaaccagttaacgtcgacACGTTTCATGATGCATTAGGTGC	En este estudio
ORFS24	UTR Myo4 claseV-P4	pMR174	TCCAAATGCAAAATACGCCCTG	En este estudio
ORFS25	Chs-2-P1	pMR176	CGTCGACCCTTTTAACTCGG	En este estudio
ORFS26	Chs-2-Gly R P2	pMR177	tccgctccgccgctccgccCCGCTCGCCAACCCCTCGCCCG	En este estudio
ORFS27	UTR chs-2 LOX F P3	pMR178	tgctatacgaagttagatccgagctcgTGTCTTGTGTTTGGG	En este estudio
ORFS28	UTR chs-2 R P4	pMR179	AGACGCACAACCTTGACCAACTAG	En este estudio
ORFS29	Chs-4-P1	pMR180	GCAAGCTGGGTTTCCGCCATCC	En este estudio
ORFS30	Chs-4-Gly R P2	pMR181	ccgctccgctccgccgctccgccAGCGTCCGAAAAGTAGTCATC	En este estudio
ORFS31	UTR chs-4 LOX F P3	pMR182	tatacgaagttagatccgagctcgGTTTTGATATGGTGTGCTG	En este estudio
ORFS32	UTR chs-4 R P4	pMR183	CGGACTAAAGATACGGAGAT	En este estudio
ORFS33	Chs-1-P1	pMR184	GGTTCTCTCTCGCTTCTACTGGC	En este estudio
ORFS34	Chs-1-Gly R P2	pMR185	cctccgctccgctccgccgctccgccGCGACGGGCAAAGCAGCA	En este estudio
ORFS45	Arg transporter F P1	pMR196	CGAGCCGGGTGCTTTTGCTCCCTA	En este estudio
ORFS46	Arg transporter R Gly P2	pMR197	tccgctccgctccgccgctccgccACCCATGATACCCGTTC	En este estudio
ORFS47	UTR 3' Arg	pMR198	tatacgaagttagatccgagctcgGGGGATGGTATAATGGAAGG	En este estudio

	transporter -LoxP F P3			
ORFS48	UTR 3' Arg transporter R P4	pMR199	CGCTTTCCGTCCTTCTGCAACCAC	En este estudio
ORFS54	PMA-1 F P1	pMR247	GCCCGGCTCTGAGGTCTACGAC	En este estudio
ORFS55	PMA-1 gly10x R P2	pMR248	ccgcctccgctccgcccgcctccgcccTTGCGACTTCTCATGCTGA G	En este estudio
ORFS56	UTR 3'PMA-1 LOXP F P3	pMR249	gctatacgaagtatggatccgagctcgGCGATATAATGATTTTCC	En este estudio
ORFS57	UTR 3' PMA-1 R P4	pMR250	CCACAAACCAGAAATAACCGTGCC	En este estudio
ORFS79	chs-2 P1 seq F	pMR379	GAAGTATGTGAAGGGGTGTACGG	En este estudio
ORFS81	chs-4 P1 seq F	pMR381	GAAATTATGGGTCTTTGTGGCG	En este estudio
ORFS83	chs-5 P1 seq F	pMR383	CTGACAACACTGCTTCTTAAGTTC	En este estudio
ORFS85	chs-7 P1 seq F	pMR385	CCTCGACGAAATGTGCGGTTC	En este estudio
ORFS87	PMA-1 P1 seq F	pMR387	CCTCCCCGTCACGATACCTAC	En este estudio
ORFS89	APS-1 P1 seq F	pMR389	GTCATTTTCGTCATCAACCTG	En este estudio

Bases en minúscula: corresponden a la secuencia necesaria para la fusión

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medios para *Neurospora crassa*

Para analizar el crecimiento y hacer observaciones microscópicas de *N. crassa* se utilizó el Medio Mínimo de Vogel (MMV), que contiene sales de Vogel 1X (Vogel, 1956) y sacarosa al 1.5 %. Para obtener medio sólido se le adicionó agar al 1.5%. Para obtener micelio para los análisis de contenido de quitina y actividad de CHS y GS, se usó medio completo de Vogel (MCV), que consiste en MMV con extracto de levadura al 0.5%, y caseína hidrolizada al 0.5%. Para llevar a cabo las cruza genéticas se usó el medio sintético de cruza (MSC) con sacarosa al 2%, sales de MSC 1X (Westergaard y Mitchell 1942), y agar al 1.5%. Para crecer conidios sometidos a transformación, se usó medio FGS de recuperación, que contiene sales de Vogel al 2%, agar al 1% y solución FGS al 10% concentración final (Sorbosa 20%, fructosa 0.5% y glucosa 0.5% [todos esterilizados por filtración]). Top-Agar conteniendo

sorbitol 2 M, sales de Vogel 1X, FGS 1X, y agar 1% se usó para mezclar los conidios transformados y agregarlos sobre el medio FGS.

Todos los medios fueron esterilizados por 15 min a 120 °C en una autoclave (VWR® Accu Sterilizer AS12). Cada medio fue suplementado con L-histidina (0.5mg/ml [esterilizado por filtración]) o higromicina (300 µg/ml) según se requería.

5.2.2 Medio para *Escherichia coli*

Para crecer *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) que contiene Bacto-Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%. Para medio sólido se añadió agar bacteriológico al 2%. Este medio fue suplementado con kanamicina (50 µg/ml) para seleccionar los transformantes de *E. coli* con el plásmido de resistencia al antibiótico. El medio fue esterilizado por 15 min a 120 °C.

5.3 Condiciones de crecimiento para *Neurospora crassa*

5.3.1 Condiciones para el crecimiento de conidios

5.3.1.1 Condiciones para obtener conidios

Las cepas de *N. crassa* se cultivaron en MMV. De acuerdo a los requerimientos de las diferentes cepas de *N. crassa* a utilizar, el MMV fue suplementado con L-histidina, un aminoácido básico que permite el crecimiento de las cepas auxótrofas para este aminoácido.

5.3.1.2 Condiciones para el análisis de conidiación

Para el análisis de conidiación, se inocularon 1×10^{10} conidios en 2 ml MMV sólido contenido en tubos de borisilicato de 10 ml. Se incubaron durante 4 días a 30°C sin luz, seguidos de 3 días con luz continua.

5.3.2 Condiciones para el crecimiento de micelio

5.3.2.1 Crecimiento de micelio para la extracción de ADN.

Para la obtención de micelio de *N. crassa*, se usaron matraces de 125 ml con 50 ml de MMV líquido que fueron suplementados en caso necesario con higromicina (300 µg/ml). Se inocularon con conidios (una asada de conidios es suficiente). Los matraces fueron

envueltos en papel aluminio para no dejar pasar luz. Se incubaron a 30°C por 2 días o 25°C por 3 días, sin agitación y en oscuridad.

5.3.3.2 Crecimiento de micelio para extracción y análisis de proteínas, contenido de quitina.

Para la obtención de micelio de *N. crassa*, se usó un matraz de 125 ml con 50 ml medio completo de Vogel (MCV) líquido que fue suplementado en caso necesario. Se inocularon 1×10^6 conidios/ml. Este matraz fue incubado a 30°C por 20 horas en agitación a 200 rpm. Nota: Para el fraccionamiento se usó un matraz de 1000 ml con 400 ml de MCV.

5.3.3 Condiciones para observar crecimiento radial

Para analizar el crecimiento se inocularon 5×10^4 conidios en 25 ml de MMV sólido, suplementado con diferentes agentes estresantes: Calcoflúor blanco (CCW; 0.2 mM), Congo Rojo (CR; 0.14 mM), sorbitol (500 mM), Nicomicina (0.2 mM), y cafeína 5 mM). Las placas fueron incubadas a 30 °C y las mediciones fueron realizadas a las 12, 15, 18 y 24 horas.

5.3.4 Condiciones para observar germinación

Para analizar la germinación se usó MMV con agar al 4%; se inocularon 1×10^5 conidios esparcidos por toda la placa, y se incubaron a 30°C por 5-8 h.

5.2.4 Colecta de células de *Neurospora crassa*

5.4.1 Conidios

Los conidios se cosecharon en condiciones de esterilidad; se agregaron 50 ml de sorbitol 1 M para lavar las paredes del matraz y se agitó vigorosamente para desprender el micelio y los conidios. Se filtró la solución a través de una tela (Magitel®) estéril para eliminar el micelio y los restos de agar, y se recuperó la suspensión de conidios en tubos de 50 ml que se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm. Dicha suspensión se lavó dos veces con 20 ml de sorbitol 1M, se centrifugó 5 min a 3000 rpm, y se resuspendió en 1 ml de sorbitol 1 M.

Para el análisis de conidiación, los conidios fueron cosechados usando 2 ml de H₂O destilada estéril que se agregaron a los tubos; se agitó vigorosamente el tubo y se colectó un ml de la suspensión; para su cuantificación se usó una cámara hemacitométrica (Neubauer).

5.4.2 Micelio

El micelio se cosechó mediante filtración. Se utilizó un embudo, el cual se cubrió con papel filtro (Whatman No. 1) que fue donde se colectó el micelio y se lavó con H₂O destilada estéril (aproximadamente 150 ml).

5.5 Análisis bioinformático

5.5.1 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos las secuencias de los genes se buscaron en la base de datos del genoma de *N. crassa* (www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora) y se utilizó el software fastPCR. Los oligonucleótidos pidieron sintetizarse a IDT Technologies (UNIPARTS-México) y Allele company. En la siguiente tabla 4 se muestran los números de acceso de cada gen de *N. crassa*:

TABLA 4. Número de acceso y homólogos de los genes usados en este estudio

Gen	Nombre del gen asignado por el Instituto Broad	Número de acceso en el genoma de <i>N. crassa</i>	Homólogo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Número de acceso en el genoma de <i>S. cerevisiae</i>
<i>chs-1</i>	chitin synthase-1	NCU03611	No	---
<i>chs-2</i>	chitin synthase A	NCU05239	chitin synthase 2 (Chs2p)	SCRG_02928.1
<i>chs-3</i>	chitin synthase-3	NCU04251	chitin synthase 1 (Chs1p)	SCRG_03321.1
<i>chs-4</i>	chitin synthase-4	NCU09324	chitin synthase 3 (Chs3p)	SCRG_02941.1
<i>chs-5</i>	chitin synthase-5	NCU04352	No	---
<i>chs-6</i>	chitin synthase-6	NCU05268	No	---
<i>chs-7</i>	chitin synthase 6	NCU04350	No	---
<i>myo-2</i>	myosin-2	NCU01440	Class V myosin (MYO2)	SCRG_01705.1
<i>pma-1</i>	Plasma membrane ATPase-1	NCU01680	Plasma membrane H ⁺ -ATPase (Pma1p)	SCRG_01016.1
<i>pmb</i>	Permease basic amino acid	NCU05168	arginine permease (Can1p)	SCRG_04407.1

5.5.2 Análisis de secuencias de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos de los genes enlistados en la tabla IV, fueron analizadas con el software ApE plasmid editor v2.0.44. Con este software también se analizó la posición de los oligonucleótidos. Además se llevaron a cabo clonaciones y restricciones *in silico* para corroborar que los insertos se encontraran en fase con la secuencia del plásmido y que los sitios de restricción no estuvieran dentro de la secuencia. Para verificar la calidad de los oligonucleótidos se usó el software PrimerAnalyzer (<http://primerdigital.com/tools/>).

5.5.3 Análisis de secuencias de aminoácidos

Para el análisis de los dominios de las proteínas se usó el portal de herramientas bioinformáticas Expasy (<http://expasy.org/tools/>) del Centro de Bioinformática de Suiza (SIB), dentro de la categoría de proteómica. Se usaron las siguientes bases de datos: Pfam Sanger center (dominios estructurales), big-PI Fungal Predictor (sitios GPI), SignalP 4.0 server (Peptido señal), PrePS-Prenylation Prediction Suite (sitios de prenilación), TMHMM server 2.0 (dominios transmembranales), String 9.0 (Interacciones proteína-proteína), y Clustal W 2.0 (Alineamientos).

5.6 Métodos para la manipulación de ADN

5.6.2 Extracción de ADN genómico

5.6.2.1 Extracción de ADN genómico de micelio

El micelio colectado se liofilizó, para llevar a cabo la extracción de ADN para la amplificación de fragmentos. Para ello se utilizó el kit ADN From Plant Tissue (Mini) DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.6.2.2 Extracción de ADN genómico de conidios

El protocolo que se siguió fue el descrito por Hervás-Aguilar et al., 2007 modificado por el laboratorio Oakley:

Se tomó una asada de conidios y se resuspendió en un tubo de 1.7 ml que contenía 0.15 ml de perlas de vidrio (0.45-0.5 mm) y 0.2 ml de buffer de rompimiento (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, y Tris-HCl 10 mM pH 8). Se incubó por 30 min. a 70 °C y se agitó cada 10 min. durante 30 seg. Se adicionó 0.1 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 5 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se formaron dos fases acuosas después de la centrifugación y se transfirieron 80 µl de la fase superior a un tubo nuevo de 1.7 ml con mucho cuidado de no perturbar la fase inferior. Para las reacciones de PCR se hizo una dilución de 1:10 y se tomó 5 µl como templado para la reacción.

5.6.3 Etiquetamiento de genes

5.6.3.1 PCR de Fusión

Se llevaron a cabo las amplificaciones de los siguientes fragmentos: el marco de lectura abierto del gen de interés (ORF, por sus siglas en inglés Open Reading Frame) utilizando los oligonucleótidos P1 y P2 y se utilizó ADN genómico de *N. crassa* como templado. Al oligonucleótido P2 se le adicionó una secuencia de aproximadamente 20 nt que corresponde al gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*). Para la región no codificante 3' (UTR) se utilizaron los oligonucleótidos P3 y P4. Al oligonucleótido P3 se le adicionó una secuencia de aproximadamente 20 nt que correspondió al gen *hph*. Para amplificar el cassette *gfp-hph* que contiene los marcos de lectura abierto de los genes de la *gfp* y el gen de resistencia a higromicina (*hph*=fosfotransferasa de higromicina), se utilizaron los oligonucleótidos 10XGly-F y LoxP-R y como templado se usó el vector pGFP::hph::loxp. Los fragmentos amplificados fueron purificados, y se usaron como templados para una PCR de fusión sucesiva, que es donde se llevó a cabo la unión de los fragmentos amplificados. Para la PCR de fusión que unió los fragmentos del marco de lectura abierto del gen de interés y el casete *gfp-hph*, se utilizaron los oligonucleótidos P1 y hph-SMR. Para fusionar la región no codificante 3' y un fragmento del gen *hph* se utilizaron los oligonucleótidos hph-SMF y P4. La PCR de fusión se esquematiza en la figura 8. Los productos de la PCR fusión fueron purificados, y se utilizaron para llevar a cabo la transformación de *N. crassa*. Las condiciones de PCR para la amplificación de cada fragmento se muestran en la tabla I del anexo I. Las condiciones para los PCR de fusión se muestran en la siguiente tabla:

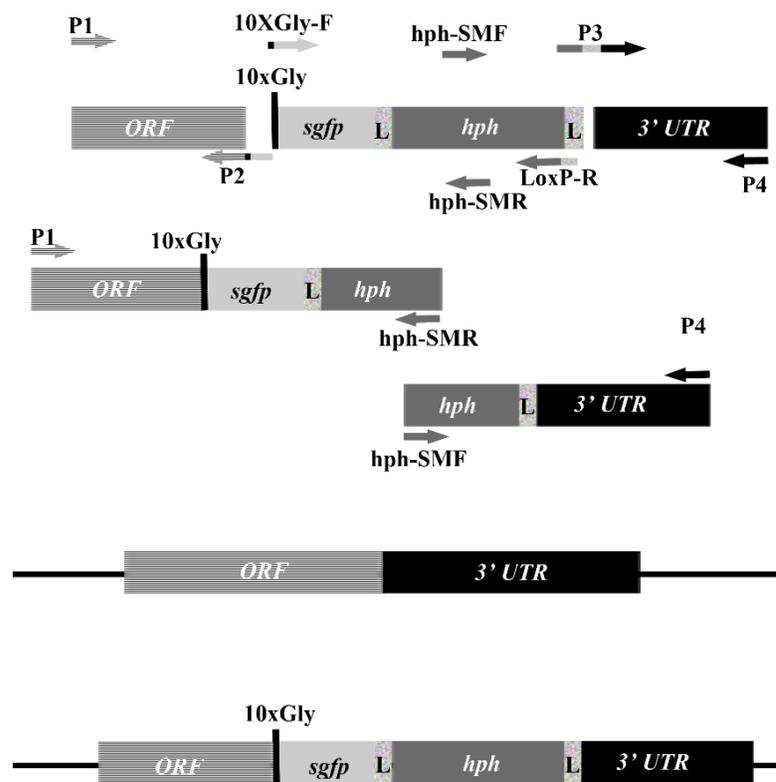


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de PCR de fusión. L= *LoxP*; 10X Gly= Brazo de diez glicinas; *hph*= Gen de resistencia a higromicina; *sgfp*= Gen de la proteína verde fluorescente; 3' UTR= Región no codificante 3'; ORF; Marco de lectura abierto; P1-P2= Par de oligonucleótidos que amplifican 1 kb del ORF; P3-P4= Par de oligonucleótidos que amplifican 1 kb del 3'UTR; *hph-SMF/R*= Oligonucleótidos cuya secuencia se encuentra a la mitad del gen *hph* en posición forward (F) o reverse (R); SM= Split marker (M. Riquelme comunicación personal).

Tabla 5. Condiciones para la PCR de fusión

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	2 min	1
94°C	30 seg	30
55°C o 58°C	4 min	
72°C	3:30	
72°C	5 min	

5.6.4 Recuperación de fragmentos de ADN de un gel de agarosa

La purificación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo empleando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una alícuota del ADN que se recuperó de la columna de afinidad eluyendo con 30 μ l de agua grado HPLC estéril (previamente calentada a 60°C), se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 80 V por 30 minutos para estimar la concentración y comprobar el tamaño del fragmento de ADN.

5.6.5 Extracción de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina tal y como lo indica el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001), a partir de un cultivo de 3 ml de medio LB con kanamicina (50 μ g/ml) inoculado con una colonia de células de *E. coli* e incubado de 12 a 16 h. El ADN plasmídico obtenido se resuspendió en 80 μ l de H₂O grado HPLC.

5.6.6 Transformación por electroporación para introducción de ADN en *Neurospora crassa*

Los conidios a transformarse (2.5×10^9 /ml) se resuspendieron en aproximadamente 90 μ l de sorbitol 1M estéril. La solución de conidios y sorbitol quedó espesa sin grumos. Si los conidios habían sido congelados anteriormente, se lavaron dos veces en tubos de 2 ml con sorbitol 1M. Se centrifugó en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad por 2 minutos. Después se resuspendió el pellet en sorbitol 1M (se añadió suficiente solamente para cubrir el pellet aproximadamente 100 μ l). Se tomaron 60 μ l para la transformación. Se mezcló 10 μ l de ADN del producto de PCR de fusión (0.5 a 1 μ g) con los 60 μ l de conidios (en hielo). Se transfirió a la celda de electroporación de 0.2 mm (después de usar la celda se lavó con cloro, etanol y agua destilada). Se conservaron las celdas 0.2 mm sobre hielo. Se dió un pulso de 600 O, 25 μ FD y 1.5 kV en un tiempo constante entre 12-14 milisegundos en el electroporador Bio-Rad Gene Pulser Xcell microbial system. Se añadió inmediatamente 1 ml de sorbitol 1 M, y se transfirió a un tubo conteniendo 15 ml de medio de regeneración

(Sales de Vogel 1x). Se incubaron las muestras a 30 °C en agitación lenta (20 rpm) durante 2-3 horas.

5.6.6.1 Plaqueo de los conidios transformados con fragmentos resultado de PCR de fusión

Después del tiempo de incubación se adicionaron 15 ml de top agar (FGS 10X, agar 1%, sales de Vogel 50X, sorbitol 2 M) a la suspensión de conidios, se mezcló y de esta solución se vertieron los 30 ml en 3 placas de Petri (10 ml en cada una) que contenía medio MMV suplementado con FGS (Fructosa 0.5%, Glucosa 0.5%, Sorbosa 20%) más higromicina B (200 µg/ml). Se incubaron a 30 °C por 3-4 días o hasta observar colonias.

5.6.7 Comprobación de la integración de los fragmentos etiquetados y de las cepas mutantes

5.6.7.1 Integración de Plásmidos

Para comprobar la integración correcta del gen de la *pma-1* etiquetado con el gen *gfp*, el cual está dirigido al locus *his-3*, se utilizaron los oligonucleótidos pMR10, pMR11, pMR12 y pMR13 (Riquelme et al., 2007). Los oligonucleótidos pMR10 y pMR11 amplifican una región de 3.2 Kb que comprende desde el gen *his-3* hasta el inicio de *gfp*. Los oligonucleótidos pMR12 y pMR13 se localizan al final del promotor *ccg-1* y en una región flanqueante 3' del gen *his-3* respectivamente, abarcando un región de 2.1 Kb (Fig. 9).

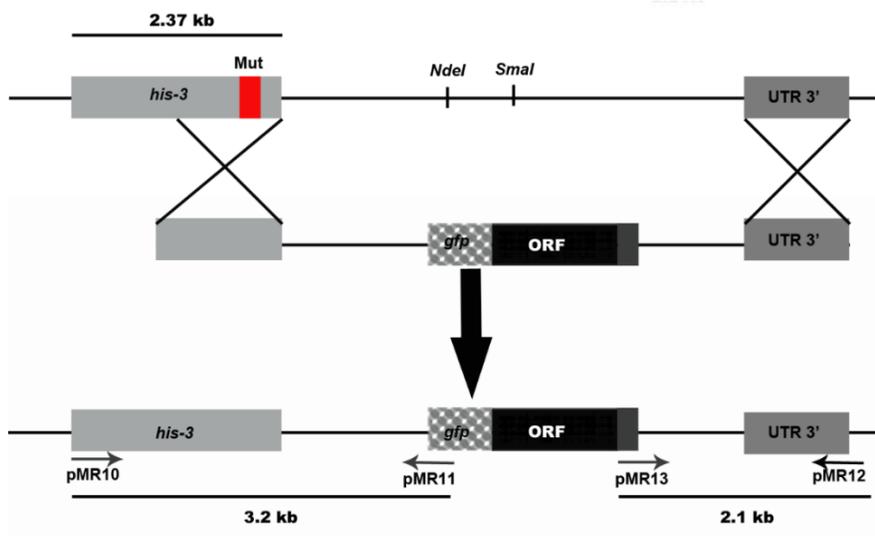


Figura 9. Esquema de la comprobación de la integración por medio de los oligonucleótidos pMR10, pMR11, pMR12 y pMR13.

5.6.7.2 Integración de fusiones

Las integraciones de las fusiones en el genoma de *N. crassa* fueron comprobadas amplificando un fragmento de aproximadamente 2.0 Kb usando los oligonucleótidos P1seq-F y GFP-r (el oligonucleótido P1seq-F es específico para cada gen, y el oligonucleótido GFP-r es general, ver Tabla 3). En la figura 10 se muestra la posición de los oligonucleótidos utilizados. Para comprobar que la secuencia integrada no contenía ninguna mutación se usaron los oligonucleótidos P2seq-F y hph-SMR que amplifican un fragmento de 2.1 Kb, y el amplicón obtenido fue enviado para su secuenciación a la compañía Retrogen (<http://www.retrogen.com/>).

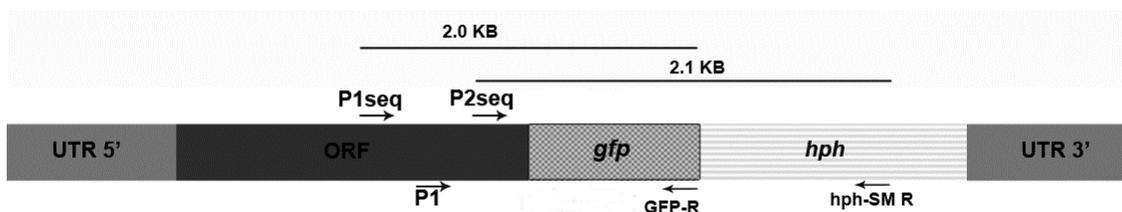


Figura 10. Esquema de la comprobación de la integración de las fusiones en el genoma de *N. crassa*.

5.6.7.3 Cepas mutantes

La comprobación de las cepas mutantes se llevó a cabo mediante PCR, incluyendo como control una reacción de PCR para amplificar el gen blanco usando ADN genómico de la cepa FGSC#988 como templado. Este control nos sirvió para verificar que las condiciones de PCR fueron las correctas; otra reacción de PCR se llevó a cabo para amplificar el gen blanco con ADN genómico de la cepa mutante; con esta reacción se comprobó la ausencia del gen blanco. Como segundo control, se amplificó una kilobase del gen *pma-1* que debería estar presente en el genoma de las mutantes y también el gen *hph* el cual se utilizó para reemplazar el gen blanco o en su defecto interrumpirlo.

5.7 Métodos genéticos en *Neurospora crassa*

5.7.1 Cepas homocariones

Se colectaron conidios con agua desionizada estéril de las cepas con tipo de apareamiento *mat a* y se lavaron con sorbitol (1M). Se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de VMM. Se esparcieron los conidios sobre el micelio de la cepa con tipo apareamiento *mat A*, crecido previamente en medio sintético de cruzas (MSC) bajo en nitrógeno. Las placas se incubaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 15 días hasta observar la presencia de peritecios en la placa y obtener ascosporas. Las ascosporas se sometieron a choque térmico a 60°C durante una hora y se sembraron en placas con VMM sólido e incubaron a 28°C por 12 horas, hasta observar ascosporas germinadas. Se colectaron 15-30 ascosporas germinadas con ayuda de una pipeta Pasteur y se inoculó cada una de éstas en tubos de borosilicato conteniendo 2 ml de VMM suplementado con higromicina B (200 µg/ml). Para su posterior

selección, se tomaron las colonias que tuvieran un fenotipo normal y que mostraran fluorescencia.

5.7.2 Cepa doble mutante

La cepa doble mutante fue obtenida mediante cruza genéticas. El método que se llevó a cabo fue similar al descrito en la sección 5.7.1; la diferencia radica en las cepas utilizadas para las cruza; ambas eran homocariones mutantes por lo que la progenie que se seleccionó fue aquella que carecía de ambos genes. Se comprobó la ausencia de los genes mediante PCR como se describe en la sección 5.6.7.3.

5.7.3 Análisis de formación de peritecios en cepas mutantes simples

Para estudiar el papel de las CHS en la formación de peritecios se realizaron cruza homocigóticas entre las cepas mutantes del mismo gen de *chs mat a* y *mat A*. Se hizo la cruza como se describe previamente en la sección 5.8.1. Se incubó durante 30 días hasta observar peritecios; se usó como control la cepa FGSC#9718.

5.8 Métodos para el análisis de proteínas

5.8.1 Centrifugación por gradiente de densidad

Este método se llevó a cabo como se detalla en Verdín, et al., 2009. El micelio de *N. crassa* fue cosechado por filtración, lavado con H₂O desionizada fría. El micelio (10 g aproximadamente), se mezcló con 10 g de perlas de vidrio (0.5 mm) y 15 ml de 10% sacarosa en un buffer de homogenización (Buffer de fosfatos 33 mM, pH 8.2 suplementado con inhibidores de proteasas), y se rompió en un homogenizador Braun MSK por 2 x 30 segundos. Después del rompimiento celular, las células homogenizadas fueron centrifugadas a 600 x g, 10 min, 4°C. El sobrenadante se mantuvo aparte mientras el precipitado fue extraído con 5 ml de sacarosa al 10% en el buffer de homogenización y se centrifugó otra vez a 600 x g (Rav), 10 min, 4°C. Ambos sobrenadantes fueron mezclados (sobrenadantes 0.6K), en la parte superior del gradiente de sacarosa lineal de 33 ml (10-65%, w/v) con el buffer de homogenización y se centrifugaron a 58000 x g por 6.5 h, 4°C, en un rotor Beckman 70 Ti. El gradiente se fraccionó (2 ml) desde la parte superior con un fraccionador ISCO y

se usó sacarosa al 70% como solución de seguimiento. Todas las fracciones fueron utilizadas para medir la actividad de quitina sintasa. La densidad y la absorbancia (280 nm) también fueron medidas.

5.8.2 Western blot

5.8.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para el análisis de fracciones, volúmenes iguales (30 μ l) de las fracciones seleccionadas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 6-8 % (Laemmli, 1970), como buffer de corrida se usó el buffer Laemmli 1X (Glicina 1.92 M, Tris-base 250 Mm, Dodecil sulfato de sodio [SDS] 4%). Cuando se usó extracto total se cargaron 50-100 μ g. La concentración de proteína fue cuantificada con el método de Bradford (Biorad). Las muestras fueron mezcladas con el buffer de carga 4X (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0.025%, β -mercaptoetanol 0.5%) en una relación para la muestra de 1:4. Posteriormente la muestra se sometió a calentamiento durante 30 min a 37°C.

5.8.2.2 Electrotransferencia de proteínas

Se llevó a cabo la transferencia húmeda, para el caso de proteínas de alto peso molecular (>100 kDa); para ello se usó la cámara de transferencia mini-protean (Biorad). Las proteínas observadas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Whatman) o PVDF, en las cuales se llevó a cabo la inmunoreacción. En la transferencia húmeda se usó el buffer de transferencia a 1X (SDS 0.02%, Tris-base 0.25M, Glicina 1.92M y Metanol 10%). La membrana fue teñida con Ponceau 0.1% (Ponceau 0.1% y ácido tricloroacético 3%) para observar la concentración de proteína transferida a la membrana y se lavó dos veces con agua destilada. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomasie para observar la proteína no transferida. El gel teñido con Coomasie fue desteñido con la solución de destinción (Metanol 20% y ácido acético 15%).

5.8.2.3 Bloqueo de membrana

Para el bloqueo de la membrana se usó TBS (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.5 M) con leche al 5% (non-fat dry milk Stater® Bros.) por una hora a temperatura ambiente.

5.8.2.4 Inmunodetección y revelado

Para las proteínas etiquetadas con GFP se utilizó el anticuerpo de ratón anti-GFP (Santa Cruz) (1:500) disuelto en TBS con leche al 5%; la incubación fue a 4°C durante toda la noche. Se lavó 3 veces con TBS-T por 5 min. Después la membrana, fue incubada con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:2000) disuelto en TBS-leche 5% a 4°C por 2 h. Se lavó 3 veces con TBS-T por 5 min. El Western blot fue revelado con el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (basado en Luminol), siguiendo las especificaciones del fabricante.

5.8.3 Contenido de quitina

Para la cuantificación del contenido de quitina se usó el método de Morgan-Elson (Morgan y Elson, 1934), el cual se describe a continuación:

El micelio se liofilizó y se pulverizó. Se usaron 5 mg de micelio de cada cepa mutante (se hizo por triplicado cada muestra) en un tubo de 1.7 ml con 1 ml de 6 N HCl, se incubó a 100°C por 20 h (baño María), y se evaporó el HCl en un termobloque a 100°C durante 3-5h aproximadamente, dentro de una campana de extracción. El material secado se resuspendió en 1 ml de H₂O destilada estéril y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min.; el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo de 1.7 ml. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y mezclaron con 100 µl de la solución 1 (1.6 g Na₂CO₃ 400 µl Acetilceltona en 10 ml de agua). Se preparó N-acetilglucosamina para la curva estándar. Se usaron 100 µl de H₂O como control. Se adicionaron 100 µl de la solución 1 al control y a cada concentración de la curva estándar (se hizo por triplicado). Los tubos se incubaron a 100°C por 20 min. en un termobloque y se enfriaron a temperatura ambiente. Se adicionaron 700 µl de 95% etanol, tanto a las muestras como a los estándares y se agregaron 100 µl de la solución 2 (260 mg p-dimetilaminobenzaldehído, 5 ml de HCl 12 N y 5 ml 100% etanol) y se mezcló. La reacción se incubó por 1h a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 520 nm en el espectrofotómetro.

5.8.4 Coinmunoprecipitación mediante GFP-TRAP®

5.8.4.1 Rompimiento celular

Al micelio en incubación (ver apartado 5.3.2) se le adicionaron 11.2 ml de formaldehído al 37% y se incubó 20 min. adicionales a temperatura ambiente (TA) en agitación lenta. Se le adicionaron 16 ml de glicerol 2.5 M e incubaron 10 min a TA en agitación lenta. Se filtró el cultivo y se lavó 3 veces con Buffer de lisis (Buffer de fosfatos 33 mM pH8.2, Triton-100X 0.3%). Se trituró el micelio con nitrógeno líquido. El micelio triturado se puso en un tubo falcón de 10 ml al cual se le agregaron 5 ml de Buffer de lisis con inhibidores de proteasas (DTT 1.5 mM, Roche Potrease inhibitors [Se siguieron las especificaciones del proveedor], Benzamidina 1.5 Mm, PMSF 1 mM). Se agitó por 1 min y esta mezcla se pasó a un tubo de ultracentrífuga Sorvall. Se centrifugó 15,000 rpm por 20 min. Se rescató el sobrenadante (Extracto total). Se usaron 5 ml aproximadamente en un tubo falcón de 10 ml.

