

Universidad Autónoma de Baja California



**Localización de proteínas SNARE en el hongo
filamentoso *Neurospora crassa***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

YESENIA TAMAYO MUETT

Ensenada, B.C.

Septiembre de 2017

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS SNARE EN EL HONGO FILAMENTOSO
NEUROSPORA CRASSA

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

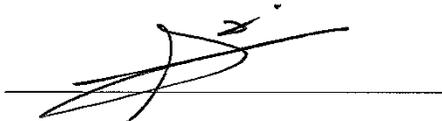
YESENIA TAMAYO MUETT

APROBADO POR:



DRA. MERITXELL RIQUELME PÉREZ

Presidente del Jurado



DR. JULIO VALENCIA SUÁREZ

SECRETARIO



DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES

IER. VOCAL

Resumen de la tesis de **Yesenia Tamayo Muett** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 2017.

Localización de proteínas SNARE en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*
Resumen aprobado por:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Presidente del jurado

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es un modelo experimental ideal para estudios genéticos, bioquímicos y celulares gracias a su genética ortodoxa, constitución haploide, susceptibilidad a la mutagénesis y fácil cultivo. A través de este hongo, es posible estudiar la ruta de secreción proteica y su relación con el crecimiento apical polarizado, el cual requiere la síntesis y orientación selectiva de proteínas, lípidos y bloques de construcción de paredes celulares hacia dominios específicos de la membrana plasmática (MP) apical. El tráfico de membrana es esencial para generar y mantener la polaridad. La ruta secretora clásica, distribuye las proteínas sintetizadas desde el retículo endoplásmico (RE), a través del Golgi, hasta su destino final. Las proteínas SNARE son elementos importantes en las últimas etapas de la ruta secretora, ya que facilitan el anclaje y fusión entre una membrana vesicular (v-SNARE) y una membrana diana (t-SNARE) para que ocurra la exocitosis. En levaduras, las sintaxinas Sso1p y Sso2p, parecen actuar como t-SNAREs que residen y funcionan en su MP. En *A. nidulans*, se reportó que la sintaxina SSOA es homóloga a la Sso1p de levadura y se localiza en la MP. La SYN-1 de *N. crassa* fue reportada anteriormente como una v-SNARE. Bajo el conocimiento de que la interacción se da entre t-SNAREs y v-SNAREs, el objetivo de este trabajo es determinar la localización de la sintaxina SSO-1 de *N. crassa* y su posible interacción con la v-SNARE SYN-1. Esto se determinó a través de técnicas de microscopía confocal en cepas de *N. crassa* que expresaron dicho componente t-SNARE etiquetado con la proteína roja fluorescente (mChFP). Se encontró una acumulación de mChFP-SSO-1 en la región subapical de las hifas de *N. crassa* en una red endomembranal tubular (posiblemente retículo endoplásmico, RE) y no presentó co-localización con la v-SNARE GFP-SYN-1. Esta localización, en combinación con el análisis de su secuencia aminoacídica, sugiere que SSO-1 está anclada a la membrana del RE, con su extremo N-terminal orientado hacia el lumen del RE y el C-terminal hacia el citosol. Sin embargo, se requieren de más análisis para determinar en qué tipo de ruta secretora participa la SSO-1 y con qué tipo de SNARE interactúa.

Palabras clave: *Neurospora crassa*, ruta secretora, SNARE, SSO-1, SYN-1, CHS-1, GS-1.

Dedicatoria

A la memoria de mi hermano Rafael.

A mi familia.

Agradecimientos

A Meritxell Riquelme Pérez, por toda la confianza en mí, su tiempo y paciencia, por dirigir este trabajo siempre con la mejor disposición, por sus valiosos comentarios y correcciones a este trabajo, por ser un ejemplo para ser cada día una mejor persona y por hacerme sentir parte de un gran equipo.

A Leonora Martínez Nuñez, por haberme enseñado con tanta paciencia cuando sentía que todo estaba en chino, por su dedicación y esmero a mi aprendizaje, por todo el tiempo invertido, por todos esos consejos y dibujos que tanto me han servido hasta la fecha y por ser para mí un gran ejemplo de superación.

A Olga Callejas Negrete, por el tiempo dedicado a enseñarme técnicas en el laboratorio tan pacientemente, por siempre tener un buen consejo y palabras que me ayudaron a recobrar ánimo.

A Julio Valencia Suárez, por siempre tener la mejor disposición para ayudarme a resolver problemas durante mi estancia en UABC, por sus valiosos consejos y observaciones a este trabajo, por ser uno de los mejores y más admirables maestros que he tenido en mi vida.

A Adriana Rico Ramírez, por todo el apoyo y tiempo dedicado a mi aprendizaje de manera incondicional, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por su gran paciencia, por ser mi guía en los experimentos realizados para este trabajo, por ayudarme a salir adelante cuando nada salía bien y brindarme su amistad.

A Faustino Camarena Rosales, quién me enseñó con su ejemplo la importancia de la pasión, entrega y dedicación en cualquier trabajo que se desempeñe. Por ser un maestro incomparable de quien me llevo las mejores enseñanzas y recuerdos.

A mis padres, les agradezco infinitamente por todo, sin su amor, apoyo y confianza nada de esto hubiese sido posible.

A René Navarro Labastida, por ser mi héroe, por compartir conmigo todo este tiempo, por estar siempre dispuesto a apoyarme y rescatarme en todas las formas que alguien puede ser rescatado, por darme la motivación e impulso de seguir adelante y nunca rendirme, por todos sus consejos y observaciones a este trabajo, por enseñarme tanto.

A los estudiantes de posgrado en CICESE, Fausto Villavicencio por siempre tener una respuesta y solución a todo, por dedicarme tiempo de enseñanzas y preocuparse por mí; Luvia Vargas por demostrar interés en este trabajo y brindarme su apoyo y consejos; Arianne Ramírez del Villar, por siempre estar dispuesta a ayudarme en cualquier cosa, a todos por hacer más agradable mis horas de estudio.

A mis compañeras de cumbias Michelle Villalobos Cristerna y Noraida Estefan Casillas, por su amistad, por ayudarme a sobrevivir a la carrera con salud mental.

Por último agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Departamento de Microbiología por brindarme el apoyo económico necesario para realizar y concluir este trabajo.

	Página
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x

Tabla de Contenido

	Página
1. Introducción y antecedentes.	11
1.1. Biología de los hongos.	11
1.2. <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudio.	12
1.3. Ruta de secreción proteica y crecimiento apical.	12
1.4. Nomenclatura y función de los SNAREs.....	13
1.5. Los SNAREs en la exocitosis.	15
1.6. Relación del exocisto, los SNAREs vesiculares y el Spitzenkörper.	17
1.7. El papel de las sintaxinas como SNAREs de membrana diana.....	20
2. Justificación.	27
3. Objetivo general.	28
3.1. Objetivos específicos.	28
4. Hipótesis.	29
5. Materiales y Métodos	30
5.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.	30
5.1.1. Cepas.....	30
5.1.2. Medios de cultivo para <i>N. crassa</i>	30
5.1.3. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	31
5.1.4. Condiciones de cultivo, obtención y recuperación de conidios.....	32
5.2. Obtención y recuperación de micelio para extracción de ADN genómico.	33
5.3. Extracción de ADN genómico a partir de micelio.	33
5.4. Diseño de oligonucleótidos y plásmidos.	33
5.5. Estrategia de etiquetamiento de la proteína SSO-1 con mChFP en el extremo N-terminal.	34
5.6. Análisis y herramientas bioinformáticas.	36

5.7.1. Localización de dominios en SSO-1 <i>in silico</i>	36
5.7. Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>sso-1</i>	37
5.8. Restricción, ligación de vector e inserto.	37
5.9. Generación y selección de transformantes de <i>E. coli</i>	38
5.10. Transformación en <i>Neurospora crassa</i>	39
5.11. Selección de colonias prototróficas.	40
5.12. Microscopía confocal	40
5.13. Co-expresión de mChFP-CHS-1 y mChFP-GS-1 con SYN-1.....	41
6. Resultados.	41
6.1. Análisis filogenético de syntaxinas.	42
6.2. Distribución de la t-SNARE SSO-1.	43
6.2.1. Resultados de técnicas moleculares.	43
6.2.2. Resultados de microscopía confocal.....	48
7. Discusiones.	53
7.1. Alineamiento múltiple de motivo SNARE en syntaxinas homólogas.	53
7.2. Distribución de la t-SNARE SSO-1.	53
7.3. Localización subcelular de la proteína SSO-1.....	57
7.4. Co-expresión de CHS-1-m-ChFP y GS-1-mChFP con SYN-1.	60
8. Conclusiones.	61
Lista de referencias bibliográficas	62

Lista de figuras

Figura	Página
1 Estructura de los dominios de una t-SNARE.....	14
2 Aparato apical secretor de la hifa.....	15
3 La reducción de Snc2 o el bloqueo de su internalización hacia la MP conduce a una deslocalización de una subunidad del exocisto.....	17
4 Localización de la GFP-SynA y ABPA-mRFP en hifas de <i>A. nidulans</i>	18
5 Localización de una v-SNARE.....	19
6 Localización de la syntaxina SSOA en hifas de <i>A. nidulans</i>	22
7 Micrografías electrónicas de células de levadura, 12 horas después del cambio de glucosa en el medio.....	23
8 Imágenes en pseudo-color realizando ápices de hifas de <i>N. crassa</i> inmunoteñidas con anti Sso2p de afinidad purificado.....	24
9 Relación espacial de GS-1-GFP y CHS-1-mChFP.....	25
10 Estrategia de etiquetamiento del gen <i>sso-1</i> con <i>mchfp</i>	34
11 Representación esquemática lineal de los dominios de SSO-1 de <i>N. crassa</i>	35
12 Alineamiento múltiple de secuencias de syntaxinas homólogas a Sso1p en <i>S. cerevisiae</i>	41
13 Amplicón de <i>sso-1</i> obtenido por PCR.....	42
14 Amplicón de <i>sso-1</i> purificado.....	43
15 ADNp de PJV18-N.....	44
16 Producto digerido y purificado de PJV18-N y <i>sso-1</i>	44
17 ADNp de colonias transformantes.....	45
18 Comprobación de la presencia del inserto <i>sso-1</i> en el vector pJV18-N.....	46
19 ADNp de PYM1.....	47
20 Localización de SSO-1 etiquetada con mChFP en una hifa en crecimiento de <i>N. crassa</i>	48
21 Co-expresión de SSO-1 y CSE-7.....	49
22 Co-expresión de las proteína CHS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1.....	50
23 Co-expresión de las proteína GS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1.....	50
24 Línea de tiempo de co-expresión de la proteína CHS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1.....	51
25 Diagramas de tráfico vesicular retrógrado.....	55
26 Análisis de presencia de secuencias tipo I o tipo II en SSO-1.....	57
27 Diagrama de la orientación subcelular de SSO-1 en hifas de <i>N. crassa</i>	59

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Comparación en porcentaje de identidad entre SNAREs homólogos a las t-SNAREs y v-SNAREs de <i>S. cerevisiae</i>	21
2 Lista de cepas utilizadas en este estudio.....	29
3 Vectores y oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	33
4 Número de anotación de los genes de interés en este proyecto.	34

1. Introducción y antecedentes.

1.1. Biología de los hongos.

Los hongos son organismos eucariotas que comparten algunas características estructurales, celulares y funcionales con animales, plantas y protistas [Watkinson et al., 2015]. Las células fúngicas están constituidas de los mismos tipos de organelos que otros eucariotas; poseen una membrana plasmática (MP), un núcleo, un complejo sistema endomembranal, y la mayoría de las especies tienen mitocondrias [Herrera, 1998; Watkinson et al., 2015]. Sin embargo, algunas estructuras de las células fúngicas no se encuentran en otros reinos; por ejemplo el conjunto de vesículas secretoras llamado Spitzenkörper (Spk), que se localiza en los ápices de las hifas de los hongos filamentosos [Watkinson et al., 2015]. Los hongos filamentosos están constituidos por hifas, que son células elongadas y cilíndricas que se expanden por el ápice, el cual tiene una forma ligeramente cónica [Bartnicki-Garcia et al., 1989]. Dichas hifas, al ramificarse en las regiones subapicales, generan una red llamada micelio que se extiende en el medio de crecimiento; es en la punta de dichas hifas donde la pared celular se sintetiza, se secretan enzimas, se perciben señales físicas y químicas que modifican el desarrollo y crecimiento de la colonia [Bartnicki-Garcia, 1987].

1.2. *Neurospora crassa* como modelo de estudio.

De entre los hongos filamentosos, el ascomiceto *Neurospora crassa* se ha usado como modelo experimental debido a que es ideal para estudios genéticos, bioquímicos y celulares [Davis, 2000]. Su importancia en la investigación radica en que puede ser manejado tan fácilmente como las bacterias y por lo tanto, proporciona una valiosa base de comparación entre eucariotas y procariotas [Davis and De Serres, 1970].

Se ha demostrado que *N. crassa* cuenta con una genética absolutamente ortodoxa y algunas características como su constitución haploide, fácil cultivo y susceptibilidad a la mutagénesis, lo convierten en un modelo eucariótico ideal para el estudio genético [Davis, 2000]. *N. crassa* cuenta con un ciclo de vida con estadios sexuales y asexuales [Davis and De Serres, 1970]; presenta diferentes morfologías celulares, mayormente derivadas de las hifas; éstas desarrollan paredes celulares transversales denominadas septos perforados por un poro central, que tiene la función de segmentar al micelio y facilitar la formación de estructuras sexuales y asexuales [Gull, 1978].

1.3. Ruta de secreción proteica y crecimiento apical.

Las hifas se elongan por crecimiento apical [Robertson, 1965]. Éste es un ejemplo extremo de crecimiento polarizado que también ocurre en neuronas, pelos radiculares y tubos de polen [Heath, 2013]. El crecimiento polarizado, es una propiedad

fundamental para el desarrollo celular, ya que permite el transporte asimétrico de componentes celulares a sitios específicos de la célula [Riquelme, 2013].

