

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada**



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

**Identificación de Cuerpos Multivesiculares en *Neurospora
crassa***

Tesis

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

Presenta:

Alba Anayatzin Aguilar Romero

**Ensenada, Baja California, México
2017**

Tesis defendida por
Alba Anayatzin Aguilar Romero

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director de tesis

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Israel Rocha Mendoza



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Alba Anayatzin Aguilar Romero** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Identificación de Cuerpos Multivesiculares en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Director de tesis

El transporte vesicular dirigido a vacuola puede ocurrir mediante la ruta biosintética o la ruta endocítica. En ambos casos, la ubiquitinación de proteínas actúa como una señal para la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs). Éstos se forman cuando la membrana del endosoma tardío invagina dentro de su propio lumen, formando vesículas intraluminales (ILVs), cuyo contenido es degradado, cuando los MVBs se fusionan con vacuola, o liberadas al espacio extracelular como exosomas, cuando los MVBs se fusionan con la Membrana Plasmática (MP). La formación de las ILVs requiere la participación de los complejos multiproteicos ESCRT-0, I, II y III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Este trabajo ha caracterizado morfológicamente a los MVBs en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, y estudiado su papel en la biogénesis o reciclaje de enzimas dirigidas hacia la MP. Como marcadores de MVB se analizaron VPS-27 y VPS-2, proteínas que conforman ESCRT-0 y ESCRT-III, respectivamente, y presuntamente tienen un papel importante en la formación de MVBs. Se localizó a lo largo de la hifa excluyendo el ápice en estructuras puntiformes. Sin embargo, VPS-27 está en la membrana de cuerpos pleomórficos mayormente esféricos, mientras que VPS-2 se encuentra en el lumen de cuerpos globulares más uniformes y distintos a los identificados por VPS-27, así como en la membrana de aquellos cuerpos marcados por VPS-27. Como marcador de proteínas de membrana, se utilizó quitina sintasa 1 (CHS-1) la cual co-localiza parcialmente en forma punteada con los cuerpos marcados por VPS-2-GFP, sugiriendo que los quitosomas pueden ser originados en los MVBs como lo sugieren estudios previos. Para conocer la naturaleza de los cuerpos elucidados por VPS-2-GFP y VPS-27-GFP se usaron cepas que expresaban marcadores de otros organelos, como el marcador vacuolar VMA-1 y el marcador endosomal RAB-7, las cuales co-localizan parcialmente en la membrana de los compartimentos prevacuolares (PVC). Se encontró la presencia tanto de RAB-7, como de VMA-1 en la membrana de los cuerpos marcados por VPS-27-GFP, así como en el centro de los cuerpos marcados por VPS-2-GFP, sugiriendo que los PVCs y los MVBs pueden converger y tratarse de un mismo organelo. La co-expresión de VPS-27-GFP y VPS-2-mCherry mostró la presencia de VPS-2 en la membrana de los cuerpos marcados por VPS-27-GFP.

Palabras clave: *Neurospora crassa*, Cuerpos Multivesiculares, Vesículas intraluminales, Endosoma, ESCRT, VPS-27, VPS-2.

Abstract of the thesis presented by **Alba Anayatzin Aguilar Romero** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Microbiology.

Identification of Multivesicular Bodies in *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

Vesicular transport to vacuole can occur through the biosynthetic or endocytic pathways. In both cases, the ubiquitination of the proteins acts as a signal for the formation of Multivesicular Bodies (MVBs), which are formed when the late endosome membrane invaginates within their own lumen forming intraluminal vesicles (ILVs). The content of the ILVs may be degraded, when the MVBs fuses with vacuoles, or released into the extracellular space as exosomes, when the MVBs fuse to the plasma membrane (MP). The formation of ILVs requires the participation of the multiprotein complexes ESCRT-0, I, II and III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). This work has studied the distribution of MVBs in the filamentous fungus *Neurospora crassa*, and their role in the biogenesis or recycling of enzymes directed to the MP. VPS-27 and VPS-2, constituents of ESCRT-0 and ESCRT-III, respectively, with presumably an important role in the formation of MVBs were used as MVB markers. They were found in a similar distribution, localizing as punctiform structures along the hyphae, excluding the apex. VPS-27 was also found in the membrane of mostly spherical pleomorphic bodies. VPS-2 was present in the lumen of globular bodies, as well as in the membrane of those bodies marked by VPS-27-GFP. Chitin synthase 1 (CHS-1) was used as a membrane protein marker, and it partially co-localized with bodies marked by VPS-2-GFP, suggesting that chitosomes could derive from MVBs as indicated by previous reports. In order to know the nature of the bodies elucidated by VPS-2-GFP and VPS-27-GFP, a set of different strains expressing markers for other organelles, such as the vacuolar marker VMA-1 and the late endosomal marker RAB-7, both proteins that co-localize at the prevacuolar (PVC) membrane, were used. Co-expression of these proteins with VPS-27-GFP identified both VMA-1 and RAB-7 at the membrane of the bodies marked by VPS-27-GFP, as well as in the center of the bodies marked by VPS-2-GFP, suggesting that PVCs and MVBs can converge or mature and become the same organelle. Co-expression of VPS-27-FGP and VPS-2-mChFP showed the presence of VPS-2 at the membrane of the bodies marked by VPS-27.

Keywords: *Neurospora crassa*, Multivesicular bodies, Intraluminal vesicles, Endosome, ESCRT, VPS.27, VPS-2.

Dedicatoria

A mis padres, **Alba Rosa Romero Figueroa** y **Ricardo Aguilar León**.
A mi hermano, **Ricardo de Jesús Aguilar Romero**.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que me han apoyado a lo largo de mi periodo de maestría. Gracias a CICESE y al Posgrado en Ciencias de la Vida por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. Gracias a CONACyT por otorgarme la beca de manutención (#340060).

Gracias Melissa Corral y Adriana Mejía por toda la ayuda en cada uno de los trámites requeridos.

Gracias a mi comité de tesis, a la Dra. Ernestina Castro Longoria y al Dr. Israel Rocha Mendoza, por su tiempo en cada avance de tesis, sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar mi trabajo.

A la Dra. Meritxell Riquelme Pérez a quien admiro mucho, es un gran ejemplo. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su paciencia desde el inicio hasta el final de mi estancia en su laboratorio, por todo su apoyo, guía y su tiempo. Por estar siempre ahí, impulsándonos para ser mejores.

Dra. Olga Callejas muchas gracias por todo lo que me enseñaste, tu siempre dispuesta a ayudar a todos dando lo mejor de ti, que sería el laboratorio de microbiología sin ti?

Dra. Rosa gracias por su ayuda y sus consejos. Gracias también por los raites de las mañanas!

A mis compañeros y amigos del laboratorio que se convirtieron en mi segunda familia.: Adria, Pamela, Lluvia, Leonora, Raquel, Arianne, Teto (Héctor), Ivan, Fausto, Marisela, Leobardo muchas gracias por su amistad, las risas, por compartir su espacio, chismesillos y comida conmigo, por su apoyo, consejos y ayuda cuando más los requerí, los quiero y los voy a extrañar mucho.

Leonora y Raquel mil gracias por toda la ayuda técnica y su disposición de ayudarme siempre.

Adria, ¿que te puedo decir? ¡Gracias al infinito y más allá! Por ser como una hermana para mí, dentro y fuera del laboratorio siempre estuviste conmigo enseñándome y guiándome en lo que se pudo. Por compartir tus conocimientos “ancestrales” e ir conmigo en cada paso del proceso. “Gracias amiga” ¡Te quiero mucho!

A mis compañeros de generación que me brindaron su amistad y me ofrecieron muy buenos momentos, influyendo de manera positiva en este trayecto, Aimeé y Leonardo, Briceida, Corazona (Nayeli), Ricardo.

Guachaporita (Daniela), sin duda alguna me ayudaste a hacer más amenos los momentos más difíciles, nosotros siempre entendiéndonos tan bien! gracias por tu amistad, te quiero mucho.

Mis padrinos Guillermo y Karina que me recibieron en su casa de la mejor manera y han sido como mis segundos padres, apoyándome y aconsejándome. Siempre estaré agradecida con ustedes. Los quiero mucho.

A mi familia y amigos, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia nunca me dejaron sola. Gracias a mis padres por estar siempre pendientes de mí y visitarme cada vez que podían, son un motor muy importante en mi vida y mi principal fuente de motivación, gracias por creer siempre en mí. A mi hermano quien ha sido para mí siempre un gran ejemplo. Mi cuñada Adilene, mis sobrinos Ricardo Esteban y Ana Sofía, a mi Nana Margarita, Tata Diego y Mamá Chepita, a todos agradezco su amor y apoyo incondicional, no solo en esta, sino en cada etapa de mi vida. A Eduardo, gracias por tu apoyo siempre, tu amor y compañía marcaron la diferencia en este trayecto.

Amibis (Ana Patricia) gracias por enseñarme que la amistad verdadera perdura a pesar del tiempo y la distancia, los cuales no han sido nunca un pretexto para separarnos, te quiero muchísimo.

Mabel, mi prima y amiga del alma, siempre estuviste pendiente de mí, regalándome sonrisas desde lejos, siempre me supiste escuchar y estuviste a mi lado cuando se podía, te quiero mucho.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en Inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.2 Generalidades de los hongos filamentosos	1
1.1.3 Crecimiento polarizado	2
1.1.4 Sistema endosomal/vacuolar.....	3
1.1.5 Cuerpos multivesiculares (MVBs).....	4
1.1.6 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)	5
1.1.6.1 VPS-27	6
1.1.6.2 VPS-2	7
1.1.7 Quitina sintasa	8
1.2 Justificación	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos	11
Capítulo 2. Metodología	12
2.1 Análisis bioinformático	12
2.2 Cepas	12
2.3 Condiciones de Cultivo.....	14
2.4 Diseño de oligonucleótidos.....	14
2.5 Construcción de vectores	16
2.6 PCR de colonia	19
2.7 Transformación de <i>Neurospora crassa</i>	20

2.8 Microscopía confocal de escaneo con laser	20
2.9 Cruzas.....	21
2.10 Comprobación de las cepas etiquetadas.....	21
2.11 Tasa de elongación	22
2.12 Velocidad de las partículas	22
2.13 Obtención de cepas Homocariontes	22
2.13.1 Obtención de microconidios.....	23
Capítulo 3. Resultados	25
3.1 Análisis bioinformático	25
3.2 Construcción de los vectores.....	29
3.3 Comprobación de la integración de los vectores en el genoma de <i>N. crassa</i>	32
3.4 Localización de VPS-27 y VPS-2	33
3.4.1 VPS-27 se localiza en pequeñas estructuras puntiformes fluorescentes y en la membrana de cuerpos pleomórficos mayormente globulares a partir de la región III de la hifa hacia regiones distales	33
3.4.2 VPS-2 se localiza en pequeñas estructuras puntiformes fluorescentes y en el lumen de cuerpos pleomórficos mayormente globulares a partir de la región III de la hifa hacia regiones distales	35
3.5 Tasa de elongación de VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27 mCherry	37
3.6 Velocidad de movimiento de las partículas.....	38
3.7 Análisis de la distribución de VPS-27 bajo el efecto de inhibidores del citoesqueleto	40
3.7.1 Distribución subcelular de VPS-27 bajo el efecto de benomilo	40
3.8 Co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP.....	41
3.9 Co-expresión de VPS-2 y VPS-27 con marcadores de otros organelos.....	43
3.9.1 Co-expresión de VPS-27 con RAB-7 y VMA-1	44
3.9.2 Co-expresión de VPS-2 con RAB-7 y VMA-1.....	46
3.10 Caracterización del papel de los MVBs en la ruta secretora de CHS-1.....	47
3.11 <i>vps-27</i> y <i>vps-2</i> son esenciales para <i>N. crassa</i>	48
Capítulo 4. Discusión	50
Capítulo 5. Conclusiones	54
Literatura citada	56

Anexos.....60

Lista de figuras

Figura	Página
1	Regiones en que se subdivide una hifa 2
2	Micrografía de <i>Aspergillus nidulans</i> obtenida mediante Microscopía electrónica de transmisión..... 4
3	Distribución de los complejos ESCRT durante el proceso de formación de las ILVs en los MVBs 6
4	Representación de VPS-27..... 7
5	Representación de VPS-2 8
6	Representación de los posibles orígenes y destino de los quitosomas..... 9
7	Esquema de la estrategia utilizada para las PCRs de comprobación..... 22
8	Alineamiento de aminoácidos de VPS-2 en diferentes organismos 25
9	Alineamiento de aminoácidos de VPS-27 en diferentes organismos..... 26
10	Comparación de la representación de la estructura de los ortólogos correspondientes a VPS-2..... 27
11	Comparación de la representación de la estructura de los ortólogos correspondientes a VPS-27 28
12	Electroforesis de la digestión de pJV20 y PCCG_C_GLYGFP..... 29
13	Electroforesis de los productos de PCR de colonia..... 30
14	Reacciones de restricción para comprobar el inserto de los genes <i>vp2-27</i> y <i>vps-2</i> en los vectores PCCG_C_GLY_GFP y pJV20 31
15	Electroforesis de los productos de PCR de comprobación de las cepas obtenidas en este estudio..... 33
16	Distribución de VPS-27 en hifas de <i>N. crassa</i> 34
17	Visualización de como uno de los corpúsculo presentes en VPS-27-GFP cambia su morfología con el tiempo 35
18	Distribución de VPS-2 en hifas de <i>N. crassa</i> 36
19	Visualización de la fusión de puntos fluorescentes a uno de los corpúsculos presentes en VPS-2-GFP 37
20	Comparación de la tasa de crecimiento de las cepas obtenidas en

	este estudio.....	38
21	Comparación de la velocidad de los cuerpos, las estructuras puntiformes y el ápice de la hifa en <i>N. crassa</i> VPS-2-GFP.....	39
22	Comparación de la velocidad de los cuerpos, las estructuras puntiformes y el ápice de la hifa en <i>N. crassa</i> VPS-2-GFP.....	39
23	Comparación de una hifa de VPS-27-GFP con o sin tratamiento con Benomilo.....	40
24	Comparación de series de tiempo de una hifa de VPS-27-GFP con o sin tratamiento con Benomilo	41
25	Co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP	42
26	Intensidad de fluorescencia de la co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP.....	43
27	Co-expresión de VPS-27-GFP y VMA-1-tdimer2.....	44
28	Co-expresión de VPS-27-GFP y VMA-1-tdimer2.....	45
29	Co-expresión de VMA-1-tdimer2 y VPS-2-GFP	46
30	Co-expresión de RAB-7-tdimer2 y VPS-2-GFP.....	47
31	Co-expresión de CHS-1-mCherry y VPS-2-GFP.....	48
32	Colonias provenientes de microconidios.....	49
33	Modelo propuesto de la distribución de los MVBs en hifas de <i>Neurospora crassa</i>	55

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas de <i>N. crassa</i> y <i>E. coli</i> utilizadas en este estudio	14
2	Condiciones de tiempo y temperatura para las reacciones de PCR	16
3	Oligonucleótidos utilizados en este estudio	16
4	Condiciones de tiempo y temperatura para PCR de colonia	20
5	Porcentaje de identidad de VPS-27 o VPS-2 en <i>N. crassa</i> con ortólogos en otros organismos	28
6	Número de transformantes obtenidas por vector	32

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.2 Generalidades de los hongos filamentosos

Los hongos pueden encontrarse naturalmente en un gran número de ecosistemas. Estos organismos pueden participar en gran variedad de procesos naturales, así como ser utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica (May y Adams, 1997). Algunos hongos pueden ser importantes patógenos de plantas y animales, otros son descomponedores y algunos son utilizados como organismos modelo en investigación de biología genética y celular (Deacon, 2006).

Los hongos pueden presentar dos morfologías principales: levaduriforme y filamentosa. Las células de los hongos filamentosos (hifas) pueden medir de 2 a 30 μm en diámetro dependiendo de la especie, se extienden hacia el ápice, ramificando repetidamente dando lugar a una red de hifas denominada micelio (Deacon, 2006). Las hifas maduras se subdividen en cuatro regiones (Figura 1): región I, que conforma el ápice hifal y abarca los primeros 2-3 μm conteniendo el Spitzenkörper; región II o región subapical (20-30 μm detrás de la región I) donde se encuentran pequeñas vesículas, mitocondrias y algunos núcleos y vacuolas, región III (30-40 μm después de la región III) donde se encuentra una mayor cantidad de núcleos y región IV, la cual se extiende hasta el primer septo y se caracteriza por tener un incremento de mitocondrias, núcleos y vesículas, apareciendo aquí la red de vacuolas tubulares (Riquelme *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2015).

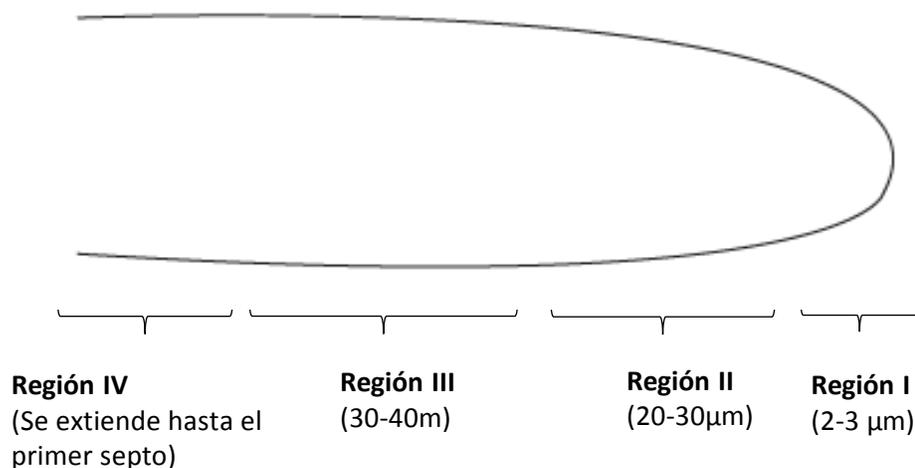


Figura 1. Regiones en que se subdivide una hifa. Fuente: Basado en Riquelme *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2015.

1.1.3 Crecimiento polarizado

Una de las principales características morfológicas de los hongos filamentosos es la forma tubular de su unidad vegetativa o hifa, que se extiende de manera polarizada mediante crecimiento apical (Bartnicki-Garcia, 2002); esto es posible gracias al suministro orquestado en tiempo y espacio, del material necesario para el crecimiento de la pared celular y la membrana plasmática (MP) (Gooday, 1995). El modelo de morfogénesis fúngica asume que la superficie celular se expande por materiales que son descargados mediante vesículas que son dirigidas a la MP (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989); estas vesículas se liberan a partir de un centro suministrador de vesículas (VSC), partiendo de éste hacia la superficie celular en todas las direcciones.

Las hifas cuentan con un mecanismo de secreción que les permite mantener el crecimiento polarizado y por lo tanto su elongación. Uno de los elementos principales de este mecanismo es el Spitzenkörper (Spk), el cual se cree que actúa como un VSC (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989). En el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se ha reportado que el Spk se encuentra formado por dos poblaciones vesiculares distintas (Sánchez-León *et al.*, 2011), unas de mayor tamaño llamadas macrovesículas o vesículas apicales y las llamadas microvesículas o quitosomas, los cuales han sido descritos como organelos diminutos, membranosos esferoidales de estructura compleja y apariencia variable durante la síntesis de fibrillas de quitina (Bracker *et al.*, 1976). Los quitosomas o microvesículas actúan como medio de transporte para entregar quitinas sintasas a la MP (Riquelme y Bartnicki-García, 2008) y se han encontrado en regiones distales de la hifa,

presentes en vacuolas; se ha visto que viajan hacia la punta de la hifa, se acumulan temporalmente en el núcleo del Spk y finalmente son dirigidas hacia la MP (Sánchez-León *et al.*, 2011; Fajardo-Somera *et al.*, 2015).

1.1.4 Sistema endosomal/vacuolar

El sistema endosomal de las células eucariotas está conformado por una red compleja de compartimentos membranosos los cuales coordinan el tráfico de proteínas entre la MP, la red trans-Golgi, y la vacuola/lisosoma. Hay dos rutas principales de transporte endosoma-vacuola/lisosoma descritas: La ruta biosintética entrega proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático a través del complejo de Golgi y luego a vacuolas/lisosomas mediante intermediarios endosomales (Babst *et al.*, 2002), y la ruta endocítica que transporta receptores, lípidos y proteínas de membrana internalizados desde la MP a través del sistema endosomal a vacuola/lisosoma. Ambas rutas se traslapan en el sistema endosomal (Babst *et al.*, 2002).

