

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA SECRETORA
SEC-10 Y RCY-1 EN *Neurospora crassa*

Que para obtener el Título de **BIOLOGO** presenta:
ALFREDO FIGUEROA MELÉNDEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA Septiembre 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

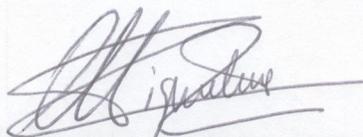
DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA SECRETORA
SEC-10 Y RCY-1 EN *Neurospora crassa*

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

ALFREDO FIGUEROA MELÉNDEZ

APROBADO POR



DRA. MERITXELL RIQUELME PÉREZ
PRESIDENTE



DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SECRETARIO



DR. CARLOS FLORES LÓPEZ
1ER. VOCAL

Agradecimientos

Este proyecto fue posible por el apoyo económico dado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; número de becario 24416) y por los conocimientos adquiridos durante la carrera de biología en la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y durante mi trabajo en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE).

Estoy sumamente agradecido con la Dra. Meritxell Riquelme por aceptarme en su laboratorio y en su equipo de investigación. También agradezco las oportunidades que me ha dado para destacar y explotar mi potencial como científico.

A mis padres Jesús Alfredo Figueroa López y Deyanira Meléndez Hinojosa por apoyarme tanto económicamente como moralmente durante mi formación como Biólogo.

A mi asesora Adriana María Rico Ramírez por enseñarme los fundamentos para trabajar en un laboratorio y por el entrenamiento necesario para poder realizar este proyecto.

A los investigadores y estudiantes del Departamento de Microbiología con los que he tenido el gusto de conocer y compartir el mismo espacio de trabajo

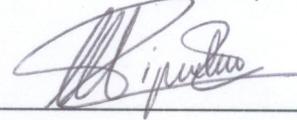
A mis amigos biólogos con quienes he compartido muchos momentos de inspiración y amor: Frida Fernanda Paredes, Juan Alberto Corral, Marylu Maldonado, Adriana Jeanette Ramírez, Romina Yitani y Yesenia Tamayo.

Resumen

Resumen de la tesis de Alfredo Figueroa Meléndez presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 2017.

Distribución de las proteínas de la ruta secretora SEC-10 y RY1 en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Las proteínas de la ruta secretora son componentes esenciales en el crecimiento polarizado y morfogénesis en hongos filamentosos. La exocitosis es el último paso de la ruta secretora y consiste en el acoplamiento de vesículas a la membrana plasmática diana en un proceso mediado por el exocisto, un complejo octamérico conformado por las proteínas SEC-3, SEC-5, SEC-6, SEC-8, SEC-10, SEC-15, EXO-70 y EXO-84. En este trabajo se describe la distribución de SEC-10-GFP en *Neurospora crassa* y la proteína GFP-RY1 mediante Microscopía Confocal de Barrido Láser y su localización en la superficie celular mediante Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total. SEC-10-GFP se encuentra acumulada en el domo apical de las hifas y en puntos subapicales que se observaron viajar anterogradamente hacia la superficie celular apical. GFP-RY1 presentó una distribución citoplasmática dispersa en la punta de las hifas y en regiones distales como puntos moviéndose en la superficie de la célula. La proteína RY1 comparte un dominio de 800 aminoácidos con la proteína SEC-10 y fue descrita como una proteína de la ruta secretora en otros organismos. La cepa mutante con el gen *ry1* eliminado presenta afectación en la formación de estructuras aéreas. SEC-10 es un componente del exocisto cuyo extremo carboxilo terminal es fundamental para la función del exocisto. La eliminación del gen *sec-10* es letal para *N. crassa* y cambios en el extremo carboxilo terminal de la proteína SEC-10 producen un fenotipo con problemas en la morfogénesis y crecimiento.

Tabla de contenido

Resumen.....	IV
1 Introducción.....	4
1.1 Los Hongos en la Naturaleza.....	4
1.2 Generalidades de los hongos filamentosos.....	5
1.3 Biología e historia de <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudio.....	5
1.4 Fisiología celular de <i>Neurospora crassa</i>	6
2 Antecedentes.....	9
2.1 El exocisto y SEC-10.....	9
2.2 RCY-1.....	13
3 Justificación.....	15
4 Objetivos.....	15
5 Hipótesis.....	15
6 Materiales y Métodos.....	16
6.1 Cepas, medios, plásmidos y oligonucleótidos.....	16
6.1.1 Cepas de <i>Neurospora crassa</i> utilizadas:.....	16
6.1.2 Medios.....	17
6.1.3 Plásmidos y oligonucleótidos.....	17
6.2 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas SEC-10 y RCY-1.....	19
6.3 Construcción de cassettes para el etiquetado endógeno.....	20
6.3.1 Extracción de ADN.....	20
6.3.2 Diseño de oligonucleótidos para el etiquetado endógeno.....	20
6.3.3 Amplificación de fragmentos de ADN.....	22
6.3.4 Purificación de ADN en gel de agarosa con Kit Qiagen.....	23
6.3.5 PCR de fusión.....	23
6.4 Etiquetado de RCY-1 en el extremo amino terminal.....	24
6.4.1 Diseño de oligonucleótidos y amplificación de <i>rcy-1</i>	24

6.4.2	Clonación del vector pCCG::N-GFP.....	25
6.4.2.1	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	26
6.4.2.2	Extracción de ADN plasmídico.....	26
6.4.3	Amplificación de <i>rcy-1</i> y purificación en gel de agarosa.....	27
6.4.4	Digestión del vector y del inserto con Pacl y Xbal.....	27
6.4.5	Generación de la construcción pCCG::GFP::RCY-1.....	28
6.4.6	Transformación de <i>E. coli</i> con el constructo.....	29
6.4.7	Extracción de ADN plasmídico y linearización del constructo.....	30
6.5	Expresión de SEC-10-GFP desde el locus <i>his-3</i>	30
6.6	Transformación de <i>N. crassa</i> y selección de transformantes.....	31
6.6.1	Preparación de conidios y transformación de 9718 y 9717.....	31
6.6.2	Selección de cepas transformantes.....	32
6.6.2.1	Transformación con la técnica "Split Marker Gene Replacement".....	32
6.6.2.2	Transformación con el vector pCCG::N-GFP y el VMRP-114.....	32
6.7	Microscopía confocal.....	33
6.7.1	Preparación de muestras.....	33
6.7.2	Observaciones y toma de imágenes.....	33
6.7.3	Tinción de endomembranas con FM4-64.....	34
6.7.4	Co-localización de SEC-10-GFP con proteínas de los diferentes estratos del Spitzenkörper.....	35
6.7.5	Procesamiento de imágenes.....	36
6.8	Análisis de mutantes para los genes <i>sec-10</i> , <i>exo-70</i> y <i>rcy-1</i>	37
6.8.1	Determinación del estado homocarión.....	37
6.8.2	Cruzas para obtener homocariones.....	38
6.8.3	Activación y aislamiento de ascosporas.....	39
6.8.4	Ensayo de crecimiento de diluciones seriadas.....	39
6.8.5	Ensayos de crecimiento en cajas de Petri y en tubos de cultivo.....	41
6.9	Análisis de la tasa de crecimiento.....	42
6.10	Microscopía TIRF de hifas de las cepas que expresan SEC-10-GFP y GFP-RCY-1.....	43
7	Resultados.....	44
7.1	Análisis <i>in silico</i> de las proteínas SEC-10 y RCY-1.....	44

7.1.1	Similitud entre SEC-10 y Rcy1.....	44
7.1.2	Similitud entre Rcy1 y RcyA.....	45
7.2	Amplificación de fragmentos de ADN.....	46
7.3	Productos de la PCR de fusión utilizada en el método "Split Marker".....	46
7.4	Transformación por el método "Split Marker".....	47
7.5	SEC-10-GFP se acumula próximo a la membrana plasmática apical.....	47
7.5.1	SEC-10-GFP expresado bajo el control de <i>Pccg-1</i> desde el locus <i>his-3</i>	50
7.6	Marcaje de la transformante que expresa SEC-10-GFP con la sonda FM4-64.....	51
7.7	Co-expresión de SEC-10-GFP con CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP.....	51
7.7.1	Co-expresión de SEC-10-GFP y CHS-1-mChFP.....	52
7.8	Fenotipo de la cepa homocarión que expresa SEC-10-GFP endógena.....	54
7.8.1	Afectación en crecimiento y morfología de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión.....	55
7.8.2	Morfología compacta de la homocarión SEC-10-GFP incubada una semana.....	56
7.9	Ensayo de crecimiento en diluciones seriadas: 9718, $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ en estado heterocarión.....	57
7.10	Ensayo de crecimiento en diluciones seriadas: 9718, SEC-10-GFP homocarión y $\Delta rcy-1$ homocarión.....	58
7.11	Análisis de las mutantes $\Delta sec-10$, $\Delta exo-70$ y $\Delta rcy-1$	59
7.12	Análisis de la tasa de crecimiento.....	60
7.13	Amplificación de <i>rcy-1</i> con secuencias reconocidas por <i>PacI</i> y <i>XbaI</i>	62
7.14	Comprobación de ligación entre pCCG::N-GFP y Rcy1.....	62
7.15	Distribución de GFP-Rcy1 a lo largo de hifas.....	63
7.16	Comprobación de la integración del vector pAFM01 linearizado dirigido al locus <i>his-3</i>	65
7.17	Microscopía TIRF de hifas de las cepas que expresan SEC-10-GFP y GFP-Rcy1.....	66
7.17.1	Análisis de la distribución de SEC-10-GFP mediante TIRFM.....	66
7.17.2	TIRFM de GFP-Rcy1.....	67
8	Discusión.....	68
9	Conclusión.....	73

1 Introducción

1.1 Los Hongos en la Naturaleza

Los hongos son organismos clave en los ecosistemas, ya que regulan la interacción entre los elementos bióticos y abióticos del medio ambiente (Dighton, 2016). Su distribución es cosmopolita y sus morfologías diversas, incluyendo desde la levadura unicelular, los mohos multicelulares filamentosos o hasta macromicetos, visibles a simple vista. El reino fungi tiene la capacidad de poder habitar ambientes terrestres (Chauvet & Suberkropp, 1995), marinos (Hyde *et al.*, 1998; Raghukumar, 2012) y sitios con temperaturas por debajo del punto de congelación, debido a la producción de ciertos azúcares que permiten su funcionamiento (Robinson, 2001). También existen hongos considerados extremófilos, como los que se aislaron de las paredes del reactor nuclear en Chernóbil después de su explosión en el año 1986 (Zhdanova *et al.*, 2000). La omnipresencia de los hongos en los bosques sugiere que “...los hongos en vez de existir en los márgenes de la vida forestal, son central para él y conectan e influyen la vida y muerte de los organismos presentes; hacer caso omiso de los hongos es no entender el sistema.” (Rayner, 1992).

1.2 Generalidades de los hongos filamentosos

Dentro de la variedad estructural que presentan los hongos, existen hongos de formas simples como los Chytridiomicetos y levaduras; sin embargo la mayoría de hongos son filamentosos. La porción filamentosa de un hongo se denomina micelio. Éste consiste en un arreglo de células tubulares o hifas que se extienden y ramifican apicalmente con el fin de explotar los nutrientes disponibles a su alrededor (Dighton, 2016). Los hongos filamentosos pueden ser cultivados dentro de un laboratorio en diferentes medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos. En medios sólidos de agar, la colonia crece radialmente desde el punto de inoculación. Este patrón de crecimiento radial también es evidente en la seta de corro de bruja (*Marasmius oreades*) que da cuerpos fructíferos en un círculo sobre las praderas (Walker & White, 2005).

1.3 Biología e historia de *Neurospora crassa* como modelo de estudio

Neurospora crassa es un modelo fúngico idóneo para el estudio de la genética, bioquímica y biología celular de células eucariotas. Este hongo fue estudiado extensivamente a mediados del siglo XIX debido a la contaminación de panaderías en Francia (Davis, 2000). *N. crassa* es un ascomiceto filamentoso que tiene un ciclo de vida heterotálico (Dodge & Shear 1927). Bernard O. Dodge le regaló cultivos de *N. crassa* a Thomas Hunt Morgan, quien a su vez le dió dichas cepas a Carl C. Lindegren para que realizara su trabajo de tesis en Caltech, California. El trabajo

de Lindegren corroboró el trabajo de Dodge sobre las bases genéticas del "Mating Type" y la segregación en la segunda división (Meiosis II), y además estableció los primeros mapas de ligación en *N. crassa*. Los estudios realizados por Lindegren y su esposa Gertrude entre 1931 y los 1940's certificó a *Neurospora* como un organismo con genes ortodoxos y demostró que es un modelo eucariota idóneo para estudios genéticos debido a la facilidad de su cultivo, su constitución haploide y susceptibilidad a la mutagénesis. Sin embargo, el potencial para trabajos bioquímicos en *N. crassa* no fue reconocido en los tiempos de Lindegren ya que el principal enfoque era la genética (Davis, 2000). Se logró acumular suficiente evidencia para estipular la hipótesis de "un gen-una enzima" usando este hongo como modelo (Beadle & Tatum, 1941). Siete años después de los hallazgos de Beadle y Tatum se comprobó la deficiencia enzimática de origen mutacional en estudios del locus de triptófano sintetasa (Mitchell & Lein, 1948). Barbara McClintock (1945) y Jesse Singleton (1953), demostraron que la citología meiótica de los cromosomas de *N. crassa* también es ortodoxa, lo cual les permitió asociar grupos de ligamiento con cromosomas que fueron identificados bajo el microscopio (Davis, 2000).

1.4 Fisiología celular de *Neurospora crassa*

Las células de *N. crassa* están rodeadas por una bicapa de membrana plasmática y por una pared celular compuesta de glucanos (polímeros de glucosa), un complejo péptido-polisacárido, poligalactosamina y quitina (Mahadevan & Tatum, 1965). Este hongo filamentoso crece rápidamente y de forma ramificada (Davis & Serres, 1970). La colonia se origina a partir de una spora que germina y produce estructuras tubulares o hifas que se extienden

apicalmente (Davis, 2000). Las hifas se encuentran segmentadas por paredes incompletas que se llaman septos, los cuales presentan un poro central de 350-500 nm de diámetro (Trinci & Collinge, 1973). Los poros de los septos permiten el flujo de citoplasma a lo largo de la hifa hacia el ápice, transportando núcleos, mitocondrias y otros componentes celulares. Si en algún momento la hifa se rompe, la disminución de presión citoplasmática incitaría la formación de tapones en septos próximos a la herida, lo cual mitigaría la fuga de su contenido interno (Wilson, 1961). Este tipo de crecimiento apical también se encuentra en células de otros eucariotas como los pelos radiculares (Shaw *et al.*, 2000), tubos de polen y neuronas (Palanivelu *et al.*, 2000). El crecimiento de hongos filamentosos depende del transporte e integración de vesículas secretoras a la membrana plasmática apical, mediante la fusión de las mismas (Rizzoli & Jahn, 2007). Previo a la fusión, las vesículas se acumulan en un cuerpo apical llamado Spitzenkörper (SPK; Brunswik, 1924) que contiene microvesículas en el interior y macrovesículas en la periferia (Riquelme *et al.*, 2014), las cuales contienen enzimas biosintetizadoras de la pared celular (Verdín *et al.*, 2009).

La acumulación de vesículas en el ápice hifal no es una congestión de tránsito vesicular, sino que corresponde a un sistema altamente evolucionado para la colecta y distribución de vesículas hacia la superficie celular. Se han encontrado microtúbulos (Roos & Turian, 1977; Kwon *et al.*, 1991) y microfilamentos de actina (Howard, 1981; Bourette & Howard, 1991) en la región del SPK. Adicionalmente, encontraron gamma tubulina en la región central del SPK lo cual apoya la noción que el SPK funciona como un centro de organización de microtúbulos (McDonald & Roberson, 2000). La explicación más convincente para la elongación de las hifas se puede encontrar en la combinación del modelo de Centro Suministrador de Vesículas

(Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; 1995) y el modelo del Estado-Estable (Wessels *et al.*, 1986; 1994). De acuerdo al modelo de Wessels, las fibras de la pared celular son sintetizadas en el ápice pero su entrecruzamiento se lleva a cabo en el subápice, dándole flexibilidad a la nueva pared. Según el modelo, la presión que ejerce el citoplasma sería suficiente para impulsar la expansión. Mientras tanto, el modelo del Centro Suministrador de Vesículas propone que el SPK recibe vesículas provenientes del aparato de Golgi que a su vez serán liberadas de manera controlada, generando un gradiente de exocitosis que determina la forma del ápice de la hifa (Bartnicki *et al.*, 1989). Las vesículas secretoras llevan consigo enzimas, proteínas de membrana y componentes de pared celular, las cuales juegan un rol importante en la arquitectura y plasticidad durante la morfogénesis (Riquelme *et al.*, 2011). Se ha descrito que la polaridad y forma tubular de una hifa se mantiene cuando hay exocitosis y endocitosis balanceada en el ápice (Shaw *et al.*, 2011). Mientras nueva membrana es integrada durante exocitosis, membrana situada en el subápice es reciclada por un anillo de actina durante endocitosis (Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

2 Antecedentes

2.1 El exocisto y SEC-10

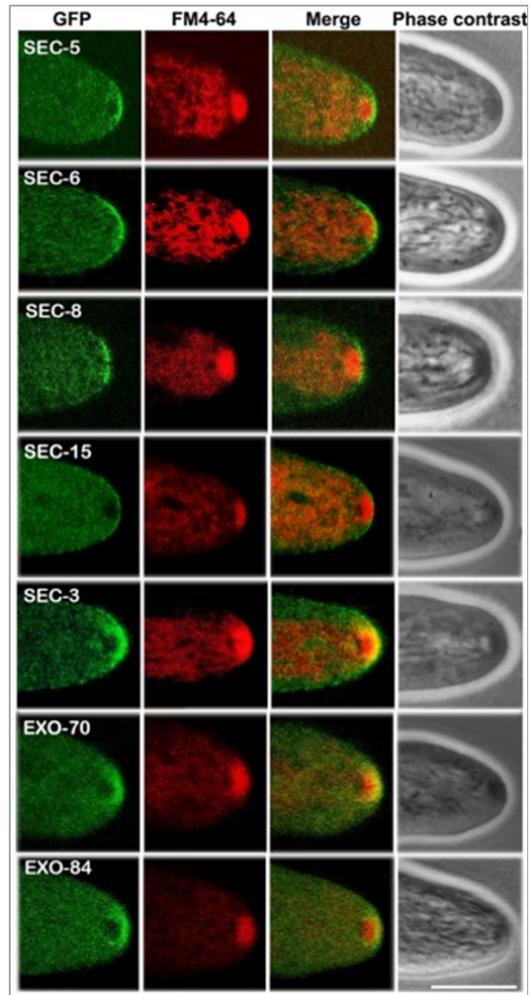
En esencia la ruta secretora en hongos filamentosos se refiere a la secreción de vesículas hacia la membrana plasmática apical en donde se fusiona la membrana de la vesícula y la de la célula, liberando el contenido de la vesícula hacia el espacio extracelular. Este proceso de secreción o exocitosis involucra la participación de varias proteínas esenciales y altamente conservadas en eucariotas (Novick *et al.*, 1980). En la última fase de exocitosis, las vesículas secretoras son reclutadas por un complejo proteico multimérico llamado exocisto, el cual está conformado por ocho subunidades identificadas en *S. cerevisiae*: Sec3p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p y Exo84p (TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999; Figura 2). En *N. crassa*, mediante análisis *in silico* se identificaron los ocho componentes del exocisto, así como una proteína adicional (RCY-1) que contiene un motivo CAAX-box, y los dominios SEC-10-like y F-Box (Ver sección 2.2), utilizando como cebo las secuencias ortólogas encontradas en plantas, hongos y humanos (Riquelme *et al.*, 2014). Todos los componentes excepto SEC-10 (NCU09313), fueron etiquetados con la técnica “Split Marker Gene Replacement” (Smith *et al.*, 2011) lo cual resultó en proteínas fusionadas con la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés “green fluorescent protein”) en el extremo C-terminal de las proteínas en cuestión. En trabajos previos la proteína SEC-10 fusionada a GFP no pudo observarse en *N. crassa* (Riquelme

et al., 2014) ni en *Magnaporthe oryzae* (Gupta *et al.*, 2015). Gupta y colaboradores sugirieron que esto se debe a un impedimento a nivel de expresión de la proteína por razones aún no determinadas. Ambos estudios etiquetaron a las proteínas de interés con GFP en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, se comprobó que la proteína SEC-10 forma parte del exocisto por su coimmunoprecipitación con Sec6 y Exo84 en *M. oryzae* (Gupta *et al.*, 2015). En *N. crassa* se determinó la composición del exocisto mediante experimentos de precipitación usando anticuerpos afines a GFP y por un estudio de espectrofotometría de masas (Riquelme *et al.*, 2014). De los siete componentes solo SEC-15 no pudo ser precipitada. Con base en estos experimentos de precipitación y espectrofotometría de masas se concluyó la presencia del complejo octamérico en *N. crassa*. Se logró describir el patrón de distribución de los siete componentes del exocisto fusionados a GFP, mediante microscopía confocal. Las proteínas etiquetadas presentaron dos localizaciones principales: La capa externa del SPK y la membrana plasmática apical. Para distinguir en que región particular se distribuye cada proteína se analizó la localización de la fluorescencia GFP y de FM4-64. FM4-64 se utiliza para teñir vesículas y endomembranas con el fin de observar el tráfico vesicular que ocurre dentro de una hifa. Los componentes SEC-5, -6, -8 y -15 no presentaron colocalización con el SPK teñido con FM4-64 y se acumularon principalmente en la membrana plasmática apical en una lúnula delimitada (Figura 1; Riquelme *et al.*, 2014).

