CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA

Biogénesis, transporte y localización de vesículas secretoras en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Tesis

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

Presenta:

Eddy Francisco Sánchez León-Hing

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Eddy Francisco Sánchez León-Hing

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director del Comité

Dr. Salomón Bartnicki García
Miembro del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dra. María Teresa Viana Castrillón
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinadora del Posgrado en
Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Enero, 2015

Resumen de la tesis que presenta **Eddy Francisco Sánchez León-Hing**, como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Biogénesis, transporte y localización de vesículas secretoras en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen elaborado por: Eddy Francisco Sánchez León-Hing

Los mecanismos de secreción en células eucariotas requieren la acción coordinada de las Rab GTPasas, que interactúan con la membrana de las vesículas secretoras promoviendo la asociación transitoria con otros factores y subsecuentemente la fusión de las vesículas con las membranas diana. A diferencia de otros modelos eucariotas, los hongos filamentosos poseen el Spitzenkörper (Spk), un complejo multivesicular que se encuentra en el ápice de las hifas en donde llegan las vesículas antes de ser re-dirigidas a la superficie celular en sitios de exocitosis. Hasta ahora, se desconoce con exactitud los mecanismos que la hifa utiliza para dar direccionalidad a las vesículas secretoras que llegan al Spk. Por lo tanto, hemos analizado las Rab GTPasas YPT-1 (Rab1), YPT-31 (Rab11) y SEC-4 (Rab8), reguladores clave en las distintas etapas de la ruta secretora en *Saccharomyces cerevisiae* y en células de mamíferos. Los análisis por microscopía confocal de escaneo con láser de las proteínas Rabs, etiquetadas con distintas versiones de proteinas fluorescentes, revelaron su localización en el Spk. Co-expresión de las distintas YPT-1 etiquetadas y las Rab GTPasas post-Golgi YPT-31 y SEC-4, revelaron que YPT-1 se encuentra confinada a la región microvesicular del Spk, mientras que SEC-4 y YPT-31 se encuentran distribuidas en la capa macrovesicular, sugiriendo que el tráfico de macrovesículas y microvesículas al o desde el Spk está regulado por las distintas Rabs. Notablemente, también se encontró en la estrato macrovesicular del Spk de *N. crassa* a la subunidad putativa del complejo β-1,3-glucano sintasa FKS-1 y a la proteína secretada INV-1. YPT-1 también se detectó en distintas cisternas de Golgi a lo largo de las hifas. Los análisis de co-localización de YPT-1 y los marcadores de Golgi temprano USO-1 (p115) y VRG-4, y los marcadores de Golgi tardío SEC-7 y VPS-52 indicaron la participación de YPT-1 en el tráfico vesicular en cisternas de Golgi temprano y tardío. Análisis TIRFM (Microscopía de Reflexión Total Interna de la Fluorescencia) y quimográficos revelaron altas tasas de movimiento de las vesículas asociadas a YPT-1, que presentaron patrones de movimiento anterógrado y retrógrado; mientras que las cisternas de Golgi asociadas a YPT-1 presentaron un movimiento más lento y desplazamiento anterógrado. Las imágenes muestran la abundancia de YPT-1 en una mezcla de formas tubulares/vesiculares en zonas distales de la hifa similares a los Agregados Tubulares Vesiculares (VTCs). A través de los análisis FRAP (Recuperación de la Fluorescencia Después del Fotoblanqueado) se determinaron diferencias significativas en la dinámica de proteínas. De manera notable, se encontró que YPT-1 y YPT-31 mostraron tiempos medios de recuperación ($t_{1/2}$) reducidos en comparación con los $t_{1/2}$ de los marcadores del Spk estudiados (CHS-1, FKS-1, y FM4-64), revelando la posible asociación transitoria de estas Rabs con las vesículas del Spk. La localización de diferentes Rab GTPasas en regiones macro- y microvesiculares del Spk, sugieren su participación en el tráfico y entrega de vesículas secretoras involucradas en la síntesis de pared celular al Spk y la subsecuente descarga a la superficie celular.

Palabras clave: **Rab GTPasas, YPT-1, YPT-31, SEC-4, Vesículas Secretoras, Neurospora**

Abstract of the thesis presented by **Eddy Francisco Sánchez León-Hing** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Biogenesis, transport and localization of secretory vesicles in the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Abstract by: Eddy Francisco Sánchez León-Hing

In eukaryotic cells secretion mechanisms require the coordinated action of small Rab GTPases, which interact with the membrane of vesicles and promote the association with other factors and the subsequent fusion of the vesicles with a target membrane. In contrast to other eukaryotic model systems, filamentous fungi contain the Spitzenkörper (Spk), a multi-vesicular complex found at the hyphal apex to which cargo-carrying vesicles arrive before being redirected to specific cell sites. The exact regulatory mechanisms utilized by hyphae to give directionality to the secretory vesicles that reach the Spk are still unknown. Hence, we have analyzed the *N. crassa* Rab-GTPases YPT-1 (Rab1), YPT-31 (Rab11) and SEC-4 (Rab8), key regulators of distinct traffic steps of the secretory pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and mammals. Laser scanning confocal microscopy of strains expressing fluorescently tagged versions of the Rabs revealed their localization at the Spk. Co-expression of differently labeled YPT-1 and the post-Golgi Rab GTPases YPT-31 and SEC-4 showed that YPT-1 was confined at the microvesicular core of the Spk, while SEC-4 and YPT-31 localized in the Spk peripheral macrovesicular layer, suggesting that trafficking of macro and microvesicles of the Spk are regulated by distinct Rabs. Notably, we also found at the Spk outer layer the *N. crassa* putative β-1,3-glucan synthase complex subunit FKS-1 and the secreted protein (INV-1). YPT-1 was also found distributed at distinct Golgi cisternae along the hyphae. Co-localization analysis of YPT-1 with the early Golgi markers USO-1 (p115) and VRG-4, and the late Golgi markers SEC-7 and VPS-52 indicated the participation of YPT-1 at early and late Golgi vesicle trafficking steps. TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) and Kymograph analyses revealed high moving rates of the YPT-1-associated vesicles, which displayed anterograde and retrograde movement patterns, while the YPT-1-associated Golgi cisternae moved more slowly and anterogradely. Image analysis revealed the abundance of YPT-1 in a mix of tubular/vesicular-like structures at distal hyphal regions, which resembled the mammalian Vesicular Tubular Clusters (VTCs). Through FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) analysis conspicuous differences in protein dynamics were determined. Remarkably, YPT-1 and YPT-31 showed lower half-time recovery rates ($t_{1/2}$) than other Spk markers (i.e. CHS-1, FKS-1, and FM4-64), suggesting a transient association of these Rab GTPases with the vesicles of the Spk. The localization of the distinct Rab GTPases at macro- and microvesicular regions of the Spk suggest their participation in the traffic and delivery of cell wall building vesicles toward the Spk and their subsequent discharge to the apical cell surface.

Keywords: **Rab GTPases, YPT-1, YPT-31, SEC-4, Secretory Vesicles, Neurospora**

Dedicatoria

A mi esposa Mavi, y mis hijos: Isaac, Samy y Emy; A mis padres Pily y Santiago; y mis hermanos Danny y Santi.

Agradecimientos

A CONACYT, por su apoyo a la ciencia y ser partícipe del nacimiento de investigadores jóvenes de México, de los cuales he sido favorecido. Al personal de CICESE por lograr siempre de mantener una institución con altos estándares de calidad muy necesarios para la generación de profesionales de alto nivel.

A las Dras. del Departamento de Microbiología del CICESE: Dra. Rufina Hernández, Dra. Ernestina Castro, Dra. Rosa Mouriño y Dra. Pilar Sánchez, por su apoyo y palabras de ánimo que inyectaron en alguna ocasión optimismo y fe para continuar con energías en el posgrado.

A mi comité de tesis doctoral por el tiempo y participación en la dirección y elaboración del proyecto que duró un poco más de 4 años, además por su paciencia en atender los avances de tesis de tiempo prolongado. Al Dr. Salomón Bartnicki-García, por participar a mayor profundidad en el proyecto a través de discusiones, sugerencias y críticas para perfeccionar la tesis.

A mi directora de tesis la Dra. Meritxell Riquelme, en quien siento gran admiración y respeto, no solo por su profesionalismo sino también como persona. Por otorgar una segunda oportunidad para integrarme en uno de sus proyectos científicos, en los cuales he sido formado y aprendido a trabajar con un alto nivel de exigencia. Por su valioso tiempo y dedicación utilizados para dirigir, discutir, corregir mi proyecto de tesis y por su honestidad para criticar mis múltiples deficiencias como estudiante de posgrado.

A mis compañeros de grupo: Lisandro, Raúl, Roxxy, Leo, Lluvia, Adria, Jovani y Adriana con los cuales compartí en algunas ocasiones buenas experiencias, el gozo efímero de un resultado, la decepción por los intentos fallidos en un experimento y los agradables momentos con mi familia en casa de la gran jefa (Dra. Riquelme). Gracias a ellos por su amistad, respeto, colaboración, apoyo y críticas constructivas durante los Lab Meetings.

A mis compañeros del posgrado e integrantes del C-4: Abraham, Luis, Socorro, Leobardo, Sarina y Marcos por sus pláticas interesantes, sinceras y profundas sobre las miles de maneras de arreglar los problemas del universo.

A Petra y George Klug, por su hospitalidad, generosidad y amistad durante mi estancia en Karlsruhe. A mis compañeros de laboratorio: Conni, Anne, Sarah, Yvonne y Matthias por hacer de mi estancia en Alemania productiva y amena.

Estoy grandemente agradecido también con el personal del laboratorio Memo (Guillermo González), Don Manuel (Manuel Valdominos Jiménez), Doña Paty (Patricia de Los Barrios Guerrero), Melissa Corral y Olguita (Olga Callejas)

por su esfuerzo en mantener el laboratorio en condiciones favorables para trabajar y por extender su mano en asistir de manera incondicional cuando fue necesario.

A los doctores: Robert Roberson, Alfredo Herrera Estrella, Stephan Seiler, Eugenio Carpizo y Reinhard Fischer por permitirme trabajar en sus laboratorios para aprender nuevas técnicas y utilizar equipo de microscopía durante el tiempo que los nuestros se encontraban averiados.

A mi entrenador de Pilates y cuñado Ernesto Reynoso por el acondicionamiento del tan deteriorado físico y por obsequiarme una LapTop como herramienta para el doctorado aún sin saber que aprobaría el ECB.

A mis padres, hermanos (Danny y Santi), amigos y hermanos en la fe, en quienes siempre sentí su apoyo sincero y ánimo para seguir adelante en el transcurso de la realización de este proyecto. Por sus oraciones y por abrir sus corazones de manera incondicional y apoyarme en tiempos de crisis y necesidad. En especial a mi madre quien a pesar de estar a más de 5,000 km de distancia no faltaron sus palabras de ánimo que alimentaron mi espíritu y me impulsaron todos los días hasta la conclusión de este proyecto.

A mis adorables hijos por inspirarme para luchar por alcanzar mis metas.

A mi amada esposa por su amor, paciencia, afecto y apoyo emocional constante, animándome a iniciar, continuar y terminar este proyecto que exigió además de mucho esfuerzo, sacrificios materiales y de tiempo.

A Dios, de quien he recibido el favor, la gracia, la sabiduría y la bendición para emprender y disfrutar este sueño de ser científico, y de conocer en el camino a personas excepcionales que han moldeado mis pensamientos y mi conducta a través de su ejemplo. A Él siempre gracias!!!

Tabla de Contenido

Resumen ..... **ii**
Abstract ..... **iii**
Dedicatoria ..... **iv**
Agradecimientos ..... **v**
Lista de Figuras ..... **xiii**
Lista de Tablas ..... **xv**
1 Introducción **1**
1.1 Crecimiento polarizado en hongos filamentosos **1**
1.2 Secreción **2**
1.2.1 Sistema de Secreción Convencional 2
1.2.2 Secreción No-Convencional 4
1.2.3 Biogénesis de vesículas secretoras 7
1.2.4 Componentes del Sistema Secretor Fúngico 9
1.2.4.1 Retículo Endoplasmático 10
1.2.4.2 Golgi 10
1.2.4.3 Mecanismos de Maduración de Cisternas de Golgi 12
1.2.4.4 Spitzenkörper 13
1.2.4.5 Microvesículas y Macrovesículas del Spk 14
1.3 Rab GTPasas: **16**
1.3.1 Pequeñas GTPasas 16
1.3.2 Características Generales de las Rab GTPasas 17
1.3.3 Estructura de Rab GTPasas 18
1.3.4 Reguladores de Rab GTPasas 18
1.3.4.1 GDF y GDI 19
1.3.4.2 GEFs y GAPs 20
1.3.4.3 Funciones de las Rab GTPasas por medio de efectores 21
1.3.5 Ypt1 22
1.3.5.1 Reguladores de Ypt1 23
1.3.5.2 Efectores de Ypt1 24
1.3.6 Ypt3 26

1.3.6.1 Reguladores y Efectores de Ypt3 27
1.3.7 Sec4 28
1.3.7.1 Reguladores de Sec4 28
1.3.7.2 Efectores de Sec4 30
1.3.8 Relación de Rab GTPasas con motores moleculares. 30
1.3.8.1 Rab GTPasas en hongos filamentosos 32

2 Justificación 34
3 Objetivos 35
3.1 Objetivos Generales 35
3.2 Objetivos Específicos 35
4 Hipótesis 36
5 Metodología 37
5.1 Condiciones de Cultivo y Cepas 37
5.1.1 Condiciones de Cultivo 37
5.1.2 Cepas 38
5.2 Etiquetamiento con Proteínas Fluorescentes: Técnicas de Recombinación de ADN y Construcción de Plásmidos 39
5.2.1 Vectores 39
5.2.2 Oligonucleótidos 40
5.2.3 Construcción de Vectores Recombinantes 43
5.2.3.1 Vectores para Etiquetamiento GFP Amino Terminal 43
5.2.3.2 Vectores para expresión de GFP Amino Terminal con Promotor Endógeno 44
5.2.3.3 Vectores para Etiquetamiento con mChFP Amino Terminal 45
5.2.3.4 Vectores con Etiquetas SGFP Carboxilo Terminal 45
5.2.3.5 Vector para eliminación del gen *fks-1* 46
5.2.4 Construcción de Fragmentos Recombinantes 46
5.2.4.1 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Endógeno de MYO- 5 46
5.2.4.2 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Endógeno de INV-1, GH61-1, GH3-4, CAT-3 47
5.2.4.3 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Interno de FKS-1 48

5.3 Análisis Bioinformático de Proteínas en Estudio 49
5.3.1 Análisis Bioinformático de SEC-4 y YPT-3 49
5.3.2 Análisis Bioinformático de FKS-1 50
5.4 Generación y Selección de Transformantes 50
5.4.1 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli* 50
5.4.2 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli* 51
5.4.3 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli* 52
5.5 Análisis Microscópicos y Procesamiento de Imágenes 53
5.5.1 Análisis Microscópicos 53
5.5.2 Microscopía Confocal 53
5.5.2.1 Microscopía de Reflexión Total Interna de la Fluorescencia 53
5.5.2.2 Ensayos FRAP del Spitzenkörper 54
5.5.2.3 Ensayos FLIP del Spitzenkörper 55
5.5.2.4 Ensayos con Sondas Fluorescentes e Inhibidores 55
5.5.3 Procesamiento de Imágenes 55
5.6 Centrifugación de Gradientes de Sacarosa, Inmunoprecipitación de proteínas y Western blots 56
5.6.1 Centrifugación de Gradientes de Sacarosa 56
5.6.2 Inmunoprecipitación de Proteínas 57
5.6.3 Análisis de expresión con distintos promotores 58
5.6.4 Western blots 58
5.7 Ensayo de Determinación de Azúcares Reductores 59
6 Resultados 61
6.1 YPT-1 se asocia con las microvesículas del Spitzenkörper 61
6.2 YPT-31 Y SEC-4 se asocian a la región macrovesicular del Spitzenkörper 64
6.2.1 Análisis de la Localización Subcelular de MYO-5-GFP 69
6.2.2 Análisis de la co-expresión de MYO-5 y las Rab GTPasas SEC-4 y YPT-1 71
6.3 Análisis del Flujo de Vesículas del Spk 71
6.3.1 Análisis FRAP 71

6.3.2 Análisis FLIP 75
6.3.3 Análisis TIRFM 76

6.4 Análisis de proteínas secretadas asociadas al Spitzenkörper 78
6.4.1 Análisis de proteínas secretadas 78
6.4.1.1 Localización subcelular de la invertasa 1 (INV-1) 78
6.4.1.2 Análisis de densidad y actividad de fracciones con INV-1-SFGFP 80
6.4.2 Análisis de FKS-1 81
6.4.2.1 Análisis Estructural de FKS-1 (NCU06871) en *N. crassa* 81
6.4.2.2 Expresión y Localización Subcelular de FKS-1-GFP^{i} 84
6.4.2.3 Análisis FRAP de FKS-1-GFPi 89

6.5 Asociación de Rab GTPasas con cisternas de Golgi 93
6.5.1 Distribución Subcelular de YPT-1, YPT-31 y SEC-4 93
6.5.2 Distribución Subcelular de YPT-1 y USO-1 95
6.5.3 Distribución subcelular de YPT-1 y VRG-4 96
6.5.4 Distribución subcelular de YPT-1 y SEC-7 97
6.5.5 Distribución subcelular de YPT-1 y VPS-52 99

6.6 YPT-1 se distribuye en una red tubular 100

6.7 YPT-1 no se localiza en endosomas 101

6.8 Análisis de la distribución de YPT-1 bajo el efecto de inhibidores del citoesqueleto 103
6.8.1 Distribución subcelular de YPT-1 bajo el efecto del Benomilo 103
6.8.2 Distribución de YPT-1 bajo el efecto de Latrunculina A (Lat A) 104

7 Discusión 106
8 Conclusiones 122
Lista de Referencias 123
Anexos 156
Leyendas de Videos Suplementarios 156
Video S1. Efecto de la BFA en la distribución subcelular de tDIMER-2-YPT-31 y GFP-YPT-1. 156
Video S2. Co-localización de YPT-1 y USO-1 en cisternas de Golgi temprano. .. 156

Video S3. Co-localización parcial de YPT-1 y el marcador de Golgi temprano VRG-4. 156
Video S4. Dinámica de estructuras tubulares de YPT-1. 156
Video S5. Estructuras tubulares de YPT-1 no corresponden al citoesqueleto microtubular. 156
Video S6. YPT-1 y el marcador de endosomas tempranos YPT-52 localizan en distintas estructuras. 157
Video S7. Distribución Subcelular del motor molecular. 157
Video S8. Distribución subcelular de INV-1-SFGFP en los ápices de las hifas. ... 157
Video S9. INV-1-SFGFP se distribuye en la región macrovesicular del Spitzenkörper. 157
Video S10. INV-1-SFGFP se localiza en Septos. 157
Medios de Cultivo 157
Medio Mínimo de Vogel (MMV, Vogel 1956) 157
Medio Completo de Vogel (MCV) 158
MMV con Fructosa-Glucosa-Sorbosa (MMV-FGS) 158
Medio Sintético de Cruzas (MSC) (Westergaard and Mitchel, 1947) 158
Medio de Caldo Lisogénico (LB) (Bertani, 1951) 158
Medio Completo Yeast Peptona Dextrosa con Adenina (YPDA) 159
Medio Definido de Selección sin Uracilo (SD-URA) 159
Reactivos y Condiciones de Reacciones de PCR 160
Reacciones de PCR para Amplificar Fragmentos de ADN 160
Reacciones de PCR de Colonia 160
Reacciones de PCR de Fusión 161
Digestión y Ligación de Amplicones o Vectores Recombinantes 161
Condiciones de Digestión de Amplicones o Vectores Recombinantes 161
Condiciones de Ligación de Amplicones con Vectores Recombinantes 162
Reactivos y Condiciones para Transformar *E. coli* quimio-competentes por Choque Térmico 162
Extracción de ADN plasmídico de Levadura (Rose *et al.*, 1990) 163
Soluciones Amortiguadoras 163
Soluciones Amortiguadora de Lisis para IP o WB 163
Soluciones Amortiguadora para SDS-PAGE 164
Solución Amortiguadora de Corrimiento 164

Solución para Gel de Separación [4X] 164
Solución para Gel de Concentración [4X] 164
Solución Amortiguadora Laemmli [4X] 165
Soluciones Amortiguadoras para Western blots 165
Solución Amortiguadora para Transferencia de Proteínas 165
Solución Amortiguadora TBS-T 165

Lista de Figuras

Figura 1. Principales componentes involucrados en el crecimiento apical de hifas fúngicas (Riquelme, 2013). 2

Figura 2. Ruta de secreción clásica o convencional de proteínas en células eucariotas (Nickel and Rabouille, 2009). 4

Figura 3. Ruta de secreción no convencional de proteínas con péptido señal (Nickel and Rabouille, 2009). 6

Figura 4. Ruta de secreción no convencional de proteínas solubles citoplasmáticas (Nickel and Rabouille, 2009). 7

Figura 5. Distribución de vesículas que se liberan del TGN (Lodish *et al.*, 2007). ... 9

Figura 6. Micrografías electrónicas de cortes en serie de Golgi en *Fusarium acuminatum* (Howard, 1981). 12

Figura 7. Modelos de tráfico vesicular de cisternas de Golgi: Compartimentos estables (a) y Maduración de Cisternas (b) (Glick and Nakano, 2009). 13

Figura 8. Esquemas de la distribución de componentes del Spitzenkörper: Componentes estructurales (a) y Componentes moleculares (b) (Riquelme and Sánchez-León, 2014). 14

Figura 9. Imágenes del ápice de una hifa de *N. crassa* obtenido por microscopía electrónica de transmisión [Modificado de (Riquelme and Sánchez-León, 2014)]. 15

Figura 10. Quitosomas: Separación en gradientes de densidad y síntesis de microfibrillas in vitro (Bartnicki-García, 2006). 16

Figura 12. Ciclos de Unión de las Rab GTPasas a Nucleótidos (Hutagalung and Novick, 2011)..... 20

Figura 13. Extracción membranal de Rab GTPasas por GDIs (Wu et al., 2007).... 20

Figura 14. Complejos TRAPP en *S. cerevisiae* (Barrowman et al., 2010). 24

Figura 15. Rab GTPasas en etapas pos-Golgi de *S. cerevisiae*..... 27

Figura 16. Distribución subcelular y análisis de la expresión bajo el control de los promotores P*ccg-1* y P*ypt-1* de la Rab GTPasa YPT-1 en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*. 62

Figura 17. Asociación de la Rab GTPasa YPT-1 con una sub-población de vesículas del Spitzenkörper en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*. 64

Figura 18. Los genes *sec-4* (NCU06404.7) y *ypt-31* (NC01523.7) codifican para los homólogos de las proteínas Rab8 y Rab11. 67

Figura 19. Distribución subcelular de las Rab GTPasas YPT-31 y SEC-4 en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*. 69

Figura 20. Distribución apical de la Miosina de Clase V, MYO-5, en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*. 70

Figura 21A. Análisis FRAP de las Rab GTPasas YPT-1 y YPT-31 en el Spitzenkörper. 73

Figura 21B. Análisis FRAP de las Rab GTPasas y marcadores del Spitzenkörper. 74

Figura 21C. Análisis FRAP y FLIP de las Rab GTPasas YPT-1 y YPT-31 en el Spitzenkörper. 75

Figura 22. Análisis de la dinámica de estructuras asociadas a mChFP-YPT-1. 77

Figura 23. Distribución subcelular de la invertasa 1 (INV-1-SFGFP)..... 79

Figura 24. Sedimentación y análisis de actividad de partículas con INV-1-SFGFP. 80

Figura 25A. Predicción de la topología de FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa* y de proteínas homólogas en hongos filamentosos. 83

Figura 25B. Predicción de la topología de FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa* y de proteínas homólogas en hongos levaduriformes. 84

Figura 26. Estrategia de etiquetamiento de la subunidad FKS-1 del complejo β-1,3-glucano sintasa en *N. crassa*..... 85

Figura 27. Análisis de expresión de FKS-1-GFP^{i} y confirmación de la integración de fragmentos recombinantes en el genoma de transformante. 87

Figura 28. Distribución subcelular de FKS-1-GFP^{i} en hifas en crecimiento de *N. crassa*. 88

Figura 30. Análisis FRAP de las subunidad putativa del complejo β-1,3-glucano sintasa, FKS-1. 90

Figura 31. Análisis de la integración del casete de eliminación para el gen *fks-1* (NCU06871.2) en las cepas de *N. crassa* FGSC 14884 y FGSC 14885..... 91

Figura 32. Esquemas y productos de PCR relacionados al vector de recombinación para la eliminación del gen *fks-1* (NCU06871.7) 92

Figura 33. La Brefeldina A (BFA) altera la distribución de YPT-1 asociada a cisternas de Golgi. 94

Figura 34. YPT-1 se asocia con cisternas de Golgi temprano. 96

Figura 35. YPT-1 se asocia con cisternas de Golgi tardío. 98

Figura 36. YPT-1 se asocia con estructuras tubulares en regions distales de las hifas. 101

Figura 37. YPT-1 no se localiza en endosomas tempranos. 102

Figura 38. Efecto del Benomilo en la localización subcelular de YPT-1. 104

Figura 39. Efecto del Latrunculina A (LatA) en la localización subcelular de YPT-1. 105

Figura 40. Distribución de Rabs en el Spitzenkörper..... 106

Lista de Tablas

Tabla 1. Proteínas de cubierta involucradas en el tráfico vesicular 8

Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en En este estudio 38

Tabla 3. Vectores Recombinantes..... 39

Tabla 4. Oliglonucleótidos. 40

Tabla 5. Análisis comparativo de las Rab GTPasas SEC-4 y YPT-31 de *N. crassa* con los homólogos más cercanos en algunas especies fúngicas y en el hombre.. 65

Tabla 6. Análisis comparativo y detección de los homólogos más cercanos de la β-1,3 glucano sintasa (FKS-1, NCU06871.7) en *N. crassa*. 82

.

1 Introducción

1.1 Crecimiento polarizado en hongos filamentosos

Una de las características de los hongos filamentosos es su capacidad para establecer y mantener un crecimiento apical, altamente polarizado (Riquelme, 2013; Reinhardt, 1892; Robertson, 1965; Castle, 1958). Este tipo de crecimiento le permite a las células fúngicas (hifas) desarrollar una morfología tubular, que es regulada por procesos genéticos y bioquímicos complejos. La elongación de las hifas durante el crecimiento polarizado requiere la expansión tanto de la membrana plasmática como de la pared celular. Este mecanismo involucra la secreción polarizada de los componentes necesarios para la biosíntesis de la pared y adición de membrana (Bartnicki-García and Lippman, 1969); para ello es necesario el transporte continuo y regulado de vesículas cargadas con precursores específicos en regiones determinadas de la célula, donde ocurre la nueva formación de pared (Figura 1). Este mismo proceso de transporte vesicular es utilizado por la célula para liberar enzimas que degradan componentes complejos del medio extracelular, y los transforman en precursores que son absorbidos por la célula y se requieren para diferentes actividades metabólicas. Aunque una gran cantidad de estudios enfocados al crecimiento polarizado se han llevado a cabo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, no se puede extrapolar toda la información obtenida para esta especie a los hongos filamentosos, debido a que en estos últimos: a) el crecimiento polarizado una vez establecido es constante, b) se han identificado componentes moleculares exclusivos en este grupo, sugiriendo la presencia de procesos diversos y/o más complejos, y c) existe la capacidad de poder desarrollar estructuras celulares más complejas.

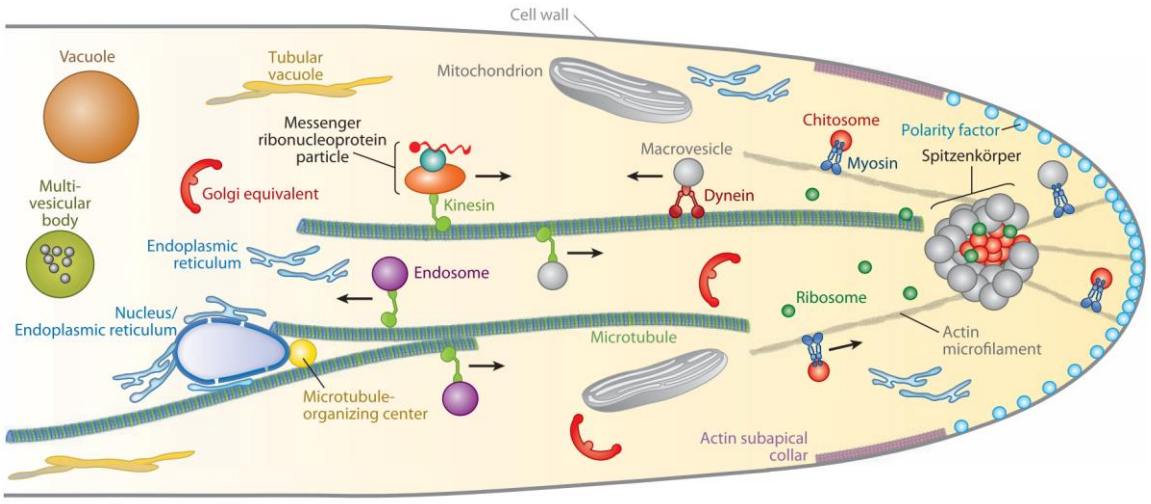


Figura 1. Principales componentes involucrados en el crecimiento apical de hifas fúngicas (Riquelme, 2013).

1.2 Secreción

1.2.1 Sistema de Secreción Convencional

La distribución intracelular de proteínas hacia organelos o estructuras específicas, requiere de mecanismos que regulan el tráfico vesicular desde los sitios de síntesis proteica hacia las membranas diana. Uno de los mecanismos generales de distribución proteica y de membrana más conocidos es la ruta de secreción convencional o clásica (Figura 2). Esta ruta involucra el retículo endoplasmático (RE) y el sistema de Golgi que participan en la formación de vesículas con proteínas que serán destinadas hacia la membrana o lumen del RE, complejo de Golgi, lisosomas (vacuolas en el caso de los hongos), o membrana plasmática (Mellman and Warren, 2000). Se conoce que muchas de las proteínas que siguen la ruta convencional poseen un péptido o secuencia de señalización (péptido señal) que es expuesto al inicio de la traducción proteica en el citosol (Blobel and Dobberstein, 1975). Por lo regular este péptido o secuencia señal posee de 16 a 30 residuos localizados en el dominio amino terminal, los cuales entre 6 y 12 residuos son hidrofóbicos, precedidos de uno o más aminoácidos básicos (Walter *et al.*, 1984); se ha sugerido que la hidrofobicidad relativa de la secuencia señal regula si las proteínas serán integradas al RE de manera co-traduccional o post-traduccional (Ng *et al.*, 1996). En algunas proteínas integrales de membrana se ha demostrado que los primeros dominios

transmembranales pueden funcionar como señales de reconocimiento (Nilsson *et al.*, 1994). Uno de los mecanismos de reconocimiento de este péptido es mediado por el complejo SRP (Signal Recognition Particle), el cual reconoce la secuencia señal uniéndose a ésta y a la subunidad ribosomal mayor; esta interacción reduce la velocidad de traducción y es reconocida por el Receptor SRP (RS) localizado en la membrana del RE, permitiendo posteriormente liberar el complejo SRP y desarrollar la traslocación co-traduccional por medio de una proteína integral de membrana denominada traslocón (Wickner and Schekman, 2005). Durante el proceso de traslocación, el péptido señal es hidrolizado y al término de la traslocación co-traduccional se libera el ribosoma [revisado en (Fewell and Brodsky, 2000; Rapoport, 2007)]. Otro mecanismo reportado de integración de proteínas al RE es el de traslocación post-traduccional, el cual es independiente del SRP y RS (Brown *et al.*, 1994). Las proteínas integradas al RE por este mecanismo, por lo regular son pequeñas (Rothblatt *et al.*, 1989) y se mantienen solubles por medio de chaperonas (Ngosuwan *et al.*, 2003), hasta el momento de ser integradas por factores que facilitan su integración al RE (Deshaies and Schekman, 1990). Se ha identificado también otras proteínas, que utilizan este mismo mecanismo, que poseen un ancla membranal hidrofóbica en el C-terminal de la proteína que sirve de secuencia señal (Steel *et al.*, 2002). La inserción de la cadena peptídica nasciente en la integración cotraduccional y post-traduccional ocurre a través de un poro de traslocación formado por el complejo Sec61 (Deshaies and Schekman, 1987), que asistido con otros factores adicionales aseguran la importación de proteínas al lumen del RE (Matlack *et al.*, 1997; Voigt *et al.*, 1996; Panzner *et al.*, 1995).

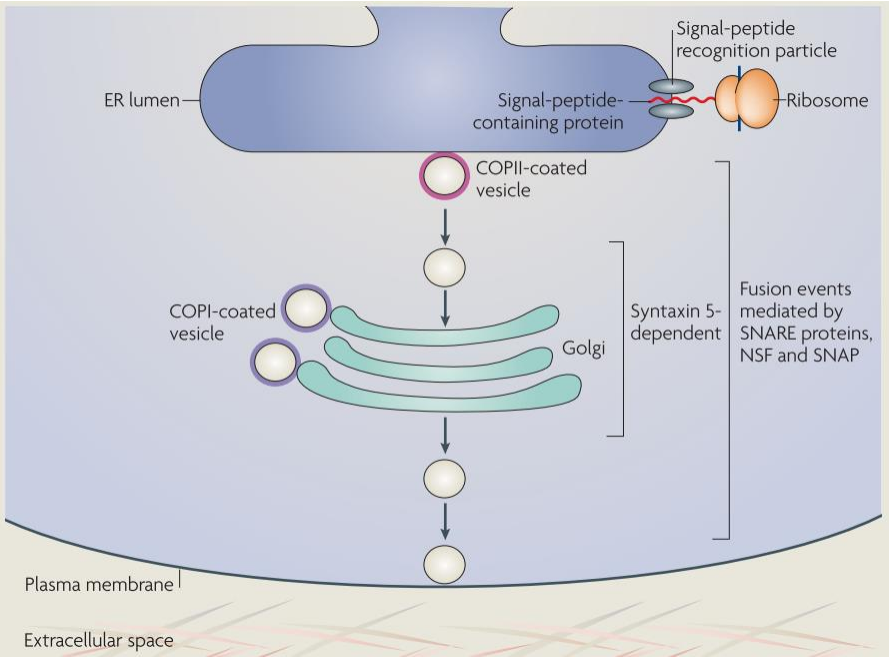


Figura 2. Ruta de secreción clásica o convencional de proteínas en células eucariotas (Nickel and Rabouille, 2009).

En el RE las proteínas recién sintetizadas son plegadas a su conformación nativa, y pueden también ser modificadas covalentemente por N- u O-glicosilación, por formación de enlaces di-sulfuro, o ser hidrolizadas en sitios específicos. Las proteínas, tras ser modificadas, son transportadas al sistema de Golgi por medio de vesículas que emergen del RE y se fusionan para dar lugar al primer compartimento membranal, denominado *cis*-Golgi. Este compartimento se mueve, alejándose físicamente del RE como parte de un proceso de maduración, en la cual toma distintos nombres dependiendo de su localización: cisternas *cis*-, *medial*- y *trans*-Golgi (Kornfeld and Kornfeld, 1985). En algunas células ocurre la formación de un compartimento intermediario entre RE y Golgi, denominado ERGIC (ER-to-Golgi Intermediate Compartment), producto de la fusión de vesículas derivadas del RE y que son transportadas por microtúbulos a *cis*-Golgi (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006).

1.2.2 Secreción No-Convencional

La secreción no convencional de proteínas incluye a las distintas rutas de secreción donde las proteínas son exportadas o dirigidas hacia la superficie celular o el espacio

extracelular, independientes de la ruta de secreción convencional RE-Golgi (Nickel, 2003; Nickel and Rabouille, 2009). Estas rutas de secreción alternativas pueden o no utilizar mecanismos vesiculares; El primero se basa en la translocación directa de las proteínas citoplásmicas a través de la membrana plasmática hacia la superficie celular o espacio extracelular, mientras que los mecanismos vesiculares utilizan intemediarios intracelulares con membrana para llevar a cabo el proceso de exportación proteica (Schafer *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2007; Manjithaya *et al.*, 2010). Se ha identificado que las proteínas que siguen estas rutas no convencionales pueden tener o no péptido señal (Nickel and Rabouille, 2009). Las proteínas con péptido señal después de ser envueltas en vesículas siguen cuatro rutas distintas al salir de RE (Figura 3), pueden ir: 1) directamente hacia la membrana plasmática en vesículas COPII, 2) a un compartimento lisosomal/endosomal que luego se fusionará con la membrana plasmática, 3) directamente hacia la membrana plasmática en vesículas sin cubierta COPII ó 4) a Golgi en vesículas sin cubierta COPII antes de fusionarse con la membrana plasmática. Las proteínas que no contienen péptido señal pueden seguir también cuatro rutas distintas que son independientes de RE y Golgi (Figura 4); en esta clasificación están las proteínas que son: 1) translocadas a través de la membrana plasmática sin la necesidad de ser englobadas en vesículas, 2) reclutadas en compartimentos secretores lisosomales que luego se fusionarán con la membrana plasmática, 3) exportadas desde vesículas que se forman desde la membrana plasmática, o 4) encapsuladas en vesículas endosomales que serán envueltas en los Cuerpos Multivesiculares (MVB, Multivesicular Bodies) que se fusionarán con la membrana plasmática (Nickel and Rabouille, 2009). Estudios recientes han revelado también la importancia de elementos autofágicos en los mecanismos de secreción no convencional (Barr *et al.*, 1997; Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010). Se han formulado varias hipótesis sobre la existencia de mecanismos no convencionales de secreción; una de ellas se basa en que la interacción prematura de la proteína secretada con otras proteínas en la ruta clásica de secreción puede afectar en el transporte intracelular; otra hipótesis sostiene que ciertos cambios pos-traduccionales como glicosilaciones y el ambiente oxidante en el lumen del RE y Golgi pueden causar agregación y problemas de plegamiento afectando funcionalmente a las proteínas (Nickel, 2010; Nickel and Rabouille, 2009).

La utilización de BFA (Brefeldina A), metabolito fúngico tóxico, para bloquear la ruta convencional de secreción en células de plantas y de mamíferos ha permitido identificar proteínas que posiblemente siguen rutas no convencionales (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Schotman *et al.*, 2008; Baldwin and Ostergaard, 2002; Toyokawa *et al.*, 2007). Uno de los efectos reportados de la BFA es la inhibición del reclutamiento de ARF1 (factor 1 de ribosilación de ADP), el cual es uno de los componentes de la cubierta COPI junto con el complejo heptamérico del Coatómero (Helms and Rothman, 1992; Donaldson *et al.*, 1992).

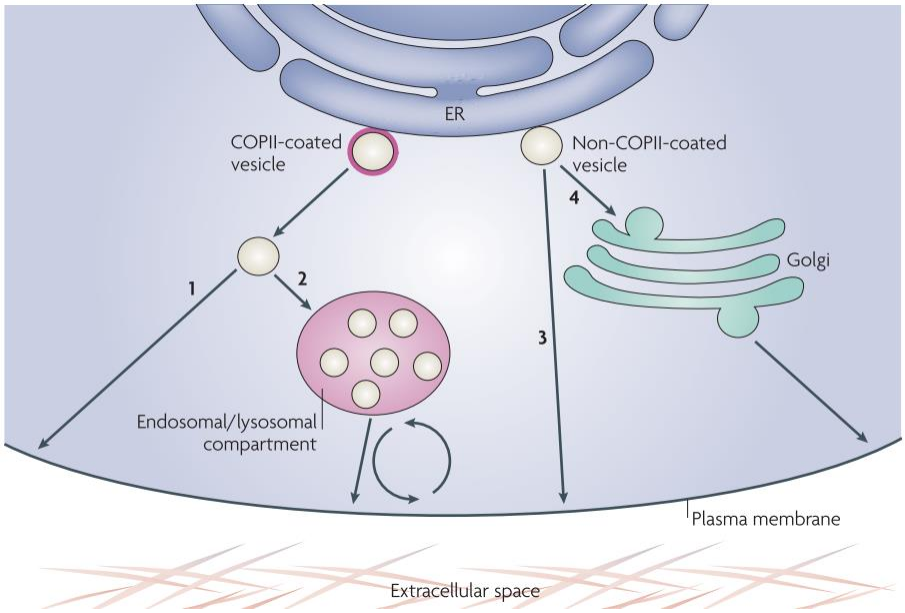


Figura 3. Ruta de secreción no convencional de proteínas con péptido señal (Nickel and Rabouille, 2009).

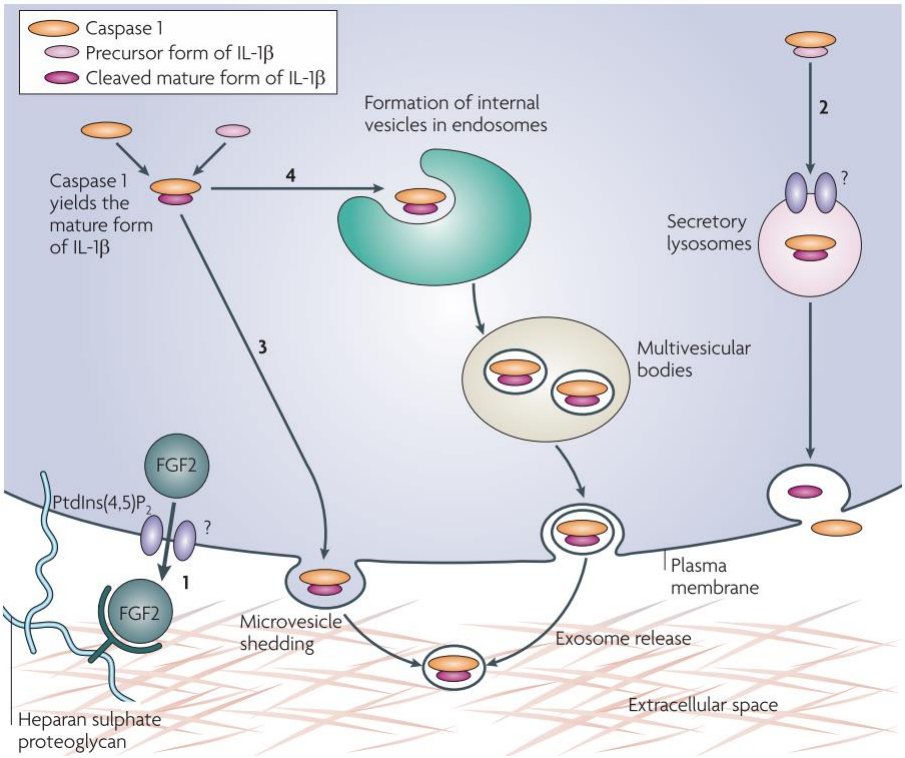


Figura 4. Ruta de secreción no convencional de proteínas solubles citoplasmáticas (Nickel and Rabouille, 2009).

1.2.3 Biogénesis de vesículas secretoras

La generación de vesículas que se forman del organelo donador por lo general es mediada por la polimerización de complejos proteicos que forman una cubierta sobre la membrana del organelo. Estas cubiertas proteicas interaccionan, por medio de proteínas adaptadoras (“cargo adaptors”), con los dominios citosólicos de proteínas de membrana que sirven como señales de clasificación (“sorting signals”), participando en la selección de proteínas que serán transportadas en vesículas específicas. Por lo general las vesículas de secreción son clasificadas en función del tipo de cubierta vesicular (Tabla 1): a) vesículas COP-II, de transporte anterógrado de proteínas del RE rugoso hacia Golgi (Matsuoka *et al.*, 1998); b) vesículas COP-I, de transporte retrógrado entre las cisternas de Golgi y de *cis*-Golgi hacia RE (Orcl *et al.*, 1993); y c) vesículas de clatrina, que se transportan desde la membrana plasmática ó *trans*-Golgi a endosomas tardíos (Black and Pelham, 2000; Costaguta *et al.*, 2001; Ohno, 2006). Recientemente se ha identificado y descrito el exómero, el cual es un complejo de proteínas adaptadoras que participan en el tráfico de la

quitina sintasa 3 (Chs3p) y Fus1p de *S. cerevisiae* desde el *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2006; Sanchatjate and Schekman, 2006; Barfield *et al.*, 2009; Richardson and Fromme, 2013). Se desconoce si el exómero, al igual que otros complejos de proteínas adaptadoras como el retrómero y AP-4 ("Adaptor Protein 4"), interactúa con proteínas de cubierta (Richardson and Fromme, 2013; Seaman, 2012; Bonifacino, 2014).

Tabla 1. Proteínas de cubierta involucradas en el tráfico vesicular

Vesícula Tipo	Proteínas de Cubierta	Reclutador Asociado*	Etapa de Transporte	Referencia (s)
COPII	Complejo Adaptador: Sec23-24 Complejo de Cubierta: Sec13-31	Sar1	Salida de RE	Faini et al., 2013
COPI	Coatómero‡: Sub-complejo Adaptor (γ, β, δ, ζ-COPs) and Cage-like Sub-complex (α, β', ε-COPs)	Arf1	Cis-Golgi a RE Intra-Golgi	Faini et al., 2013
Vesículas con Cubierta de Clatrina (CCVs)	Complejos de Proteínas Adaptadoras AP1-3 GGAs Monomérica † AP (Assembly Protein)-180, CALM ARH; Numb Complejo de Cubierta: Clatrina Cadena Pesada y de Cadena Ligera	Arf1 para AP1 y GGAs PtdIns(4,5)P2 para AP2, AP180 y CALM	AP1/GGA: RTG-Endosomas movimiento bi-directional AP2: endocitosis desde la MP AP3**: RTG/endosoma a lisosomas o lisosomas relacionados a organelos AP180/CALM: Endocitosis Mediada por Clatrina (CME) ARH: Endocitosis, y exocitosis basolateral. Numb: regulation de tráfico endosomal.	Bonifacino, 2014; Morris et al., 1993; Hirst et al., 2012; Faini et al., 2013; Chan et al., 2014; Moshkanbaryans et al., 2014; Kural et al., 2012; Kang and Fölsch, 2011. Cotton et al., 2013; Zlatic et al., 2013; Robinson, 2004
Complejos Adaptadores sin cubierta de Clatrina	AP4, Tetra-Tepsin (posible componente central de AP4)	Arf1	AP4 (TGN to endosomes)	Hirst et al., 2013
	AP5	NI	AP5 (membranas de endosomas/lisosomas tardíos)	Hirst et al., 2013

‡COPI: El coatómero es reclutado *en bloc* como un complejo simple a la membrana. *Complejos Adaptadores de Proteínas son reclutados en las membranas por GTPasas (Arfs) o PtdIns (4,5) P2 [fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato]. AP1/2 posee 4 subunidades: α, β2, μ2, and σ2. †GGA: Golgi localized, Gamma ear containing, ADP-ribosilation factor-binding proteins. ARH: proteínas autosomal recesiva de hipercolesterolemia.**AP3: Su asociación con la clatrina no es indispensable para la formación inicial (budding) de vesículas.

Las proteínas que están destinadas a la membrana plasmática o lisosomas/vacuolas, después de haber pasado por las cisternas de Golgi llegan a una red membranal y vesicular llamada red *trans*-Golgi (TGN, Trans-Golgi Network).

Esta red es un sitio de ramificación de la ruta secretora, en donde ocurre la clasificación de proteínas mediante la formación de tres tipos de vesículas (Figura 5): 1) el primer tipo (de secreción constitutiva) después de haber pasado por TGN se fusiona con la membrana plasmática mediante el proceso de exocitosis, liberando el contenido proteico o integrando las proteínas en la membrana plasmática; 2) en el segundo tipo de vesículas (de secreción regulada), su contenido es almacenado hasta que reciben una señal para la liberación de su contenido mediante el proceso de exocitosis y 3) el tercer tipo de vesículas, son destinadas a los lisosomas/vacuolas, pero antes de llegar hasta este organelo, el contenido es liberado en endosomas tardíos que se fusionarán luego con la membrana lisosomal/vacuolar (Burgess and Kelly, 1987).

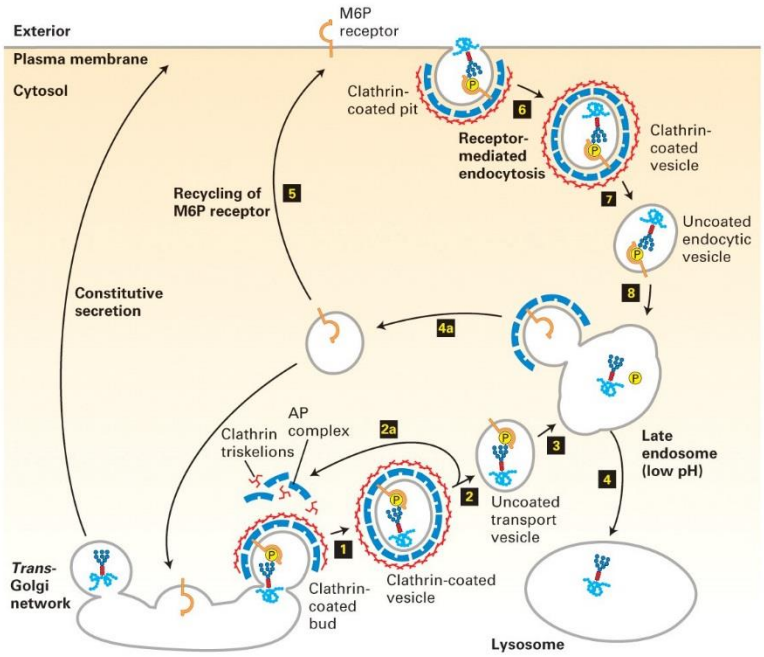


Figura 5. Distribución de vesículas que se liberan del TGN (Lodish *et al.*, 2007).

1.2.4 Componentes del Sistema Secretor Fúngico

El sistema secretor de las células fúngicas se encuentra dentro del sistema endomembranal, el cual comprende además el sistema de tráfico endocítico (Bourett *et al.*, 2007). A continuación se describirán los componentes clave del sistema secretor convencional fúngico el cual consta de RE y Golgi, aunque actualmente se sabe que en células fúngicas la secreción también puede ocurrir por sistemas no

convencionales (Giraldo *et al.*, 2013; Riquelme *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010; Stock *et al.*, 2012).

1.2.4.1 Retículo Endoplasmático

Además de la participación del RE en la biosíntesis de lípidos, almacenamiento de calcio, y plegamiento proteico, este organelo se caracteriza por ser el sitio donde algunas proteínas solubles y de membrana son internalizadas de manera co-traduccional (Levine and Rabouille, 2005). Estructuralmente el RE de la célula levaduriforme *S. cerevisiae* se distingue por ser una red interconectada de sacos aplanados no perforados con túbulos que se asocian con la membrana plasmática (Preuss *et al.*, 1991). En cambio en los hongos filamentosos el RE aparece como estructuras reticuladas o cisternas agrupadas en paralelo distribuidas en la región perinuclear o región cortical lejos del ápice (Bourett *et al.*, 2007; Maruyama and Kitamoto, 2007; Bowman *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2008; Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2013). Hasta ahora las regiones lisas del RE, denominadas sitios de salida del RE (ERES, del inglés “ER exit sites”), donde se generan las vesículas con destino a Golgi, se han descrito para *S. cerevisiae* pero poco es lo que se sabe de ellas en células fúngicas filamentosas (Watanabe and Riezman, 2004; Farquhar and Palade, 1981; Bevis *et al.*, 2002). Mediante el marcaje con moléculas fluorescentes de proteínas residentes de RE o la incorporación a moléculas fluorescentes de señales de retención en el RE (K/HDEL), el RE en células fúngicas se ha identificado como una estructura altamente dinámica y que puede estar sujeta a cambios estructurales en respuesta a señales externas (Mims *et al.*, 2002; Wedlich-Soldner *et al.*, 2002; Maruyama and Kitamoto, 2007).

1.2.4.2 Golgi

El aparato de Golgi en células eucariotas consiste de un conjunto de cisternas aplanadas apiladas de manera organizada. Esta organización es mantenida por la progresión de cisternas en sentido anterógrado respecto al RE, el flujo retrógrado de vesículas con proteínas que mantienen la identidad fisiológica entre las diferentes cisternas y el flujo anterógrado de vesículas con proteínas que serán secretadas al

medio extracelular (u otro compartimento intracelular). Aunque este tipo de estructuras es común en células de mamíferos y en plantas, en células fúngicas podemos encontrar variaciones estructurales importantes (Mowbrey and Dacks, 2009; Suda and Nakano, 2012). Observaciones iniciales por microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés “Transmission Electron Microscopy”) en hifas identificaron la presencia de cisternas dispersas (no apiladas) de Golgi, que se denominaron Equivalentes de Golgi (Grove and Bracker, 1970; Girbardt, 1969; Howard, 1981). Estructuralmente estas cisternas se presentan como sacos perforados con extensiones tubulares (Figura 6) (Howard, 1981; Bracker and Grove, 1971). Análisis por microscopía de fluorescencia de proteínas relacionadas a Golgi han permitido confirmar la morfología general y la distribución dispersa de las cisternas de Golgi en hifas de *A. nidulans* y *N. crassa* (Bowman *et al.*, 2009; Pinar *et al.*, 2013a; Pantazopoulou and Peñalva, 2009). En hongos levaduriformes se pueden encontrar dos tipos de organización de las cisternas de Golgi; *S. cerevisae* por ejemplo posee las cisternas dispersas, mientras que *Pichia pastoris* tiene las cisternas apiladas (Suda and Nakano, 2012). Hasta ahora no se conoce si las diferencias estructurales en Golgi están relacionadas a la naturaleza fisiológica o a mecanismos de generación de este organelo (Rossanese *et al.*, 1999). Se ha propuesto que posiblemente la matriz estructural generada por proteínas GRASP (del inglés “Golgi Reassembly Stacking Proteins”) son necesarias para la formación de las cisternas apiladas (Vinke *et al.*, 2011; Short *et al.*, 2005; Bourett *et al.*, 2007), aunque análisis genómicos comparativos realizados en células levaduriformes y de plantas muestran lo contrario (Suda and Nakano, 2012).

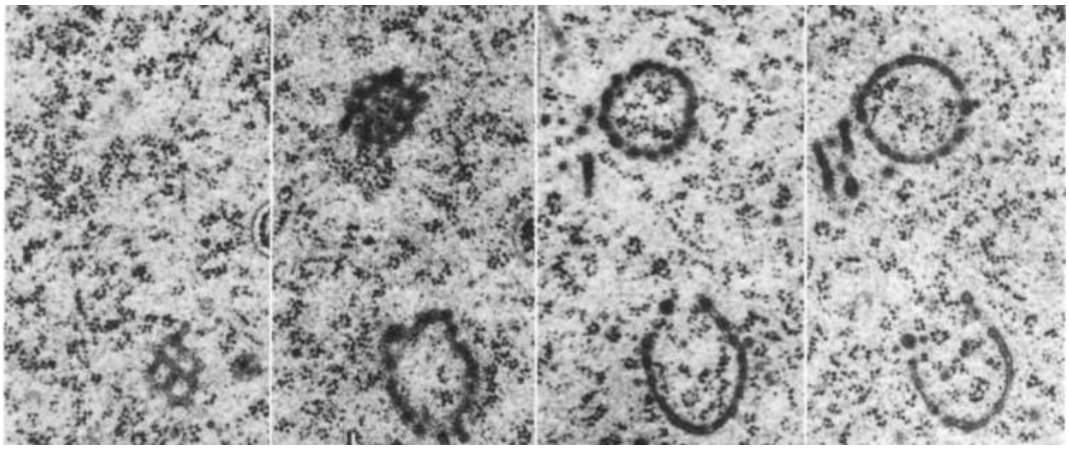


Figura 6. Micrografías electrónicas de cortes en serie de Golgi en *Fusarium acuminatum* (Howard, 1981).

1.2.4.3 Mecanismos de Maduración de Cisternas de Golgi

Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo de transporte de proteínas cargo a través de Golgi. Uno de ellos es el *modelo de transporte vesicular anterógrado* (Figura 7a) que sostiene que las cisternas son compartimentos estables con su maquinaria enzimática respectiva y que las proteínas cargo son transportadas en vesículas de modo anterógrado hacia las cisternas más distales (Farquhar and Palade, 1981), mientras que el *modelo de progresión de cisternas* (Figura 7b) sostiene que contenedores membranales salen de RE y se fusionan para dar lugar a cis-Golgi, la repetición de este mecanismo genera nuevas cisternas de Golgi, mientras que la cisterna más alejada de RE se desensambla en vesículas que se dirigen hacia la membrana plasmática (Morré, 1977). Una variación del modelo anterior es el *modelo de progresión-maduración de cisternas* el cual se basa en el transporte de proteínas en una misma cisterna que va madurando de *cis* a *trans*; la maduración es asistida por el tráfico retrógrado de enzimas residentes de Golgi posiblemente mediante vesículas COPI, cambiando la identidad de las cisternas y manteniendo la maquinaria enzimática en compartimentos (cisternas) río arriba del sistema (Schnepf, 1993; Glick *et al.*, 1997; Bonfanti *et al.*, 1998; Luini, 2011; Losev *et al.*, 2006; Matsuura-Tokita *et al.*, 2006). Un modelo alternativo pero similar al mencionado anteriormente es el *modelo de partición rápida* que se basa en la salida exponencial de proteínas cargo en la etapa final de maduración de las cisternas, y

que diferie del modelo anterior que sugiere la salida lineal de proteínas cargo de las cisternas más maduras (Patterson *et al.*, 2008). Otro modelo que se ha propuesto es el del *modelo de cisternas progenitoras* que se basa en la fusión y fisión de cisternas de Golgi, las cuales representan compartimentos estables (Pfeffer, 2010).