Las vacuolas/lisosomas juegan un papel importante en la degradación de lípidos y proteínas celulares. Con el fin de realizar esta función degradativa, las vacuolas/lisosomas contienen un gran número de hidrolasas las cuales han sido transportadas en la forma de precursores inactivos mediante la ruta biosintética y son activados proteolíticamente a la entrega a vacuola/lisosoma. La entrega de las proteínas transmembranales, tales como los receptores de la superficie celular, al lumen de la vacuola/lisosoma, ya sea para degradación/regulación negativa, o en el caso de hidrolasas, para la localización correcta, requiere la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) (Babst *et al.*, 2002).

La degradación de estas proteínas requiere de un proceso de ubiquitinación, una modificación postraduccional mediante la cual, la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, se une al grupo 3-amino de uno o varios residuos de lisina en el sustrato diana (Pickart, 2001; Hettema *et al.*, 2004). La proteínas ubiquitinadas han de ser reconocidas por receptores que contienen motivos de unión a ubiquitina, posteriormente pasan a través de cada uno de los compartimentos endosomales hasta llegar a la vacuola, donde finalmente serán degradadas.

1.1.5 Cuerpos multivesiculares (MVBs)

Los MVBs son una clase de endosomas tardíos, formados por la invaginación y gemación de su membrana limitante dentro del lumen del compartimento formando vesículas intraluminales (ILVs) (Babst *et al.*, 2002). Las proteínas ubiquitinadas que han llegado a este destino son internalizadas en ILVs y no son recicladas de nuevo a la MP, transportadas retrógradamente a la ruta secretora, o retenidas en la membrana limitante del endosoma (Raiborg y Stenmark, 2009). Los MVBs maduros se fusionan con la vacuola/lisosoma, liberando las ILVs en su lumen hidrolítico para ser degradadas (Babst *et al.*, 2002) o se fusionan con la MP liberando su contenido al espacio extracelular en forma de exosomas.

Las proteínas que no se invaginan en ILVs pueden ser recicladas y enviadas de regreso a la MP o al complejo de Golgi, o bien, permanecer en la membrana limitante de la vacuola/lisosoma como consecuencia de la fusión. Por lo tanto, la ruta de ordenamiento de los MVBs juega un papel crucial en la decisión entre el reciclaje o degradación de las proteínas de membrana (Babst *et al.*, 2002). En la figura 1 se muestra una micrografía de *Aspergillus nidulans* donde puede observarse con claridad la presencia de MVBs en la región III de la hifa.

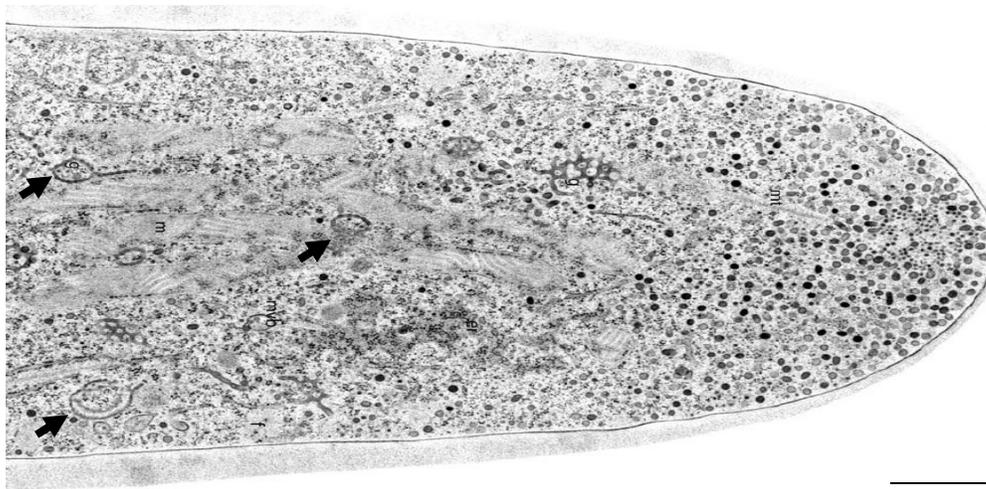


Figura 2. Micrografía de *Aspergillus nidulans* obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Cabezas de flechas indicando MVBs. Fuente: The Mycota-Howard y Gow, 2007. Barra de escala 10 μm .

1.1.6 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

En *S. cerevisiae* han sido identificados más de 60 genes codificantes para proteínas implicadas, a distintos niveles, en el tráfico entre Golgi y vacuola. Estas proteínas se han denominado Vps (vacuolar protein sorting), de las cuales 18 son requeridas tanto para la biogénesis de los MVBs, como para el reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas, que son incorporadas en las ILVs, y son conocidas como Vps de clase E (Bowers y Stevens, 2005). La caracterización de estas proteínas ha permitido la identificación de cuatro complejos multiproteicos que son reclutados de manera secuencial del citoplasma a la membrana del endosoma. Estos complejos se conocen como complejos ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) -0, -I, -II, -III, los cuales además, en células animales participan al final de proceso de citocinesis. Por otro lado, los complejos ESCRT son secuestrados durante el brote del VIH en la superficie de las células huésped infectadas donde catalizan la escisión del tallo de la membrana que conecta el virus en gemación con la célula huésped. Mientras que la ruta de biogénesis de los MVBs requiere de todos los complejos ESCRT, en el proceso de citocinesis y de gemación del VIH participan solo tres de ellos (Scmidt y Teis, 2012).

La eliminación de cualquier gen *vps* de clase E en *S. cerevisiae* tiene como resultado un bloqueo en la formación de los MVBs y la acumulación de las proteínas de carga en la membrana de los endosomas prevacuolares, lo cual da lugar al compartimento de clase E que ha sido muy bien estudiado en *S. cerevisiae* y que consiste en un cúmulo de endosomas aberrantes, carentes de vesículas internas, apiladas en forma de cisternas (Raymond *et al.*, 1992). Estos complejos se encuentran muy bien conservados desde hongos hasta mamíferos, siendo la levadura *S. cerevisiae* donde se han caracterizado a mayor detalle (Piper y Katzmann, 2009).

Según el modelo vigente, los complejos ESCRT funcionan como una cinta transportadora, reclutando y transportando en forma secuencial la carga de un complejo al siguiente (Hurley y Emr, 2006) hasta la formación de la ILV.

En levadura, el complejo ESCRT-0 consiste de dos subunidades: Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) y Vps27 (Henne *et al.*, 2011). Este complejo reconoce a la proteína carga que va a ser internalizada y a su vez recluta a ESCRT-I (Hurley, 2008). ESCRT-I, identificado originalmente en levadura, es un complejo que consiste de Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12 (Henne *et al.*, 2011). Interactúa con el cargamento y activa ESCRT-II (Hurley, 2008). ESCRT-II es un heterotetrámero que consiste de una subunidad de Vps22, una de Vps36, y dos subunidades de Vps25 (Henne *et al.*, 2011); recluta ESCRT-III (Hurley, 2008). ESCRT-III consiste de cuatro subunidades: Vps20, Snf7, Vps24 y Vps2 (Henne *et al.*, 2011). Este complejo concentra la

carga y recluta a proteínas accesorias implicadas en la desubiquitinación de la carga (Doa4) y en el desensamblaje de los complejos ESCRT (Vps4) (Hurley, 2008).

En la Figura 2 puede observarse la distribución de cada uno de los complejos proteicos, según la secuencia que siguen durante su participación en el proceso de formación de las ILVs en los MVB.

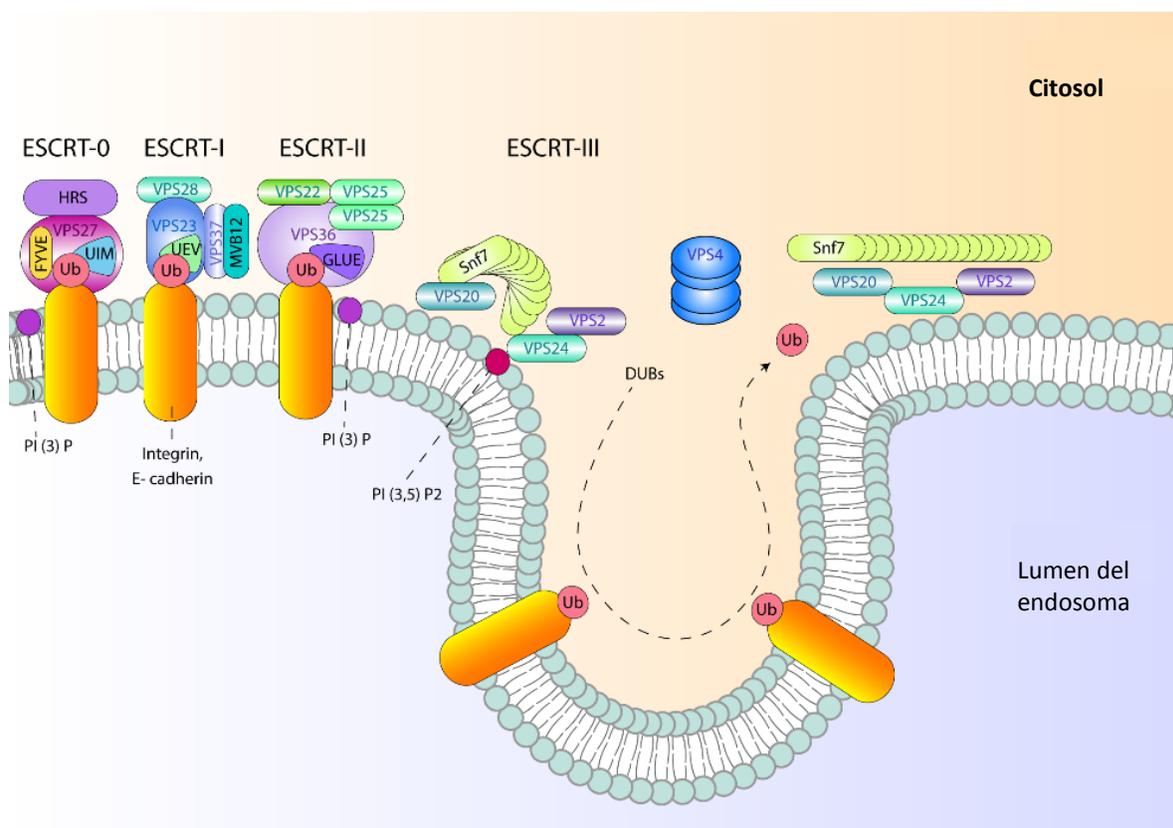


Figura 3. Distribución de los complejos ESCRT durante el proceso de formación de las ILVs en los MVBs. Fuente: Modificado de Galindo, 2010.

Este estudio se ha enfocado principalmente en las proteínas Vps27 (VPS-27) del complejo ESCRT-0 y Vps2 (VPS-2) del complejo ESCRT-III, las cuales serán utilizadas como marcadores de MVBs, debido a su papel presuntamente importante durante el proceso de formación de las ILVs.

1.1.6.1 VPS-27

VPS-27 es un componente del complejo ESCRT-0. En *S. cerevisiae* se ha reportado que esta proteína se ancla a ubiquitina (Ub) mediante un motivo de interacción a Ub (UIM) (Figura 3) (Bilodeau *et al.*, 2003). El comienzo de la clasificación de proteínas en los MVBs se encuentra dictada en gran parte por las interacciones de Vps-27 y fosfatidilinositol-3-fosfato mediante el dominio FYVE de Vps27. A su vez Vps23 de ESCRT-1 se une al COOH terminal de Vps27 en la membrana del endosoma

mediante la secuencia peptídica PTPV, por lo que se ha propuesto que la especificidad para la clasificación en los MVBs es el resultado de estas interacciones (Katzmann *et al.*, 2003).

La unión a la clatrina sirve para concentrar la carga en los sitios donde se va a llevar a cabo la invaginación de la membrana del endosoma (Hurley y Emr, 2006). VPS-27 cuenta con un dominio VHS (Vps27, HRS y STAM) cuya función aún no ha sido reportada, sin embargo el homólogo en humanos tiene la capacidad de reconocer algunos receptores sin ubiquitinación como carga para ser involucrada en la ruta de los MVBs (Hislop *et al.*, 2004), por lo que VHS es un candidato para realizar el reconocimiento de este tipo de cargas.

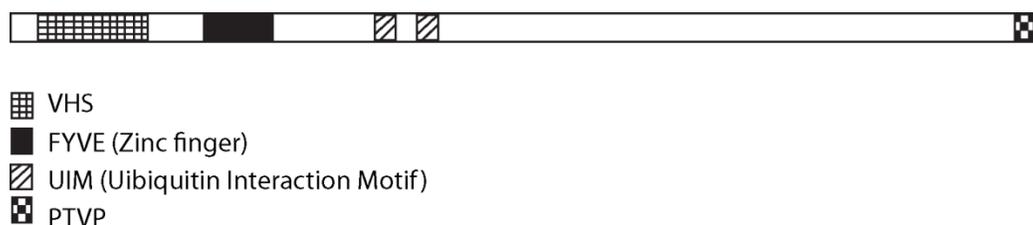


Figura 4. Representación de la proteína VPS-27. Fuente: Basado en The Broad Institute, 2015; UniProt , 2016; Katzmann *et al.*, 2003.

En *S. cerevisiae*, Vps27 está involucrada en el transporte de proteínas de compartimentos prevacuolares hacia Golgi en una ruta anterógrada, y la inactivación de estas proteínas resulta en el acumulamiento de proteínas en los PVCs (Nothwehr *et al.*, 1996).

1.1.6.2 VPS-2

A pesar de que la interacción entre las proteínas que conforman el complejo ESCRT-III aún no se ha descrito con mucho detalle, se conoce que el ordenamiento de las proteínas transmembranales en la ruta de MVBs a vacuola/lisosoma requiere de la función de estas proteínas (Babst *et al.*, 2002). Vps2 forma parte estructural de este complejo y es responsable del reclutamiento de Vps24 (Wollert *et al.*, 2009) (reclutadas del citosol) y a su vez de reclutar otras proteínas accesorias. Esta proteína forma filamentos tubulares (Ghazi-Tabatabai *et al.*, 2008) al igual que el resto de las proteínas que conforman el complejo. En la Figura 4 podemos observar un esquema con los dominios más importantes reportados de VPS-2; un dominio en el extremo amino terminal Snf7 responsable del anclaje del complejo ESCRT-III a los MVBs, y dos dominios en el extremo carboxilo terminal, uno de interacción a microtúbulos MIT y uno de interacción a Vps4 (Babst *et al.*, 2002), para llevar a cabo la disociación del complejo ESCRT (Stuchell-Brereton *et al.*, 2007).

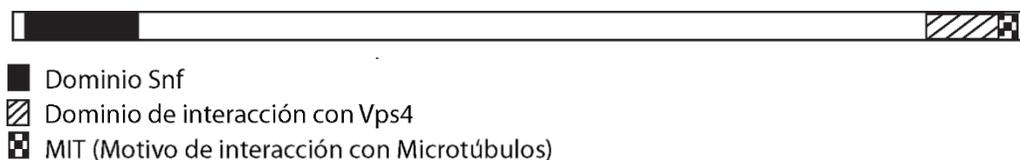


Figura 5. Representación de la proteína VPS-2. Fuente: Modificado de The Broad Institute, 2015; UniProt, 2016.

1.1.7 Quitina sintasa

La quitina es uno de los polisacáridos estructurales que constituyen la pared celular de levaduras y hongos filamentosos. Su síntesis es catalizada por las quitina sintasas (CHSs), una familia de enzimas que transfieren N-Acetil glucosamina (GlcNAc) de UDP-GlcNAc a una cadena creciente de quitina (Glaser *et al.*, 1957). Análisis realizados en *S. cerevisiae* sugieren que la CHS está presente principalmente en dos lugares: la MP y los quitosomas, considerados estos últimos como los componentes centrales del aparato sintetizador de quitina en la célula (Leal-Morales *et al.*, 1988). Se cree que los quitosomas son un dispositivo subcelular de entrega de CHS a la superficie celular (Bartnicki-García, 1981).

Estudios previos sugieren que las CHSs son proteínas de membrana con múltiples dominios transmembranales. En hongos estas enzimas han sido agrupadas en siete clases (Clase I, II, III, IV, V, VI, VII), de las cuales las clases III, V, VI, y VII son exclusivamente encontradas en hongos filamentosos (Choquer *et al.*, 2004; Riquelme y Bartnicki-García, 2008; Mandel *et al.*, 2006). El etiquetamiento de CHS con proteínas fluorescentes elucidó que los quitosomas son transportados desde regiones subapicales al Spk. La CHS-1 perteneciente a la clase III se encuentra predominantemente en el núcleo del Spk durante el crecimiento de las hifas de *N. crassa*, y en regiones distales puede encontrarse localizada en la red vacuolar y en septos en formación (Sánchez-León *et al.*, 2011).

Previamente, se propuso que los quitosomas pueden tener tres orígenes distintos: 1) Formarse a partir de pequeñas subunidades 16s que tienen la capacidad intrínseca de autoensamblarse, 2) Ser sintetizados en retículo endoplasmático o 3) Provenir de MVBs, y finalmente fusionarse con la MP (Bartnicki-García *et al.*, 1979; Figura 5). Sin embargo, estudios más recientes han sugerido que el tráfico de CHS-1 es independiente de la ruta secretora convencional retículo endoplasmático a Golgi (Riquelme *et al.*, 2007; Sánchez-León *et al.*, 2011).

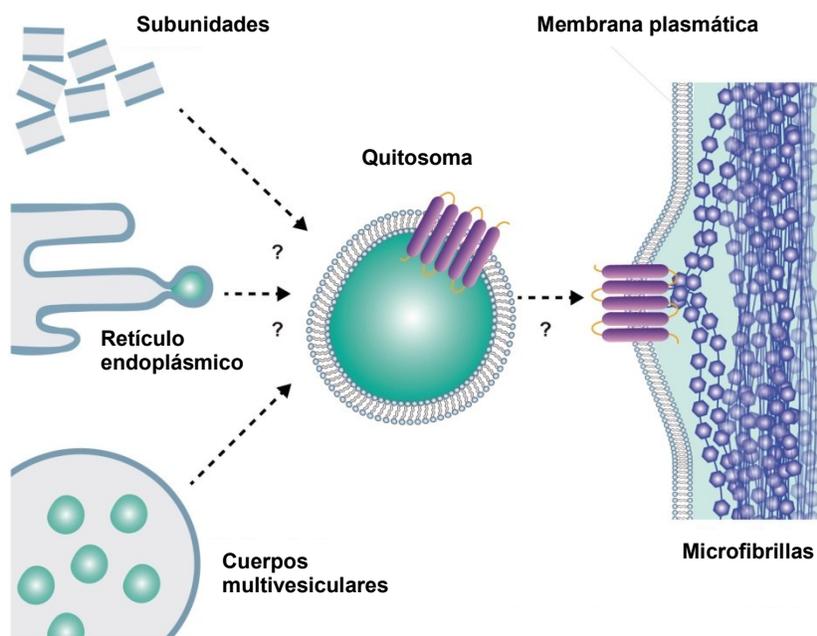


Figura 6. Representación de los posibles orígenes y destino de los quitosomas. Modificado de Bartnicki-García *et al.*, 1979.

1.2 Justificación

La biogénesis de los MVBs es un tema ampliamente estudiado en células animales y vegetales, dónde se ha observado que los MVBs pueden: 1) fusionarse con vacuolas o, 2) fusionarse con la MP liberando su contenido hacia el espacio extracelular en forma de exosomas.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido el modelo fúngico de estudio por excelencia, donde se ha encontrado que los MVBs juegan un papel importante en el reciclaje y degradación de proteínas. Sin embargo no puede extrapolarse por completo el conocimiento en levaduras a los hongos filamentosos debido a los requerimientos que precisan por sus diferencias morfológicas. En hongos filamentosos se desconoce el papel que juegan los MVBs en ciertos procesos celulares, tales como la ruta secretora de enzimas participantes del crecimiento polarizado de la pared celular.

Este estudio pretende caracterizar a nivel celular los MVBs en el hongo filamentosos *N. crassa*, nuestro modelo de estudio, y analizar su papel en la biogénesis o reciclaje de enzimas de la MP.

1.3 Hipótesis

Los MVBs están presentes en hifas de *N. crassa* en la región III y tienen un papel en la exocitosis.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar MVBs en *N. crassa* y caracterizar su papel en la exocitosis.

1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la distribución de los MVBs mediante marcadores de complejos ESCRT.
- Determinar la naturaleza de los MVBs mediante el uso de marcadores de otros organelos.
- Caracterizar el papel de los MVBs en la ruta secretora de CHS-1.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda de las secuencias correspondientes a las proteínas Vps27 y Vps2 de *S. cerevisiae* y sus ortólogos en *N. crassa* (NCU04015 y NCU00435 respectivamente) consultando la base de datos de Uniprot y The Broad Institute.

