



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

La proteína de reticulón RTN1 del hongo filamentoso
Podospora anserina y su papel en el desarrollo sexual

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ANTONIO DE JESÚS LÓPEZ FUENTES



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES**

CIUDAD DE UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
López
Fuentes
Antonio de Jesús
55 37 28 36 44
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309147736
2. Datos del tutor
Dr.
Carlos Leonardo
Peraza
Reyes
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Hermelinda Margarita
Villegas
Ríos
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Rodolfo
Salas
Lizana
7. Datos del trabajo escrito.
La proteína de reticulón RTN1 del hongo filamentoso *Podospora anserina* y su papel en el desarrollo sexual
95 páginas
2016

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes, en el Departamento de Bioquímica y Biología estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del proyecto titulado **"La dinámica y las interacciones del peroxisoma, la mitocondria y el retículo endoplásmico durante el desarrollo sexual del hongo *Podospora anserina*"** del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con clave IA201815, de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la educación brindada y en especial, a la Facultad de Ciencias, por el espacio y la virtud de sus profesores en formar científicos profesionales.

A mi tutor, el Dr. Leonardo Peraza Reyes, muchas gracias por brindarme la oportunidad de trabajar a tu lado, por enseñarme, apoyarme y seguir haciéndolo.

A los miembros del jurado, el Dr. Víctor Valdés, la Dr. Margarita Villegas, el Dr. Rodolfo Salas y la Dra. Laura Kawasaki, por tomarse el tiempo de leer y revisar esta tesis y dar sus mejores consejos y correcciones.

A los investigadores del I.F.C, el Dr. Francisco Torres, el Dr. Jesús Aguirre, el Dr. Wilhelm Hansberg, el Dr. Fernando Suaste, la Dra. Paola Moreno y la Dra. Martha Contreras, quienes nos facilitaron con el uso de diversos instrumentos y nos apoyaron con algunas técnicas de laboratorio.

A mi familia, en especial a mis padres por permitirme seguir mis sueños, a mis hermanas quienes por mucho tiempo han sido y serán un gran ejemplo en mi vida y a mis sobrinos, los cuales inundan la casa de alegría.

A Daniel Benítez, gracias por todo el amor y cariño que me has brindado.

A mis amigos, Elizabeth, Serrat y Tochi, gracias por todo su apoyo y por estar presentes cuando más los necesito.

A mis amigas de la Facultad, en especial a Zaida y Eileen, pues son muy importantes para mí.

A todos los miembros del laboratorio 101-Oriente y quienes formaron parte de él: Karime, Harumi, Claudia, Jorge, Aldo, Anaid, Paco y Cynthia G, quienes convierten ese espacio en un lugar más divertido.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	8
I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
1. El retículo endoplásmico.	10
1.1. Arquitectura y función del retículo endoplásmico.	10
1.2. La conformación y la dinámica del retículo endoplásmico.	17
1.3. Los reticulones.	19
2. La diferenciación celular en hongos filamentosos.	20
2.1. <i>Podospora anserina</i> como modelo de estudio.	21
III. ANTECEDENTES.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Análisis bioinformáticos.	31
1.1. Análisis de secuencias para la identificación y caracterización de las proteínas RTN.	31
1.1.1. Identificación de las proteínas RTN de <i>P. anserina</i>	31
1.1.2. Comparación de los ortólogos de la proteína RTN en diversos genomas fúngicos.	31
1.1.3. Dominios presentes en la proteína putativa RTN1.	32
1.1.4. Análisis de secuencias de proteínas ortólogas.	32
1.1.5. Marcadores de secuencia expresados (<i>EST</i>).	32
1.2. Diseño de las secuencias de los oligonucleótidos.	32
2. Generación de las cepas mutantes de delección de <i>RTN1</i>	33
3. Técnicas de biología molecular.	35
3.1. Purificación de productos de PCR.....	35
3.2. Almacenamiento de cepas y plásmidos.	36
4. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	36
4.1. Células competentes de <i>E. coli</i> usando cloruro de calcio (CaCl ₂). ..	36