La polaridad, requiere la síntesis continua y orientación selectiva de proteínas, lípidos y bloques de construcción de paredes celulares hacia dominios específicos de la MP apical [Arkowitz and Bassilana, 2011; Harris and Momany, 2004]. El tráfico de membrana es esencial para generar y mantener la polaridad. La ruta secretora clásica, distribuye las proteínas sintetizadas desde el retículo endoplásmico, a través de cisternas de Golgi, hasta su destino final (podría ser la MP o alguna vacuola). La biogénesis y entrega de las vesículas, incluye la gemación vesicular (escisión de la membrana donante-formación de vesícula), transporte vesicular, anclaje vesicular y fusión vesicular [Bonifacino and Glick, 2004; Grosshans et al., 2006]. Para cada una de estas etapas de secreción, se requiere la participación de complejos de revestimiento para la formación de vesículas y reconocimiento de señales de clasificación de cargo; complejos de cadena que interactúan con proteínas de recubrimiento y median un acoplamiento; y por último SNAREs que facilitan en anclaje y fusión entre membrana donante y diana [Bonifacino and Glick, 2004; Riquelme, 2013].

1.4. Nomenclatura y función de los SNAREs.

Los SNAREs, “Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor –NSF– Attachment protein REceptor” por sus siglas en inglés, son una superfamilia proteica que se encarga del anclaje y fusión de membranas, a través de la formación de complejos fuertes o

estables entre membranas aceptoras y vesiculares [Bonifacino, 2014]. Los SNAREs actúan en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis y en la mayoría de las vías de tráfico intracelular [Lodish, 2008; Ungar and Hughson, 2003].

En la fusión entre membranas generalmente participan un v-SNARE y tres t-SNAREs. Los v-SNAREs, según el esquema de funcionalidad de proteínas, son los asociados a la vesícula, mientras que los t-SNAREs (de “target” en inglés) son los asociadas a la membrana aceptora (Fig. 1). La afinidad entre ellos es lo que permite el acercamiento entre vesículas y membranas diana; es decir el intercambio de material proteico o de neurotransmisores mediante anclaje y fusión [Bock et al., 2001; Lodish, 2008; Söllner et al., 1993]

Según las características estructurales de las proteínas, los SNAREs también se pueden clasificar en función al aminoácido que se encuentra en el centro del motivo SNARE [Bock et al., 2001; Fasshauer et al., 1998; Ungar and Hughson, 2003; Yamaoka et al., 2013]. Se les llama R-SNAREs cuando se trata de una Arginina y Q-SNAREs, cuando es una Glutamina [Bock et al., 2001; Fasshauer et al., 1998]. En la mayoría de los casos se ha encontrado que los v-SNAREs son R-SNAREs y los t-SNAREs son Q-SNAREs [Ungar and Hughson, 2003].

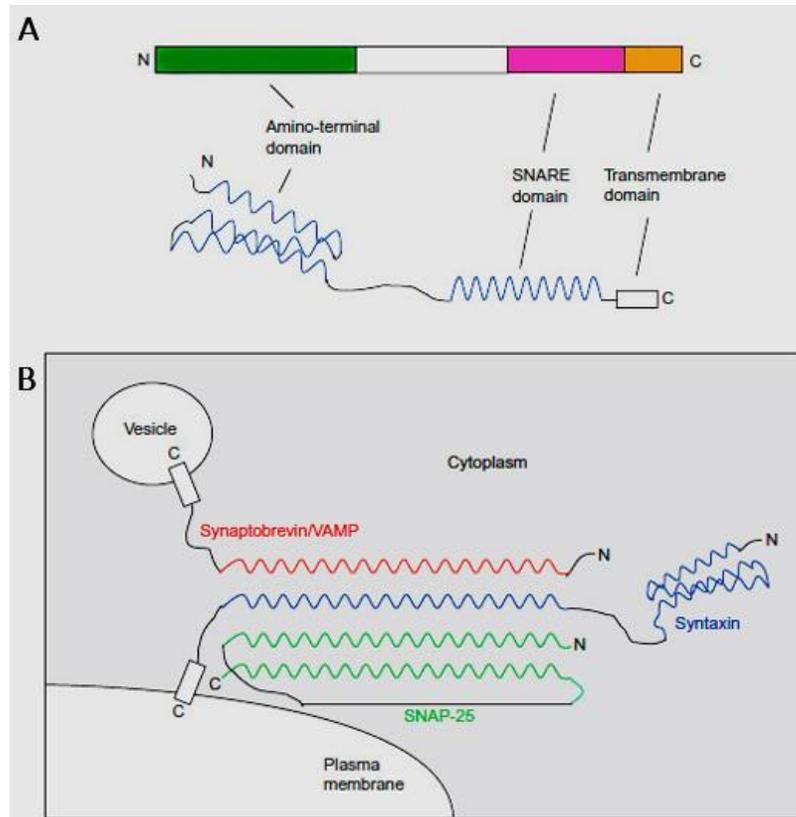


Figura 1. Estructura de los dominios de una t-SNARE. (A) Representación esquemática de la estructura de la sintaxina 1A, que ilustra los dominios de manera lineal y los dominios en forma de bucle helicoidal con relevancia espacial entre sí. N, amino terminal; C, carboxilo terminal. (B) Representación esquemática de la asociación de cuatro hélices del complejo de fusión sináptica, formado por sintaxina 1A (azul), sinaptobrevina/VAMP (rojo) y SNAP-25 (verde) en la membrana plasmática presináptica. Figura de HsuanYu et al., 2001.

1.5. Los SNAREs en la exocitosis.

Los SNAREs están involucrados en eventos de fusión vesicular en etapas finales de la ruta secretora o exocitosis. La exocitosis ocurre mediante la dilatación de un poro, el colapso de las vesículas en la MP y el depósito del contenido de dichas vesículas en el espacio extracelular (Rizzoli y Jahn, 2007). Todo este proceso es inicialmente mediado por el complejo multiproteico llamado exocisto (Fig. 2), encargado de acercar vesículas

a sitios específicos de la MP antes de que los SNAREs correspondientes actúen (Novick *et al.*, 1980, 1981; Hsu *et al.*, 2004). En hongos filamentosos, como en *N. crassa*, la exocitosis de vesículas en el ápice de la hifa es un requerimiento esencial para que ocurra el crecimiento apical y mantenimiento de la morfología de las hifas (Riquelme, 2013).

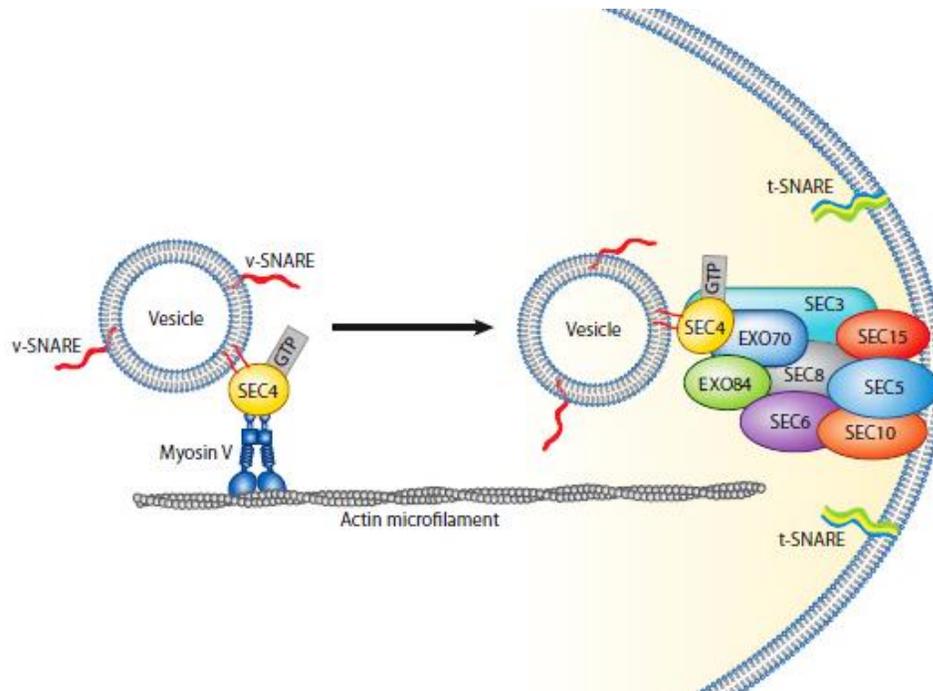


Figura 2. Aparato apical secretor de la hifa. El exocisto media el anclaje de las vesículas generadas en la región subapical a la membrana plasmática, donde las v-SNAREs y t-SNAREs intervienen en la promoción de fusión de ambas membranas. Figura de Riquelme, 2013.

Por medio de marcadores de superficie [Castle, 1953] o radioisótopos, [Bartnicki-Garcia and Lippman, 1969; Bartnicki-Garcia and Lippman, 1977; Gooday, 1971] se hizo evidente que el crecimiento apical implica un gradiente de expansión superficial, con un máximo en la punta y un progresivo declive hacia la base de la

región de extensión [Green, 1965]. Una propuesta para la regulación de dicho gradiente exocítico apical invoca un "Centro de Suministro de Vesículas" cuya ubicación en hifas fúngicas coincide con la del Spk [Bartnicki-Garcia et al., 1989].

1.6. Relación del exocisto, los SNAREs vesiculares y el Spitzenkörper.

El complejo del exocisto se compone de las subunidades de anclaje Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p y Exo84p [Guo et al., 1999; TerBush et al., 1996]. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo modelo de referencia ampliamente estudiado, cada subunidad del exocisto se requiere para la etapa final de la ruta secretora. En ésta, las vesículas secretoras son dirigidas hacia la MP para fusionarse en sitios bien definidos por la maquinaria que establece la polaridad de la célula [Novick and Brennwald, 1993].

Las ocho subunidades del exocisto, se concentran en dichos sitios; sin embargo, seis de ellos (Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p y Exo84p) alcanzan esta localización exclusivamente al montarse en vesículas secretoras. Estas vesículas son transportadas activamente por la Myo2p (proteína motora) a lo largo de cables de actina [Boyd et al., 2004]. En *S. cerevisiae* se examinó la localización de la subunidad del exocisto Sec6p etiquetada con la proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein o GFP) en una cepa mutante para el gen *SNC2* (*Snc2-V39A,M42A*) y en una cepa silvestre (Fig. 3). En la cepa mutante *Snc2-V39A,M42A*, el aminoácido en la posición 39, valina, fue reemplazado por el aminoácido alanina y el aminoácido en la posición 42,

metionina, fue reemplazado por el aminoácido alanina. La localización de la subunidad del excisto Sec6p-GFP se vió afectada en la cepa mutante *Snc2-V39A,M42A*, lo que sugiere que los aminoácidos valina y metionina son esenciales para la interacción entre la subunidad del excisto Sec6p y la v-SNARE Snc2p [Shen et al., 2013]. Además, mediante un análisis de dominios de las proteínas, se determinó que la región N-terminal de Sec6p es necesaria para la interacción con Snc2p; lo que confirma la interacción de la subunidad del excisto Sec6p con la v-SNARE Snc2p [Shen et al., 2013].

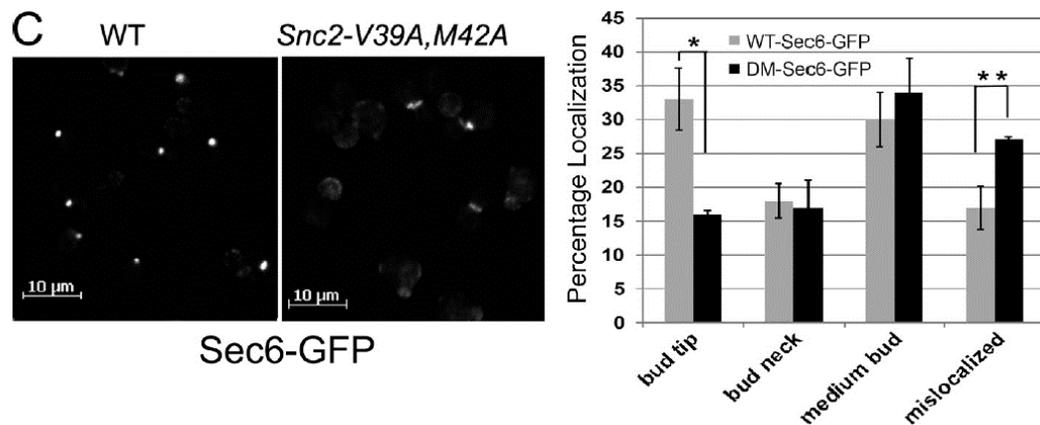


Figura 3. La reducción de Snc2 o el bloqueo de su internalización hacia la membrana plasmática, conduce a una deslocalización de una subunidad del excisto. Por medio de fluorescencia, se observa la subunidad del excisto Sec6, etiquetada con GFP en la cepa tipo silvestre (izquierda). Las células de la cepa *Snc2-V39A, M424A* (derecha), muestran la fluorescencia de la Sec6p-GFP deslocalizada. En la gráfica (derecha) se cuantificó el porcentaje de células con GFP localizadas en diferentes sitios de gemación de las células. Se observa un alto porcentaje de deslocalización de Sec6p-GFP. Figura tomada de Shen et al., 2013.

Además, las proteínas v-SNAREs Snc1p y Snc2p, junto con el exocisto, son controladas por la Rab GTPasa Sec4p [Guo et al., 1999; Shen et al., 2013] y parecen estar involucradas en la fusión de vesículas secretoras con la MP. La Snc1p, es reciclada activamente hacia un compartimiento de Golgi a partir de la MP por endocitosis [Lewis et al., 2000; Protopopov et al., 1993].

La sinaptobrevina Snc1p en levaduras es homóloga a la SynA en *Aspergillus nidulans*. Ésta fue observada en vesículas secretoras durante la exocitosis e incorporada a la MP (Fig. 4) [Taheri-Talesh et al., 2008].

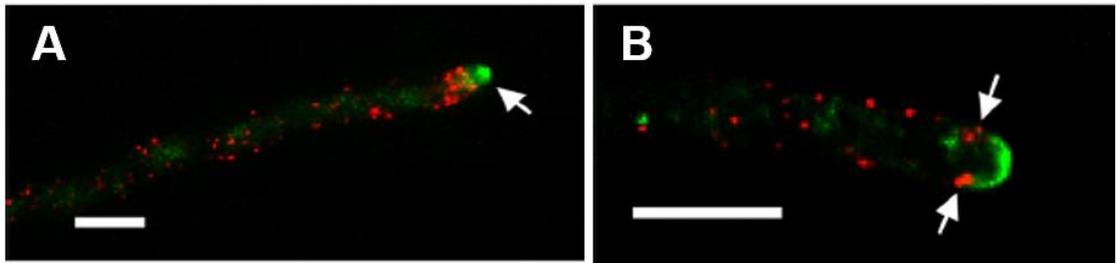


Figura 4. Localización de la GFP-SynA y ABPA-mRFP en hifas de *A. nidulans*. **A.** La GFP-SynA se observa (flecha) en verde localizada en el ápice, en el Spitzenkörper y membrana plasmática apical. **B.** GFP-SynA en verde y en rojo ABPA-mRFP (flechas). Se observa claramente la localización de SynA en la membrana plasmática y los parches de ABPA-mRFP forman un collar alrededor de la hifa, detrás del Spitzenkörper ABPA (del inglés Actin-Binding Protein A) etiquetada con mRFP (del inglés monomeric Red Fluorescent Protein). Barra 5 μ m. Figura de Taheri-Talesh *et al.*, 2008.