Una vez obtenidas las secuencias, se buscaron ortólogos que han sido estudiados en otros organismos, con ayuda de la base de datos Uniprot y la base de datos correspondiente a cada organismo. Para VPS-2 (NCU00435) se encontraron *A. nidulans* (An6898), *S. pombe* (SPAC4F8.01) y *S. cerevisiae* (SO00001485), para VPS-27 (NCU04015): *A. nidulans* (An2071), *S. pombe* (SPAC19A8.05c), *S. cerevisiae* (SO00005289) y *F. graminearum* (FG08545.1). Se procedió a realizar un alineamiento de las secuencias con ayuda de la página de internet Clustal Omega para obtener el porcentaje de identidad entre ortólogos y el Software BioEdit Sequence Alignment Editor llevando a cabo una alineación múltiple ClustalW.

Además se utilizaron las secuencias para la búsqueda de los dominios para cada ortólogo en las bases de datos Uniprot, FungiDB y NCBI y se utilizó el software DOG para elaborar los diseños de las proteínas.

2.2 Cepas

Las cepas de *Neurospora crassa* y *Escherichia coli* que se han utilizado en este estudio se encuentran en la Tabla I.

Tabla 1. Cepas de *N. crassa* y *E. coli* utilizadas en este estudio.

Nombre de cepa en laboratorio	Nombre de cepa autor/ #FGSC	Genotipo	Tipo de apareamiento	Estado
SMRP55	NES2-11	<i>End prom-chs-1::sgfp⁺ hph</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP325	Rab-7	<i>Pccg-1::tdimer red::rab-7</i>	<i>Mat A</i>	Heterocarión
SMRP158	VMA-1-tdimer2	<i>Pccg-1::tdimer::vma-1</i>	<i>Mat A</i>	Heterocarión
SMRP14	N150/9013	<i>WT</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMARP13	N1/988	<i>WT</i>	<i>Mat a</i>	Homocarión

SMRP277	SAD-2/ 20680	<i>sad-2Δ::hph+</i>	<i>Mat a</i>	Homocarión
SMRP90	NJV12.1.1	<i>Pccg-1-chs-1-ChFP</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP24	#9717	<i>his-3 Δmus-51::bar^r</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP374	VPS-2-GFP	<i>his-3 + ::Pccg-1::vps-2::8xGly::gfp:: Δmus51::bar+</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP376	VPS-2-mCherry	<i>his-3+::Pccg-1::vps-2::mCherry:: Δmus-51::bar+</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP373	VPS-27-GFP	<i>his-3 + ::Pccg-1::vps-27::8xGly::gfp:: Δmus51::bar+</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP375	VPS-27-mCherry	<i>his-3+::Pccg-1::vps-27::mCherry::Δmus-51::bar</i>	<i>Mat A</i>	Heterocarión
SMRP391	VPS-2-GFP	<i>his-3 + ::Pccg-1::vps-2::8xGly::gfp:: Δmus51::bar+</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP392	VPS-2-mCherry	<i>his-3+::Pccg-1::vps-2::mCherry:: Δmus-51::bar+</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
SMRP393	VPS-27-GFP	<i>his-3 + ::Pccg-1::vps-27::8xGly::gfp:: Δmus51::bar+</i>	X	Homocarión
SMRP394	VPS-27-mCherry	<i>his-3+::Pccg-1::vps-27::mCherry::Δmus-51::bar</i>	<i>Mat A</i>	Homocarión
Gen	Cepas KO (Proteína)	#FGSC	Tipo de apareamiento	Estado
NCU04015	VPS-27	#16302	<i>Mat a</i>	Heterocarión
NCU00435	VPS-2	#16497	<i>Mat a</i>	Heterocarión
<i>E.coli</i> DH5α.	F- φ80/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ-			

FGSC: Fungal Genetics Stock Center

2.3 Condiciones de Cultivo

Para el crecimiento de células competentes de *E. coli* DH5 α se utilizó medio de cultivo Luria Bertani (LB) sólido o líquido (según lo requerido) con ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Las cepas de *N. crassa* fueron crecidas en Medio Mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1995) sólido adicionando al medio histidina a una concentración final de 25 mg/ml para las cepas auxótrofas para histidina o higromicina B (200 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar aquellas cepas con resistencia al antibiótico.

Para inducir la reproducción sexual entre las cepas mutantes y la cepa 9717 se utilizó Medio Sintético de Cruzas (MSC) (Westergaard y Mitchel, 1947) con histidina. Las placas se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad. Las ascosporas resultantes de la reproducción sexual se recuperaron y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Para activar las ascosporas, se inocularon en MMV y se incubaron por 1 hora a 60°C y posteriormente a 30°C por 14 horas.

Para la selección de cepas transformantes, los conidios transformados fueron inoculados en medio FGS (Fructosa, Glucosa, Sorbosa) e incubados a 30°C.

Para la obtención de microconidios se utilizó medio Westergaard (Westergaard y Mitchell, 1947), conteniendo sacarosa y biotina. Para 100 ml se utilizaron 2 ml de Westergaard 5X, 0.5 g de sacarosa, 2 g de agar y biotina (500 ng/100 ml). Se inocularon conidios de cada una de las cepas (VPS-2-GFP, VPS-27-GFP, VPS-2mCherry, VPS-27-mCherry, $\Delta vps-2$ y $\Delta vps-27$). Los tubos inoculados se incubaron por 10 días a 25°C. Los microconidios se resuspendieron y se recuperaron mediante filtración, utilizando filtros estériles de acetato de celulosa marca VWR de 0.45 μm . Se centrifugaron y se resuspendieron en 200 μl de agua, se tomaron 180 μl y 20 μl y se inocularon en placas Petri con medio FGS. Se incubaron por dos días y se recuperaron las colonias más pequeñas en tubos inclinados con MMV al 1.5% (en el caso de las cepas mutantes se añadió higromicina al medio).

2.4 Diseño de oligonucleótidos

Se buscó la secuencia de los genes que codifican para las proteínas VPS-27 y VPS-2 en el genoma publicado de *N. crassa* en la base de datos de Uniprot. Con base en dichas secuencias se llevó a cabo el

diseño de oligonucleótidos para amplificar *vps-27* y *vps-2* flanqueando el marco de lectura abierto (ORF) con la secuencia de las endonucleasas *PacI* y *XbaI*.

Se extrajo DNA genómico de la cepa silvestre N1 con el kit de extracción de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) según el protocolo del fabricante.

Se llevaron a cabo reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un termociclador iCycler (BioRad®) con las siguientes condiciones de mezcla: 2 µl de oligo directo 10 µM y 2 µl de oligo reverso 10 µM, 0.2 µl de LA Taq DNA polimerasa (Takara, 5 U/µl), 5 µl de buffer PFU 10X, 5µl de DNA genómico de la cepa silvestre N1 de *N. crassa* como templado [80 ng/µl], 5µl MgCl₂ 2.5 mM, 2.5µl dNTPs 2.5 µM, y agua HPLC para ajustar el volumen, todas las reacciones se ajustaron a un volumen de 50 µl. Los productos obtenidos de la PCR se analizaron mediante electroforesis de gel de agarosa. Las condiciones utilizadas en el termociclador para la PCR pueden verse en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura para las reacciones de PCR.

Temperaturas	°C	Tiempo	} 30 ciclos
Inicio	95	3 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineamiento	55	30 segundos	
Elongación de la cadena	72	1 minuto por cada Kb	
Elongación final	72	7 minutos	
Conservación	12	∞	

En la Tabla 3 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Núm. en el Stock	Gen que amplifica	Nombre en el Stock	Sentido	Secuencia
491	<i>vps-2</i>	vps2FmCh-C	Derecho	GCTCTAGAATGAACGTGAGTTTCCGTCGT
492	<i>vps-2</i>	vps2mCh-C	Reverso	CCTTAATTAATCGTCTCAGACTGTCCAACCT
493	<i>vps-27</i>	vps27mCh-C	Derecho	GCTCTAGAATGAACGTGAGTTTCCGTCGT
494	<i>vps-27</i>	vps2mCh-C	Reverso	CCTTAATTAATCGTCTCAGACTGTCCAACCT

2.5 Construcción de vectores

Se utilizaron los vectores pJV20 (Verdín *et al.*, 2009) (VMRP62), el cual permite etiquetar a la proteína en el extremo carboxilo terminal con una proteína rojo fluorescente mCherry, y pccg_C_GLYGFP (Honda y Selker, 2009), que permite el etiquetamiento de una proteína en el extremo carboxilo terminal con la proteína GFP, conteniendo una bisagra de glicina con la intención de no afectar la actividad de las proteínas etiquetadas. Ambos vectores están dirigidos a los sitios de locus His 3. Los vectores fueron reamplificados usando la técnica de transformación en células de *E. coli* DH5 α y recuperados mediante miniprep, con la finalidad de insertar los fragmentos *vps-27* y *vps-2* en los sitios de corte de las enzimas *PacI* y *XbaI*. Para esto se llevaron a cabo reacciones de restricción con *PacI* y *XbaI* (New England Biolabs), en las cuales se utilizaron las siguientes cantidades de cada uno de los elementos:

Para la primer digestión: pccg_C_GLYGFP, pJV20 y *vps-27*

Para la digestión del vector pJV20

- DNA plasmídico (203.3 ng/ μ l): 8 μ l
- *PacI* (10,000 u/ml): 1 μ l
- *XbaI* (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l
- ddH₂O: 8 μ l

Volumen final: 20 μ l

Para la digestión del vector pccg_C_GLYGFP

- DNA plasmídico (841 ng/ μ l): 4 μ l
- *PacI* (10,000 u/ml): 1 μ l
- *XbaI* (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l
- ddH₂O: 12 μ l

Volumen final: 20 μ l

Para la digestión del fragmento *vps-27*

- DNA (26.4 ng/ μ l): 26 μ l
- *PacI* (10,000 u/ml): 1 μ l
- *XbaI* (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l
- ddH₂O: 8 μ l

Volumen final: 30 μ l

Para la segunda digestión: pccg_C_GLYGFP, pJV20 y vps-2

Para la digestión del vector pJV20

- DNA plasmídico (941.1 ng/ μ l): 5 μ l
- PacI (10,000 u/ml): 1 μ l
- XbaI (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l
- ddH₂O: 11 μ l

Volumen final: 20 μ l

Para la digestión del fragmento vps-2

- DNA (53.1 ng/ μ l): 26 μ l
- PacI (10,000 u/ml): 1 μ l
- XbaI (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l

Volumen final: 30 μ l

Para la digestión del vector pccg_C_GLYGFP

- DNA plasmídico (1,108.3 ng/ μ l): 4 μ l
- PacI (10,000 u/ml): 1 μ l
- XbaI (20,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer CutSmart 10X: 2 μ l
- ddH₂O: 12 μ l

La reacción se dejó incubando a 37°C toda la noche y después se incubó por 1 hr a 37°C con fosfatasa alcalina (SAP de Promega) con el fin de defosforilar el vector. Los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se recuperaron las bandas de interés para posteriormente purificarlas y extraer el DNA con ayuda del kit de extracción QIAGEN®. Una vez purificado el DNA del gel se midió la concentración en Nanodrop (marca), aplicando una gota de 1 μ l de cada muestra y posteriormente se realizaron reacciones de ligación en relación 1:5 para la ligación de los vectores con *vps-27* y de 1:1 para la ligación con *vps-2* (Se probaron diferentes relaciones de concentración para encontrar la óptima).

Para la ligación de pJV20- vps-27

- DNA plasmídico (45.3 ng/ μ l): 2 μ l
- Fragmento (18.1 ng/ μ l): 15 μ l
- T4 ligasa Biolabs (400,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer T4 Ligasa Biolabs: 2 μ l

Volumen final: 20 μ l

Para la ligación de pccg_C_GLYGFP- vps-27

- DNA plasmídico (62 ng/ μ l): 1.5 μ l
- Fragmento (18.1 ng/ μ l): 18 μ l
- T4 ligasa Biolabs (400,000 u/ml): 1 μ l
- Buffer T4 Ligasa Biolabs: 2.2 μ l

Volumen final: 22 μ l

Para la ligación de pJV20- vps-2

- DNA plasmídico (54.7 ng/ μ l): 2 μ l
- Fragmento (32.1 ng/ μ l): 3.5 μ l
- T4 ligasa Biolabs (400 000 u/ml): 1 μ l
- Buffer T4 Ligasa Biolabs: 1 μ l
- ddH₂O: 2.5 μ l

Volumen final: 10 μ l

Para la ligación de pccG_C_GLYGFP- vps-2

- DNA plasmídico (67.2 ng/ μ l): 1.6 μ l
- Fragmento (32.1 ng/ μ l): 3.4 μ l
- T4 ligasa Biolabs (400 000 u/ml): 1 μ l
- Buffer T4 Ligasa Biolabs: 1 μ l
- ddH₂O: 3 μ l

Volumen final: 10 μ l

Las reacciones incubaron a 16°C toda la noche en un termociclador BioRad. Una vez terminado ese tiempo se utilizó la ligación para transformar células súper competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico con el fin de multiplicar el número de copias de cada construcción; para ello se utilizaron 50 μ l de células de *E. coli* DH5 α , 50 μ l de KCM 1M, y 3 cantidades de ligación distintas (3, 5 y 7 μ l); se dejaron en hielo por media hora para luego someterlas a un choque térmico a 42°C por 2 minutos, pasándose rápidamente de regreso al hielo; luego se agregaron 250 μ l de LB líquido precalentado a 37°C para que las células se recuperaran y se incubaron por 1 hora a 37°C. Las células fueron crecidas en dos placas con medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/ml) distribuyendo 150 μ l por placa y se incubaron a 37°C por 16 horas.

2.6 PCR de colonia

Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron 10 colonias aisladas de las células transformantes con cada una de las construcciones (excepto de la ligación pJV20+*vps2* ya que solo crecieron 7 colonias) y se llevó a cabo una PCR de colonia para verificar la presencia de los fragmentos *vps-2* y *vps-27* usando los oligonucleótidos diseñados para cada gen. Los productos de las reacciones de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de reacción que se utilizaron para la PCR de colonia son las siguientes:

Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura para PCR de colonia

Temperaturas	°C	Tiempo
Inicio	95	5 minutos
Desnaturalización	95	30 segundos
Alineamiento	55	30 segundos
Elongación de la cadena	72	1 minuto por cada Kb
Elongación final	72	7 minutos
Conservación	12	∞

30 ciclos

Para corroborar que no hubo daño de los sitios de clonación de los insertos en el DNA plasmídico se extrajo DNA plasmídico mediante miniprep y posteriormente se realizaron reacciones de restricción con *PacI* y *XbaI* a 37°C por toda la noche, para finalmente comprobarlo mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.7 Transformación de *Neurospora crassa*

Una vez obtenidas las construcciones de los vectores recombinantes pAAR-001.1 (pJV20 + *vps-27*), pAAR-002.1 (pccg_C_GLYGFP + *vps-27*), pAAR-003.1 (pJV20 + *vps-2*) y pAAR-004.1 (pccg_C_GLYGFP + *vps-2*) se procedió a transformar células de la cepa FGSC #9717 (125×10^6 conidios). Para ello se linearizó cada uno de los vectores utilizando 2,000 ng de DNA, con 1 μ l de enzima *SspI* (5,000 u/ml) dejándose digerir por toda la noche a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación se adicionó 1 μ l de SAP (fosfatasa alcalina) con el fin de eliminar los grupos fosfatos y se llevó de nuevo a incubación por 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo, se agregó 1 μ l de EDTA (0.5M) para inactivar la SAP. Posteriormente se procedió a precipitar el DNA con 1/10 volúmenes de acetato de sodio (3M), y dos volúmenes de etanol absoluto; se dejó incubar por 20 minutos a -80°C, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ l de etanol al 70%; se centrifugó de nuevo por 5 minutos, se desechó una vez más el sobrenadante y finalmente se diluyó el DNA en 13 μ l de buffer de elución (EB).

Una vez linearizados los vectores, se transformó mediante electroporación en un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad) con las siguientes condiciones del programa: 1.5kV, 25 μ FD, 600 Ω en un tiempo constante de 12-14 milisegundos; antes del pulso eléctrico los conidios fueron lavados 3 veces con sorbitol (1M). Después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de sorbitol (1M) y los conidios se transfirieron a tubos estériles de 15 ml donde luego se añadió 1 ml de solución de recuperación (Sales de Vogel y agua destilada). Las muestras fueron incubadas por 3 horas a 30°C en condiciones de agitación (20 rpm); pasado el tiempo de incubación los conidios se sembraron en placas con medio FGS (Fructosa-Glucosa-Sorbosa) y se incubó a 30°C durante 4 días, hasta que se observó crecimiento de colonias. Se recuperaron cada una de las colonias resultantes para ser crecidas en tubos inclinados con MMV. En el cuadro 5 se indica el número de transformantes obtenidas por cada transformación. Posteriormente se revisaron las transformantes mediante microscopía confocal de escaneo con Laser (Olympus FV1000).

2.8 Microscopía confocal de escaneo con laser

Los análisis de microscopía se llevaron a cabo con el microscopio confocal invertido Olympus Flouview™ FV1000 con láser de argón (GFP: excitación, 488nm; emisión, 505-525 nm) (mCherry/RFP:

excitación, 543 nm; emisión, 560–660 nm) utilizando el método de agar invertido (Hickey et al., 2004) con el objetivo de 60X PLAN apocromático. Las imágenes y videos fueron capturados utilizando el software FV10-ASW (versión 4.0.2.9, Olympus) y se procesaron con el editor de imágenes Adobe Photoshop CS5.

2.9 Cruzas

Con la finalidad de obtener homocariontes a partir de las cepas mutantes heterocariontes, se inocularon 125×10^6 conidios de la cepa FGSC#9717 de tipo de apareamiento *mat A* en medio sintético de cruza (MSC) conteniendo histidina (25 mg/ml) y se incubaron por aproximadamente 24 horas en oscuridad para luego inocular sobre el micelio las cepas FGSC#16302 ($\Delta vps-27$) o FGSC#16947 ($\Delta vps-2$) de tipo de apareamiento *mat a*, inoculando 1×10^6 conidios en 4 gotas de 10 μ l dispersas por el micelio de las cepas para ser incubadas en oscuridad por dos semanas. Pasado el tiempo se recuperaron las ascosporas producto de la crusa, y se re suspendieron en 1 ml de agua estéril, para activarlas se sembraron en MMV e incubadas a 60°C por 1 hora y se incubaron aproximadamente 16 horas a 30°C, las germínulas de las ascosporas se recuperaron y se aisló cada una en tubos inclinados con MMV con histidina e higromicina y se incubaron a 30°C.

Se inocularon 125×10^6 conidios de la cepa N150 de tipo de apareamiento *mat A* en MSC. Se llevó a incubación por 24 horas en condiciones de oscuridad; posteriormente se inoculó sobre el micelio 1×10^6 conidios de las cepas FGSC#16302 ($\Delta vps-27$) o FGSC#16947 ($\Delta vps-2$) y se llevaron a incubación en oscuridad a 25°C por dos semanas. Se recuperaron las ascosporas, se resuspendieron en 1 ml de agua estéril, se activaron en MMV 1.5% a una temperatura de 60°C por una hora, se incubaron por 5 horas a 30°C y posteriormente se recolectaron 36 colonias de cada crusa en tubos inclinados con higromicina, llevándose a incubar a 30°C por cinco días.

2.10 Comprobación de las cepas etiquetadas

Las cepas VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27-mCherry se crecieron en Medio Completo de Vogel, a una temperatura de 30°C con agitación, por 24 horas. El micelio fue triturado con ayuda de un mortero y Nitrógeno líquido. Se extrajo el DNA genómico por medio de kit de extracción DNAeasy de QIAgen.

Para corroborar que los insertos se han integrado de manera correcta en el genoma de *N. crassa*, se realizaron reacciones de PCR comprobatorias utilizando como templado el DNA genómico extraído de cada cepa, y usando como control el DNA genómico de la cepa silvestre N1; para ello se utilizaron oligonucleótidos diseñados para la hibridación dentro y fuera del casete introducido. En la Figura 6 se muestra un esquema en el cual se representa la estrategia utilizada.

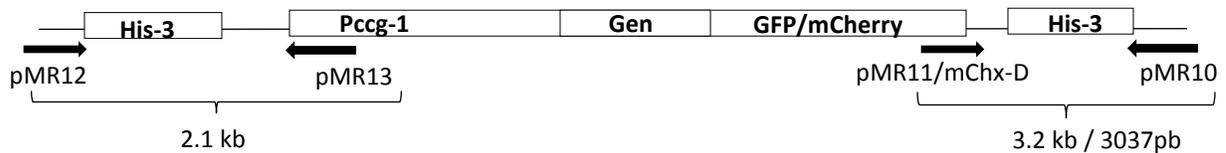


Figura 7. Esquema de la estrategia utilizada para las PCRs de comprobación.

2.11 Tasa de elongación

Para los ensayos llevados a cabo para determinar la tasa de elongación se inocularon 1×10^6 conidios de las cepas VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27-mCherry, en estado heterocarión, en cajas de Petri con 20 ml de MMV sólido a 1.5%. Se incubaron por 12 horas a 30°C y se registró su crecimiento cada 4 horas. Los datos fueron procesados para obtener un promedio de velocidades, así como su desviación estándar.