4.2.	Transformación para células competentes de <i>E. coli</i> con CaCl ₂	37
5.	Extracción de DNA de <i>P. anserina</i>	37
6.	Transformación de <i>P. anserina</i>	38
6.1.	Formación de protoplastos.	38
6.2.	Transformación de protoplastos de <i>P. anserina</i>	39
7.	Cepas y plásmidos	39
8.	Medios y condiciones de cultivo.	40
8.1.	Medios de crecimiento.	40
8.2.	Envejecimiento.	41
8.3.	Cruzas sexuales.	41
8.4.	Recolección y germinación de las ascosporas.....	41
8.5.	Medio para la regeneración de protoplastos.....	41
8.6.	Medios selectivos	42
9.	Análisis citológicos y microscopía.....	42
9.1.	Observación de la distribución nuclear en el micelio.	42
9.2.	Estructuras sexuales.	42
9.2.1.	Fijación de peritecios y tinción de ascosporas.	42
9.3.	Microscopia de fluorescencia.....	43
10.	Ensayos de complementación genética.	43
VII.	RESULTADOS.....	45
1.-	Identificación de las proteínas de la familia de los reticulones de <i>Podospora anserina</i>	45
2.-	Generación de cepas mutantes de delección del gen <i>RTN1</i> de <i>P. anserina</i>	51
3.-	Caracterización de las mutantes de delección <i>Δrtn1</i> de <i>P. anserina</i>	56
3.1.-	La fase somática de las mutantes de delección <i>Δrtn1</i> de <i>P. anserina</i>	56
3.2.-	La fase sexual del desarrollo de las mutantes de delección <i>Δrtn1</i> de <i>P. anserina</i>	60
4.-	Ensayos de complementación genética de las mutantes de delección <i>Δrtn1</i> de <i>P. anserina</i>	69
VIII.	DISCUSIÓN	72
IX.	CONCLUSIONES	78

X.	PERSPECTIVAS	78
XI.	APÉNDICE	79
XII.	ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	88
1.	Tablas.	88
2.	Figuras.....	88
XIII.	BIBLIOGRAFÍA	89

ABREVIATURAS

3DEM¹

Microscopía electrónica tridimensional.

BLAST¹

Alineamiento de secuencias de tipo local.

Ca²⁺

Calcio.

CDD¹

Dominio de proteínas conservadas.

DNA¹

Ácido desoxirribonucleico

D.O.

Densidad óptica.

ERAD¹

Degradación asociada a retículo endoplásmico.

ERES¹

Respuesta a estrés de retículo endoplásmico.

ERMES¹

Estructura de encuentro mitocondria- retículo endoplásmico.

EST¹

Marcadores de secuencia expresados.

Pb

Pares de bases.

PCR¹

Reacción en cadena de la polimerasa.

PDI¹

Proteína disulfuroisomerasa.

PI

Fosfatidilinositol.

PPI¹

Proteína prolil isomerasa.

RE

Retículo endoplásmico.

REL

Retículo endoplásmico liso.

RER

Retículo endoplásmico rugoso.

RHD¹

Dominio de homología de reticulón.

RTN

Proteína de reticulón/reticulones.

SGD¹

Base de datos de *Saccharomyces cerevisiae*.

SH

Grupo sulfhidrido.

SRP¹

Partícula de reconocimiento de señal.

SPB¹

Cuerpos polares del huso acromático.

UPR¹

Respuesta de proteínas mal plegadas.

¹ Por sus siglas en inglés

I. RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo esencial que interviene en múltiples funciones celulares. Su arquitectura presenta un arreglo que está conformado por diferentes dominios estructurales, los cuales comprenden la envoltura nuclear y el área periférica. A su vez, en los dominios periféricos del RE podemos distinguir la formación de una red de láminas (cisternas) y túbulos que emergen de las membranas nucleares. El mantenimiento de estas estructuras requiere la participación activa de algunas proteínas estructurales como los reticulones (RTN), los cuales, gracias a sus dominios transmembranales conservados, tienen la capacidad de establecerse en la membrana lipídica del RE y modificar su topología. En este estudio, describimos a la única proteína de reticulón RTN1 del hongo filamentoso *P. anserina*. Demostramos que las mutantes carentes de la proteína RTN1 no tienen alteraciones en su crecimiento, ni en su pigmentación o en su envejecimiento durante la fase vegetativa. Sin embargo, esta proteína es necesaria durante el desarrollo sexual del hongo. En las mutantes *Δrtn1* se aprecia un aumento en la producción de ascas anormales que se caracterizan por contener un número y tamaño anormal de ascosporas. Además, se demuestra que esta producción anormal de ascosporas está relacionada con una mala segregación del material genético durante el desarrollo meiótico.

Palabras clave: Retículo endoplásmico (RE), reticulones, hongos, *P. anserina*, desarrollo sexual.

II. INTRODUCCIÓN

1. El retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico (RE) es el organelo membranoso celular más extenso. Es un organelo muy estudiado y actualmente, gracias a las mejoras en la identificación de las proteínas que lo conforman, así como la comprensión de los procesos para su mantenimiento y el avance en las técnicas de microscopía, se ha generado información importante para comprender su significado biológico, lo que a su vez, ha permitido establecer que la relación entre la forma y la función del RE se vuelvan un foco central de estudio (Westrate, Lee, Prinz, & Voeltz, 2015).