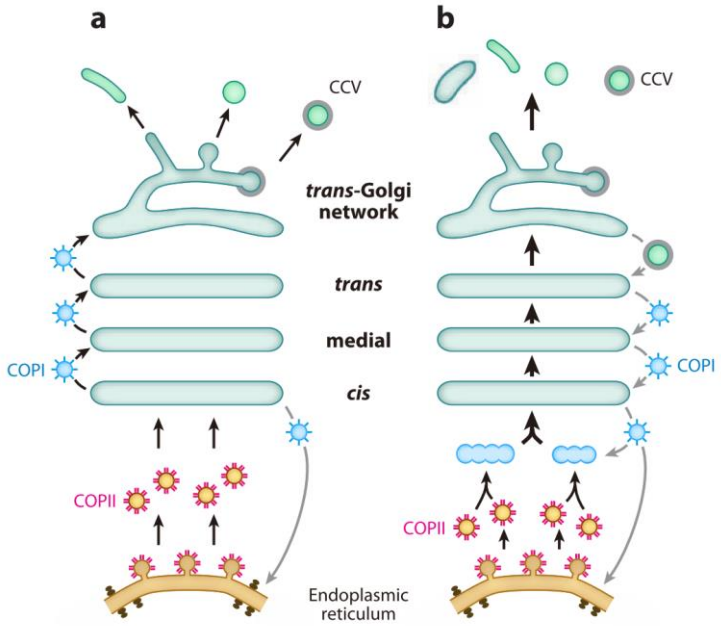


Figura 7. Modelos de tráfico vesicular de cisternas de Golgi: Compartimentos estables (a) y Maduración de Cisternas (b) (Glick and Nakano, 2009).

1.2.4.4 Spitzenkörper

El Spitzenkörper (del alemán cuerpo apical) es un complejo multivesicular localizado en los ápices de células fúngicas filamentosas, al cual se le atribuyen papeles cruciales en el crecimiento apical, morfología y definición de la dirección del crecimiento de la hifa (Brunswik, 1924; Girbardt, 1969; Riquelme *et al.*, 1998; Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). En base a un modelo matemático se ha propuesto que el Spitzenkörper se comporta como un Centro Suministrador de Vesículas (VSC, Vesicle Supply Center), donde vesículas conteniendo enzimas sintetizadoras de pared celular se acumulan y son re-direccionadas a sitios específicos de crecimiento (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989). Consistente con este modelo se han identificado en esta estructura moléculas relacionadas a la biosíntesis de pared celular como las

quitina sintasas y reguladores asociados a la síntesis de β-1-3 glucano (Fajardo-Somera, 2013; Sánchez-León *et al.*, 2011; Verdín *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2007; Richthammer *et al.*, 2012). Estudios iniciales para determinar la composición del Spitzenkörper permitieron identificar mediante TEM además de vesículas, ribosomas, material amorfo no identificado, y microfilamentos de actina como componentes del Spitzenkörper (Girbardt, 1969; Grove and Bracker, 1970; Howard, 1981; Bourett and Howard, 1991). Posteriormente el avance de herramientas moleculares y el desarrollo de la microscopía de fluorescencia ha permitido realizar el análisis *in vivo* no solo de estructuras sino de proteínas que probablemente tengan un papel importante en la fisiología del Spitzenkörper (Figura 8) (Riquelme, 2013; Riquelme and Sánchez-León, 2014).

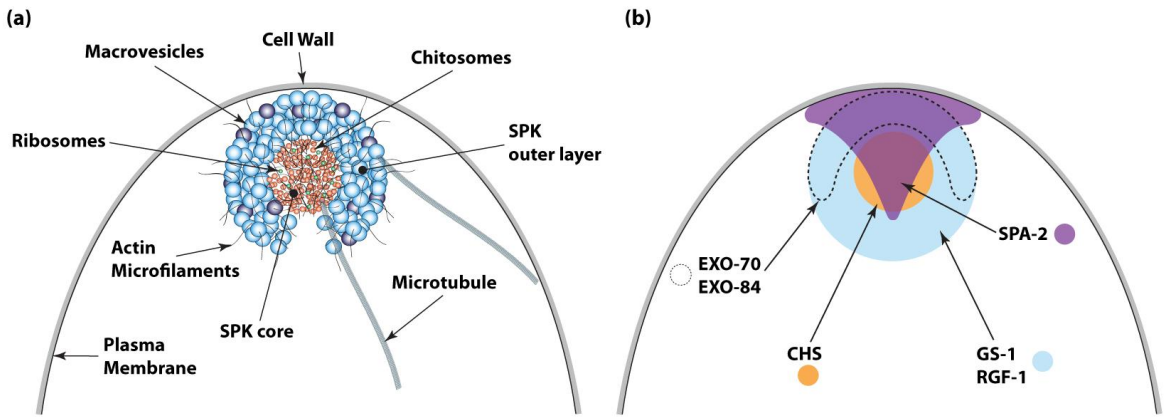


Figura 8. Esquemas de la distribución de componentes del Spitzenkörper: Componentes estructurales (a) y Componentes moleculares (b) (Riquelme and Sánchez-León, 2014).

1.2.4.5 Microvesículas y Macrovesículas del Spk

Una particularidad del Spitzenkörper es su composición predominante de vesículas (López-Franco and Bracker, 1996; Girbardt, 1969; Grove and Bracker, 1970; Howard and Aist, 1979; Roberson and Fuller, 1988). Se han identificado al menos dos poblaciones de vesículas, según el tamaño (Hohmann-Marriott *et al.*, 2006; Howard, 1981): las macrovesículas que poseen un diámetro 70-100 nm y que se encuentran en la región más externa del Spitzenkörper, y las microvesículas cuyo diámetro está en el rango de los 25-40 nm y que se localizan en la región interna o central del

Spitzenkörper (Figura 9). La predicción de que las vesículas del Spitzenkörper son contenedoras de enzimas que sintetizan pared y de enzimas que son secretadas al espacio extracelular se basó en parte en los estudios iniciales en donde se reveló que la síntesis de pared ocurría de manera preferencial en la región apical (Bartnicki-García and Lippman, 1969; Bartnicki-Garcia, 2006) y en evidencia posterior donde se logró aislar extractos celulares con la capacidad de sintetizar microfibrillas de quitina *in vitro* (Figura 10) (Ruiz-Herrera and Bartnicki-Garcia, 1974). Los análisis por microscopía electrónica de las fracciones con alta actividad quitina sintasa mostraron un alto contenido de microvesículas con un rango de diámetro de 40-70 nm, las cuales fueron denominadas quitosomas (Figura 10) (Bartnicki-Garcia, 2006; Bracker *et al.*, 1976). Mediciones recientes, a partir de imágenes obtenidas por TEM, de las microvesículas del Spitzenkörper sugieren que estas tienen un diámetro de 25-40 nm (R. Roberson, *comm. pers.*). La localización de quitina sintasas en el ápice de *Ustilago maydis* y *A. nidulans* confirmó la hipótesis de que la maquinaria biosintética se encuentra en el ápice (Weber *et al.*, 2003; Takeshita *et al.*, 2005), mientras que el análisis de la distribución de quitina sintasas en la región microvesicular del Spitzenkörper de *N. crassa* confirmó la relación espacial de las enzimas con los quitosomas (Riquelme *et al.*, 2007; Sánchez-León *et al.*, 2011; Fajardo-Somera *et al.*, 2015; Verdín *et al.*, 2009).

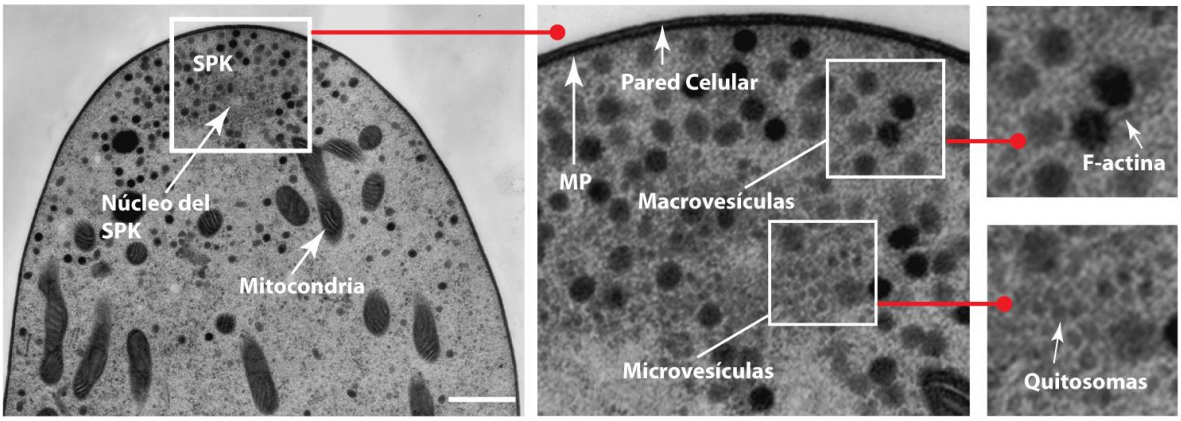


Figura 9. Imágenes del ápice de una hifa de *N. crassa* obtenido por microscopía electrónica de transmisión [Modificado de (Riquelme and Sánchez-León, 2014)].

Seguido del descubrimiento de los quitosomas se determinó que este tipo de vesículas podían mantener la actividad quitina sintasa aún después de disociarse en partículas más pequeñas (7-12 nm) tras tratamiento con digitonina (Ruiz-Herrera *et*

al., 1980). Estas partículas se nombraron subunidades 16 S por su coeficiente de sedimentación. En contraste con los quitosomas, las subunidades 16 S presentaron actividad quitina sintasa reducida y las fibras de quitina fueron más cortas y en forma de aguja. La hipótesis de que los quitosomas siguen una ruta no convencional se basa en la evidencia de la no inhibición del transporte de quitosomas hacia el Spitzenkörper en hifas de *N. crassa* tratadas con brefeldina A (BFA) (Riquelme *et al.*, 2007; Sánchez-León *et al.*, 2011). Aún permanecen muchos interrogantes acerca de las vesículas del Spitzenkörper como: a) ¿Cuál es la ontogenia de las vesículas? b) ¿Cuál es la composición de las macrovesículas? c) ¿Existe alguna ventaja fisiológica en la organización vesicular del Spitzenkörper? d) ¿Qué factores están regulando el transporte de las vesículas? A pesar de la composición multivesicular del Spitzenkörper, esta estructura no se ha considerado como parte del sistema secretor de las células fúngicas, o como una variación o especialización del sistema de secreción eucariota.

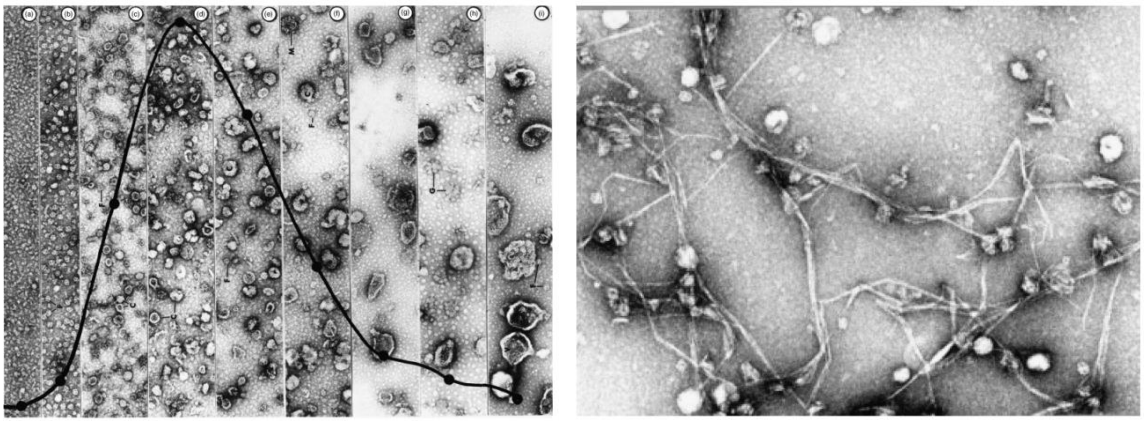


Figura 10. Quitosomas: Separación en gradientes de densidad y síntesis de microfibrillas in vitro (Bartnicki-García, 2006).

1.3 Rab GTPasas:

1.3.1 Pequeñas GTPasas

La superfamilia de proteínas Ras está comprendida por moléculas denominadas pequeñas GTPasas (guanosina trifosfatasas) las cuales contienen motivos G de unión a GTP (Guanosina Trifosfato) o GDP (Guanosina Difosfato). Las secuencias motivo de las regiones G1 (GXXXXGKS/T), G2(T), G3(DXXGQ/H/T), G4(T/NKXD) y

G5(C/SAK/L/T) le confieren al dominio G una estructura y características bioquímicas conservadas (Bourne *et al.*, 1991). Basado en las secuencias primarias y la homología funcional de proteínas de la superfamilia Ras, éstas se han clasificado en al menos 5 grupos o familias distintas: Rab, Ras, Rho, Ran y Arf (Wennerberg *et al.*, 2005). Estas proteínas funcionan como encendedores moleculares ("molecular switches"); pueden estar en estado activo o inactivo según se encuentren unidas a los nucleótidos GTP o GDP, respectivamente, para los cuales presentan una alta afinidad (Vetter and Wittinghofer, 2001). La unión de las GTPasas a GDP o GTP induce cambios conformacionales drásticos en regiones específicas denominadas Switch I y Switch II, que permiten la modulación de la actividad de proteínas específicas "efectoras" con las cuales interacciona (Bishop and Hall, 2000). Aunque las pequeñas GTPasas presentan actividad intrínseca para la hidrólisis de GTP y para el intercambio de GDP por GTP, estos procesos son catalizados por proteínas reguladoras (Ver sección 1.3.4). El extremo carboxilo terminal de la mayoría de las pequeñas GTPasas contiene secuencias de reconocimiento para la modificación pos-traduccional y adición de grupos prenilos, los cuales son necesarios no solo para la asociación y estabilidad de Rab GTPasas con membranas específicas, sino también para la función de estas proteínas (Seabra, 1998; Calero *et al.*, 2003; Ghomashchi *et al.*, 1995). Para las familias Rho y Ras el motivo de reconocimiento comprende 4 aminoácidos: una cisteína, dos aminoácidos alifáticos y cualquier aminoácido (CAAX). Esta secuencia es reconocida por la farnesil-transferasa (FTase) o geranilgeranil-transferasa I (GGTase-I), que unen de modo covalente a la cisteína una molécula de farnesil o geranilgeranil, respectivamente (Liang *et al.*, 2002). En cambio, para la familia de Rab GTPasas existen distintas secuencias motivo con dos cisteínas (CC, CXC, CCX, CCXX, ó CCXXX), en las cuales se añaden grupos geranilgeranil por medio de la Rab geranilgeranil-transferasa II (RabGGTase o GGTase-II) (Cox and Der, 2002; Seabra and Wasmeier, 2004; Stenmark and Olkkonen, 2001).

1.3.2 Características Generales de las Rab GTPasas

La familia de proteínas Rab (Ras-like proteins in brain) conserva un rango de tamaño de 20 a 29 kDa y comprende el grupo más extenso perteneciente a la superfamilia

Ras de pequeñas GTPasas. En humanos, por ejemplo, se han identificado más de 60 proteínas pertenecientes a esta familia (Stenmark and Olkkonen, 2001; Pereira-Leal and Seabra, 2001). Las Rab GTPasas tienen un papel importante en el transporte de proteínas a través de la regulación del tráfico vesicular, permitiendo mantener la integridad estructural y fisiológica de los organelos en células eucariotas (Hutagalung and Novick, 2011). Las Rab GTPasas están involucradas en los procesos de formación, transporte, anclaje, y fusión de vesículas entre las membranas de organelos donadores y aceptores.

1.3.3 Estructura de Rab GTPasas

La familia de Rab GTPasas presenta dominios estructurales similares a los de las pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras, como las seis hojas plegadas β (5 paralelas y una anti-paralela), rodeadas de cinco hélices α (Pfeffer, 2005). Además las Rabs contienen dos regiones específicas, Switch I y Switch II, de unión a GTP (Stroupe and Brunger, 2000). La conformación estructural que adoptan las regiones Switch I y Switch II cuando entran en contacto con el γ fosfato de una molécula de GTP (Lee *et al.*, 2009) es muy variable e importante, ya que confiere la especificidad de interacción de cada Rab con moléculas efectoras particulares (Pfeffer, 2005). Además de estas regiones, se han identificado cinco fragmentos de secuencias conservadas propias de la familia Rab denominados motivos RabF1-RabF5, y cuatro fragmentos de secuencia encontrados en algunos grupos de Rabs denominados RabSF1-RabSF4. Se ha propuesto que las regiones RabF y RabSF ejercen funciones adicionales en las interacciones con efectores (Pereira-Leal and Seabra, 2000; Ali and Seabra, 2005). Adicional a las regiones mencionadas, se han identificado en el extremo carboxilo terminal, 35 a 40 aminoácidos río arriba del sitio de prenilación, la región con más alta variabilidad (región hipervariable), la cual es importante en la determinación de la localización membranal (Chavrier *et al.*, 1991).

1.3.4 Reguladores de Rab GTPasas

La regulación de la actividad de las Rab GTPasas es facilitada por la acción conjunta de distintas proteínas (REP, GDI, GAPs y GEFs) quienes participan en la

modificación pos-traduccional, reciclamiento membranal, y en la activación por intercambio de nucleótidos de guanina.

1.3.4.1 GDF y GDI

El ciclo de unión a nucleótidos de Guanina de las Rab GTPasas inicia con su asociación a GDP después de su traducción en el citoplasma. En este estado "inactivo", las Rabs interactúan con las proteínas REP (Rab Escort Proteins) quienes a su vez facilitan la prenilación simple o doble por medio de las RabGGTasas (Figura 12) (Desnoyers *et al.*, 1996; Walworth *et al.*, 1989; Pylypenko *et al.*, 2003; Rak *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007). Las Rabs preniladas unidas a una REP son dirigidas hacia membranas específicas, proceso coadyuvado por los factores GDF (GDI Dissociation Factor), en donde ocurre el intercambio de GDP por GTP por proteínas GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors), dejándolas en estado "activo" (Sivars *et al.*, 2003; Andres *et al.*, 1993; Ayad *et al.*, 1997; Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997). Las Rabs unidas a GTP regulan la actividad de proteínas efectoras específicas hasta el momento que la actividad GTPasa de las Rabs es acelerada por GAPs (GTPase Activating Proteins), estimulando la generación de Rabs unidas a moléculas de GDP y por consecuencia dejándolas nuevamente en estado inactivo (Sivars *et al.*, 2003; Segev, 2001; Pfeffer, 2001). El ciclo termina a través de la extracción membranal de Rabs-GDP por proteínas GDI (Figura 13) (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) (Wu *et al.*, 1996). Aunque los reguladores GDF y GDI conservan una alta afinidad por las Rab GTPasas unidas a GDP, al menos en las GDI ésta varía en función del estado de prenilación de las Rabs (Rak *et al.*, 2004; Rak *et al.*, 2003; Pylypenko *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). Los dominios I y II en estas proteínas reguladoras (GDF y GDI) son los responsables de la alta afinidad por las Rab GTPasas unidas a GDP; el primer dominio I se asocia con la región hipervariable de las Rabs mientras que el dominio II contiene los sitios de unión con los grupos prenilo (Wu *et al.*, 2007).

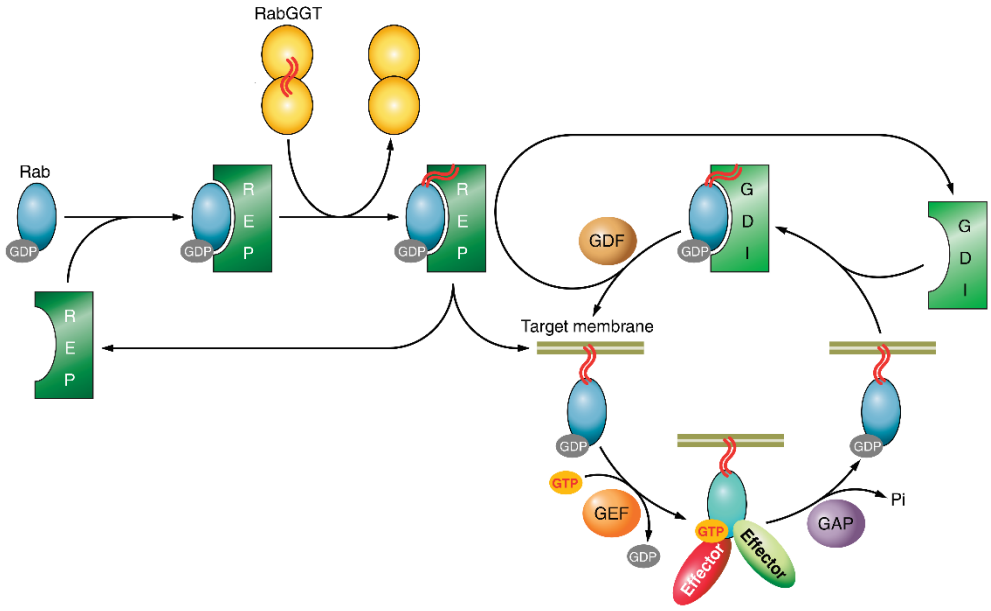


Figura 12. Ciclos de Unión de las Rab GTPasas a Nucleótidos (Hutagalung and Novick, 2011).

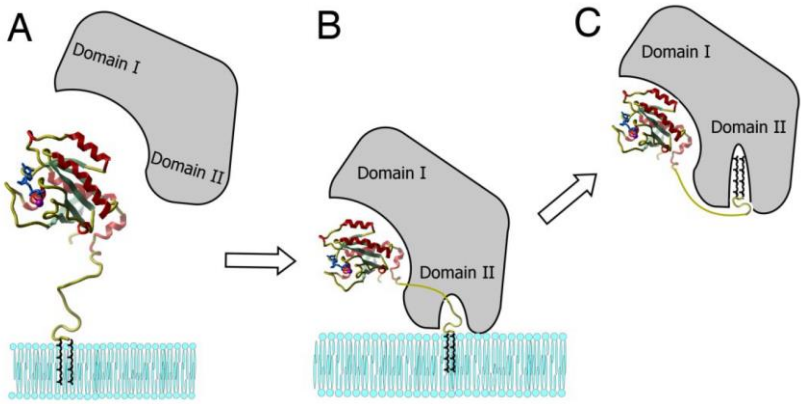


Figura 13. Extracción membranal de Rab GTPasas por GDIs (Wu et al., 2007).

1.3.4.2 GEFs y GAPs

Además de las proteínas GDF y GDI mencionadas anteriormente, existen dos grupos de proteínas importantes involucradas en la regulación del ciclo de activación e inactivación de las Rabs. El grupo de las GAPs ("GTPase Activating Proteins") participa en la inactivación de Rabs catalizando la hidrólisis de GTP a GDP (Rak *et al.*, 2000; Du and Novick, 2001; Fukuda, 2011; Symons and Settleman, 2000). A diferencia de las GAP, las proteínas GEF ("Guanine nucleotide Exchange Factors") participan en la activación de las Rabs, provocando cambios conformacionales en la

estructura de las Rabs que favorecen al intercambio de GDP por GTP (Bos *et al.*, 2007; Eva and Aaronson, 1985; Schmidt and Hall, 2002).

Además de asistir en la interacción intramembranal por medio de las Rabs, los complejos multiméricos pueden actuar como GEFs para activar las Rabs como es el caso de los complejos TRAPP (Yu and Liang, 2012) y HOPs (Wurmser *et al.*, 2000).

1.3.4.3 Funciones de las Rab GTPasas por medio de efectores

Es ampliamente conocido que las Rab GTPasas regulan las distintas etapas del tráfico vesicular en eucariotas, específicamente en la formación, transporte, anclaje inicial y fusión de vesículas. Los distintos pasos del tráfico vesicular regulados por la Rabs se llevan a cabo por medio de la interacción con moléculas efectoras que se unen a las Rabs en estado activo (Pfeffer, 2001; Grosshans *et al.*, 2006b). En la formación de vesículas la regulación la hacen a través de la selección del cargo (Carroll *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2008; Diaz and Pfeffer, 1998; Munro, 2002; Jedd *et al.*, 1997), mientras que el transporte vesicular a través del citoesqueleto es facilitado por la interacción directa o indirecta con motores moleculares (Lipatova *et al.*, 2008; Hales *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2001; Mallik and Gross, 2004; Wagner *et al.*, 2002). Además se ha encontrado que algunas Rabs participan en el transporte de organelos como Golgi o mitocondrias (Arai *et al.*, 2008; Boldogh *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 1994; Echard, 1998). El anclaje inicial (“tethering”) o interacción inicial de las vesículas con las membranas aceptoras es un proceso que asegura la integridad de la fusión vesicular con las membranas blanco o receptoras. Para ello las Rabs interaccionan con dos tipos de efectores: las proteínas ancla monoméricas (“coiled-coil tethers”) y los complejos ancla multiméricos (“multi-subunit tethers”). Las anclas monoméricas con sus dominios coiled-coil interactúan con las Rabs en las membranas vesiculares y con factores en las membranas aceptoras, mediando el primer contacto previo a la fusión vesicular (Allan *et al.*, 2000; An *et al.*, 2009; Stenmark *et al.*, 1996); aunque también estos efectores pueden regular el mecanismo de fusión a través de su interacción con proteínas SNARE [soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor] (Diao *et al.*,

2008; Simonsen *et al.*, 1999). Una de las anclas monoméricas mejor estudiadas es la proteína Uso1p de *S. cerevisiae* (Nakajima *et al.*, 1991) y su homóloga en humanos p115 (Waters *et al.*, 1992; Sappersteins *et al.*, 1995), las cuales participan en la interface RE y *cis*-Golgi anclando vesículas a las membranas de Golgi por medio de su interacción con Ypt1/Rab1 y otros factores (Cao *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Beard *et al.*, 2005; Shorter *et al.*, 2002). En el caso de los complejos ancla multiméricos hasta ahora se han identificado ocho de ellos en distintas etapas de tráfico entre estructuras celulares: 1) TRAPP I (TRAnsport Protein Particle I) en RE-Golgi (Zou *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2006), 2) TRAPP II entre cisternas de Golgi y también en endosomas tardíos-Golgi tardío (Zou *et al.*, 2012), 3) Exocisto en Golgi-membrana plasmática (Munson and Novick, 2006), 4) GARP (Golgi Associated Retrograde Protein complex) en el reciclamiento endosomas-Golgi (Siniossoglou and Pelham, 2001), 5) CORVET (class C cOre Vacuole/Endosome Tethering complex) en endosomas-Golgi (Peplowska *et al.*, 2007), 6) HOPS (HOmotypic fusión and vacuole Proetin Sorting complex) entre vacuolas y en vacuolas-endosomas (Seals *et al.*, 2000), 7) COG (Conserved Oligomeric Golgi) en endosomas-Golgi y también entre Golgi (Miller and Ungar, 2012), y 8) Dsl (Dependence on SLY1) en Golgi-RE (Andag and Schmitt, 2003; VanRheenen *et al.*, 2001). Algunas Rabs actúan en la separación de proteínas de cubierta reclutando efectores que asisten al proceso de desprendimiento o bien inhibiendo en la formación de la cubierta vesicular (Semerdjieva *et al.*, 2008; Moyer *et al.*, 2001). Las Rabs participan de manera indirecta en los procesos de fusión vesicular a través de los complejos multiméricos interactuando con proteínas SNAREs (Whyte and Munro, 2001; Sivaram *et al.*, 2005; Stroupe *et al.*, 2006); aunque en estudios recientes se ha demostrado la participación de Rabs en procesos de fusión de manera directa o sin la necesidad de los complejos ancla multiméricos (Grosshans *et al.*, 2006a; Weber-Boyvat *et al.*, 2011).

1.3.5 Ypt1

La Rab GTPasa Ypt1p de *S. cerevisiae*, ortóloga a la Rab1 en mamíferos, participa en la ruta de secreción regulando varios pasos del transporte vesicular: desde el RE hacia Golgi, entre cisternas de Golgi y desde endosomas tempranos hacia Golgi tardío (Bacon *et al.*, 1989; Segev *et al.*, 1988; Jedd *et al.*, 1995; Sclafani *et al.*, 2010).

Ypt1p se asocia a las vesículas después de su formación durante el transporte de vesículas de RE hacia Golgi (Segev, 1991). Estudios recientes han demostrado que Ypt1p también participa en procesos de Autofagia (Lipatova and Segev, 2012). La versatilidad de Ypt1p en las distintas etapas del tráfico membranal está relacionada a las funciones de regulación de los complejos TRAPP (Barrowman *et al.*, 2010). La localización de Ypt1p en la membrana de las vesículas es facilitada por los grupos prenilo que se asocian de manera covalente en el extremo carboxilo-terminal (Calero *et al.*, 2003).

1.3.5.1 Reguladores de Ypt1

Análisis de la estructura cristalográfica de TRAPPI unido a Ypt1p ha permitido inferir el posible mecanismo de activación de Ypt1p por parte de los complejos. De este modo, se ha propuesto que las subunidades responsables de la actividad GEF en Ypt1p son Bet5, Trs23, Trs31 y dos copias de Bet3, las cuales se encuentran en ambos complejos (Cai *et al.*, 2008). Otro regulador de la Ypt1p es Gyp1p, proteína GAP miembro de la familia GYP (GAPs for Ypts), la cual es reclutada río arriba de Ypt1p por la Rab GTPasa Ypt32p y participa en la inactivación de Ypt1p conforme al modelo de cascada GAP contracorriente (Rivera-Molina and Novick, 2009; Albert and Gallwitz, 1999; Albert *et al.*, 1999; Du and Novick, 2001; Rak *et al.*, 2000). Defectos en el reciclaje de la SNARE Snc1p y FM4-64 de la mutante de *S. cerevisiae gyp5Δ* sugieren que la inactivación de Ypt1p por Gyp5p es necesaria para el reciclaje membranal (Lafourcade *et al.*, 2004).

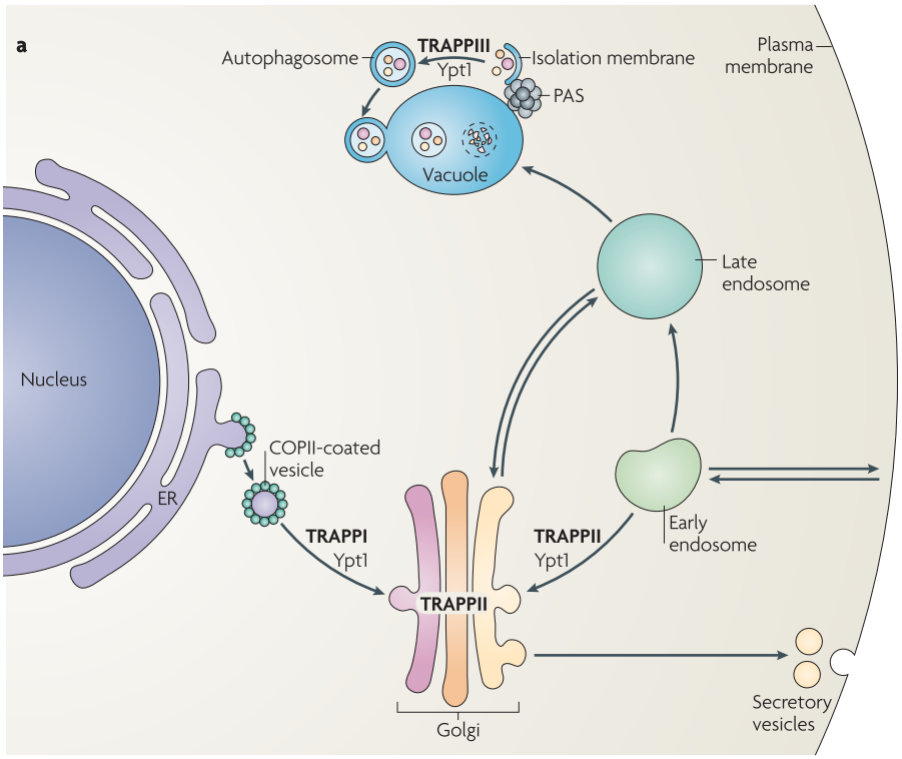


Figura 14. Complejos TRAPP en *S. cerevisiae* (Barrowman et al., 2010).

1.3.5.2 Efectores de Ypt1

Se han identificado varios efectores de Ypt1p, que están relacionados a las distintas etapas y/o rutas del tráfico membranal. Los complejos ancla multiméricos TRAPP I y TRAPP II además de actuar como GEF de Ypt1p, participan como efectores en distintas etapas del tráfico vesicular. Análisis in vitro identificaron que TRAPP I es necesario para anclar en Golgi las vesículas generadas en RE, un evento asistido por la subunidad del complejo Bet3, que interactúa con la subunidad Sec23 del complejo COPII (Cai *et al.*, 2007b; Sacher *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2007a; Miller *et al.*, 2003). El anclaje de vesículas por TRAPP I al parecer es asistido por Uso1p, proteína ancla monomérica con dominio coiled-coil, otro efector de Ypt1p (Barrowman *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 1998). Mientras que el complejo TRAPP I determina la interacción con vesículas COPII, el complejo TRAPP II en cambio interactúa con vesículas COPI, especificidad probablemente definida por las subunidades únicas del complejo que inhiben la interacción con Sec23 (Barrowman *et al.*, 2010; Yamasaki *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2010). Reciente se identificó que el complejo TRAPP III contiene además de las cuatro subunidades comunes de los complejos TRAPP (las

cuales poseen actividad GEF en Ypt1p), la subunidad Trs85 la cual dirige el complejo a la Estructura Pre-Autofagosomal (PAS, Pre-Autophagosomal Structure). El complejo TRAPP III también está relacionado con la activación de Ypt1p en el PAS durante el proceso de expansión membranal en de la autofagia (Lynch-Day *et al.*, 2010).

Los complejos TRAPP tienen la capacidad de activar y reclutar de manera específica a Ypt1p/Rab1 en las vesículas, mientras que las proteínas ancla monoméricas con dominio coiled-coil, efectoras de Ypt1p, participan en el proceso de interacción de las vesículas previo a su fusión con las membranas aceptoras (Gillingham and Munro, 2003). En mamíferos p115, ortóloga de Uso1p en *S. cerevisiae*, forma homodímeros con dos dominios globulares (H1 y H2), una cola extensa con cuatro dominios coiled-coil (CC1-CC4) y un extremo acídico (Striegel, 2009; Grabski *et al.*, 2012; Yamakawa *et al.*, 1996). En el extremo amino terminal de p115 se localizan los dos dominios globulares los cuales se unen a: la subunidad β-COP del complejo COPI, la GEF GBF1 y la Rab1 (Guo *et al.*, 2008; García-Mata and Sztul, 2003; An *et al.*, 2009); mientras que en la región central el dominio coiled-coil CC1 se asocia con Rab1 y proteínas SNARE (Beard *et al.*, 2005; Allan *et al.*, 2000), interacción necesaria para el tráfico anterógrado de vesículas. Las proteínas ancla monoméricas coiled-coil de la familia de las golginas, GM130 y la gigantina (factor vesicular COPI), interactúan con p115 en su extremo C-terminal acídico y participan en la regulación de la interacción de Rab1 con p115 (Shorter and Warren, 1999) (Short *et al.*, 2005; Moyer *et al.*, 2001; Sönnichsen *et al.*, 1998).

El complejo ancla multimérico COG (conserved oligomeric Golgi) es también un efector de Ypt1p, que regula el tráfico retrógrado de vesículas, en y hacia Golgi, con enzimas de glicosilación (Miller and Ungar, 2012). El complejo COG al interactuar con la cubierta COPI, la SNARE Sed5 y la proteína Sly1 participa en la regulación del tráfico retrógrado en Golgi y de endosomas a Golgi (Ullrich *et al.*, 1993; Shestakova *et al.*, 2007; Laufman *et al.*, 2009). La Rab GTPasa Ypt1p se asocia con las subunidades Cog3/Cog2 del complejo COG (anteriormente nombradas Sec34/35) y además con la golgina-84 (Sohda *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 2003) interacciones probablemente necesarias para regular el mecanismo de anclaje de

las vesículas COPI en Golgi (Zolov and Lupashin, 2005; Suvorova *et al.*, 2002; Ungar *et al.*, 2006).

Otro efector de Ypt1p es el componente ancla monomérico con dominio coiled-coil Atg11, que se asocia con la forma activa Ypt1p-GTP (Lipatova and Segev, 2012). La localización y ensamble de Atg11 en el PAS durante el proceso de la autofagia selectiva Cvt (Cytoplasm-to-vacuole targeting) es coadyuvado por la formación del módulo Trs85-Ypt1p-Atg11 (Lipatova *et al.*, 2012). La formación de los autofagosomas requiere de la expansión membranal del PAS a partir de agregados túbulo-vesiculares que contienen principalmente a la proteína transmembranal Atg9 (Mari *et al.*, 2010). Se ha sugerido un modelo donde el complejo TRAPP III unido a Ypt1p recluta a Atg9 (u otros componentes de los compartimentos Atg9) previo a su interacción con Atg11, quien finalmente dirige los compartimentos membranales Atg9 hacia el PAS (He *et al.*, 2006a; Yorimitsu and Klionsky, 2005; Backues and Klionsky, 2012).

1.3.6 Ypt3

La proteína Ypt3 es homóloga a Ypt31/32p de *S. cerevisiae* y la Rab11 de mamíferos. El papel de Ypt31/32p se concentra en la regulación del tráfico vesicular desde Golgi hacia la membrana plasmática en pasos previos a la exocitosis (Figura 15). Estudios iniciales identificaron a Ypt31p y Ypt32p como homólogas con funciones redundantes, que participan en la ruta de secreción río abajo de Ypt1p y río arriba de Sec4p, localizando su papel en la regulación del tráfico vesicular en Golgi tardío o *trans*-Golgi (Benli *et al.*, 1996; Jedd *et al.*, 1997; Losev *et al.*, 2006). La función de Ypt31/32p está estrechamente relacionada con su localización entre las Rab GTPasas Ypt1p y Sec4p; De manera estratégica Ypt31/32p recluta efectoras que son reguladoras de las Rabs funcionalmente localizadas inmediatamente antes y después de Ypt31/32p (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012; Rivera-Molina and Novick, 2009). En *Schizosaccharomyces pombe* Ypt3p participa en el tráfico vesicular desde trans-Golgi, en pasos finales de la ruta exocítica y también está involucrada en el tráfico retrógrado de endosomas hacia Golgi (Cheng *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006b). Rab11 se la ha relacionado también en el tráfico vesicular de endosomas de reciclamiento (RE, recycling endosomes) hacia la membrana plasmática, proceso

regulado posiblemente por la interacción de Rab11 con la subunidad del Exocisto Sec15 (Takahashi *et al.*, 2012; Grant and Donaldson, 2009; Jones *et al.*, 2006). Recientemente se ha generado la hipótesis de que Ypt31/32p participan de manera indirecta en la autofagia a través de la regulación del tráfico de vesículas con componentes autofágicos (Zou *et al.*, 2013).

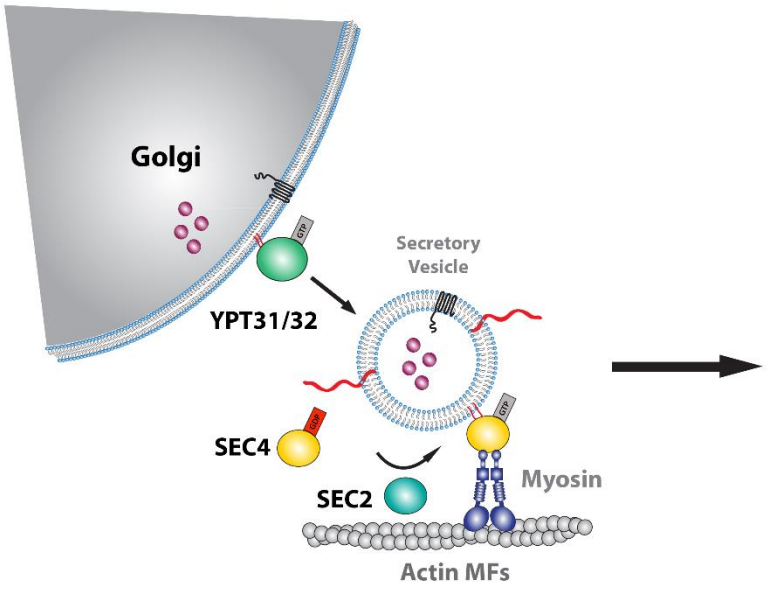


Figura 15. Rab GTPasas en etapas pos-Golgi de *S. cerevisiae*.

1.3.6.1 Reguladores y Efectores de Ypt3

Aunque se ha planteado que los complejos TRAPP participan en la regulación de la activación de Ypt1p (Barrowman *et al.*, 2010), otros estudios basados en análisis genéticos y bioquímicos sostienen que el complejo TRAPP II, a través de la subunidad Trs130, también participa en la activación de Ypt31/32p (Tokarev *et al.*, 2009; Morozova *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2013). Con el objetivo de entender el mecanismo molecular de funcionamiento de Ypt32, se han realizado análisis cristalográficos de la proteína unida a los nucleótidos de guanina, revelando detalles interesantes en la conformación del dominio Switch II en unión con el regulador GDI (Sultana *et al.*, 2011). Análisis del mecanismo de funcionamiento de Ypt31/32p permitió identificar que en el proceso de secreción exocítico estas proteínas reclutan a la proteína efectora Sec2p, la cual tiene actividad GEF sobre Sec4p pero no en

Ypt31/32p (Ortiz *et al.*, 2002); este evento es necesario para darle continuidad al proceso de secreción y se ajusta al modelo propuesto de activación en cascada por GEFs (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012). Análisis de interacción in vivo determinaron que el dominio C-terminal de Sec15 en *Drosophila melanogaster* interactúa con la Rab11 en un modo GTP dependiente (Wu *et al.*, 2005). Otra proteína efectora importante de Ypt31/32p es la GAP Gyp1p, la interacción es importante para la localización y estabilización de Gyp1p en Golgi, y participa en la inactivación de Ypt1p (Rivera-Molina and Novick, 2009). En mamíferos la Rab11a mediante la interacción con el efector Rab11-FLIP2 (Rab11 Family interacting protein 2) y el motor molecular Myo Vb, forma un complejo ternario involucrado en el proceso de reciclado de la membrana plasmática (Hales *et al.*, 2002).

1.3.7 Sec4

Una de las Rab GTPasas mejor caracterizadas es la Sec4p de *S. cerevisiae*, proteína homóloga de la Rab8 en mamíferos, la cual tiene un rol esencial en la regulación del tráfico de vesículas secretoras desde Golgi hacia la membrana plasmática y en eventos previos a la exocitosis (Salminen and Novick, 1987; Kabcenell *et al.*, 1990; Walworth *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1999; Novick *et al.*, 2006); aunque también se encuentra involucrada en procesos de autofagia y endocitosis (Geng *et al.*, 2010; Kean *et al.*, 1993). El inicio de la actividad reguladora de Sec4p está basado en dos eventos anteriores: 1) El reclutamiento de la GEF Sec2p por la Rab Ypt32p (Ortiz *et al.*, 2002) y 2) la activación de Sec4p por Sec2p mediante la liberación de GDP unida a Sec4p para su unión con GTP (Walch-Solimena *et al.*, 1997). Sec4p se une a las membranas de las vesículas a través de los grupos prenilo ubicados en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Goud *et al.*, 1988; Newman and Magee, 1993; Calero *et al.*, 2003).

1.3.7.1 Reguladores de Sec4

Estudios relacionados al funcionamiento de la Rab GTPasa Sec4p han permitido identificar moléculas reguladoras de su actividad. La proteína GDI de *S. cerevisiae* Gdi1p tiene un rol esencial en la estabilización de Sec4p unido a GDP, además participa en la regulación de la extracción membranal de Sec4p-GDP (Garrett *et al.*,

1994; Garrett *et al.*, 1993). La actividad de Sec4p es regulada por proteínas GAP como Gyl1p y Gyp5p las cuales forman un complejo en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*; análisis in vitro demostraron que ambas GAPs interactúan con Sec4p posiblemente regulando su actividad exocítica en sitios de crecimiento polarizado. La doble mutante *gyl1Δgyp5Δ* presentó defectos en la secreción y la acumulación de vesículas secretoras (Chesneau *et al.*, 2004). Defectos similares presentó la doble mutante *msb3Δmsb4Δ*, y se demostró que estas proteínas GAP (Msb3p y Msb4p) interactúan in vivo con Sec4p (Gao *et al.*, 2003). Gdi1p es una proteína GDI involucrada en el reciclaje de Sec4-GDP desde la membrana plasmática hacia el complejo de Golgi o membranas vesiculares a través del citoplasma (Garrett *et al.*, 1994).

El cambio al estado activo de Sec4p es inducido por dos proteínas, la Dss4p que favorece la remoción de GDP unida a Sec4p y su estabilización en ese estado libre de nucleótidos y la GEF Sec2p que favorece el intercambio de GDP por GTP en Sec4p (Moya *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1997; Itzen *et al.*, 2007; Strick *et al.*, 2002; Walch-Solimena *et al.*, 1997). Estudios iniciales en mutantes Sec15p de *S. cerevisiae* revelaron una posible interacción entre Sec15p, Sec4p y Sec2p en donde estas últimas participan río arriba de Sec15p (Salminen and Novick, 1989). Posteriormente se identificó que Sec2p participaba de manera directa en el intercambio de GTP-GDP de Sec4p, definiendo a Sec2p como GEF de la Rab GTPasa, ubicando su actividad en etapas iniciales del tráfico vesicular de Golgi hacia la membrana; además se determinó que la interacción de ambas proteínas ocurre en la membrana de vesículas secretoras (Elkind *et al.*, 2000; Walch-Solimena *et al.*, 1997). El reclutamiento de Sec2p en vesículas secretoras es favorecido por la interacción directa con la Rab Ypt32p en su estado activo, permitiendo el intercambio de GDP por GTP en Sec4p en el proceso de regulación de tráfico vesicular post-Golgi hacia la membrana plasmática (Ortiz *et al.*, 2002). La interacción del complejo GEF-Rab-Efector favorece el estado activo de la Rab-GTP en sitios específicos de la membrana, asegurando el reclutamiento y la regulación de otros componentes necesarios para el tráfico vesicular; Un ejemplo de esto es la interacción de Sec4p con Sec2p, Myo2p, Sec15p, Sro7p (Grosshans *et al.*, 2006b; Walch-Solimena *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1999; Medkova *et al.*, 2006; Grosshans *et al.*, 2006a). Ypt32p y

Sec15p interactúan secuencialmente con Sec2p, y compiten por el mismo dominio de unión con Sec2p (Medkova *et al.*, 2006). Esta interacción parece estar regulada por el PI4P (Fosfatidilinositol 4 Fosfato); se propone que las altas concentraciones de PI4P en Golgi inhiben la interacción de Sec2p con Sec15p, permitiendo el reclutamiento membranal de Sec2p por Ypt32p. La baja concentración de PI4P en las vesículas permiten el reemplazamiento de Ypt32p por Sec15p, asegurando un mecanismo de retroalimentación positiva a través del reclutamiento de Sec2p para activar a Sec4p en los sitios de exocitosis (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010).

1.3.7.2 Efectores de Sec4

En la membrana vesicular Sec4p unido a GTP interactúa con distintos efectores los cuales finalmente definen sus funciones de regulación. El Exocisto por ejemplo, es un complejo ancla hetero-octamérico reclutado por la forma activa de Sec4p en sitios específicos de la membrana plasmática donde participa en el anclaje “tethering” de las vesículas. En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que Sec15p, subunidad del Exocisto, tiene una interacción directa con Sec4p en su forma activa, interacción importante para el reclutamiento del complejo (TerBush *et al.*, 1996; Lipschutz and Mostov, 2002; Guo *et al.*, 1999). La interacción Sec15p-Sec4p está regulado por la asociación directa de Sec2p con Sec15p, acoplando la activación de Sec4p y el reclutamiento del Exocisto (Medkova *et al.*, 2006; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012). Otro efector identificado de Sec4p incluye a la proteína Sro7p la cual es miembro de la familia de proteínas *lgl* (lethal giant larvae) supresoras de tumores. Sec4p, Sro7p y la t-SNARE (target-associated SNARE) Sec9p se han identificado formando un complejo proponiendo una regulación indirecta de Sec4p en la fusión vesicular (Brennwald *et al.*, 1994; Grosshans *et al.*, 2006a).

1.3.8 Relación de Rab GTPasas con motores moleculares.

Tanto en células fúngicas como en células animales se ha determinado que los componentes del citoesqueleto, como microtúbulos y filamentos de actina, participan como carriles para el tráfico vesicular hacia sitios específicos de crecimiento celular (Akhmanova and Hammer III, 2010; Hammer and Sellers, 2012). El transporte de larga distancia de vesículas hacia estos sitios es realizado por motores proteicos

como la cinesina o dineina, las cuales utilizan a los microtúbulos como estructuras (carriles) para llegar a sitios cercanos de fusión vesicular, en donde las vesículas se transfieren a filamentos de actina, para finalmente fusionarse con la membrana plasmática (Heath, 1994; Seiler *et al.*, 1997; Schliwa, 1999). En *S. cerevisiae* los microtúbulos no participan en el transporte vesicular (Jacobs *et al.*, 1988; Huffaker *et al.*, 1988), mientras que la actina posee un rol esencial en la secreción polarizada (Novick and Botstein, 1985). En este organismo se demostró mediante mutantes de tropomiosina termosensibles, que los cables de actina están involucrados en la polarización de vesículas secretoras unidas a Sec4p mediante un motor proteico (Pruyne *et al.*, 1998). Actualmente se sabe que Myo2p (miosina de clase V) es el motor molecular responsable del transporte vesicular hacia sitios de crecimiento a través del citoesqueleto de actina (Johnston *et al.*, 1991). La localización de Myo2p se ha determinado que es dependiente de la integridad de los cables de actina, y que se distribuye junto a vesículas secretoras marcadas con Sec4p, en los mismos sitios de exocitosis y crecimiento polar (Llilie and Brown, 1994; Walch-Solimena *et al.*, 1997; Pruyne *et al.*, 1998). Las miosinas de tipo V poseen un domino carboxilo-terminal (cola) que une la proteína motora a la vesícula, mientras que en el dominio amino terminal se encuentra el dominio motor de unión a actina (Cheney *et al.*, 1993) (Schott *et al.*, 1999; Pruyne *et al.*, 2002). La interacción de Sec4p, Mlc1p y Myo2p fue determinada por co-inmunoprecipitación (Wagner *et al.*, 2002), aunque la Rab GTPasa activa unida a la vesícula no es necesaria como señal para la interacción de la vesícula con Myo2p (Bielli *et al.*, 2006). El análisis de la dinámica vesicular utilizando el marcador vesicular Sec4p fusionado a GFP (Green Fluorescent Protein) permitió determinar en mutantes con defectos en la asociación de vesículas secretoras con Myo2p y en mutantes de tropomiosina que la miosina y los cables de actina son necesarios para el tráfico de vesículas secretoras (Schott *et al.*, 1999; Pruyne *et al.*, 1998). Además la velocidad de las vesículas secretoras a los sitios de exocitosis es de 3 μm/s en la levadura (Schott *et al.*, 2002), lo cual concuerda con la velocidad de otras vesículas o proteínas que se mueven por cables de actina (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Sánchez-León *et al.*, 2011).

El transporte de vesículas a través del citoesqueleto de actina o microtúbulos es asistido por las Rab GTPasas a través de efectores específicos (Weisman, 2006).

Por ejemplo Ypt31/32p reclutan a la miosina de clase V, Myo2p para el transporte de vesículas hacia sitios de secreción, de la misma manera la Rab11 y Rab8 de mamíferos de manera indirecta se asocia al motor molecular miosina-Vb (Lipatova *et al.*, 2008; Hales *et al.*, 2002; Roland *et al.*, 2007; Lapierre *et al.*, 2001). La interacción de Myo2p con Ypt32p se da lugar en la cola con dominio globular (GTD, globular tail domain) localizada en la región carboxi-terminal de Myo2p, interacción probablemente regulado por la proteína Mlc1p (myosin light chain 1) (Casavola *et al.*, 2008). De acuerdo con la idea de que las Rab GTPasas son factores clave en la interacción con motores moleculares para el transporte de vesículas, un estudio reciente confirmó la interacción directa de Sec4p y Ypt32p con Myo2p, la cual es probablemente asistida por la presencia de PI4P en las membranas (Santiago-Tirado *et al.*, 2011). Myo2p se activa cuando se une a la vesícula a través de la Rab GTPasa, mientras que el desprendimiento del motor molecular de la vesícula es coordinado por el Exocisto y la hidrólisis de GTP en Sec4p; Esto sugiere que además de ejecutar funciones de transporte Myo2p participa de manera indirecta en la regulación del anclaje de vesículas (Rossi and Brennwald, 2011; Donovan and Bretscher, 2012).

1.3.8.1 Rab GTPasas en hongos filamentosos

La mayoría de la investigación relacionada a las Rab GTPasas está basada en el hongo levaduriforme *S. cerevisiae* y en mamíferos (Stenmark and Olkkonen, 2001). Aunque los hongos filamentosos y levaduriformes comparten ortólogos pertenecientes al grupo de Rab GTPasas también poseen componentes específicos (Borkovich *et al.*, 2004). En un estudio incluyendo 26 genomas de distintas especies fúngicas (filamentosas y levaduriformes) se identificaron hasta 12 tipos diferentes de Rabs, donde no se encontró relación alguna entre éstas Rabs y la morfología celular o estilo de vida de las especies analizadas (Pereira-Leal, 2008). En el genoma del hongo filamentoso *N. crassa* se identificaron 11 Rabs putativas, tres de ellas ausentes en *S. cerevisiae* (Borkovich *et al.*, 2004). A pesar de la importancia de las Rabs en la regulación del tráfico vesicular y en la secreción de proteínas, poco es lo que se sabe de ellas en hongos filamentosos en comparación con *S. cerevisiae*. Las proteínas homólogas a la Rab1, Ypt1p en *S. cerevisiae*, se han caracterizado en: *N. crassa* (solo a nivel de estructura primaria) (Heintz *et al.*, 1992), *Aspergillus niger*

(SrgB/YPTA) (Punt *et al.*, 2001; Saloheimo *et al.*, 2004), *Trichoderman reesei* (Ypt1) (Saloheimo *et al.*, 2004), *A. nidulans* (RabO) (Pinar *et al.*, 2013a) y *C. albicans* (Ypt1) (Lee *et al.*, 2001). Homólogas a la Rab8, Sec4p en *S. cerevisiae*, se han identificado en: *A. niger* (SrgA) (Punt *et al.*, 2001), *C. albicans* (Sec4) (Jones and Sudbery, 2010), *Colletotrichum lindemuthianum* (CLPT-1) (Dumas *et al.*, 2001); mientras que las Rabs homólogas a la Ypt31/32p en *S. cerevisiae*, Rab11 en mamíferos, se ha caracterizado únicamente en *A. nidulans* $RabE^{ypt31}$ (Abenza *et al.*, 2010). En *A. nidulans* RabC, homóloga a Ypt6p de *S. cerevisiae* posiblemente esté involucrada en la secreción (Pantazopoulou and Peñalva, 2011). Además se han identificado otras Rabs que se encuentran involucradas en la endocitosis como: $RabB^{Rab5}$. En *A. nidulans* (Abenza *et al.*, 2010), Vps21/Ypt52/Ypt53 en *C. albicans* (Johnston *et al.*, 2013; Horazdovsky *et al.*, 1994), Rab5A en *Ustilago maydis* (Fuchs *et al.*, 2006), y YPT-52 *N. crassa* (Seidel *et al.*, 2013).

2 Justificación

Un conocimiento más avanzado del tráfico de vesículas secretoras y de los organelos relacionados, es clave para entender los mecanismos de secreción proteica en hongos filamentosos, y por consecuencia puede contribuir en el desarrollo de la industria biotecnológica, la cual utiliza estos organismos en la producción heteróloga de proteínas y compuestos de interés comercial y médico. Además el conocimiento generado de este trabajo permitió profundizar en el conocimiento de la biogénesis y organización apical de las vesículas secretoras, procesos que ayudarán a entender, en parte, el complejo proceso de crecimiento apical y procesos morfogenéticos en hongos de interés médico.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Generales

- Caracterizar las vesículas secretoras que componen el Spitzenkörper a través del análisis de proteínas que regulan el tráfico vesicular
- Analizar el tráfico intracelular de proteínas secretadas modelos desde los sitios de síntesis hacia las regiones de exocitosis

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar el tráfico intracelular de vesículas, mediante la expresión de Rab GTPasas como YPT-1, YPT-31 y SEC-4, con distintas versiones de proteínas fluorescentes.
- Analizar la distribución y dinámica de YPT-1, YPT-31 y SEC-4, en la región apical de las hifas de *N. crassa* en crecimiento.
- Analizar la distribución intracelular y la secreción proteica de enzimas contenidas en vesículas secretoras como la invertasa (INV-1) y la subunidad del complejo β-1,3-glucano sintasa (FKS-1).
- Identificar las distintas cisternas de Golgi con los marcadores USO-1, VRG-4, SEC-7 y VPS-52.