2.12 Velocidad de las partículas

Se midió la distancia a la cual los cuerpos globulares viajan en relación al tiempo donde $n=49$ para VPS-27-GFP y $n=28$ para VPS-2-GFP (el número de cuerpos de cada cepa depende de la cantidad de cuerpos presentes en cada hifa), de igual manera se realizó con las pequeñas estructuras puntiformes ($n=100$), así como con el ápice de la hifa. Los datos fueron procesados para obtener un promedio de velocidades e intervalos de confianza con un error permitido de 5%.

2.13 Obtención de cepas Homocariontes

Para obtener cepas en estado homocarión expresando cada una de las proteínas etiquetadas se llevaron a cabo cruces entre las diferentes cepas con la cepa $\Delta sad-2$. Se inocularon en medio sintético

de cruza 125×10^6 conidios de las cepas VPS-27-GFP, VPS-27-mCherry, VPS-2-GFP o VPS-2-mCherry y se incubaron a 25°C por un día, sobre el micelio se inocularon 1×10^6 conidios de la cepa $\Delta sad-2$. Las placas se incubaron por 3 semanas en condiciones de oscuridad a 25°C. Pasado el tiempo de incubación, se recuperaron las ascosporas producto de la reproducción sexual de cada una de las cepas, estas se inocularon en medio MMV 1.5%, se activaron a 60°C por una hora y luego se incubaron a 30°C por 12 horas, se seleccionaron 25 colonias de cada cruce y se aislaron en tubos con MMV 1.5% con higromicina (por la resistencia a higromicina de la cepa Δsad). Se llevaron a incubación por 5 días y las cepas que tuvieron la capacidad de crecer en medio con higromicina se revisaron mediante microscopía confocal, seleccionando aquellas cepas que presentaran mayor fluorescencia.

Se seleccionaron 40 colonias obtenidas a partir de ascosporas activadas producto de la reproducción sexual entre las cepas FGSC#9717 x FGSC#16302 ($\Delta vps-27$) y FGSC#9717 x FGSC#16497 ($\Delta vps-2$) con la finalidad de obtener cepas mutantes homocariontes y poder de esta manera llevar a cabo ensayos que permitieran determinar el efecto que tiene la eliminación de estos genes sobre la ruta de secreción de CHS-1.

Cada colonia se aisló en tubos inclinados de MMV 1.5% conteniendo histidina a una concentración de 25 mg/ml e higromicina a 200 μ g/ml. Se incubaron por dos semanas a 30 °C y no se observó crecimiento de micelio (el experimento se repitió dos veces y se obtuvo el mismo resultado; total de ascosporas aisladas: 80 por cada cruce).

Se seleccionaron 36 colonias de ascosporas producto de la cruce genética realizada entre las cepas N150 x #16302 ($\Delta vps-27$) y N150 x #16497 ($\Delta vps-2$), cada colonia fue aislada en tubos inclinados con MMV 1.5% conteniendo higromicina a 200 μ g/ml, como resultado se obtuvo una colonia de la cruce N150 x #16497 ($\Delta vps-2$). Se recuperó la colonia y se extrajo DNA genómico para realizarse una prueba de PCR para corroborar que la cepa.

2.13.1 Obtención de microconidios

Las cepas $\Delta vps-2$ y $\Delta vps-27$ fueron inoculadas en tubos de cultivo inclinados con medio Westergaard, sacarosa y biotina.

Se incubaron por dos días y se recuperaron 35 de las colonias más pequeñas en tubos inclinados con MMV al 1.5% (en el caso de las cepas mutantes se añadió higromicina al medio). Se seleccionaron 40

colonias de microconidios obtenidos de cada una de las cepas mutantes ($\Delta vps-2$ y $\Delta vps-27$), se aislaron en tubos inclinados con MMV 1% con higromicina (200 $\mu\text{g/ml}$) de los cuales ninguna de ellas fue viable. El ensayo se repitió añadiendo higromicina al medio FGS, después de dos semanas pudieron observarse 20 colonias pequeñas de $\Delta vps-2$ y 24 de $\Delta vps-27$, se aislaron en tubos con MMV 1.5% y después de dos semanas de incubación a 30°C no se observó crecimiento alguno de micelio. Ninguna de las colonias aisladas de las cepas mutantes fue capaz de crecer en medio con higromicina, por lo que se asumió que ninguna de ellas contaba con el genotipo deseado. Por tal motivo se repitió el procedimiento con algunos cambios, para lo cual se adicionó higromicina al medio FGS, donde se inocularon los microconidios, con el fin de asegurar que las colonias que se aislaran fueran aquellas que contaban con resistencia a higromicina y por tanto tuvieran el genotipo de interés.

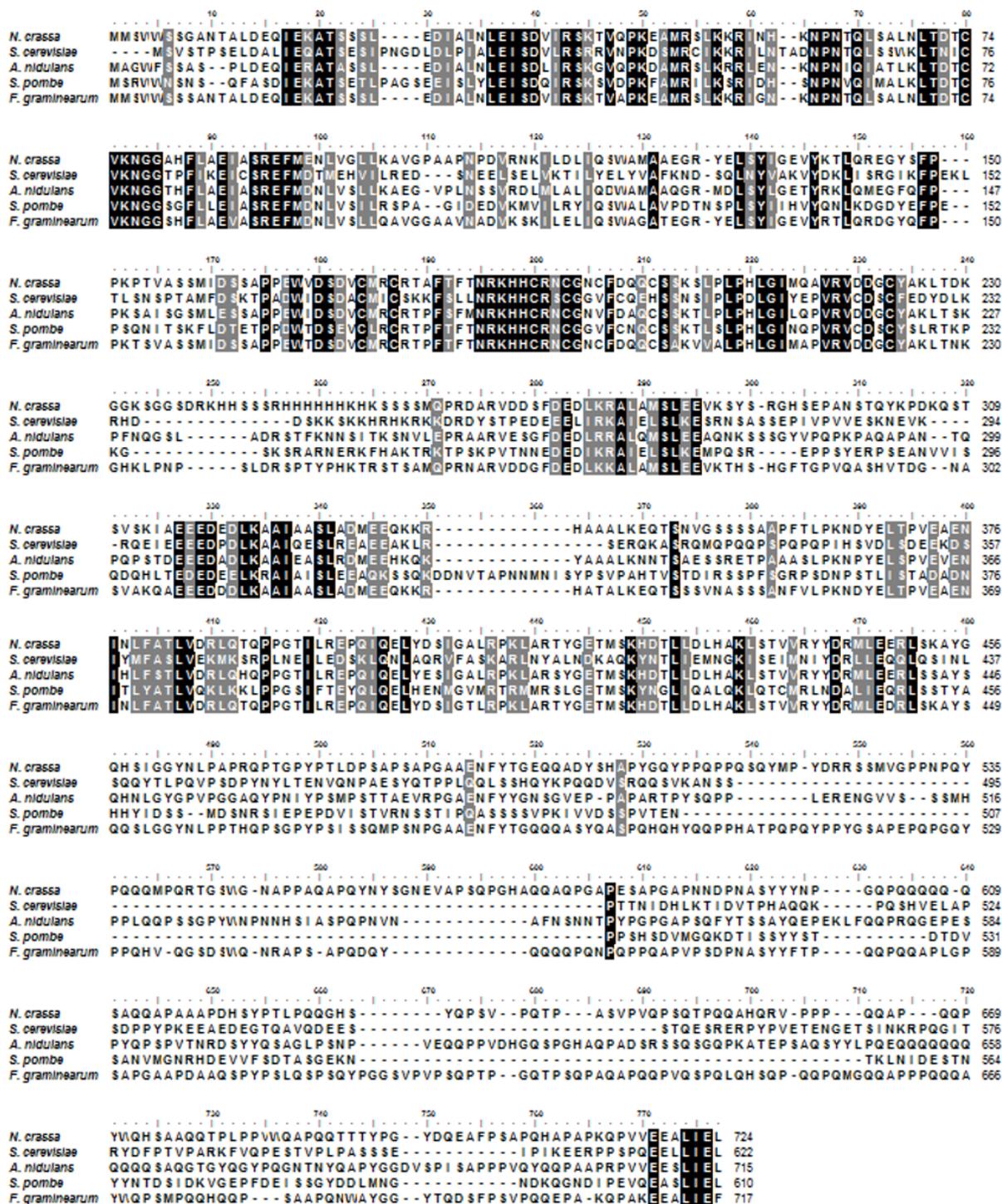


Figura 9. Alineamiento de aminoácidos de VPS-27 en diferentes organismos.

Se analizó el porcentaje de identidad de las proteínas VPS-2 y VPS-27 en *N. crassa* comparado con la secuencia aminoacídica de los ortólogos en *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans* y *F. graminearum*. De las secuencias de los organismos analizados, se encontró que VPS-27 de *N. crassa* comparte mayor

semejanza con VPS-27 de *Fusarium gramineum* (69.99%), mientras que la secuencia de VPS-2 de *N. crassa* comparte mayor porcentaje de identidad con VPS-2 de *A. nidulans* (73.87 %) (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de identidad de VPS-27 o VPS-2 en *N. crassa* con ortólogos de diferentes organismos

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>F. graminearum</i>
<i>N. crassa</i> (VPS-27)	34.06%	39.51%	55.30%	69.99%
<i>N. crassa</i> (VPS-2)	52.86%	51.21%	74.67%	No reportado

Adicional a los alineamientos se revisó la secuencia de cada uno de los ortólogos en las bases de datos NCBI, Uniprot y FungiDB, para obtener una comparación de los dominios presentes en cada una de las proteínas, donde se encontró que tanto en VPS-2, como en VPS-27 estos son bien conservados en cada especie. En la figura 10 se observa las estructuras de las proteínas correspondientes a VPS-27, y en la figura 11 se muestran las estructuras equivalentes a VPS-2.

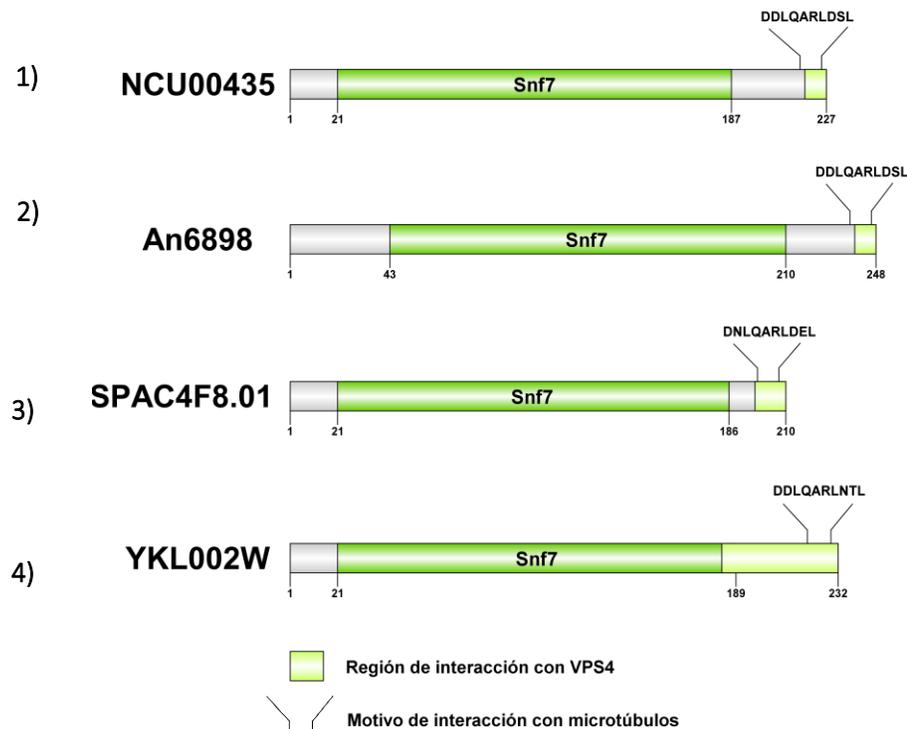


Figura 10. Comparación de la representación de la estructura de los ortólogos correspondientes a VPS-2. 1) VPS-2 en *Neurospora crassa*, 2) *Aspergillus nidulans*, 3) *Schizosaccharomyces pombe*, y 4) *Saccharomyces cerevisiae*.

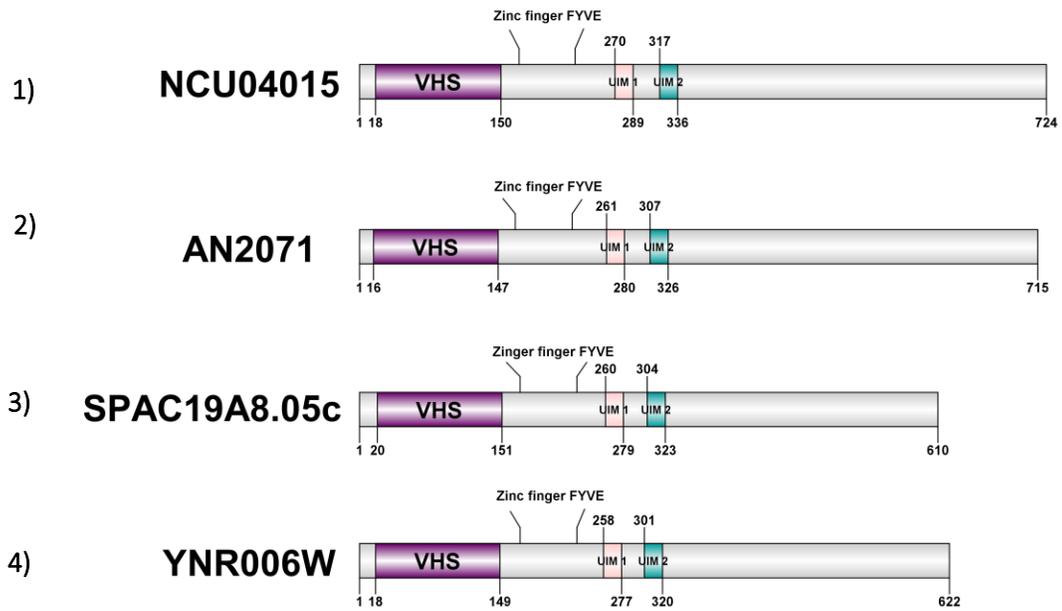


Figura 11. Comparación de la representación de la estructura de los ortólogos correspondientes a VPS-27. 1) VPS-27 en *Neurospora crassa*, 2) *Aspergillus nidulans*, 3) *Schizosaccharomyces pombe*, y 4) *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Construcción de los vectores

Se llevaron a cabo reacciones de restricción con las enzimas *PacI* y *XbaI* de los vectores pccg_C_GLYGFP y pJV20 y de los amplicones obtenidos de la amplificación del ORF de *vps-2* y *vps-27* (Figura 12B, 12C). El vector pJV20 que contenía el fragmento correspondiente a *gs1* liberó una banda correspondiente al peso molecular del ORF del gen (Figura 12E).

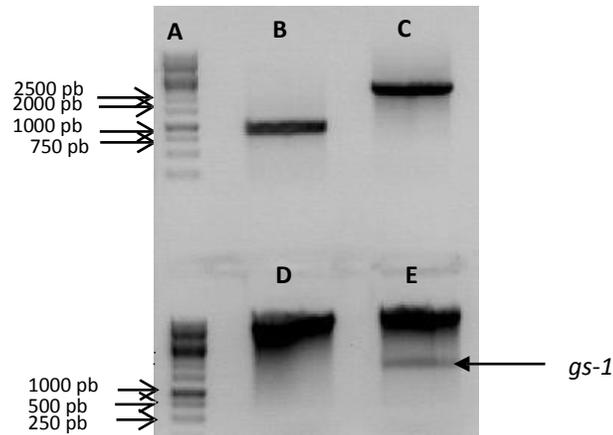


Figura 12. Electroforesis de la digestión de pJV20 y PCCG_C_GLYGFP. A. Marcador de peso molecular 1Kb (O'GeneRuler Thermo Scientific). B. ORF del gen *vps-2* de 904 pb. C. ORF del gen *vps-27* de 2,453 pb. D. Vector pccg_C_GLYGFP digerido E. Vector pJV20 digerido con *PacI* y *XbaI* mostrando liberación del ORF del gen *gs-1* de 2549 pb.

Después de escindir las bandas del gel, purificarlas, y ligarlas con los vectores digeridos correspondientes, se transformó *E. coli*, obteniendo gran número de colonias aisladas. Se seleccionaron 10 colonias provenientes de la transformación con cada constructo y se revisaron por PCR, para verificar la presencia de *vps-2* y *vps-27*. En la Figura 13 se observan las bandas de los fragmentos amplificados que coinciden con los tamaños de cada uno de los genes (*vps-2* y *vps-27*) lo que indica que la construcción de los vectores fue exitosa.

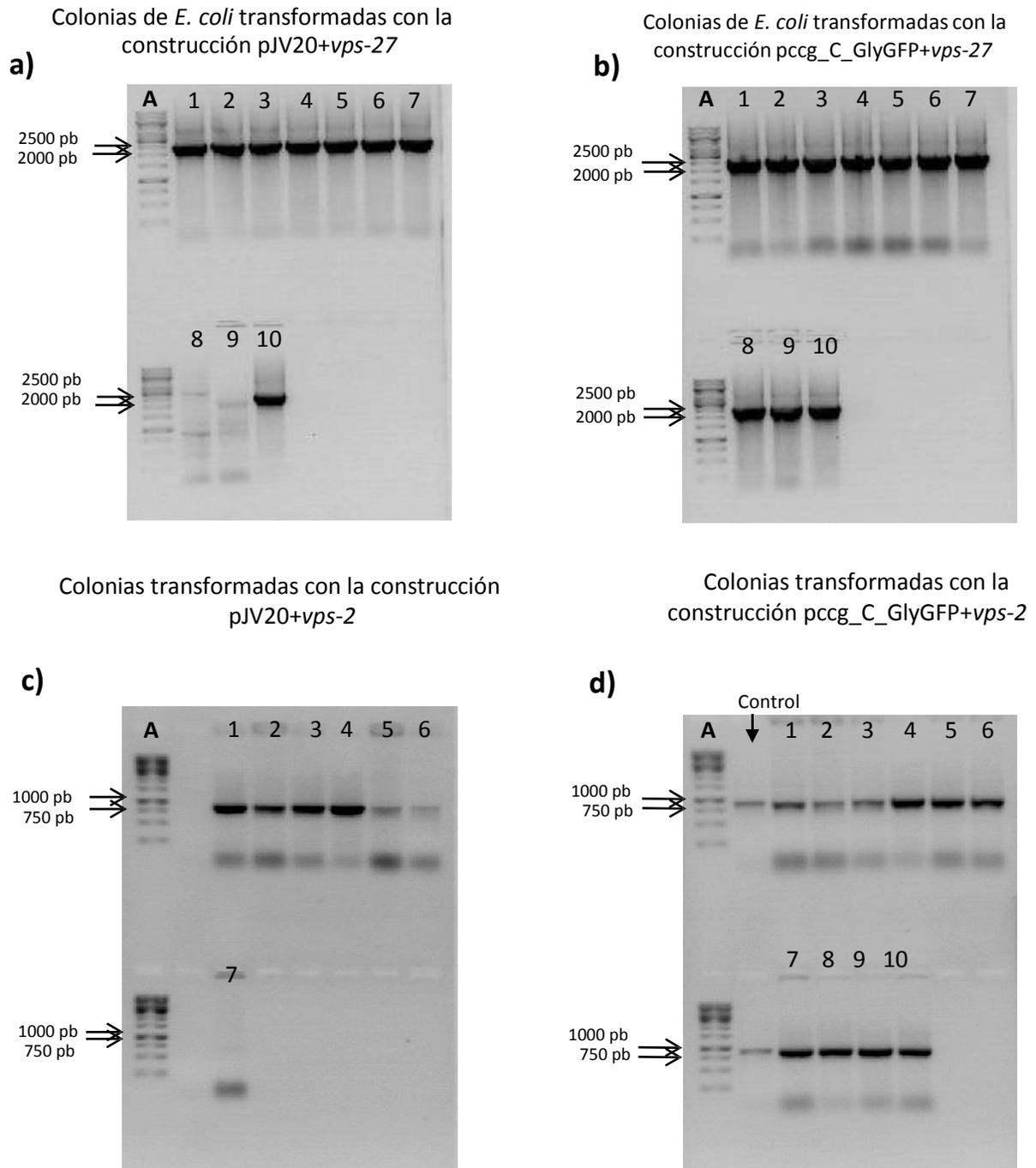


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR de colonia. **A.** Marcador de peso molecular 1Kb(O'GeneRuler Thermo Scientific). **a y b.** Del 1 al 10 se muestra la amplificación el ORF del gen *vps-27* de 453 pb. **c y d.** del 1 al 10 se muestra la amplificación del ORF del gen *vps-2* de 904 pb. El control muestra la amplificación del fragmento utilizando como templado DNA genómico de una cepa silvestre de *N. crassa* (N1).

