

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

**Análisis funcional de CSE-8: una proteína hipotética de retículo
endoplasmático, receptor cargo de quitina sintasas en
*Neurospora crassa***

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

Presenta:

Samantha Verónica González Téllez

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Samantha Verónica González Téllez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Dr. Jacob Licea Rodríguez

Dr. Jorge Alberto Verdín Ramos



Dra. Ana Denise Re Arajo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Samantha Verónica González Téllez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Análisis funcional de CSE-8: una proteína hipotética de retículo endoplasmático, receptor cargo de quitina sintasas en *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

La pared celular de hongos se compone principalmente de quitina y glucanos. La quitina, a pesar de no ser el componente mayoritario de la pared celular, es responsable de la plasticidad y conservación de la integridad celular. La síntesis de quitina en hongos se lleva a cabo por las quitina sintasas (CHS), una familia de proteínas transmembranales que son transportadas dentro de la célula en microvesículas acarreadoras llamadas quitosomas. Los mecanismos que involucran la biogénesis y el transporte de CHS aún conservan múltiples incógnitas. En *Saccharomyces cerevisiae*, la chaperona Chs7 es requerida para la salida de la quitina sintasa de clase IV, Chs3, del retículo endoplasmático y se transporta en conjunto con la microvesícula hasta la membrana plasmática para llevar a cabo la biosíntesis de quitina. En *Neurospora crassa*, se identificaron dos proteínas ortólogas a la Chs7 de *S. cerevisiae*: CSE-7 y CSE-8. La CSE-7 fue caracterizada por ser imprescindible en la secreción y biogénesis de la quitina sintasa de CHS-4 (clase IV). El papel de CSE-8 en el tráfico y biogénesis de quitosomas en *N. crassa* aún es desconocido. Sin embargo, en este estudio se caracterizó el fenotipo de la cepa $\Delta cse-8$, que en comparación con las cepas de tipo parental y silvestre, presentó una reducción del 40% en el contenido de N-acetilglucosamina total de la célula. Adicionalmente, $\Delta cse-8$ mostró una intensidad de fluorescencia de blanco de calcoflúor en septos disminuida y un menor grosor en hifas principales. Estos resultados, sugieren que CSE-8 podría jugar un papel en la síntesis de la pared celular. Para analizar el papel de CSE-8 en la ruta secretora de quitina sintasas de clase III (CHS-1) y V (CHS-5) en hifas de *N. crassa*, se llevaron a cabo cruza genéticas para obtener cepas de *chs-1::gfp* y *chs-5::gfp* con fondo mutante $\Delta cse-8$. Los resultados obtenidos permitieron corroborar que CSE-8 no participa en el tráfico de CHS-1 y CHS-5 a septos ni al Spitzkörper (SPK). Sin embargo, su localización en la región central del SPK, septos, red de cisternas endomembranales y zona periférica nuclear, sugiere una posible participación de CSE-8 en el transporte de otras CHS.

Palabras clave: Quitina sintasas, pared celular, microvesículas

Abstract of the thesis presented by **Samantha Verónica González Téllez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Molecular and Cellular Microbiology

Functional analysis of CSE-8: a hypothetical endoplasmic reticulum protein, receptor cargo of chitin synthases in *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

PhD. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

The cell wall of filamentous fungi and yeasts is mainly composed of chitin and glucans. Chitin, although not a major component of the cell wall, is responsible for plasticity and preservation of cell integrity. Chitin synthesis in fungi is carried out by chitin synthases (CHS), a family of transmembrane proteins that are transported into the cell in microvesicle carriers called chitosomes. The mechanisms involving CHS biogenesis and trafficking remain largely unknown. In *Saccharomyces cerevisiae*, Chs7 is required for the exit of class IV chitin synthases from the endoplasmic reticulum and is transported together with the microvesicle to the plasma membrane, where chitin biosynthesis takes place. Therefore, it is considered that Chs7 must be involved in the trafficking of chitin synthase-carrying chitosomes. In *Neurospora crassa*, two proteins orthologous to *S. cerevisiae* Chs7p were identified: CSE-7 and CSE-8. CSE-7 was characterized as having a key role in the secretion and biogenesis of the class 4 chitin synthase CHS-4. The role of CSE-8 in chitosome trafficking and biogenesis in *N. crassa* is unknown. However, previous studies suggest that it may represent an element of the machinery involved in the trafficking of one of the other chitin synthases, whose secretory pathway has not been described. In this study, we characterized the phenotype of a $\Delta cse-8$ strain, which, compared to the parental and wild-type strains, presented a 40% reduction in the total N-acetylglucosamine content of the cell. Additionally, $\Delta cse-8$ showed decreased fluorescence intensity of calcofluor white in septa and reduced thickness in main hyphae. These results suggest that CSE-8 may play a role in cell wall synthesis. To analyze the role of CSE-8 in the secretory pathway of class III (CHS-1) and V (CHS-5) chitin synthases in *N. crassa* hyphae, genetic crosses were carried out to obtain *chs-1::gfp* and *chs-5::gfp* strains with a $\Delta cse-8$ mutant background. The results corroborated that CSE-8 is not involved in the trafficking of CHS-1 and CHS-5 to septa and to the Spitzenkörper (SPK). However, its localization in the central region of the SPK, septa, network of endomembranous cisternae (NEC), and nuclear envelope suggests a possible involvement of CSE-8 in the transport of other CHS.

Keywords: Chitin synthases, cell wall synthesis, microvesicles

Dedicatoria

Para Juan Agustín y Verónica

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación superior de Ensenada, Baja California. Por brindarme la oportunidad de darle continuidad a mi vocación científica y de convivir con personas sensacionales del ámbito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que sostuvo mis estudios de maestría con una beca que me permitió darle continuidad a mi formación científica. La investigación fue financiada por el proyecto CONACYT-DFG FONCICYT 277869.

A la Dra. Meritxell Riquelme, quien fue mi guía principal en el desarrollo de este trabajo. Agradezco profundamente que me haya brindado un espacio en su grupo de trabajo y me haya brindado la ayuda necesaria en mi desarrollo como estudiante. Gracias Dra. Meritxell, por compartir su pasión y entusiasmo por la biología de hongos, por motivar mi curiosidad, por su paciencia, sus comentarios y sus correcciones.

A la Dra. Olga Callejas, que siempre estuvo disponible para dudas no solo para este escrito, sino durante mi formación en el laboratorio.

Al Dr. Jorge Verdín y el Dr. Jacob Licea, por sus valiosas aportaciones para este trabajo.

A Juan Agustín Romero, mi imprescindible. Gracias por ser mi apoyo y mi impulso en todo momento desde que te conocí, por nunca dejar de incitarme a cumplir mi sueño de estudiar un posgrado. Gracias por todos los abrazos, las conversaciones e ideas cuando me sentí estancada en los experimentos. Gracias por tus palabras de aliento, por la Genoveva y todo lo que implica estar juntos. Gracias, porque realmente solo tú sabes todo lo que hay detrás de este saltito. Gracias por ser la mejor parte esta aventura.

A mi hermano Ángel, que extraño muchísimo ver crecer todos los días y de quien estoy tan orgullosa.

A mis padres, Verónica Téllez y Marco Polo González, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente a perseguir mis sueños, que me han seguido apoyando y dando palabras de aliento a la distancia. Gracias por seguirme procurando, soy muy afortunada por tener padres tan incondicionales.

A mis compañeros de laboratorio Dolores Camacho, Jazmín Álvarez, Juan Manuel Martínez, Mónica Cante, Vianey López, Daniel Salgado y Shalma Ortíz, por el compañerismo, las enseñanzas, las risas y sus aportaciones.

A mis abuelos Verónica Espinosa, Rosa López, Antonio González y Ponciano Téllez, que aún a la distancia sé que están presentes y me hacen sentir muy afortunada por su compañía a lo largo de mi vida.

A mi familia y amigos, en especial a Miriam Corona, Adrián Olivares, Mariana López, Rosely Rodríguez, Víctor Gutiérrez, María Varela, Alejandro Téllez, Edgar Domingo, Ximena García y Lizeth Guerrero, por siempre estar ahí para mí, en CDMX o fuera. Que fortuna crecer a su lado y contar con ustedes.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Características generales de los hongos	1
1.2 Crecimiento apical.....	1
1.3 La pared celular de los hongos.....	2
1.3.1 Producción de quitina en la pared celular de los hongos.....	2
1.4 Antecedentes	3
1.4.1 Las quitina sintasas de <i>Neurospora crassa</i>	3
1.4.2 Biosíntesis de quitina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.4.3 Biogénesis y tráfico de quitina sintasas en <i>Neurospora crassa</i>	7
1.5 Justificación	8
1.6 Hipótesis.....	8
1.7 Objetivos	8
1.7.1 Objetivo general.....	8
1.7.2 Objetivos específicos	8
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Análisis bioinformáticos	9
2.2 Cepas y condiciones de cultivo	9

2.2.1	Medios de cultivo para <i>Neurospora crassa</i>	9
2.2.2	Recolección de conidios de <i>Neurospora crassa</i>	10
2.2.3	Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	11
2.3	Caracterización de la cepa $\Delta cse-8$	11
2.3.1	Confirmación de la deleción del gen NCU01814	11
2.3.2	Análisis de fenotipos de $\Delta cse-8$	12
2.3.2.1	Análisis de morfología colonial y crecimiento radial	12
2.3.2.2	Análisis de ramificaciones y septos.....	12
2.3.2.3	Determinación de quitina por cuantificación de N-acetilglucosamina.....	13
2.3.2.4	Cruzas genéticas	14
2.4	Métodos genéticos y moleculares	14
2.4.1	Diseño de oligonucleótidos.....	14
2.4.2	Preparación de células quimio-competentes de <i>E. coli</i>	14
2.4.3	Clonación del plásmido pRS416.....	16
2.4.4	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	16
2.4.5	Extracción de ADN genómico de <i>Neurospora crassa</i>	16
2.4.6	Electroforesis en gel de agarosa	17
2.4.7	Purificación de ADN en gel de agarosa	17
2.4.8	Etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP	17
2.4.9	Transformación de <i>Neurospora crassa</i> por electroporación.....	18
2.5	Microscopía confocal	18
Capítulo 3.	Resultados	20
3.1	Análisis bioinformáticos	20
3.2	Comprobación de cepa $\Delta cse-8$	22
3.3	Caracterización fenotípica de la cepa $\Delta cse-8$	24

3.3.1	Análisis de contenido de N-acetilglucosamina en la cepa mutante de $\Delta cse-8$	28
3.4	Análisis de germínulas mediante microscopía confocal	30
3.5	Etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP.....	31
3.6	Análisis mediante microscopía confocal de barrido láser de la cepa homocarión con genotipo $cse-8::gfp::hph$	32
3.7	Análisis de cruas genéticas $chs-5::gfp$ x $\Delta cse-8$ y $chs-1::gfp$ x $\Delta cse-8$	35
Capítulo 4. Discusión.....		38
4.1	Análisis de la caracterización fenotípica de $\Delta cse-8$	38
4.2	CSE-8 cocaliza en los sitios de crecimiento polarizado y de construcción de nueva pared celular en hifas de <i>N. crassa</i>	40
4.3	CSE-8 no participa en el transporte de CHS-1 y CHS-5 a Spitzkörper y septos en hifas de <i>N. crassa</i>	41
Capítulo 5. Conclusiones		44
5.1	Perspectivas	44
Literatura citada		45
Anexos.....		51

Lista de figuras

Figura	Página
1. Estructura de las siete clases de quitina sintasas de <i>Neurospora crassa</i> (Imagen tomada de Fajardo-Somera et al., 2015).....	4
2. Localización y participación de las CHS en el crecimiento de <i>Neurospora crassa</i> . (A) Distribución de las quitina sintasas en el Spitzkörper y septos durante el crecimiento de <i>N. crassa</i> . (B) Participación de las quitina sintasas. Imágenes tomadas de Fajardo-Somera et al., 2015.	5
3. Esquema de salida de Chs3 del retículo endoplasmático en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Tomado y modificado de Orlean, 2012; Rico-Ramírez, 2018).....	6
4. Análisis bioinformáticos de CSE-8 (NCU01814). (A) Ilustración de las regiones y dominios citoplasmáticos de CSE-8, CSE-7, y Chs7 obtenidos con la base de datos InterPro. Las ilustraciones se realizaron con el software Biological Sequences IBS 1.0.1. Estructura tridimensional de CSE-8 predicha por (C) I-TASSER y (D) AlphaFold. Ambas estructuras cuentan con siete dominios hélice, pero diferente conformación. (D) Matriz de porcentaje de identidad para las secuencias protéicas de Chs7p, CSE-7 y CSE-8).	21
5. Distribución taxonómica de proteínas CSE representativas en las Divisiones del Reino Fungi. El árbol filogenético ilustra las proteínas más cercanas a la familia pfam12271 (E-value < 1 x 10 ⁻¹⁰⁰). Las barras azules indican el número de proteínas CSE encontradas para cada especie. El árbol fue editado en iTOL v6 (Letunic y Bork, 2021).....	23
6. Comprobación de la eliminación del gen <i>cse-8</i> en gel de agarosa al 1%. (A) y (B), corresponden a los marcos abiertos de lectura de <i>cse-8</i> y <i>pex-26</i> , respectivamente, indicando los oligonucleótidos empleados en la comprobación. (C) A: se observa la amplificación de <i>cse-8</i> empleando los oligonucleótidos 850 y 851, y empleando ADN genómico de una cepa WT como templado; B: se empleó ADN genómico de la cepa $\Delta cse-8$ como templado y los oligonucleótidos 850 y 851, C: Amplificación de <i>pex-26</i> con los oligonucleótidos 820 y 821, que se utilizó como PCR control.....	24
7. Evaluación de crecimiento de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Crecimiento colonial de las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718. (B) Gráfico de crecimiento radial a las 2 h (t ₁), 4 h (t ₂), 6 h (t ₃) y 8 h (t ₄). Las barras de error denotan la desviación estandar muestral.	25
8. Producción de hifas aéreas de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Producción de hifas aéreas y conidios a los 6 días en completa oscuridad a temperatura ambiente (24-25°C). (B) Gráfico de promedio de formación de hifas aéreas (n=50). (C) Concentración de conidios obtenida (n= 8). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.	26
9. Gráficos correspondientes a la caracterización fenotípica de las hifas de las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988, y FGSC #9718. (A) Se presenta el promedio del número de ramificaciones en hifas principales, en donde solo se puede observar una diferencia significativa comparando las cepas parental y mutante, con la cepa silvestre. (B) Gráfico de las diferencias entre el ancho de las hifas principales (Tabla 4). (C) Promedio de septos en 500 μ m de distancia del ápice a la zona subapical de las hifas principales. (D) Gráfico de las distancias del ápice al primer septo y la distancia entre el primer y segundo septo de las cepas evaluadas. Las barras de error	

- corresponden a la desviación estándar muestral. (*) Indica una diferencia significativa para dos muestras: FGSC #9718 y $\Delta cse-8$ (Tabla 5). Indica una diferencia significativa para dos muestras: (***) FGSC #9718 y $\Delta cse-8$; (**) FGSC #988 y $\Delta cse-8$ (Tablas 4 y 5). 28
10. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de N-acetilglucosamina total en micelio liofilizado. Las barras de error en cada punto cuenta con barras de error en cada punto indican la desviación estándar de la absorbancia correspondiente a las mediciones para cada concentración (n=5). También se expresa la ecuación de la recta y el valor de R, correspondientes al análisis de regresión lineal de los datos obtenidos..... 29
 11. Gráfico de promedios de la concentración total de GlcNAc en 10 μg de micelio liofilizado de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. Las barras de error indican la desviación estándar del conjunto de datos obtenidos. (**) Indica una diferencia significativa entre las cepas #988 y $\Delta cse-8$; (***) Indica una diferencia significativa entre las cepas #9718 y $\Delta cse-8$ (Ver Tabla 8). 30
 12. Análisis de septos en el plano medio focal con blanco de calcoflúor en las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Ejemplos de edición de imágenes con Fiji Image J para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia del blanco de calcoflúor en septos. (B) Gráfico de promedios de intensidad de fluorescencia (n=10). Las barras de error corresponden a la desviación estándar del conjunto de datos, (**) y (***) señalan las diferencias significativas entre las cepas analizadas (Tabla 9). 31
 13. Gemínulas de las cepas #9718 y $\Delta cse-8$ (60X). (A) #9718; (B) cepa $\Delta cse-8$. Las flechas con corte triangular en la parte inferior, representan la fusión de tubos germinativos; las flechas blancas señalan la formación de CATs. Las barras de escala equivalen a una distancia de 10 μm 32
 14. Obtención de fragmentos para el etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP. F4 y F5 corresponden a las fusiones de F1 con F2 y F2 con F3, respectivamente. Los detalles de la amplificación de F1, F2 y F3 pueden observarse en la Figura 3. 33
 15. Comprobación molecular del etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP en la cepa FGSC #9718 transformada con los fragmentos F4 y F5. (A) Los carriles a-d corresponden a cepas transformadas sin la construcción presente, mientras que el carril e, corresponde a la reacción de PCR del fragmento *cse-8::gfp* empleando los oligonucleótidos 850 y 226. (B) Reacción de PCR con oligonucleótidos 225 y 858 para la comprobación de *gfp::hph::3'UTR cse-8*. 33
 16. CSE-8 se localiza en el Spitzkörper y los septos durante el crecimiento de *N. crassa*. (A) Secuencia de crecimiento de una hifa de *N. crassa* expresando *cse-8::gfp*. Se observa el inicio de la formación de una ramificación nascente (0 min), seguida del la formación de la ramificación (4 min). Posteriormente, se aprecia a a CSE-8 en el SPK de la hifa principal y la ramificación formada (5 min 60 seg). (D) Se observa a CSE-8 en los septos formados de hifas principales y ramificaciones de *N. crassa*. Las flechas blancas señalan la expresión *cse-8::gfp* en SPK y septos. Las barras de escala corresponden a una distancia de 10 μm 34
 17. CSE-8 se localiza alrededor de los núcleos en hifas de *Neurospora crassa*. (A) Se observa a CSE-8 en en el SPK y alrededor de los núcleos en las zonas subapicales de la hifa (Barras de escala: 20 μm). El cuadro amarillo indica el núcleo que se observa en (B), donde se puede observar el núcleo señalado y la fluorescencia alrededor de él. Barras de escala: 5 μm 34

18. CSE-8 colocaliza en el centro del Spitzkörper y en la red de cisternas elongadas en hifas de *Neurospora crassa*. (A) Se puede observar a CSE-8 en el centro del SPK teñido con FM4-64. La flecha negra con contorno blanco, señala la colocalización de *cse-8::gfp* y FM4-64. (B) Las flechas gruesas señalan puntos de traslape que denotan la presencia de CSE-8 en la NEC. Las flechas delgadas, señalan los puntos de traslape en vesículas donde se expresa *cse-8::gfp*. Las barras de escala corresponden a una distancia de 10 μm 35
19. Comprobación de progeñe resultante de cruas genéticas entre las cepas SMRP55 y SMRP287 con la cepa $\Delta\text{cse-8}$. (A) Diagrama de las construcciones comprobadas en (B) y (C), indicando los oligos empleados para cada comprobación. (B) Comprobación molecular de la cepa con genotipo *chs-1::gfp/\Delta\text{cse-8}*. El carril (a) corresponde a la amplificación de *chs-1::gfp* con los oligonucleótidos 383 y 226; (b) corresponde a la ausencia de *cse-8* en la cepa, reacción para la que se emplearon los oligonucleótidos 850 y 851; (c) es el producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 850 y 851 empleando ADN de la cepa FGSC #988. (C) El carril (a) corresponde a la ausencia de *cse-8* en la cepa progeñe, empleando los oligonucleótidos 850 y 851; el carril (b) corresponde a la comprobación de *chs-5::gfp* en ausencia de *cse-8*. 36
20. Análisis de cruas genéticas de las cepas $\Delta\text{cse-8}$ y la quitina sintasa de clase III etiquetada con GFP (60X). (A) Se observa que la ausencia de CSE-8 en el fondo mutante $\Delta\text{cse-8}$, no interrumpe la llegada de CHS-5 al (A) Spitzkörper y (B) a los septos en hifas de *N. crassa*. (A) La imagen de *chs-1::gfp* x $\Delta\text{cse-8}$, fue tomada con el objetivo de 60X con 2.0 unidades de aumento para su mejor observación. Las barras de escala corresponden a 10 μm 36
21. Análisis de cruas genéticas de las cepas $\Delta\text{cse-8}$ y quitina sintasa de clase V etiquetada con GFP. Se puede apreciar como la ausencia de CSE-8, no interrumpe la llegada de CHS-5 al (A) Spitzkörper y (B) a los septos en hifas de *N. crassa*. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal de barrido láser. Las barras de escala corresponden a 10 μm 37
22. Estudio *in silico* de las posibles interacciones moleculares entre las chaperonas CSE-7 y CSE-8, con las quitina sintasas de *N. crassa*. (A) Se observa la interacción entre los dominios de CSE-7 (rojo) en el extremo N-terminal de CHS-4 (azul). (B) Modelado de la interacción entre CSE-8 (rojo) y el extremo N-terminal de CHS-4 (azul). (C) Modelado de la interacción entre CSE-8 (rojo) y el extremo N-terminal CHS-1 (azul). (D) Se ilustra la interacción entre los dominios de CHS-3 (azul) en su extremo N-terminal, y CSE-8 (rojo). 42

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Neurospora crassa</i> y vectores empleados.....	10
2. Curva de calibración de N-acetilglucosamina.	13
3. Oligonucleótidos empleados en el trabajo experimental.....	15
4. Crecimiento micelial promedio para la cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718	25
5. Resultados del análisis de la producción de hifas aéreas y conidiación para las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.....	26
6. Número de ramificaciones y ancho de hifas principales.....	27
7. Distancias del ápice al primer septo y del primer y segundo septo para las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.....	27
8. Tabla de absorbancias para curva de calibración estándar de N-Acetilglucosamina.	29
9. Resultados de la determinación de N-acetilglucosamina en 0.01 g de micelio liofilizado.	30
10. Promedios de la intensidad de fluorescencia en septos subapicales.	30
11. Composición de la solución 2X para MSC.	51
12. Resultados de determinación de contenido de de N-Acetilglucosamina en 0.01 g de micelio liofilizado de las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.	52

Capítulo 1. Introducción

1.1 Características generales de los hongos

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas con un papel fundamental para el sustento en la vida en la Tierra. Los hongos, representan el segundo grupo polifilético de eucariotas más diverso, solo detrás de los insectos (Raghukumar, 2017). La importancia de los hongos en los ecosistemas, radica en su papel crucial como descomponedores de materia orgánica y recicladores de nutrientes. Los hongos están presentes en diversos ecosistemas, desde terrestres a acuáticos, incluidos aquellos ecosistemas que son difíciles de habitar para otros organismos. Hoy en día, gracias a técnicas de secuenciación masiva, se estima que existen alrededor de 5.1 millones de especies de hongos de las cuales, se han descrito solo alrededor de 70,000 especies (Blackwell, 2011).