5.8.4.2 Co-Inmunoprecipitación con las perlas de agarosa cubiertas del anticuerpo anti-GFP (GFP-TRAP® Cromotek)

Se lavaron 30 μ l de las perlas con GFP-TRAP® en Buffer de Lisis. Se agregaron las perlas a los 5 ml del extracto total. Se incubó 2-3 horas a 4°C. Después se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min. a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 5 ml de buffer de lisis. Se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min. a 4°C. Se volvió a desechar el sobrenadante, pero se dejó de 0.5-1 ml del sobrenadante. Se traspasó todo a un tubo de 1.7 ml usando una punta de pipeta con la punta cortada y se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min. a 4°C. Se desechó completamente el sobrenadante. Se agregaron 50 μ l de Buffer de carga 3X-SDS. Se incubó durante 10 min. a 95°C. Se usaron 20 μ L del Co-IP para correr un gel SDS-PAGE. Se llevó a cabo un Western blot como se describe en la sección 5.8.2. Los 30 μ l restantes del Co-IP se usaron para correr un gel SDS-PAGE, el cual se tiñó con Coomassie. Se cortó el carril (con extrema limpieza) para posteriormente llevar a cabo la digestión con tripsina.

5.8.4.3 Digestión con tripsina para la secuenciación de proteínas

Para identificar las proteínas mediante LCMS (por sus siglas en inglés, Liquid chromatography-mass spectrometry), los carriles cortados provenientes de la CoIP (GFP-TRAP®) fueron digeridos con la proteasa tripsina (Promega); esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

Los carriles del gel fueron cortados en pequeñas piezas y puestos en tubos de 1.7 ml; a éstos se les adicionaron 30 µl de acetonitrilo al 100%, se incubaron durante 10 min. a TA, y se evaporó el acetonitrilo en una centrífuga speed vac (a nivel medio). A la muestra se le adicionaron 150 µl de DTT 100 mM (disuelto en NH_4HCO_3 100mM) y se incubó a 56°C por una hora. Se eliminó el DTT con una pipeta, se le adicionaron 150 µl de idoacetamida 55 mM (disuelto en NH_4HCO_3 100mM) y se incubó 45 min. a TA en oscuridad. Se eliminó la idoacetamida con una pipeta y la muestra se lavó con 150 µl de NH_4HCO_3 100mM, se incubó 10 min. a TA, se eliminó la solución, se le agregaron 150 µl de acetonitrilo 100%, y se incubó 10 min. a TA. Se eliminó la solución y se repitió el lavado una vez más. Se eliminó el exceso de humedad usando la centrífuga speed vac (nivel medio). Se le adicionaron 30 µl del buffer de digestión, el cual contiene la tripsina (la tripsina se diluyó 1:20 con NH_4HCO_3 50 mM). Se incubó por 45 min. a 4 °C. Después se eliminó el buffer de digestión y se le adicionaron 30 µl de NH_4HCO_3 50 mM y se incubó toda la noche. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por un min. a TA; se colectó el sobrenadante en un tubo de 1.7 ml. Se le volvió a adicionar 30 µl de NH_4HCO_3 50 mM, se incubó 10 min. a TA y se volvió a colectar el sobrenadante adicionándose en el mismo tubo de 1.7 ml. Una vez más se le adicionaron 30 µl de acetonitrilo al 30 % con ácido fórmico al 5% y se incubó 20 min a TA. Después se centrifugó y se colectó el sobrenadante en el tubo de 1.7 ml. Se repitió dos veces más el paso de acetonitrilo-ácido fórmico colectándose el sobrenadante. Finalmente el sobrenadante fue evaporado y la pastilla fue disuelta en 20 µl de H_2O con acetonitrilo 5% y ácido fórmico 0.1%, para posteriormente ser analizada en LC-MS; esta parte se llevó a cabo en la Universidad Georg-August en Göttingen, Alemania en el Laboratorio del Dr. Gerhard Braus.

5.9 Métodos de microscopía

5.9.1 Microscopía confocal

Las hifas en crecimiento fueron observadas a 20° C o 22° C usando los microscopios confocal de barrido con láser META LSM-510 Zeiss invertido y Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan). En ambos se usó el láser argon/2 con un set de filtros para GFP (excitación 488nm: emisión 510 nm). Se usó el objetivo 100X Ph3 Plan Neofluar de inmersión (N.A. 1.4) en el microscopio Zeiss, y el objetivo 60x, *Plan Apocromático* de inmersión en aceite (1.42 N. A) para el microscopio Olympus.

5.9.2 Microscopía de campo evanescente (TIRFM)

Para visualizar un área de aproximadamente 200-300 nm del citoplasma cercano a la MP, se usó TIRFM (por sus siglas en inglés Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), que además tiene una resolución temporal muy alta y un láser con baja toxicidad, lo cual permitió visualizar el tráfico vesicular en un tiempo cercano al real con poco daño a la célula. Los datos fueron procesados y analizados con MetaMorph 6. (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Esta parte se llevó a cabo en Arizona State University, Tempe, con la ayuda del Dr. Robert Roberson.

5.9.3 Microscopía de bajo aumento (Estereoscopio)

Para el análisis del crecimiento radial de colonia de las cepas que se examinaron, se sembraron 1×10^4 conidios en una caja Petri con VMM en una orilla de la caja. Las muestras se incubaron a 30°C durante 15 h. Se tomaron imágenes a los aumentos de 10X y 40X de los márgenes de las colonias así como de las ramificaciones usando el estereoscopio SZX12 (Olympus®).

Capítulo 6

Resultados

Parte 1: 6.1 Quitina sintasas (CHS)

6.1.1 Localización de las quitina sintasas CHS-2, CHS-4, CHS-5 y CHS-7 etiquetadas con proteínas fluorescentes.

6.1.1.1 Etiquetamiento endógeno

6.1.1.1.1 Amplificaciones de fragmentos y fusiones de los genes *chs*

Para conocer la distribución celular de las CHS-2, CHS-4, CHS-5 y CHS-7 en hifas de *N. crassa*, llevamos a cabo el etiquetamiento de cada una de los genes correspondientes con el gen de la *gfp* usando la técnica de “Split marker” Knock-In (Fig. 7) y *hph* como marcador de selección (descrito en la sección 5.6.3.1). En la figura 11A se muestran las amplificaciones correspondientes a los fragmentos de una kilobase del marco de lectura abierto (ORF, O), y la región no traducida 3' (UTR, U); además se muestran las amplificaciones de las fusiones izquierda (I) y derecha (D) para cada uno de los genes *chs* (Fig. 11C).

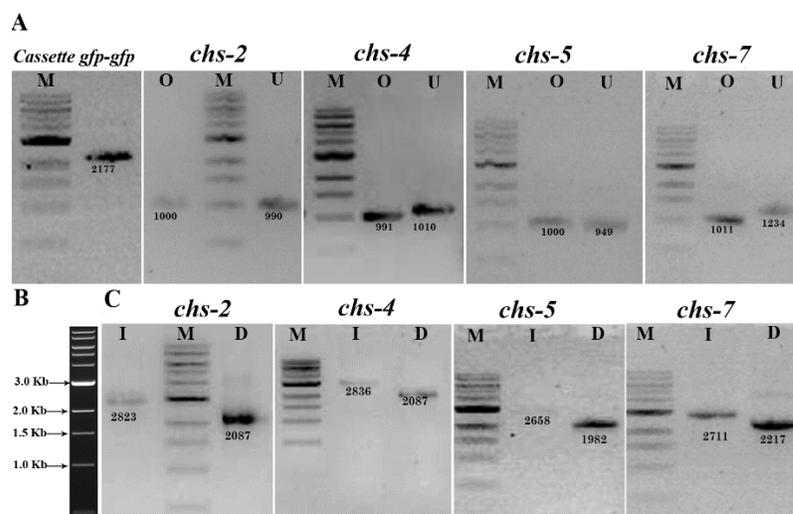


Figura 11. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados, el cassette y las fusiones. A) Amplicón correspondiente al cassette *gfp-hph*, del marco de lectura abierto región 3' (~1Kb) y de la región no traducida 3' (~1Kb) para las CHS clase II, IV, V y VII. Carril O, fragmento del marco de lectura abierto; carril U, fragmento de la región no traducida 3'. B) Marcador de peso molecular Fermentas® usado en cada gel, carriles M. C) Amplicones de las fusiones, carril I, Fusión izquierda; carril D, Fusión derecha.

6.1.1.1.2. Amplificación y fusión de la miosina MYO-2 clase V versión truncada

Con el fin de conocer si las CHS viajan hacia el SPK con la ayuda de proteínas motoras asociadas a actina, llevamos a cabo el etiquetamiento de la miosina MYO-2 clase V, la cual se ha reportado como la clase de miosinas que ayudan en el transporte de vesículas en levaduras (Jonhston et al., 1991). Esta proteína fue etiquetada con GFP, en la parte carboxilo terminal, pero eliminando el dominio DIL (104 aa, Q1378-E1481), el cual está involucrado en la unión de las vesículas (Fig. 20A).

El etiquetamiento se llevó a cabo de la misma manera que para las CHS. Se utilizó el cassette *gfp-hph*, y para este caso se usaron los oligonucleótidos de la miosina, ORFS21-P1 /ORFS22-P2 para amplificar ~1 Kb del ORF región 3' y los oligonucleótidos ORFS23-P3 /ORFS24-P3, para amplificar la región no traducida 3' (Fig. 12 B, C).

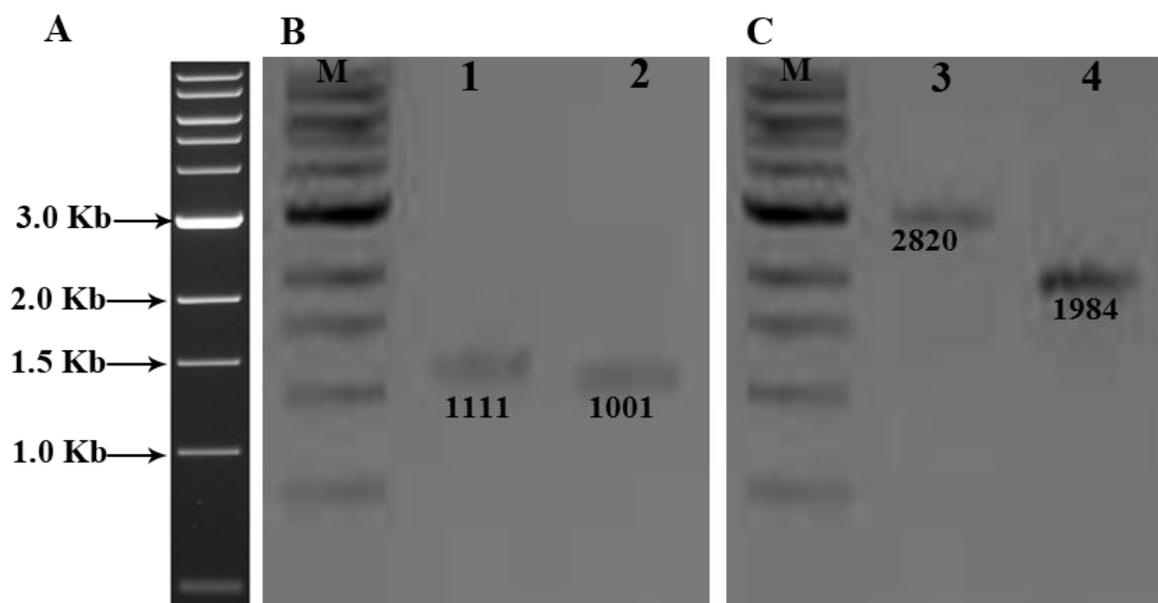


Figura 12. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados y fusiones de la MYO-2 clase V. A) Marcador de tamaño molecular de Fermentas®, usado en cada gel, carril M. B) Amplificación de los fragmentos carril O, marco de lectura abierto; carril U, región no traducida 3'. C) Amplificación de las fusiones, carril I fusión izquierda, carril D fusión derecha.

6.1.1.2. Obtención de cepas expresando CHS-GFP

6.1.1.2.1 Transformantes expresando las proteínas CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP, CHS-7-GFP.

En trabajos anteriores se ha descrito la localización de las CHS-1, CHS-3 y CHS-6 correspondientes respectivamente a las clases III, I y VI en *N. crassa* (Riquelme, et al., 2007; Sánchez-León et al 2011). En estos estudios se observó la localización de estas CHS en el núcleo de SPK y en el septo en formación, lo que sugiere un papel de las CHS en ambos sitios. En este trabajo se analizó la localización del resto de las CHS: CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP, y CHS-7-GFP. .

Se seleccionaron transformantes heterocariones resistentes a higromicina (300 g/ml) transformados con las fusiones *chs-2*, *chs-4*, *chs-5* y *chs-7-gfp* que mostraron fluorescencia, las cuales se nombraron TRAF2, TRAF4, TRAF5 y TRAF7 respectivamente. Las transformantes positivas (TRAF2, TRAF4, TRAF5 y TRAF7) se cruzaron con la cepa WT (N150) para obtener las cepas homocariones NRAF2, NRAF4, NRAF5 y NRAF7. Mediante el análisis de microscopía confocal se observó una localización en el ápice de todas las CHS similar a las CHS reportadas previamente (Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011). CHS-2, CHS-4, CHS-5 y CHS-7-GFP se localizaron en el núcleo del SPK pero en diferente proporción, sugiriendo poblaciones diferentes de quitosomas (Fig. 13G, H, O, P). Sin embargo, en el septo la CHS-2-GFP, y la CHS-4-GFP presentaron una localización diferente a la observada para las demás CHS (Fig 13Q, R). A diferencia de las CHS-1, -3, -5, -6, y -7, que se encuentran alrededor de todo el septo (Fig. 13, S,T; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011), CHS-2-GFP se acumulaba en la MP lateral durante el comienzo de la formación del septo y avanzaba centrípeta y progresivamente hasta llegar al poro central (Fig. 13Q). CHS-4-GFP aunque también mostró una distribución en todo el septo, del mismo modo que la CHS-2-GFP mostró una localización más intensa en el centro del septo en la zona del poro septal (Fig. 13R)

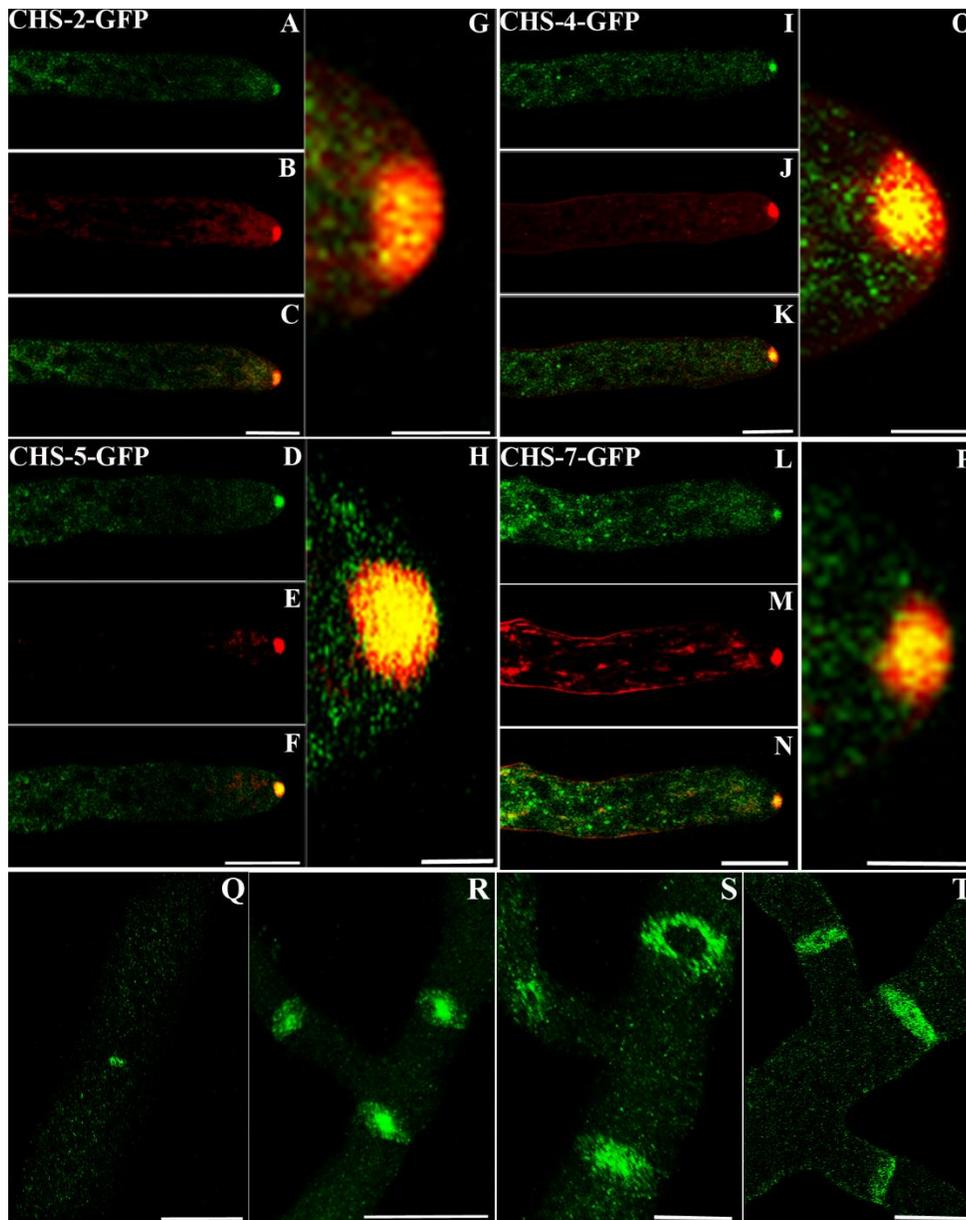


Figura 13. Localización de las CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP, y CHS-7-GFP. A-C, G, Q) Localización de la CHS-2-GFP; A y C) Localización CHS-2-GFP en la punta de la hifa. G) Aumento de la región apical de la hifa (C). Q) Imagen 3D de la localización de la CHS-2-GFP en el septo. I-K, O, R) Localización de la CHS-4-GFP; I y K) Localización CHS-4-GFP en la punta de la hifa. O) Aumento de la región apical de la hifa (K). R) Imagen 3D del septo, donde se observa la localización de la CHS-4-GFP. D-F, H, S) Localización de la CHS-5-GFP; D y F) Localización CHS-5-GFP en la punta de la hifa. S) Aumento de la región apical de la hifa (F). S) Imagen 3D del septo, donde se observa la localización de la CHS-5-GFP. L-N, P, T) Localización de la CHS-7-GFP; L y N) Localización CHS-7-GFP en la punta de la hifa. P) Aumento de la región apical de la hifa (N). T) Imagen 3D del septo, donde se observa la localización de la CHS-7-GFP. B, J, E y M) Tinción con FM4-64. A-C, I-J, D-F, L-N) Barras= 10 μ m; G, H, O y P) Barras= 2.5 μ m; Q-T) Barras= 20 μ m.

6.1.1.2.2 Crecimiento colonial y comprobación de integraciones en las cepas CHS-GFP

Para corroborar la viabilidad de las cepas que contienen las proteínas etiquetadas con la GFP, se comprobó la integración de las fusiones en el genoma de las cepas transformantes seleccionadas, así como su crecimiento y morfología colonial, lo que se muestra en los siguientes apartados.

6.1.1.2.2.1 Confirmación de las integraciones por PCR

Mediante reacciones de PCR se corroboró la correcta integración de las fusiones para cada una de las CHS como se explica en la figura 10 (ver sección 5.6.7.2), usando el par de oligonucleótidos P1seq-F/GFP-R. Para *chs-2* se usó ORFS79-P1seq/GFP-R; para *chs-4*, ORFS81-P1seq/ GFP-R; *chs-5*, ORFS83-P1seq/ GFP-R; *chs-7*, ORFS85-P1seq/GFS-R (Fig. 14).

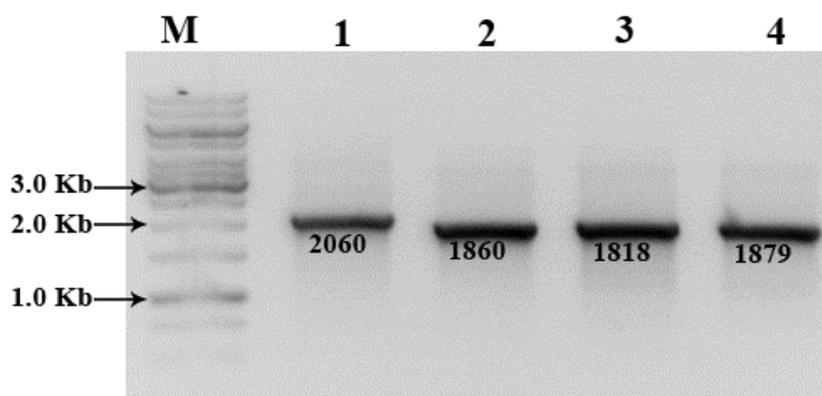


Figura 14. Comprobación de la integración de las fusiones en las cepas que expresan CHS-GFP. Carril M: Marcador de tamaño molecular. Carril 1: PCR de integración de la cepa que expresa CHS-2-GFP. Carril 2: PCR de integración de la cepa que expresa CHS-4-GFP. Carril 3: PCR de integración de la cepa que expresa CHS-5-GFP. Carril 4: PCR de integración de la cepa que expresa CHS-7-GFP. En la parte inferior de los amplicones se muestra el tamaño exacto de cada amplicón.

6.1.1.2.2.2. Crecimiento de la colonia de las cepas que expresan las CHS-GFP

Se observó una morfología y un crecimiento radial de la colonia normal en todas las cepas que expresan CHS-GFP, aunque se observó una pequeña disminución en el crecimiento radial, en las cepas CHS-5-GFP y CHS-7-GFP, con respecto a la cepa FGSC#9718 (cepa parental). Esta disminución no fue significativa, concluyendo que las cepas con las CHSs etiquetadas con GFP, no están afectadas por dicho etiquetamiento (Fig. 15).

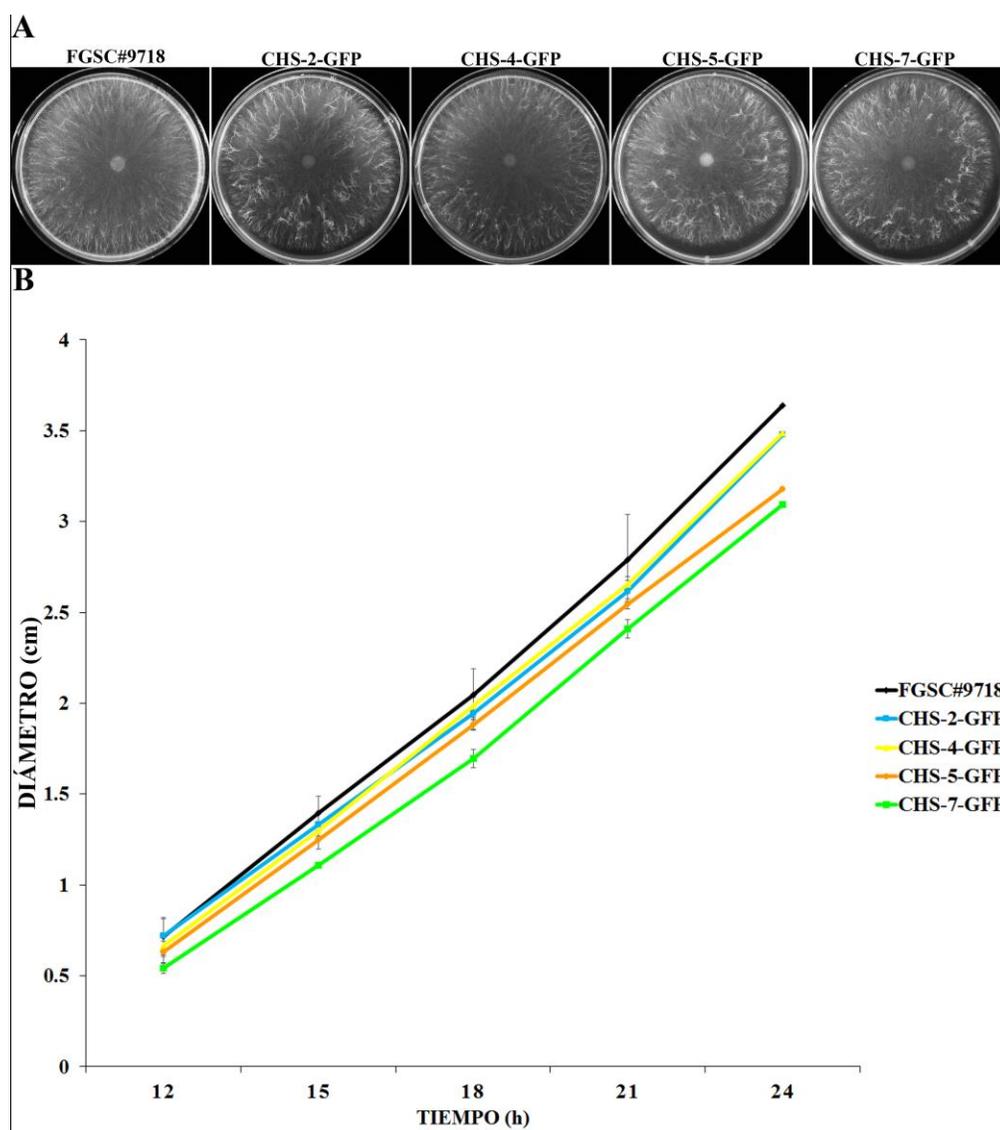


Figura 15. Crecimiento radial de las cepas expresando CHS etiquetadas con GFP. A) Morfología de la colonia de las cepas FGSC#9718 (cepa parental), CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP y CHS-7-GFP. B) Gráfica del crecimiento de las cepas que expresan las diferentes CHS etiquetadas con GFP.

6.1.2. Análisis de microscopía de las cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes

6.1.2.1 Efecto del inhibidor Brefeldina A

Para explorar la ruta de secreción seguida por el reciclamiento de la proteína, se usó el inhibidor BFA, el cual como se ha descrito previamente bloquea la salida de las vesículas de Golgi en la ruta de secreción convencional y a su vez en la ruta de endocitosis. Se adicionó el inhibidor BFA (200 $\mu\text{g/ml}$) a las cepas CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, y CHS-5-GFP. En todos los casos observamos una disminución en la velocidad del crecimiento, así como un hinchamiento en la punta de las hifas; no obstante las CHSs continuaban localizándose en el SPK, inclusive se observó un aumento en el diámetro del SPK (Fig. 16). Además se pudo observar una acumulación de vesículas en la en la región subapical en CHS-2-GFP (Ver flechas en B y C); CHS-4-GFP y CHS-5-GFP se localizaron en la MP de las región apical (ver flechas en E y H).

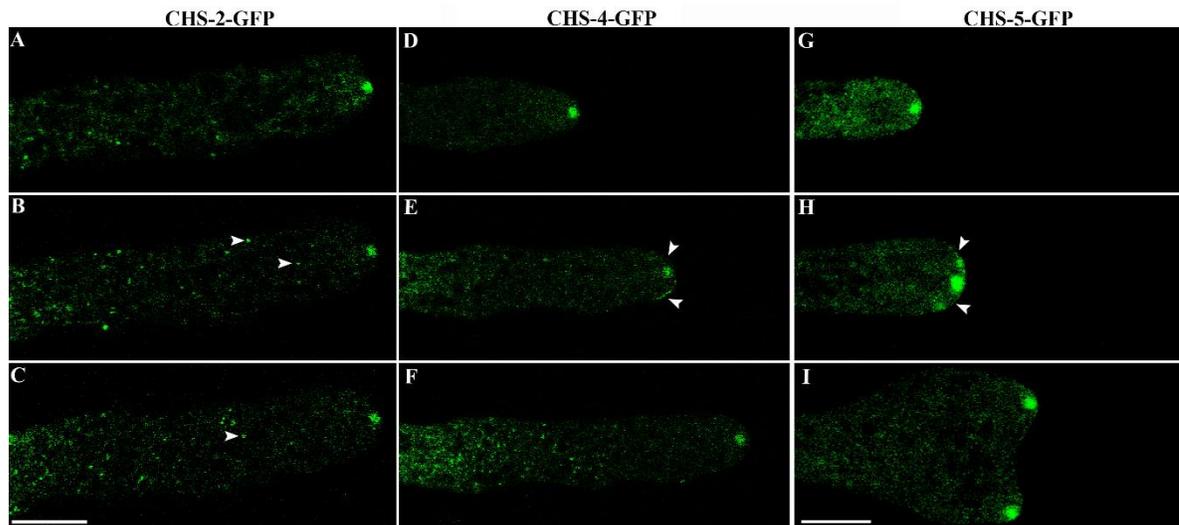


Figura 16. Efecto del inhibidor Brefeldina A en las CHS-2-GFP, CHS-4-GFP, CHS-5-GFP. A-C) CHS-2-GFP bajo el efecto de la BFA a los 40 min. D-E) CHS-4-GFP a los 30 min de la adición de BFA. G-I) CHS-5-GFP a los 26 min de exposición con BFA. Barras: 10 μm .

6.1.2.2 Colocalización de la CHS-1 y la CHS-5

En trabajos previos de CHS en *N. crassa*, se ha descrito que las CHS-1, CHS-3 y CHS-6 viajan en diferentes poblaciones de vesículas (Sánchez-León, et al., 2011). Con la idea de conocer si hay una población para cada clase de CHS, llevamos a cabo la coexpresión de las CHS-1 y CHS-5. Mediante una cruce genética se obtuvo una cepa que expresaba ambas clases de CHS; esta cepa fue denominada NRAF5a. Se observó una localización central de la CHS-5-GFP en el SPK, y la CHS-1-mChFP parece estar localizada en un área más amplia que la CHS-5 por lo que solo observamos una colocalización parcial en el SPK de ambas clases (Fig. 17C y E). En las regiones subapicales se observaron pequeñas vesículas que al parecer solo contienen CHS-1-mChFP, debido a que no se observó una colocalización en esas áreas (Fig. 17B, C y D, flechas). Durante la formación del septo al parecer ambas proteínas llegan al mismo tiempo, aunque se puede observar diferente distribución de ambas proteínas durante la formación del septo (Fig. 17F-H). Estos resultados sugieren que hay una población de vesículas para la clase V, y además respaldan la teoría de que hay diferentes poblaciones de vesículas que contienen diferentes CHS.

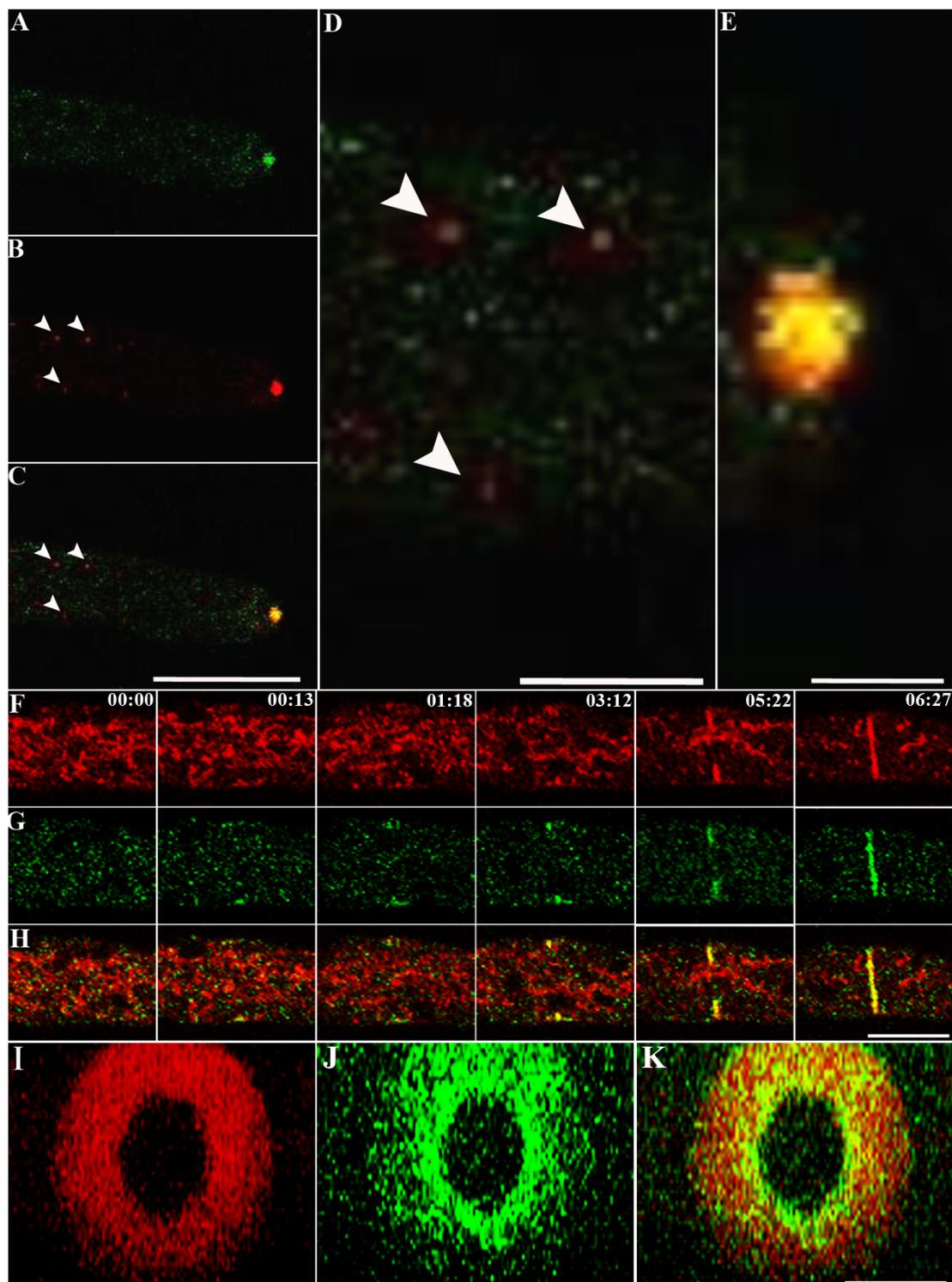


Figura 17. Colocalización de CHS-1-mChFP y CHS-5-GFP. A, G Y J) CHS-5-GFP; B, F e I) CHS-1-mChFP; C, H y K) Traslape de CHS-1-mChFP y CHS-5-GFP. D y E) Aumento de las regiones subapicales y apical de la hifa C. I-K) Imagen en 3D del septo; C) Barras= 20 μ m, H, K) Barras= 5 μ m, D y E) Barras= 2.5 μ m.