En *N. crassa* la sinaptobrevina SYN-1 es una v-SNARE que comparte un 64% de identidad con SynA en *A. nidulans* y 58% de identidad con Snc1p de *S. cerevisiae* [Sánchez-León et al., 2015]. En *N. crassa* SYN-1 se localiza en el Spk (Fig. 5) en el ápice de las hifas y co-localiza con el marcador vital lipofílico FM4-64 [Sánchez-León et al., 2015].

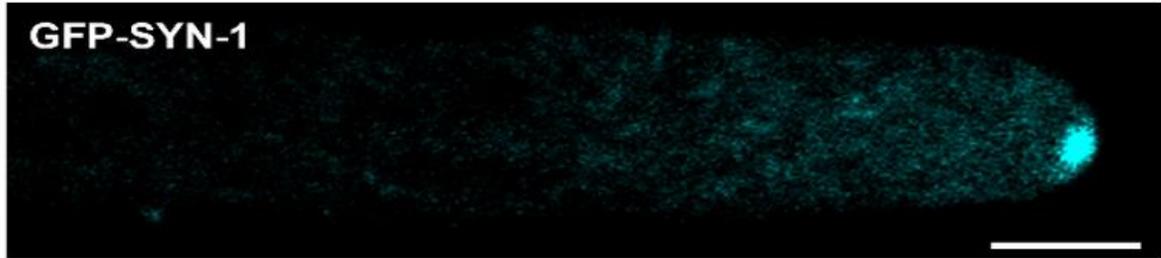


Figura 5. Localización de una v-SNARE. La GFP-SYN-1 fue observada en las capas macrovesiculares y microvesiculares del Spitzenkörper. Barra 5 μm . Figura de Sánchez-León *et al.*, 2015.

El Spk es una agrupación de vesículas encontradas en las regiones apicales de las hifas [Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995; Girbardt, 1969; Grove and Bracker, 1970; McClure *et al.*, 1968]; se constituye de actina, una matriz amorfa no definida, una capa exterior con macrovesículas y un núcleo lleno de microvesículas [Bourett and Howard, 1991; Girbardt, 1969; Verdín *et al.*, 2009]. El Spk, en conjunto con el exocisto y el polarisoma, son parte importante del aparato apical de crecimiento de las hifas y participa en la construcción de la pared celular [Harris *et al.*, 2005; Riquelme *et al.*, 2007; Sudbery, 2011; Taheri-Talesh *et al.*, 2008].

1.7. El papel de las sintaxinas como SNAREs de membrana diana.

Se han reportado 15 miembros de la familia sintaxina en mamíferos, incluyendo al humano, y siete genes similares a sintaxina en *S. cerevisiae*; además, existen secuencias de proteínas similares a sintaxinas en todos los eucariotas [Bock *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2001]. La diversidad adicional dentro de la familia de sintaxinas, es generada por

splicing alternativo; las isoformas identificadas han sido en sintaxina 1A, 2, 3, 5 y 16 [Teng et al., 2001].

En levaduras, las sintaxinas Sso1p y Sso2p (*Tabla 1*), parecen actuar como SNAREs de membrana diana que residen y funcionan en la MP [Walch-Solimena et al., 1995]. También pueden entrar en las vesículas endocíticas, así como lo hace la sintaxina 1 neuronal nSSO1p. En mamíferos se ha reportado la presencia de las sintaxinas Syn 1, 2, 3 y 4 también en la MP [Pelham, 1999]. En *A. nidulans*, se reportó que la sintaxina SSOA (Fig. 6) es homóloga a la Sso1p de levadura, localizada como proteína integral de membrana [Aalto et al., 1993; Taheri-Talesh et al., 2008].

Tabla 1. Comparación en porcentaje de identidad entre SNAREs homólogas a las t-SNAREs y v-SNAREs de *S. cerevisiae*.

Organismo	Homóloga	# Acc.	Descripción	ID	E-value
t-SNAREs					
Sso1p (<i>S. cerevisiae</i>)		YPL232W	t-SNARE de MP involucrada en fusión de MP con vesículas secretoras.		
<i>A. nidulans</i>	SSOA	AN3416	Similar a sintaxinas, se localiza en la MP apical.	35%	2.4
<i>N. crassa</i>	SSO-1	NCU04244	SNARE de interacción en el transporte vesicular.	39%	5e-04
<i>N. crassa</i>	SSO-2	NCU01722	Proteína hipotética	36%	1.3
Sso2p (<i>S. cerevisiae</i>)		YMR183C	t-SNARE de MP; involucrada en la fusión de vesículas secretoras con la MP.		
<i>N. crassa</i>	SSO-1	NCU04244	SNARE de interacción en el transporte vesicular.	35%	1e-40
<i>A. nidulans</i>	SSOA	AN3416	Proteína similar a sintaxina; localizada en la MP apical de las hifas.	24%	5e-16
<i>N. crassa</i>	SSO-2	NCU01722	Proteína hipotética	42%	2.8
v-SNAREs					
Snc1p (<i>S. cerevisiae</i>)		YAL030W	v-SNARE de membrana vesicular, involucrada en la fusión entre vesículas derivadas de Golgi con la MP involucrada en la endocitosis.		
<i>A. nidulans</i>	SYNA	AN8769	Sinaptobrevina homóloga putativa; v-SNARE secretora, se localiza en la MP apical de las hifas.	57%	5e-36
<i>N. crassa</i>	SYN-1	NCU00566	SNARE, involucrada en el transporte vesicular.	55%	2e-39

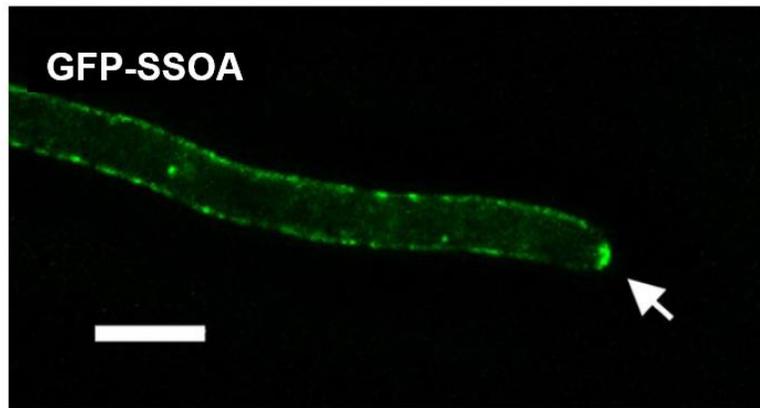


Figura 6. Localización de la sintaxina SSOA en hifas de *A. nidulans*. SSOA está predominantemente en la membrana plasmática, hay una región de mayor concentración en el ápice de la hifa (flecha) y una región de menor concentración inmediatamente detrás del parche apical de SSOA. Barra 5 μ m. Figura de Taheri-Talesh *et al.*, 2008.

La Sso1p de levadura, actúa en el transporte vesicular hacia la MP y se localizó como proteína integral de membrana [Aalto et al., 1993]. Esto se logró determinar a través de un experimento en donde se utilizó la cepa de levadura 'H440', en la que *SSO1* se expresa a partir de la inducción de galactosa por el promotor *GAL1*. La cepa se cultivó en galactosa y luego se cambió el medio a glucosa para desactivar el promotor *GAL1*. Las células se retiraron a diferentes tiempos, se analizaron por microscopía electrónica y como resultado, se encontró que las células H440 dejaron de crecer después de 12 horas. La inhibición del crecimiento se asoció a un fenotipo en el que un gran número de vesículas de 100 nm, se acumularon dentro de la yema (Fig. 7). Esto sugirió que la pérdida de Sso1p ocasiona un bloqueo en el transporte de vesículas secretoras desde el complejo de Golgi hacia la MP [Aalto et al., 1993]

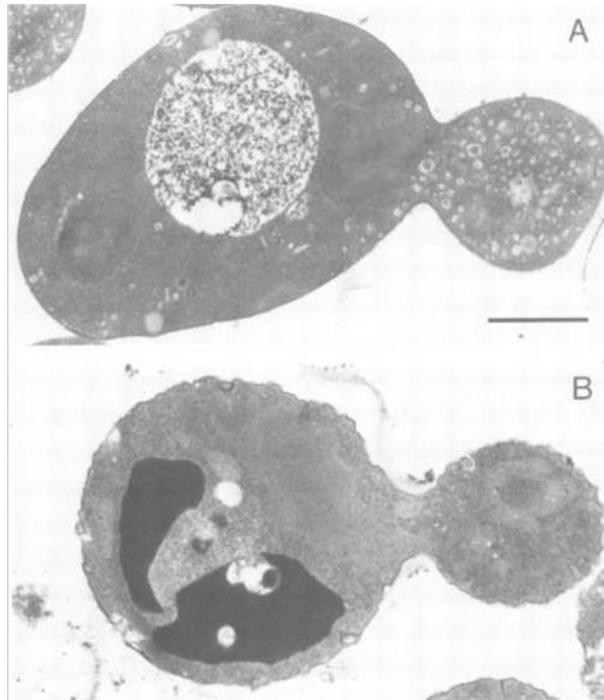


Figura 7. Micrografías electrónicas de células de levadura, 12 horas después del cambio de glucosa en el medio. En **A**, células de la cepa H440 con Sso1p agotada. En **B**, Células de tipo silvestre W303-1A. Barra 1 μ m. Figura adaptada de Aalto *et al.*, 1993.

En *N. crassa*, los anticuerpos contra la t-SNARE Sso2p de *S. cerevisiae*, identificaron a una homóloga de 39 kDa [Gupta and Heath, 2000]; sin embargo, no se cuenta con datos que confirmen el tipo de SNARE al que pertenece dicha homóloga, aunque se observó concentrada en la región apical de las hifas de *N. crassa*, formando un gradiente exocítico a lo largo de la MP (Fig. 8). Los autores sugirieron, que dicho gradiente por sí mismo, es insuficiente para explicar la fusión vesicular en la región de crecimiento apical; y que posiblemente existan otros factores que jueguen un papel importante en la regulación de la exocitosis [Gupta and Heath, 2000].

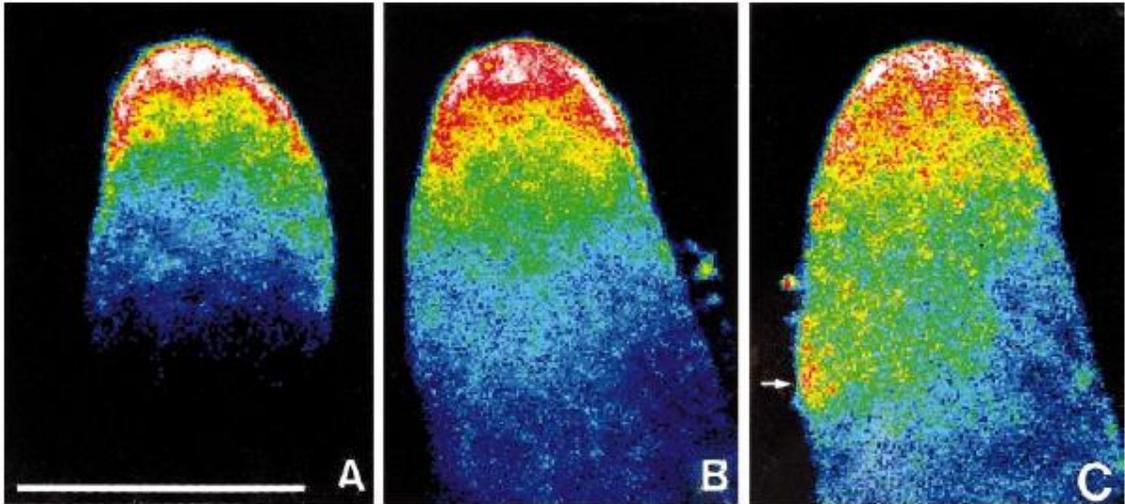


Figura 8. Imágenes en pseudo-color realzando ápices de hifas de *N. crassa* inmunoteñidas con anti-Sso2p de afinidad purificado (A, B y C). Las velocidades de crecimiento de A-C fueron determinadas antes de la fijación y podrían estar relacionadas con patrones de tinción de las regiones apicales de estas hifas (A=11 $\mu\text{m}/\text{min}$; B= 14 $\mu\text{m}/\text{min}$; C= 24 $\mu\text{m}/\text{min}$). Cada punto representa la posición de una sólo vesícula. La flecha en C, indica que la tinción anti-Sso2p también se concentra en ramas incipientes. En la región apical, los píxeles de mayores intensidades (rojo-amarillo) representan la acumulación de pared vesicular; el área, (número de píxeles) longitud y gradiente son representados por el cambio de intensidad de píxeles sobre longitud de área gradiente, (de rojo a azul). Barra 10 μm . Figura de Gupta y Heath, 2000.

1.8. Relación entre la v-SNARE SYN-1 y proteínas ubicadas en el Spitzenkörper en *N. crassa*.

Anteriormente, la sinaptobrevina SYN-1, fue observada en las capas macrovesiculares y microvesiculares del Spk confirmando que se trata de una v-SNARE [Sánchez-León et al., 2015]. A través del marcaje con proteínas fluorescentes, se han identificado a las quitinas sintasas (CHS-1/CHS-7) en el núcleo del Spk [Fajardo-Somera et al., 2015; Riquelme et al., 2007; Sánchez-León et al., 2011]. De igual manera, la proteína FKS-1 y la subunidad GS-1 del complejo glucano sintasa, se localiza en la región rica en macrovesículas (Fig. 9) que rodea al núcleo del Spk, donde se localizan las

quitinas sintasas [Sánchez-León and Riquelme, 2015; Verdín et al., 2009]).