1.1. Arquitectura y función del retículo endoplásmico.

El RE es un organelo presente en todas las células eucariontes (Shibata et al., 2008), participa en una gran variedad de funciones celulares esenciales, incluyendo la síntesis, el procesamiento y la secreción de proteínas, la síntesis de lípidos, el almacenamiento y la liberación de calcio (Ca^{2+}) (Phillips & Voeltz, 2016). El arreglo del RE se caracteriza por comprender diferentes dominios estructurales, dentro de los cuales se pueden definir claramente la envoltura nuclear y el área periférica. Los dominios periféricos del RE están formados por una red de láminas (cisternas) y túbulos que emergen de las membranas nucleares y forman una arquitectura continua y cerrada (Shibata et al., 2008). A su vez, las membranas del RE delimitan un espacio interno común, al cual se le conoce como lumen del RE o espacio cisternal del RE (Alberts et al., 2015). A nivel ultraestructural existen dos tipos de RE: el rugoso con ribosomas adheridos (RER), y el liso, sin ribosomas (REL). Ambos son modificaciones regionales del mismo sistema de membranas (Chen, Novick, & Ferro-Novick, 2013) (Figura 1).

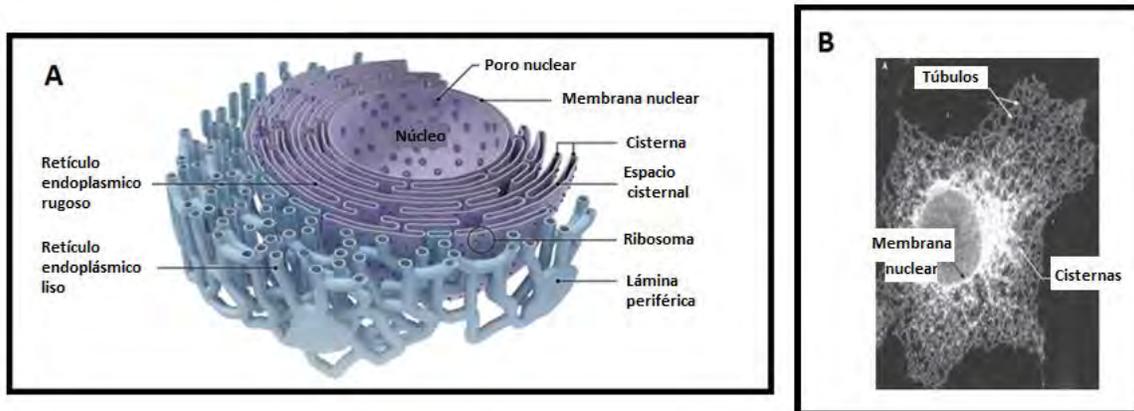


Figura 1. Arquitectura del retículo endoplásmico en una célula. A) Dominios estructurales del retículo endoplásmico (RE), se indica la envoltura nuclear (conformada por las membranas nucleares externa e interna), el área periférica conformada por el retículo endoplásmico rugoso (con presencia de ribosomas) y el retículo endoplásmico liso (constituido por túbulos y cisternas periféricas). B) Micrografía del RE señalando los túbulos y las cisternas. Modificado de Goyal & Blackstone (2013).

1.1.1. Síntesis, procesamiento y secreción de proteínas.

La membrana del RE es el sitio de producción de las proteínas de secreción y de la membrana plasmática, así como de los organelos del sistema de endomembranas celulares (las vías endocítica y secretoria) (Alberts et al., 2015; Gidalevitz, Stevens, & Argon, 2013; Johnson, Powis, & High, 2013). Una de las más notables especializaciones del RE es el RER (Alberts et al., 2015), quien ofrece un soporte a los ribosomas para que lleven a cabo la síntesis de las proteínas en este organelo (Chen et al., 2013). El RER está constituido primordialmente por una serie de láminas que proveen plataformas más estables a los polirribosomas que los túbulos, y que permiten un mejor soporte para la síntesis de proteínas. Esto a su vez, favorece que en las células eucariontes muchas de las proteínas comiencen a ser impotadas a la membrana del RE antes de que su cadena polipeptídica se haya sintetizado completamente, en un proceso llamado cotraduccional; mientras que la importación de la mayoría de las proteínas a la

mitocondria, los cloroplastos, el núcleo y los peroxisomas es un proceso postraducciona (Johnson et al., 2013). Asimismo, esto genera que las proteínas que son sintetizadas e importadas al RE, se puedan clasificar en dos tipos: las proteínas transmembranales, las cuales son parcialmente translocadas al organelo, y las proteínas solubles, las cuales son completamente translocadas a través de la membrana del RE (Alberts et al., 2015).