4 Hipótesis

Las Rab GTPasas YPT-1, YPT-31 y SEC-4 están involucradas en la organización y dinámica de las vesículas secretoras del Spitzenkörper.

5 Metodología

5.1 Condiciones de Cultivo y Cepas

5.1.1 Condiciones de Cultivo

La composición de soluciones y medios de cultivo se especifica en los Anexos. Para el crecimiento de células competentes de *E. coli* DH5α y TOP10 (Invitrogen®) se utilizó el medio de cultivo LB (Bertani, 2004, 1951) añadiendo ampicilina (100 μg/ml) o kanamicina (50 μg/ml), según los requerimientos. Para el crecimiento de *S. cerevisiae* se utilizó el medio completo YPD (A) y el medio de selección SD–URA. Para el crecimiento de las cepas de *N. crassa* se utilizó medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1956) solidificado con agar bacteriológico al 1.5%. Los extractos celulares se obtuvieron de micelio desarrollado en medio completo de Vogel (MCV). Para el mantenimiento de la cepa auxótrofa de *N. crassa* FGSC 9717 se incluyó en el medio de cultivo el aminoácido básico L-histidina a una concentración final de 0.5 mg/ml. Para la conservación y crecimiento de cepas transformantes, resistentes a la higromicina, provenientes de la cepa parental de *N. crassa* FGSC 9718 se añadió al medio higromicina B (InvivoGen®) a una concentración final de 200 μg/ml. Para mantenimiento de cepas a largo plazo, conidios de las cepas en estudio crecidas en tubos de 5 ml, se mezclaron con una solución de 2 ml de leche deshidratada (7%) estéril y se almacenaron en perlas de sílice a 4° C (Wilson, 1986). Para la selección de cepas transformantes, los conidios fueron inoculados en medio MMV-FGS, añadiendo higromicina B (200 μg/ml) según los requerimientos. Para inducir la reproducción sexual conidios del tipo de apareamiento *mat A* se inocularon en Medio Sintético de Cruzas (MSC) (Westergaard and Mitchel, 1947). Los conidios *mat A* se incubaron a temperatura ambiente por 16-24 h en oscuridad, hasta que el micelio hubo cubierto la placa para proceder a inocular los conidios *mat a*. Las ascosporas producto de la cruza se inocularon en MMV y se activaron a 60° C por 1 hora. Todos los medios de cultivos fueron esterilizados a una temperatura de 121° C por 15-20 minutos.

5.1.2 Cepas

Las cepas de *E. coli*, *S. cerevisiae* y de *N. crassa* que se usaron y generaron en este estudio se encuentran listadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en En este estudio

Cepa	Genotipo	Procedencia[b]
E. coli		
DH5α™	F⁻ ϕ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rk⁻, mk⁺) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ⁻	Invitrogen ®
TOP10™	F⁻ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ 80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G λ-	Invitrogen ®
S. cerevisiae		
FY834	*MATα his3* Δ *200 ura3-52 leu2* Δ *1 lys2* Δ *202 trp1* Δ *63*	(Winston *et al.*, 1995)
Neurospora crassa		
N1	*mat a*	FGSC 988
SMRP12	*rid^{RIP1} mat A; his3$^+$*::P*ccg-1::Bml$^+$::sgfp$^+$*	FGSC 9520
SMRP25	*mat a;* Δ *mus-51::bar$^+$*	FGSC 9718
SMRP24	*mat A his-3;* Δ *mus-51::bar$^+$*	FGSC 9717
SMRP55	*mat A;* P*chs-1::chs-1::gfp+::hph$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP76	*mat a;* Δ *ypt-1*::*hph$^+$*	FGSC 11607
SMRP84	*mat A;* P*gs-1::gs-1::gfp+::hph$^+$*	(Verdín *et al.*, 2009)
SMRP277	*mat a;* Δ *sad-2*::*hph$^+$*	FGSC 20680
SMRP278	*mat A;* Δ *sad-2^{RIP}*	(Shiu *et al.*, 2006)
SMRP279	*mat a;* P*uso-1::uso-1::gfp$^+$::hph$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP300	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::sgfp$^+$::8xGly::ypt-1$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP301[a]	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::sgfp$^+$::8xGly::ypt-1$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP302	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::mchfp$^+$::ypt-1$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP303[a]	*his-3$^+$*::P*ccg-1::mchfp$^+$::ypt-1$^+$; uso-1$^+$::sgfp$^+$::hph$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP304	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::mchfp$^+$::sec-4$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP305	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::sgfp$^+$::8xGly::sec-4$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP306	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::tdimer2(12)$^+$::ypt-3$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP307	*mat a; hph::* P*ccg-1::sgfp$^+$::8xGly::ypt-1$^+$; Δmus-51::bar$^+$*	En este estudio
SMRP308	*mat a;* P*myo-5::myo-5::Gly10x::gfp$^+$::hph$^+$;* Δ*mus-51::bar+*	En este estudio
SMRP309[a]	*mat a;* P*myo-5::myo-5::Gly10x::gfp$^+$::hph$^+$;* Δ*mus-51::bar+*	En este estudio
SMRP310	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::inv-1*::*SFgfp$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	En este estudio
SMRP311[a]	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::inv-1*::*SFgfp$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	En este estudio
SMRP320	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1::sgfp$^+$::8xGly::ypt-52$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	(Seidel *et al.*, 2013)
SMRP328	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1:: vps-52$^+$::sgfp$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	(Bowman *et al.*, 2012)
SMRP329	*mat A his-3$^+$*::P*ccg-1:: vrg-4$^+$::sgfp$^+$;* Δ *mus51::bar$^+$*	(Bowman *et al.*, 2012)

SMRP330	*mat A his-3*$^{+}$*::* P*ccg-1:: tdimer2*$^{+}$*:: vps-52*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Bowman *et al.*, 2009)
SMRP348	*mat A his-3* $^{+}$ ::P*cgg-1::sgfp*$^{+}$*::8xGly::syn-1*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP349	*mat A his-3* $^{+}$ ::P*ypt-1::sgfp*$^{+}$*::8xGly::ypt-1*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP350	*mat A his-3* $^{+}$ ::P*sec-4::sgfp*$^{+}$*::8xGly::sec-4*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP351	*mat a;* P*sec-7::sec-7::10xGly::gfp*$^{+}$*::hph*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SMRP352	*mat A; his-3;* P*sec-7::sec-7::10xGly::gfp*$^{+}$*::hph*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
NMF565	*mat A; his-3;* P*exo-70::exo-70::sgfp*$^{+}$*::hph*$^{+}$*;* Δ *mus51::bar*$^{+}$	(Riquelme *et al.*, 2014)

[a] homocariontes; [b] FGSC: Fungal Genetics Stock Center

5.2 Etiquetamiento con Proteínas Fluorescentes: Técnicas de Recombinación de ADN y Construcción de Plásmidos

5.2.1 Vectores

Los vectores que se usaron y generaron en este estudio se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Vectores Recombinantes.

Vector	Genotipo	Procedencia
pCCG::N-GFP	P*ccg1*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*	(Honda and Selker, 2009)
pJV18-N	P*ccg1*:: *mchfp* $^{+}$*::gs-1; 5' Δ-his-3*	Riquelme Lab.
pMF334	P*ccg1*::*tdimer2(12)*$^{+}$	(Freitag and Selker, 2005)
pST-14	P*ccg1*::*SFgfp*$^{+}$::*8xGly*	Donado por Trevor Star
pTH1117-12	*hph*; P*ccg1*::*sgfp*$^{+}$::*4x(GA)*	(Hammond *et al.*, 2011)
pCSN44	T*rpC::hph:*P*trpC*	(Staben *et al.*, 1989)
pRS426	2μ *ori*:: *URA3*	(Christianson *et al.*, 1992)
pGFP*::hph::loxP*	10*xGly::gfp::hph::loxP*	(Honda and Selker, 2009)
pCoS204	P*ccg-1::c-Gly::gfp::ypt-52, 5' Δhis-3* flank, Amp^{r}	(Seidel *et al.*, 2013)
pESL05b-2	P*ccg1*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*sec-4*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pESL06	P*ccg1*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*sec-2*	En este estudio
pESL07b-2	P*ccg1*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*ypt-1*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pESL08-15	P*ccg1*:: *mchfp*$^{+}$::*sec-4*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pESL09-5	P*ccg1*:: *mchfp*$^{+}$::*sec-2*	En este estudio
pESL10-25	P*ccg1*:: *mchfp*$^{+}$::*ypt-1*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pESL11-5	P*ccg1*::*inv-1*::*8xGly::SFgfp*$^{+}$	En este estudio
pESL12-5	P*ccg1*:: *gh3-4*::*8xGly::SFgfp*$^{+}$	En este estudio
pCoS225	P*ypt-1*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*ypt-1*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)

pCoS226	P*ypt-3*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*ypt-3*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pCoS227	P*sec-4*::*sgfp*$^{+}$::*8xGly*::*sec-4*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
pESL13	2μ *ori*:: *URA3::5fr-fks-1::hph::3fr-fks-1*	En este estudio
ptdimer2(12)-YPT-3	P*ccg1*::*tdimer2(12)*$^{+}$*::ypt-3*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
VMRP-74	*Pccg-1::sgfp*$^{+}$*::8xGly::syn-1*	(Sánchez-León *et al.*, 2014)

5.2.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se diseñaron y usaron en este estudio se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Oliglonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia[a]	Referencia
AscI-Sec4-F-01b	5´-CTTA**GGCGCGCC**CATGTCGAGTAACAGGAA-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
Sec4-Xba1-R	5' -**TCTAGA**TTAACAGCACTTGCCGC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-Sec2-F-01	5´-CGCA**TTAATTAA**CATGAGCCCCGCAAGCGGA-3´	En este estudio
XbaI-Sec2-R-01	5´-CGAT**TCTAGA**TCAAGCTGGGAAAGCCCCG -3´	En este estudio
AscI-YPT1-F-01b	5´- CTAA**GGCGCGCC**CATGAACCCTGAGTAGTAGGT-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
XbaI-YPT1-R-01	5´-CTAGG**TCTAGA**TTAGCAGCAGCCGCCGGAAGAG-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-Sec4-F-01b	5´-CGCG**TTAATTAA**CATGTCGAGTAACAGGAATTACG-3´-	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
EcoRI-Sec4-R-01	5´-CATC**GAATTC**TTAACAGCACTTGCCGCCGGATC-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-Sec2-F-01b	5´-CAGA**TTAATTAA**CATGAGCCCCGCAAGCGGAGT-3´	En este estudio
EcoRI-Sec2-R-01	5´-CTAC**GAATTC**TCAAGCTGGGAAAGCCCCGGAT-3´	En este estudio
PacI-Ypt1-F-01b	5´-CGCG**TTAATTAA**CATGAACCCTGAGTAGTAGGTTTA-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
EcoRI-YPT1-R-01	5´-CAGA**GAATTC**TTAGCAGCAGCCGCCGGAAGAG-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-YPT1-F-02	5´- CTAA**TTAATTAA**CATGAACCCTGAGTAGTAGGT -3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
XbaI-YPT1-R-01	5´- CTAGG**TCTAGA**TTAGCAGCAGCCGCCGGAAGAG -3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-SEC4-F-02	5'CTAA**TTAATTAA**CATGTCGAGTAACAGGAA-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
XbaI-SEC4-R-02	5´-CTAGG**TCTAGA**TTAACAGCACTTGCCGCCGG-3	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-YPT31-F-01	5'CTAA**TTAATTAA**CATGTCTTCGTCTTCAAAAGACTCGC-3'	Sánchez-León et al., 2014

XbaI-YPT31-R-01	5´-CTAGG**TCTAGA**CTAGGAAGAGACCATTTCGAC-3	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
EcoRI-Pypt1-F	5´- GGCA**GAATTC**GCAGCTATTCGTATCCTCG -3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
BamHI-Pypt1-R	5´- CTTA**GGATCC**GATGGGCAACGAGGG-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
EcoRI-Psec4-F	5´- GGCA**GAATTC**GTGCGTATAGACTGTTCACC-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
BamHI-Psec4-R	5´- CTTA**GGATCC**GATGAACTGGTGTGGGGGTTAAC-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
EcoRI-Pypt3-F	5´- GGCA**GAATTC**CTCAACCATCATATGACAAGGC-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
BamHI-Pypt31-R	5´- CTTA**GGATCC**GATGAGAACTGGCAAGATCTAAAGG-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
PacI-YPT3-F1-01	5'CTAA**TTAATTAA**CATGTCTTCGTCTTCAAAAGACTCGC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
XbaI-YPT31-R-01	5´-CTAGG**TCTAGA**CTAGGAAGAGACCATTTCGAC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
MluI-Pypt3-F	5´- CCTT**ACGCGT**ATGGCCAACGA-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
BglII-Pypt3-R	5´- CAAA**AGATCT**CTAACAGCAGC-3´	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
USO-1-F	5'- TCCGGAGAGAGCAAGCCACCCAGC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
USO-1-R-GLY	5'-CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCATCTTCATCTTCAGCACCATCCTC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
USO-1-UTR-F-lox	5'-TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGAGATGGTGAGGGGGTTAATGAATA-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
USO-1-UTR-R	5'- GTTCCCCTCGCAACTACCGCCTCG-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SEC-7-F-01	5'-CTCCCATTCCTCAGTTCACAACCGT-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SEC-7-10xGLY-R	5'-CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCCCTCGCCATATCCTCCCCTTCTCCCTCCCC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
LOX-3UTR-SEC-7-F	5'-TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGAGGAAGGAAGATGACGGAAGAAGAAG-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
3UTR-SEC-7-R	5'-CGTCAAGGAGATTGTGAGAGAGGC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SYN N term PacI F	5'-GCGTTAATTAAAATGTCCGACGCTCCG-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
SYN N term XbaI R	5'-CTAGTCTAGACTTAGCGCGTAGCAACGAC-3'	(Sánchez-León *et al.*, 2014)
INV-1-XbaI-F	5´-CGGA**TCTAGA**ATGACAAAAACAACGCCATAC-3´	En este estudio
INV-1-PacI-R	5´-GCGC**TTAATTAA**TTCCCAAGCAGACCCC-3´	En este estudio
GH61-1-XbaI-F	5´-GTTC**TCTAGA**ATGAAGGTCCTCTCCCTC-3´	En este estudio
GH61-1-PacI-R	5´-GGCC**TTAATTAA**CGAGCACTGCGAATAATAATC-3´	En este estudio
GH3-4-XbaI-F	5´-GGCC**TCTAGA**ATGCACCTTCGAATATTTGC-3´	En este estudio
GH3-4-PacI-R	5´-CGGGG**TTAATTAA**ATAAACATCAAACTTCCC-3	En este estudio
5f-fks-1	5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGccatgttccagcgcagtccagt-3'	En este estudio
5r-fks-1	5'-ACCGGGATCCACTTAACGTTACTGAAATCcgggacaggtcagcggagtg-3'	En este estudio
3f-fks-1	5'-GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCcatagcggatcaggactgcgg- 3'	En este estudio

3r-fks-1	5'-AAATGCTCCTTCAATATCATCTTCTGTCGgcgaagaaacggggattgg-3'	En este estudio
hph-R	5'- TCGACAGAAGATGATATTGAAGG -3'	Check origin/Seiler
hph-F	5'- GGAGCTGACATCGACACCAACG -3'	Check origin/Seiler
10xGlyF	5'-GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG-3'	(Riquelme *et al.*, 2014)
loxP-R	5'-CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA -3'	(Riquelme *et al.*, 2014)
MYO-2-F-01	5´- CATCAACCCCGGTGCCTTCTGG -3´	En este estudio
MYO-2-10xGLY-R	5´-cctccgcctccgcctccgccgcctccgccGGCACTCGCTTCCACAATCTCTTGCCC-3´	En este estudio
LOX-3UTR-MYO-2-F	5´-tgctatacgaagttatggatccgagctcgGTTGCACCCCCGCAACCATCATCACC-3´	En este estudio
3UTR- MYO-2-R	5´- CGTCTCAACCATGTGCGAATTAACAT -3´	En este estudio
HPH-SM-R	5'-TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC-3'	(Riquelme *et al.*, 2014)
HPH-SM-F	5'-AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG-3'	(Riquelme *et al.*, 2014)
INV-1-F-01	5´-CTTCTGGGACCCCACCGCCAACAAC-3´	En este estudio
INV-1-10xGLY-R	5´-gcctccgcctccgcctccgccgcctccgccTTCCCAAGCAGACCCCATGGGCGTCAGAAC-3´	En este estudio
GH61-1-F-01	5´-CAATATCTGCGAGTCTGTAGGCCCCTTCA-3´	En este estudio
GH61-1-10xGLY-R	5´-cctccgcctccgcctccgccgcctccgccCGAGCACTGCGAATAATAATCATTCATCTTCTTG-3´	En este estudio
GH3-4-F-01	5´-CATCGTCCGTTGTCAACCCTGCGGG-3´	En este estudio
GH3-4-10xGLY-R	5´-cctccgcctccgcctccgccgcctccgccTCAATAAACATCAAACTTCCCATTCAACCTC-3´	En este estudio
CAT-3-F-01	5´- CGCCGACTTCCACCGTCAGGATC -3´	En este estudio
CAT-3-10xGLY-R	5´-cctccgcctccgcctccgccgcctccgccCTCCTCATCATCGCCATCAACGGCG-3´	En este estudio
LOX-3UTR-INV-1-F	5´-tgctatacgaagttatggatccgagctcgCTAAAAAGTTAGAAAGAAAACGTACA-3´	En este estudio
3UTR-INV-1-R	5´- CTCTCCGCAAAATCGAGGGCTCACAC-3´	En este estudio
LOX-3UTR-GH61-1-F	5´-tgctatacgaagttatggatccgagctcgGGAAGAAATCTTGGGCACGACGATGG-3´	En este estudio
3UTR-GH61-1-R	5´-CAAAGAGGAAGAAAGAGAGGCGACC-3´	En este estudio
LOX-3UTR-GH3-4-F	5´-tgctatacgaagttatggatccgagctcgGTCAGCTGTAGGGAGTAAGGGCTGTTAG-3´	En este estudio
3UTR-GH3-4-R	5´-CGTCACGCCCTGTCGCCCTGAACTC-3´	En este estudio
LOX-3UTR-CAT-3-F	5´-tgctatacgaagttatggatccgagctcgGTAGATTTGATAACAATGGGATGACC-3´	En este estudio
3UTR-CAT-3-R	5´- GATGTCTGGAATCTCCGCTGGAACT-3´	En este estudio
Pfks1-F	ctttacactcgctcaccggcaactttc	En este estudio
Hph-Pfks1-R	CAGACGTCGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTCATattgggcaattaaagctgggcgggacaggtc	En este estudio

HPH-1-F	atgaaaaagcctgaactcaccgc	En este estudio
Ufks1-Pccg1-R	ccgccgccttgctgaggatatcccgacatTTTGGTTGATGTGAGGGGTTG TGAACGTGG	En este estudio
Ufks1-F	ATGTCGGGATATCCTCAGCAAGGC	En este estudio
Ufks1-gfp-R	CGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATcttttttcttggtgcgctt caggttgcccttc	En este estudio
Fwverde (336)	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	Riquelme Lab.
Dfks1-GFP-R	CTCGGCTTCGTTTTGGGGCTCGTCACCCTTGGCcttgtacagctcg tccatgccgtgagtgat	En este estudio
Dfks1-F	GCCAAGGGTGACGAGCCCCAAAA	En este estudio
Dfks1-R	CGACGTACTTGCGTGAGTTCTTG	En este estudio

[a] En negritas las secuencia de los sitios de restricción

5.2.3 Construcción de Vectores Recombinantes

5.2.3.1 Vectores para Etiquetamiento GFP Amino Terminal

Para el etiquetamiento con GFP en el extremo amino terminal de YPT-1, SEC-4 y SEC-2 se fusionó el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) en el extremo 5' de los genes *ypt-1* (NCU08477.7)*, sec-4* (NCU06404.7) y *sec-2* (NCU01911.7), respectivamente. Para ello se amplificaron por PCR los genes *ypt-1, sec-4* y *sec-2* utilizando los oligonucleótidos AscI-YPT1-F-01b / XbaI-YPT1-R-01, AscI-Sec4-F-01b / Sec4-Xba1-R, PacI-SEC2-F-01 / XbaI-SEC2-R-01, respectivamente. Las condiciones de temperatura utilizadas en las reacciones de PCR fueron de: un ciclo de 94ºC por 2 minutos para la desnaturalización; 30 ciclos para la amplificación, correspondiente a 94ºC por 30 segundos para la desnaturalización, 55° C por 30 segundos para el alineamiento, y 72ºC por 2.5 a 3 minutos para la extensión; para la extensión final se usó un ciclo de 72ºC de 10 minutos. Los reactivos contenidos en la reacción de PCR se especifican en los Anexos. Para confirmar el tamaño esperado de los amplicones, los productos de la reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las bandas en el gel correspondientes al ADN de los genes de interés se purificaron con kits comerciales de extracción de ADN (QIAquick Gel Extraction, QIAGEN; GeneJET Gel Extraction Kit, Thermoscientific) o bien se purificaron directamente de la suspensión de la reacción de PCR con el kit de purificación GeneJET PCR Purification Kit (Thermoscientific).

Para la fusión con *gfp* de *ypt-1*, *sec-4* y *sec-2* se realizó la digestión enzimática con *Asc*I ó *Pac*I y *Xba*I de los amplicones y el vector recombinante pCCG::N-GFP. Los productos digeridos de los amplicones y el vector fueron purificados y posteriormente ligados. Para la amplificación y selección de los nuevos vectores recombinantes se transformaron por choque térmico células competentes de *E. coli* DH5α® o TOP10®. Para seleccionar colonias positivas se llevó a cabo PCR de colonia, se hicieron minipreps de las colonias positivas y posteriormente se realizó el análisis de los vectores por restricción enzimática. Los vectores resultantes fueron secuenciados para confirmar la integridad de la secuencia y determinar que la fusión hubiera ocurrido respetando el marco de lectura abierta. Las condiciones de las reacciones de: digestión enzimática, ligación, transformación de *E. coli*, PCR de colonia y análisis de restricción se encuentran especificadas en el Anexo.

5.2.3.2 Vectores para expresión de GFP Amino Terminal con Promotor Endógeno

Para expresar las proteínas de fusión GFP-YPT-1, GFP-SEC-4 y GFP-YPT-31 bajo el control de los promotores de *ypt*-1, *sec-4* y *ypt-3,* respectivamente*,* se generaron tres vectores recombinantes con las secuencias promotoras putativas de cada uno de los genes. Para seleccionar las regiones promotoras de cada uno de los genes se consideraron resultados de secuenciación de ARN, permitiendo la identificación de fragmentos (~1 kb) 5’ no codificantes (UTR, Un-Translated Region) del codón de inicio de (M. Freitag, comms. pers.). Para amplificar por PCR los genes *ypt-1*, *sec-4* y *ypt-3* se utilizaron los oligonucleótidos: PacI-YPT1-F-02 / XbaI-YPT1-R-01, PacI-SEC4-F-02 / XbaI-SEC4-R-02, PacI-YPT3-F-01 / XbaI-YPT3-R-01, respectivamente, mientras que para amplificar los promotores se utilizaron los siguientes cebadores: EcoRI-Pypt1-F / BamHI-Pypt1-R, EcoRI-Psec4-F / BamHI-Psec4-R, EcoRI-Pypt3-F / BamHI-Pypt3-R, respectivamente. Para generar vectores con la fusión de *ypt-1*, *sec-4* y *ypt-3* con *gfp* se realizó la digestión enzimática con *Pac*I y *Xba*I y subsecuentemente la ligación de los genes amplificados y el vector recombinante pCOS204 (Seidel *et al.*, 2013). Para generar vectores con los promotores de *ypt-1*, *sec-4* y *ypt-3* se realizó la digestión enzimática con *Eco*RI y *Bam*HI y subsecuentemente la ligación del vector pCOS204 con las secuencias promotoras

P*ypt-1*, P*sec-4* y P*ypt-3* amplificadas; De estos vectores se subclonaron las secuencias de P*ypt-1*, P*sec-4* y P*ypt-3* y se reemplazaron por el promotor P*ccg-1* de los vectores con la fusión *gfp::ypt-1*, *gfp::sec-4*, *gfp::ypt-3*. Las condiciones de las reacciones de: digestión enzimática, ligación, transformación de *E. coli*, PCR de colonia y análisis de restricción se encuentran especificadas en el Anexo.

5.2.3.3 Vectores para Etiquetamiento con mChFP Amino Terminal

Para el etiquetamiento con mChFP en el extremo amino terminal de YPT-1 y SEC-4 se fusionó el gen de la proteína Cherry fluorescente (*mchfp*) en el extremo 5' de los genes *ypt-1* (NCU08477.7), *sec-4* (NCU06404.7) y *sec-2* (NCU01911.7), respectivamente. Para ello se amplificó por PCR los genes *ypt-1, sec-4* y *sec-2* utilizando los oligonucleótidos PacI-YPT1-F-01b / EcoRI-YPT1-R-01, PacI-SEC4-F-01b / EcoRI-SEC4-R-01 y PacI-SEC2-F-01b / EcoRI-SEC2-R-01, respectivamente. Las condiciones de las reacciones de PCR, la confirmación del tamaño de amplicones y su purificación, se realizaron de manera similar a lo descrito previamente. Para la fusión con *mchfp* de *ypt-1*, *sec-4* y *sec-2* se realizó la digestión enzimática con *Pac*I y *Eco*RI de los genes amplificados y el vector recombinante pJV18-N. Los procedimientos de: construcción de los nuevos vectores, clonación, y confirmación de integración de secuencias se realizó de manera similar a lo mencionado previamente.

5.2.3.4 Vectores con Etiquetas SGFP Carboxilo Terminal

Para el etiquetamiento con la proteína Superfolder GFP (SGFP), en el extremo carboxilo terminal de las proteínas de secreción Invertasa-1 (INV-1), Glicosil Hidrolasa 61-1 (GH61-1), Glicosil hidrolasa 3-4 (GH3-4), se fusionó el gen variante de la proteína verde fluorescente *sgfp* en el extremo 3' de los genes *inv-1* (NCU04265.7), *gh61-1* (NCU02240.7) y *gh3-4* (NCU04952.7). Para ello el genes se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos INV-1-XbaI-F / INV-1-PacI-R, GH61-1-XbaI-F / GH61-1-PacI-R, GH3-4-XbaI-F / GH3-4-PacI-R. Las condiciones de: reacciones de PCR, confirmación del tamaño de amplicones, y purificación, se realizaron de manera similar a lo mencionado previamente. Para la fusión con *sgfp*

de *inv-1*, *gh61-1* y *gh3-4* se realizó la digestión enzimática con *Xba*I y *Pac*I de los amplicones obtenidos y el vector recombinante pST14. Los procedimientos de: construcción del vector, clonación, y confirmación de integración de la secuencias se realizó de manera similar a lo mencionado previamente.

5.2.3.5 Vector para eliminación del gen *fks-1*

Para generar el vector recombinante para la eliminación del gen *fks-1* (NCU06871.7) en *N. crassa* se utilizó el protocolo de recombinación en levadura (Colot *et al.*, 2006). La estrategia de eliminación se basa en el reemplazamiento del gen por el gen de resistencia a la higromicina, utilizando los fragmentos flanqueantes localizados río arriba y río abajo de los extremos 5' y 3' del codón de inicio y de paro del gen, respectivamente. Para generar los 2 fragmentos flanqueantes de *fks-1* se diseñaron los oligonucleótidos 5f-fks-1 / 5r-fks-1 y 3f-fks-1 / 3r-fks-1 utilizados para amplificar por PCR regiones (~ 1 kb) río arriba del codón de inicio y río abajo del codón de paro, respectivamente. Para obtener el marcador de selección se amplificó por PCR el gen *hph* del vector pCSN44 (Staben *et al.*, 1989) utilizando los oligonucleótidos hph-R y hph-F. Los amplicones se fusionaron en el vector pRS426 previamente digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I en la cepa de levadura FY834. El casete 5fr-*fks-1::hph::*3fr-*fks-1* en el vector pRS426 se confirmó por PCR utilizando los oligonucleótidos 5f-fks-1 y 3r-fks-1. Las condiciones de amplificación por PCR del vector de deleción con el casete 5fr-*fks-1::hph::*3fr-*fks-1* se describe en los Anexos

5.2.4 Construcción de Fragmentos Recombinantes

5.2.4.1 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Endógeno de MYO-5

Para el etiquetamiento endógeno de la miosina de clase V, MYO-5, con GFP en el extremo carboxilo terminal se utilizó la técnica de marcaje por división por reemplazamiento de genes (Split Marker Gene Replacement) (Smith *et al.*, 2011). Para ello se utilizaron 6 oligonucleótidos necesarios para la generación del fragmento

común GFP-HPH y los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho. Para la amplificación del fragmento GFP-HPH por PCR se utilizaron los oligonucleótidos 10xGly-F y loxP-R, usando como molde el vector pGFP*::hph::loxP*; el amplicón correspondiente se purificó directamente de la solución de reacción previo a su utilización en las siguientes etapas de fusión por PCR. Para la generación parcial del fragmento izquierdo se amplificó por PCR ~1200 pb del extremo 3' del marco abierto de lectura de *myo-5* (NCU01440.7), a partir de ADN genómico de *N. crassa* N1. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos MYO-2-F-01 y MYO-2-10xGLY-R que excluían el codón de paro. De la misma manera para la generación parcial del fragmento derecho se amplificó por PCR ~1150 pb de la región río abajo del marco abierto de lectura del gen *myo-5*, utilizando los oligonucleótidos LOX-3UTR-MYO-2-F y 3UTR-MYO-2-R. El tamaño de las secuencias de ADN de ambos amplicones se determinó por electroforesis en gel de agarosa, para luego purificarlas con kits comerciales de extracción de ADN. Para completar los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho se fusionó cada fragmento parcial con el casete GFP-HPH; Para ello se realizó otra ronda de PCR utilizando los oligonucleótidos MYO-2-F-01 / HPH-SM-R y HPH-SM-F / 3UTR- MYO-2-R, respectivamente. La determinación del tamaño de los fragmentos de recombinación y su purificación se realizaron de manera similar a lo mencionado anteriormente. Las condiciones de las reacciones de PCR para la generación de fragmentos recombinantes se mencionan en los Anexos.

5.2.4.2 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Endógeno de INV-1, GH61-1, GH3-4, CAT-3

Para el marcaje endógeno de proteínas que se secretan se siguió la misma estrategia de etiquetamiento de la proteína MYO-2, descrito anteriormente. Para la amplificación por PCR del fragmento parcial izquierdo de *inv-1* (NCU04265.7), *gh61-1* (NCU02240.7), *gh3-4* (NCU04952.7), y *cat-3* (NCU00355.7) utilizaron los siguientes oligonucleótidos: INV-1-F-01 / INV-1-10xGLY-R, GH61-1-F-01 / GH61-1-10xGLY-R, GH3-4-F-01 / GH3-4-10xGLY-R, CAT-3-F-01 / CAT-3-10xGLY-R, respectivamente. Para la generación del fragmento parcial derecho de las mismas proteínas se utilizaron los siguiente cebadores: LOX-3UTR-INV-1-F / 3UTR-INV-1-

R, LOX-3UTR-GH61-1-F / 3UTR-GH61-1-R, LOX-3UTR-GH3-4-F / 3UTR-GH3-4-R, LOX-3UTR-CAT-3-F / 3UTR-CAT-3-R, respectivamente. Para generar los fragmentos recombinantes completos todos los fragmentos parciales se fusionaron con el casete GFP-HPH. La determinación del tamaño de los fragmentos de recombinación y su purificación se realizaron de manera similar a lo mencionado anteriormente. Las condiciones de las reacciones de PCR para la generación de fragmentos recombinantes se mencionan en los Anexos.

5.2.4.3 Fragmentos Recombinantes para Etiquetamiento Interno de FKS-1

Para el etiquetamiento de la putativa subunidad catalítica del complejo 1,3 β-Glucano Sintetasa, FKS-1, se insertó el gen *gfp* dentro del marco de lectura abierto del gen *fks-1* (NCU06871.7). Para la selección del sitio de inserción de *gfp* se desarrolló una estrategia de etiquetamiento similar a la desarrollada con Bgs4p, proteína correspondiente a la subunidad catalítica del complejo 1,3 β-Glucano Sintetasa de *Schizosaccharomyces pombe*. El sitio de inserción de *gfp* en *S. pombe* se realizó en un fragmento hidrofílico de la región amino terminal de Bgs4p 196 residuos río arriba del primer dominio transmembranal (Cortés *et al.*, 2005). Para identificar la región homóloga en FKS-1 respecto al sitio donde se realizó el etiquetamiento funcional de Bgs4p, se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica de FKS-1 (XP_957980.1) con Bgs4p (NP_588501.1). De esta manera la inserción de *gfp* en FKS-1 se realizó en el marco de lectura abierta de la base nucleotídica 984 de *fks-1* que corresponde al aminoácido 303, aproximadamente 195 residuos río arriba del primer dominio transmembranal. Para el etiquetamiento interno de FKS-1 con GFP se utilizó una variación a la estrategia de marcaje por división por reemplazamiento de genes (Figura 11). Para ello se utilizaron 6 pares de oligonucleótidos para generar los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho. El fragmento izquierdo se generó amplificando y fusionando secuencialmente por PCR los siguientes fragmentos de ADN: la región río arriba del codón de inicio (P*fks-1*, 704 pb), el gen de resistencia a la higromicina y el promotor *ccg-1* (*hph::*P*ccg-1*, 1949 pb), el extremo 5' del gen *fks-1* (U*fks-1*, 954 pb). Para generar los fragmentos P*fks-1*, *hph::*P*ccg*-1, y U*fks-1* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: Pfks1-F / Hph-Pfks1-R, HPH-1-F / Ufks1-Pccg1-R, Ufks1-F / Ufks1-gfp-R, respectivamente**.** Mientras que el fragmento

derecho se generó igualmente por amplificación y fusión por PCR quedando constituido de los siguientes fragmentos: el extremo 5' del gen *fks-1* (U*fks-1*, 954 pb), el gen de la GFP (*gfp,* 717 pb), fragmento 3' de U*fks-1* (D*fks-1*, 1042 pb). Para generar los fragmentos U*fks-1*, *gfp*, y D*fks-1* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: Ufks1-F / Ufks1-gfp-R, fwverde (336) / Dfks1-GFP-R, Dfks1-F / Dfks1-R, respectivamente**.** Todos los fragmentos se amplificaron por PCR usando ADN genómico de *N. crassa* N1 excepto los fragmentos *hph::*P*ccg-1* y *gfp*, para los cuales se utilizaron los vectores recombinantes pTH1117.12 y pCCG::N-GFP, respectivamente. La determinación del tamaño de los fragmentos de recombinación y su purificación se realizaron de manera similar a lo mencionado anteriormente. Las condiciones de las reacciones de PCR para la generación de fragmentos recombinantes se mencionan en los Anexos.

5.3 Análisis Bioinformático de Proteínas en Estudio

5.3.1 Análisis Bioinformático de SEC-4 y YPT-3

Para la identificación de ortólogos putativos en otras especies de las proteínas de *N. crassa* YPT-31 (NCU01523.7) y SEC-4 (NCU06404.7) se utilizaron los códigos de acceso del GeneBank XP_962242.1 y XP_956972.2, respectivamente. La herramienta de búsqueda y alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1990) se utilizó a través del sitio NCBI Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Los análisis comparativos de identidad y similitud se realizaron con las secuencias de aminoácidos resultantes de las especies fúngicas: *Magnaporthe oryzae* (taxid: 318829), *Aspergillus nidulans* (taxid: 162425), *Schizosaccharomyces pombe* (taxid: 4896), *Candida albicans* (taxid: 5476), *Saccharomyces cerevisiae* (taxid: 4932), y el humano: *Homo sapiens* (taxid: 9606). Para el alineamiento e identificación de dominios de las proteínas de estudio en relación a las proteínas identificadas (con alta identidad en la búsqueda BLAST) se utilizó el programa Geneious Basic (versión 4.8.5) con la configuración predeterminada de alineamiento.

5.3.2 Análisis Bioinformático de FKS-1

Para la identificación de homólogos putativos de la proteína FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa*, se utilizó el código de acceso del GeneBank XP_957980.1 en la herramienta de búsqueda y alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1990). La búsqueda se realizó utilizando datos de secuencias de los genomas de las especies fúngicas: *Magnaporthe oryzae* (taxid: 318829), *Aspergillus nidulans* (taxid: 162425), *A. niger* (taxid: 5061), *A. fumigatus* (taxid: 746128), *Schizosaccharomyces pombe* (taxid: 4896), *Saccharomyces cerevisiae* (taxid: 559292), *Coccidioides posadasii* (taxid: 199306), *C. immitis* (taxid: 5501). Para identificar posibles homólogos (parálogos) de FKS-1 en el genoma de *N. crassa* se utilizó la herramienta BLAST Similarity Search (Altschul *et al.*, 1997) del sitio http://www.broadinstitute.org/, utilizando la secuencia aminoacídica NCU06871.7 obtenida de la misma base de datos. Para el alineamiento e identifiación de los sitios de inserción de GFP en las secuencias de FKS-1 en *N. crassa* y Bgs4 en *S. pombe* se utilizaron los códigos de acceso del GeneBank XP_957980.1 y NP_588501.1, respectivamente. El alineamiento se realizó utilizando el programa Geneious Basic (versión 4.8.5) con la configuración predeterminada. La predicción de dominios transmembranales se determinó con el programa TMHMM Server v. 2.0 (http:// www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

5.4 Generación y Selección de Transformantes

5.4.1 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli*

Las transformaciones de células competentes de *E. coli* DH5α® o TOP10® (Invitrogen) se realizaron por choque térmico. Las células (50-100 µl) conservadas a -80ºC se descongelaron en hielo y se mezclaron con el mismo volumen de la solución fría (4° C) de KCM mezclada con: 1-2 µl de vector purificado de una miniprep ó 2-15 µl del vector (producto de una ligación) en un tubo estéril de 1.5ml. La solución se mezcló suavemente sin pipetear y se mantuvo en hielo por 30 minutos. Luego se produjo el choque térmico por 2 minutos a una temperatura de 42ºC. Se introdujo el tubo nuevamente en hielo por 2 minutos y se añadió 300-500 µl de medio LB

precalentado a 37ºC y se incubó por 1 hora a la misma temperatura a 225 rpm. El cultivo fue sembrado en una placa con LB sólido con ampicilina o kanamicina de 10 a 16 horas a 37ºC. Las colonias transformantes que crecieron en el medio selectivo se analizaron por PCR de colonia y las positivas se sembraron en medio de selección líquido para la extracción posterior del ADN plasmídico. Los vectores recombinantes se analizaron por restricción enzimática y secuenciación.

5.4.2 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli*

Para generar transformantes de *N. crassa* se utilizaron conidios de la cepa de *N. crassa* FGSC 9717 y *N. crassa* FGSC 9718, las cuales son deficientes en la integración no homóloga de ADN exógeno (Ninomiya *et al.*, 2004). Las transformaciones se realizaron por electroporación utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad®) usando el siguiente protocolo: 600 Ohms, 25 µFD y 1.5 kV, para obtener un tiempo constante entre 12 y 14 milisegundos. Las transformaciones con vectores recombinantes linearizados (~ 1 μg) se realizaron en conidios (2.5 x 10^9 cel/ml) de la cepa de *N. crassa* FGSC 9717, mientras que las transformaciones con los fragmentos recombinantes generados por PCR (0.5 μg cada uno) se realizaron en conidios (2.5 x 10^9 cel/ml) de la cepa de *N. crassa* FGSC 9718. Inmediatamente después de la electroporación los conidios se incubaron por 2 a 3 horas con 1 mL de MMV a 30° C con agitación lenta. Los conidios se precipitaron por centrifugación a una velocidad de 2500 rpm por 2 min y se sembraron en medio FGS (Fructosa-Glucosa-Sorbosa), aproximadamente ~ 100 µl de la solución con conidios por placa. Entre 20 y 30 colonias protótrofas para la histidina o resistentes a higromicina fueron transferidas a tubos de borosilicato con 1.5ml de MMV ó MMV más higromicina B (200 µg/ml). Para la selección de transformantes de *N. crassa*, las hifas en crecimiento fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Para la obtención de cepas transformantes homocariontes conidios con el tipo de apareamiento *mat a* se sembraron sobre micelio *mat A* crecido en MSC.

5.4.3 Generación y Selección de Transformantes de *E. coli*

Las transformaciones de la cepa de *S. cerevisiae* FY834 auxótrofa para el uracilo, histidina leucina, lisina y triptófano se realizaron por choque térmico (Colot *et al.*, 2006). Para la obtención de células competentes de levadura se preparó un pre-cultivo de la cepa FY834 inoculando una colonia de FY834 en 50 ml de YPD (A) at 30° C a 110 rpm por 12-16 horas, hasta alcanzar una OD_{600} (densidad óptica a 600 nm) de 0.125-0.2. Se inoculó 3 ml del pre-cultivo en 200 ml de YPD (A) utilizando las mismas condiciones utilizadas anteriormente por 3-4 horas hasta alcanzar una OD_{600} de 0.4-0.6. Inmediatamente después todo el cultivo se centrifugó en tubos de 50 ml a 2500 rpm por 5 minutos, para luego lavarlo con 20 ml de agua de-ionizada estéril. Después de centrifugar las células éstas se re-suspendieron en 1 ml de LiAc (Acetato de Litio, 100 mM) y se transfirieron a tubos de 1.5 ml para centrifugarlos a 10000 rpm por 10 segundos. Inmediatamente después, las células se re-suspendieron con 600 μl de LiAc [100 mM]. Para cada transformación se utilizó 1 μl del vector pRS426 digerido con *Eco*RI / *Xho*I, 2 μl de cada uno de los fragmentos de ADN a fusionar: 5fr-*fks-1*, *hph,* 3fr-*fks-1*, y 326 μl de la solución de transformación (ST). La ST se preparó mezclando: 240 μl de PEG3350 [50%], 36 μl de LiAc [1 M], 50 μl de ADN de hebra sencilla de esperma de arenque desnaturalizado. La ST y los fragmentos de ADN se mezclaron previamente con agitador de vórtice antes de añadir 25 μl de células competentes. La suspensión de células se mezcló por inversión y se incubó por 30 minutos en hielo, para luego realizar el choque térmico a 42° C por 20 minutos. Después del choque térmico las células se centrifugaron a 2000 rpm por 1 minuto, y el precipitado se resuspendió con 200 μl de agua estéril. La suspensión de células transformadas se sembró con perlas de vidrio en placas con medio SD-URA a 30° C por 2-3 días. Para obtener el vector pRS426 con el casete 5fr-*fks-1::hph::*3fr-*fks-1* de las células protótrofas a uracilo se realizó la extracción de ADN plasmídico de las células de levadura transformadas; El producto obtenido se utilizó directamente para transformar en *E. coli* DH5α, y purificar el vector de deleción. El protocolo de extracción de ADN plasmídico de las células de levadura se describe en los Anexos.

5.5 Análisis Microscópicos y Procesamiento de Imágenes

5.5.1 Análisis Microscópicos

5.5.2 Microscopía Confocal

Los análisis por microscopía de fluorescencia se realizaron en tres equipos diferentes: 1) El microscopio confocal invertido Zeiss LSM-510 Meta con el láser ión argón/2 para observar GFP (excitación a 488 nm; emisión 500-550 nm); Para visualización simultánea de GFP con mCherry se utilizaron los láseres de ión argón/2 y He/Ne-2 (mCherry: excitación 543-561nm; emisión, 575-615 nm). Para las observaciones confocales se utilizaron los objetivos de inmersión en aceite 100× Ph3 Plan (NA, 1.3) ó 63× LCI Plan Neofluar Imm Korr DIC (NA, 1.3). Se utilizó el software LSM 510 (versión 3.2, Carl Zeiss®) para capturar imágenes y para evaluarlas se utilizó el LSM 510 Image Examiner (versión 4.2, Carl Zeiss®). 2) El microscopio confocal invertido Olympus Fluoview TM FV1000 con el láser para visualizar GFP (excitación, 488 nm; emisión, 505-525 nm) y el láser de estado sólido Diode Pump Solid State (DPSS, Melles Griot, Carlsbad, CA) para visualizar mCherry, RFP ó tDIMER-2 (excitación, 543 nm; emisión, 560-660 nm). Todas las observaciones con este equipo confocal se realizaron con el objetivo de inmersión en aceite 60× Plan Apo N (Olympus) (NA, 1.42). Las imágenes confocal fueron capturadas y examinadas con el software FV10-ASW (versión 4.0.2.9, Olympus). 3) El microscopio confocal Leica DM5000 confocal con láser de argón para observar GFP (excitación, 488 nm; emisión, 497-536 nm) y un láser DPSS para observar mCherry ó tDIMER-2 (excitación, 561 nm; emisión, 568-646 nm) de manera individual o en forma simultánea con otras moléculas fluorescentes. Las observaciones en este equipo se realizaron con el objetivo de inmersión en aceite 63× HCX PL APO lambda blue (NA, 1.4). Para la captura de las imágenes se utilizó el software LAS AF (versión: 2.6.3, Leica).

5.5.2.1 Microscopía de Reflexión Total Interna de la Fluorescencia

Para analizar la dinámica de estructuras etiquetadas con moléculas fluorescentes se utilizó la microscopía de reflexión total interna de la fluorescencia [total internal

reflection fluorescence microscopy, TIRFM, por sus siglas en inglés]. Las observaciones se realizaron en un microscopio invertido TIRFM Olympus IX-81 con un objetivo 60× (NA, 1.49) Apo-N TIRF y láseres DPSS: 488 nm y 561 nm (Melles Griot, Carlsbad, CA). Las imágenes fueron capturadas con una Cámara Digital Hamamatsu C11440 Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) en un rango de 2 a 3 minutos de duración y una resolución de cada cuadro de imagen de 960 x 720 pixeles. Para el control de la cámara y la captura de imágenes se utilizó el software Dimensions cell Sens (versión 1.9; Olympus Corporation).

5.5.2.2 Ensayos FRAP del Spitzenkörper

Para determinar la dinámica de las vesículas en el Spitzenkörper se realizaron ensayos de recuperación y de pérdida de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento [Fluorescence Recovery After Photobleaching and Fluorescence Loss in Photobleaching, FRAP y FLIP, por sus siglas en inglés, respectivamente]. Para los ensayos de FRAP el Spitzenkörper de las hifas en crecimiento fue fotoblanqueado con el láser de argón de 488 nm o con el láser DPSS de 543 nm a una intensidad de ~50% por 5 segundos, y la recuperación de la fluorescencia fue capturada en imágenes a intervalos de tiempo de 0.61 a 3.39 segundos a una intensidad de irradiación del láser de 2.5 a 5%. La intensidad de la señal fluorescente fue analizada con el software Image J (versión 1.48u; Maryland, USA). Las series de tiempo de las imágenes fueron convertidas a escala de grises (8 bit) y se determinó la intensidad promedio de la fluorescencia en pixeles del área correspondiente al Spitzenkörper. Los valores de intensidad fueron normalizados considerando el valor de intensidad más alto después del fotoblanqueado como el 100%. El rango de tiempo analizado fue de 70 a 200 segundos, tiempo en el cual los valores más altos de la intensidad de la fluorescencia se mantenían en un bajo rango de variación. Se calculó el tiempo medio de la recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$), definido como el tiempo necesario para recuperar el 50% de la intensidad del nivel máximo de la fluorescencia.

5.5.2.3 Ensayos FLIP del Spitzenkörper

Para los ensayos de FLIP se realizó el fotoblanqueamiento en zonas subapicales de hifas en crecimiento, en un área de ~ 80 μm^2 y a una distancia de 10 a 20 μm respecto de los ápices. Las condiciones de fotoblanqueamiento fueron similares a las utilizadas para los ensayos FRAP. La intensidad de la señal fluorescente del Spitzenkörper fue capturada a intervalos de tiempo de 0.4 a 1.50 segundos, a una intensidad de irradiación del láser de 2.5 a 5%. Para determinar la pérdida de la intensidad de la fluorescencia en el Spitzenkörper, las imágenes fueron procesadas de manera similar que en los análisis de los ensayos FRAP. Los valores de intensidad de la fluorescencia se normalizaron tomando como 100% el valor máximo la intensidad del Spitzenkörper inmediatamente después del fotoblanqueado.

5.5.2.4 Ensayos con Sondas Fluorescentes e Inhibidores

El marcador lipofílico FM4-64 (N-(3-triethyl- ammoniumpropyl)-4-(p-diethyl-aminophenyl-hexatrienyl) pyridinium dibromide, Invitrogen®) se utilizó a una concentración final de 10 a 25 µM con MMV líquido. La solución stock de Brefeldina A (BFA, 20 mg/ml) se preparó con DMSO [100 %], y la solución de trabajo se preparó a una concentración final de 10 a 200 µg/ml con MMV. La solución stock de Benomilo (methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate, Sigma) se preparó a una concentración de 500 μg/ml con etanol absoluto y la solución de trabajó a una concentración de 10 μg/ml diluída en MMV. El inhibidor de actina Latrunculina A (Lat A, Sigma) se preparó en DMSO [100 %] y se utilizó en las hifas a una concentración 5 µg/ml con MMV. La Rapamicina (Cat # Tlr1-rap, 5 mg, FW 914.17, 10mM en DMSO, InvivoGen) se usó a una concentración final de 0.5 µg/ml diluída con MMV. El tratamiento de las hifas, para las observaciones bajo el microscopio, con cualquier inhibidor o sonda fluorescente se realizó añadiendo un volumen de 5 a 10 µl de solución de trabajo.

5.5.3 Procesamiento de Imágenes

Para la captura de imágenes y obtención de series de tiempo de hifas *in vivo* se utilizó la técnica de bloque invertido invertido (Hickey *et al.*, 2005). Todas las

imágenes obtenidas por microscopía fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS5 (versión 15.0). Los ensayos de colocalización de proteínas in vivo se obtuvieron de cepas heterocariontes crecidas en MMV sólido a una temperatura de 28-30° C. Las cepas heterocariontes de *N. crassa* se obtuvieron por la fusión vegetativa de hifas a partir de la mezcla de conidios de dos cepas con el mismo tipo de apareamiento. Para el análisis cuantitativo de los experimentos de co-localización se calculó el Cociente de Correlación de la Intensidad (Intensity Correlation Analysis, ICQ, por sus siglas en inglés) en secciones de hifas con una longitud ~60 µm. Previo a la determinación del ICQ las imágenes de ambos canales se convirtieron a escala de grises y el umbral de intensidad de la fluorescencia fue ajustado y normalizado. Los valores de ICQ para cada muestra se obtuvieron utilizando el software ImageJ (version 1.48u; Maryland, USA). Para el análisis de los valores promedio de ICQ se utilizó el test estadístico t-Student con una significancia del 0.05. Para la generación de quimografías y la detección automática del rastro de vesículas a partir de imágenes obtenidas por TIRFM se utilizó el software Kymomaker (Chiba *et al.*, 2014). Los promedios de los $t_{1/2}$ obtenido de los análisis por FRAP se analizaron mediante Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA) y la prueba *post-hoc* de Tukey HSD con el software de análisis de datos STATISTICA (versión 8.0, StatSoft, Inc.).

5.6 Centrifugación de Gradientes de Sacarosa, Inmunoprecipitación de proteínas y Western blots

5.6.1 Centrifugación de Gradientes de Sacarosa

Para el aislamiento de vesículas de las cepas transformantes de *N. crassa* en estudio se realizaron centrifugaciones de extractos celulares en gradientes de sacarosa. Para obtener micelio se sembró conidios en 400 mL de MCV a una concentración final de $1x10^6$ cel/ml. Los cultivos se incubaron a 30° C y 200 rpm por 16-20 horas. Los micelios obtenidos se lavaron dos veces con agua fría estéril y una vez con solución amortiguadora de fosfatos [SAF, 33mM, pH 8.2]. La homogenización de éstos se realizó mezclando ~10 g de micelio, 20 g de perlas de vidrio (0.5 mm, Biospec) y 10 ml de SAF con inhibidor de proteasas [1x] en un homogeneizador Braun enfriado con una línea de CO_2. El extracto celular con perlas se transfirió a un

tubo de 50 ml y se centrifugó a 1500 x *g* por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante (~ 5 ml) se transfirió sobre un gradiente lineal de sacarosa [35 ml, 10-65 %, el hacedor de gradientes es CBS Scientific GM-40] en un tubo para ultracentrifugación (Quick seal Tube, Beckman, 344326). Las condiciones de centrifugación para todos los aislamientos de vesículas fue de: 50,000 rpm, 4° C por 4 horas en un rotor Beckman 70Ti y una ultracentrífuga Beckman Modelo L8M. Los gradientes se fraccionaron desde la parte inferior del tubo con sacarosa al 70 % en un fraccionador de gradientes de densidad (ISCO Modelo 185). Se generaron de cada gradiente 20 fracciones de 2 ml cada una. La densidad de cada fracción se calculó con el índice de refracción medido en un refractómetro Abbe (Carl Zeiss). Para el análisis por Western blot (WB) se tomaron 100 μl de cada fracción, se diluyeron con 100 μl de amortiguador Laemmli [4x] y se hirvieron a 95° C por 5 minutos. Finalmente las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y se conservaron a -20° C.

5.6.2 Inmunoprecipitación de Proteínas

Para la purificación de proteínas de extractos celulares de *N. crassa* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) utilizando anticuerpos acoplados a perlas de agarosa (GFP-TRAP®, Chromotek). Para la obtención de micelio de *N. crassa* se inoculó una suspensión de conidios frescos en MMV líquido (~150 ml) y se incubaron a 37° C, 110 rpm por 16 horas. El micelio se cosechó por filtración y se pulverizó con nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C antes de homogenizarlo. Para la homogenización del micelio pulverizado (~5 ml) se utilizó 20 ml de solución amortiguadora de lisis con inhibidor de proteasas. La solución con micelio se mezcló con agitación fuerte y se centrifugó en dos etapas. En la primera se utilizó una velocidad de 4500 rpm por 25 minutos, y en la segunda se centrifugó 4 ml del sobrenadante en dos tubos de 2 ml a 16000 rpm por 1 hora. Las perlas con los anticuerpos (3-5 μl) se equilibraron con 1 ml de solución amortiguadora de lisis y se precipitaron a 3000 rpm por 1 minuto a 4° C. Las perlas se incubaron con el sobrenadante del extracto de la segunda centrifugación en dispositivo rotatorio (360°) por ~2 horas a 4° C. Inmediatamente después se cosecharon las perlas centrifugando a 3000 rpm por 1 minuto a 4° C, y se lavaron con 1 ml de solución de amortiguadora de lisis. El sobrenadante se desechó y las perlas se hirvieron con 40

μl de solución amortiguadora Laemmli [3X] a 98° C por 10 minutos, antes de proceder a realizar el Western blot. La solución amortiguadora de lisis se describe en los Anexos.

5.6.3 Análisis de expresión con distintos promotores

Para el análisis de la expresión de GFP-YPT-1 se utilizaron conidios frescos de las cepas SMRP300 y SMRP349, las cuales expresan la construcción bajo el control de los promotores P*ccg-1* y P*ypt-1*, respectivamente. Los conidios de las cepas en estudio se inocularon en 200 mL de MMV y se incubaron a 30°C por ~20 h a 150rpm. El micelio obtenido se filtró y se lavó dos veces con agua fría estéril y subsecuentemente se pulverizó con nitrógeno líquido antes de almacenarlo a -80°C. Para la obtención de extractos celulares se utilizó de 5 a 8 ml de micelio pulverizado el cual se mezcló con 25 ml de solución amortiguadora de lisis e inhibidor de proteasas. El homogenizado se centrifugó a 2,850 x *g* (R_{max}) por 25 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a 19,000 x *g* por 1 h a 4°C. Doscientos microlitros del sobrenadante de cada muestra se mezclaron con 200 μl de solución amortiguadora Laemmli (4X), y se hirvieron por 5 min y almacenaron a -20°C previo al análisis por Western blot.

5.6.4 Western blots

Para los análisis por Western blot se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), utilizando el equipo para electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra (BioRad). Los geles (1 mm) se prepararon a una concentración de 8-13.5% de poliacrilamida en placas de vidrio. Las soluciones amortiguadoras para preparar los geles de poliacrilamida y para realizar el corrimiento se describen en los Anexos. Por cada fracción obtenida de los gradientes de densidad se analizaron 30 μl. Para la determinación de la expresión de GFP-YPT-1 con los distintos promotores (P*ccg-1* y P*ypt-1*) los análisis se hicieron por triplicado. Para cada una de las muestras se midió la concentración total de proteínas equivalente a BSA y se cargó 40 μg de proteína total equivalente a BSA. Las condiciones para el corrimiento fueron de 100 V por 15-20 minutos seguido de 200 V por 40-45 minutos. Las proteínas del gel se transfirieron

a membranas de nitrocelulosa (PALL Life Sciences, Biotrace ® NT) ó membrana de PVDF (Millipore) mediante transferencia líquida a 60 V por 1-2 horas, utilizando 2 capas externas de papel filtro para cromatografía (3MM CHR, Whatman™) y solución para transferencia de proteínas [1 X]. Las transferencias se realizaron a baja temperatura con el equipo Mini Trans-Blot ® Cell (BioRad). Inmediantamente después de la transferencia las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con Rojo Ponceau [0.1 %] por 5-10 minutos para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana, seguido de un lavado con agua deionizada no estéril para proceder a la inmuno-detección. Después del lavado de las membranas se bloquearon con una solución de TBS-T [1 X]-5% leche deshidratada por 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección con el primer anticuerpo: anti-GFP (mouse anti-GFP, SC-9996; Santa Cruz Biotechnology), anti-Cherry (rabbit anti-Cherry, GTX59788, GeneTex) o control de carga anti-Actina [mouse anti-β-actina, 20272; Abcam] se realizó a una concentración de 1:1000 ó 0.5 μg/ml. El periodo de incubación se realizó con agitación lenta por 1 hora a temperatura ambiente por 16 horas a 4° C. Después de los lavados con TBS-T [1 X] por 30 minutos las membranas se revelaron con anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP [1:3,000, 04719930001; Roche,] ó anti-conejo-HRP [1:25,000, A0545, Sigma] utilizando el ensayo quimioluminiscente del kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo scientific, 32106). Para la detección se utilizaron placas autoradiográficas (HyBlot CL, Denville Scientific Inc.) y soluciones de fijación y revelación (Kodak GBX, 1901859).

