

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



“Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-4 y su papel en el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

Alejandra Irene Hernández Saiz

Ensenada, Baja California, México. Junio 2019



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-4 y su papel en
el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA

ALEJANDRA IRENE HERNÁNDEZ SAIZ

APROBADO POR:

DRA. OLGA ALICIA CALLEJAS NEGRETE

DR. MANUEL ALEJANDRO CARBALLO AMADOR

DR. JULIO VALENCIA SUÁREZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a los profesores que me ayudaron a formarme como profesionista en el área de biología.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar el proyecto 2015-03.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme desarrollar mi proyecto y ser parte de esta institución con gran importancia nacional.

Al laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) por el uso de microscopios.

Al Dr. Julio Valencia y al Dr. Alejandro Carballo, miembros de mi comité, por su apoyo durante la realización de mi tesis.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez por haberme dado la oportunidad de trabajar en el mundo científico cuando más lo necesitaba, en verdad agradezco enormemente esa oportunidad.

A mi directora de tesis la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por haber creído en mí cuando quizá nadie más lo hacía, por todo el tiempo que me ha dedicado, por su paciencia, por cada enseñanza, por demostrarme que, si se puede a pesar de los obstáculos, que solo se necesita perseverancia y paciencia, muchas gracias por todo su apoyo en verdad no tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, prometo seguir esforzándome.

A Luis Bojórquez por darme la oportunidad de ayudarlo en su proyecto y por todo lo que aprendí, a Fausto por sus enseñanzas, tiempo y las canciones que cantaba en el laboratorio, a Arianne por brindarme su tiempo y ayuda, he aprendido mucho de ti, a Marisela por su apoyo, enseñanzas y su gran energía.

También a Adriana y Enrique por toda su ayuda, en verdad aprendí muchísimo de ustedes. Noraida y Rocío por nuestras pláticas tan amenas, a Yesenia por escucharme y hacer mis días más agradables, a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio de microbiología.

A Diego y Rosita por su aportación a mi conocimiento.

A la familia Zavala Tapia por abrirme las puertas de su hogar, por todo el apoyo, el cariño y los momentos que he vivido con ustedes.

A mis hermosos gatitos Merlina, Mandy y Casim que me han llenado de tanto amor y me han acompañado hasta en los momentos más difíciles, siento a veces no poder estar todo el tiempo a su lado, los adoro.

A mi mamá y a mi papá por apoyarme tanto, por todo su amor, sus consejos, su tiempo, su esfuerzo, por formarme como persona, por creer en mí y por todo, nunca acabare de agradecerles todo lo que han hecho por mí, son mi ejemplo a seguir, los quiero muchísimo.

A mis hermanos Moisés y Erubiel por darme tan buenos momentos, aunque a veces me hagan enojar los quiero muchísimo, nunca dejarán de ser mis pequeños hermanos.

A mi querido y adorado Fernando por todo su amor, paciencia, apoyo, por demasiados momentos tan lindos, estoy enormemente agradecida por estar con una persona como tú, gracias por haberme apoyado durante todo este transcurso, solo tú conoces bien cuanto he pasado en este tiempo. Te adoro.

A Dios por siempre estar.

DEDICATORIA

A mis padres

Resumen de la tesis de Alejandra Irene Hernández Saiz presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México, Junio 2019.

Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-4 y su papel en el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:



DRA. OLGA ALICIA CALLEJAS NEGRETE

Director de tesis

I. RESUMEN

Las flipasas de fosfolípidos son proteínas transmembranales conservadas entre los organismos eucariotas; estas translocan poblaciones específicas de fosfolípidos de la cara luminal hacia la cara citosólica y han sido asociadas con la señalización de apoptosis, ordenamiento de proteínas, tráfico vesicular y secreción. El gen *dnf-4* de *Neurospora crassa* tiene una alta identidad con el gen *neo-1* de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es un gen esencial en la levadura de gemación y pertenece a una subfamilia altamente conservada de genes ATPasas tipo-P que codifican las flipasas de fosfolípidos. Con la finalidad de entender la dinámica celular y función de DNF-4 en *N. crassa*, se etiquetó esta proteína con la proteína verde fluorescente (sGFP) y se analizaron hifas mediante microscopia confocal, por otra parte, se caracterizó la mutante por delección $\Delta dnf-4$. DNF-4-sGFP se observó cómo partículas brillantes fluorescentes, aparentemente alrededor del retículo endoplasmático y complejo de Golgi, co-localizando parcialmente con marcadores de estos compartimentos. Las partículas fluorescentes se mueven en dirección

anterógrado y retrogrado; algunos de ellos con el flujo citoplasmático, pero otros se mueven a velocidades más altas, probablemente conducidos por proteínas motoras asociadas a los microtúbulos, como se pudo observar en experimentos con drogas anti-microtúbulos (Benomilo). Adicionalmente se observó estructuras parecidas a vacuolas que contienen pequeños compartimentos membranosos moviéndose hacia la punta de la hifa. En la mutante *Δdnf-4* se observó una disminución en la tasa de crecimiento del 41%, un 30% en producción de biomasa y 76% en producción de conidios ($p < 0.05$) con respecto a la cepa WT. Además, la tasa de ramificación fue tres veces más alta en la mutante *Δdnf-4* comparado con la WT. El análisis de hifas maduras de la mutante, mostraron una morfología distorsionada, con sitios abultados y un Spitzenkörper pequeño y menos estable. La mutación del gen *dnf-4* en *N. crassa* no es esencial pero afecta la tasa de crecimiento, incrementa la frecuencia de ramificación y reduce la producción de conidios.

II. ABSTRACT

Phospholipid flippases are transmembrane proteins that translocate specific population of phospholipids from the luminal to the cytosolic leaflet of the plasma membrane and have been associated with apoptosis signaling, protein sorting, vesicular traffic, and secretion. The *dnf-4* gene of *Neurospora crassa* has high identity with the *neo-1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* that is essential and belongs to a highly conserved subfamily of P-type ATPase. To understand the cellular dynamics and functions of DNF-4 in *N. crassa*, we used live-cell imaging methods to record and analyze growing hyphae after labeling these proteins with sGFP and also examined the deletion mutant *Δdnf-4*. DNF-4-sGFP was present as bright particles, apparently surrounding the endoplasmic reticulum and the Golgi, co-localizing partially with markers from these compartments. The fluorescent spots moved in anterograde and retrograde fashion; some of them with the cytoplasmic bulk flow, but some others moved at

a higher speed, probably driven by motors associated to microtubules, as was shown with the anti-microtubule drug (benomyl) experiments. Additionally, we observed vacuole-like structures, containing smaller membranous compartments moving towards the hyphal tip. The $\Delta dnf-4$ mutant had a decrease of 41% in the elongation rate, 30% in biomass production and 76% in conidia production ($p < 0.05$). Branching rate was three-fold higher in the $\Delta dnf-4$ mutant ($p < 0.05$). Mature hyphae showed a small and unstable Spitzenkörper. Hyphal morphology was affected, presenting a meandering profile. The mutation *dnf-4* gene in *N. crassa* is not essential but strongly affects the growth rate, increase the frequency of branching and reduce significantly conidial production.

Key words: Phospholipid flippases, DNF-4, endoplasmic reticulum, endosomes, Golgi, *N. crassa*.

ÍNDICE DEL TRABAJO

I.	RESUMEN	6
II.	ABSTRACT	7
III.	LISTA DE FIGURAS	12
IV.	LISTA DE TABLAS	15
V.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
VI.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	18
1.	Hongos filamentosos.....	18
2.	Características de los hongos filamentosos	18
3.	<i>Neurospora crassa</i> como organismo modelo	19
4.	Crecimiento polarizado.....	20
5.	Spitzenkörper	21
6.	Secreción de proteínas durante la morfogénesis de la hifa	21
7.	Fosfolípidos.....	22
8.	Distribución de los fosfolípidos	25
9.	Antecedentes de las flipasas.....	26
10.	Flipasas en hongos	28
VII.	JUSTIFICACIÓN	32
VIII.	HIPÓTESIS.....	33
IX.	OBJETIVOS.....	34
	OBJETIVO GENERAL	34
	OBJETIVOS ESPECIFICOS	34
X.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
1.	Organismos y medios de cultivo.....	35

2.	Diseño de oligonucleótidos para el marcaje endógeno de DNF-4 con la proteína verde fluorescente (sGFP)	35
3.	Extracción de ADN genómico de <i>N. crassa</i>	37
4.	Construcción de cassettes para marcaje endógeno	38
4.1	PCR del cassette <i>sgfp-hph</i>	38
4.2	PCR de los fragmentos 5' y 3' del gen <i>dnf-4</i>	39
4.3	PCR de fusión de los fragmentos 5' y 3' del gen <i>dnf-4</i> con <i>sgfp-hph</i>	39
4.4	Purificación de los productos de PCR	41
5.	Transformación de <i>N. crassa</i> por electroporación	43
6.	Microscopia y análisis de imágenes	43
7.	Ensayos de co-expresión de DNF-4 con CSE-7 y YPT-1	44
8.	Tinción con FM4-64	44
9.	Ensayos de despolimerización de F-actina y microtúbulos.....	45
10.	Experimentos tipo FRAP	45
11.	Caracterización morfológica de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y la cepa tipo silvestre (WT).....	46
11.1	Cuantificación de la tasa de crecimiento	46
11.2	Morfología de colonia y borde de la colonia.....	46
11.3	Tasa de elongación	47
11.4	Tasa de ramificación	47
11.5	Cuantificación de producción de conidios.....	48
11.6	Determinación de biomasa.....	48
11.7	Hifas aéreas	49
XI.	RESULTADOS.....	50
1.	Análisis bioinformático.....	50
2.	Localización de DNF-4.....	57

2.1 Localización de DNF-4 en hifas maduras de <i>N. crassa</i>	57
3. Co-expresión de DNF-4-sGFP con CSE-7-mChFP y YPT-1	64
4. Fenotipo de la mutante por eliminación del gen <i>dnf-4</i>	68
4.1 Crecimiento vegetativo en la mutante $\Delta dnf-4$	68
4.1.1 Morfología de las colonias de la mutante $\Delta dnf-4$	68
4.1.2 Caracterización morfológica de hifas de la cepa mutante $\Delta dnf-4$	72
4.1.3 Morfología y producción de conidios en la mutante $\Delta dnf-4$	75
4.1.4 Comportamiento del Spitzenkörper en la mutante $\Delta dnf-4$	77
XII. DISCUSIONES	79
1. Comparación de los dominios de flipasas en <i>N. crassa</i>	79
2. Localización y dinámica de DNF-4-sGFP	80
3. Efecto de la ausencia del gen <i>dnf-4</i> en <i>N. crassa</i>	82
4. Reproducción asexual en la mutante <i>dnf-4</i>	84
XIII. CONCLUSION	86
XIV. BIBLIOGRAFÍA	87
XV. APÉNDICE	100
Apéndice 1. Medios de cultivo y soluciones	100

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de las proteínas que intervienen en el sistema de asimetría de membrana.	24
Figura 2	Diagrama de la estructura de las flipasas de <i>S. cerevisiae</i> .	28
Figura 3	PCR de fusión para el marcaje endógeno de proteínas en el hongo filamentoso <i>N. crassa</i> .	42
Figura 4	Dominios de las proteínas DNF-4, DNF-1, DNF-2 de <i>N. crassa</i> y los homólogos de DNF-4 en <i>A. nidulans</i> (DnfD) y <i>S. cerevisiae</i> (Neo1).	54
Figura 5	Análisis de la secuencia DKTGTLT.	55
Figura 6	Modelo estructural de la proteína DNF-4.	56
Figura 7	Serie de tiempos de la localización y dinámica de DNF-4-sGFP en hifas maduras en <i>N. crassa</i> .	58
Figura 8	Microscopia confocal Spinning Disk de las estructuras membranosas presentes en la región distal de hifas maduras conteniendo DNF-4-sGFP de <i>N. crassa</i> .	59

Figura 9	Dinámica de DNF-4-sGFP. (A) Movimiento retrógrado de la proteína DNF-4-sGFP.	61
Figura 10	Análisis de TIRF de partículas fluorescentes de DNF-4-sGFP.	62
Figura 11	Foto blanqueamiento de la región apical de hifas maduras de <i>N. crassa</i> conteniendo DNF-4-sGFP.	63
Figura 12	Imagen confocal de hifas maduras conteniendo DNF-4-sGFP tratadas con Benomilo y Latrunculina.	64
Figura 13	Localización de DNF-4-sGFP en el RE.	66
Figura 14	Localización de DNF-4-sGFP.	67
Figura 15	Morfología macroscópica de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT.	70
Figura 16	Caracterización de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT.	71
Figura 17	Morfología macroscópica y microscópica de las colonias de la cepa WT y la mutante $\Delta dnf-4$.	73
Figura 18	Frecuencia del número de ramificaciones producidas por la cepa la mutante $\Delta dnf-4$ y WT.	74

Figura 19	Conidios de la cepa mutante $\Delta dnf-4$.	76
Figura 20	Producción de conidios en la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT.	77
Figura 21	Serie de tiempo del comportamiento del Spk teñido con FM4-64 en hifas maduras de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT.	78

IV. LISTA DE TABLAS

Tabla I	Organismos utilizados en el estudio.	36
Tabla II	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	37
Tabla III	Porcentaje de identidad de DNF-4 de <i>N. crassa</i> con sus diferentes homólogos y ortólogos.	51

V. LISTA DE ABREVIATURAS

mChFP	Monomeric Cherry Fluorescent Protein
UTR	Untranslated Region
ORF	Open Reading Frame
sGFP	Superfolder Green Fluorescence Protein
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
CSE-7	Chitin Synthase Export chaperone 7
YPT-1	Yeast Protein Two 1
aa	Amino ácidos
TIRF	Total internal reflection fluorescence microscope
DIC	Differential Interference Contrast
°C	Grados Centígrados
h	Hora
s	Segundo
min	Minutos
Dnf1p	Drs2 Neo1 Family 1 protein
Dnf2p	Drs2 Neo1 Family 2 protein
Dnf3p	Drs2 Neo1 Family 3 protein
DNF4	Drs2 Neo1 Family 4 protein
Drs2p	Deficiency of Ribosomal Subunits
Neo1p	Neomycin- resistance 1
DnfA	Drs2 Neo1 Family A
DnfB	Drs2 Neo1 Family B
DnfC	Drs2 Neo1 Family C
DnfD	Drs2 Neo1 Family D
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Spk	Spitzenkörper
RE	Retículo endoplasmático
MP	Membrana Plasmática
Chol	Colesterol
GL	Glicolípidos
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
SM	Esfingomielina
PIPn	Fosfoinosítidos
PG	fosfatidilglicerol
CL	Cardiolipina
ATP	Ádenosín trifosfato
Ca²⁺	Ion Calcio
CDC50	Cell division control protein 50
Atp8b1	ATPase phospholipid transporting 8B1
SERCA 1	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
TGN	Trans-Golgi Network
COPI	Coat complex protein I
COPII	Coat complex protein II

MMV	Medio Mínimo de Vogel
his	Histidina
hph	Higromycin Phosphotransferase
Kb	Kilobase
<i>mat A</i>	Mating type A
<i>mat a</i>	Mating type a
PCR	Polymerase Chain Reaction
μL	Microlitros
mM	Milimolar
μM	Micromolar
M	Molaridad
DMSO	Dimethyl sulfoxide/ Dimetilsulfóxido
dNTP's	Deoxinucleósido trifosfato
pb	Pares de bases
7xgly	7 glicinas
rpm	Revoluciones por minuto
μF	Microfaradio
kV	Kilovoltio
mg	Miligramos
mL	Militros
nm	Nanómetro
μm	Micrómetro
Lat B	Latrunculina B
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
WT	Wild Type
mm	Milímetros
g	Gramos
cm	Centímetros
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
μg	Microgramo
ATP9A	ATPase phospholipid transporting 9A
TAT-5	Transbilayer Amphipath Transporter 5
ZnSO₄ · 7H₂O	Sulfato de Zinc heptahidratado
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O	Amonio y hierro(II) sulfato hexahidrato
CuSO₄ · 5H₂O	Sulfato de cobre (II) pentahidratado
Na₂MoO₄ · 2H₂O	Molibdato de sodio dihidratado
MnSO₄ · H₂O	Sulfato de manganeso II monohidrato
(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O	Heptamolibdato de Amonio, Tetrahidrato
KH₂PO₄	Dihidrógeno fosfato de potasio
NH₄NO₃	Nitrato de amonio
MgSO · 7H₂O	Sulfato de Magnesio heptahidratado
TAE	Tris, Acetato y EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
pH	Potencial de Hidrógeno

VI. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, existiendo como saprófitos y parásitos. Los saprófitos obtienen nutrientes a partir de la materia orgánica en descomposición, mientras que los parásitos secuestran nutrientes de un hospedero vivo. Hay hongos que pueden ser patógenos de animales y/o de plantas, según la especie, teniendo graves repercusiones en los sectores de salud, ganadería y agricultura. La mayoría de los hongos filamentosos que causan enfermedades en el ser humano son de tipo oportunistas, por lo que requieren que se cumplan condiciones específicas para poder desarrollar la patogenia en el hospedero (Pontón y col., 2000; Walsh y col., 2004). Por otra parte, los hongos filamentosos son una fuente importante de enzimas de interés industrial, gracias a su capacidad para secretar grandes cantidades de proteínas (Powers y col., 2016; Wainwright, 1992).

2. Características de los hongos filamentosos

Se ha clasificado a los hongos en unicelulares y multicelulares. Cabe mencionar que los hongos pueden asumir múltiples morfologías, basadas en el modo de división y crecimiento celular. Estas pueden ser levaduriforme, filamentosa o una combinación de estas, es decir, dimórfico (Alexopoulos y col., 1996). En el caso de las levaduras, la división ocurre por gemación o fisión y su

crecimiento suele ser isotrópico, mientras que los hongos filamentosos tienen una citocinesis incompleta y crecen por extensión apical de sus filamentos, conocidos como hifas. El crecimiento proveniente de las hifas puede ocurrir con o sin separación de la pared celular, a esto se le conoce como septación. Cuando el crecimiento es continuo da lugar a una gran red de hifas llamadas micelio (Alexopoulos y col., 1996; Powers-Fletcher y col., 2016).

3. *Neurospora crassa* como organismo modelo

Neurospora crassa es un organismo central en la historia de la genética, bioquímica y biología molecular del siglo XX (Galagan y col., 2003). Las investigaciones sobre este organismo en la primera parte del siglo XX fueron esenciales para la genética moderna y la biología molecular. Documentado por primera vez en 1843 como contaminante de panaderías en París, este organismo se desarrolló como un organismo experimental en la década de 1920. El trabajo posterior sobre *Neurospora* por Beadle y Tatum en la década de 1940 estableció la relación entre los genes y las proteínas, que se resume en la hipótesis de "un gen, una enzima" (Beadle y Tatum, 1941.). En la segunda mitad del siglo, *Neurospora* tuvo un papel central como organismo modelo, contribuyendo a la comprensión fundamental de los sistemas de defensa del genoma, la metilación del ADN, la importación de proteínas mitocondriales, el ritmo circadiano, el silenciamiento génico postranscripcional y la reparación del ADN (Davis, 2000). Debido a que *Neurospora* es un hongo filamentoso

multicelular, también ha proporcionado un sistema para estudiar la diferenciación y el desarrollo celular, así como otros aspectos de la biología eucariótica (Galagan y col., 2003), ofreciendo un gran potencial para un continuo descubrimiento.

4. Crecimiento polarizado

El crecimiento polarizado apical de los hongos filamentosos fue identificado hace más de medio siglo, siendo una de sus características principales (Trinci y col., 1994). También podemos encontrar esta forma en algunas algas, musgos, células de raíz en plantas, células neuronales y tubos de polen (Heath, 1990) . Las levaduras en gemación han sido un modelo muy útil para investigar el crecimiento polarizado y sus determinantes. Sin embargo, no es el hongo modelo ideal para entender el crecimiento de punta polarizada ya que las levaduras son unicelulares y se dividen asexualmente por gemación o fisión (Bartnicki, 1968; Herskowitz, 1988)(S Bartnicki-Garcia, 1968). La forma de la hifa está determinada por el ensamblaje de la pared celular, este proceso polarizado tiene lugar en la punta. Las paredes celulares de los hongos están compuestas principalmente por polisacáridos y glicoproteínas. Evidencias sugieren que las glicoproteínas de la matriz son sintetizadas a través de la ruta secretora, se transportan en vesículas secretoras y se incorporan a la pared celular por exocitosis (Bartnicki, 1968; Hunsley & Burnett, 1970).