Posteriormente se seleccionaron 4 colonias por cada ligación, se extrajo DNA plasmídico y se llevó a cabo una reacción de restricción para corroborar que se liberara *vps-27* o *vps2*. En la Figura 14 se puede ver la liberación de los fragmentos correspondientes a *vps-2* y *vps-27* (marcados por flechas) y como control se cargaron en el gel de electroforesis los vectores sin digerir, a) corresponde a la digestión de los vectores pccg_C_GLYGFP y pJV20 con *vps-27* como inserto y se observa cómo se libera una banda del tamaño del ORF de *vps-27* (2543 pb), mientras que b) indica la digestión de ambos vectores con *vps-2* como inserto, mostrando liberada la banda correspondiente al ORF de *vps-2* (904 pb).

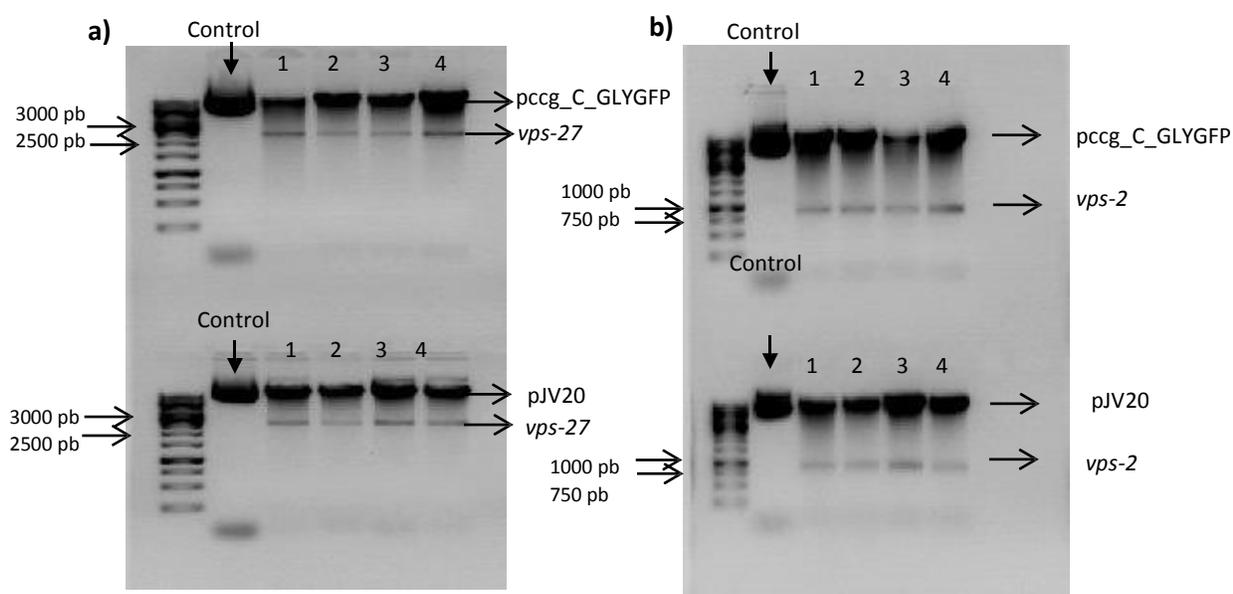


Figura 14. Reacciones de restricción para comprobar el inserto de los genes *vp2-27* y *vps-2* en los vectores PCCG_C_GLY_GFP y pJV20. Gel **a)** indica la digestión de los vectores donde se insertó *vps-27* (*vps-27*=2453pb). Gel **b)** indica digestión de los vectores donde se insertó *vps-2* (*vps-2*=904 pb) **A.** Marcador de peso molecular 1Kb (O'GeneRuler Thermo Scientific).

Se completó la primer parte de la fase experimental cuyo objetivo era la construcción de vectores recombinantes para el etiquetamiento de las proteínas VPS-2 y VPS-27, cada una con las proteínas fluorescentes mCherry y GFP. Después de obtener las construcciones de los plásmidos recombinantes se transformaron células de *N. crassa*. En la tabla 6 se muestra la cantidad de transformantes obtenidas por cada vector.

Tabla 6. Número de transformantes obtenidas por vector

Vector	# de colonias obtenidas	# de colonias que presentaron fluorescencia
pAAR-001.1	11	7
pAAR-002.1	10	8
pAAR-003.1	24	15
pAAR-004.1	8	6

3.3 Comprobación de la integración de los vectores en el genoma de *N. crassa*.

Mediante una prueba de PCR se corroboró la correcta integración del ADN recombinante generado en este estudio en el genoma de *N. crassa*. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos. En gel de agarosa se puede observar el tamaño esperado de los amplicones correspondientes, donde los oligonucleótidos pMR13 y pMR12 dieron como resultado un fragmento correspondiente a 2.1 kb, amplificando una sección del UTR 5' del locus His 3 y una sección del promotor Pccg-1 contenido en el vector pCCG_C_GLYGFP. Mientras los oligonucleótidos pMR11 y pMR10 amplificaron bandas de 3.2 kb correspondientes a una sección de GFP y una sección del UTR 3' del locus de His 3 y el par de oligos mChx-D y pMR10 amplificando una banda de 3037 pb, correspondientes a una parte de mCherry y una parte del UTR 3' del locus de His 3 (Ver figura 6 en la sección de metodología).

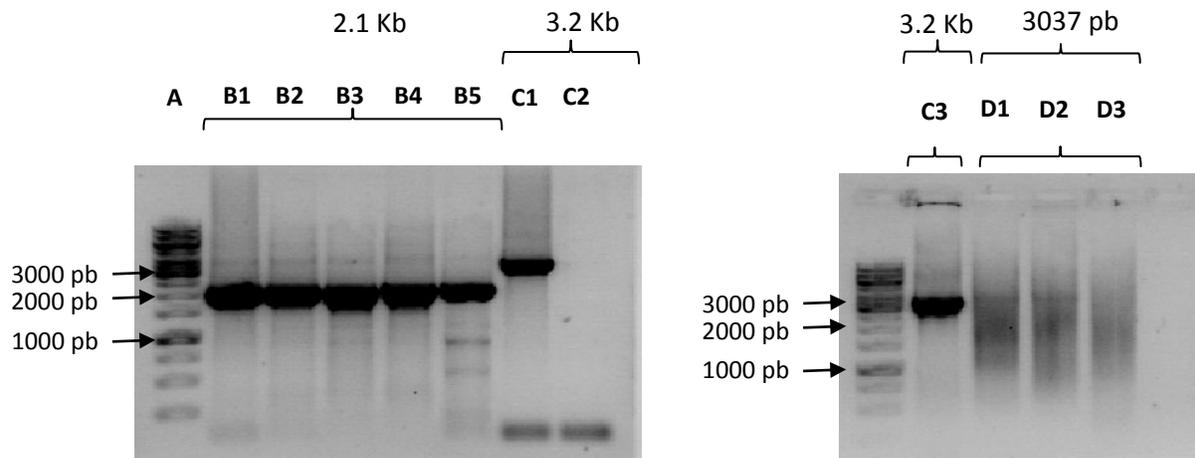


Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR de comprobación de las cepas obtenidas en este estudio. **A.** Marcador de peso molecular 1Kb (O'GeneRuler Thermo Scientific). **B.** Se utilizaron los oligonucleótidos pMR13 y pMR12 **1)** DNA genómico de VPS-2-GFP. **2)** DNA genómico de VPS-2-mCherry. **3)** DNA genómico de VPS-27-GFP. **4)** DNA genómico de VPS-27-mCherry. **C.** Se utilizaron los oligonucleótidos pMR10 y pMR11. **1)** DNA genómico de VPS-2-GFP. **2)** DNA genómico de N1. **3)** DNA genómico de VPS-27-GFP. **D.** Se utilizaron los oligonucleótidos pMRP10 y mChx-D. **1)** DNA genómico de VPS-2-mCherry. **2)** DNA genómico de VPS-27-mCherry. **3)** DNA genómico de N1.

3.4 Localización de VPS-27 y VPS-2

La distribución de las proteínas previamente etiquetadas (VPS-2 y VPS-27) se determinó mediante microscopía confocal de escaneo con láser.

3.4.1 VPS-27 se localiza en pequeñas estructuras puntiformes fluorescentes y en la membrana de cuerpos pleomórficos mayormente globulares a partir de la región III de la hifa hacia regiones distales

VPS-27 se observó en pequeñas estructuras puntiformes distribuidas a lo largo de la hifa con excepción del ápice (Figura 16). A partir de la región III (Figura 16 A) hasta zonas distales (figura 16 B), VPS-27 se observó en la membrana de unos cuerpos pleomórficos, mayormente globulares, de $\sim 3 \mu\text{m}$ de diámetro que presentaron un movimiento anterógrado sin llegar al ápice (Video 1). Además de observarse fluorescencia en toda la membrana de estas estructuras, VPS-27-GFP se observó en puntos de mayor intensidad asociados a la membrana de estos organelos. En las cepas etiquetadas con mCherry se observó un patrón similar, difiriendo en la intensidad de la fluorescencia.

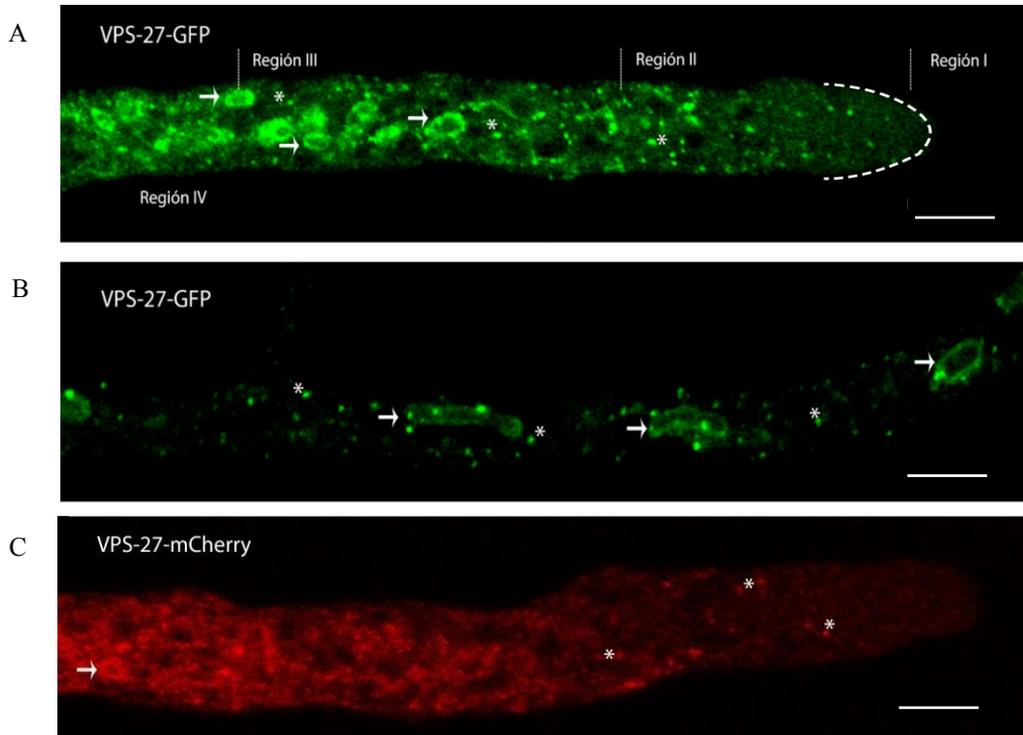


Figura 16. Distribución de VPS-27 en hifas de *N. crassa*. Las flechas indican algunos ejemplos de los corpúsculos pleomórficos, potencialmente MVBs. Los asteriscos indican la proteína distribuida en el citosol de la célula. **A.** Muestra una hifa dividida en sus cuatro regiones y la distribución de VPS-27-GFP a lo largo de ellas. **B.** Localización de VPS-27-GFP en regiones distales. **C.** Distribución de VPS-27-mCherry muestra una distribución de VPS-27 a lo largo de la hifa excluyendo la región del ápice, así como en la membrana de corpúsculos pleomorfos, tal como se muestra en la cepa VPS-27-GFP. Objetivo 60 X. Barra de escala, 10 μm.

En la serie de tiempo mostrada en la figura 16 puede observarse con mejor detalle como los cuerpos pueden cambiar su morfología conforme avanzan a lo largo de la hifa, y como algunos puntos fluorescentes se asocian a la membrana de estos cuerpos.

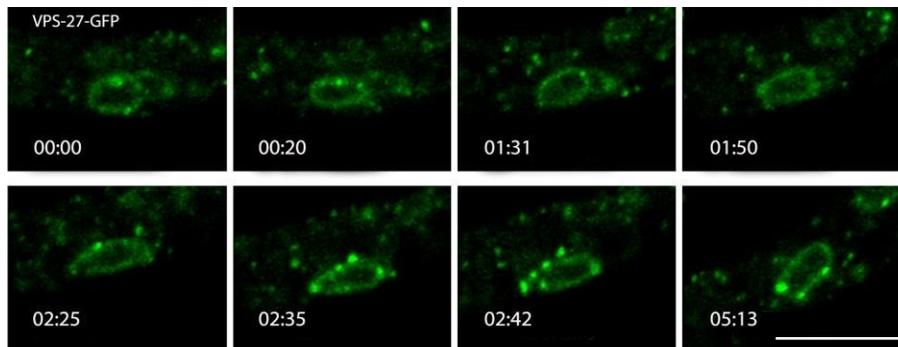


Figura 17. Visualización de como uno de los corpúsculo presentes en VPS-27-GFP cambia su morfología con el tiempo. Barra de escala, 5 μm . Tiempo en minutos:segundos.

3.4.2 VPS-2 se localiza en pequeñas estructuras puntiformes fluorescentes y en el lumen de cuerpos pleomórficos mayormente globulares a partir de la región III de la hifa hacia regiones distales

VPS-2-GFP pudo observarse en pequeñas estructuras puntiformes a lo largo de toda la hifa excluyendo la región del ápice. Además, a partir de la región III (Figura 13 A) y en zonas distales (figura 13 B), VPS-2-GFP se observó en el lumen de estructuras mayormente globulares de $\sim 3 \mu\text{m}$ de diámetro que seguían un flujo anterógrado sin llegar al ápice (Figura 14; video 2). VPS-2-mCherry mostró un patrón similar al observado con VPS-2-GFP, mostrando mayor número de cuerpos esféricos (Figura 18.C).

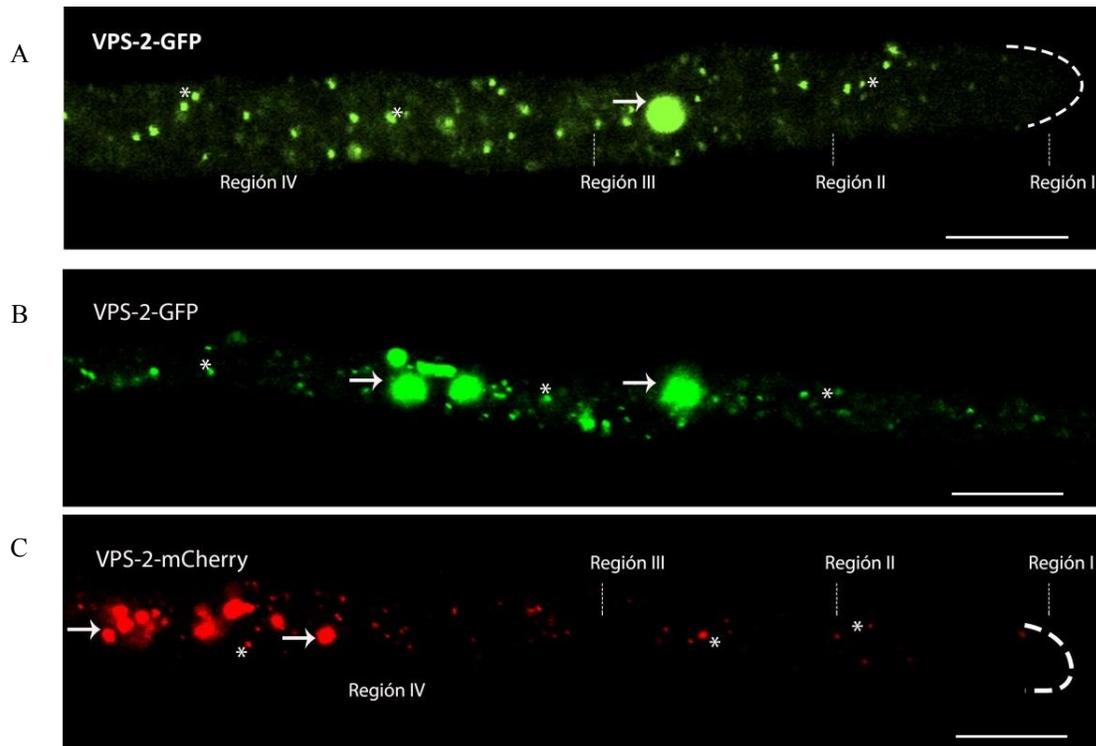


Figura 18. Distribución de VPS-2 en hifas de *N. crassa*. Las flechas indican algunos ejemplos de los corpúsculos marcados por VPS-2. Los asteriscos indican la proteína distribuida en el citosol de la célula. A. Muestra una hifa dividida en sus cuatro regiones y la distribución de VPS-2-GFP a lo largo de ellas. B. Localización de VPS-2-GFP en regiones distales. C. Distribución de VPS-2-mCherry muestra una distribución de VPS-2 a lo largo de la hifa excluyendo la región del ápice, así como en el lumen de corpúsculos pleomorfos, tal como se muestra en la cepa VPS-27-GFP. Barra de escala, 10 μm .

En la figura 19 se muestra una serie de tiempo donde puede observarse como algunas de las estructuras puntiformes parecen fusionarse a los cuerpos marcados por VPS-2-GFP, los cuales variaban constantemente de tamaño en su trayectoria.

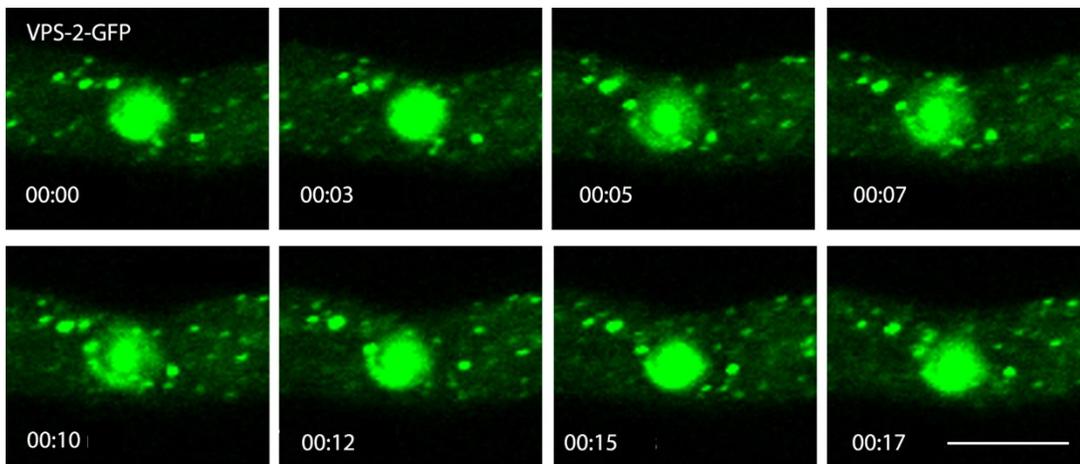


Figura 19. Visualización de la fusión de puntos fluorescentes a uno de los corpúsculos presentes en VPS-2-GFP. Barra de escala, 5 μ m. Tiempo en minutos: segundos.

3.5 Tasa de elongación de VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27 mCherry

Para determinar si el etiquetado de las proteínas pudiera afectar el crecimiento de cada una de las cepas obtenidas en este estudio (VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27-mCherry) se procedió a medir y comparar la tasa de elongación de cada una con respecto a la cepa silvestre. En la medición de la tasa de crecimiento de cada una de las cepas, se puede observar que no hay diferencia relevante en el crecimiento, por lo tanto las cepas no se ven afectadas por el etiquetamiento, se calculó la velocidad a la cual estas cepas crecen y no se encontró diferencia alguna (Wild type= 1.1667, VPS-2-GFP=1.2202, VPS-2-mCherry=1.2143, VPS-27-GFP=1.2024 y VPS-27-mCherry=1.2292; ver en la figura 15).