Las proteínas EXO-70 y EXO-84 se encontraron distribuidas en la parte frontal de la capa externa del SPK, correspondiente a la región macrovesicular que contiene actividad glucano sintetasa (Riquelme *et al.*, 2014; Sánchez-León *et al.*, 2011). Curiosamente, SEC-3 se acumuló tanto en la membrana plasmática apical como en la capa externa del SPK (Figura 1), esto

sugiere que la proteína actúa como un enlace entre los dos subcomplejos del excisto (Riquelme *et al.*, 2014).

Figura 1. Distribución de los componentes del excisto contrastados con el colorante lipofílico



FM4-64 (Color rojo). La columna de la derecha corresponde a imágenes *in vivo* de contraste de fase. Barra de escala = 10 μ m. Figura tomada de Riquelme *et al.*, 2014.

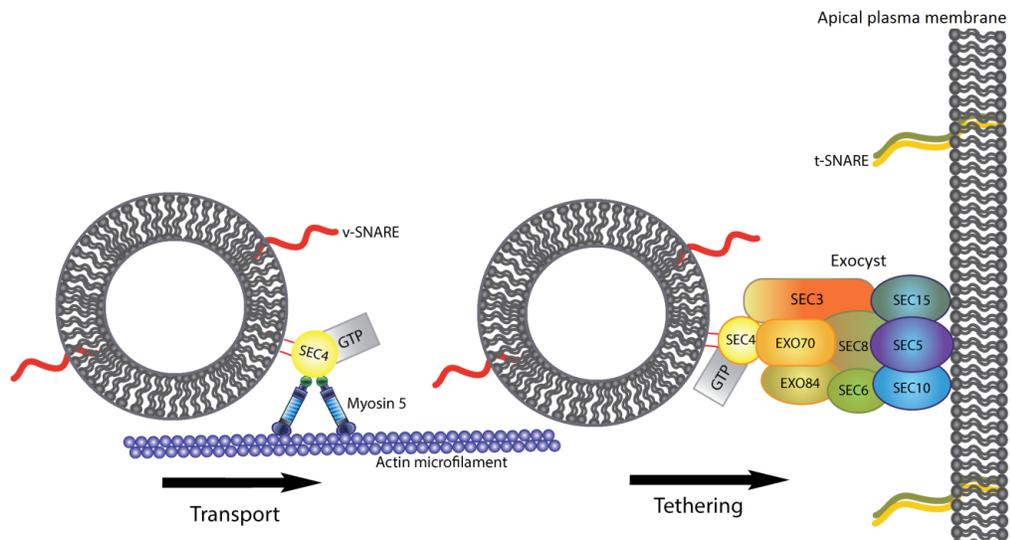


Figura 2. Representación gráfica del transporte vesicular hacia la membrana plasmática apical (*Transport*) en donde las vesículas son reclutadas por los componentes del exocisto (*Tethering*). Figura adaptada de Riquelme *et al.*, 2013.

La morfología de las cepas transformantes fue comparada con la del tipo silvestre (WT) para verificar que la localización de las proteínas corresponde a un exocisto funcional. En un proyecto del genoma funcional de *N. crassa* se determinó que los genes *sec-8*, *sec-10*, *sec-15*, *exo-70* y *exo-84* son esenciales para el correcto funcionamiento de la célula porque los mutantes homocariontes con delección en los genes en cuestión no eran viables, con la excepción de $\Delta sec-5$ (Colot *et al.*, 2006; cepas disponibles en Fungal Genetics Stock Center [FGSC]). El fenotipo de $\Delta sec-5$ presenta un crecimiento anormal parecido a la cepa mutante *sec-5*⁽⁷⁻⁹⁾ que generada por mutagenesis con rayos UV (Seiler & Plamann, 2003). Al secuenciar el locus *sec-5* de la cepa *sec-5*⁽⁷⁻⁹⁾ se encontraron varias inserciones nucleotídicas, resultando en la introducción de un codón sin sentido en una región temprana de la secuencia, lo cual indica una mutante con pérdida de función en la proteína. Las dos mutantes $\Delta sec-5$ y *sec-5*⁽⁷⁻⁹⁾

crecieron en botón de forma compacta comparándolas con la cepa WT que muestra ramificaciones extensas (Riquelme *et al.*, 2014). Se investigó el fenotipo a nivel celular de la mutante *sec-5*⁽⁷⁻⁹⁾ con microscopía de transmisión de electrones y se comparó con el WT; encontraron una acumulación anormal de macrovesículas en la mutante (Riquelme *et al.*, 2014).

2.2 RCY-1

El gen *rcy-1* (NCU03658) fue identificado *in silico* usando como cebo las secuencias ortólogas de los componentes del exocisto presentes en hongos, plantas y humanos (www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html; Galagan *et al.*, 2003). Este gen fue identificado como *sec-10-like* debido al dominio SEC-10 que contiene (Riquelme *et al.*, 2014), la proteína RCY-1 contiene un dominio F-Box y fue previamente descrita en *Schizosaccharomyces pombe* como Pof6 (Hermand *et al.*, 2002), en *S. cerevisiae* como Rcy1p (Wiederkehr *et al.*, 2000) y en *Aspergillus nidulans* como RcyA (Herrero *et al.*, 2014). Pof6 es esencial en *S. pombe* y se demostró su asociación con Skp1 sin el complejo SCF (Hermand *et al.*, 2002). La proteína Rcy1p, o reciclina, regula el transporte endosoma-Golgi en *S. cerevisiae* mediante el reciclaje de proteínas de membrana, específicamente de la proteína de v-SNARE (Receptor soluble de fusión, sensible a N-etilmaleimida para vesículas) sinaptobrevina (Snc1p) (Galan *et al.*, 2001). Herrero y colaboradores estudiaron la distribución subcelular de RcyA en *A. nidulans* mediante su fusión a GFP en el extremo amino terminal y expresado bajo un promotor endógeno o por un promotor inducible con alcohol deshidrogenasa. La proteína mostró una acumulación dinámica en la punta de la hifa ya que la señal fluorescente se movía

retrógradamente en algunos instantes y mostró movimiento bidireccionalmente en puntos fluorescentes subapicales. También se observó fluorescencia en septos en formación y no en septos maduros (Herrero *et al.*, 2014). “Recycling-1” o Rcy1p, en *S. cerevisiae*, está involucrada en el reciclaje de membrana mediante el reciclaje de Snc1p. En *A. nidulans* se probó la distribución de SynA (Snc1p en *S. cerevisiae*) en una mutante con el gen *rcyA* deletado. En la mutante $\Delta rcyA$ se observó una acumulación de SynA en regiones subapicales de hifas hinchadas. El fenotipo de la mutante $\Delta rcyA$ no mostró alguna aberración morfológica drástica en comparación al tipo silvestre y la internalización de membrana (FM4-64) no se vio afectada (Herrero *et al.*, 2014). Estos hallazgos concuerdan con lo observado en *S. cerevisiae*, en donde la mutante $\Delta rcy1$ muestra afectación en el reciclaje de membrana sin afectar la internalización de la misma (Chen *et al.*, 2011).

3 Justificación

Estudios previos han descrito la localización subcelular de siete de las ocho subunidades del exocisto SEC-3, SEC-5, SEC-6, SEC-8, SEC-15, EXO-70 y EXO-84 en *N. crassa* (Riquelme *et al.*, 2014) y en *M.oryzae* (Gupta *et al.*, 2015). El componente SEC-10 es la subunidad del exocisto aún no descrita en *N. crassa* y su localización completaría el modelo de distribución de los componentes del exocisto. La proteína RCY-1, con los dominios CAAX, F-Box, y un dominio SEC-10 like no se ha descrito en *N. crassa* y el análisis de su ubicación subcelular revelaría su posible función en la ruta secretora y complementaría lo visto en la proteína ortóloga en *A. nidulans* (Herrero *et al.*, 2014).

4 Objetivos

Objetivo general

Caracterización de las proteínas SEC-10 y RCY-1 en hifas de *Neurospora crassa*.

Objetivos específicos

1. Analizar la distribución intracelular de las proteínas SEC-10 y RCY-1.
2. Determinar la participación de SEC-10 y RCY-1 respecto al tráfico vesicular.

5 Hipótesis

SEC-10 se localiza en una creyente apical asociada a la membrana plasmática.

RCY-1 se localiza en septos en desarrollo y en puntos subapicales.

6 Materiales y Métodos

6.1 Cepas, medios, plásmidos y oligonucleótidos

6.1.1 Cepas de *Neurospora crassa* utilizadas:

Tabla 1. Las cepas de *Neurospora crassa* que fueron utilizadas se cultivaron en medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel 1956) solidificado con 1.5 % de agar (AGARMEX, S.A. dE C.V) y se incubaron a 30 °C.

Núm.	Genotipo	Referencia
N1	<i>Mat a</i> ; WT	FGSC988
N150	<i>Mat A</i> ; WT	FGSC9013
SMRP22	<i>Mat A</i> ; Δ <i>rcy-1</i>	FGSC21256
SMRP24	<i>Mat A</i> ; Δ <i>mus-51::bar⁺</i> ; <i>his-3</i>	FGSC9717
SMRP25	<i>Mat a</i> ; Δ <i>mus-51::bar⁺</i>	FGSC9718
SMRP90	* <i>Mat A</i> ; <i>Pccg-1::chs-1::chfp</i>	Verdin <i>et al.</i> , 2009
SMRP93	* <i>Mat A</i> ; <i>Pccg-1::gs-1::chfp</i>	Verdin <i>et al.</i> , 2009
SMRP13 7	<i>Mat a</i> ; Δ <i>exo-70</i>	FGSC11414
SMRP25 8	<i>Mat a</i> ; Δ <i>sec-10</i>	FGSC11723
SMRP41 0	<i>Mat A</i> ; <i>Pccg-1::sec-10::gfp</i>	Este estudio
SMRP41 1	<i>Mat a</i> ; <i>Psec-10::sec-10::10xGly::gfp::loxp::hph::loxp</i> ; Δ <i>mus-51::bar⁺</i>	Este estudio
SMRP41 2	* <i>Psec-10::sec-10::10xGly::gfp::loxp::hph::loxp</i> ; Δ <i>mus-51::bar⁺</i> Homocarión	Este estudio
SMRP41 3	<i>Mat A</i> ; <i>his-3⁺::Pccg-1::gfp::8xGly::rcy-1</i> ; Δ <i>mus-51::bar⁺</i>	Este estudio
SMRP41 4	Δ <i>rcy-1</i> (Homocarión)	Este estudio

WT = Genotipo tipo Silvestre, FGSC = Fungal Genetics Stock Center, * = Homocarión

6.1.2 Medios

Se obtuvo el material genético de la cepa N1 inoculando 1×10^6 conidios en medio completo de Vogel (2 % sales de Vogel 50X, 1.5 % sacarosa, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % N-Z casaminoácidos). Las cepas transformadas genéticamente fueron cultivadas en placas de agar FGS (2 % sales de Vogel 50X, 1 % agar, 10 % de solución FGS). La solución FGS está compuesta de 0.5 % fructosa, 0.5 % glucosa y 20 % sorbosa en agua destilada, la cual fue esterilizada por filtración (Filtro VWR® con 0.45 μm de acetato de celulosa). Todos los medios utilizados fueron previamente esterilizados a 121 °C y 15 psi (Libra-fuerza por pulgada cuadrada) en una autoclave durante 15 minutos (Marker Forge, Sterilmatic®).

6.1.3 Plásmidos y oligonucleótidos

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

Número	Vector	Genotipo	Referencia
VMRP-48	pGFP::hph::loxP	<i>10xGly::gfp</i>	Honda & Selker 2009
VMRP-73	pCCG::N-GFP	<i>Pccg1::8xGly::gfp</i>	Honda & Selker 2009
VMRP-114	SEC-10-2-1	<i>Pccg1::sec-10::gfp</i>	Riquelme UCSD
VMRP-143	pAFM-GFPrcy1	<i>Pccg1::8xGly::rcy-1::gfp</i>	Este estudio

En la Tabla 2 se muestran los plásmidos utilizados para transformar a *Neurospora crassa* y etiquetar las proteínas SEC-10 y RCY-1. Los oligonucleótidos necesarios para generar los fragmentos de ADN utilizados en la construcción del vector recombinante pAFM01, en la amplificación de los fragmentos “Split Marker” y de fragmentos de comprobación (Tabla 2).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Número del Lab	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
260	hph SM-R	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC
261	hph SM-F	AAAAAGCCTGAACTCACCGGACG
298	loxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA
299	10XGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
420	sec10GlyR	CCTCCGCCTCCGCTCCGCCGCTCCGCCAGTCCAGCCAGTACACCCTGGATACC
421	sec10GlyF	CGATTCGTCAGACCTTACGCCAC
422	sec10loxF	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGAAGATATTGCGAGTTTTGGTGGGG
423	sec10loxR	GGTCTGGGTCTGGGTTTGC GACTG
527	Sec-10-XbaI-F	CTAGTCTAGAATGGAACGCGGCGGACCC
528	Sec-10-PacI-R	CCTTAATTAACCTCGCCATATCCTCCCCTTC
531	GST-EXO-70-F- BamHI	ATGGCTGTCGGCCTCATCAACG
532	GST-EXO-70-R-NotI	GTAAAGACTGCGGAAAACAGC
555	PacI-RCY1-F	CCTTAATTAACATGTCCAATTCAAAGGGCCTCCATG
556	XbaI-RCY1-R	GCTCTAGATCACATTACCAAACACTCCAGCCCATAC
630	RCY1mi-F	GCAATGCGAGGCCATATTCGTCGCT
631	RCY1-Gly-R	CGCCTCCGCTCCGCCGCTCCGCCATTACCAAACACTCCAGCCCATAC
632	LoxP-UT3RCY1-F	ATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGGGTTGTAGGGAGGGACCATCGAAGG
633	UT3RCY1-R	GGATTTTGGTCTAGCACGGAGCTTTGC

6.2 Análisis *in silico* de las proteínas SEC-10 y RCY-1

RCY-1 fue previamente encontrada en la base de datos cómo una proteína que contiene un dominio incompleto de SEC-10 (Riquelme *et al.*, 2014). Para corroborar esto se realizó un análisis de alineamiento local usando el programa SIM que utiliza un algoritmo de similitud local en un espacio vectorial para encontrar el mejor alineamiento sin intersecciones entre dos secuencias de proteínas (<http://web.expasy.org/sim/>; Huang & Miller 1991). Se bajaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas SEC-10 y RCY-1 en archivos tipo FASTA desde la base de datos bioinformática de *Neurospora crassa* en EnsemblFungi (http://fungi.ensembl.org/Neurospora_crassa/Info/Index). La proteína RcyA de *Aspergillus nidulans* es ortóloga de RCY-1 y su secuencia fue obtenida en la base de datos del genoma de *A. nidulans* con el número sistemático AN10061 (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/protein>). Las secuencias de estas proteínas fueron introducidas por pares, RCY-1 contra SEC-10 y RCY-1 contra RcyA, al programa SIM usando los siguientes parámetros predeterminados: Matriz de comparación BLOSUM62, 20 alineamientos calculados, penalización por gap abierto de 12 y penalización por extensión de gap de 4. El programa genera un archivo tipo PL que fue abierto con el programa gráfico LalnView utilizado para visualizar el alineamiento local entre secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas (<http://doua.prabi.fr/software/lalnview>; Duret & Gout 1996). Debido al tamaño y baja resolución del gráfico generado por este programa se decidió rediseñar en Adobe Illustrator CC 2015.

6.3 Construcción de cassettes para el etiquetado endógeno

6.3.1 Extracción de ADN

Para llevar a cabo el etiquetado de las proteínas de interés (SEC-10 y RCY-1) se extrajo el ADN genómico de la cepa tipo silvestre N1 (Tabla 1). Se inocularon 1×10^6 conidios en un matraz de 1 L con 300 mL de MCV y se dejó en incubar a 30 °C (Environ Shaker®, Lab line) con agitación lenta (150 rpm) durante 16 h. Posteriormente el micelio fue filtrado al vacío con una bomba (felisa™ Modelo FE-1500) en un embudo sujeto a un matraz Kitasato de 2 L. El micelio fue macerado en un mortero con nitrógeno líquido hasta quedar como un polvo fino. Después se procedió con la extracción del ADN genómico utilizando el Kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen N.V), siguiendo el protocolo tal y como lo describe la casa comercial.