5. Spitzenkörper

El Spitzenkörper (Spk) es una estructura altamente dinámica y pleomórfica que desempeña un papel central en el crecimiento apical y determina la morfogénesis de la hifa (Bartnicki y col.,1995). La composición del Spk corresponde a una acumulación densa de vesículas de diferentes tamaños, ribosomas, microtúbulos, actina y un material amorfo o granular de naturaleza indefinida (Bourett & Howard, 1991; Girbardt, 1969; Grove & Bracker, 1970; Howard, 1980, 1981; Roberson & Vargas, 1994). Una función atribuida al Spk es la concentración de vesículas secretoras antes de que se administren a la membrana plasmática, a la cual se fusionan para producir nueva superficie de la pared celular. Se ha sugerido que el Spk funciona como centro organizador de microtúbulos, ya que se ha observado nucleación de estos en el ápice de las hifas y se han encontrado microtúbulos cerca del Spk (Bartnicky, 1990; Mouriño y col., 2006; Uchida y col., 2010). Los microtúbulos son esenciales en la maquinaria de crecimiento de la punta que permite una elongación rápida y continua (Horio, 2007).

6. Secreción de proteínas durante la morfogénesis de la hifa

Las proteínas secretoras comienzan su viaje hacia el medio extracelular ingresando al retículo endoplasmático (RE). En este sitio las proteínas se pliegan y pueden someterse a modificaciones, como la glicosilación, formación de puentes disulfuro, fosforilación y ensamblaje de subunidades.

Posteriormente, las proteínas salen del RE empacadas en vesículas de transporte y se dirigen al compartimiento de Golgi, donde pueden tener modificaciones adicionales. Para finalizar, nuevamente empacadas en vesículas secretoras, las proteínas se dirigen a la membrana plasmática donde serán secretadas. Se ha observado que, en algunos casos las proteínas no llegarán al espacio extracelular, pero están dirigidas a los compartimentos intracelulares como la vacuola, ya sea para convertirse en proteínas residentes o para someterse a degradación proteolítica (Conesa y col., 2001).

7. Fosfolípidos

Las células eucariotas se compartimentan en distintos orgánulos mediante bicapas lipídicas. Estas membranas están compuestas de fosfolípidos que se encuentran dispuestos asimétricamente entre las dos capas de la membrana plasmática. Anteriormente se pensó que era una característica estática de las membranas (Bretscher, 1972; Pomorski, 2004). Sin embargo, la topología lipídica es el resultado del movimiento continuo bidireccional de los lípidos entre las dos capas, llamado 'flip-flop', donde las proteínas de membrana tienen un papel fundamental (**Figura 1**) (Pomorski y col, 2004). Para producir esta asimetría en la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, existen proteínas involucradas en el movimiento de estos, como son las flipasas que mueven los fosfolípidos de la capa externa a la capa interna de la membrana, las flopasas que son responsables del movimiento opuesto y las

escramblasas que son capaces de llevar a cabo ambas clases de movimientos
(Figura 1) (Pomorski y col., 2004).

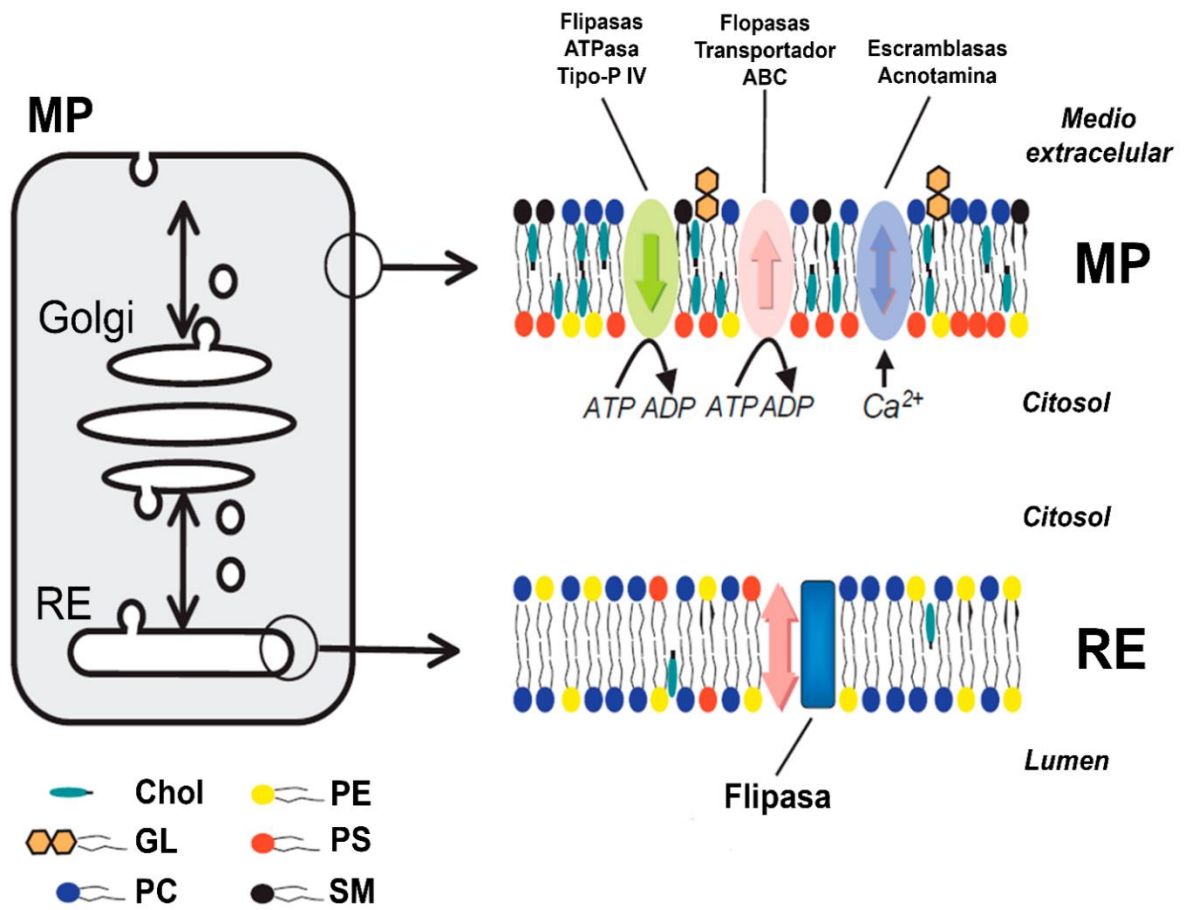


Figura 1. Diagrama de las proteínas que intervienen en el sistema de asimetría de membrana. Las siglas corresponden: Membrana plasmática (MP), Retículo endoplásmico (RE), Colesterol (Chol), Glicolípidos (GL), Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilserina (PS), Esfingomielina (SM) (Pomoski y col., 2004).

8. Distribución de los fosfolípidos

Se han identificado varias 'flipasas lipídicas' (Pomorski y col., 2004). En células eucariotas, la superficie esta enriquecida en fosfolípidos aniónicos que contienen aminos primarias (fosfoinositidos (PIPn), ácido 2 fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS)), mientras que en la cara extracitoplasmática y la superficie del lumen topológicamente equivalente de orgánulos internos están enriquecidos en fosfolípidos que contienen colina (fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina) y glicoesfingolípidos (Op den Kamp, 1979). En las células procariotas, la PE es enriquecida en la capa citoplásmica de la membrana plasmática, el fosfatidilglicerol (PG) se localiza predominantemente en la capa externa, y la cardiolipina (CL) tiene una distribución asimétrica de transbicapa (Op den Kamp, 1979).

El origen de la asimetría de los lípidos proviene principalmente de la biosíntesis vectorial (Daleke, 2007). La mayoría de los glicerofosfolípidos eucarióticos se sintetizan en la cara citoplasmática del RE, mientras que los esfingolípidos son sintetizados o modificados en la superficie del lumen del RE y del complejo de Golgi. Para mantener el equilibrio de la bicapa, algunos lípidos recién sintetizados deben atravesar el lado de la membrana opuesto al sitio de síntesis. Una vez sintetizados, los lípidos también deben moverse a otras membranas dentro de la célula, que ocurre principalmente mediante un proceso vesicular (Vance & Vance, 2004; Daleke, 2007).

9. Antecedentes de las flipasas

La primera evidencia de una flipasa dependiente de ATP en la membrana plasmática fue reportada en eritrocitos humanos (Seigneuret y Devauxt, 1984). La actividad de las flipasas requiere ATP (Daleke & Huestis, 1985; Seigneuret & Devauxt, 1984), es sensible al Ca^{2+} (Bitbol y col., 1987; Daleke & Huestis, 1985), además, muestran un alto grado de selectividad para la PS (Daleke & Huestis, 1985; Op den Kamp, 1979; Schroit & Zwaal, 1991) .

El descubrimiento de la actividad de la flipasa en gránulos de cromafines suprarrenales bovinos condujo a la purificación y clonación de la ATPasa II bovina (Zachowski y col., 1989). Se encontró que esta enzima era homóloga a proteínas de la superfamilia tipo-P ATPasa y estrechamente homóloga a Drs2p, una ATPasa de levadura que se ha asociado con el ensamblaje ribosómico (Marx y col., 1998; Siegmund y col., 1998).

Como se mencionó anteriormente, las flipasas son proteínas transmembranales clasificadas dentro de la superfamilia de proteínas ATPasas tipo-P, subclase IV (Tang y col., 1996). Esta familia (P4-ATPasas) son el mayor subgrupo de ATPasas tipo P que se encuentran en células eucarióticas, con cinco miembros en *Saccharomyces cerevisiae*, seis miembros en *Caenorhabditis elegans*, doce miembros en *Arabidopsis thaliani* y catorce miembros en humanos (Axelsen & Palmgren, 1998; Muthusamy y col., 2009). Además, la mayoría de las P4-ATPasas requieren interacción con una subunidad no catalítica de la familia de genes *cdc50* para su transporte fuera

del RE. La deficiencia de una P4-ATPasa (Atp8b1) causa enfermedades hepáticas en humanos, y estudios en una variedad de sistemas modelo indican que esta familia juega papeles diversos y esenciales en la biogénesis de la membrana, más allá de su papel para establecer y mantener la asimetría de la membrana plasmática (Paulusma & Oude Elferink, 2005). Las P4-ATPasas están relacionadas con el transporte de proteínas mediada por vesículas en las vías exocíticas y endocíticas. Como la mayoría de ATPasas tipo-P, las P4-ATPasas suelen contener 10 segmentos transmembranales con los extremos N-terminal y C-terminal frente al citosol. Por analogía la estructura cristalizada del Ca^{2+} ATPasa (SERCA 1), el N- terminal queda en la cara citosólica, donde el bucle entre los segmentos transmembranales 2 y 3 forman el dominio actuador y el bucle citosólico entre los segmentos de membrana 4 y 5 forman el sitio de fosforilación y el dominio de unión al nucleótido (**Figura 2**) (Kühlbrandt, 2004; Toyoshima & Mizutani, 2004; Muthusamy y col., 2009)

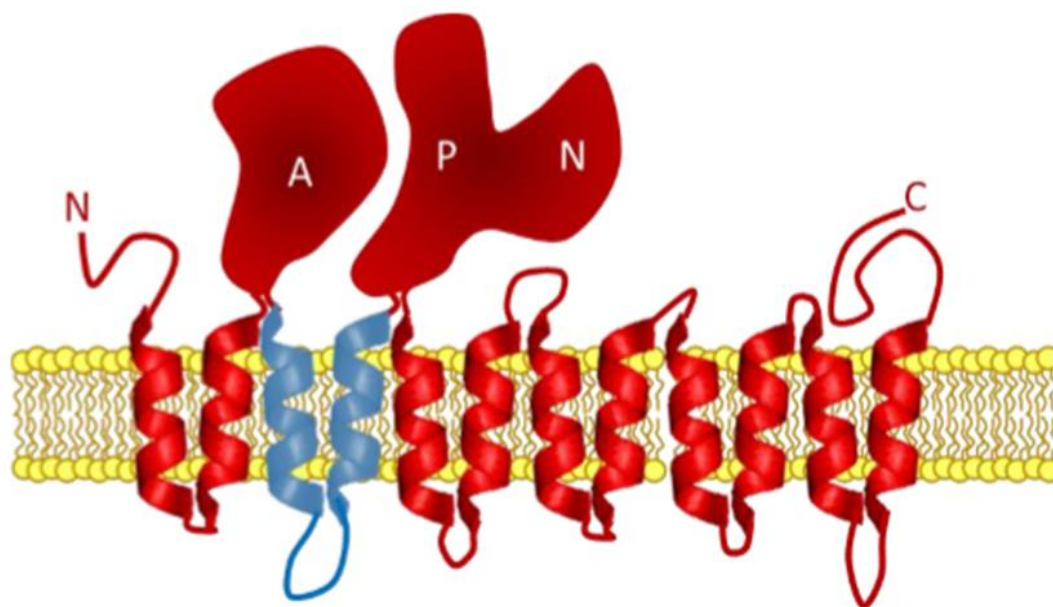


Figura 2. Diagrama de la estructura de las flipasas de *S. cerevisiae* (A: dominio actuador, P: dominio de fosforilación, N: dominio de unión a nucleótido) (Tomado de Murillo-Corona, 2017, Modificado de Baldrige R., 2012; Roland y col., 2016).

10. Flipasas en hongos

Se han descrito cinco flipasas en *S. cerevisiae*: Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3 y Neo1p las cuales se encuentran distribuidas de distinta manera en la célula (Hua y col., 2002). Drs2p se localiza en Golgi tardío y endosomas tempranos sugiriendo que esta proteína forma parte de la ruta secretora (Hua y col., 2002; Ripmaster y col., 1993). En el caso de Dnf1p se ha reportado que se encuentra distribuida en las membranas internas y en la membrana plasmática, observándose mayor concentración en el sitio de gemación emergente, el cual es muy similar a la localización de los parches de actina cortical (Hua y col.,

2002; Pomorski, 2004). Esto sugiere que Dnf1p se concentra en vesículas exocíticas dirigidas a sitios de crecimiento polarizado (Hua y col., 2002; Pomorski y col., 2004). Dnf2p se encuentra en forma de pequeñas estructuras puntiformes localizadas debajo de la membrana plasmática, sin mostrar una distribución polarizada como en el caso de Dnf1p, indicando que Dnf2p se asocia a vesículas endocíticas o a invaginaciones de la membrana plasmática (Hua y col., 2002; Pomorski y col., 2004). Dnf3p es una proteína que se encuentra dispuesta en estructuras puntiformes distribuidas uniformemente por toda la célula, con una mayor superposición con el marcador de TGN (Trans-Golgi Network) Kex2p, que se asemeja al patrón de localización de Drs2 (Hua y col., 2002).

Se ha estudiado que tanto por inmunolocalización cómo por marcaje con proteínas fluorescentes, que Neo1p se encuentra en forma de estructuras puntiformes localizadas en la ruta secretora temprana, la cual corresponde a retículo endoplasmático y Golgi temprano (Hua & Graham, 2003; Wicky y col., 2004; Barbosa y col., 2010). Por otra parte, se ha reportado que las P4-ATPasas se requieren para la viabilidad de *S. cerevisiae* y que *neo1* es el único gen esencial en esta familia (Prezant y col., 1996; Hua y col., 2002). La mutante condicional sensible a temperatura *neo1-ts*, mostró defectos pleiomórficos en las rutas secretoras y endocíticas, que incluyen vacuolas fragmentadas, defectos en el transporte de proteínas dependientes de COPI (implicadas en el transporte de carga a través de Golgi y en el transporte retrógrado al RE de

aquellos componentes que necesitan ser reciclados o recuperados [Sönnichsen y col., 1998]), defectos en el transporte de proteínas dependientes de GGA/clatrina desde el RE hasta el endosoma tardío, y la exposición de PS y PE en la lámina externa de la membrana plasmática. Las reacciones de glicosilación también se ven perturbadas en células *neo1-ts*, dando lugar a defectos en la pared celular (Wu y col., 2016).

En el caso del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* se han identificado cuatro genes flipasas de fosfolípidos: *dnfA*, *dnfB*, *dnfC* y *dnfD*. Mediante marcaje con proteínas fluorescentes se observó que tanto DnfA como DnfB se encuentran segregadas dentro del Spk y membrana plasmática, con DnfA concentrada en el exterior del Spk y DnfB en el núcleo, indicando que estas proteínas se encuentran presentes en diferentes poblaciones de vesículas (DnfA en macrovesículas, DnfB en microvesículas) (Schultzhaus y col., 2015). Por otra parte, la interrupción de la función de ambos genes no causa letalidad, pero si produce defectos en el crecimiento y en la producción de conidios (Schultzhaus y col., 2015). En el caso de la delección del gen *dnfC* no produce defectos en el fenotipo de la cepa, además, de no observarse la presencia de señal en clones conteniendo DnfC::GFP (Schultzhaus y col., 2019). DnfD ortólogo de Neo1p, se encuentra distribuido en el citoplasma en forma de estructuras irregulares en la región distal y subapical de hifas, lo que corresponde a equivalentes de Golgi tardío, sugiriendo que DnfD participa en la ruta secretora. La interrupción de la función de esta proteína no exhibió un

defecto en el crecimiento de las hifas, pero, genera una disminución evidente en la producción de conidios (Schultzhaus y col., 2019).

11. Antecedentes directos

En previos trabajos realizados en nuestro laboratorio, se llevó a cabo el análisis de la dinámica de la proteína DNF-2-sGFP en *N. crassa*, donde se observó que dicha proteína se localiza en el núcleo del Spk, similar a la localización de la quitina sintasa, además de observarse algunos puntos difusos en el citoplasma que se transportan de manera anterógrada desde regiones distales al subápice (Murillo-Corona, 2017). La delección de los genes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ mostró defectos significativos en el crecimiento y en la producción de conidios, siendo más evidente el defecto en la mutante $\Delta dnf-1$. Ambas mutantes ($\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$) mostraron un patrón errático en la direccionalidad del Spk provocando que las hifas crecieran de forma abultada (Murillo-Corona, 2017). Existe la posibilidad de que los fenotipos deficientes presentes en las mutantes de las flipasas, sean consecuencia de la pérdida en la asimetría de los fosfolípidos tanto de la membrana plasmática, así como en la membrana de organelos. Sin embargo, hace falta información sobre estas proteínas, su localización y sus efectos en el crecimiento de hongos filamentosos, para determinar su importancia en el crecimiento polarizado.

VII. JUSTIFICACIÓN

La composición de fosfolípidos típicamente distinta entre la bicapa lipídica, se genera y mantiene mediante el transporte bidireccional (flip-flop) de lípidos (Pomorski y col., 2004). Las flipasas son proteínas responsables del movimiento de los fosfolípidos para crear asimetría entre las capas de las diferentes membranas celulares, cuyo propósito es establecer señales para las diferentes cargas y destinos de las vesículas que son secretadas o endocitadas en las células. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, hay evidencia de que las flipasas están implicadas en el crecimiento polarizado durante el proceso de gemación, así como, en la generación y clasificación de vesículas en el tráfico vesicular (Hua y col., 2002; Saito y col., 2007; Sartorel y col., 2014; Hankins y col., 2015). En el hongo filamentoso *A. nidulans* se ha encontrado que cada flipasa pertenece a distintas poblaciones de vesículas, además de observarse en equivalentes de Golgi tardío (Schultzhaus y col., 2015, Schultzhaus y col., 2019). Sin embargo, no se ha podido establecer cuál es el papel que estas proteínas tienen en el tráfico de membranas y su impacto en el crecimiento polarizado y organización celular de hongos filamentosos, es por esto que en este trabajo estamos interesados en estudiar a DNF-4 de *N. crassa*.