La estructura vegetativa (o talo) de los hongos, se desarrolla de distintas formas. Muchos hongos unicelulares producen extensiones de tipo rizoide para colonizar superficies. Otros, como las levaduras, crecen sobre las partículas de la superficie o viven suspendidas en medio acuoso. Los hongos filamentosos se caracterizan por formar una estructura vegetativa compuesta de filamentos microscópicos llamados “hifas”, que se caracterizan por presentar crecimiento apical (Raghukumar, 2017).

1.2 Crecimiento apical

Las hifas fúngicas se extienden y ramifican mediante secreción polarizada la cual, requiere del suministro de vesículas a la punta de la hifa (Riquelme & Bartnicki-García, 2008; Takeshita, 2016). Dichas vesículas, transportan lípidos y proteínas a la zona de crecimiento apical mediante el citoesqueleto de actina y de microtúbulos (Fischer et al., 2008; Riquelme, 2013; Takeshita, 2016). Se ha sugerido que estas vesículas se acumulan, según la especie, en el Spitzkörper (SPK) o en el *Apical Vesicle Crescent* (AVC) antes de salir de la célula mediante exocitosis (Bartnicki-García et. al., 1989; Fisher y Roberson, 2016; Vargas et. al., 1993; Verdín et. al., 2019).

1.3 La pared celular de los hongos

La pared celular, más que una capa de protección para la célula, debería ser considerada como un organelo altamente dinámico que funciona como barrera de protección para la conservación de la integridad celular (Nobel et. al., 2000; Gow et al., 2017). La pared celular, cuenta con una gran plasticidad que asegura la viabilidad celular, protegiendo a los hongos del medio ambiente y factores de estrés externos (Gow et al., 2017; Rubio et al., 2020). Esta pared celular está conformada por glicoproteínas y polisacáridos (principalmente quitina y glucanos), unidos mediante otros componentes de esta matriz, cuya organización y composición se ha determinado como variable en distintas especies (Lipke y Ovalle, 1998; Lesage y Bussey, 2006; Free et al., 2013; Kang et al., 2018).

1.3.1 Producción de quitina en la pared celular de los hongos

La quitina es considerada como el segundo biopolímero más abundante en la tierra, solo después de la celulosa (Rinaudo, 2006; Jiménez-Gómez et al., 2020). Para los hongos, la quitina es el polisacárido estructural más conservado desde tiempos ancestrales (Gow et al., 2017). La quitina no es un componente mayoritario en cuanto a peso seco en la célula (1-2% en levaduras; 10-20% en *Neurospora crassa* y *Aspergillus fumigatus*); sin embargo, tiene un papel crucial en la morfología y la conservación de la integridad celular (Bartnicki-García, 1968; Bowman y Free, 2006; De Novel et al., 2000; Klis, 1994).

La quitina es un homopolímero compuesto por unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas mediante enlaces β -(1,4) glucosídicos que forman moléculas homopoliméricas lineales (Kar et. al., 2019). Adicionalmente, la estabilidad del homopolímero está dada por los puentes de hidrógeno que se forman debido a las interacciones de las moléculas de GlcNAc. Estas interacciones, dan como resultado un entramado de microfibrillas de quitina con una resistencia y rigidez tal que asegura el mantenimiento de la integridad celular (Bowman y Free, 2006; Gow et al., 2017).

La síntesis de quitina se lleva a cabo en la membrana plasmática (MP), en la cual, los hongos como *Saccharomyces cerevisiae* y *N. crassa*, emplean como sustrato unidades de UDP-GlcNAc metabolizada a partir de monómeros de glucosa. Una molécula de UDP-GlcNAc se unirá a otra mediante enlaces β -(1,4) glucosídicos formando dímeros de GlcNAc, que se unirán a otra unidad dimérica mediante el mismo enlace. La catálisis de la síntesis de quitina es llevada a cabo por las quitina sintasas (CHS; Cabib et al., 1983; Durán, 1975; Glaser y Brown, 1957; Roncero et al., 2016). Las CHS son transportadas en su forma inactiva a la MP dentro de microvesículas acarreadoras llamadas quitosomas, que cuentan con un tamaño

de 40-70 nm de diámetro y una membrana de cubierta de 6.5-7 nm de ancho (Bartnicki-García et al., 1978; Bartnicki-García; 2006; Duran, 1975).

1.4 Antecedentes

1.4.1 Las quitina sintasas de *Neurospora crassa*

La síntesis de quitina en la pared celular de los hongos involucra la participación de quitina sintasas (CHS). Éstas, son transportadas a la pared celular en microvesículas llamadas quitosomas (Bartnicki-García, 1987; Bartnicki-García et al., 1978). Las CHS engloban una gran familia de enzimas que se dividen en siete clases (I-VII), de acuerdo con la clasificación con base en las secuencias de aminoácidos (Pacheco-Arjona y Ramírez-Pardo, 2014). Estas siete clases de CHS, a su vez, son agrupadas en tres divisiones conforme a sus dominios proteicos conservados. La división 1 está conformada por CHS de clase I, II y III, las cuales se caracterizan por presentar un dominio C-terminal hidrofóbico y un subdominio catalítico hidrofílico en la región N-terminal. En la división 2, se agrupa a las clases IV, V y VII que incluyen un dominio catalítico conservado citocromo b5. Por último, la división 3 sólo está conformada por CHS de la clase VI, que contienen únicamente un dominio Pfam03142, que define a las proteínas como CHS (Figura 1) (Riquelme y Bartnicki-García, 2008; Fajardo-Somera et al., 2015).

En *N. crassa* se han identificado siete genes, cada uno codificante de una CHS de diferente clase (Borkovich et al., 2004; Riquelme y Bartnicki-García, 2008). Las diferentes CHS presentan funciones distintas durante el desarrollo celular (Figura 2). Los cambios en los fenotipos obtenidos después de la eliminación de los genes *chs-1* y *chs-5* son muy notorios. En Δ *chs-1*, consisten en una reducción drástica del crecimiento vegetativo e hinchamiento a lo largo de las hifas (Yarden et al., 1991). En cuanto a Δ *chs-5*, la eliminación del gen ocasiona una reducción drástica de hifas aéreas y disminución en la producción de conidios maduros (Fajardo-Somera et al., 2015).

En *N. crassa*, la CHS-1 y la CHS-5 colocalizan parcialmente en el centro del SPK y en septos durante el crecimiento vegetativo, mientras que la CHS-1, también se observa en la red de vacuolas tubulares. En cuanto a su función, se ha observado que ambas CHS participan en la formación de septos, en el crecimiento polarizado de las hifas y en la reproducción sexual (Sánchez-León et al., 2011; Fajardo-Somera et al., 2015). Ensayos con brefeldina A, inhibidor del tráfico de retículo endoplasmático (RE) a Golgi, sugirieron que la CHS-1 sigue una ruta de secreción no convencional que además es dependiente del

citoesqueleto de actina (Sánchez-León et al., 2011). Por otro lado, la CHS-5 presenta un dominio motor miosina (DMM) en el extremo N-terminal con tres motivos conservados de unión a ATP, los cuales se presume que son necesarios para su actividad motora dependiente del citoesqueleto de actina (Takeshita et al., 2006; Trietschke et al., 2010; Fajardo-Somera et al., 2015). El DMM de las CHS-5, ha sido asociado con la virulencia y el desarrollo de hongos patógenos en plantas; cuando CHS-5 es eliminada de hongos como *Penicillium digitatum* o *Ustilago maydis*, se retrasa el desarrollo de la enfermedad o incluso, la pérdida de capacidad de infección (Fernandes et al., 2016; Gandía et al., 2019; Trietschke et al., 2010; Weber et al., 2006).

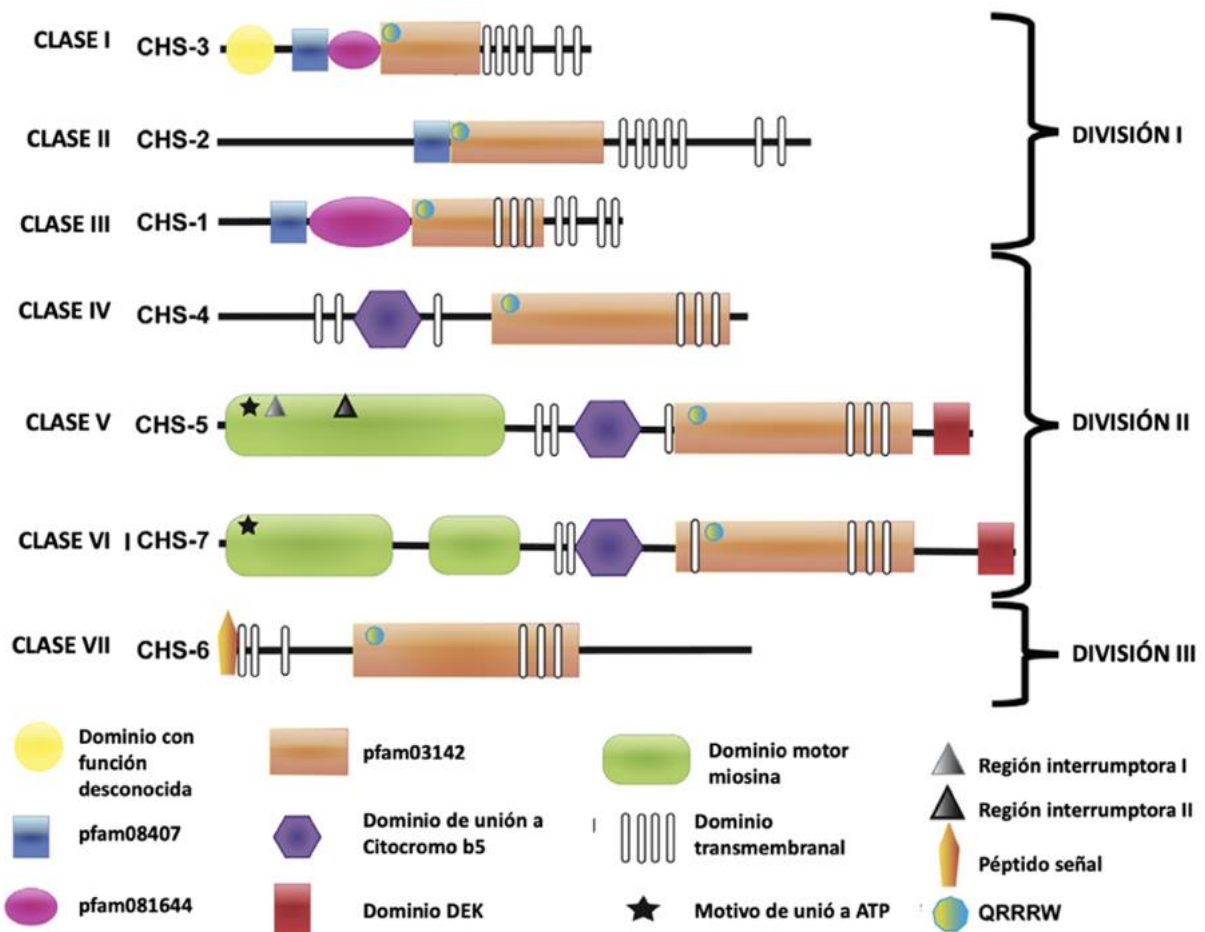


Figura 1. Estructura de las siete clases de quitina sintasas de *Neurospora crassa* (Imagen tomada de Fajardo-Somera et al., 2015).

1.4.2 Biosíntesis de quitina en *Saccharomyces cerevisiae*

Uno de los organismos modelo empleados para el estudio del tráfico y biogénesis de CHS es *S. cerevisiae*, que cuenta con tres tipos de quitina sintasas: Chs1 (clase I), Chs2 (clase II) y Chs3 (clase IV). Las CHS de *S.*

cerevisiae, pertenecen a la familia 2 de las glucosiltransferasas inversas o procesivas (GT-2), que incluye a las sintasas de hialuronato y celulosa (Orlean, 2012). Chs1, Chs2 y Chs3, se sintetizan en el RE y tienen actividad catalítica en la MP. Chs2 y Chs3 participan en la septación y citocinesis de la levadura, aunque su ausencia, no impide que el proceso se lleve a cabo (Cabib, 2004; Cabib y Schmidt, 2003; Orlean, 2012; Shaw et al., 1991). Sin embargo, mutantes triples de las tres quitina sintasas crecen muy lentamente y originan que un tercio de la población de células no sean viables (Orlean, 2012; Schmidt, 2004). Se ha determinado que la actividad de las CHS en *S. cerevisiae*, requiere de proteínas auxiliares.

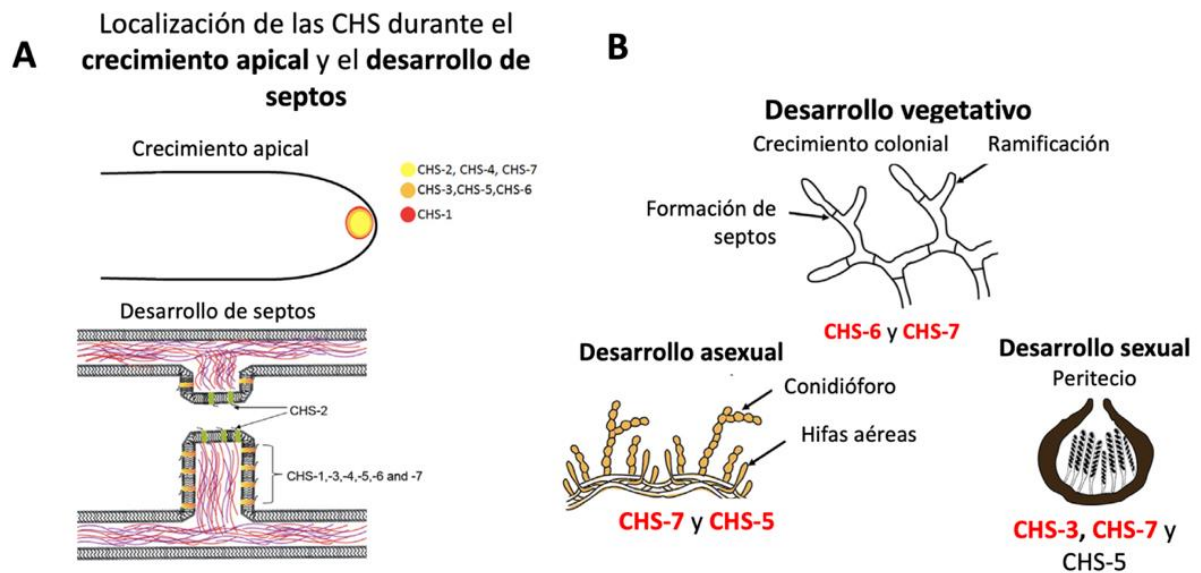


Figura 2. Localización y participación de las CHS en el crecimiento de *Neurospora crassa*. (A) Distribución de las quitina sintasas en el Spitzkörper y septos durante el crecimiento de *N. crassa*. (B) Participación de las quitina sintasas. Imágenes tomadas de Fajardo-Somera et al., 2015.

La Chs3 es sintetizada en el RE y es responsable de la producción del 90 al 95% de quitina en la célula (Pammer et al., 1992; Roncero et al., 1988). Para su salida de RE, Chs3 es palmitoada por Pfm4 en dos de sus sitios catalíticos para su posterior asociación con Chs7 (Lam et al., 2006; Montoro et al., 2011; Trilla et al., 1999; Orlean, 2012). La cepa $\Delta CHS7$, muestra una alteración en la producción de quitina casi igual que $\Delta CHS3$. Además, la delección de *CHS7* provoca la acumulación de Chs3 en el RE (Orlean, 2012; Trilla et al., 1999). Por ello, Chs7 es considerada chaperona de Chs3. En un principio, fue caracterizada como residente del RE y por su papel en la salida de la Chs3 hacia el aparato de Golgi (Trilla et al., 1999). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la Chs7 no se acumula en el RE tras la salida de la Chs3, sino que forma un complejo con la Chs3 que contribuye a su salida del RE y su plegamiento en la MP (Dharwada et al., 2018). En otro estudio donde se analizó la función de la proteína Chs7 de *Candida albicans*, ortóloga a

la Chs7 de *S. cerevisiae*, se observaron niveles reducidos de quitina, alteraciones morfológicas y virulencia atenuada al realizar mutantes de supresión del gen *CHS7* (Sanz et al., 2005; Sudoh et al., 1999).

Una vez en Trans-Golgi, Chs3 viaja a la MP gracias a su asociación con las proteínas periféricas del Aparato de Golgi Chs5 y Chs6, y los homólogos de Chs6 Bch1, Bch2 y Bud7 (Figura 3). Chs5, Chs6 y sus homólogos, forman complejos exoméricos que ayudan a Chs3 a viajar a MP y llevar a cabo la síntesis de quitina (Sanchatjate y Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Finalmente, Chs3 interactúa con Chs4 para ser activada y ubicada en los sitios de formación del anillo de septina durante el desarrollo de la levadura (Orlean, 2012; Reyes et al., 2007; Sanz et al., 2002). Bni4 también interviene en la localización de Chs3 en los sitios de gemación, pero no es indispensable para su actividad (Orlean, 2012; Sanz et al., 2004).

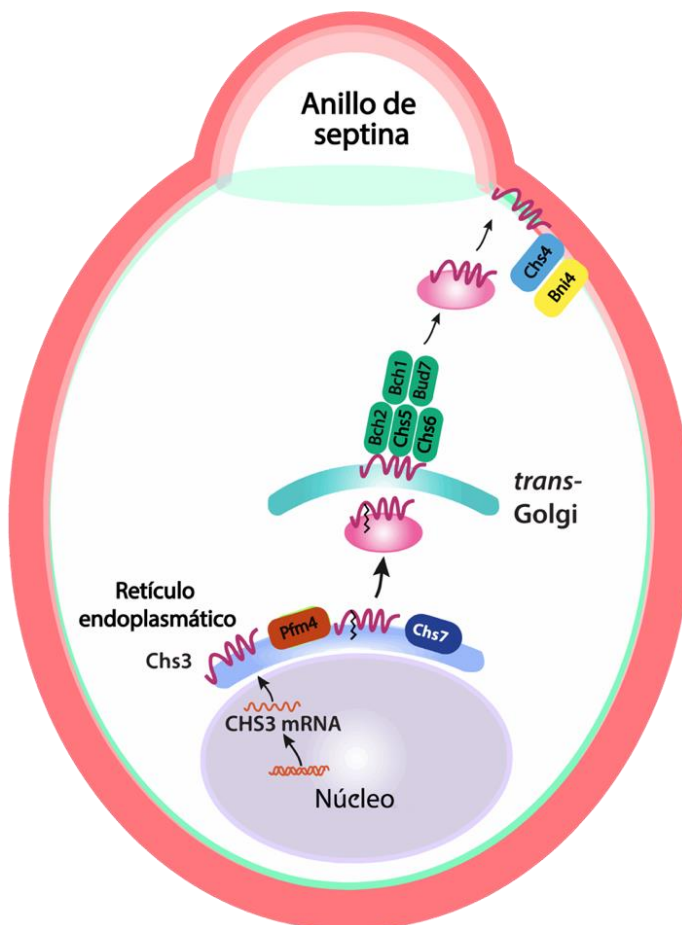


Figura 3. Esquema de salida de Chs3 del retículo endoplasmático en *Saccharomyces cerevisiae* (Tomado y modificado de Orlean, 2012; Rico-Ramírez, 2018).

1.4.3 Biogénesis y tráfico de quitina sintasas en *Neurospora crassa*

En diversos intentos para dilucidar la biogénesis y el transporte de CHS a la región apical y MP, se han detectado proteínas auxiliares que funcionan como chaperonas para el tráfico vesicular de quitosomas (Munro, 2013). En *N. crassa*, se identificaron proteínas que interactuaban con las CHS-1, CHS-4, y CHS-5 mediante ensayos de inmunoprecipitación (Fajardo-Somera et al., 2015). Los ensayos de inmunoprecipitación y LC/MS-MS, se realizaron por separado para cada CHS. Se detectaron 37, 21, y 23 proteínas putativas que interactúan con la CHS-1, CHS-4, y CHS-5, respectivamente. Por ello, se sugiere que es muy probable que los mecanismos de biogénesis y transporte de quitosomas acarreadores de CHS-1, CHS-4, y CHS-5 dentro de la célula, sean dependientes de la interacción con una maquinaria proteica que aún no está caracterizada.

Anteriormente, se describió una proteína chaperona ortóloga a la Chs4 de *S. cerevisiae* en *N. crassa*: la CSE-7. Ésta se localiza en el RE y vacuolas tubulares, y tiene un papel importante en la secreción y biogénesis de la CHS-4, una quitina sintasa de clase IV (Rico-Ramírez et al., 2018). La cepa $\Delta cse-7$ de *N. crassa* no presenta cambios importantes en su fenotipo. Por otro lado, una cepa de *Trichoderma atroviride* cepa $\Delta cse-7$ mostró cambios en la morfología colonial, presentando un micelio con ramificaciones abundantes, apiladas unas sobre otras. Además, *T. atroviride* $\Delta cse-7$ mostró una reducción del $83.3\% \pm 7.7$ en la producción de quitina en la pared celular (Kappel et al., 2020).

Se ha identificado otra proteína ortóloga a CSE-7 en *N. crassa*: la proteína hipotética CSE-8, que pudiera jugar un papel importante en la secreción de CHS del RE a MP, y por ende, colaborar en la síntesis de quitina en la pared celular de *N. crassa*. Por ello, en este estudio se pretende identificar la función de la CSE-8 (“chitin synthase export chaperone 8”) en el tráfico vesicular de quitosomas durante el crecimiento polarizado.