6.1.2.3 Importancia del citoesqueleto en la distribución de las CHS

6.1.2.3.1 Microscopía de evanescencia (TIRFM) de la cepa CHS-5-GFP

Mediante TIRFM (por sus siglas en inglés: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) observamos el movimiento de las vesículas que contienen CHS-5-GFP, clase V, que contiene el dominio motor de miosina. Destacaron unos filamentos cortos que se movían en dirección tanto retrógrada como anterógrada (Fig. 18). Estos filamentos se movían de manera ondulatoria, lo que sugiere que las vesículas que contienen las CHS-5, se encuentran deslizándose sobre los cables de actina, de tal manera que los filamentos que observamos podrían ser un grupo de vesículas que están decorando los cables de actina (Fig. 18; Video supl. 1).

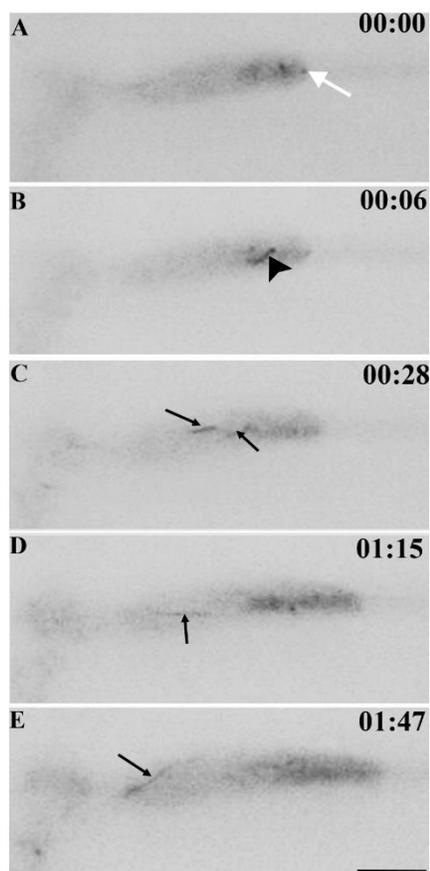


Figura 18. Imágenes de TIRFM de las vesículas con CHS-5-GFP. A-E) Las flechas señalan la CHS-5-GFP, la cual está decorando los cables de actina. A) La flecha blanca señala la posición del SPK. B) La cabeza de flecha negra señala vesículas en movimiento retrógrado. C-D) Las flechas negras señalan vesículas en movimiento anterógrado. Barra= 10 μ m.

6.1.2.3.2 Efecto del inhibidor del citoesqueleto de actina, Latrunculina A

Trabajos previos describieron que la localización de la CHS-1 en el SPK requiere el citoesqueleto de actina (Sánchez-León, et al., 2011). En este estudio se usó el inhibidor Latrunculina A (Lat A; 20 $\mu\text{g/ml}$) en las cepas que expresan las CHS-4, CHS-5 y CHS-7. En todas las cepas se observó que desapareció la fluorescencia del SPK, y apareció una acumulación de fluorescencia en regiones subapicales y en la MP (Fig. 19A, C y E). Inclusive se observaron estructuras de forma redondeada cercanas a los septos parecidas a vacuolas globulares (Flechas en Fig. 19B, D y E); estas estructuras, también descritas como vacuolas, han sido observadas previamente para la CHS-1-GFP tras tratamiento con el mismo inhibidor (Sánchez-León et al., 2011).

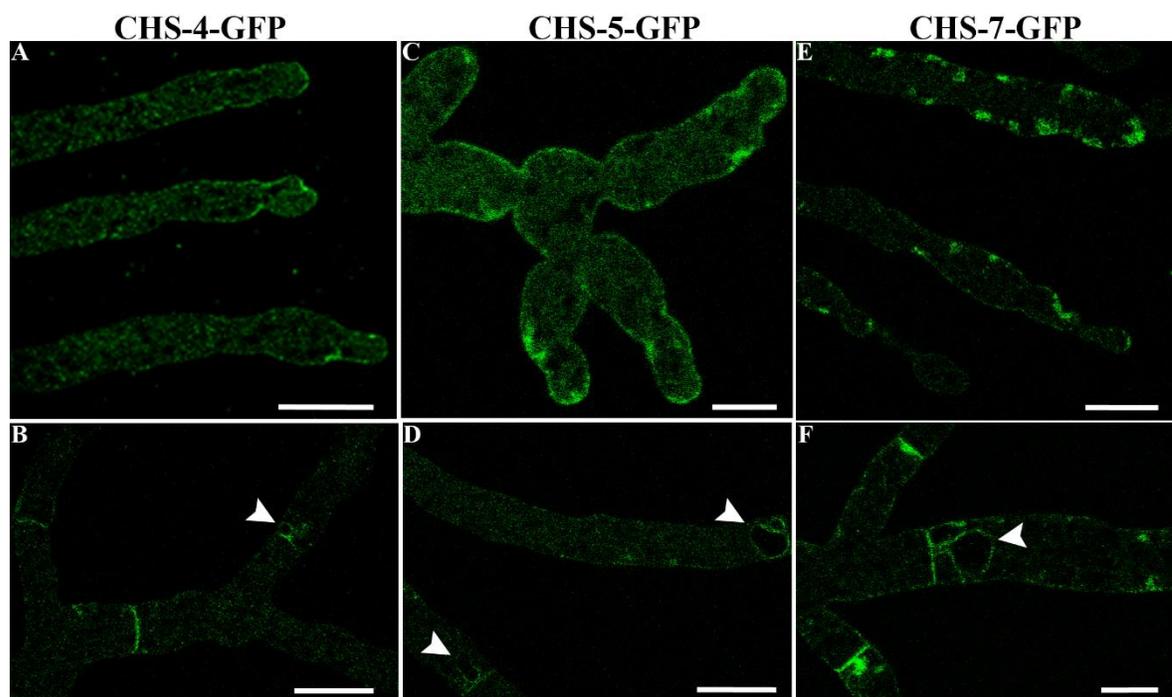


Figura 19. Efecto del inhibidor Latrunculina A en las CHS-4, CHS-5 y CHS-7. A y B) Puntas y septos de una hifa expresando CHS-4-GFP; C y D) Puntas y septos de una hifa expresando CHS-5-GFP; E y F) Puntas y septos de una hifa expresando CHS-7-GFP. Barras=10 μm . Lat A= 20 $\mu\text{g/ml}$.

6.1.2.3.3 Colocalización de la quitina sintasa CHS-1 con la miosina MYO-2 (clase V) truncada en el carboxilo terminal

Previamente se ha descrito en *N. crassa* que las vesículas que contienen las CHS, viajan a través del citoesqueleto usando los cables de actina (Sánchez-León, et al., 2011). Para conocer si las miosinas, proteínas motoras que interactúan con el citoesqueleto de actina, están involucradas en el transporte de estas proteínas, eliminamos el dominio “dil”, dominio involucrado en la unión a las vesículas, en la miosina de clase V MYO-2 (Fig. 20A y B). La eliminación de este dominio afectó gravemente el crecimiento y morfología en *N. crassa*; no obstante la MYO-2-dil Δ siguió llegando al SPK (Fig. 20D, F y H). A nivel de la colonia, se observó un micelio muy compacto, con hiperramificación, e hifas muy delgadas con pérdida de forma hifoide; además la fluorescencia de MYO-2-dil Δ -GFP se observó de una manera más focalizada en el núcleo del SPK (Fig. 20F), en comparación a la miosina completa (MYO-2-GFP), la cual se vio distribuida en la punta de la hifa formando un tipo de abanico más disperso e intenso (Fig. 20E). Para corroborar si esta proteína motora está implicada en el transporte de las vesículas que contienen CHS, se llevó a cabo una cruce genética con la finalidad de obtener una cepa homocarión que expresara tanto MYO-2-dil Δ -GFP como CHS-1-mChFP. La cepa que expresaba ambas proteínas fue llamada NRAF8a, y se observó que ambas proteínas colocalizan en el SPK, donde la CHS-1-mChFP se encuentra en el centro (Fig. 20I-K). Lo que sugiere que la CHS-1-mChFP llega al SPK, independientemente de la MYO-2.

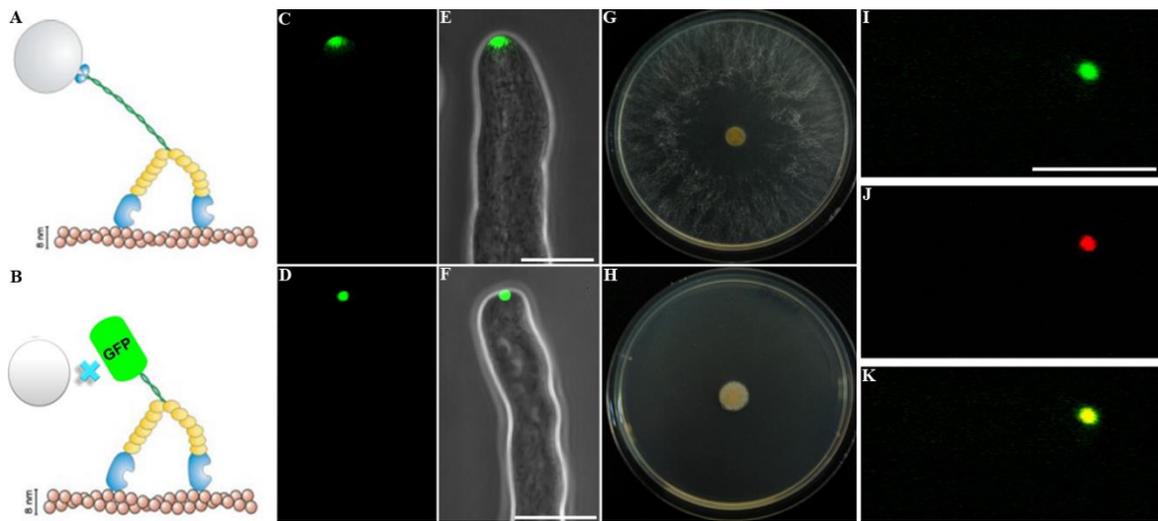


Figura 20. Localización de MYO-2-GFP y CHS-1-mChFP. A y B) Representación esquemática de la miosina de clase V MYO-2 completa y con el dominio de unión a cargo truncado y fusionado a GFP, respectivamente. C, E y G) MYO-2-GFP; D, F, H e I) MYO-2-dil Δ -GFP, J) CHS-1-mChFP, K) Co-expresión de CHS-1-mChFP y MYO-2-dil Δ -GFP. G) Crecimiento colonial de la cepa MYO-2-GFP; H) Reducción de crecimiento de la colonia de la cepa MYO-2-dil Δ -GFP. Barras = 10 μ m

6.1.3 Proteínas asociadas a las CHS

6.1.3.1 Coinmunoprecipitación de las proteínas CHS-1-GFP, CHS-4-GFP y CHS-5-GFP

Las tres CHS antes mencionadas se usaron para llevar a cabo una coinmunoprecipitación, usando las perlas GFP-TRAP® como se detalla en la sección 5.8.4, una vez que las proteínas obtenidas mediante el CoIP, fueron digeridas con tripsina para ser sometidas a secuenciación por espectrometría de masa en el Departamento de Microbiología y Genética en la Universidad de Göttingen, Alemania. Estos experimentos fueron repetidos dos veces.

Los resultados de las dos repeticiones arrojaron varias secuencias, las cuales fueron depuradas y contrastadas con la cepa que expresaba la GFP citosólica, usada como control. Los resultados se resumen en la tabla 6, donde se resaltan algunas de las proteínas putativas de mayor interés. En las tablas 7, 8, 9 se encuentran las secuencias que solo fueron encontradas en las CHS-1, CHS-4 y CHS-5 respectivamente.

De los datos obtenidos se pueden sugerir algunas interacciones putativas que podrían ser importantes con las CHS, por ejemplo; CSR-4 la cual es la homóloga a la Chs4p, activadora de la Chs3p, en *S. cerevisiae* (Bulawa, 1993; DeMarini, et al., 1997; Grabinska, et al., 2007). En el caso de la CHS-1 se obtuvo la secuencia de la proteína SEC-10, una proteína que forma parte del complejo exocisto (TerBush, et al., 1996), lo que hace sugerir que este complejo está involucrado en la exocitosis de los quitosomas que contienen la CHS-1. La SEC-14, es una proteína que se ha reportado está involucrada en el tráfico del *trans*-Golgi-PM o vacuolas en *S. cerevisiae* (Curwin, et al., 2009). Además una homoserin cinasa que podría estar involucrada en la fosforilación de la proteína, en *S. cerevisiae* se ha reportado que la Chs3p necesita ser fosforilada para su correcta localización y función (Lenardon, et al., 2010). Otra proteína de interés que surgió en la secuenciación fue la serin proteasa, identificada con la CHS-4 y la CHS-5. Se ha descrito previamente que las CHS, son proteínas zimógenas, que necesitan ser activadas proteolíticamente (Cabib y Fargas, 1971; McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Duran et al., 1975; Leal-Morales, et al., 1988; Ruiz Herrera et al., 1975). Inclusive en trabajos previos en *N. crassa* se ha observado que para la actividad total de CHS es necesario usar tripsina, como activador proteolítico, lo que hace pensar que esta proteína podría estar involucrada en la activación de al menos estas dos clases de CHS.

TABLA 6. Resumen de las proteínas obtenidas por secuenciación

SECUENCIAS SIMILARES EN LAS 3 CHS (9)*	SECUENCIAS SIMILARES EN CHS-1 Y CHS-4 (7)*	SECUENCIAS SIMILARES EN CHS-1 Y CHS-5 (14)*	SECUENCIAS SIMILARES EN CHS-4 Y CHS-5 (4)*
NCU01429 (Fosfoferin aminotransferasa)	NCU10007 (Malato sintasa)	NCU0 7562 (Proteína ribosomal 60S)	NCU06687 (Glicógeno sintasa)
NCU09041 (L-xilulosa reductasa)	NCU05495 (Proteína con dominio CVNH)	NCU8940 (Complejo reductasa de ubiquinol-citocromo C)	NCU08046 (factor de iniciación de la traducción en eucarióticas 3)
NCU10058 (Fosfoglucomutasa 2)	NCU04923 (Glicerol deshidrogenasa-1)	NCU06880 (Proteína de la familia AhpC/TSA)	NCU02481 (Metilisocitrato Mitocondrial 2)
NCU07853 (Uricasa)	NCU92482 (2-metilcitrato)	NCU3151 (Proteína Peroxisomal de membrana)	NCU00673 (Serina proteasa p2)
NCU04230 (Isocitrato liasa)	NCU03944 (Proteína con dominios repetidos de WD)	NCU07232 (Proteína de choque térmico 30)	
NCU09132 (α-Tubulina)	NCU03368 (Proteína hipotética- con dominio asociado a metales pesados)	NCU04245 (Translocasa del exterior de la membrana mitocondrial 70)	
NCU08791 (Catalasa+)	NCU08550 (Proteína hipotética-con dominio BTP)	NCU04510 (Aldosa reductasa)	
NCU09040 (Oxidoreductasa)		NCU01221 (Proteína Ribosomal 60S)	
NCU07352 (Proteína hipotética- rica en ácido glutámico)		NCU09732 (Acetil CoA acetiltransferasa)	
NCU00629 (6-fosfofructoquinasa+)		NCU09718 (DAHP sintasa)	
		NCU03112 (NADH citocromo-b5 reductasa 2)	
		NCU02438 (dihidrolipoamida succiniltransferasa)	
		NCU06346 (Proteína hipotética-con dominio ACBP)	
		NCU03118 (Proteína hipotética-parecida a saccaropina deshidrogenasa)	

Letras en negrita: Proteínas de interés

Letras en rojo: Proteínas encontradas en las dos repeticiones

TABLA 7. Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-1-GFP

#NCU	Nombre de la proteína
NCU06397	profilina (134 aa) [MASS=13963]
NCU01587	cofilina (155 aa) [MASS=17185]
NCU02133	superóxido dismutasa (155 aa) [MASS=15884]
NCU06556	tioredoxina II (148 aa) [MASS=16077]
NCU06876	adenosina 5'-monofosforamidasas (141 aa) [MASS=15456]
NCU08949	proteína hipotética (170 aa) [MASS=18143]
NCU09371	6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa (204 aa) [MASS=21203]
NCU03935	homoserin deshidrogenasa (366 aa) [MASS=38663]
NCU06464	proteína hipotética (171 aa) [MASS=19027]
NCU03611	Quitina sintasa (918 aa) [MASS=102692]
NCU01107	deshidrogenasa de cadena corta (334 aa) [MASS=36467]
NCU07287	proteína hipotética (227 aa) [MASS=24523]
NCU06549	piridoxina 2 (253 aa) [MASS=27046]
NCU05290	orotato fosforibosiltransferasa (234 aa) [MASS=25147]
NCU09646	3-cetoacil-CoA tiolasa (416 aa) [MASS=43898]
NCU08936	gen clock-controlled -15 (412 aa) [MASS=43114]
NCU04277	homoserin cinasa (359 aa) [MASS=38659]
NCU08004	flavoproteína de transferencia de electrones alpha-subunidad (349 aa) [MASS=36049]
NCU03893	deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR (365 aa) [MASS=38786]
NCU03310	prohibitina-2 (311 aa) [MASS=34095]
NCU02438	dihidrolipoamida succiniltransferasa (422 aa) [MASS=45775]
NCU09817	DAHP sintasa (377 aa) [MASS=40969]
NCU02263	factor citosólico SEC-14 (335 aa) [MASS=37230]
NCU00260	oxidoreductasa (362 aa) [MASS=39387]
NCU02580	fumarato reductasa Osm1 (617 aa) [MASS=66848]
NCU04303	asparagina sintetasa 2 (582 aa) [MASS=65609]
NCU08434	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteina metiltransferasa (402 aa)
NCU09313	proteína similar a SEC-10 del complejo exocisto

TABLA 8. Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-4-GFP

#NCU	Nombre de la proteína
NCU04334	chaperonina (105 aa) [MASS=11134]
NCU05995	ubiquitina (306 aa) [MASS=34465]
NCU03415	aldehído deshidrogenasa (495 aa) [MASS=53973]
NCU03739	proteína ERP38 (370 aa) [MASS=39282]
NCU06836	acetil-coenzima A sintetasa (668 aa) [MASS=73765]
NCU01179	Translocasa del exterior de la membrana mitocondrial 40 (350 aa) [MASS=38151]
NCU01546	coproporphirinogeno III oxidasa (410 aa) [MASS=46590]
NCU01181	familia miembro de la acil-CoA deshidrogenasa 11 (452 aa) [MASS=50050]
NCU10008	fumarato hidratasa (534 aa) [MASS=57201]
NCU09324	Quitina sintasa 4 (1236 aa) [MASS=137989]
NCU08287	pyrABCN (1833 aa) [MASS=202675]
NCU09322	Quitina sintasa activadora

TABLA 9. Proteínas encontradas exclusivamente en CHS-5-GFP

#NCU	Nombre de la Proteína
NCU02003	factor elongación de la traducción -1 (461 aa) [MASS=49672]
NCU04552	Proteína ribosomal citoplasmática-5 (120 aa) [MASS=13546]
NCU00618	40S Proteína ribosomal S27 (83 aa) [MASS=8898]
NCU04352	Quitina sintasa C (1799 aa) [MASS=199689]
NCU05338	proteína hipotética (105 aa) [MASS=11962]
NCU07787	proteína controladora del reloj CCG-14 (139 aa) [MASS=14612]
NCU01227	succinil-CoA ligasa cadena alfa (334 aa) [MASS=34738]
NCU04414	proteína hipotética (461 aa) [MASS=51441]
NCU00050	piruvato deshidrogenasa componente X (427 aa) [MASS=44825]
NCU02482	2-metilcitrato sintasa (471 aa) [MASS=51884]
NCU08935	peroxisomal-coenzima A sintetasa (523 aa) [MASS=57029]
NCU03194	fosforibosilaminoimidazol carboxilasa (634 aa) [MASS=69161]
NCU02813	factor de iniciación de la traducción en eucariotas 3 subunidad M (435 aa) [MASS=49702]

6.1.4. Función de las quitina sintasas en *N. crassa*

6.1.4.1. Obtención de la cepa mutante doble de *chs* en *N. crassa*

La doble mutante fue obtenida a través de genética clásica, revisando la progenie resultante de las cruces sexuales. Se cruzaron la cepa *chs-1Δ mat a* con la cepa *chs-3Δ mat A*. La progenie (ascosporas) fue colectada y activada por choque térmico a 60°C por una hora. Se seleccionaron 100 colonias de las cuales solo 48 fueron resistentes higromicina y solo las que mostraron un fenotipo más afectado (NRAF3d-83 y NRAF3d-84) fueron consecutivamente comprobadas por PCR.

6.1.4.1.2 Comprobación de la doble mutante mediante PCR

De las colonias que fueron resistentes a higromicina (300 µg/ml) y mostraron un fenotipo más afectado (NRAF3d-83 y NRAF3d-84), se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las cepas candidatas doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ* por el método de esporas (ver apartado 5.6.2.2). Se usó como control la cepa FGSC#9718, y para comprobar la calidad del ADN se amplificó 1 kb del gen *pma-1*, usando los oligonucleótidos ORFS54-F y ORFS55-R. Para comprobar la ausencia de los genes deletados en la cepa NRAF3d, se usaron los oligonucleótidos ORFS33-F y ORFS34-R para el gen *chs-1* que amplifica un tamaño de 1 kb aproximadamente; para el gen *chs-3* se usaron los oligonucleótidos 04251-F y 04251-R que amplifica un tamaño de 3.0 kb aproximadamente (Fig. 22). Además se amplificó el gen *hph*, el cual es el cassette de delección, con los oligonucleótidos OMF53F y OMF54, que amplifica una banda de 0.7 kb aproximadamente (Fig. 22). Solo dos colonias fueron positivas (NRAF3d-83 y NRAF3d-84). Para la subsecuente caracterización se tomó la cepa NRAF3d-83.

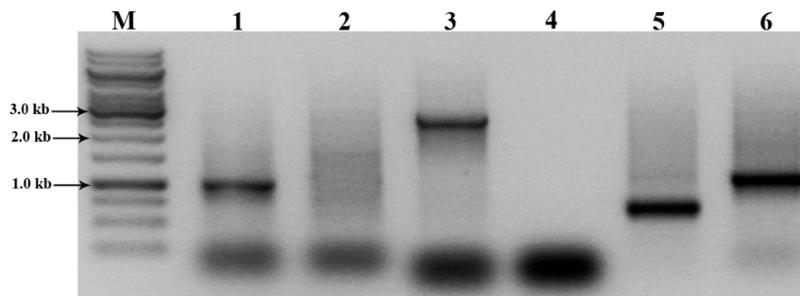


Figura 22. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrando los fragmentos de la *chs-1*, *chs-3* cassette de delección de la cepa doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ*. Carril 1 y 2: Amplicón del fragmento del gen *chs-1* (1 kb) en la cepa FGSC#9718 y doble mutante respectivamente. Carril 3 y 4) Amplicón del gen *chs-3* (3 kb) en la cepa FGSC#9718 y doble mutante respectivamente. Carril 5) Amplicón del cassette de delección *hph* (0.7 kb) en la cepa doble mutante. 6) Amplicón de un fragmento del gen *pma-1* (1 kb).

6.1.4.2 Caracterización de las cepas mutante simples y doble en *N. crassa*

6.1.4.2.1 Crecimiento radial y diámetro del Spitzenkörper de las cepas mutantes simples y la doble mutante.

CHS son proteínas implicadas en la formación de la pared celular en el ápice y en los septos. Para investigar si todas CHS están participando en la extensión de la pared celular de las hifas, se midió el crecimiento radial de las colonias. Las mediciones fueron tomadas las 24 horas de crecimiento. En las mutantes simples, la cepa más afectada fue la *chs-6Δ*, además las cepas *chs-7Δ* y *chs-5Δ* mostraron una disminución en la tasa de extensión (Fig. 23). El resto de las mutantes de CHS no mostraron una reducción significativa respecto a las cepas control. No obstante la doble mutante *chs-1Δ; chs-3Δ* muestra un ritmo menor de extensión que la mutante simple *chs-3Δ* (Fig. 23).

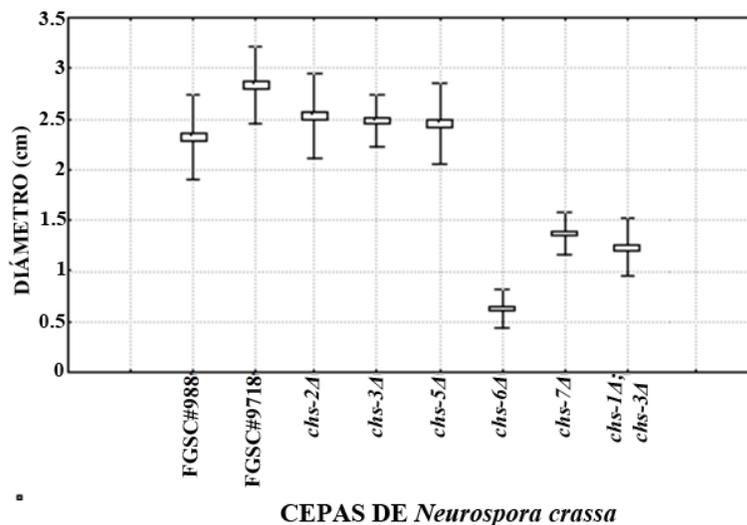


Figura 23. Diámetro de la colonia después de 24 horas de las cepas mutantes de *chs*.

Para examinar si las células fúngicas se ven afectadas por la ausencia de los genes de *chs*, y si el SPK ha sido perturbado en estas mutantes, se usó microscopía de contraste de fases y confocal para observar las hifas de cada una de las cepas y el marcador para SPK, FM4-64. Se midió el diámetro del SPK en cada cepa mutante. Observamos que el diámetro del SPK más pequeño fue en la mutante *chs-7Δ* donde además se observa una hifa muy delgada (Fig. 24B, Tabla 10); igualmente las cepas *chs-6Δ* y la doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ* también mostraron un disminución en el diámetro del SPK y unas hifas con un fenotipo afectado. El resto de las mutantes de CHS también mostraron un SPK de diámetro reducido e comparado con cepas control (FGSC#988 y FGSC#9718), pero no tan marcado como la *chs-7Δ* (Fig. 24B, Tabla 10).

Tabla 10. Diámetro del Spitzenkörper de las hifas de las cepas mutantes de *chs* en *N. crassa*

CEPA	DIAMETRO DEL SPK (μm)*
FGSC#9718	1.9 \pm 0.2
FGSC#988	1.7 \pm 0.1
<i>chs-2Δ</i>	1.4 \pm 0.3
<i>chs-3Δ</i>	1.4 \pm 0.3
<i>chs-5Δ</i>	1.3 \pm 0.25
<i>chs-6Δ</i>	1.1 \pm 0.09
<i>chs-7Δ</i>	0.9 \pm 0.2
<i>chs-1Δ;chs-3Δ</i>	1.1 \pm 0.2

\pm SE 96%

n= 20 hifas

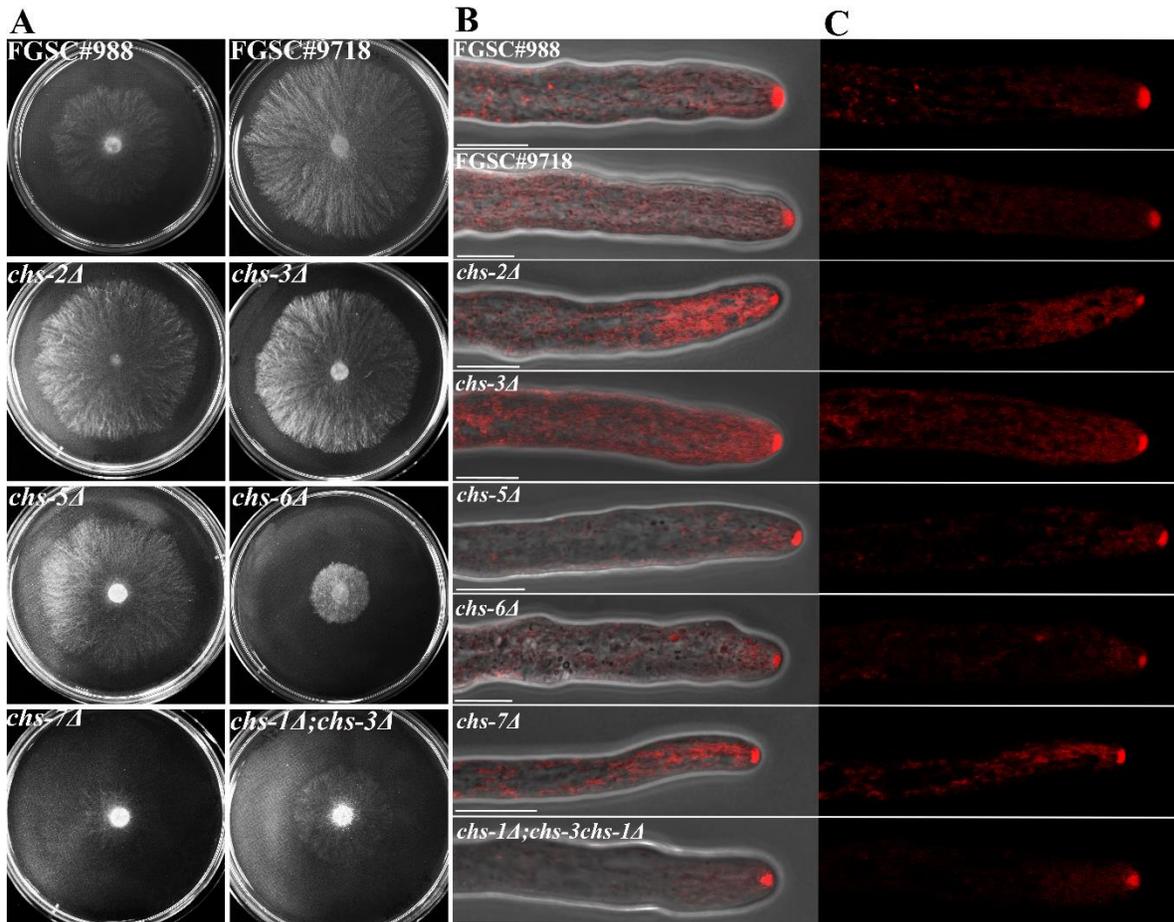


Figura 24. Morfología de las colonias e hifas de las cepas mutantes de *chs*. A) Imágenes de las colonias de las cepas mutantes. B y C) Morfología hifal de las cepas mutantes. B) Traslape de contraste de fases y FM4-64. C) Tinción con el colorante FM4-64 en las hifas de las cepas mutantes. Barras: 20 μm.

6.1.4.2.2 Hifas aéreas y conidiación en las cepas mutantes de *chs*

La formación de hifas aéreas es necesaria para la formación de los conidióforos (estructura que produce los conidios o esporas asexuales). Para conocer cuál de las *chs* es la que tiene un papel esencial durante este proceso, se analizó el crecimiento de hifas aéreas y se llevó a cabo la cuantificación de conidios en cada una de las cepas. Se observó que en las mutantes simples *chs-7Δ*, *chs-5Δ*, y en la doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ* existía una reducción en la formación de hifas aéreas (Fig. 25). De la misma manera la producción de conidios se vio drásticamente reducida en estas tres cepas (Fig. 26). La disminución en la producción de conidios observada en la doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ* no es observada en la cepa parental *chs-3Δ*, la cual presenta hifas aéreas y una producción de conidios normales.

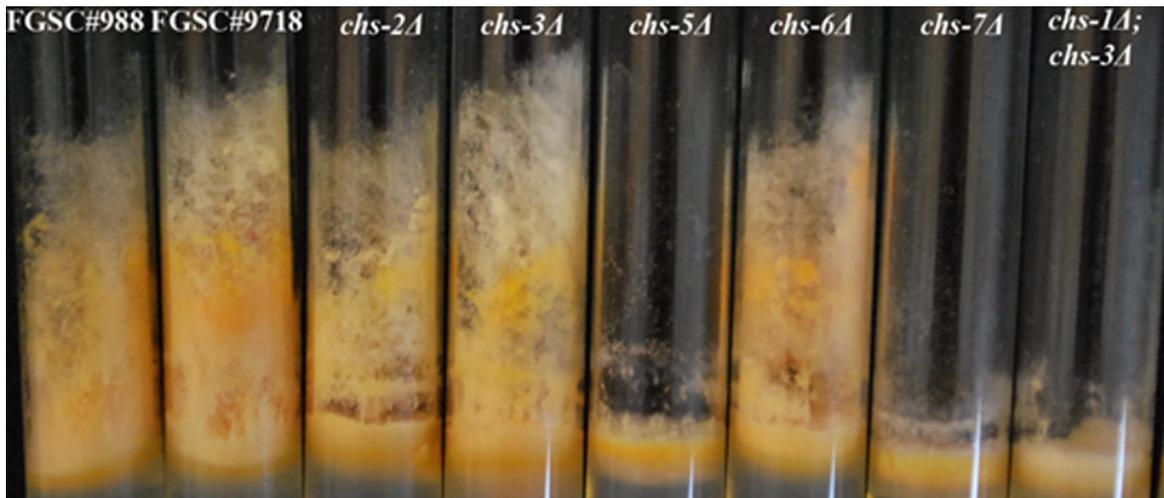


Figura 25. Hifas aéreas de las cepas mutantes de *chs*.