VIII. HIPÓTESIS

La flipasa DNF-4 de *Neurospora crassa* se encuentra localizada en el retículo endoplasmático y complejo de Golgi. La delección del gen causará defectos en el crecimiento polarizado de este hongo.

IX. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar y evaluar la dinámica de la flipas de fosfolípidos DNF-4 y su papel en el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la localización y dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-4.
- Determinar el efecto de la mutación por delección del gen *dnf-4* sobre el crecimiento polarizado.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Organismos y medios de cultivo

Los organismos que se utilizaron en este trabajo, se enlistan en la **Tabla I**. Las cepas de *N. crassa* para su mantenimiento y cultivo se realizó en Medio Mínimo de Vogel (MMV) con sacarosa (1.5% [p/v] y agar (1.5% [p/v]) a una temperatura de 30°C. Las cepas de *N. crassa* con genotipo *his*⁻³ *hph*⁺ se cultivaron en MMV enriquecido con histidina (500 µg/mL) e higromicina (300 µg/mL). Los conidios electroporados se cultivaron en medio FIGS (MMV+ fructosa 0.05%, glucosa 0.05%, sorbosa 2%) a 30°C hasta observar crecimiento de las colonias transformantes.

2. Diseño de oligonucleótidos para el marcaje endógeno de DNF-4 con la proteína verde fluorescente (sGFP)

Para realizar el marcaje endógeno de la proteína DNF-4, se realizó el análisis de la secuencia del gen *dnf-4* de *N. crassa*. Esto para determinar la posición exacta de su región promotora, el marco de lectura abierto y el terminador del gen, con el fin de diseñar dos pares de oligonucleótidos; un par para amplificar el fragmento 5', el cual corresponde aproximadamente 1 kb de la región terminal del ORF excluyendo el codón de paro, y otro par para el fragmento 3', también corresponde aproximadamente 1kb de la secuencia río abajo del gen *dnf-4*. Se utilizó el vector pRM15 para amplificar la proteína verde fluorescente (sGFP) unido al gen de resistencia a higromicina (*hph*- Higromycin

Phosphotransferase), cabe mencionar que esos genes se encuentran en un vector de almacenamiento (pGEM). Para la construcción del cassette 5' se utilizó el oligonucleótido sentido del ORF del gen *dnf-4* y el antisentido del gen *hph*. En el caso del cassette 3' se fusionó con el oligonucleótido sentido *hph* y el antisentido del UTR 3' del gen *dnf-4*. En la **Tabla II** se enlistan los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo.

Tabla I. Organismos utilizados en el estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>N. crassa</i>		
FGSC9717	<i>mat A; his-3⁻; Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC
FGSC16010	<i>mat a; Δdnf-4</i>	FGSC
FGSC9718	<i>mat a; Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC
FGSC4200	<i>mat a; Wildtype</i>	FGSC
SMRP302	<i>mat A; Pccg-1::mchfp-ypt-1::his-3⁺; Δmus-51::bar⁺^a</i>	Sánchez-León., 2015
SMPR364	<i>mat A; Pccg-1::cse-7-8xgly-mchfp::his-3⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	Rico-Ramírez., 2018
TRM-86-AH01	<i>mat A; dnf-4-sgfp::hph⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	Este estudio
TRM-87-AH02	<i>mat A; dnf-4-sgfp::hph; Δmus-51::bar⁺ + Pccg-1::cse-7-8xgly-mchfp::his-3⁺</i>	Este estudio
TRM-88-AH03	<i>mat A; dnf-4-sgfp::hph; Δmus-51::bar⁺ + Pccg-1::mchfp-ypt-1::his-3⁺</i>	Este estudio

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
(hph)::UTR3 dnf-4 For	atccacttaacgttctgaaatcgagttgtgtgggcaaaagaa
UTR3' dnf-4 Rev	accaagaggaggccacaaac
UTR3' dnf-4 Nest Rev	catctacctcctcccgac
dnf-4 ORF5' For	tccgaagcaagaccgattcc
dnf-4 ORF5' Nest For	cctcgccatgtacctgac
dnf-4::GlyNew Rev	gcctccgctccgcctccgcctatcccctggaccttctata
7Gly-sGFP-hph For	ggcgaggcgga
hph For	gtcggagacagaagatgatattgaaggagc
hph Rev	gttgagatttcagtaacgttaagtggat
sGFP Fow	atggtgagcaagggcgag

3. Extracción de ADN genómico de *N. crassa*

La extracción de ADN genómico de las cepas de interés se llevó a cabo utilizando micelio previamente cultivado en MMV líquido a 30°C durante 4 días. El micelio se filtró y se lavó con agua destilada-estéril para su almacenamiento a -80°C. Posteriormente el micelio congelado se transfirió a un mortero frío y estéril, donde se agregó nitrógeno líquido para su trituración hasta obtener un polvo fino. El polvo fino se procesó con el Kit DNeasy® plant (QUIAGEN, Cat. No. 69104) siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

4. Construcción de cassettes para marcaje endógeno

Los cassettes para el marcaje endógeno de la proteína DNF-4 con sGFP, fueron contruidos mediante la técnica de PCR de doble unión descrita por Yu y col., (2004). Para llevar a cabo este procedimiento primero se amplificó el fragmento de ADN *sgfp_hph* presente en el plásmido pRM15, este se fusionó con el fragmento 5' (aproximadamente 1 kb de ADN) y 3' (secuencia río abajo del gen, aproximadamente 1kb) de *dnf-4*.

4.1 PCR del cassette *sgfp-hph*

Para realizar la amplificación del fragmento *sgfp_hph* se agregaron 30.25 μ L de H₂O HPLC, 10 μ L de 5X phusion GC Buffer, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 2.5 μ L del oligonucleótido sentido *7xgly_sgfp_hph* 10 μ M, 2.5 μ L del oligonucleótido antisentido *hph Rev* 10 μ M, 1.5 μ L de DMSO, 2 μ L de ADN templete (pRM15), 0.25 μ L de polimerasa Phusion (New England Biolabs®), en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler- Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 30 s a 98°C más 30 ciclos de 10 s a 98°C de desnaturalización, 30 s a 48°C de alineamiento y 1 min 30 s a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final (**Figura 3a**).

4.2 PCR de los fragmentos 5' y 3' del gen *dnf-4*

Para la amplificación de los fragmentos 5' y 3' del gen se realizó una mezcla de reacción que contenía 30.25 µL de agua HPLC, 10 µL de 5X phusion GC Buffer, 1 µL de dNTP's 10 mM, 2.5 µL del oligonucleótido sentido 10 µM (5'F o 3'F del gen), 2.5 µL del oligonucleótido antisentido 10 µM (5'R o 3'R del gen), 1.5 µL de DMSO, 2 µL de ADN genómico como template y 0.25 µL de Phusion polimerasa, la reacción final fue de 50 µL. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler- Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 30 s a 98°C, 30 ciclos de 10 s a 98°C de desnaturalización, 30 s a 55°C de alineamiento y 1 min a 72°C de extensión, finalizando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final (**Figura 3a**).

4.3 PCR de fusión de los fragmentos 5' y 3' del gen *dnf-4* con *sgfp-hph*

Los cassettes realizados mediante la técnica de PCR de fusión recibieron el nombre de 5' o 3' posteriormente el nombre de la proteína de interés y *sgfp*. El fragmento 5' consiste en aproximadamente 1171 pb río arriba del gen antes del codón de paro de *dnf-4* seguido por una bisagra de siete glicinas, el gen *sgfp* y la secuencia completa del gen *hph*. El fragmento 3' está formado por la secuencia completa del gen *hph* seguido por una secuencia de aproximadamente 1208 pb río abajo del codón de paro correspondiente al UTR 3' del gen *dnf-4*.

La mezcla de reacción para amplificar el cassette 5' *dnf-4_7xGly_sgfp_hph* fue la siguiente: 25.7 µL de agua HPLC, 5 µL de 10X Dream Taq Buffer, 1 µL de dNTP's 10 mM, 2.5 µL del oligonucleótido sentido 5' del gen 10 µM, 2.5 µL del oligonucleótido antisentido *hph* Rev 10 µM, 6.8 µL del cassette *sgfp_hph* y 4 µL del fragmento 5' como ADN template, y 0.5 µL de la polimerasa Taq Dream (Thermo Scientific ®). Para amplificar el cassette *hph_3'dnf-4* del gen se realizó la misma mezcla de reacción con las siguientes modificaciones: 2.5 µL del oligonucleótido sentido *hph* 10 µM, 2.5 µL del oligonucleótido antisentido 3' 10 µM, 1 µL del cassette *sgfp_hph* y del fragmento 3' como ADN template. Ambas mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 50 µL y se colocaron en un termociclador APOLLO Thermal Cycler ATC 401 bajo las siguientes condiciones: Para la fusión del cassette 5' *dnf-4_7xGly_sgfp_hph*: 3 min a 94°C más 30 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 58°C de alineamiento y 3 min 30 s a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final. Para llevar a cabo la fusión del cassette *hph_3'dnf-4* se utilizaron las siguientes condiciones: 3 min a 94°C más 30 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 50°C de alineamiento y 3 min a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final (**Figura 3b**).

4.4 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) (bromuro de etidio al 0.1% [p/v]) a 80V durante 45 min. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados y cassettes se purificaron mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAgen®), siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

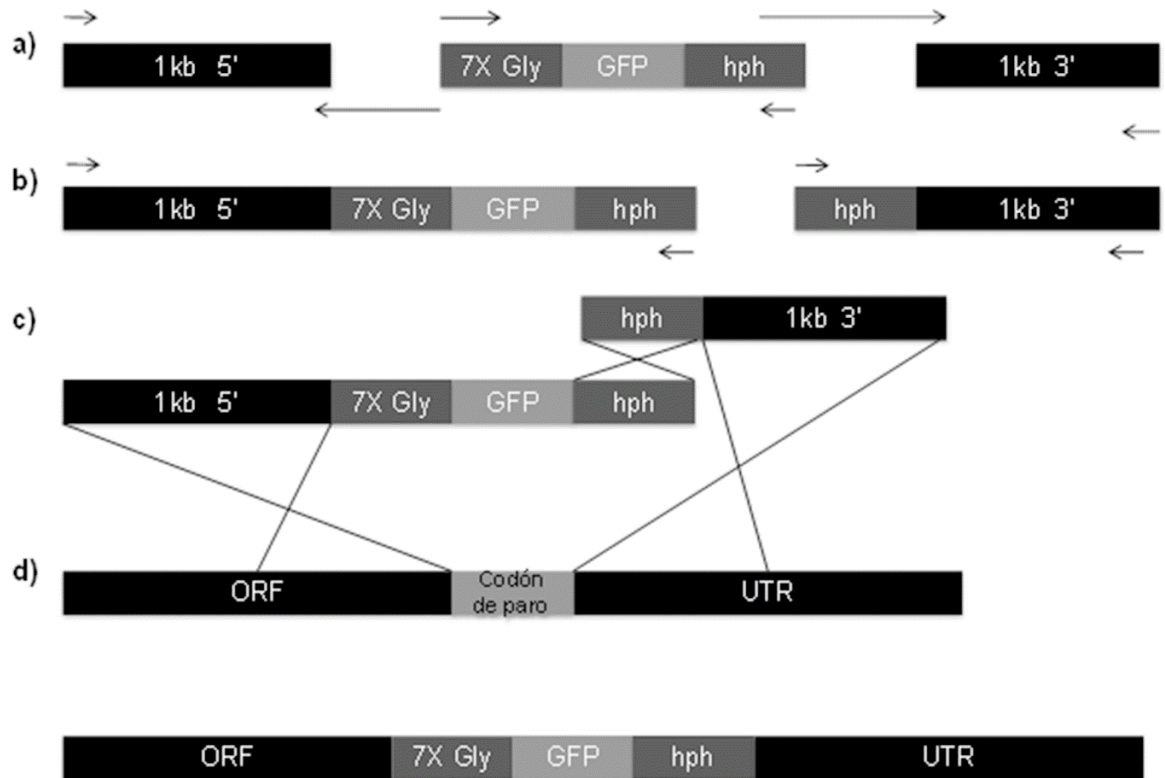


Figura 3. PCR de fusión para el marcaje endógeno de proteínas en *N. crassa*. **(a)** Amplificación de los fragmentos 5' y 3' de los genes de interés y del cassette *7xgly* (que codifica para siete glicinas) seguido de la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (sGFP) y del gen de resistencia a higromicina (*hph*). **(b)** PCR de fusión del fragmento 5' con el cassette *7xgly_sgfp_hph* y del fragmento 3' con *hph*. **(c)** Se utilizaron los dos cassettes contruidos para transformar mediante electroporación a *N. crassa*, y por recombinación homóloga se reemplazó el gen nativo de la proteína de interés por los cassettes *5'-dnf-4_7xgly_sgfp_hph_UTR-3'* **(d)**.

5. Transformación de *N. crassa* por electroporación

Las cepas de *N. crassa* FGSC # 9717 ($\Delta mus-51::bar^+$; *his-3 mat A*) y FGSC #9718 ($\Delta mus-51::bar^+$) fueron sembradas en MMV con histidina, se incubaron a 30°C durante una semana, y se expusieron a luz a 30°C por 1 a 2 días. Los conidios maduros se extrajeron agregando agua destilada estéril, agitando vigorosamente el matraz hasta desprenderlos. El sobrenadante fue filtrado y se recuperaron los conidios centrifugándose a 5,000 rpm por 5 min. La pastilla celular se lavó tres veces con sorbitol 1 M estéril y finalmente, se resuspendieron en 80 μ L de sorbitol 1 M. Los conidios de las cepas FGSC #9717 y FGSC#9718 se utilizaron para la transformación génica. La mezcla de conidios y los fragmentos de ADN se transfirieron a una celda de electroporación de 2 mm previamente fría, posteriormente se sometió a un pulso eléctrico en el electroporador Bio-Rad Gene Pulser bajo las siguientes condiciones: resistencia 600 Ω , capacitancia 25 μ F y voltaje de 1.5 kV (Margolin y col, 1997). La selección de las recombinantes se realizó por crecimiento en presencia de higromicina (0.3 mg mL⁻¹) y su fluorescencia como respuesta a la excitación de la sGFP.

6. Microscopia y análisis de imágenes

Las cepas transformantes de *N. crassa* se observaron por microscopia confocal, mediante el método de agar invertido (Hickey y col., 2004). El aumento usado fue de 60X con una apertura numérica de 1.42 utilizando un

microscopio confocal Olympus FV 1000 con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 510 nm para la sGFP. Las imágenes se tomaron simultáneamente en dos canales: uno con luz fluorescente, utilizando un láser de argón para la excitación de sGFP y otro de luz transmitida para la obtención de imágenes de contraste diferencial de interferencia. Las imágenes confocales fueron examinadas en el software FluoView™ FV1000 (Olympus Corp). Posteriormente las imágenes se procesaron con Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

7. Ensayos de co-expresión de DNF-4 con CSE-7 y YPT-1

Con la finalidad de determinar si existe co-localización de DNF-4 con CSE-7, proteína integral de membrana de retículo endoplásmico (Rico-Ramírez., 2018) y YPT-1, proteína asociada a cisternas de Golgi (Sánchez-León., 2015), se realizaron experimentos de co-expresión. Se inocularon conidios de la cepa DNF-4-sGFP con conidios de CSE-7-mChFP y YPT-1-mChFP respectivamente incubándose a 30°C durante 10 h. Las colonias fueron seleccionadas de acuerdo con ambos marcajes fluorescentes como respuesta a la excitación de la sGFP y mChFP.

8. Tinción con FM4-64

El colorante vital FM4-64 fue usado para visualizar el Spk en la mutante *Δdnf-4* y la cepa tipo silvestre. Este colorante tiñe la membrana plasmática y

membranas de macrovesículas y microvesículas. Las cepas fueron incubadas con 10 μ l (5 μ M) de FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 5 min y se realizó el análisis mediante microscopia confocal.

9. Ensayos de despolimerización de F-actina y microtúbulos

Para determinar si DNF-4-sGFP se mueve a través de los microtúbulos o del citoesqueleto de actina, se usaron dos tipos de drogas: Latrunculina B (Lat B), la cual interrumpe al citoesqueleto de actina y Benomilo, que interrumpe al citoesqueleto microtubular. Una solución stock de Lat B (Sigma-Aldrich) y de Benomilo (Sigma-Aldrich) a 10 mg mL⁻¹ fue preparada con etanol al absoluto. La concentración de estas drogas que inhibe el 50 % la tasa de crecimiento de la hifa fue seleccionada por Ramos-García y col. (2009). Células de *N. crassa* fueron expuestas con 10 μ g mL⁻¹ de Lat B y 2.5 μ g mL⁻¹ de Benomilo, ambas drogas se diluyeron en MMV. 10 μ L de las drogas se colocaron en un cubreobjetos y posteriormente el micelio se colocó por la técnica de bloque de agar invertido, después de 5 min de incubación se examinaron las muestras mediante microscopia confocal.

10. Experimentos tipo FRAP

Se utilizó la técnica de microscopia confocal de Recuperación de la fluorescencia después del Fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés Fluorescence Recovery After Photobleaching) para observar la recuperación de

la fluorescencia en distintas zonas de la hifa etiquetada con DNF-4-sGFP. El área de interés fue marcada en forma rectangular en la región subapical y se expuso a una longitud de excitación de 488 nm con un láser de argón/2 a una intensidad de 80% durante 6 s. Se realizó el mismo procedimiento a varias hifas y los videos tuvieron una duración aproximada de 4 min.

11. Caracterización morfológica de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y la cepa tipo silvestre (WT)

11.1 Cuantificación de la tasa de crecimiento

Se midió por triplicado la tasa de crecimiento de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y la cepa silvestre (WT). Para llevar a cabo este procedimiento, en cajas Petri de 150 mm con MMV sólido, se inocularon 2.59×10^6 conidios en la periferia de la caja, posteriormente se marcó la circunferencia de la colonia cada 6 h durante 36 h. Cuando el micelio de la cepa WT llegó al borde, se fotografió con una cámara D3100 de Nikon. La distancia de crecimiento de cada marca se cuantificó en el software Piximètre 5.9 R1520, calibrado con una regla graduada en milímetros.

11.2 Morfología de colonia y borde de la colonia

Para la observación de las características de la morfología colonial, se inocularon 2.59×10^6 conidios en el centro de una caja Petri de 100 mm de diámetro con MMV, y se incubaron durante 12 h a 30°C. Después de haber

concluido la incubación, las cajas fueron fotografiadas con una cámara D3100 de Nikon. El borde de la colonia se observó después de 18 h de incubación a 30°C, utilizando un estereoscopio SZX12 (Olympus®) y se fotodocumentó con una cámara DP70 (Olympus®) en el software DPManger v1.1.1.71 OLYMPUS OPTICAL CO.

11.3 Tasa de elongación

Para determinar la tasa de elongación se midió la velocidad de crecimiento mediante la fórmula $v=d/t$ de la cepa $\Delta dnf-4$ y WT (n=9) utilizando el software FluoView™ FV1000 (Olympus Corp).

11.4 Tasa de ramificación

Para calcular la tasa de ramificación se sembraron 2.59×10^6 esporas de la mutante $\Delta dnf-4$ y la cepa WT en una placa Petri con MMV-Agar 1.5%, posteriormente se incubaron a 30°C por 18 h. Utilizando un estereoscopio Olympus SZXILLB2-100® se tomaron imágenes del margen de la colonia con un aumento de 25X mediante una cámara Olympus DP70®. Para establecer la tasa de ramificación se cuantificó el número de ramificaciones de 30 hifas principales dentro de una distancia de 500 μm desde la punta de la hifa hasta la región distal de la misma de ambas cepas.

11.5 Cuantificación de producción de conidios

Para obtener una comparación de la producción de conidios entre la cepa silvestre y la cepa *Δdnf-4*, se sembraron 2.59×10^6 conidios en matraces de 250 mL con 50 mL de MMV-Agar 1.5%. Se incubaron en oscuridad a 30°C durante 24 h y posteriormente a 25°C en luz blanca durante 72 h. Los conidios se recuperaron utilizando filtros de tela (Corporacion Magitel, C.A), primero se lavó el micelio previamente cultivado con 50 mL de sorbitol 1 M estéril o agua destilada estéril agitando vigorosamente el matraz, posteriormente se pasó la solución por el filtro y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se enjuagó con 30 mL de agua destilada estéril, para después ser nuevamente centrifugado a 5,000 rpm por 5 min. Finalmente se retiró el sobrenadante y la pastilla de conidios se resuspendió en 2 mL de sorbitol estéril al 1 M. Por último, se tomaron 10 μ L de cada muestra previamente diluidas 1:10 y se cuantificó el número de esporas de cada repetición por duplicado utilizando una cámara Neubauer.