Para identificar la función de CSE-8 en el transporte de CHS a los sitios de crecimiento y formación de septos de la hifa, se seleccionaron la CHS-1 (Clase III) y CHS-5 (Clase V) ya que son exclusivas de hongos filamentosos. Dado que la función de CSE-7 como receptor cargo de CHS-4 está confirmada, se pretende explorar los posibles mecanismos de transporte subcelular para quitina sintasas de otras clases. Las cepas de *N. crassa* carentes de *chs-1* o de *chs-5*, a diferencia de otras CHS, presentan fenotipos significativamente alterados durante el desarrollo vegetativo, sexual y asexual de *N. crassa*, por lo que la interacción de estas CHS con CSE-8 podría ser evaluada fenotípicamente.

1.5 Justificación

El papel de CSE-8 en el tráfico y biogénesis de quitosomas en *N. crassa* es desconocido. Sin embargo, estudios previos sugieren que podría representar un elemento de la maquinaria que participa en el tráfico de alguna de las otras quitina sintetasas, cuya ruta secretora no se ha descrito. Por ello, en este estudio se pretende analizar la función de CSE-8 en hifas de *N. crassa* y su papel en la ruta secretora de quitina sintetasas de clase III (CHS-1) y V (CHS-5). Este estudio, podría incorporar otro elemento a la maquinaria de secreción de quitosomas en hongos filamentosos.

1.6 Hipótesis

La proteína codificada por el gen con el código de acceso CSE-8, es una proteína de retículo endoplasmático que participa como receptor cargo de las quitinas sintetasas CHS-1 y/o CHS-5, para su salida del retículo endoplasmático (RE) hacia el Spitzenkörper (SPK) y septos.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Revelar la función de la proteína hipotética CSE-8 (NCU01814) en la biosíntesis y localización de quitina sintetasas en hifas de *Neurospora crassa*.

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar si la ausencia del gen de *cse-8* (NCU01814) en el genoma de *N. crassa*, afecta a su desarrollo vegetativo.
- Determinar la localización subcelular de CSE-8 mediante su etiquetado endógeno con GFP.
- Analizar la función de CSE-8 en la salida de las quitina sintetasas CHS-1 y CHS-5 del RE en hifas de *Neurospora crassa*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis bioinformáticos

Para la identificación de dominios conservados y matriz de identidad de Chs7 (YHR142W), CSE-7 (NCU05720) y CSE-8 (NCU01814), se empleó la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). El alineamiento de CSE-8 y CSE-7, se llevó a cabo en BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este alineamiento, fue ingresado en HMMsearch (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>) para la obtención de secuencias ortólogas a las proteínas CSE. El alineamiento resultante de este análisis, realizado con Clustal Omega v. 2.0.1., se empleó para realizar el un análisis de filogenia por el método de Neighbor-Joining en Jalview v. 2.11.2.5, empleando una matriz BLOSUM62. El árbol filogenético obtenido se editó en iTOL v6 (<https://itol.embl.de/tree/1589766147326311667424835#>). Para la obtención de las predicciones de la estructura protéica de CSE-8, se empleó AlphaFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) e I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). Los análisis de docking molecular, se realizaron en la plataforma ClusPro (Kozakov et al., 2017; <https://cluspro.bu.edu/home.php>). Las predicciones protéicas de las estructuras y posibles interacciones entre las proteínas analizadas *in silico*, fueron analizadas y editadas en PyMOL v2.5.4.

2.2 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas y vectores empleados en este estudio se enlistan en la tabla 1.

2.2.1 Medios de cultivo para *Neurospora crassa*

Las cepas de *N. crassa* se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de Medio Mínimo de Vogel (MMV) adicionado con 1.5% de sacarosa y agar al 1% (Vogel, 1956). Para promover las condiciones de crecimiento, los matraces inoculados se incubaron a una temperatura de 30°C (Davis, 2000). Los conidios transformados se recuperaron con Solución de Recuperación (Sales de Vogel 50X y extracto de levadura al 2%) y después de la incubación, se inocularon en medio FGS suplementado con higromicina (0.5 mg/mL) con o sin histidina (0.25 mg/mL), según la cepa parental empleada. El medio FGS está compuesto de sales de Vogel al 2%, agar al 1% y solución FGS al 10% (fructosa 0.5%, glucosa 0.5%, y

sorbosa 20%). Los componentes del medio fueron previamente esterilizados por filtración. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min. Se empleó Medio Sintético de cruzas (MSC) compuesto por solución de MSC 2X al 50%, sacarosa al 2%, y agar al 1.5% (Westergaard y Mitchell, 1947) (Ver Anexo A).

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* y *Neurospora crassa* y vectores empleados.

<i>Escherichia coli</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 α TM	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ ,mk ⁺) phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Invitrogen [®]
<i>Neurospora crassa</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
FGSC #988	<i>mat a</i> ; <i>tipo silvestre</i>	FGSC
FGSC #9013	<i>mat A</i> ; <i>tipo silvestre</i>	FGSC
FGSC #9717	<i>his-3::Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC
FGSC #9718	<i>Δmus-51::bar⁺</i>	FGSC
FGSC #13138	<i>Δcse-8</i> ; <i>mat A</i> ; <i>hyg^r</i>	FGSC
SMRP287	<i>Pchs-5::chs-5::gfp</i> ; <i>hph</i> ; <i>mat a</i>	Fajardo-Somera et. al., 2015
FGSC #13408	<i>Pchs-1::chs-1::gfp</i> ; <i>hph</i> ; <i>mat a</i>	Sánchez-León et. al., 2011
SMRP529	<i>Pcse-8::gfp::hph</i> ; <i>Δmus-51::bar⁺</i>	Este estudio
SMRP530	<i>Pchs-1::sgfp::hph</i> ; <i>Δcse-8</i> , <i>hyg^r</i> , <i>Δmus-51::bar⁺</i>	Este estudio
SMRP531	<i>Pchs-5::sgfp::hph</i> ; <i>Δcse-8</i> , <i>hyg^r</i> , <i>Δmus-51::bar⁺</i>	Este estudio
Vectores		
Nombre	Genotipo	
pRS416	<i>10xGly::gfp::hph</i>	Honda y Selker, 2009

2.2.2 Recolección de conidios de *Neurospora crassa*

Para extraer conidios de las cepas utilizadas en este estudio, se tomaron 20 μ L del stock de conidios de cada cepa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MMV al 1.5% de sacarosa adicionado con higromicina o histidina, según el caso. Los matraces se incubaron 48 h a 30°C en obscuridad y posteriormente, fueron expuestos a la luz por 48 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de

conidiación, se añadieron 50 mL de agua destilada estéril al matraz y con agitación constante, se desprendió el micelio de las paredes del matraz. La suspensión de conidios se filtró con una tela estéril y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min en un tubo Falcon de 50 mL. Después, se retiró el agua destilada y los conidios obtenidos se lavaron de nuevo con 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión de conidios se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 5 min. Por último, se retiró el sobrenadante y la pastilla de conidios se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M. Los conidios resuspendidos se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL para su conservación a -20°C.

2.2.3 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Para la replicación del plásmido pRS416 se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α TM, que se creció en medio de cultivo Luria-Bertani (LB). Este medio se preparó añadiendo 15 g de agar bacteriológico, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 1 g de NaCl y ampicilina (500 mg por cada litro de medio preparado). Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

2.3 Caracterización de la cepa Δ cse-8

2.3.1 Confirmación de la delección del gen NCU01814

Para confirmar la eliminación del gen *cse-8*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con oligonucleótidos que amplificaron la región ORF del gen *cse-8* empleando como templado el ADN genómico de la cepa Δ cse-8. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T100TM configurado como se indica a continuación: 95°C por 1 min para la desnaturalización de la doble cadena de ADN; 30 ciclos de 30 s a 98°C, 30 ciclos a 58°C por 1 min como temperatura de alineamiento para los oligonucleótidos; 30 ciclos a 72°C para la extensión de la cadena con GoTaq Polymerase y extensión final a 72°C por 5 min.

2.3.2 Análisis de fenotipos de $\Delta cse-8$

2.3.2.1 Análisis de morfología colonial y crecimiento radial

Se analizaron las diferencias entre las cepas $\Delta cse-8$ (FGSC #13138), parental (FGSC #9718), y tipo silvestre de *N. crassa* (FGSC #988) para identificar fenotipos del micelio y de las hifas. Para llevar a cabo el análisis de hifas aéreas, se inocularon conidios en una concentración de 5×10^6 conidios/mL en tubos de ensayo con 1 mL de agar MMV con 1.5% de sacarosa y se incubaron a 30°C durante 14 h en condiciones de obscuridad. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente y se observó el crecimiento por 8 h.

Para determinar la tasa de crecimiento hifal, se realizó un ensayo de crecimiento radial. En este ensayo, se inoculó un trozo de agar en el extremo de una placa Petri de 8 cm de diámetro con 15 mL de agar MMV con 1.5% de sacarosa. Posteriormente, se midió el crecimiento hifal cada 2 h por 10 h. Una vez terminado el ensayo, el crecimiento radial se determinó empleando el programa Image J. Por otro lado, la morfología hifal y septos se analizaron en un microscopio estereoscópico Olympus SZX12, empleando una cámara AxioCam Erc 5s de Zeiss para la toma de las imágenes con una amplificación de 32X empleando el programa Image J.

2.3.2.2 Análisis de ramificaciones y septos

Se realizó un conteo de las ramificaciones y septos de 25 y 17 hifas principales, respectivamente, de la cepa $\Delta cse-8$, silvestre y parental de *N. crassa*. Para ello, se inoculó un bloque de agar de las cepas mencionadas anteriormente, en el extremo de una placa Petri con MMV (1.5% sacarosa y 3% de agar). Las placas se incubaron durante 14 h a 30°C y se realizó el conteo empleando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12, empleando una cámara AxioCam Erc 5s de Zeiss para la toma de las imágenes. Para el análisis de ramificaciones, se empleó el objetivo 32 X y se realizó el conteo en una distancia de 500 μm desde el ápice hasta la zona subapical. Para el conteo de septos, se empleó el objetivo 50 X y se realizó el conteo en una distancia de 500 μm en la región subapical de la hifa. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Image J.

2.3.2.3 Determinación de quitina por cuantificación de N-acetilglucosamina

Para comparar el contenido de quitina total en la célula, se cuantificó la N-acetilglucosamina en 0.01 g de micelio liofilizado de las cepas silvestre, parental y $\Delta cse-8$ (n=8) (Morgan y Elson, 1934; Fajardo-Somera, 2015). A los 10 mg de micelio liofilizado, colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 1 mL de HCl 6 N. Las muestras se incubaron a 100°C durante 20 h. Posteriormente, se evaporó el HCl en un termoblock a 100°C dentro de una campana de extracción, proceso que duró aproximadamente 3 h. La pastilla de micelio seca, se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se centrifugó a 11,000 rpm por 20 min. Se tomaron 100 μ L de sobrenadante de cada muestra y se mezcló 100 μ L de solución 1 (1.6 g Na_2CO_3 y 400 μ L de acetona en 10 mL agua destilada estéril). Al mismo tiempo, se preparó una solución madre de GlcNAc (10 mg de N-acetilglucosamina en 10 mL de agua destilada), para realizar una curva de calibración con diferentes concentraciones de GlcNAc, indicadas en la tabla 3. Se usaron 100 μ L de agua destilada como control, y se añadieron 100 μ L de la solución 1. Cada concentración del stock se preparó por triplicado. Todas las muestras (de micelio digerido y curva de calibración), se incubaron 20 min a 100°C; pasado el tiempo de incubación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 700 μ L de etanol al 95% y 100 μ L de solución 2 (260 mg de p-dimetilbenzaldehído en 5 mL de etanol al 100% y 5 mL de HCl 12 N). Los tubos se dejaron incubando 1 h a temperatura ambiente y, por último, se midió la absorbancia de cada uno por triplicado a 520 nm.

Tabla 2. Curva de calibración de N-acetilglucosamina.

Concentración de N-acetilglucosamina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen Stock N-acetilglucosamina (μL)	H ₂ O (μL)
0	0	100
50	5	95
100	10	90
150	15	85
200	20	80
250	25	75
300	30	70

2.3.2.4 Cruzas genéticas

Se emplearon dos placas Petri con MSC para crecer los conidios obtenidos de la cepa $\Delta cse-8$, los cuales fueron incubados a 30°C por 48 h. Al mismo tiempo, los conidios de las cepas SMRP287 y SMRP55 suspendidos sorbitol 1 M, se lavaron con agua desionizada estéril para ser centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida, que fue resuspendida en 1 mL de MMV. Una vez pasado el tiempo de incubación de la cepa $\Delta cse-8$, los conidios resuspendidos en MMV, se esparcieron en la placa y fueron incubados a temperatura ambiente en obscuridad durante 15 días o hasta observar la presencia de peritecios maduros. Las ascosporas obtenidas, fueron sometidas a choque térmico (60°C) durante una hora y después, se sembraron en agar MMV suplementado con higromicina (0.5 mg/mL), y se incubaron a 28°C hasta observar ascosporas germinadas. Las ascosporas se recolectaron en tubos con 1 mL de MMV adicionado con higromicina y fueron seleccionadas aquellas que presentaron resistencia al antibiótico. Las cepas seleccionadas, se analizaron mediante microscopía confocal de barrido láser. Se seleccionó la cepa que presentaba la construcción completa de *chs-5::gfp* y *chs-1::gfp* por análisis de PCR. También se comprobó molecularmente la ausencia de *cse-8* en las cepas seleccionadas.

2.4 Métodos genéticos y moleculares

2.4.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos empleando el marco abierto de lectura (ORF) del gen *cse-8* (chitin synthase export chaperone 8), su región promotora y extremo UTR 3'. Se empleó la base de datos FungiDB: Fungal and Oomycete Informatics Resources (<https://fungidb.org/fungidb/app>) para identificar el ORF. Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos para el etiquetado de CSE-8 con GFP empleando la secuencia nucleotídica del vector pRS416 (Honda & Selker, 2009). Los oligonucleótidos fueron diseñados en el software ApE (A Plasmid Editor), y analizados en OligoAnalyzer Tool del IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (Tabla 3).

2.4.2 Preparación de células quimio-competentes de *E. coli*

Para la preparación de células quimio-competentes, se empleó el protocolo de Sambrook y Russell (2001) con algunas modificaciones. Primero, se inocularon células de *E. coli* de la cepa DH5 α TM en medio líquido

LB y se incubaron durante 14 h a 37°C con agitación constante de 225 rpm. Todas las soluciones y material estéril empleados en este procedimiento fueron previamente enfriados a 4 y -20°C, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon 5 mL de cultivo en 100 mL de medio líquido LB. El cultivo fue incubado a 37°C a 225 rpm hasta obtener una densidad óptica de A600=0.3-0.4, A550= 0.45-0.5. Cuando se alcanzó la absorbancia esperada, el cultivo se transfirió a tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla de bacterias se resuspendió en 10 mL de solución CaCl₂ 80 mM – MgCl₂ 50 mM, agitando suavemente en hielo durante 30 min. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 2500 rpm y 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y la pastilla de células, se resuspendió en 1 mL de solución de CaCl₂ 100 mM en glicerol al 20%. Finalmente, el cultivo fue transferido a tubos Eppendorf® de 1.5 mL en alícuotas de 50 µL para congelarse en nitrógeno líquido y conservarse a -80°C.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en el trabajo experimental.

Código Lab Riquelme	Nombre	Secuencia
225	GFP-F/P6	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
226	GFP-R/P6	CTTGACAGCTCGTCCATGC
260	hph SMF	AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
261	hph SMR	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC
298	loxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATA
299	10xGly-F	GGCGGAGGCGGGCGGAGGCGGAGGC
386	chs-5 P1 seq F	CTGACAACACTGCTTCTTAAGTTC
820	FWgfpGlypex26ORF	GGGCGGCGGAGGCGGGCGGAGGCGGCATGGCTTCCAATCTCGATTCATCG
821	RVpex26ORF	CTCCGCTTCTTCTGATCCTCC
850	P1-cse8 FW	CCTCCATATTTACAGGACTTCTGTCTG
851	P2-cse8 RV	GGCCAATCGTCTTCGGTAATGCTG
855	cse-8/Gly-FW	ATGGGCTCAACACAATTTGGCAACTTTTCATG
856	cse-8/Gly-RV	CCTCCGCTCCGCTCCGCGCCTCCGCTGGGAAGTGGTTAGGCGGAACC
857	FW-lox/3'cse-8	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGAAGGGCCAGTACAGGTTGAAGTCTCG
858	RV-lox/3'cse-8	GGGCACGACAAATCGGATTTATGGG
885	FW_XbaI_ORFcse-8	GCTCTAGAATGGGCTCAACACAATTTGGC
886	RV_ORFcse-8_Pacl	CCTTAATTAATGGGAAGTGGTTAGGCGG
891	chs-1_ORF	CGTCCGCATGTTCTTCTTCCA

2.4.3 Clonación del plásmido pRS416

Para la propagación del plásmido pRS416, se añadieron 50 ng del plásmido a 100 μ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α TM mantenidas en hielo. La mezcla de células y ADN se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42°C durante 2 min empleando un termoblock digital Thermo ScientificTM. Después, las células se incubaron en hielo durante 2 min y se les añadió 0.9 ml de medio líquido LB precalentado a 37°C. El cultivo se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante de 225 rpm. Para la obtención de las células transformadas, el cultivo se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y en seguida, se desechó el sobrenadante. Por último, las células se inocularon en placas Petri con agar LB adicionado con ampicilina para la selección de colonias transformadas y se incubaron a 37°C durante 14 h.

2.4.4 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para obtener ADN plasmídico, se seleccionó una de las colonias transformadas de *E. coli* y se incubó por 14 h en medio LB líquido. Posteriormente, se tomó 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 8,000 rpm durante 2 min para precipitar las células bacterianas. Para la extracción de ADN, se empleó el QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (50) de Qiagen[®], siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

2.4.5 Extracción de ADN genómico de *Neurospora crassa*

Para obtener micelio de las cepas de las que se extraería ADN genómico, se inocularon de 50 a 100 μ L de conidios en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MMV líquido. Los matraces se incubaron a 30°C en condiciones de obscuridad. Cuando se observó un crecimiento suficiente de micelio (3 a 5 días después de la inoculación), se realizó una filtración al vacío para retirar el medio y obtener el micelio. El micelio se secó con toallas de papel y se añadió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL para liofilizarlo en nitrógeno líquido. Posteriormente, se mantuvo por 24 h en un liofilizador FreeZone 2.5 L de Labconco[®] para obtener el micelio completamente libre de humedad. Pasado el tiempo de liofilización, el micelio se pulverizó en un mortero con pistilo estéril. Para la extracción de ADN genómico, se empleó el DNeasy[®] Plant Mini Kit de Qiagen[®], siguiendo el protocolo del fabricante.

2.4.6 Electroforesis en gel de agarosa

Para la interpretación de resultados y purificación de los fragmentos de ADN necesarios, se empleó un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1%. El gel de agarosa se colocó en una cámara de electroforesis, situando el extremo con los pozos del lado negativo de la cámara. Después, se añadió buffer TAE 1X a la cámara hasta cubrir por completo el gel. Se usaron alícuotas de 1 a 25 μ L de cada muestra de ADN, se añadió Loading Dye 6X y se añadieron a cada pozo. Todas las electroforesis se llevaron a cabo a 75 mV por 55 min. El gel obtenido se analizó empleando un transiluminador UV Bio-Rad™ UNIVERSAL HOOD II.

2.4.7 Purificación de ADN en gel de agarosa

Para purificar los productos de las amplificaciones obtenidas por PCR, se empleó el QIAquick® Gel Extraction Kit (50) de Qiagen®. El primer paso, consistió en cortar las bandas obtenidas del gel de agarosa una vez terminada la electroforesis. El gel con ADN, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se pesó el contenido del mismo en una balanza analítica. Una vez conocido el peso, se añadieron tres volúmenes de buffer QC y se incubó por 10 min a 55°C para disolver la agarosa. Posteriormente, se añadió un volumen de isopropanol a la mezcla y se dejó reposar por 4 min a -20°C. La mezcla se transfirió a una columna QIAquick y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min. En este paso, se desecha la mezcla que contiene los restos de agarosa y el ADN se queda retenido en la membrana de la columna. Para extraer el ADN de la membrana, se añadieron 35 μ L de Buffer EB. La columna se colocó en un tubo Eppendorf estéril y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. La concentración en ng/ μ L de ADN obtenido, se determinó con el equipo NanodropLite Spectrophotometer de Thermo Scientific™.

2.4.8 Etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP

El etiquetado endógeno de la proteína CSE-8 con GFP, se llevó a cabo mediante el método de Split Marker (Fu et al., 2006; Goswami, 2012). Para llevarlo a cabo, se emplearon los oligonucleótidos *cse-8*/Gly-FW y *cse-8*/Gly-RV para realizar una amplificación directa en el ORF del gen *cse-8* y obtener el primer fragmento (F1). Los oligonucleótidos FW-lox/3'*cse-8* y RV-lox/3'*cse-8*, fueron usados para amplificar la región 3' UTR del gen *cse-8* (F2). Por último, se utilizó el plásmido pRS416 (Honda & Selker, 2009), para amplificar el gen de la proteína verde fluorescente GFP que está unido al gen *hph* utilizando los oligonucleótidos loxP-R y 10xGly-F (F3). Posteriormente, se realizó una PCR de fusión para ligar F1 con F3 y una segunda PCR de

fusión para la ligación de F2 y F3. De esta manera, se obtuvieron los fragmentos F4 y F5 (Figura 3), los cuales se introdujeron en las cepas FGSC #9718 por electroporación.