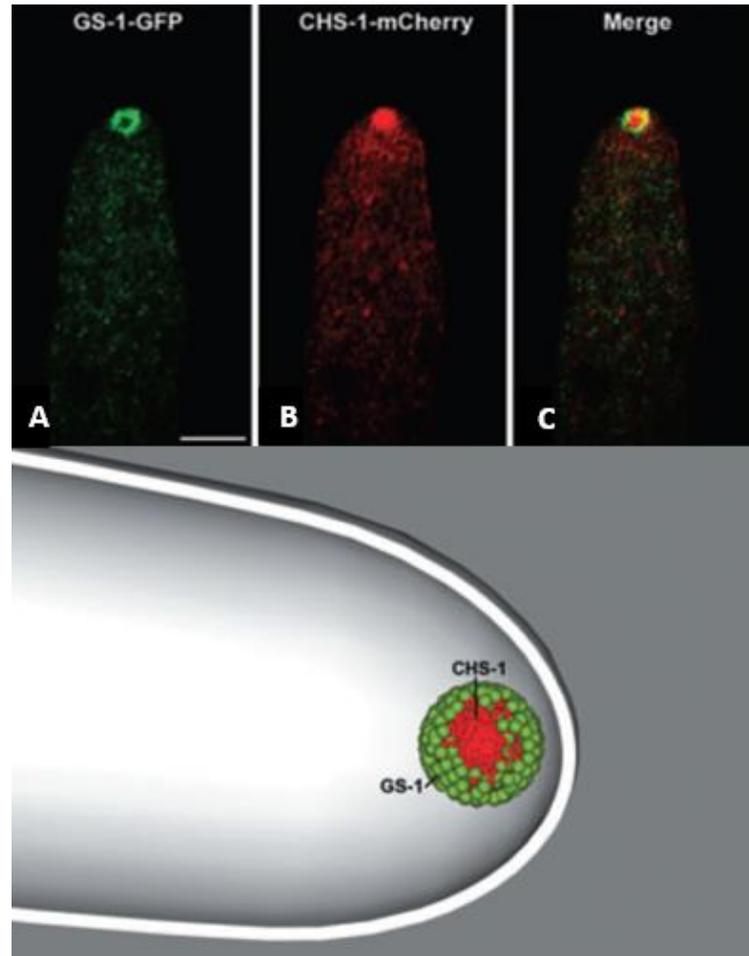


Figura 9. Relación espacial de GS-1-GFP y CHS-1-mChFP. Etiquetado dual mostrando la localización diferencial de GS-1-GFP y CHS-1-mCherryFP en el Spk (A, B y C). En D, se da una representación 3D de los estratos funcionales del Spk definidos por GS-1 y CHS-1. Barra de escala 5 μ m. Figura de Verdín et al., 2009.

2. Justificación.

Se sabe que en *N. crassa* la sinaptobrevina SYN-1 (v-SNARE) se encuentra en los ápices de las hifas co-localizando con el Spk, cuerpo celular donde ocurre la mayor concentración de vesículas [Sánchez-León et al., 2015]. Sin embargo se desconoce si ésta participa en la fusión tanto de macro como de microvesículas con la MP. Asimismo, se desconoce si interactúa con la syntaxina SSO-1 (t-SNARE), que hipotéticamente se ubica en la MP apical de *N. crassa*. Se cree que existe una relación entre ellas, porque previamente se ha reportado una relación entre proteínas syntaxinas (Sso1p y Sso2p) y sinaptobrevinas (Snc1p y Snc2p) en *S. cerevisiae* [Neiman, 1998]. Por lo anterior en este trabajo se determinará la distribución de la t-SNARE predicha SSO-1 y su relación espacial con la v-SNARE SYN-1.

3. Objetivo general.

Describir la distribución de la syntaxina SSO-1 en hifas de *N. crassa*, así como analizar la relación espacial que guarda con otros componentes necesarios para la exocitosis.

3.1. Objetivos específicos.

3.2.1. Determinar la distribución de la t-SNARE SSO-1 y su relación espacial con la v-SNARE SYN-1.

3.2.2. Determinar si hay co-localización de las proteínas mChFP-CHS-1 y mChFP-GS-1 con la v-SNARE SYN-1.

4. Hipótesis.

La syntaxina SSO-1 (t-SNARE) se ubica en la MP apical de *N. crassa* y co-localiza parcialmente con la sinaptobrevina SYN-1 (v-SNARE) de manera temporal durante el proceso de exocitosis. ChFP-CHS-1 y ChFP-GS-1 co-localizan con la SYN-1 en la región de micro y macrovesículas del Spk.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.

5.1.1. Cepas

Se utilizaron las cepas de *E. coli* y *N. crassa* enlistadas en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Lista de cepas utilizadas en este estudio.

<i>N. crassa</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
N150	Tipo Silvestre <i>mat A</i>	FGSC9013
SMRP24	<i>mat A his-3⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC9717
SMRP90	<i>mat A; Pccg-1::chs-1⁺::mchfp⁺</i>	(Verdín et al., 2009)
SMRP93	<i>mat A; his-3⁺::Pccg-1::gs-1⁺::mchfp⁺</i>	(Verdín et al., 2009)
SMRP348	<i>mat A his-3⁺::Pccg-1::sgfp::8xGly::syn-1⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	(Sánchez-León et al., 2015)
SMRP415	<i>mat A his-3⁺::Pccg-1::mchfp::8xGly::sso-1⁺; Δmus-51::bar⁺</i>	Este estudio
<i>E. coli</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5α	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-	Invitrogen®

5.1.2. Medios de cultivo para *N. crassa*.

Para el mantenimiento, crecimiento y manipulación de rutina de las cepas de *N. crassa* se utilizó medio mínimo de Vogel (MMV), que contiene sales de Vogel 1X (100

mL de sales de Vogel 50X contienen: 12.35 g de Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de fosfato de potasio monohidratado (KH_2PO_4), 10 g de nitrato de amonio (NH_4NO_3), 0.49 g de sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), 0.38 g de cloruro de calcio anhidro (CaCl_2), 500 μL de elementos traza, 250 μL de solución de biotina a una concentración inicial de 0.1 mg mL⁻¹ y sacarosa al 1.5 % (Vogel, 1956).

Para obtener MMV sólido se adicionó agar al 1.5%. Para observaciones mediante microscopía confocal de escaneo con láser (MCSL) se utilizó MMV con agar al 2.5%. Para obtener micelio en cultivo líquido se utilizó medio completo de Vogel (MCV); este contiene MMV con extracto de levadura al 0.5% y caseína hidrolizada al 0.5%. Para la selección de cepas prototróficas de *N. crassa* después del proceso de electroporación se utilizó el medio FGS de recuperación, que contiene sales de Vogel al 2%, agar al 1% y solución FGS estéril al 10% concentración final (Sorbosa 20%, fructosa 0.5% y glucosa 0.5%). Todos los medios fueron esterilizados por 15 min a 120 °C en una autoclave (VWR® Accu Sterilizer AS12).

5.1.3. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Para el crecimiento y propagación de *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) que contiene Bacto-Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%. En el caso del medio sólido se adicionó agar bacteriológico al 2%. El medio fue suplementado con

ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para seleccionar las células transformadas de *E. coli* que adquirieron el plásmido con el inserto que confiere resistencia a ampicilina.

5.1.4. Condiciones de cultivo, obtención y recuperación de conidios.

Las cepas de *N. crassa* fueron cultivadas en MMV con los suplementos que así fueron requeridos. En específico para obtener conidios de la cepa #9717 auxótrofa a histidina, fue suplementada con L-histidina (0.5 mg mL^{-1} , esterilizado por filtración). Se utilizaron 100 mL de MMV sólido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL; con un asa bacteriológica se inoculó una muestra de micelio de la cepa #9717, se incubó por 4 días a 30°C bajo obscuridad, seguidos de 3 días con luz continua hasta la aparición de masa conidial.

Los conidios se cosecharon en condiciones asépticas; se agregaron 50 mL de agua destilada estéril para lavar las paredes del matraz y se agitó vigorosamente para desprender el micelio y los conidios. Se filtró la solución a través de una tela (Magitel®) estéril para eliminar el micelio y los restos de agar, y se recuperó la suspensión de conidios en tubos de 50 mL y se centrifugaron por 10 min a 6,000 rpm en una centrífuga eppendorf modelo 5415 D. Dicha suspensión se lavó dos veces con 20 mL de agua estéril, se centrifugó una última vez por 10 min a 6,000 rpm, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M. Posteriormente,

mediante el uso de un hematocitómetro (Cámara de Neubauer), se determinó el número de células por mililitro de suspensión.

5.2. Obtención y recuperación de micelio para extracción de ADN genómico.

En un matraz Erlenmeyer de 1,000 mL con 200 mL de MCV se inoculó una asada de conidios de la cepa de interés en condiciones de esterilidad. Después de incubarse a 30°C por 48 horas, el micelio se recuperó mediante filtración utilizando un embudo, 150 mL de agua destilada estéril y papel filtro Whatman® No. 1.

5.3. Extracción de ADN genómico a partir de micelio.

El micelio colectado se pulverizó usando nitrógeno líquido y se utilizó para llevar a cabo la extracción de ADN mediante el kit Plant Tissue (Mini) DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.4. Diseño de oligonucleótidos y plásmidos.

En la *Tabla 3* se muestra el plásmido y los oligonucleótidos que fueron utilizados en este trabajo.

Tabla 3. Vectores y oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Vector	Genotipo	Procedencia
PJV18-N	<i>Pccg1::mchfp⁺ :: gs-1; 5' his-3</i>	Verdín et al., 2009
Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Procedencia
P1PacIGlySSO1-Fw	ccTTAATTAAGGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCATGTCTTATAATCAAAAT CCCTA	Este estudio
P2ApaISSO1-Rv	ccGGGCCCTAATTCTTCTGTTCGAGAAGTAG	Este estudio

5.5. Estrategia de etiquetamiento de la proteína SSO-1 con mChFP en el extremo N-terminal.

Para el etiquetado de SSO-1 (Tabla 4) con la proteína fluorescente mChFP, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan el marco de lectura abierto (ORF) del gen P1-Pac1-Gly-SSO1 (Fw)/ P2-Apa1-SSO1 (Rv) adicionando secuencias de reconocimiento para las endonucleasas *PacI* y *ApaI* para los extremos 5' y 3' respectivamente, adicionalmente se añadió una secuencia de 24 nucleótidos que codifica para 8 glicinas en el 5' (Fig. 10). Para la fusión de *mchfp* con *sso-1* se realizó una doble digestión enzimática con *PacI* y *ApaI* del gen amplificado y el vector pJV18-N.

Tabla 4. Número de anotación de los genes de interés en este proyecto.

Gen	Nombre asignado	Número de anotación en genoma de <i>N. crassa</i>
<i>syn-1</i>	“Predicted vesicular SNARE, involved in vesicular transport”	NCU00566
<i>ss0-1</i>	“SNARE interactions in vesicular transport”	NCU04244

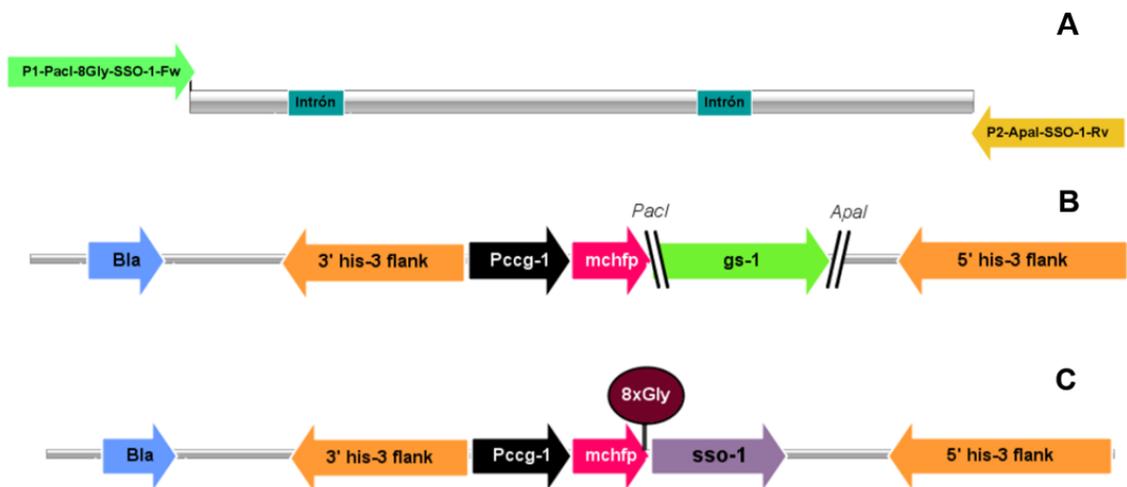


Figura 10. Estrategia de etiquetamiento del gen *ss0-1* con *mchfp*. En **A**, se observan los oligonucleótidos diseñados para flanquear el ORF del gen *ss0-1*, el oligonucleótido “forward” (flecha verde) incluye la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa *PacI*, una secuencia de 24 nucleótidos que codifica para 8 glicinas en el extremo 5’. El oligonucleótido “reverse” (flecha amarilla) incluye una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa *ApaI*. En **B**, se representa el vector pJV18-N en forma linealizada, está constituido por 10,198 pares de bases (pb), que incluye (flecha verde) un ORF para *gs-1*, componente necesario para la actividad glucano sintasa, las diagonales flanqueantes a los extremos de *gs-1*, indican que fue escindido mediante las endonucleasas *PacI* y *ApaI*. En **C**, se observa el constructo final con el ORF del gen *ss0-1* insertado en el extremo 3’ de *mchfp*, incluyendo la secuencia de glicinas.

5.6. Análisis y herramientas bioinformáticas.

5.7.1. Localización de dominios en SSO-1 *in silico*

Se utilizó la base de datos de genomas fúngicos “fungi DB” para obtener la secuencia nucleotídica y UTRs de *sso-1*. Las secuencias fueron editadas utilizando el software ApE plasmid editor v2.0.44.

Con el servidor en línea, National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se analizó la secuencia de *sso-1* para buscar los dominios conservados (Fig. 11). Los dominios obtenidos se ejecutaron en el visualizador de secuencias de proteínas y nucleótidos GPS V.1.0.2N.