11.6 Determinación de biomasa

Para determinar la producción de biomasa de la cepa *Δdnf-4* y WT, se inocularon 2.59×10^6 esporas en 100 mL de MMV líquido, posteriormente se incubaron a 30°C en oscuridad en agitación constante durante 48 h. Se recuperó el micelio por filtración al vacío en un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato y una bomba de vacío. Se utilizaron filtros Whatman® del #1 de

90 mm de diámetro previamente pesados. Las muestras fueron secadas a 50°C y pesadas cada 30 min hasta obtener un peso constante (al peso obtenido se sustrajo de la masa del filtro previamente obtenida).

11.7 Hifas aéreas

Con el fin de conocer la producción de hifas aéreas de la cepa $\Delta dnf-4$ y WT se inocularon 2.59×10^6 esporas en medio MMV sólido en tubos de borosilicato, posteriormente se dejaron incubar a 30°C durante 48 h. Finalmente se determinó la altura de las hifas aéreas tanto de la mutante como la silvestre con la ayuda de una regla de 20 cm.

XI. RESULTADOS

1. Análisis bioinformático

Con la finalidad de estudiar el ortólogo de Neo1 (translocador de fosfolípido) de *S. cerevisiae* en *Neurospora crassa*, se llevó a cabo, utilizando la secuencia nucleotídica de *neo1* (YIL048W), un BLAST (NCBI-BLAST[®]) de *N. crassa*. El resultado de dicha búsqueda estableció una secuencia nucleotídica de 4,157 pb que codifica para una proteína de 1,331 aa, denominada DNF-4 (NCU03818). Esta secuencia, se comparó con sus otros dos translocadores, DNF-1 (NCU07443) y DNF-2 (NCU00352) previamente reportados por Murillo-Corona (2017), y se encontró que el porcentaje de identidad que comparte DNF-4 con DNF-1 y DNF-2 es del 25% y 28% respectivamente. Al momento de realizar el análisis bioinformático de DNF-4 con las secuencias completas de Neo1p de *S. cerevisiae* y DnfD de *Aspergillus nidulans* (ortólogos de DNF-4) se observó un 55% y 60% de identidad respectivamente, como se puede ver en la **tabla III**.

Tabla III. Porcentaje de identidad de DNF-4 de *N. crassa* con sus diferentes homólogos y ortólogos

Organismo	NCU	Nombre	Tamaño (No. aminoácidos)	% de identidad entre DNF-4
<i>N. crassa</i>	NCU07443	DNF-1	1562	25%
	NCU00352	DNF-2	1360	28%
	NCU03818	DNF-4	1331	100%
<i>A. nidulans</i>	AN6614	DnfD	1265	60%
<i>S. cerevisiae</i>	YIL048W	Neo1	1151	55%

El análisis de dominios utilizando las herramientas en línea InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), reveló que la proteína DNF-4 presenta un dominio conservado E1-E2 (323-632 residuos), esta región participa en el cambio conformacional durante el transporte de cationes (Prezant y col., 1996). Además, posee un dominio hidrolasa (654-1113 residuos) que participa en la hidrólisis de ATP para la obtención de energía (**Figura 4**). El porcentaje de identidad de este dominio comparado con las flipasas DNF-1 y DNF-2 de *N. crassa*, DnfD de *A. nidulans* y Neo1p de *S. cerevisiae* fue del 32%, 33%, 75% y 60% respectivamente. También se determinó que DNF-4 presenta 10 dominios transmembranales localizados a lo largo de un tercer dominio conservado denominado ATPasa tipo-P.

Se ha descrito que la proteína Neo1p de *S. cerevisiae* contiene una secuencia de siete aminoácidos (DKTGTLT) altamente conservada y es parte

importante del sitio activo de la familia ATPasa tipo-P. Este motivo incluye un residuo de ácido aspártico (D), el cual es esencial en el ciclo de reacción de estas proteínas. El mecanismo a través del cual se bombean los sustratos se basa en el modelo E1-E2 mencionado anteriormente, en el que la fosforilación mediada por ATP, la unión al sustrato y la desfosforilación del ácido aspártico se acoplan a un cambio conformacional del transportador (Moiler y col., 1996; Prezant y col., 1996; Paulusma & Oude Elferink, 2005). Debido a esto se realizó la búsqueda de esta secuencia en la proteína DNF-4 en *N. crassa* y se encontró que se localiza entre los residuos 660-666 con un porcentaje de identidad del 100% **(Figura 5)**.

Para determinar la estructura tridimensional de la proteína DNF-4 se generó un modelo utilizando el servidor *I-TASSER* (Yang & Zhang, 2015; Zhang, Freddolino, & Zhang, 2017) usando como base el modelo de las ATPasas-P4 de *S. cerevisiae* (Baldrige y Graham, 2012; Roland y Graham, 2016). El modelaje nos permitió identificar que DNF-4 está conformado por 32 hélices- α , de las cuales 11 conforman los 10 dominios. También, se pudo determinar que el amino terminal de la proteína DNF-4 queda orientado hacia la región citoplasmática de la célula. Del mismo modo, una gran región del dominio ATPasa Tipo-P (307 residuos), hidrolasa (507 residuos) y la región del carboxilo terminal (14 residuos), conformados tanto por hélices- α y hojas β , quedan orientados hacia la región citoplasmática. Los dominios transmembranales se

encuentran unidos por la región no citoplasmática a través de bucles cortos de entre 4 y 10 residuos (**Figura 6**).

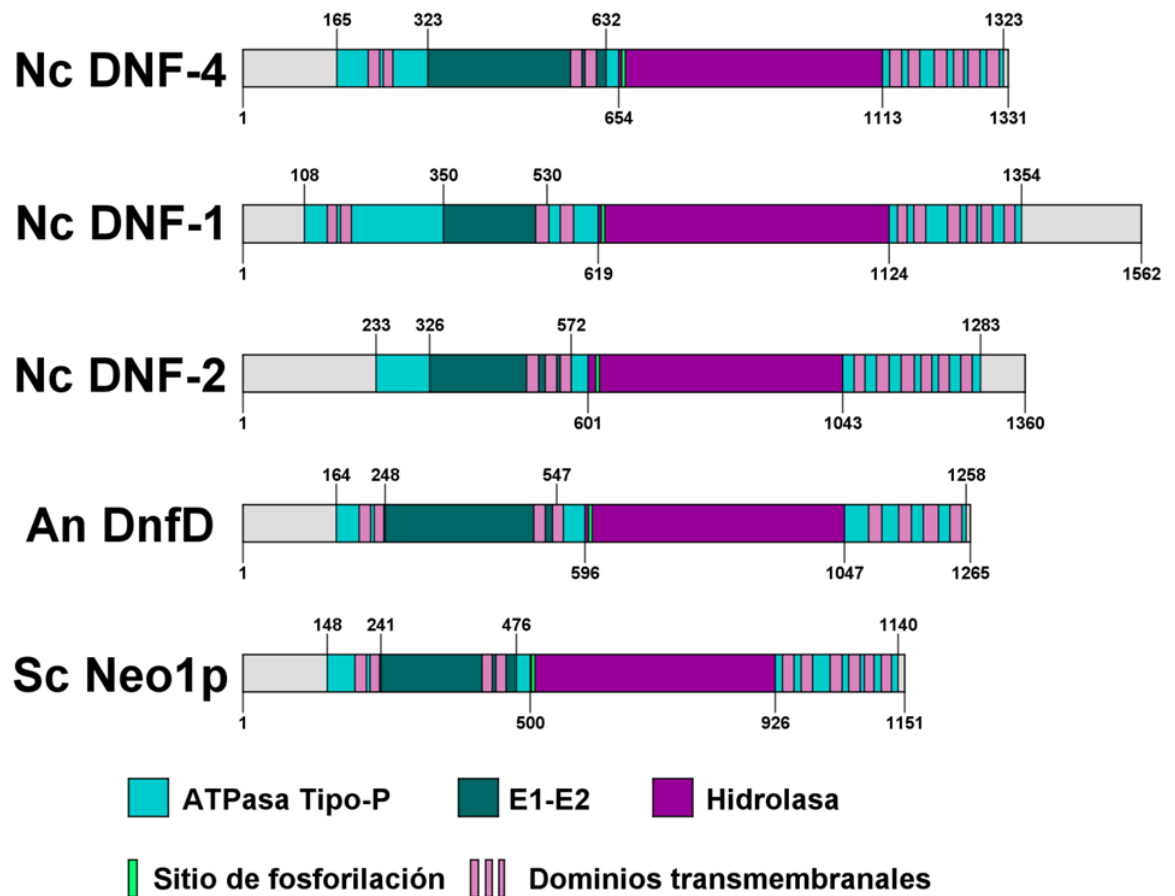


Figura 4. Dominios de las proteínas DNF-4, DNF-1, DNF-2 de *N. crassa* y los ortólogos de DNF-4 en *A. nidulans* (DnfD) y *S. cerevisiae* (Neo1p). Esquema elaborado usando IBS 1.0.2.(<http://ibs.biocuckoo.org/>)



Figura 5. Análisis de la secuencia DKTGTLT. **(A)** Secuencia de la proteína DNF-4, en rojo se muestra la secuencia conservada de siete aminoácidos (DKTGTLT), importante para el sitio activo de la familia ATPasa tipo-P. **(B)** Análisis tipo BLAST (NCBI-BLAST[®]) entre la secuencia de siete aminoácidos conservados de las proteínas DNF-4, DnfD y Neo1p, mostró un 100% de identidad.

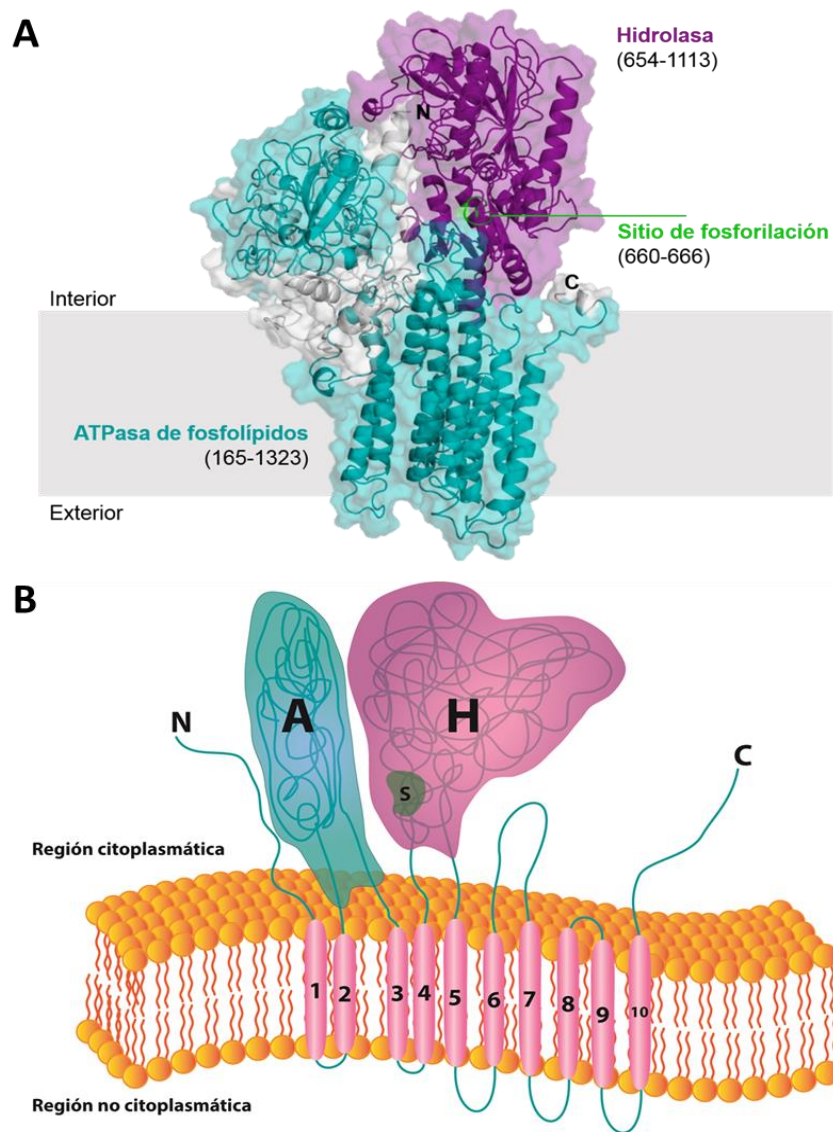


Figura 6. Modelo estructural de la proteína DNF-4. **(A)** Representación superficial y en cintas de la estructura de DNF-4. El límite aproximado de la bicapa lipídica se muestra como un rectángulo gris. **(B)** Representación esquemática de DNF-4. A (cian): dominio ATPasa de fosfolípidos; H (morado): hidrolasa; S (verde-gris): sitio de fosforilación; dominios transmembranales (rosa); las letras N y C señalan el amino y el carboxilo terminal, respectivamente Modificado de Baldrige y Graham, 2012; Roland y Graham, 2016.

2. Localización de DNF-4

2.1 Localización de DNF-4 en hifas maduras de *N. crassa*

Con la finalidad de conocer la distribución celular y dinámica de DNF-4 en hifas maduras de *N. crassa*, esta proteína fue etiquetada fluorescentemente en el carboxilo-terminal bajo la expresión de su propio promotor con la proteína verde fluorescente (sGFP). La cepa transformante de *N. crassa*, se analizó utilizando el método de obtención de imágenes de células vivas mediante microscopia confocal descrito en materiales y métodos. Como podemos ver en la **Figura 7**, DNF-4 se observó en forma de puntos brillantes fluorescentes distribuidos en la región subapical y distal de la hifa, aparentemente rodeando el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. Sin embargo, también se pudo ver que algunos de estos puntos fluorescentes alcanzaban la región apical cerca del Spitzenkörper. Por otra parte, en la región distal de la hifa, se observó la presencia de algunos compartimentos membranosos conteniendo otras estructuras membranosas moviéndose en dirección anterógrada (**Figura 8**).

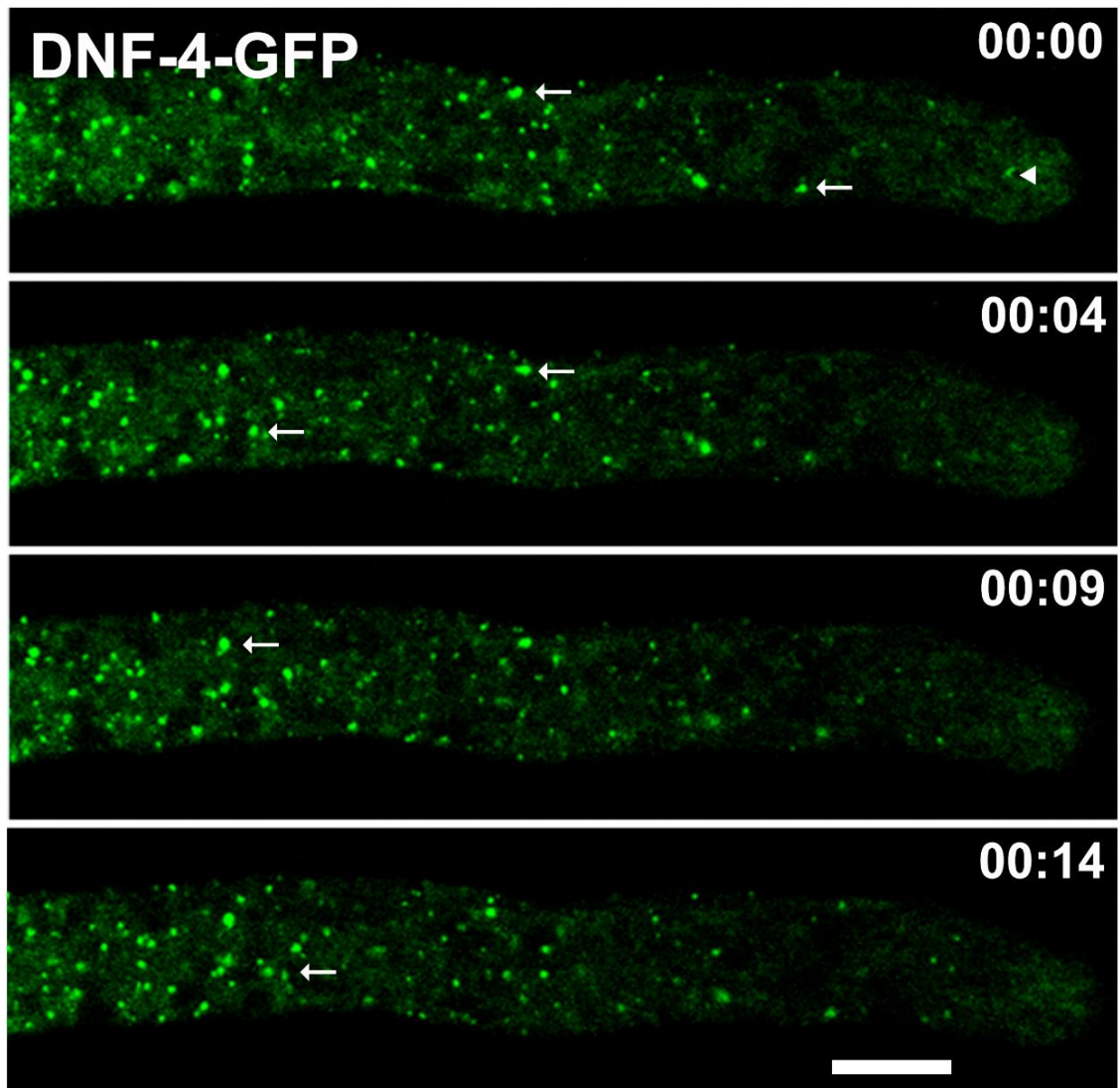


Figura 7. Serie de tiempos de la localización y dinámica de DNF-4-sGFP en hifas maduras en *N. crassa*. Las flechas indican las partículas fluorescentes localizados en la región subapical y distal de la hifa aparentemente rodeando el RE. La cabeza de flecha indica puntos fluorescentes localizados en la región apical. Barra de escala: 10 μm .