2.4.9 Transformación de *Neurospora crassa* por electroporación

Para la transformación de las cepas FGSC #9717 y FGSC #9718, los conidios se ajustaron a una concentración de 4×10^9 conidios/mL. Si los conidios estuvieron resguardados a -20°C antes de la transformación, éstos se lavaron por triplicado con 1 mL de sorbitol 1 M. Tras la obtención de la suspensión final de conidios, se realizó una mezcla con 60 μL de conidios (4×10^9 conidios/mL) y 0.5 ng de cada brazo (F4 y F5), de la construcción molecular (Figura 3), en un tubo Eppendorf estéril. La suspensión de conidios y ADN, se mantuvo en hielo hasta ser añadida a la celda de electroporación. Antes de usarse, las celdas se conservaron en hielo por 10 min. Posteriormente, se añadió la suspensión de conidios y ADN a una celda de electroporación. Las celdas con la suspensión se dejaron reposar por 10 min en hielo. Para llevar a cabo la electroporación de conidios, se empleó el Electroporador Biorad® Gene Pulser y se ajustó a las siguientes condiciones: resistencia: 600 Ω ; voltaje: 1.5 kV; capacitancia: 25 μF (Margolin et al., 1997). Se añadió 1 mL de sorbitol frío a cada celda inmediatamente después de sacarla del Electroporador. Los conidios electroporados suspendidos en 1 mL de sorbitol, se añadieron a un tubo Falcon de 15 mL con 1 mL de solución de recuperación. Los tubos se incubaron por 3 h a 30°C en un hibridizador UVP HL-2000 HybriLinker. Finalmente, se sembraron 350 μL en una placa Petri con medio FGS suplementado con higromicina (50 mg/L) e histidina (25 mg/mL) para la cepa FGSC #9718. Las placas se incubaron 4 días para la selección de colonias transformadas de *N. crassa*. Una vez obtenidas las colonias transformadas, se seleccionaron 30 colonias, las cuales recolectaron en tubos con MMV 1.5% de sacarosa, y se dejaron a temperatura ambiente de 2 a 3 días hasta su conidiación. Una vez obtenidos, los conidios se sembraron en placas de MMV 1.5% para el análisis de fluorescencia por microscopía confocal.

2.5 Microscopía confocal

El análisis de fenotipos se realizó mediante Microscopía Confocal de Barrido Láser. Se empleó blanco de calcoflúor como marcador de la pared celular. Por otro lado, se analizaron las cepas transformadas que contienen el cassette *cse-8::gfp* y la progenie de las cruces genéticas entre las cepas $\Delta cse-8$ mat A con SMRP55 mat *a*, y $\Delta cse-8$ mat A con SMRP285 mat *a*, que expresan *chs-5::gfp* y *chs-1::gfp*, respectivamente, con la cepa $\Delta cse-8$. Para ello, se empleó un microscopio invertido Olympus Fluoview FV1000 equipado con un láser para excitar la proteína GFP y DAPI (filtro de excitación: 480; filtro de emisión: 505-525; filtro de

excitación: 405; filtro de emisión: 358-460). Todas las muestras se observaron empleando el método de agar invertido (Hickey et al., 2004). Las imágenes se obtuvieron con el software FLUOVIEW FV1000 4.0.2.9 y se analizaron con el software Fiji Image J versión 2.1.0/1.53c. Para el análisis de intensidad de fluorescencia de blanco de calcoflúor en septos, se utilizó un área de 67 píxeles para todas las mediciones, invirtiendo los colores de la imagen y eliminando el ruido de fondo con los parámetros de contraste y brillo.

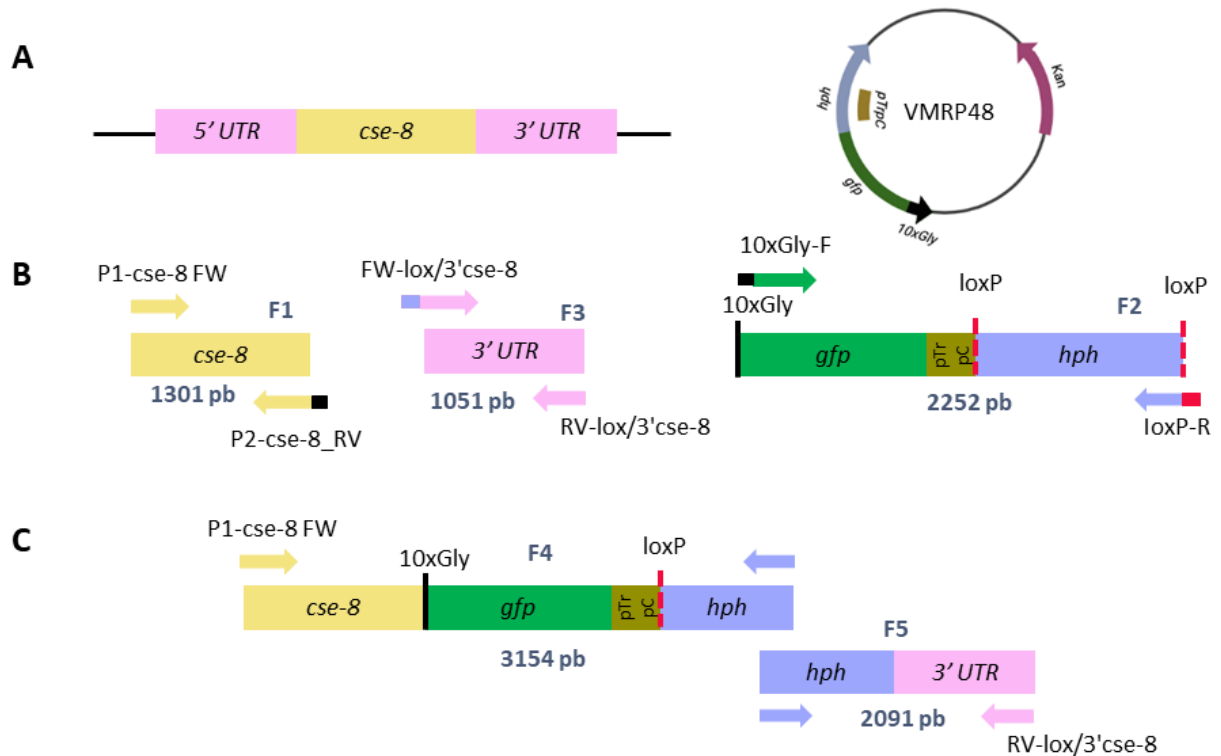


Figura 3. Estrategia de etiquetado de CSE-8 con GFP por el método de Split Marker. (A) ADN genómico (*cse-8*) y plasmídico (VMRP48), que se emplearon como templado para las reacciones de PCR. (B) Fragmentos obtenidos de PCR. (C) Brazo izquierdo (F4) y brazo derecho (F5), productos de la PCR fusión de F1-F2 y F2-F3.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis bioinformáticos

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *cse-8* (NCU01814), se obtuvo de la base de datos de FungiDB (Fungal and Oomycete Informatics Resources: <https://fungidb.org/fungidb/app>). El gen NCU01814, se encuentra en el cromosoma II y consta de 2514 pb, de las cuales, 1301 pb corresponden al marco abierto de lectura (ORF), conformado por 6 exones y 7 intrones; el ORF de *cse-8* codifica una proteína de 299 aminoácidos y un peso molecular de 806.41 kD. Para identificar los posibles dominios y regiones transmembranales del producto codificado por *cse-8*, se empleó la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). El análisis, que analiza la secuencia de 299 aminoácidos en formato FASTA, predijo que la proteína hipotética CSE-8 posee 7 regiones transmembranales y 4 dominios citoplasmáticos, al igual que la chaperona Chs7 de *S. cerevisiae* (Figura 4). Esto nos indica que ambas proteínas poseen una estructura similar. En cuanto a la clasificación de la familia de proteínas a la que pertenece la proteína codificada por la secuencia NCU01814, la base de datos InterPro la clasificó como un miembro de la familia IPR022057, que agrupa a proteínas de una longitud de 288 a 332 aminoácidos y constituyen el dominio catalítico de la quitina sintasa III (Chs3) de *S. cerevisiae*. Del mismo modo, la base de datos Conserved Database Domain del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>), la clasificó como una proteína de la familia con el código pfam12271, que agrupa a las proteínas con dominio catalítico Chs3.

Por otro lado, se realizó un análisis con BLASTp en la base de datos UNIPROT, donde se observó que ambas secuencias comparten un porcentaje de identidad del 25.42%. Cabe resaltar el papel de la primera chaperona identificada en *N. crassa*, la CSE-7, que también cuenta con 7 regiones transmembranales y 4 dominios citoplasmáticos. Además, a diferencia de CSE-8, CSE-7 presenta un mayor porcentaje de identidad con Chs7 (43.42%). En cuanto a CSE-7 y CSE-8, éstas conservan un porcentaje de identidad de 31.12%. Considerando estos datos, podríamos concluir que CSE-8 y CSE-7 son proteínas filogenéticamente relacionadas. Cabe mencionar que dos proteínas se pueden considerar homólogas con base en un porcentaje $\geq 30\%$ de identidad entre ellas (Pearson, 2013). Sin embargo, pueden existir proteínas homólogas con menos porcentaje de identidad. El alineamiento de las secuencias proteicas de CSE-7 y CSE-8, se realizó con modelos ocultos de Markov (MHM) (Sievers y Higgins, 2014). Con el alineamiento de CSE-7 y CSE-8, se obtuvo evidencia de que ambas proteínas tienen 7 dominios conservados entre ellas (Figura 4A). Por otro lado, el modelado de las estructuras de CSE-8 se llevó a cabo empleando las

plataformas en línea de AlphaFold (4C) e I-TASSER (4D). Se emplearon ambas plataformas ya que I-TASSER, realiza el modelado con base a estructuras cristalográficas y predicciones ya reportadas en PDB (Roy et al., 2010). Por otro lado, AlphaFold realiza el modelado a partir de un algoritmo de inteligencia artificial, que no se limita al conocimiento de estructuras modeladas anteriormente (Jumper et al., 2021), lo que puede dar como resultado estructuras más confiables. El resultado de ambos modelados, nos mostró 7 dominios en forma de hélice en ambas estructuras. Estos análisis refuerzan la idea de la posible similitud funcional que podría tener CSE-8 en comparación con CSE-7.

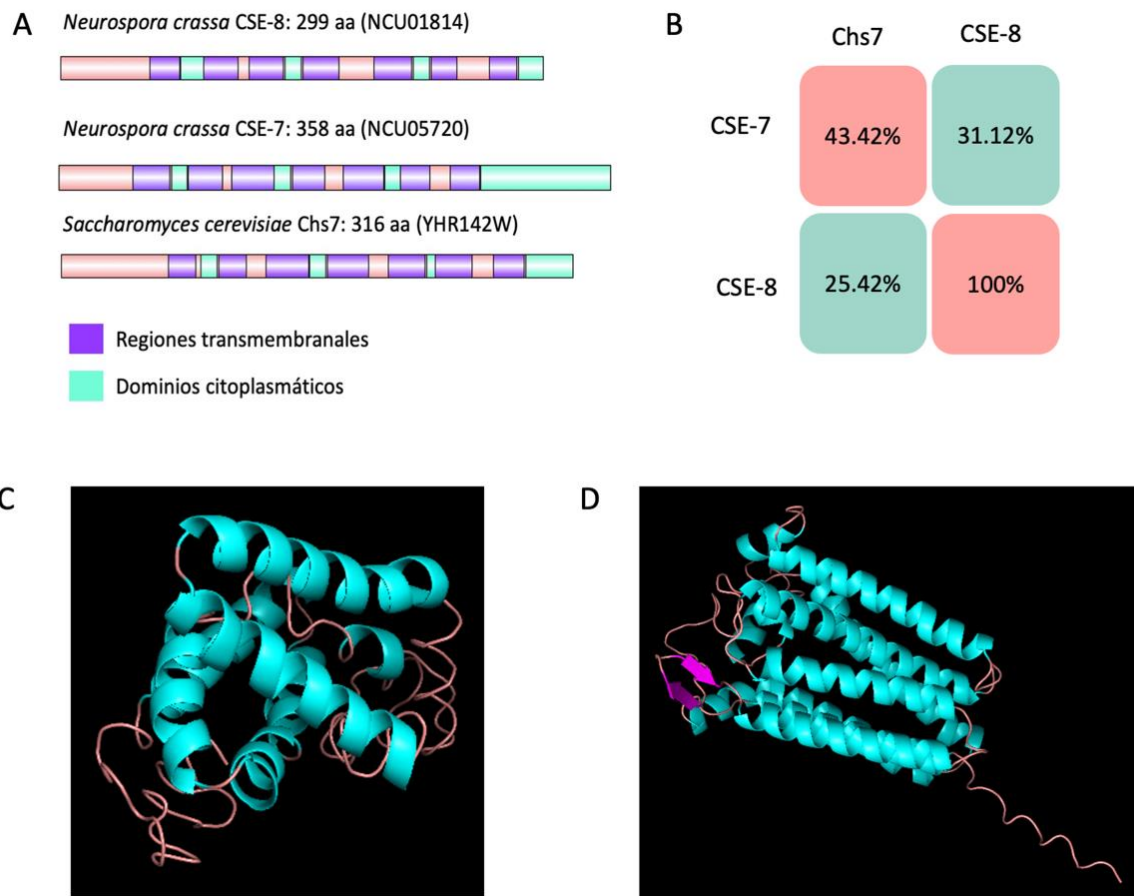


Figura 4. Análisis bioinformáticos de CSE-8 (NCU01814). (A) Ilustración de las regiones y dominios citoplasmáticos de CSE-8, CSE-7, y Chs7 obtenidos con la base de datos InterPro. Las ilustraciones se realizaron con el software Biological Sequences IBS 1.0.1. Estructura tridimensional de CSE-8 predicha por (C) I-TASSER y (D) AlphaFold. Ambas estructuras cuentan con siete dominios hélice, pero diferente conformación. (D) Matriz de porcentaje de identidad para las secuencias protéicas de Chs7p, CSE-7 y CSE-8.

El análisis para la identificación de proteínas homólogas a CSE-8 en el genoma de *N. crassa*, nos permitió identificar a CSE-7 y CSE-8 como las únicas proteínas de *N. crassa* que podrían contar con los mismos dominios de aminoácidos conservados, así como una función similar. Dado este resultado, se exploró la

posibilidad de que estas dos proteínas pudieran estar en el genoma de otros Ascomycota u otras divisiones de hongos. Por ello, se empleó el alineamiento de las secuencias de CSE-7 y CSE-8. El alineamiento se ingresó en HMMsearch, una herramienta en línea que realiza una búsqueda de secuencias ortólogas con base en los dominios conservados del alineamiento. En este alineamiento, se identificaron en total 1502 secuencias proteicas distribuidas en las distintas divisiones del reino Fungi. La mayoría de las secuencias proteicas encontradas, pertenecieron a la división Ascomycota (926), seguidas de Basidiomycota (393), Mucormycota (68), Zoopagomycota (45), Microsporidia (31), Chytridiomycota (26), Blastocladiomycota (7) y Cryptomycota (2) (Figura 5).

Las proteínas identificadas se describen como integrantes de la familia pfam12271 (chitin synthase export chaperone family) o proteínas hipotéticas. Asimismo, las proteínas identificadas pertenecen tanto a especies de hongos filamentosos como de levaduras. Las proteínas identificadas, presentan un E-value en un rango de 2.5×10^{-152} a 0.77, siendo los valores más pequeños correspondientes a Ascomycetos. Esta distribución nos indica que tanto CSE-7 y CSE-8, son proteínas conservadas en el Reino Fungi, lo que podría significar la conservación de algún mecanismo o función en el desarrollo de los hongos. Cabe resaltar que cada especie cuenta con un número distinto de secuencias no redundantes que contienen los dominios característicos de CSE-7 y CSE-8. Por ejemplo, *Basidiobolus meristosporus* (Zoopagomycota), *Fibularhizoctonia* sp. (Basidiomycota), *Sphaerobolus stellatus* (Basidiomycota) y *Allomyces macrogynus* (Blastocladiomycota), presentan 26, 19, 12 y 5 proteínas de la familia pfam12271, respectivamente. Respecto a la división Ascomycota, se pudo observar que especies de hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., cuentan con solo dos genes que codifican para proteínas CSE (chitin synthase export chaperone). Las especies levaduriformes y dimórficas, como *S. cerevisiae* y *C. albicans*, presentan solo una proteína CSE en su genoma. *Coccidioides* spp. fueron una excepción al contar con dos proteínas CSE en su genoma. Por ende, es muy probable que las especies de Ascomycetos filamentosos posean un mecanismo conservado para la función de sus CHS, con CSE-7 y CSE-8 como proteínas auxiliares de la síntesis de quitina (Figura 5).

3.2 Comprobación de cepa $\Delta cse-8$

Para el análisis de la cepa mutante $\Delta cse-8$, se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplifican en la región del ORF del gen *cse-8*. La comprobación se llevó a cabo empleando el ADN genómico de la cepa $\Delta cse-8$, mientras que, los mismos oligonucleótidos también se emplearon para amplificar el ORF en ADN genómico de la cepa silvestre (WT), donde se esperaba amplificar un fragmento de 1167 pb

correspondiente al gen *cse-8*. Como control, se empleó el ADN genómico de la cepa $\Delta cse-8$ para amplificar el ORF de *pex-26* empleando los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 986 pb. Con esto, pudimos cerciorarnos de que el ADN extraído de la cepa $\Delta cse-8$ permanecía en buenas condiciones y que, además, no cuenta con el gen *cse-8* (Figura 6).

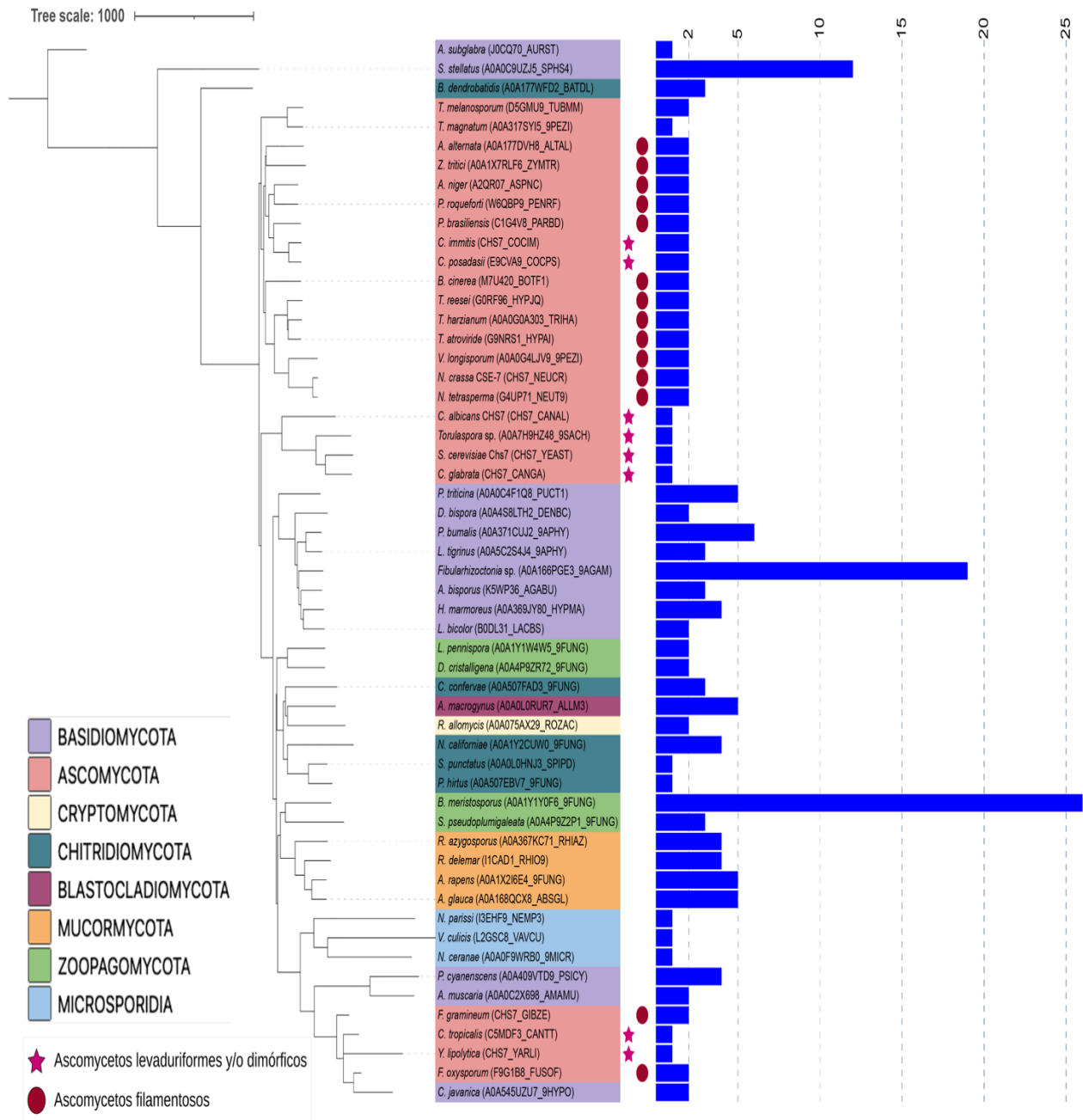


Figura 5. Distribución taxonómica de proteínas CSE representativas en las Divisiones del Reino Fungi. El árbol filogenético ilustra las proteínas más cercanas a la familia pfam12271 (E-value < 1×10^{-100}). Las barras azules indican el número de proteínas CSE encontradas para cada especie. El árbol fue editado en iTOL v6 (Letunic y Bork, 2021).