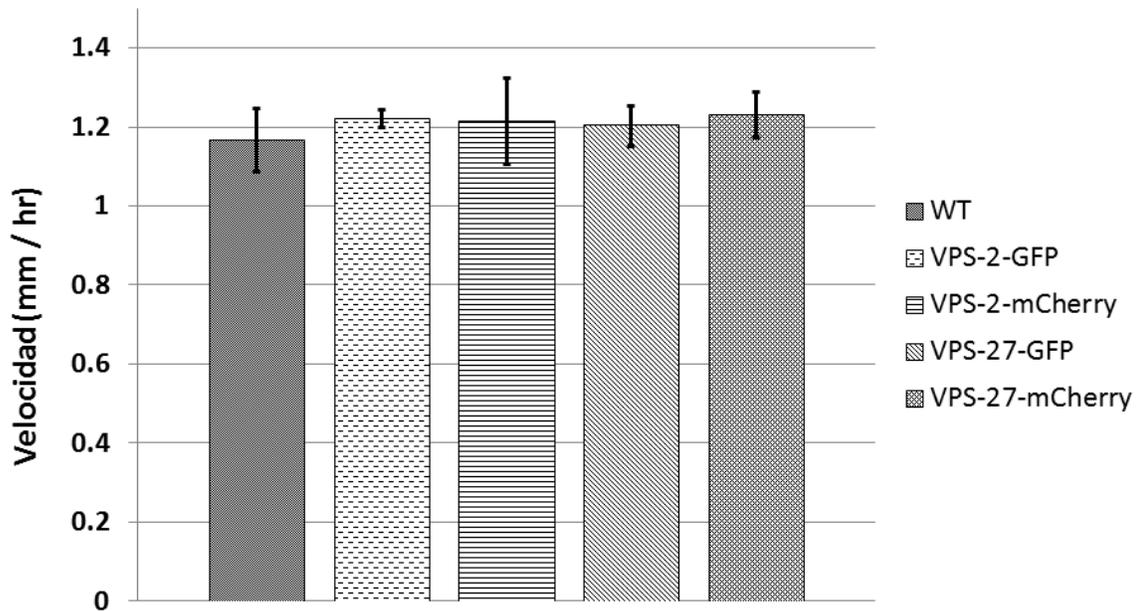


Figura 20. Comparación de la tasa de crecimiento de las cepas obtenidas en este estudio. Cepas de *N. crassa* expresando VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27-mCherry en relación a la cepa WT.

3.6 Velocidad de movimiento de las partículas

Con el fin de conocer la dinámica de los corpúsculos, posiblemente MVBs, con el etiquetado de las proteínas VPS-2 y VPS-27, se midió la velocidad a la que éstos viajan a través de la célula; esto ayudaría a conocer si siguen un movimiento browniano o son independientes del flujo citoplasmático. Para ello se calculó un promedio en las velocidades de cada uno de los elementos: puntos (N=100), cuerpos (VPS-27-GFP, N=49; VPS-2-GFP, N=28), y puntas de hifas (N=10). En las figuras 16 y 17 se encuentran los gráficos obtenidos de estos análisis, donde se muestran las barras de error con un intervalo de confianza del 95%. No se observó diferencia significativa entre las velocidades de los cuerpos y el crecimiento de las hifas, lo que indica que estos viajan a velocidades similares, mientras las estructuras puntiformes tienen una velocidad significativamente distinta, por lo que probablemente el movimiento de éstas esté asociado al citoesqueleto para su transporte.

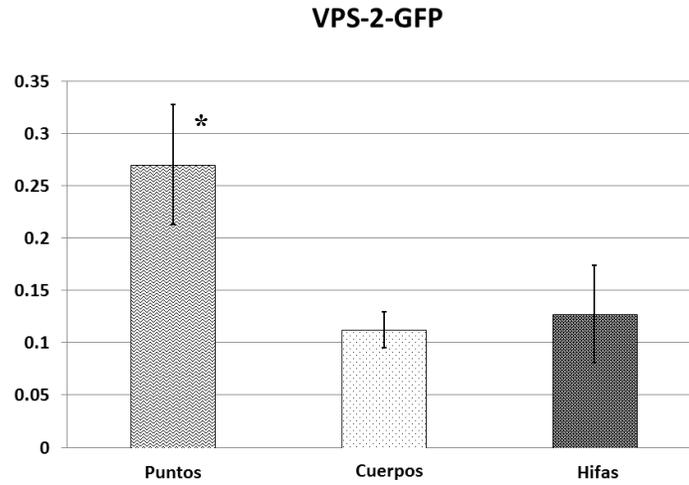


Figura 21. Comparación del promedio de velocidades en que viajan los cuerpos, las estructuras puntiformes y el ápice de la hifa en VPS-27-GFP. Las barras indican el error estándar. Asterisco indica muestra diferente significativamente.

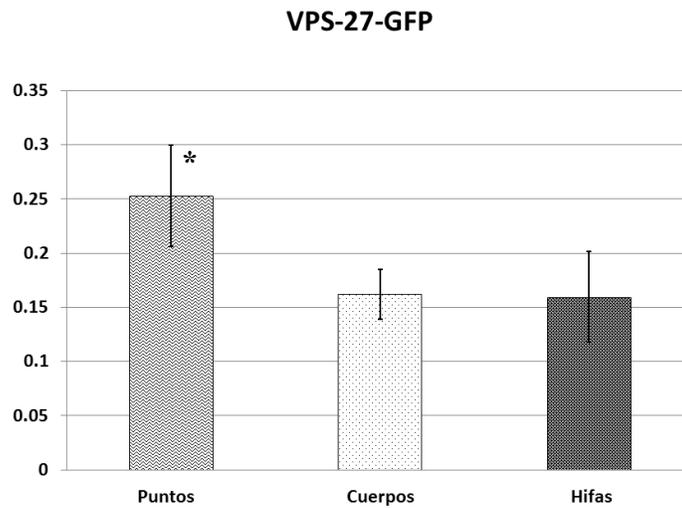


Figura 22. Comparación de la velocidad de los cuerpos, las estructuras puntiformes y el ápice de la hifa en *N. crassa* VPS-2-GFP. Las barras indican el error estándar. Asterisco indica muestra diferente significativamente.

3.7 Análisis de la distribución de VPS-27 bajo el efecto de inhibidores del citoesqueleto

3.7.1 Distribución subcelular de VPS-27 bajo el efecto de benomilo

La adición de benomilo ocasionó cambios en la morfología de la hifa, tales como el hinchamiento del ápice y ramificación apical, así como cambios en la dirección de crecimiento (Figura 24; video 3). Durante los primeros minutos se observó un cambio en la distribución y comportamiento de los cuerpos en las cepas tratadas con benomilo en comparación a la cepa sin tratamiento, la cual muestra una distribución más amplia y coordinada como puede observarse en la serie de tiempo en la figura 25.

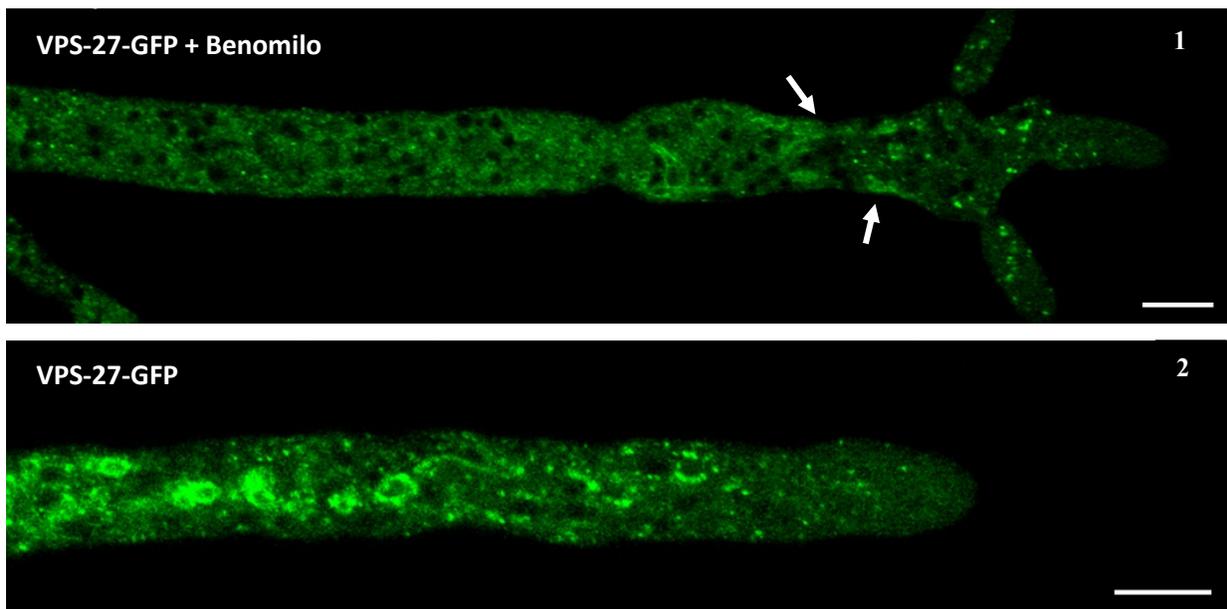


Figura 23. Comparación de una hifa de VPS-27-GFP con o sin tratamiento con Benomilo. Panel **1**. La hifa tratada con benomilo muestra cambios en su morfología en comparación con la hifa sin tratamiento (**Panel 2**), así como el cambio en el patrón de distribución normal que muestran los cuerpos en la hifa sin tratamiento. Barra de escala, 10 μ m.

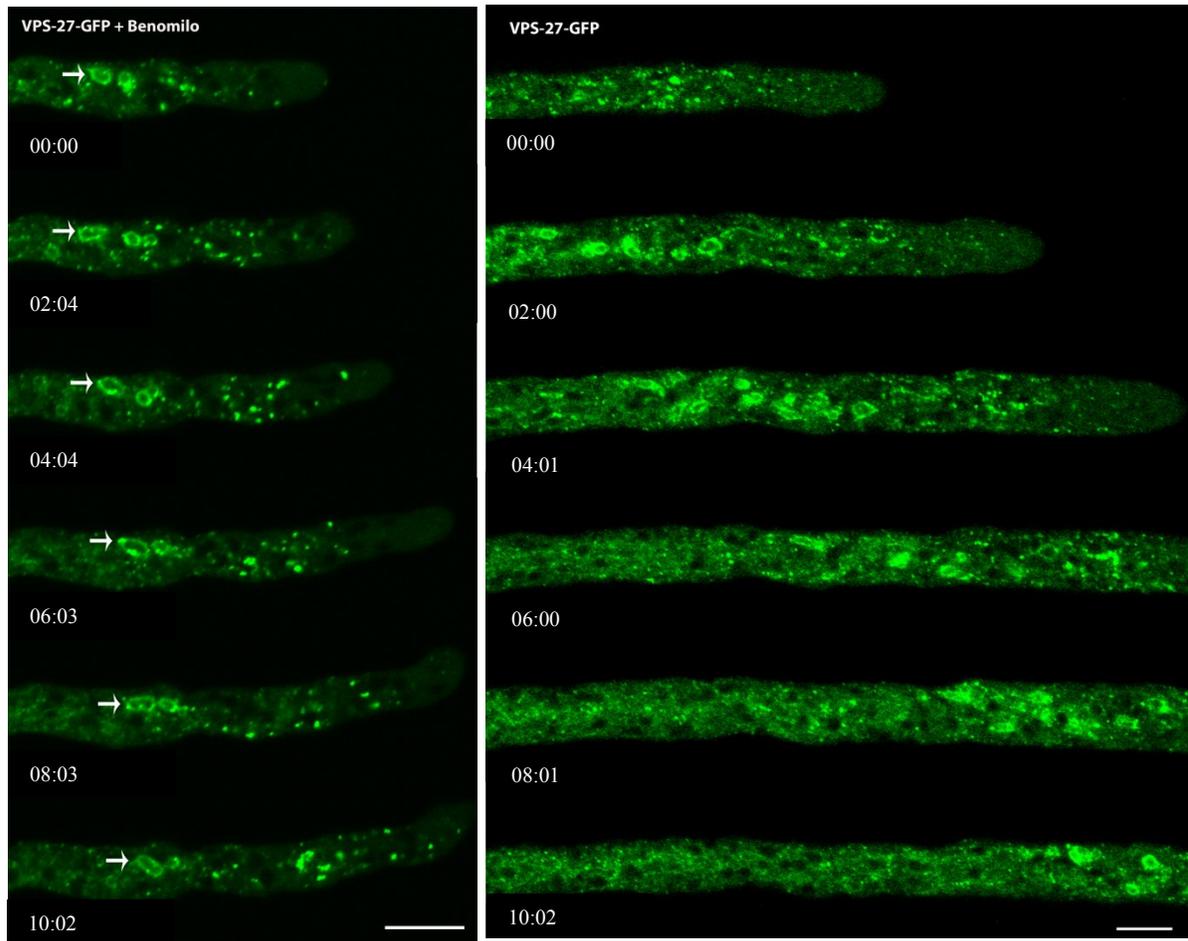


Figura 24. Comparación de series de tiempo de una hifa de VPS-27-GFP con o sin tratamiento con Benomilo. **Izquierda.** Se muestra el crecimiento de una hifa de VPS-27-GFP tratada con benomilo y la dinámica de los MVBs bajo el efecto del inhibidor. **Derecha.** Serie de tiempo donde se muestra el crecimiento de una hifa de VPS-27-GFP sin benomilo y la dinámica de los MVBs sin el efecto del inhibidor, mostrando un mayor crecimiento y movimiento de los cuerpos en comparación con la cepa tratada con benomilo. La flecha muestra el seguimiento de un mismo cuerpo en cada uno de los paneles. Barra de escala, 10 μm . Tiempo en minutos: segundos.

3.8 Co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP

Como se mostró anteriormente VPS-27 y VPS-2 tienen aparentemente una distribución celular similar, sin embargo cada una mostró diferencias en los patrones de fluorescencia. Con el fin de conocer la relación entre ellas, se llevó a cabo la co-expresión de ambas proteínas (Figura 21; video 4). El resultado mostró que VPS-2-GFP llega en forma de estructuras punteadas a la membrana de los cuerpos marcados por VPS-27-mCherry.

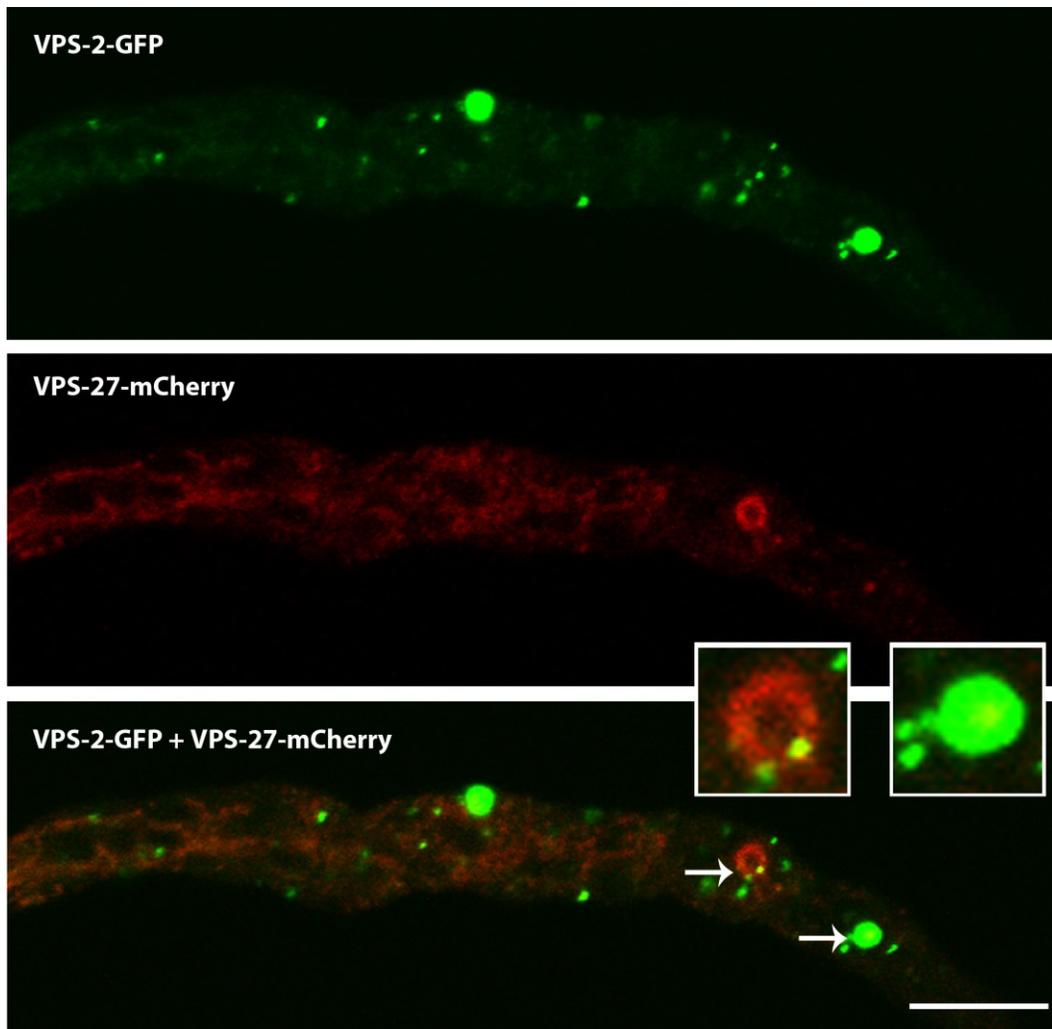


Figura 25. Co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP. Panel 1. Muestra distribución de VPS-2-GFP. **Panel 2.** Distribución de VPS-27-mCherry. **Panel 3.** La co-expresión de ambas cepas muestra co-localización parcial en la membrana de los cuerpos marcados por VPS-27-mCherry (flechas) y en el centro de los cuerpos marcados por VPS-2-GFP. Barra de escala, 10 μm .

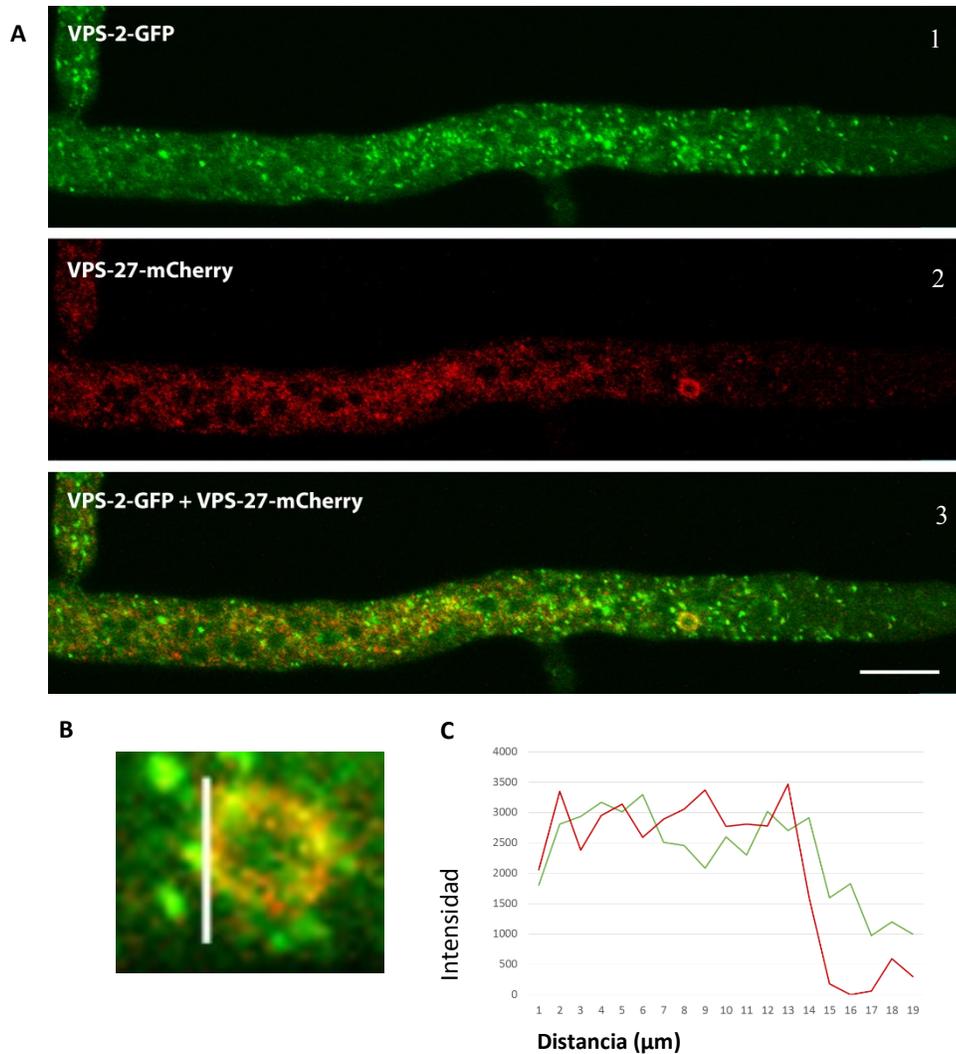


Figura 26. Intensidad de fluorescencia de la co-expresión de VPS-27-mCherry y VPS-2-GFP. **Panel A.1.** Muestra distribución de VPS-2-GFP. **Panel A.2.** Distribución de VPS-27-mCherry. **Panel A.3.** La co-expresión de ambas cepas muestra co-localización parcial en la membrana de los cuerpos marcados por VPS-27-mCherry. **C.** Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-2-GFP y VPS-27-mCherry en la membrana de los cuerpos MVBs (**B**). Barra de escala, 10 μm .