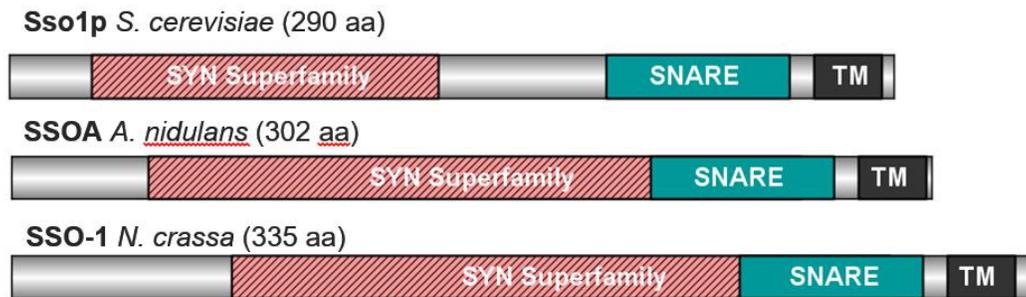


Figura 11. Representación esquemática lineal de los dominios de sintaxinas homólogas. “SYN Superfamily” es el dominio N-terminal más conservado en la familia de las sintaxinas, involucrado en el anclaje de vesículas con membranas plasmáticas; el dominio “SNARE” y “TM” median las interacciones entre proteínas SNARE y transmembranales (*National Center for Biotechnology Information*). Arriba, dominios de Sso1p *S. cerevisiae*; intermedio, dominios de SSOA *A. nidulans*; abajo, dominios de SSO-1 *N. crassa*.

5.7. Condiciones de PCR para amplificación del gen *ssu-1*.

Se llevó a cabo la amplificación del ORF del gen *ssu-1* utilizando los oligonucleótidos P1PacIGlySSO1-Fw/ P2ApaISSO1-Rv, utilizando como templado DNAG de *N. crassa* de la cepa silvestre N150 y utilizando la polimerasa TaKaRa. Las condiciones de temperatura utilizadas en la reacción de PCR fueron de: un ciclo de 94°C por 1 min para la desnaturalización; 30 ciclos para la amplificación, correspondientes a 94 °C por 30 s para la desnaturalización, 55 °C por 30 s para el alineamiento, y 72 °C por 1.5 min para la extensión; para la extensión final se usó un ciclo de 72 °C de 5 min. Los reactivos contenidos en la reacción de PCR fueron los siguientes: 58.6 µL H₂O, 10 µL Buffer 10X, 6 µL MgCl₂ (5mM), 5 µL DNTPs (0.05 mM), 3 µL P1 (10 µM), 3 µL P2 (10 µM), 14 µL ADN genómico templado, 0.4 µL Taq Polimerasa (marca), en un volumen final de 100 µL. El producto de la PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1%. El amplicón fue escindido del gel y purificado por medio del kit Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen).

5.8. Restricción, ligación de vector e inserto.

Se realizó una digestión del inserto *ssu-1* y el vector PJV18-N con las enzimas de restricción *PacI* y *ApaI*, siguiendo las recomendaciones del 'Double Digest Finder' (New England Biolabs, NEB). La enzima *ApaI* actúa a 25 °C. Luego de seis horas de incubación, se agregó *PacI* y se incubó a 37°C. Con el producto de estas restricciones, se corrió un

gel para poder observar las bandas correspondientes al vector e inserto digeridos en el transiluminador con luz ultravioleta y cortar dichas bandas para su posterior extracción y purificación de vector e inserto por medio del kit 'QIAquick gel extraction'. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de ligación del inserto y vector ya purificados; en una proporción 3:1, del inserto se utilizaron 2 μL , del vector 5.5 μL , de la enzima ligasa T4[®] (NEB) 1 μL y del buffer T4, 2.2 μL . El volumen total de 11 μL , se dejó incubando una hora a temperatura ambiente (23°C).

5.9. Generación y selección de transformantes de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* DHS α [®] (50-100 μL) conservadas a -80° C se descongelaron en hielo y se mezclaron con el mismo volumen de la solución fría (4° C) de KCM (Solución de Cloruro de Potasio 100 mM, Cloruro de Calcio 30 mM y Cloruro de Magnesio 50 mM) mezclado con: 1-3 μL del producto de ligación en un tubo estéril de 1.5 mL. La solución se mezcló suavemente sin pipetear y se mantuvo en hielo por 30 min. Luego se aplicó un choque térmico por 2 min a una temperatura de 42° C. Se introdujo el tubo nuevamente en hielo por 2 min y se le añadieron 300 μL de medio LB estéril y se incubó por 1 hora a 37 °C y 225 rpm. El cultivo se sembró en una placa con LB sólido y ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 16 horas a 37° C. Las colonias transformantes que crecieron en el medio selectivo, se analizaron por PCR de colonia y las positivas se sembraron en medio de selección líquido para la posterior extracción del ADN plasmídico.

5.10. Transformación en *Neurospora crassa*

El plásmido generado pYM1 que contiene la construcción *Pccg1::mchfp⁺::sso-1; 5'his-3*, se linearizó con la enzima de restricción *SspI* para introducirlo por electroporación en macroconidios de *N. crassa* de la cepa SMRP24 (#FGSC9717). Se mezclaron 60 μL de la suspensión de conidios (concentración final 2.5×10^9 células mL^{-1}) de la cepa #9717 en un tubo estéril de 1.5 mL con 5-10 μL (1 μg) del plásmido linealizado, y se transfirieron a una cubeta de electroporación estéril de 0.2 mm-gap (Precision Electroporation Cuvettes, Daigger®). Se mantuvieron en hielo por 5-10 min.

La electroporación se realizó en un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad®) usando el siguiente protocolo: 600 Ohms, 25 μFD y 1.5 kV para obtener un tiempo constante entre 12 y 14 milisegundos. Después del pulso se añadió inmediatamente 1 mL de sorbitol (1M) y se transfirieron los conidios a un tubo cónico de polipropileno de 15 mL al que se le añadió 1 mL de sales de Vogel 1X. Las muestras se incubaron a 30°C con agitación muy lenta (20-25 rpm) durante 3 h.

Los conidios fueron inoculados en 6 placas Petri (100 mm x 15 mm) con medio FGS descrito anteriormente (350 μL de la suspensión de conidios por placa). La presencia de sorbosa en este medio permite la fácil selección de las colonias prototróficas transformadas, ya que restringe el crecimiento, evitando así que se mezclen unas colonias con otras dentro de la misma placa. Las placas se incubaron a

30°C por 5 días hasta observar colonias compactas de color blanco.

5.11. Selección de colonias prototróficas.

Se obtuvieron trece colonias transformantes, de las cuales siete presentaron fluorescencia. Dichas colonias se traspasaron individualmente a tubos de borosilicato de 4 mL conteniendo 2 mL de MMV y se incubaron a 30°C hasta observar micelio y conidios. Posteriormente las cepas obtenidas se traspasaron a placas de Petri (100 mm x 15 mm) con 25 mL de MMV, inoculadas en un extremo e incubadas a 25°C por 20 h. Para analizar si presentan fluorescencia se revisaron en un microscopio confocal láser (del acrónimo inglés LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) de barrido invertido Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan).

5.12. Microscopía confocal

Para la obtención de imágenes mediante microscopía confocal, se utilizó el método de “agar invertido” como ha sido descrito previamente [Hickey et al., 2004]. Las cepas seleccionadas fueron analizadas en un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview™ FV1000 equipado con un LASER de Argón (GFP: excitación, 488 nm; emisión, 505-525 nm) y un LASER de estado sólido bombeado por diodos (DPSS, Melles Griot, Carlsbad, CA; mCherry o RFP: excitación, 543 nm; emisión, 560–660 nm).

Para observar la fluorescencia en las cepas, se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 60X UPLNF (NA, 1.3; Olympus). Las imágenes fueron capturadas y examinadas

usando el software FV10-ASW (versión 4.2.0.9, Olympus) y se procesaron con Adobe Photoshop CS5.

5.13. Co-expresión de mChFP-CHS-1 y mChFP-GS-1 con SYN-1.

En condiciones de esterilidad, se inocularon las perlas del cepario SMRP correspondientes a cada cepa mChFP-GS-1, mChFP-CHS-1, y GFP-SYN-1 en cajas de Petri con 25 mL de MMV e incubaron a 30 °C durante toda la noche. Ambas cepas presentan un tipo de apareamiento compatible (*mat A*), por lo tanto se forzó la formación de heterocariones para expresar mChFP-GS-1::GFP-SYN-1 y mChFP-CHS-1::GFP-SYN-1, y se dejaron incubando toda la noche a 30 °C. Una vez obtenidas las fusiones, se traspasaron a placas de Petri (100 mm x 15 mm) con 25 mL de MMV inoculadas en un extremo e incubadas a 30 °C hasta la observación de micelio. Para analizar la fluorescencia, se revisaron en microscopio confocal LASER de barrido invertido Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Japan).

6. Resultados.

Esta sección se encuentra dividida en tres subsecciones principales; en la primera se incluyen los resultados obtenidos para el análisis filogenético de sintaxinas; en la segunda, la distribución de la t-SNARE SSO-1 y su relación espacial con la v-SNARE SYN-1 y en la tercera, se muestran los resultados obtenidos para la co-expresión de mChFP-CHS-1 o mChFP-GS-1 con GFP-SYN-1.

6.1. Análisis filogenético de sintaxinas.

Se elaboró un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de algunas t-SNAREs homólogas a SSO-1 (NCU04244) de *N. crassa*. Se utilizaron las t-SNAREs SSOA (AN3416) de *A. nidulans*; Sso1p (YPL232W) de *S. cerevisiae*; STX1A (Q16623) de *H. sapiens* y la sintaxina de *D. melanogaster* (Fig.12). El alineamiento se realizó con el software CLC Sequence viewer versión 7.8.1.

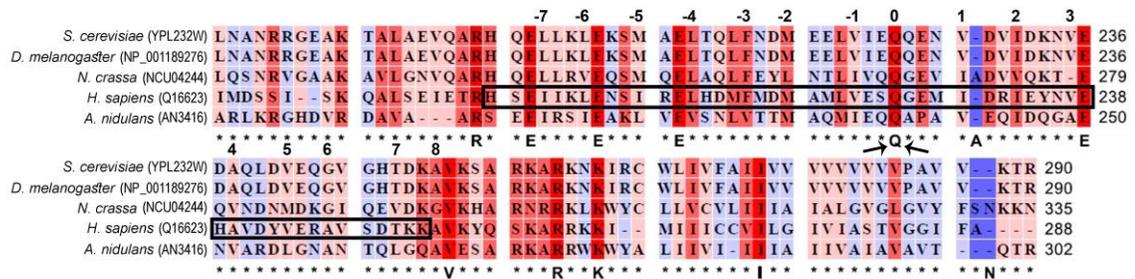


Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de sintaxinas homólogas a Sso1p en *S. cerevisiae*. Se observa la secuencia de aminoácidos del motivo SNARE que comparten las homólogas de la sintaxina de *S. cerevisiae* Sso1p. En los rectángulos negros se destaca la secuencia del motivo SNARE de la sintaxina humana [Hong, 2005] utilizada como punto de comparación entre las otras secuencias. Las flechas negras señalan la capa 0 del motivo SNARE, en la cual, el residuo 100% conservado es la glutamina (Q). La secuencia del motivo SNARE de la proteína utilizada en este trabajo, SSO-1 de *N. crassa*, también presenta este residuo en la capa cero. La numeración de 0 a 8 y de 0 a -7, indican las capas del motivo SNARE.

6.2. Distribución de la t-SNARE SSO-1.

6.2.1. Resultados de técnicas moleculares.

6.2.1.1. Obtención de amplicón *sso-1* mediante PCR.

Con las condiciones de PCR ya mencionadas en la sección de materiales y métodos, se obtuvo el marco abierto de lectura (ORF) de *sso-1* amplificado y el tamaño del fragmento se observó en un gel de agarosa al 1% (Fig. 13).

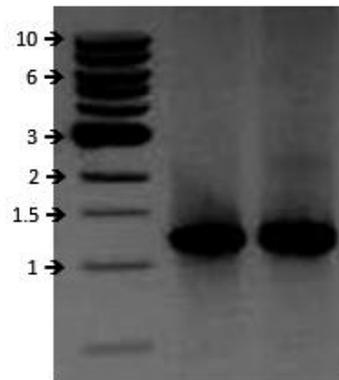


Figura 13. Amplicón de *sso-1* obtenido por PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestra los amplicones obtenidos por PCR. Marco de lectura abierto de *sso-1* (templado ADN genómico de *N. crassa*) de 1,180 pb. Los números y flechas de la izquierda indican los pares de bases en kilobases.

El mismo amplicón después de la purificación por kit presentó una concentración de ADN de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ en un volumen final de $30 \mu\text{L}$ (Fig. 14).

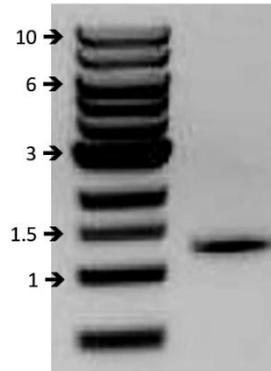


Figura 14. Amplicón de *sso-1* purificado. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que muestra los amplicones obtenidos por PCR y purificados con el kit 'QIAquick Gel extraction'. ORF de *sso-1* (templado ADN genómico de *N. crassa*) de 1,180 pb. Los números y flechas de la izquierda indican los pares de bases en kilobases.

6.2.1.2. Obtención de plásmido pJV18-N a partir de colonias transformantes de *E. coli*.

Según las indicaciones de extracción de ADN plasmídico (ADNp) por kit ya vistas en la sección de materiales y métodos, se obtuvo ADNp a una concentración de 981 ng μL^{-1} y 849 ng μL^{-1} , para los plásmidos correspondientes a la colonia 1 y 2, respectivamente. Se observó la integridad y el tamaño aproximado de los ADNp en un gel de agarosa 1% (Fig. 15).

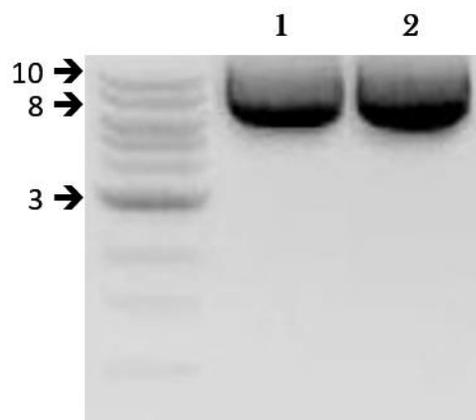


Figura 15. ADNp de PJV18-N. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestra el ADN plasmídico PJV18 extraído a partir de colonias por medio de kit. Los números superiores 1 y 2, indican el número de colonia de *E. coli* a partir de la cual se hizo la extracción. Los números y flechas de la izquierda indican los pares de bases en kilobases.