En este punto, para que las proteínas que serán destinadas al RE sean reconocidas, se utiliza una secuencia señal, la cual determina la localización de estas proteínas por un mecanismo en el que participan dos componentes principales: la partícula de reconocimiento de señal (*SRP*), quien actúa como un receptor citosólico de la secuencia señal de las proteínas del RE, y su receptor en la membrana del RE (Alberts et al., 2015; Johnson et al., 2013). A su vez, las proteínas residentes del RE logran permanecer en él pues presentan una señal de retención conformada por cuatro residuos de aminoácidos (-KDEL o -HDEL) en su dominio carboxilo terminal (Alberts et al., 2015). Una vez que ya están ahí, el RER también constituye una zona donde ocurre de manera importante la modificación postraducciona y el plegamiento de las proteínas del RE (Westrate et al., 2015). En este proceso interviene un gran número de proteínas chaperonas –como la proteína chaperona BiP– que facilita el correcto plegamiento de las proteínas del RE conforme son importadas al organelo (Aebi, 2013; Gidalevitz et al., 2013). Asimismo, en el RE también se cataliza la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres (SH) en las cisteínas de las proteínas para formar su enlace disulfuro. En este proceso intervienen la disulfuroisomerasa (*PDI*) y la prolil isomerasa (*PPI*), quienes definen la estructura, la función y la regulación de las proteínas del RE (Gidalevitz et al., 2013). Por su parte, las proteínas del RE que siguen la vía secretoria son glicosiladas –mediante N-glicosilación– en el lumen de este organelo antes de ser exportadas y

destinadas a otros organelos (Wendland, 2015). Esta ruta de glicosilación, la cual se lleva a cabo en el RE con ayuda de un complejo enzimático de oligosacariltransferasa y una molécula lipídica especial llamada dolicol, transfieren un bloque de oligosacáridos precursores a la cadena lateral del grupo amino o a un aminoácido asparagina presente en las proteínas, logrando con ello múltiples implicaciones que son esenciales para la homeostasis del RE (Aebi, 2013; Cherepanova, Shrimal, & Gilmore, 2016).

Existe también, un sistema de control de calidad de las proteínas del RE, el cual monitorea los niveles de las proteínas mal plegadas e impide su acumulación. Este sistema, conocido como la respuesta a las proteínas desplegadas (*UPR*), tiene la capacidad de activar la vía de degradación asociada a RE (*ERAD*) (Cherepanova et al., 2016), e incluso, este sistema puede determinar el destino celular e inducir muerte celular programada (apoptosis) asociada a estrés de RE (*ERES*) para proteger al organismo mediante la eliminación de proteínas mal plegadas, las cuales son exportadas del RE mediante vesículas que se forman en dominios específicos del mismo, conocidos como sitios de salida del RE (Gidalevitz et al., 2013). Una vez que la mayoría de las proteínas pasan el control de calidad en el RE, existe un control de tráfico vesicular a partir de este organelo, el cual es esencial para que las proteínas sean destinadas a la vía secretoria y lleguen hasta el aparato de Golgi (D'Arcangelo, Stahmer, & Miller, 2013), donde posteriormente serán dirigidas a los diferentes organelos del sistema de endomembranas (Fribley, Zhang, & Kaufman, 2009). Por otra parte, existe una relación entre la forma que adopta el RE y los requerimientos celulares de secreción de proteínas que se establecen de acuerdo a cada tipo celular. Por ejemplo, células con una alta actividad secretora, como las células pancreáticas, poseen un mayor número de láminas apiladas de RER; mientras que en células con una baja actividad secretora, como

las células neuronales, musculares o epiteliales, hay una gran formación de redes tubulares carentes de ribosomas (Westrate et al., 2015).

1.1.2. Síntesis de lípidos.

La membrana del RE es el sitio de mayor biosíntesis de lípidos (Wendland, 2015), incluyendo tanto los fosfolípidos como el colesterol y las ceramidas requeridas para la producción de nuevas membranas celulares (Alberts et al., 2015; Armesto et al., 2011). Entre los fosfolípidos más elaborados por el RE se encuentra la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y, en menor proporción, el fosfatidilinositol (Bishop & Bell, 1988; Daleke, 2003). Por su parte, se ha descrito que la zona tubular del RE, específicamente el REL, es la región primaria en la cual estos lípidos se originan (Westrate et al., 2015). De manera importante, recientemente se ha descrito que en esta zona también se establecen múltiples sitios de contacto entre la membrana del RE y la membrana plasmática o la de otros organelos (ver sección 1.1.4), lo que favorece la formación e intercambio entre organelos de moléculas pequeñas como los lípidos y el calcio (Voss, Lahiri, Young, Loewen, & Prinz, 2012).