3.9 Co-expresión de VPS-2 y VPS-27 con marcadores de otros organelos

Para conocer la naturaleza de los cuerpos encontrados en las cepas VPS-2-GFP, VPS-2-mCherry, VPS-27-GFP y VPS-27-mCherry, se utilizaron cepas expresando proteínas marcadores de otros organelos previamente reportados, tales como VMA-1 (marcador de vacuolas) y RAB-7 (endosomas tardíos) ambas encontradas en la membrana de los PVCs.

3.9.1 Co-expresión de VPS-27 con RAB-7 y VMA-1

La co-expresión realizada entre las cepas VPS-27-GFP + VMA-1-tdimer2 (Figura 28; video 5) y VPS-27-GFP + RAB-7-tdimer2 (Figura 29; video 6) dio como resultado la co-localización parcial de las proteínas en la membrana de los compartimentos prevacuolares (Bowman *et al.*, 2015), mostrando pequeños puntos verdes correspondientes a VPS-27 y la puntos rojos correspondiendo a VMA-1 y RAB-7.

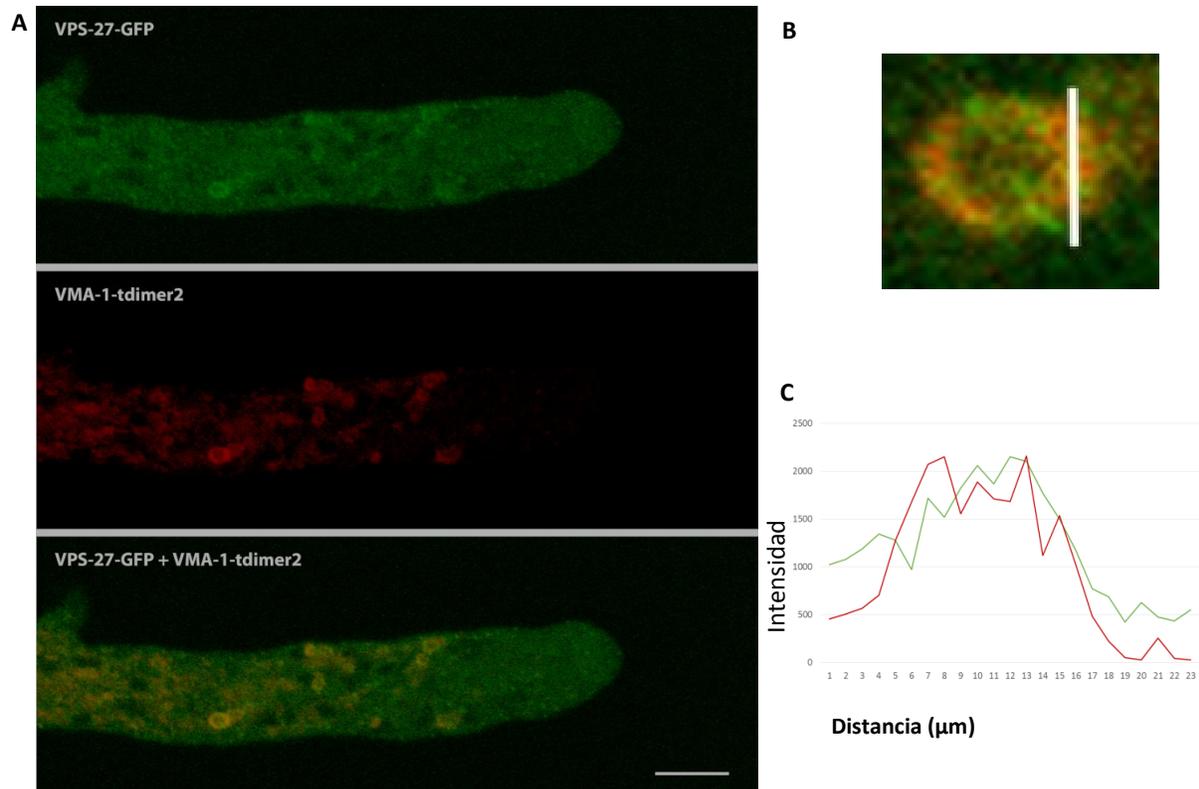


Figura 27. Co-expresión de VPS-27-GFP y VMA-1-tdimer2. **Panel A.1.** Distribución de VPS-27-GFP a lo largo de la hifa. **Panel A.2.** VMA-1-tdimer2 se localiza en la membrana de los PVCs. **Panel A.3.** El traslape de señal de VPS-2-GFP7 y VMA-1-tdimer2 muestra una co-localización parcial en la membrana de los MVBs/PVCs, donde las partículas de color verde corresponden a VPS-27, las partículas en rojo corresponden a VMA-1 y las zonas de color amarillo representan la co-localización de ambas proteínas. **C.** Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-27-GFP y VMA-1-tdimer2 en la membrana de los cuerpos MVBs (**B**). Barra de escala, 10 μm.

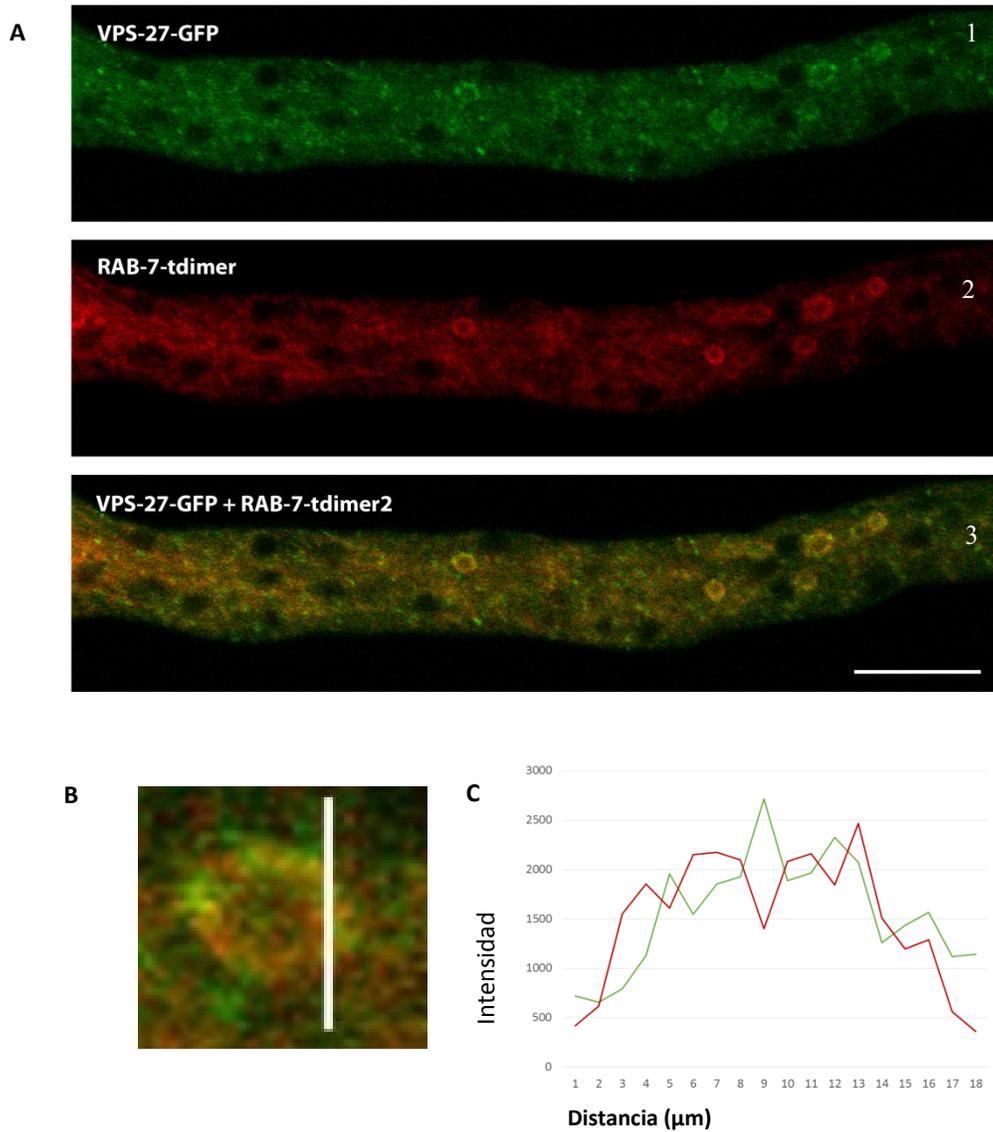


Figura 28. Co-expresión de las VPS-27-GFP y RAB-7-tdimer2. **Panel A.1.** Distribución de VPS-27-GFP a lo largo de la hifa. **Panel A.2.** RAB-7-tdimer2 se localiza en la membrana de los endosomas tardíos/PVCs. **Panel A.3.** El traslape de señales de VPS-27-GFP y RAB-7-tdimer2 muestra una co-localización parcial en la membrana de estos organelos, donde las partículas de color verde corresponden a VPS-27, las partículas en rojo corresponden a RAB-7 y las zonas de color amarillo representan la co-localización de ambas proteínas. **C.** Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-27-GFP y RAB-7-tdimer2 en la membrana de los cuerpos MVBs (**B**). Barra de escala, 10 µm.

3.9.2 Co-expresión de VPS-2 con RAB-7 y VMA-1

La co-expresión realizada entre las cepas VPS-2-GFP + VMA-1-tdimer2 (Figura 30; video 7) y VPS-2-GFP + RAB-7-tdimer2 (Figura 31; video 8) mostró una co-localización parcial en la membrana de los compartimentos prevacuolares (Bowman *et al*, 2015), mostrando pequeños puntos verdes correspondientes a VPS-2, así como la presencia de puntos de mayor tamaño de color amarillo en el centro de los cuerpos globulares marcados por VPS-2-GFP, correspondiendo a VMA-1 y RAB-7.

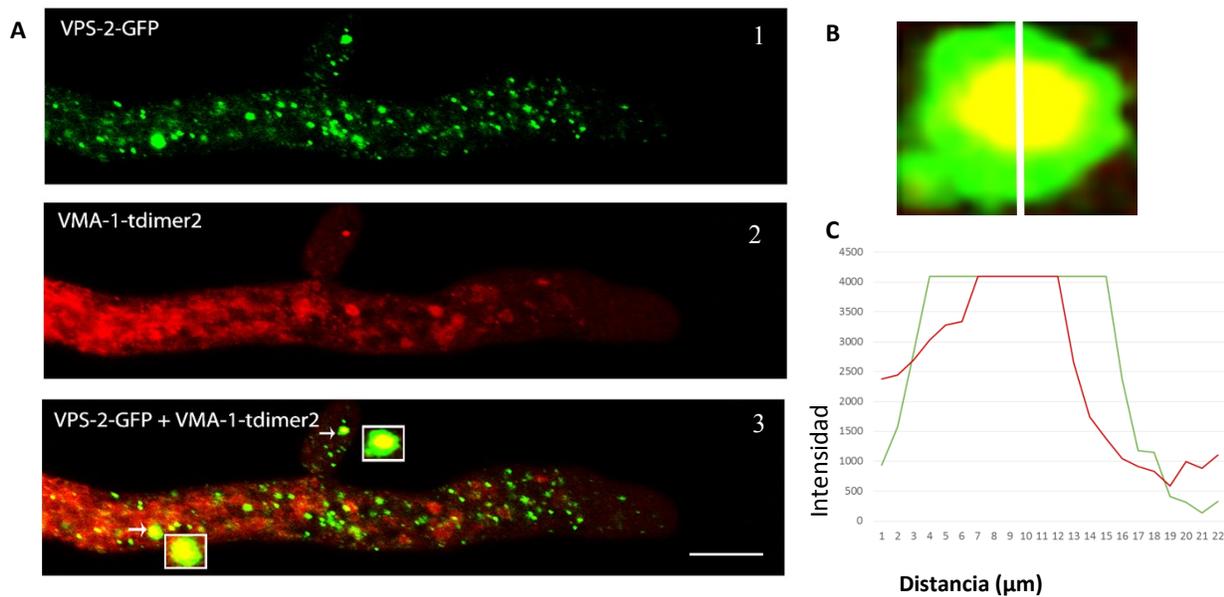


Figura 29. Co-expresión de VMA-1-tdimer2 y VPS-2-GFP. Panel A.1. Distribución de VPS-2-GFP a lo largo de la hifa. Panel A.2. Pueden observarse algunos PVCs marcados por VMA-1, la cual se localiza en su membrana. Panel A.3. El traslape de señales de ambas proteínas muestra una co-localización parcial en el centro de las estructuras globulares marcadas por VPS-2, así como en la membrana de los PVC, donde las partículas de color verde corresponden a VPS-2, las partículas en rojo corresponden a VMA-1 y las zonas de color amarillo representan la co-localización de ambas proteínas. C. Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-2-GFP y VMA-1-tdimer2 en uno de los cuerpos globulares (B). El asterisco indica la amplificación de un PVC marcado por VMA-1-tdimer2 con VPS-2-GFP asociada a la membrana. Barra de escala, 10 μm.

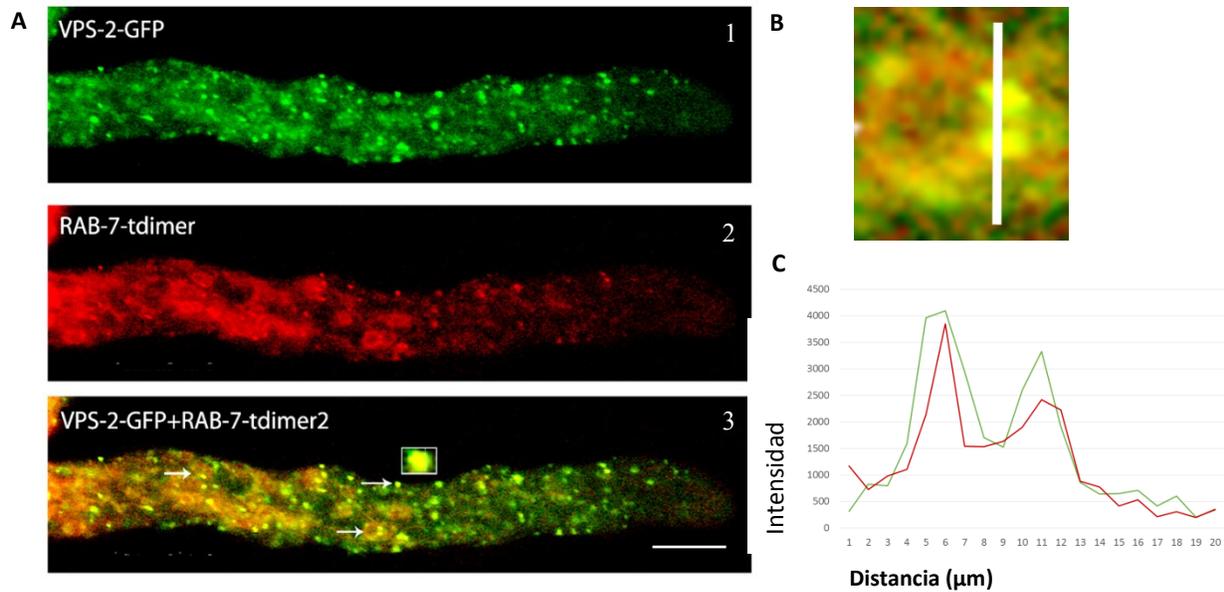


Figura 30. Co-expresión de RAB-7-tdimer2 y VPS-2-GFP. **Panel A.1.** Distribución de VPS-2-GFP a lo largo de la hifa. **Panel A.2.** Pueden observarse algunos endosomas tardíos/PVCs marcados por RAB-7-tdimer2, la cual se encuentra presente en su membrana. **Panel A.3.** El traslape de señal de ambas muestra una co-localización parcial en el centro de las estructuras globulares marcadas por VPS-2, así como en la membrana de los endosomas/PVCs, donde las partículas de color verde corresponden a VPS-2, las partículas en rojo corresponden a RAB-7 y las zonas de color amarillo representan la co-localización de ambas proteínas. **C.** Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-2-GFP y RAB-7-tdimer2 en la membrana de uno de los cuerpos globulares marcados por RAB-7 (**B**). Flechas indican zonas donde ambas proteínas co-localizan. Barra de escala, 10 μm.

3.10 Caracterización del papel de los MVBs en la ruta secretora de CHS-1

Para dilucidar si los MVBs juegan un papel en la secreción de la enzima sintetizador de pared celular CHS-1, se llevó a cabo la co-expresión de VPS-2-GFP y CHS-1-mCherry, y se encontró una co-localización parcial de estas proteínas en forma de manchas amorfas amarillas presentes en algunos de los cuerpos globulares marcados por VPS-2-GFP (Figura 32).

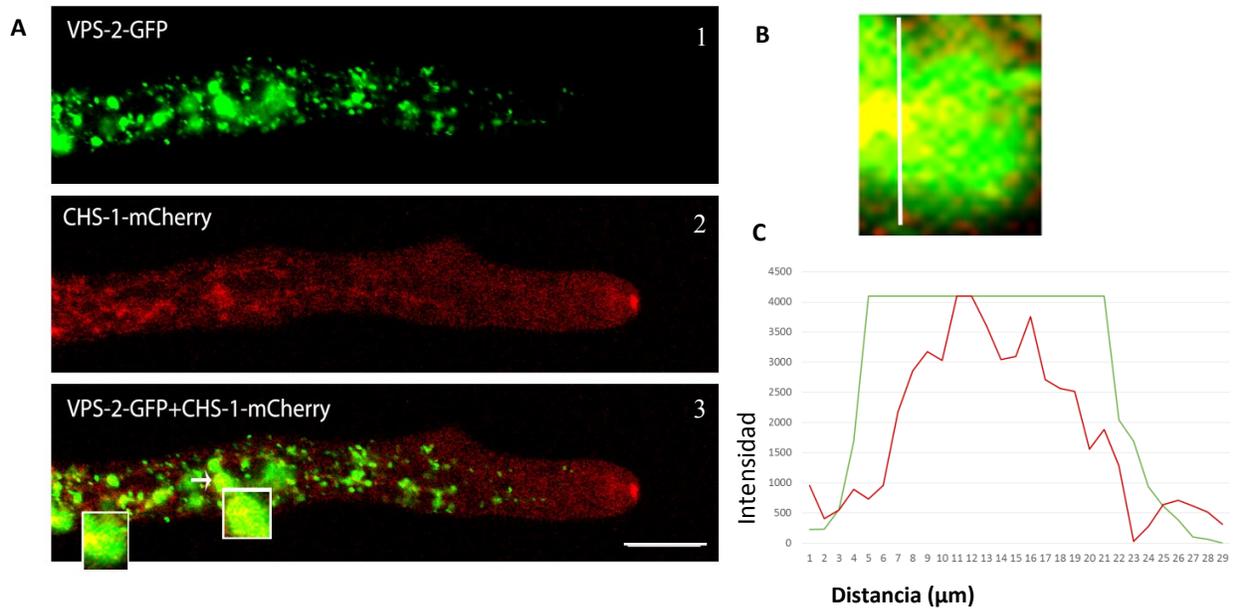


Figura 31. Co-expresión de CHS-1-mCherry y VPS-2-GFP. Panel 1. Distribución de VPS-2-GFP. **Panel 2.** La CHS-1 se encuentra distribuida en pequeños puntos en la hifa y mayormente en el Spk. **Panel 3.** Co-expresión de VPS-2-GFP y CHS-1-mCherry; las partículas y cuerpos de color verde corresponden a VPS-2, las partículas en rojo corresponden a CHS-1 y las zonas de color amarillo representan la co-localización parcial de ambas proteínas. **C.** Intensidad de fluorescencia de la co-localización de VPS-2-GFP y CHS-1-mCherry en uno de los cuerpos globulares marcados por VPS-2-GFP (**B**). Flechas indican zonas donde ambas proteínas co-localizan. Barra de escala, 10 μm .

3.11 *vps-27* y *vps-2* son esenciales para *N. crassa*

Se recuperaron las colonias provenientes de microconidios en tubos de cultivo con MMV 1.5%, en la figura 33 se muestran micrografías de algunas de las colonias obtenidas de las cepas mutantes, de tamaño diminuto (Menos de 500 μm) las cuales después de 2 semanas no fueron capaces desarrollarse.