6.2.1.3. Obtención de vector pJV18-N e inserto *sso-1* digeridos.

El producto digerido y purificado de PJV18-N y *sso-1* se observó en un gel de agarosa al 1% (Fig. 16). La concentración de ADN obtenida para PJV18-N fue de $9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y para *sso-1*, de $12 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

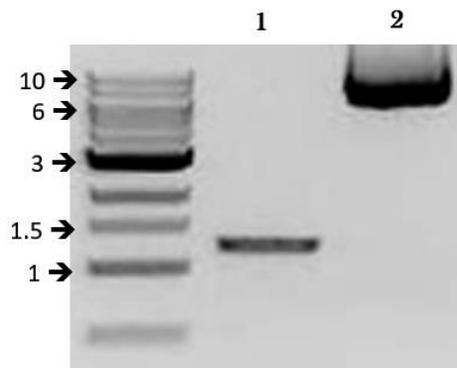


Figura 16. Producto digerido y purificado de PJV18-N y *sso-1*. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestra a SSO-1 y PJV18 purificados mediante Kit después de la doble restricción enzimática. (1) *sso-1* después de la restricción y purificación, 1,180 pb. (2) Vector PJV18-N de 8,493 pb. Los números y flechas de la izquierda indican los pares de bases en kilobases.

6.2.1.4. Obtención del nuevo plásmido pYM1 con el inserto *sso-1* recombinado.

Tras ligar vector e inserto, y transformar *E. coli*, se obtuvieron 10 colonias transformantes. El ADNp obtenido de cada una se observó (Fig. 17) en un gel de agarosa al 1%. La concentración de ADNp promedio de éstas fue de $2,555 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

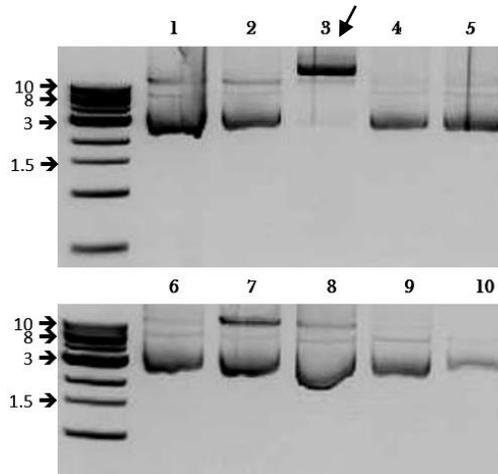


Figura 17. ADNp de colonias transformantes. Geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestran el ADN plasmídico extraído a partir de 10 colonias transformantes. En el gel superior, se enumera el ADN plasmídico de las colonias 1 a 5, la flecha en el carril 3 indica el ADN seleccionado para posterior transformación; en el gel inferior, se enumeran del 6-10. Las flechas de la izquierda indican el número de pares de bases, dado en kilobases.

6.2.1.5. Comprobación de incorporación de inserto *ssr-1* al ADN plasmídico.

En un gel de agarosa al 1%, se observó el ADNp digerido comparado con el mismo ADNp sin digerir (Fig. 18). Con esto se determinó que la clona No. 3 (Fig. 17A, panel de arriba, carriles 6 y 7) adquirió la construcción pJV18+*ssr-1*, debido a que al ser digerida mostró la liberación del inserto *ssr-1* de 1,180 pb y del vector por encima de 8,000 pb.

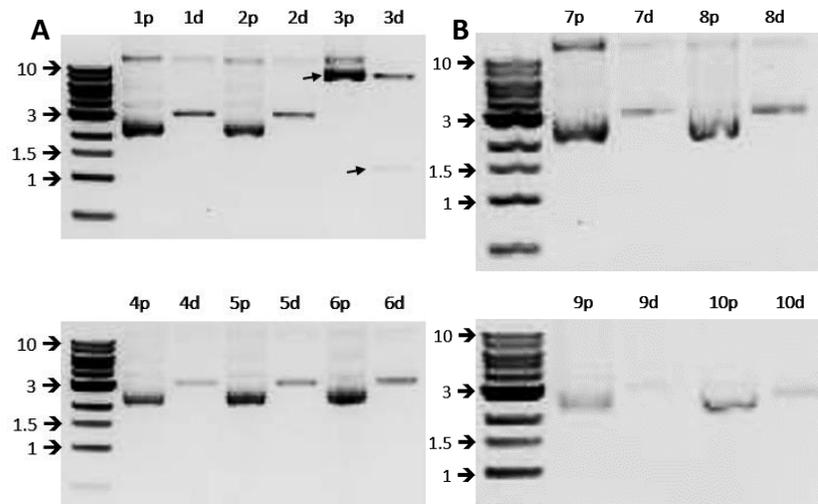


Figura 18. Comprobación de la presencia del inserto *sso-1* en el vector pJV18-N. Geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestran el ADN plasmídico extraído a partir de 10 colonias transformantes y el ADN digerido de las mismas. En cada carril de los cuatro geles se indica con número la colonia correspondiente y con la letra “p” si es ADN plasmídico o “d” si es ADN plasmídico digerido. En la parte superior de **A** se muestran las clonas 1 a 3; en A inferior, clonas de 4 a 6; en **B** superior las clonas 7 y 8, B inferior las clonas 9 y 10. Las flechas en **A** señalan un tamaño esperado de ADN plasmídico 9,615 pb (carril 3p) y ADN plasmídico digerido 1,180 pb para *sso-1* y 8, 493 pb para el vector PJV18 (carril 3d). Las flechas de la izquierda indican el número de pares de bases, dado en kilobases.

A partir de la clona seleccionada se obtuvo un nuevo ADNp “PYM1” por extracción con kit como se describe en la sección de materiales y métodos. El tamaño aproximado total del plásmido PYM1 se observó en un gel de agarosa 1% (Fig. 19). La concentración de este fue de $345 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, y la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1.8, lo que indica un nivel de pureza deseado.

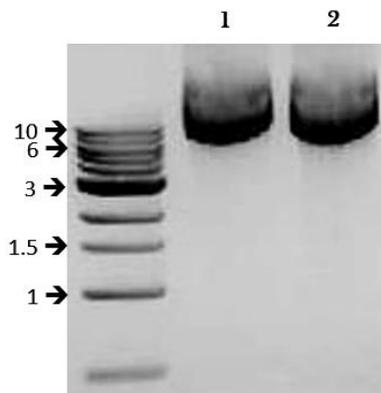


Figura 19. ADNp de PYM1. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) que muestra el ADN plasmídico “PYM1” extraído con kit QIAGEN. Los números superiores (1 y 2) representan el ADN de dos colonias seleccionadas 1 y 2 respectivamente. El tamaño del ADN plasmídico corresponde a 9,615 pb. Los números y flechas de la izquierda indican los pares de bases en kilobases.

6.2.2. Resultados de microscopía confocal.

PYM1 se linearizó con la enzima *SspI*, para poder incorporarlo en el genoma de *N. crassa* a través de la transformación descrita en la sección de materiales y métodos. En la siguiente sección se muestra las hifas que presentaron fluorescencia y que fueron observadas en microscopio confocal con un objetivo de 60X.

6.2.2.1. Distribución de la syntaxina SSO-1 en hifas de *N. crassa*.

La fluorescencia en las hifas de las cepas prototróficas se observó a lo largo de la región distal y subapical conforme la hifa se elongaba (Fig. 20). No se observó en la MP apical, ni subapical. La proteína SSO-1 etiquetada con mCHFP se observó principalmente en una red endomembranal tubular en regiones distales y subapicales

de la hifa, por lo que se sugiere que SSO-1, se localiza en el retículo endoplásmico (RE) de las hifas de *N. crassa*.

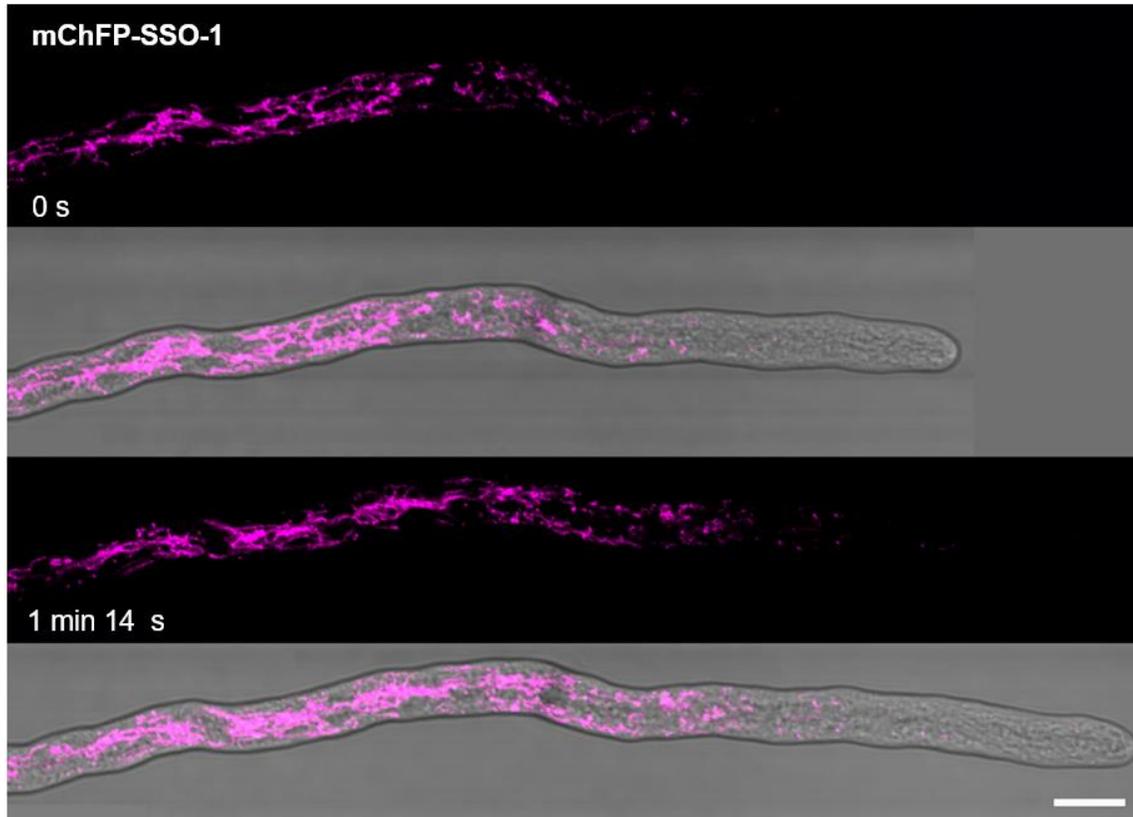


Figura 20. Localización de SSO-1 etiquetada con mChFP en una hifa en crecimiento de *N. crassa*. Hifa de *N. crassa* que muestra la fluorescencia observada a diferentes tiempos en la región distal en forma de endomembranas tubulares. Barra 10 μm .

Para comprobar la naturaleza de la red endomembranal tubular evidenciada por SSO-1, se co-expresaron versiones etiquetadas con proteínas fluorescentes de SSO-1 y la proteína CSE-7, una proteína transmembranal que ha sido observada en el RE tubular por la M.C. A. M. Rico Ramírez del grupo de laboratorio de la Dra. M. Riquelme del Departamento de Microbiología, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada [Rico-Ramírez and Riquelme, 2017]. Al co-expresar la hipotética

t-SNARE mChFP-SSO-1 con el marcador de RE CSE-7-GFP se observó una co-localización parcial de ambas proteínas (Fig. 21).

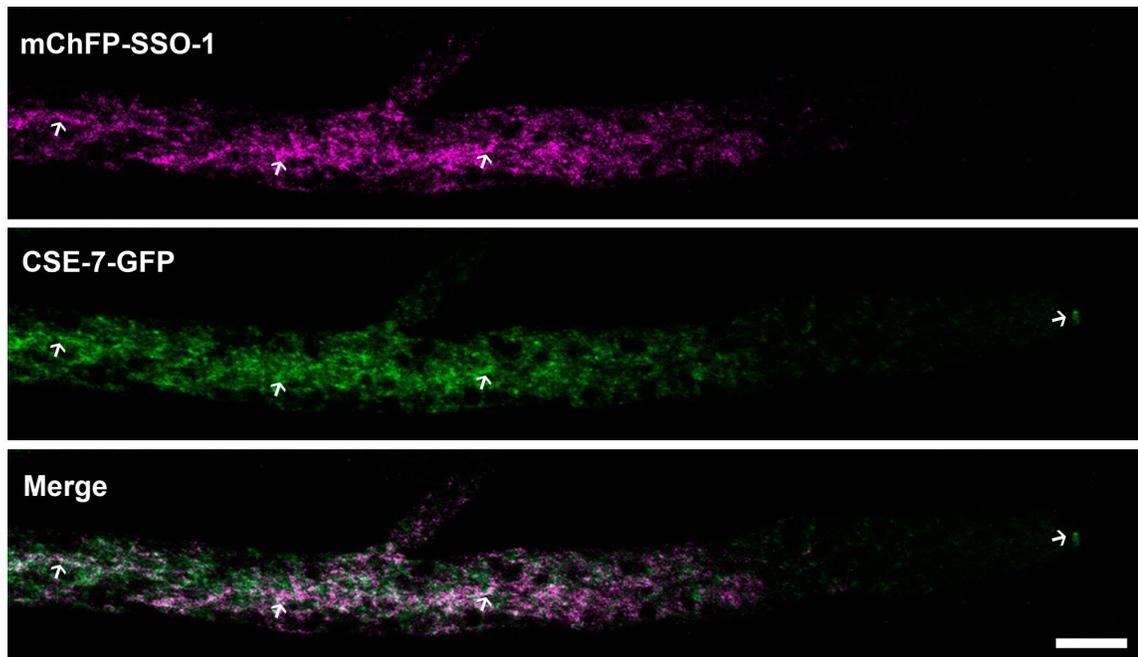


Figura 21. Co-expresión de SSO-1 y CSE-7. En el panel superior se observa mChFP-SSO-1 localizada en una red endomembranal; en el panel central se observa la CSE-7-GFP también localizada en una red endomembranal y en el núcleo del Spk (flecha); en el panel inferior, las flechas del RE indican algunos puntos de co-localización, entre SSO-1 y CSE-7. La flecha en la región apical indica que no hay co-localización entre estas proteínas en la región del Spk. Barra 10 μm .