5.7 Ensayo de Determinación de Azúcares Reductores

Para determinar la actividad enzimática de las fracciones generadas de los gradientes de densidad de la cepa de *N. crassa* INV-1-GFP, se realizaron ensayos de determinación de azúcares reductores. La determinación de la curva estándar se determinó en función de los valores promedios de absorbancia (575 nm) generada en presencia del reactivo DNS [1 %] y las distintas concentraciones [0-4 mM] del azúcar reducido (glucosa). Las soluciones con glucosa de concentración conocida se prepararon con agua deionizada estéril y se mezclaron con el reactivo DNS [1 %] en una proporción de 1:1. Las soluciones de reacción se calentaron a 95° C por 5 minutos y luego se enfriaron por 2 minutos para proceder a estabilizar las reacciones

con 500 μl de Tartrato de Sodio y Potasio [40 %]. Inmediatamente después se midió la absorbancia a 575 nm usando como blanco el tubo con solución de reacción sin glucosa. Para determinar la actividad enzimática de las fracciones éstas se descongelaron en hielo y se diluyeron en una solución amortiguadora de acetato de sodio [0.1 M, pH 5.0] en una relación 1:10. La reacción enzimática para cada fracción se realizó mezclando: 100 μl de la dilución, 900 μl de agua deionizada estéril y 500 μl de solución amortiguadora de acetato de sodio [0.1 M, pH 5.0], estabilizando por 3 minutos a 30° C. A cada muestra se le añadió 1000 μl de sacarosa [30 %] y se incubó a 30° C por 5 minutos, para luego parar la reacción con el reactivo DNS [1 %]. Inmediatamente después se incubaron los tubos en agua hirviendo por 5 minutos. Los tubos se enfriaron con agua fría por 2 minutos y se les añadió 500 μl de Tartrato de Sodio y Potasio [40 %] para estabilizar el color de la reacción. La absorbancia de cada una de las muestras se midió a 575 nm y la concentración de azúcares reductores presentes en la reacción se estimó en función de la curva estándar obtenida inicialmente. Se realizaron ensayos de actividad de fracciones de dos muestras independientes.

6 Resultados

6.1 YPT-1 se asocia con las microvesículas del Spitzenkörper

Para caracterizar la distribución subcelular de la Rab GTPasa YPT-1 (NCU08477.7) en *N. crassa*, se etiquetó a la proteína en el extremo amino terminal con la proteína GFP. Las imágenes de microscopía confocal a bajo aumento revelaron una acumulación de YPT-1 en la región apical y subapical proximal de las hifas (Fig. 16A). En la región apical se identificó a GFP-YPT-1 en el Spitzenkörper de todas las hifas vegetativas en crecimiento (Fig. 16B, flecha, panel 1), mientras que en regiones distales no se observó a GFP-YPT-1 en sitios de formación de septos (Fig. 16C). Inicialmente se analizó la expresión de GFP-YPT-1 bajo el control del promotor reprimible por glucosa P*ccg-1*, anteriormente llamado *grg-1* (McNally and Free, 1988). Aunque P*ccg-1* ha sido ampliamente utilizado para los análisis de localización de proteínas etiquetadas con proteínas fluorescentes en *N. crassa*, su utilización ha generado controversia ya que algunos autores consideran que este promotor genera niveles muy altos de expresión, clasificándolo como un promotor fuerte. Como consecuencia se ha especulado que la expresión regulada por este promotor genera artefactos. Para descartar que la distribución subcelular de GFP-YPT-1 bajo control del promotor *ccg-1* pudiera deberse a un efecto del promotor, se expresó GFP-YPT-1 bajo el control del promotor propio del gen *ypt-1*, P*ypt-1*. No se encontraron diferencias en la distribución subcelular de GFP-YPT-1 expresado bajo el control del promotor *ccg-1* o el promotor propio (Fig. 16B, panel 2). Para confirmar que GFP-YPT-1 se estuviera expresando a niveles similares con ambos promotores se determinó por Western blot la concentración del constructo expresado bajo control del promotor P*ccg-1* (en presencia de sacarosa en el medio) y bajo control del promotor P*ypt-1*. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de GFP-YPT-1 bajo el control de ambos promotores (Fig. 16D). Por lo tanto, la mayoría de los análisis se realizaron con la cepa que expresa GFP-YPT-1 con el promotor P*ccg-1*.

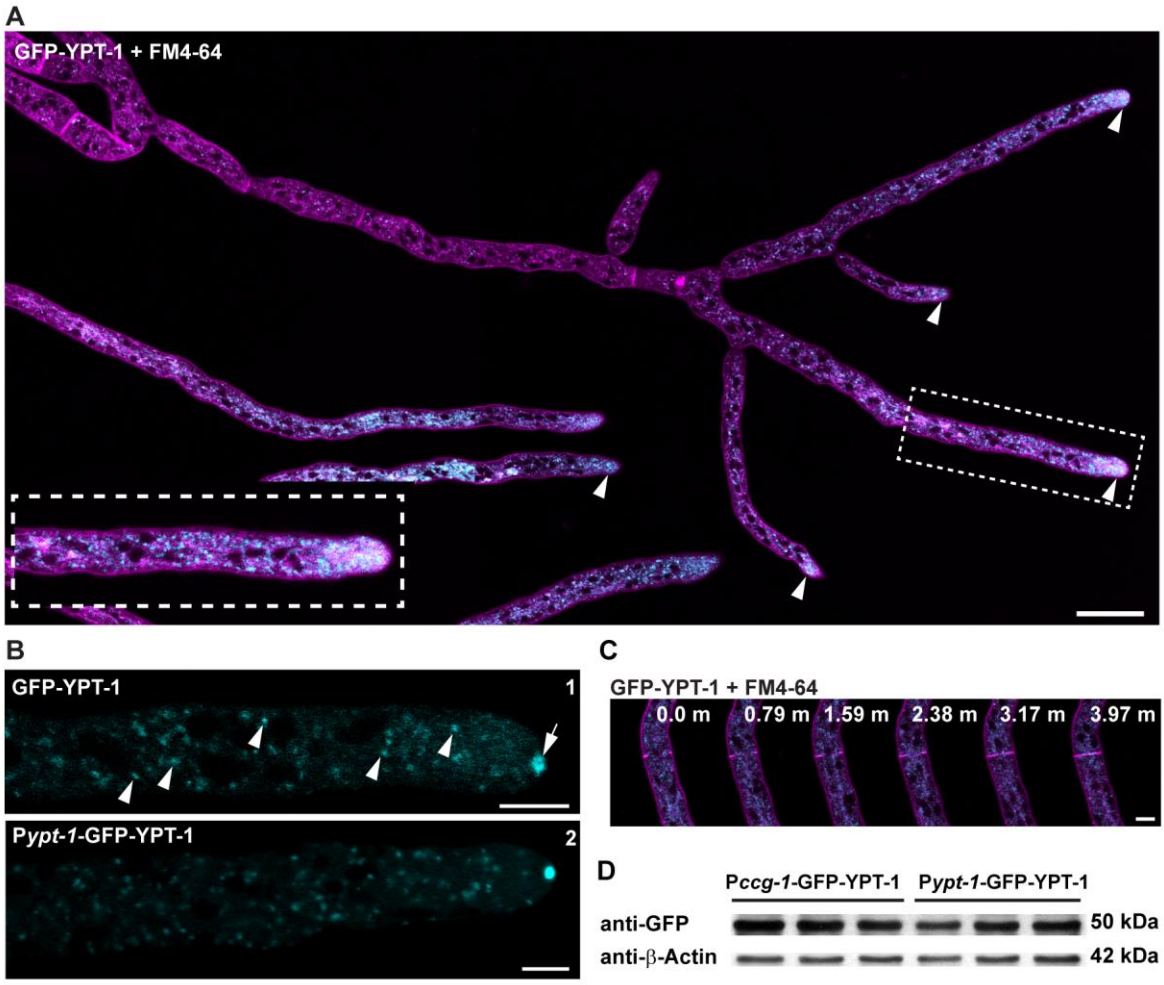


Figura 16. Distribución subcelular y análisis de la expresión bajo el control de los promotores P*ccg-1* y P*ypt-1* de la Rab GTPasa YPT-1 en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*.

A. El análisis a bajo aumento por LSCM mostró la acumulación de GFP-YPT-1 en distintas regiones de las hifas en crecimiento teñidas con FM4-64. GFP-YPT-1 se observó principalmente en regiones apicales como fluorescencia dispersa en el citoplasma (cabezas de flecha) y en regiones subapicales se detectó a YPT-1 en estructuras puntuales a lo largo de las hifas. Nótese la acumulación de GFP-YPT-1 en estructuras pleomórficas citoplasmáticas en la región subapical distal de la hifa (recuadro). Barra, 20 µm.
B. Panel 1: El análisis a mayor aumento por LSCM mostró la acumulación de GFP-YPT-1 expresada bajo el control del promotor P*ccg-1* en el núcleo (región microvesicular) del Spitzenkörper (flecha), pero además se observó en numerosas estructuras puntuales posiblemente cisternas de Golgi (cabezas de flecha). Barra, 10 µm. Panel 2: El análisis por LSCM mostró la distribución subcelular de GFP-YPT-1 expresado bajo el control del promotor P*ypt-1*, mostrando un patrón de localización similar al de las hifas que regulan la expresión de GFP-YPT-1 con el promotor reprimible por glucosa P*ccg-1* (McNally and Free, 1988). Barra, 5 µm.
C. Los análisis de series de tiempo por LSCM de hifas teñidas con FM4-64 mostraron la ausencia de GFP-YPT-1 en septos en formación. Barra, 5 µm.
D. Western blot de extractos celulares (carga de 40 µg/ml de proteína total equivalente a BSA), inmuno-detectado con anti-GFP, de las cepas que expresan GFP-YPT-1 bajo el control de los promotores P*ccg-1* y P*ypt-1* (*n*= 3). En el panel inferior se muestra el control de carga inmuno-detectado con anti-β-actina.

Para analizar a detalle la distribución de YPT-1 en el Spitzenkörper se utilizó el marcador lipofílico FM4-64, el cual se ha utilizado ampliamente para el marcaje de estructuras membranosas y el Spitzenkörper (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Hickey *et al.*, 2002). Se observó que la tinción con FM4-64 se limitó a la región macrovesicular del Spitzenkörper, circundando la región de distribución de GFP-YPT-1 (Fig. 17A, panel 1). En estudios anteriores se determinó que en *N. crassa* las enzimas encargadas de la biosíntesis de quitina se encuentran en los quitosomas, los cuales se distribuyen en la región microvesicular del Spitzenkörper (Riquelme *et al.*, 2007; Fajardo-Somera, 2013; Sánchez-León *et al.*, 2011). Para determinar si YPT-1 podría estar asociado con la población de quitosomas se analizó el patrón de distribución de GFP-YPT-1 y CHS-1-GFP en el Spitzenkörper de una cepa heterocarionte que expresaba ambas proteínas recombinantes. Ambas proteínas co-localizaron en el núcleo del Spitzenkörper (Fig. 17A, panel 2). En estudios previos también se identificó a GS-1, proteína relacionada a la síntesis de β-(1,3) glucanos en *N. crassa*, confinada a la región más externa del Spitzenkörper (Verdín *et al.*, 2009), la cual coincide con la distribución de macrovesículas observadas por microscopía electrónica de transmisión (Grove and Bracker, 1970; Howard, 1981). Para confirmar la exclusión de YPT-1 de la región macrovesicular se analizó la localización de GS-1-GFP y mChFP-YPT-1 en una cepa heterocarionte que expresaba ambas construcciones. Se observó claramente que tanto GS-1-GFP como mChFP-YPT-1 ocupaban distintos estratos del Spitzenkörper (Fig. 17A, panel 3). El análisis por Western blot de las fracciones obtenidas por gradientes de densidad (10-65%) mostraron la presencia de GFP-YPT-1 (banda de 50 kDa) en todas las fracciones, aunque las más altas concentraciones se encontraron en las fracciones 10 a 12, las cuales tenían un rango de densidad de 1.119 a 1.138 g/ml (Fig. 17B).

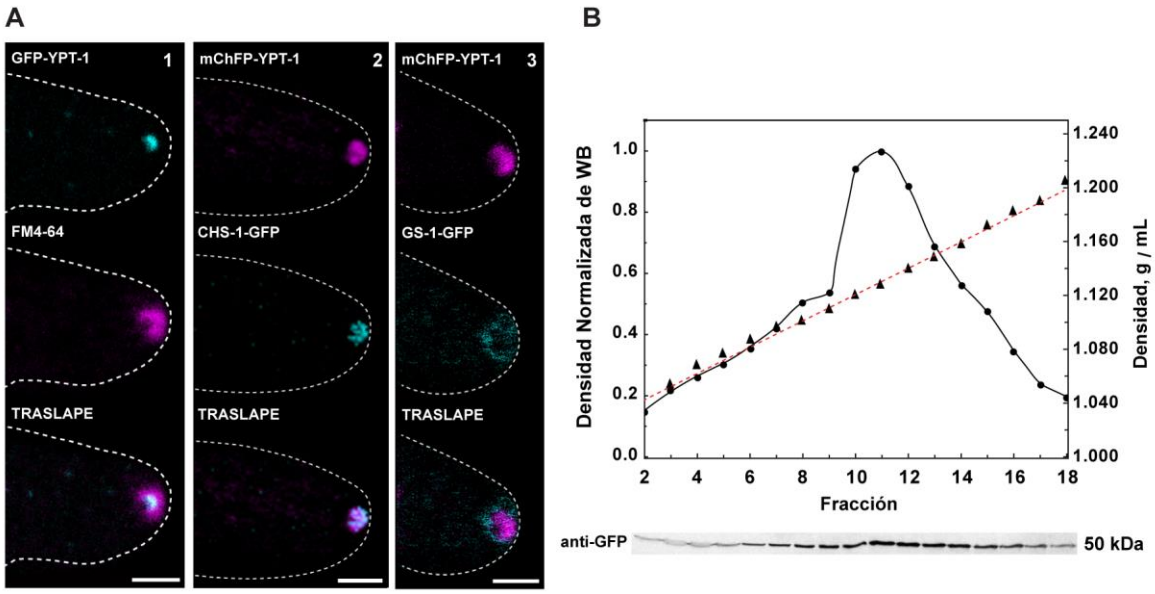


Figura 17. Asociación de la Rab GTPasa YPT-1 con una sub-población de vesículas del Spitzenkörper en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*.

A. Panel 1: El marcaje con FM4-64 confirmó la distribución de GFP-YPT-1 confinada al núcleo del Spitzenköper. Panel 2: La co-expresión de mChFP-YPT-1 y la CHS-1-GFP, quitina sintasa etiquetada con GFP previamente identificada en la región microvesicular del Spitzenkörper (Sánchez-León *et al.*, 2011), mostró una co-localización conspicua de YPT-1 y CHS-1 en el núcleo del Spitzenkörper. Panel 3: La co-expresión de mChFP-YPT-1 y la GS-1-GFP, proteína relacionada a la síntesis de beta glucano etiquetada con GFP y que previamente se identificó en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Verdín *et al.*, 2009), no mostró una co-localización de YPT-1 con la región macrovesicular (o externa) del Spitzenkörper. Barras, 2 µm.

B. Homogenizados libres de células (sobrenadantes de 1,000 x *g*) de la cepa de *N. crassa* que expresa GFP-YPT-1 fueron fraccionados por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa (10-65%) a 184,000 x *g* por 4 h. Se identificaron bandas de 50 kDa por Western blot, utilizando el anticuerpo anti-GFP, correspondientes a GFP-YPT-1 en las fracciones 2 a la 19 con las bandas de intensidad más alta en las fracciones 8 a 12 (panel inferior). Las ordenadas muestran, para cada fracción, el promedio de dos valores normalizados de los análisis de Western blot (línea continua) y el valor promedio de densidad de sacarosa (línea punteada) de dos experimentos independientes. F: Fracción.

6.2 YPT-31 Y SEC-4 se asocian a la región macrovesicular del Spitzenkörper

En *S. cerevisiae* las Rab GTPasas Ypt31/32p se asocian a Golgi tardío y a las vesículas post-Golgi, donde participan en el reclutamiento de Sec2p, regulador GEF de Sec4p (Jedd *et al.*, 1997; Benli *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 2002). Sec4p participa río abajo de Ypt31/32p en los últimos pasos del tráfico de vesículas exocíticas (Goud *et al.*, 1988; Salminen and Novick, 1987). En un estudio previo se identificaron las Rab GTPasas de *N. crassa* YPT-31 (NCU01523.5) y SEC-4 (NCU06404.5) como homólogas putativas de las Rabs post-Golgi de *S. cerevisiae* Ypt31p/32p y Sec4p,

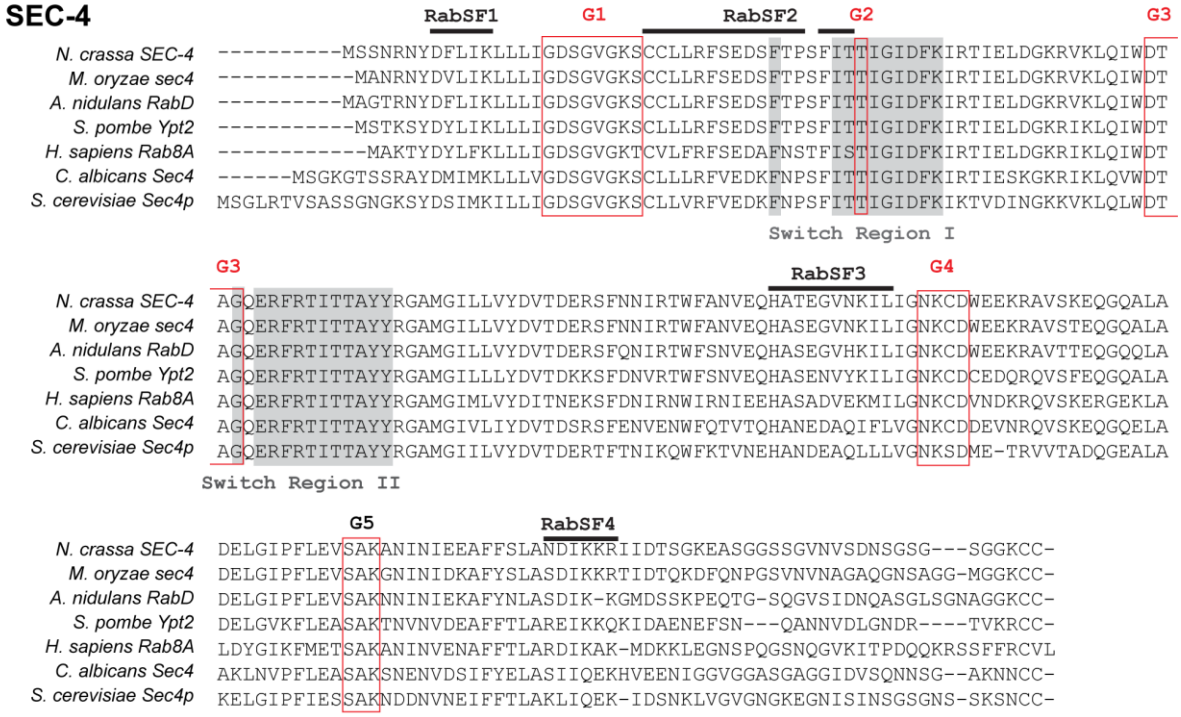
respectivamente (Borkovich *et al.*, 2004). Los análisis BLAST de las Rabs putativas de *N. crassa* YPT-31 y SEC-4, mostraron un alto grado de identidad (62-87%) a nivel de aminoácidos en relación a los ortólogos correspondientes en otros hongos y en humano (Tabla 5, Fig. 18A y B).

Tabla 5. Análisis comparativo de las Rab GTPasas SEC-4 y YPT-31 de *N. crassa* con los homólogos más cercanos en algunas especies fúngicas y en el hombre.

Organismo	Proteína	No. Acceso*	Descripción	ID	SIM	E. value
SEC-4						
Magnaporthe oryzae	Ypt2	XP_003712007.1	GTP-binding protein ypt2 [*M. oryzae* 70-15]	87%	90%	9.00E-126
Aspergillus nidulans	RabD	XP_664578.1	hypothetical protein AN6974.2 [*A. nidulans* FGSC A4]	83%	90%	1.00E-120
Schizosaccharomyces pombe	Ypt2	NP_594580.1	GTPase Ypt2 [*S. pombe* 972h-]	73%	86%	4.00E-104
Homo sapiens	Rab8A	NP_005361.2	ras-related protein Rab-8A [*H. sapiens*]	63%	78%	1.00E-89
Candida albicans	Sec4	XP_718333.1	likely rab family GTP-binding protein [*C. albicans* SC5314]	62%	76%	2.00E-85
Saccharomyces cerevisiae	Sec4p	NP_116650.1	Sec4p [*S. cerevisiae* S288c]	65%	83%	6.00E-79
YPT-31						
Magnaporthe oryzae	Rab11A	XP_003717859.1	Ras-like protein Rab-11A [*M. oryzae* 70-15]	83%	87%	4.00E-124
Aspergillus nidulans	RabE	XP_657951.1	hypothetical protein AN0347.2 [*A. nidulans* FGSC A4]	72%	78%	7.00E-114
Homo sapiens	Rab11A	NP_004654.1	ras-related protein Rab-11A isoform 1 [*H. sapiens*]	75%	83%	2.00E-110
Schizosaccharomyces pombe	Ypt3	NP_593667.1	GTPase Ypt3 [*S. pombe* 972h-]	70%	84%	7.00E-104
Saccharomyces cerevisiae	Ypt31p	NP_010948.1	Ypt31p [*S. cerevisiae* S288c]	64%	79%	8.00E-95
Saccharomyces cerevisiae	Ypt32p	NP_011305.1	Ypt32p [*S. cerevisiae* S288c]	62%	78%	1.00E-90
Candida albicans	Ypt31	XP_710395.1	likely rab family GTP-binding protein [*C. albicans* SC5314]	64%	80%	5.00E-90

*Búsqueda BLAST usando la secuencia de aminoácidos de SEC-4 (XP_962242.1) y YPT-31 (XP_956972.2) de *N. crassa* como templado. ID y SIM: Identidad entre aminoácidos. SIM: Similitud entre aminoácidos.

A


SEC-4
RabSF1
G1
RabSF2
G2
G3
N. crassa SEC-4 ----------MSSNRNYDFLIKLLLIGDSGVGKSCCLLRFSEDSFTPSFITTIGIDFKIRTIELDGKRVKLQIWDT
M. oryzae sec4 ----------MANRNYDVLIKLLLIGDSGVGKSCCLLRFSEDSFTPSFITTIGIDFKIRTIELDGKRVKLQIWDT
A. nidulans RabD ----------MAGTRNYDFLIKLLLIGDSGVGKSCCLLRFSEDSFTPSFITTIGIDFKIRTIELDGKRVKLQIWDT
S. pombe Ypt2 ----------MSTKSYDYLIKLLLIGDSGVGKSCLLLRFSEDSFTPSFITTIGIDFKIRTIELDGKRIKLQIWDT
H. sapiens Rab8A ----------MAKTYDYLFKLLLIGDSGVGKTCVLFRFSEDAFNSTFISTIGIDFKIRTIELDGKRIKLQIWDT
C. albicans Sec4 ------MSGKGTSSRAYDMIMKLLLVGDSGVGKSCLLLRFVEDKFNPSFITTIGIDFKIRTIESKGKRIKLQVWDT
S. cerevisiae Sec4p MSGLRTVSASSGNGKSYDSIMKILLIGDSGVGKSCLLVRFVEDKFNPSFITTIGIDFKIKTVDINGKKVKLQLWDT
Switch Region I
G3
RabSF3
G4
N. crassa SEC-4 AGQERFRTITTAYYRGAMGILLVYDVTDERSFNNIRTWFANVEQHATEGVNKILIGNKCDWEEKRAVSKEQGQALA
M. oryzae sec4 AGQERFRTITTAYYRGAMGILLVYDVTDERSFNNIRTWFANVEQHASEGVNKILIGNKCDWEEKRAVSTEQGQALA
A. nidulans RabD AGQERFRTITTAYYRGAMGILLVYDVTDERSFQNIRTWFSNVEQHASEGVHKILIGNKCDWEEKRAVTTEQGQQLA
S. pombe Ypt2 AGQERFRTITTAYYRGAMGILLLYDVTDKKSFDNVRTWFSNVEQHASENVYKILIGNKCDCEDQRQVSFEQGQALA
H. sapiens Rab8A AGQERFRTITTAYYRGAMGIMLVYDITNEKSFDNIRNWIRNIEEHASADVEKMILGNKCDVNDKRQVSKERGEKLA
C. albicans Sec4 AGQERFRTITTAYYRGAMGIVLIYDVTDSRSFENVENWFQTVTQHANEDAQIFLVGNKCDDEVNRQVSKEQGQELA
S. cerevisiae Sec4p AGQERFRTITTAYYRGAMGIILVYDVTDERTFTNIKQWFKTVNEHANDEAQLLLVGNKSDME-TRVVTADQGEALA
Switch Region II
G5
RabSF4
N. crassa SEC-4 DELGIPFLEVSAKANINIEEAFFSLANDIKKRIIDTSGKEASGGSSGVNVSDNSGSG---SGGKCC-
M. oryzae sec4 DELGIPFLEVSAKGNINIDKAFYSLASDIKKRTIDTQKDFQNPGSVNVNAGAQGNSAGG-MGGKCC-
A. nidulans RabD DELGIPFLEVSAKNNINIEKAFYNLASDIK-KGMDSSKPEQTG-SQGVSIDNQASGLSGNAGGKCC-
S. pombe Ypt2 DELGVKFLEASAKTNVNVDEAFFTLAREIKKQKIDAENEFSN---QANNVDLGNDR----TVKRCC-
H. sapiens Rab8A LDYGIKFMETSAKANINVENAFFTLARDIKAK-MDKKLEGNSPQGSNQGVKITPDQQKRSSFFRCVL
C. albicans Sec4 AKLNVPFLEASAKSNENVDSIFYELASIIQEKHVEENIGGVGGASGAGGIDVSQNNSG--AKNNCC-
S. cerevisiae Sec4p KELGIPFIESSAKNDDNVNEIFFTLAKLIQEK-IDSNKLVGVGNGKEGNISINSGSGNS-SKSNCC-

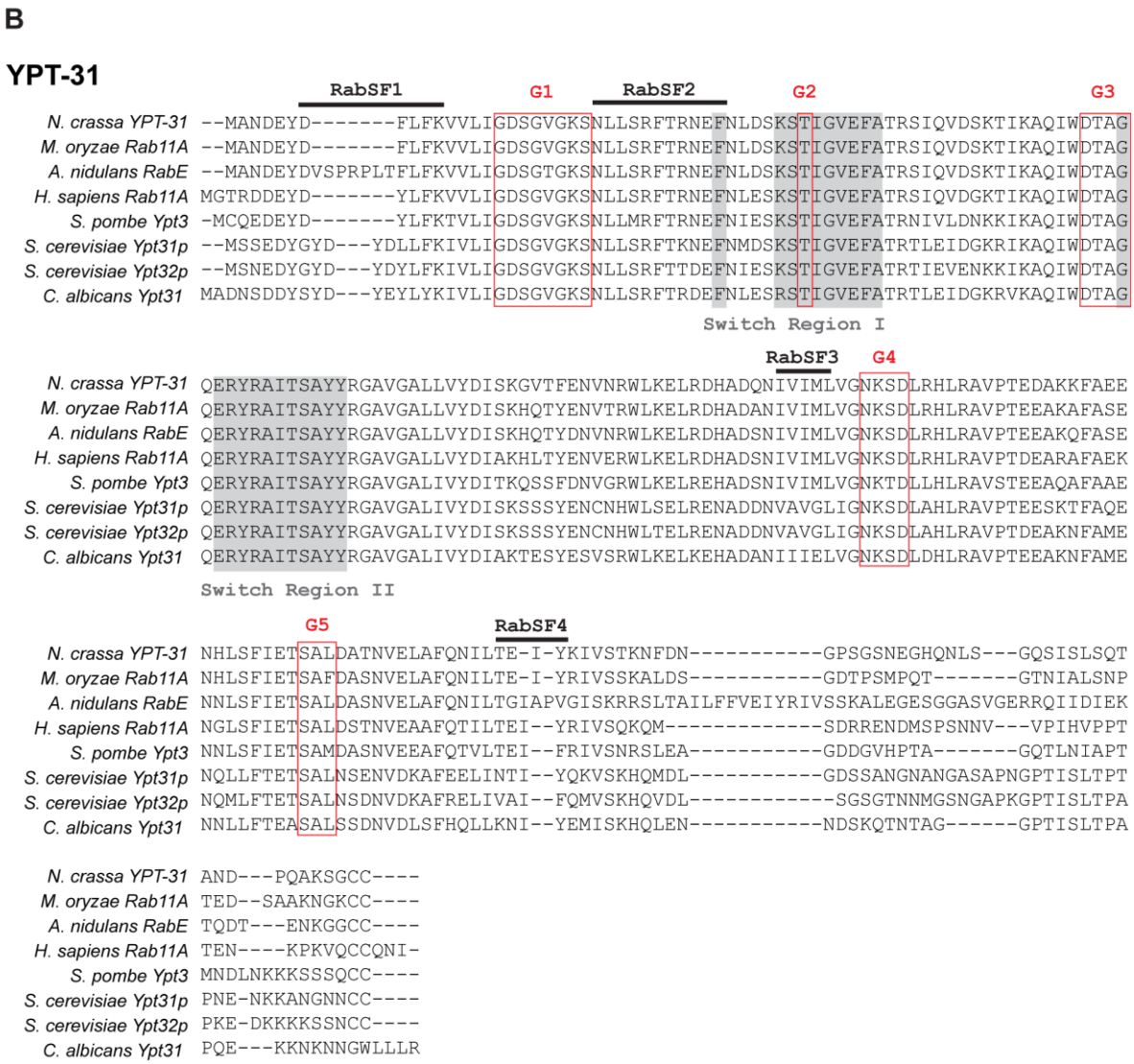


Figura 18. Los genes *sec-4* (NCU06404.7) y *ypt-31* (NC01523.7) codifican para los homólogos de las proteínas Rab8 y Rab11.

A. Alineamiento e identificación de dominios de las Rab GTPasas de *N. crassa* SEC-4 (codificada por el gen *sec-4* NCU06404.7) y
B. YPT-31 (codificada por el gen *ypt-31* NCU01523.7). En ambos casos se analizan con Rab GTPasas reportadas [y que comparten una identidad >60% (ver Tabla S2)] en hongos filamentosos, hongos levaduriformes y del humano. Enmarcado en rojo: secuencia de residuos correspondientes a las regiones (1 a la 5) del dominio G. Sombreadas en gris: Regiones Switch I y II sombreadas en grises. Barras negras superiores: regiones 1 a la 4 de la Sub-Familia Rab (RabSF).

Con el objetivo de determinar si YPT-31 y SEC-4 están involucradas en el tráfico de las vesículas del Spitzenkörper, estas Rabs se etiquetaron en el extremo amino terminal con las proteínas fluorescentes tDIMER-2 y GFP o mChFP, respectivamente. Los análisis por microscopía confocal permitieron identificar que

tDIMER-2-YPT-31 se acumula en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 19A, panel 1, flecha). La co-expresión de GFP-YPT-1 y tDIMER-2-YPT-31 en una cepa heterocarionte, confirmó la localización de ambas Rab GTPasas en distintos estratos del Spitzenkörper (Fig. 19B, panel 1). En el caso de las cepas que expresaban GFP- o mChFP-SEC-4 se logró observar que SEC-4 se acumulaba en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 19A, panel 2 y 3, flechas), aunque también se detectó acumulación de fluorescencia subapical (Fig. 19A, panel 2 y 3, cabezas de flecha). No se detectaron diferencias en el patrón de distribución de la proteína cuando su expresión fue regulada bajo el promotor P*ccg-1* o el promotor propio del gen P*sec-4* (Fig. 19A, panel 2 y 3). La co-expresión de GFP-SEC-4 y tDIMER-2-YPT-31, confirmó la co-localización parcial de ambas Rabs en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 19B, panel 2). Para confirmar la presencia de vesículas secretoras en el Spitzenkörper, se etiquetó la vSNARE putativa SYN-1 (NCU00566.7), homóloga de vSNAREs utilizadas como marcadores vesiculares en otras especies fúngicas (Lewis *et al.*, 2000; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Las proteínas vSNAREs pertenecen a la familia de proteínas synaptobrevinas y están involucradas en eventos de fusión vesicular durante las últimas etapas de la ruta secretora (Shanks *et al.*, 2012; Grote *et al.*, 2000; Protopopov *et al.*, 1993). El análisis BLAST reveló un alto grado de identidad a nivel de aminoácidos (64% y 58%) con sus homólogos en *A. nidulans* (SynA, AN8769) y *S. cerevisiae* (Snc2p, NP_014972), respectivamente. GFP-SYN-1 se observó en la región macrovesicular y microvesicular del Spitzenkörper (Fig. 19A, panel 4; Fig. 19B, panel 3). Recientemente, en *N. crassa* se identificaron las subunidades del complejo del Exocisto EXO-70, EXO-84 y SEC-3, asociadas a regiones periféricas del Spitzenkörper (Riquelme *et al.*, 2014). La co-expresión de tDIMER-2-YPT-31 y GFP-EXO-70 (expresada bajo el control de su propio promotor) mostró una co-localización parcial de ambas proteínas en la zona macrovesicular del Spitzenkörper, aunque EXO-70 se encontró distribuida principalmente entre la zona entre la membrana plasmática y el área ocupada por YPT-31 (Fig. 19B, panel 4).

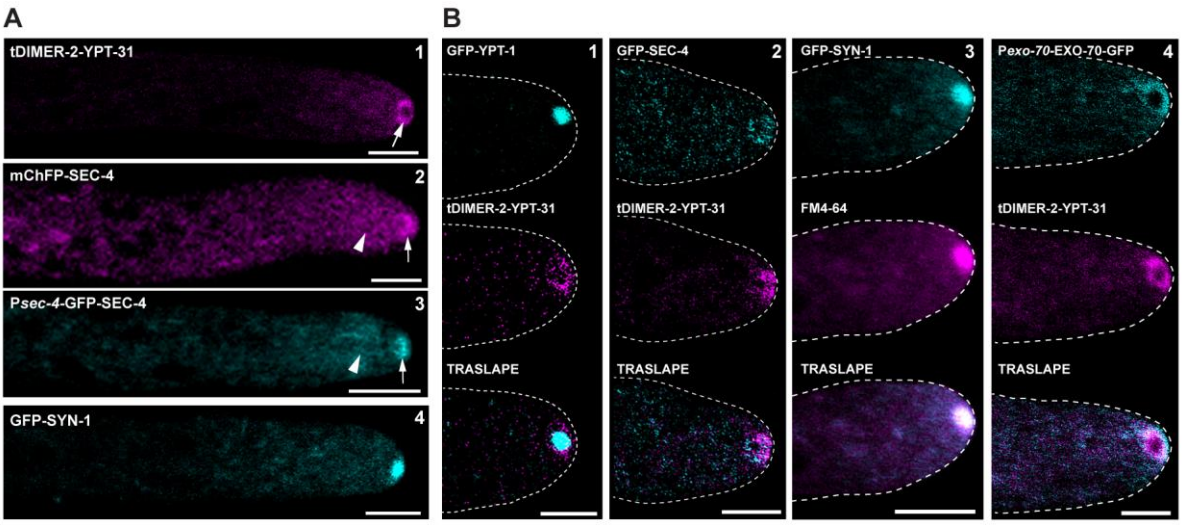


Figura 19. Distribución subcelular de las Rab GTPasas YPT-31 y SEC-4 en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*.

A. Panel 1: El análisis por LSCM mostró una clara acumulación de tDIMER-2-YPT-31 en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper (flecha). Panel 2 y 3: La expresión de mChFP- o GFP-SEC-4 bajo el control del promotor reprimible por glucosa P*ccg-1* (McNally and Free, 1988) y el promotor del gen nativo P*sec-4*, respectivamente, mostraron un patrón similar de distribución en la región macrovesicular del Spitzenkörper (flechas). Nótese la dispersión de la señal fluorescente en la región apical de las hifas (cabezas de flecha). Panel 4: El análisis por LSCM de la vSNARE SYN-1 de *N. crassa* etiquetada en el C-terminal con GFP, mostró una acumulación de la proteína en ambos estratos del Spitzenkörper. Barras, 5 µm.

B. Panel 1: La co-expresión de tDIMER-2-YPT-31 y GFP-YPT-1 mostró una distribución conspicua de ambas proteínas en distintos estratos del Spitzenkörper. Panel 2: La co-expresión de tDIMER-2-YPT-31 y GFP-SEC-4 reveló que ambas proteínas se distribuyen en la capa externa del Spitzenkörper rodeando a una región central libre de fluorescencia; aunque se encontró que el patrón de distribución de ambas Rabs (i.e. YPT-31 y SEC-4) fue distinto (panel inferior). Panel 3: El marcaje con FM4-64 confirmó la distribución de SYN-1-GFP en la región macrovesicular y microvesicular del Spitzenköper. Panel 4: tDIMER-2-YPT-31 y EXO-70-GFP, expresado bajo su propio promotor (Riquelme *et al.*, 2014), mostraron una co-localización parcial en el Spitzenkörper. Barras, 2 µm.

6.2.1 Análisis de la Localización Subcelular de MYO-5-GFP

En *N. crassa* y *A. nidulans*, se ha demostrado que las miosinas de clase V se localizan en los ápices y septos de las hifas en crecimiento (Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Echauri-Espinosa, 2013); además la eliminación de esta proteína motora provocó alteraciones en la distribución de vesículas secretoras en el Spitzenkörper (Pantazopoulou *et al.*, 2014; Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Ramírez-del Villar, 2014). En *S. cerevisiae*, las Rab GTPasas Ypt31/32p y Sec4p interactúan directamente con Myo2p (miosina de clase V), en distintas etapas del tráfico vesicular (Jin *et al.*, 2011;

Lipatova *et al.*, 2008). Para determinar si existe una relación en la distribución y dinámica entre MYO-5 (NCU01440) de *N. crassa* y las vesículas secretoras asociadas a las Rabs, se realizaron análisis de la distribución intracelular de SEC-4 y MYO-5. Para el análisis de MYO-5, la proteína se etiquetó con GFP en el extremo C-terminal dejando un brazo flexible "linker" de 10 glicinas entre el dominio motor y la etiqueta fluorescente; además la expresión MYO-5-GFP fue regulada bajo el promotor propio P*myo5*. El motor molecular MYO-5 se observó principalmente en los ápices de las hifas en crecimiento en forma de kipá, extendiéndose desde la región del Spitzenkörper hacia el domo apical próximo a la membrana plasmática (Fig. 20 A, panel 1-3; Video S7). En la región posterior del domo apical, MYO-5-GFP se detectó frecuentemente a manera de nube en la región posterior de la zona de acumulación más alta de la fluorescencia (Fig. 20 A, panel 3, cabezas de flecha).

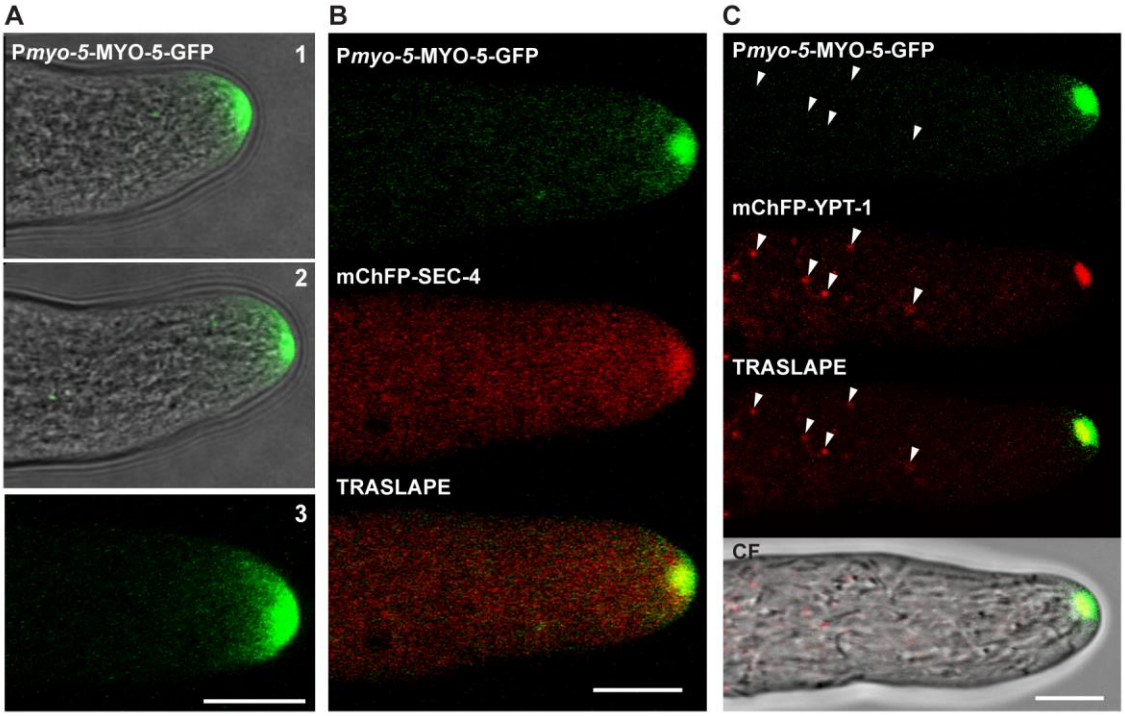


Figura 20. Distribución apical de la Miosina de Clase V, MYO-5, en hifas en crecimiento de *Neurospora crassa*.

A. Panel 1-3: El análisis por LSCM reveló la acumulación apical de MYO-5-GFP, expresado bajo el promotor nativo, con un patrón de distribución en forma de cúpula en las puntas de las hifas (flecha) que se extendía fuera de los límites de distribución Spitzenkörper. Nótese el gradiente de de fluorescencia dispersa en la región apical de las hifas (panel 3). Barra, 5 µm.
B. La co-expresión de MYO-5-GFP y mChFP-SEC-4 reveló la co-localización de ambas proteínas en la región del Spitzenkörper. Aunque MYO-5-GFP se observó también fuera del área del Spk, en el domo apical de la hifa. Nótese que la señal de fluorescencia dispersa en el citoplasma es más extensa para mChFP-SEC-4. Barra, 5 µm

C. La co-expresión de MYO-5-GFP y mChFP-YPT-1 mostró la ausencia de MYO-5 en las posibles cisternas de Golgi marcadas con YPT-1 (cabezas de flecha), mientras que en los ápices se mostró la presencia de YPT-1 en la región microvesicular del Spitzenkörper y dentro del área de distribución de MYO-5. CF: Contraste de Fases. Barra, 5 µm.

6.2.2 Análisis de la co-expresión de MYO-5 y las Rab GTPasas SEC-4 y YPT-1

La co-expresión de mChFP-SEC-4 y MYO-5-GFP reveló la localización de ambas proteínas en el Spitzenkörper (Fig. 20 B), aunque el patrón de distribución no fue similar. La distribución de MYO-5 se detectó acumulada en el Spitzenkörper con fluorescencia dispersa alrededor de esta estructura. SEC-4 se observó también en el Spitzenkörper aunque con una señal menos intensa; además se detectó una mayor concentración de fluorescencia citoplasmática a lo largo de las hifas a diferencia de MYO-5. La co-expresión de MYO-5-GFP con la Rab GTPasa mChFP-YPT-1 reveló diferencias en la distribución de ambas proteínas en el Spitzenkörper (Fig. 20 C). YPT-1 se identificó en la región microvesicular del Spitzenkörper mientras que MYO-5 se identificó en todo el Spitzenkörper además de la fluorescencia dispersa en el domo apical. No se observó la presencia de MYO-5 en las estructuras marcadas por YPT-1 en las zonas subapicales distales de la hifa (Fig. 20 C, cabezas de flecha).

6.3 Análisis del Flujo de Vesículas del Spk

6.3.1 Análisis FRAP

Aunque algunos estudios han revelado la distribución de marcadores moleculares en el Spitzenkörper, existe poca información respecto a la dinámica y tasas de recambio (turnover rates) de vesículas secretoras que fluyen al y desde el Spitzenkörper (Jones and Sudbery, 2010; Dijksterhuis and Molenaar, 2013). Para determinar la tasa de recambio de microvesículas y macrovesículas se condujo análisis FRAP mediante el fotoblanqueamiento de la fluorescencia del Spitzenkörper por 5 segundos. Ninguna señal fluorescente fue detectada en el área del Spitzenkörper inmediatamente después del fotoblanqueamiento (Fig. 21, área circular discontinua en tiempo 0.0 s). La recuperación de la fluorescencia de GFP-YPT-1, FM4-64, CHS-1-GFP, tDIMER-2-YPT-31 y GS-1-GFP ocurrió de manera progresiva en el Spitzenkörper (Fig. 21 A, panel 1-4), donde puntos fluorescentes aparecieron

segundos después del fotoblanqueamiento (Fig. 21 A, flechas). Se detectó un incremento gradual en el tiempo de la fluorescencia por GFP-YPT-1 o CHS-1-GFP en la zona microvesicular del Spitzenkörper, mientras que la acumulación de FM4-64 ocurrió en la zona circundante al área ocupada por GFP-YPT-1 (Fig. 21 A, panel 1 y 2). La recuperación de la fluorescencia de tDIMER-2-YPT-31 y GS-1-GFP ocurrió también de manera gradual aunque restringida al estrato macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 21 A, panel 3 y 4). El valor de tiempo medio de recuperación ($t_{1/2}$, Media ± Error Estándar), que corresponde al tiempo en el cual el 50% de la fluorescencia máxima (después del fotoblanqueado) fue alcanzada, se calculó para GFP-YPT-1, FM4-64, CHS-1-GFP, tDIMER-2-YPT-31 y GS-1-GFP a partir de los valores normalizados de recuperación de la fluorescencia (Fig. 21 B). El $t_{1/2}$ para GFP-YPT-1 fue de 15.5 ± 4.3 s (*n*= 11), para FM4-64 fue de 21.3 ± 5.7 s (*n*= 11), para CHS-1-GFP fue de 21.5 ± 3.7 s (*n*= 9), para tDIMER-2-YPT-31 fue de 9.9 ± 2.6 s (*n*= 9) y para GS-1-GFP fue de 10.2 ± 1.7 s (*n*= 12). La prueba estadística post-hoc Tukey-HSD [ANDEVA – análisis de varianza- de una vía] reveló diferencias significativas entre los $t_{1/2}$ de tDIMER-2-YPT-31 y GS-1-GFP comparado a los $t_{1/2}$ de CHS-1-GFP y FM4-64; mientras que no hubo diferencias significativas entre el $t_{1/2}$ de GFP-YPT-1 y el resto de los $t_{1/2}$ analizados.

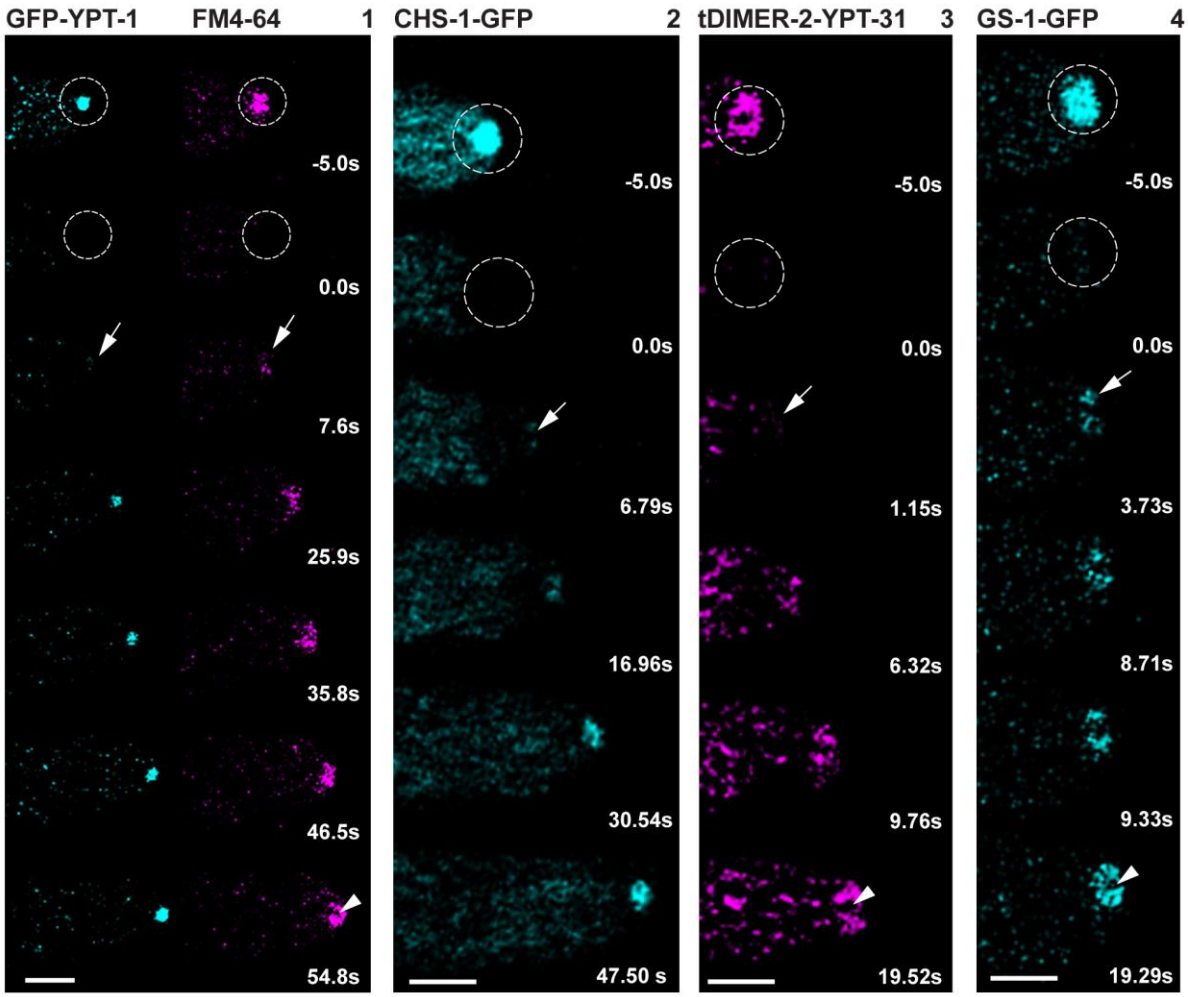


Figura 21A. Análisis FRAP de las Rab GTPasas YPT-1 y YPT-31 en el Spitzenkörper.

El fotoblanqueamiento se realizó por 5 segundos en la región apical de las hifas (área circular) antes de iniciar el proceso de captura continua de imágenes. Panel 1-4: FRAP en ápices de hifas de las cepas de *N. crassa* que expresan: GFP-YPT-1 (teñidas con FM4-64) (1), los marcadores del Spitzenkörper CHS-1-GFP (2), la Rab GTPasa tDIMER-2-YPT-31 (3), y GS-1-GFP (4). En todos los análisis FRAP se observaron puntos fluorescentes acumulándose en el Spitzenkörper gradualmente en el tiempo. Mientras que GFP-YPT-1 y CHS-1-GFP ocupaban el núcleo del Spitzenkörper, el colorante FM4-64 y las proteínas etiquetadas de YPT-31 y GS-1 se acumularon en la región externa del Spitzenkörper (flechas); Nótese la ausencia de estos tres últimos marcadores en el núcleo del Spitzenkörper (cabezas de flecha). Barras, 5 µm.

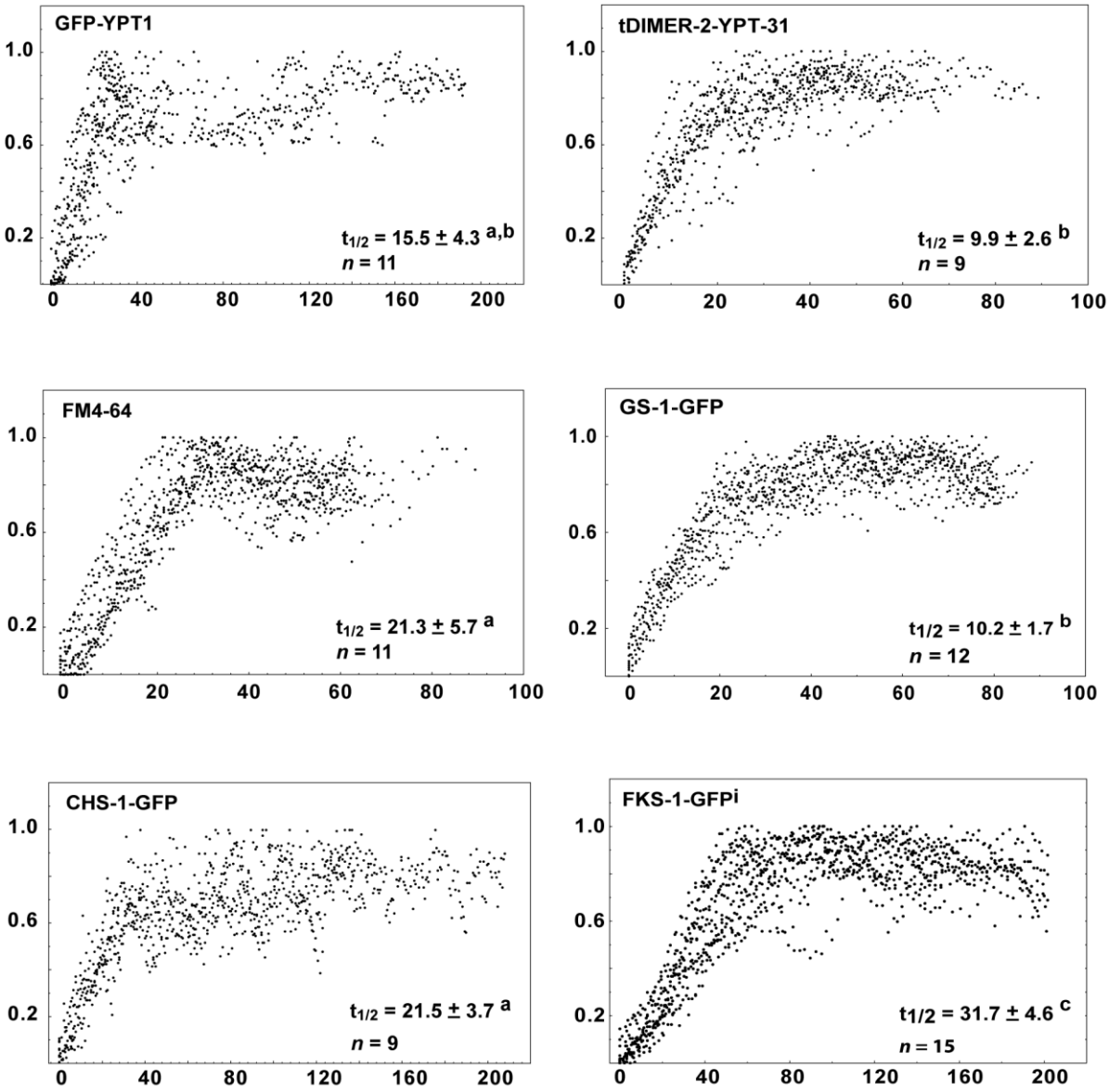


Figura 21B. Análisis FRAP de las Rab GTPasas y marcadores del Spitzenkörper.

Se muestran gráficas obtenidas con los valores normalizados de los análisis FRAP y los tiempos medios de recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$= segundos; Media ± Error Estándar, P< 0.05) de hifas que expresaron GFP-YPT-1, CHS-1-GFP, tDIMER-2-YPT-3, GS-1-GFP, FKS-1-GFP^{i} e hifas teñidas con FM4-64. Valores de $t_{1/2}$ con la misma letra (i.e., a, b o c) no son significativamente diferentes en el test post hoc Tukey HSD (ANDEVA de una vía; F [5, 61]=15.915; P<0.00001). Las abscisas y ordenadas muestran el tiempo (en segundos) y los valores de recuperación de la fluorescencia normalizada, respectivamente.