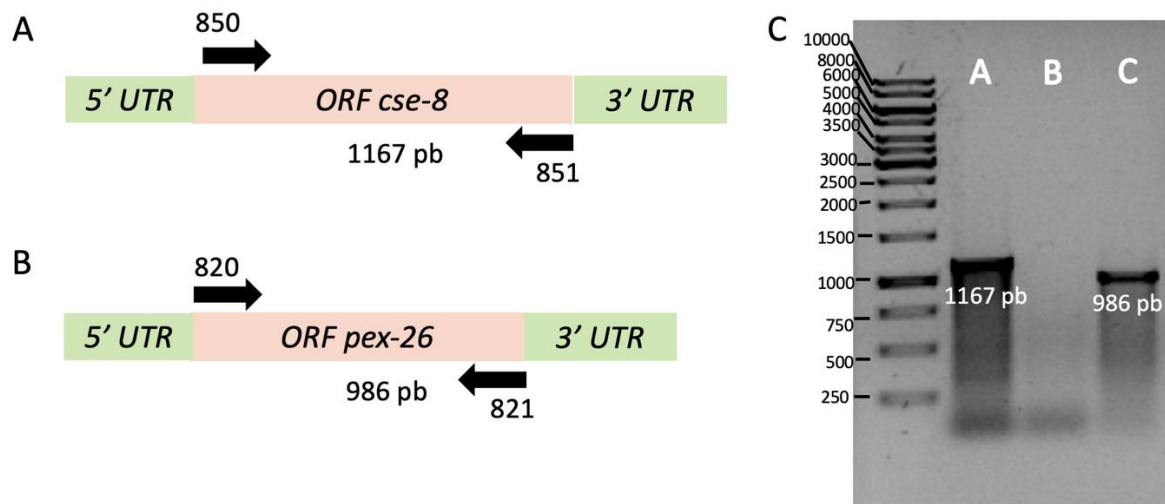


Figura 6. Comprobación de la eliminación del gen *cse-8* en gel de agarosa al 1%. (A) y (B), corresponden a los marcos abiertos de lectura de *cse-8* y *pex-26*, respectivamente, indicando los oligonucleótidos empleados en la comprobación. (C) A: se observa la amplificación de *cse-8* empleando los oligonucleótidos 850 y 851, y empleando ADN genómico de una cepa WT como templado; B: se empleó ADN genómico de la cepa $\Delta cse-8$ como templado y los oligonucleótidos 850 y 851, C: Amplificación de *pex-26* con los oligonucleótidos 820 y 821, que se utilizó como PCR control.

3.3 Caracterización fenotípica de la cepa $\Delta cse-8$

Una vez confirmada la eliminación del gen *cse-8* en la cepa $\Delta cse-8$, se procedió a realizar una cinética de crecimiento comparando a la cepa $\Delta cse-8$ con las cepas FGSC #988 y FGSC #9718, que corresponden a la cepas WT y parental de la mutante en cuestión (Colot et. al., 2006). Se analizaron los parámetros de: tasa de crecimiento hifal mediante análisis de crecimiento radial, análisis de hifas aéreas, conidiación, número de ramificaciones, número de septos y ancho de hifas. El objetivo de estos análisis fue detectar si la ausencia de *cse-8* influiría en el desarrollo regular de *N. crassa*.

Para determinar la tasa de crecimiento de la cepa $\Delta cse-8$, silvestre y parental, se midió la longitud del crecimiento micelial cada 2 h durante 8 h. Los resultados, demostraron que la cepa $\Delta cse-8$ muestra una diferencia significativa de crecimiento hasta las 8 h de crecimiento con respecto a la cepa de tipo silvestre (Figura 7B). Sin embargo, no se mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa parental (Tabla 4). Por lo anterior, se sugiere que la diferencia de crecimiento con la cepa silvestre, corresponde al fenotipo $\Delta mus-51$ de la cepa FGSC #9717, y no a $\Delta cse-8$. Estos resultados nos muestran que la carencia de *cse-8* no afecta en gran medida el desarrollo vegetativo de *N. crassa*.

Tabla 4. Crecimiento micelial promedio para la cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718 .

	2h	4h	6h	8h	Valor de <i>p</i>
FGSC #988	0.9 ± 0.05	1.9 ± 0.23	2.8 ± 0.53	3.7 ± 0.71	1.14x10 ⁻⁸ *
FGSC #9718	0.3 ± 0.06	0.7 ± 0.06	1.1 ± 0.07	1.5 ± 0.07	0.048*
$\Delta cse-8$	0.4 ± 0.05	0.8 ± 0.04	1.2 ± 0.08	1.7 ± 0.05	-

*Los valores fueron calculados considerando: varianzas desiguales entre los valores de la cepa indicada con los valores obtenidos para $\Delta cse-8$; $\alpha= 0.05$; n= 30.

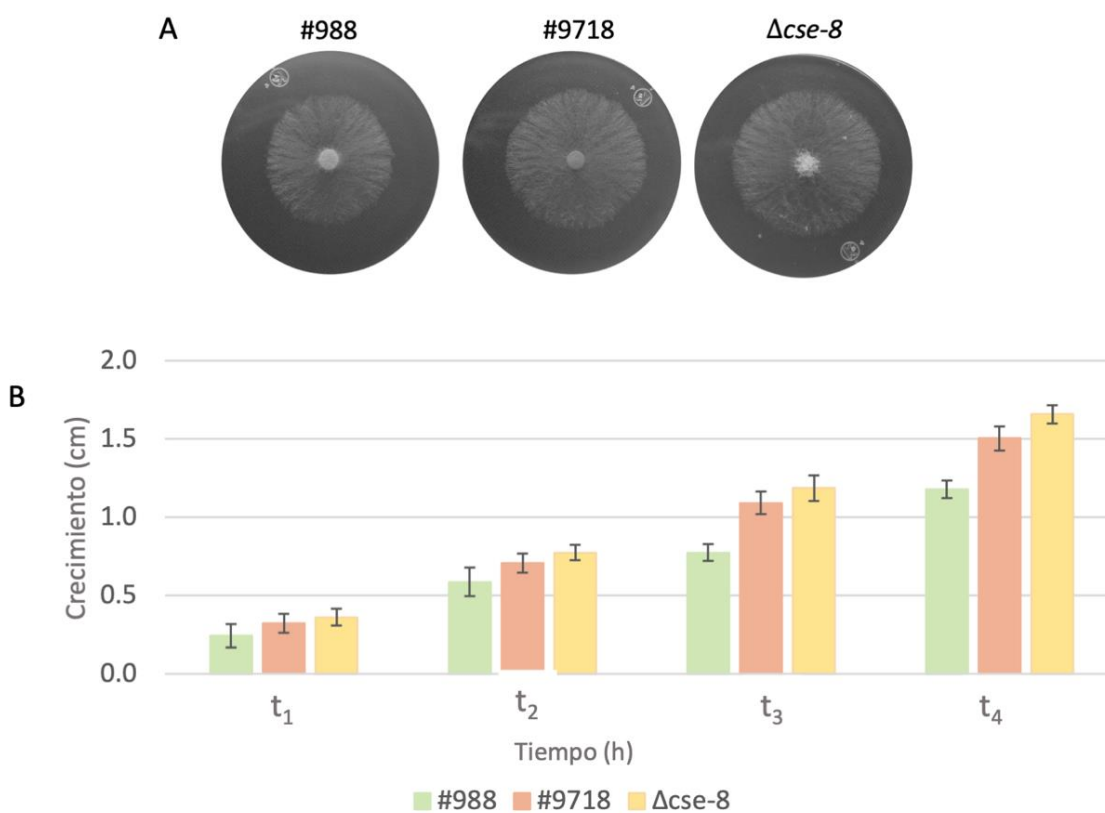


Figura 7. Evaluación de crecimiento de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Crecimiento colonial de las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718. (B) Gráfico de crecimiento radial a las 2 h (t_1), 4 h (t_2), 6 h (t_3) y 8 h (t_4). Las barras de error denotan la desviación estandar muestral.

Se analizó la producción de hifas aéreas, midiendo la altura de las hifas para cada cepa después de 6 días de incubación en completa oscuridad. Se realizaron un total de 50 mediciones para 10 tubos con 1 mL de MMV 1.5%, inoculados con 1×10^7 conidios/mL. La producción de hifas aéreas, parece estar reducida en la cepa $\Delta cse-8$ en comparación con la cepa de tipo silvestre, al contrario de la comparación con la cepa parental (Figura 8, Tabla 5). Adicionalmente, se realizó un análisis para identificar si la producción de

conidios era menor en comparación con la cepa de tipo silvestre (n= 8). La cepa $\Delta cse-8$ produce una mayor cantidad de conidios después de 6 días de incubación a temperatura ambiente en completa oscuridad (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del análisis de la producción de hifas aéreas y conidiación para las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.

	Producción de hifas aéreas (cm)	Producción de conidios (conidios/mL)	Valores de p para la producción de hifas aéreas ($\alpha= 0.05$; n= 50)	Valores de p para la producción de conidios ($\alpha= 0.05$; n= 8)
FGSC #988	3.26 \pm 0.11	2.4 $\times 10^6 \pm 5.4 \times 10^5$	1.3 $\times 10^{-29}$	0.001
FGSC #9718	2.26 \pm 0.15	15.1 $\times 10^6 \pm 2.8 \times 10^6$	5.9 $\times 10^{-6}$	0.77
$\Delta cse-8$	2.48 \pm 0.25	15.8 $\times 10^6 \pm 4.01 \times 10^6$	-	-

Los valores estadísticos de p fueron calculados considerando una diferencia hipotética de 0; (\pm) indica la desviación estándar para cada valor promedio de producción de hifas aéreas y conidiación.

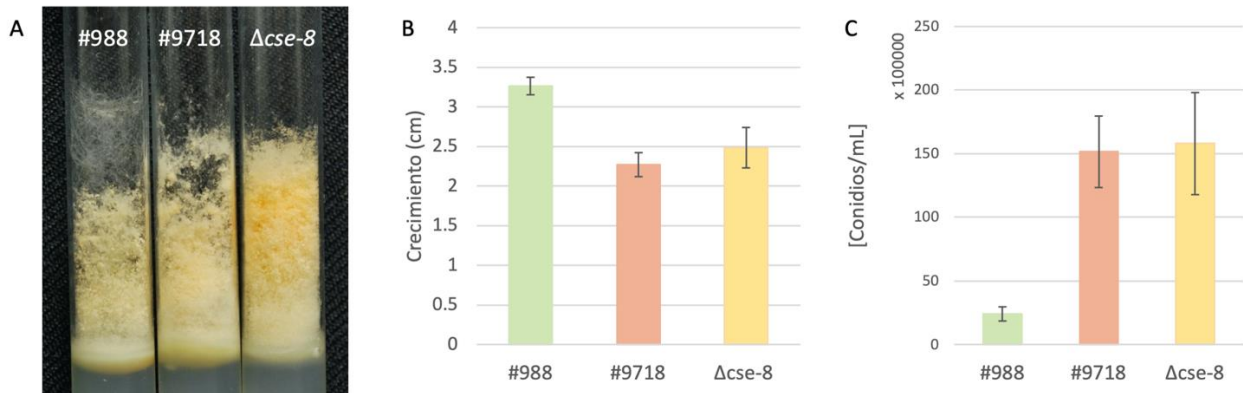


Figura 8. Producción de hifas aéreas de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Producción de hifas aéreas y conidios a los 6 días en completa oscuridad a temperatura ambiente (24-25°C). (B) Gráfico de promedio de formación de hifas aéreas (n=50). (C) Concentración de conidios obtenida (n= 8). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se analizaron las cepas #988, #9718 y $\Delta cse-8$ a un aumento de 12.5 X en un microscopio estereoscópico para el conteo de ramificaciones en una distancia de 500 μm desde el ápice (Figura 9). El número de ramificaciones producidas por la cepa WT difiere significativamente de las ramificaciones desarrolladas por $\Delta cse-8$. Sin embargo, la cepa $\Delta cse-8$ no difirió significativamente de la cepa parental #9718 (Tabla 6,

Figura 9). Este análisis, permitió constatar que la cepa $\Delta cse-8$ muestra hifas con un fenotipo afectado, con hifas ligeramente más delgadas con respecto a las cepas silvestre y parental (Tabla 6, Figura 9). Por otro lado, se cuantificó el número de septos formados por las dos cepas control y la cepa $\Delta cse-8$ en una distancia de 500 μm de la zona subapical ($>200 \mu\text{m}$ del ápice de la hifa). La cepa $\Delta cse-8$ solo presentó una diferencia significativa en la producción de septos en cuanto a la distancia entre el primer y segundo septo (Figura 9, Tabla 7).

Tabla 6. Número de ramificaciones y ancho de hifas principales.

	FGSC #988	FGSC #9718	$\Delta cse-8$
Número de ramificaciones	3 \pm 0.60	5 \pm 1.4	5 \pm 1.6
Valor de p ($\alpha= 0.05$; $n= 20$)	2.7 $\times 10^7$	0.53	-
Ancho de hifas principales (μm)	13.6 \pm 1.3	14.3 \pm 2.07	10.6 \pm 1.2
Valor de p ($\alpha= 0.05$; $n= 70$)	8.5 $\times 10^{-32}$	1.2 $\times 10^{-32}$	-

Los valores estadísticos de p fueron calculados considerando una diferencia hipotética de 0; (\pm) indica la desviación estándar para cada valor.

Tabla 7. Distancias del ápice al primer septo y del primer y segundo septo para las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.

	FGSC #988	FGSC #9718	$\Delta cse-8$
Número de septos en 500 μm de la zona sub apical de la hifa	4.4 \pm 0.75	4.5 \pm 1.03	5.7 \pm 0.8
Valor de p ($\alpha= 0.05$; $n= 20$)	1.49 $\times 10^{-3}$	3.32 $\times 10^{-6}$	-
Distancia media del ápice al primer septo (μm)	183.6 \pm 30.3	239.3 \pm 4.8	237.8 \pm 32.7
Valor de p ($\alpha= 0.05$; $n= 10$)	0.026	0.92	-
Distancia media del primer al segundo septo (μm)	69.9 \pm 16.4	64.4 \pm 3.9	81.19 \pm 11.06
Valor de p ($\alpha= 0.05$; $n= 10$)	0.23	0.023*	-

Los valores estadísticos de p fueron calculados considerando una diferencia hipotética de 0; (\pm) indica la desviación estándar para cada valor promedio de producción de hifas aéreas y conidiación; (*) indica una diferencia significativa para dos muestras (muestra 1: FGSC #9718; muestra 2: $\Delta cse-8$).

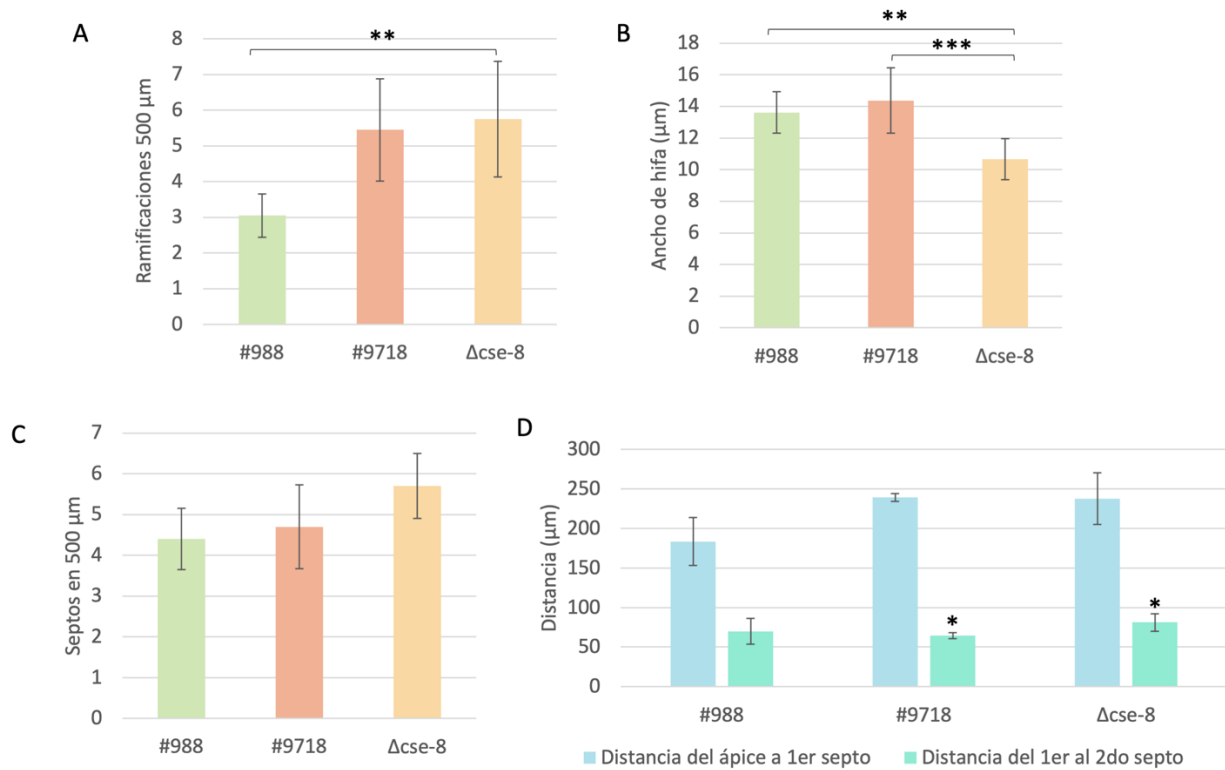


Figura 9. Gráficos correspondientes a la caracterización fenotípica de las hifas de las cepas $\Delta\text{cse-8}$, FGSC #988, y FGSC #9718. (A) Se presenta el promedio del número de ramificaciones en hifas principales, en donde solo se puede observar una diferencia significativa comparando las cepas parental y mutante, con la cepa silvestre. (B) Gráfico de las diferencias entre el ancho de las hifas principales (Tabla 4). (C) Promedio de septos en 500 μm de distancia del ápice a la zona subapical de las hifas principales. (D) Gráfico de las distancias del ápice al primer septo y la distancia entre el primer y segundo septo de las cepas evaluadas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar muestral. (*) Indica una diferencia significativa para dos muestras: FGSC #9718 y $\Delta\text{cse-8}$ (Tabla 5). Indica una diferencia significativa para dos muestras: (***) FGSC #9718 y $\Delta\text{cse-8}$; (**) FGSC #988 y $\Delta\text{cse-8}$ (Tablas 4 y 5).

3.3.1 Análisis de contenido de N-acetilglucosamina en la cepa mutante de $\Delta\text{cse-8}$

Para explorar más a fondo la posibilidad de la participación de CSE-8 en la ruta secretora de CHS y en consecuencia en la síntesis de quitina de la pared celular, se realizó un ensayo bioquímico para cuantificar colorimétricamente el contenido de GlcNAc (Morgan y Elson, 1934) en las cepas WT, #9718, y $\Delta\text{cse-8}$. Para ello, se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de GlcNAc (Tabla 8, Figura 10). La curva fue empleada para determinar el contenido de quitina en 0.01 g de micelio (Anexo B). La cepa $\Delta\text{cse-8}$ presentó una notable reducción en el contenido de GlcNAc, lo cual, representa una reducción de alrededor del 40% de la GlcNAc total en comparación con las cepas parentales (Tabla 10, Figura 11).

Se realizaron ensayos para analizar la deposición de quitina en septos de las zonas subapicales con blanco de calcoflúor en las cepas control y $\Delta\text{cse-8}$. El blanco de calcoflúor se une naturalmente a la quitina y la

celulosa de las paredes celulares (Harris & Fincher, 2009). Ambas se expusieron al colorante 30 min a temperatura ambiente antes de su análisis en el microscopio confocal de barrido láser. Para este análisis, las imágenes fueron editadas en Fiji Image J para eliminar el posible ruido de fondo y falsa fluorescencia en la imágenes presentadas (Figura 12A). Aparentemente, existe una diferencia en la deposición de quitina en los septos visualizados en el plano focal (Tabla 11, Figura 12B).

Tabla 8. Tabla de absorbancias para curva de calibración estándar de N-acetilglucosamina.

Concentración de N-acetilglucosamina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 520 nm	Desviación estándar (n=3)
0	0	0
50	0.460	0.006
100	0.792	0.014
150	1.124	0.034
200	1.233	0.044
250	1.650	0.089
300	1.871	0.045

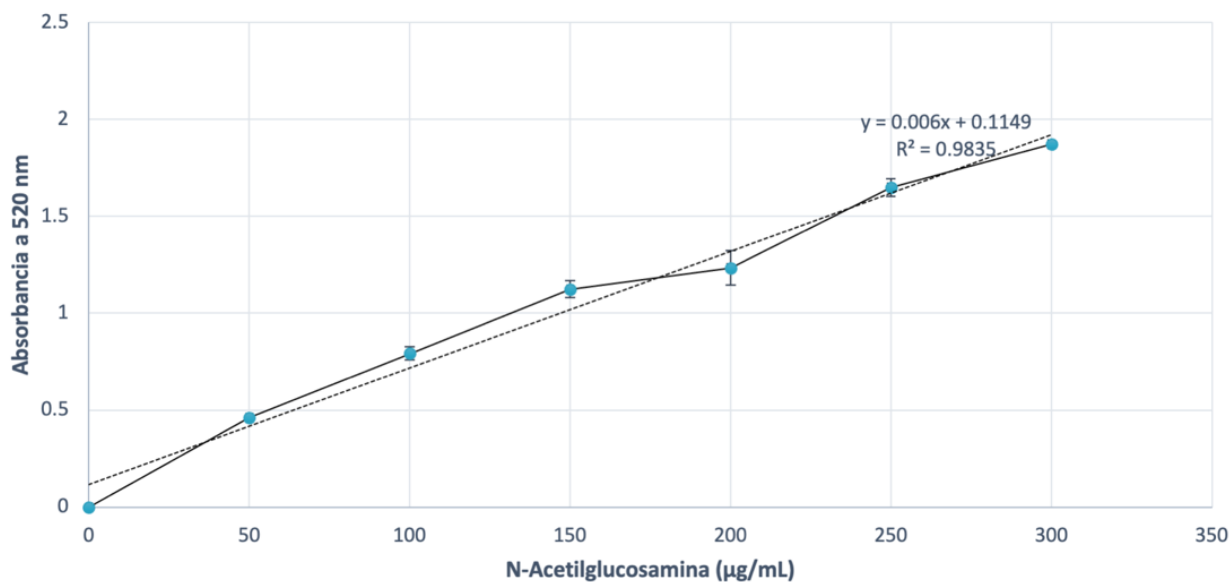


Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de N-acetilglucosamina total en micelio liofilizado. Las barras de error en cada punto cuenta con barras de error en cada punto indican la desviación estándar de la absorbancia correspondiente a las mediciones para cada concentración (n=5). También se expresa la ecuación de la recta y el valor de R, correspondientes al análisis de regresión lineal de los datos obtenidos.

Tabla 9. Resultados de la determinación de N-acetilglucosamina en 0.01 g de micelio liofilizado.