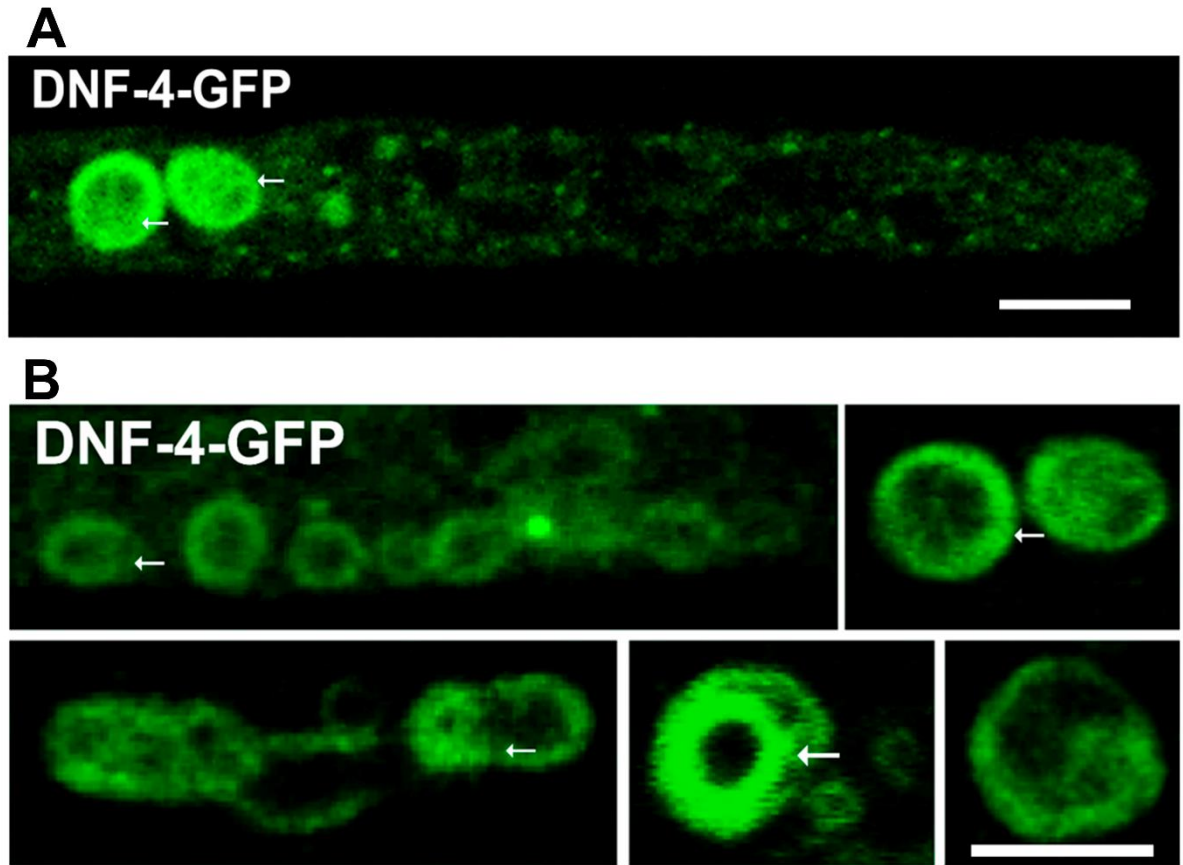


Figura 8. Microscopia confocal Spinning Disk de las estructuras membranas presentes en la región distal de hifas maduras conteniendo DNF-4-sGFP de *N. crassa* (A). Las flechas indican las estructuras membranas contenidos en compartimentos membranosos en la región distal (A y B). Barra de escala: 10 y 5 μm respectivamente.

Por otra parte, también se pudo observar que estas partículas fluorescentes se movían en ambas direcciones (**Figura 9**). Por microscopia TIRF, además de observar el movimiento anterógrado y retrogrado de estas partículas, se pudo ver que se mueven a diferentes velocidades (entre $0.1 \mu\text{m s}^{-1}$ y $3.8 \mu\text{m s}^{-1}$) (**Figura 10**).

Para determinar si DNF-4-sGFP se mueven a través del flujo citoplasmático, se realizaron experimentos de fotoblanqueamiento en la región distal de la hifa, y posteriormente a esto, se pudo observar como el área fotoblanqueada se recuperaba rápidamente de las partículas de DNF-4-sGFP (**Figura 11**). Esto nos indicó que algunas partículas de DNF-4-sGFP viajan de manera independiente al flujo citoplasmático.

Con la finalidad de conocer si DNF-4 se desplaza a través del citoesqueleto microtubular o de actina, dos drogas que interrumpen el citoesqueleto fueron utilizadas, como se describe en materiales y métodos. Como podemos observar en la **Figura 12**, no hubo cambios en el patrón de movimiento de DNF-4 cuando utilizamos la droga anti-actina (Latrunculina B). Sin embargo, al despolimerizar a los microtúbulos con Benomilo, se pudo ver que la dinámica de DNF-4-sGFP se encontraba alterada. Estos datos sugieren que probablemente DNF-4-sGFP viaja a través del citoesqueleto microtubular.

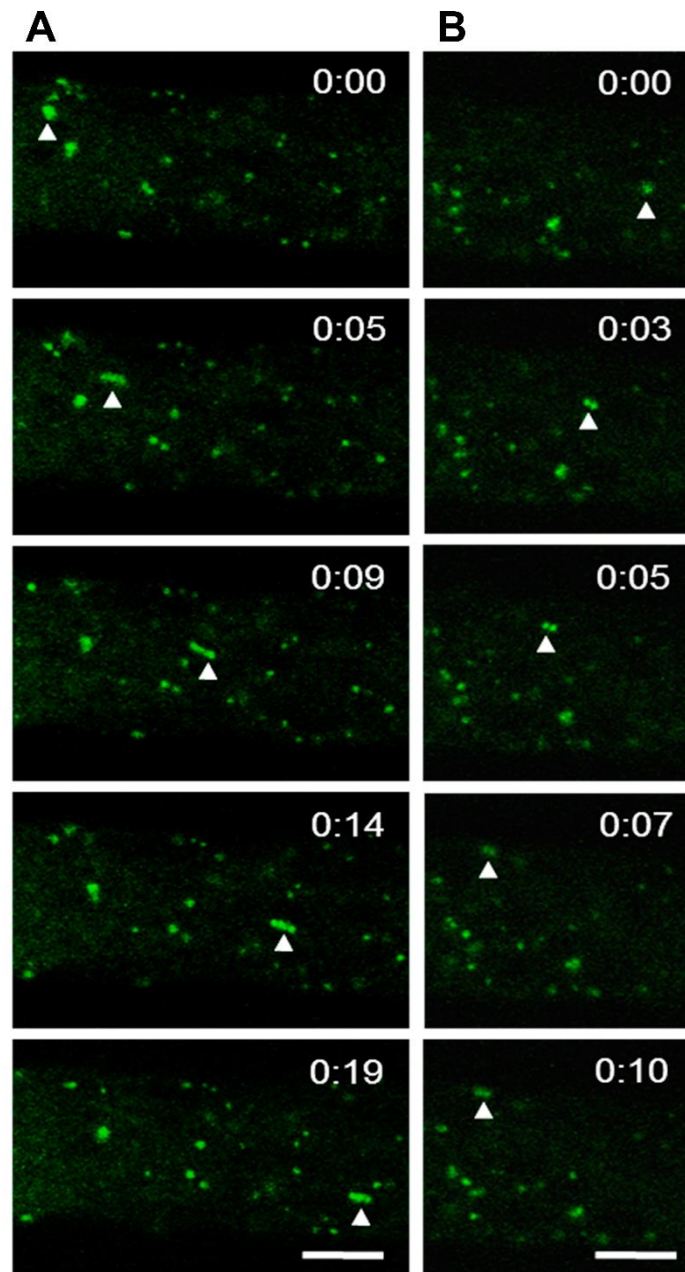


Figura 9. Dinámica de DNF-4-sGFP. **(A)** Movimiento retrógrado de la proteína DNF-4-sGFP. **(B)** Movimiento anterógrado de DNF-4-sGFP. Las cabezas de flecha señalan el movimiento de una partícula fluorescente. Barra de escala: 5 μm .

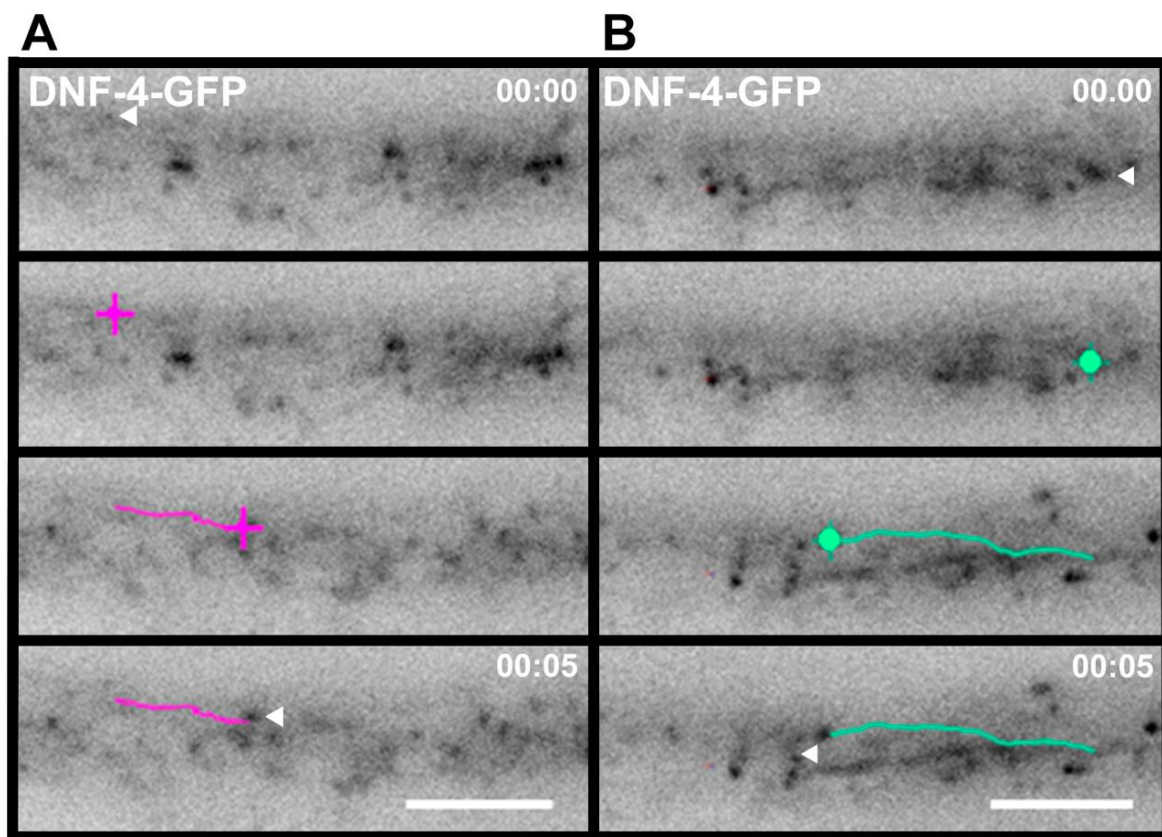


Figura 10. Análisis de TIRF de partículas fluorescentes de DNF-4-sGFP. **(A)** Corresponde al movimiento anterógrado de la proteína DNF-4-sGFP. **(B)** Movimiento retrogrado de DNF-4-sGFP. Las cabezas de flecha señalan la partícula de DNF-4-sGFP y en colores (rosa y verde) la trayectoria de las partículas fluorescentes. Barra de escala: 5 μ m.

DNF-4-GFP

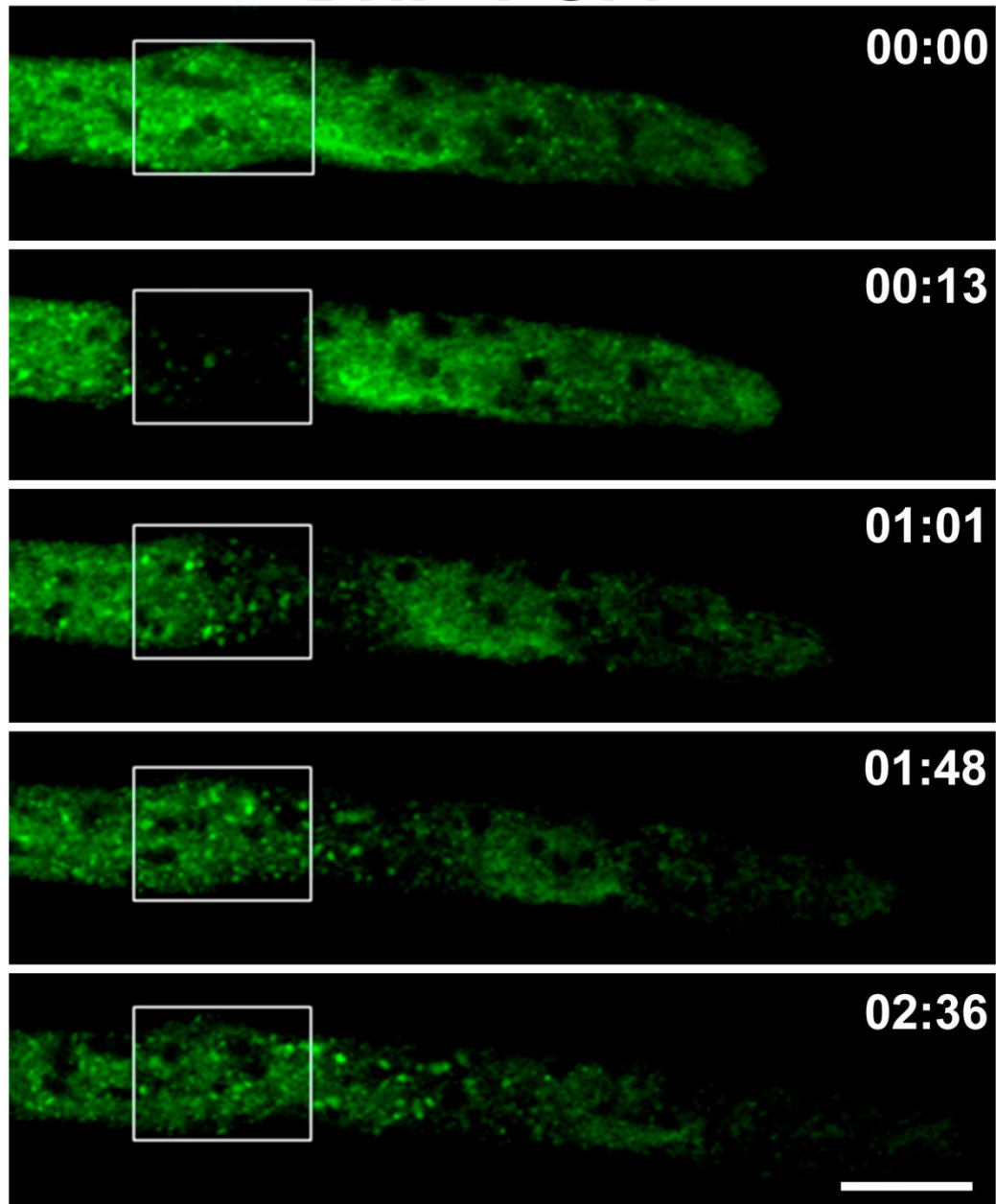


Figura 11. Fotoblanqueamiento de la región apical de hifas maduras de *N. crassa* conteniendo DNF-4-sGFP. El recuadro blanco enmarca la región que se fotoblanqueo. Barra de escala: 10 μ m.

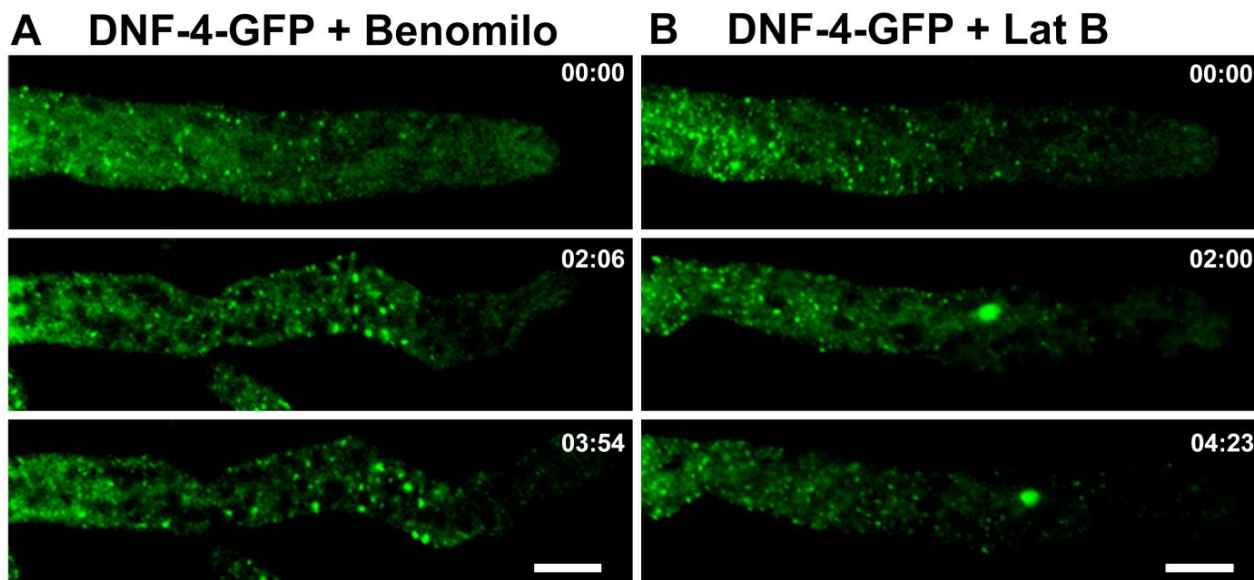


Figura 12. Imagen confocal de hifas maduras conteniendo DNF-4-sGFP tratadas con: **(A)** 2.5 µg mL⁻¹ de Benomilo, droga despolimerizadora de microtubulos y en **(B)** 10 µg mL⁻¹ de la droga anti-actina Latrunculina B. Barra de escala: 10µm.

3. Co-expresión de DNF-4-sGFP con CSE-7-mChFP y YPT-1

Como se mencionó anteriormente, la proteína DNF-4-sGFP se encuentra distribuida en la región subapical y distal de la hifa, aparentemente rodeando el RE y el complejo de Golgi. Con la finalidad de determinar si DNF-4 se encuentra en alguno de estos compartimentos o en ambos, se llevaron a cabo experimentos de co-expresión de DNF-4-sGFP con la proteína quitina sintasa-7 (CSE-7, proteína chaperona residente de RE) etiquetada con mChFP y YPT-1-

mChFP una proteína Rab-GTPasa, la cual se ha reportado que se localiza en cisternas de Golgi y en el núcleo del Spk

Una vez que se generó la cepa heterocarión conteniendo DNF-4-sGFP y CSE-7-mChFP mediante fusión vegetativa, se observaron las hifas maduras de esta cepa mediante microscopia confocal, y cómo se muestra en la **Figura 13** y **14**, tanto DNF-4-sGFP con CSE-7 y YPT-1-mChFP co-localizan parcialmente. Estos datos indican que DNF-4 se encuentra tanto en la región del RE como en el complejo de Golgi.

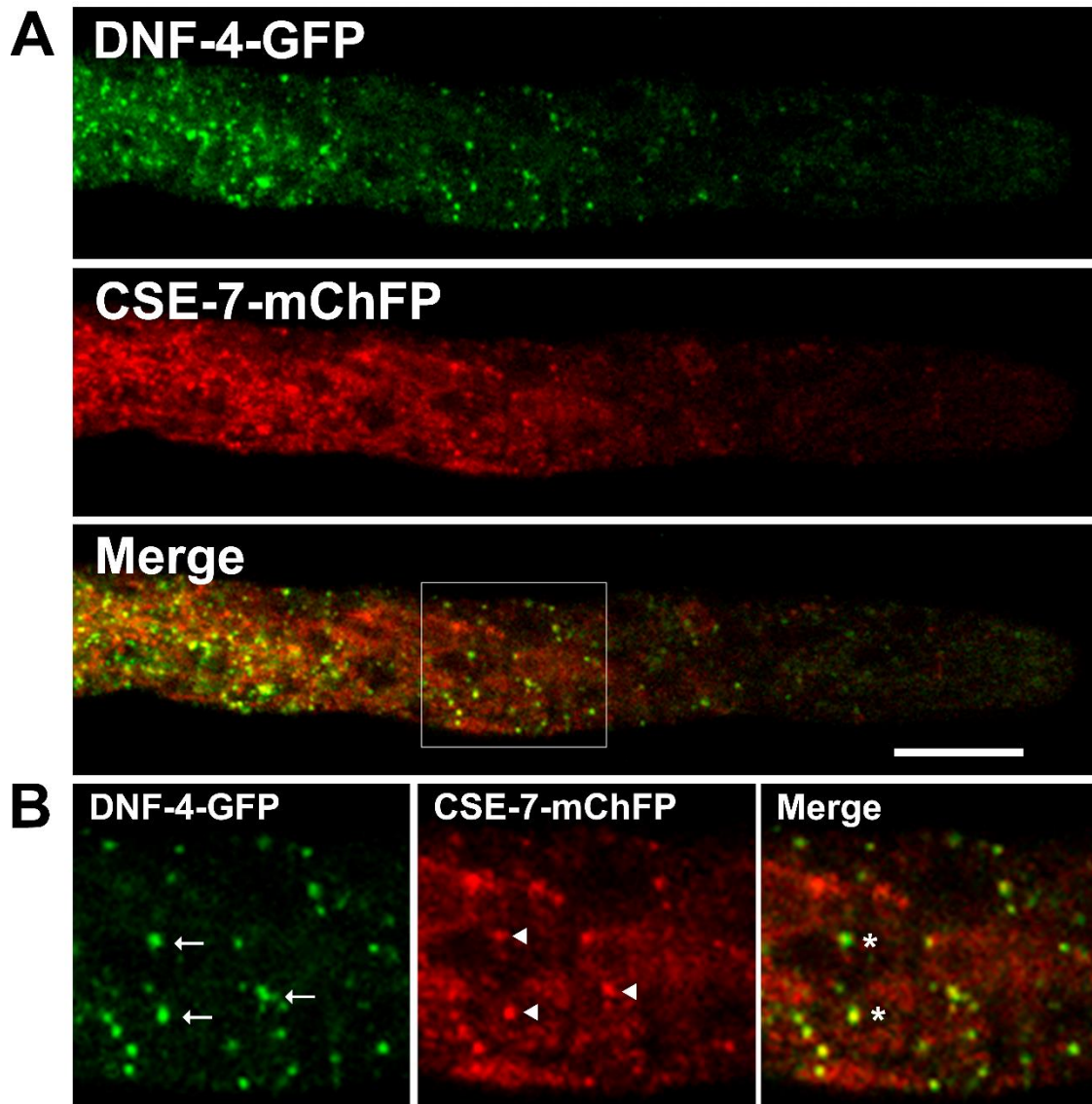


Figura 13. Localización de DNF-4-sGFP en el RE. **(A)** Co-expresión de DNF-4-sGFP y CSE-7-mChFP (proteína chaperona residente de RE) en hifas maduras de *N. crassa*. **(B)** Magnificación de la región distal de la hifa. Las flechas indican las partículas fluorescentes correspondientes a DNF-4-sGFP, las cabezas de flecha a CSE-7-mChFP y asteriscos la co-localización de ambas proteínas. Barra de escala: 10µm.