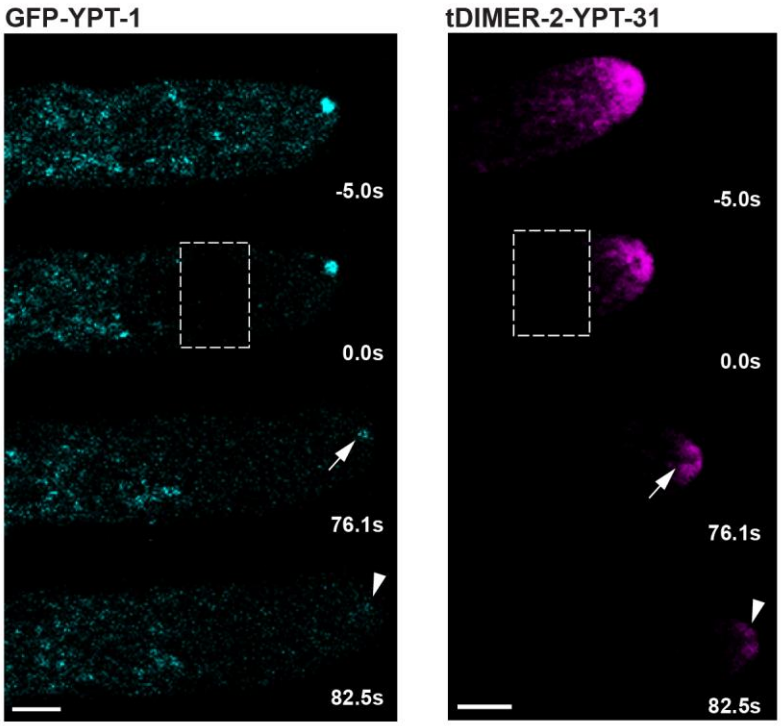


Figura 21C. Análisis FRAP y FLIP de las Rab GTPasas YPT-1 y YPT-31 en el Spitzenkörper.

Análisis de la pérdida de la fluorescencia después del fotoblanqueado (FLIP) de GFP-YPT-1 y tDIMER-2-YPT-31. Se muestran series de tiempo de hifas fotoblanqueadas en regiones subapicales ~ 80 μm^2. Nótese la reducción de la intensidad de la fluorescencia en el Spitzenkörper para ambas proteínas. Barra, 5 μm.

6.3.2 Análisis FLIP

Los análisis FRAP de las Rab GTPasas YPT-1 y YPT-31 revelaron la existencia de una alta tasa de recambio de estas proteínas en el Spitzenkörper, sin embargo, se desconoce si estas proteínas se asocian a las vesículas directamente en el Spitzenkörper o antes de que lleguen a esta estructura. Para determinar si el fotoblanqueamiento en regiones subapicales de la hifa provocaba una reducción en la intensidad fluorescente del Spitzenkörper se realizó análisis FLIP. Después de fotoblanquear hifas que expresaban GFP-YPT-1 o tDIMER-2-YPT-31 en una región subapical de ~ 80 μm^2, se observó una reducción gradual de la fluorescencia en el Spitzenkörper (Fig. 21 C). Para GFP-YPT-1 se observó una reducción del 78.3 ± 5.6 % (*n*= 10) de la señal fluorescente en el Spitzenkörper transcurridos ~40 s después

del fotoblanqueamiento. De manera similar la señal fluorescente de tDIMER-2-YPT-31 en el Spitzenkörper se redujo en un 80.5 ± 9.8 % (*n*= 16) a los 44 s.

6.3.3 Análisis TIRFM

Los análisis por Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRFM), confirmaron la localización de mChFP-YPT-1 en vesículas (Fig. 22 A y B, cabezas de flecha) y en cisternas de Golgi putativas (Fig. 22 A y B, flechas), las cuales se desplazaban con un dinámica distinta (Fig. 22 B). Las quimografías no solo confirmaron variaciones en las velocidades de las estructuras marcadas con YPT-1 (Fig. 22 C, panel 1), sino que detectaron que el movimiento fue principalmente paralelo respecto al eje longitudinal de crecimiento de las hifas (Fig. 22 C, panel 2). Trazos de la rutas de las partículas fluorescentes obtenidos de las quimografías revelaron que las vesículas se mueven de manera anterógrada y retrógrada en un rango de velocidad de 0.4-4 μm/s (*n*> 50) (Fig. 22 C, panel 3 y 4), en contraste con el movimiento reducido (< 0.5 μm/s, *n*> 20) y anterógrado registrado para las putativas cisternas de Golgi (Fig. 22 C, panel 5).

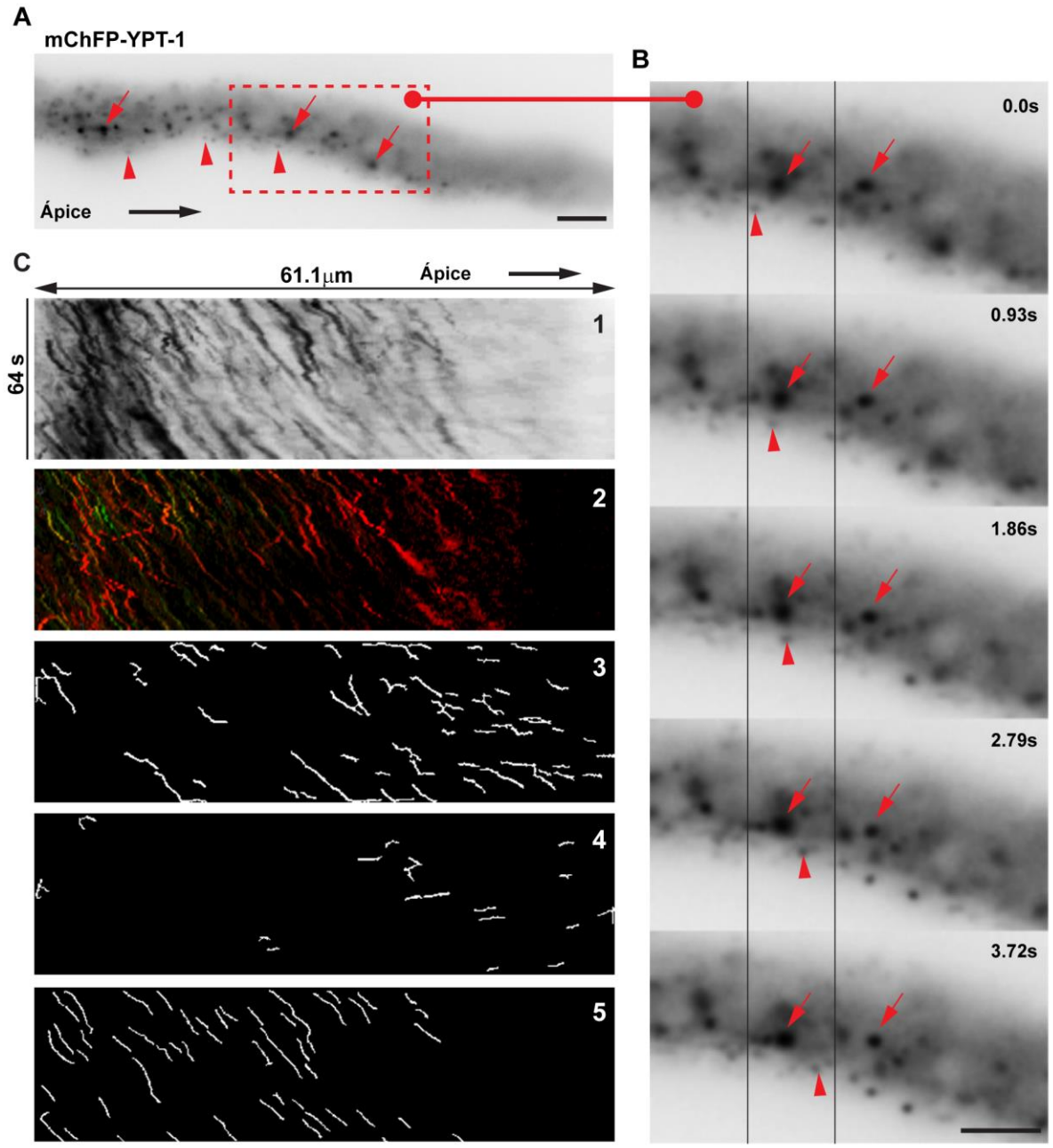


Figura 22. Análisis de la dinámica de estructuras asociadas a mChFP-YPT-1.

A. Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Total Interna (TIRFM) reveló la localización de mChFP-YPT-1 en vesículas (cabezas de flecha) y en supuestas cisternas de Golgi (flechas). Barra, 5 µm.
B. Magnificación digital de imágenes en serie de tiempo (del recuadro en A) mostrando cambios espaciales de estructuras asociadas a mChFP-YPT-1. Nótese el desplazamiento considerable de vesículas (cabezas de flecha) en contraste con el movimiento reducido de las cisternas de Golgi putativas (flechas). Barra, 5 µm.
C. Panel 1: Quimógrafía de la hifa en A mostrando la relación espacio-temporal de estructuras relacionadas que contienen mChFP-YPT-1. Panel 2: Quimógrafía de color, como en Panel 1, mostrando el cambio posicional, perpendicular al eje longitudinal de las hifas, de estructuras marcadas con mChFP-YPT-1; Los colores verdes, amarillos y rojos representan a vesículas y cisternas de Golgi marcadas con mChFP-YPT-1 en las secciones superior, media e inferior de las

hifas, respectivamente. Nótese la baja cantidad de movimiento perpendicular de estructuras con YPT-1. Paneles 3 y 4, muestran trazos de vesículas asociadas con mChFP-YPT-1 obtenidas de la quimógrafía (Panel 1) con velocidades en el rango de 0.4-4 μm s^{-1}, con movimiento anterógrado y retrógrado, respectivamente. Panel 5: Se muestran trazos de cisternas de Golgi con movimientos anterógrado, obtenidas de la quimógrafía en Panel 1, con velocidades <0.5 μm s^{-1}.

6.4 Análisis de proteínas secretadas asociadas al Spitzenkörper

6.4.1 Análisis de proteínas secretadas

Para el análisis in vivo de vesículas secretoras en *N. crassa* se procedió a etiquetar con GFP, de manera endógena, cuatro proteínas de secreción: Invertasa-1 [*inv-1* (NCU04265.7)], celulasa [*gh61-1* (NCU02240.7)], β-D-glucosidasa [*gh3-4* (NCU04952.7)] y la catalasa-3 [*cat-3* (NCU00355.7)]. Para cada constructo, se obtuvieron al menos 25 transformantes, de las cuales ninguna resultó positiva. Para determinar si un cambio en la molécula fluorescente permitiría visualizar proteínas secretadas se etiquetaron con mChFP, utilizando la misma estrategia anterior, la invertasa-1, celulasa y β-D-glucosidasa. Se obtuvieron ~30 transformantes para la construcción INV-1-mChFP, ~210 transformantes para la β-D-glucosidasa y ~120 transformantes para la celulasa. Se seleccionaron 20 de ellas y ninguna transformante fue positiva. Por esa razón se generaron vectores recombinantes para la fusión carboxilo terminal con la variante de la proteína verde fluorescente GFP Superfolder (SFGFP), la cual se caracteriza por tener un plegamiento rápido evitando la formación de dímeros y posibles problemas de plegamiento causados por la exposición a condiciones muy oxidantes del retículo endoplasmático (Aronson *et al.*, 2011). Se logró obtener dos vectores recombinantes: pESL11-5 y pESL12-5 con las fusiones INV-1-SFGFP y GH3-4-SFGFP, respectivamente. Se analizaron por microscopía confocal las cepas transformantes para ambas construcciones, y solo se obtuvieron transformantes positivas para la expresión de INV-1-SFGFP.

6.4.1.1 Localización subcelular de la invertasa 1 (INV-1)

INV-1 se observó acumulada en los ápices de hifas en crecimiento (Fig. 23 A, Video S8, Video S9), específicamente en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 23 A, recuadro). A lo largo de las hifas, no se observó la acumulación de la proteína en alguna estructura en específico, pero se detectó fluorescencia dispersa en zonas

proximales subapicales (Fig. 23 A, Video S9). En zonas distales de algunas de las hifas analizadas se observó INV-1 localizada en septos y regiones corticales (Fig. 23 B, Video S10). En conidios la INV-1 se observó acumulada en toda la superficie celular (Fig. 23 C), mientras que en las distintas etapas de la germinación no se observó la presencia de la proteína en la superficie del tubo germinativo (Fig. 23 D).

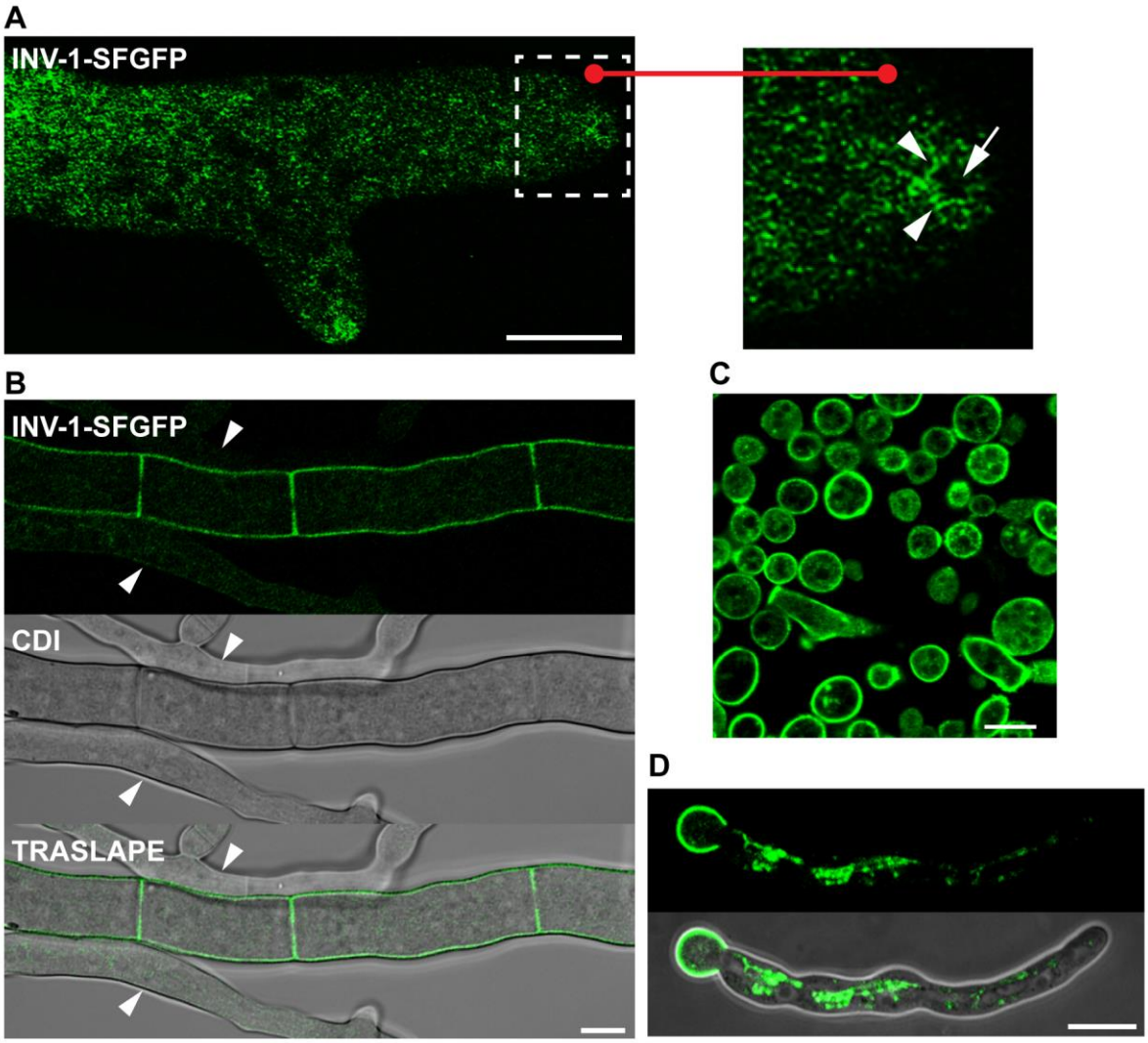


Figura 23. Distribución subcelular de la invertasa 1 (INV-1-SFGFP).

A. El análisis por LSCM reveló la distribución de INV-1-SFGFP en la región apical de las hifas, y en regiones subapicales distales se observó señal fluorescente dispersa en el citoplasma. Recuadro: Nótese la acumulación de INV-1-SFGFP en la región macrovesicular del Spitzenkörper (cabezas de flecha) formando un tipo de anillo alrededor de un espacio libre de fluorescencia (flecha). Barra, 10 µm.

B. En zonas alejadas del borde de la colonia, INV-1-SFGFP se presentó en septos y regiones de la superficie celular de algunas de las hifas. Nótese la ausencia de la proteína en otras hifas (cabezas de flecha) de la misma colonia. CDI: Contraste Diferencial de Interferencia. Barra, 10 µm.

C. INV-1-SFGFP se mostró en la superficie celular de los conidios distribuida a manera de una capa gruesa. Barra, 10 µm.
D. En tubos germinativos se observó a INV-1-SFGFP en las parede del conidio pero ausente de la superficie celular de las células. Nótese la acumulación de la proteína en estructuras vesiculares distribuidas a lo largo de la hifa. Barra, 10 µm.

6.4.1.2 Análisis de densidad y actividad de fracciones con INV-1-SFGFP

Los análisis por Western blot, de dos muestras independientes, de las fracciones obtenidas en los gradientes de densidad (10-65%) permitieron detectar dos picos de concentración de INV-1-SFGFP (Fig. 24 B, línea negra); El pico más alto se identificó en la fracción 5 el cual tenía una densidad de 1.088 g/mL, mientras que el pico menor se identificó en la fracción 12 cuya densidad fue de 1.147 g/mL. El análisis de actividad invertasa (Fig. 24 B, línea azul) se realizó de las mismas fracciones analizadas por Western blot. La fracción 5 mostró el nivel más alto de actividad invertasa.

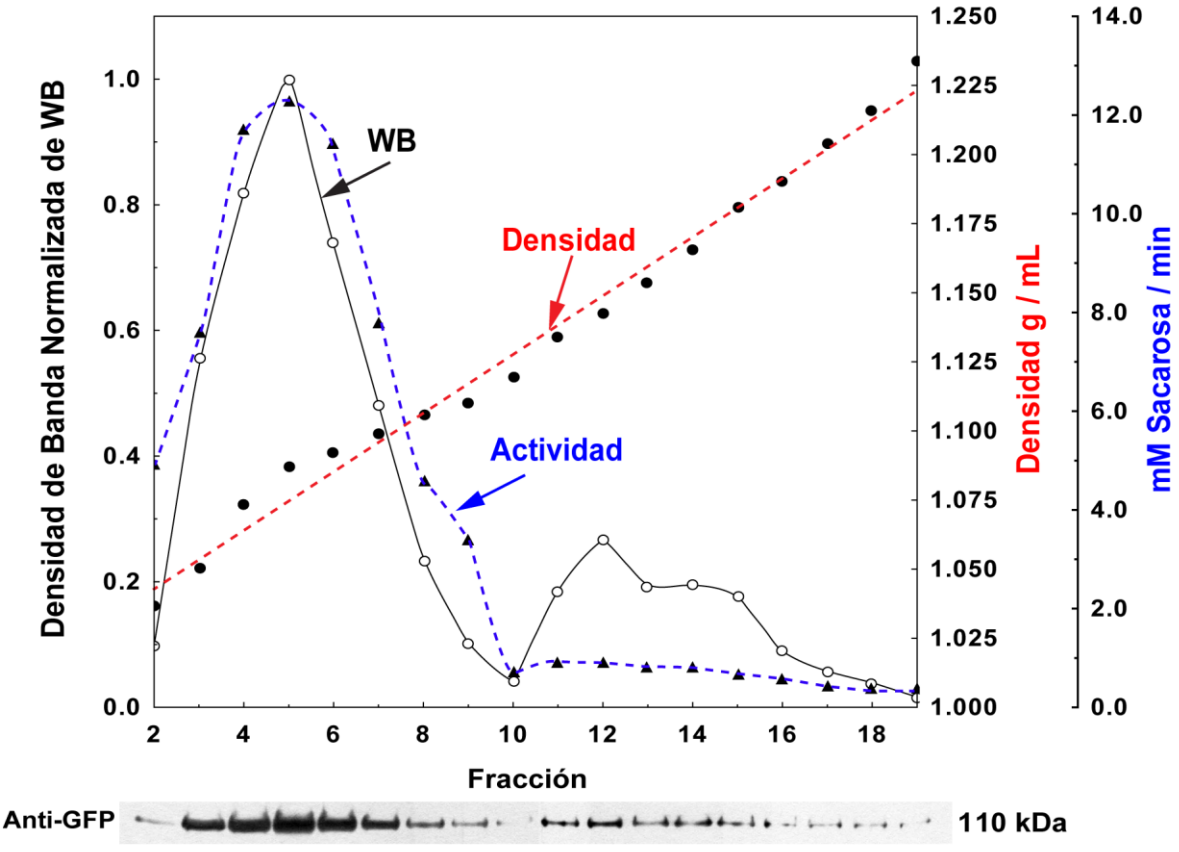


Figura 24. Sedimentación y análisis de actividad de partículas con INV-1-SFGFP.

Homogenizados de extractos celulares (sobrenadantes de 1,000 x *g*) de la cepa de *N. crassa* que expresa INV-1-SFGFP fueron fraccionados por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa (10-65%) a 184,000 x *g* por 4 h. Se identificaron por Western blot bandas de 110 kDa, utilizando el anticuerpo anti-GFP, correspondientes a INV-1-SFGFP en las fracciones 2 a 19. Los picos más altos de concentración se detectaron en la fracción 5 de densidad de 1.088 g/mL, y el de menor concentración en la fracción 12 de densidad de 1.147 g/mL. Las ordenadas muestran el promedio de valores normalizados de los análisis por Western blot (línea negra) y el valor promedio de densidad de sacarosa (línea roja). El análisis de la actividad invertasa mostró una alta actividad en las fracciones 3 a 7, con el nivel más alto de actividad en la fracción 5 de densidad (1.075 g/mL). Nótese la coincidencia en las fracciones 2 a 10 en el patrón de distribución de INV-1-SFGFP del Western blot y los niveles de actividad. Ambos análisis se realizaron con las mismas fracciones en dos experimentos independientes. F: Fracción.

6.4.2 Análisis de FKS-1

6.4.2.1 Análisis Estructural de FKS-1 (NCU06871) en *N. crassa*

Mediante la búsqueda y alineamiento en BLAST se detectaron en otras especies fúngicas secuencias de proteínas con un alto nivel de identidad (64%) y de similitud (77%) con respecto a la secuencia aminoacídica de FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa* (Tabla 6). La identidad promedio en relación a la FKS-1 de *N. crassa* fue más alta con las especies de hongos filamentosos (73%) que con las especies fúngicas levaduriformes (57%). De la misma manera, la similitud promedio fue mayor para las especies filamentosas (83%) que para las levaduras (72%). Todas las proteínas identificadas en el alineamiento incluyendo a FKS-1 de *N. crassa* poseen: 1) el dominio FKS1_dom1 (Pfam 14288), el cual se encuentra río arriba del primer dominio transmembranal y que probablemente está involucrado en la actividad glucano sintasa (Okada *et al.*, 2010) y 2), y el dominio denominado componente β-1,3 glucano sintasa (Pfam02364), que se encuentra en la región carboxilo terminal y que comprende ~870 residuos (Mio *et al.*, 1997). Además se determinó mediante una búsqueda BLAST de proteínas en el genoma de *N. crassa* que la FKS-1 de *N. crassa* (NCU06871.7) no comparte homología con alguna otra proteína. Mediante la predicción de las regiones transmembranales se determinó que FKS-1 y sus homólogos más cercanos contienen de 13 a 18 dominios transmembranales (DTMs) (Tabla 6, Fig. 25 A y B).

Tabla 6. Análisis comparativo y detección de los homólogos más cercanos de la β-1,3 glucano sintasa (FKS-1, NCU06871.7) en *N. crassa*.

Organismo	Proteína	N° Acceso*	Descripción	ID	SIM	Valor E.	DTMs
M. oryzae	FKS1	XP_003718107.1	β-1,3-glucan synthase component FKS1 [*M. oryzae* 70-15]	76%	85%	0.00	16
C. posadasii	FKS1	XP_003065511.1	β-1,3-glucan synthase [*Coccidioides posadasii* C735 delta SOWgp]	75%	84%	0.00	14
C. immitis	FKS1	XP_001247982.1	β-1,3-glucan synthase component [*Coccidioides immitis* RS]	75%	84%	0.00	15
A, fumigatus	FksP	XP_751118.1	β-1,3-glucan synthase catalytic subunit FksP [*A. fumigatus* Af293]	72%	82%	0.00	14
A, fumigatus	FksP	EDP49808.1	β-1,3-glucan synthase catalytic subunit FksP [*A. fumigatus* A1163]	72%	82%	0.00	14
A. nidulans	FKS-1	XP_661333.1	hypothetical protein AN3729.2 [*A. nidulans* FGSC A4]	72%	83%	0.00	16
A. niger	FKS1	XP_001390977.1	β-1,3-glucan synthase component FKS1 [*A. niger* CBS 513.88]	71%	81%	0.00	16
C. albicans	GLS2	EEQ43214.1	β-1,3-glucan synthase component GLS2 [*C. albicans* WO-1]	54%	70%	0.00	18
S. pombe	Bgs4	NP_588501.1	β-1,3-glucan synthase subunit Bgs4 [*S. pombe* 972h-]	57%	73%	0.00	16
S. pombe	Bgs2	NP_594032.1	β-1,3-glucan synthase subunit Bgs2 [*S. pombe* 972h-]	58%	74%	0.00	16
S. pombe	Bgs1	NP_595971.1	β-1,3-glucan synthase catalytic subunit Bgs1 [*S. pombe* 972h-]	54%	70%	0	13
S. pombe	Bgs3	NP_594766.1	β-1,3-glucan synthase subunit Bgs3 [*S. pombe* 972h-]	53%	71%	0	16
S. cerevisiae	Fks1p	NP_013446.1	Fks1p [*S. cerevisiae* S288c]	62%	75%	0.00	13
S. cerevisiae	Gsc2p	NP_011546.3	Gsc2p [*S. cerevisiae* S288c]	61%	74%	0	14
S. cerevisiae	Fks3p	NP_014036.1	Fks3p [*S. cerevisiae* S288c]	55%	71%	0.00	18

*Búsqueda Blast utilizando la secuencia amino acídica de la proteína FKS-1 (XP_957980.1) de *N. crassa*. DTMs: Dominios Transmembranales. ID y SIM: Identidad entre aminoácidos. SIM: Similitud entre aminoácidos.

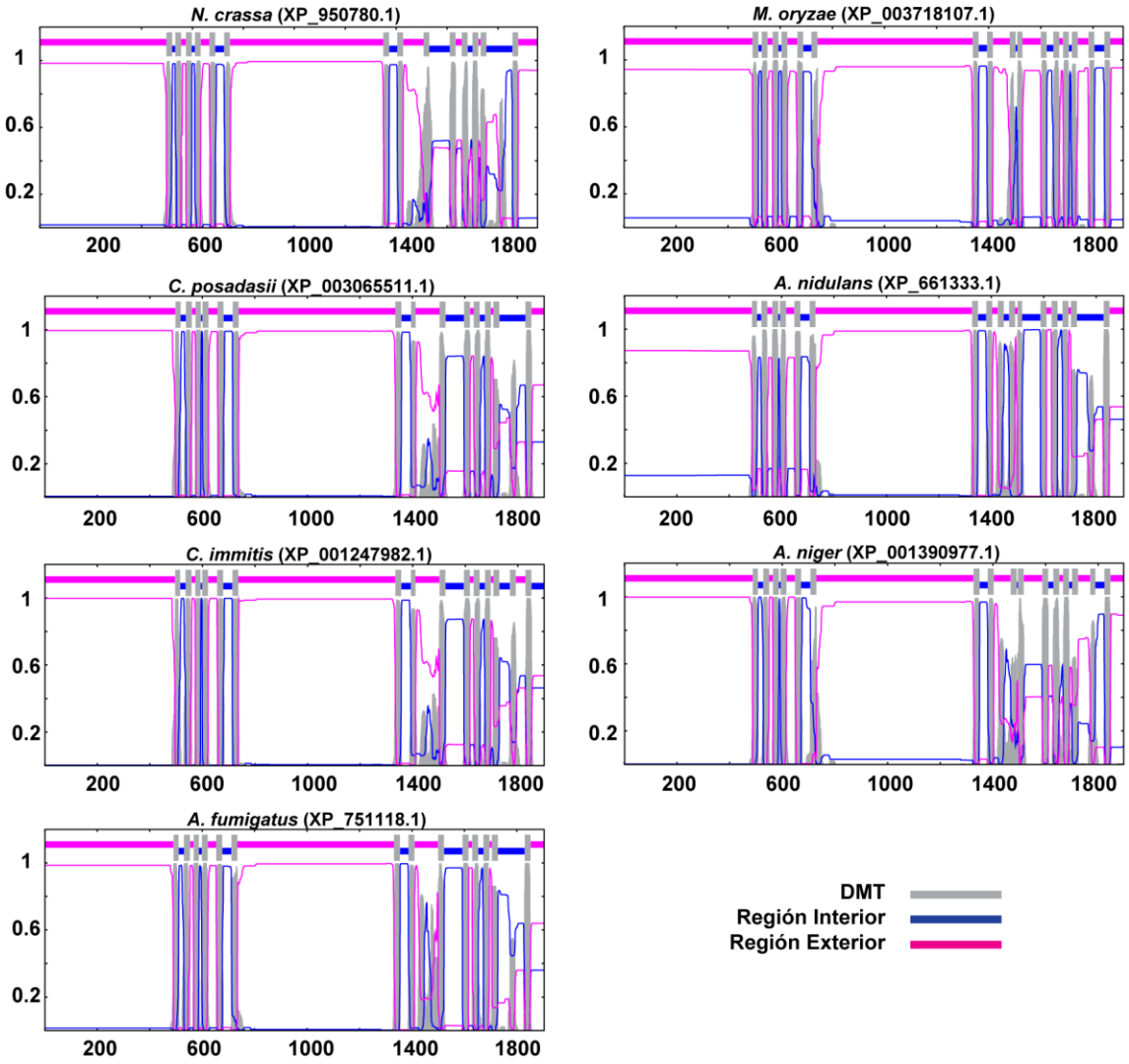


Figura 25A. Predicción de la topología de FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa* y de proteínas homólogas en hongos filamentosos.

A y B. Gráficas con las predicciones de la topología de los homólogos más cercanos para la FKS-1 de *N. crassa* con el programa TMHMM Server (v. 2.0). En la parte superior de cada gráfica (entre los valores 1 y 1.2) se indica, utilizando el algoritmo N-best, la mejor predicción para la localización de residuos en alfa hélices. Nótese que los DTMs están agrupados entre los residuos 400 y 800 (~6 DTMs), y entre los residuos 1300 y 1900 (~9 DTMs). El número total de DMTs de cada proteína se indican en la Tabla 6.

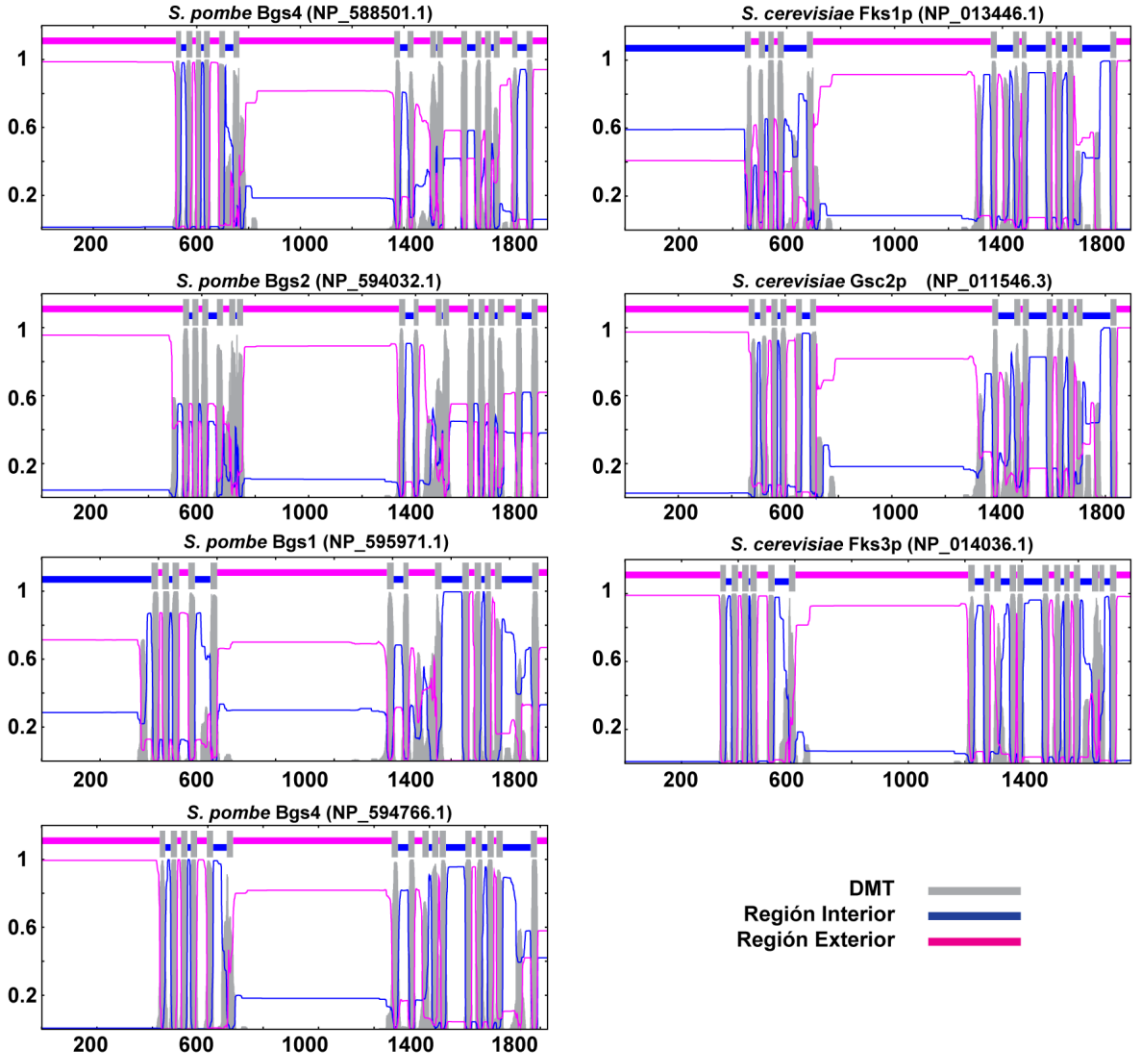


Figura 25B. Predicción de la topología de FKS-1 (NCU06871.7) de *N. crassa* y de proteínas homólogas en hongos levaduriformes.

A y B. Gráficas con las predicciones de la topología de los homólogos más cercanos para la FKS-1 de *N. crassa* con el programa TMHMM Server (v. 2.0). En la parte superior de cada gráfica (entre los valores 1 y 1.2) se indica, utilizando el algoritmo N-best, la mejor predicción para la localización de residuos en alfa hélices. Nótese que los DTMs están agrupados entre los residuos 400 y 800 (~6 DTMs), y entre los residuos 1300 y 1900 (~9 DTMs). El número total de DMTs de cada proteína se indican en la Tabla 6.

6.4.2.2 Expresión y Localización Subcelular de FKS-1-GFP[i]

Hasta ahora la localización in vivo de los homólogos de la FKS-1 en hongos filamentosos no se ha descrito; los intentos para el etiquetamiento con proteínas fluorescentes tanto en el extremo amino como carboxilo terminal no han sido exitosos. Por ello se procedió a etiquetar a la FKS-1 (NCU06871.7) con la GFP

dentro del marco abierto de lectura, es decir de manera “interna”, denominando a la etiqueta GFP^{i} para distinguir el tipo de etiquetamiento. Los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho (Fig. 26 B) se obtuvieron al final de tres rondas consecutivas de PCR (Fig. 26 C-E), se purificaron y utilizaron para transformar la cepa FGSC 9718 de *N. crassa*. Se obtuvieron alrededor de siete transformantes positivas que mostraron fluorescencia.

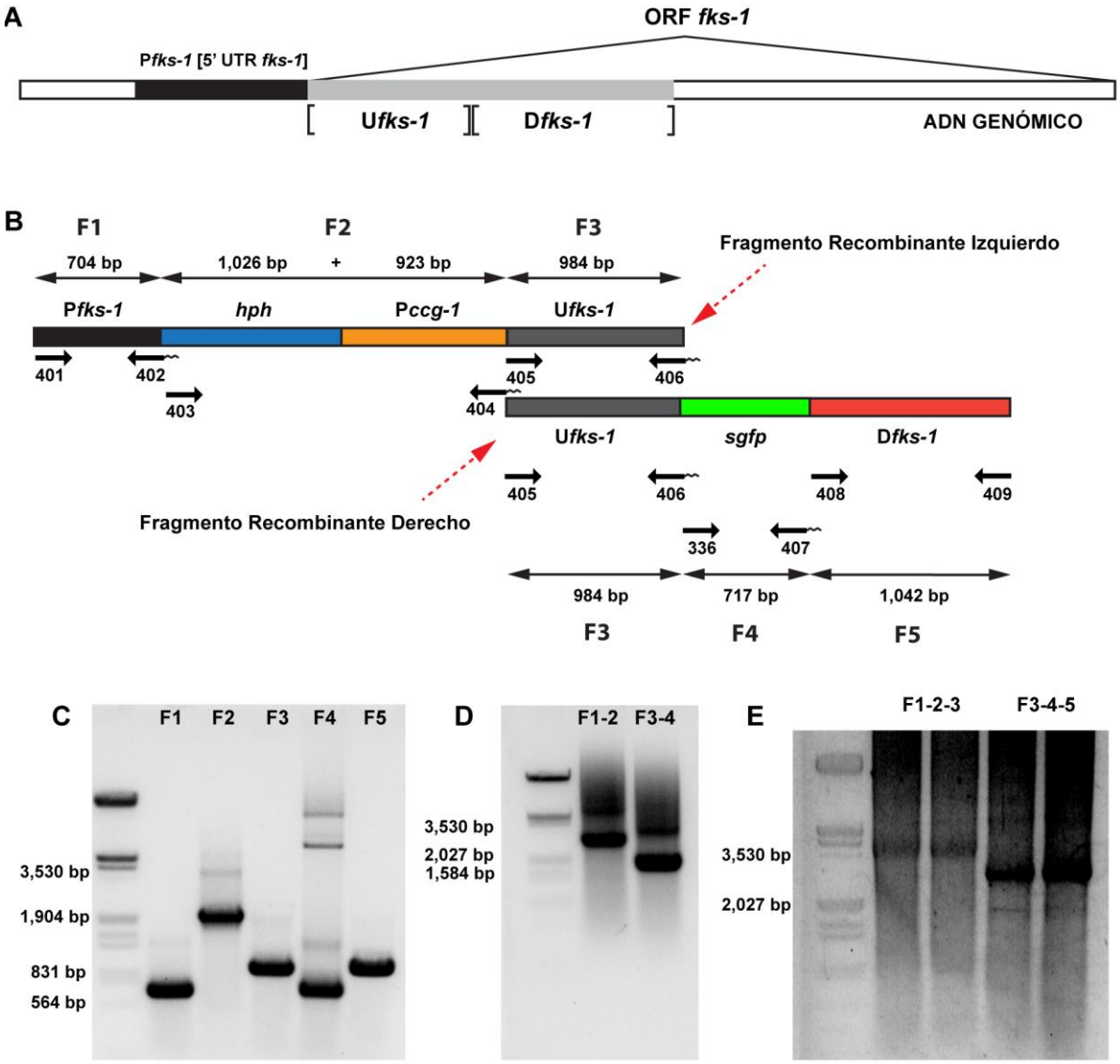


Figura 26. Estrategia de etiquetamiento de la subunidad FKS-1 del complejo β-1,3-glucano sintasa en *N. crassa*.

A. Ilustración de la estrategia de etiquetamiento interno de FKS-1 con GFP. El sitio de inserción de la *gfp* se realizó después de la base 910 dentro del marco abierto de lectura de *fks-1* (NCU06871.7). Se muestran los 3 sitios de recombinación que se distribuyen: en la región

promotora (P*fks-1*), desde el codón de inicio hasta la base 909 (U*fks-1*), desde la base 910 a 1951 (D*fks-1*).

B. Ilustración mostrando los fragmentos recombinantes izquierdo y derecho, los cuales contenían los tres sitios de recombinación. El fragmento recombinante izquierdo se diseñó con cuatro fragmentos desde el extremo 5' al 3': P*fks-1* (fragmento UTR 5' del gen *fks-1*), *hph* (gen de resistencia a la higromicina), P*ccg-1* (promotor *ccg-1*), y U*fks-1* (región río arriba del marco abierto de lectura). El fragmento recombinante derecho se generó con tres fragmentos que incluían desde el extremo 5' al 3': U*fks-1* (igual al anterior), s*gfp* (gen de la variante de la GFP) y D*fks-1* (fragmento río debajo de U*fks-1* en el marco abierto de lectura del gen *fks-1*). Se muestran los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos 401-409 y 336 (ver Tabla 4) y tamaño de cada uno de los fragmentos. F: fragmento.

C. Se muestran las bandas de ADN F1-F5 correspondientes a los fragmentos que se indican en B, para la generación de los casetes recombinantes izquierdo y derecho. F1: 704 bp, F2: 1,949 bp, F3: 984 bp, F4: 717 bp, F5: 1,042 bp.

D. Se muestran las bandas F1-2 y F3-4 correspondientes a la fusión de amplicones individuales obtenidos en A en la segunda ronda de PCR (i.e., F1-2= F1 + F2). F1-2: 2,653 bp, F3-4: 1,701 bp.

E. Se muestran los amplicones obtenidos en la tercera ronda de PCR correspondientes a la fusión de los fragmentos F1-2 con el amplicón F3, y los amplicones producto de la fusión del fragmento F3-4 con el amplicón F5, generando los fragmentos F1-2-3 y F3-4-5 respectivamente. F1-2-3: 3,637 bp, F3-4-5: 2,743 bp.

Debido a que la estrategia de transformación involucró tres sitios de recombinación (P*fks-1*, *Ufks-1*, *Dfks-1*; Fig. 26 B), es posible que fragmentos individuales se hubieran recombinado en el genoma de la cepa parental FGSC 9718. Para descartar esta posibilidad, se realizaron ensayos de inmuno-precipitación y Western blot de extractos celulares de la transformante seleccionada FKS-1-GFP^{i}. Se confirmó por Western blot la expresión de una proteína de alto peso molecular ~250 kDa, la cual coincide con el tamaño aproximado de la construcción FKS-1 (223 kDa) unida a la GFP (27 kDa) (Fig. 27 A y B). La integración de los fragmentos recombinantes en la transformante se confirmó por PCR utilizando como templado el ADN genómico de la transformante y oligonucleótidos que amplificaban los fragmentos P*fks-1*/*hph* y U*fks-1* /D*fks-1* del ORF de FKS-1 (Fig. 27 C y D).

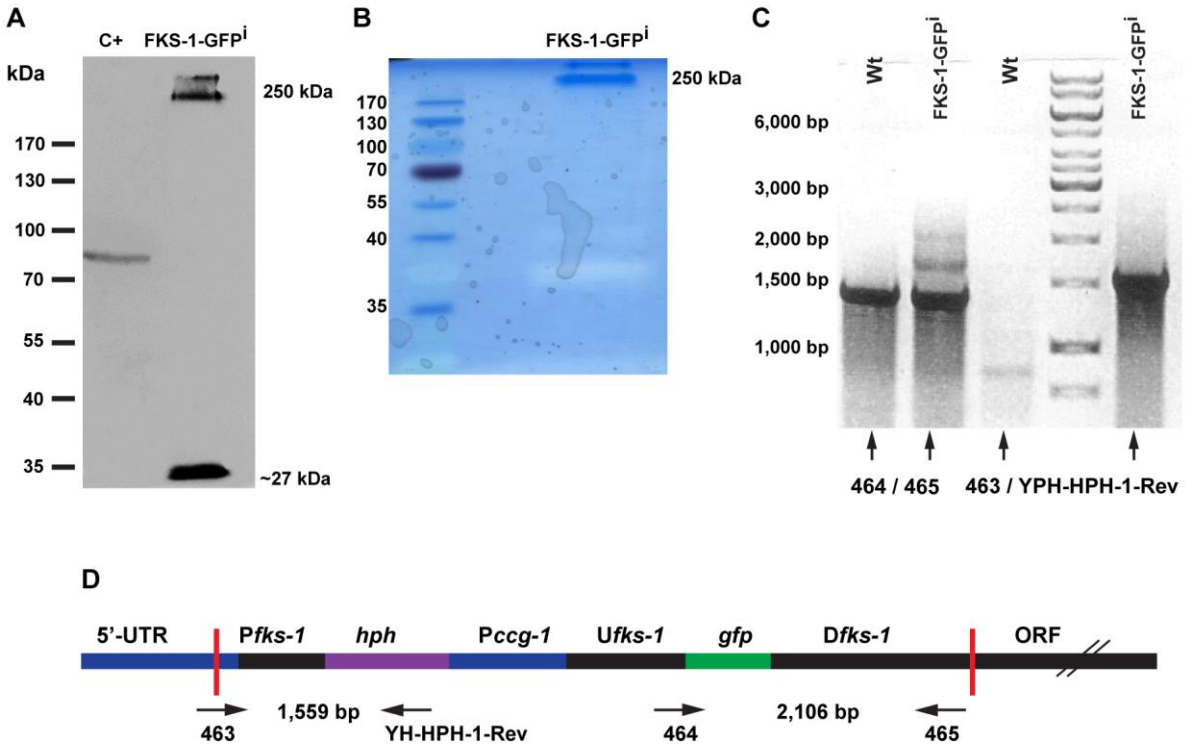


Figura 27. Análisis de expresión de FKS-1-GFP^{i} y confirmación de la integración de fragmentos recombinantes en el genoma de transformante.

A y B. Detección de banda (~250 kDa), obtenida por inmunoprecipitación y Western blot, de un extracto celular de la cepa que expresa FKS-1-GFP^{i} utilizando el anticuerpo anti-GFP (A) y mediante tinción con azul de Coomasie en geles SDS de poliacrilamida al 10% (B). Nótese la presencia de una banda de ~27 kDa. C+: Control positivo.

C. Determinación de la integración del casete de transformación en la cepa transformante heterocarionte que expresa FKS-1-GFP^{i}. Amplicones obtenidos a partir de ADN genómico de la transformante: Las bandas en los carriles 2 (2,106 bp y 1,389 bp) y 4 (1,559 bp) corresponden a la amplificación utilizando los oligonucleótidos 464/465 y 463/YH-HPH-1-Rev, respectivamente (ver en D). Amplicones obtenidos a partir de ADN genómico de la cepa silvestre de *N. crassa* como control: La banda 1 (1,389 bp) y el carril 3 corresponden a los productos de PCR usando los oligonucleótidos 464/465 y 463/YH-HPH-1-Rev, respectivamente.

D. Ilustración de la integración del casete de transformación en la cepa transformante que expresa FKS-1-GFP^{i}. Se indican los sitios de hibridación de los oligonucleótidos (ver Tabla 4) de comprobación utilizados en el análisis por PCR (ver en C).

Se observó a FKS-1-GFP^{i} en la región apical de las hifas. FKS-1-GFP^{i} se identificó en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Fig. 28 A, panel 1, cabeza de flecha; Fig. 28 B) y en la superficie celular desde el domo apical extendiéndose hacia la región proximal subapical de las hifas (Fig. 28 A, panel 1, flechas). En ocasiones fue posible observar a la proteína en la región anterior del Spitzenkörper próximo a la membrana plasmática (Fig. 28 A, panel 2) y en sitios de ramificación (Fig. 28 A, panel 2, cabezas de flecha). La co-localización de FKS-1-GFP^{i} y FM4-64 en el

Spitzenkörper confirmó la posible asociación de FKS-1-GFP^{i} con las macrovesículas del Spitzenkörper (Fig. 28 B). En la mayoría de las observaciones se determinó que FKS-1-GFP^{i} se encontraba ausente en una región central reducida del Spitzenkörper, la cual coincidía parcialmente con la región microvesicular del Spitzenkörper (Fig. 28 A; Fig. 28 B, panel central). Debido a la alta intensidad de la señal fluorescente emitida por FKS-1-GFP^{i} en los ápices de las hifas, la mayoría de las observaciones se realizaron con niveles bajos de potencia del láser. De manera interesante no se observó la presencia de FKS-1-GFP^{i} en septos en formación (Fig. 28 C). No se observó acumulación de GFP en la superficie celular de conidios (Fig. 29, panel 1), mientras que en germínulas se observó la presencia de FKS-1 en la superficie celular apical (Fig. 29, panel 2 y 3).

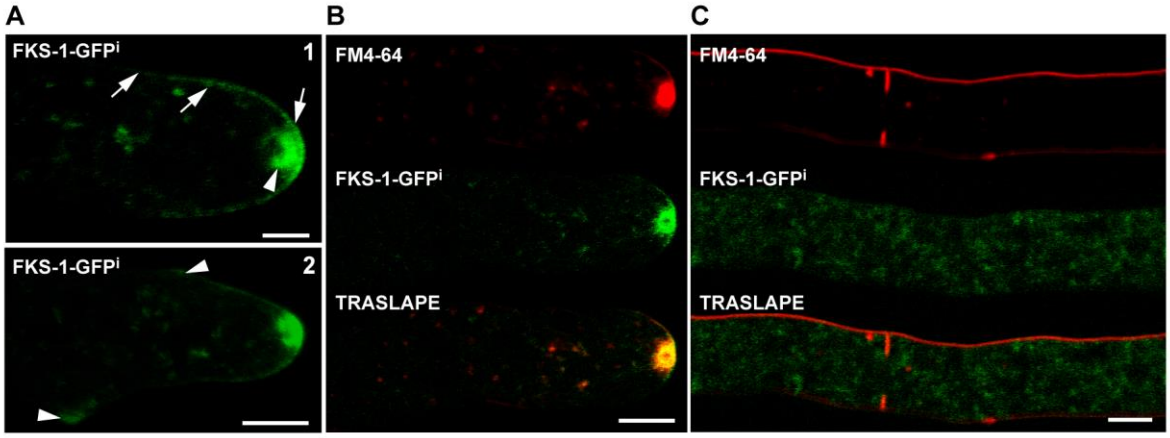


Figura 28. Distribución subcelular de FKS-1-GFP^{i} en hifas en crecimiento de *N. crassa*.

A. Panel 1: El análisis por LSCM reveló la acumulación de FKS-1-GFP^{i} en los ápices de hifas en crecimiento. Se observó a la proteína distribuida en la región macrovesicular del Spitzenkörper (Panel 1, cabezas de flecha). En algunas ocasiones la FKS-1-GFP^{i} distribuida en la región macrovesicular del Spitzenkörper se observó muy cercana a la superficie celular apical. FKS-1-GFP^{i} en la superficie celular apical y subapical de la hifa (flechas). Panel 2: Acumulación de FKS-1-GFP^{i} en regiones próximas a la membrana plasmática en sitios de ramificación. Barras, 5 µm.
B. Distribución de FKS-1-GFP^{i} en la región macrovesicular del Spitzenkörper en hifas teñidas con FM4-64. Barra, 5 µm.
C. Hifa teñida con FM4-64 mostrando septo en formación. En ninguna ocasión se observó a FKS-1-GFP^{i} durante la formación de septos (n> 20). Barra, 5 µm.

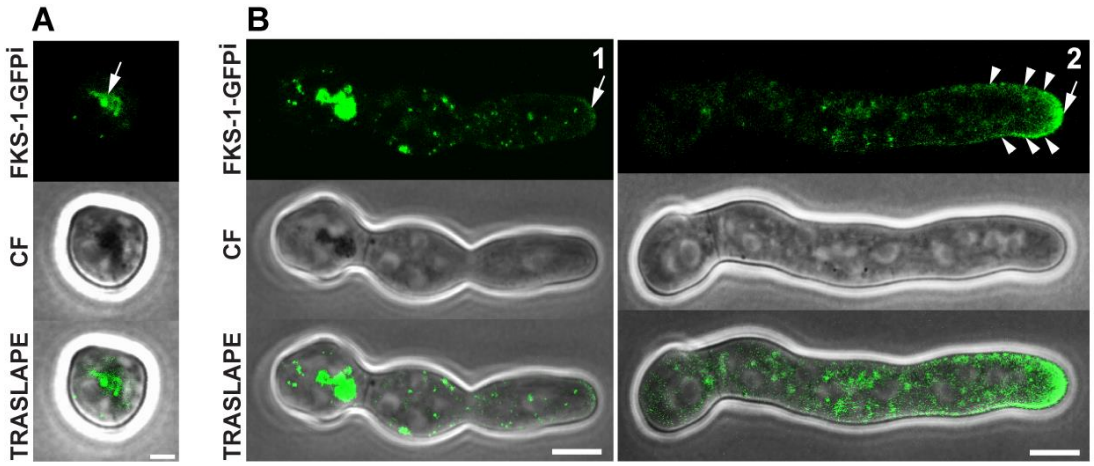


Figura 29. Distribución subcelular de FKS-1-GFP^{i} en germínulas en crecimiento de *N. crassa*.

A. Análisis por LSCM de FKS-1-GFP^{i} mostraron que en conidios la proteína se localiza de manera no específica en el interior de la célula (flecha). Nótese la ausencia de FKS-1-GFP^{i} en regiones corticales del conidio. Barra, 2 µm.
B. Panel 1 y 2: Análisis por LSCM en germínulas de distintas longitudes mostrando a FKS-1-GFP^{i} en la superficie celular de tubos germinativos, principalmente en el domo apical (flechas) y además en regiones subapicales proximales (cabezas de flecha). Barras, 5 µm.

6.4.2.3 Análisis FRAP de FKS-1-GFPi

Para determinar la tasa de recuperación de macrovesículas asociadas a FKS-1 se llevó a cabo análisis FRAP en el Spitzenkörper de la cepa que expresa FKS-1-GFP^{i}, utilizando la misma estrategia mencionada anteriormente (ver Sección 6.3.1). Ninguna señal fluorescente se detectó en la región macrovesicular del Spitzenkörper inmediatamente después del fotoblanqueamiento (Fig. 30 A, área circular discontinua, tiempo 0.0 s). La recuperación de la fluorescencia de FKS-1-GFP^{i} ocurrió de manera progresiva después del fotoblanqueamiento en el Spitzenkörper (Fig. 30 A, cabezas de flecha blanca), observándose la acumulación de fluorescencia en la región macrovesicular y en la superficie celular apical (Fig. 30 A). El tiempo medio de recuperación ($t_{1/2}$, Media ± Error Estándar), de FKS-1-GFP^{i} fue de 31.7 ± 4.6 s (*n*= 15) (Fig. 21). La prueba estadística post-hoc Tukey-HSD [ANDEVA de una vía] reveló diferencias significativas (F [3, 43]; P< 0.00001) entre los valores de $t_{1/2}$ de FKS-1-GFP^{i} y los $t_{1/2}$ de los marcadores de la región macrovesicular: FM4-64, tDIMER-2-YPT-31 y GS-1-GFP (Fig. 30 B).

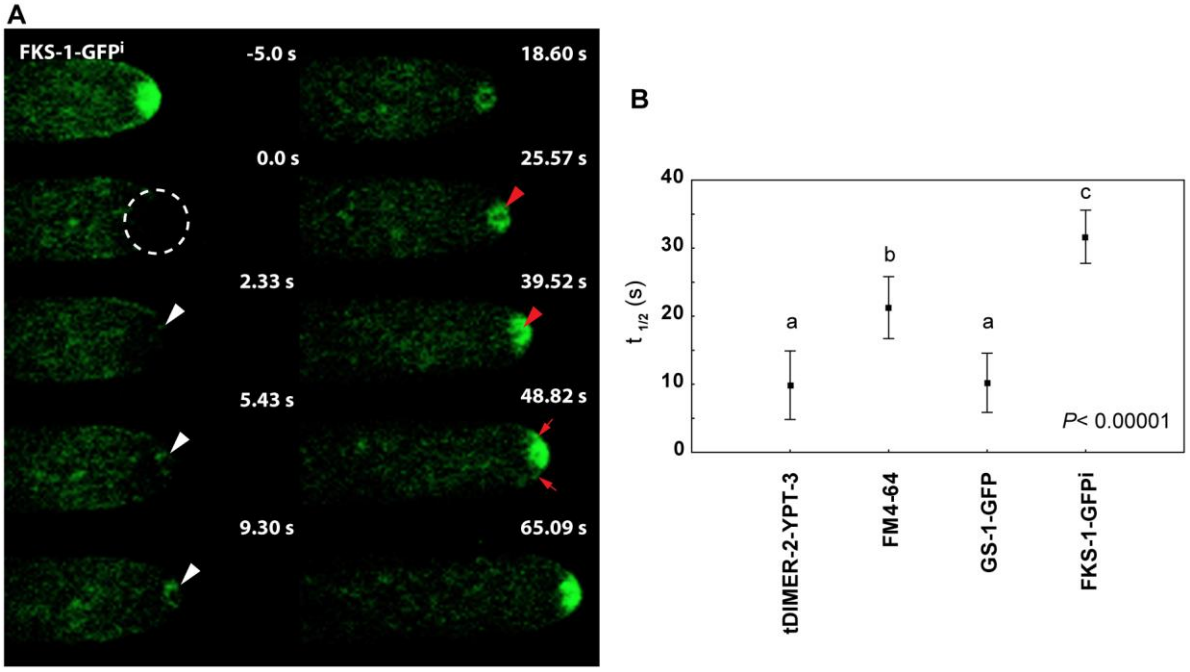


Figura 30. Análisis FRAP de las subunidad putativa del complejo β-1,3-glucano sintasa, FKS-1.