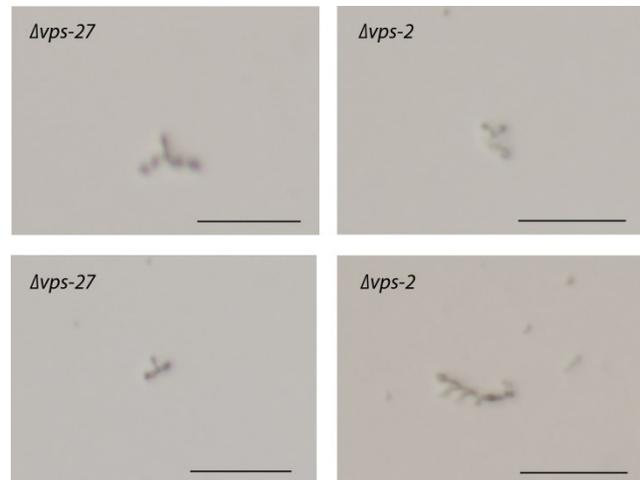


Figura 32. Colonias provenientes de microconidios. Cepas $\Delta vps-2$ y $\Delta vps-27$ en medio FGS con higromicina. Barra de escala, 530 μm .

Capítulo 4. Discusión

Los componentes de los complejos ESCRT estudiados VPS-27 y VPS-2 (ESCRT 0 y ESCRT III, respectivamente) mostraron un patrón de distribución muy parecido en hifas de *N. crassa*. Ambas proteínas se encontraron localizadas en pequeños puntos fluorescentes a lo largo de la hifa excluyendo la región del ápice (aproximadamente desprovista de proteínas a 5 μm). Así mismo, VPS-27 y VPS-2 se encontraron formando parte de cuerpos esféricos pleomórficos de 3 μm de ancho en promedio, presentes a partir de la región III de la hifa que siguen un movimiento anterógrado sin llegar a la punta. Sin embargo, VPS-27 se encontró en la membrana de estos corpúsculos, mientras que VPS-2 se mostró presente en el lumen, y a su vez se observó cómo algunos de los puntos fluorescentes (correspondientes a VPS-2) se fusionaban a estos cuerpos.

Se sugiere que los pequeños puntos corresponden a las proteínas distribuidas en el citosol de la célula como se ha mencionado anteriormente en la literatura para *S. cerevisiae* (Schmidt y Teis, 2012; Katzman *et al.*, 2003), y que son reclutadas por los cuerpos esféricos que corresponden a los MVBs presentes a partir de la región III, tal como se pueden observar en micrografías de microscopía electrónica de transmisión del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Howard y Gow, 2007). Esto permite concluir que se ha demostrado la primer parte de la hipótesis propuesta: “Los MVBs se encuentran a partir de la región III de las hifas de *Neurospora crassa*”.

Las diferencias encontradas en la morfología de los cuerpos elucidados por VPS-27 y VPS-2 podrían resultar de las diferencia de etapas de maduración de los MVBs.

Recientemente, se identificaron en *N. crassa* los compartimentos prevacuolares (PVCs), estructuras más o menos esféricas de 1 a 3 μm de diámetro, localizadas entre las regiones III y IV (Bowman *et al.*, 2015). Estos organelos comparten localización solo con un subconjunto de proteínas encontradas en vacuola, y se observó que el contenido en el interior de las vacuolas no es igual al de estos organelos. Sin embargo se hipotetizó que los PVCs pueden estar involucrados en la formación de la red de vacuolas tubulares. La Rab GTPasa RAB-7, supuestamente está involucrada en el tráfico de proteínas entre endosomas y vacuola. La co-localización parcial de esta proteína con VMA-1-GFP, marcador de compartimentos prevacuolares y vacuolas, en algunos de los PVCs, sugirió que los organelos evidenciados por RAB-7 pueden ser PVCs.

Esto ayuda a interpretar lo que hemos encontrado en las fusiones realizadas entre VPS-27 o VPS-2 con VMA-1 o RAB-7, lo que sugiere que los PVCs y los MVBs están estrechamente relacionados o incluso que estos pueden tratarse de un mismo organelo, como se ha reportado en la literatura sobre *S. cerevisiae*, donde se menciona que los PVC se pueden madurar y encontrarse en forma de MVBs (Dickinson y Schweizer, 2004).

Para complementar los resultados obtenidos hasta ahora sería de gran ayuda poder contar con inmunomicroscopía electrónica de transmisión que nos permita observar a mejor detalle la morfología de los cuerpos encontrados.

Por otra parte, con base en el modelo propuesto por Bartnicki-García y colaboradores en 1979, donde mencionan que los quitosomas pueden ser originados en los MVBs, en este trabajo se había propuesto que los MVBs pueden jugar un papel en la exocitosis de la CHS-1. Para dilucidar lo anterior se realizó la fusión entre las cepas VPS-2-GFP + CHS-1-mCherry, y se encontró una co-localización parcial de estas proteínas en el lumen de los cuerpos marcados por VPS-2-GFP a partir de la región III de la hifa. Esto sugiere que el modelo de formación de los quitosomas puede ser correcto y efectivamente los quitosomas partan de los MVBs. Sin embargo también existe la posibilidad de que la CHS-1 esté siendo incorporada a los MVBs para su degradación en vacuola. Para dilucidar lo anterior mencionado aun es necesario realizar algunos ensayos de microscopía TIRF que nos permita seguir en paralelo el tráfico de la CHS-1 y de éstas proteínas putativas de los MVBs.

El no poder haber obtenido cepas mutantes $\Delta vps-27$ y $\Delta vps-2$ en estado homocarión, sugieren que ambos genes *vps-2* y *vps-27* son esenciales para *N. crassa*, ya que sus ascosporas germinan, pero éstas no logran desarrollarse, deteniéndose el crecimiento vegetativo, por lo que no se pudo proceder a realizar ensayos de microscopía o caracterización fenotípica. Lo anteriormente mencionado no ha sido reportado en otros organismos; por ejemplo en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se mostró que *sst4/vps27* (Homólogo a Vps27 en *S. cerevisiae*) es requerida para la entrega eficiente de proteínas a la vacuola. Aunque no se encontró diferencia significativa en el tamaño de las vacuolas de las cepas mutantes comparadas con las cepas de tipo silvestre, mediante microscopía electrónica de transmisión se encontró un cúmulo de estructuras

membranas aberrantes. También se reportó una inhibición en la internalización de proteínas de la MP, pero la mutante nula es viable (Iwaki *et al.*, 2007).

En *S. cerevisiae* se mostró el requerimiento de Vps27 para la localización de ESCRT-I en la membrana de los endosomas y la correcta internalización de proteínas en las ILVs (Katzman, 2007; Tran *et al.*, 2009).

Si bien los resultados observados en levadura no pueden extrapolarse en su totalidad a hongos filamentosos, el conocimiento que se tiene hasta ahora en muchos temas de biología celular y molecular se basa en trabajos realizados en levaduras como organismo modelo. Sin embargo el sistema celular de los hongos filamentosos suele ser aún más complejo.

En cuanto a hongos filamentosos, en *A. nidulans* la ausencia de Vps27 ocasiona anormalidades morfológicas tales como el hinchamiento apical, mayor frecuencia de septación y diámetros hifales mayores, en comparación con la cepa de tipo silvestre (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011). En contraste con lo esperado, la elongación de la mutante mostró un aumento en la extensión apical comparado con la cepa silvestre y otras mutantes de Vps de clase E. De manera similar a lo observado en la levadura *S. pombe*, la internalización del marcador lipofílico FM4-64 se vio afectada, impidiendo su tráfico hacia la membrana vacuolar. También se vio afectada la endocitosis y el tráfico de proteínas hacia endosomas y vacuolas, pero la ausencia del gen no derivó en un fenotipo letal (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011).

En el hongo filamentoso *Fusarium graminearum*, el cual es un patógeno importante de plantas se encontró que la eliminación del gen *vps27* resultó en una reducción en la tasa de crecimiento, la endocitosis y la virulencia se vieron afectadas significativamente. Además se observó menor formación de hifas aéreas y conidios, así como la incapacidad de generar peritecios en la reproducción sexual (Xie *et al.*, 2016).

En cuanto a organismos carentes del gen *vps2* la información es más limitada. En *S. pombe* se observaron cambios en la morfología celular, anormalidades en la separación celular después de la citocinesis (Graml *et al.*, 2014; Bhutta *et al.*, 2014).

En hongos filamentosos la información sobre el papel que desempeña Vps2 es aún menor. La mutante nula de *Aspergillus oryzae* se mostró deficiente en conidiación, presentó una morfología

vacuolar anormal y una disminución en el crecimiento vegetativo, pero de igual manera que en los organismos mencionados anteriormente, el gen mostró no ser esencial (Tatsumi *et al.*, 2007).

Vps2 y Vps27 juegan papeles similares en todos estos organismos, pero a la vez los efectos de su ausencia pueden diferir en cada uno de ellos, como por ejemplo el efecto que tiene la eliminación de Vps27 sobre el crecimiento vegetativo en *Fusarium graminearum* y en *Aspergillus nidulans*, lo que responde de cierta manera lo que puede estar ocurriendo en las cepas mutantes de *N. crassa*, sugiriendo que la presencia o ausencia de estos genes es más importante para algunos organismos que para otros.

Aún se requieren experimentos adicionales, tales como la expresión de *vps-2* y *vps-27* bajo un promotor reprimible, que permita la inactivación de los genes y de esta manera poder observar los efectos que tiene su ausencia sobre la localización de otros marcadores, así como sus efectos en la morfología celular.

Capítulo 5. Conclusiones

VPS-27 y VPS-2 se encuentran distribuidas en el citosol a lo largo de la hifa y son reclutadas a la membrana de los endosomas tardíos o compartimentos prevacuolares para llevar a cabo su función en el proceso de formación de las vesículas intraluminales.

La eliminación de los genes *vps-27* y *vps-2* tiene un efecto severo en el desarrollo de las células, lo que sugiere que son esenciales para *Neurospora crassa*.

En la figura 33 se muestra la propuesta de un modelo en el cual se representa la distribución de los MVBs. Aquellos elementos que se encuentran en la membrana plasmática y son endocitados se integran al sistema endosomal, pasando por un proceso de maduración de endosoma temprano a endosoma tardío donde una porción de su membrana limitante invagina dentro de su propio lumen formando vesículas intraluminales, con ayuda de los complejos multiproteicos ESCRT, que se encuentran distribuidos en el citosol de la célula (VPS-27 y VPS-2 se muestran en la figura). Mientras los PVC participan en el tráfico vesicular de Golgi a vacuola, involucrándose en el sistema endosomal/vacuolar, pasando por una etapa de maduración donde actúan como MVBs convergiendo con los LE, para posteriormente degradar su contenido en vacuola.

Los MVBs se encuentran presentes a partir de la región III de la hifa y en regiones distales, viajando de manera anterógrada y asociados a microtúbulos, sin llegar al ápice.

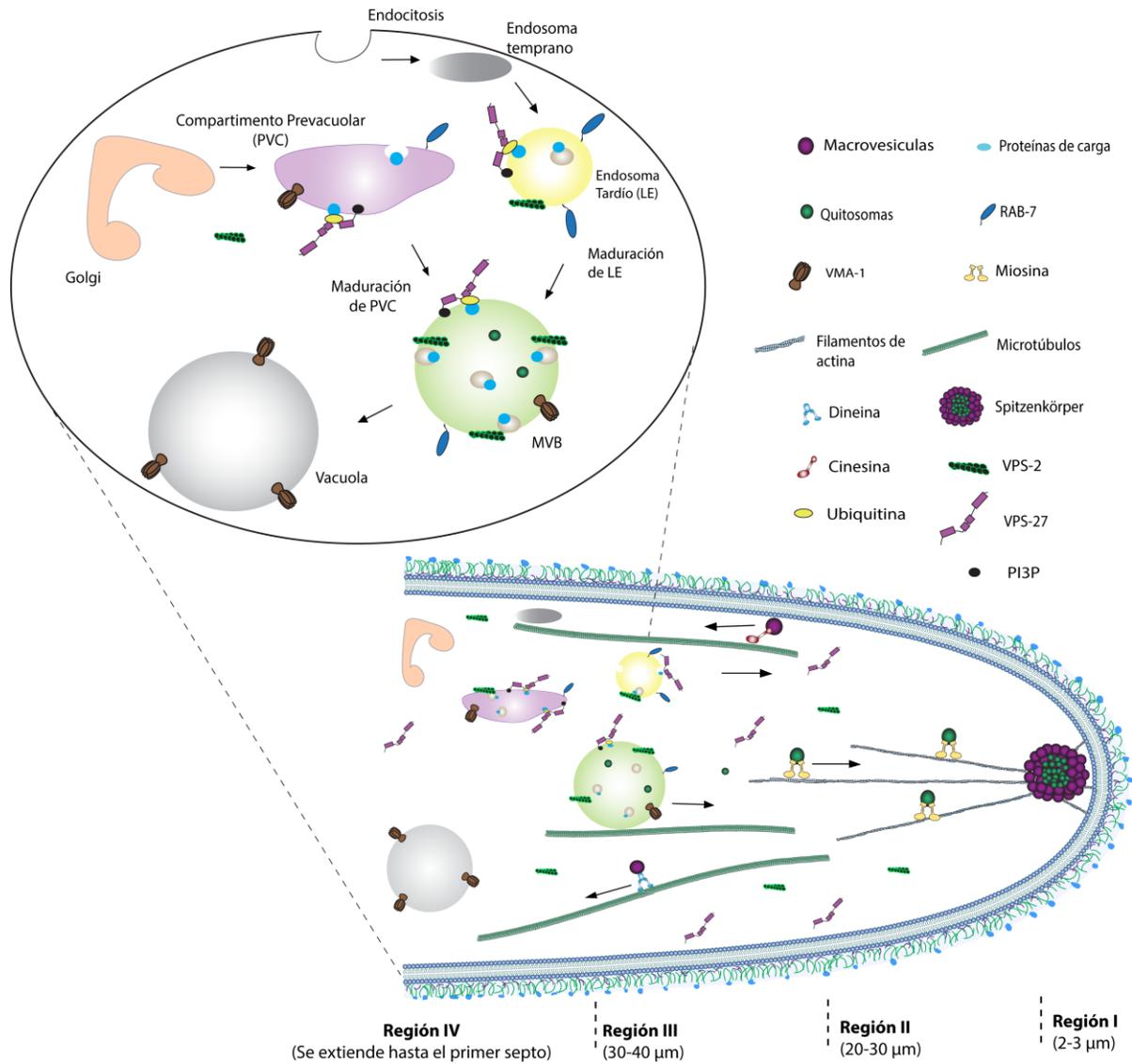


Figura 33. Modelo propuesto de la distribución de los MVBs en hifas de *Neurospora crassa*. Las flechas indican la dirección del transporte de las moléculas.

Literatura citada

- Babst, M., Katzmann, D., Estepa-Sabal, E., Merlo, T., Emr, S. 2002. ESCRT-III: An endosome-associated heteroglimeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell*. 3: 271-282.
- Bartnicki-García, S., Hergert, F. Gierz, G. 1979. Computer simulation of morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153: 46-57.
- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: outstanding questions. En: Osiewacz (ed 2002), H. Molecular Biology of Fungal Development. Marcel Dekker, Inc., New York. 29-58.
- Bowers, K., Stevens, T. 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744:438 – 454.
- Bowman, B.J., Draskovic, M., Schnittker, RR., El-Mellouki, T., Plamann, MD., Sánchez-León E, Riquelme M, Bowman EJ. 2015. Characterization of a novel prevacuolar compartment in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 14:1253-1263.
- Bracker, C. Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S. 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:4570-4574.
- Calcagno-Pizarelli, A., Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., Abenza, J., Peñalva, M., Arst, H. 2011. Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signaling. *Journal of Cell Science*. 124: 4064-4076.
- Choquer, M., Vidal-Cros, A., Boccara, M., Goncalves, I., Soulié, M. 2004. Survey of *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *European Journal of Biochemistry*. 271:2153-2164.
- Dickinson J.R, Schweizer, M., 2004. *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*. 2° edición. Londres, Inglaterra. CRC PRESS.
- Fajardo-Somera, R., Riquelme, M., Bowman, B. 2013. The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 12 (8): 1097-1105.

- Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J., Pobbati, A., Veprintsev, D., Crowther, R., Emr, S., Egelman, E., Williams, R. 2008. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure*. 16:1345-1356.
- Glaser, L., Brown, D. 1957. The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*. 228:729-742.
- Gooday, G. 1995. Cell Walls. En: Gow, N. y Gadd, G. (eds). *The Growing Fungus*. Chapman & Hall, London, 43-59 p.
- Henne, W., Buchkovich, N., Emr, S. 2011. The ESCRT pathway. *Developmental Cell*. 21(1):77-91.
- Hettema, E., Valdez-Taubas, J., Pelham, H. 2004. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *The EMBO Journal*. 23:1279-1288.
- Hislop, J., Marley, A., Von Zastrow, M. 2004. Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. *Journal Biological Chemistry*. 279Ñ22522-22531.
- 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.
- Hurley, J. 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion. Cell Biology*. 20:4-11.
- Hurley, J. y Emr, S. 2006. The ESCRT Complexes: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 35:277-298.
- Hurley, J., Erm, S. 2006. The ESCRT complexes: Structure and mechanism of a membrane trafficking network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 35:277-298.
- Iwaki, T., Onishi, M., Ikeuchi, M., Kita, A., Sugiura, R., Giga-Hama, Y., Fukui, Y., Takegawa, K. 2007. Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 153(8): 2753–2764.
- Katzmann, D., Stefan, C., Babst, M., Emr, S. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal Cell of Biology*. 160(3):413–423.

- Leal-Morales, C., Bracker, C., Bartnicki-García, S. 1988. Localization of chitin synthase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:8516-8520.
- Mandel, M., Orbach M., Kroken, S., Galgiani, J. 2006. *Coccidioides posadassi* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. *Fungal Genetics and Biology*. 43:775-788.
- May, G. y Adams, T. 1997. The importance of fungi to man. *Genome Research*. 7:1041-1044.
- Peñalva, M. 2010. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Current Opinion in Microbiology*. 13(6):684-692.
- Pickart, C. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*. 70:503-533.
- Raymond, C., Howald-Stevenson, I., Vater, C., Stevens, T. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Molecular Biology of the Cell*. 3:1389-1402.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S. 2008. Advances in understanding hyphal morphogenesis: ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews*. 22:56-70.
- Riquelme, M., Roberson, R., McDaniel, D., Bartnicki-Garcia, S. 2002. The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 37:171-179.
- Raiborg, C., Stenmark, H. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458(7237):445-452.
- Sánchez-León, E., Riquelme, M., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R., Bartnicki- García, S. 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*.10:683-695.
- Scheuring, D., Viotti, C., Kruger, F., Kunzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D., Pimpl, P., Schumacher, K. 2011. Multivesicular Bodies Mature from the Trans-Golgi Network/Early Endosome in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 23:3463–3481

- Schmidt, O., Teis, D., 2012. The ESCRT machinery. *Current Biology*. 22(4):116–120.
- Stuchell-Brereton, M., Skalicky, J., Kieffer, C., Karren, M., Ghaffarian, S., Sundquist, W. 2007. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*. 449:740-744.
- Tatsumi, A., Shoji, J., Kikuma, T., Arioka, M., Kitamoto, K. 2007. Aggregation of endosomal-vacuolar compartments in the Aovps24-deleted strain in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362(2): 474–479.
- Tran, J., Chen, Ch., Emr, S., Schekman, R. 2009. Cargo sorting into multivesicular bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (41): 17395–17400.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M., 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*. 74(5):1044-1053.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., Hurley, J. 2009. Membrane Scission by the ESCRT-III Complex. *Nature*. 458(7235):172-7.
- Westergaard, M., Mitchell, H.K., 1947. *Neurospora* V: a synthetic medium favoring sexual production. *American Journal of Botany*. 34: 573–574.
- Xie, Q., Chen, A., Zheng, W., Xu, H., Shang, W., Zheng, H., Zhang, D., Zhou, J., Lu, G., Li, G., Wang, Z. 2016. Endosomal sorting complexes required for transport-0 is essential for fungal development and pathogenicity in *Fusarium graminearum* .*Environmental microbiology*. 00-00.

Anexos

Lista de videos

Video		Página
1	Distribución de VPS-27-GFP.....	34
2	Distribución de VPS-2-GFP	36
3	Distribución de VPS-27-GFP en una hifa tratada con benomilo	40
4	Co-expresión de VPS-2-GFP y VPS-27-mCherry.....	42
5	Co-expresión de VPS-27-GFP y VMA-1-tdimer2.....	44
6	Co-expresión de VPS-27-GFP y RAB-7-tdimer2	45
7	Co-expresión de VPS-2-GFP y VMA-1-tdimer2	46
8	Co-expresión de VPS-2-GFP y RAB-7-tdimer2	47
9	Co-expresión de VPS-2-GFP y CHS-1-mCherry	48