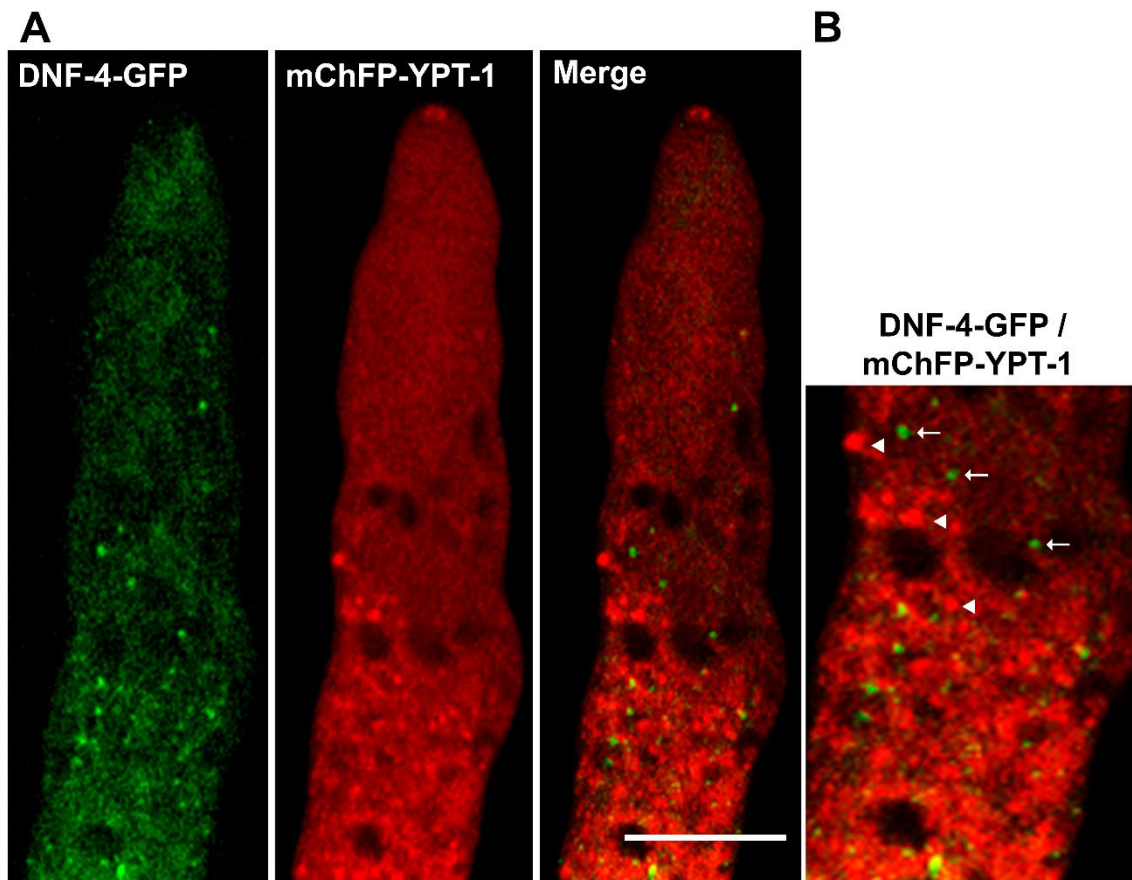


Figura 14. Localización de DNF-4-sGFP. **(A)** Co-expresión de DNF-4-sGFP y YPT-1-mChFP (Rab-GTPasa, localiza en cisternas de Golgi y en el núcleo del Spk) en hifas maduras de *N. crassa*. **(B)** Magnificación de la región distal de la hifa. Las flechas nos indican las partículas fluorescentes correspondientes a DNF-4-sGFP, las cabezas de flecha a YPT-1-mChFP. Barra de escala: 10µm.

4. Fenotipo de la mutante por eliminación del gen *dnf-4*

4.1 Crecimiento vegetativo en la mutante $\Delta dnf-4$

4.1.1 Morfología de las colonias de la mutante $\Delta dnf-4$

Previos reportes en otros organismos, por ejemplo, en *S. cerevisiae*, demostraron que la mutación del gen *neo1* causa letalidad a la célula, a diferencia de lo observado en *A. nidulans*, donde se ha descrito que la interrupción del gen *dnfD*, ortólogo de *neo1*, no produce letalidad, sin embargo, si se ven alteraciones importantes en la esporulación. Con la finalidad de determinar si la ausencia del gen *dnf-4* afecta la morfología y el crecimiento vegetativo de *N. crassa*, se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de la mutante por delección $\Delta dnf-4$ y tipo silvestre (WT), evaluándose la tasa de elongación, la producción de biomasa, esporulación, así como la formación de ramificaciones.

Para lo anterior, en primer lugar, se observó la morfología colonial en placas Petri de la cepa $\Delta dnf-4$. Como se puede ver en la **Figura 15A y B**, la colonia de la cepa mutante se vio más compacta y de menor tamaño en comparación con la cepa WT después de 12 h de crecimiento. Al analizar la formación de hifas aéreas, también se observó una reducción de estas en la cepa $\Delta dnf-4$ comparado con la WT (**Figura 15C y D**). Posteriormente para determinar de manera cuantitativa la disminución del tamaño de la colonia observada, se realizó la tasa de crecimiento de ambas cepas como se ha descrito en materiales y métodos. Con lo anterior se pudo determinar que la

velocidad de crecimiento de $\Delta dnf-4$ fue de $0.31 \mu\text{m s}^{-1}$, lo que representa una disminución del 34% comparado con la WT ($0.9 \mu\text{m s}^{-1}$) (**Figura 16A**). Cuando se evaluó el índice de elongación de las hifas de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ ($0.06 \pm 0.004 \mu\text{m s}^{-1}$), se observó una disminución del 40% en comparación con la WT ($0.15 \pm 0.004 \mu\text{m s}^{-1}$) (**Figura 16B**), de la misma manera la producción de biomasa de la mutante $\Delta dnf-4$ ($36.67 \pm 0.014 \text{ mg d}^{-1}$) se vio una reducción del 35.29% comparado con la cepa WT ($56.67 \pm 0.014 \text{ mg d}^{-1}$) (**Figura 16C**). Con estos resultados se pudo observar que la mutación en el gen *dnf-4* de *N. crassa* no causa letalidad, pero si afecta significativamente su crecimiento.

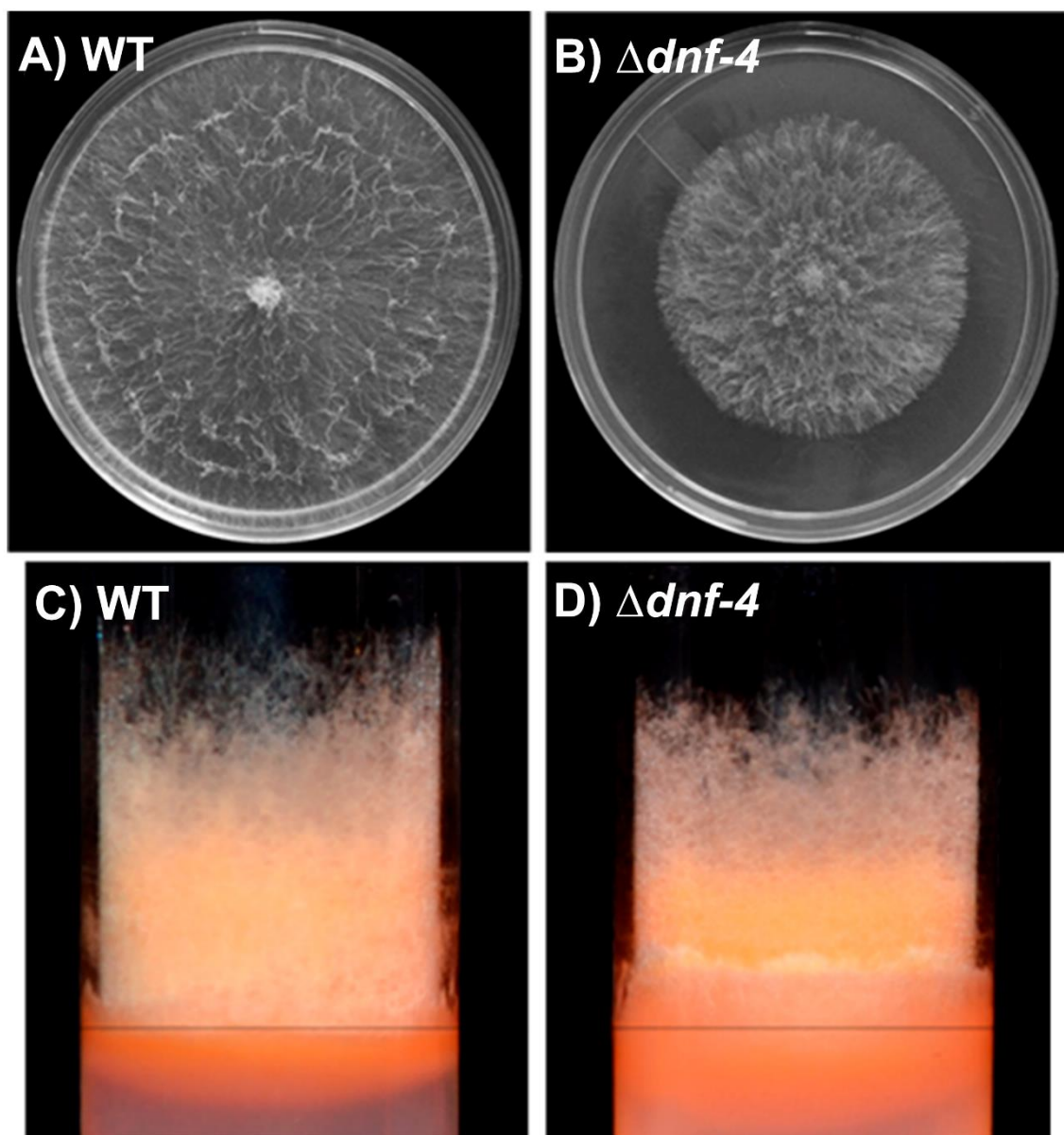


Figura 15. Morfología macroscópica de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT. En **A** y **B** corresponden a la morfología colonial en placa Petri después de 12 h de crecimiento a 30°C. En **C** y **D**, muestra la longitud de la formación de hifas aéreas, después de 5 días de crecimiento en oscuridad a 30°C.

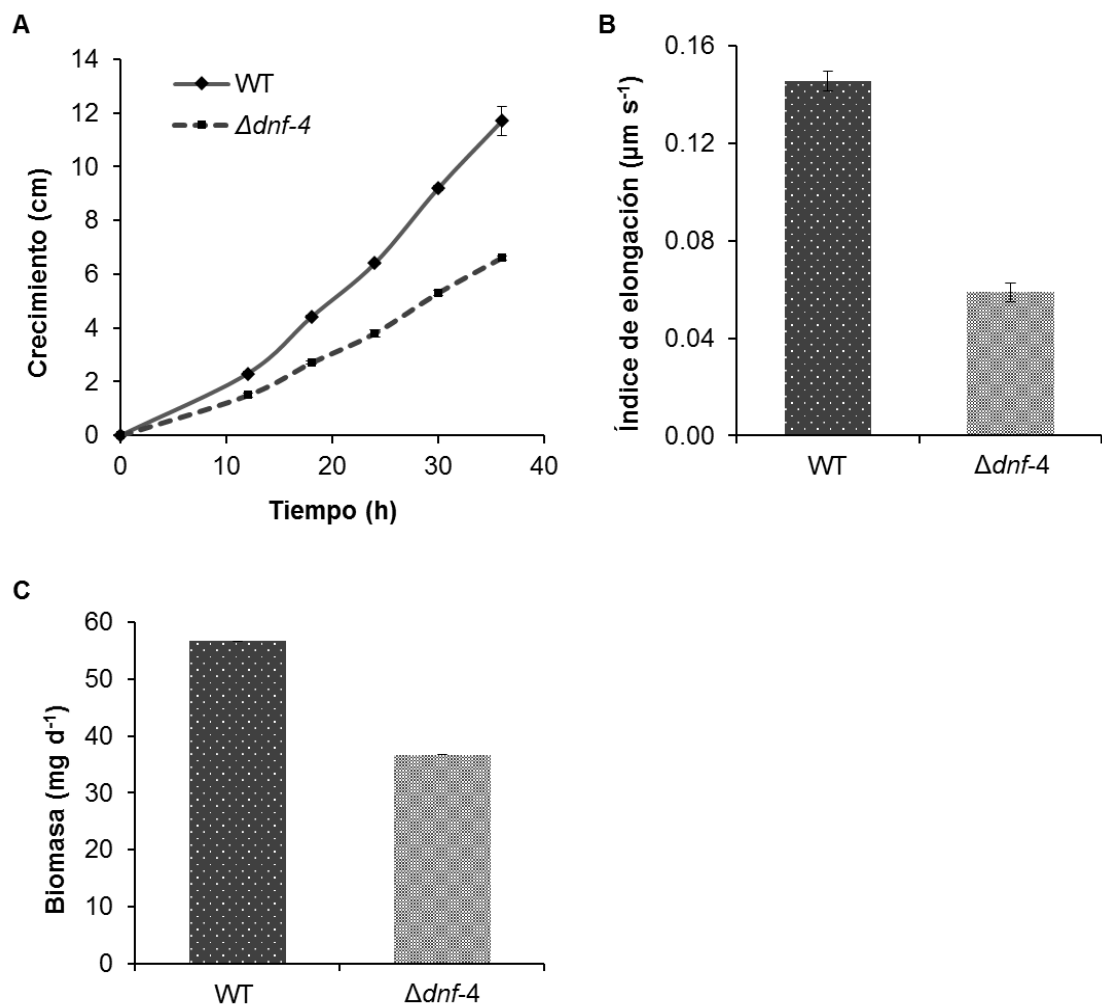


Figura 16. Caracterización de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT. En **A** corresponde a la tasa de crecimiento (cm) durante 36 h de incubación a 30°C. En **B** representación gráfica del índice de elongación de las hifas en $\mu\text{m/s}$. La cepa mutante presenta menor índice de elongación en comparación con la cepa WT (n=9). **C**, biomasa producida durante 24 h de crecimiento en agitación a 30°C. Barras de error muestran el Intervalo de confianza al 95% (**A**) y el error estándar (**B** y **C**).

4.1.2 Caracterización morfológica de hifas maduras de la cepa mutante $\Delta dnf-4$

Otro parámetro que se determinó fue la caracterización morfológica de las hifas de $\Delta dnf-4$ así como las ramificaciones y compararlas con WT. Como podemos apreciar en la **Figura 17A**, la mutante $\Delta dnf-4$ se observó con mayor densidad de hifas y más compactas en comparación con la WT. Al determinar la morfología de la hifa en la mutante $\Delta dnf-4$ mediante microscopia de campo claro (DIC por sus siglas en inglés Differential Interference Contrast), se pudo ver que presentaba bordes irregulares y crecimiento errático a pesar de que aparentemente tienen el mismo grosor que las hifas de la WT (**Figura 17B**). Posteriormente se determinó el número de ramificaciones producidas por la cepa mutante $\Delta dnf-4$, dentro de una distancia de 500 μm desde la punta de la hifa hasta la región distal de la misma ($n=30$), y se observó que en promedio producían de 4 y 5 ramas en la mutante, lo que representa aproximadamente tres veces más formación de ramificaciones comparado con la cepa WT (de 1 a 2 ramificaciones) (**Figura 18**).

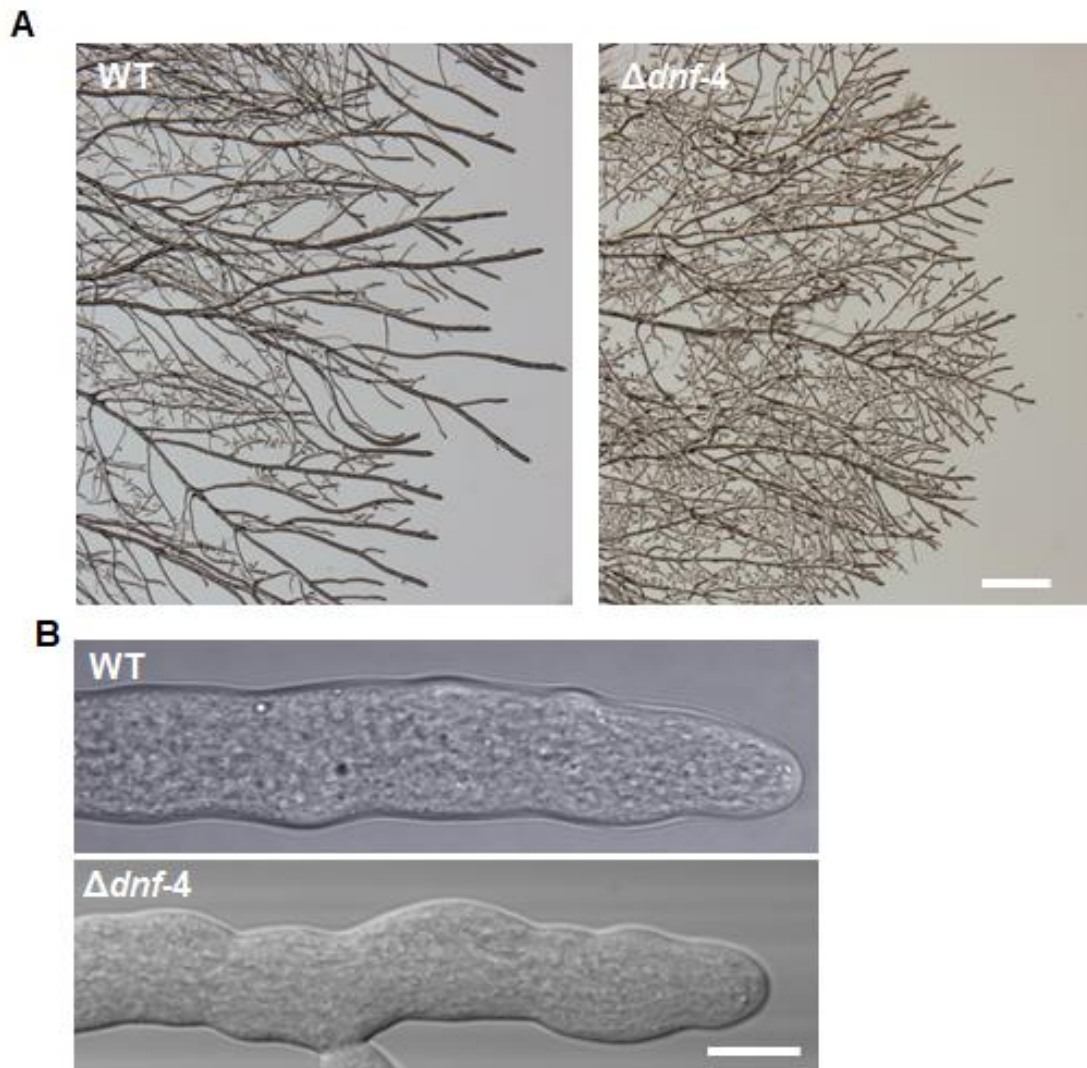


Figura 17. Morfología macroscópica y microscópica de las colonias de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y la WT. En **A**, imágenes que muestra el borde de la colonia de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT. Barra de escala: 500 μm . En **B**, imágenes en campo claro (DIC) de hifas maduras de las cepas $\Delta dnf-4$ y WT. Las hifas en la cepa mutante $\Delta dnf-4$ crece de forma ondulada a diferencia de la WT. Barra de escala: 10 μm .