	FGSC #988	FGSC #9718	$\Delta cse-8$
Media muestral del contenido de N-acetilglucosamina	284 ± 45.8	238 ± 38.7	141 ± 11.9
Valor estadístico de p para dos muestras (n= 8; $\alpha= 0.05$)	2.7×10^{-5}	1.4×10^{-4}	-

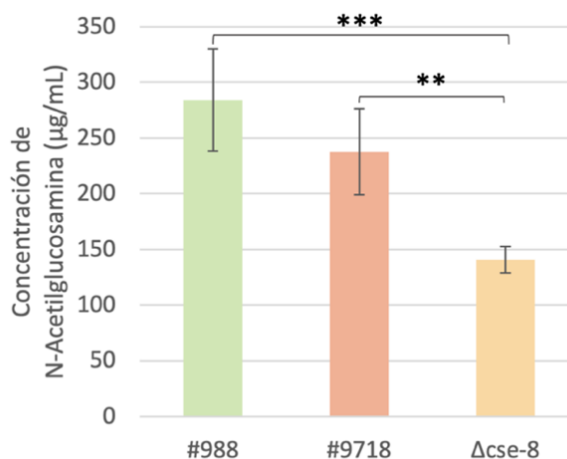


Figura 11. Gráfico de promedios de la concentración total de GlcNAc en 10 µg de micelio liofilizado de las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. Las barras de error indican la desviación estándar del conjunto de datos obtenidos. (**) Indica una diferencia significativa entre las cepas #988 y $\Delta cse-8$; (***) Indica una diferencia significativa entre las cepas #9718 y $\Delta cse-8$ (Ver Tabla 8).

Tabla 10. Promedios de la intensidad de fluorescencia en septos subapicales.

	FGSC #988	FGSC #9718	$\Delta cse-8$
Intensidad de fluorescencia (Densidad integrada/Área)	87.16 ± 16.9	123.7 ± 8.45	43.75 ± 17.2
Valor estadístico de p para dos muestras (n=10; $\alpha= 0.05$)	1.33×10^{-7}	8.5×10^{-7}	-

3.4 Análisis de germínulas mediante microscopía confocal

Para explorar si la ausencia de *cse-8* interrumpe la fusión vegetativa, dado el fenotipo alterado asociado a la producción de quitina en la pared celular, se analizaron germínulas de la cepa FGSC #9718 y $\Delta cse-8$ teñidas con blanco de calcoflúor. Para ello, se sembraron conidios a una concentración de 1×10^5 de ambas

cepas en MMV con 1.5% de sacarosa y se analizaron después de 4 h de incubación a 30°C por el método de agar invertido. A pesar de observar una germinación más lenta de $\Delta cse-8$, se observó la fusión de tubos germinativos y la formación de CATs, lo cual, indica que la ausencia de CSE-8 en hifas de *N. crassa* no afecta el desarrollo regular de estos procesos (Figura 13). Los CATs permiten la fusión vegetativa de hifas, fenómeno que ha sido descrito en 21 especies y 73 géneros de hongos Ascomycetos (Roca et. al., 2005). La formación de CATs permite la comunicación del micelio durante la formación de colonias multicelulares a partir de conidios. Esta conexión permite que la colonia distribuya de mejor manera el agua y los nutrientes de la red hifal (Roca et al., 2005).

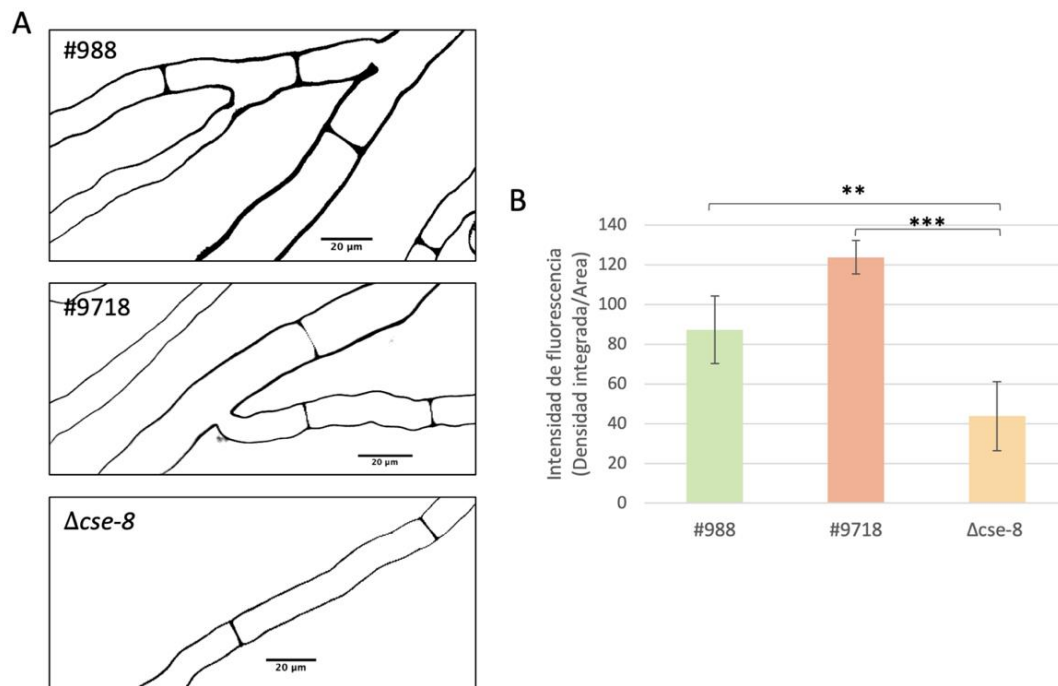


Figura 12. Análisis de septos en el plano medio focal con blanco de calcoflúor en las cepas FGSC #988, FGSC #9718 y $\Delta cse-8$. (A) Ejemplos de edición de imágenes con Fiji Image J para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia del blanco de calcoflúor en septos. (B) Gráfico de promedios de intensidad de fluorescencia (n=10). Las barras de error corresponden a la desviación estándar del conjunto de datos, (**) y (***) señalan las diferencias significativas entre las cepas analizadas (Tabla 9).

3.5 Etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP

Para el etiquetado de CSE-8 con GFP, se empleó el plásmido VMRP48, el cual tuvo que ser previamente replicado en células químicamente competentes de *E. coli*. Una vez obtenido, se realizaron las amplificaciones de los fragmentos del ORF de *cse-8*, la región 3' UTR del gen *cse-8* y el gen *gfp* unido al gen *hph*. En la Figura 14, se puede observar que los fragmentos corresponden a 1301 pb, 1051 pb y 2252 pb, las longitudes de los fragmentos deseados. Los fragmentos obtenidos se purificaron del gel de agarosa y

dieron como resultado las concentraciones reportadas en la Tabla 12. Dichos fragmentos, se emplearon en la PCR de fusión para la construcción del brazo izquierdo y derecho siguiendo el método de Split Marker, obteniendo fragmentos de 3154 pb y 2091 pb, necesarios para realizar la transformación de conidios en *N. crassa*.

Una vez obtenidos los fragmentos fusionados, se transformaron conidios de la cepa FGSC #9717 y FGSC #9718. Después de cuatro días de incubación de las placas con conidios transformados, se obtuvieron colonias transformadas con una eficiencia de transformación de 7.7×10^9 colonias por μg de ADN empleado. Posteriormente, se inocularon 20 colonias de cada cepa transformada para su análisis mediante microscopía confocal de barrido láser. Se seleccionaron 10 colonias que mostraban mejor fluorescencia de la proteína GFP al ser expuestas a un láser de 488 nm. Finalmente, se seleccionó aquella colonia en la que se comprobó la construcción completa *cse-8::gfp* y se realizaron cruza de la misma con la cepa #988 para obtener la cepa transformada homocarión con la construcción *cse-8::gfp::hph* (Figura 14).

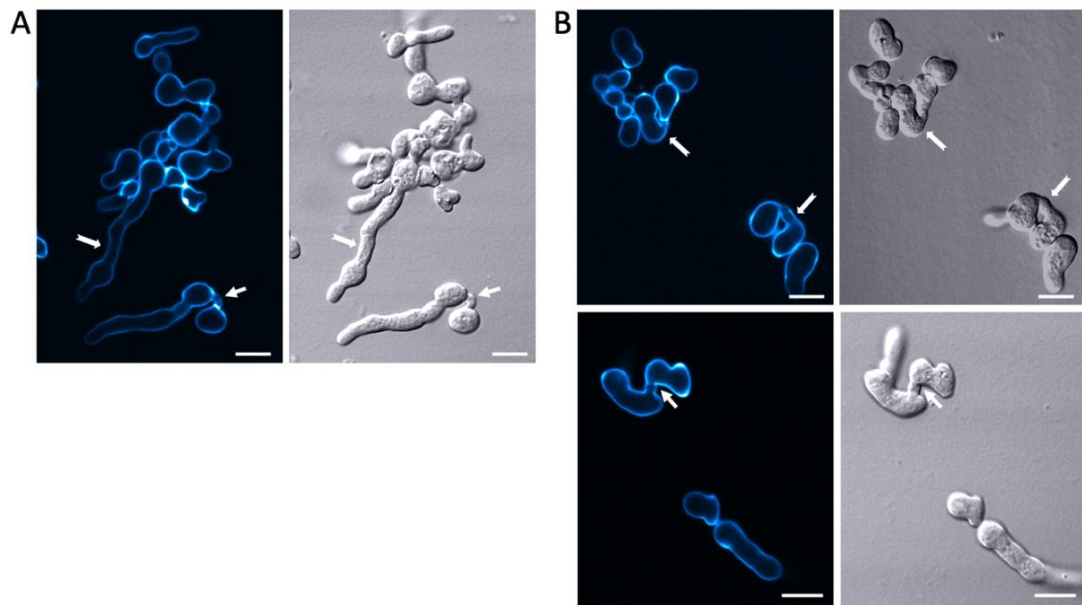


Figura 13. Gemínulas de las cepas #9718 y $\Delta cse-8$ (60X). (A) #9717; (B) cepa $\Delta cse-8$. Las flechas con corte triangular en la parte inferior, representan la fusión de tubos germinativos; las flechas blancas señalan la formación de CATs. Las barras de escala equivalen a una distancia de $10 \mu\text{m}$.

3.6 Análisis mediante microscopía confocal de barrido láser de la cepa homocarión con genotipo *cse-8::gfp::hph*

La cepa homocarión expresando CSE-8 etiquetada con GFP (Figura 15), fue analizada mediante microscopía confocal de barrido láser para identificar la ubicación subcelular de CSE-8 durante el

crecimiento polarizado. Se observó a CSE-8 en el SPK y en septos formados de hifas maduras durante el crecimiento de *N. crassa* (Figura 16). CSE-8 también se localiza alrededor de los núcleos durante el crecimiento polarizado de *N. crassa* (Figura 17). Se esperaba que CSE-8 sea una proteína de RE, por lo que su localización alrededor de los núcleos, podría ser un indicio de este hecho.

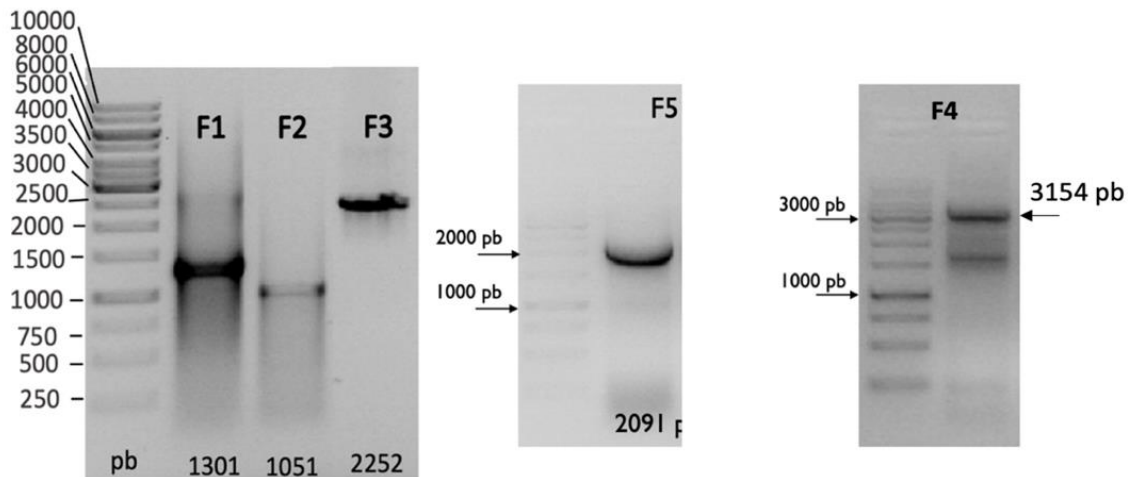


Figura 14. Obtención de fragmentos para el etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP. F4 y F5 corresponden a las fusiones de F1 con F2 y F2 con F3, respectivamente. Los detalles de la amplificación de F1, F2 y F3 pueden observarse en la Figura 3.

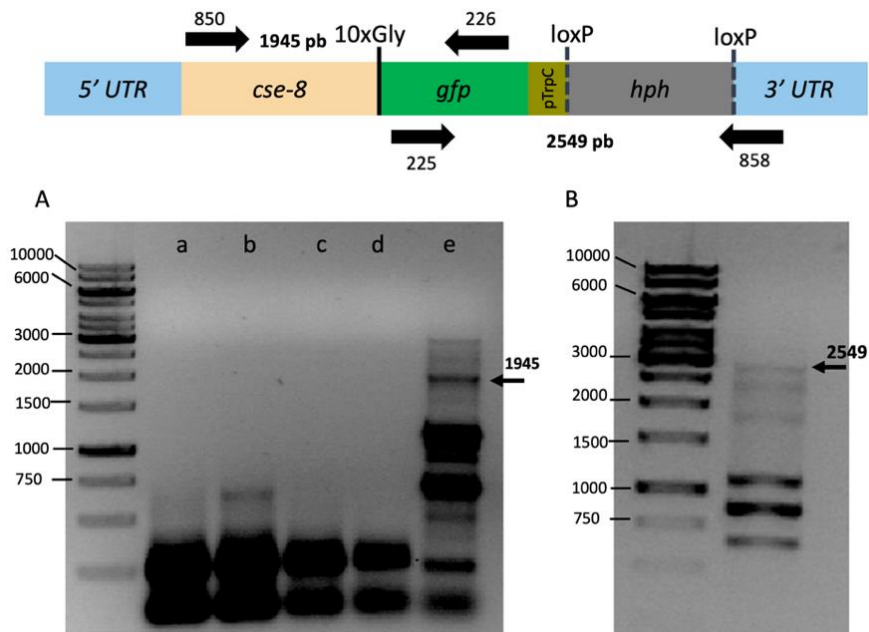


Figura 15. Comprobación molecular del etiquetado endógeno de CSE-8 con GFP en la cepa FGSC #9718 transformada con los fragmentos F4 y F5. (A) Los carriles a-d corresponden a cepas transformadas sin la construcción presente, mientras que el carril e, corresponde a la reacción de PCR del fragmento *cse-8::gfp* empleando los oligonucleótidos 850 y 226. (B) Reacción de PCR con oligonucleótidos 225 y 858 para la comprobación de *gfp::hph::3'UTR cse-8*.

También, se analizó la cepa con la construcción *cse-8::gfp* empleando FM4-64. En el SPK, se puede observar que CSE-8 se localiza en la parte central del SPK (Figura 18A). CSE-8 también se localiza en la Red de Cisternas Elongadas (NEC) (Rico-Ramírez, 2018), ubicada en la zona subapical de la hifa. Además, se observó que CSE-8 se localizaba en pequeñas vesículas en zonas subapicales (Figura 18B).

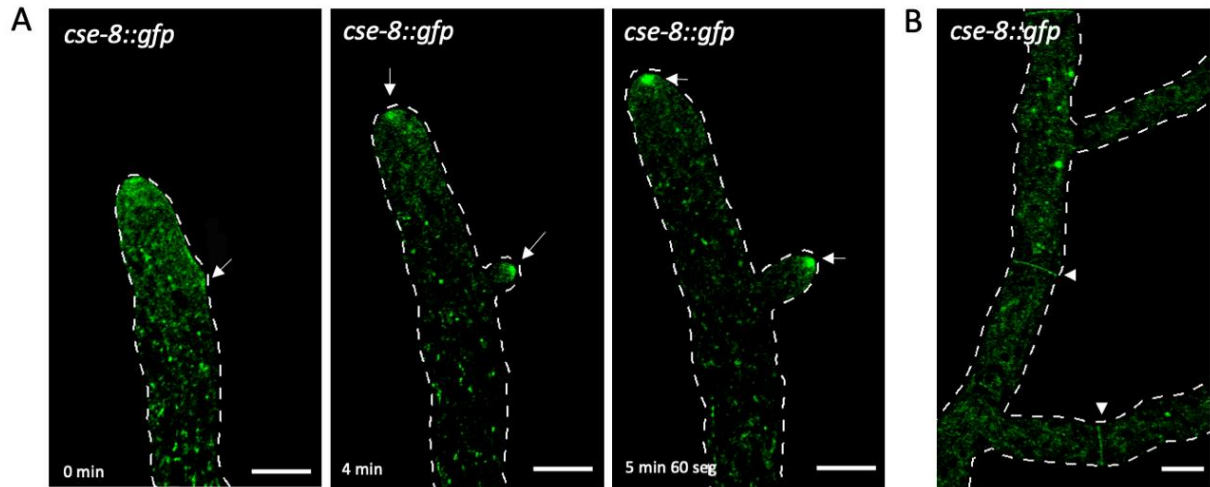


Figura 16. CSE-8 se localiza en el Spitzkörper y los septos durante el crecimiento de *N. crassa*. (A) Secuencia de crecimiento de una hifa de *N. crassa* expresando *cse-8::gfp*. Se observa el inicio de la formación de una ramificación nascente (0 min), seguida del la formación de la ramificación (4 min). Posteriormente, se aprecia a a CSE-8 en el SPK de la hifa principal y la ramificación formada (5 min 60 seg). (D) Se observa a CSE-8 en los septos formados de hifas principales y ramificaciones de *N. crassa*. Las flechas blancas señalan la expresión *cse-8::gfp* en SPK y septos. Las barras de escala corresponden a una distancia de 10 μm .

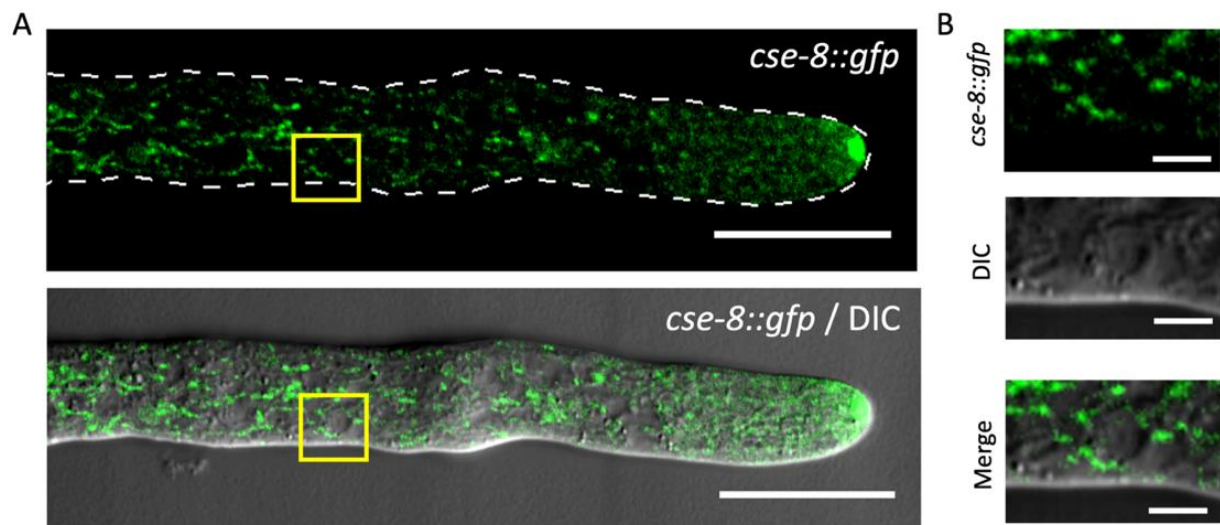


Figura 17. CSE-8 se localiza alrededor de los núcleos en hifas de *Neurospora crassa*. (A) Se observa a CSE-8 en en el SPK y alrededor de los núcleos en las zonas subapicales de la hifa (Barras de escala: 20 μm). El cuadro amarillo indica el núcleo que se observa en (B), donde se puede observar el núcleo señalado y la fluorescencia alrededor de él. Barras de escala: 5 μm .

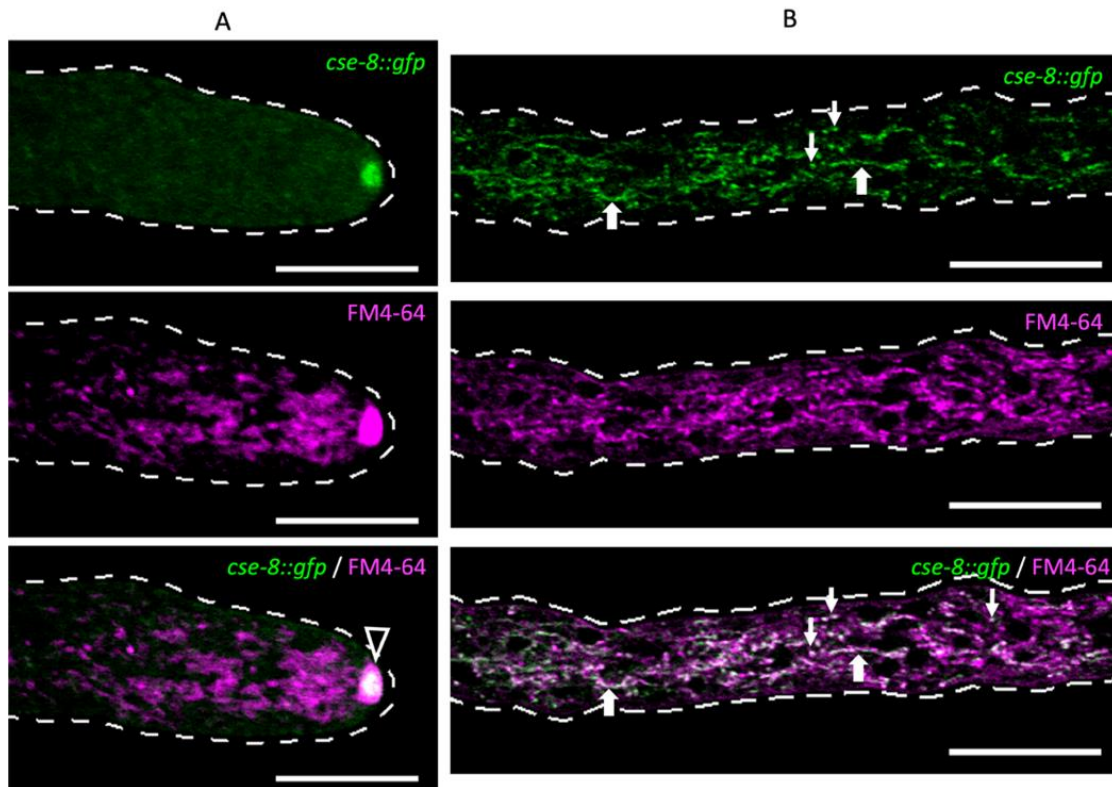


Figura 18. CSE-8 colocaliza en el centro del Spitzkörper y en la red de cisternas elongadas en hifas de *Neurospora crassa*. (A) Se puede observar a CSE-8 en el centro del SPK teñido con FM4-64. La flecha negra con contorno blanco, señala la colocalización de *cse-8::gfp* y FM4-64. (B) Las flechas gruesas señalan puntos de traslape que denotan la presencia de CSE-8 en la NEC. Las flechas delgadas, señalan los puntos de traslape en vesículas donde se expresa *cse-8::gfp*. Las barras de escala corresponden a una distancia de 10 μm .