1.1.3. Almacenamiento y liberación de calcio (Ca²⁺).

El RE se caracteriza por almacenar calcio y iones que funcionan en muchas cascadas de transducción de señales (Meldolesi & Pozzan, 1998). En los mamíferos, la liberación de calcio desde el RE se produce en las neuronas en respuesta a una gran variedad de señalizaciones, que incluyen neurotransmisores y factores neurotróficos (Pinton et al., 2001). Existen dos tipos de canales mediadores de la liberación de calcio en el RE, los receptores de inositoltrifosfato y los receptores de

rianodina, mientras que el almacenamiento de calcio en el RE está mediado por una actividad de ATPasa (Wang, Mattson, & Furukawa, 2002). En los mamíferos, ambos procesos pueden influir en el crecimiento de las neuritas, la plasticidad sináptica, la supervivencia celular o la muerte, además de que la excesiva liberación de calcio puede contribuir a la disfunción neuronal o algunas condiciones patológicas, incluyendo la isquemia cerebrovascular y la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2002). En las células musculares podemos encontrar una modificación abundante del REL llamada retículo sarcoplásmico, la cual se encarga de la liberación y reabsorción del Ca^{2+} que desencadena la contracción y relajación de las miofibrillas en cada contracción muscular (Alberts et al., 2015).

1.1.4. Las interacciones con otros organelos.

El RE tiene la capacidad de generar organelos distintos a partir de él, los cuales difieren tanto en su morfología como en su función (English & Voeltz, 2013). Por otra parte, diferentes dominios del RE también establecen sitios de contacto con la membrana plasmática y con organelos, como el aparato de Golgi, los endosomas, las vacuolas, las mitocondrias, las gotas lipídicas y los peroxisomas (English & Voeltz, 2013; Wendland, 2015). Estos sitios de contacto son muy abundantes, se encuentran dispersos por todo el citoplasma y son de importancia en la regulación de la actividad de los diversos organelos. A su vez, estos sitios de contacto también pueden influir en la arquitectura y función del RE (English & Voeltz, 2013).

El REL es el lugar en donde se establece la mayoría de las interacciones del RE (Chen et al., 2013). Gracias a la microscopía de fluorescencia de alta resolución, a la microscopía electrónica tridimensional (*3DEM*) y a numerosos ensayos de bioquímica, se ha

podido caracterizar los sitios de contacto que el RE establece con otros organelos, así como su papel en la dinámica, la biogénesis y la función de ellos (Agrawal, Joshi, & Subramani, 2011; English & Voeltz, 2013; Friedman & Voeltz, 2011; Glick & Nakano, 2009; Lam, Yoda, & Schekman, 2010; Rizzuto et al., 1998; van der Zand, Gent, Braakman, & Tabak, 2012). Entre estas interacciones destaca la que el RE establece con el aparato de Golgi, en la cual se regula la transferencia de proteínas y lípidos (Glick & Nakano, 2009) tanto por medio del transporte anterógrado (mediado por el complejo de proteínas de revestimiento COP II) como por el retrogrado de vesículas (mediado por COP I) (Barlowe et al., 1994; D'Arcangelo et al., 2013; Hanada, 2010; Ladinsky, Mastronarde, McIntosh, Howell, & Staehelin, 1999; Malhotra, Serafini, Orci, Shepherd, & Rothman, 1989). Asimismo, en los sitios de contacto entre el RE y los endosomas ocurre el intercambio de lípidos y esteroides (English & Voeltz, 2013), se monitorea y regula los niveles de colesterol de la vía endocítica (cuya acumulación afectaría la dirección del tráfico de los endosomas tardíos) (Rocha et al., 2009) y se facilita la división de los endosomas (Rowland, Chitwood, Phillips, & Voeltz, 2014).