6.3.2 Diseño de oligonucleótidos para el etiquetado endógeno

Los oligonucleótidos (#420-423 de Lab Riquelme) utilizados para etiquetar SEC-10 (NCU09313) con la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) fueron diseñados en un estudio previo en el cual no se logró obtener ninguna cepa transformante fluorescente (Riquelme *et al.*, 2014). Para poder etiquetar a RCY-1 (NCU03658) con GFP bajo el control de su promotor endógeno, primero se consultó la base de datos (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora>). Se identificó la secuencia codificante de la proteína incluyendo los intrones y 1 500 pares de bases de la región río abajo no traducida (UTR-3'). Este método inicia con la amplificación de dos fragmentos de ADN: 1 Kb del marco abierto de lectura (ORF) desde el codón de terminación (Figura 3A) y 1 Kb de la UTR-3' (Figura 3B). Usando el programa de edición de plásmidos ApE (A plasmid editor), se diseñaron los oligonucleótidos requeridos para la amplificación de estos fragmentos. Para amplificar el fragmento A se diseñó un oligonucleótido directo A1 (sec10 GlyF) de 25 pb situado

a 1 Kb río arriba del codón de terminación y un oligonucleótido reverso A2 (sec10 GlyR) con las últimas 25 pb del ORF sin incluir el codón de terminación y agregando 25 pb que flanquean el extremo 5' del vector pGFP::hph::loxP (Honda & Selker, 2009) que codifica para 8 glicinas (Tabla 2). Bajo el mismo principio se diseñó otro par de oligos para la amplificación de una Kb de la UTR-3': un oligo directo B1 (sec10 LoxF) que flanquea una extensión de 25 pb del extremo 5' del UTR y 25 pb de la región loxP de VMRP-48 y un oligo reverso B2 (sec10 LoxR) que flanquea 25 pb ~ 1 Kb después del oligo B1.

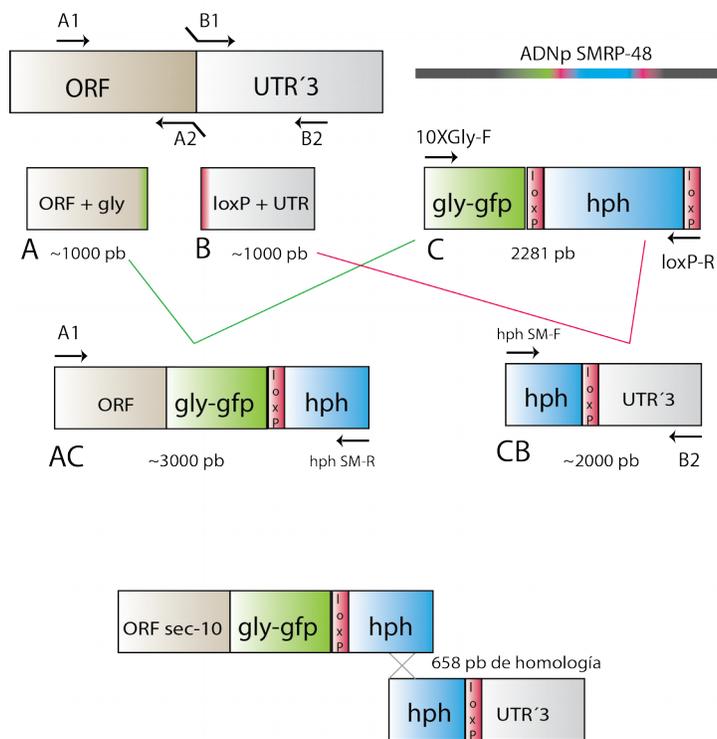


Figura 3. Diagrama mostrando los pasos a seguir en el etiquetado de SEC-10 utilizando la técnica de "Split Marker" (Adaptada de Riquelme *et al.*, 2014).

6.3.3 Amplificación de fragmentos de ADN

Se realizaron dos reacciones en cadena de polimerasa (PCR) independientes, usando como templado el ADN genómico de *N. crassa*. La primera reacción amplificó (1 Kb) del ORF del gen de interés in el codón de terminación (*sec-10* y *rcy-1*, independientemente) más un brazo que codifica para glicinas (Figura 3A). Se utilizó un oligonucleótido directo que flanquea 25 bases situadas 1 Kb río arriba del codón de terminación y un oligonucleótido reverso con ~50 bases que flanquea las últimas 25 bases del ORF sin el codón de terminación y 25 bases de la secuencia codificante del brazo de glicinas. La segunda reacción de PCR amplificó 1 Kb del UTR 3' con un oligonucleótido directo de 50 bases que flanquea 25 bases de loxP y 25 bases del inicio del UTR 3' y un oligonucleótido reverso que flanquea 25 bases del UTR 3' ~1 Kb río abajo del gen (Figura 3B). Se realizó además una PCR que amplificó el fragmento *10xGly::gfp::hph* usando como templado el plásmido VMRP-48 (Figura 3C). Cada una de las dos reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando la enzima TaKaRa LA Taq® (Clontech) con sus respectivos reactivos, en un volumen final de 50 µL, siguiendo las indicaciones de la casa comercial y utilizando el programa recomendado para la reacción.

6.3.4 Purificación de ADN en gel de agarosa con Kit Qiagen

Para eliminar las inespecificidades de la reacción en cadena de la polimerasa, se requiere purificar los fragmentos deseados en un gel de agarosa. Con cinta adhesiva se juntaron tres moldes de pozo del peine para gel de agarosa por cada fragmento (Figura 3A-C); se colocó el peine sobre una celda y se vertió una capa delgada de agarosa al 1 % con bromuro etidio. En cada pozo grande se le añadió todo el volumen de la muestra mezclándolo con de Buffer de carga 6x (40 % Sacarosa y 0.25 % azul de bromofenol o xileno cianol) a una concentración final 1x. Se permitió correr el gel bajo 90V durante 40 minutos para separar el ADN. Al ser expuesto el gel a rayos ultravioleta a una intensidad de 75 % en un transiluminador (WiseUv Modelo-L10) se pudo observar una banda con el tamaño correspondiente de cada fragmento (Figura 3A-C) respecto al marcador de peso molecular de 1 Kb (O'Gene™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Con una navaja (Tamaño 11) se cortó rápidamente las bandas del gel para evitar causar mutaciones en los fragmentos de interés. Cada banda visible en el gel se colocó en un tubo de microcentrifuga para posteriormente ser purificado con QIAquick® Gel Extraction Kit, utilizando el protocolo establecido por la casa comercial.

6.3.5 PCR de fusión

Se realizaron dos PCR de fusión para obtener los dos cassettes (Figura 3AC y CB) que fueron utilizados para transformar a *N. crassa*. El amplicón AC es aproximadamente de 3 Kb y contiene 1 Kb del ORF de *sec-10*, la secuencia codificante de GFP y la mitad de la secuencia que codifica para resistencia a higromicina. Para amplificar lo previamente mencionado, se utilizaron los oligonucleótidos A1 y hph SM-R (Figura 3). Se obtuvo el amplicón CB de ~2 Kb usando los oligos hph SM-F y B2 para amplificar el cassette que contiene el UTR del gen de

interés (Figura 3CB). Ocurrieron tres recombinaciones al introducir ambas fusiones en *N. crassa*: En el extremo 5' del amplicón AC, entre las 658 pb homólogas de hph de ambos fragmentos y en el extremo 3' del amplicón CB (Figura 3). Por cada una de las dos reacciones se preparó un mix de 100 µL utilizando la enzima TaKaRa LA Taq® (Clontech) con sus respectivos reactivos, el cual fue dividido en dos tubos de PCR con 50 µL en uno. Finalmente se realizó el mismo protocolo de purificación de gel de agarosa (Ver sección 6.3.4) y en el último paso indicado en el kit se utilizaron 30 µL del Buffer de elución. Los dos productos purificados se utilizaron para transformar a la cepa FGSC # 9718 cómo indica la sección 6.6.2.1.

6.4 Etiquetado de RCY-1 en el extremo amino terminal

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos y amplificación de *rcy-1*

Para el etiquetado de RCY-1 en el extremo amino terminal se diseñaron oligonucleótidos con secuencias de reconocimiento de las endonucleasas PacI y XbaI, para amplificar el gen e insertarlo en el vector pCCG::N-GFP (Honda & Selker 2009) el cual está dirigido al locus *his-3*. El par de oligonucleótidos diseñados flanquean los extremos 5' y 3' del gen completo, cada uno incluye 25 bases del gen y la secuencia reconocida por las enzimas de restricción mencionadas (PacI-RCY1-F y XbaI-RCY1-R; Tabla 2).

6.4.2 Clonación del vector pCCG::N-GFP

El vector mostrado en el siguiente mapa fue reproducido en *E. coli* mediante transformación de células quimiocompetentes. El promotor CCG es reprimible por glucosa y contiene el sitio de clonación múltiple después de las secuencias que codifican para 8 glicinas (Honda & Selker 2009).

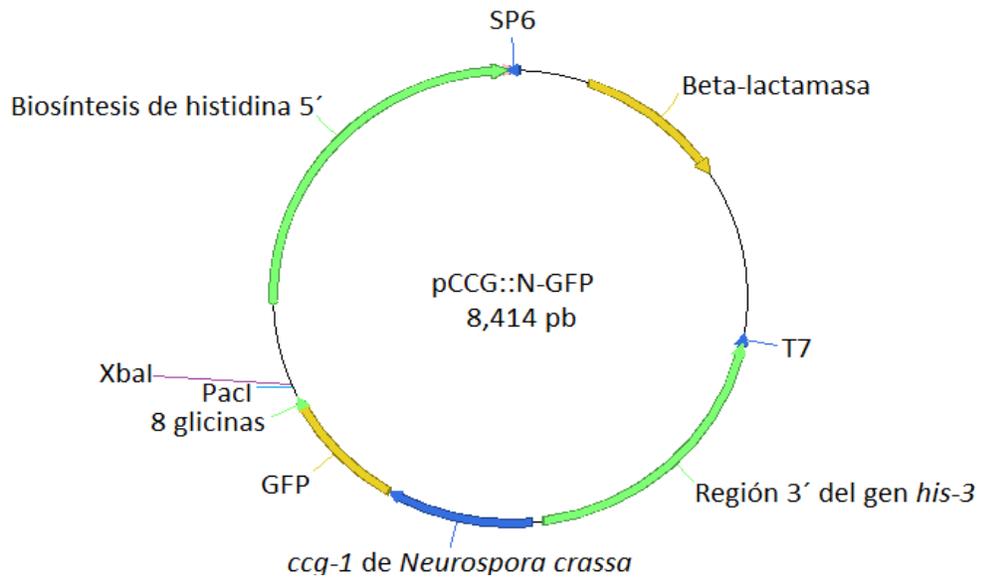


Figura 4. Mapa del vector pCCG::N-GFP generado en el programa ApE. En color verde se muestran las secuencias para dirigir la integración del cassette al locus *his-3* y después del gen *gfp* se encuentran las secuencias que codifican para 8 glicinas seguidas por el sitio múltiple de clonación en donde las endonucleasas *Pacl* y *Xbal* fueron utilizadas.

6.4.2.1 Transformación de células competentes de *E. coli*

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 50 μ L de la solución KCM (Potasio, Calcio y Magnesio), 2 μ L del del vector pCCG::N-GFP y 52 μ L de la cepa DH5 α mezclando las células cuidadosamente. El tubo fue incubado 30 min en hielo y después recibió un choque térmico exactamente 2 min a 42 °C e inmediatamente fue incubado 3 min en hielo. Posteriormente se le agregaron 200 μ L de medio LB líquido en esterilidad y se dejó incubar 1 hr a 37 °C con agitación de 650 rpm en el bloque térmico Digital Heating Shaking Drybath de Thermo Scientific™. Después del tiempo de incubación se esparcieron 150 μ L de las células en dos placas de LB agar con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL y las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 horas.

6.4.2.2 Extracción de ADN plasmídico

Las colonias que crecieron en las placas con ampicilina fueron seleccionadas individualmente con la ayuda de picadientes estériles sujetos por una pinza flameada. La colonia individual se picó con el palillo y fue transferido a un tubo de cultivo de borosilicato con 9 mL de LB líquido con ampicilina. Los tubos se inclinaron ligeramente y se incubaron a 37 °C con 150 rpm de agitación durante 16 horas. Con guantes, se transfirió el volumen a un tubo con rosca de 15 mL y se centrifugó 2 min a 5,000 rpm. El sobrenadante se desechó y la pastilla fue resuspendida con 250 μ L Buffer P1 del kit QIAprep® Spin Miniprep. Después se realizó la

extracción del ADN plasmídico utilizando el Kit de extracción QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen N.V), siguiendo los pasos como lo describe la casa comercial.

6.4.3 Amplificación de *rcy-1* y purificación en gel de agarosa

Se amplificó el gén *rcy-1* usando los oligonucleótidos Pacl-RCY1-F y Xbal-RCY1-R, y los reactivos que están incluidos en el kit TaKaRa LA PCR™. Las condiciones físicas de la PCR fueron las que recomienda la casa comercial, la temperatura de alineamiento en esta reacción fue de 57 °C y el volumen de 50 µL. Se usaron 5 µL del producto en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño de 3,281 pb. Posteriormente se purificó el producto de PCR usando el kit de purificación de Qiagen y el mismo protocolo de la sección 6.3.4.

6.4.4 Digestión del vector y del inserto con Pacl y Xbal

Después de amplificar *rcy-1* y clonar el vector pCCG::N-GFP se cuantificó la cantidad de ADN en ambas muestras con Nanodrop y se realizó una digestión en los productos con las endonucleasas Pacl y Xbal para obtener extremos cohesivos. Se digirieron 1,500 ng del amplicón *rcy-1* y 2,400 ng del vector independientemente a un volumen final de 20 µL con 8 unidades enzimáticas (U) de Pacl y 5 (U) en ambas muestras. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR sellados con parafilm e incubados a 37 °C durante 20 horas. Posteriormente se desfosforiló el vector pCCG::N-GFP con fosfatasa alcalina de camarón, incubando el tubo a 37 °C por 1 hr para evitar la auto-ligación del vector. El tubo después fue incubado 15 minutos a 80 °C para desactivar la fosfatasa alcalina y realizar exitosamente la ligación con T4 ligasa. Ambas

muestras digeridas fueron purificadas en gel de agarosa usando el protocolo de la sección 6.3.4 y las muestras purificadas fueron cuantificadas con Nanodrop.

6.4.5 Generación de la construcción pCCG::GFP::RCY-1

La reacción de ligación se llevó a cabo usando una relación 1:3 entre el vector y el inserto. En un tubo de PCR se le añadieron 128 ng del vector, 384 ng del inserto y 1 μ L de la enzima T4 ligasa(New England Biolabs) en un volumen final de 20 μ L lo cual fue incubado durante 18 horas a 16 °C en un termociclador. El constructo debería de medir 11 754 pb como se puede ver en el mapa de la Figura 5.

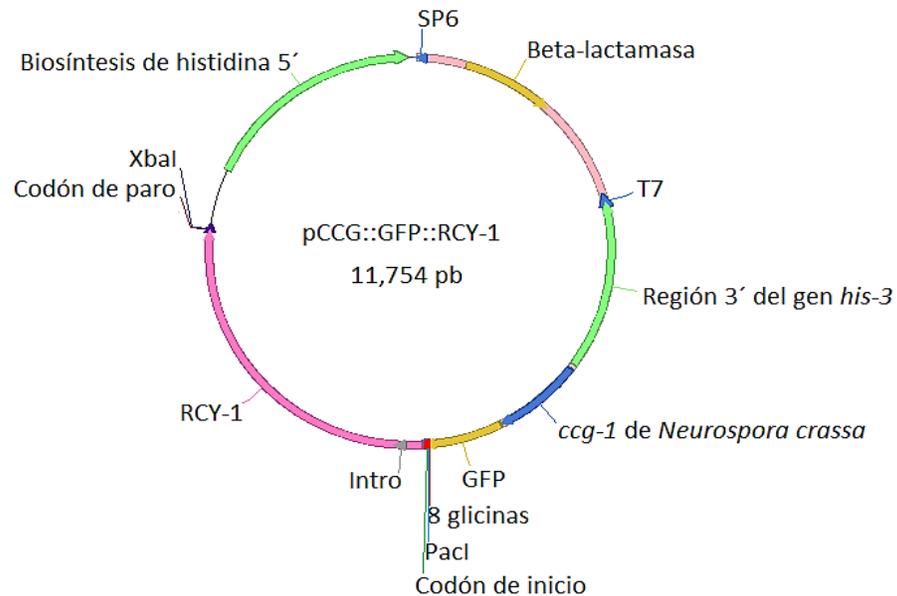


Figura 5. Mapa del vector pCCG::GFP::RCY-1, producto de la ligación entre el vector pCCG::N-GFP y el gen *rcy-1*. En el extremo 5' de *rcy-1* se encuentra la secuencia que codifica para 8 glicinas y GFP.

6.4.6 Transformación de *E. coli* con el constructo

Se utilizó el producto de la ligación de la sección 6.4.5 para transformar a la cepa DH5 α con el protocolo de transformación de la sección 6.4.2.1. Las colonias que crecieron en medio LB agar con ampicilina deberían de contener el vector pCCG::N-GFP con la resistencia a ampicilina dado por beta lactamasa (Figura 5). Se aislaron las colonias individuales como es descrito en la sección 6.4.2.2, sin embargo en vez de usar el kit Qiagen se realizó el siguiente miniprep casero: Se centrifugó la suspensión de células de *E. coli* 3 min a 6 000 rpm en tubos con rosca de 15 mL. Se desechó el sobre nadante y se resuspendieron las células con 100 μ L de buffer P1 frío y se transfirió el volumen a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se le agregaron 150 μ L de buffer P2, se mezcló por inversión 17 veces y fue incubado 5 minutos en hielo. A continuación se le añadió 200 μ L de buffer P3 frío, se mezcló por inversión suave y se permitió incubar 10 min en hielo. La mezcla se centrifugó 15 min a 13 000 rpm, se rescató el sobrenadante con pipeta sin tocar la pastilla y fue transferido a un nuevo tubo eppendorf. El ADN fue precipitado con 2 volúmenes de alcohol absoluto al 96% y se dejó enfriar 30 min a -20 °C en el congelador, mezclando por inversión cada 7 minutos. El tubo fue centrifugado 15 min a 13 000 rpm, se desechó el sobrenadante con pipeta y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al

70% mezclando el tubo por inversión. Se centrifugó el tubo 5 min a 13 000 rpm, desechando el sobrenadante y dejando secar la pastilla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se resuspendió el extracto con 60 μ L de agua libre de ADNasas. 5 μ L del extracto plasmídico fue digerido con las enzimas *PacI* y *XbaI* en un volumen final de 20 μ L e incubado 20 horas a 37 °C en tubos de PCR con parafilm. El ADN digerido se dejó correr en un gel de agarosa al 1% para revelar las dos bandas esperadas *rcy-1* de 3 281 pb y pCCG::N-GFP de 8 414 pb. La colonia que presente las dos bandas en el gel de agarosa contiene el constructo de 11 754 pb (Resultados en sección 7.14.1).

6.4.7 Extracción de ADN plasmídico y linearización del constructo

Se realizó la extracción de ADNp con el kit Qiagen para obtener ADN puro, siguiendo el protocolo de la sección 6.4.2.2. Se mezcló 4 μ g de ADNp con la enzima *NdeI* y fue aforado a un volumen final de 20 μ L e incubado 20 horas a 37 °C con parafilm en el tubo. Se tomaron 500 ng del vector linearizado para transformar conidios de FGSC #9717.