3.7 Análisis de cruza genéticas *chs-5::gfp* x $\Delta\text{cse-8}$ y *chs-1::gfp* x $\Delta\text{cse-8}$

Para estudiar si existe alguna interacción entre CSE-8 y la CHS-5 de *N. crassa*, se realizaron cruza genéticas entre las cepas *chs-1::gfp* y $\Delta\text{cse-8}$. Se cosecharon un total de 40 ascosporas de correspondientes a las cruza genéticas, de las cuales, se seleccionó la que mostró mejor fluorescencia para su posterior análisis molecular (Figura 19B y 20). Se observó que la interrupción del transporte de CHS-1 a septos ni al SPK, no se ve afectada bajo la mutación del gen de *cse-8*. Por otro lado, se realizaron cruza genéticas entre las cepas *chs-5::gfp* y $\Delta\text{cse-8}$. De las 30 germínulas ascosporas cosechadas, se seleccionaron cuatro cepas que mostraron mejor fluorescencia al ser expuestas a un láser de 488 nm. El análisis molecular para la comprobación de la hifa de CHS-5 marcada con GFP, reveló la presencia de la construcción *chs-5::gfp* en una de las cepas seleccionadas, así como la comprobación de la ausencia de *cse-8* en la cepa, empleando oligonucleótidos que amplificaron la región del ORF de *cse-8* (Figura 19C) Sin embargo, se logró observar fluorescencia en septos y SPK. Por lo cual, la ausencia en *cse-8* no ocasiona la interrupción de la llegada

de las CHS-5 a septos y SPK en *N. crassa*. Estos resultados, muestran que CSE-8 probablemente no es chaperona de quitina sintasas de clase III y V (Figura 20 y 21).

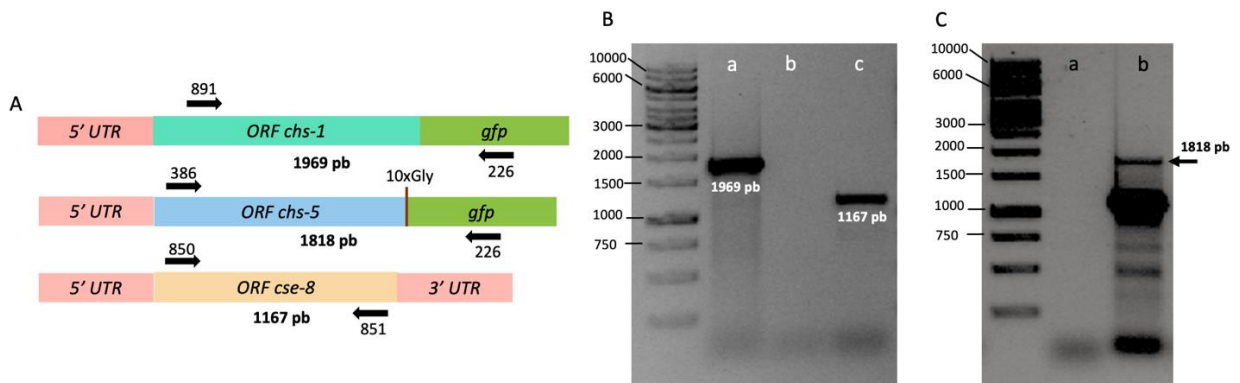


Figura 19. Comprobación de progenie resultante de cruza genéticas entre las cepas SMRP55 y SMRP287 con la cepa $\Delta cse-8$. (A) Diagrama de las construcciones comprobadas en (B) y (C), indicando los oligos empleados para cada comprobación. (B) Comprobación molecular de la cepa con genotipo *chs-1::gfp*/ $\Delta cse-8$. El carril (a) corresponde a la amplificación de *chs-1::gfp* con los oligonucleótidos 383 y 226; (b) corresponde a la ausencia de *cse-8* en la cepa, reacción para la que se emplearon los oligonucleótidos 850 y 851; (c) es el producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 850 y 851 empleando ADN de la cepa FGSC #988. (C) El carril (a) corresponde a la ausencia de *cse-8* en la cepa progenie, empleando los oligonucleótidos 850 y 851; el carril (b) corresponde a la comprobación de *chs-5::gfp* en ausencia de *cse-8*.

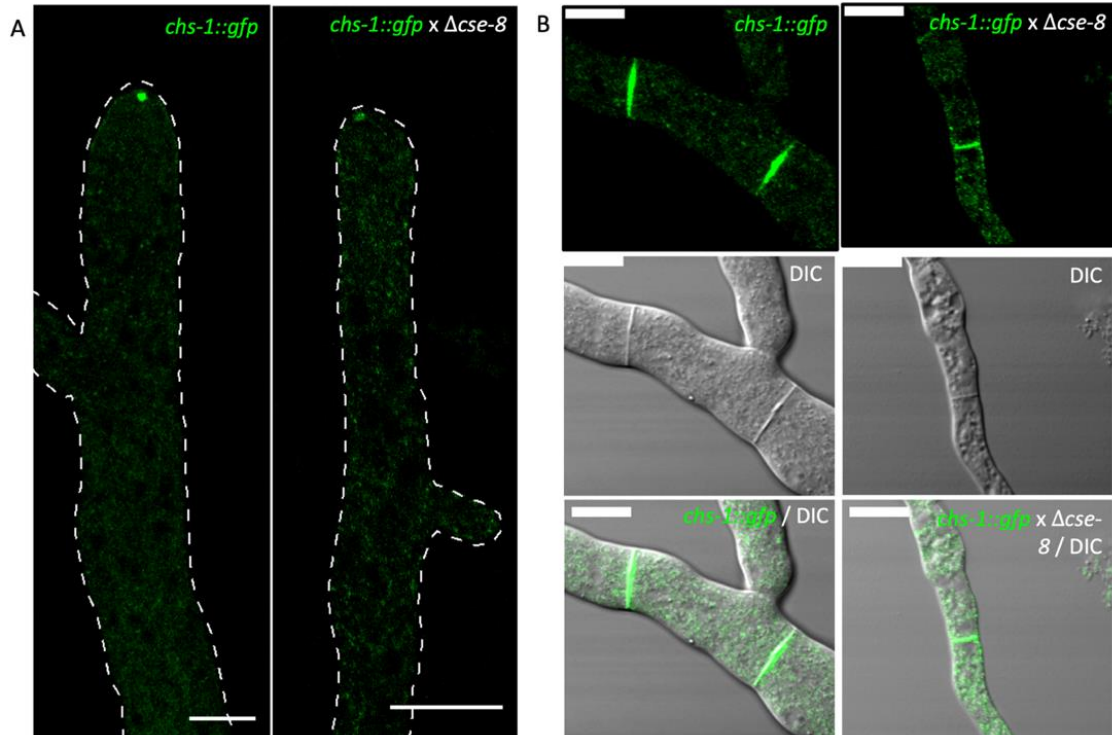


Figura 20. Análisis de cruza genéticas de las cepas $\Delta cse-8$ y la quitina sintasa de clase III etiquetada con GFP (60X). (A) Se observa que la ausencia de CSE-8 en el fondo mutante $\Delta cse-8$, no interrumpe la llegada de CHS-5 al (A) Spitzkörper y (B) a los septos en hifas de *N. crassa*. (A) La imagen de *chs-1::gfp* x $\Delta cse-8$, fue tomada con el objetivo de 60X con 2.0 unidades de aumento para su mejor observación. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

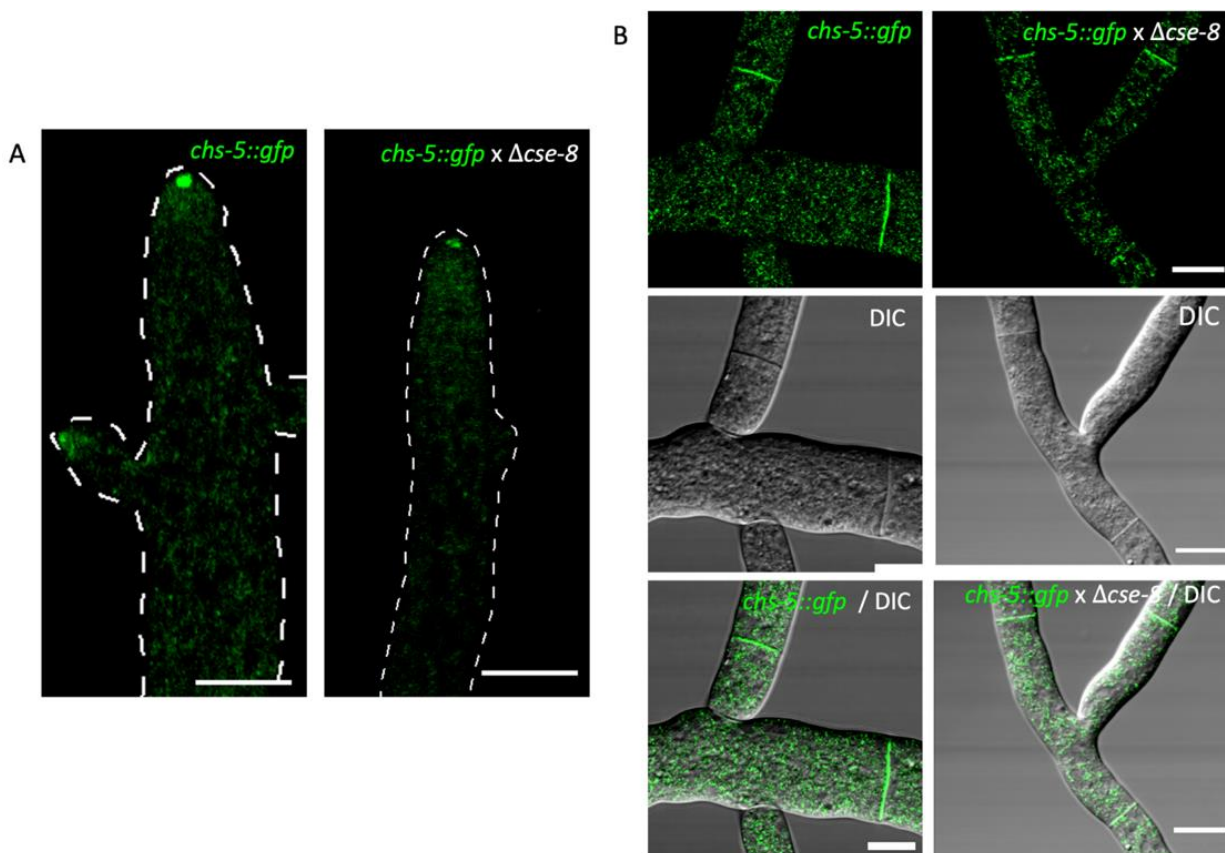


Figura 21. Análisis de cruza genéticas de las cepas $\Delta cse-8$ y quitina sintasa de clase V etiquetada con GFP. Se puede apreciar como la ausencia de CSE-8, no interrumpe la llegada de CHS-5 al (A) Spitzkörper y (B) a los septos en hifas de *N. crassa*. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal de barrido láser. Las barras de escala corresponden a 10 μm .

Capítulo 4. Discusión

4.1 Análisis de la caracterización fenotípica de $\Delta cse-8$

La quitina en la pared celular de los hongos es indispensable para el mantenimiento de la célula durante su desarrollo. En distintas especies de levaduras y hongos filamentosos, se ha demostrado que las distintas clases de CHS, se encargan de la síntesis de quitina en las diversas estructuras que estos presentan. Por ejemplo, la ausencia de las CHS de clase II en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, Chs2 y Chs1, respectivamente, da como resultado fenotipos anormales por la alteración en los procesos de división celular (Munro et al., 2001; Shaw et al., 1991). En la cepa $\Delta chs7$ (clase IV) de *U. maydis*, se detiene por completo la formación de filamentos y, por lo tanto, se reduce drásticamente la virulencia del hongo (Weber et al., 2006). Otro ejemplo son las mutantes ChsII y ChsVII de *Penicillium digitatum* (Clase V), que muestran una alteración significativa en el crecimiento colonial y la formación de hifas aéreas (Gandía et al., 2019). Anteriormente se ha descrito la actividad de Chs7 como chaperona de Chs3 en *S. cerevisiae* (Dharwanda et al., 2018). En el caso de la CSE-7 de *N. crassa*, acarreadora de CHS-4 a Spk y septos, no se observa un fenotipo notablemente afectado con respecto a la velocidad de crecimiento de las cepas $\Delta cse-7$ de la cepa parental y silvestre (Rico-Ramírez, 2018). Sin embargo, en el caso de la cepa $\Delta cse7$ de *T. atroviridae*, se puede observar un fenotipo alterado en la morfología colonial, con hifas hiper-ramificadas y micelio estratificado (Kappel et al., 2020). En este sentido, en este trabajo se realizó la caracterización de la cepa de *N. crassa* $\Delta cse-8$ con la intención de observar alteraciones fenotípicas que nos pudieran indicar si CSE-8 interacciona con alguna de las quitina sintetasas.

El crecimiento colonial no se vió significativamente alterado con respecto a la cepa de tipo parental (Figura 6). Al mismo tiempo, la producción de hifas aéreas y producción de conidios, no se vieron alteradas en comparación con la cepa de tipo parental (Figura 7). Las cepas $\Delta chs-5$, $\Delta chs-7$, y una cepa con doble fondo mutante $\Delta chs-1/\Delta chs-3$, cuentan con un fenotipo muy alterado en la producción de hifas aéreas y la conidiación, interrumpiéndola casi por completo (Fajardo-Somera et al., 2015). Por otro lado, las cepas de *N. crassa* $\Delta chs-1/\Delta chs-3$, $\Delta chs-6$ y $\Delta chs-7$ presentan una reducción drástica en crecimiento colonial (Fajardo-Somera et al., 2015). Mientras tanto, $\Delta chs-1^{RIP}$ muestra una reducción en el crecimiento colonial y, $\Delta chs-3$ presenta una reducción mínima en el crecimiento colonial (Fajardo-Somera et al., 2015; Yarden y Yanofsky, 1991). Por lo anterior, si CSE-8 participara en el transporte de quitina sintetasas de clases III, V, VI y VII a los sitios de crecimiento, se observaría una disrupción en los procesos de formación de

estructuras de reproducción asexual y crecimiento vegetativo. Estos datos, nos demuestran que probablemente CSE-8 no sea chaperona de CHS-5, CHS-6 y CHS-7 en *N. crassa*.

Por otro lado, la caracterización fenotípica de las hifas de la cepa $\Delta cse-8$ demuestra que es probable que CSE-8 participe en la síntesis de quitina en la pared celular. $\Delta cse-8$ cuenta con hifas más delgadas a diferencia de la cepa de tipo parental y silvestre con una diferencia muy pequeña (Figura 8, Tabla 4). La cantidad de quitina en la pared celular es independiente para cada especie, para las cuales, las condiciones ambientales y edad del organismo influye en este parámetro (Abo Esoud y El Kady, 2019). En *S. cerevisiae*, la pared celular corresponde al 15-30% del peso seco de la célula, no obstante, solo el 1-2% corresponde a la quitina (García-Rubio et al., 2020; Kopeček y Raclavský, 1999; Orlean, 1997). Por otro lado, la pared celular de *C. albicans* en su forma filamentosa, cuenta con una proporción de quitina de hasta el 6.7% (Chattaway et al; 1968). El grosor de la pared celular en hifas maduras de *Aspergillus nidulans* es de 78 nm \pm 17 nm, del cual, el 9% del peso seco de esta pared correspondería a la matriz de quitina (Chevalier et al., 2022; Kang et al., 2018). *Basidiobolus ranarum* y *Coprinus sterquilunus* cuentan con alrededor del 5% de quitina en su pared celular, mientras que el porcentaje de quitina para *N. crassa* es de alrededor del 4% (Kopecek y Raclavsky, 1999). Tomando en cuenta las proporciones del contenido de quitina en *N. crassa* y otros hongos filamentosos y dimórficos en su forma pseudo-hifal, no se puede concluir que el efecto de las hifas más delgadas en $\Delta cse-8$ se deba a una alteración en los mecanismos de síntesis de quitina. Es necesario un análisis ultraestructural de $\Delta cse-8$ mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, para concluir el por qué de este resultado y obtener un panorama más general de como afecta la falta de *cse-8* a la pared celular de *N. crassa*.

$\Delta cse-8$ también presenta una reducción del 40-50% en el contenido de GlcNAc total en muestras de micelio liofilizado, comparado con cepas de tipo parental y silvestre (Tabla 8, Figura 10). Según el contenido de quitina determinado en mutantes de las CHS de *N. crassa*, $\Delta chs-1/\Delta chs-3$, $\Delta chs-6$ y $\Delta chs-7$, son las que muestran un fenotipo de reducción de contenido de quitina (40-50% menos), más afectado en comparación con las cepas de tipo silvestre y parental. $\Delta chs-2$ y $\Delta chs-5$ producirían alrededor de un 30% menos quitina que las cepas WT y parental, mientras que $\Delta chs-3$ no presenta ninguna diferencia en el contenido de quitina (Fajardo-Somera, 2015). Sería complicado poder predecir con cuál quitina sintasa podría interaccionar CSE-8 con estos datos, ya que hasta el momento, no podemos atribuir la reducción de quitina a la interacción de esta posible chaperona con una sola quitina sintasa. Sin embargo, estos datos demuestran una posible relación de CSE-8 en la producción de quitina de la pared celular en *N. crassa*.

El desarrollo del número de septos en hifas de la cepa $\Delta cse-8$, no parece estar significativamente afectado en comparación con las cepas control. Sin embargo, existe una distancia mayor entre el primer y segundo septo en hifas principales de la cepa mutante (Tabla 5, Figura 8D). Para continuar explorando la posible relación de CSE-8 con la síntesis de quitina en *N. crassa* y el desarrollo de septos, se realizó una medida de la intensidad de fluorescencia con blanco de calcoflúor en septos de las zonas subapicales de la hifa. Se observó una diferencia significativa en la producción de septos en $\Delta cse-8$ con respecto a la cepa WT y parental, siendo la diferencia más notoria entre esta última y la mutante (Tabla 9, Figura 11). En conjunto, estos resultados presumen a CSE-8 como participante de la síntesis de la quitina que conforma los sitios de formación de la nueva pared celular en la hifa, en este caso, en el desarrollo de los septos.

Los análisis de germínulas de la cepa $\Delta cse-8$, demostraron que CSE-8 no participa en la fusión de hifas y formación de CATs durante el crecimiento de *N. crassa*. Sin embargo, cabe resaltar que a pesar de que ambas cepas se expusieron a las mismas condiciones en agar MMV antes de ser analizadas, las germínulas mutantes mostraron tubos germinativos hinchados y con menos crecimiento que la cepa de tipo parental (Figura 12). Además, los tubos germinativos se observan hinchados y menos desarrollados que los de la cepa #9718. Las hifas hinchadas suelen estar relacionadas a condiciones no favorables para el crecimiento (Bent y Morton, 1963). Dado que se emplearon las mismas condiciones para el análisis de ambas cepas, podría ser que $\Delta cse-8$ experimente un desequilibrio osmótico con el ambiente, debido al menor contenido de quitina que presenta en la pared celular (Ene et al., 2015). Sería interesante analizar las germínulas por más tiempo, para observar en qué punto la red micelial logra ser tan extensa, como para no afectar al crecimiento colonial de *N. crassa*.

4.2 CSE-8 cocaliza en los sitios de crecimiento polarizado y de construcción de nueva pared celular en hifas de *N. crassa*

El etiquetado endógeno en el extremo C terminal del CSE-8 con la proteína GFP nos permitió observar que CSE-8 se localiza en el SPK y septos (Figura 13). La tinción de esta cepa con FM4-64, nos permitió observar que CSE-8 se localiza en la región central del SPK, ya que el FM4-64 tiñe las endomembranas de las macrovesículas que lo conforman (Hickey et al., 2002; Hickey et al., 2004; Riquelme et al., 2007) (Figura 15A). En *N. crassa*, los quitosomas acarreadores de las quitina sintasas se localizan en la región central del SPK (Verdín et al., 2009; Fajardo, Somera et al., 2015). CSE-8 también se localiza en la región periférica de los núcleos, lo cuál es más notorio en las zonas subapicales (Figura 14). Esto es un resultado que esperábamos, ya que nuestra hipótesis sugería que CSE-8 debería ser una proteína de RE debido a los

dominios transmembranales conservados que tiene similares a CSE-7, que se sintetiza en el RE (Rico Ramírez et al., 2018). Para confirmar que CSE-8 se localiza alrededor de los núcleos de CSE-8, sería conveniente realizar cruces genéticas con alguna cepa que cuente con una proteína nuclear etiquetada con una proteína fluorescente. De momento, estas observaciones no nos permiten confirmar con mayor certeza la presencia de CSE-8 en el RE.