A. FRAP en ápice de una hifa de la cepa de *N. crassa* que expresa FKS-1-GFP^{i}. El fotoblanqueamiento se realizó por 5 segundos en la región apical de las hifas (área circular) antes de iniciar el proceso de captura continua de imágenes. Se observó la llegada rápida de fluorescencia en la región apical de las hifas (*t*= 2.33s) y la acumulación gradual de FKS-1-GFP^{i} en la región macrovesicular del Spitzenkörper (cabezas flecha blanca). Nótese la aparición de fluorescencia en el domo apical (*t*= ~49 s) (flechas rojas). Nótese que a los 18.6 s FKS-1-GFP^{i} se distribuye en el Spk formando un anillo similar al marcaje obtenido por GS-1 etiquetado con moléculas fluorescentes (Verdín et al., 2009).

B. Análisis de Mínimos Cuadrados por ANDEVA de una vía de los promedios de $t_{1/2}$ en tDIMER-2-YPT-3, FM4-64, GS-1-GFP y FKS-1-GFPi (ver Fig. 6B). Valores de $t_{1/2}$ con la misma letra (i.e., a, b o c) no son significativamente diferentes en el test *post hoc* Tukey HSD (ANDEVA de una vía; F [3, 43]=24.522; P<0.00001). Las abscisas y ordenadas muestran el tiempo (en segundos) y los valores de recuperación de la fluorescencia normalizada, respectivamente.

Con el objetivo de analizar las características fenotípicas de mutantes Δ*fks-1* se obtuvieron del Neurospora Genome Project las cepas FGSC 14884 y 14885, registradas con la eliminación del gen *fks-1* (NCU06871.2). No se mostraron diferencias en el crecimiento y/o morfología de la cepa silvestre de *N. crassa* con respecto a las cepas FGSC 14884 y 14885. Debido a que la mutante Δ*fks-1* se generó utilizando la versión 2 de la anotación del gen, se revisó la secuencia de los oligonucleótidos (5f, 5r, 3f y 3r) utilizados para generar el casete de eliminación. El análisis *in silico* reveló que el oligonucleótido 5f se alinea ~3,300 bp río abajo del codón de inicio (Fig. 31 A y B), el cual permite dejar un fragmento, después de la traducción, amino terminal de 412 amino ácidos de la proteína. Para analizar la

integración de los casetes en las mutantes, estas se analizaron por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para la hibridación dentro y fuera del casete. Se logró amplificar una banda de 2.5 kb en la cepa silvestre de *N. crassa*, aunque también en las cepas FGSC 14884 y 14885 (Fig. 31 B). Además no se lograron obtener amplicones correspondientes al fragmento del gen con el casete de resistencia a la higromicina (Fig. 31 B).

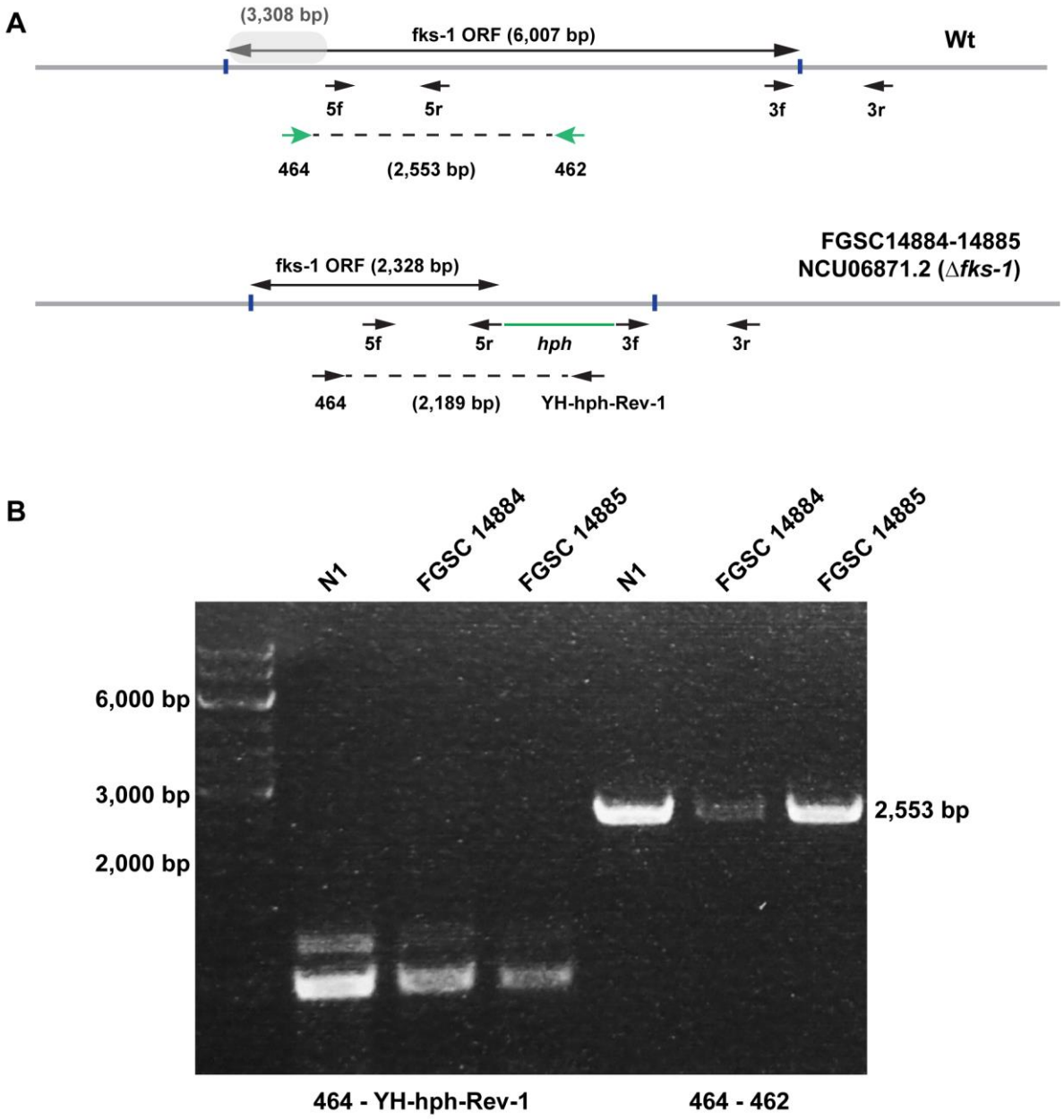


Figura 31. Análisis de la integración del casete de eliminación para el gen *fks-1* (NCU06871.2) en las cepas de *N. crassa* FGSC 14884 y FGSC 14885

A. Esquemas que indican los sitios de hibridación de los oligonucleótidos de comprobación 464, 462, y YH-hph-Rev-1 (ver Tabla 4), en la cepas de *N. crassa* N1 (silvestre), FGSC 14884 y FGSC 14885, para confirmar la integración del casete de eliminación de *fks-1* (NCU06871.2). Se muestran los sitios de hibridación de los oligonucleótidos 5f/5r y 3f/3r diseñados por el Neurospora Genome Project (www.dartmouth.edy/~neurosporagenome. html) para generar los fragmentos de recombinación flanqueantes al gen que confiere resistencia a la higromicina (*hph*). Nótese que el oligonucleótido 5f se alinea 3,308 pares de bases río abajo del codón de inicio.
B. Amplicones obtenidos por PCR a partir de ADN genómico de las cepas de *N. crassa*: N1 (silvestre), FGSC 14884 y FGSC 14885. Se muestran bandas de 2,553 bp amplificadas con los oligonucleótidos 462-464; Y dos bandas inespecíficas (< 2000 bp) utilizando los oligonucleótidos 464 y YH-HPH-REV-1 en todas las cepas.

La alta probabilidad de que las cepas FGSC 14884 y 14885 no fueran mutantes para el gen *fks-1*, llevó a la generación del casete de recombinación diseñado con fragmentos flanqueantes al marco abierto de lectura con el fin de eliminar por completo el gen *fks-1* (Fig. 32 A). Para ello se generó a través del sistema de recombinación en levadura (Colot *et al.*, 2006), el vector recombinante pESL-13 (Fig. 32 B) con el casete de resistencia a la higromicina (*hph*) fusionado a los fragmentos flanqueantes 5' (5fr) y 3' (3fr) del gen *fks-1* (NCU06871.7) (Fig. 32 B-D).

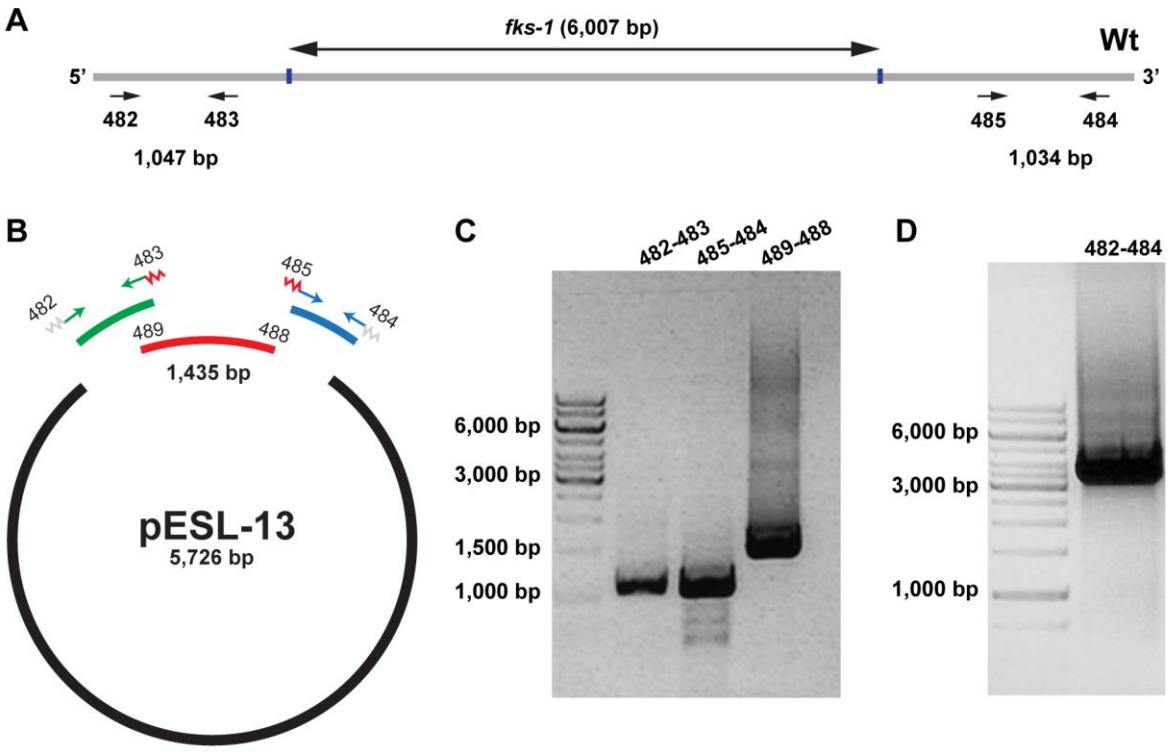


Figura 32. Esquemas y productos de PCR relacionados al vector de recombinación para la eliminación del gen *fks-1* (NCU06871.7)

A. Esquema que indica los sitios de hibridación de los oligonucleótidos 482-483 y 484-485 (ver Tabla 4) de los extremos flanqueantes 5' y 3', respectivamente, en el marco abierto de lectura del gen *fks-1* (NCU06871.7). Se indican los tamaños de banda esperados para cada fragmento.
B. Esquema del vector recombinante pESL-13 obtenido por el sistema de recombinación en levadura [Yeast Recombination Protocol](Colot *et al.*, 2006), a partir del vector pRS426 digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I.
C. Amplicones correspondientes a los fragmentos de ADN flanqueantes 5' (482-483) y 3' (485-484) al marco abierto de lectura del gen *fks-1* (NCU06871.7), y gen de resistencia a la higromicina (489-488, ver Tabla 4) obtenidos por PCR con los oligonucleótidos respectivos (ver en A y B).
D. Amplicón de ~3,516 bp correspondiente al casete de eliminación para el gen *fks-1* obtenido por PCR del vector recombinante pESL13 utilizando los oligonucleótidos 482 y 484.

6.5 Asociación de Rab GTPasas con cisternas de Golgi

6.5.1 Distribución Subcelular de YPT-1, YPT-31 y SEC-4

Además de la localización en el Spitzenkörper, GFP-YPT-1 se observó también en numerosos acúmulos fluorescentes a lo largo de las hifas (Fig. 16B, panel 1, cabezas de flecha), que se distribuían principalmente en regiones subapicales y distales de la hifa (8-49 μm desde el extremo apical, *n*= 28); aunque algunas partículas marcadas con YPT-1 se observaron en las regiones subapicales proximales cercanas a la punta (7 μm desde el extremo apical, *n*= 28). Para determinar si los acúmulos de GFP-YPT-1 correspondían a cisternas de Golgi, se examinó la distribución intracelular de GFP-YPT-1 después de añadir Brefeldina A (BFA). En diversos estudios se ha demostrado que este metabolito fúngico altera la organización de Golgi en hongos filamentosos (Pinar *et al.*, 2013a; Pantazopoulou and Peñalva, 2011). La exposición de BFA en hifas de *N. crassa* en crecimiento indujo a la formación de agregados con GFP-YPT-1 y a la reducción de putativas cisternas de Golgi (Fig. 33 A, Video S1). El tratamiento con BFA provocó además una interrupción temporal en la acumulación de GFP-YPT-1, tDIMER-2-YPT-31 y GFP-SEC-4 de los ápices de las hifas, asociado a un cese del crecimiento, hinchamiento de las puntas y desensamble del Spitzenkörper (Fig. 33 A). Bajo el efecto de la BFA hifas que co-expresaban CHS-1-mChFP o tDIMER-2-YPT-31 y GFP-YPT-1 mostraron la formación de agregados de YPT-1, pero no de CHS-1 o YPT-31 (Fig. 33 B, panel 1 y 2, Video S1). De manera interesante, se observó CHS-1-mChFP pero no GFP-YPT-1 en el núcleo del Spitzenkörper (Fig. 33 B, panel 1). De manera similar a YPT-31, ante la exposición de BFA no se detectó a GFP-SEC-4 en agregados similares a los observados para GFP-YPT-1 (Fig. 33 A). Para

explorar a detalle la distribución de YPT-1 en las distintas subpoblaciones de cisternas de Golgi, se co-expresó GFP-YPT-1 o mChFP-YPT-1 con distintos marcadores de Golgi como USO-1, VRG-4, VPS-52 y SEC-7, en ausencia o presencia de BFA.

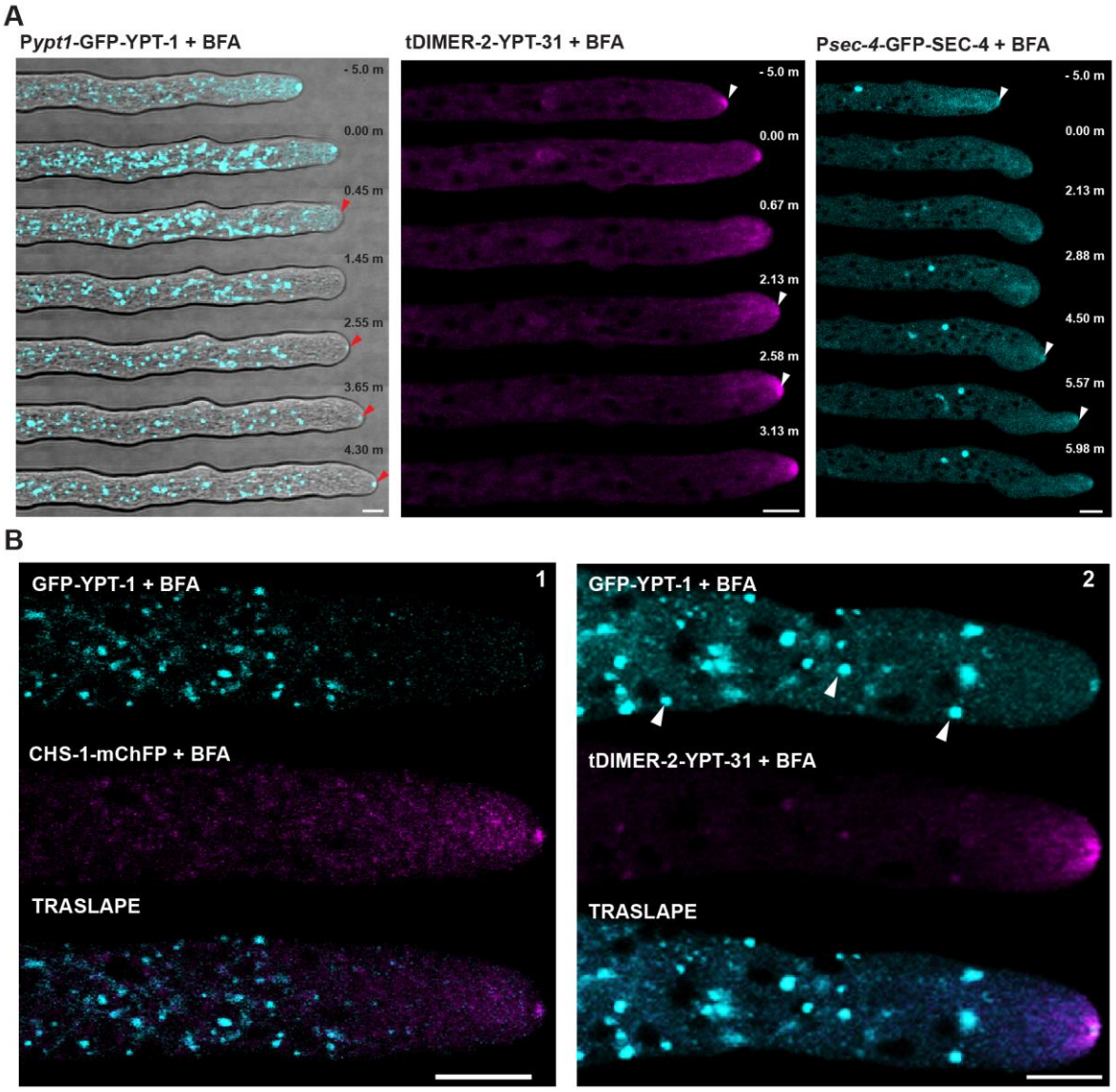


Figura 33. La Brefeldina A (BFA) altera la distribución de YPT-1 asociada a cisternas de Golgi.

A. El tratamiento con BFA en hifas que expresaban las Rab GTPasas (YPT-1, YPT-31 y SEC-4) con etiquetas fluorescentes no provocó la acumulación de tDIMER-2-YPT-31 o GFP-SEC-4 como se observó en GFP-YPT-1. Nótese que la localización de las distintas Rabs en el Spitzenkörper se interrumpió temporalmente en los ápices de las hifas hinchadas. Barras, 5 µm.

B. Panel 1: Análisis por LSCM mostró la formación de agregados con GFP-YPT-1 y a CHS-1-mChFP (Sánchez-León *et al.*, 2011) localizada en la región central del Spitzenkörper ante la exposición a BFA (~7 min). Nótese la ausencia de CHS-1 y YPT-1 en los agregados presentes en las regiones subapical de la hifa. Barra, 10 µm. Panel 2: La exposición a la BFA en células que co-expresan

tDIMER-2-YPT-31 y GFP-YPT-1 no provocó la agregación de tDIMER-2-YPT-31 en contraste a lo observado con la GFP-YPT-1. Barra, 5 μm.

6.5.2 Distribución Subcelular de YPT-1 y USO-1

En *S. cerevisiae* y en mamíferos Uso1p/p115 es una proteína grande de anclaje con dominio coiled-coil, la cual es reclutada por Ypt1p/Rab1 (Allan *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 1998) y es necesaria, a través de la interacción con GM130 (Barr *et al.*, 1998) (Shorter and Warren, 1999; Moyer *et al.*, 2001) para el anclaje inicial de vesículas secretoras derivadas de RE hacia Golgi temprano o *cis*-Golgi (Beard *et al.*, 2005). La expresión de USO-1-GFP bajo el control del promotor propio P*uso-1*, reveló la distribución de múltiples estructuras fluorescentes distribuidas a lo largo de las hifas (Fig. 34 A); la morfología y distribución subcelular de las estructuras marcadas con USO-1-GFP fueron similares a las putativas cisternas de Golgi marcadas con YPT-1 (Fig. 30B, panel 1, cabezas de flecha). En regiones distales y subapicales distales (>36.2 μm desde el extremo apical, *n*= 30) se identificó a USO-1-GFP y mChFP-YPT-1 co-localizando en múltiples partículas, posiblemente cisternas de Golgi temprano (Fig. 34 B, panel 1, cabezas de flecha; Fig. 34 C). Aunque ambas proteínas co-localizaron en algunas estructuras, el patrón de la señal fluorescente exhibió pleomorfismos (Fig. 34 B, panel 1, 3-6; Video S2), posiblemente resultado del comportamiento dinámico de las cisternas de Golgi durante el proceso de maduración de este organelo. Se identificó además estructuras marcadas con mChFP-YPT-1 que no co-localizaron con USO-1-GFP (Fig. 34 B, flechas). La exposición a BFA provocó un cambio en la distribución en las cisternas fluorescentes (Fig. 34 B, panel 2). La inspección visual de las señales fluorescentes sugirió que casi todas las cisternas marcadas con USO-1-GFP co-localizaban con una fracción de las cisternas marcadas con mChFP-YPT-1 (Fig. 34 B, panel 2 inferior). Para cuantificar el grado de co-localización se calculó el ICQ (Cociente de Correlación de la Intensidad) a partir de las imágenes de hifas con y sin tratamiento de BFA. El índice de ICQ mide la relación entre las intensidades relativas entre dos partículas fluorescentes (Li *et al.*, 2004). La distribución azarosa de dos partículas fluorescentes arrojan un ICQ cercano a 0, mientras que partículas que co-localizan definen un ICQ en el rango de $0 < ICQ \leq +0.5$ y las que no-colocalizan definen un ICQ de $0 > ICQ \geq -0.5$. En células no tratadas los valores de ICQ (Media ± Error Estándar) fueron de

0.144 ± 0.026 (*n*= 8), mientras que las células tratadas con BFA los valores de ICQ fueron significativamente mayores 0.212 ± 0.019 (*n*= 5) (t-Student, p< 0.01).

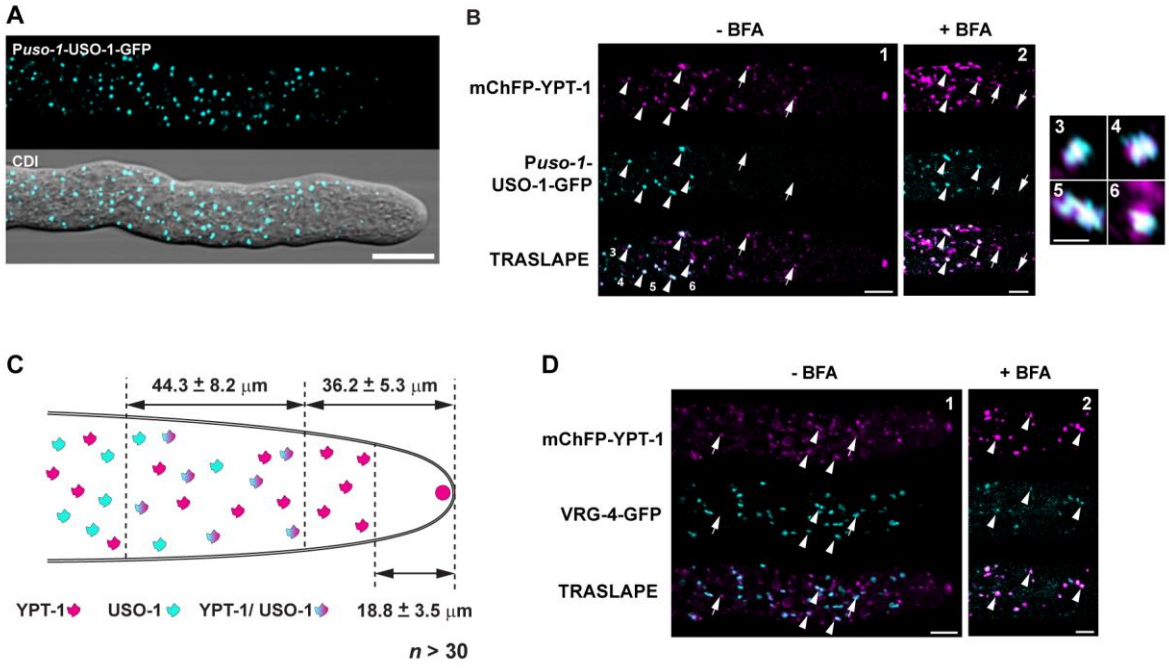


Figura 34. YPT-1 se asocia con cisternas de Golgi temprano.

A. Análisis por LSCM mostró a USO-1-GFP en numerosas estructuras puntuales en las regiones subapicales distales y proximales de la hifa. Barra, 5 µm.
B. Panel 1: Co-expresión de mChFP-YPT-1 y el marcador de Golgi temprano USO-1-GFP (cabezas de flecha) mostrando co-localización de YPT-1 y USO-1 en algunas cisternas de Golgi localizadas en las regiones distales y subapicales distales de las células. Barra: 5 µm. Panel 2: Exposición a la BFA indujo a la agregación de USO-1-GFP y mChFP-YPT-1 (cabezas de flecha). Nótese que una fracción de agregados con mChFP-YPT-1 (flechas) no co-localizaron con USO-1-GFP. Barra: 5 µm. Panel 3-6: Magnificación digital de partículas co-localizando en panel 1 (cabezas de flecha) mostrando como ambas proteínas ocupan distintos dominios de las cisternas de Golgi identificadas. Barra: 1 µm.
C. Ilustración de la distribución subcelular de mChFP-YPT-1 y USO-1-GFP y sus posiciones relativas respecto a los ápices de las hifas (Media ± Error Estándar).
D. Panel 1: La co-expresión de mChFP-YPT-1 y VRG-4-GFP (Bowman *et al.*, 2012) reveló la presencia de una población mixta de cisternas individuales (flechas) y cisternas que co-localizan (cabezas de flecha). Panel 2: Los agregados de mChFP-YPT-1 formados por la exposición a la BFA co-localizaron con las cisternas de Golgi marcadas con VRG-4-GFP (cabezas de flecha). Barras, 5 µm.

6.5.3 Distribución subcelular de YPT-1 y VRG-4

Vrg4 (Vanadate resistant gene 4) es un transportador de manosa, cuya localización ha sido reportada en estructuras de Golgi en diferentes especies fúngicas (Bowman *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 1997; Jackson-Hayes *et al.*, 2008; Nishikawa *et al.*, 2002).

Evidencia experimental del transportador de GDP-manosa en *S. cerevisiae*, Vrg4p, sugiere que la proteína se recicla entre RE y Golgi (Abe *et al.*, 2004). Para analizar más a detalle las diferentes poblaciones de cisternas de Golgi se co-expresaron mChFP-YPT-1 y VRG-4-GFP. Los análisis de imágenes revelaron la co-localización de ambas proteínas en una sub-población de cisternas de Golgi (Fig. 34 D, panel 1, cabezas de flecha; Video S3). A pesar de que se observaron numerosas estructuras co-localizando, también se observaron partículas con una sola señal fluorescente (Fig. 34 D, panel 1, flechas). La exposición a la BFA indujo a la típica morfología aberrante de las cisternas de Golgi, caracterizada por las agregaciones de las cisternas de Golgi marcadas con mChFP-YPT-1 las cuales co-localizaron con todas las partículas marcadas con VRG-4-GFP (Fig. 34 D, panel 2, cabezas de flecha). El valor de ICQ en células no tratadas con BFA respecto a las que recibieron tratamiento con la droga se incrementó de manera significativa de 0.091 ± 0.025 (n= 12) a 0.201 ± 0.025 (n= 10) (t-Student, $p< 0.01$).

6.5.4 Distribución subcelular de YPT-1 y SEC-7

Para determinar si las partículas con YPT-1 que no co-localizaron con USO-1/VRG-4 en los experimentos anteriores correspondían a cisternas de Golgi tardío, se realizaron ensayos de co-localización de YPT-1 y SEC-7 (NCU07658.7, ortóloga putativa de Sec7p en *N. crassa*). En *S. cerevisiae*, *SEC-7* codifica para un factor intercambiador de guaninas (GEF) que activa GTPasas (Arfs) en cisternas de Golgi tardío (*-trans*) (Sata *et al.*, 1998; Achstetter *et al.*, 1988). Análisis de la localización intracelular y dinámica de Golgi en *S. cerevisiae* y *A. nidulans* reveló que Sec7 puede ser usado como un marcador genuino de cisternas de Golgi tardío (Matsuura-Tokita *et al.*, 2006; Losev *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Peñalva, 2009). La búsqueda BLAST reveló que la proteína de *N. crassa* (NCU07658.7) codifica para una proteína con una identidad general de 38% y 57% en relación a Sec7p (NP_010454) de *S. cerevisiae* y HypB^{Sec7} (AN6709) de *A. nidulans*, respectivamente. Además la predicción de la secuencia de aminoácidos de NCU07658.7, contiene el dominio Sec7 (Pfam: PF01369). Por lo tanto la proteína de *N. crassa* NCU07658.7 fue designada como SEC-7. SEC-7 se etiquetó endógenamente con GFP y se reguló su expresión bajo su propio promotor, permitiendo identificar algunas de las estructuras

fluorescentes, posiblemente cisternas de Golgi tardío a lo largo de las hifas (Fig. 35 A, *n*> 30); ocasionalmente algunas de estas estructuras se observaron cerca de las puntas de las hifas (Fig. 35 A, cabezas de flecha). Como se esperaba, la co-expresión de SEC-7-GFP y mChFP-YPT-1 reveló que ambas proteínas co-localizaban en algunas cisternas de Golgi tardío putativas (Fig. 35 B, panel 1). Esta co-localización se incrementó levemente durante el tratamiento con BFA (Fig. 35 B, panel 2). Los promedios de ICQ antes y después del tratamiento fueron de 0.122 ± 0.037 (*n*= 5) y 0.154 ± 0.030 (*n*= 8), respectivamente. De manera inesperada, el tratamiento con BFA provocó la acumulación de SEC-7-GFP en el Spitzenkörper (Fig. 35 B, panel 2; *n*> 20), en contraste con las células no tratadas.

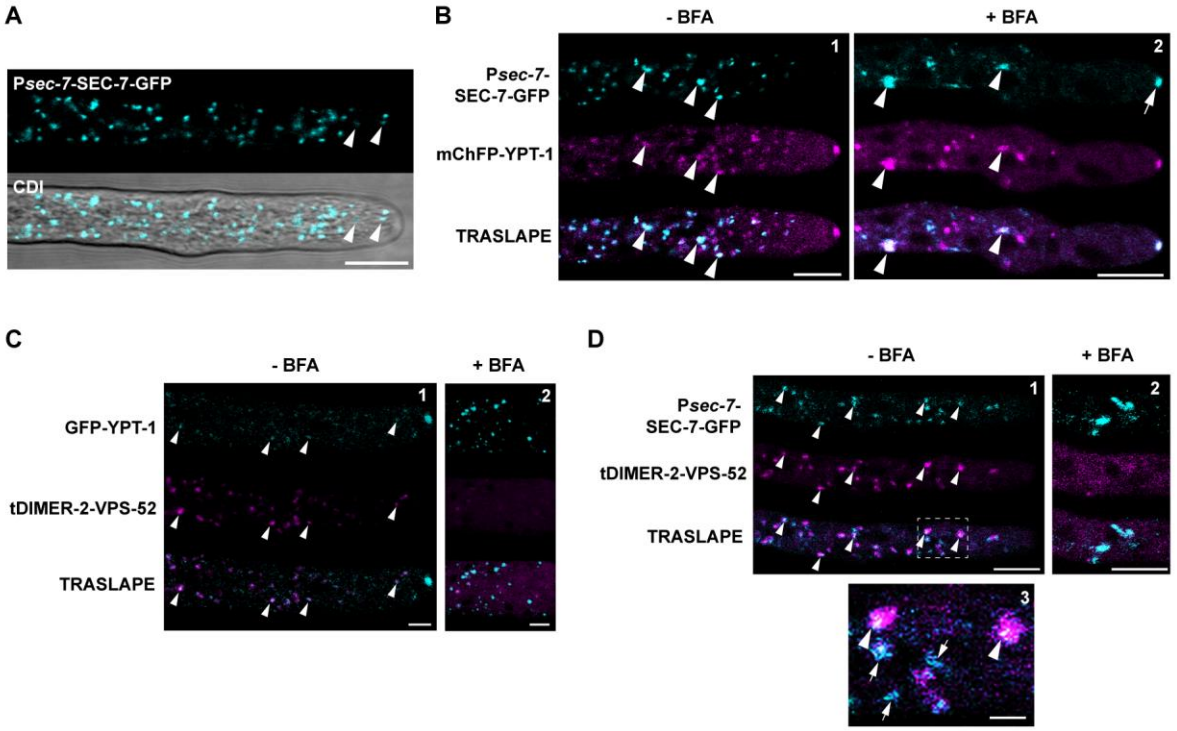


Figura 35. YPT-1 se asocia con cisternas de Golgi tardío.

A. Análisis por LSCM del marcador de Golgi tardío SEC-7 etiquetado con GFP reveló numerosas estructuras puntuales fluorescentes distribuidas en regiones distales y subapicales de las hifas. Nótese la presencia de SEC-7-GFP en los ápices de las hifas. Barra, 10 µm.
B. Panel 1: La co-expresión de mChFP-YPT-1 y SEC-7-GFP mostró una co-localización parcial en las cisternas de Golgi tardío (cabezas de flecha). Panel 2: Exposición a la BFA causó una reducción y agregación de estructuras fluorescentes con YPT-1 y SEC-7; se muestra además co-localización parcial (cabezas de flecha). Nótese que la presencia de GFP-SEC-7 en el Spitzenkörper. Barra, 10 µm.
C. Panel 1: La co-expresión de GFP-YPT-1 y tDIMER-2-VPS-52 (Bowman *et al.*, 2012) mostró que todas las partículas con VPS-52 co-localizaron con YPT-1 en una subpoblación de cisternas de Golgi. Panel 2: La BFA causó una pérdida de la localización de tDIMER-2-VPS-52 en todas las cisternas de Golgi marcadas con GFP-YPT-1. Barra, 5 µm.

D. Panel 1: SEC-7-GFP y tDIMER-2-VPS-52 se identificaron en numerosas estructuras puntuales que mostraron una co-localización parcial (cabezas de flecha). Panel 2: Agregación de SEC-7 y desensamble de VPS-52 ante los efectos de la BFA. Barra, 10 µm. Panel 3: Magnificación digital de partículas fluorescentes en el panel 1 mostrando ambas proteínas en las mismas estructuras (cabezas de flecha), pero también en estructuras individuales (flechas). Bar, 2 µm.

6.5.5 Distribución subcelular de YPT-1 y VPS-52

En estudios previos, se observó a VPS-52 en *N. crassa* en cisternas de Golgi separadas de las cisternas de Golgi temprano, las cuales estaban marcadas con el transportador de calcio PMR-1; estas observaciones guiaron a los autores a concluir que VPS-52 posiblemente se encontraba en cisternas de Golgi tardío (Bowman *et al.*, 2012). El complejo GARP (Golgi Associated Retrograde Complex) es un factor de anclaje "tether" multimérico involucrado en el tráfico retrógrado de vesículas derivadas de endosomas hacia Golgi tardío o TGN (Red Trans-Golgi) (Conibear and Stevens, 2000). Se ha demostrado que este complejo, compuesto por las subunidades Vps51p, -52p, -53p, -54p, es reclutado por la Rab GTPasa Ypt6p/Rab6 en Golgi tardío (Siniossoglou and Pelham, 2001; Liewen *et al.*, 2005). Sin embargo en *A. nidulans*, RabC, homólogo de Ypt6p de la levadura se identificó en compartimentos de Golgi temprano y tardío (Pantazopoulou and Peñalva, 2011). En un estudio con *S. cerevisiae* se encontró a Ypt1p en cisternas de Golgi tardío y se reportó que esta Rab GTPasa podría estar regulando el tráfico vesicular entre endosomas tempranos y Golgi tardío (Sclafani *et al.*, 2010). Para confirmar la distribución de YPT-1 en Golgi tardío, se analizó la distribución de GFP-YPT-1 y tDIMER-2-VPS-52 en hifas maduras de *N. crassa*. La localización de algunas de las cisternas evidenciadas por tDIMER-2-VPS-52 coincidió con cisternas de Golgi marcadas con GFP-YPT-1 (Fig. 35 C, panel 1, cabezas de flecha). Los análisis de imágenes arrojaron un ICQ de 0.177 ± 0.013 (n= 4). Ante los efectos de la BFA, tDIMER-2-VPS-52 se dispersó en el citosol provocando un incremento en la señal fluorescente en el citoplasma, concomitante con la ausencia de la proteína en presuntas cisternas de Golgi tardío (Fig. 21 C, panel 2). Aunque se había sugerido que VPS-52 se localizaba en cisternas de Golgi tardío (Bowman *et al.*, 2012), hasta ahora, su distribución en este organelo no se había confirmado. La co-expresión de SEC-7-GFP y tDIMER-2-VPS-52 mostró que ambas proteínas co-localizan parcialmente en las mismas estructuras (Fig. 35 D, panel 1 y 3). Análisis de co-

localización arrojaron un ICQ de 0.113 ± 0.017 (*n*= 21). El tratamiento con BFA indujo a la agregación de cisternas de Golgi marcadas con SEC-7-GFP y la dispersión de tDIMER-2-VPS-52 en el citosol (Fig. 35 D, panel 2).

6.6 YPT-1 se distribuye en una red tubular

Además de la distribución de YPT-1 en las cisternas de Golgi y en el núcleo del Spitzenkörper, se encontró YPT-1 en otras membranas subcelulares. En regiones distales de las hifas (79.6 ± 22.8 μm, *n*=7), se encontró a mChFP-YPT-1 decorando numerosas estructuras parecidas a túbulos (Fig. 36 A, panel 1). Ninguna de estas estructuras se observaron cerca de la región apical o distal-subapical de las hifas. Los análisis por microscopía TIRF revelaron que la longitud y posición de los túbulos con YPT-1 variaba a lo largo de la hifa (Fig. 36 B). Las estructuras tubulares frecuentemente se arreglaban en una red poco densa de filamentos que presentaban un comportamiento muy dinámico (Fig. 36 C; Video S4); algunas veces estos túbulos se encontraron formando ramas o bucles (Fig. 36 C, cabezas de flecha). Para descartar la posibilidad de que los túbulos correspondieran a alguna población de microtúbulos se co-expresaron mChFP-YPT-1 y, como marcador de microtúbulos, BML-GFP. No se observó co-localización alguna de ambos marcadores, confirmando que las estructuras tubulares marcadas por YPT-1 no pertenecen a estructuras relacionadas al citoesqueleto microtubular (Fig. 36 A, panel 2-4; Video S5).

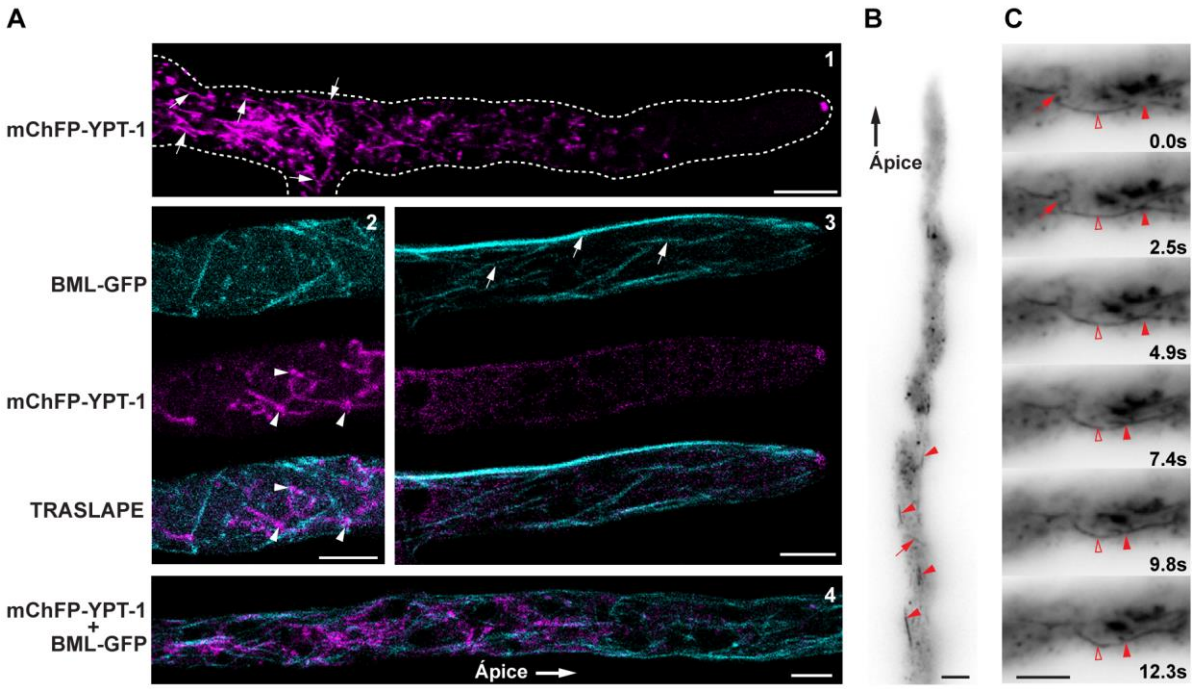


Figura 36. YPT-1 se asocia con estructuras tubulares en regions distales de las hifas.

A. Panel 1. Los análisis por LSCM mostaron a mChFP-YPT-1 decorando estructuras tubulares (flechas) localizadas en regiones distales de las hifas (79.6 ± 22.8 µm, *n*=7). Nótese el gradiente de este tipo de estructuras tubulares/vesiculares desde la región subapical distal a la región apical de la hifa. Panel 2-4: La co-expresión del marcador de microtúbulos BML-GFP y mChFP-YPT-1 mostró la ausencia de co-localización de los microtúbulos marcados con GFP (3, flechas) con las estructuras tubulares marcadas con YPT-1; Nótese que la longitud de las estructuras tubulares marcadas con YPT-1 (2, cabezas de flecha) es menor en comparación a los microtúbulos marcados con GFP. Barras, 5 µm.
B. Microscopía TIRF reveló que las estructuras tubulares de YPT-1 se orientan de manera paralela principalmente respecto al eje longitudinal de las hifas. Barra, 5 µm.
C. Imágenes en serie de tiempo mostrando túbulos de YPT-1 formando bucles (flechas) y ramas (cabezas de flecha). Nótese el pandeo o encogimiento de los túbulos a través del tiempo (cabezas de flecha sin relleno). Barra, 5 µm.

6.7 YPT-1 no se localiza en endosomas

Estudios previos demostraron que la Ypt1p/Rab1 posee un papel en el tráfico endocítico (Sclafani *et al.*, 2010; Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Mientras que la mayoría de las observaciones indicaron que la YPT-1 de *N. crassa* se localizaba principalmente en diferentes cisternas de Golgi, no se excluyó la posibilidad de que algunas de las estructuras observadas correspondían a endosomas tempranos. Además, se observó una co-localización parcial entre los puntos citoplasmáticos fluorescentes de YPT-1 y membranas marcadas con FM4-64 (Fig. 37 A, cabezas de flecha). Para descartar esta posibilidad se co-expresaron mChFP-YPT-1 y el

marcador de endosomas tempranos YPT-52 previamente etiquetado con GFP en el extremo amino terminal (Seidel *et al.*, 2013). No se observó co-localización entre endosomas tempranos marcados con GFP-YPT-52 y ninguna de las estructuras marcadas con mChFP-YPT-1 (Fig. 37 B, Video S6). Cada una de las muestras analizadas presentó un valor de ICQ de -0.5. Para verificar que las estructuras con GFP-YPT-52 no correspondían a cisternas de Golgi se expuso las hifas a la BFA. No se observaron cambios en la localización de GFP-YPT-52 con respecto a las hifas sin tratamiento (Fig. 37 C).

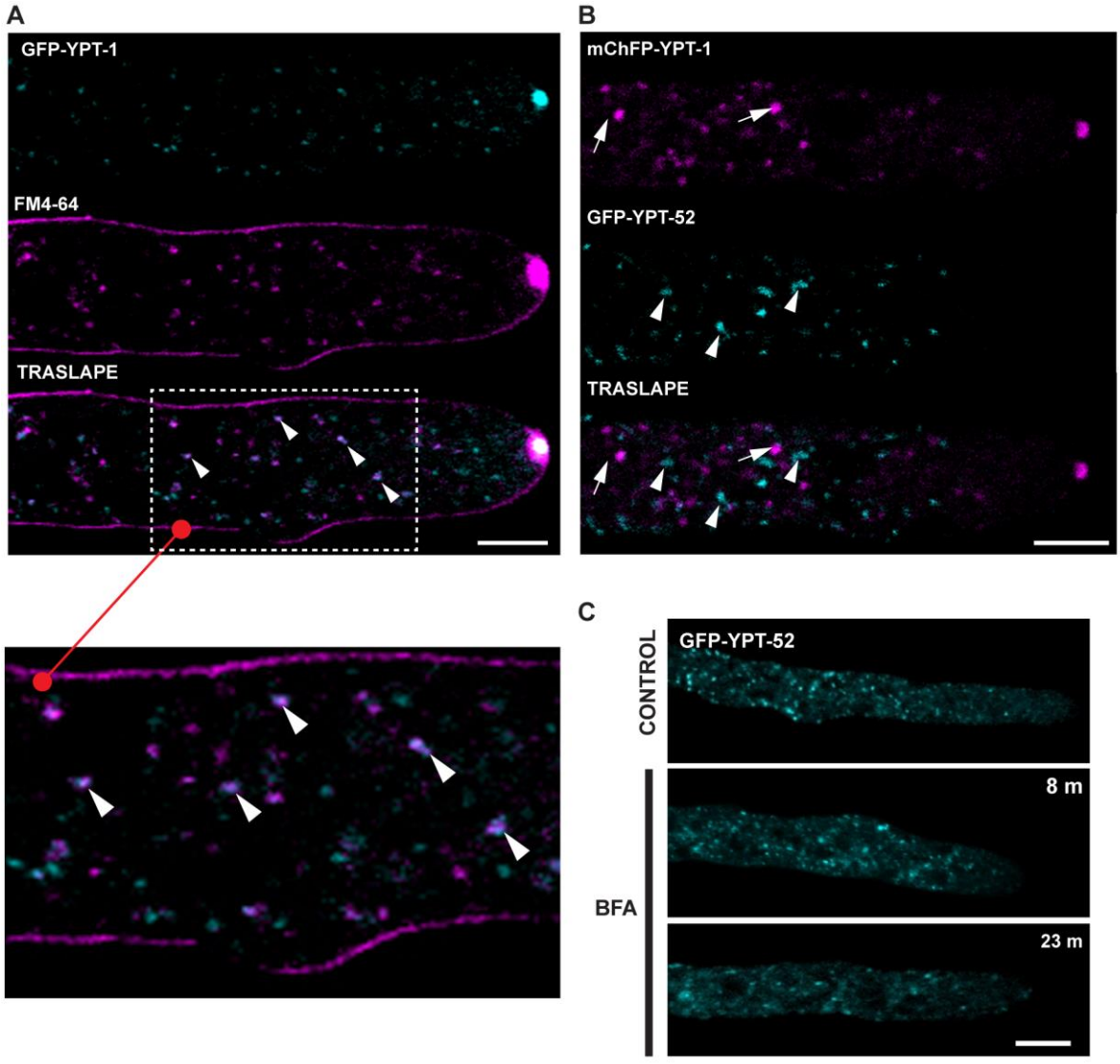


Figura 37. YPT-1 no se localiza en endosomas tempranos.

A. Se observó una co-localización parcial de FM4-64 y las estructuras marcadas con GFP-YPT-1 (cabezas de flecha). Note la distribución de mayor extensión de FM4-64 comparado a YPT-1, en el Spitzenkörper.

B. La co-expresión del marcador de endosomas tempranos GFP-YPT-52 [(Seidel *et al.*, 2013)] y mChFP-YPT-1, no mostró co-localización alguna entre las estructuras asociadas a YPT-1 (flechas) y los endosomas tempranos (cabezas de flecha). Barra, 5 µm.
C. La exposición a la BFA no mostró alteraciones en la distribución de endosomas tempranos marcados con GFP-YPT-52. Barra, 5 µm.

6.8 Análisis de la distribución de YPT-1 bajo el efecto de inhibidores del citoesqueleto

6.8.1 Distribución subcelular de YPT-1 bajo el efecto del Benomilo

El Benomilo provocó cambios severos en la morfología celular tales como: hinchamiento de los ápices de las hifas (Fig. 38 A), alteraciones en la dirección del crecimiento (Fig. 38 B, flecha roja y 38 C), distribución anormal de núcleos e híper-ramificación (Fig. 38 B, panel 3). Además se observó durante los primeros minutos del tratamiento la presencia de un gran número de partículas fluorescentes en regiones apicales y subapicales de las hifas, de tamaño y morfología distinta las observadas con YPT-1 sin el tratamiento (Fig. 38 A, panel 1, flechas). A los 15 minutos de tratamiento se observó una reducción de las partículas fluorescentes y la aparición de estructuras fluorescentes de mayor tamaño, similares a las cisternas de Golgi putativas, localizadas muy cercanas a la punta (Fig. 38 B, panel 1 y 2). De manera notable se observó que el efecto del inhibidor alteró transitoriamente la localización de YPT-1 en el Spitzenkörper (Fig. 38 B).

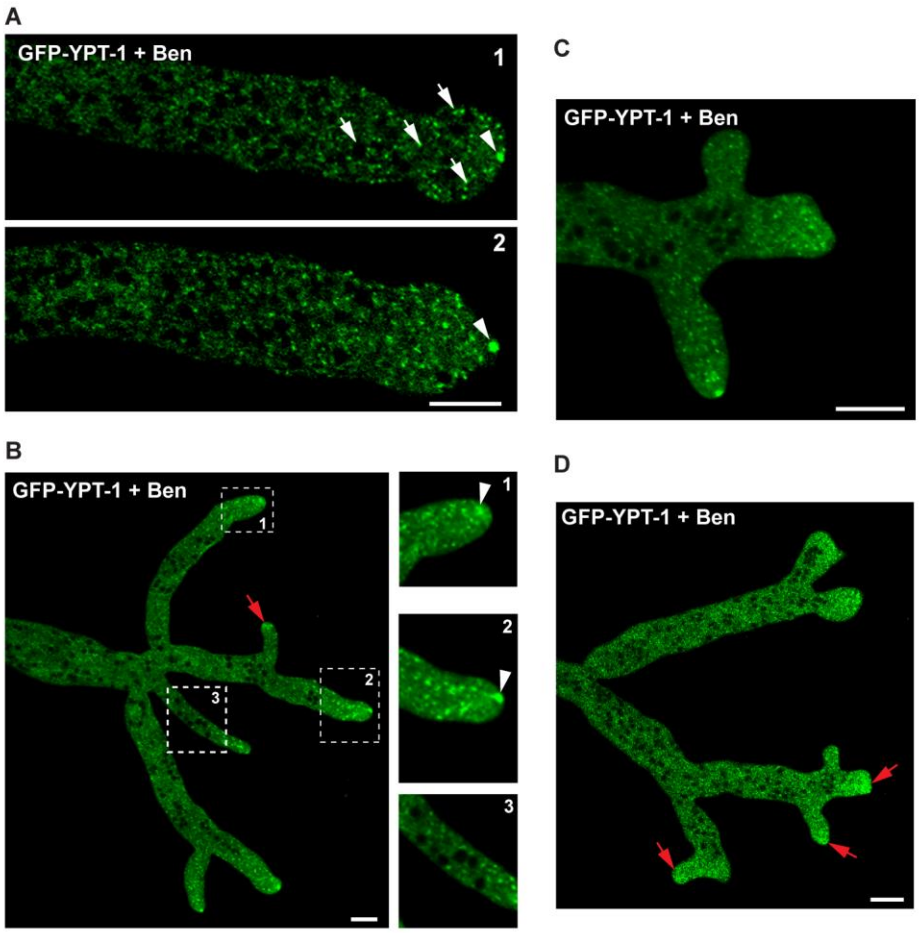


Figura 38. Efecto del Benomilo en la localización subcelular de YPT-1.

A. Hinchamiento en región apical de hifas ante la exposición al Benomilo (~ 8 min) (Paneles 1 y 2). Nótese a GFP-YPT-1 en la región apical, en una estructura similar al Spitzenkörper pero de tamaño reducido; además de la presencia de numerosos puntos fluorescentes acumulados en la región apical y subapical de las hifas. Barra, 5 µm.

B. Ante el efecto del Benomilo (> 15 min) algunas hifas mostraron alteraciones en la direccionalidad del crecimiento (flecha rojas; ver C y D) y distribución anormal de núcleos con morfología circular (Panel 3). Nótese la presencia de GFP-YPT-1 en el Spitzenkörper (Panel 1 y 2, cabezas de flecha) y en cisternas de Golgi putativas, en algunas de las hifas Barra, 10 µm.

C y D. El tratamiento con Benomilo (> 25 min) provocó defectos en la formación de ramificaciones y ausencia de GFP-YPT-1 en ápices con morfología no hifoide. Nótese la acumulación de fluorescencia dispersa en regiones apicales y subapicales de las hifas (flechas rojas). Barras, 10 µm.

6.8.2 Distribución de YPT-1 bajo el efecto de Latrunculina A (Lat A)

La despolimerización del citoesqueleto de actina, por el efecto de Lat A, provocó el desensamble del Spk concomitante con severos cambios morfológicos de las hifas, tales como: crecimiento isotrópico (Fig. 39, panel 1), ramificación dicotómica de hifas (Fig. 39, panel 2) e híper-ramificación (Fig. 39, panel 3). Durante los primeros minutos (~5 min) fue recurrente la observación de ápices hinchados, los cuales contenían un

gran número de partículas de tamaño reducido (Fig. 39, panel 1) similares a las observadas en el tratamiento de las hifas con Benomilo (Fig. 38, panel 1). Fue notable la ausencia de GFP-YPT-1 localizada en la región del Spitzenkörper de todas las hifas sometidas al tratamiento con Lat A.

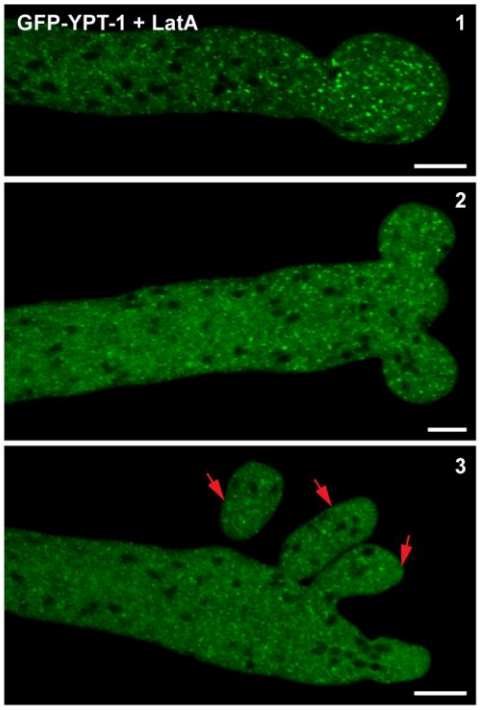


Figura 39. Efecto del Latrunculina A (LatA) en la localización subcelular de YPT-1.

La exposición a LatA (> 5 min) provocó hinchamiento en la región apical de hifas (Panel 1), defectos en la formación de ramificaciones (Paneles 2 y 3). Nótese la ausencia de YPT-1 en la región apical en todas las hifas y la presencia de numerosas partículas distribuidas en región apical y subapical proximal de las hifas después de los 5 minutos del tratamiento. Barras, 5 µm.

7 Discusión

El Spitzenkörper es una estructura pleomórfica que está involucrada en el crecimiento de las hifas y la morfogénesis de numerosas especies fúngicas [revisado en (Riquelme and Sánchez-León, 2014)]. Estudios previos han revelado que el Spitzenkörper está presente en las hifas en crecimiento de *N. crassa* y que posee una alta concentración vesículas de distinto tamaño organizadas en distintos estratos; además se ha identificado que estas vesículas contienen enzimas de distinta naturaleza importantes para la biosíntesis de la pared celular (Verdín *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2007). En *A. nidulans* dos Rab GTPasas RabC y RabO, homólogas a Rab6/Ypt6p y Rab1/Ypt1p en mamíferos y en *S. cerevisiae* han sido identificadas en el Spitzenkörper (Pantazopoulou and Peñalva, 2011; Pinar *et al.*, 2013a). En este estudio se pudo identificar a las Rab GTPasas de *N. crassa* YPT-1, YPT-31 y SEC-4 en los diferentes estratos del Spitzenkörper (Fig. 40 A), sugiriendo que las distintas Rabs podrían estar regulando de modo diferencial el tráfico de diferentes poblaciones de vesículas del Spitzenkörper.