Una de las interacciones más estudiadas es la que el RE establece con las mitocondrias. Los sitios de contacto entre estos organelos están altamente conservados y están asociados con funciones importantes, como la transferencia de calcio, la regulación de la señalización por esta molécula y la biosíntesis de lípidos (Friedman & Voeltz, 2011; Rizzuto et al., 1998; Vance, 1990). Tal es la magnitud de esta interacción que en los sitios de contacto RE-mitocondrias se facilita la biogénesis de la membrana mitocondrial, que requiere de la importación de fosfolípidos provenientes del RE (específicamente del transporte de fosfatidilserina) (Voss et al., 2012), y se controla tanto la división como la herencia de este organelo (Boldogh & Pon, 2007). Cabe resaltar que se han esclarecido muchos de los componentes responsables de establecer los sitios de contacto entre estos dos organelos; por ejemplo, en hongos

como *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas del complejo *ERMES* constituyen un cierre molecular que une el RE con la membrana externa mitocondrial (Kornmann & Walter, 2010). Finalmente, organelos como los peroxisomas reciben mucho de su material inicial –incluyendo los lípidos y las proteínas de su membrana– del RE (Kim, Mullen, Schumann, & Lippincott-Schwartz, 2006; Lam et al., 2010), lo cual permite que los peroxisomas puedan formarse *de novo* en la célula (Agrawal & Subramani, 2016; David et al., 2013). Asimismo, el RE promueve una correcta orquestación de la dinámica y maduración peroxisomal (Agrawal et al., 2011; Lam et al., 2010; Raychaudhuri, Im, Hurley, & Prinz, 2006; van der Zand et al., 2012). Al igual que para las mitocondrias, se han identificado algunas de las proteínas responsables de establecer las interacciones físicas de estos organelos, tales como las peroxinas Pex29 y Pex30, que en *S. cerevisiae* interactúan dinámicamente con proteínas integrales de la membrana del RE, como Rtn1 y Yop, y modulan la biogénesis peroxisomal (Mast et al., 2016b).

1.2. La conformación y la dinámica del retículo endoplásmico.

El RE es una estructura compleja que logra mantener la continuidad e identidad de sus diferentes dominios gracias a interacciones con el citoesqueleto, la actividad de proteínas estructurales y la maquinaria de fusión homotípica de sus membranas (English & Voeltz, 2013). Es un organelo altamente dinámico y a través de su unión al citoesqueleto puede someterse continuamente a rearrreglos tanto de la zona de sus láminas como de sus túbulos. Estas modificaciones pueden involucrar la envoltura nuclear y los dominios periféricos del RE e incluir procesos de ramificación, retracción y fusión de diferentes dominios, o bien, su fraccionamiento durante la división celular (Chen et al., 2013).

1.2.1. Conformación de láminas y túbulos.

La morfología del RE de todos los organismos en que se ha estudiado –incluidos animales, levaduras y plantas– está regulada por proteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia de los reticulones (RTN) y de DP1/YOP1 (English & Voeltz, 2013). Estas proteínas están presentes a lo largo de las zonas tubulares del RE, en las zonas donde se conforman las uniones tubulares y en los bordes de las cisternas; promoviendo en ellas una alta curvatura de la membrana que permite generar una forma cóncava en la membrana del RE (Shemesh et al., 2014). Junto con éstas interactúan otras proteínas, como las pertenecientes a la familia de las atlastinas/RHD3/Sey1p, que se encargan de mediar la interacción y fusión homotípica de los túbulos del RE, proceso que resulta en la formación de uniones en tres sentidos en el RE tubular, que son responsables de conformar la red poligonal del RE periférico. El arreglo de esta red poligonal también depende de las proteínas lunapark, que actúan de forma antagónica a las atlastinas (Goyal & Blackstone, 2013). Por otro lado, en los hongos y los mamíferos se ha estudiado a las proteínas TMEM33 (o Per33) y TMEM170A, las cuales se localizan en el RE periférico y en la membrana de la envoltura nuclear y regulan la distribución de los complejos de los poros nucleares. Estas proteínas también promueven la formación de las láminas del RE actuando de manera antagónica a los reticulones, con quienes establecen interacciones físicas (Christodoulou, Santarella-Mellwig, Santama, & Mattaj, 2016; Urade, Yamamoto, Zhang, Ku, & Sakisaka, 2014). A su vez, existen diferentes proteínas que permiten la formación de las láminas del RE, entre ellas están las proteínas membranales con dominios de hélice superenrollada (*coiled-coil*) que actúan como estabilizadores de las membranas laminares de las cisternas –como p180– o como espaciadores que mantienen la distancia entre sus membranas –como CLIPM-63– e impiden que el lumen de

éstas se colapse (Goyal & Blackstone, 2013; Shibata, Voeltz, & Rapoport, 2006). Asimismo, algunas de las proteínas del complejo de translocación de proteínas del RE contribuyen a estabilizar las láminas de las cisternas (Puhka, Joensuu, Vihinen, Belevich, & Jokitalo, 2012). Actualmente, con la identificación y caracterización de la función que cumple cada uno de los elementos que participan en la conformación de las láminas y los túbulos del RE, se ha propuesto un modelo teórico que explica cómo es que dependiendo del tipo celular y estado funcional de la membrana del RE éste logra adoptar diferentes morfologías, incluida la red poligonal de túbulos interconectados y las láminas; las cuales pueden contener fenestraciones o estar apiladas una sobre otra (Shemesh et al., 2014).