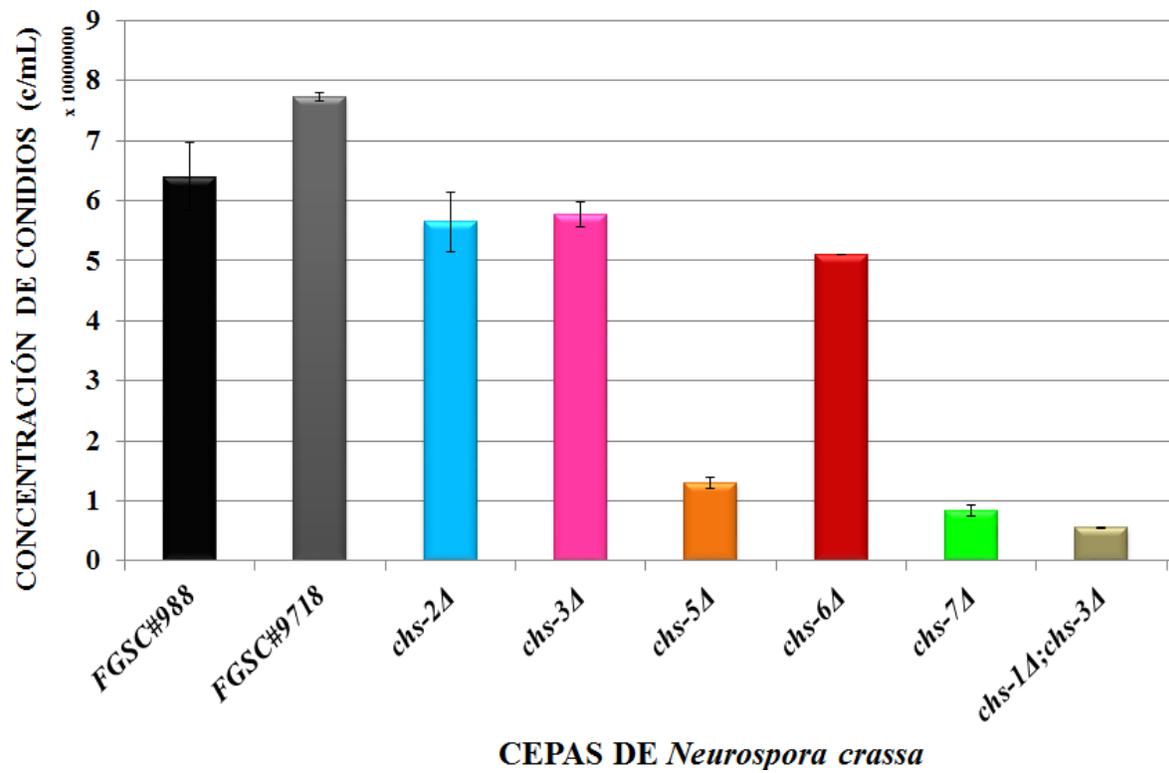


Figura 26. Gráfica de la concentración de conidios en las cepas mutantes simples y en la doble mutante de *chs*. Las barras sobre cada columna representan la desviación standard.

6.1.4.2.3 Ramificación y septación de las cepas mutantes simples y la doble mutante.

Otros procesos importantes durante el crecimiento de los hongos filamentosos son la ramificación y la septación, procesos en los cuales las CHS están involucradas. Se realizó la cuantificación tanto de ramas, número de septos, distancia entre la punta y el primer septo, además de la distancia entre el primer y el segundo septo.

Se observó que las mutantes simples *chs-3Δ* y *chs-6Δ*, presentaron un mayor número de ramas comparado con las cepas control (FGSC#988 y FGSC#9718) (Fig. 27). Cabe resaltar que la mutante simple *chs-6Δ* además de haber mostrado una reducción en el crecimiento, mostró una ramificación anormal en las partes apicales (Fig. 28). Asimismo se observó que las mutantes simples *chs-7Δ*, *chs-5Δ*, y la doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ* presentaron una reducción en la ramificación (Fig. 27 y 28). Estos resultados nos sugieren que probablemente el aumento de ramificación en la mutante simple *chs-6Δ*, resulta en la reducción en la velocidad de crecimiento. La reducción en el número de ramas en las mutantes simples *chs-7Δ*, *chs-5Δ*, y la doble mutante *chs-1Δ;chs-3Δ*, sugiere que las CHS correspondientes participan en la formación de ramas.

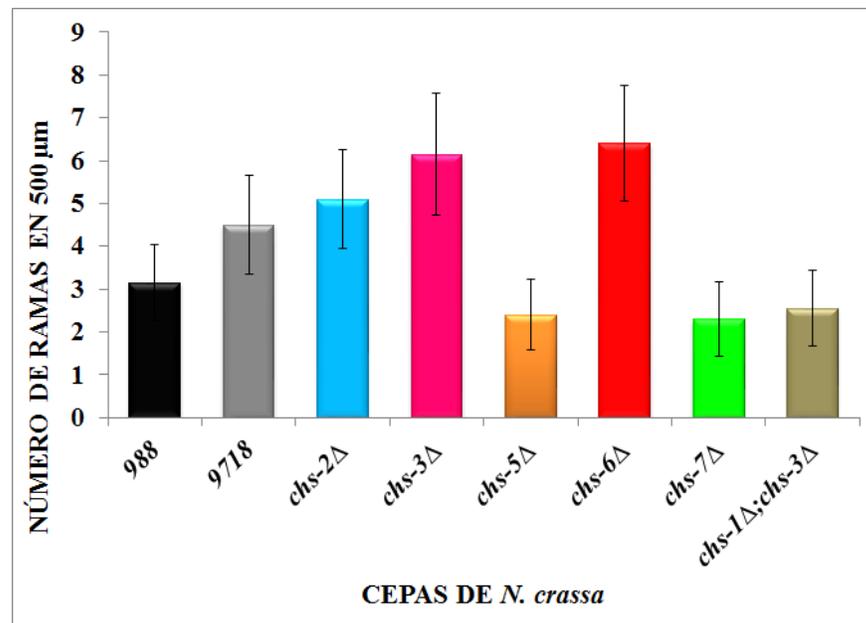


Figura 27. Gráfica del número de ramas en 500 μm, en las cepas mutantes simples y en la doble mutante. Las barras sobre cada columna representan la desviación standard, n=20.

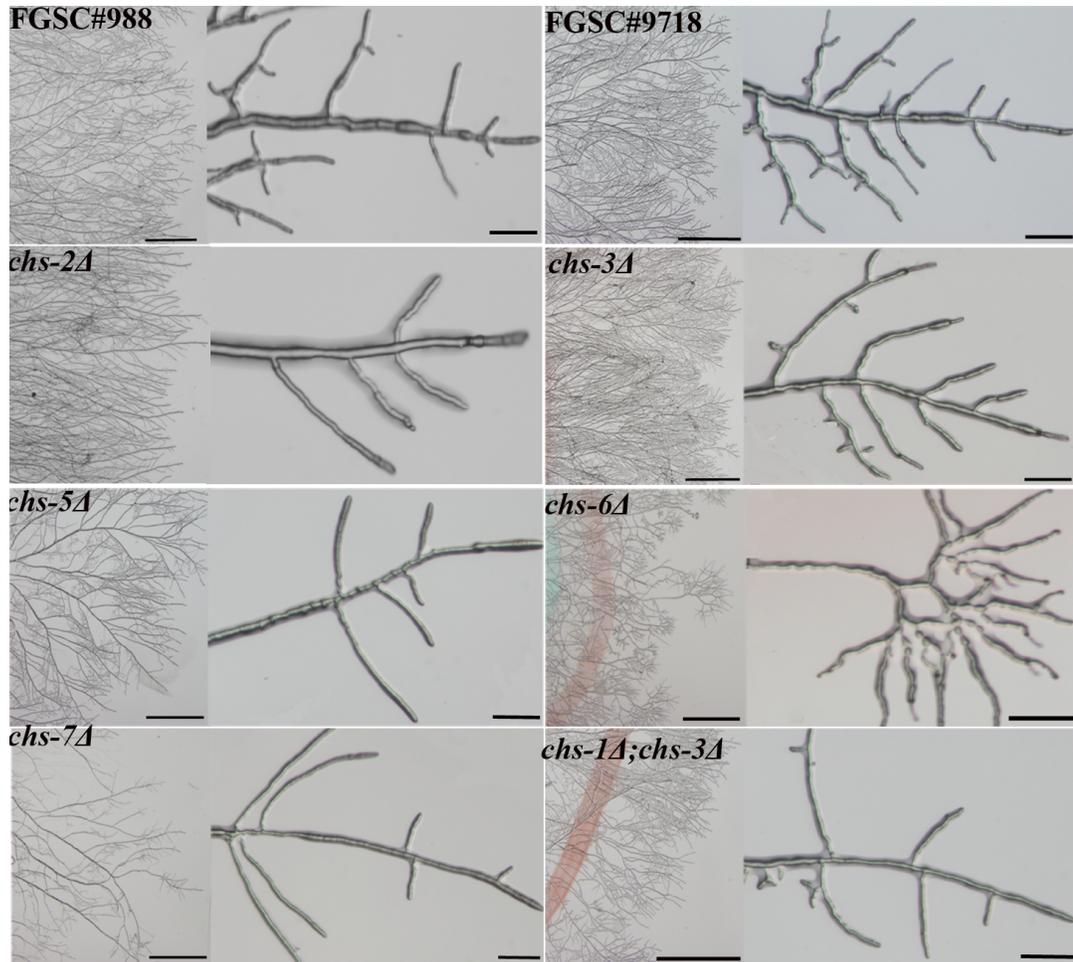


Figura 28. Ramificación en las cepas mutantes *chs*. A) Borde de colonias observadas al estereoscopio (objetivo 7X y 90X); Barras = 2 mm y 100 μ m, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas con respecto al número de septos entre las cepas mutantes y las cepas control. Con relación a la distancia entre la punta y el primer septo, se observó que la mutante *chs-6Δ* mostró una distancia de 220 μm (n=20; SE \pm 26) a diferencia de las cepas control FGSC#988 y FGSC#9718, las cuales mostraron una distancia de 263 y 278 μm (n=20; SE \pm 23 y 15 respectivamente); además también mostró una distancia más corta entre el primer y el segundo septo (72 μm , n=20; SE \pm 18), en relación de las cepas control. Las demás cepas no mostraron una disminución significativa en relación a las cepas control (Tabla 10; Fig. 29).

TABLA 11. Número de septos en las cepas mutantes *chs* en *N. crassa*

CEPA	NÚMERO DE SEPTOS *	DISTANCIA DE LA PUNTA AL 1 ^{ER} SEPTO (μm)	DISTANCIA 1 ^{ER} to 2 ^{DO} SEPTO (μm)
FGSC#9718	3 \pm 0.2	263 \pm 23	122 \pm 11
FGSC#988	2 \pm 0.17	278 \pm 15	110 \pm 10
<i>chs-2Δ</i>	3 \pm 0.4	278 \pm 16	133 \pm 20
<i>chs-3Δ</i>	3 \pm 0.5	240 \pm 25	94 \pm 18
<i>chs-5Δ</i>	3 \pm 0.2	269 \pm 31	105 \pm 18
<i>chs-6Δ</i>	4 \pm 0.4	220 \pm 26	72 \pm 18
<i>chs-7Δ</i>	3 \pm 0.7	260 \pm 37	114 \pm 17
<i>chs-1Δ;chs-3Δ</i>	3 \pm 0.8	250 \pm 25	95 \pm 10

*Número de septos desde la punta hasta 500 μm

\pm SE 96%

n= 20 hifas

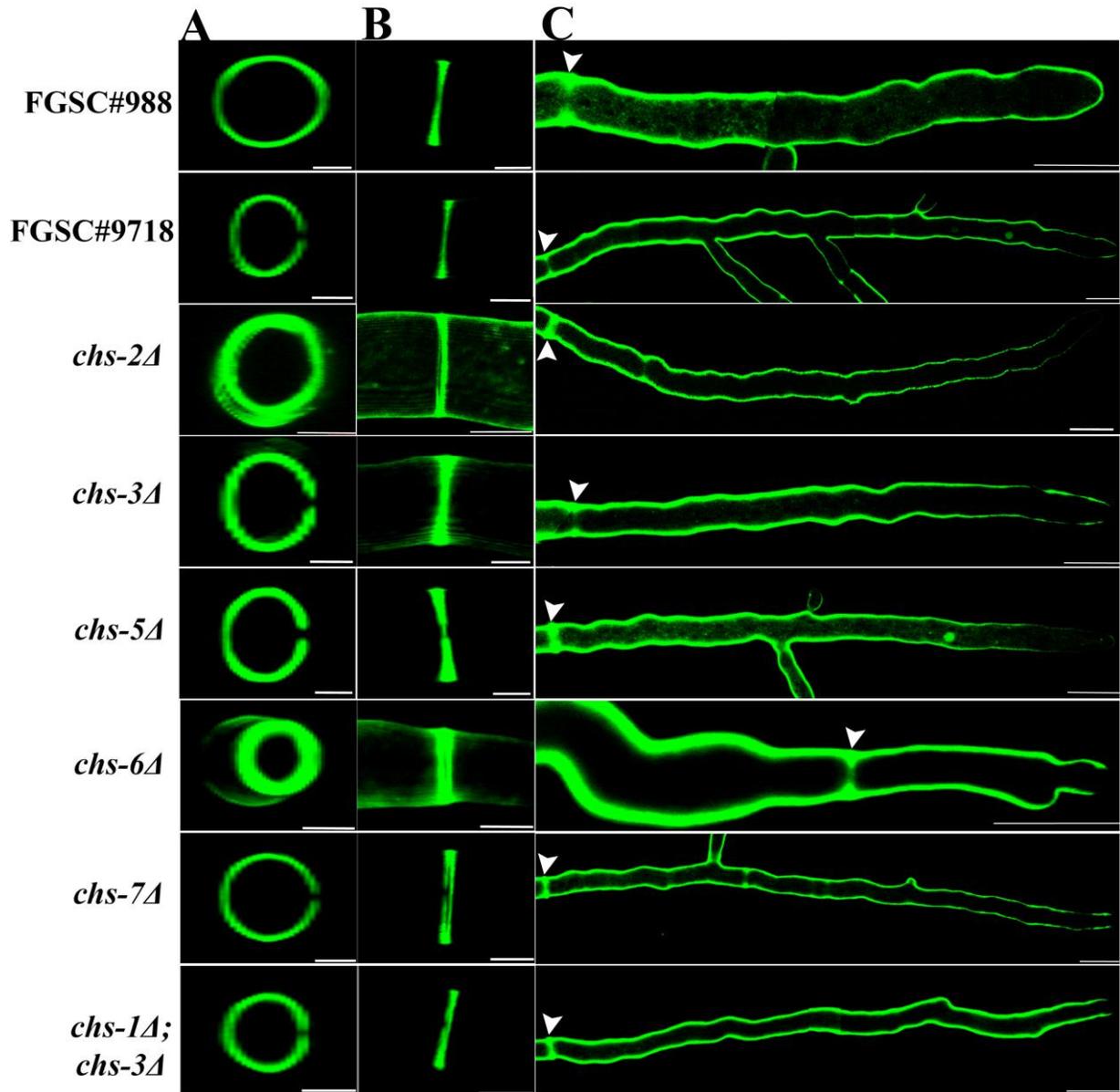


Figura 29. Septación en las cepas mutantes CHS de *N. crassa*. A y B) Proyección en X y Y de los septos en las cepas mutantes CHS. C) Reconstrucción de hifas en cepas mutantes de CHS, teñidas con el colorante Solofenil flavina 7GFE 500 (43 μ g/ml). Barras= 5 y 10 μ m.

6.1.4.2.4. Participación de las CHS en la formación de estructuras sexuales (peritecios)

Durante la reproducción sexual, es necesaria la generación de estructuras que ayudan a la protección de las ascosporas (esporas sexuales haploides). Estas estructuras son llamadas peritecios y tienen forma de botella. Con la finalidad de determinar cuál de las clases de CHS, tiene una participación más específica llevamos a cabo cruza homocigóticas de las cepas mutantes *chs-3*, *chs-5*, *chs-6* y *chs-7*; como control se usaron las cepas parentales (FGSC#9718 mat *a* y FGSC#9717 mat *A*). Estas cruza homocigóticas se hicieron por triplicado, repitiendo dos veces el experimento. Tras 30 días de incubación no hubo formación de peritecios en las cruza correspondientes a las cepas mutantes de los genes *chs-3Δ mat a* x *chs-3Δ mat A*; y *chs-7Δ mat a* x *chs-7Δ mat A*; de la cruza *chs-5Δ mat a* x *chs-5Δ mat A* se obtuvieron muy pocos peritecios, a diferencia de lo que se observó en el control y en la cepa mutante *chs-6Δ*, donde si hubo formación de peritecios (Fig. 30A); además en la cepa control se observó la liberación de las ascosporas (Fig. 30C). Sin embargo si se observó la formación de protoperitecios en todos los casos. Aunque se observaron peritecios en las cepas *chs-5Δ* y *chs-6Δ* estos todavía no liberaban ascosporas, inclusive se observaron peritecios inmaduros en ambos casos (Fig. 30B). Estas observaciones sugieren que las *chs-3* y *chs-7* tiene una participación más importante durante este estado del desarrollo.

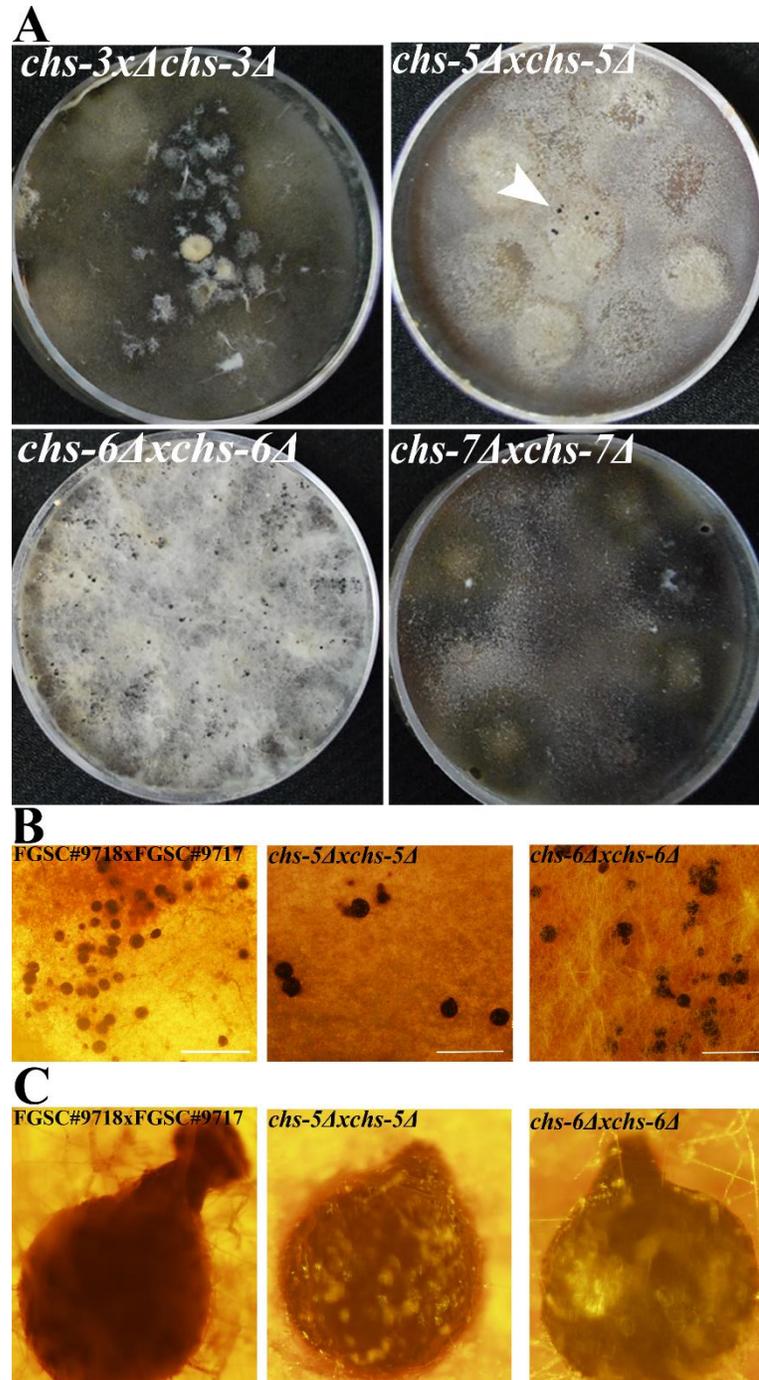


Figura 30. Peritecios en cepas mutantes *chs* a los 30 días. A).Placas con las cruces homocigóticas. B) Aumento al 10X en estereoscopio. C) Aumento al 90X en estereoscopio. Barras = 0,5 y 1 mm.

6.1.4.2.5. Contenido de quitina y biomasa de las cepas mutantes CHS.

Para conocer si la ausencia de alguno de los genes *chs*, repercutía en la composición de la pared celular, se midió el contenido de N-acetil-glucosamina según el método de Morgan-Elderson (Morgan y Elderson, 1934) y se cuantificó la biomasa en las cepas mutantes. Las cepas mutantes en los genes *chs-6Δ*, *chs-7Δ*, y la doble mutante presentaron una disminución en la concentración de N-Acetil-glucosamina (0.34, 0.30, 0.35 μg/5mg) comparada con la de las cepas control (0.59, 0.58 μg/5mg; Figura 31B). A su vez la biomasa también disminuyó en estas cepas (*chs-6Δ*, 0.013; *chs-7Δ*, 0.014, FGSC#988, 0.022; FGSC#9718, 0.024) así como en las *chs-3Δ* y *chs-5Δ* (0.018 y 0.014 respectivamente) (Figura 31A). Estos datos sugieren que las *chs-6* y *chs-7* tienen una participación en la formación de la pared celular durante el crecimiento vegetativo. Estos resultados soportan la disminución del crecimiento radial observado previamente (Figura 31A).

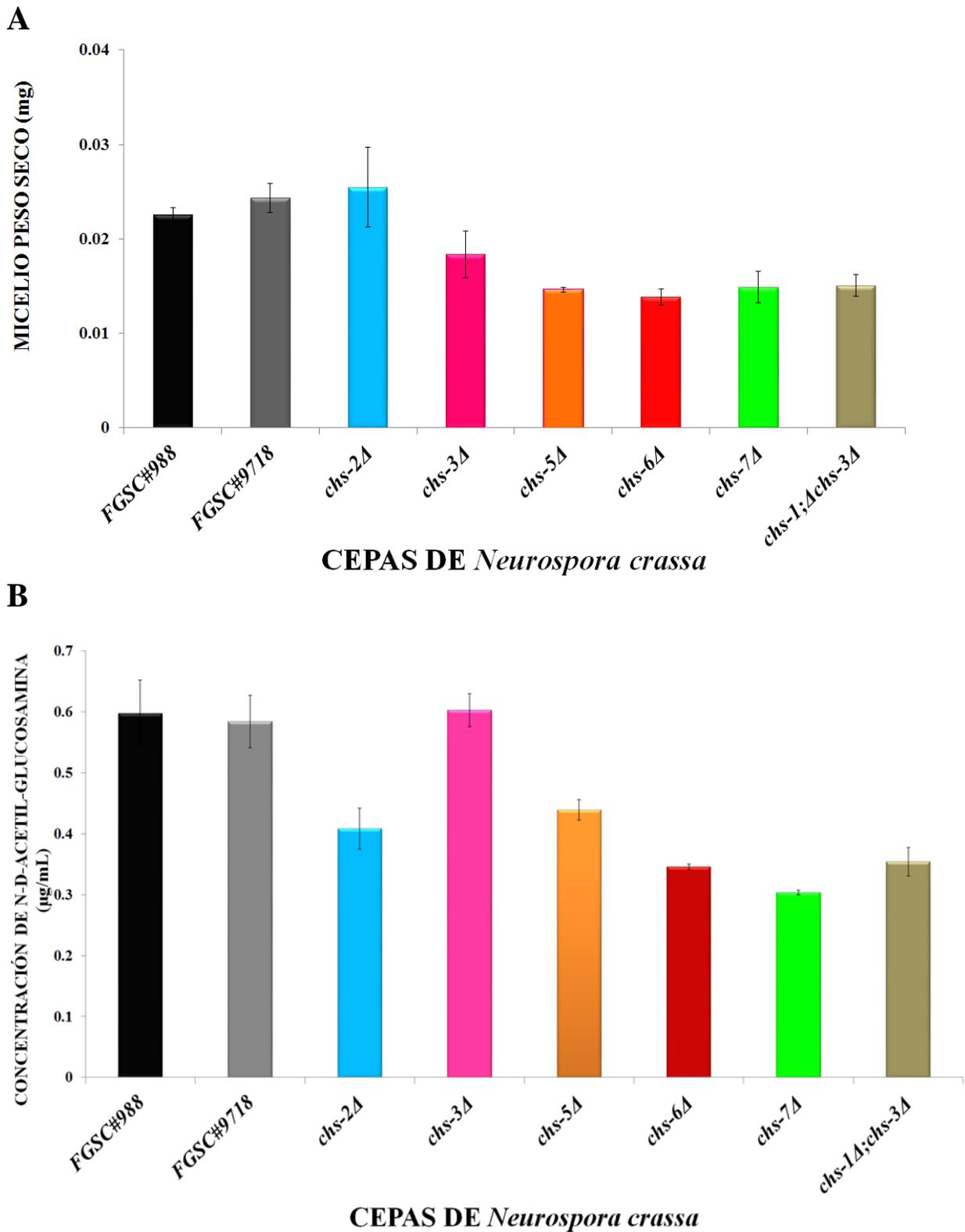


Figura 31. Gráficas de biomasa y contenido de quitina en cepas mutantes de *chs*. A) Gráfica de biomasa. B) Gráfica del contenido de quitina. Las barras sobre cada columna representan la desviación standard.

6.1.4.2.6. Crecimiento de las cepas mutantes en medio mínimo adicionado con agentes estresantes

Con la finalidad de analizar la integridad de la pared celular en las cepas mutantes, éstas se crecieron en presencia de diferentes agentes estresantes de pared celular. Los agentes utilizados fueron los siguientes: se usó cafeína, debido a que se ha descrito como un agente que afecta la ruta de integridad de la pared celular causando estrés (Ketela et al., 1999; Martín et al., 2000). El sorbitol se usó como un agente de estrés osmótico. La Nicomicina Z es un inhibidor competitivo de las CHS (Cabib, 1991; Choi, et al., 1994; Gaughran, et al., 1996). El blanco de calcofluor y el rojo congo son colorantes y perturbadores de pared celular que se unen a varios polisacáridos, entre ellos la quitina, en la pared celular de hongos (Roncero et al., 1985). Las cepas mutantes *chs*, fueron crecidas en MMV al cual se le adicionó cada uno de los agentes estresantes, antes mencionados. Se observó un patrón de crecimiento radial parecido en todos los tratamientos comparados con el tratamiento control (MMV) en todas las cepas mutantes (Fig. 32). Tal vez sea necesario aumentar las concentraciones de estos agentes estresantes o buscar otros agentes que nos puedan dar algún indicio de la integridad de la pared celular.

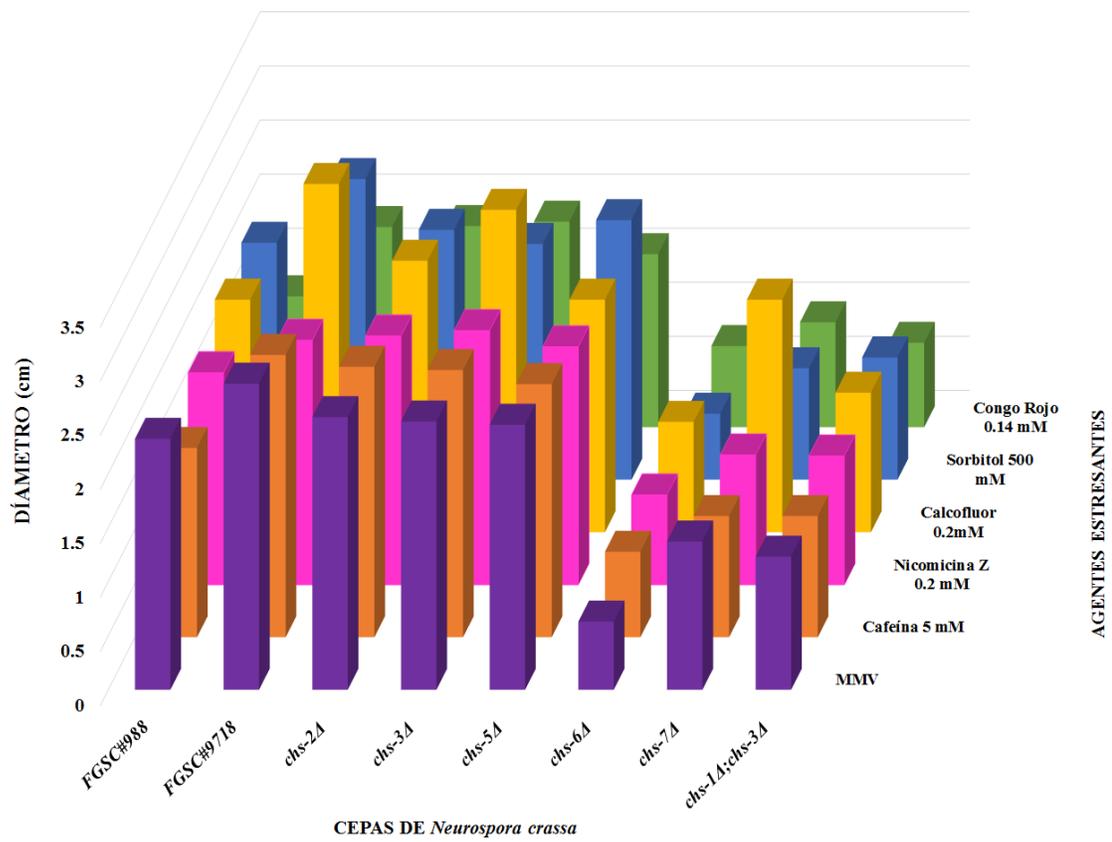


Figura 32. Crecimiento radial de las cepas mutantes *chs* en MMV-adicionado con agentes estresantes.

Parte 2: 6.2 ATPasa de MP (PMA-1)

6.2.1 Generación de la cepa expresando PMA-1-GFP

6.2.1.1 Etiquetamiento endógeno de las proteínas PMA-1 y PMB con GFP

Empleando la técnica del “Split marker” descrita en el apartado 5.6.3.1, se obtuvieron los fragmentos del ORF y UTR 3’ de aproximadamente 1kb usando los pares de oligonucleótidos ORFS54F-P1/ORFS55R-P2 y ORFS56F-P3/ORFS57R-P4 para *pma-1*, y ORFS45F-P1/ORFS46R-P2 y ORFS47F-P3/ORFS48R-P4 para *pmb*; así como también la amplificación del cassette *gfp-hph* de aproximadamente 2.3 kb (Fig. 11B) usando los oligonucleótidos 10XGly-F y LoxP-R. Los fragmentos purificados fueron utilizados para la subsecuente reacción de PCR, donde se fusionaron los fragmentos con el cassette *gfp-hph* obteniendo dos fragmentos de aproximadamente 3.0 kb y 2.0 kb (ver tabla X en anexo X para tamaños específicos) a los que se llamó brazo izquierdo usando el par de oligonucleótidos ORFS54F-P1/hph SM-R para *pma-1*, y ORFS45F-P1/hph SM-R para *pmb* (Fig.33 A,B). Para el brazo derecho se usaron los oligonucleótidos hph SM-F/ORFS57R-P4 para *pma-1* y hph SM-F/ORFS48R-P4 para *pmb* (Fig.33A,B).

6.2.1.2 Selección de cepas que expresan PMA-1-GFP

Se seleccionaron las cepas que fueron transformadas con las construcciones para etiquetar con *gfp* los genes *pma-1* (TRAF6) y *pmb* (TRAF9) que mostraron fluorescencia estable y resistencia a higromicina (300 µg/ml). Las cepas fueron analizadas para corroborar la correcta integración de las construcciones, mediante la amplificación por PCR de fragmentos de 2.1-kb usando el par de oligonucleótidos ORFS87-P1seq / GFP-r para la cepa PMA-1-GFP (Fig. 33A) y ORFS89-P1seq / GFP-r para la cepa que expresaba la proteína PMB-GFP (Fig. 33A). En este trabajo también se corroboró la correcta integración de la construcción genética en la cepa TESM003, la cual expresaba la proteína de la PMA-1-GFP bajo el promotor *ccg-1* (Riquelme et al., 2005), esto se realizó mediante PCR usando los pares de oligonucleótidos pMRP10/11 y pMRP12/13, amplificando dos fragmentos, uno de 3.2 kb y otro de 2.1 kb (Fig. 33C).