6.3. Co-expresión de las proteínas CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1.

La proteína quitina sintasa 1 etiquetada con la proteína Cherry fluorescente (CHS-1-mChFP), se observó localizada en la región de microvesículas del Spk, tal y como se reporta en estudios previos. La ya reportada v-SNARE Sinaptobrevina etiquetada con

la proteína verde fluorescente (GFP-SYN-1), se vió co-localización total con la CHS-1-mChFP en el núcleo del Spk (Fig. 22).

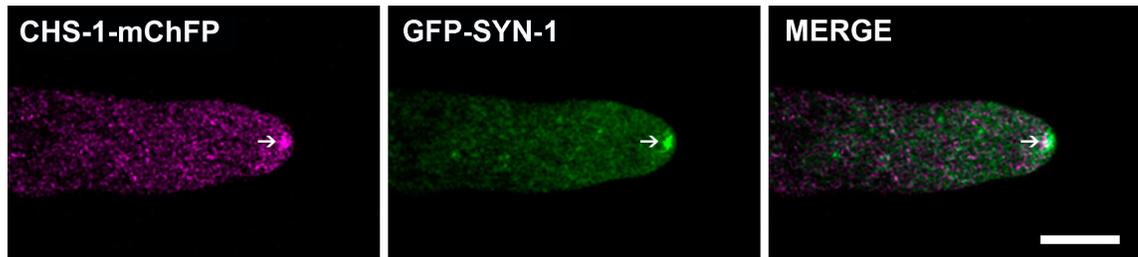


Figura 22. Co-expresión de las proteína CHS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1. En el panel de la izquierda se observa la CHS-1-mChFP en el núcleo del Spk (flecha) o región de microvesículas. En el panel central, la flecha indica la acumulación de la GFP-SYN-1 en la región microvesicular del Spk (flecha). En el panel de la derecha, la flecha indica el punto de co-localización de las proteínas. Barra 10 μ m.

El componente necesario para la actividad Glucano Sintasa (GS-1) etiquetado con la proteína cherry fluorescente (GS-1-mChFP), se observó localizado en la región de macrovesículas del Spk, tal y como se reporta en estudios previos. Al co-expresarse GFP-SYN-1 y GS-1-mChFP, no se observó co-localización en el Spk (Fig. 23).

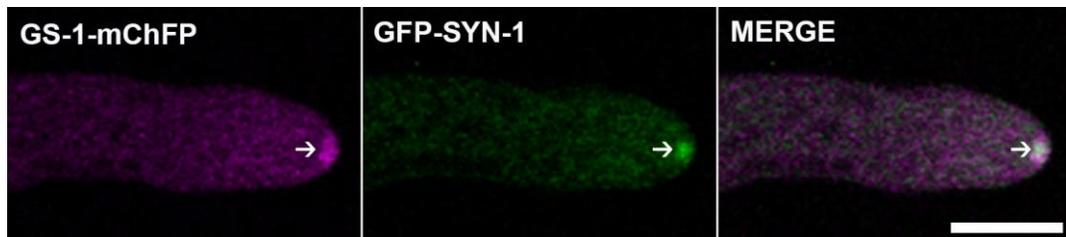


Figura 23. Co-expresión de las proteína GS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1. En el panel de la izquierda se observa GS-1-mChFP localizada en la región de macrovesículas del Spk (flecha); en el panel intermedio se observa GFP-SYN-1 localizada en el núcleo del Spk (flecha) y en el panel de la derecha se observa la falta de co-localización de ambas proteínas (flecha). Barra 10 μ m.

Adicionalmente, las proteínas CHS-1-mChFP y GFP-SYN-1 se observaron localizadas en septos en desarrollo. Se observó a través del tiempo la formación del septo en todas las hifas con fluorescencia; estas proteínas, se observaron co-localizando en los septos (Fig. 24).

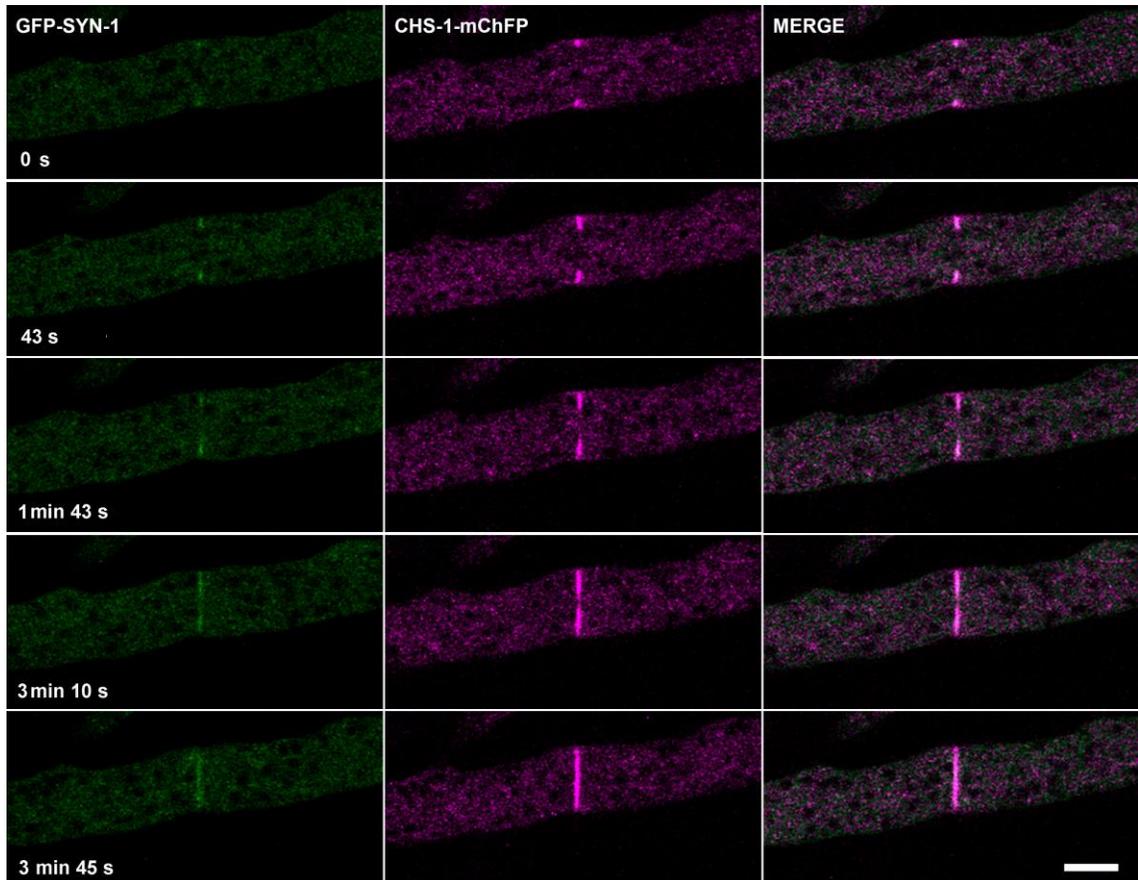


Figura 24. Serie de tiempo de co-expresión de la proteína CHS-1-mChFP con la v-SNARE GFP-SYN-1. Ambas proteínas se ven localizadas en un septo en formación a través del tiempo. En el panel de la izquierda se observa GFP-SYN-1 localizada en el septo y se marca el tiempo de crecimiento del septo de manera vertical. En el panel intermedio, se observa la CHS-1-mChFP localizada claramente en el septo y en el panel de la derecha, se observa la co-localización de ambas proteínas en el septo. Barra 10 μm .

7. Discusiones.

7.1. Alineamiento múltiple de motivo SNARE en syntaxinas homólogas.

Con el fin de respaldar la hipótesis planteada en este trabajo acerca de la naturaleza t-SNARE de la proteína SSO-1 de *N. crassa*, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del motivo SNARE de homólogas a SSO-1. Se eligió el motivo SNARE para hacer el alineamiento, ya que a partir de éste surge la clasificación de SNAREs vesiculares o de membrana diana [Fasshauer et al., 1998]. La secuencia del motivo SNARE de la syntaxina humana, homóloga a Sso1p de *S. cerevisiae* [Hong, 2005] sirvió como referencia para alinear los residuos conservados de otras homólogas, incluyendo a la SSO-1 de este trabajo. Se observó una región conservada de glutaminas en todas las secuencias de proteínas analizadas; este resultado es congruente con la descripción de Fasshauer, donde indica que las t-SNAREs presentan dicho aminoácido en la capa central o capa cero del motivo SNARE. Además, la mayoría de los aminoácidos presentes en las secuencias del motivo SNARE, están conservados en la mayoría de los organismos, lo que apoya la hipótesis de que la SSO-1 es una SNARE de membrana diana.

7.2. Distribución de la t-SNARE SSO-1.

La hipotética localización de SSO-1 en la MP apical, hubiese sido congruente con el análisis de homólogas t-SNARE de otros organismos que conservan la localización-

función. Por ejemplo en *A. nidulans* SSOA se observa en la MP apical [Taheri-Talesh et al., 2008] y está reportada como una t-SNARE que guarda 35% de identidad con la t-SNARE de MP Sso1p en *S. cerevisiae* [Aalto et al., 1993]. El porcentaje de similitud (39%) que comparten la Sso1p y la SSO-1 de *N. crassa*, es más alto que el porcentaje (36%) entre Sso1p y SSO-2 de *N. crassa*, por lo que se esperaba que la SSO-1 se localizara en la MP; sin embargo, la observamos lejos de la región apical, en una red endomembranal tubular. La SSO-2 fue observada por Gupta y Heath en el año 2000, con una técnica de inmunotinción en la que los anticuerpos contra la t-SNARE Sso2p de *S. cerevisiae*, la localizaron a lo largo de la MP. El porcentaje de homología entre estas t-SNAREs es de 42%. Con estos antecedentes, se abre la perspectiva de etiquetar a la SSO-2 de *N. crassa* con una proteína fluorescente, para analizar si ésta es la t-SNARE de MP y no la SSO-1.

La cepa de *N. crassa* expresando mChFP-SSO-1 obtenida en este trabajo muestra fluorescencia lejos de la región apical y en estructuras con forma de red endomembranal tubular. Se ha reportado que en hongos filamentosos, el RE aparece en estructuras reticuladas o cisternas agrupadas en paralelo distribuidas en la región perinuclear o región cortical lejos del ápice [Bourett et al., 2007; Bowman et al., 2009; Maruyama and Kitamoto, 2007]. La co-localización de mChFP-SSO-1 y la proteína CSE-7-GFP [Rico-Ramírez and Riquelme, 2017], marcador putativo de RE, apoya la localización de SSO-1 en el RE. El RE se caracteriza por ser el sitio donde algunas

proteínas solubles y de membrana son internalizadas de manera co-traducciona [Levine and Rabouille, 2005]. Es posible que una ruta de secreción proteica acumule a la SNARE SSO-1 en las membranas del RE. En levaduras, hay evidencia de que la fusión entre membranas del RE es crucial para la división celular y el mantenimiento normal del organelo, esta fusión requiere de la sintaxina Ufe1p, una t-SNARE de RE, pero se desconoce la interacción con alguna v-SNARE [Patel et al., 1998]. Los autores proponen que la Ufe1p tiene una doble capacidad de actuar en la fusión de membranas de organelos mediante la interacción directa t-t-SNARE. La Ufe1p, es una proteína de 41 kDa que participa en la fusión de transportadores retrógrados con el RE, está anclada a la membrana del RE a través de una secuencia de anclaje transmembranal tipo II en el carboxilo terminal [Patel et al., 1998]. La proteína Ufe1p comparte un 40% de similitud con la SSO-1 de *N. crassa*, lo que sugiere que esta proteína puede actuar de manera similar a la Ufe1p de *S. cerevisiae*. Un análisis para determinar el tipo de secuencia de anclaje transmembranal que tiene la SSO-1, podría servir para indicarnos su orientación respecto al citosol.

En eucariotas, la secreción proteica se da a través del transporte de vesículas [Hong, 2005] y se ha observado que las proteínas coatómeros (COPI) se encuentran en dichas vesículas de transporte retrógrado (Fig. 25), que están direccionadas de Golgi a RE [Orcl et al., 1993]. Por lo tanto, este transporte retrógrado explicaría la acumulación de SSO-1 en membranas del RE. Además de este conocimiento, el porcentaje de

identidad con otras proteínas t-SNARE de MP apical y la presencia del residuo glutamina en la capa cero del motivo SNARE, también conservado en otras t-SNAREs ya reportadas, nos indican que la SSO-1 es una t-SNARE.

Para comprobar si SSO-1 es transportada en vesículas COPI que van de Golgi hasta el RE, se podrían utilizar inhibidores de esta ruta, como por ejemplo BFA (Brefeldina A), metabolito fúngico tóxico que bloquea la ruta clásica de secreción [Lippincott-Schwartz et al., 1989].

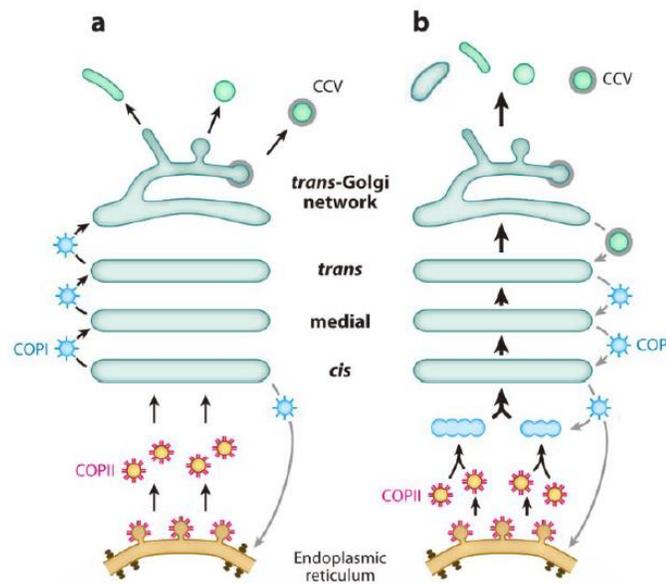


Figura 25. Diagramas de tráfico vesicular retrógrado. Ruta de transporte vesicular de Golgi a Retículo endoplásmico. (a) Compartimentos estables (b) maduración de cisternas. Figura adaptada de [Glick and Nakano, 2009].