6.5 Expresión de SEC-10-GFP desde el locus *his-3*

Aparte de expresar SEC-10-GFP bajo el control de su promotor endógeno, fue de interés expresar SEC-10-GFP bajo el control del promotor CCG-1 desde el locus *his-3*. El constructo VMRP-114 (Tabla 2) requerido para poder realizar esto fue creado por la Dra. Meritxell Riquelme en UCSD. Este vector expresa SEC-10 con GFP en el extremo carboxilo terminal sin una cadena de glicinas y el plásmido se encontraba congelado para posteriormente ser utilizado en la transformación de *N. crassa*. El vector fue clonado mediante la transformación de células

competentes descrito en la sección 6.4.2.1 y el ADN plasmídico se obtuvo por miniprep Qiagen (Sección 6.4.2.2). El plásmido fue linearizado tal y como es descrito en la sección 6.4.7 y el mismo fue utilizado para transformar conidios de la cepa auxótrofa a histidina 9717.

6.6 Transformación de *N. crassa* y selección de transformantes

6.6.1 Preparación de conidios y transformación de 9718 y 9717

Una alícuota con 12.5×10^7 de conidios de la cepa 9718 (SMRP25) se lavó con 100 μ L de sorbitol 1M (Previamente esterilizado por autoclave), se centrifugó en una centrífuga de mesa (Galaxy Mini Centrifuge de VWR) por 10 seg y se desechó el sobrenadante de sorbitol. Se repitió lo anterior dos veces más para obtener conidios limpios que se resuspendieron con 70 μ L de sorbitol 1M. Las dos construcciones de ADN generadas se mezclaron con la suspensión de conidios y se transfirieron a una celda de electroporación previamente expuesta a rayos UV durante 30 min en el equipo UV Crosslinker de UVP[®], y enfriada en hielo, para recibir un pulso eléctrico en la electroporadora GenePulser Xcell[™] (BIO-RAD[®]). Justo después del pulso eléctrico (1 500 Volts, 25 microFarads, 600 Ohms) los conidios se mezclaron con 1mL de sorbitol 1M y se transfirieron a un tubo estéril con rosca de 15 mL. Los conidios residuales dentro de la celda se mezclaron con 1 mL de Solución de Recuperación estéril (2 % Sales de Vogel en agua destilada) y fueron transferidos al mismo tubo. Se repitió la misma metodología de transformación, utilizando el mismo volumen de agua envés de ADN como control. Se selló la tapa de ambos

tubos con rosca de 15 mL con parafilm y se cubrieron los tubos con aluminio para su posterior incubación a 30 °C con 5 rpm de agitación horizontal durante tres horas. Los tubos con conidios se centrifugaron a 5 000 rpm durante 3 minutos en la centrifuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Scientific). Se desechó 1.8 mL del sobrenadante, el botón se resuspendió y se inoculó 100 µL de la suspensión sobre dos cajas petri con 25 mL de FGS Agar con Solución FGS e higromicina a una concentración final de 300 µg/mL. El mismo protocolo se repitió para la cepa 9717, utilizando 0.5 µg del constructo linearizado de la sección 6.4.7 y por otra parte 0.5 µg de VMRP-114 linearizado para transformar a esta cepa auxótrofa a histidina.

6.6.2 Selección de cepas transformantes

6.6.2.1 Transformación con la técnica "Split Marker Gene Replacement"

Después de su incubación a 30 °C durante 4 a 5 días se seleccionaron colonias individuales bajo condiciones de esterilidad y fueron colectadas en tubos de cultivo (VWR® 10 x 75 mm de Borosilicato) con 1.5 mL de MMV sólido al 1.5 % de agar con higromicina a una concentración final de 300 µg/mL. Los tubos se incubaron durante 3 o 4 días a 30 °C. Las colonias que crezcan indicarían la presencia putativa del cassette completo *gfp::hph::loxP* lo cual fue verificado por microscopía confocal y posteriormente por PCR.

6.6.2.2 Transformación con el vector pCCG::N-GFP y el VMRP-114

Después de su incubación se seleccionaron colonias individuales y se transfirieron a tubos de cultivo (VWR® 10 x 75 mm de Borosilicato) con 1.5 mL de MMV sólido al 1.5 % de agar. Los tubos se incubaron durante 3 o 4 días a 30 °C. En teoría, las colonias que crecieron

recuperaron la biosíntesis de histidina y tendrían la información genética para expresar GFP-RCY-1 y SEC-10-GFP respectivamente, lo cual fue comprobado por microscopía confocal.

6.7 Microscopía confocal

6.7.1 Preparación de muestras

Se colectó una muestra de conidios con un palillo estéril y se inoculó en una caja preparada con MMV solidificado con 1.5 % de agar, perforando el margen del medio con el palillo. La caja pasó a ser incubada durante 16 horas a 30 °C y se cortó un rectángulo del medio que incluye el margen de la colonia y una zona aún no colonizada de medio (Ver Figura 4). El corte se hizo con una espátula flameada y el rectángulo de agar se transfirió a un cubreobjetos (VWR VistaVision™ Cover Glasses 16004-096, No. 1, 24 x 60 mm) con la cara de la colonia hacia la laminilla. Se incubó 30 min a temperatura ambiente para que las hifas se recuperen y para poder observar puntas de hifas en crecimiento.



Figura 6. Esquema del área del medio conteniendo micelio de *N. crassa* que se cortó.

6.7.2 Observaciones y toma de imágenes

La muestra conteniendo de agar e hifas pasó a ser observada en el microscopio confocal, en el cual se le agregó aceite de inmersión entre el objetivo y el portaobjetos. El microscopio confocal Olympus fluoview™ FV1000 es un equipo de escaneo por láser con los objetivos invertidos. Este sistema de escaneo SIM combina dos dispositivos de escaneo: un explorador principal y un estimulador con láser. Para excitar a la proteína GFP, la cual se fusionó a la proteína blanco, se utilizó un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm. En el caso de las proteínas etiquetadas con la proteína fluorescente mCherry (mChFP) o marcadas con FM4-64, se utilizó un láser de Helio-Neón a una longitud de onda de 543 nm. Los parámetros del láser y de microscopía se configuraron dentro del software del equipo que fue instalado en una computadora exclusiva para uso de microscopía confocal. Primeramente se seleccionó una hifa saludable bajo luz transmitida con un objetivo de 60X, se enfocó la muestra y se encendió el láser. Dentro del programa se cortó la imagen para mostrar solamente la región de interés. Se buscaron las proteínas SEC-10 y RCY-1 en sitios donde se espera encontrarlas, según las

hipótesis planteadas en la sección 5. Se capturó un video de la fluorescencia dentro de la hifa en crecimiento y se guardó en un formato de video OIB.

6.7.3 Tinción de endomembranas con FM4-64

La tinción FM4-64 es un colorante que se ha empleado ampliamente para seguir el tráfico vesicular. Su aplicación en este estudio fue útil para distinguir la asociación de SEC-10-GFP respecto a vesículas del SPK. La internalización de la tinción es rápida y se trabajó con rapidez para poder observar con facilidad las estructuras de membrana internas. Dentro de las opciones de láser del software fluoview FV1000 se seleccionaron EGFP y Texas Red, y se activó el canal de láser de 543 nm ya que la molécula de FM4-64 es excitable a esa longitud de onda. El colorante FM4-64 se preparó a una concentración final de 7 μ M y se conservó en un tubo de PCR cubierto con papel de aluminio sobre hielo, debido a la inestabilidad de la molécula al exponerse a la luz. Se repitió el protocolo de la sección 6.7.1, seguido por la inyección de 5 μ L de la tinción entre el corte rectangular del agar y el portaobjetos. Se colocó la muestra en el microscopio y se grabó la fluorescencia de la GFP y del colorante FM4-64.

6.7.4 Co-localización de SEC-10-GFP con proteínas de los diferentes estratos del

Spitzenkörper

Como fue mencionado en la sección 1.4, el Spitzenkörper está conformado de una capa externa de macrovesículas que contienen glucano sintasas (GS) y un núcleo interno con microvesículas o quitosomas, la cuales contienen quitina sintasas (CHS). En este estudio se

realizaron dos ensayos de co-expresión, entre la cepa que expresa SEC-10-GFP y otras dos cepas que expresan quitina sintasa-1 (CHS-1-mChFP) y una proteína importante para la actividad glucano sintasa-1 (GS-1-mChFP) etiquetadas con la proteína fluorescente mCherry, la cual tiene una emisión en el espectro visible rojo al ser excitada con láser en el espectro del verde. La cepa que expresa SEC-10-GFP es una transformante que fue generada mediante electroporación, en donde se integró el vector de expresión en el locus *his-3* bajo el control de *Pccg-1* (Sección 6.5). Para realizar esto se crecieron las tres cepas individualmente en cajas de Petri con MMV solidificado al 1.5% e incubado toda la noche a 30 °C. Al día siguiente se cortaron y colocaron pequeños bloques de agar con micelio de cada par de cepas. Es decir, se permitió el crecimiento simultáneo de la cepa que expresa SEC-10-GFP con la que expresa CHS-1-mCherry en una caja de Petri (MMV al 1.5%) y en otra caja la que expresa SEC-10-GFP con la GS-1-mCherry y se incubaron las dos cajas a temperatura ambiente por 18 horas (Figura 7; ver cepas en Tabla 1). Ambos pares de cepas son del mismo tipo de apareamiento y por ende pueden fusionar sus paredes celulares, compartiendo sus núcleos transformados, lo cual resultaría en cepas heterocariones en las cuales hay expresión de dos proteínas etiquetadas con distintos fluoróforos. Finalmente se cortaron y montaron bloques de agar tal y como fue realizado en la sección 6.7.1 para posteriormente realizar microscopía confocal y toma de imágenes (Figura 6).

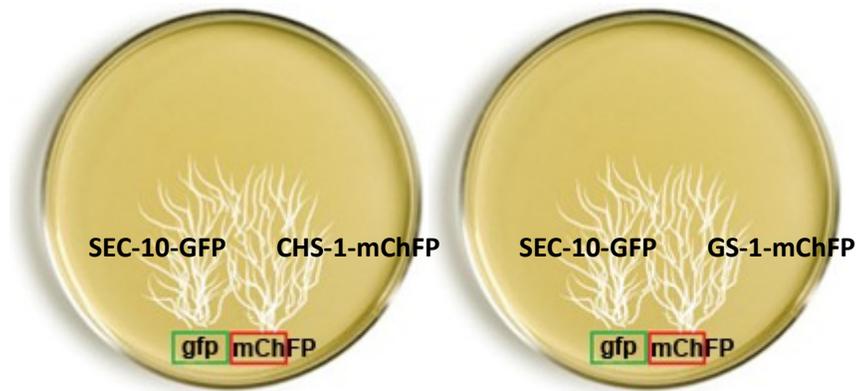


Figura 7. Ensayo de co-expresión de proteínas etiquetadas con GFP y mChFP. La placa izquierda muestra el crecimiento simultáneo de las cepas que expresan SEC-10-GFP y CHS-1-mChFP y en la placa derecha las cepas que expresan SEC-10-GFP y GS-1-mChFP.

6.7.5 Procesamiento de imágenes

Cada video tomado en el programa fluoview FV1000 se guardó en formato .OIB en una carpeta dentro de la dirección FTP del laboratorio de microbiología (<ftp://ftp.cicese.mx/pub/divBEA/microbiologia>). Los videos guardados en la carpeta del directorio se descargaron en un equipo personal y se abrieron individualmente en el software FV10-ASW Viewer. Se le agregó una barra de escala de 10 μm y un indicador de tiempo real. El video se exportó en formato .TIFF para ser importado y mejorado en Adobe Photoshop CS5.1.

6.8 Análisis de mutantes para los genes *sec-10*, *exo-70* y *rcy-1*

6.8.1 Determinación del estado homocarión

Las cepas mutantes en stock provienen del “Fungal Genetics Stock Center” y fueron generadas mediante el bloqueo genético o “gene knockout” que reemplaza el gen en cuestión con un cassette de resistencia a higromicina (Colot *et al.*, 2006). Las cepas $\Delta sec-10$ (SMRP258), $\Delta exo-70$ (SMRP137) y $\Delta rcy-1$ (SMRP22) se cultivaron individualmente a partir del stock de conidios refrigerados y conservados en perlas de sílice con leche a 4 °C. Se inocularon de 3 a 5 perlas en un tubo de cultivo (VWR® 20 x 150 mm de Borosilicato) preparado con 10 mL de MMV solidificado al 1.5% de agar bajo condiciones estériles. Los tubos se etiquetaron y se permitieron incubar a 30 °C hasta conidiar. Se transfirió una muestra de conidios a un matraz de 1 L con 300 mL de Medio Completo de Vogel con la ayuda de un palillo de brocheta estéril y se siguió el protocolo de extracción de ADN de la sección 6.3.1. Posteriormente se realizaron PCRs para cada uno de los extractos de ADN_g usando el par de oligonucleótidos correspondientes, lo cual se repitió usando el ADN_g de la cepa N1. Los oligonucleótidos que se utilizaron son los siguientes (Sección 6.1.3): #527 y #528 usando ADN_g molde de $\Delta sec-10$, #531 y #532 con ADN_g molde de $\Delta exo-70$ y oligos #630 y #633 con ADN_g molde de $\Delta rcy-1$. Cada producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, usando el marcador de peso molecular de 1 Kb para identificar el tamaño de las bandas de cada producto. Si el producto control y el producto de interés presentan el mismo tamaño de banda, la mutante se encuentra en estado heterocarión, es decir, la cepa aun contiene núcleos de tipo silvestre.

6.8.2 Cruzas para obtener homocariones

Las cepas mutantes que se encuentran en estado heterocarión se cruzaron con una cepa tipo silvestre para obtener descendencia homocarión. Por otra parte se cruzó la transformante que expresa SEC-10-GFP bajo el control de su promotor endógeno con la tipo silvestre N150 (Sección 6.1.1, Tabla 1). Primero se inocularon conidios de la cepa N150 en el centro de una caja de Petri con Medio Sintético de Cruzas (2 % Sacarosa, 2 % agar y la solución Sintética de Cruzas de Westergaard & Mitchell, 1947). La caja se cubrió con papel de aluminio y se incubó a 25 °C hasta que el micelio cubrió todo el agar. Posteriormente se le agregaron conidios de la mutante heterocarión en cinco diferentes puntos, como indican las flechas negras en la figura 7. La caja se volvió a cubrir con papel de aluminio y se incubó a 25 °C durante dos semanas.

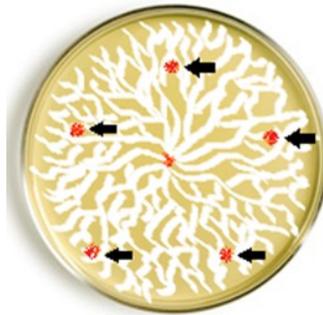


Figura 7. Esquema del método de fertilización por conidios usado para cruzar cepas. Las flechas negras son los puntos en donde se añadieron conidios.

6.8.3 Activación y aislamiento de ascosporas

Durante las dos semanas de incubación a 25 °C se generaron los peritecios, los cuales liberan ascosporas hacia la tapa de la caja de Petri. Se recuperaron las ascosporas de la tapa con la ayuda de una pipeta, mezclando las esporas con agua destilada estéril y transfiriéndolas en

un tubo de microcentrifuga que contenga 1 mL de agua destilada estéril. La suspensión se mezcló por inversión, se tomaron 70 μ L y se distribuyeron sobre una caja de Petri con MMV sólido al 1.5 % agar. Se le aplicó un choque térmico de 60 °C a la caja durante una hora, para activar las ascosporas. Después de 5 a 6 horas las ascosporas que germinaron, se recuperaron delicadamente del agar con una espátula flameada. Se recortó alrededor de la ascospora germinada y se transfirió el cubo recortado de agar en un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) con MMV sólido al 1.5 % agar que fue tratado con 300 μ g de higromicina por mL de medio. Los tubos se incubaron a 30 °C de 3 – 5 días; aquellos tubos que crecieron con el antibiótico son las mutantes homocariones candidatas. La comprobación descrita en la sección 6.8.1 se repitió de nuevo con las cepas resistentes a higromicina. En dado caso que las PCRs no amplifiquen el fragmento esperado, se pudiera concluir que la cepa está en estado homocarión para la mutación deletérea en cuestión. Si no se pudo obtener descendencia homocarión, es posible que los mismos no sean viables y que el gen es esencial.

6.8.4 Ensayo de crecimiento de diluciones seriadas

Las cepas mutantes para los genes de interés y la transformante que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión fueron analizadas en un ensayo de crecimiento de diluciones seriadas. Se usaron las cepas homocariontes para este ensayo, o las heterocariontes en caso de que no se haya podido obtener la mutante homocarión. Primero se inocularon conidios de las cepas en cuestión en matraces individuales de 500 mL con 100 mL de MMV sólido al 1.5 % agar, las cuales se incubaron a 30 °C durante una semana y posteriormente fueron expuestas a luz

artificial. En esterilidad se le agregaron 50 mL de agua destilada estéril al matraz y se mezcló con vortex para disolver los conidios. Se vertió el líquido a un tubo Falcon® VWR estéril de 50 mL a través de un embudo con filtro de tela estéril (50 % rayón y 50 % poliéster). Después se centrifugó a 7,000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo con 10 mL de agua destilada estéril. La centrifugación se repitió con las mismas configuraciones, se desechó el sobrenadante y se resuspendió con 1 mL de sorbitol 1 M. La suspensión de conidios en sorbitol se transfirió en tubos estériles de microcentrifuga y se cuantificó el número de conidios de cada uno de ellos con una cámara de Neubauer, diluido 100 veces. Teniendo los datos de concentración de conidios por mL, se transfirió el volumen requerido de conidios en un 1 mL de agua para tener 10^7 conidios por cada 10 μ L, o bien 10 millones de conidios en un mL. Se tomaron 100 μ L de la solución anterior y se mezclaron en 900 μ L de agua, esto se repitió 3 veces más. Las últimas cuatro diluciones con 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 conidios por cada 10 μ L, respectivamente. Este procedimiento se replicó para la cepa Mus51 (tipo parental). Se inoculó cada una de las diluciones de cada cepa en una matriz de 4 x 4 en una caja de Petri, como se ve representado en la figura 6. El ensayo se replicó 3 veces más y las cajas se incubaron a 30 °C. Se le tomaron fotografías a las cajas para comparar el crecimiento de las cepas en cuestión.

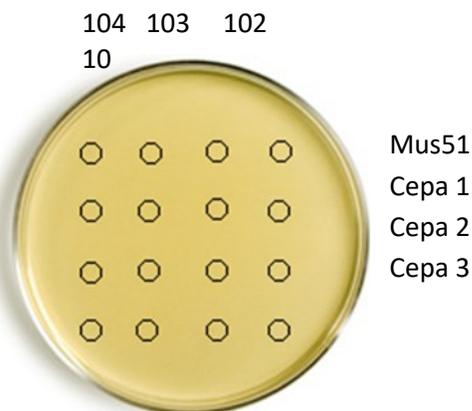


Figura 8. Esquema del ensayo de crecimiento de diluciones seriadas desde 10,000 conidios hasta 10 con las diferentes cepas.