1.3. Los reticulones.

Los reticulones (RTN) son proteínas integrales de la membrana del RE (Voeltz & Barr, 2013) que, junto a las proteínas de la familia DP1/YOP1, tienen la capacidad de formar homo- y hetero-oligómeros que favorecen la curvatura de la membrana del RE (Shibata, Hu, Kozlov, & Rapoport, 2009) (Figura 2). Además, estas proteínas favorecen el anclaje y la formación del complejo del poro nuclear (Goyal & Blackstone, 2013). Como características semejantes, ambas familias presentan un dominio homólogo, conocido como **RHD**, cuya característica principal es presentar alrededor de 200 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, mismos que favorecen la formación de segmentos transmembranales. El **RHD** consiste en un dominio de dos horquillas transmembranales separadas por un asa hidrofílica. Se ha determinado experimentalmente que los extremos amino y el carboxilo terminal de los reticulones se encuentran expuestos hacia el citosol; de manera que el dominio **RHD** adopta una topología inusual en la que la horquilla transmembranal ocupa más espacio en la capa externa de la

membrana del RE que en la capa interna, lo cual promueve la flexión y favorece las regiones de alta curvatura del RE (Westrate et al., 2015).

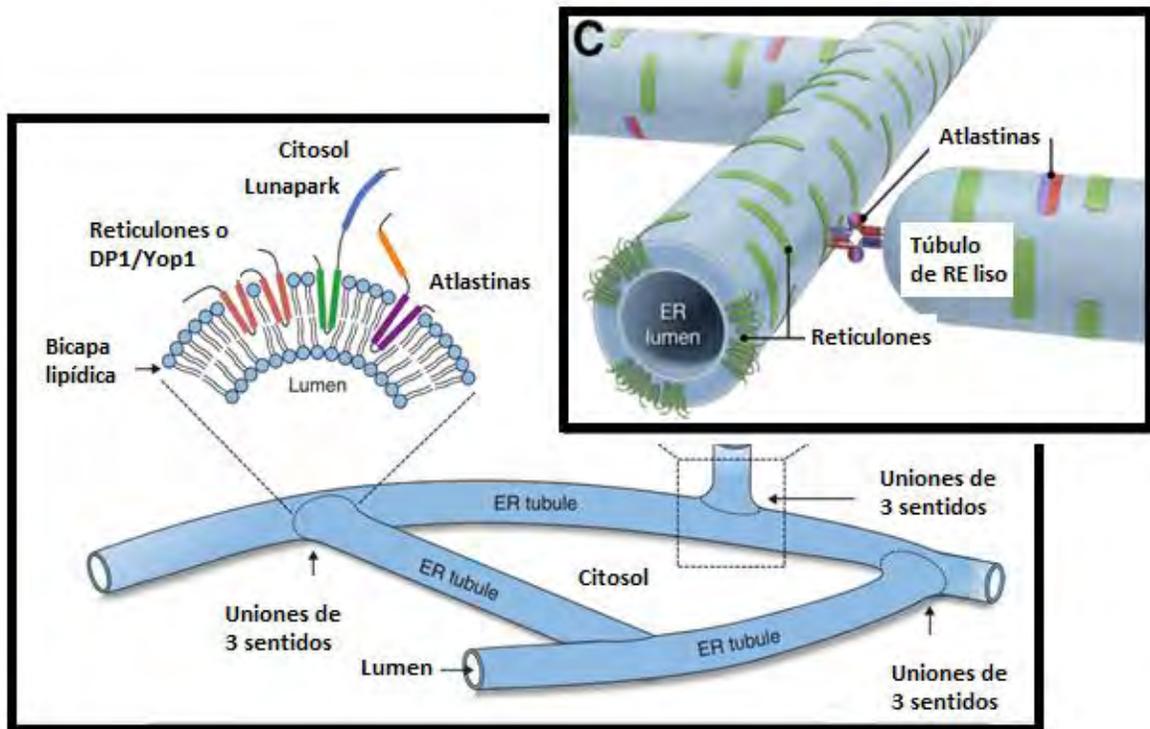


Figura 2. Modelo de la conformación de las proteínas estructurales del retículo endoplásmico. Se muestra la presencia de las proteínas de reticulón, DP1/Yop1, lunapark y las atlastinas en la bicapa lipídica y en las uniones de tres sentidos. Las atlastinas forman complejos trans-oligoméricos que catalizan la fusión de los túbulos del RE (recuadro). Modificado de (Chen et al., 2013; Goyal & Blackstone, 2013).