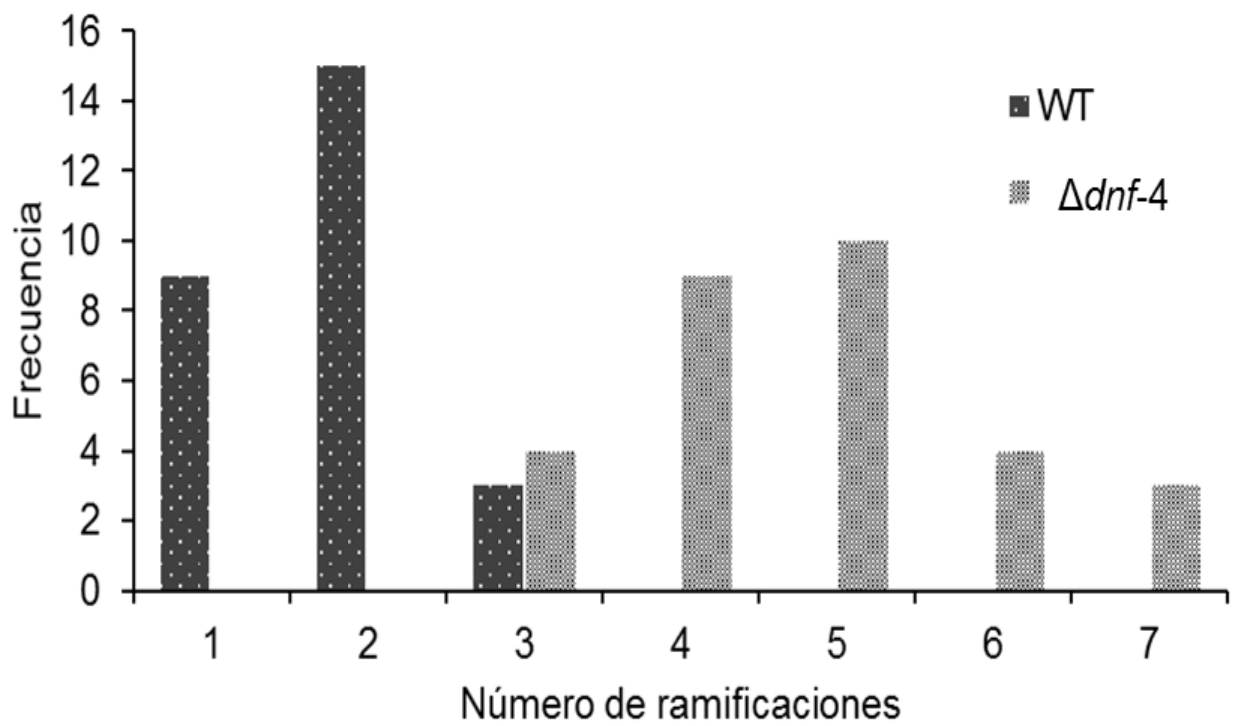


Figura 18. Frecuencia del número de ramificaciones producidas por la cepa la mutante $\Delta dnf-4$ y WT. En la cepa $\Delta dnf-4$ produce de 4 a 5 ramas por hifa, mientras que la cepa WT produce en promedio 2 ramas en una distancia de 500 μm .

4.1.3 Morfología y producción de conidios en la mutante $\Delta dnf-4$

Para determinar si la interrupción de la función del gen *dnf-4* produce defectos en la reproducción asexual en *N. crassa*, se realizaron observaciones de la morfología de los conidios, esto mediante microscopía de campo claro (DIC). Se observó que los conidios en la cepa mutante $\Delta dnf-4$ eran más pequeños y ovalados a diferencia de los conidios redondeados de la cepa WT (**Figura 19A**). Para determinar cuantitativamente la disminución del tamaño, se midió el área de 30 conidios de cada cepa mediante el software Piximètre 5.9 R1520. Como se puede ver en la **Figura 19B**, se observó una disminución del 7.35% de la $\Delta dnf-4$ comparado con la WT. Para determinar si se encuentra alterada la producción de esporas en la cepa mutante, se cuantificó la producción de conidios y cómo se puede ver en la **Figura 20**, la cepa $\Delta dnf-4$ tiene una disminución del 90% en la producción de conidios (2.23×10^7 conidios $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$) en relación a lo que produce la cepa silvestre WT (2.35×10^8 conidios $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$), lo que indica que la función del gen *dnf-4* es muy importante para la esporulación.

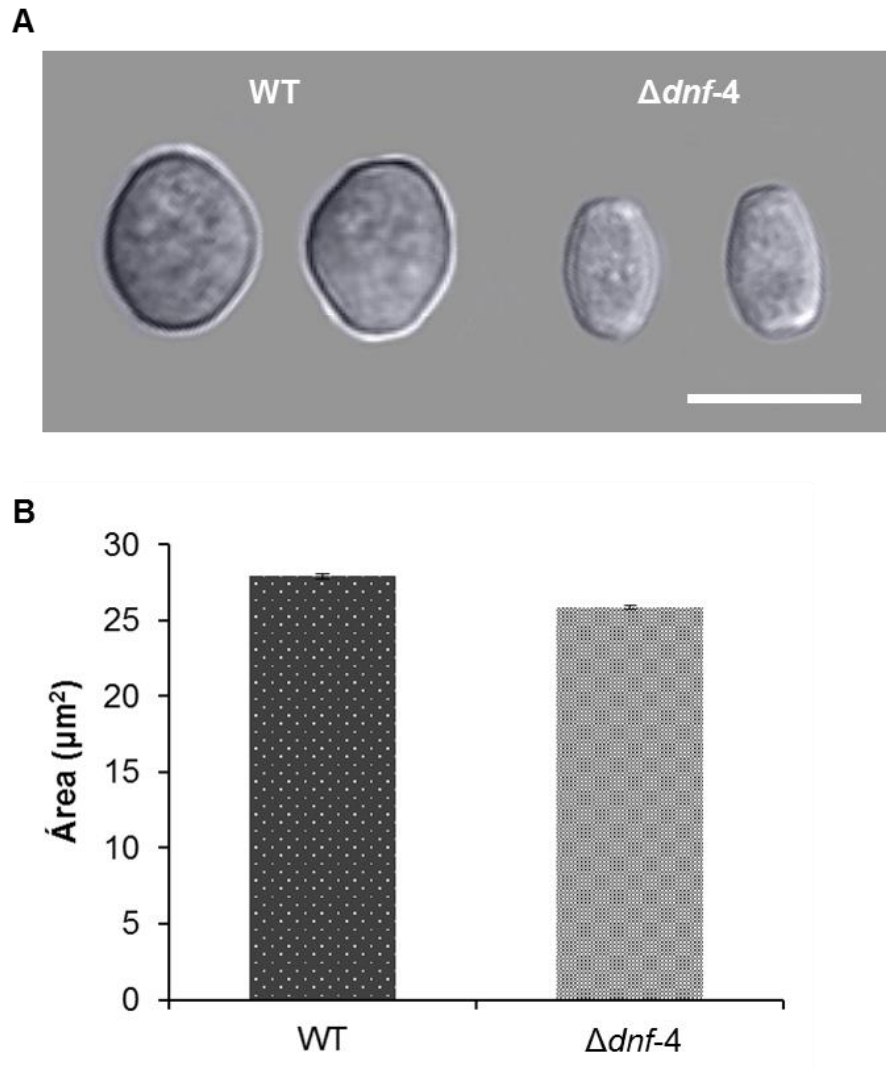


Figura 19. Conidios de la cepa mutante $\Delta dnf-4$. **(A)** Morfología de los conidios de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT. Los conidios en la cepa WT son redondos, mientras que en la mutante $\Delta dnf-4$ se observaron ovalados. Barra de escala: 10 μm . **(B)** Representación gráfica del área de los conidios. El área de los conidios en la mutante $\Delta dnf-4$ es 7.35% menor al área de los conidios en la WT.

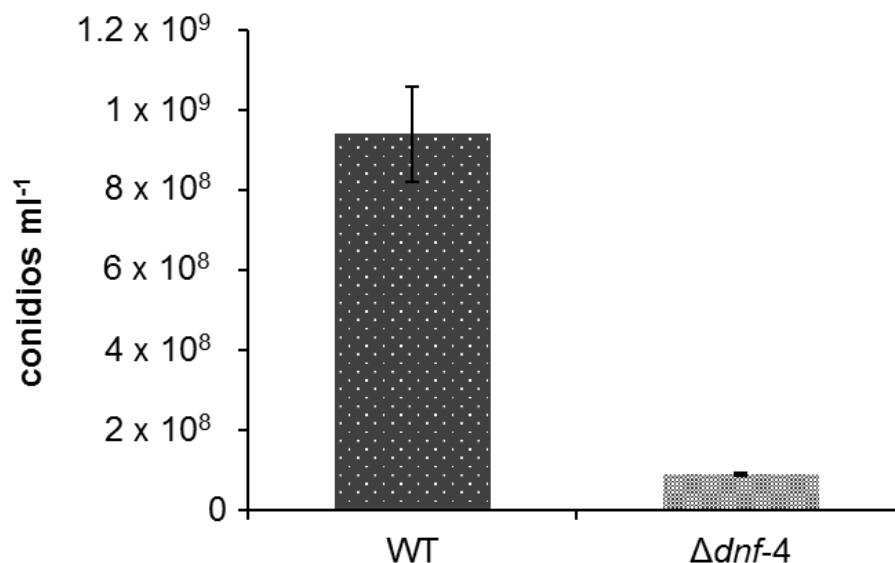


Figura 20. Producción de conidios en la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT recolectados a las 96 h de incubación a 30°C. La cepa mutante $\Delta dnf-4$ produce 90.53% menos que la cepa WT. Barras de error muestran el error estándar.

4.1.4 Comportamiento del Spitzenkörper en la mutante $\Delta dnf-4$

Para conocer con mayor detalle el crecimiento polarizado en hifas maduras en ausencia del gen *dnf-4*, se analizó la organización apical, tiñendo el Spk con el fluoróforo FM4-64 y se realizaron observaciones por microscopia confocal. Como podemos ver en la **Figura 21**, en la mutante $\Delta dnf-4$, se observó un Spk más pequeño, comparado con la WT, con cambios evidentes en la trayectoria conforme crecía la hifa, moviéndose hacia un lado o hacia el otro en

el domo apical produciendo que la hifa creciera ondulada. Estos datos sugieren que la interrupción de la función del gen *dnf-4* altera la estabilidad del Spk, provocando alteraciones en la trayectoria del crecimiento apical de la hifa.

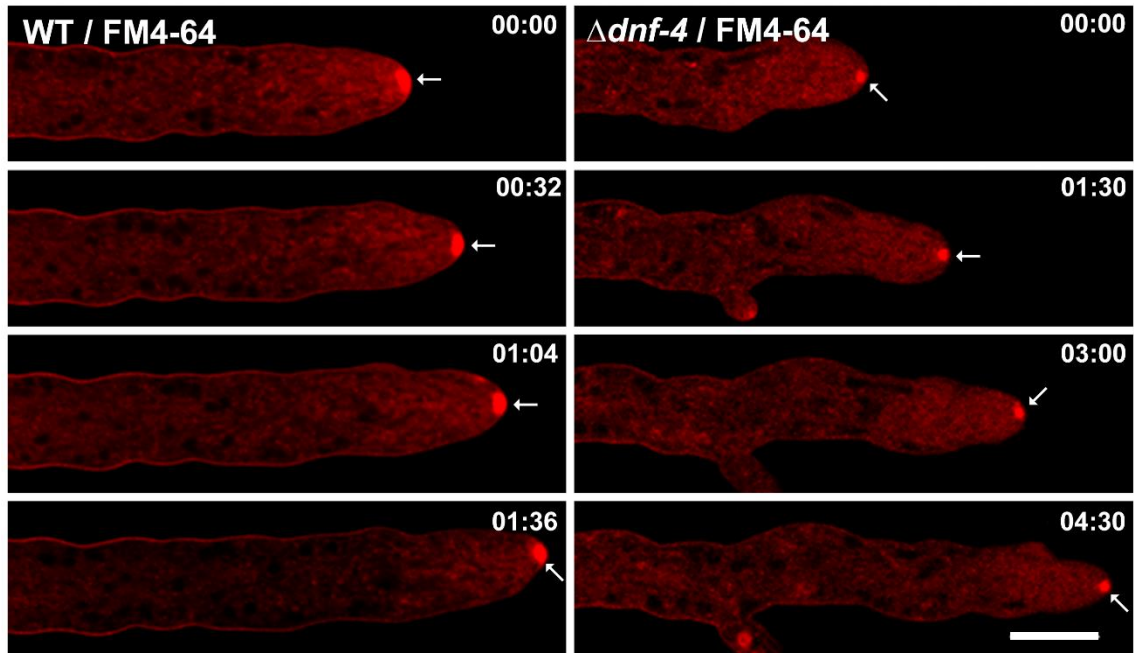


Figura 21. Serie de tiempo del comportamiento del Spk teñido con FM4-64 en hifas maduras de la cepa mutante $\Delta dnf-4$ y WT. El movimiento del Spk (flecha) en la mutante muestra cambios ligeros de dirección de la hifa. Tiempo: m:s; Barra de escala: 10 μ m.

XII. DISCUSIONES

Se conoce que en la maquinaria de secreción en eucariotas, el tráfico organizado de membranas es esencial para realizar diversas funciones, como el transporte de nutrientes (Divito y Amara, 2009), la endocitosis (Platta y Stenmark, 2011), la señalización celular (Groves y Kuriyan, 2010) y la citocinesis (Emoto y Umeda, 2001; Luo y col., 2009). Sin embargo, es poco lo que se conoce a cerca de la maquinaria de secreción y del sistema de tráfico vesicular en hongos filamentosos, ya que no hay estudios que expliquen el mecanismo de organización de las diferentes poblaciones de vesículas en distintas regiones de las hifas. Una probable explicación es la posibilidad de que las poblaciones de vesículas, así como de otros compartimentos membranosos están identificadas por la composición y topología de la membrana que los forman, siendo las flipasas capaces de generar modificaciones cualitativas y cuantitativas en la distribución de aminofosfolípidos y que posiblemente podrían estar involucradas en la correcta distribución de vesículas.

1. Comparación de los dominios de flipasas en *N. crassa*

En el hongo filamentosos *N. crassa* se han identificado tres ATPasas de Tipo-P: DNF-1, DNF-2 y DNF-4 (Murillo-Corona, 2017). Aunque las tres flipasas pertenecen a la misma familia, DNF-4 solo comparte el 30% de identidad con las otras dos proteínas, lo que sugiere que posiblemente estas desempeñan funciones diferentes. En este trabajo se estableció que DNF-4 es el ortólogo de

Neo1p de *S. cerevisiae* y DnfD de *A. nidulans* y el análisis de dominios mostró, que en la región N-terminal y C-terminal de la proteína DNF-4 que contiene el dominio hidrolasa y gran parte del dominio ATPasa Tipo-P, quedan orientados hacia la región citoplasmática, mientras que los dominios transmembranales se encuentran incrustados en la membrana unidos por bucles cortos. La disposición de los dominios de DNF-4 en el modelo estructural, sugiere que la región que abarca los residuos 263-570 corresponde al dominio actuador, y los residuos 617-1124 corresponden dominio de unión a nucleótido. Además, posee un dominio de fosforilación con un motivo conservado de siete aminoácidos (DKTGTLT), y que comparte el 100% de identidad con el motivo presente en la flipasas Neo1p de *S. cerevisiae*, DnfD de *A. nudulans*, ATP9A de humanos, entre otros (Prezant y col., 1996). Por lo tanto, la estructura general y la orientación de los dominios de la proteína DNF-4 en *N. crassa*, sugiere que esta proteína desempeña la función de transporte de fosfolípidos con un mecanismo similar al de todas las flipasas descritas.

2. Localización y dinámica de DNF-4-sGFP

DNF-4 mediante marcaje endógeno con sGFP, mostró estructuras en forma de puntos brillantes fluorescentes distribuidos en la región subapical y distal de la hifa, aparentemente rodeando el RE y el complejo de Golgi, así como la presencia de algunos compartimentos membranosos conteniendo otras estructuras membranosas moviéndose en dirección anterógrada. Estos compartimentos membranosos pudieran estar relacionados a cuerpos

multivesiculares que son una clase de endosomas tardíos, implicados en el transporte de proteínas recién sintetizadas en el RE, así como en el transporte de lípidos y proteínas de membrana que son internalizadas a través de la membrana plasmática (Aguilar-Romero, 2017). Sugiriendo estos datos que DNF-4 podría estar localizada en las membranas del RE, complejo de Golgi y endosomas. Acorde con estas observaciones, esta lo descrito en *S. cerevisiae* donde Neo1p, se encuentra distribuido en las membranas de los mismos compartimentos de la misma manera que ATP9A de humano (Hua y col., 2002; Hua & Graham, 2003; Wu y col., 2016; Tanaka y col., 2016). Otro reporte similar es lo observado con DnfD en *A. nidulans*, donde se ha establecido que esta proteína se encuentra en forma de estructuras irregulares en el citoplasma y que dichas estructuras se ven más abundantes en la región subapical correspondiente a los equivalentes del complejo de Golgi tardío (Schultzhaus y col., 2019).

Por otra parte, se determinó que las partículas fluorescentes de DNF-4 co-localizan parcialmente con CSE-7-mChFP (proteína chaperona residente de RE responsable de monitorear el plegamiento correcto de proteínas) y YPT-1-mChFP (Rab-GTPasa, localizada en cisternas de Golgi y en el núcleo del Spk), confirmando con esto que DNF-4 se encuentra en la membrana del RE y complejo de Golgi.

Estas partículas fluorescentes de DNF-4-sGFP se mueven anterógrada y retrógradamente, a diferentes velocidades, sugiriendo que DNF-4 podría estar involucrada en el intercambio de fosfolípidos en las vesículas que viajan a través de la ruta secretora. Acorde con esto, previos estudios mostraron que Neo1p es necesaria para una vía de transporte anterógrado de proteínas entre el RE y complejo de Golgi dependiente de COPII y en el movimiento retrogrado dependiente de COPI entre el complejo de Golgi y el RE (Hua y col., 2002, Hua y col., 2003, Wu y col., 2016).

Mediante experimentos de fotoblanqueamiento y usando drogas que afectan el citoesqueleto de actina y microtubular, se determinó que las partículas fluorescentes de DNF-4 que tienen movimiento pasivo y en sentido anterógrado es a través del flujo citoplasmático, mientras que aquellas partículas que se mueven en sentido retrogrado y movimiento activo lo hacen a través del citoesqueleto microtúbular. Parte de estos resultados concuerda con lo descrito con DnfA y DnfB de *A. nidulans*, donde describen que la despolimerización de los microtúbulos altera la dinámica de estas flipasas, indicando que estas proteínas probablemente son conducidas por proteínas motoras asociadas a los microtúbulos (Schultzhaus y col., 2015).

