

Comprendiendo la función de las vesículas extracelulares de *Neurospora crassa*

Daniel Alfonso Salgado-Bautista¹, Rubén Darío Cadena-Nava² y Meritxell Riquelme¹.

¹Departamento de Microbiología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, México. C.P.: 22860. ²Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada, Baja California, México. C.P.: 22860. e-mail: em.daniel.alf@gmail.com

Palabras clave: *Neurospora crassa*, vesículas extracelulares, proteómica

Introducción. Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras de bicapa lipídica utilizadas por diferentes tipos de células para la liberación de metabolitos, ARN, ADN y proteínas a la región extracelular (1). El estudio de las VEs fúngicas ha tomado importancia desde el 2007, cuando se identificaron en *Cryptococcus neoformans* con un papel importante en la patogénesis (2). Recientemente, se publicó el proteoma de las VEs provenientes de *N. crassa* (3), un hongo ampliamente estudiado.

Para comprender la función de las VEs durante el crecimiento fúngico, y además obtener información acerca de su biogénesis, se analizaron las proteínas cargo en VEs de *N. crassa* proveniente de dos condiciones en una etapa de crecimiento temprana, así como, su diámetro hidrodinámico.

Metodología. Se inocularon 2×10^8 conidios de *N. crassa* #988 en 400 mL de medio mínimo de Vogel suplementado con sacarosa (MMS) o glucosa (MMG) (1.5%) en un Matraz Erlenmeyer de 1L. Se incubó por 16h a 30°C y con una agitación de 150 rpm. El cultivo se filtró para separar la biomasa, y el filtrado fue procesado por centrifugación diferencial: 300g por 5 min, 4000g por 30 min y 150000g por 3h. El pellet recuperado se lavó con 20mM Tris-HCL pH 7.2 (20BT) y nuevamente se ultracentrifugó a 350000g por 4h. El pellet se resuspendió con 20BT, y centrifugó a 10000g para eliminar sólidos. El diámetro hidrodinámico de las VEs se estimó por DLS, la proteína se cuantificó por BCA y se analizó por LC-MS/MS. Se usaron MASCOT y ProteoIQ para el análisis de las proteínas identificadas.

Resultados. Se encontraron diferencias en el diámetro hidrodinámico de las VEs (Fig. 1) siendo ligeramente mayor con MMG (dh=78.82 nm) que con MMS (dh=58.77 nm). No se observaron diferencias significativas en el número de proteínas identificadas; sin embargo, se identificaron 8 proteínas sobre-reguladas con MMS y 100 proteínas con MMG. Además, se observó un alto número de proteínas consideradas intracelulares (Fig. 2). Una Glicosidasa

(Q7S222) y la non-anchored cell wall protein (Q1K5A2) fueron las más abundantes.

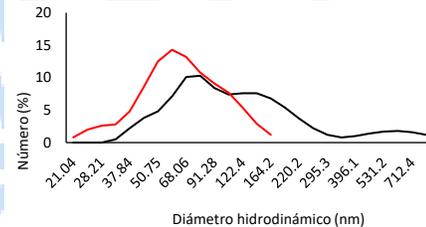


Fig. 1. Diámetro hidrodinámico de las VEs de *N. crassa* #988 provenientes de medio con MMG (línea negra) o MMS (línea roja) al 1.5%. Se utilizaron tres réplicas biológicas.

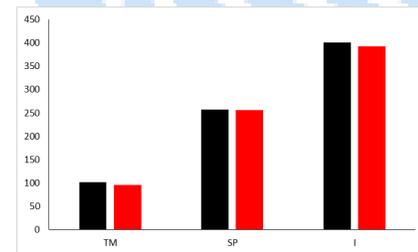


Fig. 2. Número de proteínas cargo de las VEs de *N. crassa* #988. Barras negras corresponden a MMG, barras rojas corresponden a MMS. TM=proteínas transmembranales; SP= proteínas con péptido señal; I= proteínas intracelulares.

Conclusiones. Existen diferencias en el diámetro dinámico de las VEs de *N. crassa*, siendo mayor con MMG que con MMS. No hay diferencias significativas en las proteínas cargo de las EVs obtenidas con ambos sustratos. Sin embargo, si hubo diferencias en cuanto a la abundancia, siendo la glucosa un factor que favorece la síntesis de cien proteínas. Además, el alto número de proteínas intracelulares y asociadas a pared celular sugieren que las VEs son relevantes para la secreción no convencional y la biosíntesis de pared celular.

Agradecimiento. DABS agradece al CONACyT por la beca posdoctoral de continuidad 2022.

Bibliografía.

- Liebana-Jordan, M. et al. (2021). Int J Mol Sci. 22(13), 7221.
- Rodríguez, M. L. et al. (2007). Eukaryot Cell. 6, 48.
- Medina-Castellanos E. et al., (2023). Fungal Genet. Biol. 165, 103778