6.8.5 Ensayos de crecimiento en cajas de Petri y en tubos de cultivo

Adicionalmente se analizaron las cepas SEC-10-GFP y $\Delta rcy-1$ en estado homocarión mediante ensayos simples de crecimiento, ya que las mismas presentaron afectación en el crecimiento. La cepa homocarión que expresa SEC-10-GFP y la tipo parental (9718) se permitieron crecer individualmente en cajas de Petri con MMV al 1.5% agar y se incubaron durante 20 horas a 30° C. Se tomaron fotografías de dichas colonias sin aumento y a un aumento de 63X en un microscopio estéreooscópico (Olympus Optical Co., Ltd. Modelo SZX-ILLB2-100). Por otra parte, se realizó un ensayo de crecimiento con 14×10^4 células de las cepas $\Delta rcy-1$ en estado homocarión y 9718 en tubos individuales de borosilicato con MVV solidificado al 1.5% e incubado durante una semana a 37 °C. Posteriormente se tomaron fotografías (Nikon Digital Camera D33697, Nikon Corp., Japan) de dichos tubos en un fondo oscuro y la imagen seleccionada fue editada en Adobe Photoshop CS5.1.

6.9 Análisis de la tasa de crecimiento

Se cuantificaron las diferencias en la tasa de crecimiento de las cepas N1, SMRP25 (9718), SMRP411 (SEC-10-GFP), SMRP412 (SEC-10-GFP homocarión), $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ en un ensayo de crecimiento de 12 horas (Tabla 1). Se inocularon 3×10^6 conidios en cada placa de MMV solidificado al 1.5% y se prepararon 4 réplicas de cada cepa analizada. Las placas se incubaron a 30 °C durante 16 horas y al día siguiente se marcó con plumón permanente el margen de cada

colonia cada 3 horas durante el transcurso de 12 horas. Se dibujaron 3 líneas en cada caja desde el punto de inoculación hasta la última línea marcada. En cada una de estas tres líneas se midió la distancia en milímetros que avanzó el margen de la colonia cada tres horas de crecimiento. Cada placa tuvo un total de 12 mediciones que corresponde a 4 réplicas que fueron promediadas, convertidas a mm/hr y la desviación estándar calculada en Excel. Estos datos fueron analizados en el programa STATISTICA de StatSoft para obtener la tasa de crecimiento promedio de cada cepa y los intervalos de confianza.

6.10 Microscopía TIRF de hifas de las cepas que expresan SEC-10-GFP y GFP-RCY-1

Este tipo de microscopía de fluorescencia de reflexión interna total es conocido como TIRFM por sus siglas en inglés (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy). Es un método de microscopía de fluorescencia que ilumina selectivamente a fluoróforos que se encuentran muy cercanos a la superficie del cubreobjetos. La muestra es iluminada por un láser en un ángulo oblicuo que atraviesa el cubreobjetos y tendrá una reflexión interna total si el

ángulo de la luz incidente (ángulo θ) es suficientemente grande. En estos ángulos mayores la luz produce un campo que disminuye exponencialmente al alejarse de la superficie del cubreobjetos en vez de propagarse hacia la muestra. La profundidad del rango de este campo es muy pequeño y varía dependiendo del ángulo θ de tal forma que las moléculas fluorescentes fuera del campo y hacia el interior de la muestra no serán visibles. (Axelrod 1981). Las muestras de las cepas que expresan SEC-10-GFP y GFP-RCY-1 (Tabla 1 en la sección 6.1.1) fueron montadas en cubreobjetos (VWR VistaVision™ Cover Glasses 16004-096, No. 1, 24 x 60 mm) con la cara de la colonia hacia la laminilla. Se incubaron 30 min a temperatura ambiente y fueron observados el microscopio Nikon Eclipse Ti-E con una cámara digital CMOS ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu Photonics K.K, Japón) y un módulo de TIRFM. Se tomaron videos de hifas en crecimiento de la cepa que expresa SEC-10-GFP y la que expresa GFP-RCY-1 para observar con mayor detalle los movimientos de los puntos fluorescentes y la localización de la fluorescencia vista en la punta.

7 Resultados

7.1 Análisis *in silico* de las proteínas SEC-10 y RCY-1

7.1.1 Similitud entre SEC-10 y RCY-1

En el alineamiento de las proteínas SEC-10 (NCU09313) y RCY-1 (NCU03658) se encontró que no hay homología en la mayor parte de las secuencias. Sin embargo hay similitud en una región de alrededor de 80 aminoácidos de acuerdo a los resultados de SIM. Esta región de 80 aminoácidos para ambas proteínas presentó un porcentaje de similitud entre 20 y 30%, lo que corresponde al dominio SEC-10.

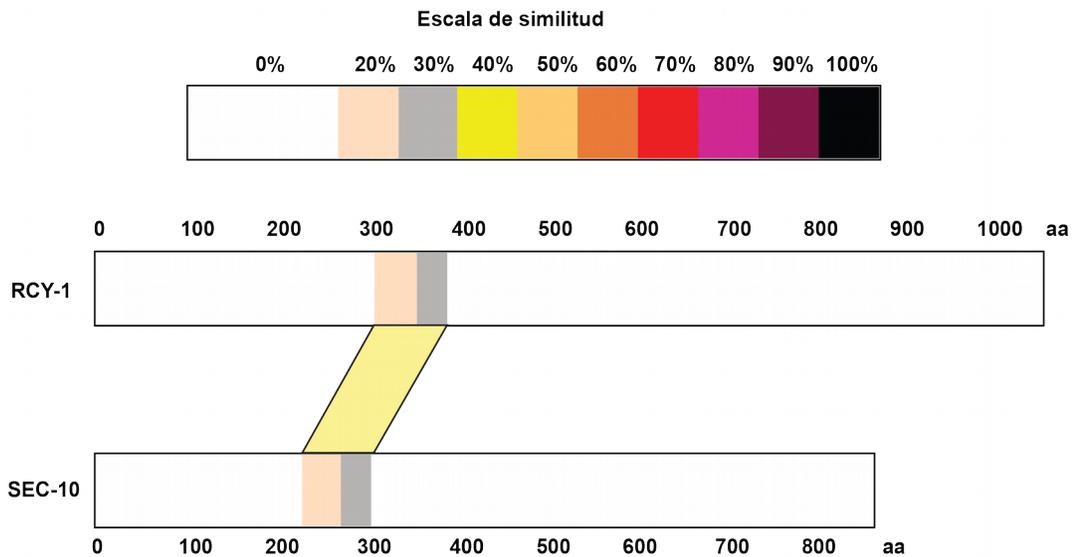


Figura 9. Alineamiento local y porcentaje de similitud entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas RCY-1 y SEC-10 de *Neurospora crassa*. RCY-1 tiene 1,059 residuos de aminoácidos y SEC-10 tiene 880. La escala de colores representa el porcentaje de similitud que mostraron los resultados SIM.

7.1.2 Similitud entre RCY-1 y RcyA

Las proteínas ortólogas RCY-1 y RcyA presentaron hasta 50% de similitud en el extremo 5' de las secuencias en donde se encuentra el dominio F-box. Después de este dominio hay una

región con 0% de similitud; 125 aminoácidos en RCY-1 y 60 aminoácidos en RcyA. La región más 3' de las secuencias tuvo hasta 60% de similitud en donde se encuentra el motivo CAAX-box. Esta región abarca la mayor parte de ambas proteínas y tiene regiones heterogéneas con distintos porcentajes de similitud.

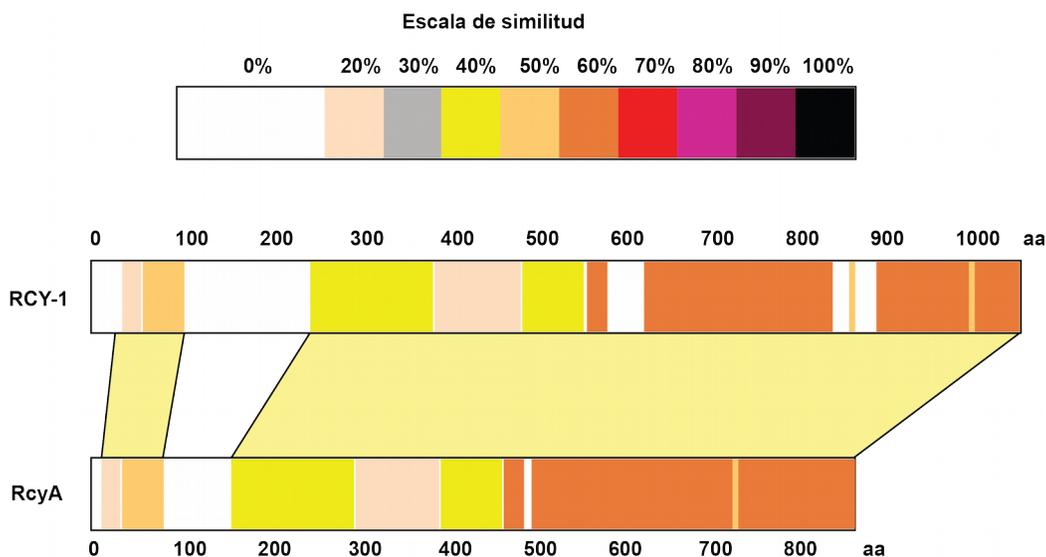


Figura 10. Alineamiento local y porcentaje de similitud entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas RCY-1 de *Neurospora crassa* y RcyA de *Aspergillus nidulans*. RCY-1 tiene 1,059 residuos de aminoácidos y RcyA tiene 880, curiosamente igual que SEC-10. La escala de colores representa el porcentaje de similitud que mostraron los resultados SIM.

7.2 Amplificación de fragmentos de ADN

Para poder etiquetar endógenamente a la proteína SEC-10 con GFP en el extremo carboxilo terminal se llevó acabo las PCR de la sección 6.3.3. Se lograron amplificar los fragmentos

necesarios para construir los brazos utilizados en la técnica "Split Marker" usando los oligonucleótidos sec10GlyF y sec10GlyR para el fragmento A, sec10loxF y sec10loxR para B, y 10xGly-F y loxP-R para el amplicón C (Figura 3). Se usó una temperatura de alineación de 55 °C (Figura 11A-C panel izquierdo) con la excepción del fragmento A que requería una Tm de 61 °C (Figura 11A panel derecho).

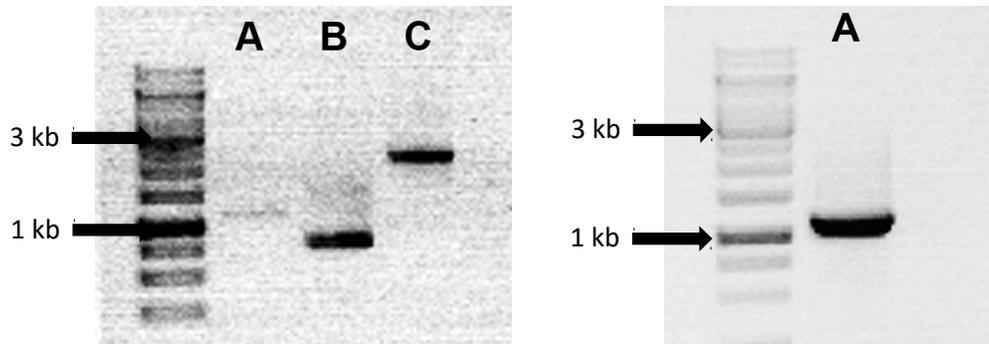


Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR utilizados para la construcción de los brazos para "Split Marker" (ver figura 3). A) Amplicón ORF-10xGly de 1,146 pb. B) Amplicón loxP-UTR-3' de 804 pb. C) Amplicón de 2,281 pb del vector MRP-48.

7.3 Productos de la PCR de fusión utilizada en el método "Split Marker"

Se utilizaron los oligonucleótidos sec10GlyF y hph SM-R para producir el brazo AC y los oligonucleótidos hph SM-F y sec10loxR para el brazo CB (Figura 3). Ambos fragmentos de ADN fueron usados para transformar conidios de la cepa 9718 mediante electroporación.

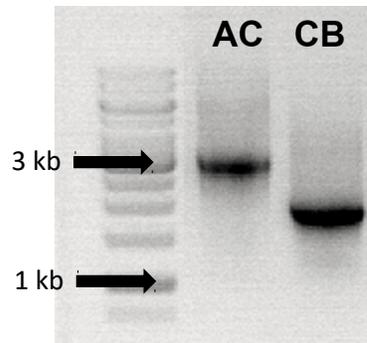


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR de fusión. AC) El producto fusionado *sec-10::10xGly::hph* de 2,969 pb. CB) Amplicón *hph::sec-10UTR-3::loxP* de 1,862 pb.

7.4 Transformación por el método "Split Marker"

De los 125 millones de conidios utilizados en la transformación, solamente crecieron 22 colonias en placas de medio FGS con higromicina. De las 22 cepas resistentes a higromicina 6 mostraron fluorescencia y se seleccionó la que tuvo más intensidad de señal.

7.5 SEC-10-GFP se acumula próximo a la membrana plasmática apical

Las imágenes tomadas en el microscopio confocal revelaron que SEC-10-GFP se encuentra próximo a la membrana plasmática apical, acumulado en forma de lúnula y también en puntos fluorescentes en zonas subapicales. La fluorescencia en la punta era constante y su orientación concordaba con la dirección del crecimiento de la hifa observada. Los puntos fluorescentes subapicales no llegaban a la punta pero se mantenían en la zona subapical hasta que dejaban de ser visibles.

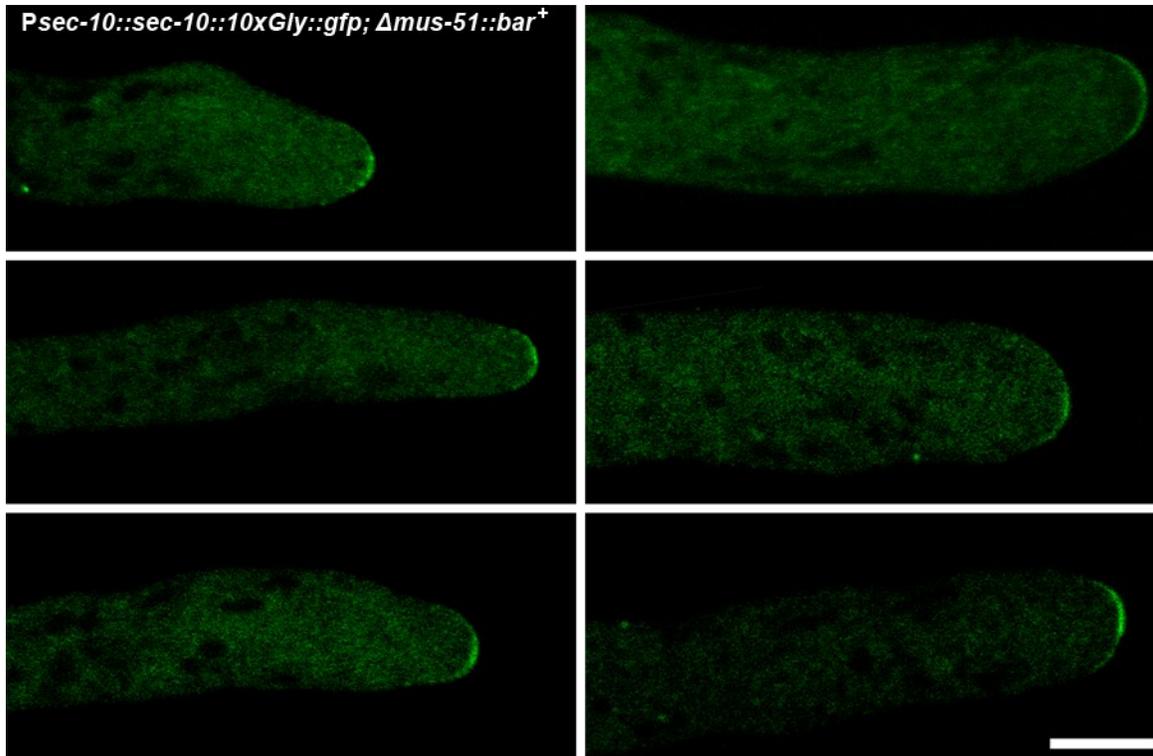


Figura 13. Análisis de la distribución de SEC-10-GFP en diferentes hifas de la cepa transformante de *N. crassa* seleccionada, mediante LSCM. Esta cepa fue producida por el método de “Split Marker”. Barra de escala = 10 μ m.

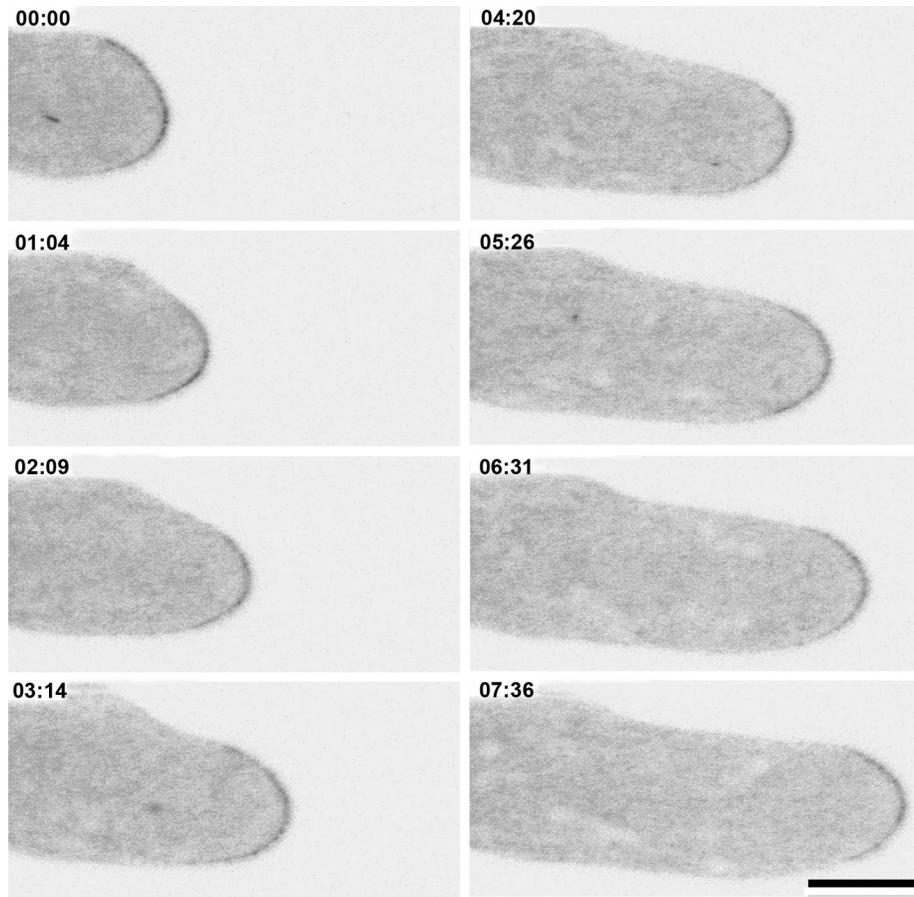


Figura 14. Serie de tiempo de la localización de SEC-10-GFP mediante LSCM convertido en blanco y negro con los colores invertidos. Barra de escala = 10 μ m. Tiempo en min:seg.