Las transformantes TRAF6 (*pma-1*) y TRAF9 (*pmb*) son cepas heterocariones por lo que para tener cepas homocariones se cruzaron con la cepa mutante *sad-2Δ*. Se obtuvo la progenie y se analizaron alrededor de 30 colonias por cepa. Para los estudios subsecuentes se usaron las cepas homocariones denominadas NRA6-11 y NRAF9-7.

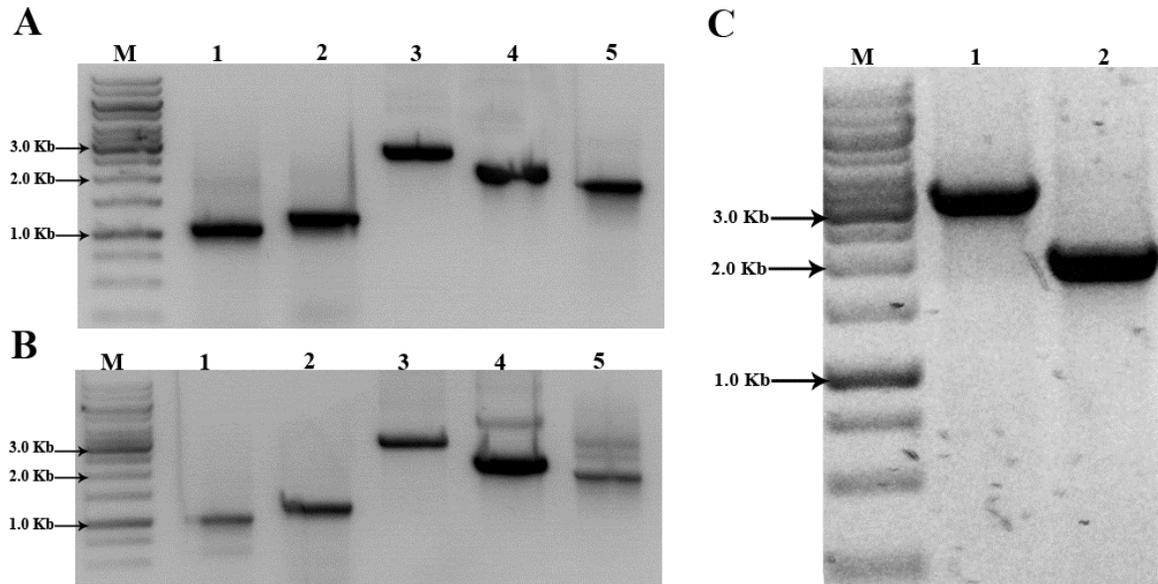


Figura 33. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos amplificados, fusiones y comprobación de PMA-1 y PMB. A) Amplicones correspondientes a PMA-1. B) Amplicones correspondientes a PMB. Carriles 1 y 2) Amplicón del marco de lectura abierto región 3' (~1Kb) y de la región no traducida 3' (~1Kb). Carriles 3 y 4) Amplicones de la fusión izquierda y fusión derecha. Carril 5) Amplicón de 2kb demostrando la correcta integración en el genoma para PMA-1 (A) y PMB (B) usando los oligonucleótidos P1Seq y GFP-R (ver Figura 10 en Materiales y métodos). C) Amplicones de 3.2 y 2.1 kb demostrando la correcta integración de PMA-1 bajo el promotor *ccg-1* en el locus *his-3*.

6.2.1.3 Crecimiento colonial de las cepas que expresan PMA-1-GFP bajo los promotores *ccg-1* y el endógeno

PMA-1 es una proteína esencial. En *N. crassa* la delección del gen *pma-1* es letal para el hongo. Para analizar la funcionalidad de la proteína etiquetada con la proteína fluorescente GFP, se midió el crecimiento colonial en las cepas que contenían esta fusión. La cepa que expresa la PMA-1-GFP bajo el promotor endógeno, mostró un crecimiento más lento que la cepa parental (FGSC#9718); a diferencia de la cepa que está bajo el promotor *ccg-1*, la cual mostró un crecimiento muy parecido a la cepa parental (Fig. 34). Aunque se observó un crecimiento menor, la viabilidad con el replazamiento del gen nativo con la versión *pma-1-gfp* indicó que la proteína recombinante es funcional.

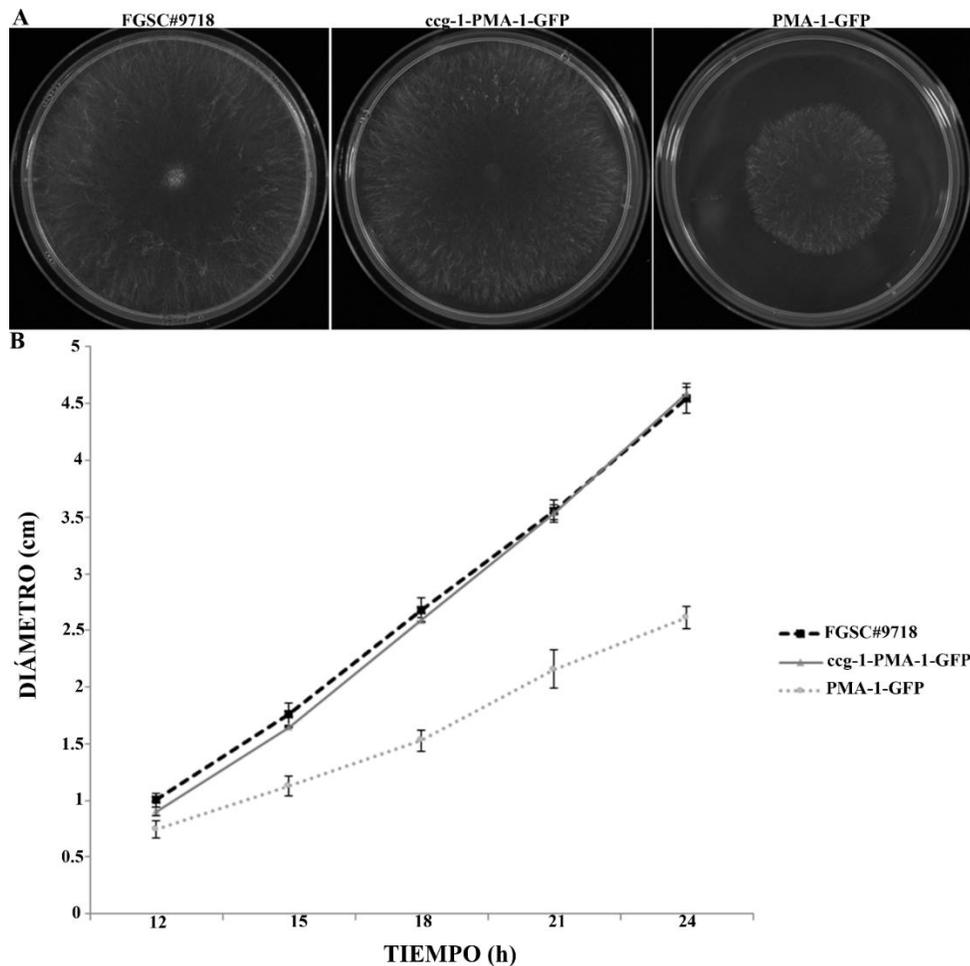


Figura 34. Crecimiento colonial de las cepas expresando PMA-1-GFP bajo el promotor *ccg-1* y el promotor endógeno. A) Morfología colonial; B) Gráfica del crecimiento radial de las cepas FGSC#9718 (parental), *ccg-1*-PMA-1-GFP y PMA-1-GFP.

6.2.2 Gradiente de densidad y análisis de western blot

El Western Blot de las fracciones de *N. crassa* expresando PMA-1-GFP mostró presencia de la proteína de fusión desde la fracción 7 hasta la 19, observándose dos picos mayoritarios. El primero de la fracción 7-12, cuya densidad en dichas fracciones es de 1.10-1.13 g/ml, estos valores son parecidos a la densidad donde sedimentan los quitosomas de *N. crassa* (Leal-Morales, et al., 1988) (Fig. 35). Y el segundo pico corresponde a la intensidad de las bandas más fuerte, en las fracciones 13-19 (1.14-1.21g/ml), al igual que la GS-1 y la MP cuya mayor sedimentación va de 1.1272-1.2124 g/ml y 1.21-1.23 respectivamente, en estudios previos (Serrano et al., 1978; Verdín, et al., 2009).

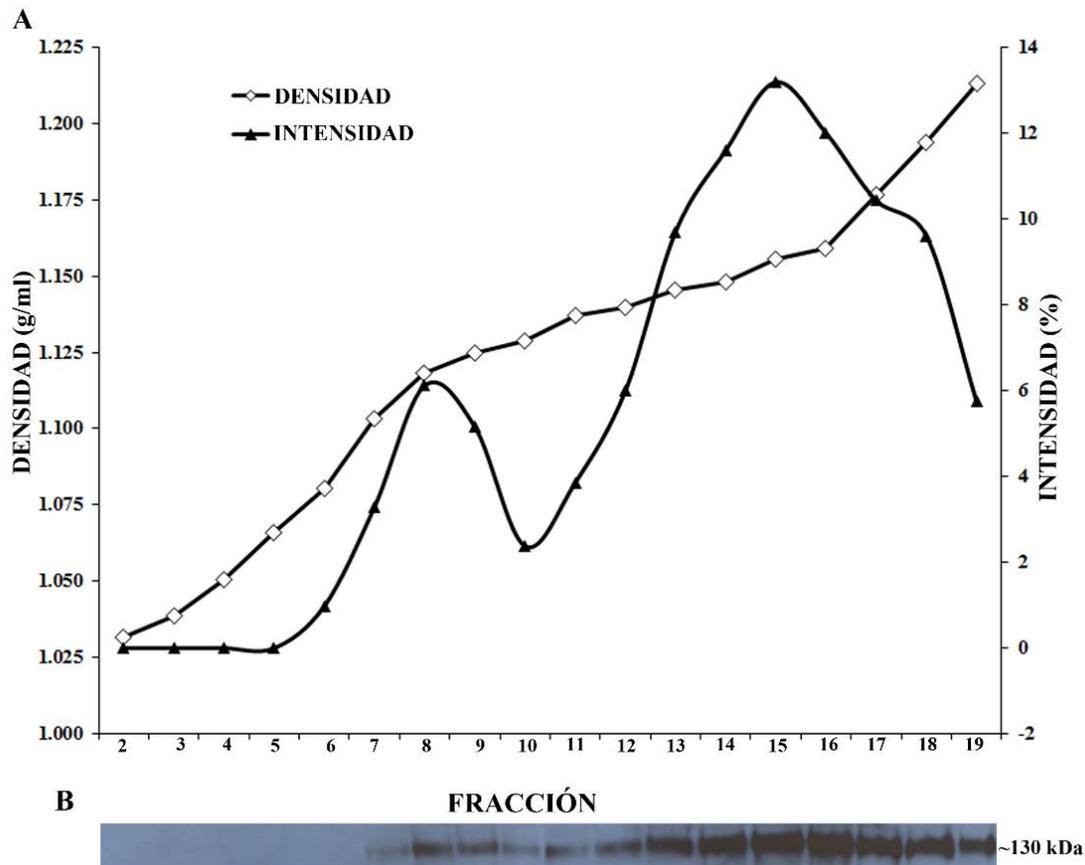


Figura 35. Gradiente de densidad de sacarosa y Western blot de las fracciones de la cepa PMA-1-GFP. A) La gráfica muestra el gradiente de densidad (g/ml) y la intensidad de las bandas (%). B) Western blot de las fracciones, detectado con el anticuerpo anti-GFP (1:500, Santa Cruz), donde se observó que sólo en las fracciones 7-19 hubo señal.

6.2.3 Análisis de microscopía de la PMA-1-GFP

6.2.3.1 Distribución de la PMA-1-GFP en etapas tempranas e hifas maduras

La PMA-1-GFP fue expresada bajo dos diferentes promotores, el promotor endógeno y el promotor fuerte reprimible *ccg-1*. La expresión en conidios y germínulas presentó similitudes en cuanto a la localización en la MP (Fig. 36A-K), pero cuando PMA-1-GFP estaba bajo el promotor *ccg-1*, se observó fluorescencia en vacuolas esféricas y un movimiento muy dinámico de vacuolas tubulares (Fig. 36A-F). En cambio, la PMA-1 expresada bajo el promotor endógeno sólo se observó en unas estructuras que no parecen vacuolas esféricas, sino un tipo de vesículas grandes (Fig. 36G-K).

La localización de la PMA-1 en hifas maduras también fue similar con ambos promotores; se localizó en la MP en regiones distales, en vacuolas esféricas y pequeñas vesículas en la región apical (Fig. 37A, B, D, E, G). Pero en la cepa que expresa PMA-1-GFP bajo el promotor *ccg-1*, además se observó localizada en una red de vacuolas tubulares en las regiones subapicales y pequeñas vesículas en regiones distales (Fig. 37B-D). Estas localizaciones estuvieron ausentes en la cepa que expresa la PMA-1-GFP bajo el promotor endógeno (Fig. 37E-G).

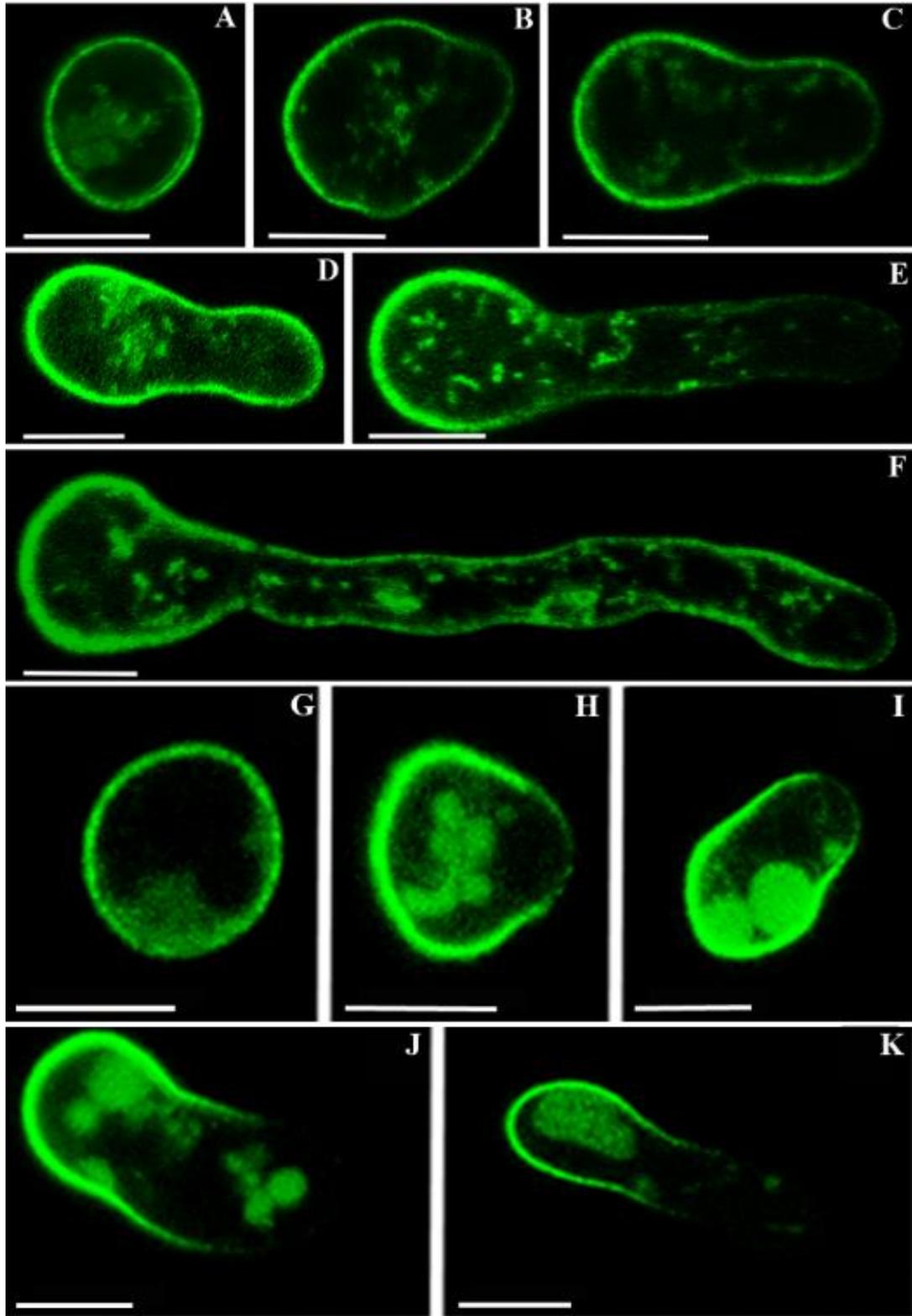


Figura 36. Localización de la Pccg-1-PMA-1-GFP y PMA-1-GFP en conidios y germínulas. A) Conidio expresando la PMA-1-GFP. B-F) Germínulas expresando la PMA-1-GFP; nótese la ausencia de las vacuolas globulares. G) Conidio expresando Pccg-1-PMA-1-GFP. H-K) Germínulas expresando Pccg-1-PMA-1-GFP; se pueden observar vacuolas globulares en el citoplasma. Barra= 5μm.

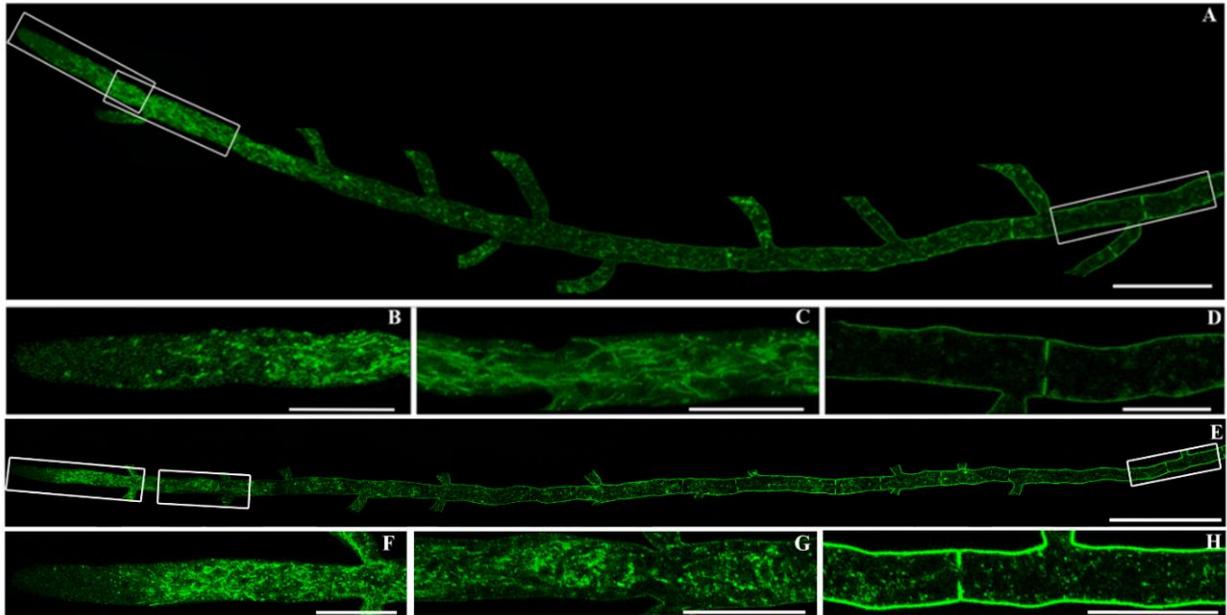


Figura 37. Localización de la PMA-1-GFP bajo el promotor *cgg-1* y el promotor endógeno en hifas maduras. A-D) Hifa madura expresando la *cgg-1*-PMA-1-GFP. B-D) Aumentos de las cajas en A; B) Ápice de la hifa donde se observa la expresión de la *cgg-1*-PMA-1-GFP alrededor de $> 50 \mu\text{m}$ se observa en pequeñas vesículas y endomembranas tubulares; C) La *cgg-1*-PMA-1-GFP se observa en las endomembranas tubulares en las regiones subapicales; D) Región distal de la hifa expresando *cgg-1*-PMA-1-GFP en la MP lateral y del septo; E-H) Expresión de la PMA-1-GFP en hifa madura. F-H) Aumentos de las cajas que se muestran en E; F) Región apical de la hifa donde la expresión de la PMA-1-GFP se observa en pequeñas vesículas y endomembranas tubulares ($> 50 \mu\text{m}$); G) Región subapical donde se empieza a observar la PMA-1-GFP en la MP lateral ($> 100 \mu\text{m}$); H) Región distal de la hifa donde la PMA-1-GFP se encuentra completamente localizada en la MP lateral y del septo. Barras= 20 y $50 \mu\text{m}$.

6.2.3.2 La PMA-1-GFP está excluida del Spitzenkörper

La mayoría de las hipótesis acerca del crecimiento en hongos filamentosos sugieren un tráfico unidireccional de vesículas hacia el ápice de las hifas, así como una agregación temporal en el SPK, seguido de la fusión con la MP. Sin embargo, se observó que la PMA-1-GFP se incorporó en la MP de regiones distales, y claramente no se acumuló en el SPK (Fig. 37A, E; Video supl. 2). Para examinar la posibilidad que la presencia de un SPK funcional podría excluir la localización de la PMA-1 en la punta, se usaron varios inhibidores del citoesqueleto que a su vez perturban la integridad del SPK. Cuando se observaron los efectos de los inhibidores sobre microtúbulos o de los microfilamentos de actina, el SPK ya no fue visible y la PMA-1-GFP todavía fue localizada en la MP y ausente en el ápice (Fig. 38B-D, G-K). Los inhibidores del citoesqueleto de actina (Citocalasina A y Latrunculina A) perturbaron al SPK teñido con FM4-64, mientras que el benomilo tuvo un efecto menos drástico pero aun así redujo la estabilidad y tamaño del SPK, como se mostró en previos trabajos (Riquelme et al., 2000). La PMA-1-GFP se encontró cercana a las regiones apicales de la MP en todos los casos, probablemente porque los inhibidores del citoesqueleto perturban la polarización de la célula.

Además, durante la emergencia de las ramas, se observó que las vacuolas tubulares están presentes en las ramas pero mantienen una cierta distancia de la punta. También se observó que la PMA-1-GFP empezó a localizarse en la MP de la base de la rama solamente cuando esta se localizaba en el MP de la hifa principal.

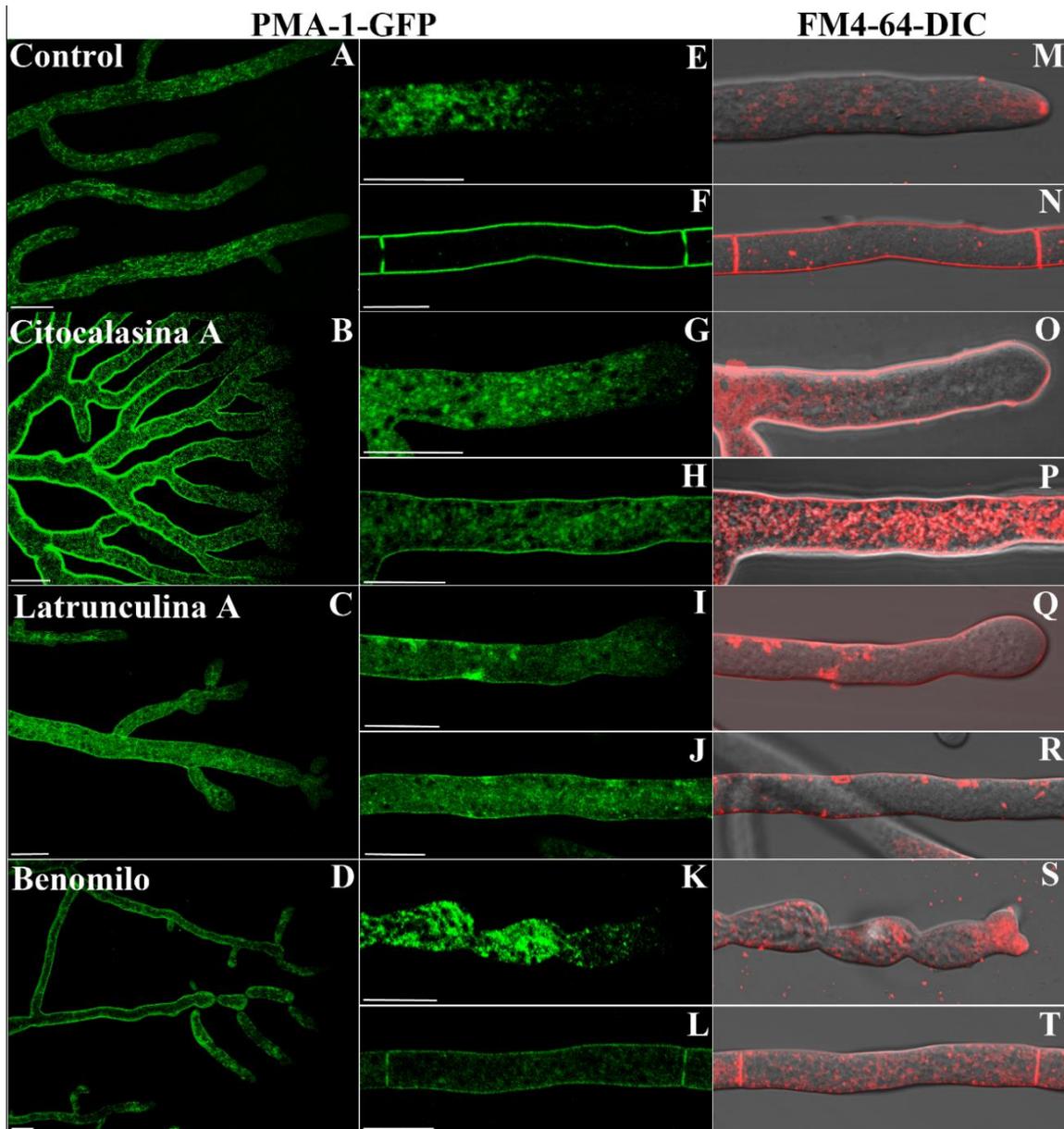


Figura 38. Efecto de los inhibidores del citoesqueleto en la localización de PMA-1-GFP. A-D) Hifa a bajo aumento; E-L) PMA-1-GFP a alto aumento; M-T) Tinción con FM4-64. Para cada tratamiento se muestra la región apical y una región distal de la hifa. En las células no tratadas (A, F-E) se observa la PMA-1-GFP en las endomembranas tubulares en regiones subapicales y en la MP en regiones distales. En células no tratadas pudo observarse un SPK normal teñido con FM4-64. Las hifas tratadas con Citocalasina A mostraron las puntas de las hifas hinchadas seguido de ramificaciones dicotómicas (B, G, O) y una distribución anormal de la PMA-1-GFP (B, G, H); no se observaron las endomembranas tubulares y se observó fluorescencia en la MP de las regiones apicales (B, G). No se observaron la presencia del SPK en las puntas de las hifas teñidas con FM4-64 (O). Las hifas tratadas con Latrunculina A mostraron hinchamiento en la punta de las hifas (C, I, Q); la PMA-1-GFP se observó cerca de la MP de las regiones apicales (C, I) y el SPK estuvo ausente en el ápice de la hifa (Q); además se observó a la PMA-1-GFP y el colorante FM4-64 acumulándose corticalmente, debajo de la superficie celular en regiones subapicales y distales, indicativo de una endocitosis defectuosa (I-J y Q-R). Las hifas tratadas con Benomilo mostraron una morfología distorsionada (D), la presencia de PMA-1-GFP en la endomembranas tubulares fue más prominente (K) y además se extendió en la MP de regiones subapicales (D). El SPK teñido con FM4-64 apareció con un tamaño más reducido y con pérdida de estructura (S). En todos los casos, PMA-1-GFP continuó localizada en la MP en regiones distales (F, H, J L). Cit A 100 $\mu\text{g/ml}$, Lat A 20 $\mu\text{g/ml}$, Benomilo 50 $\mu\text{g/ml}$. A, B, C y D) Barras 10 μm ; E-T) Barras= 20 μm .

6.2.3.3 Localización de la PMA-1-GFP en el septo

Para investigar la participación de PMA-1-GFP en la formación del septo, se usó el colorante vital FM4-64. Durante la formación del septo, el colorante se acumuló en la MP a medida que esta iba creciendo concéntricamente hasta formar los límites del poro septal; sin embargo la PMA-1-GFP empezó a acumularse en los septos que ya estaban formados (Fig. 39A-C). El colorante FM4-64 fue visible en el septo a los 6 min. (± 1.4) después de iniciar su formación (Fig. 39E), mientras que la PMA-1-GFP no empezó a observarse en el septo hasta los 39 min. (± 2.9) después de iniciar su formación (Fig. 39J). En reconstrucciones 3D se pudo observar como la PMA-1-GFP se localiza en toda la MP del septo (Fig. 39M).

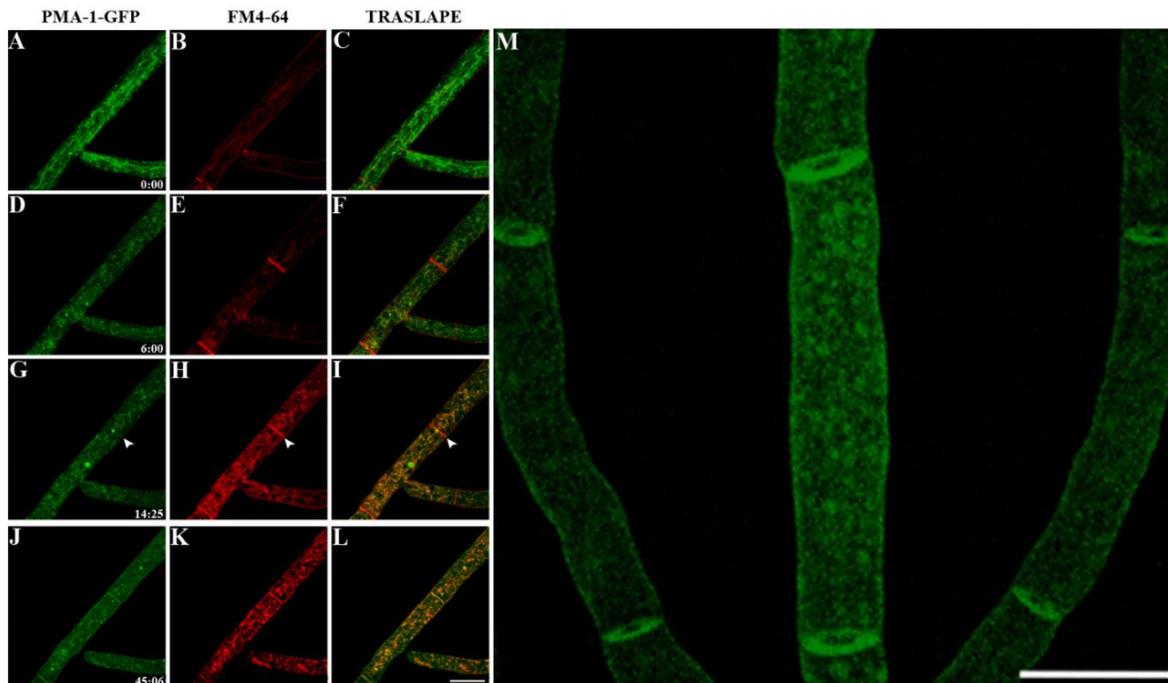


Figura 39. La PMA-1-GFP se localiza en la MP del septo completamente formado. A-C) No se observa fluorescencia de GFP en el septo naciente teñido con FM4-64. D-G) Después de 6:00 min., el septo teñido con FM4-64 parece estar completamente formado, mientras que la PMA-1-GFP todavía no se observa. G-I) Después de 14:25 min. la PMA-1-GFP empezó a acumularse ligeramente en la periferia del septo formado (flecha). J-L) A los 45:06 min., la PMA-1-GFP se observó claramente en el septo completo. M) Imagen 3D de la localización de la PMA-1-GFP en septos. Barras= 20 μ m.