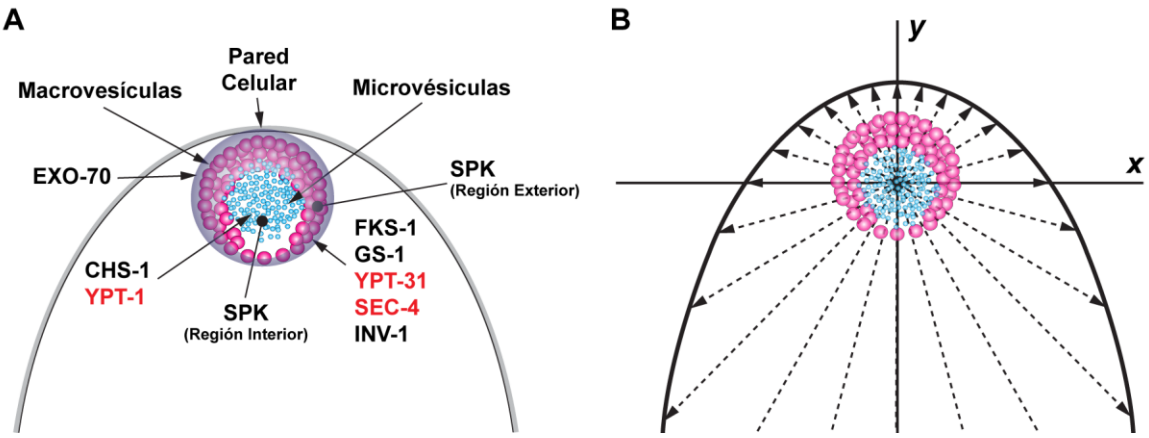


Figura 40. Distribución de Rabs en el Spitzenkörper.

A. Representación esquemática de la distribución de proteínas Rabs en los diferentes estratos del Spitzenkörper donde se han identificado previamente otros marcadores.
B. Ilustración mostrando la transposición de microvesículas y macrovesículas acumuladas en estratos diferentes en el Spitzenkörper de *N. crassa* y el modelo de morfogénesis fúngica Centro Suministrador de Vesículas (VSC). De acuerdo al modelo, el VSC (= Spitzenkörper) colecta vesículas que arriban de regiones distales de la hifa y las distribuye en todas la direcciones de manera equidistante hasta que las vesículas alcanzan se fusionan con la membrana plasmática [modificaado de (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989)].

La presencia constante de Rab GTPasas en el Spitzenkörper sugiere que la tasa de descarga de vesículas desde el Spitzenkörper es igual a la tasa de llegada de

vesículas hacia esta estructura, lo cual es consistente con el modelo del Centro Suministrador de Vesículas (VSC) para la morfogénesis fúngica, el cual propone que las vesículas secretoras que llegan desde regiones distales de la hifa se acumulan temporalmente en el Spitzenkörper antes de ser descargadas hacia la membrana plasmática (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989) (Fig. 40 B). Las tasas de recuperación de la fluorescencia obtenidas de los análisis de los ensayos FRAP en otras especies fúngicas indican que las vesículas secretoras putativas exhiben un comportamiento altamente dinámico en el Spitzenkörper (Dijksterhuis and Molenaar, 2013; Jones and Sudbery, 2010; Pantazopoulou *et al.*, 2014). Los análisis FRAP en *N. crassa* revelaron que el tiempo medio de recuperación ($t_{1/2}$) para YPT-1 y YPT-31 estuvo entre los 10 y 16 s, sugiriendo la existencia de un flujo abundante de vesículas que arriban al Spitzenkörper, en concordancia con los cálculos de Trinci (Prosser and Trinci, 1979). En *A. nidulans* y *C. albicans* se obtuvieron $t_{1/2}$ de 7 y 10 s en ensayos de FRAP para $RabE^{RAB11}$ y Sec4, ortólogos de YPT-31, respectivamente (Jones and Sudbery, 2010; Pantazopoulou *et al.*, 2014). A pesar de las diferencias en las tasas de crecimiento reportadas para *N. crassa* (~60 µm/min) (Hickey *et al.*, 2002), *C. albicans* (0.25 µm/min) (Jones and Sudbery, 2010) y *A. nidulans* (0.5-1 µm/min) (Horio and Oakley, 2005), se obtuvieron valores promedio similares de $t_{1/2}$ para las Rabs mencionadas, indicando que las tasas de recambio de vesículas hacia el Spitzenkörper son independientes de las tasas de crecimiento. Los promedios de $t_{1/2}$ para YPT-1 y YPT-31 fueron inferiores que los obtenidos para FM4-64 y CHS-1, sugiriendo una alta tasa de recambio de las Rabs en el Spitzenkörper en relación con los otros marcadores. Los análisis FLIP de GFP-YPT-1 en regiones subapicales de la hifa mostraron una reducción significativa de la fluorescencia en el Spitzenkörper. Se podría especular que estas Rab GTPasas se unen a las membranas de las vesículas secretoras antes de llegar al Spitzenkörper, y después de arribar a esta estructura se disocian de las vesículas. Este comportamiento podría explicar el tiempo de permanencia reducido de las Rabs en el Spitzenkörper comparado al de CHS-1 y FM4-64, los cuales se encuentran supuestamente inmersos en la membrana de las vesículas. Análisis de la topología de las CHS de *N. crassa* revelaron la presencia de 4 a 7 dominios transmembranales (Fajardo-Somera, 2013; Riquelme and Bartnicki-García, 2008), además se ha demostrado

que la señal fluorescente de marcadores lipofílicos como el FM4-64 depende de su asociación a membranas (Betz *et al.*, 1996).

Se identificó a YPT-1 en el núcleo del Spitzenkörper de *N. crassa*, co-localizando casi completamente con CHS-1. En un estudio reciente, se identificó a YPT-1 entre proteínas que co-inmunoprecipitaron con CHS-1, CHS-4 y CHS-5 (Fajardo-Somera *et al.*, 2015). Además se encontró que GFP-YPT-1 sedimentó en fracciones con un rango de densidad similar a la densidad (1.125 g/ml) de las fracciones con alta actividad quitina sintasa reportadas en estudios previos (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1984; Leal-Morales *et al.*, 1994; Verdín *et al.*, 2009). En general, toda la evidencia obtenida apunta a que YPT-1 podría tener un papel en el tráfico pre-exocítico de las microvesículas del Spitzenkörper, incluyendo a los quitosomas. El papel hipotético de YPT-1 en la regulación del tráfico de microvesículas quitosomales en el Spitzenkörper, añade otra función para YPT-1, además del papel descrito en *S. cerevisiae* y en células de mamíferos en la interfase de retículo endoplasmático-Golgi, endosomas-Golgi y autofagosomas (Barrowman *et al.*, 2010; Lynch-Day *et al.*, 2010). Esta “promiscuidad” funcional de YPT-1 en las distintas etapas de la ruta secretora es probablemente finamente regulada por GEFs y GAPs correspondientes.

Ypt31/32p se han localizado en sitios de crecimiento polarizado en levaduras (Jedd *et al.*, 1997). Estas Rab GTPasas participan en un mecanismo de cascada reclutando a Sec2p, proteína GEF que subsecuentemente activa a la Rab post-Golgi Sec4p, en vesículas secretoras (Ortiz *et al.*, 2002). Análisis de la secuencia de amino ácidos de las Rabs de *N. crassa* SEC-4 y YPT-31 revelaron un alto grado de identidad con las Rabs Sec4p/Rab8 y Ypt32p/Rab11, respectivamente. Además, el alineamiento de las secuencias mostró un alto grado de conservación de las regiones identificadas (motivos G, Regiones Switch I y II, y RabSF1-4). La evidencia sugiere que tanto SEC-4 como YPT-31 de *N. crassa* son en realidad proteínas homólogas de las Rab8 y Rab11, respectivamente. Se encontró que en *N. crassa* YPT-31 se distribuye en el estrato periférico del Spitzenkörper circundando al núcleo marcado por YPT-1. Dada la distribución de FM4-64 y YPT-31 en la región periférica del Spitzenkörper se esperó obtener tasas similares de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento tanto como para el marcador lipofílico como para la Rab

GTPasa. Sin embargo, el $t_{1/2}$ de YPT-31 fue significativamente inferior que el de $t_{1/2}$ de FM4-64, sugiriendo que YPT-31 al igual que YPT-1 se asocia transitoriamente a las vesículas del Spitzenkörper, mientras que FM4-64 permanece más tiempo en las membranas de las vesículas. Aunque se requiere de una mayor evidencia bioquímica para descifrar la asociación diferencial de YPT-1 y YPT-31 con las diferentes vesículas que conforman el Spitzenkörper, los resultados de los experimentos de localización y las diferencias en los $t_{1/2}$ indican que las Rab GTPasas podrían estar involucradas en la estratificación finamente orquestada del Spitzenkörper. Además, se identificó a SEC-4 distribuida de manera similar a YPT-31 en la capa externa del Spitzenkörper. Estos resultados son consistentes con el papel de Ypt31/32p y Sec4p en los últimos pasos del tráfico vesicular de la ruta secretora. Sec4 ha sido previamente identificada en ápices de las hifas de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Ashbya gossypii* (Jones and Sudbery, 2010; Powers-Fletcher *et al.*, 2013; Schmitz *et al.*, 2006). Notablemente, en *N. crassa* no solo SEC-4, sino también YPT-31 está involucrada en el tráfico de macrovesículas. Recientemente, la caracterización del complejo del Exocisto reveló que las subunidades SEC-3, EXO-70 y EXO-84 están parcialmente asociadas al estrato macrovesicular del Spitzenkörper (Riquelme *et al.*, 2014). En *C. albicans*, basado en las diferencias de la dinámica y patrones de localización observados para Sec4 y componentes del Exocisto (i.e. Exo70 y Exo84), se ha propuesto que las vesículas secretoras del Spitzenkörper se asocian con el Exocisto en la superficie celular (Jones and Sudbery, 2010). En *N. crassa* la co-localización parcial de EXO-70 y YPT-31 en la región macrovesicular del Spitzenkörper sugiere que las vesículas secretoras asociadas a YPT-31 se asocian a subunidades del Exocisto (i.e. EXO-70) en la periferia del Spitzenkörper desde donde son posiblemente dirigidas hacia sitios de exocitosis. Se requieren estudios más específicos para determinar si las subunidades del Exocisto localizadas en la región macrovesicular actúan como efectores de SEC-4 o YPT-31. Todos estos resultados sugieren de manera indirecta la existencia de mecanismos regulados por las Rabs para el ordenamiento en la entrega de vesículas hacia el Spitzenkörper y su subsecuente descarga hacia la superficie apical de las hifas.

La presencia de Rab GTPasas post-Golgi en el estrato periférico del Spitzenkörper sugiere que las proteínas secretadas, con destino al espacio extracelular y contenidas en las vesículas secretoras, posiblemente se encuentren en la misma región periférica del Spitzenkörper. Se identificó a la invertasa 1 (INV-1) en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper, aunque la señal fluorescente no fue muy abundante, sugiriendo que posiblemente en *N. crassa* las macrovesículas están involucradas en el tráfico de las proteínas que se secretan al espacio extracelular. La localización apical de INV-1 en *N. crassa* coincide con lo observado en *Aspergillus niger* , donde se determinó que la glucoamilasa y proteínas extracelulares se secretan al medio externo desde los ápices de las hifas localizadas en el margen de la colonia (Wösten *et al.*, 1991). La localización intracelular de la glucoamilasa de *A. niger* en los ápices de las hifas fue confirmada por microscopía de fluorescencia con una versión truncada de la proteína etiquetada en el carboxilo terminal con GFP (GLA::GFP) (Gordon *et al.*, 2000).

Además de la localización apical en *N. crassa*, INV-1-SFGFP también se encontró en la superficie celular de conidios, y algunas hifas y septos (de regiones alejadas de la zona de crecimiento). La distribución observada de invertasa en la superficie celular y septos coincide con análisis bioquímicos anteriores donde demostraron la retención de invertasa en paredes celulares de micelio y conidios de *N. crassa* (Eberhart, 1961; Trevithick and Metzenberg, 1966). Mediante análisis microautoradiográficos de micelio en crecimiento se determinó que en *A. niger* y *Phanerochaete chrysosporium* la secreción de proteínas al medio extracelular ocurre también en regiones centrales de la colonia (Wösten *et al.*, 1991). La distribución de proteínas secretadas en la superficie celular y en septos se ha reportado también para *A. niger* y *Aspergillus oryzae*; para esta última especie la α-amilasa fue localizada en la región periplásmica de los septos (Gordon *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2011). La presencia de invertasa en la superficie celular y septos de hifas alejadas del borde de la colonia sugiere la existencia de mecanismos de secreción no apicales en hongos filamentosos.

En los análisis de sedimentación se detectó a INV-1-SFGFP en fracciones de baja y alta densidad, principalmente en las densidades de 1.088 g/mL y 1.147 g/mL;

presentándose una concentración significativamente mayor de la proteína en la fracción (soluble) de menor densidad, sugiriendo que una fracción de la invertasa obtenida de los extractos se encuentra en estructuras membranosas mientras que la otra en forma libre o soluble. Es posible que el alto contenido de invertasa en la fracción soluble corresponda a la proteína del espacio periplásmico liberada después de la homogenización. En las fracciones más densas la baja concentración de INV-1-GFP encontrada posiblemente corresponda a la proteína contenida en vesículas secretoras; la ausencia de actividad invertasa en las fracciones más densas posiblemente se deba a que las membranas de las vesículas secretoras impidieron la exposición de la proteína al substrato.

Otra de las proteínas que se identificaron en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper de *N. crassa* fue la subunidad catalítica del complejo β-1,3-glucano sintasa, FKS-1. La cual conserva un alto grado de identidad (64%) en su secuencia de aminoácidos comparado a sus homólogos en otras especies fúngicas; además posee los dominios: FKS-1 (Pfam 14288), β-1,3-glucano sintasa (Pfam02364) y ~16 DMTs, comunes en este grupo de proteínas. En *S. cerevisiae*, este complejo está compuesto de al menos dos componentes: la subunidad catalítica, Fks1p, y la subunidad reguladora, Rho1p (Kang and Cabib, 1986). Posteriormente se determinó que la GS-1 de *N. crassa* tiene también posiblemente un papel regulador en la síntesis de β-1,3-glucanos (Enderlin and Selitrennikoff, 1994; Tentler *et al.*, 1997), al igual que la Rho GTPasa Rho-1 (Richthammer *et al.*, 2012). En otro estudio en esta misma especie, se encontró a GS-1-GFP en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper de las hifas (Verdín *et al.*, 2009); además en gradientes de densidad GS-1-GFP co-sedimentó principalmente en las fracciones con actividad β-1,3-glucano sintasa (Verdín *et al.*, 2009). Hasta ahora no se ha resuelto si FKS-1, GS-1 y/o RHO-1 forman parte del complejo macromolecular necesario para la síntesis de β-1,3-glucanos; sin embargo, la evidencia bioquímica indirecta y de microscopía apuntan a su existencia (Verdín *et al.*, 2009; Richthammer *et al.*, 2012).

Uno de los obstáculos para el análisis de la localización subcelular de FKS-1 en *N. crassa* ha sido la dificultad para etiquetar a la proteína tanto en el extremo amino como carboxilo terminal (Riquelme, M. comunicación personal). De manera similar

en *Schizosaccharomyces pombe* el etiquetamiento con GFP en los extremos de Bgs4p, proteína ortóloga a Fks1p, resultó en transformantes no viables (Cortés *et al.*, 2005). La inserción de *gfp* dentro del marco de lectura abierta de *fks-1* de *N. crassa*, permitió obtener transformantes que expresaban a FKS-1 fusionada “internamente” a la GFP, fusión que fue confirmada por Western blot. Esto sugiere que la señal fluorescente observada en los análisis de microscopía de fluorescencia, corresponden verdaderamente a la construcción FKS-1-GFP^{i}. Los intentos por obtener transformantes homocariontes que expresaran FKS-1-GFP^{i} no fueron exitosos, sugiriendo la posibilidad de que la construcción no sea funcional Sin embargo, en *S. pombe* usando una estrategia parecida se logró obtener el etiquetamiento funcional de Bgs4p (Cortés *et al.*, 2005).

El desarrollo de septos en hongos filamentosos involucra procesos finamente regulados por la maquinaria citoesquelética y de biosíntesis de pared (Mouriño-Pérez, 2013; Mourino-Perez and Riquelme, 2013). Estudios de la estructura y desarrollo de los septos en *N. crassa*, revelaron que la quitina es el principal componente fibrilar de la pared septal (Hunsley and Gooday, 1974), además se determinó que en el septo ocurre incorporación de glucosa, el monómero de los β-glucanos, aunque de modo no específico (Hunsley and Gooday, 1974). La presencia de CHS durante el proceso de formación de septos refuerza la hipótesis de que la síntesis de quitina ocurre durante este proceso (Sánchez-León *et al.*, 2011; Riquelme *et al.*, 2007). En este estudio no se logró observar a FKS-1-GFP^{i} en los procesos de formación de septos en hifas maduras de *N. crassa*, sugiriendo que no hay síntesis de β-1,3-glucanos en la pared del septo. Este resultado coincide con la resistencia a laminarinasa (β-1,3-glucanasa) de las microfibrillas de los septos de *N. crassa* (Hunsley and Gooday, 1974); Además, ninguno de los componentes del complejo glucano sintasa en *N. crassa* (i.e. GS-1 o RHO-1) se han observado en septos en formación (Richthammer *et al.*, 2012; Verdín *et al.*, 2009). En contraste con esta idea, en *S. cerevisiae* y *S. pombe* se ha observado β-glucano sintasas en los septos (Cortés *et al.*, 2005); además, la presencia de β-endoglucanasas (i.e. EGL-2 y EGL-1) durante la septación sugiere que estas enzimas posiblemente participan en la hidrólisis de β-glucanos de la pared septal (Martínez-Núñez, 2011). Alternativamente, se podría especular que el contenido de β-1,3-glucanos del septo

es relativamente bajo y en consecuencia no se requeriría altas concentraciones de FKS-1. Se requieren estudios más específicos para determinar la presencia de β-1,3-glucanos en la pared del septo y el posible papel de la FKS-1 de *N. crassa* en la formación de esta estructura.

Debido a la distribución de FKS-1-GFP^{i} en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper, se pensó que el comportamiento dinámico de las macrovesículas con FKS-1-GFP^{i} sería similar al observado con las vesículas asociadas a YPT-31. Sin embargo, la tasa de recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$) para FKS-1-GFP^{i} (~31.7 s) fue significativamente mayor comparada a las tasas de recuperación de tDIMER-2-YPT-31 (~9.9 s) o GS1-GFP (~10.2 s), mientras que para estos dos últimos marcadores no se encontró diferencias. Las diferencias entre los valores de $t_{1/2}$ de GS-1 y FKS-1, sugieren que ambas proteínas podrían estar interactuando de manera transitoria. Aunque el valor promedio de $t_{1/2}$ de FKS-1-GFP^{i}, respecto a los obtenidos para otros marcadores, se puede explicar por la naturaleza de la interacción de FKS-1 con las macrovesículas. La FKS-1 de *N. crassa* posee ~16 dominios transmembranales, que le permitirían permanecer unida a las membranas de las vesículas y posteriormente a la membrana plasmática del ápice de las hifas; esta última idea coincide con la distribución observada de FKS-1-GFP^{i} en la superficie del domo apical de las hifas. Estos resultados sugieren la existencia de un flujo constante de vesículas con FKS-1 hacia el Spitzenkörper, que posiblemente se acumulan en esta estructura antes de fusionarse en la superficie celular. La localización en la región macrovesicular del Spitzenkörper de GS-1-GFP y tDIMER-2-YPT-31 y los valores promedios, casi idénticos, de $t_{1/2}$ (~10 s) obtenidos para ambas proteínas sugieren que YPT-31 podría estar involucrada en el tráfico de macrovesículas con GS-1, aunque se requiere experimentos más detallados para confirmar esta idea.

FKS-1-GFP^{i} se observó también en tubos germinativos (> 22 µm). FKS-1-GFP^{i} se identificó en la superficie celular apical y subapical proximal de las células, aunque no se observó en alguna estructura similar al Spitzenkörper. En *N. crassa* se determinó que la aparición del Spitzenkörper no ocurre en hifas con longitudes menores a 150 µm (Araujo-Palomares *et al.*, 2007). Análisis de la distribución de CHS en germínulas de *N. crassa* revelaron que estas proteínas no se acumulan a

un nivel detectable en la región apical de las germínulas (Sánchez-León *et al.*, 2011). La acumulación de FKS-1-GFP^{i} a niveles detectables podría explicarse por la necesidad de sintetizar concentraciones altas de β-1,3-glucano en ápices de las germínulas. En *N. crassa* se ha demostrado que el contenido de β-1,3-glucano de la pared celular es relativamente alto (~87%) (Maddi and Free, 2010; Free, 2013). La observación de FKS-1 en germínulas indica la existencia de biosíntesis de β-1,3-glucanos en etapas tempranas de la germinación.

Es generalmente aceptado que el aparato de Golgi tiene un papel clave en el sistema secretor de células eucariotas (Mowbrey and Dacks, 2009). A diferencia de la organización apilada del aparato de Golgi observada en algunos organismos, las cisternas de Golgi en algunas especies fúngicas están dispersas, es decir, separadas en compartimentos de Golgi temprano y tardío, los cuales se pueden resolver ópticamente por microscopía de campo claro (Wooding and Pelham, 1998). De acuerdo al modelo propuesto de maduración de las cisternas de Golgi, las proteínas que atraviesan la ruta de secreción son modificadas por un set de enzimas, las cuales cambian en el tiempo dentro de una misma cisterna (Losev *et al.*, 2006; Matsuura-Tokita *et al.*, 2006). Este modelo asume que las enzimas utilizadas en Golgi temprano retornan, a través de vesículas, a estas mismas cisternas después de que son trasladadas a Golgi tardío efectuando de esta manera un proceso de tráfico retrógrado; de acuerdo a esto, las cisternas de Golgi tardío corresponden a cisternas de Golgi temprano “maduras” que han adquirido proteínas de Golgi tardío. Dentro de las diversas especies fúngicas existe una amplia evidencia en la variación y morfología del aparato de Golgi. Por ejemplo al contrario de las cisternas apiladas de Golgi observadas en *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* y *A. nidulans* poseen cisternas de Golgi dispersas (Mogelsvang *et al.*, 2003; Suda and Nakano, 2012; Bowman *et al.*, 2012; Pantazopoulou and Peñalva, 2011; Pinar *et al.*, 2013a). Los procesos de secreción proteica en Golgi requieren un conjunto de funciones orquestadas por distintas Rabs para asegurar la direccionalidad de las vesículas hacia los distintos organelos (Hutagalung and Novick, 2011). La proteína Ypt1p de *S. cerevisiae* y la Rab1 de mamíferos están involucradas en la regulación del tráfico vesicular desde y hacia las distintas estructuras de Golgi (Barrowman *et al.*, 2010). Además de la localización de YPT-1

en las puntas de las hifas de *N. crassa*, se identificó a la proteína en múltiples estructuras puntuales fluorescentes, a lo largo de las hifas; este patrón de distribución fue similar a las estructuras previamente identificadas con marcadores de Golgi (Bowman *et al.*, 2012; Hubbard and Kaminskyj, 2008; Pinar *et al.*, 2013a). Los análisis de co-localización de YPT-1 con diferentes marcadores de Golgi temprano y tardío confirmaron que esta Rab GTPasa se asocia con cisternas de Golgi y participa en eventos de tráfico en la interfase de Golgi en *N. crassa*. Un estudio reciente en *A. nidulans* mostró que la BFA afecta la morfología de Golgi induciendo a la agregación de las cisternas (Pinar *et al.*, 2013a). En *N. crassa*, la exposición a la BFA indujo a la formación de agregados de las cisternas de Golgi, las cuales estaban marcadas con GFP-YPT-1 pero no de tDIMER-2-YPT-31, confirmando que YPT-1 participa en los eventos de tráfico de membranas a nivel de Golgi. La ausencia de YPT-31 en estructuras similares y su localización exclusiva en las puntas de las hifas sugiere que en *N. crassa* YPT-31 participa en etapas post-Golgi de la ruta secretora, como previamente se ha reportado para Ypt31/32p en *S. cerevisiae* (Jedd *et al.*, 1997) y para RabE^{Rab11} en *A. nidulans* (Pantazopoulou *et al.*, 2014). Ante la exposición a la BFA, el arribo de YPT-1 y YPT-31 al Spitzenkörper fue parcialmente interrumpido, mientras que la organización de cisternas de Golgi fue drásticamente alterada. La llegada de YPT-1 y YPT-31 al Spitzenkörper a pesar de la desorganización de las cisternas de Golgi, sugiere que las alteraciones en el sistema de secreción convencional posiblemente no afectan al tráfico de las vesículas que se dirigen hacia el Spitzenkörper y a las cuales están asociadas estas Rabs. Esto sugiere que YPT-1 y YPT-31 se asocian cada una a las vesículas por una ruta alternativa a la ruta convencional de secreción, como previamente se ha sugerido para las CHS (Riquelme *et al.*, 2007); otra explicación alternativa, supone que la recuperación gradual de las cisternas de Golgi de los efectos de la BFA permite la salida de vesículas secretoras con destino al Spitzenkörper. Recientemente, el ortólogo de Ypt1p en *A. nidulans* RabO^{Rab1}, se detectó en distintos compartimentos identificados como cisternas de Golgi temprano y tardío, cuya distribución estaba determinada a regiones específicas de las hifas (Pinar *et al.*, 2013a). En *N. crassa* YPT-1 y el marcador de Golgi temprano USO-1 co-localizaron parcialmente dentro de las mismas cisternas de Golgi, aunque ambas ocuparon

distintas regiones en las hifas, lo cual sugiere la progresión de las cisternas de Golgi en las etapas de maduración. La distribución asimétrica de las cisternas de Golgi marcadas con YPT-1/USO-1 a lo largo de las hifas indica de un sistema de secreción organizado que avanza y al mismo tiempo mantiene cierta distancia desde la zona apical. En este estudio también se identificó que el marcador de Golgi temprano VRG-4 co-localizó con YPT-1 en algunas cisternas de Golgi. Recientemente, en *C. albicans* Vrg4 fue visualizado en cisternas de Golgi, las cuales estaban localizadas en regiones de la punta durante la formación de las hifas (Rida *et al.*, 2006). En *S. cerevisiae* el transportador de manosa VRG4 ha sido identificado en cisternas de Golgi temprano (Abe *et al.*, 2004; Losev *et al.*, 2006). Los valores promedio de ICQ de VRG-4/YPT-1, fueron inferiores a los obtenidos para USO y YPT-1. Estas diferencias entre las cisternas de USO-1/YPT-1 y VRG-4/YPT-1 podrían explicarse por los distintos tiempos de residencia de cada una de las proteínas en las cisternas de Golgi. Mientras que para USO-1 podrían requerirse eventos de anclaje en las membranas de Golgi temprano (Beard *et al.*, 2005), VRG-4 podría necesitarse en las cisternas de Golgi por mayor tiempo, debido a su participación necesaria para el transporte de manosa (Jackson-Hayes *et al.*, 2008). En *A. nidulans* RabO^{Rab1} se identificó en cisternas de Golgi (Pinar *et al.*, 2013a). Consistente con estas observaciones, en *N. crassa* YPT-1 exhibió co-localización parcial con la GEF SEC-7, marcador “genuino” de cisternas de Golgi tardío, sugiriendo que una fracción de la población de cisternas de Golgi marcadas con YPT-1 corresponden a Golgi tardío. También se encontró una co-localización parcial de SEC-7 y VPS-52.

Los bajos promedios de ICQ obtenidos para YPT-1/SEC-7 con respecto a los obtenidos para YPT-1/VPS-52 se podrían explicar por la posibilidad de que VPS-52 también se encuentre en otras estructuras además de cisternas de Golgi tardío. Aunque el complejo GARP está principalmente asociado al TGN (Perez-Victoria *et al.*, 2008), también se ha detectado en endosomas (Liewen *et al.*, 2005). Excepto para VPS-52, la exposición a la BFA incrementó la co-localización entre los diferentes marcadores de Golgi y YPT-1, en los agregados de Golgi. En *A. nidulans* la observación detallada del destino del marcador PH^{OSBP}, reveló que las cisternas de Golgi tardío son estructuras temporales que se disipan en cargadores de membrana post Golgi asociados a RabE^{Rab11} (Pantazopoulou *et al.*, 2014).

YPT-1 también se encontró decorando estructuras tipo-túbulos altamente dinámicos en regiones distales de las hifas, los cuales podrían corresponder a túbulos del sistema secretor endomembranal previamente reportados (Sánchez-León *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2007). Estas estructuras tubulares podrían corresponder a los equivalente fúngicos de Agregados Tubulares Vesiculares (Vesicular Tubular Clusters, VTCs) observados en mamíferos, también referidos como compartimentos intermedios de RE-Golgi o ERGICs (Sesso *et al.*, 1994). Hasta ahora, la existencia de los VTCs en hifas fúngicas no se ha explorado. Análisis posteriores se requieren para identificar la naturaleza de los túbulos decorados por YPT-1.

Varios estudios han revelado que las Rab GTPasas tienen un papel importante en la autofagia (Bento *et al.*, 2013). Previamente en *S. cerevisiae* que el complejo de anclaje TRAPPIII actúa como un GEF específico de Ypt1p en la autofagia, siendo la Rab GTPasa esencial para el proceso (Lynch-Day *et al.*, 2010). La interacción de Ypt1p y su efector Atg11p, proteína de andamiaje requerida para la autofagia, se requiere para el ensamble de estructuras pre-autofagosomales (PAS) (Lipatova and Segev, 2012). Recientemente, se demostró que la autofagia en *A. nidulans* es dependiente de $RabO^{Rab1}$ (Pinar *et al.*, 2013b), que llevó a proponer el papel en hipotético de $RabO^{Rab1}$ en la homeostasis entre el Spitzenkörper y autofagosomas (Pinar *et al.*, 2013b). El estudio de la relación de YPT-1 de *N. crassa* con los autofagosomas está fuera de los objetivos de este trabajo, y se requiere de más estudios para probar el papel de esta proteína en la autofagia de *N. crassa*.

Rab5 es una pequeña Rab GTPasa previamente identificada en endosomas tempranos (Chavrier *et al.*, 1990). Los distintos roles atribuidos a esta Rab incluyen la coordinación del desensamble de vesículas con cubierta de clatrina, reclutamiento de proteínas cargo, regulación de la fusión entre membranas endocíticas y el movimiento por microtúbulos de endosomas tempranos (Stenmark *et al.*, 1994; Rubino *et al.*, 2000; Kümmel and Ungermann, 2014; Nielsen *et al.*, 1999). Ortólogos fúngicos de la Rab5 se han identificado en endosomas tempranos y están involucrados en la ruta de secreción de membranas endocíticas (Abenza *et al.*, 2010; Seidel *et al.*, 2013; Singer-Krüger *et al.*, 1994). La Ypt1p de la levadura tiene un papel

en la interfase de Golgi tardío basado en una revisión de mutantes de *ypt1* interrumpidas en el tráfico de endosomas tempranos-Golgi tardío (Sclafani *et al.*, 2010). En *N. crassa* no se encontró co-localización entre el marcador de endosomas tempranos YPT-52 (Seidel *et al.*, 2013) y las estructuras marcadas con YPT-1. A pesar de la ausencia de co-localización, no descartamos la posibilidad de que YPT-1 participe en eventos del tráfico vesicular entre endosomas tempranos y Golgi tardío en *N. crassa*. Se requieren estudios posteriores con cepas mutantes y ensayos bioquímicos para entender de la manera en que YPT-1 está involucrada en el tráfico endocítico.

Hasta ahora poco es lo que sabe acerca de la relación de las Rab GTPasas y el tráfico de vesículas del Spitzenkörper. Un mejor entendimiento del papel de las Rab GTPasas en los eventos tardíos del tráfico vesicular ayudarían a descifrar las diferencias organizacionales encontradas en el Spitzenkörper de diversas especies de hongos filamentosos.

En hongos filamentosos el citoesqueleto de actina y microtubular, así como los motores moleculares asociados, tienen un papel clave en el crecimiento polarizado, morfogénesis, distribución de organelos, y transporte intracelular de vesículas endocíticas y secretoras (Lichius *et al.*, 2011; Torralba *et al.*, 1998; Steinberg, 2014; Horio and Oakley, 2005; Riquelme *et al.*, 2000). El papel de los cables de actina en el transporte apical de vesículas secretoras en hongos filamentosos se ha demostrado mediante la utilización de metabolitos tóxicos como la citocalasina A o latrunculina (A o B), que alteran la formación de los cables de actina (Torralba *et al.*, 1998; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Sánchez-León *et al.*, 2011). En este estudio se observó que la despolimerización de cables de actina con latrunculina A provocó la desaparición de GFP-YPT-1 del Spitzenkörper de las hifas de *N. crassa* concomitante con la ausencia de la proteína en las putativas cisternas de Golgi; además se observaron numerosas partículas acumuladas en la región apical y subapical de las células morfológicamente afectadas. De manera similar en *A. nidulans* la exposición a latrunculina B afectó la localización de la Rab GTPasa $RabE^{Rab11}$ del Spitzenkörper (Pantazopoulou *et al.*, 2014). En hifas de *C. albicans*, la distribución de Sec4 en el Spitzenkörper fue rápidamente afectada (< 90 s) ante el

tratamiento con citocalasina A, además que se mostraron numerosas partículas fluorescentes a lo largo de los tubos germinativos (Jones and Sudbery, 2010). La acumulación citoplasmática de partículas fluorescentes con GFP-YPT-1 en *N. crassa*, ante la despolimerización de los cables de actina, coincide con el efecto provocado en GFP-Sec4 por la citocalasina A, en *C. albicans*. El tamaño y morfología de estas estructuras en *N. crassa*, fueron distintos con respecto a las cisternas de Golgi observadas en las células sin tratamiento, sugiriendo que posiblemente estas partículas correspondan a vesículas secretoras asociadas a YPT-1. En *S. cerevisiae*, defectos causados en el citoesqueleto de actina indujeron a la acumulación de vesículas (40-60 nm) que contenían Ypt1p (Mulholland *et al.*, 1997). Los defectos en la localización apical de YPT-1 por alteraciones en el citoesqueleto de actina, sugiere la necesidad en el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto de actina para la acumulación de vesículas secretoras en el Spitzenkörper de *N. crassa*.

Las miosinas son los motores moleculares asociados a los cables de actina (Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Akhmanova and Hammer III, 2010). Alrededor de 35 familias de miosinas se han identificado mediante análisis de genómica comparativa (Odronitz and Kollmar, 2007). En *N. crassa*, hasta ahora, se han reportado 3 miosinas: MYO-1 (NCU02111), MYO-2 (NCU0051) y MYO-5 (NCU01440) que corresponden a las clases I, II y V, respectivamente (Echauri-Espinosa, 2013). Se ha sugerido que el papel de la MYO-5 en *N. crassa* es en el tráfico vesicular en los ápices de la hifas y en la formación del septos (Echauri-Espinosa, 2013; Ramírez-del Villar, 2014). Los análisis de co-expresión revelaron que SEC-4 y YPT-1 mantienen una co-localización parcial con MYO-5 en el Spitzenkörper. Mientras que las Rabs GTPasas se distribuyeron en regiones específicas, MYO-5 se detectó, al igual que SYN-1, en las regiones macro y microvesiculares del Spitzenkörper; de manera notable no se observó a ninguno de los marcadores vesiculares en la región externa fuera del Spitzenkörper donde se encontró a MYO-5. La distribución de MYO-5 sugiere que esta miosina participa posiblemente en el transporte de las macro- y microvesículas. En análisis FRAP de la región apical, la MYO-5 de *N. crassa* tardó ~ 2 min en recuperar el 50% de la señal fluorescente inicial (Ramírez-del Villar, 2014). La posible asociación temporal de las Rabs ($t_{1/2}$ ~ 10 s) con las vesículas contrasta con los tiempos de recuperación de MYO-5-GFP (Ramírez-del Villar, 2014), donde esta

última tarda ~12 veces más en recuperarse que YPT-1. Esta distribución coincide con la hipótesis de que las Rab GTPasas se asocian temporalmente con las vesículas hasta su llegada al Spitzenkörper; sugiriendo además, que las vesículas que son transportadas desde esta estructura hacia los sitios de exocitosis permanecen más tiempo asociadas a MYO-5 que las Rabs. Alternativamente, es posible que los altos valores obtenidos para $t_{1/2}$ de MYO-5-GFP, se deban a que el área del fotoblanqueamiento excedió el área ocupada por el Spitzenkörper (Ramírez-del Villar, 2014).

En hongos filamentosos, la participación de los microtúbulos en el crecimiento polarizado al parecer no es tan relevante como el transporte dependiente de actina (Riquelme *et al.*, 2011; Takeshita *et al.*, 2014). Esta idea se basa en observaciones donde el crecimiento polarizado de las hifas no es interrumpido por el tratamiento con Benomilo, mientras que la despolimerización de los cables de actina si detienen por completo el crecimiento polarizado y provocan defectos en la localización de marcadores vesiculares del Spitzenkörper (Zhang *et al.*, 2011; Horio and Oakley, 2005; Pantazopoulou *et al.*, 2014; Sánchez-León *et al.*, 2011). En *N. crassa*, ante la exposición al Benomilo, la localización de YPT-1 en el Spitzenkörper en la mayoría de las hifas no fue afectada; además se observó una acumulación de partículas fluorescentes en regiones apicales y subapicales de las células. Esto sugiere que los microtúbulos no tienen un papel importante en la acumulación de vesículas secretoras asociadas a YPT-1, en el Spitzenkörper de hifas de *N. crassa*. En un estudio previo, se demostró que la localización de CHS-1-GFP en el Spitzenkörper no fue afectada ante la despolimerización de microtúbulos (Sánchez-León *et al.*, 2011). El comportamiento similar de YPT-1 y CHS-1, ante la despolimerización de microtúbulos, refuerza la hipótesis de que YPT-1 posiblemente participa en el tráfico de quitosomas. Es posible que ante la ausencia de microtúbulos el flujo citoplasmático tenga un papel en el transporte activo de vesículas secretoras hacia el ápice de las hifas. Se ha propuesto que en hifas de *N. crassa*, el flujo citoplasmático es el responsable de transporte pasivo de los núcleos (Ramos-Garcia *et al.*, 2009). Otros autores han propuesto que la aproximación de las cisternas de Golgi en regiones apicales de *A. nidulans*, permite tener un suministro suficiente de vesículas secretoras en el ápice, las cuales no dependen del transporte microtubular

(Pantazopoulou *et al.*, 2014). Hasta ahora la información sobre el papel de los distintos motores moleculares en el tráfico de vesículas en las distintas etapas de la ruta de secreción es escasa; la expresión de Rab GTPasas (YPT-1, SEC-4 y YPT-31) con etiquetas fluorescentes en fondos mutantes del citoesqueleto ayudaría a entender el papel de los distintos motores en los mecanismos de secreción. Se requieren más estudios para entender el papel del citoesqueleto en el tráfico vesicular de *N. crassa*.

8 Conclusiones

- En la región apical de las hifas de *N. crassa* la Rab GTPasa YPT-1 se distribuye en la región microvesicular del Spitzenkörper y posiblemente se asocia a los quitosomas.
- Las proteínas YPT-31 y SEC-4 de *N. crassa* son Rab GTPasas post-Golgi y se localizan en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper.
- Los análisis FRAP-FLIP de Rab GTPasas y marcadores del Spitzenkörper demuestran que las vesículas del Spitzenkörper exhiben un comportamiento altamente dinámico.
- La diferencias en las tasas de recuperación de la fluorescencia de las Rab GTPasas y los marcadores del Spitzenkörper, obtenidos por FRAP, posiblemente esté relacionada al tipo de asociación de las proteínas con las vesículas.
- En *N. crassa* YPT-1 se localiza en cisternas de Golgi temprano, Golgi tardío y en estructuras tubulares/vesiculares de regiones distales de las hifas.
- La proteína de anclaje USO-1 y la GEF SEC-7 se asocian a Golgi temprano y Golgi tardío, respectivamente.
- La subunidad catalítica del complejo β-1,3-glucano sintasa, FKS-1, es una proteína transmembranal que se distribuye en la región macrovesicular del Spitzenkörper y la superficie del domo apical de las hifas maduras de *N. crassa*.
- En hifas maduras la proteína secretada invertasa-1, INV-1, se encontró en el estrato macrovesicular del Spitzenkörper, y en superficie celular y septos de hifas alejadas del borde de la colonia.

Lista de Referencias

Abe, M., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K. (2004). Localization of GDP-mannose transporter in the Golgi requires retrieval to the endoplasmic reticulum depending on its cytoplasmic tail and coatomer. *J Cell Sci, 117* (Pt 23), 5687-5696.

Abenza, J. F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., de los Rios, V., and Peñalva, M. A. (2010). *Aspergillus* RabB^{Rab5} integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. *Mol Biol Cell, 21* (15), 2756-2769.

Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C., and Schekman, R. (1988). SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J Biol Chem, 263* (24), 11711-11717.

Akhmanova, A., and Hammer III, J. A. (2010). Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol, 22* (4), 479-487.

Albert, S., and Gallwitz, D. (1999). Two New Members of a Family of Ypt/Rab GTPase Activating Proteins: Promiscuity of Substrate Recognition. *Journal of Biological Chemistry, 274* (47), 33186-33189.

Albert, S., Will, E., and Gallwitz, D. (1999). Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J, 18* (19), 5216-5225.

Ali, B. R., and Seabra, M. C. (2005). Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem Soc Trans, 33* (Pt 4), 652-656.

Allan, B.B., Moyer, B., and Balch, W. E. (2000). Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion. *Science, 289*, 444-448.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol, 215* (3), 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res, 25* (17), 3389-3402.

An, Y., Chen, C. Y., Moyer, B., Rotkiewicz, P., Elsliger, M. A., Godzik, A., Wilson, I. A., and Balch, W. E. (2009). Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering. *J Mol Biol, 391* (1), 26-41.

Andag, U., and Schmitt, H. D. (2003). Dsl1p, an essential component of the Golgi-endoplasmic reticulum retrieval system in yeast, uses the same sequence

motif to interact with different subunits of the COPI vesicle coat. *J Biol Chem, 278* (51), 51722-51734.

Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P., and Goldstein, J.L. (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell, 73*, 1091-1099.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci, 119* (Pt 11), 2173-2183.

Arai, S., Noda, Y., Kainuma, S., Wada, I., and Yoda, K. (2008). Ypt11 functions in bud-directed transport of the Golgi by linking Myo2 to the coatomer subunit Ret2. *Curr Biol, 18* (13), 987-991.

Araujo-Palomares, C. L., Castro-Longoria, E., and Riquelme, M. (2007). Ontogeny of the spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol, 44* (6), 492-503.

Aronson, D. E., Costantini, L. M., and Snapp, E. L. (2011). Superfolder GFP is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon. *Traffic, 12* (5), 543-548.

Ayad, N., Hull, M., and Mellman, I. (1997). Mitotic phosphorylation of rab4 prevents binding to a specific receptor on endosome membranes. *EMBO J, 16* (15), 4497-4507.

Backues, S. K., and Klionsky, D. J. (2012). Atg11: a Rab-dependent, coiled-coil membrane protein that acts as a tether for autophagy. *Autophagy, 8* (8), 1275-1278.

Bacon, R., Salminen, A., Ruohola, H., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J Cell Biol, 109*, 1015-1022.

Baldwin, T. A., and Ostergaard, H. L. (2002). The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via golgi-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem, 277* (52), 50333-50340.

Barfield, R. M., Fromme, J. C., and Schekman, R. (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell, 20* (23), 4985-4996.

Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell, 91* (2), 253-262.

Barr, F., Nakamura, N., and Warren, G. (1998). Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J, 17* (12), 3258-3268.

Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2010). TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nat Rev Mol Cell Biol, 11* (11), 759-763.

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

Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E., Lippman, E., and Ruiz-Herrera, J. (1984). Chitosomes from the wall-less "slime" mutant of *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol, 139*, 105-112.

Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., and Gierz, G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma, 153*, 46-57.

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

Bartnicki-Garcia, Salomon, Bartnicki, David D., Gierz, Gerhard, López-Franco, Rosamaría, and Bracker, Charles E. (1995). Evidence That Spitzenkörper Behavior Determines the Shape of a Fungal Hypha: A Test of the Hyphoid Model. *Experimental Mycology, 19* (2), 153-159.

Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., and Warren, G. (2005). A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem, 280* (27), 25840-25848.

Benli, M., Doring, F., Robinson, D. G., Yang, X., and Gallwitz, D. (1996). Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J, 15* (23), 6460-6475.

Bento, C. F., Puri, C., Moreau, K., and Rubinsztein, D. C. (2013). The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J Cell Sci, 126* (Pt 5), 1059-1069.

Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis. *J Bacteriol, 62* (3), 293.

Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *J Bacteriol, 186* (3), 595-600.

Betz, William J., Mao, Fei, and Smith, Corey B. (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology, 6* (3), 365-371.

Bevis, B. J., Hammond, A. T., Reinke, C. A., and Glick, B. S. (2002). De novo formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*. *Nat Cell Biol, 4* (10), 750-756.

Bielli, P., Casavola, E. C., Biroccio, A., Urbani, A., and Ragnini-Wilson, A. (2006). GTP drives myosin light chain 1 interaction with the class V myosin Myo2 IQ motifs via a Sec2 RabGEF-mediated pathway. *Mol Microbiol, 59* (5), 1576-1590.

Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J, 348 Pt 2*, 241-255.

Black, M. W., and Pelham, H. R. (2000). A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J Cell Biol, 151* (3), 587-600.

Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol, 67* (3), 852-862.

Boldogh, I. R., Ramcharan, S. L., Yang, H. C., and Pon, L. A. (2004). A type V myosin (Myo2p) and a Rab-like G-protein (Ypt11p) are required for retention of newly inherited mitochondria in yeast cells during cell division. *Mol Biol Cell, 15* (9), 3994-4002.

Bonfanti, L., Mironov, A. A., Jr., Martinez-Menarguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A., and Luini, A. (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell, 95* (7), 993-1003.

Bonifacino, J. S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol, 204* (1), 7-17.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., and Pratt, R. (2004). Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68* (1), 1-108.

Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell, 129* (5), 865-877.

Bourett, T. M., James, S. W., and Howard, R. J. (2007). The Endomembrane System of the Fungal Cell. In: R. J. Howard and N. A. R. Gow (Eds.), *The Mycota* (Vol. VIII, pp. 1-47). Berlin Heidelberg. Springer-Verlag

Bourett, T.M., and Howard, R.J. (1991). Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. *Protoplasma, 163*, 199-202.

Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature, 349* (6305), 117-127.

Bowman, B. J., Abreu, S., Johl, J. K., and Bowman, E. J. (2012). The *pmr* gene, encoding a Ca^{2+}-ATPase, is required for calcium and manganese homeostasis

and normal development of hyphae and conidia in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell, 11* (11), 1362-1370.

Bowman, B. J., Draskovic, M., Freitag, M., and Bowman, E. J. (2009). Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell, 8* (12), 1845-1855.

Bracker, C. E., and Grove, S. N. (1971). Continuity between cytoplasmic endomembranes and outer mitochondrial membranes in fungi. *Protoplasma, 73*, 15-34.

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

Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keränen, S., Bankaitis, V. A., and Novick, P. (1994). Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell, 79*, 245-256.

Brown, J. D., Hann, B. C., Medzihradszky, K. F., Niwa, M., Burlingame, A. L., and Walter, P. (1994). Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J, 13* (18), 4390-4400.

Brunswik, H. (1924). Untersuchugen über die Geslechts und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetengattung Coprinus (Vol. 5). Jena. Gustav Fisher Verlag.

Burgess, T. L., and Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol, 3*, 243-293.

Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007a). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell, 12* (5), 671-682.

Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J. C., and Ferro-Novick, S. (2007b). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature, 445* (7130), 941-944.

Cai, H., Zhang, Y., Pypaert, M., Walker, L., and Ferro-Novick, S. (2005). Mutants in trs120 disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *J Cell Biol, 171* (5), 823-833.

Cai, Y., Chin, H. F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C., Cai, H., Sclafani, A., Rodgers, D. W., De La Cruz, E. M., Ferro-Novick, S., and Reinisch, K. M. (2008). The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell, 133* (7), 1202-1213.

Calero, M., Chen, C. Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K. A., Gilbert, P. M., Burd, C. G., and Collins, R. N. (2003). Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol Biol Cell, 14* (5), 1852-1867.

Cao, X., Ballew, N., and Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J, 17* (8), 2156-2165.

Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., and Pfeffer, S. (2001). Role of Rab9 GTPase in Facilitating Receptor Recruitment by TIP47. *Science, 292*, 1373-1376.

Casavola, E. C., Catucci, A., Bielli, P., Di Pentima, A., Porcu, G., Pennestri, M., Cicero, D. O., and Ragnini-Wilson, A. (2008). Ypt32p and Mlc1p bind within the vesicle binding region of the class V myosin Myo2p globular tail domain. *Mol Microbiol, 67* (5), 1051-1066.

Castle, E. (1958). The topography of tip growth in a plant cell. *J. Gen. Physiol., 41*, 913-926.

Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature, 353* (6346), 769-772.

Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of Low Molecular Weight GTP Binding Proteins to Exocytic and Endocytic Compartments. *Cell, 62*, 317-329.

Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., and Moosejer, M. S. (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell, 75*, 13-23.

Cheng, H., Sugiura, R., Wu, W., Fujita, M., Lu, Y., Sio, S. O., Kawai, R., Takegawa, K., Shuntoh, H., and Kuno, T. (2002). Role of the Rab GTP-binding protein Ypt3 in the fission yeast exocytic pathway and its connection to calcineurin function. *Mol Biol Cell, 13* (8), 2963-2976.

Chesneau, L., Dupre, S., Burdina, A., Roger, J., Le Panse, S., Jacquet, M., and Cuif, M. H. (2004). Gyp5p and Gyl1p are involved in the control of polarized exocytosis in budding yeast. *J Cell Sci, 117* (Pt 20), 4757-4767.

Chiba, K., Shimada, Y., Kinjo, M., Suzuki, T., and Uchida, S. (2014). Simple and direct assembly of kymographs from movies using KYMOMAKER. *Traffic, 15* (1), 1-11.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene, 110*, 119-122.

Collins, R.N., Brennwald, P., Garrett, M., Lauring, A., and Novick, P. (1997). Interactions of Nucleotide Release Factor Dss4p with Sec4p in the Post-Golgi Secretory Pathway of Yeast. *J Biol Chem, 272* (29), 18281-18289.

Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., and Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103* (27), 10352-10357.

Conibear, E., and Stevens, T. H. (2000). Vps52p, Vps53p, and Vps54p Form a Novel Multisubunit Complex Required for Protein Sorting at the Yeast Late Golgi. *Mol Biol Cell, 11*, 306-323.

Cortés, J.C.G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A., and Ribas, J.C. (2005). The novel fission yeast (1,3) β-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci, 118* (1), 157-174.

Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., and Payne, G. S. (2001). Yeast GGA coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol Biol Cell, 12* (6), 1885-1896.

Cox, A. D., and Der, C. J. (2002). Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther, 1* (6), 599-606.

Dean, N., Zhang, Y.B., and Poster, J. B. (1997). The VRG4 Gene Is Required for GDP-mannose Transport into the Lumen of the Golgi in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry, 272* (50), 31908-31914.

Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., and 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.

Deshaies, R. J., and Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol, 105* (2), 633-645.

Deshaies, R. J., and Schekman, R. (1990). Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol, 10* (11), 6024-6035.

Desnoyers, L., Anant, J. S., and Seabra, M. C. (1996). Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochem Soc Trans, 24* (3), 699-703.

Diao, A., Frost, L., Morohashi, Y., and Lowe, M. (2008). Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. *J Biol Chem, 283* (11), 6957-6967.

Diaz, E., and Pfeffer, S. (1998). TIP47: A Cargo Selection Device for Mannose 6-Phosphate Receptor Trafficking. *Cell, 93*, 433-443.

Dijksterhuis, J., and Molenaar, D. (2013). Vesicle trafficking via the Spitzenkörper during hyphal tip growth in *Rhizoctonia solani*. *Antonie Van Leeuwenhoek, 103* (4), 921-931.

Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T., and Pfeffer, S. R. (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J, 16* (3), 465-472.

Donaldson, J. G., Finazzi, D., and Klausner, R. D. (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature, 360* (6402), 350-352.

Donovan, K. W., and Bretscher, A. (2012). Myosin-V is activated by binding secretory cargo and released in coordination with Rab/exocyst function. *Dev Cell, 23* (4), 769-781.

Du, L-L., and Novick, P. (2001). Yeast Rab GTPase-activating Protein Gyp1p Localizes to the Golgi Apparatus and Is a Negative Regulator of Ypt1p. *Molecular Biology of the Cell, 12*, 1215-1226.

Dumas, B., Borel, C., Herbert, C., Maury, J., Jacquet, C., Balsse, R., and Esquerre-Tugaye, M. T. (2001). Molecular characterization of *CLPT1*, a *SEC4*-like Rab/GTPase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* which is regulated by the carbon source. *Gene, 272* (1-2), 219-225.

Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F., and Malhotra, V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol, 188* (4), 527-536.

Eberhart, B. M. (1961). Exogenous enzymes of *Neurospora* conidia and mycelia. *J Cell Comp Physiol, 58*, 11-16.

Echard, A. (1998). Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6. *Science, 279* (5350), 580-585.

Echauri-Espinosa, R. O. (2013). Localización y dinámica de las proteínas : miosinas de clase II (MYO-2) miosina de clase V (MYO-5), miosina de cadena ligera (CDC-4) y coronina (CRN-1) en el hongo filamentoso *Neurospora crassa.* Tesis de doctorado en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 80 p.

Elkind, N.B., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (2000). The Role of the COOH Terminus of Sec2p in the Transport of Post-Golgi Vesicles. *J Cell Biol, 149* (1), 95-110.

Enderlin, C. S., and Selitrennikoff, C. (1994). Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3)β-glucan synthase activity and cell wall formation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 91*, 9500-9504.

Eva, A., and Aaronson, S. A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature, 316* (6025), 273-275.

Fajardo-Somera, R. (2013). Tráfico vesicular de las proteínas quitina sintasas y la ATPasa de H^+ de membrana plasmática durante el crecimiento de *Neurospora crassa.* Tesis de doctorado en ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 130 p.

Fajardo-Somera, R., Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G.H., and Riquelme, M. (2015). Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, *(submitted)*.

Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1981). The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *J Cell Biol, 91* (3 Pt 2), 77s-103s.

Fewell, S. W., and Brodsky, J. L. (2000). Entry into the Endoplasmic Reticulum: Protein Translocation, Folding and Quality Control. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Recuperado el 20 de Noviembre del 2014, de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6210/.

Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., and Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc, 198* (Pt 3), 246-259.

Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet, 81*, 33-82.

Freitag, M., and Selker, E. (2005). Expression and Visualization of Red Fluorescent Protein (RFP) in *Neurospora crassa Fungal Genet. Newslet.* (Vol. 52, pp. 14-17).

Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., and Steinberg, G. (2006). Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell, 18* (8), 2066-2081.

Fukuda, Mitsunori. (2011). TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Reports, 31* (3), 159-168.

Gao, X. D., Albert, S., Tcheperegine, S. E., Burd, C. G., Gallwitz, D., and Bi, E. (2003). The GAP activity of Msb3p and Msb4p for the Rab GTPase Sec4p is required for efficient exocytosis and actin organization. *J Cell Biol, 162* (4), 635-646.

García-Mata, R., and Sztul, E. (2003). The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor. *EMBO Rep, 4* (3), 320-325.

Garrett, M., Kabcenell, A.K., Zahner, J.E., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., Cheney, C.M., and Novick, P. (1993). Interaction of Sec4 with GDI proteins from bovine

brain, *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae FEBS J, 331* (3), 233-238.

Garrett, M., Zahner, J.E., Cheney, C.M., and Novick, P. (1994). *GDI1* encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J, 13* (7), 1718-1728.

Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K., and Klionsky, D. J. (2010). Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell, 21* (13), 2257-2269.

Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L., and Gelb, M. H. (1995). Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry, 34* (37), 11910-11918.

Gillingham, A.K., and Munro, S. (2003). Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta, 1641*, 71-85.

Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N. J., and Valent, B. (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat Commun, 4*, 1996.

Girbardt, M. (1969). Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhyphen. *Protoplasma, 67*, 413-441.

Glick, B. S., Elston, T., and Oster, G. (1997). A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. *FEBS Lett, 414* (2), 177-181.

Glick, B. S., and Nakano, A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol, 25*, 113-132.

Gordon, C. L., Archer, D. B., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B., Trinci, A. P. J. , and Robson, G. D. (2000). A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J Microbiol Methods, 42*, 39-48.

Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C., and Novick, P. (1988). A GTP-Binding Protein Required for Secretion Rapidly Associates with Secretory Vesicles and the Plasma Membrane in Yeast. *Cell, 53*, 753-768.

Grabski, R., Hay, J., and Sztul, E. (2012). Tethering factor P115. *BioArchitecture, 2* (5), 175-180.

Grant, B. D., and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10* (9), 597-608.