7.3. Localización subcelular de la proteína SSO-1.

Existen dos tipos de secuencias primarias de aminoácidos involucradas en el direccionamiento y orientación de las proteínas. Estas secuencias permiten determinar la localización subcelular de las proteínas [Nilsson and Warren, 1994]. Algunos de los factores que se consideran para determinar si la proteína se encuentra anclada a una membrana, es la presencia de una secuencia señal topogénica [Lodish, 2008]. La secuencia tipo I contiene dos lisinas en la posición -3, -4 /-5 respecto al C-terminal [-K(X)KXX, donde X es cualquier aminoácido] y se caracteriza por tener el extremo N-terminal orientado al lumen del RE [Nilsson and Warren, 1994], lo que le permite actuar como señal de “rescate” cuando viajan de RE a Golgi, donde son sorteadas y devueltas a su compartimento de residencia, el RE [Nilsson and Warren, 1994; Rothman, 1981]. La secuencia tipo II, contiene dos argininas dentro de los primeros cinco residuos respecto al extremo N-terminal [XX(RR)X] [Nilsson and Warren, 1994]. En este trabajo analizamos la secuencia de aminoácidos de la proteína SSO-1 y observamos que no presenta ninguno de los dos tipos de secuencias descritas anteriormente (Fig. 26).



Figura 26. Análisis de presencia de secuencias tipo I o tipo II en SSO-1. Los últimos cinco residuos del extremo C-terminal se observan en color naranja, en este sitio podrían encontrarse las dos lisinas (K) en la posición [-3, -4 /-5] que caracterizan a la secuencia tipo I; sin embargo, se observan dos lisinas en las posiciones [-2 y -3]. Para que la secuencia se clasificara como tipo II, tendría que presentar dos argininas (RR) en los primeros cinco residuos del extremo N-terminal, los residuos C-terminal de SSO-1 se observan en color púrpura [Nilsson and Warren, 1994].

La información que tenemos sobre la proteína SSO-1, evidencia su localización en una red endomembranal tubular en regiones basales de la hifa, lo que sugiere que se trata del RE. Su porcentaje de similitud con otras t-SNARE homólogas observadas en MP o RE, también respalda la hipótesis de que es una t-SNARE, como es el caso de la Ufe1p de *S. cerevisiae*, que participa como una t-t-SNARE en la fusión de transportadores retrógrados con el RE y cuenta con una secuencia de anclaje transmembranal tipo II que le permite estar anclada a la membrana del RE. Tras analizar la SSO-1, observamos que no hay presencia de estos tipos de secuencia en ninguno de sus extremos terminales; sin embargo, su alto porcentaje de similitud con la t-SNARE de RE Ufe1p en *S. cerevisiae*, nos sugieren que también puede presentar una interacción t-t-SNARE. En SSO-1, el dominio transmembranal (TM) se encuentra en el C-terminal y de acuerdo a un análisis de su secuencia realizado con el servidor “predicción de hélices transmembranales en proteínas” (TMHMM) v. 2.0, el C-terminal está orientado hacia el

citosol; el extremo N-terminal y el dominio SNARE hacia el lumen del RE (Fig. 27). Las evidencias obtenidas apuntan a que la SSO-1 es una t-SNARE de RE, con una orientación subcelular opuesta a la reportada en la t-SNARE Ufe1p de *S. cerevisiae*, que tiene su dominio SNARE orientado hacia el citosol y su extremo carboxilo hacia el lumen del RE. Estas t-SNAREs tienen en común la localización de su dominio transmembranal, en la membrana del RE. Se ha reportado que la Ufe1p, necesaria para el tráfico retrógrado, no actúa en la fusión de la membrana del RE con una v-SNARE conocida; sino que se une a otra t-SNARE en la membrana opuesta del RE, es decir, participa en la fusión homotípica de membranas del RE. Esta información sugiere que la mChFP-SSO-1 puede actuar de manera similar a Ufe1p, a pesar de que su orientación subcelular es opuesta; debido a que cuando ocurre la fusión y anclaje de membranas, la parte de la proteína orientada hacia el lumen, pasa a una ubicación citosólica y viceversa [Alberts et al., 2013] por lo que es posible que la mChFP-SSO-1 esté siendo acumulada en el RE por una ruta retrógrada de Golgi a RE y es por esto que observamos el dominio SNARE orientado hacia el lumen del RE. Estos antecedentes nos sugieren la necesidad de realizar más análisis para determinar en concreto qué tipo de ruta es la causante de la acumulación de mChFP-SSO-1 en el RE.

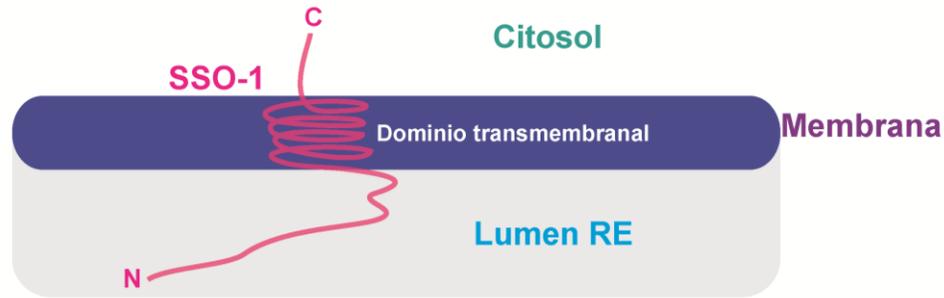


Figura 27. Diagrama de la orientación subcelular de SSO-1 en hifas de *N. crassa*. El dominio transmembranal se encuentra dentro de la membrana del RE; el extremo C-terminal queda orientado hacia el citosol y el extremo N-terminal, hacia el lumen del RE. La mayor parte de esta proteína t-SNARE queda orientada hacia el lumen del RE, de manera que el dominio SNARE queda orientado hacia el lumen del RE.

7.4. Co-expresión de CHS-1-m-ChFP y GS-1-mChFP con SYN-1.

En este trabajo, observamos la co-localización entre las proteínas CHS-1 y GS-1 con SYN-1. Todas ellas se acumulan en el Spk. Se sugiere que SYN-1 está presente en microvesículas del Spk, ya que co-localiza con la CHS-1, pero no con GS-1 en macrovesículas. Además se observó que la SYN-1 se localiza en septos de hifas en crecimiento; esto se observó en la co-expresión con CHS-1. Se ha observado una fuerte fluorescencia de la CHS-1-GFP en septos en desarrollo [Sánchez-León et al., 2011]. Es posible que la v-SNARE SYN-1 esté involucrada en procesos regulados por la maquinaria citoesquelética y de biosíntesis de pared, ya que de esto depende el desarrollo de septos en hongos filamentosos [Mouriño-Pérez and Riquelme, 2013].

8. Conclusiones.

La t-SNARE mChFP-SSO-1 no se observó localizada en la MP apical de las hifas de *N. crassa*; por el contrario, se observó en membranas del RE. La co-localización parcial de mChFP-SSO-1 con CSE-7-GFP confirmó que SSO-1 se ubica en la membrana del RE. Se requieren más estudios para lograr determinar el tipo de ruta celular en la que participa la t-SNARE SSO-1. Las diferencias de localización entre la v-SNARE GFP-SYN-1 y la t-SNARE SSO-1, nos indican que no interaccionan. En *N. crassa*, la v-SNARE GFP-SYN-1 co-localiza en las regiones de microvesículas y septos en desarrollo con laCHS-1-mChFP; a diferencia de la GFP-SYN-1 que no co-localizó con la GS-1-mChFP en la región de macrovesículas.

Lista de referencias bibliográficas

- Aalto M, Ronne H, Keränen S: Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *The EMBO journal* 1993;12:4095.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Essential cell biology*, Garland Science, 2013.
- Arkowitz RA, Bassilana M: Polarized growth in fungi: symmetry breaking and hyphal formation; in: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, 2011, vol 22, pp 806-815.
- Bartnicki-Garcia S: The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. *Evolutionary biology of the fungi* 1987:389-403.
- Bartnicki-Garcia S, Bartnicki DD, Gierz G, López-Franco Ra, Bracker CE: Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Experimental mycology* 1995;19:153-159.
- Bartnicki-Garcia S, Hergert F, Gierz G: Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 1989;153:46-57.
- Bartnicki-Garcia S, Lippman E: Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 1969;165:302-304.
- Bartnicki-Garcia S, Lippman E: Polarization of cell wall synthesis during spore germination of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* 1977;1:230-240.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH: A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 2001;409:839.
- Bonifacino JS: Adaptor proteins involved in polarized sorting. *Journal Cell Biology* 2014;204:7-17.
- Bonifacino JS, Glick BS: The mechanisms of vesicle budding and fusion. *cell* 2004;116:153-166.
- Bourett T, Howard R: Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. *Protoplasma* 1991;163:199-202.
- Bourett T, James S, Howard R: The endomembrane system of the fungal cell; in: *Biology of the Fungal Cell*. Springer, 2007, pp 1-47.
- Bowman BJ, Draskovic M, Freitag M, Bowman EJ: Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell* 2009;8:1845-1855.
- Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P: Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *The Journal of cell biology* 2004;167:889-901.
- Castle ES: Problems of oriented growth and structure in *Phycomyces*. *The Quarterly review of biology* 1953;28:364-372.
- Davis RH: *Neurospora: contributions of a model organism*, Oxford University Press, 2000.
- Davis RH, De Serres FJ: [4] Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in enzymology* 1970;17:79-143.
- Fajardo-Somera RA, Jöhnk B, Bayram Ö, Valerius O, Braus GH, Riquelme M: Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 2015;75:30-45.

- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the national academy of sciences* 1998;95:15781-15786.
- Girbardt M: Die ultrastruktur der apikalregion von pilzhyphen. *Protoplasma* 1969;67:413-441.
- Glick BS, Nakano A: Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annual Review of Cell and Developmental* 2009;25:113-132.
- Gooday G: An autoradiographic study of hyphal growth of some fungi. *Microbiology* 1971;67:125-133.
- Green PB: Pathways of cellular morphogenesis. *The Journal of cell biology* 1965;27:343-363.
- Grosshans BL, Andreeva A, Gangar A, Niessen S, Yates JR, Brennwald P, Novick P: The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *The Journal of cell biology* 2006;172:55-66.
- Grove SN, Bracker CE: Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology* 1970;104:989-1009.
- Gull K: Form and function of septa in filamentous fungi. *Filamentous fungi* 1978.
- Guo W, Grant A, Novick P: Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:23558-23564.
- Gupta GD, Heath IB: A tip-high gradient of a putative plasma membrane SNARE approximates the exocytotic gradient in hyphal apices of the fungus *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 2000;29:187-199.
- Harris SD, Momany M: Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology* 2004;41:391-400.
- Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M: Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryotic cell* 2005;4:225-229.
- Heath IB: *Tip growth in plant and fungal cells*, Elsevier, 2013.
- Herrera T: *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*, México, MX: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- Hickey PC, Swift SR, Roca MG, Read ND: Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in microbiology* 2004;34:63-87.
- Hong W: SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2005;1744:120-144.
- Levine T, Rabouille C: Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Current opinion in cell biology* 2005;17:362-368.
- Lewis MJ, Nichols BJ, Prescianotto-Baschong C, Riezman H, Pelham HR: Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Molecular biology of the cell* 2000;11:23-38.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD: Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 1989;56:801-813.
- Lodish H: *Molecular cell biology*, Macmillan, 2008.
- Maruyama J-i, Kitamoto K: Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi. *FEMS microbiology letters* 2007;272:1-7.
- McClure WK, Park D, Robinson P: Apical organization in the somatic hyphae of fungi. *Microbiology* 1968;50:177-182.

- Mouriño-Pérez RR, Riquelme M: Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. *Advan Genet* 2013;83:99-134.
- Neiman AM: Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *The Journal of cell biology* 1998;140:29-37.
- Nilsson T, Warren G: Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology* 1994;6:517-521.
- Novick P, Brennwald P: Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 1993;75:597-601.
- Orcl L, Palmer DJ, Amherdt M, Rothman JE: Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* 1993;364:732.
- Patel SK, Indig FE, Olivieri N, Levine ND, Latterich M: Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* 1998;92:611-620.
- Pelham HR: SNAREs and the secretory pathway—lessons from yeast. *Experimental cell research* 1999;247:1-8.
- Protopopov V, Govindan B, Novick P, Gerst JE: Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 1993;74:855-861.
- Riquelme M: Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual review of microbiology* 2013;67:587-609.
- Riquelme M, Bartnicki-García S, González-Prieto JM, Sánchez-León E, Verdín-Ramos JA, Beltrán-Aguilar A, Freitag M: Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell* 2007;6:1853-1864.
- Robertson N: Presidential address: the fungal hypha. *Transactions of the British Mycological Society* 1965;48:1IN2-8.
- Rothman JE: The Golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* 1981;213:1212-1219.
- Sánchez-León E, Riquelme M: Live imaging of β -1, 3-glucan synthase FKS-1 in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology* 2015;82:104-107.
- Sánchez-León E, Verdín J, Freitag M, Roberson RW, Bartnicki-Garcia S, Riquelme M: Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic cell* 2011;10:683-695.
- Sánchez-León E, Bowman B, Seidel C, Fischer R, Novick P, Riquelme M: The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology* 2015;95:472-490.
- Shen D, Yuan H, Hutagalung A, Verma A, Kümmel D, Wu X, Reinisch K, McNew JA, Novick P: The synaptobrevin homologue Snc2p recruits the exocyst to secretory vesicles by binding to Sec6p. *The Journal of cell biology* 2013;jcb. 201211148.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362:318-324.
- Sudbery P: Fluorescent proteins illuminate the structure and function of the hyphal tip apparatus. *Fungal Genetic Biology* 2011;48:849-857.

- Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, Osmani SA, Oakley BR: The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell* 2008;19:1439-1449.
- Teng FYH, Wang Y, Tang BL: The syntaxins. *Genome biology* 2001;2:reviews3012. 3011.
- TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P: The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 1996;15:6483.
- Ungar D, Hughson FM: SNARE protein structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 2003;19:493-517.
- Verdín J, Bartnicki-Garcia S, Riquelme M: Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology* 2009;74:1044-1053.
- Walch-Solimena C, Blasi J, Edelmann L, Chapman ER, Von Mollard GF, Jahn R: The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *The Journal of cell biology* 1995;128:637-645.
- Watkinson SC, Boddy L, Money N: *The fungi*, Academic Press, 2015.
- Yamaoka T, Imada K, Fukunishi K, Yamasaki Y, Shimoda C, Nakamura T: The fission yeast synaptobrevin ortholog Syb1 plays an important role in forespore membrane formation and spore maturation. *Eukaryotic cell* 2013;12:1162-1170.