6.2.3.4 Análisis de la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP)

El análisis de FRAP es una técnica muy usada para estudiar la movilidad de proteínas marcadas con proteínas fluorescentes. Llevamos a cabo el análisis de FRAP para examinar la dinámica de incorporación de la PMA-1-GFP en la MP y poder discernir si las vesículas que contienen PMA-1-GFP llegan ya sea del citoplasma o por difusión lateral de PMA-1-GFP ya incorporada en la bicapa lipídica de regiones adyacentes. Después de la exposición a la irradiación del láser a alta intensidad, la fluorescencia en la MP desapareció en las regiones fotoblanqueadas y gradualmente reapareció hasta que la fluorescencia quedó casi completamente reestablecida ($\approx 80\%$) (Fig. 40). Se llevaron a cabo diferentes análisis; Primero, se seleccionaron tres pequeñas regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés region of interest) de la MP. Esto nos permitió hacer un análisis de FRAP de la región fotoblanqueada y también un iFRAP (por sus siglas en inglés inverse FRAP) en las regiones contiguas no fotoblanqueadas (Fig. 40A). Segundo, se seleccionó una región larga que incluía toda la MP dentro de un compartimento de la hifa (Fig. 40B); finalmente, se seleccionó una ROI que incluía el citoplasma dentro del compartimento de la hifa (Fig. 40C). Los valores de recuperación de la fluorescencia y diversas variables fueron graficados, donde la fracción móvil (FM; fracción de las proteínas fluorescentes que difunden a la región fotoblanqueada) y el tiempo de vida media de la recuperación ($t_{1/2}$) fueron calculados. Para las ROIs que incluían la MP se obtuvieron valores de $t_{1/2}$ bajos (28-50 seg), mientras para las ROIs que contenían el citoplasma (Fig. 40) se obtuvieron valores de $t_{1/2}$ altos (550s), indicando que la PMA-1-GFP se mueve principalmente del citoplasma a la MP. En todos los casos la FM dio valores similares (81-87 %). iFRAP reveló pérdida de la fluorescencia en regiones no fotoblanqueadas de la MP (FM=45% $t_{1/2}=49$ s; Fig 40A) adyacentes a las regiones fotoblanqueadas, indicando una difusión lateral adicional de la PMA-1-GFP. En las regiones donde se analizó el iFRAP no hubo una pérdida completa de la fluorescencia; aunque gradualmente se llegó a una intensidad que coincidió con la intensidad de fluorescencia de las regiones fotoblanqueadas adyacentes.

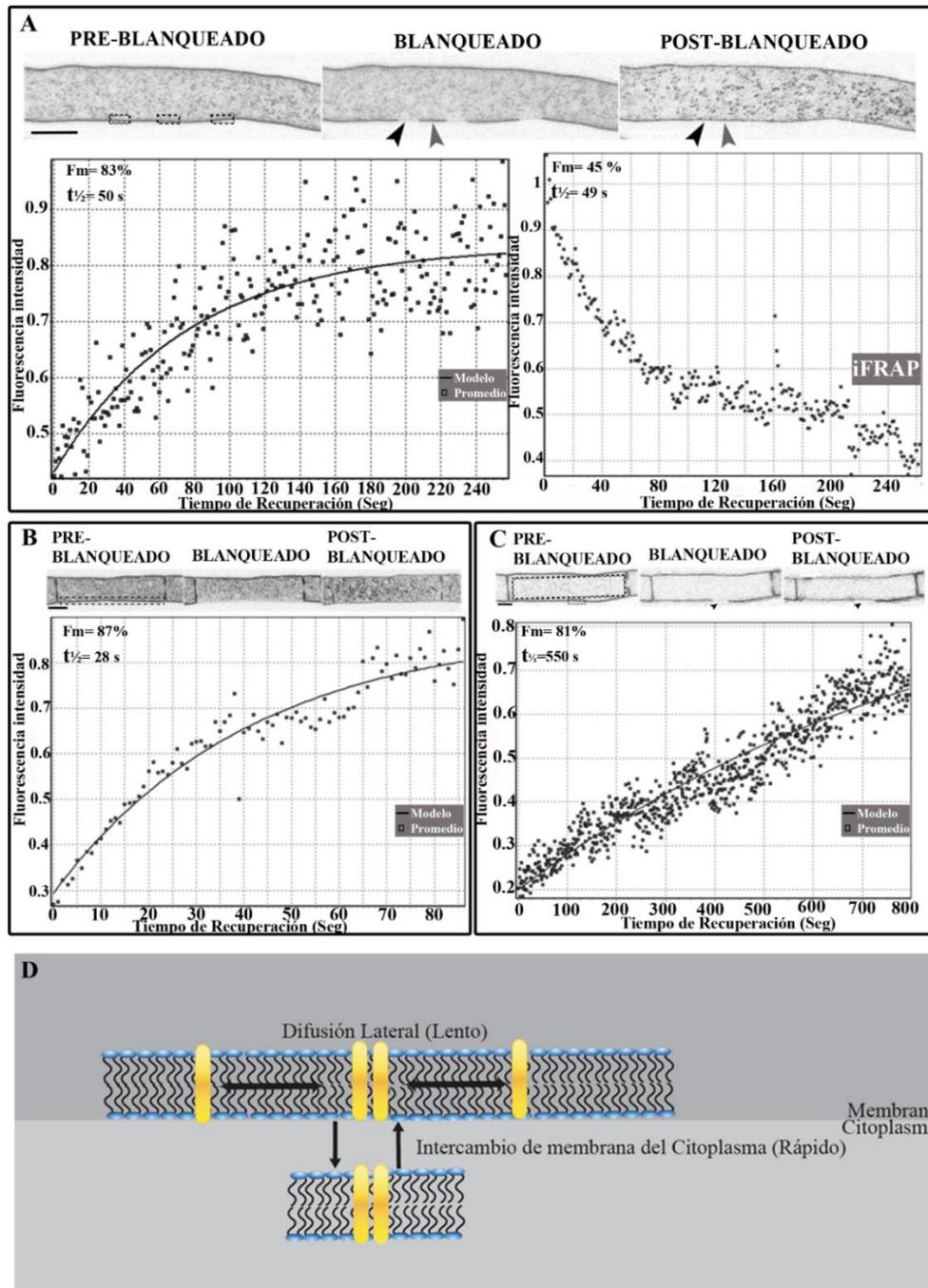


Figura 40. Análisis de FRAP de la PMA-1-GFP en la MP. A) Tres regiones pequeñas de interés (ROI) fueron fotoblanqueadas (cajas punteadas). La cabeza de flecha negra indica ROI fotoblanqueada que fue graficada y la cabeza de flecha gris señala la ROI seleccionada para el análisis de iFRAP. Barra= 20 μ m. B) Una ROI de largo tamaño en la MP (caja punteada) fue fotoblanqueada. Barra= 10 μ m. C) Una ROI que incluyó la región citoplasmática contenida dentro del compartimento de la hifa y una pequeña ROI en la MP fueron seleccionadas. La cabeza de la flecha negra indica la ROI graficada. Barra= 10 μ m. En cada uno de los casos se muestra la localización de la PMA-1-GFP antes y después del fotoblanqueamiento. Los datos de los gráficos están normalizados y corresponden a los valores de recuperación de la fluorescencia y a la curva ajustada. La fracción móvil (F_m) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se muestran en cada análisis. D) Esquema sobre la difusión lateral de proteínas dentro de la bicapa lipídica de la MP vs el intercambio de endomembrana a la MP.

6.2.3.5 Colocalización de la PMA-1-GFP con la ATPasa de membrana vacuolar VMA-1-RFP

Para elucidar la función de las endomembranas tubulares que contienen PMA-1-GFP, que se localizan en las regiones subapicales, se llevó a cabo una co-expresión con la proteína VMA-1-RFP, la cual es una ATPasa de membrana vacuolar que se localiza en la membrana de las vacuolas tubulares y esféricas (Bowman, et al., 2009). Se observó una colocalización parcial de ambas proteínas en las membranas de las vacuolas tubulares de las regiones subapicales, pero no se observó colocalización en las pequeñas vesículas (Fig. 41). En regiones distales se observó a la PMA-1-GFP en el lumen de las vacuolas globulares, mientras que la VMA-1-RFP se encontró en la membrana de las vacuolas esféricas (Fig. 41A-D).

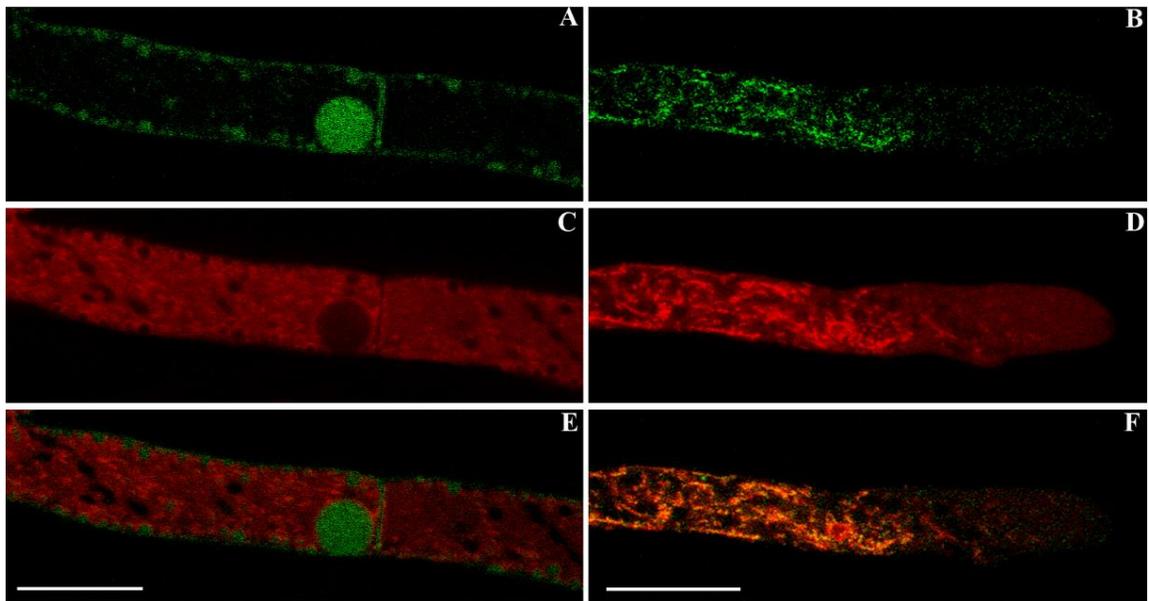


Figura 41. Colocalización de la PMA-1-GFP y VMA-1-RFP. La PMA-1-GFP se localiza en el lumen de las vacuolas tubulares y globulares, mientras la VMA-1-RFP se encuentra en la membrana vacuolar (A-F); A,B) Localización de la PMA-1-GFP; C-D) Localización de la VMA-1-RFP. Columna izquierda: región distal (vacuolas globulares); columna derecha: región apical (vacuolas tubulares). Barras= 20 μ m.

6.2.3.6 Efecto del inhibidor Brefeldina A en la cepa PMA-1-GFP

Con el objetivo de explorar la ruta de secreción de la proteína PMA-1, usamos el inhibidor Brefeldina A (BFA), el cual se ha usado tradicionalmente para bloquear las vesículas provenientes del Golgi (Fujiwara, et al., 1988; Lippincott-Schwartz, et al., 1989; Yamashina, et al., 1990). Células de *N. crassa* que expresaban la proteína PMA-1-GFP fueron expuestas al inhibidor BFA (200 $\mu\text{g/ml}$) y analizadas con el LSCM. Después de 7 min. de exposición, el crecimiento se detuvo y la PMA-1-GFP se empezó a observar en pequeñas vesículas que corresponden supuestamente a “cuerpos de Brefeldina” en las regiones subapicales y distales (Fig 42 flechas). A los 30 min. de exposición, las puntas de las hifas comenzaron a hincharse y vesículas pequeñas empezaron a acumularse en regiones apicales (Fig.42). Después de 90 min., la PMA-1-GFP se empezó a acumular en la MP de regiones apicales (Fig. 42). Aproximadamente 2 horas. después, las puntas estaban hinchadas y la PMA-1-GFP estaba distribuida en toda la MP a lo largo de la hifa, incluyendo regiones apicales y subapicales (Fig. 42). Una vez que la hifa recuperó su crecimiento polarizado, se observó una distribución normal de la PMA-1-GFP.

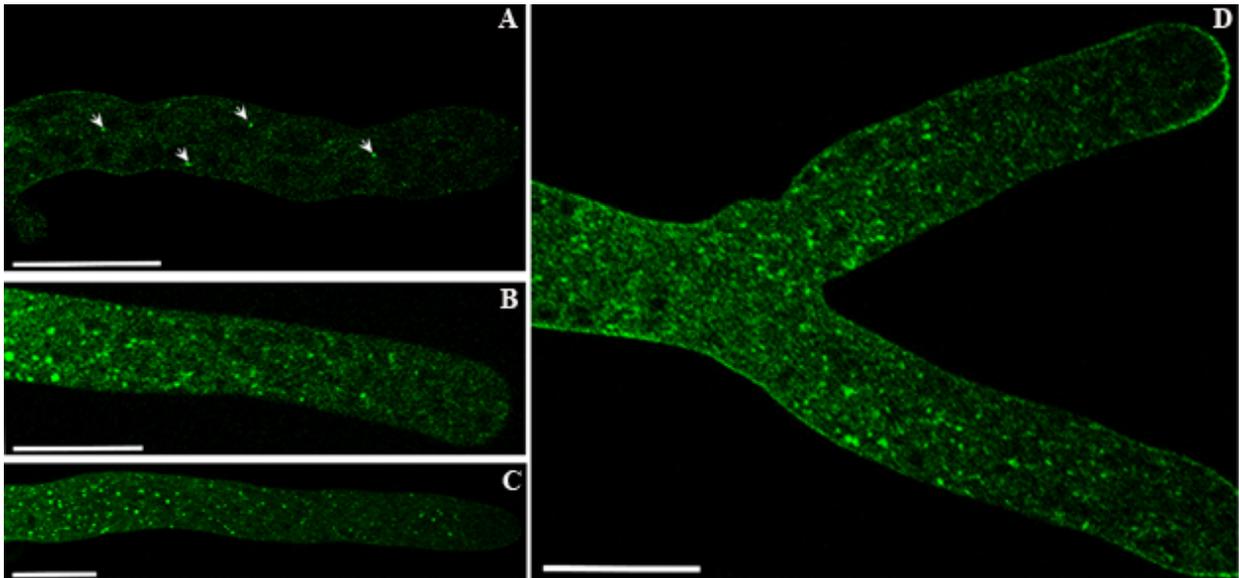


Figura 42. Efecto de la Brefeldina A sobre la expresión de la PMA-1-GFP en hifas maduras. A) A los 7:00 min., de exposición la PMA-1-GFP empieza a acumularse en supuestos “cuerpos de Brefeldina” (flechas blancas en regiones apicales y subapicales); B-C) Después de los 30-90 min. de exposición la punta empezó a hincharse y la PMA-1-GFP empezó a acumularse en la MP del ápice; D) Después de las 2 h de exposición, la PMA-1-GFP se acumuló a través de toda la MP de la hifa, incluyendo el ápice y el subápice. Barras= 20 μm . BFA: 200 $\mu\text{g/ml}$.

Para dilucidar si las endomembranas tubulares que observamos en las regiones apicales, las cuales desaparecen cuando las hifas son expuestas a BFA transformándose en pequeñas vesículas, forman parte del sistema de endomembranas de reciclamiento de la ruta de endocitosis, usamos el análisis de FRAP en vacuolas esféricas cercanas a la región apical. Una de las hipótesis que fundamentaron este análisis fue que la PMA-1 pudiera ser constantemente reciclada, y usando la ruta de endocitosis internalizarse de la MP a endosomas tempranos y luego tardíos, terminando en las vacuolas esféricas para su degradación. Se llevó a cabo el fotoblanqueamiento de vacuolas esféricas cercanas a la región apical en presencia y ausencia del inhibidor BFA. Se observó que en ausencia del inhibidor las vacuolas recuperaban la fluorescencia casi inmediatamente, 5 seg. después del fotoblanqueamiento (Fig. 43), a diferencia de la vacuola en presencia de BFA, en donde la fluorescencia no se recuperó después de 4:30 min., sugiriendo que la ruta de reciclamiento de la PMA-1 había sido interrumpida por el inhibidor BFA (Fig. 43).

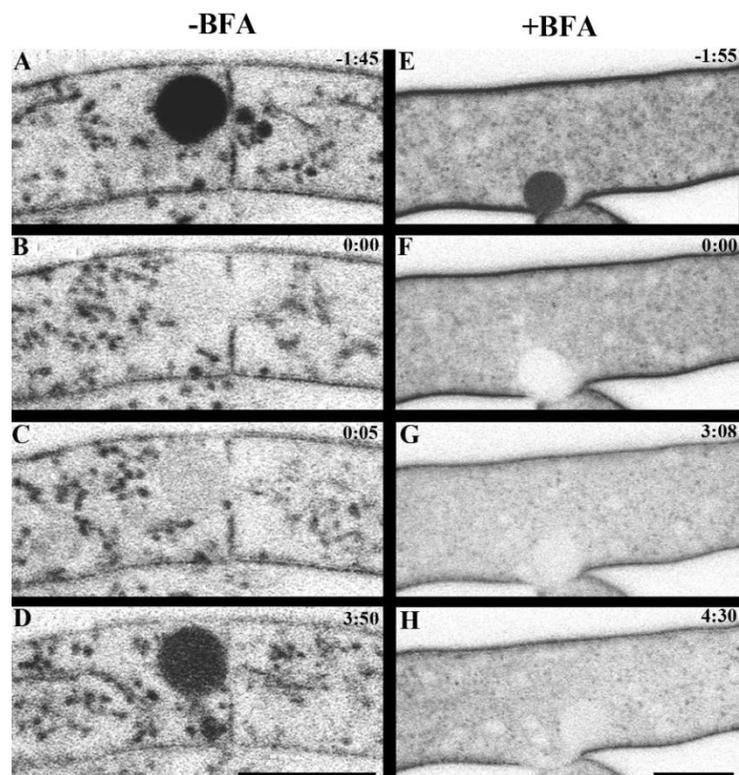


Figura 43. Análisis de FRAP en vacuolas globulares cercanas a la región apical de las hifas tratadas con BFA. A-D) FRAP en una vacuola de una hifa sin tratamiento; E-H) FRAP en una vacuola de una hifa expuesta a BFA; A y E) Fluorescencia en una vacuola globular antes del fotoblanqueamiento; B y F) Fotoblanqueamiento de fluorescencia en las vacuolas globulares; C) Recuperación de la fluorescencia a los 5 seg después del fotoblanqueamiento; D) Completa recuperación después de los 3:50 min.; G-H) La fluorescencia de la vacuola globular en la hifa expuesta a BFA no se recuperó 4:30 min. Barras= 20 μ m; BFA: 200 μ g/ml.

6.2.3.7 Localización del transportador de arginina/H⁺ (PMB)

Trabajos previos en *N. crassa* han sugerido que transportadores de aminoácidos, glucosa, fosfatos y potasio, las cuales tienen la función de bombear nutrientes hacia el interior de la célula, además están acoplado al transporte de iones (Slayman y Slayman, 1974; Lowendorf, et al., 1974). En *N. crassa* se etiquetó con GFP a la permeasa de aminoácidos básicos PMB, la cual es homóloga a la proteína Can1p de *S. cerevisiae* (Malínská, et al., 2003). El etiquetamiento endógeno no provocó ningún cambio en el crecimiento y morfología de la cepa homocarión (ver apéndice 1). En *S. cerevisiae* tanto Pma1p como Can1p se encuentran distribuidas en toda la MP; sin embargo no hay una colocación de las dos proteínas, sino que se encuentran distribuidas de manera alternada a lo largo de la MP, lo que sugiere la presencia de diferentes microdominios en la MP (Malínská, et al., 2003). En *N. crassa* PMB-1-GFP presentó una localización muy similar a la de PMA-1-GFP, sugiriendo que hay una compartimentación de membrana al igual que en *S. cerevisiae* (Fig. 44).

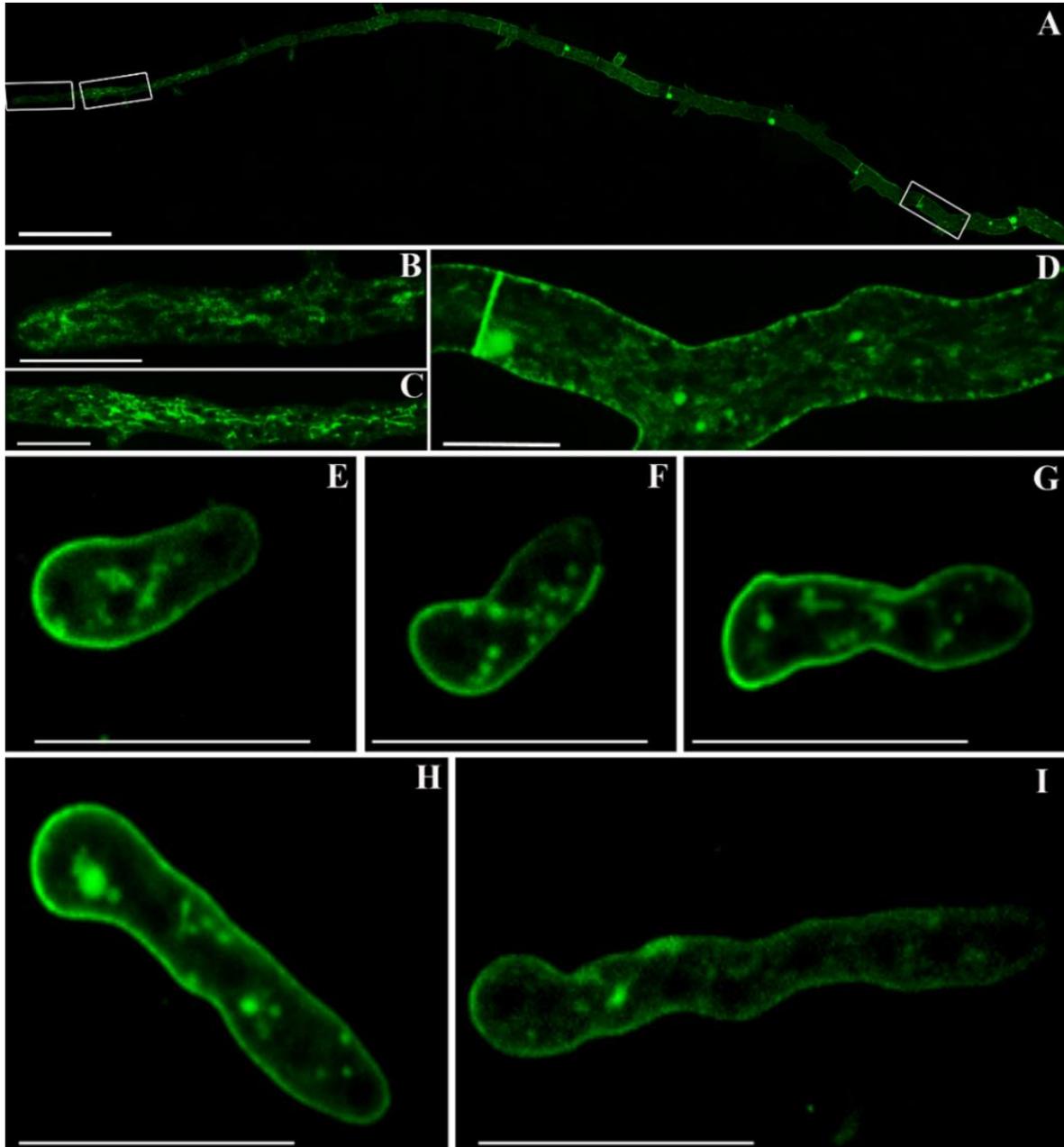


Figura 44. Localización de la PMB-GFP en germínulas e hifas maduras. A) Reconstrucción de una hifa madura que muestra la localización de la PMB-GFP, la cual está ausente en la MP de regiones apicales y presente en las regiones distales. B-D) Aumento de las regiones apical, subapical y distal de A (cajas); PMB se encuentra también en endomembranas tubulares. E-I) La PMB-GFP se localiza alrededor de la MP de las germínulas, pero es menos abundante en las puntas. Barras=10 μm (E-I), 20 μm (B-D) y 100 μm (A).

Capítulo 7

DISCUSIÓN

Durante el tráfico vesicular en los hongos filamentosos, no todas las proteínas se acumulan en el Spitzenkörper.

Una de las principales características de los hongos filamentosos es el crecimiento apical, donde la extensión de la pared celular y la exocitosis de vesículas son dos procesos estrechamente relacionados que implican el tráfico altamente polarizado de vesículas de secreción. Estas vesículas contienen proteínas involucradas en la síntesis de la pared celular, lípidos y otros tipos de proteínas. Uno de los modelos ampliamente aceptado para el crecimiento de hongos, es el del VSC (por sus siglas en inglés: vesicles supply center), que como se mencionó anteriormente atribuye al SPK una función de centro suministrador de vesículas (Bartnicki-García et al., 1989; 1995; Bartnicki-García, 2000). En este trabajo se sugiere que hay diversas poblaciones de vesículas, unas que efectivamente se concentran en el SPK y otras vesículas que no pasan por el SPK y son dirigidas al septo y a la MP lateral de regiones subapicales y distales. Con estos hallazgos surge la necesidad de plantear nuevos modelos que expliquen el tráfico vesicular hacia regiones no apicales de las hifas.

Todas las CHS analizadas se concentran en la parte central del SPK en *N. crassa* (Véase Fig. 13, 45; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2009); esta localización indica un tráfico de quitosomas hacia la región apical, lo que concuerda con reportes previos en donde se observó que los monómeros de quitina (N-acetil-glucosamina), sustrato de las CHS, se encontraban en mayor concentración en la región apical (Bartnicki-García y Lippman, 1969). Estudios de localización de CHS en otros hongos como *Ustilago maydis* y *Aspergillus nidulans* han mostrado también un tráfico vesicular hacia las regiones apicales (Weber et al., 2006; Takeshita et al., 2005). En *N. crassa*, todas las CHS además de localizarse en la región apical también están implicadas en la formación del septo. En contraste, en *U. maydis* sólo cuatro de las ocho CHS que tiene, se encuentran en la región apical, mientras que las restantes están localizadas exclusivamente durante la formación del septo en las dos formas de crecimiento que presenta este hongo (células de tipo levadura y filamentos), lo que sugiere que hay poblaciones de quitosomas que no se agregan en las regiones apicales durante el tráfico de estas enzimas.

Previamente se había descrito que algunas proteínas de la MP, tales como las ATPasas de H⁺, esenciales para el crecimiento hifal, están ausentes o inactivas en el ápice de la hifa (Slayman,

1987; Potapova et al., 1988; Belozerskaya y Potapova, 1993). En este estudio se demostró que la PMA-1 tiene una localización diferencial a lo largo de la superficie celular de las hifas maduras y germínulas. PMA-1-GFP se encuentra localizada en la región subapical así como distal de la superficie celular, pero no en el ápice (Fig. 45). Estos resultados confirman las predicciones anteriores de que la ATPasa H^+ es deficiente en el ápice, pero abundante distalmente (Takeuchi et al., 1988). Los protones son expulsados en regiones distales por las ATPasas translocadoras de protones y entran a la célula en regiones apicales por una serie de transportadores, incluyendo los que llevan los iones de potasio y fosfato como se ha reportado previamente (Takeuchi et al., 1988). El análisis de pH intracelular usando verde de bromocresol (un pH indicador) mostró que las zonas apicales tienen un pH ácido, mientras que las regiones distales tienen un pH básico (MacGillviray y Gow, 1987). Este gradiente de pH intracelular en *N. crassa* podría ser resultado, al menos en parte, de la distribución diferencial de PMA-1 en la MP. Además se observó un gradiente citoquímico similar en otros hongos filamentosos (Turian, 1979). Algunas proteínas, como transportadores o proteínas simporter, necesitan protones para su función, lo que sugiere que estas proteínas pueden utilizar el gradiente electroquímico creado por la ATPasa H^+ . En *S. cerevisiae*, el transportador arginina/ H^+ Can1p, al igual que la Pma1p, también es encontrado a lo largo de la MP (Malínská et al., 2003). Sin embargo, Pma1p y Can1p ocupan diferentes microdominios en la MP, que confirma la existencia de una compartimentación de proteínas dentro de la MP en la levadura (Malínská, et al 2003). Esta compartimentación de proteínas probablemente también exista en la MP de *N. crassa*. En *N. crassa* la permeasa de aminoácidos básicos PMB, homóloga de Can1p, etiquetada con GFP mostró una distribución similar a la de PMA-1 (Fig. 44). La coexpresión de las dos proteínas PMA-1 y PMB etiquetadas con diferentes marcadores fluorescentes y un análisis de microscopía de mayor resolución son necesarios para discernir si estas dos proteínas ocupan diferentes microdominios en la MP en un rango de varios cientos de nanómetros.

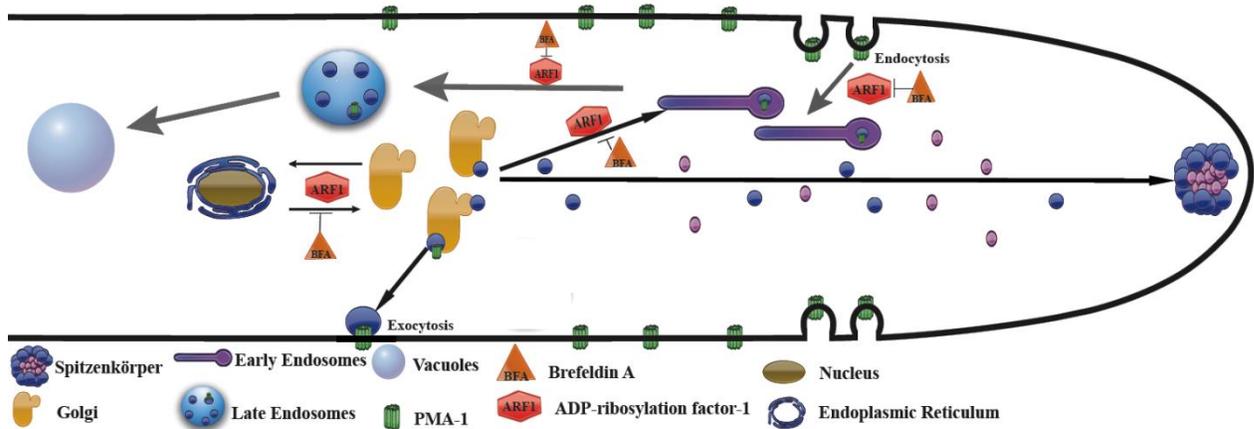


Figura 45. Modelo de secreción de la PMA y CHS. Este modelo propone una vía secretora clásica RE-Golgi de la PMA-1 y una ruta no convencional para las CHS, donde la PMA-1 se incorpora a la MP (flechas negras), mientras que las CHS se agregan en el SPK antes de incorporarse a la MP. Además la PMA-1 es reciclada a través de la vía endosomal (flechas de color gris).

La exocitosis de la PMA-1 se produce en las regiones distales de las hifas.

El etiquetado de PMA-1 con GFP proporciona una herramienta para estudiar una de las rutas de secreción de proteínas que pasan por Golgi a la superficie de la célula en hifas de los hongos. A pesar de que PMA-1-GFP se encuentra en las fracciones celulares de una densidad correspondiente a la de ER y macrovesículas (Fig. 35; Verdín et al., 2009), no se acumuló en el SPK, donde hay la mayor concentración de vesículas de secreción de acuerdo con micrográficas electrónicas de puntas de hifas de *N. crassa* (Riquelme et al., 2002). En su lugar, como se mencionó arriba PMA-1-GFP se localiza en las regiones subapicales y de alguna manera está siendo entregada directamente a la MP. El análisis de FRAP reveló que la tasa de recuperación de la fluorescencia fue mayor para el intercambio citoplasmático que para la difusión lateral, lo que sugiere que la PMA-1 se incorpora a la MP principalmente por intercambio con el citoplasma. A la resolución utilizada, desafortunadamente no pueden resolverse vesículas individuales en movimiento. Por ello, se supone que la PMA-1-GFP incorporada a la MP es transportada en vesículas que se fusionan con la MP. Sin embargo, la difusión lateral también se produce, como podría inferirse de los resultados iFRAP (Véase Fig. 40). Además el análisis FRAP sugiere exocitosis continua de PMA-1 a la MP en las regiones distales. Algunas proteínas SNAREs y componentes del complejo exocisto (AoSec3), que están involucrados en los eventos de exocitosis, se han localizado en el septo y en la MP en *Aspergillus oryzae* (Hayakawa et al., 2011; Karatsu et al., 2007). En *A. oryzae*, se ha

demostrado que las proteínas de transporte se expresan principalmente en las regiones distales. Por ejemplo, AoUapC y AoGap1, dos permeasas de aminoácidos, tampoco se acumulan en el SPK, pero si se localizan en la MP lateral y en septos (Hayakawa et al., 2011; Masai et al., 2006). Algunos mecanismos de exocitosis en células de mamíferos, como el mecanismo “Kiss and Run” (K&R), no está implicado en el crecimiento de la MP (Alés et al., 1999; Henkel et al., 2000; Lollike et al., 1998). Durante K&R, las proteínas se liberan pero las vesículas no colapsan totalmente, es decir, la membrana de la vesícula no se fusiona completamente con la MP y no contribuye a la expansión de membrana (Keighron et al., 2012).). Si bien los mecanismos de K&R no se han explorado o identificado en levaduras u hongos filamentosos, toda la evidencia sugiere que pueden existir. Se ha propuesto que durante el crecimiento de la hifa, la membrana vesicular es exocitada por fusión completa en diferentes zonas ubicadas en la punta, contribuyendo de esta manera al incremento en superficie de la hifa; Dado que no se ha identificado el crecimiento intercalar en hifas de *N. crassa*, si este mecanismo de fusión de membranas ocurriera para las vesículas acarreadoras de PMA-1, tendría que llevarse a cabo el proceso de endocitosis en otras regiones de la hifa aparte del collar subapical endocítico identificado por varios autores (Delgado-Álvarez et al., 2010; Updhyay y Shaw, 2008; Araujo-Bazán et al., 2008; Taheri-Talesh et al., 2008) para eliminar el exceso de membrana. Indudablemente se requieren más estudios en donde se analice cuantitativamente la contribución de cada uno de estos procesos durante el crecimiento celular.