Grosshans, B. L., Andreeva, A., Gangar, A., Niessen, S., Yates III, J. R., Brennwald, P., and Novick, P. (2006a). The yeast Lgl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *J Cell Biol, 172* (1), 55-66.

Grosshans, B. L., Ortiz, D., and Novick, P. (2006b). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103* (32), 11821-11827.

Grote, E., Carr, C. M., and Novick, P. J. (2000). Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol, 151* (2), 439-452.

Grove, S. N., and Bracker, C. E. (1970). Protoplasmic Organization of Hyphal Tips Among Fungi: Vesicles and Spitzenkörper. *J Bacteriol, 104* (2), 989-1009.

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J, 18*, 1071-1088.

Guo, Y., Punj, V., Sengupta, D., and Linstedt, A. D. (2008). Coat-tether interaction in Golgi organization. *Mol Biol Cell, 19* (7), 2830-2843.

Hales, C. M., Vaerman, J. P., and Goldenring, J. R. (2002). Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem, 277* (52), 50415-50421.

Hammer, J. A., 3rd, and Sellers, J. R. (2012). Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat Rev Mol Cell Biol, 13* (1), 13-26.

Hammond, T. M., Xiao, H., Rehard, D. G., Boone, E. C., Perdue, T. D., Pukkila, P. J., and Shiu, P. K. (2011). Fluorescent and bimolecular-fluorescent protein tagging of genes at their native loci in *Neurospora crassa* using specialized double-joint PCR plasmids. *Fungal Genet Biol, 48* (9), 866-873.

Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J. Y., Nakano, H., and Kitamoto, K. (2011). Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol, 81* (1), 40-55.

He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W. L., Legakis, J. E., and Klionsky, D. J. (2006a). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol, 175* (6), 925-935.

He, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Kita, A., Deng, L., Takegawa, K., Matsuoka, K., Shuntoh, H., and Kuno, T. (2006b). Genetic and functional interaction between Ryh1 and Ypt3: two Rab GTPases that function in *S. pombe* secretory pathway. *Genes Cells, 11* (3), 207-221.

Heath, I. B. (1994). The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements and mitosis. In: J. G. H. Wessels and F. Meinhardt (Eds.), *The Mycota.* (pp. 43-65). Heidelberg, Germany. Springer-Verlag.

Heintz, K., Palme, K., Diefenthal, T., and Russo, V. E. (1992). The *Ncypt1* gene from *Neurospora crassa* is located on chromosome 2: molecular cloning and structural analysis *Mol Gen Genet, 235*, 413-421.

Helms, J. B., and Rothman, J. E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature, 360* (6402), 352-354.

Hickey, P. C., Jacobson, D. J., Read, N. D., and Glass, N. L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol, 37*, 109-119.

Hickey, P.C., Swift, S.M., Roca, M.G., and Read, N.D. . (2005). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes. *Methods in Microbiology 34*, 63-87.

Hohmann-Marriott, M. F., Uchida, M., van de Meene, A. M., Garret, M., Hjelm, B. E., Kokoori, S., and Roberson, R. W. (2006). Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytol, 172* (2), 208-220.

Honda, S., and Selker, E. U. (2009). Tools for Fungal Proteomics: Multifunctional *Neurospora* Vectors for Gene Replacement, Protein Expression and Protein Purification. *Genetics, 182* (1), 11-23.

Horazdovsky, B. F., Busch, G. R., and Emr, S. D. (1994). VPS21 encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins. *EMBO J, 13* (6), 1297-1309.

Horio, T., and Oakley, B. R. (2005). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell, 16* (2), 918-926.

Howard, R. (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J Cell Sci, 48*, 89-103.

Howard, R., and Aist, J.R. (1979). Hyphal Tip Cell Ultrastructure of the Fungus Fusarium: Improved Preservation by Freeze-Substitution. *Journal of Ultrastructure Research, 66*, 224-234.

Hubbard, M. A., and Kaminskyj, S. G. (2008). Rapid tip-directed movement of Golgi equivalents in growing *Aspergillus nidulans* hyphae suggests a mechanism for delivery of growth-related materials. *Microbiology, 154* (Pt 5), 1544-1553.

Huffaker, T. C., Thomas, J. H., and Botstein, D. (1988). Diverse effects of beta-tubulin mutations on microtubule formation and function. *J Cell Biol, 106* (6), 1997-2010.

Hunsley, D., and Gooday, G. W. (1974). The structure and development of septa in *Neurospora crassa*. *Protoplasma, 82*, 125-146.

Hutagalung, A., and Novick, P. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol Rev, 91*, 119-149.

Itzen, A., Rak, A., and Goody, R. S. (2007). Sec2 is a highly efficient exchange factor for the Rab protein Sec4. *J Mol Biol, 365* (5), 1359-1367.

Jackson-Hayes, L., Hill, T. W., Loprete, D. M., Fay, L. M., Gordon, B. S., Nkashama, S. A., Patel, R. K., and Sartain, C. V. (2008). Two GDP-mannose transporters contribute to hyphal form and cell wall integrity in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology, 154* (Pt 7), 2037-2047.

Jacobs, C. W., Adams, A. E., Szaniszlo, P. J., and Pringle, J. R. (1988). Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol, 107* (4), 1409-1426.

Jedd, G., Mulholland, J., and Segev, N. (1997). Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast *trans*-Golgi compartment. *J Cell Biol, 137* (3), 563-580.

Jedd, G., Richardson, C., Litt, R., and Segev, N. (1995). The Ypt1 GTPase Is Essential for the First Two Steps of the Yeast Secretory Pathway. *J cell Biol, 131* (3), 583-590.

Jin, Yui, Sultana, Azmiri, Gandhi, Pallavi, Franklin, Edward, Hamamoto, Susan, Khan, Amir R, Munson, Mary, Schekman, Randy, and Weisman, Lois S. (2011). Myosin V Transports Secretory Vesicles via a Rab GTPase Cascade and Interaction with the Exocyst Complex. *Developmental Cell, 21* (6), 1156-1170.

Johnston, D. A., Tapia, A. L., Eberle, K. E., and Palmer, G. E. (2013). Three prevacuolar compartment Rab GTPases impact *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell, 12* (7), 1039-1050.

Johnston, G. C., Presndergast, J. A., and 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.

Jones, L. A., and Sudbery, P. E. (2010). Spitzenkörper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryot Cell, 9* (10), 1455-1465.

Jones, M. C., Caswell, P. T., and Norman, J. C. (2006). Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr Opin Cell Biol, 18* (5), 549-557.

Kabcenell, A.K., Goud, B., Northup, J.K, and Novick, P. (1990). Binding and hydrolysis of guanine nucleotides by Sec4p, a yeast protein involved in the regulation of vesicular traffic. *J Biol Chem, 265* (16), 9366-9372.

Kang, M. S., and Cabib, E. (1986). Regulation of fungal cell wall growth: A guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1-3)-β-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A, 83*, 5808–5812.

Kean, L.S., Fuller, R.S., and Nichols, J.W. (1993). Retrograde Lipid Traffic in Yeast: Identification of Two Distinct Pathways for Internalization of Fluorescent-

labeled Phosphatidylcholine from the Plasma Membrane. *J Cell Biol, 123*, 1403-1419.

Kim, Y. G., Raunser, S., Munger, C., Wagner, J., Song, Y. L., Cygler, M., Walz, T., Oh, B. H., and Sacher, M. (2006). The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell, 127* (4), 817-830.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem, 54*, 631-664.

Kümmel, D., and Ungermann, C. (2014). Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol, 29*, 61-66.

Lafourcade, C., Galan, J. M., Gloor, Y., Haguenauer-Tsapis, R., and Peter, M. (2004). The GTPase-Activating Enzyme Gyp1p Is Required for Recycling of Internalized Membrane Material by Inactivation of the Rab/Ypt GTPase Ypt1p. *Molecular and Cellular Biology, 24* (9), 3815-3826.

Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A., Bahler, M., and Goldenring, J. R. (2001). Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell, 12* (6), 1843-1857.

Laufman, O., Kedan, A., Hong, W., and Lev, S. (2009). Direct interaction between the COG complex and the SM protein, Sly1, is required for Golgi SNARE pairing. *EMBO J, 28* (14), 2006-2017.

Leal-Morales, C.A., Bracker, Charles E., and Bartnicki-Garcia, S. (1994). Distribution of Chitin Synthetase and Various Membrane Marker Enzymes in Chitosomes and Other Organelles of the Slime Mutant of *Neurospora crassa*. *Exp Mycol, 18*, 168-179.

Lee, M. T., Mishra, A., and Lambright, D. G. (2009). Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases. *Traffic, 10* (10), 1377-1389.

Lee, S. A., Mao, Y., Zhang, Z., and Wong, B. (2001). Overexpression of a dominant-negative allele of YPT1 inhibits growth and aspartyl protease secretion in *Candida albicans*. *Microbiology, 147* (Pt 7), 1961-1970.

Levine, T., and Rabouille, C. (2005). Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Curr Opin Cell Biol, 17* (4), 362-368.

Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H. R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell, 11* (1), 23-38.

Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., and Stanley, E. F. (2004). A syntaxin 1, Gα_o, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci, 24* (16), 4070-4081.

Liang, Po-Huang, Ko, Tzu-Ping, and Wang, Andrew H. J. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry, 269* (14), 3339-3354.

Lichius, A., Berepiki, A., and Read, N. D. (2011). Form follows function - the versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biol, 115* (6), 518-540.

Liewen, H., Meinhold-Heerlein, I., Oliveira, V., Schwarzenbacher, R., Luo, G., Wadle, A., Jung, M., Pfreundschuh, M., and Stenner-Liewen, F. (2005). Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex. *Exp Cell Res, 306* (1), 24-34.

Lipatova, Z., Belogortseva, N., Zhang, X. Q., Kim, J., Taussig, D., and Segev, N. (2012). Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109* (18), 6981-6986.

Lipatova, Z., and Segev, N. (2012). A Ypt/Rab GTPase module makes a PAS. *Autophagy, 8* (8), 1271-1272.

Lipatova, Z., Tokarev, A. A., Jin, Y., Mulholland, J., Weisman, L. S., and Segev, N. (2008). Direct interaction between a myosin V motor and the Rab GTPases Ypt31/32 is required for polarized secretion. *Mol Biol Cell, 19* (10), 4177-4187.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., and 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.

Lipschutz, J. H., and Mostov, K. E. (2002). Exocytosis: The Many Masters of the Exocyst. *Curr Biol, 12*, R212-214.

Llilie, S. H., and Brown, S. S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol, 125*, 825-842.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., and Matsudaira, P. (2007). *Molecular Cell Biology* (6th ed.). W.H. Freeman.

López-Franco, R., and Bracker, C. E. (1996). Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma, 195*, 90-111.

Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., and Glick, B. S. (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature, 441* (7096), 1002-1006.

Luini, A. (2011). A brief history of the cisternal progression-maturation model. *Cell Logist, 1* (1), 6-11.

Lynch-Day, M. A., Bhandari, D., Menon, S., Huang, J., Cai, H., Bartholomew, C. R., Brumell, J. H., Ferro-Novick, S., and Klionsky, D. J. (2010). Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107* (17), 7811-7816.

Maddi, A., and Free, S. J. (2010). α-1,6-Mannosylation of N-Linked Oligosaccharide Present on Cell Wall Proteins Is Required for Their Incorporation into the Cell Wall in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell, 9* (11), 1766-1775.

Mallik, R., and Gross, S. P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol, 14* (22), R971-982.

Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W. F., and Subramani, S. (2010). Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol, 188* (4), 537-546.

Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., and Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol, 190* (6), 1005-1022.

Markina-Inarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E. A., and Peñalva, M. A. (2013). The *Aspergillus nidulans* Peripheral ER: Disorganization by ER Stress and Persistence during Mitosis. *PLoS One, 8* (6), e67154.

Martínez-Núñez, L. E. (2011). Localización de las β (1,3) endoglucanasas EGLC-1 y EGLC-2 y su papel en la morfogénesis de *Neurospora crassa.* Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 75 p.

Martinez, O., Schmidt, A., Salamero, J., Hoflack, B., Roa, M., and Goud, B. (1994). The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol, 127* (6 Pt 1), 1575-1588.

Maruyama, J., and Kitamoto, K. (2007). Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett, 272* (1), 1-7.

Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B., and Rapoport, T. A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science, 277* (5328), 938-941.

Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell, 93* (2), 263-275.

Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K., and Nakano, A. (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature, 441* (7096), 1007-1010.

McNally, M. T, and Free, S. J. (1988). Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr Genet, 14*, 545-551.

Medkova, M., France, Y. E., Coleman, J., and Novick, P. (2006). The rab exchange factor Sec2p reversibly associates with the exocyst. *Mol Biol Cell, 17* (6), 2757-2769.

Mellman, I., and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell, 100* (1), 99-112.

Miller, Elizabeth A., Beilharz, Traude H., Malkus, Per N., Lee, Marcus C. S., Hamamoto, Susan, Orci, Lelio, and Schekman, Randy. (2003). Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell, 114* (4), 497-509.

Miller, V. J., and Ungar, D. (2012). Re'COG'nition at the Golgi. *Traffic, 13* (7), 891-897.

Mims, C. W., Rodriguez-Lother, C., and Richardson, E. A. (2002). Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma, 219* (3-4), 221-226.

Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S.B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., and Yamada-Okabe, H. (1997). Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae G*SC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol, 179* (13), 4096-4105.

Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., and Novick, P. (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell, 18* (5), 828-840.

Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., and Novick, P. (2012). GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annu Rev Biochem, 81*, 637-659.

Mogelsvang, S., Gomez-Ospina, N., Soderholm, J., Glick, B. S., and Staehelin, L. A. (2003). Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell, 14* (6), 2277-2291.

Morozova, N., Liang, Y., Tokarev, A. A., Chen, S. H., Cox, R., Andrejic, J., Lipatova, Z., Sciorra, V. A., Emr, S. D., and Segev, N. (2006). TRAPPII subunits are required for the specificity switch of a Ypt-Rab GEF. *Nat Cell Biol, 8* (11), 1263-1269.

Morré, D. J. (1977). Membrane differentiation and the control of secretion: a comparison of plant and animal Golgi apparatus. . In: B. R. Brinkley and K. R. Porter (Eds.), *International Cell Biology* (pp. 293-303). New York. Rockefeller University Press.

Mourino-Perez, R. R., and Riquelme, M. (2013). Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. *Adv Genet, 83*, 99-134.

Mouriño-Pérez, Rosa R. (2013). Septum development in filamentous ascomycetes. *Fungal Biology Reviews, 27* (1), 1-9.

Mowbrey, K., and Dacks, J. B. (2009). Evolution and diversity of the Golgi body. *FEBS Lett, 583* (23), 3738-3745.

Moya, M., Roberts, D., and Novick, P. (1994). *DSS4-1* is a dominant suppressor of *sec4-8* that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature, 361*, 460-463.

Moyer, B., Allan, B.B., and Balch, W. E. (2001). Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle *cis*-Golgi Tethering. *Traffic, 2*, 268-276.

Mukhopadhyay, A., Nieves, E., Che, F-Y., Wang, J, Jin, L., Murray, J.W., Gordon, K., Angeletti, R.H., and Wolkoff, A.W. (2011). Proteomic analysis of endocytic vesicles: Rab1a regulates motility of early endocytic vesicles. *J Cell Sci, 124*, 765-775.

Mulholland, J., Wesp, A., Riezman, H., and Botstein, D. (1997). Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of Golgi-derived secretary vesicle. *Mol Biol Cell, 8*, 1481-1499.

Munro, S. (2002). Organelle identity and the targeting of peripheral membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol, 14*, 506-514.

Munson, M., and Novick, P. (2006). The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat Struct Mol Biol, 13* (7), 577-581.

Nakajima, H., Hirata, A., Ogawa, Y., Yonehara, T., Yoda, K., and Yamasaki, M. (1991). A cytoskeleton-related gene, *USO1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol, 113* (2), 245-260.

Newman, C. M., and Magee, A. I. (1993). Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim Biophys Acta, 1155* (1), 79-96.

Ng, D. T., Brown, J. D., and Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol, 134* (2), 269-278.

Ngosuwan, J., Wang, N. M., Fung, K. L., and Chirico, W. J. (2003). Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem, 278* (9), 7034-7042.

Nickel, W. (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol, 21* (5), 621-626.

Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10* (2), 148-155.

Nickel, Walter. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. *European Journal of Biochemistry, 270* (10), 2109-2119.

Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., and Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol, 1* (6), 376-382.

Nilsson, I., Whitley, P., and von Heijne, G. (1994). The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J Cell Biol, 126* (5), 1127-1132.

Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101* (33), 12248-12253.

Nishikawa, A., Poster, J. B., Jigami, Y., and Dean, N. (2002). Molecular and Phenotypic Analysis of CaVRG4, Encoding an Essential Golgi Apparatus GDP-Mannose Transporter. *Journal of Bacteriology, 184* (1), 29-42.

Novick, P., and Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell, 40*, 405-416.

Novick, P., Medkova, M., Dong, G., Hutagalung, A., Reinisch, K., and Grosshans, B. (2006). Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis. *Biochem Soc Trans, 34* (Pt5), 683-686.

Odronitz, F., and Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol, 8* (9), R196.

Ohno, H. (2006). Clathrin-associated adaptor protein complexes. *J Cell Sci, 119* (Pt 18), 3719-3721.

Okada, H., Abe, M., Asakawa-Minemura, M., Hirata, A., Qadota, H., Morishita, K., Ohnuki, S., Nogami, S., and Ohya, Y. (2010). Multiple functional domains of the yeast 1,3-beta-glucan synthase subunit Fks1p revealed by quantitative phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants. *Genetics, 184* (4), 1013-1024.

Orcl, L., Palmer, D. J., Amherdt, M., and Rothman, J. E. (1993). Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatomer and ARF proteins from the cytosol. *Nature, 364* (6439), 732-734.

Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J Cell Biol, 157* (6), 1005-1015.

Pantazopoulou, A., and Peñalva, M. A. (2009). Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell, 20* (20), 4335-4347.

Pantazopoulou, A., and Peñalva, M. A. (2011). Characterization of *Aspergillus nidulans* RabC/Rab6. *Traffic, 12* (4), 386-406.

Pantazopoulou, A., Pinar, M., Xiang, X., and Peñalva, M. A. (2014). Maturation of late Golgi cisternae into RabE^{RAB11} exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol Biol Cell, 25* (16), 2428-2443.

Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A. (1995). Post-translational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell, 81* (4), 561-570.

Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell, 133* (6), 1055-1067.

Peplowska, K., Markgraf, D. F., Ostrowicz, C. W., Bange, G., and Ungermann, C. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell, 12* (5), 739-750.

Pereira-Leal, J. B. (2008). The Ypt/Rab family and the evolution of trafficking in fungi. *Traffic, 9* (1), 27-38.

Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2000). The Mammalian Rab Family of Small GTPases: Definition of Family and Subfamily Sequence Motifs Suggests a Mechanism for Functional Specificity in the Ras Superfamily. *Journal of Molecular Biology, 301*, 1077–1087.

Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab Family of Small GTP-binding Proteins. *J Mol Biol, 313*, 889-901.

Perez-Victoria, F. J., Mardones, G. A., and Bonifacino, J. S. (2008). Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes. *Mol Biol Cell, 19* (6), 2350-2362.

Pfeffer, S. (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in Cell Biology, 11* (12), 487-491.

Pfeffer, S. R. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J Biol Chem, 280* (16), 15485-15488.

Pfeffer, S. R. (2010). How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107* (46), 19614-19618.

Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst, H. N., Jr., and Peñalva, M. A. (2013a). Acute inactivation of the *Aspergillus nidulans* Golgi membrane fusion machinery:

correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization. *Mol Microbiol, 89* (2), 228-248.

Pinar, M., Pantazopoulou, A., and Peñalva, M. A. (2013b). Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement. *Autophagy, 9* (7), 1024-1043.

Powers-Fletcher, M. V., Feng, X., Krishnan, K., and Askew, D. S. (2013). Deletion of the *sec4* homolog *srgA* from *Aspergillus fumigatus* is associated with an impaired stress response, attenuated virulence and phenotypic heterogeneity. *PLoS One, 8* (6), e66741.

Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C. A., Orlean, P., Albright, C., Rose, M. D., Robbins, P. W., and Botstein, D. (1991). Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast, 7* (9), 891-911.

Prosser, J. I., and Trinci, A. P. J. (1979). A Model for Hyphal Growth and Branching. *J Gen Microbiol, 111*, 153-164.

Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P., and Gerst, J. E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell, 74* (5), 855-861.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science, 297*, 612-615.

Pruyne, D., Schott, D., and Bretscher, A. (1998). Tropomyosin-containing Actin Cables Direct the Myo2p-dependent Polarized Delivery of Secretory Vesicles in Budding Yeast. *J cell Biol, 143* (7), 1931-1945.

Punt, P. J., Seiboth, B., Weenink, X. O., van Zeijl, C., Lenders, M., Konetschny, C., Ram, A. F., Montijn, R., Kubicek, C. P., and van den Hondel, C. A. (2001). Identification and characterization of a family of secretion-related small GTPase-encoding genes from the filamentous fungus *Aspergillus niger*: a putative *SEC4* homologue is not essential for growth. *Mol Microbiol, 41* (2), 513-525.

Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B. E., Thomae, N. H., Constantinescu, A. T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R. S., and Alexandrov, K. (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J, 25* (1), 13-23.

Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Cioaca, M. D., Bessolitsyna, E., Thoma, N. H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R. S., and Alexandrov, K. (2003). Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Mol Cell, 11* (2), 483-494.

Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., and Dubyak, G. R. (2007). Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol, 179* (3), 1913-1925.

Rak, A., Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R. S., Gallwitz, D., and Scheidig, A. J. (2000). Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *EMBO J, 19* (19), 5105-5113.

Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A., Kushnir, S., Brunsveld, L., Waldmann, H., Goody, R. S., and Alexandrov, K. (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science, 302* (5645), 646-650.

Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R. S., and Alexandrov, K. (2004). Structure of the Rab7:REP-1 complex: insights into the mechanism of Rab prenylation and choroideremia disease. *Cell, 117* (6), 749-760.

Ramírez-del Villar, A. (2014). Caracterización de la miosina de clase V del hongo filamentoso *Neurospora crassa.* Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 75 p.

Ramos-Garcia, S. L., Roberson, R. W., Freitag, M., Bartnicki-Garcia, S., and Mourino-Perez, R. R. (2009). Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell, 8* (12), 1880-1890.

Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature, 450* (7170), 663-669.

Reinhardt, M.O. (1892). Das Wachsthum der Pilzhyphen. *Jahrb. Wissenschafliche Bot., 23*, 479-566.

Richardson, B. C., and Fromme, J. C. (2013). The exomer cargo adaptor features a flexible hinge domain. *Structure, 21* (3), 486-492.

Richthammer, C., Enseleit, M., Sánchez-León, E., Marz, S., Heilig, Y., Riquelme, M., and Seiler, S. (2012). RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology, 85* (4), 716-733.

Rida, P. C., Nishikawa, A., Won, G. Y., and Dean, N. (2006). Yeast-to-hyphal transition triggers formin-dependent Golgi localization to the growing tip in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell, 17* (10), 4364-4378.

Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol, 67*, 587-609.

Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A., and 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., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltran-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., and Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol Biol Cell, 25* (8), 1312-1326.

Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology, 146*, 1743-1752.

Riquelme, M., Reynaga-Pena, C. G., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (1998). What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genet Biol, 24*, 202-109.

Riquelme, M., and Sánchez-León, E. (2014). The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol, 20*, 27-33.

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

Riquelme, Meritxell, and Bartnicki-García, Salomon. (2008). Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews, 22* (2), 56-70.

Rivera-Molina, F. E., and Novick, P. J. (2009). A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106* (34), 14408-14413.

Roberson, R.W., and Fuller, R.S. (1988). Ultrastructural Aspects of the Hyphal Tip of *Sclerotium rolfsii* Preserved by Freeze Substitution. *Protoplasma, 146*, 143-149.

Robertson, N.F. (1965). The fungal hypha. *Trans. Br. Mycol. Soc., 48*, 1-8.

Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J., Raposo, G., van der Sluijs, P., and Bonifacino, J. S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol, 183* (3), 513-526.

Roland, J. T., Kenworthy, A. K., Peranen, J., Caplan, S., and Goldenring, J. R. (2007). Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3. *Mol Biol Cell, 18* (8), 2828-2837.

Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K., and Glick, B. S. (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol, 145* (1), 69-81.

Rossi, G., and Brennwald, P. (2011). Yeast homologues of lethal giant larvae and type V myosin cooperate in the regulation of Rab-dependent vesicle clustering and polarized exocytosis. *Mol Biol Cell, 22* (6), 842-857.

Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., and Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol, 109* (6 Pt 1), 2641-2652.

Rubino, M., Miaczynska, M., Lippé, R., and Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem, 275*, 3745-3748.

Ruiz-Herrera, J., and Bartnicki-Garcia, S. (1974). Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science, 186* (4161), 357-359.

Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S., and Bracker, C. E. (1980). Dissociation of chitosomes by digitonin into 16 S subunits with chitin synthetase activity. *Biochim Biophys Acta, 629*, 201-216.

Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., and Ferro-Novick, S. (2001). TRAPP I Implicated in the Specificity of Tethering in ER-to-Golgi Transport. *Molecular Cell, 7*, 433-442.

Salminen, A., and Novick, P. (1987). A ras-like Protein Is Required for a Post-Golgi Event in Yeast Secretion. *Cell, 49*, 527-538.

Salminen, A., and Novick, P. (1989). The Sec15 protein responds to the function of the GTP binding protein, Sec4, to control vesicular traffic in yeast. *J Cell Biol, 109* (3), 1023-1036.

Saloheimo, M., Wang, H., Valkonen, M., Vasara, T., Huuskonen, A., Riikonen, M., Pakula, T., Ward, M., and Penttila, M. (2004). Characterization of Secretory Genes *ypt1/yptA* and *nsf1/nsfA* from Two Filamentous Fungi: Induction of Secretory Pathway Genes of *Trichoderma reesei* under Secretion Stress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology, 70* (1), 459-467.

Sanchatjate, S., and 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., Barry, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P., and Riquelme, M. (2014). The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*, Nov 25. doi: 10.1111/mmi.12878. [Epub ahead of print].

Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S., and Riquelme, M. (2011). Traffic of Chitin Synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell, 10* (5), 683-695.

Santiago-Tirado, F. H., Legesse-Miller, A., Schott, D., and Bretscher, A. (2011). PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev Cell, 20* (1), 47-59.

Sappersteins, S.K., Walter, D.M., Grosvenor, A.R., Heuser, J. E., and Waters, M. G. (1995). p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Uso1p. *Proc Natl Acad Sci U S A, 92*, 522-526.

Sata, M., Donaldson, J. G., Moss, J., and Vaughan, M. (1998). Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95* (8), 4204-4208.

Satoh, Ayano, Wang, Yanzhuang, Malsam, Jörg, Beard, Matthew B., and Warren, Graham. (2003). Golgin-84 is a rab1 Binding Partner Involved in Golgi Structure. *Traffic, 4* (3), 153-161.

Schafer, T., Zentgraf, H., Zehe, C., Brugger, B., Bernhagen, J., and Nickel, W. (2004). Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *J Biol Chem, 279* (8), 6244-6251.

Schliwa, M. (1999). Molecular motors join forces. *Nature, 397* (6716), 204-205.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev, 16* (13), 1587-1609.

Schmitz, H. P., Kaufmann, A., Kohli, M., Laissue, P. P., and Philippsen, P. (2006). From function to shape: a novel role of a formin in morphogenesis of the fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Biol Cell, 17* (1), 130-145.

Schnepf, E. (1993). Golgi apparatus and slime secretion in plants: the early implications and recent models of membrane traffic. *Protoplasma, 172*, 3-11.

Schotman, H., Karhinen, L., and Rabouille, C. (2008). dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Dev Cell, 14* (2), 171-182.

Schott, D. H., Collins, R. N., and Bretscher, A. (2002). Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol, 156* (1), 35-39.

Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., and 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*.

Sclafani, A., Chen, S., Rivera-Molina, F., Reinisch, K., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2010). Establishing a role for the GTPase Ypt1p at the late Golgi. *Traffic, 11* (4), 520-532.

Seabra, M. C. (1998). Membrane Association and Targeting of Prenylated Ras-like GTPases. *Cell Signal., 10* (3), 167-172.

Seabra, M. C., and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol, 16* (4), 451-457.

Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T., and Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A, 97* (17), 9402-9407.

Seaman, M. N. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci, 125* (Pt 20), 4693-4702.

Segev, N. (1991). Mediation of the attachment or fusion step in vesicular transport by the GTP-binding Ypt1 protein. *Science, 252* (5012), 1553-1556.

Segev, N. (2001). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE, 2001* (100), re11.

Segev, N., Mulholland, J., and Bolstein, D. (1988). The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell, 52*, 915-924.

Seidel, C., Moreno-Velásquez, S. D., Riquelme, M., and Fischer, R. (2013). *Neurospora crassa* NKIN2, a kinesin-3 motor, transports early endosomes and is required for polarized growth. *Eukaryot Cell, 12* (7), 1020-1032.

Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G., and Schliwa, M. (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J, 16* (11), 3025-3034.

Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B. D., and Smythe, E. (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol, 183* (3), 499-511.

Sesso, A., de Faria, F. P., Iwamura, E. S., and Correa, H. (1994). A three-dimensional reconstruction study of the rough ER-Golgi interface in serial thin sections of the pancreatic acinar cell of the rat. *J Cell Sci, 107 (Pt 3)*, 517-528.

Shanks, S. G., Carpp, L. N., Struthers, M. S., McCann, R. K., and Bryant, N. J. (2012). The Sec1/Munc18 protein Vps45 regulates cellular levels of its SNARE binding partners Tlg2 and Snc2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One, 7* (11), e49628.

Shestakova, A., Suvorova, E., Pavliv, O., Khaidakova, G., and Lupashin, V. (2007). Interaction of the conserved oligomeric Golgi complex with t-SNARE Syntaxin5a/Sed5 enhances intra-Golgi SNARE complex stability. *J Cell Biol, 179* (6), 1179-1192.

Shiu, P. K., Zickler, D., Raju, N. B., Ruprich-Robert, G., and Metzenberg, 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 U S A, 103* (7), 2243-2248.

Shoji, J. Y., Arioka, M., and Kitamoto, K. (2008). Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol Lett, 30* (1), 7-14.

Short, B., Haas, A., and Barr, F. A. (2005). Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta, 1744* (3), 383-395.

Shorter, J., Beard, M. B., Seemann, J., Dirac-Svejstrup, A. B., and Warren, G. (2002). Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J Cell Biol, 157* (1), 45-62.

Shorter, J., and Warren, G. (1999). A Role for the Vesicle Tethering Protein, p115, in the Post-mitotic Stacking of Reassembling Golgi Cisternae in a Cell-free System. *The Journal of Cell Biology, 146* (1), 57-70.

Simonsen, A., Gaullier, J. M., D'Arrigo, A., and Stenmark, H. (1999). The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem, 274* (41), 28857-28860.

Singer-Krüger, B., Stenmark, H., Düsterhöft, A., Philippsen, P., Yoo, J-S., Gallwitz, D., and Zerial, M. (1994). Role of Three Rab5-1ike GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the Endocytic and Vacuolar Protein Sorting Pathways of Yeast. *The Journal of Cell Biology, 125* (2), 283-298.

Siniossoglou, S., and Pelham, H. R. (2001). An effector os Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *EMBO J, 20* (21), 5991-5998.

Sivaram, M. V., Saporita, J. A., Furgason, M. L., Boettcher, A. J., and Munson, M. (2005). Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry, 44* (16), 6302-6311.

Sivars, U., Aivazian, D., and Pfeffer, S. R. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature, 425* (6960), 856-859.

Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R., and Freitag, M. (2011). Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Mol Cell Biol, 31* (12), 2528-2542.

Sohda, Miwa, Misumi, Yoshio, Yamamoto, Akitsugu, Nakamura, Nobuhiro, Ogata, Shigenori, Sakisaka, Shotaro, Hirose, Shinichi, Ikehara, Yukio, and Oda, Kimimitsu. (2010). Interaction of Golgin-84 with the COG Complex Mediates the Intra-Golgi Retrograde Transport. *Traffic, 11* (12), 1552-1566.

Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jämsä, E., Dirac-Svejstrup, B., and Warren, G. (1998). A Role for Giantin in Docking COPI Vesicles to Golgi Membranes. *J Cell Biol, 1405*, 1013-1021.

Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., and Schechtman, M. (1989). Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet. Newsl., 36*, 79-81.

Steel, G. J., Brownsword, J., and Stirling, C. J. (2002). Tail-anchored protein insertion into yeast ER requires a novel posttranslational mechanism which is independent of the SEC machinery. *Biochemistry, 41* (39), 11914-11920.

Steinberg, G. (2014). Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol, 20C*, 10-18.

Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B. H., and D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem, 271* (39), 24048-24054.

Stenmark, H., and Olkkonen, Vesa M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol, 2* (5), 3007.3001-3007.3007.

Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ulrich, O., Goud, B., and Zerial, M. (1994). Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity.

Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrugge, M., and Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol, 161* (2), 80-91.

Strick, D. J., Francescutti, D. M., Zhao, Y., and Elferink, L. A. (2002). Mammalian suppressor of Sec4 modulates the inhibitory effect of Rab15 during early endocytosis. *J Biol Chem, 277* (36), 32722-32729.

Striegel, H. (2009). Unusual Armadillo Fold in the Human General Vesicular Transport Factor p115. *PLoS One, 4* (e4656), 1-8.

Stroupe, C., and Brunger, A.T. (2000). Crystal Structures of a Rab Protein in its Inactive and Active Conformations. *J Mol Biol, 304*, 585-598.

Stroupe, C., Collins, K. M., Fratti, R. A., and Wickner, W. (2006). Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J, 25* (8), 1579-1589.

Suda, Y., and Nakano, A. (2012). The yeast Golgi apparatus. *Traffic, 13* (4), 505-510.

Sultana, A., Jin, Y., Dregger, C., Franklin, E., Weisman, L. S., and Khan, A. R. (2011). The activation cycle of Rab GTPase Ypt32 reveals structural determinants of effector recruitment and GDI binding. *FEBS Lett, 585* (22), 3520-3527.

Suvorova, E. S., Duden, R., and Lupashin, V. V. (2002). The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *J Cell Biol, 157* (4), 631-643.

Symons, M., and Settleman, J. (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol, 10* (10), 415-419.

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

Taheri-Talesh, N., Xiong, Y., and Oakley, B. R. (2012). The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One, 7* (2), e31218.

Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H. W., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci, 125* (Pt 17), 4049-4057.

Takeshita, N., Manck, R., Grun, N., de Vega, S. H., and Fischer, R. (2014). Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol, 20*, 34-41.

Takeshita, N., Ohta, A., and 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.

Tentler, S., Palas, J., Enderlin, C., Campbell, J., Taft, C., and Miller, T.K. (1997). Inhibition of *Neurospora crassa* growth by a glucan synthase-1 antisense construct. *Curr Microbiol, 34*, 303-308.

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

Tokarev, A. A., Taussig, D., Sundaram, G., Lipatova, Z., Liang, Y., Mulholland, J. W., and Segev, N. (2009). TRAPP II complex assembly requires Trs33 or Trs65. *Traffic, 10* (12), 1831-1844.

Torralba, S., Raudaskoski, M, Pedregosa, A. M., and Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology, 144*, 45-53.

Toyokawa, K., Carling, S. J., and Ott, T. L. (2007). Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): I. Ovine Mx1 is secreted by endometrial epithelial cells via an 'unconventional' secretory pathway. *Am J Reprod Immunol, 57* (1), 13-22.

Trevithick, J. R., and Metzenberg, R. L. (1966). Molecular sieving by *Neurospora* cell walls during secretion of invertase isozymes. *J Bacteriol, 92* (4), 1010-1015.

Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., and Zerial, M. (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem, 268* (24), 18143-18150.

Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., and Hughson, F. M. (2006). Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol, 16* (2), 113-120.

VanRheenen, Susan M., Reilly, Barbara A., Chamberlain, Stormy J., and Waters, M. Gerard. (2001). Dsl1p, an Essential Protein Required for Membrane Traffic at the Endoplasmic Reticulum/Golgi Interface in Yeast. *Traffic, 2* (3), 212-231.

Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., and Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol, 74* (5), 1044-1053.

Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science, 294* (5545), 1299-1304.

Vinke, F. P., Grieve, A. G., and Rabouille, C. (2011). The multiple facets of the Golgi reassembly stacking proteins. *Biochem J, 433* (3), 423-433.

Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbial Genet. Bull, 13*, 42-43.

Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T. A. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol, 134* (1), 25-35.

Wagner, W., Bielli, P., Wacha, S., and Ragnini-Wilson, A. (2002). Mlc1p promotes septum closure during cytokinesis via the IQ motifs of the vesicle motor Myo2p. *EMBO J, 21* (23), 6397-6408.

Walch-Solimena, C., Collins, R. N., and Novick, P. (1997). Sec2p Mediates Nucleotide Exchange on Sec4p and Is Involved in Polarized Delivery of Post-Golgi Vesicles. *The Journal of Cell Biology, 137* (7), 1495-1509.

Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell, 38* (1), 5-8.

Walworth, N.C., Brennwald, P., Kabcenell, A.K., Garrett, M., and Novick, P. (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol, 12* (5), 2017-2028.

Walworth, N.C., Goud, B., Kabcenell, A.K., and Novick, P. (1989). Mutational analysis of *SEC4* suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J, 8* (6), 1685-1693.

Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L., and 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.

Watanabe, R., and Riezman, H. (2004). Differential ER exit in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol, 16* (4), 350-355.

Waters, M. G., Clary, D. O., and Rothman, J. E. (1992). A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol, 118* (5), 1015-1026.

Weber-Boyvat, M., Aro, N., Chernov, K. G., Nyman, T., and Jantti, J. (2011). Sec1p and Mso1p C-terminal tails cooperate with the SNAREs and Sec4p in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell, 22* (2), 230-244.

Weber, I., Gruber, C., and Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell, 15* (12), 2826-2842.

Wedlich-Soldner, R., Schulz, I., Straube, A., and Steinberg, G. (2002). Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell, 13* (3), 965-977.

Weisman, L. S. (2006). Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat Rev Mol Cell Biol, 7* (4), 243-252.

Wennerberg, K., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci, 118* (Pt 5), 843-846.

Westergaard, M, and Mitchel, H.K. (1947). *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am J Bot, 14*, 573–577.

Whyte, J.R.C., and Munro, S. (2001). The Sec34/35 Golgi Transport Complex Is Related to the Exocyst, Defining a Family of Complexes Involved in Multiple Steps of Membrane Traffic.

Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science, 310* (5753), 1452-1456.

Wilson, C. (1986). FGSC Culture Preservation Methods. *Fungal Genet. Newsl., 33*, 47-48.

Winston, F., Dollard, C., and Ricupero-Hovasse, S. L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast, 11* (1), 53-55.

Wooding, S., and Pelham, H. R. (1998). The Dynamics of Golgi Protein Traffic Visualized in Living Yeast Cells. *Mol Biol Cell, 9*, 2667-2680.

Wösten, H. A., Moukha, S. M., Sietsma, J. H., and Wessels, J. G. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol, 137* (8), 2017-2023.

Wu, S. K., Zeng, K., Wilson, I. A., and Balch, W. E. (1996). Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem Sci, 21* (12), 472-476.

Wu, S., Mehta, S. Q., Pichaud, F., Bellen, H. J., and Quiocho, F. A. (2005). Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol, 12* (10), 879-885.

Wu, X., Rao, K., Bowers, M. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Hammer, J. A., 3rd. (2001). Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci, 114* (Pt 6), 1091-1100.

Wu, Y. W., Tan, K. T., Waldmann, H., Goody, R. S., and Alexandrov, K. (2007). Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104* (30), 12294-12299.

Wurmser, A. E., Sato, T. K., and Emr, S. D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol, 151* (3), 551-562.

Yamakawa, H., Seog, D. H., Yoda, K., Yamasaki, M., and Wakabayashi, T. (1996). Uso1 protein is a dimer with two globular heads and a long coiled-coil tail. *J Struct Biol, 116* (3), 356-365.

Yamasaki, A., Menon, S., Yu, S., Barrowman, J., Meerloo, T., Oorschot, V., Klumperman, J., Satoh, A., and Ferro-Novick, S. (2009). mTrs130 is a component of a mammalian TRAPPII complex, a Rab1 GEF that binds to COPI-coated vesicles. *Mol Biol Cell, 20* (19), 4205-4215.

Yip, C. K., Berscheminski, J., and Walz, T. (2010). Molecular architecture of the TRAPPII complex and implications for vesicle tethering. *Nat Struct Mol Biol, 17* (11), 1298-1304.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D. J. (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell, 16* (4), 1593-1605.

Yu, S., and Liang, Y. (2012). A trapper keeper for TRAPP, its structures and functions. *Cell Mol Life Sci*.

Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A., 3rd, and Xiang, X. (2011). Aspergillus myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS One, 6* (e28575), 1-8.

Zolov, S. N., and Lupashin, V. V. (2005). Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol, 168* (5), 747-759.

Zou, S., Chen, Y., Liu, Y., Segev, N., Yu, S., Liu, Y., Min, G., Ye, M., Zeng, Y., Zhu, X., Hong, B., Bjorn, L. O., Liang, Y., Li, S., and Xie, Z. (2013). Trs130 participates in autophagy through GTPases Ypt31/32 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic, 14* (2), 233-246.

Zou, S., Liu, Y., Zhang, X. Q., Chen, Y., Ye, M., Zhu, X., Yang, S., Lipatova, Z., Liang, Y., and Segev, N. (2012). Modular TRAPP complexes regulate intracellular protein trafficking through multiple Ypt/Rab GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics, 191* (2), 451-460.

Anexos

Leyendas de Videos Suplementarios

Video S1. Efecto de la BFA en la distribución subcelular de tDIMER-2-YPT-31 y GFP-YPT-1.

Serie de tiempo mostrando que tDIMER-2-YPT-31 no se encuentra en los agregados de GFP-YPT-1 formados por el efecto de la BFA. Nótese que tDIMER-2-YPT-31 no se acumula en alguna estructura a lo largo de la hifa, pero si localiza al igual que la YPT-1 en el Spitzenkörper.

Video S2. Co-localización de YPT-1 y USO-1 en cisternas de Golgi temprano.

La co-expresión de mChFP-YPT-1 y el marcador de Golgi temprano USO-1-GFP mostró que ambas proteínas co-localizan en una subpoblación de cisternas de Golgi. Nótese la co-localización parcial de ambas proteínas en cisternas individuales y en movimiento.

Video S3. Co-localización parcial de YPT-1 y el marcador de Golgi temprano VRG-4.

Serie de tiempo de la co-expresión de mChFP-YPT-1 y VRG-4-GFP (Bowman *et al.*, 2012) mostrando a YPT-1 y VRG-4 en una población mixta de cisternas de Golgi donde ambas proteínas co-localizan mientras que otras mantienen el marcaje individual.

Video S4. Dinámica de estructuras tubulares de YPT-1.

Microscopía TIRF revelando cambios en la morfología de túbulos marcados por YPT-1, que se encuentran distribuidos paralelos al eje longitudinal de las hifas. Nótese la presencia de cisternas de Golgi y vesículas en el mismo plano de observación.

Video S5. Estructuras tubulares de YPT-1 no corresponden al citoesqueleto microtubular.

Serie de tiempo mostrando en regiones distales de la hifa, la ausencia de co-localización entre la YPT-1 y los microtúbulos marcados con GFP.

Video S6. YPT-1 y el marcador de endosomas tempranos YPT-52 localizan en distintas estructuras.

Serie de tiempo mostrando la co-expresión de mChFP-YPT-1 y GFP-YPT-52 (Seidel *et al.*, 2013). En ningún momento durante la observación se observaron estructuras en donde co-localicen YPT-1 y YPT-52.

Video S7. Distribución Subcelular del motor molecular.

A. Serie de tiempo mostrando la distribución de MYO-5-GFP en el domo apical de las hifas. Nótese la nube de vesículas siempre detrás de la región de más alta concentración de la proteína.
B. Serie de tiempo mostrando la localización pleomórfica y muy dinámica MYO-5-GFP aproximándose a regiones anteriores del Spitzenkörper.
C. Serie de tiempo obtenida con escaneo con rebanadas ópticas delgadas, mostrando la localización de MYO-5-GFP en la región del Spitzenkörper.

Video S8. Distribución subcelular de INV-1-SFGFP en los ápices de las hifas.

Serie de tiempo mostrando a INV-1-SFGFP en la región del Spitzenkörper. Nótese la baja concentración de la proteína localizada en las puntas de las hifas.

Video S9. INV-1-SFGFP se distribuye en la región macrovesicular del Spitzenkörper.

Serie de tiempo mostrando el marcaje de la región externa del Spitzenkörper por INV-1-SFGFP.

Video S10. INV-1-SFGFP se localiza en Septos.

Proyección de imagen tri-dimensional mostrando la localización de INV-1-SFGFP en septos de *N. crassa*.

Medios de Cultivo

Medio Mínimo de Vogel (MMV, Vogel 1956)

a) Sales de Vogel* [1 X]
b) Sacarosa 15 g/L
c) Agar 15 g/L
d) Agua Deionizada

Sales de Vogel 50X (100 ml): 12.35 g de Citrato de Sodio ($Na_3C_6H_5O_7$ x $2H_2O$), 25 g de Fosfato de Potasio Monohidratado (KH_2PO_4), 10 de Nitrato de Amonio (NH_4NO_3), 0.49 g de Sulfato de Magnesio Anhidro ($MgSO_4$), 0.38 g de Cloruro de Calcio Anhidro ($CaCl_2$). 500 μl de elementos traza, 250 μl de solución de Biotina (0.1 mg/ml).

Medio Completo de Vogel (MCV)

a) Sales de Vogel [1 X]
b) Sacarosa 15 g/L
c) Extracto de Levadura 0.5 %
d) Casaminoácidos 0.5%
e) Agua Deionizada

MMV con Fructosa-Glucosa-Sorbosa (MMV-FGS)

a) Sales de Vogel [2 X]
b) Agar Bacteriológico1%
c) Agua Deionizada
d) Solución FGS* [1 X]

*Solución FGS 10X: Fructosa 0.5%, Glucosa 0.5%, Sorbosa 20%. Esterilizado por filtración.

Medio Sintético de Cruzas (MSC) (Westergaard and Mitchel, 1947)

a) Medio SC stock* [1 X]
b) Sacarosa 2%
c) Agua deionizada

*Medio SC stock 5X (1L): 5 g KNO_3, 3.5 g K_2HPO_4, 2.5g KH_2PO_4, 5 g $MgSO_4$ $7H_20$, 0.5 g NaCl, 0.5 g $CaCl_2$, 25 mg Biotina, 0.5 ml Elementos traza, agua destilada. Mantener a 4° C.

Medio de Caldo Lisogénico (LB) (Bertani, 1951)

a) Triptona o Peptona 1%
b) Extracto de Levadura 0.5%

c) Cloruro de Sodio 0.5%
d) Hidróxido de Sodio 1mM
e) Agar Bacteriológico 1.4%

Medio Completo Yeast Peptona Dextrosa con Adenina (YPDA)

a) Triptona o Peptona 2%
b) Glucosa 2%
c) Extracto de Levadura 1%
d) Adenina ~80 mg/l
e) Agar Bacteriológico 2%

Medio Definido de Selección sin Uracilo (SD-URA)

a) Triptona o Peptona 2%
b) Levadura Base de Nitrógeno (sin aminoácidos) 1.7 mg/l
c) Sulfato de Amonio 5 mg/l
d) Solución de Aminoácidos* [1 X] sin Uracilo
e) Aminoácidos [1 X]: L-Histidina, L-Leucina, L-Triptófano, L-Adenina
f) Agua deionizada H_2O
g) Glucosa 2%
h) Agar Bacteriológico 2%

Ajuste de la mezcla a-f a pH to 5.8 con NaOH [1 M].

Solución de Aminoácidos [10 X]: L-Arginina-HCl [200 mg/l], L-Isoleucina [300 mg/l], L-Lisina [300 mg/l], L-Fenilalanina [500 mg/l], L-Treonina [2 g/l], L-Tirosina [300 mg/l], L-Valina [1.5 g/l], Metionina [200 mg/l]. Esterilizados por filtración y mantenidos a 4° C.

Suplementos de aminoácidos individuales [100 X]: L-histidina [15 g/l], L-Leucina [10 g/l], L-Triptófano [2 g/l], L-Adenina [80 mg/l]. Esterilizados por filtración y mantenidos a 4° C.

Reactivos y Condiciones de Reacciones de PCR

Reacciones de PCR para Amplificar Fragmentos de ADN

5 μl Amortiguador LA PCR Buffer II (sin Mg^{2+}) [10 X]

5 μl MgCl [25 mM]

8 μl dNTPs [2.5 mM]

1.0 μl ADN genómico

1.5 μl Oligonucleótido sentido [10 μM]

1.5 μl Oligonucleótido anti-sentido [10 μM]

0.2 μl enzima TAKARA LA Taq [5 U/μl]

Llevar a 50μl con H_2O deionizada estéril

94° C 2 min

94° C 30 s / 55° C 30 s / 72° C 2 min 30 s* [30 X]

72° C 10 min 30 s

4° C ∞

*Tiempo de extensión en función de la longitud del fragmento a razón de 1 kb/min

Reacciones de PCR de Colonia

3 μl Amortiguador GoTaq® Buffer (Promega) [5 X]

1.5 μl MgCl [25 mM]

0.6 μl dNTPs [2.5 mM]

0.3 μl Oligonucleótido sentido [10 μM]

0.3 μl Oligonucleótido anti-sentido [10 μM]

0.2 μl enzima ADN polimerasa

Llevar a 15μl con H_2O deionizada estéril

94° C 5 min

94° C 30 s / 55° C 30 s / 72° C 1 min 30 s* [30 X]

72° C 5 min 30 s

4° C ∞

*Tiempo de extensión en función de la longitud del fragmento a razón de 1 kb/min

Reacciones de PCR de Fusión

5 μl Amortiguador LA PCR Buffer II (sin Mg^{2+}) [10 X]

5 μl MgCl [25 mM]

8 μl dNTPs [2.5 mM]

1.0 μl Amplicón purificado fragmento 1

1.0 μl Amplicón purificado fragmento 2

1.5 μl Oligonucleótido sentido [10 μM]

1.5 μl Oligonucleótido anti-sentido [10 μM]

0.2 μl enzima TAKARA LA Taq [5 U/μl]

Llevar a 50μl con H_2O deionizada estéril

94° C 3 min

94° C 3 min / 58° C 3 min / 72° C 3 min 30 s [30 X]

72° C 10 min 30 s

4° C ∞

Digestión y Ligación de Amplicones o Vectores Recombinantes

Condiciones de Digestión de Amplicones o Vectores Recombinantes

2 μl BSA [10 X]

1 μl Enzima 1

1 μl Enzima 2

2 μl Amortiguador de las Enzimas [10X]

10-14 μl Amplicón purificado fragmento o vector

Llevar a 20μl con H_2O deionizada estéril

Incubar a 37° C 3 horas. Adicionar 1 μl de Fosfatasa Alcalina [SAP, 5 U/μl] e Incubar a 37° C 45 min. Adicionar 1 μl EDTA [0.5 M] y purificar con kit comercial.

Condiciones de Ligación de Amplicones con Vectores Recombinantes

Añadir al tubo de reacción el inserto y el vector a una razón molar de (1:3). Se puede determinar la cantidad de ambos usando la siguiente ecuación:

ng inserto= 3 x ng vector x kpb inserto) / kpb vector

1 μl Ligasa T4
1 μl Amortiguador de Ligasa [10X]
Llevar a 20μl con H_2O deionizada estéril

Incubar a 16° C por 16 horas. Inactivar con temperatura a 65° C por 10 min. Transformar inmediatamente con el producto de ligación en *E. coli.*

Reactivos y Condiciones para Transformar *E. coli* quimio-competentes por Choque Térmico

a) Descongelar células quimio-competentes en hielo
b) Añadir 2-10 μl of ADN plasmídico o producto de ligación DNA a 50 μl de KCM [5X] frío
c) Añadir el mismo volumen de células quimio-competentes que la mezcla anterior
d) Mantener en hielo por 30 minutos
e) Incubar a 42° C por 2 minutos y luego pasar al hielo
f) Añadir medio LB líquido e incubar a 37° C por 1 hora a 220 rpm
g) Sembrar en placas con medios de selección* e incubar a 37° C

*Sembrar todas las células transformadas si la reacción lleva el producto de ligación. Se puede concentrar a 13 krpm por 1 minuto. Sembrar una dilución de 1:10 si el objetivo de la reacción es de clonar un vector.

Solución KCM: KCl [100 mM], $CaCl_2$ [30 mM], $MgCl_2$ [50 mM]. Preparar a partir de stocks [1 M] esterilizados por filtración. Almacenado a -20° C.

Extracción de ADN plasmídico de Levadura (Rose *et al.*, 1990)

1. Añadir 1-2 ml de medio YPD en la placa con levaduras transformadas; estriar las colonias con un sobre-objetos y pasar la suspensión de células a un tubo de 1.5 ml
2. Centrifugar a 4500 rpm por 1 min y desechar el sobrenadante; eliminar células si el volumen de ellas excede los 50-75 µl
3. Añadir al precipitado 0.2 ml de Solución de Lisis S&G, 0.2 ml fenol/cloroformo y 0.3 g de perlas de vidrio (0.45-0.5 mm). Homogeneizar con agitador de vórtice Mini Bead-Beater
4. Centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad y remover 100 µl del sobrenadante a un tubo nuevo. Evitar la interfase.
5. Añadir 1:10 de Acetato de Sodio o Potasio pH 5.2 [3 M]
6. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío
7. Centrifugar por 5 min a máxima velocidad; desechar el sobrenadante y lavar con etanol al 70% frío; Centrifugar nuevamente
8. Secar a 37° C por 15 min y resuspender el vector en solución amortiguadora de elución
9. Transformar con 1-2 µl del vector en *E. coli*

Solución de Lisis S&G: Tritón X-100 2%, SDS 1%, Cloruro de Sodio [100 mM], Tris pH8.0 [10 mM], EDTA [1 mM].

Soluciones Amortiguadoras

Soluciones Amortiguadora de Lisis para IP o WB

a) Tris Base pH 7.4 [50 mM]
b) Cloruro de Potasio [100 mM]
c) Cloruro de Magnesio [10 mM]

d) Tritón X-100 [1%] o NP-40 [0.1%]

Inhibidor de proteasas: Aprotinina [10 ng/µl], Leupeptina [10 ng/µl], Dithiotreitol [2 mM], Pepstatina [2 ng/µl], Pefabloc [1 mM], Benzamidina [0.35 µg/µl], Fluoruro de Sodio [NaF, 5 mM], Ortovanadato de Sodio [Na_3VO_4, 1 mM], β-Glicerofosfato [25 mM]. Para WB se utilizó también cOmplete ULTRA Tablets EDTA free (Roche, ref 05892953001).

Soluciones Amortiguadora para SDS-PAGE

Solución Amortiguadora de Corrimiento

a) 60.6 g Tris Base
b) 288.2 g Glicina
c) 20 g Sodio Dodecil Sulfato (SDS)
d) Llevar a 2 litros con agua deionizada.

Solución para Gel de Separación [4X]

a) Tris Base [1.5 M]
b) SDS [0.4%]
c) Llevar a pH 8.8

Para preparar 10 ml de gel de poliacrilamida se añade la solución de poliacrilamida para la concentración deseada y se complementa con: 2.5 ml de solución de separación [4X], 50 µl de Persulfato de Amonio [APS, 10%], 9.5 µl de TEMED y 4.1 ml agua deionizada estéril.

8.1.1.1 Solución para Gel de Concentración [4X]

d) Tris Base [0.5 M]
e) SDS [0.4%]
f) Llevar a pH 6.8

Para preparar 5 ml de gel de poliacrilamida se añade la solución de poliacrilamida para la concentración deseada y se complementa con: 2.5 ml de solución de

concentración [4X], 25 µl de Persulfato de Amonio [APS, 10%], 4 µl de TEMED y 1.875 ml agua deionizada estéril.

Solución Amortiguadora Laemmli [4X]

a) 2.4 ml de Tris HCl pH 6.8 [1M]
b) 0.8 g SDS
c) 4 ml de Glicerol [100%]
d) 1 mg Azul de bromofenol
e) 1 ml de β-mercaptoetanol
f) 2.8 ml de Agua deionizada estéril

Mantener a -20° C y hervir la solución antes de usarla.

Soluciones Amortiguadoras para Western blots

Solución Amortiguadora para Transferencia de Proteínas

a) 100 ml de Solución Amortiguadora de Transferencia [10X]
b) 200 ml de Metanol
c) 700 ml de agua deionizada.

Preparar la solución fresca y mantenerla a 4° C. Solución Amortiguadora de Transferencia [10X]: 15 g Tris Base, 72 g Glicina, 1 g Sodio Dodecil Sulfato (SDS), llevar a 2 litros con agua deionizada.

Solución Amortiguadora TBS-T

a) TBS [1X]
b) Tween [0.1%]

Preparar la solución fresca con agua deionizada estéril, esterilizarla y mantenerla a 4° C. Solución Amortiguadora TBS [10X]: 24.2 g Tris Base, 80 g Cloruro de Sodio, llevar a 2 litros con agua deionizada y ajustar el pH a 7.6 con HCl.