CSE-8 también se localiza en la red de cisternas elongadas (NEC), que se encuentra en la zona subapical de las hifas (Rico-Ramírez et al, 2018). Para determinar en qué organelo se encuentra CSE-8, se necesitaría de un análisis más profundo ya que el FM4-64 tiñe tanto vacuolas tubulares, RE y mitocondrias en menor medida (Figura 15B). De igual manera, CSE-8 está localizada en pequeñas vesículas cerca de la NEC, las cuales podrían ser endosomas (Hickey et al., 2004). Con los resultados obtenidos hasta el momento, es difícil discernir entre cada uno de estos organelos para determinar la localización exacta de CSE-8. Sin embargo, es un hecho que CSE-8 se localiza en varios puntos de la maquinaria endocítica, determinada en esta ocasión por el mecanismo de internalización del FM4-64 en las hifas (Fischer-Parton et al., 2000; Hickey et al.,2004). La extensión apical de la hifa requiere de un suministro constante de vesículas con material necesario para la construcción de la pared celular; dicho material puede ser reciclado vía endocitosis (Seaman, 2008). Un trabajo experimental más exhaustivo para diferenciar entre estos organelos, sería fundamental para determinar el tráfico de CSE-8 en *N. crassa* y si este tiene alguna relación con la síntesis de la pared celular.

4.3 CSE-8 no participa en el transporte de CHS-1 y CHS-5 a Spitzkörper y septos en hifas de *N. crassa*

El análisis de las cepas obtenidas con fondo mutante $\Delta cse-8$, comprueba que CSE-8 no participa en el tráfico de CHS-1 y CHS-5 a los sitios de crecimiento (Figuras 20 y 21). Sin embargo, las hifas de la cepa con fondo mutante conservan el fenotipo notorio de hifas más delgadas observado en la cepa mutante. Estas hifas, al ser expuestas al láser de 488 nm, parecían ser más sensibles a la irradiación a una intensidad del 5%. Esto podría relacionarse con la falta de quitina en la pared celular. Sería interesante realizar un análisis más profundo de estas hifas para el efecto de la exposición de las hifas a un desequilibrio osmótico inducido.

En *N. crassa*, CHS-1 y CHS-5 han sido previamente localizadas en septos y parcialmente en la región central del SPK (Sánchez-León et al., 2011; Fajardo-Somera et al., 2015). La comparación de los fenotipos de $\Delta cse-$

8 y $\Delta chs-5$, podrían confirmar lo observado en estos análisis. A pesar de que $\Delta chs-5$ y $\Delta chs-1$ no están significativamente afectadas en el crecimiento colonial, el fenotipo de conidiación y formación de hifas aéreas difiere mucho del que presenta CSE-8.

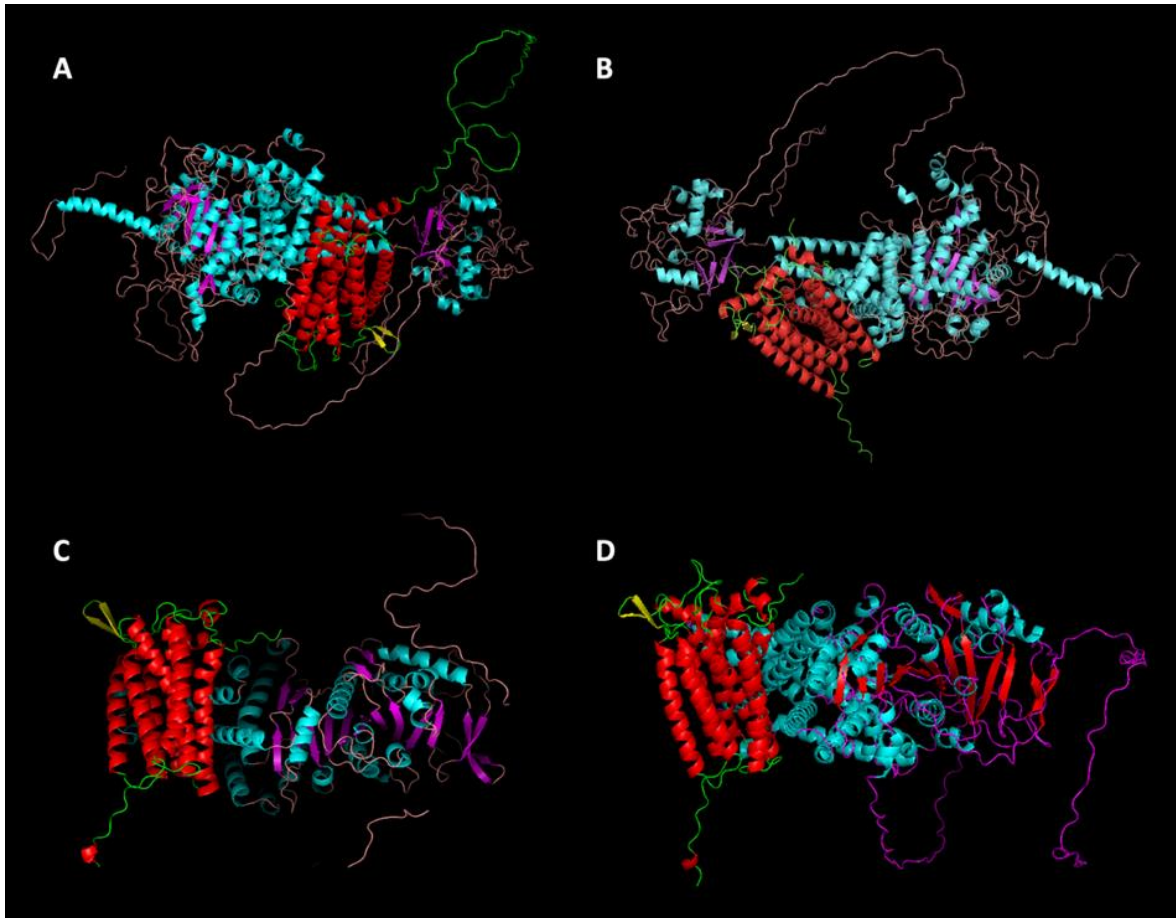


Figura 22. Estudio *in silico* de las posibles interacciones moleculares entre las chaperonas CSE-7 y CSE-8, con las quitina sintasas de *N. crassa*. (A) Se observa la interacción entre los dominios de CSE-7 (rojo) en el extremo N-terminal de CHS-4 (azul). (B) Modelado de la interacción entre CSE-8 (rojo) y el extremo N-terminal de CHS-4 (azul). (C) Modelado de la interacción entre CSE-8 (rojo) y el extremo N-terminal CHS-1 (azul). (D) Se ilustra la interacción entre los dominios de CHS-3 (azul) en su extremo N-terminal, y CSE-8 (rojo).

Este hecho nos ha llevado a explorar otras posibilidades para el estudio de la interacción de CSE-8 con las quitina sintasas. Por ello, se realizaron análisis de docking molecular, tomando como referencia la estructura de CSE-8 y de las quitina sintasas, propuestas por AlphaFold. Para considerar una posible interacción, se tomaron en cuenta los valores de las interacciones hidrofóbicamente favorables, con base en los valores obtenidos para la interacción entre CSE-7 y CHS-4. Estos análisis preliminares, sugieren la interacción de CSE-8 con CHS-4, CHS-1 y CHS-3. En estos análisis, se propone a CHS-4 como posible candidata a interactuar con CSE-8, debido a los dominios que conserva con CSE-7. También, se sugiere a CHS-1 como posible candidata, aunque en este análisis se comprobó que CHS-1 no interrumpe su llegada

a septos y SPK en el fondo mutante $\Delta cse-8$. No obstante, esto podría abrir una ventana a pensar que CSE-8 no impide el transporte de CHS-1, pero si interacciona con ella. Es muy interesante que también CSE-8 sea una posible candidata a ser chaperona de CHS-3, tomando en cuenta que esta quitina sintasa es ortóloga de las Chs1 de *S. cerevisiae*. El estudio de su interacción, podría significar un mecanismo de tráfico conservado en los Ascomycota.

Capítulo 5. Conclusiones

Los análisis realizados en este trabajo sugieren a CSE-8 como una proteína involucrada en la síntesis de quitina de la pared celular, por lo que debe abandonarse el término de proteína hipotética para referirse a ella. Adicionalmente, CSE-8 y CSE-7 presentan 7 dominios estructurales conservados, lo que sugiere la funcionalidad de CSE-8. En este sentido, este trabajo también presentó la distribución taxonómica de las CSE en el reino fungi, lo que abre la posibilidad del estudio de los mecanismos de formación de quitina de la pared celular de otros organismos, empleando secuencias ortólogas de CSE-7 y CSE-8.

Los análisis de microscopía confocal de la cepa con genotipo *cse-8::gfp*, sugieren a CSE-8 como partícipe del crecimiento polarizado y la construcción de nueva pared celular en la zona apical de hifas de *N. crassa*. De momento, la hipótesis de que CSE-8 es una proteína de RE no se descarta.

Al mismo tiempo, se ha descartado la actividad de CSE-8 como chaperona de CHS-1 y CHS-5. Sin embargo, cabe mencionar que este estudio solo evaluó la actividad de las CHS exclusivas de hongos filamentosos. Por ende, no se descarta que CSE-8 pueda presentar alguna interacción con otras CHS ortólogas a las de levadura. Adicionalmente, observaciones de este trabajo indican que es muy probable que CSE-8, no interaccione con las quitina sintetas CHS-6 y CHS-7 de *N. crassa*. Sin embargo, la caracterización fenotípica de la cepa nos brinda una idea de la posible interacción con otra quitina sintasa por los fenotipos discutidos anteriormente, principalmente el crecimiento colonial, conidiación, formación de estructuras de reproducción asexual y contenido de quitina.

5.1 Perspectivas

Con base en los análisis bioinformáticos y de docking molecular, se estudiará si CSE-8 tiene alguna interacción con CHS-2 y CHS-3, ortólogas de la Chs2 y Chs1 de *S. cerevisiae*, ya que las cepas $\Delta chs-3$ y $\Delta chs-2$ de *N. crassa* presentan fenotipos muy similares a los de $\Delta cse-8$. Adicionalmente, se espera observar la expresión de CSE-8 bajo la acción del promotor *ccg-1* para observar su ubicación subcelular con más detalle. También, se realizará un análisis de las ascosporas de cruza sexuales entre una cepa con *Sec-24* etiquetada con mCherry, para confirmar la hipótesis de CSE-8 como una proteína de RE.

Literatura citada

- Abo Elsoud, M. M., & El Kady, E. M. 2019. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bullet of the National Research Centre*, 43, 59. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>
- Bartnicki-Garcia, S. 1987. Chitosomes and chitin biogenesis. *Food Hydrocolloids*, 1(5-6), 353–358. [https://doi:10.1016/s0268-005x\(87\)80025-5](https://doi:10.1016/s0268-005x(87)80025-5)
- Bartnicki-Garcia, S. 2006. Chitosomes: Past, present and future. *FEMS Yeast Research*, 6: 957-965. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00158.x>
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C. E., Reyes, E., Ruiz-Herrera, J. 1978. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in vitro. *Experimental Mycology*, 2(2), 173-192 pp. ISSN 0147-5975. [https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(78\)80031-0](https://doi.org/10.1016/S0147-5975(78)80031-0)
- Bent, K. J., & Morton, A. G. 1963. Formation and nature of swollen hyphae in *Penicillium* and related fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(3), 401–407. [https://doi:10.1016/s0007-1536\(63\)80034-0](https://doi:10.1016/s0007-1536(63)80034-0)
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-38. <https://doi: 10.3732/ajb.1000298>
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Pratt, R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(1), 1–108. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.1.1-108.2004>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Cabib, E. 2004. The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.030>
- Cabib, E., Bowers, B., Roberts, R. L. 1983. Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(11), 3318-21. <https://doi:10.1073/pnas.80.11.3318>
- Cabib, E., & Schmidt, M. 2003. Chitin synthase III activity, but not the chitin ring, is required for remedial septa formation in budding yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 224, 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00477-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00477-4)
- Chattaway, F. W., Holmes, M. R. y Barlow, A. J. E. 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *Microbiology Society*, 51:3. <https://doi.org/10.1099/00221287-51-3-367>

- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601456103>
- Davis, R. H. 2000. *Neurospora: Contributions of a model organism*. New York, United States of America: Oxford University Press, Inc. ISBN: 978-0195122367.
- Dharwada, S. T., Dalton, L. E., Bean, B. D. M., Padmanabhan, N., Choi, C., Schluter, C., Davey, M., Conibear E. 2018. The chaperone Chs7 forms a stable complex with Chs3 and promotes its activity at the cell surface. *Traffic*, 19(4), 285-295. <https://doi.org/10.1111/tra.12553>
- Duran, A. 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 3952–3955. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.10.3952>
- Ene I. V., Walker, L. A., Schiavone, M., Lee, K. K., Martin-Yken, H., Dague, E., Gow, N. A., Munro, C. A., Brown, A. J. 2015. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*, 6(4), e00986. <https://doi.org/10.1128/mBio.00986-15>
- Fajardo-Somera, R. A., Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., Riquelme, M. 2015. Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 7, 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.01.002>
- Fischer, R., Zekert, N., Takeshita, N. 2008. Polarized growth in fungi-interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, 68(4), 813-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x>
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A. and Read, N. D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198, 246–259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00708.x>
- Fisher, K. E., & Roberson, R. W. 2016. Hyphal tip cytoplasmic organization in four zygomycetous fungi. *Mycologia*, 108(3), 533–542. <https://doi.org/10.3852/15-226>
- Free, S. J. 2013. Chapter two - Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics Academic Press*, 81 (33-82). ISBN 9780124076778. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>.
- Fu, J., Hettler, E., Wickes, B.L. 2006. Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(3), 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.09.007>.
- Gandía, M., Garrigues, S., Bolós, B., Manzanares, P., & Marcos, J. F. 2019. The myosin motor domain-containing chitin synthases are involved in cell wall integrity and sensitivity to antifungal proteins in *Penicillium digitatum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02400>

- Glaser, L., & Brown, D. H. 1957. The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. Journal of Biological Chemistry, 228(2), 729-742. ISSN 0021-9258. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70655-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70655-8).
- Goswami, R. S. 2012. Targeted gene replacement in fungi using a Split-marker approach. In: Bolton M., Thomma B. Plant Fungal Pathogens. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), 835. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_16
- Hickey, P. C., Jacobson, D. J., Read, N. D., Glass, N. L. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology, 37(1), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00035-X).
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. Microbial Imaging, 63-87. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34003-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34003-1)
- Jiménez-Gómez, C. P., Cecilia, J. A. 2020. Chitosan: A natural biopolymer with a wide and varied range of applications. Molecules, 1, 25(17), 3981. <https://doi: 10.3390/molecules25173981>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. Nature communications, 9(1), 1-12.
- Kappel, L., Münsterkötter, M., Sipos, G., Escobar-Rodriguez, C., Gruber, S. 2020. Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. PLOS Pathogens, 16(2), e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>
- Kar, B., Patel, P., Ao, J., Free, S. J. 2019. *Neurospora crassa* family GH72 glucanosyltransferases function to crosslink cell wall glycoprotein N-linked galactomannan to cell wall lichenin. Fungal Genetics and Biology, 123, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.11.007>
- Klis, F. M. 1994. Review: Cell wall assembly in yeast. Yeast, 10:851-869. <https://doi.org/10.1002/yea.320100702>
- Kopeček, P., & Raclavský, V. 1999. Comparison of chitin content in the apical and distal parts of fungal hyphae in *Basidiobolus ranarum*, *Neurospora crassa* and *Coprinus sterquilinus*. Folia Microbiologica, 44(4), 397-400. <https://doi.org/10.1007/bf02903712>.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., Vajda, S. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. Nature Protocols, 12(2), 255-278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Lesage, G., & Bussey, H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(2), 317-343. <https://doi.org/10.1128/mubr.00038-05>
- Letunic, I., & Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Research, 49 (2), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>

- Lipke, P. N., & Ovalle R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-40. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>
- Munro, C. A. 2013. Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. *Advances in Applied Microbiology*, 145–172. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407678-5.00004-0>
- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J., Bulawa, C. E., Gow, N. A. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Molecular Microbiology*, 39(5):1414–1426. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02347.x>
- Nobel, H. de, Ende, H. van den, Klis, F. M. 2000. Cell wall maintenance in fungi. *Trends in Microbiology*, 8, 344-345. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01805-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01805-9)
- Orlean, P. 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components, pp. 229–362 In: *Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N.Y. ISBN: 978-0879693640
- Orlean P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775-818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Pacheco-Arjona, J. R. & Ramirez-Prado, J. H. 2014. Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in *Aspergillus* genomes. *PloS one*, 9(8), e104920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104920>
- Pammer, M., P. Briza, A., Ellinger, T. Schuster, R. Stucka, Brteintenbach, M. 1992. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast*, 8(12), 1089-99. <https://doi.org/10.1002/yea.320081211>.
- Raghukumar, S. 2017. Fungi: characteristics and classification. In: *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8_1
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A., Roncero, C. 2007. Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 120, 1998-2009. <https://doi.org/10.1242/jcs.005124>
- Rico-Ramírez, A. M. 2018. Biogénesis y tráfico de quitosomas acarreadores de la CHS-4, una quitina sintasa clase IV, en hifas de *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., 12 pp.
- Rico-Ramírez, A. M., Roberson, R. W., Riquelme, M. 2018. Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.006>
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Riquelme, M. 2013. Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67, 587-609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>

- Riquelme, M., & Bartnicki-García, S. 2008. Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews*, 22(2), 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.05.003>
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A., Freitag, M. 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1853-64. <https://doi.org/10.1128/EC.00088-07>
- Roncero, C., Sanchez-Diaz, A., Valdivieso, M. H. 2016. 9 - Chitin synthesis and fungal cell morphogenesis. In: Hoffmeister, D. (eds) *Biochemistry and Molecular Biology. The Mycota*, Vol III. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_9
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., Durán, A. 1988. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *Journal of Bacteriology*, 170(4), 1950–1954. <https://doi.org/10.1128/jb.170.4.1950-1954.1988>
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Sambrook, J. F., & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1. ISBN: 1936113422
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S., & Riquelme, M. 2011. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell*, 10(5), 683-695. <https://doi.org/10.1128/EC.00280-10>
- Sanz, M., Carrano, L., Jiménez, C., Candiani, G., Trilla, J. A., Durán, A., Roncero, C. 2005. *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology*, 151(8), 2623-2636. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28093-0>
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A., Roncero, C. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology*, 150, 3229–3241. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27352-0>
- Sanz, M., Trilla, J. A., Duran, A., Roncero, C. 2002. Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1183-95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02812.x>
- Seaman, M. N. 2008. Endosome protein sorting: Motifs and machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(18), 2842-58. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8354-1>
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A., Cabib, E. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 114(1), 111–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.111>

- Sudoh, M., Tatsuno, K., Ono, N., Ohta, A., Chibana, H., Yamada-Okabe, H., Arisawa, M. (1999). The *Candida albicans* CHS4 gene complements a *Saccharomyces cerevisiae* skt5/chs4 mutation and is involved in chitin biosynthesis. *Microbiology*, 145(7), 1613–1622. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1613>
- Takeshita, N. 2016. Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(9), 1693–1699. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1179092>
- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H. 2006. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Molecular Microbiology*, 59, 1380–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05030.x>
- Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster, M., Steinberg, G. 2010. The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 22(7), 2476–2494. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075028>
- Trilla, J. A., Durán, A., & Roncero, C. 1999. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(6), 1153–1163. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.6.1153>
- Vargas, M. M., Aronson, J. M., Roberson, R. W. 1993. The cytoplasmic organization of hyphal tip cells in the fungus *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*, 176(1-2), 43–52. doi:10.1007/bf01378938
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74, 1044–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x>
- Verdín, J., Sánchez-León, E., Rico-Ramírez, A. M., Martínez-Núñez, L., Fajardo-Somera, R. A., Riquelme, M. 2019. Off the wall: The rhyme and reason of *Neurospora crassa* hyphal morphogenesis. *The Cell Surface*, 5.
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42–47.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E., Steinberg, G. 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, 18, 225–242. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037341>
- Westergaard, M., & Mitchell, H. K. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34(10), 573–577. <https://doi.org/10.2307/2437339>
- Yarden, O., & Yanofsky, C. 1991. Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 5(12b), 2420–2430. <https://doi.org/10.1101/gad.5.12b.2420>

Anexos

Anexo A: Preparación de Solución 2X para MSC

1. Pesar las cantidades indicadas en la Tabla 1A para cada compuesto.
2. Disolver cada compuesto y solución en 1 L de agua destilada estéril. Añadir cada compuesto por separado y esperar hasta su disolución para evitar la formación de aglomerados.
3. Añadir 2 mL a la solución preparada. Usar campana de extracción.
4. Almacenar la solución a 4°C

Tabla 11. Composición de la solución 2X para MSC.

Compuesto	Cantidad
KNO ₃	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.0 g
NaCl	0.2 g
CaCl ₂	0.2 g
Biotina	10 mg
Solución de Elementos Traza	0.2 mL

Anexo B: Datos de determinación de contenido de N-acetilglucosamina

Tabla 12. Resultados de determinación de contenido de de N-acetilglucosamina en 0.01 g de micelio liofilizado de las cepas $\Delta cse-8$, FGSC #988 y FGSC #9718.

FGSC #988	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Biomasa ($\mu\text{g/mL}$)	10450	10420	10500	10710	10750	10870	10600	10310
Media de las absorbancias a 520 nm	1.7	1.6	1.8	2.1	2.0	2.4	2.2	1.5
Concentración de quitina por muestra ($\mu\text{g/mL}$)	261	253	287	323	310	388	355	231
Concentración de quitina en 0.01 g	250	243	273	302	288	357	335	224
FGSC #9718	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Biomasa ($\mu\text{g/mL}$)	10410	10510	10530	10260	10350	10000	10180	10140
Media de las absorbancias a 520 nm	1.4	1.9	1.5	1.7	1.6	1.3	1.9	1.3
Concentración de quitina muestra ($\mu\text{g/mL}$)	220	303	231	261	245	201	301	196
Concentración de quitina en 0.01 g	211	288	219	255	237	201	296	194
$\Delta cse-8$	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Biomasa ($\mu\text{g/mL}$)	10590	10370	10480	10370	10500	10250	10560	10120
Media de las absorbancias a 520 nm	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0
Concentración de quitina muestra ($\mu\text{g/mL}$)	133	128	147	144	148	162	158	151
Concentración de quitina en 0.01 g	126	123	141	139	141	158	150	149