Las diferentes clases de CHS viajan en diferentes clases de quitosomas

Todas las CHS se localizaron en el SPK, aunque cada una de ellas ocupó un área distinta. Se observó que la CHS-2 y la CHS-7 ocupan un área menor que la CHS-4 y la CHS-5 en el SPK. Y a su vez la CHS-5 parece ocupar un área mayor en el SPK que las otras CHS (Fig. 13). Del mismo modo, la distribución de las CHS en el septo fue variable según la clase de CHS (Fig. 13). Durante la formación del septo la CHS-2 sólo mostró localización en el poro septal, mientras que la CHS-4 además de encontrarse distribuida alrededor de todo el septo se acumuló más intensamente en el poro septal. Estas diferencias sugieren que las diferentes CHS son transportadas en diferentes quitosomas (Fig. 45). A pesar de que la CHS-5 y la CHS-1 (Fig. 17) mostraron una colocalización parcial en el SPK. Además la CHS-1 se observó en ciertas vesículas en regiones subapicales, no observadas para la CHS-5.

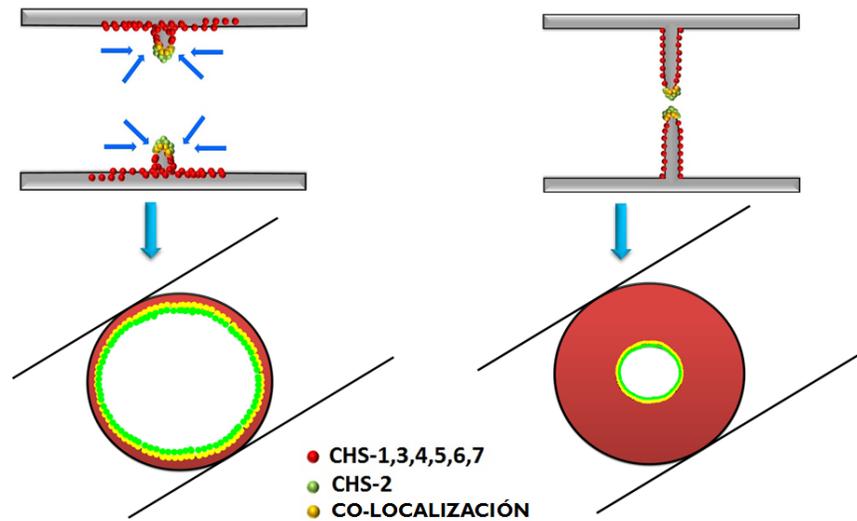


Figura 46. Modelo de la localización de las CHS durante la formación del septo. En este modelo se muestra como la CHS-2 tiene una localización al principio de la formación del septo, diferente al resto de las CHS.

En estudios previos se observó una colocalización parcial de la CHS-3, CHS-1 y CHS-6 en el centro del SPK (Sánchez-León et al., 2011). La carencia de evidencia bioquímica con respecto a las diferentes poblaciones de quitosomas, no permite establecer una conclusión más contundente. Lo ideal sería poder purificar los diferentes quitosomas que contienen cada una de las clases de CHS; aunque ello requeriría la obtención de mutantes múltiples de *chs*, que expresaran una sola clase de CHS.

El transporte de los quitosomas depende del citoesqueleto de actina

Se ha reportado en estudios previos que la CHS-1 sufre una deslocalización del SPK en presencia de inhibidores de actina (Citocalasina A y Latrunculina A) (Sánchez-León et al., 2011); sin embargo en presencia del inhibidor de microtúbulos (Benomilo) la CHS-1 continúa llegando al SPK, aún cuando los microtúbulos todavía no se han recuperado por el efecto del inhibidor (Sánchez-León et al., 2011). La Latrunculina A tuvo el mismo efecto en la distribución de las proteínas CHS-4, CHS-5 y CHS7, provocando una localización aberrante de éstas tanto en la región apical como en el septo; en este último se observaron unas estructuras redondeadas cercanas a los septos que se ha sugerido previamente que son vacuolas (Sánchez-León et al., 2011). Como se ha descrito anteriormente la CHS-5 y la CHS-7 contienen un dominio motor de miosina (DMM), lo que hace suponer su interacción con el citoesqueleto de actina. En las miosinas el DMM se une a los filamentos de actina y utiliza la energía generada por la hidrólisis de ATP para llevar a cabo su

movimiento a través de los cables de actina. Este dominio es altamente conservado entre las diferentes clases de miosinas (Holmes, 2008). Los aminoácidos implicados en la unión al ATP son altamente conservados en todas las clases de miosinas (90%; Cope et al., 1996). El alineamiento del DMM de la miosina clase V (MYO-2), CHS-5 y la CHS-7, indicó alrededor de un 20% de homología en todas las combinaciones (ver apéndice 2); se ha descrito anteriormente un porcentaje similar entre los dominios motores de otras CHS clase V y miosinas clase V (Takeshita et al., 2006, Weber et al., 2008). Por lo anterior se sugiere la posible participación del DMM, durante el tráfico de estas CHS mediante el citoesqueleto de actina. Paralelamente, al analizar la CHS-5-GFP mediante microscopía de evanescencia (TIRFM), se observaron unos filamentos parecidos a los cables de actina (Fig. 18), lo que sugirió la interacción entre los filamentos de actina con los quitosomas que contienen la CHS-5. Esta clase de CHS además se caracteriza por tener el dominio DMM, lo que hace sugerir que la CHS-5 usa su dominio miosina para moverse a través del citoesqueleto de actina. No obstante, en trabajos previos sobre la CHS clase V en los hongos *A. nidulans* y *U. maydis* se reportó que el dominio miosina interacciona con la F-actina y funciona como un ancla entre la CHS y el citoesqueleto de actina en las puntas de la hifa pero no está participando en el transporte hacia las regiones apicales (Takeshita et al., 2006; Treitschke et al., 2010). Para poder establecer si este dominio DMM de la CHS-5 en *N. crassa* está realmente participando en el transporte de la CHS, necesitamos hacer un estudio más específico de este dominio en ambas clases (V y VII) de CHS.

Por otra parte la CHS-1 también se predice como una CHS que utiliza el citoesqueleto de actina para su transporte. Pero a diferencia de la CHS-5 para la cual se ha observado que decora cables de actina (Fig. 18), la CHS-1 sólo se ha observado en pequeñas vesículas que se mueven en ambas direcciones (Sánchez-León et al., 2011). Debido a que el resto de las CHS no tienen dominio DMM, se cree que se necesitan proteínas motoras como las miosinas para su transporte. En este estudio se analizó la MYO-2 clase V, la cual se ha reportado que está involucrada en el transporte de vesículas secretoras, vacuolas, Golgi *tardío* y peroxisomas (Johnston et al., 1991, Govindan et al., 1995; Hill et al., 1996; Catlett y Weisman, 1998; Schott et al., 1999; Karpova et al., 2000; Hoepfner et al., 2001; Rossanese et al., 2001). Las vesículas secretoras se unen a la MYO-2 por un dominio denominado “*dilute*”, dominio globular o dominio de unión al cargo en *S. cerevisiae* (CBD, por sus siglas en inglés: cargo binding domain; Schott et al., 1999); este dominio contiene dos subdominios estructurales que corresponden a dos regiones funcionales. El subdominio I es

específico para vacuolas y el subdominio II es específico para vesículas secretoras (Pashkova et al., 2005). Además se había descrito que vesículas que contenían Chs3p en *S. cerevisiae* son transportadas por la Myo2p (Santos y Snyder, 1997). En este trabajo se eliminó el dominio de unión al cargo (104 aa, Q1378-E1481), para asegurar que la MYO-2 no transportara ningún tipo de cargo y además se etiquetó con GFP. La cepa MYO-2-dilΔ-GFP mostró un fenotipo colonial muy aberrante; además la fluorescencia se observó de una manera más focalizada en el núcleo del SPK (Fig. 20F). Sin embargo cuando se expresó la CHS-1-mChFP en la cepa MYO-2-dilΔ-GFP, se observó que la CHS-1 continuaba transportándose hacia la región apical y localizándose en el SPK, sugiriendo que al menos la población de quitosomas que transportan la CHS-1, no requiere de la MYO-2 para su transporte. Por lo que queda la incógnita de cuál es la proteína motora que se encarga del transporte de la CHS-1. El genoma de *N. crassa* sólo tiene cuatro genes codificantes para miosinas y sólo una de ellas pertenece a la clase V, la MYO-2. Se ha descrito que las miosinas clase V (Myo2p) transportan vesículas secretoras provenientes del Golgi (Evans et al., 1998; Miller et al., 2000; Santos y Snyder, 1997). Previamente se ha postulado que la CHS-1 no sigue la ruta de secreción clásica (Sánchez-León et al., 2011), y que los quitosomas no provienen del Golgi. El hecho que la CHS-1 llegue al SPK independientemente de la MYO-2 apoya la idea de que la CHS-1 viaja a través de una ruta de secreción no convencional, con participación de otras proteínas motoras o a cuenta de otras poblaciones de quitosomas (por ejemplo, las poblaciones que contengan las clases V y VII las cuales tienen el dominio DMM). Para corroborar esto último se requeriría expresar CHS-1-mChFP, en cepas mutantes de las *chs* clase V y VII.

El reciclaje de la PMA-1 implica la vía endosomal.

Después de un exposición corta a BFA, la PMA-1-GFP se entregó a la MP, y no fue aparentemente bloqueada en hifas de *N. crassa*. Además, PMA-1-GFP se acumuló en pequeñas estructuras visibles en regiones apicales y subapicales, de manera similar a los “cuerpos de Brefeldina” u “orgánulos de Brefeldina” observados en células de *A. nidulans* que expresan los marcadores de Golgi PH^{OSBP} ó HypBSec7 y de *S. cerevisiae* que expresan el marcador Sec7p, etiquetados con proteínas fluorescentes, y expuestos a BFA (Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Rambourg et al., 1995; Deitz et al., 2000). Como se mencionó anteriormente, Pma1p es muy estable en la MP, por lo tanto, el hecho de que todavía se observe en la MP después de una breve exposición a BFA podría indicar que, aunque ninguna PMA-1-GFP adicional llega a la MP, la proteína existente al momento que se aplicó el inhibidor, aún no ha sido reciclada. Ante una exposición más larga a BFA, PMA-1-GFP

fue encontrada en la MP en regiones apicales, lo que indica que de alguna forma el ápice perdió sus marcadores de "polaridad" y la PMA-1 fue entregada a todas las regiones de la MP, inclusive en las regiones apicales. Lo que no se puede discernir hasta el momento es si PMA-1-GFP llega a la MP apical por difusión lateral desde las zonas más distales. Además, se ha sugerido que la BFA potencia las vías secundarias (Klausner et al., 1992). BFA tiene un sitio adicional de acción, más allá del Golgi, uno que afecta a los endosomas (Nebenführ et al., 2002). Hemos observado que la PMA-1-GFP no llega a las vacuolas globulares y que las endomembranas tubulares desaparecen cuando las hifas fueron tratadas con BFA (Fig. 42, 43). Esto sugiere una función de entrega endosomal para estos orgánulos tubulares. El transporte entre endosomas temprano (EE: Early Endosomes) y endosomas tardíos (LE: Late endosomes) implica el reclutamiento dependiente de Arf1, un subgrupo de polipéptidos de la cubierta vesicular COPI. En *S. cerevisiae* y células de mamíferos, las mutantes ARF1 muestran defectos similares en la endocitosis y la vía secretora (Gaynor et al., 1998). Además, se ha descrito que la Pma1p es endocitada con la ayuda de las proteínas VPS ("Vacuolar protein sorting"), a través de la vía de endosomal (Luo y Chang 2000).

Interacción de las CHS con otras proteínas involucradas en su transporte o regulación

En levaduras se ha reportado que para el tráfico y activación de las Chs2p y Chs3p se requieren diferentes grupos de proteínas auxiliares que garantizan su localización espacial y temporal correcta. Para elucidar el mecanismo de regulación del tráfico quitosomal y la activación de las CHS en el hongo filamentoso *N. crassa*, en este estudio se seleccionaron tres CHS: la CHS-1, la CHS-4, y la CHS-5. El análisis *in silico* sólo permitió identificar proteínas que interaccionan con CHS-4 (ver apéndice 3); lo cual no es sorprendente dado que la mayoría de los estudios realizados sobre interacciones con CHS se basan en la levadura *S. cerevisiae*, que no posee ni CHS-1 ni CHS-5, ambas exclusivas de hongos filamentosos.

Mediante análisis preliminares de coimmunoprecipitación (GFP-TRAP®), se pudieron obtener varias proteínas putativas (Tablas 6-11), cuyas interacciones podrían ser importantes para las CHS en *N. crassa*. Para CHS-4, se encontró CSR-4, una proteína activadora que resultó ser homóloga a Chs4p, la proteína activadora de Chs3p en *S. cerevisiae*. Previamente se ha descrito que la Chs3p necesita de ciertas chaperonas para su tráfico a través de la ruta de secreción clásica. La localización y la activación en la MP de Chs3p en *S. cerevisiae* dependen de su asociación con Chs4p, cuya asociación con el anillo de septina está mediada a través de una interacción con la formina Bni4

(Bulawa, 1993; DeMarini et al., 1997; Grabinska et al., 2007). No se encontraron las proteínas pertenecientes al complejo exómero o la chaperona Chs7p. Ello puede ser debido a dos factores; el primero que sea por cuestiones técnicas, debido a que sólo se tomaron proteínas con un peso más alto de 70 kDa y los tamaños de estas proteínas oscilan entre 70-40 kDa aproximadamente; el segundo a que las interacciones entre las chaperonas sean transitorias, lo que dificultaría obtenerlas por este tipo de método. Para la purificación de este complejo se han utilizado otras técnicas como la de TAP-TAG (Sanchatjate y Schekman, 2006). El hecho que se haya encontrado CSR-4 puede deberse a que su interacción sea más estable, ya que al menos en *S. cerevisiae*, Chs3p necesita a Chs4p tanto para su localización como para su función; por lo que probablemente estén interaccionando hasta el momento de su reciclaje. En el caso de la CHS-1 se obtuvieron las proteínas SEC-10 y la SEC-14; la primera es una proteína que forma parte del complejo exocisto (TerBush et al., 1996), y la segunda es una proteína que se ha reportado está involucrada en el tráfico del *trans*-Golgi a MP y endosomas-vacuolas en *S. cerevisiae* (Curwin et al., 2009). Estos datos sugieren que la entrega de la CHS-1 a la MP en la región apical, es probablemente mediada por el complejo del exocisto. En cambio la SEC-14, esté probablemente más involucrada en la ruta endocítica de la CHS-1, por el antecedente que esta proteína en *N. crassa* no sigue la ruta de secreción clásica (Sánchez-León et al., 2011). Asimismo se identificó una homoserina cinasa que podría estar involucrada en la fosforilación de la CHS-1. En *S. cerevisiae* se ha reportado que la fosforilación de la Chs2p y Chs3p es necesaria, ya sea para su regulación o para su transporte. La Chs3p necesita ser fosforilada para su correcta localización y función, aunque en la levadura no se ha identificado que cinasa es la responsable de dicha regulación (Lenardon et al., 2010). Por otro lado la fosforilación de Chs2p afecta su localización espacio temporal, por dos proteínas cinasas; la primera es la Cdk1, la cual fosforila directamente a la Chs2p en el RE; esta fosforilación retiene a la Chs2p en el RE hasta que la célula sale de la mitosis; subsecuentemente la proteína es desfosforilada por la Cdc14p fosfatasa (Chin et al., 2012). Por otro lado, de manera indirecta la fosforilación afecta el tráfico de Chs2p cuando se sintetiza en el RE durante la metafase, pero su liberación desde RE se coordina con la salida de la célula de la mitosis activa y la inactivación de la cinasa mitótica por Sic1p (Zhang et al., 2006). Además se identificó una proteína de gran interés, la serina proteasa, identificada con ambas, CHS-4 y CHS-5. Se ha descrito previamente que las CHS, son proteínas zimógenas, que necesitan ser activadas proteolíticamente, para llevar a cabo la síntesis de quitina (Cabib y Farkas, 1971; McMurrrough y Bartnicki-García, 1971; Duran et al., 1975; Leal-Morales et al., 1988; Ruiz Herrera et al., 1975). En trabajos previos en *N. crassa* se ha

observado que para la actividad total de CHS es necesario usar tripsina, como activador proteolítico. La tripsina se encuentra dentro de la familia de las serina proteasas, por lo que se sugirió que esta proteína podría estar involucrada en la activación de al menos estas dos clases de CHS.

Las CHS están implicadas en el crecimiento apical así como en diferentes estados del desarrollo en *N. crassa*

En varias especies de hongos filamentosos tales como *Aspergillus nidulans* (Motoyama et al., 1994; Motoyama et al., 1996; Takeshita et al., 2005; Takeshita et al., 2006), *A. fumigatus* (Munro and Gow, 2001; Mellado et al., 2003), *Ustilago maydis* (Xoconostle-Cázares et al.; 1997; Weber et al., 2006), *Fusarium oxysporum* (Martin-Urídóz et al., 2004), *Magnaporthe grisea* (Kong et al., 2012) y *Botrytis cinerea* (Wang et al., 2001; Soulié et al. 2003, Soulié et al., 2006; Arbelet et al., 2010) se han descrito diferentes funciones para cada clase de CHS. La caracterización de las cepas mutantes de *chs* reveló funciones específicas para las CHS clases I, II, VI, V, y VII en *N. crassa*. La *chs-2Δ* (clase II) no mostró ningún fenotipo afectado en los estados de desarrollo estudiados, como previamente se había reportado en la mutante *chs-2^{RIP}* (Din y Yarden, 1994). Por otro lado la *chs-3Δ* (clase I) tampoco mostró anomalías a simple vista (crecimiento, conidiación, ramificación etc.), como ya se había descrito anteriormente (Sánchez-León et al., 2011); pero cuando se analizó la formación de estructuras sexuales, se observó que no había formación de peritecios a los 30 días post-inoculación; cuando el control (cepas parentales) ya había formado peritecios e inclusive liberado ascosporas, lo que sugiere que esta clase de CHS está involucrada en el desarrollo de estructuras sexuales. En el caso de *A. nidulans* y *A. fumigatus*, mutantes de *chs* clase I *ChsA* y *ChsC*, mostraron un fenotipo normal en comparación con las cepas de tipo silvestre (Motoyama et al., 1994; Munro y Gow, 2001). En cambio, en otras especies fúngicas, la CHS I parece tener un papel importante. Por ejemplo, en *B. cinerea* la *chsI* está implicada en el crecimiento hifal y la patogenicidad (Wang et al., 2001; Soulié et al., 2003). En *N. crassa* se ha reportado que la mutante *chs-I^{RIP}* muestra un fenotipo anormal, con hifas anormales y un crecimiento lento (Yarden y Yanofsky, 1991). La mutante *chs-1Δ* no había presentado un fenotipo evidente (Sánchez-León et al., 2011). Sin embargo, en este estudio se llevó a cabo el análisis de la mutante *chs-1Δ* y se demostró mediante PCR que esta cepa contenía una copia del gen *chs-1*, además del cassette de delección con el gen *hph*, indicando que la cepa se encontraba en estado heterocarión. Por lo anterior, aún queda corroborar si realmente la *chs-1* podría tener una función primordial durante el

crecimiento vegetativo de la hifa tal como lo sugirió el análisis de la mutante *chs-1^{RIP}*. La mutante *chs-6Δ* mostró un crecimiento más lento que el resto de las mutantes y una hiperramificación apical, por lo que se concluye que la *chs-6* tiene un papel principal en el crecimiento apical. Anteriormente se ha descrito que la ramificación apical produce una reducción drástica en la tasa de elongación de la hifa (Riquelme et al., 2004); ello explicaría la reducción de la tasa de crecimiento en la mutante *chs-6Δ*. Existen pocos reportes acerca de la CHS clase VI. En *M. grisea* se ha reportado que la *chs-7* clase VI tiene un papel en la formación de estructuras especializadas de infección (apresorio), sugiriendo su participación durante la invasión al hospedero (Kong et al., 2012). Las clases V y VII parecen ser importantes en varias especies de hongos; se han descrito ser esenciales para el crecimiento apical y morfogénesis en *A. nidulans* (CSMA y CSMB), *Colletotrichum graminicola* (ChsVb), *Fusarium verticillioides* (CHS5 y CHS7), *A. fumigatus* (CHSE), y *U. maydis* (Msc1) (Takeshita et al., 2005; Takeshita et al., 2006; Amnuaykanjanasin et al., 2006; Larson et al., 2011; Mellado et al., 2003; Weber et al., 2008). En *N. crassa* se observó que las mutantes *chs-5Δ* y *chs-7Δ* mostraron un fenotipo más afectado en la formación de hifas aéreas, además una disminución en la concentración de conidios, contenido de quitina, biomasa y menos ramas. Pero en cuanto a la morfología de la hifa solamente la *chs-7Δ* mostró un fenotipo afectado. De acuerdo con los resultados obtenidos para *N. crassa* y los observados para otros hongos filamentosos, se concluye que aunque los genes de *chs* perteneciendo a una misma clase de CHS de diferentes especies fúngicas tienen un alto grado de homología, ello no implica que cada clase de CHS tenga una misma función en las diferentes especies fúngicas. La función de cada clase de CHS varía según la especie fúngica y su papel en el ambiente (invasión al hospedero, crecimiento, reproducción, etc.). Lo que nos hace sugerir que este tipo de diferencias en su función se deba a la regulación ya sea transcripcional o postraduccional. Estudios a nivel de expresión han demostrado diferencias de expresión de cada una de las clases, sugiriendo su participación (Larson et al., 2010; Kong et al., 2012). A nivel postraduccional como se mencionó anteriormente las CHS son reguladas tanto por fosforilación (Lenardon et al., 2010), como por activación proteolítica (Cabib y Farkas, 1971; McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Duran et al., 1975; Leal-Morales et al., 1988; Ruiz Herrera et al., 1975). Cabe señalar que hace falta un análisis de las secuencias de las proteínas CHS, para conocer si los aminoácidos implicados (ya sea aminoácidos que son fosforilados o secuencias de proteínas que son sustrato de las proteasas) están conservados en cada una de las clases en las diferentes especies fúngicas.

Conclusiones

Conclusión general

El tráfico vesicular de las proteínas quitina sintasas (CHS) y la ATPasa de H⁺ (PMA-1) en el hongo *N. crassa* toman diferentes rutas de transporte. Las vesículas que transportan ATPasa de H⁺ (PMA-1) se dirigen a la MP de septos formados y de regiones distales de las hifas; mientras que los quitosomas, microvesículas que transportan quitinas sintasas, se dirigen a septos en formación y a la MP de regiones apicales, previa acumulación en el núcleo del SPK.

Conclusiones particulares

Primera parte

1. Todas las clases de CHS se encuentran en el núcleo del SPK y en septos en formación.
2. Las CHS viajan en diferentes poblaciones de quitosomas.
3. Los quitosomas parecen usar el citoesqueleto de actina para su localización en el SPK.
4. El tráfico de la CHS-1 hacia el SPK no depende de MYO-2 (Clase V).
5. Cada clase de CHS tiene una función específica en los diferentes estados del desarrollo.

Segunda parte:

1. El presente estudio demuestra que la PMA-1-GFP está ausente en la superficie celular del ápice y no se acumuló en el SPK, pero está presente en las regiones subapicales y distales.
2. PMA-1-GFP es endocitada mediante la vía endosomal, donde es degradada en vacuolas esféricas.
3. PMA-1-GFP se encontró en dos picos de densidad, el primer pico corresponde a fracciones con menor densidad que corresponden a los quitosomas, y el segundo pico donde se observó mayoritariamente en fracciones celulares de una densidad correspondiente al RE y macrovesículas, además en.
4. El análisis de FRAP reveló que la tasa de recuperación de la fluorescencia es más alta para el intercambio de membrana que proviene de una fuente citoplasmática que para la difusión lateral. Además, el análisis FRAP demostró una exocitosis continua de PMA-1 a la MP en las regiones distales.
5. PMB-GFP (transportador de Arginina/H⁺), tiene una localización similar a la PMA-1-GFP

Referencias bibliográficas

- Abramczyk, D., Park, C., & Szaniszlo, P. J. (2009). Cytolocalization of the class V chitin synthase in the yeast, hyphal and sclerotic morphotypes of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Fungal Genet. Biol.* 46(1): 28-41.
- Alés, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau M., & Álvarez de Toledo, G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat. Cell. Biol.* 1(1):40-44.
- Amnuaykanjanasin, A., Epstein, L. (2003). A class V chitin synthase gene, *chsA* is essential for conidial and hyphal wall strength in the fungus *Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola)*. *Fungal Genet. Biol.* 38(3):272-285.
- Amnuaykanjanasin, A., Epstein, L. (2006). A class Vb chitin synthase in *Colletotrichum graminicola* is localized in the growing tips of multiple cell types, in nascent septa, and during septum conversion to an end wall after hyphal breakage. *Protoplasma.* 227(2-4):155-164.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., & Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 67(4):891-905.
- Araujo-Palomares, C. L., Castro-Longoria E., & Riquelme, M. (2007). Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 44(6):492-503.
- Arbelet, D., Malfatti, P., Simond-Côte, E., Fontaine, T., Desquilbet, L., Expert, D., Kunz, C., & Soulié, M. C. (2010). Disruption of the *Bcchs3a* chitin synthase gene in *Botrytis cinerea* is responsible for altered adhesion and overstimulation of host plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact.* 23(10):1324-1334.
- Atkinson, K.D., Ramirez, R.M. (1984). Secretion can proceed uncoupled from net plasma membrane expansion in inositol-starved *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 160(1):80-86.
- Bagnat, M., Chang, A., & Simons, K. (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 12(12):4129-4138.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola M., Amherdt M., & Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 77(6):895-907.
- Bartnicki-García, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-107.

Bartnicki-García, S., Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*. 165(3890):302-304.

Bartnicki-García, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In: J. M. Ashworth and Smith J. E. (eds.). *Microbial Differentiation*. (pp.245-267). Cambridge, Cambridge University Press.

Bartnicki-García, S., Hergert, F., & Gierz, J. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma*. 153(1-2):46-57.

Bartnicki-García, S. (1990) Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. In: I. B. Heath (ed.), *Tip growth in plant and fungal cells*. (pp. 211-232). San Diego, CA, Academic Press.

Bartnicki-García, S., Bartnicki, D.D., Gierz G., Lopez-Franco, R., & Bracker, C.E. (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol*. 19(2):153-159.

Bartnicki-García, S., Bracker, C. E., Gierz, G., López-Franco, R., & Lu, H. (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophys. J*. 79(5):2382-2390.

Bartnicki-García, S. (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res*. 6(7): 957-965.

Bracker, C. E., J. Ruiz-Herrera, & Bartnicki-García, S. (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73(12):4570-4574.

Belozerskaya, T. A., Potapova, T. V. (1993). Intrahyphal communication in segmented mycelium. *Exp. Mycol*. 17(3):157-169.

Benito, B., Moreno, E., & Lagunas, R. (1991). Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta*. 1063(2):265-268.

Bonifacino, J.S., Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116(2):153-66.

- Borgia, P. T., Iartchouk, N., Riggle, P. J., Winter, K. R., Koltin, Y., & Bulawa, C. E. (1996). The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet. Biol.* 20(3):193-203.
- Bowen, A.R., Chen-Wu, J.L., Momany, M., Young, R., Szaniszlo, P.J., & Robbins, P.W. (1992). Classification of fungal chitin synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(2):519-523
- Bowman, B. J., Blasco, F., & Slayman, C. W. (1981). Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 256(23):12343-12349.
- Bowman, B. J., Draskovic, M., Freitag, M. & Bowman, E. J. (2009). Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 8(12):1845-1855.
- Bowman, S. M., Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 28(8):799-808.
- Brada, D., Schekman, R. (1988). Coincident localization of secretory and plasma membrane proteins in organelles of the yeast secretory pathway. *J. Bacteriol.* 170(6):2775-2783.
- Brunswick, H. (1924). Untersuchungen über Geschlechts and kerverhaktnisse bei der Hymenomyzetengattung *Coprinus*. In: K. Goebel (ed.) *Botanische Abhandlungen*, Vol. 5 (pp. 243-305). Jena, Gustav Fischer verlag.
- Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair Jr, W. L., & Robbins, P. W. (1986). The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell.* 46(2):13-225.
- Bulawa, C.E. (1992). CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 12(4):1764-1776.
- Bulawa, C. E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Ann. Rev Microbiol.* 47(1):505-534.
- Bulawa, C. E., Osmond, B. C. (1990). Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(19):7424-7428.
- Cabib, E., Farkas, V. (1971). The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68(9):2052-2056.

- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., & Silverman, S. J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 108(5):1665-1672.
- Cabib, E., Silverman, S. J., & Shaw, J. A. (1992). Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138(1):97-102.
- Cabib, E. (1991). Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(1):170-173.
- Catlett, N. L., Weisman, L. S. (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(25):14799-14804.
- Chang, A., Fink, G. R. (1995). Targeting of the yeast plasma membrane [H⁺] ATPase: a novel gene *AST1* prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. *J. Cell Biol.* 128(1-2):39-49.
- Chang, A., Slayman, C. W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺] ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* 115(2):289-295.
- Chin, C. F., Bennett, A. M., Ma, W. K., Hall, M. C., & Yeong, F. M. (2012). Dependence of Chs2 ER export on dephosphorylation by cytoplasmic Cdc14 ensures that septum formation follows mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 23(1):45-58.
- Choi, W. J., Santos, B., Durán, A., & Cabib, E. (1994). Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level?. *Mol. Biol. Cell.* 14(12):7685-7694.
- Choque, M., Boccara, M., Gonçalves, I.R., Soulié, M., & Vidal-Cros, A., (2004). Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271(11):2153-2164.
- Chuang, J. S., Schekman, R. W. (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol.* 135(3):597-610.
- Cope, M. J. T., Whisstock, J., Rayment, I., & Kendrick-Jones, J. (1996). Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure*, 4(8): 969-987.

Curwin, A. J., Fairn, G. D., & McMaster, C. R. (2009). Phospholipid transfer protein Sec14 is required for trafficking from endosomes and regulates distinct trans-Golgi export pathways. *J. Biol. Chem.* 284(11):7364-7375.

Deacon, J. W. (2005). *Fungal Biology*. 4th Ed. Cornwall. Wiley Blackwell.

De Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., & Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiol.* 146(9):2121-2132.

Deitz, S. B., Rambourg, A., Kepes, F., & Franzusoff, A. (2000). Sec7p directs the transitions required for yeast Golgi biogenesis. *Traffic.* 1(2):172-183.

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 Genet. Biol.* 47(7):573-586.

DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S., & Pringle, J. R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* 139(1):75-93.

Din, A. B., Yarden, O. (1994). The *Neurospora crassa chs-2* gene encodes a non-essential chitin synthase. *Microbiol.* 140(9):2189-2197.

Duran, A., Bowers, B., & Cabib, E. (1975). Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72(10):3952-3955.

Eisenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E., & Schneiter, R. (2002) A specific structural requirements for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 13(12):4414-4428.

Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C., & Mooseker, M. S. (1998). Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell Sci.* 111(14):2055-2066.

Fleet, G.H. (1991) Cell walls. In: Rose A.H., Harrison J.S. (eds). *The yeasts* vol. 4. (pp 199-277) 2nd ed. London, Academic Press.

Foster, J. W. (1949). *Chemical activities of fungi*. New York, Academic Press.

- Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M., (1997). A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(1):75-78.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., & Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263(34):18545-18552.
- Fukuda, K., Yamada, K., Deoka, K., Yamashita, S., Ohta, A., & Horiuchi, H. (2009). Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot. Cell.* 8(7): 945-956.
- Gaughran, J. P., Lai, M. H., Kirsch, D. R., & Silverman, S. J. (1994). Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* 176(18):5857-5860.
- Gaynor, E. C., Chen, C. Y., Emr, S. D., & Graham, T. R. (1998). ARF is required for maintenance of yeast Golgi and endosome structure and function. *Mol. Biol. Cell.* 9(3):653-670.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R, Talbot, NJ, & Valent, B. (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Commun.* 4(1996):1-12.
- Girbardt, M. (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta.* 50:47-59.
- Gooday, G.W. (1990). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation.* 1(2-3):177-190.
- Gooday, G. W. (1994). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In: Ratledge C. (ed.). *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 279-312). Dordrecht Springer.
- Gould, G. W., Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(4):287-292.
- Govindan, B., Bowser, R., & Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* 128(6):1055-1068.
- Gow, N. 1984. Transhyphal electrical currents in fungi. *J. Gen. Microbiol.* 130(12):3313-3318.

- Grabińska, K. A., Magnelli, P., & Robbins, P. W. (2007). Prenylation of *Saccharomyces cerevisiae* Chs4p affects chitin synthase III activity and chitin chain length. *Eukaryot. Cell.* 6(2):328-336.
- Gradmann, D., Hansen, U.P., Long, W. S., Slayman, C. L., & Warncke, J. (1978) Current-voltage relationship for the membrane plasmatic and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*: I. Steady conditions. *J. Membr. Biol.* 39(4):333-367.
- Grove, S. N., Bracker, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J. Bacteriol.* 104(2):989-1009.
- Hager, K. (1986). Aminoacid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: Deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(20):7693-7697.
- Hansen, U.P., Slayman, C. L. (1978). Current–voltage relationships for a clearly electrogenic cotransport system. In: Hoffman J. F. (ed.), *Coupled transport phenomena in cells and tissues.* (pp. 141-154). New York Raven Press.
- Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J. Y., Nakano, H., & Kitamoto, K. (2011). Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol. Microbiol.* 81(1):40-55.
- Henkel, A. W., Meiri, H., Horstmann, H., Lindau, M., & Almers, W. (2000). Rhythmic opening and closing of vesicles during constitutive exo and endocytosis in chromaffin cells. *EMBO J.* 19(1): 84-93.
- Hickey, P. C., Jacobson, D., Read, N. D., & Glass, N. L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37(1):109-19.
- Hervás-Aguilar, A., Rodriguez, J. M., Tilbum, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2007). Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor *PacC*. *J. Biol. Chem.* 282(48):4735-4747.
- Hill, K. L., Catlett, N. L., & Weisman, L. S. (1996). Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 135(6): 1535-1549.
- Hinners, I., Tooze, S. A. (2003). Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes. *J. Cell Sci.* 116(5): 763-771.