7.5.1 SEC-10-GFP expresado bajo el control de *Pccg-1* desde el locus *his-3*

La distribución de la proteína SEC-10-GFP expresado bajo el control de *Pccg-1* fue distinto a la cepa etiquetada endógenamente. En el ápice de la hifa se pudo observar la acumulación de SEC-10-GFP en la punta pero con menor intensidad y frecuencia que la endógenamente etiquetada, a demás esta cepa presentó mayor fluorescencia citoplasmática a lo largo de las hifas.

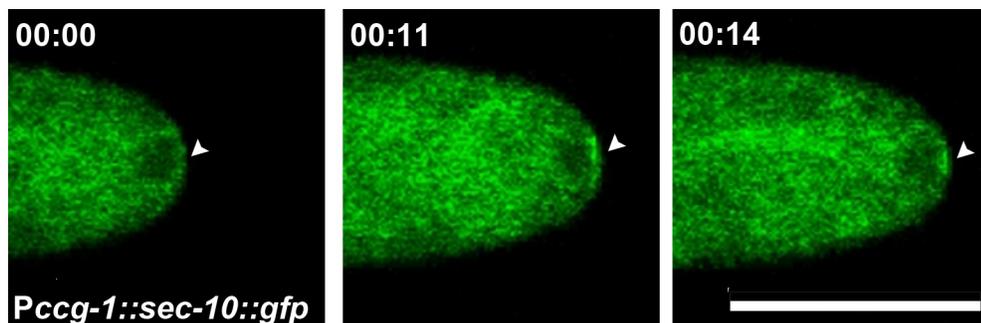


Figura 15. Serie de tiempo en LSCM de la localización de SEC-10-GFP expresado bajo el control de *Pccg-1*. En los tres paneles se señala con una saetilla blanca la acumulación de SEC-10-GFP próximo a la membrana plasmática apical. Barra de escala = 10 μ m. Tiempo en min:seg.

7.6 Marcaje de la transformante que expresa SEC-10-GFP con la sonda FM4-64

La sonda utilizada para marcar endomembranas reveló que no hay colocación fuerte entre las señales emitidas por SEC-10-GFP y FM4-64, particularmente en la zona del SPK que tiene mayor señal de FM4-64. Sin embargo, existe un traslape de señal pequeño entre ambos fluoróforos ya que el SPK esta próximo a la membrana plasmática. La acumulación de SEC-10-GFP se concentra principalmente en el punto medio de la membrana plasmática apical y disminuye en forma de gradiente conforme se aleja de la punta hacia zonas distales a lo largo de la membrana plasmática.

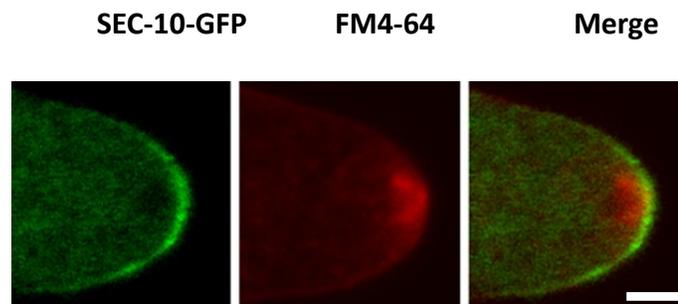


Figura 16. LSCM del ápice de la transformante que expresa SEC-10-GFP. La imagen izquierda muestra la localización de SEC-10-GFP, la del centro muestra la localización de FM4-64 y la imagen derecha es el conjunto de ambas señales fluorescentes. Barra de escala = 10 μ m.

7.7 Co-expresión de SEC-10-GFP con CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP

Se tomaron imágenes confocales de los dos pares de cepas que fueron fusionadas por fusión de hifas, lo cual esta descrito en la sección 6.7.4.

7.7.1 Co-expresión de SEC-10-GFP y CHS-1-mChFP

El primer par de cepas que se fusionaron revelaron que la localización de CHS-1-mChFP coincide con el núcleo del SPK en donde se encuentran los quitosomas, mientras tanto la proteína SEC-10-GFP se encontraba acumulada próximo a la membrana plasmática apical. Ambas proteínas se encuentran en distintos sitios de la célula como se puede apreciar en la figura 17C-D y en la gráfica E dada por el análisis de colocalización que se realizó dentro del programa de Olympus.

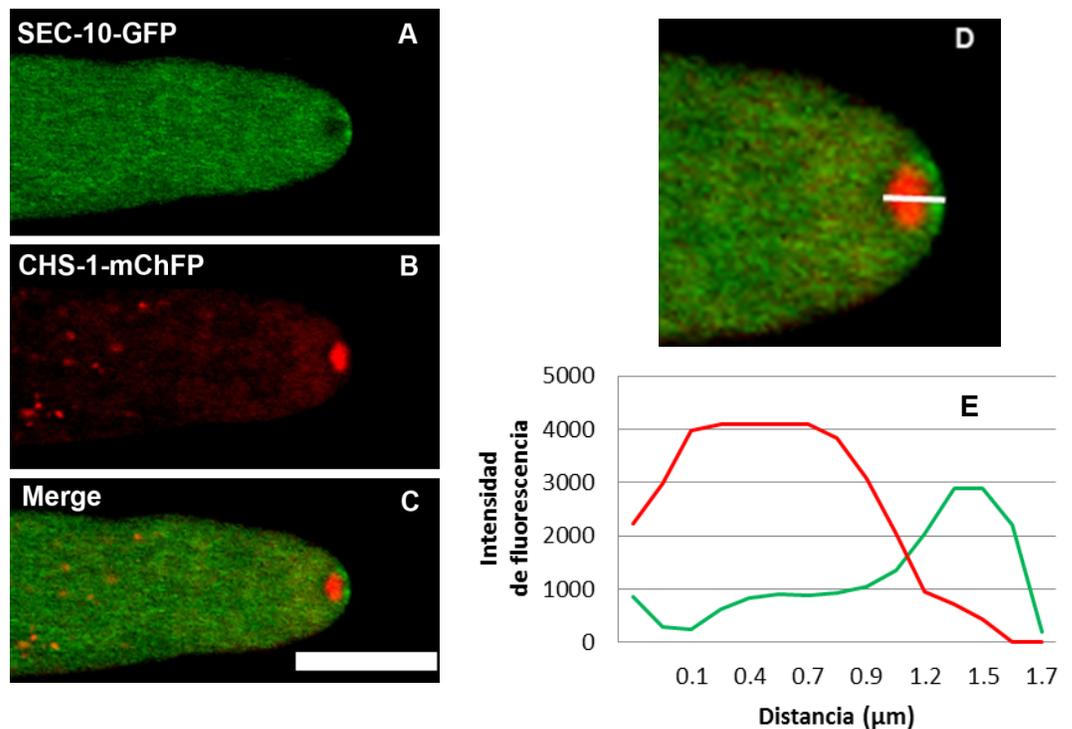


Figura 17. Coexpresión de SEC-10-GFP y CHS-1-mChFP y análisis mediante LSCM. A) Se muestra la fluorescencia de SEC-10-GFP expresado bajo el control de pCCG-1 desde el locus *his-3*. B) Localización de CHS-1-mChFP visible en puntos subapicales y en el núcleo del SPK. C) El conjunto de las señales emitidas por GFP y por mChFP. D) Aumento de la punta de hifa de la

imagen C y la línea blanca es la distancia analizada en la gráfica E. E) La intensidad de fluorescencia analizada en los 1.7 μm de distancia abarcados por la línea blanca. Barra de escala = 10 μm .

En la fusión de las cepas se pudo observar GS-1-mChFP localizada en la capa externa del SPK, y presentó poca co-localización con SEC-10-GFP en la punta (Figura 18B-C). Sin embargo, la fluorescencia citoplasmática de SEC-10-GFP co-localizó parcialmente con GS-1-mChFP en la periferia de la capa macrovesicular. El análisis de co-localización comprobó estos hechos y mostró que existe un traslape de señal a 0.45 μm de la punta, sin embargo no hubo traslape de los picos más altos de ambas señales (Figura 18E).

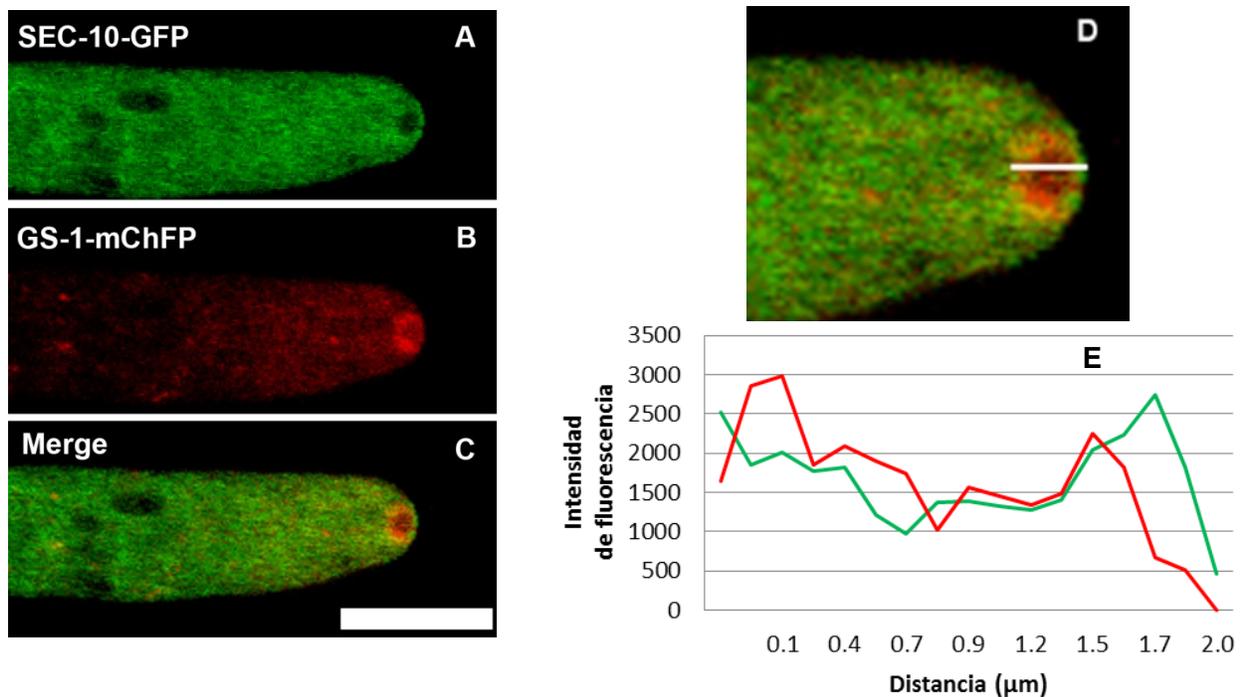


Figura 18. Imagen confocal de la punta de la cepa fusionada que expresa SEC-10-GFP y GS-1-mChFP. A) Señal fluorescente citoplasmática y apical de SEC-10-GFP expresado ectópicamente.

B) Se muestra la localización de GS-1-mChFP visible como una dona que corresponde a la capa externa del SPK. C) El traslape de las señales emitidas por GFP y por mChFP. D) Vista aumentada de la punta de la hifa y la línea blanca es la distancia analizada en la gráfica E. E) Análisis de la intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos en 2 μm de distancia. Barra de escala = 10 μm .

7.8 Fenotipo de la cepa homocarión que expresa SEC-10-GFP endógena

La cepa SMRP411 (Tabla 1) producida por el método "Split Marker" descrito en la sección 6.3 se encuentra en estado heterocarión, es decir no todos los núcleos expresan la proteína etiquetada. Por esta razón se cruzó con la cepa N150 (Tabla 1) para obtener la descendencia homocarión. Se encontró que toda la descendencia presentaba un fenotipo aberrante que afecta el crecimiento y morfología de las hifas. La forma tubular característica de hifas normales no se pudo observar en la descendencia, ya que todas tenían puntas hinchadas, formas irregulares e hiperramificación en las hifas (Figura 19). A pesar de lo previamente mencionado, la proteína SEC-10-GFP aún se localizaba acumulada en la membrana plasmática apical en forma de lúnula (Figura 19) y el crecimiento, siendo bastante conspicuo, ocurría lentamente. Adicionalmente, no se pudieron observar los fuertes puntos fluorescentes subapicales vistos en la transformante heterocarión (Figura 13 y 14).

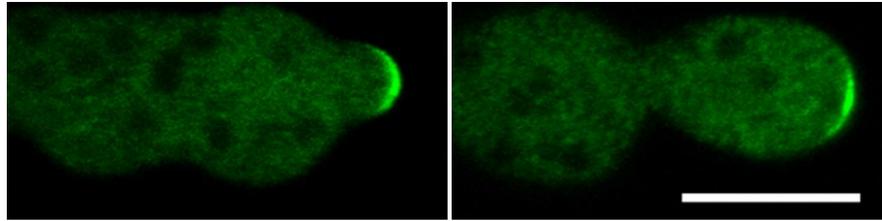


Figura 19. Imagen de hifas afectadas que muestran la localización de SEC-10-GFP expresado en todos los núcleos (en estado homocarión) observada mediante LSCM. Barra de escala = 10 μ m.

7.8.1 Afectación en crecimiento y morfología de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión.

Se comparó la cepa FGSC #91718 con la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión para mostrar el grado de afectación que tiene la cepa homocarión que expresa SEC-10-GFP. A 20 horas de incubación la diferencia en crecimiento entre la cepa parental 9718 y la homocarión SEC-10-GFP era evidente. Como se puede observar en la primera columna de la siguiente figura, la colonia de 9718 logró abarcar casi todo el medio, mientras tanto la transformante homocarión solamente creció como un pequeño botón de 4 mm. En la segunda columna se puede apreciar, a un aumento de 63X, la discrepancia de fenotipos de ambas cepas; a diferencia de la cepa parental, la transformante homocarión mostró una morfología compacta e hiperramificada. Curiosamente, se pudieron observar hifas que no estaban hiperramificadas, las cuales alcanzaron a crecer un poco más que las hifas expuestas al aire.

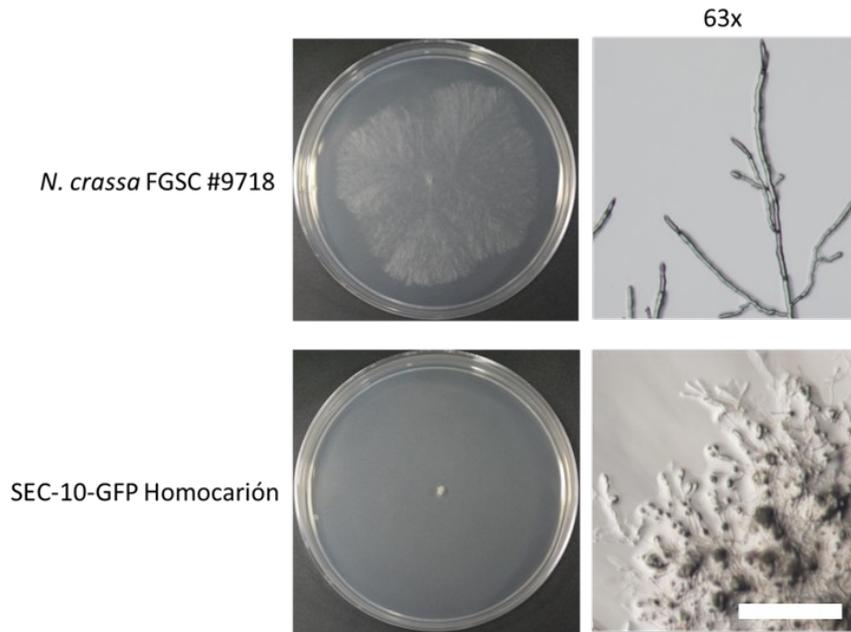


Figura 20. Comparación cualitativa del crecimiento y morfología de la cepa que expresa SEC-10-GFP y la parental 9718. En los dos paneles de la izquierda se muestran fotografías de las cepas 9718 y SEC-10-GFP (homocarión) sin aumento y en los paneles del lado derecho se puede apreciar la morfología de las colonias a un aumento de 63X. Barra de escala = 1 mm.

7.8.2 Morfología compacta de la homocarión SEC-10-GFP incubada una semana.

Debido al crecimiento lento que presenta la cepa en estado homocarión se dejó crecer esta colonia durante una semana a 30 °C. La colonia mostró una apariencia compacta y su micelio estaba elevado respecto al nivel del agar. Adicionalmente, aparte de presentar crecimiento dentro del agar, se pudo observar la formación de conidios en la colonia compacta lo cual fue evidente por la coloración naranja que presentaba.



Figura 21. Crecimiento y morfología compacta de la cepa que expresa SEC-10-GFP en estado homocarión después de una semana de incubación.

7.9 Ensayo de crecimiento en diluciones seriadas: 9718, $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ en estado heterocarión

Hubo poca diferencia en cuanto al crecimiento entre la mutante $\Delta sec-10$ en estado heterocarión y la cepa parental FGSC #9718 cómo se puede apreciar en la siguiente figura. En todas las repeticiones la mutante $\Delta sec-10$ presentó un crecimiento ligeramente reducido respecto a la cepa parental. Mientras tanto la mutante $\Delta exo-70$ tuvo una tasa de crecimiento parecida a la cepa 9718.

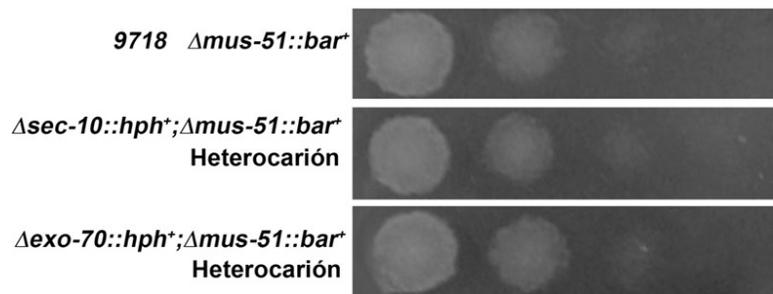


Figura 22. Crecimiento de las cepas 9718, $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ en estado heterocarión. Las cepas fueron inoculadas a partir de conidios diluidos a una concentración de 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 conidios en $10 \mu\text{L}$ respectivamente.

7.10 Ensayo de crecimiento en diluciones seriadas: 9718, SEC-10-GFP homocarión y $\Delta rcy-1$ homocarión.

En este ensayo se comparó el crecimiento y morfología de la cepa parental 9718 con las cepas SEC-10-GFP (homocarión) y $\Delta rcy-1$ (homocarión). Como se puede observar en la figura 19, el crecimiento de SEC-10-GFP en estado homocarión esta reducido y su morfología es compactada, pero la afectación no fue tan notoria como el ensayo de la sección 7.8.1. Por otra parte el crecimiento y morfología de $\Delta rcy-1$ en estado homocarión era parecido a 9718. En este ensayo las diferencias no eran tan notorias comparadas con las vistas en las secciones 7.8.1 y 7.8.2.