3. Efecto de la ausencia del gen *dnf-4* en *N. crassa*

Dentro de las flipasas en *S. cerevisiae*, solo el gen *neo1* se reconoce como esencial y aparentemente es funcionalmente distinto a los genes *drs2/dnf* (Hua

y col., 2002), por lo que se generó una mutante condicional de Neo1p, la cual produjo acumulaciones de pequeñas vesículas, vacuolas fragmentadas, así como estructuras anormales de membrana que probablemente son cisternas de Golgi y RE expandido, lo que sugiere un defecto general en el tránsito de membrana a través de la vía secretora (Hua y col., 2003).

En otro estudio con la ATP9A de humanos, la cual es una flipasa de fosfolípido, se observó que la ausencia de esta proteína no es letal y que además no influye en la biogénesis de los endosomas o en la integridad del complejo de Golgi, pero afecta el reciclaje de los endosomas hacia la membrana plasmática (Tanaka y col., 2016). Del mismo modo, en *C. elegans* el gen que codifica para la flipasa TAT-5, su ausencia provoca el desprendimiento de vesículas extracelulares y altera la adhesión celular produciendo defectos en su morfología (Wehman y col., 2011). Por otra parte, en *A. nidulans* se ha descrito que la interrupción del gen *dnfD*, ortólogo de *neo1*, produce conidióforos deformes, donde se observan malformación de las vesículas, alterando las méulas y como consecuencia produciendo una fuerte disminución en la producción de esporas (Schultzhaus y col., 2019). En el presente estudio se demostró que en *N. crassa*, la ausencia del gen *dnf-4* no resulta ser letal, sin embargo, el fenotipo fue anormal. La cepa $\Delta dnf-4$ produce colonias pequeñas, con hifas que crecen a menor velocidad de forma ondulada, observándose una evidente disminución en la producción de biomasa, un aumento en la formación de ramificaciones, lo que nos indica que probablemente la ausencia de *dnf-4*

produce alteraciones en la distribución de fosfolípidos, esto asociado a defectos en la clasificación y secreción de las vesículas que van del RE a complejo de Golgi y viceversa, produciendo defectos en la morfología y crecimiento celular.

Además de las observaciones de la morfología y el índice de elongación de la mutante $\Delta dnf-4$, se determinó el comportamiento del Spk, donde se observaron cambios ligeros en la trayectoria; sin embargo, este movimiento fue menos evidente comparado con la trayectoria del Spk observada en la mutante $\Delta dnf-2$ por Murillo-Corona, 2017. Este comportamiento, refuerza la idea de que la flipasa DNF-4 podría estar implicada en la organización de las vesículas en la región subapical donde se localiza el RE y complejo de Golgi a diferencia de DNF-2 que participa en la estabilidad del Spk y crecimiento celular.

4. Reproducción asexual en la mutante *dnf-4*

El análisis de la reproducción asexual en ausencia del gen *dnf-4*, reveló resultados similares a los reportados para las cepas mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-2$ en *N. crassa* (Murillo-Corona, 2017). La ausencia de cualquiera de las tres flipasas altera la producción de conidios observándose más evidente la disminución en las mutantes $\Delta dnf-1$ y $\Delta dnf-4$. Acorde con esto, es lo descrito en *A. nidulans*, donde la cepa mutante *dnfD* Δ mostró una disminución dramática en la producción de conidios (Schultzhaus y col., 2019) Esta reducción en la producción podría ser resultado de alteraciones en el tráfico vesicular debido a

defectos en la clasificación de las vesículas, disminuyendo así la secreción y como consecuencia impidiendo la formación de conidios.

XIII. CONCLUSION

En este trabajo se demostró que DNF-4 se encuentra distribuido en equivalentes de RE y complejo de Golgi probablemente participando en el tráfico de membranas en la vía secretora. Además, la interrupción de la función del gen $\Delta dnf-4$ no es letal, pero causa defectos en el crecimiento polarizado, observándose más afectada en la producción de conidios en *N. crassa*.

XIV. BIBLIOGRAFÍA:

1. Aguilar Romero, A. A. (2017). Identificación de Cuerpos Multivesiculares en *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 60 pp. Recuperado de <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/973>
2. Møller, J. V, Juul, B., & Le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286(1), 1-51. doi: 10.1016/0304-4157(95)00017-8
3. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. Recuperado de <https://www.worldcat.org/title/introductory-mycology/oclc/647694345>
4. Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (1998). Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1), 84–101. doi: 10.1007/PL00006286
5. Baldridge, R. D., & Graham, T. R. (2012). Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), E290–E298. doi: 10.1073/pnas.1115725109
6. Barbosa, S., Pratte, D., Schwarz, H., Pipkorn, R., & Singer-Krüger, B. (2010). Oligomeric Dop1p is Part of the Endosomal Neo1p-Ysl2p-Arl1p Membrane Remodeling Complex. *Traffic*, 11(8), 1092–1106. doi:

10.1111/j.1600-0854.2010.01079.x

7. Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, 22, 87-108. doi: 10.1146/annurev.mi.22.100168.000511
8. Bartnicki-Garcia, S. (1990). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*. Recuperado de <https://ci.nii.ac.jp/naid/10014756964/>
9. Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R., & Bracker, C. E. (1995). Evidence That Spitzenkörper Behavior Determines the Shape of a Fungal Hypha: A Test of the Hyphoid Model. *Experimental Mycology*, 19(2), 153–159. doi: 10.1006/emyc.1995.1017
10. Bitbol, M., Fellmann, P., Zachowski, A., & Devaux, P. F. (1987). Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 904(2), 268–282. doi: 10.1016/0005-2736(87)90376-2
11. Bourett, T. M., & Howard, R. J. (1991). Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. *Protoplasma*, 163(2–3), 199–202. doi: 10.1007/BF01323344
12. Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nature New Biology*, 236(61), 11–12. doi: 10.1038/newbio236011a0

-
-
13. Conesa, A., Punt, P. J., Van Luijk, N., & Van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*, 33(3), 155–171. doi: 10.1006/fgbi.2001.1276
14. Daleke, D. L. (2007). Phospholipid flippases. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 821–825. doi: 10.1074/jbc.R600035200
15. Daleke, D. L., & Huestis, W. H. (1985). Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry*, 24(20), 5406–5416. doi: 10.1021/bi00341a019
16. Davis, R. H. (2000). *Neurospora: contributions of a model organism*. Oxford University Press.
17. Divito, C. B., & Amara, S. G. (2009). Close encounters of the oily kind: regulation of transporters by lipids. *Molecular Interventions*, 9(5), 252–262. doi: 10.1124/mi.9.5.8
18. Emoto, K., & Umeda, M. (2001). Membrane lipid control of cytokinesis. *Cell Structure and Function*, 26(6), 659–665. doi: 10.1247/csf.26.659
19. Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D.,... Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–968. doi: 10.1038/nature01554
20. Beadle and Tatum. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Genetics*, 499–506. Recuperado de
-
-

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1078370/pdf/pnas01634-0009.pdf>

21. Girbardt, M. (1969). Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypen. *Protoplasma*, 67(4), 413–441. doi: 10.1007/BF01254905
22. Grove, S. N., & Bracker, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology*, 104(2), 989–1009. Recuperado de <https://jlb.asm.org/content/104/2/989.long>
23. Groves, J. T., & Kuriyan, J. (2010). Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 659–665. doi: 10.1038/nsmb.1844
24. Hankins, H. M., Baldridge, R. D., Xu, P., & Graham, T. R. (2015). Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*, 16(1), 35–47. doi: 10.1111/tra.12233
25. Heath, I. B. (Ian B. (1990). *Tip growth in plant and fungal cells*. Academic Press.
26. Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536–553. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3070323>
27. Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. (2004). Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63–87. doi: 10.1016/S0580-

9517(04)34003-1

28. Horio, T. (2007). Role of microtubules in tip growth of fungi. *Journal of Plant Research*, 120(1), 53–60. doi: 10.1007/s10265-006-0043-2
29. Howard, R. J. (1980). Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze- substitution of hyphal tip cells. *The Journal of Cell Biology*, 87(1), 55–64. <https://doi.org/10.1083/jcb.87.1.55>
30. Howard, R. J. (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkorper, cytoskeleton and endomembranes after freeze- substitution. *Journal of Cell Science*, 48(1). Recuperado de <http://jcs.biologists.org/content/48/1/89.short>
31. Hua, Z., Fatheddin, P., & Graham, T. R. (2002). An Essential Subfamily of Drs2p-related P-Type ATPases Is Required for Protein Trafficking between Golgi Complex and Endosomal/Vacuolar System. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 3162–3177. doi: 10.1091/mbc.e02-03-0172
32. Hua, Z., & Graham, T. R. (2003). Requirement for Neo1p in Retrograde Transport from the Golgi Complex to the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 14(12), 4971–4983. doi: 10.1091/mbc.e03-07-0463
33. Hunsley, D., & Burnett, J. H. (1970). The Ultrastructural Architecture of the Walls of Some Hyphal Fungi. *Journal of General Microbiology*, 62(2), 203–218. doi: 10.1099/00221287-62-2-203

-
-
34. IBS (V. 1.0) [Software]. (2009). Obtenido de <http://ibs.biocuckoo.org>
35. InterPro (V. 74) [Software]. (1999). Obtenido de <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
36. Kühlbrandt, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 282–295. doi: 10.1038/nrm1354
37. Luo, J., Matsuo, Y., Gulis, G., Haylee Hinz, Patton-Vogt, J., & Marcus, S. (2009). Phosphatidylethanolamine Is Required for Normal Cell Morphology and Cytokinesis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, 8(5), 790–799. doi: 10.1128/EC.00029-09
38. Margolin, B. S., Freitag, M., & Selker, E. U. (1997). Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genetics Reports*, 44, 13. doi: 10.4148/1941-4765.1281
39. Marx, U., Polakowski, T., Pomorski, T., Lang, C., Nelson, H., Nelson, N., & Herrmann, A. (1999). Rapid transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues in the plasma membrane of endocytosis-deficient yeast cells does not require the Drs2 protein. *The FEBS Journal*. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00497.x
40. Mouriño-Pérez, R. R., Roberson, R. W., & Bartnicki-García, S. (2006). Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(6), 389–400. doi: 10.1016/J.FGB.2005.10.007
-
-

-
-
41. Murillo Corona, I. (2017). Dinámica de la flipasa de fosfolípidos DNF-2 y su papel en el crecimiento polarizado en *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 49 pp. Recuperado de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1045>
42. Muthusamy, B. P., Natarajan, P., Zhou, X., & Graham, T. R. (2009). Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 612–619. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.03.004
43. Op den Kamp, J. A. F. (1979). Lipid Asymmetry in Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 47–71. doi: 10.1146/annurev.bi.48.070179.000403
44. Paulusma, C. C., & Oude Elferink, R. P. J. (2005). The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1741(1–2), 11–24. doi: 10.1016/J.BBADIS.2005.04.006
45. Piximètre (V. 59) [Software]. Obtenido de <http://ach.log.free.fr/Piximetre/New.htm>
46. Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 393–403. doi: 10.1016/J.CEB.2011.03.008
47. Pomorski, T., Holthuis, J., Hermann, A., and Meer, G. (2004). Tracking
-
-

-
-
- down lipid flippases and their biological functions. *Journal of Cell Science*, 117(6), 805–813. doi: 10.1242/jcs.01055
48. Pontón, J., Rüchel, R., Clemons, K. V., Coleman, D. C., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise, T., Cano, J., Carrillo, J., Gené, J., Pinel, C., Stevens, D. A., Sullivan, D. J. (2000). Emerging pathogens. *Medical Mycology*, 38(s1). doi: 10.1080/mmy.38.s1.225.236
49. Powers-Fletcher, M. V, Kendall, B. A., Griffin, A. T., & Hanson, K. E. (2016). Filamentous Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0002-2015
50. Prezant, T. R., Chaltraw, W. E. j., & Fischel-Ghodsian, N. (1996). Identification of an overexpressed yeast gene which prevents aminoglycoside toxicity. *Microbiology*, 142(12), 3407–3414. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3407>
51. Rico Ramírez, A. M. 2018. Biogénesis y tráfico de quitosomas acarreadores de la CHS-4, una quitina sintasa clase IV, en hifas de *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 77 pp. Recuperado de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2076>
52. Ripmaster, T. L., Vaughn, G. P., & Woolford, J. L. (1993). DRS1 to DRS7, novel genes required for ribosome assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12),
-
-

7901–7912. doi: 10.1128/MCB.13.12.7901

53. Roberson, R. W., & Vargas, M. M. (1994). The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*, 182(1–2), 19–31. doi: 10.1007/BF01403685
54. Roland, B. P., & Graham, T. R. (2016). Directed evolution of a sphingomyelin flippase reveals mechanism of substrate backbone discrimination by a P4-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(31), E4460–E4466. doi: 10.1073/pnas.1525730113
55. Sánchez León-Hing, E.F. (2015). Biogénesis, transporte y localización de vesículas secretoras en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Recuperado de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/642>
56. Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Hanamatsu, H., Kato, U., Umeda, M., Kozminski, K. G., & Tanaka, K. (2007). Transbilayer Phospholipid Flipping Regulates Cdc42p Signaling during Polarized Cell Growth via Rga GTPase-Activating Proteins. *Developmental Cell*, 13(5), 743–751. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2007.09.014
57. Sartorel, E., Barrey, E., Lau, R. K., & Thorner, J. (2014). Plasma membrane aminoglycerolipid flippase function is required for signaling competence in the yeast mating pheromone response pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), 134–150. doi: 10.1091/mbc.e14-07-

-
-
58. Schroit, A. J., & Zwaal, R. F. A. (1991). Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1071(3), 313–329. doi: 10.1016/0304-4157(91)90019-S
59. Schultzhaus, Z., Cunningham, G. A., Mouriño-Pérez, R. R., & Shaw, B. D. (2019). The phospholipid flippase DnfD localizes to late Golgi and is involved in asexual differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, 111(1), 13–25. doi: 10.1080/00275514.2018.1543927
60. Schultzhaus, Z., Yan, H., & Shaw, B. D. (2015). A *aspergillus nidulans* flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB. *Molecular Microbiology*, 97(1), 18–32. doi: 10.1111/mmi.13019
61. Seigneuret, M., & Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: Relation to shape changes (phospholipid asymmetry/transverse diffusion/erythrocyte shape/bilayer couple/electron spin resonance). *Cell Biology*, 81, 3751–3755. doi: 10.1073/pnas.81.12.3751
62. Siegmund, A., Grant, A., Angeletti, C., Malone, L., Nichols, J. W., & Rudolph, H. K. (1998). Loss of Drs2p Does Not Abolish Transfer of Fluorescence-labeled Phospholipids across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51),
-
-

34399–34405. doi: 10.1074/jbc.273.51.34399

63. Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jämsä, E., Dirac-Svejstrup, B., & Warren, G. (1998). A Role for Giantin in Docking COPI Vesicles to Golgi Membranes. *The Journal of Cell Biology*, 140(5), 1013–1021. doi: 10.1083/JCB.140.5.1013
64. Tanaka, Y., Ono, N., Shima, T., Tanaka, G., Katoh, Y., Nakayama, K., ... Shin, H.-W. (2016). The phospholipid flippase ATP9A is required for the recycling pathway from the endosomes to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 27(24), 3883–3893. doi: 10.1091/mbc.e16-08-0586
65. Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., & Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, 272(5267), 1495–1497. doi: 10.1126/science.272.5267.1495
66. *The Pfam protein families database in 2019*: S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani, S.C. Potter, M. Qureshi, L.J. Richardson, G.A. Salazar, A. Smart, E.L.L. Sonnhammer, L. Hirsh, L. Paladin, D. Piovesan, S.C.E. Tosatto, R.D. Finn, **Nucleic Acids Research** (2019) doi: 10.1093/nar/gky995
67. Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529–535. doi: 10.1038/nature02680

-
-
68. Trinci, A. P. J., Wiebe, M. G., & Robson, G. D. (1994). The Mycelium as an Integrated Entity. In *Growth, Differentiation and Sexuality* (pp. 175–193). doi: 10.1007/978-3-662-11908-2_10
69. Uchida, M., Mouriño-Pérez, R. R., & Roberson, R. W. (2010). *Live-Cell Imaging of Microtubule Dynamics in Hyphae of Neurospora crassa*. doi: 10.1007/978-1-60761-611-5_19
70. Vance, J. E., & Vance, D. E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 82(1), 113–128. doi: 10.1139/o03-073
71. Wainwright, M. (1992). An introduction to fungal biotechnology. *An Introduction to Journal of Cell Biology*, . doi: 10.1083/jcb.140.5.1013
72. Walsh, T. J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., & Anaissie, E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 48–66. doi: 10.1111/j.1470-9465.2004.00839.x
73. Wehman, A. M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B. D., & Nance, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Current Biology*, 21(23), 1951–1959. doi: 10.1016/j.cub.2011.10.040
74. Wicky, S., Schwarz, H., & Singer-Krüger, B. (2004). Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking
-
-

-
-
- within the endomembrane system. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7402–7418. doi: 10.1128/MCB.24.17.7402-7418.2004
75. Wu, Y., Takar, M., Cuentas-Condori, A. A., & Graham, T. R. (2016). Neo1 and phosphatidylethanolamine contribute to vacuole membrane fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular Logistics*, 6(3), e1228791. doi: 10.1080/21592799.2016.1228791
76. Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981. doi: 10.1016/J.FGB.2004.08.001
77. Zachowski, A., Henry, J.-P., & Devaux, P. F. (1989). Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, 340(6228), 75–76. doi: 10.1038/340075a0
78. Zhang, C., Freddolino, P. L., & Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res*, 45(W1), W291-w299. doi: 10.1093/nar/gkx366
79. Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W174-181. doi: 10.1093/nar/gkv342
-
-

XV. APÉNDICE

Apéndice 1. Medios de cultivo y soluciones

Solución de elementos traza (100 ml)

- Disolver en 75 mL de agua destilada las siguientes sustancias:
- Ácido cítrico · H₂O 5 g
- ZnSO₄ · 7H₂O 5 g
- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O 1 g
- CuSO₄ · 5H₂O 0.25 g
- H₃BO₃ anhidro 0.05 g
- Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.05 g
- MnSO₄ · H₂O 0.05 g
- (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.35 g
- Aforar con agua destilada.
- Almacenar a 4° C.

Solución de biotina 0.1 M (10 mL)

- Biotina 0.25 g
- Aforar con agua destilada.
- Almacenar a -20°C.

Medio Mínimo de Vogel agar 1.5% (1 L)

- Sacarosa 15 g
- Sales de Vogel 20 ml
- Agar 15 g
- Aforar con agua destilada.
- Esterilizar por autoclave.

Medio Mínimo de Vogel agar 1.5% + higromicina + histidina

- MMV 1 ml
- Higromicina 50 mg/ml 3 µl en 1 ml de medio
- Histidina 25 mg/ml 2 ml en 50 ml de medio

Medio Mínimo de Vogel líquido (1 L)

- Sacarosa 15 g
- Sales de Vogel 20 ml
- Aforar con agua destilada.
- Esterilizar por autoclave.

Sales de Vogel 50x (1 L)

- En 600 mL de agua destilada disolver en orden las siguientes sustancias:
- Citrato de sodio 117.5 g
- KH₂PO₄ 250 g
- NH₄NO₃ 100 g
- MgSO · 7H₂O 10 g
- Solución de elementos traza 5 ml
- Solución de biotina 100 ml
- Aforar con agua destilada.
- Agregar 2 mL de cloroformo como conservador.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Sorbitol 1 M (1 L)

- Sorbitol 182.17 g
- Aforar con agua destilada.
- Esterilizar por autoclave.

Gel electroforesis 1% (100 mL)

-
-
- Agarosa 1 g
 - Bromuro de Etidio 2 μ l
 - Aforar con TAE 1x

FM4-64 5 μ M (1 mL)

- FM4-64 1.6 mM 3.4 μ l
- Agua destilada HPLC 996.6 μ l

L-Histidina (50 mL)

- L-Histidina 1.25 g
- Esterilizar por filtración.

TAE 50 X (1 L)

- Tris-base 242 g
- Ácido acético glacial 57.1 ml
- EDTA 0.5 M pH 8.0 100 ml
- Aforar con agua destilada.

Benomilo 10 μ g mL⁻¹ (1 mL)

- Benomilo 10 mg
- Etanol 1ml