- Hoepfner, D., Berg, V. D., M., Philippsen, P., Tabak, H. F., & Hettema, E. H. (2001). A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 155(6):979-990.
- Holcomb, C. L., Hansen, W. J., Etcheverry, T., & Shekman, R. (1988). Secretory vesicles externalize the major plasma membrane ATPase in yeast. *J. Cell Biol.* 106(3):641-648.
- Holmes, K.C. (2008). Myosin structure In: Coluccio L.M., (ed.) *Myosins: a superfamily of molecular motors. Proteins and cell regulation*, (35–54). Berlin, Springer.
- Honda, S., Selker, E.U. 2009. Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics*. 1:11-23.
- Hosobuchi, M., Kreis, T., & Schekman, R. (1992). SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature*. 360(6404):603-605.
- Howard, R. J. (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Sci.* 48(1): 89-103.
- Ichinomiya, M., Horiuchi, H., & Ohta, A. (2002). Different functions of the class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, are revealed by repression of *chsB* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 42(1):51-58.
- Ichinomiya, M., Yamada, E., Yamashita, S., Ohta, A., & Horiuchi, H. (2005) Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 4(6):1125-36.
- Iwaki, T., Iefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., & Takegawa, K. (2008). Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol.* 154(3):830-841.
- Johnston, G. C., Prendergast, J. A., & Singer, R. A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* 113(3):539-551.
- Kappeler, F., Klopfenstein, D. R. C., Foguet, M., Paccaud, J. P., & Hauri, H. P. (1997). The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J. Biol. Chem.* 272(50):31801-31808.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochem. Biophys. Acta.* 1426(2):373-383.

Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J., & Cooper, J. A. (2000). Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11(5):1727-1737.

Keighron, J., Ewing, A. G., & Cans, A. S. (2012). Analytical tools to monitor exocytosis: a focus on new fluorescent probes and methods. *Analyst.* 137(8):1755-1763.

Kent, P. W., Whitehouse, M. W. (1955). *Biochemistry of the aminosugars.* (pp. 311). Academic Press. New York.

Ketela, T., Green, R., & Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* 181(11):3330-3340.

Khoushab, F., Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Mar. Drugs.* 8(7):1988-2012.

Klausner, R. D., Donaldson, J. G., & Lippincot-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116(5):1071-1080.

Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast.* 10(7):851-869.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microl. Rev.* 26(3):239-256.

Kong, L. A., Yang, J., Li, G. T., Qi, L. L., Zhang, Y. J., Wang, C. F., Wang C. F., Zhao W. S., Xu J.R., & Peng, Y. L. (2012). Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathog.* 8(2), doi: 10.1371/journal.ppat.1002526.

Kropf, D. L., Caldwell, J. H., Gow, N. A., & Harold, F. M. (1984). Transcellular ion currents in the water mold *Achlya*. Amino acid proton symport as a mechanism of current entry. *J. Cell Biol.* 99(2):486-496.

Kühlbrandt, W., Zeelen, J., & Dietrich, J. (2002). Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. *Science.* 297(5587):1692-1696.

Kuratsu, M., Taura, A., Shoji, J. Y., Kikuchi, S., Arioka, M., & Kitamoto, K. (2007). Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 44(12):1310-1323.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Lam, K. K., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G., & Conibear, E. (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* 174(1):19-25.
- Larson, T. M., Kendra, D. F., Busman, M., & Brown, D. W. (2011). *Fusarium verticillioides* chitin synthases CHS5 and CHS7 are required for normal growth and pathogenicity. *Curr. Genet.* 57(3):177-189.
- Latgé, J.P., Calderone, R. 2006. The Fungal Cell Wall. In: Esser K., Kües U. and Fischer R. (eds.). *The Mycota I Growth, Differentiation and Sexuality*. (p. 73-104). Berlin Springer.
- Leal-Morales, C. A., Bracker, C. E., & Bartnicki-Garcia, S. (1988). Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(22):8516-8520.
- Leal-Morales, C. A., Bracker C. E., & Bartnicki-García S. (1994). Subcellular localization, abundance and stability of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 140(9):2207-2216.
- Lenardon, M. D., Milne, S. A., Mora-Montes, H. M., Kaffarnik, F. A., Peck, S. C., Brown, A. J., Munro A., & Gow, N. A. (2010). Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *J. Cell Sci.* 123(13):2199-2206.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., & Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell.* 56(5):801-813.
- Lollike, K., Borregaard N., & Lindau M. (1998). Capacitance flickers and pseudoflickers of small granules, measured in the cell-attached configuration. *Biophys. J.* 75(1):53-59.
- Lowendorf, H. S., Slayman, C. L., & Slayman, C. W. (1974). Phosphate transport in *Neurospora*: Kinetic characterization of a constitutive, low-affinity transport system. *Biochem. Biophys. Acta.* 373(3):369-382.
- Luo, W., Chang, A. (2000). An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 11:579-592.
- McMurrough, I., Bartnicki-Garcia, S. (1971). Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 246(12):4008-4016.

- Malínská, K., Malínský J., Opekarová, M., & Tanner, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell.* 14(11):4427-4436.
- Mandel, M. A., Galgiani, J. N., Kroken, S., & Orbach, M. J. (2006). *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. *Fungal Genet. Biol.* 43(11):775-788.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., & Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275(2):1511-1519.
- Masai, K., Maruyama, J., Sakamoto, K., Nakajima, H., Akita, O., & Kitamoto, K. (2006). Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(6):881-891.
- McGillviray, A. M., Gow, N. (1987). The transhyphal electrical current of *Neurospora crassa* is carried principally by protons. *J. Gen. Microbiol.* 133:2875-2881.
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Gow, N. A., & Holden, D. W. (1996). The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol. Microbiol.* 20(3):667-679.
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden D.W., Rodriguez-Tudela J.L., & Latgé, J. P. (2003). Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chs/G⁻/chsE⁻ of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 38(1):98-109.
- Merzendorfer, H. (2006). Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 176(1):1-15.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90(9):759-769.
- Miller, K. E., Sheetz, M. P. (2000). Characterization of myosin V binding to brain vesicles. *J. Biol. Chem.* 275(4):2598-2606.
- Morgan, W. T. J., Elson, L. A. (1934). A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem. J.* 28(3):988-995.

- Motoyama, T., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M. (1994). Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(12):2254-2257.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi M. (1996). The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol. Gen. Genet.* 253(4):520-8.
- Munro, C. A., Gow, N. A. R. (2001). Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 39(1):41-53.
- Nakamoto, R. K., Rao, R., & Slayman, C. W. (1991). Expression of the yeast plasma membrane [H⁺] ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 266(12):7940-7949.
- Nakamura, N., Yamazaki, S., Sato, K., Nakano, A., Sakaguchi, M., & Mihara, K. (1998). Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol. Biol. Cell.* 9(12):3493-3503.
- Nebenführ, A., Ritzenthaler, C., & Robinson, D. G. (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130(3):1102-1108.
- Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M., & Faundez, V. (2007). Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J. Cell Sci.* 120(4):531-541.
- Nickel, W. (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 6(8):607-614.
- Nickel, W., Rabouille, C. (2008). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(2):148-155.
- Nishimura, N., Balch, W. E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science.* 277(5325):556-558.
- Owen, D. J. (2004). Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem. Soc. Trans.* 32(1):1-14.
- Pantazopoulou, A., Peñalva, M. A. (2009). Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 20(20): 4335-4347.

- Pashkova, N., Catlett, N. L., Novak, J. L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R. E., & Weisman, L. S. (2005). Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *J. Cell Biol.* 168(3):359-364.
- Pelham, H. R. (1995). Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(4):530-535.
- Perkins, D. (2005). How to make a cross. *Neurospora Protocol Guide*. Recuperado de: <http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols/How%20to%20make%20a%20cross-2.pdf>
- Potapova, T.V., Aslanidi, K. B., Belozerskaya, T. A., & Levina, N. N. (1988). Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. Transfer of energy from proximal to apical cells. *FEBS Lett.* 241(1-2):173-176.
- Rambourg, A., Clermont, Y., Jackson, C. L., & Kepes, F. (1995). Effects of brefeldin A on the three-dimensional structure of the Golgi apparatus in a sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Anat. Rec.* 241(1):1-9.
- Rao, R., Slayman, C. W. (1996). Plasma-membrane and related ATPases. In: Brambl R. and Marzluf G. A. *The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 29-56). Berlin Springer.
- Read, D. N. (2011). Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Mol. Microbiol.* 81(1):4-7.
- Richthammer, C., Enseleit M., Sanchez-Leon E., März S., Heilig Y., Riquelme M., & Seiler S. (2012). RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 85(4):716-733.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gires, G. & Bartnicki-García, S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae?. *Fungal Genet. Biol.* 24(1-2):101-109.
- Riquelme, M, Gierz, G, & Bartnicki-García, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiol.* 146(7):1743-1752
- Riquelme, M., Roberson, R. W., McDaniel, D. P., & Bartnicki-García, S. (2002). The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37(2):171-179.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S. (2004). Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 41(9):842-851.

Riquelme, M., Freitag, M., Sánchez León-Hing, E., & Bowman, B. (2005). Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. *XXIII Fungal Genetics Conference* Del 15 al 20 de marzo. Pacific Grove, California.

Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J., Beltrán-Aguilar, A., & Freitag, M. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 6(10):1853-1864.

Riquelme, M., Bartnicki-García, S. (2008). Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases *Fungal Biol. Rev.* 22(2):56-70.

Riquelme, M., Yarden O., Bartnicki García, S., Bowman, B., Castro, Longoria, E., Free, S. J., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mouriño Perez, R. R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richtnammer, C., Roberson, R. W., Sánchez León-Hing, E. F., Seiler, S.; & Watters, M. K. (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha a model cell for polarized growth. *Fungal Biol.* 115(6):446-474.

Roerg, K.J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., & Kaiser, C. A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 145(4):659-672.

Roncero, C., Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* 163(3):1180-1185.

Rossanese, O. W., Reinke, C. A., Bevis, B. J., Hammond, A. T., Sears, I. B., O'Connor, J., & Glick, B. S. (2001). A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 153(1):47-62.

Rudall, K.M. (1955). The distribution of collagen and chitin. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 9:49-71

Rudall, K.M. (1963) The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles, In: Beament J.W.L., Treherne J.E. and. Wigglesworth V.B, (eds). *Advances in Insect Physiology*, vol. 1. (p. 257-313) London Academic Press.

Ruiz-Herrera, J., Sing, V. O., Van Der Woude, W. J., & Bartnicki-García, S. (1975). Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72(7)2:706-2710.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchatjate, S., Schekman, R. (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol. Biol. Cell.* 17(10):4157-4166.
- Sánchez-León, E., Verdin, J., Freitag, M., Roberson, R., Bartnicki-García, S., & Riquelme, M. (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot. Cell.* 10(5): 683-695.
- Santos, B., Snyder, M. (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell Biol.* 136(1):95-110.
- Seidl, V., (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22(1):36-42.
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., & Schekman, R. (2000) Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 151(5):973-984.
- Shiu, P. K., Zickler, D., Raju, N. B., Ruprich-Robert, G., & Metzberg, R. L. (2006). SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(7):2243-2248.
- Schott, D. H., Collins, R. N., & Bretscher, A. (2002). Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol.* 156(1):35-40.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., & Bretscher, A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol.* 147(4):791-808.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N. J., & Steinberg, G. (2011). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.* 31(1):214-227.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., & Rothmant, J. E. (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell,* 67(2):239-253.
- Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 22(1):51-63.

Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A., & Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 114(1):111-123.

Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H. (1994). Apical wall biogenesis. In: Esser, K. Kües U., and Fischer R. (eds). *The mycota I Growth, Differentiation and Sexuality* (pp. 125-141). Berlin Springer.

Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L., & Cabib, E. (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(13):4735-4739.

Slayman, C. L., Long, W. S., & Lu, C. H. (1973). The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. *J. Memb. Biol.* 14(1):305-338.

Slayman, C. L. (1974). Proton pumping and generalized energetics of transport: a review. In: Zimmermann U., Dainty J. (eds). *Membrane Transport in Plants* (pp. 107-119). Berlin Springer.

Slayman, C. L., Slayman, C. W. (1974). Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose: evidence for a proton-dependent cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71(5): 1935-1939.

Slayman, C. L. (1987). The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton-pumping electroenzyme. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19(1):1-20.

Soulié, M. C., Piffeteau, A., Choquer, M., Boccara, M., & Vidal-Cros, A. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene *Bcchs1* results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet. Biol.* 40(1):38-46.

Stack, J. H., Horazdovsky B., & Emr S. D. (1995). Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:1-33.

Starr, T. L., Pagant, S., Wang, C. W., & Schekman, R. (2012). Sorting signals that mediate traffic of chitin synthase III between the TGN/endosomes and to the plasma membrane in yeast. *PloS one*, 7(10), doi:10.1371/journal.pone.0046386.

Taheri-Talesh, N. H. T., Araujo-Bazan, L. D., Espeso, X. E. A., Peñalva, M.A., Osmani, S.A., & Oakley, B. R. (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 19(4):1439-1449.

Takeshita N., Ohta, A., & Horiuchi, H. (2005) CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 16(4):1961-1970.

Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A., & Horiuchi, H. (2006). *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol. Microbiol.* 59(5):1380-1394.

Takeuchi, G., Schmidt, J., Caldwell, J. H., & Harold, F.M. (1988). Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* 101(1):33-41.

Teasdale, R. D., Jackson, M. R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12(1):27-54.

TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., & Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15(23):6483-6494.

Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., & Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* 25(5):943-954.

Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster, M., & Steinberg, G. (2010). The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* 22(7):2476-2494.

Trilla, J. A., Durán, A., & Roncero, C. (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145(6):1153-1163.

Tsuizaki, M., Takeshita, N., Ohta, A., & Horiuchi, H. (2009). Myosin motor-like domain of the class VI chitin synthase CsmB is essential to its functions in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(5):1163-1167.

Turian, G. (1979). Cytochemical gradients and mitochondrial exclusion in the apices of vegetative hyphae. *Experientia.* 37(9):1164-1166.

Upadhyay, S., Shaw, B. D. 2008. The Role of actin, fimbrin, and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 68(3):690-705.

- Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E., & Durán, A. (1991). CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 114(1):101-109.
- Valkonen, M. (2003). Functional studies of the secretory pathway of filamentous fungi. The effect of unfolded protein response on protein production. VTT Publications. 505:114.
- Verdín, J., Bartnicki-García, S., & Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 74(5):1044-1053.
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbiol. Gen. Bull.* 13:42-43.
- Votsmeier, C., Gallwitz, D. (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* 20(23):6742-6750.
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* 174(7):973-983.
- Waters, M. G., Serafini, T., & Rothman, J. E. (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature.* 349(6306):248-51.
- Wessels, J. G. H. (1986). Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int. Rev. Cytol.* 104: 37-79.
- Weber I., Assmann, D., Thines, E., & Steinberg, G. (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* 18(1):225-242.
- Westergaard, M. Mitchel, H. K. (1942). *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* 34(10):573-577.
- Wösten, H.A., Moukha, S.M., Sietsma, J.H. & Wessels, J.G. (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. Genet. Microbiol.* 137(8):2017-23
- Xoconostle-Cázares, B., Specht, C. A., Robbins, P. W., Liu, Y., León, C., & Ruiz-Herrera, J. (1997). *Umchs5*, a Gene Coding for a Class IV Chitin Synthase in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 22(3):199-208.

Yamashina, S., Katsumata, O., Tamaki, H., & Takatsuki, A. (1990). Morphological effects of brefeldin A on the intracellular transport of secretory materials in parotid acinar cells. *Cell Struct. Funct.* 15:31-37.

Yarden, O., Yanofsky, C. (1991). Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Gen. Dev.* 5(12b):2420-2430.

Zhang, G., Kashimshetty, R., Ng, K. E., Tan, H. B., & Yeong, F. M. (2006). Exit from mitosis triggers Chs2p transport from the endoplasmic reticulum to mother-daughter neck via the secretory pathway in budding yeast. *J. Cell Biol.* 174(2):207-220.

Apéndice

Apéndice 1. Morfología y crecimiento radial de la cepa PMB-GFP.

Se observó una morfología y un crecimiento radial de la colonia normal, en la cepa que expresa PMB-GFP, con respecto a la cepa FGSC#9718 (cepa parental). Por lo que se concluye que la cepa con la proteína PMB-GFP no está afectada por el marcaje endógeno (Fig. A3).

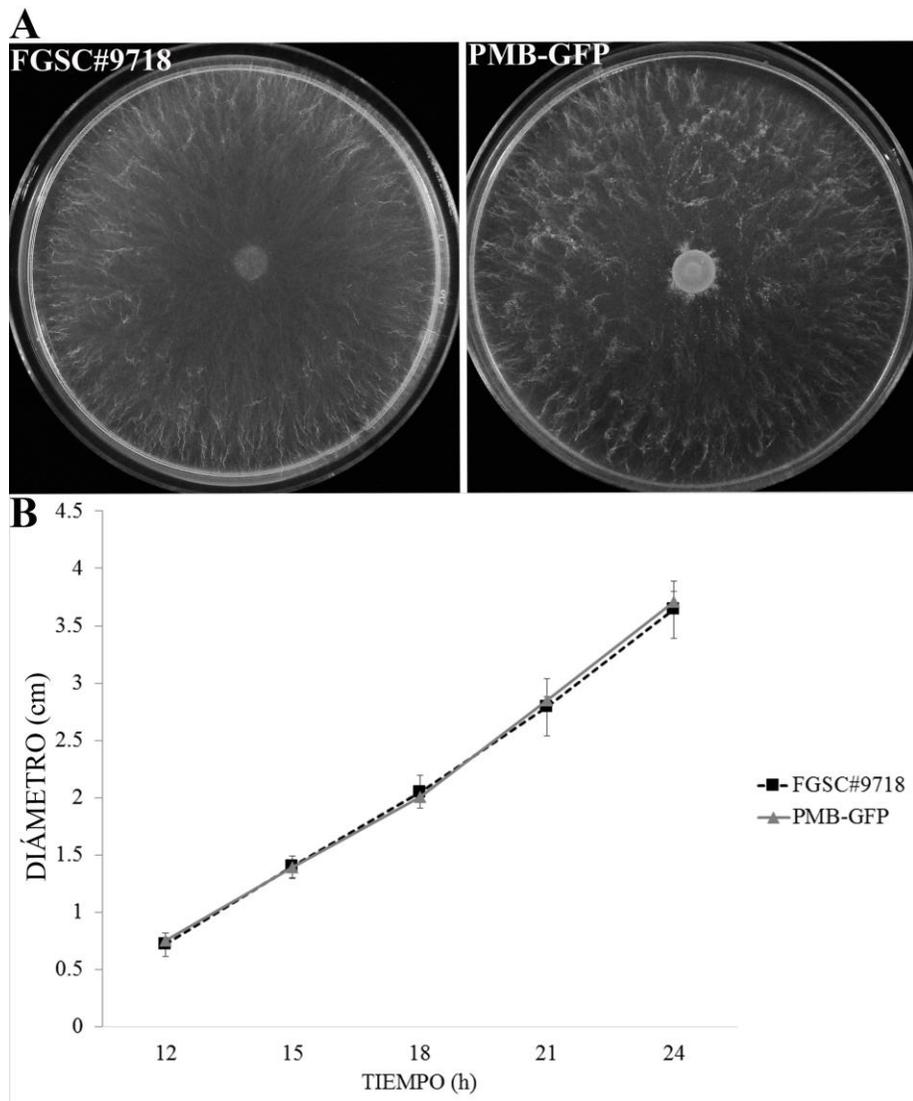


Figura A1. Morfología y crecimiento colonial de la cepa PMB-GFP. A) Morfología de la colonia de las cepas FGSC#9718 (cepa parental) y PMB-GFP. B) Gráfica del crecimiento de las cepas FGSC#9718 (cepa parental) y PMB-GFP

Apéndice 2. Similitud entre los dominios motor de miosina de las CHS-5, CHS-7 y MYO-2 de *N. crassa* y Myo2p de *Saccharomyces cerevisiae*

```

NCU04350      -----QPSQVSTITLLNS-VHNIYL-SSQFYRLDAGTSLVNVNWLTAQ-----AGPD
NCU04352      -----HLQSDHTLTAHLASRFHVSLPISRLSSHALVSNINTYSS-----TKGD
NCU01440      -DDLNLSHLNEPAVLQA-IRLRYA-QKEIYTYSGIVLIATNPFARVDSLYVPMQVQVYA
SCRG_01705    TEDLTSLSYLNPAVLHA-IKQRYS-QLNIYTYSGIVLIATNPFDRVDQLYTQDMQIQA
          : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
NCU04350      GHVGGTVD---GALALRAMEHARRRAEDGCIILGSLHNSTPS-----LLRPFLLSTIPLLEI
NCU04352      GTRESSAMGGAEIMAEAYIRLGHRSENQAVLFLGESGSGHTTIRAHVLTALLNWSSTPL
NCU01440      GKQRATQAPHLFAIAEEAFMDLRDGNQITVVSGESGAGHTVSAKYIMRYFATRES-PD
SCRG_01705    GKRRGELEPHLFAIAEEAYRLRQNDKQNTIVVSGESGAGHTVSAKYIMRYFASVVE-EN
          * . : : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
NCU04350      PA-----SVMKALDAIEPFLRCVYPNPSTPRQTGLAVTLTLNLIGNL
NCU04352      SN-----MVSLLAAYVFDLTLTKIATTPIAS-MAGLFFELQYDTASTI
NCU01440      SPGSRVKKGGHESMSQTEEAIALATNPIMEAFGNKTRNDNSS-RFGKYIEIMFDKA---
SCRG_01705    SATV---QHQVEMSETEQKILATNPIMEAFGNKTRNDNSS-RFGKYIEILFDKD---
          : : : : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
NCU04350      TAASLSLIQGGIDTD--KGLLGVSEPGYRAFDVYFLLTITASTPAERFELGLK----A
NCU04352      ---SPQLIGAKLLDHLRLERSRIAAPTGERNFVLYLLAG-TSPAERKHLGFEEGTGG
NCU01440      ---TNIIGAKIRTYLLERSRIVQPKERNYHIFYQLVAG-VTDKERQELGLP----V
SCRG_01705    ---TSIIGAKIRTYLLERSRIVQPFIERNYHIFYQLMAG-LPAQTKHEELHLD----A
          : : : : : : : : : : * : : : * : : : : : : : : : : : : : :
NCU04350      SQYSLIARSGTYDPSVLPATDDGAAADDFRSALKDIGKSSHRNLISILAGLLKIGNT
NCU04352      KRKMYLGHPT----QLKVGINDAEGFLFMTALRLEFPTEIAEICQLAAILHIGQL
NCU01440      EQFEYLNQNT----PTIDGVDKAEFNATKASLRTIGVDEGQTEIFKLLAGLLHGV
SCRG_01705    SDYFYMNGGD----TKINGIDDAKEYKITVDALTVGKITETQHQIFKLLAALLHIGNI
          : : : : : : : : : : * : : : * : : : : : : : : : : * : : : : :
NCU04350      LDYNV-----QVLEEEICEDVGGLLGIEPEILARQL---
NCU04352      EFETTSSTISATGDDSGGFSHEGGQMTAVKNDVLAIVAA---FLGVGVDLQTLTGK
NCU01440      KIGAMRNDSSLDPESEPS-----LVKACE-----ILGIDAEFAHWVTKK
SCRG_01705    EIKKTRNDASLSADEPN-----LKLACE-----LLGIDAYNFAHWVTKK
          * : : : : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
NCU04350      -----STDDRATLIGGLYEALVDVVIKQANDAIAVQMGKRSRSGDSS--
NCU04352      TKMIHKEKRVTVMLDPAGARENADELARTLYSLLVAYIENINQKLCAR--DAISNTVSI
NCU01440      QLVTRGKIVSNLQQAIVVRDVAHYIYSSFLDNLVLEIINHSLASEEVLIVTISFIV
SCRG_01705    QIITRSEKIVSNLWYQALVANDSVAKFIYSALFDNLVENINVLNCPAVNDQISSFIV
          : : : : : : : : : : * : * : * : : : : : * : : : : : : : :
NCU04350      --SDGASRSGAPISNEDSGDTVCLTVLEIPDQNLGK-----AIAMRGIF
NCU04352      IDFFGFQ--QSSSTGSLDQLLNAAAESMYNLTLOTFFDRKAEELLEEVTVFATSYF
NCU01440      LDYVGFH--FAK--NSFEQFCINYANEKQQEFTNQVFKLEQEEYVREQIDWTFID-F
SCRG_01705    LDYVGFH--FEK--NSFEQFCINYANEKQQEFTNQVFKLEQEEYVREEIEMSFIE-F
          * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
NCU04350      DD
NCU04352      DNSDAVWGLLKPNGLLSILDQTRRHR-DMQLLESLEKRFEGNPAIEVGSATAKLP
NCU01440      ADNQPCIDLIEKGLSLLDEESRLPMGSDQFVTKLHNY-----A-ADK
SCRG_01705    NDNQPCIDLIEKGLSLLDEESRLPMGSDQFVTKLQYL-----DMSPT
          :
NCU04350      -----
NCU04352      SNFFTE--NTAATFVVKHFAEVDYPIKGLVEENGEVIVSGDLNMLNINSSVNFVIRLFGQ
NCU01440      HKFYKPKRFGKSSFTVCHYAI DVYESDGFIEKNRDTPDEHMAVLRASINQFLVSLDA
SCRG_01705    NKVFSKPRFGQTHFIVSHYALDVAYDVEGFIEKNRDTPDGHLEVLKASTNETLINILEG
NCU04350      EALHTVVRPQKTIIVMQASVSSKPMRTPSVLSKGRPAFGRRLRGEKADPDIAIDEVSES
NCU04352      ASAVR-----EKDLASASSNAVKP-----AAGR--IGVAVN-----
SCRG_01705    LEKAA-----KK-LEEAKKLELEQ-----AGSKKPGPIRTVN-----
NCU04350      -----
NCU04352      GEPKRSKSSKSGEQAQAFLSALENVKTALTAQGTNCYVVFCLKPNDRRIANQFDSKCVR
NCU01440      ---RKPTLG-----GIFKSSL--IELMNTINGTDVHYIRCIKPNKAKEPWKEGPMVL
SCRG_01705    ---RKPTLG-----SMFKQSL--IELMNTINSTVHYIRCIKPNADKAWQFENMLVL
NCU04350      -----
NCU04352      AQVQTFGIAEISQRLRAADFSLFLPFGEFLGLADDTILVGTREKQVEMVVEKRWPS--
NCU01440      SQLRACGVLETV-RISCAGYPTWTFEEFALA-----YMLVPSQTQWTFSEI
SCRG_01705    SQLRACGVLETI-RISCAGFPSRWTFEEFVLA-----YYILIPHEQWDLIF
NCU04350      -----NEVAIGATGVFLS
NCU04352      REMANA-----ILTAFGASTGKGLDKYQLGTHIFFR
SCRG_01705    KGGETTEEDIISVVMILDATVKKMSKYQIGNTHIFFK

```

Figura A2. Alineamiento de los dominios motor de miosina de las CHS-5 y -7 con las miosinas clase V de *N. crassa* y *S. cerevisiae*.

Tabla A1. Porcentaje de identidad de los dominios Motor de Miosina

	<i>CHS-7</i>	<i>CHS-5</i>	<i>MYO-2</i> <i>(Clase V)</i>	<i>ScMyo2</i> <i>(Clase V)</i>
CHS-7	100	19.83	20.58	20.58
CHS-5	19.83	100	25.12	25.67
MYO-2 (Clase V)	20.58	25.12	100	63.28
ScMyo2 (Clase V)	20.58	25.67	63.28	100

Apéndice 3. Análisis bioinformático de las interacciones con CHS-1, CHS-4, y CHS-5.

Para conocer si las CHS necesitan de otras proteínas para su transporte o función, seleccionamos tres clases de CHS: la CHS-1, debido a que esta clase solo se encuentra en hongos filamentosos; la CHS-4, por ser la ortóloga a la Chs3p de *S. cerevisiae* y por último la CHS-5 que además de ser exclusiva de hongos filamentosos, se seleccionó por presentar un dominio motor de miosina. Se realizó un análisis bioinformático de cada una de las CHS antes mencionadas, usando el software STRING 9.0 (<http://string-db.org/>), para tener una idea de las proteínas que interactúan con estas CHS.

El análisis *in silico* nos arrojó varias secuencias que podrían estar interaccionando con las CHS (Fig. 21). Sin embargo este software se basa en trabajos que se han reportado previamente, la mayoría de estos trabajos se basan en la levadura *S. cerevisiae*, lo que explicaría las pocas o nulas interacciones encontradas para las CHS-1 y CHS-5, exclusivas de hongos filamentosos.

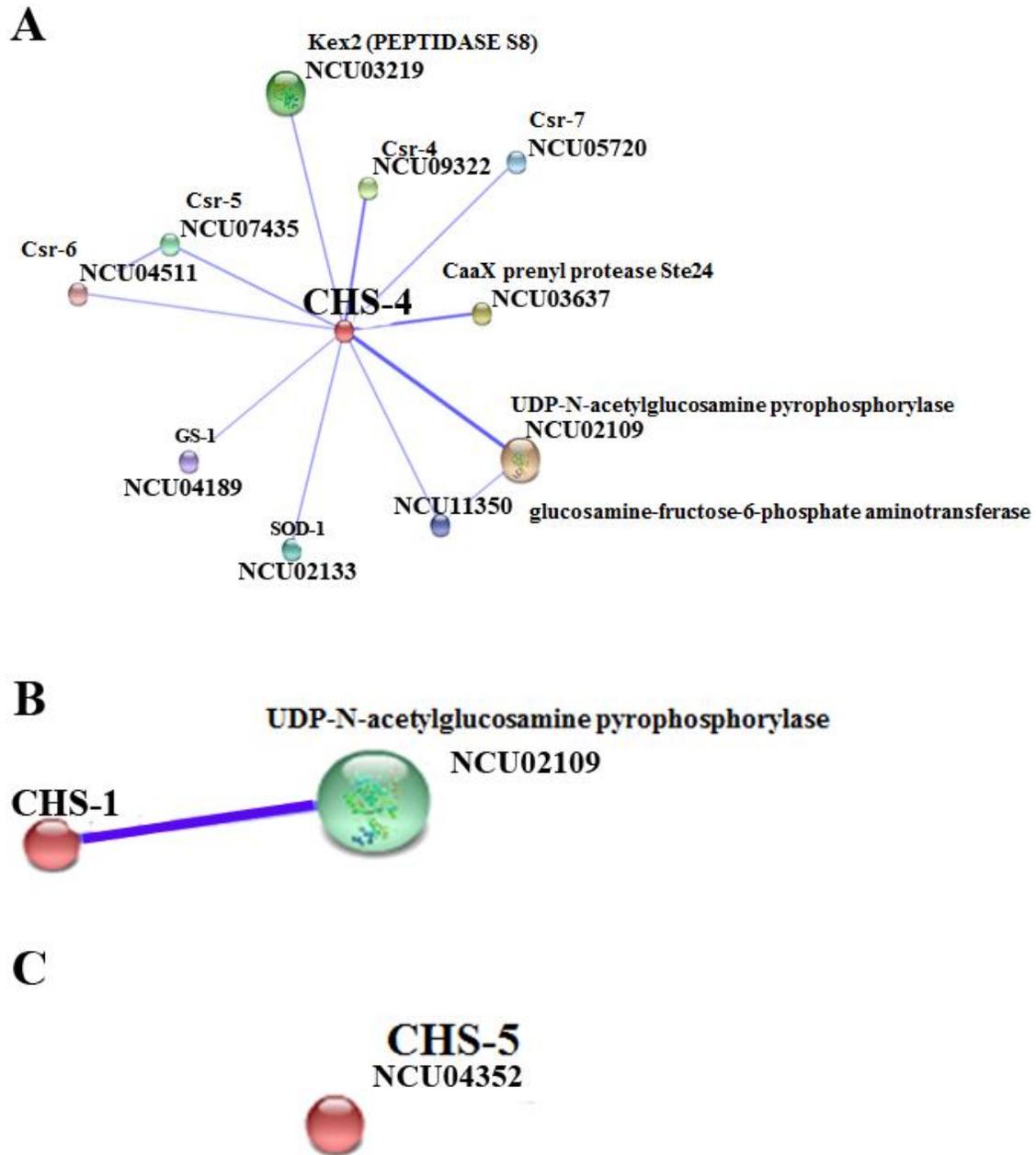


Figura A3. Interacciones *in silico* de las proteínas CHS-1, CHS-4 y CHS-5. A) Predicción de las proteínas que interactúan con CHS-4. B) Predicción de las proteínas que interactúan con CHS-1. C) Predicción de las proteínas que interactúan con CHS-5.