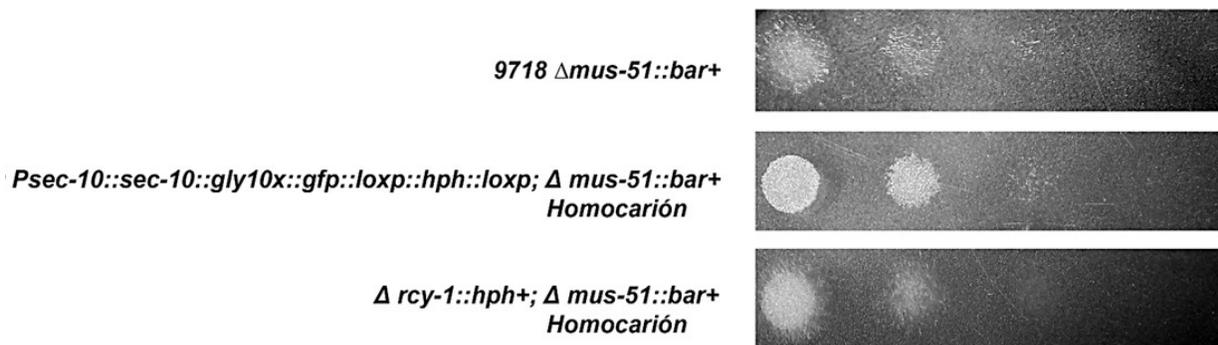


Figura 23. Imágenes del ensayo de crecimiento de las cepas 9718, SEC-10-GFP homocarión y $\Delta rcy-1$ homocarión. Las soluciones de conidios fueron diluidas a una concentración de 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 conidios en 10 μ L.

7.11 Análisis de las mutantes $\Delta sec-10$, $\Delta exo-70$ y $\Delta rcy-1$.

La determinación del estado heterocarión de la sección 6.8.1 reveló que las cepas efectivamente son heterocarión y se procedió a realizar las cruza de la sección 6.8.2. Se logró obtener descendencia homocarión para la cepa $\Delta rcy-1$, lo cual fue comprobado por PCR (Figura 24). Sin embargo, esa cepa presentaba problemas en la formación de hifas aéreas y por ende produjo menor cantidad de conidios (Figura 25). Por otra parte, solo había 1% de viabilidad en la descendencia de la cruce entre N150 y las cepas $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$. De las cuales ninguna pudo ser comprobada ser homocarión por PCR.

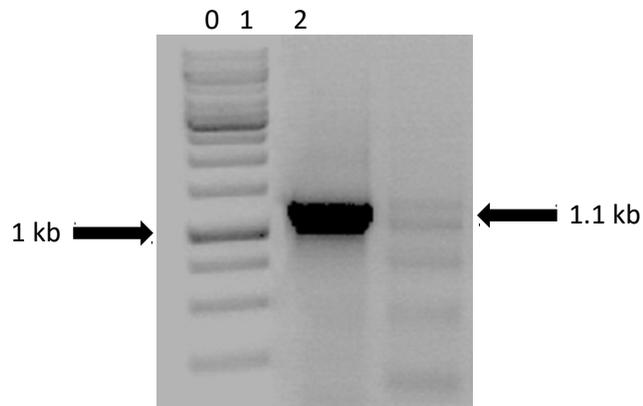


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Carril 0 = Marcador de peso molecular, carril 1 = Amplicón de *rcy-1* de 1,112 pb usando ADNg de N1 y carril 2 = Amplicón *rcy-1* usando ADNg de la homocarión $\Delta rcy-1$.



Figura 25. Fotografía del crecimiento de las cepas 9718 y $\Delta rcy-1$. La fotografía fue tomada después de una semana de incubación a 30 °C en tubos de borosilicato con MMV inclinado y solidificado al 1.5%. Izquierda = cepa parental FGSC #9718, derecha = mutante $\Delta rcy-1$ en estado homocarión.

7.12 Análisis de la tasa de crecimiento

El análisis cuantitativo de la tasa de crecimiento de las cepas N1, 9718, SEC-10-GFP, SEC-10-GFP Hmkryn, $\Delta exo-70$ y $\Delta sec-10$ reveló que sí existen diferencias significativas entre las mutantes del exocisto y la cepa parental 9718. Además se pudo cuantificar que tan afectado está el crecimiento de la transformante homocarión SEC-10-GFP. La tasa de crecimiento es casi 17 veces más lenta que la cepa parental 9718 como se puede apreciar en la siguiente gráfica. Por otro lado, la cepa SEC-10-GFP en estado heterocarión también presentó una tasa de crecimiento significativamente más lenta que la parental, casi $\frac{1}{4}$ de la

tasa de crecimiento de 9718. Las cepas $\Delta exo-70$ y $\Delta sec-10$ fueron las únicas que presentaron un crecimiento similar en el análisis de varianza (ANOVA de una vía).

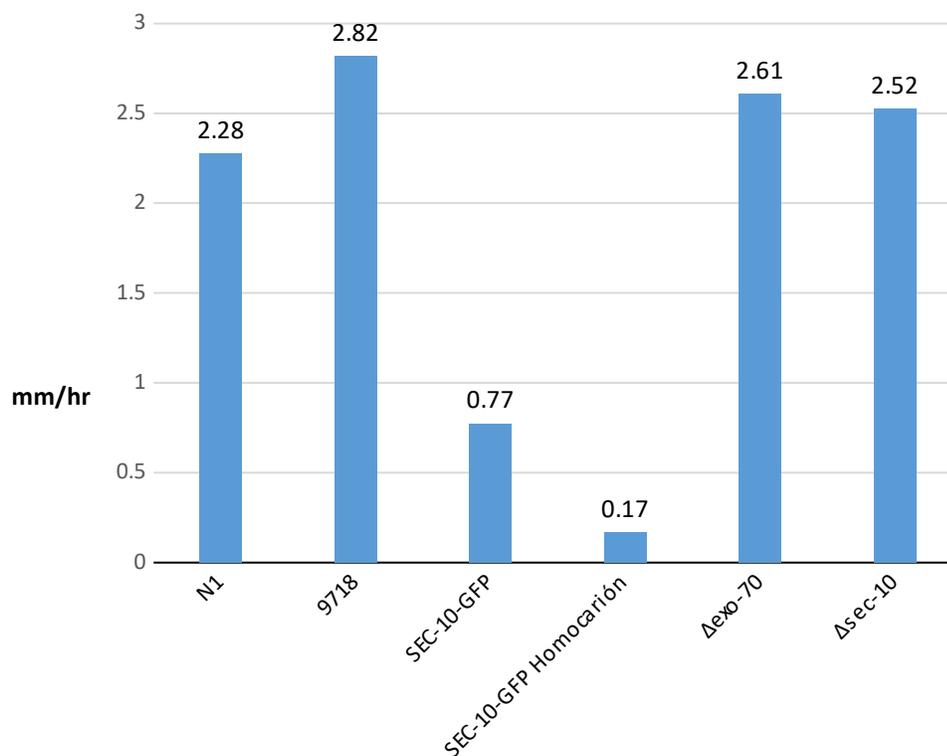


Figura 27. Diagrama de barras del promedio de la tasa de crecimiento de la cepas estudiadas. Cada letra representa una tasa de crecimiento significativamente distinta a las otras letras.

7.13 Amplificación de *rcy-1* con secuencias reconocidas por *PacI* y *XbaI*

El gen *rcy-1* fue amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos descritos en la sección 6.4.3. El amplicón contiene secuencias en sus extremos, las cuales son reconocidas por las endonucleasas *PacI* y *XbaI*. Este producto de PCR fue digerido y purificado a la par con el vector pCCG::N-GFP.

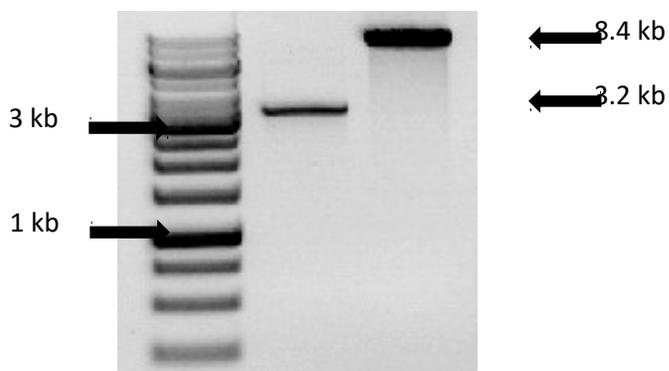


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de *rcy-1* y pCCG::N-GFP. En el primer pozo se cargó el producto de PCR *rcy-1* de 3.2 kb y en el segundo pozo se cargó el vector pCCG::N-GFP de 8.4 kb.

7.14 Comprobación de ligación entre pCCG::N-GFP y RCY-1

Se comprobó la integridad del vector recombinante pAFM01 tras la liberación del inserto *rcy-1* del vector pCCG::N-GFP por acción de las mismas endonucleasas utilizadas en la sección 6.4.4 para formar los sitios cohesivos previo a la ligación. El vector pAFM01 fue construido mediante la ligación de *rcy-1* en el sitio múltiple de clonación del vector pCCG::N-GFP descrita en la sección 6.4.5.

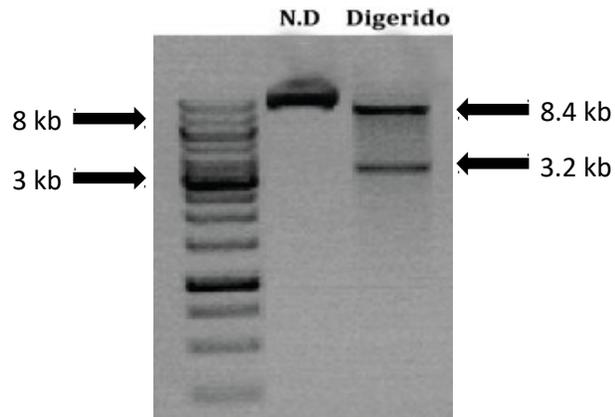


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa del vector pAFM01 no digerido (N.D) y digerido. En el primer pozo se cargó el vector N.D y en el segundo pozo el mismo vector pero digerido con *Xba*I y *Pac*I. La reacción de digestión liberó dos fragmentos de ADN, el vector pCCG:N-GFP de 8,414 pb y el gen *rcy-1* de 3,281 pb los cuales están señalados con las flechas en la parte izquierda de esta figura.

7.15 Distribución de GFP-RCY-1 a lo largo de hifas

La proteína GFP-RCY-1 expresada ectópicamente desde el locus *his-3* bajo el control del promotor CCG-1 mostró fluorescencia dispersa en la punta y en algunos puntos subapicales, tal y como fue descrita la proteína ortóloga RcyA en *A. nidulans* (Herrero *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia de *A. nidulans*, la proteína GFP-RCY-1 no fue detectada en septos inmaduros en *N. crassa*. Los puntos subapicales tenían movimientos tanto anterógrados como retrógrados y en pocos casos se pudo observar la llegada de uno de esos puntos al ápice. En la mayoría de los casos estos puntos fluorescentes se perdían en el plano focal y sus movimientos eran pausados e impredecibles.

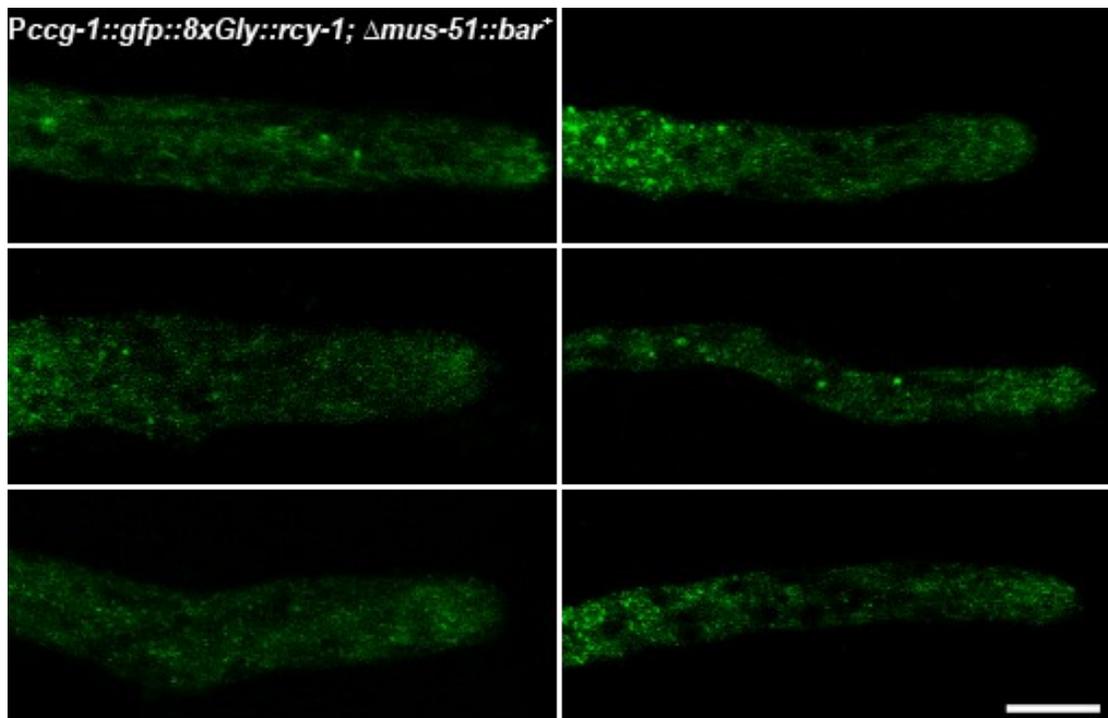


Figura 29. Imágenes de la punta de hifas de la transformante que expresa GFP-RCY-1. Se muestra la fluorescencia dispersa en la punta de la hifa y en puntos subapicales. Barra de escala = 10 μ m.

7.16 Comprobación de la integración del vector pAFM01 linearizado dirigido al

locus *his-3*

Las dos reacciones de PCR utilizadas para comprobar la integración de *Pccg-1::gfp::8xGly::rcy-1* revelaron que solamente la transformante tiene la información del vector integrado en el locus *his-3*. En la primera reacción se prueba si la cepa tiene el promotor *Pccg-1* en la región 3' del locus *his-3*. La segunda reacción prueba la presencia del gen *rcy-1* en la región 5' del locus *his-3* de cada cepa.

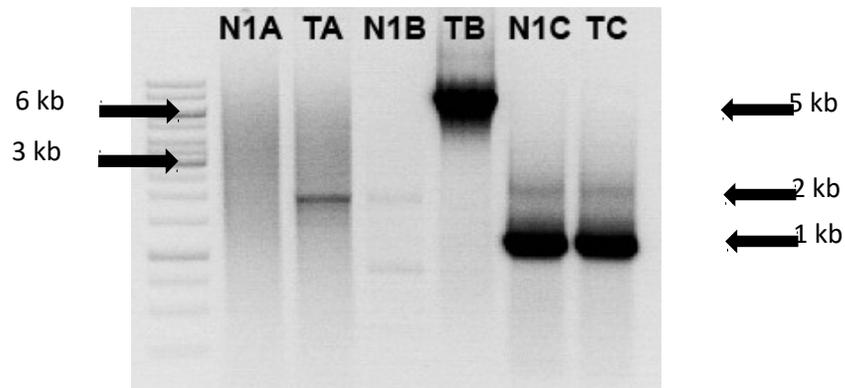


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa de las PCR que comprueban la integración de pAFM01 en locus *his-3*. N1 se refiere al ADN genómico de la cepa tipo silvestre y T al ADNg de la transformante SMRP413 que expresa GFP-RCY-1. El primer par de pozos A muestran la PCR que amplifica un fragmento 3' *his-3::Pccg-1* de 2 kb. El segundo par B muestra los amplicones de la PCR que produce un fragmento *rcy-1::5'his-3* de 5 kb. El tercer par de pozos C corresponden a una PCR control que amplifica el gen *cse-7* de 1 kb.

7.17 Microscopía TIRF de hifas de las cepas que expresan SEC-10-GFP y GFP-RCY-1

7.17.1 Análisis de la distribución de SEC-10-GFP mediante TIRFM

En la cepa SMRP411 (SEC-10-GFP) se pudo observar la llegada de la proteína SEC-10-GFP por la superficie celular hacia la punta en donde ocurre el crecimiento apical. Con este tipo de microscopía no se pudo observar la localización en los sitios de mayor crecimiento en la punta de la hifa debido a la poca profundidad de la onda evanescente característica de TIRFM.

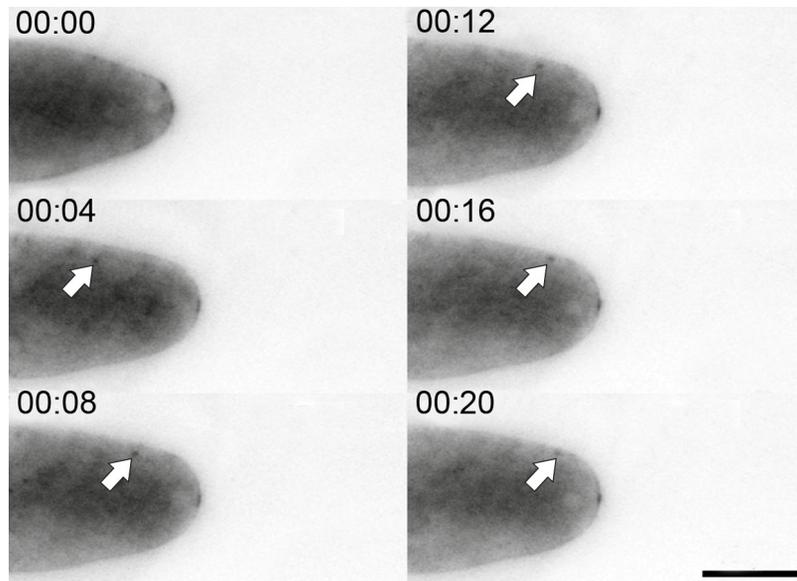


Figura 31. Serie de tiempo de microscopía TIRF de la cepa que expresa SEC-10-GFP. La flecha blanca señala punto fluorescente de SEC-10-GFP que llegó a la punta por la superficie celular. Barra de escala = 10 μ m. Tiempo min:seg.

7.17.2 TIRFM de GFP-RCY-1

La fluorescencia vista en la microscopía TIRF mostró que las partículas de GFP-RCY-1 se mueven dentro de la zona subapical y algunas partículas se mantienen dispersas en la punta (Figura 32). También se pudo observar un punto fluorescente de GFP-RCY-1 de mayor tamaño moverse por la corteza celular hacia el ápice. A pesar de que no se pudo observar la llegada de estas partículas a la punta, se pudo ver con mayor detalle la localización dispersa de GFP-RCY-1 en la punta. La fluorescencia en la punta no presentaba una localización definida como pudo haber sido en la membrana plasmática o en el SPK.

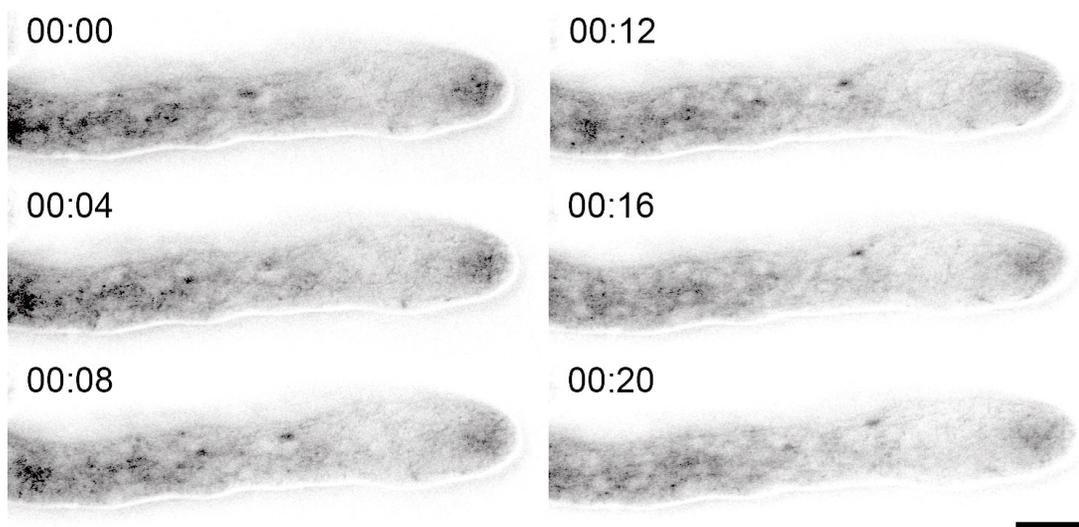


Figura 32. Serie de tiempo de microscopía TIRF de la cepa que expresa GFP-RCY-1. En esta imagen se muestran los cúmulos de GFP-RCY-1 y el movimiento que tienen. Barra de escala = 10 μ m. Tiempo min:seg.

8 Discusión

En este estudio se logró describir la localización de la proteína SEC-10, la cual fue etiquetada endógenamente en el extremo carboxilo terminal mediante el método de reemplazo de gen "Split Marker" (Smith *et al.*, 2011). En un estudio previo se intentó etiquetar endógenamente a todos los ocho componentes del exocisto, incluyendo a SEC-10 (Riquelme *et al.*, 2014). Sin embargo, en ese estudio no se logró obtener una transformante que expresara SEC-10-GFP. En otro estudio independiente se intentó etiquetar los componentes del exocisto en *M. oryzae* y tampoco se pudo obtener una transformante que expresara SEC-10-GFP y se sugirió que posiblemente era debido al mal plegamiento de la proteína etiquetada con GFP o por algún otro fenómeno molecular (Gupta *et al.*, 2015). La localización de SEC-10-GFP en *N. crassa* comprueba la hipótesis propuesta en este estudio ya que la proteína se acumula en la membrana plasmática apical. La distribución de SEC-10-GFP es parecida al resto de las otras proteínas SEC (Figura 1), lo cual fue revelado por el marcaje con la sonda FM4-64 (Figura 17). Además la localización de SEC-10-GFP (expresado ectópicamente desde el locus *his-3*) fue comparada con la de CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP en un ensayo de co-expresión con microscopía confocal (Sección 6.7.4). No hubo colocalización entre SEC-10-GFP y CHS-1-mChFP debido a que la quitina sintasa se encuentra en el núcleo del SPK en microvesículas (Figura 17). En la co-expresión de SEC-10-GFP y GS-1-mChFP se pudo observar colocalización a 400 nm de la punta en la periferia frontal de la capa macrovesicular. Esto sugiere que el exocisto participa en

el acercamiento de las macrovesículas a la membrana plasmática (Figura 18). La interacción del exocisto con macrovesículas se reveló previamente en una mutante *sec-5* que presentaba macrovesículas dispersas y fuera de la zona del SPK (Riquelme *et al.*, 2014). Se utilizó la cepa que expresa SEC-10-GFP bajo el control de *Pccg-1* (Figura 15) ya que su tipo de apareamiento A es el mismo que las cepas que expresan CHS-1-mChFP y GS-1-mChFP, lo que permitió la fusión de las hifas entre las distintas cepas. A pesar de haber diferencia en la señal fluorescente vista entre la cepa que expresan SEC-10-GFP endógenamente y desde el locus *his-3*, la proteína localizó principalmente próxima a la membrana plasmática apical (Figura 14 y 15). También es importante destacar el hecho que la cepa que expresa SEC-10-GFP desde el locus *his-3* no tiene una cadena de glicinas entre SEC-10 y la GFP, lo cual pudiera afectar el plegamiento y localización de SEC-10. Otra posible explicación es que la SEC-10-GFP expresada desde el locus *his-3* esté en competencia con la SEC-10 producida endógenamente y la maquinaria celular tenga una preferencia hacia la SEC-10 sin modificaciones. A diferencia de la SEC-10-GFP bajo el control de promotor *ccg-1*, SEC-10-GFP expresada bajo el control de su promotor nativo presentaba una fuerte localización en la punta y poca fluorescencia citoplasmática. Mediante TIRFM fue posible observar la llegada de SEC-10-GFP por la corteza celular hacia la punta (Figura 31). Se decidió utilizar esta técnica para observar con mayor detalle las partículas fluorescentes que se encuentran muy cercanas a la corteza celular y seguir su trayectoria sin fluorescencia de fondo. De acuerdo a los resultados del ensayo de co-expresión se soporta la idea de que existen subcomplejos del exocisto en *N. crassa*, uno con mayor afinidad a las macrovesículas, otro con mayor afinidad a la membrana plasmática apical y uno de distribución intermedia (Figura 1). En este caso la SEC-10-GFP parece estar más próximo a la membrana apical que a la capa macrovesicular del SPK, lo que sugiera que SEC-10 es parte del subcomplejo

con mayor afinidad a la membrana plasmática apical. Adicionalmente se quiso observar cómo era la expresión de SEC-10-GFP si la cepa se encontraba en estado homocarión, por lo cual se cruzó con la tipo silvestre N150 (Tabla 1). La descendencia viable presentó defectos en la morfología celular y en la tasa de crecimiento (Sección 7.8), esto se puede deber a una afectación de la exocitosis al expresar SEC-10 con una etiqueta en el extremo carboxilo terminal. La tasa de crecimiento en tanto la transformante homocarión SEC-10-GFP como la heterocarión era significativamente más lenta de lo normal (Figura 27). La homocarión creció hasta casi 17 veces más lento que la cepa parental 9718, lo que demuestra que el crecimiento de la transformante heterocarión es compensado por el gen *sec-10* sin etiqueta presente en los otros núcleos. Este resultado nos indica que el extremo carboxilo terminal es importante para la función del exocisto y la etiqueta GFP este bloqueando la unión con los otros componentes. Esto coincide con un estudio reciente en levadura que muestran por la técnica del doble híbrido que el extremo carboxilo terminal de Sec10p interactúa con el extremo amino terminal de Sec15p y que ambos forman un subcomplejo Sec10p-Sec15p (Picco *et al.*, 2017). El subcomplejo Sec10-Sec15 se ha comprobado en levadura usando métodos bioquímicos, genéticos y estructurales que se utilizaron para discernir la arquitectura y el ensamblado del exocisto en levadura (Heider *et al.*, 2016). Sin embargo, no se ha comprobado la dinámica de los subcomplejos del exocisto en *N. crassa* a pesar de que el exocisto está altamente conservado en eucariotas (Novick *et al.*, 1980).

En este estudio se pudo corroborar que las mutantes $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ no eran viables en estado homocarión, lo cual fue demostrado previamente para otros componentes del exocisto (Riquelme *et al.*, 2014). Este resultado sugiere que todos los componentes del exocisto son

esenciales, con la excepción de SEC-5, dado que $\Delta sec-5$ que puede sobrevivir en estado homocarión. Además, las mutantes $\Delta sec-10$ y $\Delta exo-70$ presentaron una tasa de crecimiento significativamente similar entre si y más lentas a la parental. Este resultado nos indica que el crecimiento de las células se ve afectado al tener una porción de la población de nucleós que tiene eliminado el gen de uno de los componentes del exocisto, en este caso *sec-10* y *exo-70*. Mientras tanto, la cepa $\Delta rcy-1$ en estado homocarión era viable y presentaba problemas en la formación de hifas aéreas (Figura 25). Se requieren más estudios para elucidar la relación entre la proliferación de hifas aéreas y la proteína RCY-1 en *N. crassa*. No obstante, cuando se realizó el etiquetado endógeno de RCY-1 en el extremo carboxilo terminal por el método "Split Marker" no se logró observar la proteína en la punta ya que la GFP bloqueaba la modificación postraducciona que realiza la farnesiltransferasa sobre el motivo CAAX-box en el extremo carboxilo terminal, lo que pudiera impedir la unión de la proteína con la membrana de vesículas u otras proteínas encontradas en la punta.

La proteína RCY-1 etiquetada en el extremo amino terminal y expresada bajo el control del promotor *ccg-1* (Sección 6.4), mostró una distribución dispersa en el citoplasma (Figura 29). En el extremo carboxilo terminal esta proteína tiene un motivo CAAX que sufre una modificación lipídica por acción de una transferasa de isoprenoides. CAAX se refiere a los residuos C = Cisteína, A = cualquier aminoácido alifático y X = cualquier aminoácido; este último determinará si es sustrato para geranilgeraniltransferasa o para farnesiltransferasa (Zhang & Casey 1996). En el caso de RCY-1, el último aminoácido es metionina que en efecto es sustrato para la farnesiltransferasa. Por esta razón se decidió etiquetar la proteína RCY-1 en el extremo amino terminal con GFP ya que en el extremo carboxilo terminal existe un motivo CAAX-box. La

distribución de GFP-RCY-1 es parecida a la que fue reportada en su ortóloga GFP-RcyA de *A. nidulans* ya que ambas se encuentran en la punta y presentan puntos subpicales con movimientos dinámicos (Herrero *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia de GFP-RcyA, la proteína GFP-RCY-1 no se observó en septos en formación. Esto pudiera ser explicado por la divergencia en la función de RCY-1 o porque el dominio F-Box en el extremo amino terminal esté involucrado en algún proceso no esencial involucrado en la formación de septos.

9 Conclusión

En este estudio se reveló por LSCM y TIRFM que SEC-10 llega a la punta de la hifa y se acumula próxima a la membrana plasmática apical en forma de lúnula. Su localización es parecida a la de los componentes SEC-5, -6, -8 y -15 ya que todos se acumulan en la membrana plasmática apical sin co-localizar con el SPK. Esto fue corroborado por la falta de co-localización vista mediante microscopía confocal de la cepa que co-expresa SEC-10-GFP y el marcador de macrovesículas del SPK GS-1-mChFP (Figura 18C). El gen *sec-10* es esencial y su extremo carboxilo terminal es un dominio importante para el correcto ensamblaje del exocisto. Mediante microscopía confocal se observó que la proteína GFP-RCY-1 se localiza dispersa en la punta y en pequeños cuerpos subapicales. La eliminación del gen *rcy-1* no es letal y tiene efectos severos en la formación de hifas aéreas. El motivo CAAX-box en *N. crassa* es presuntamente un sustrato para farnesiltransferasa, en donde se le añade un grupo farnesil lipofílico que facilita la interacción con membranas y posiblemente con otras proteínas. Los hallazgos reportados en este estudio tanto para los esperados como los inesperados han inspirado nuevas preguntas que intentan descifrar el rol de las proteínas SEC-10 y RCY-1 en cuanto al crecimiento y morfogénesis de hifas de *N. crassa* tales como, ¿Cual componente o componentes del exocisto interaccionan con el extremo carboxilo terminal de SEC-10 que lo hace tan importante para la función correcta del exocisto?, ¿Cuál es la función de *rcy-1* y con

qué proteínas interactúa?, y ¿Por qué la ausencia del gen *rcy-1* afecta la formación de hifas aéreas?.

Referencias

- **Bartnicki-Garcia S.** 2003. "Hyphal Tip Growth: Outstanding Questions." *Molecular Biology Fungal Development.* 29-58.
- **Bartnicki-Garcia S, Bartnicki DD, Gierz G, Lopez-Franco R & Bracker CE.** 1995. Evidence That Spitzenkörper Behavior Determines the Shape of a Fungal Hypha: A Test Of The Hyphoid Model. *Experimental Mycology.* **19**: 153-159.
- **Bartnicki-Garcia S, Hergert F & Gierz G.** 1989. Computer Simulation of Morphogenesis and Mathematical Basis for Hyphal Tip Growth. *Experimental Mycology* **2**: 173-192
- **Bartnicki-Garcia S & Lippman E.** 1969. Fungal Morphogenesis: Cell Wall Construction in *Mucor rouxii*. *Science.* **165**: 302-304.
- **Brunswik, H.** 1924. Untersuchungen über Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomycetengattung *Coprinus*. En K. Goebel (ed.), Botanische Abhandlungen. Gustav Fischer, Jena, Germany. 1-152.
- **Bourett TM & Howard RJ.** 1991. Ultrastructural Immunolocalization of Actin in a Fungus. *Protoplasma.* **163**: 199-202.

- **Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew C, Litvinkova L, Weiss R. L, Borkovich K. A & Dunlap J. C.** 2006. A High-Throughput Gene Knockout Procedure for *Neurospora* Reveals Functions for Multiple Transcription Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(27): 10352-10357.
- **Davis RH & de Serres FJ.** 1970. Genetic and Microbial Research Techniques for *Neurospora crassa*. Davis, R.H., and de Serres, F.J. (1970). Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology*. **17**(A): 79-143.
- **Davis RH.** 2000. *Neurospora: Contributions of a Model Organism*. Oxford University Press.
- **Dighton J.** 2016. Fungi in Ecosystem Processes. Second Edition. *Nature*. 1.1 Introduction & 1.2 Why fungi? 1-4.
- **Duret L, Gasteiger E & Perriere G.** 1996. LALNVIEW: A Graphical Viewer for Pairwise Sequence Alignments. *Computer Applications in the Biosciences*. **12**: 507-510.
- **Guo W, Grant A, & Novick P.** 1999. Exo84p Is An Exocyst Protein Essential for Secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(33): 23558-23564.
- **Heider MR, Gu M, Duffy CM, Mirza AM, Marcotte LL, Walls AC, Farrall N, Hakhverdyan Z, Field MC, Rout MP, Frost A & Munson M.** 2016. Subunit Connectivity, Assembly Determinants and Architecture of the Yeast Exocyst Complex. *Nature Structural & Molecular Biology*. **23**(1): 59-66.
- **Herrero S, Takeshita N & Fischer R.** 2014. F-Box Protein RcyA Controls Turnover of The Kinesin-7 Motor KipA in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. **13**(8): 1085-1094.

- **Honda S & Selker EU.** 2009. Tools for Fungal Proteomics: Multifunctional *Neurospora* Vectors for Gene Replacement, Protein Expression and Protein Purification. *Genetics*. **182**(1): 11-23.
- **Howard RJ.** 1981. Ultrastructural Analysis of Hyphal Tip Cell Growth in Fungi: Spitzenkörper, Cytoskeleton and Endomembranes after Freeze-Substitution. *Journal Of Cell Science*. **48**: 89-103.
- **Huang X, & Miller W.** 1991. A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *Advances In Applied Mathematics*. **12**(3): 337-357.
- **Kwon YH, Hoch HC & Aist JR.** 1991. Initiation of Appressorium Formation in *Uromyces appendiculatus*: Organization of the Apex, and the Responses Involving Microtubules and Apical Vesicles. *Canadian Journal of Botany*. **69**: 2560-2573.
- **Lindgren, C. C.** 1942. The Use of Fungi in Modern Genetical Analysis. *Iowa State College Journal of Science*. 271-290.
- **McDaniel DP & Roberson RW.** 2000. Microtubules Are Required for Vesicle and Mitochondria Motility and Positioning in Hyphal Tip Cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genetics and Biology*. **31**: 233-244.
- **Palanivelu R & Preuss D.** 2000. Pollen Tube Targeting and Axon Guidance: Parallels In Tip Growth Mechanisms. *Trends in Cell Biology*. **10**(12): 517-524.
- **Picco A, Irastorza-Azcarate I, Specht T, Böke D, Pazos I, Rivier-Cordey A. S., Devos D. P., Kaksonen M & Gallego O.** 2017. The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis For Exocytosis. *Cell*. **168**(3): 400-412.e18

- **Robinson, CH.** 2001. Cold Adaptation in Arctic and Antarctic Fungi. *New Phytologist*. **151**: 341-353.
- **Rayner, ADM.** 1992. Introduction. In *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Ed. G. C. Carroll & D. T. Wicklow, 17-24.
- **Riquelme M, Yarden O, Bartnicki-Garcia S, Bowman B, Castro-Longoria E, Free SJ, Fleissner A, Freitag M, Lew RR, Mouriño-Pérez R, Plamann M, Rasmussen C, Richthammer C, Roberson R-W, Sanchez-León E, Seiler S & Watters MK.** 2011. Architecture and Development of the *Neurospora crassa* Hypha - A Model Cell for Polarized Growth. *Fungal Biology*. **115**: 446-474.
- **Rizzoli Silvio O & Jahn Reinhard.** 2007. Kiss-And-Run, Collapse and 'Readily Retrievable' Vesicles. *Traffic*. **8**: 1137-1144.
- **Roos UP & Turian G.** 1977. Hyphal Tip Organization in *Allomyces arbuscula*. *Protoplasma*. **93**: 231-247.
- **Sietsma JH & Wessels J.** 1994. Apical Wall Biogenesis. p. 126-141. *En J. Wessels and F. Meinhardt (ed.), The Mycota, vol. 1.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- **Shaw SL, Dumais J & Long SR.** 2000. Cell Surface Expansion in Polarly Growing Root Hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. **124**: 959-969.
- **Shaw BD, Chung DW, Wang CL, Quintanilla LA & Upadhyay S.** 2011. A Role for Endocytic Recycling In Hypha Growth. *Fungal Biology*. **115**: 541-546.

- **Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazan L, Dou X, Espeso EA, Penalva MA, Osmani SA & Oakley BR.** 2008. The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. **19**(4): 1439-1449
- **TerBush DR, Maurice T, Roth D & Novick P.** 1996. The Exocyst Is A Multiprotein Complex Required For Exocytosis In *Saccharomyces Cerevisiae*. *The EMBO Journal*. **15** (23): 6483-6494.
- **Trinci AP & Collinge AJ.** 1973. Structure and Plugging of Septa of Wild Type and Spreading Colonial Mutants of *Neurospora crassa*. *Archives für Mikrobiologie*. **91**: 355-364.
- **Verdín J, Bartnicki-Garcia S & Riquelme M.** 2009. Functional Stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*. **74**(5): 1044-1053.
- **Vogel HJ.** 1956. A Convenient Growth Medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*. **13**: 42-43.
- **Walker M. & White A.** 2005. Fungi Biology and Applications. Chapter 1. Introduction to Fungal Physiology. 1.2.1 Filamentous Fungi: 3.
- **Wessels JGH.** 1986. Cell Wall Synthesis in Apical Hyphal Growth. *International Review of Cytology*. **104**: 37-79.
- **Westergaard M & Mitchell H K.** 1947. *Neurospora* V. A Synthetic Medium Favoring Sexual Reproduction. *American Journal of Botany*. **34**: 573-577.
- **Wiederkehr A, Avaro S, Prescianotto-Baschong C, Haguenaer-Tsapis R & Riezman H.** 2000. The F-Box Protein Rcy1p Is Involved in Endocytic Membrane

Traffic and Recycling out of an Early Endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. **149**(2): 397-410.

- **Zhang FL & Casey PJ**. 1996. Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annual Review of Biochemistry*. **65**(1): 241-269