2. La diferenciación celular en hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos son organismos atractivos para estudiar cómo se determinan y regulan los procesos de diferenciación celular. Presentan distintos modos de vida, con una excelente capacidad para crecer en una gran variedad de materiales orgánicos, ya sea cuerpos vivos o muertos de animales, plantas u otros organismos, así como sus fragmentos, desechos o exudados (Borkovich & Ebbole, 2010). Para su

mantenimiento y estudio en el laboratorio, muchas especies de hongos son capaces de crecer y completar su ciclo de vida en medios de cultivo simples y bien definidos (Carlile, 1995). A su vez, en ellos se puede generar nuevos individuos a partir de la fragmentación de sus hifas o por el desarrollo de estructuras de propagación asexuales, como los conidios, o sexuales, como las meiosporas (Peraza-Reyes, 1997). Asimismo, sus ciclos de vida son cortos y se puede inducir un proceso sincrónico en el que se separen los estadios diferenciados para su análisis (Peraza-Reyes, 2005). Además, su micelio presenta totipotencialidad y habilidad para propagarse, ramificarse y formar patrones de desarrollo complejos (Carlile, 1995). Por su parte, su muerte celular generalmente es local, limitada a ciertas zonas o módulos no funcionales del micelio, con lo cual, clones de un mismo individuo genético pueden cubrir grandes superficies y vivir por mucho tiempo (Carlile, 1995; Smith, Bruhn, & Anderson, 1992). En lo que respecta a los ascomicetos filamentosos, presentan una gran biodiversidad, son uno de los tres grandes grupos de eucariontes multicelulares y son el grupo hermano de los animales, lo cual los vuelve organismos modelo muy representativos y comparables con otros sistemas vivos. Gracias a estas características, en ellos se puede realizar estudios de genética clásica e inversa, su manipulación molecular es simple y, además, la secuencia genómica de muchas especies representativas de diferentes linajes evolutivos ha sido determinada.

2.1. *Podospora anserina* como modelo de estudio.

Podospora anserina es un hongo filamentosos del Phylum Ascomycota perteneciente al orden de los Sordariales, en el que también son ubicados géneros como *Sordaria* y *Neurospora*. Se

caracteriza por ser un hongo saprobio con un ciclo de vida corto que se encuentra normalmente en el estiércol de animales herbívoros o materia vegetal en descomposición (Geydan, Debets, Verkley, & van Diepeningen, 2012).

P. anserina, ha sido un modelo celular en el cual se han estudiado los procesos de desarrollo sexual. Se sabe que su tipo de apareamiento está definido por una región genómica conocida como locus del tipo sexual (***MAT+*** y ***MAT-***), la cual lo convierte en un hongo heterotálico bipolar en el que se establecen dos tipos sexuales (Wendland, 2015). Su desarrollo comienza con la germinación de ascosporas, dando lugar a un micelio que tiene la capacidad de crecer en promedio 7 mm por día (P. Silar, 2013). Una vez que su micelio se ha desarrollado por 3 días, a una temperatura de 27°C y una humedad relativa del 85%, comienza una formación rápida de sus gametos, los cuales se diferencian en espermacios y ascogonios, mismos que son independientes de los genes del tipo sexual (Borkovich & Ebbole, 2010). Cuando los gametos están presentes y poseen un tipo sexual complementario, la fecundación se produce y comienzan a formarse los ascomas en un tiempo aproximado de 4 días, produciendo una progenie de cientos de meiosporas (ascosporas) que son expulsadas de forma continua por 5 días y que le permiten la dispersión relativamente lejana a su sustrato (P. Silar, 2013) (Figura 3 A). Específicamente, para llevar a cabo la plasmogamia, sus ascogonios desarrollan una hifa diferenciada –llamada tricógina- que se encarga de localizar a los espermacios del sexo complementario y, una vez que los núcleos complementarios (***MAT+*** y ***MAT-***) se asocian - en una estructura especializada llamada ***crozier***- se lleva a cabo la cariogamia la cual inmediatamente da inicio a la formación del asca donde se llevan a cabo los procesos de meiosis y mitosis post-meiótica, los cuales culminan con la formación de cuatro ascosporas (Wendland, 2015) (Figura 3 B).

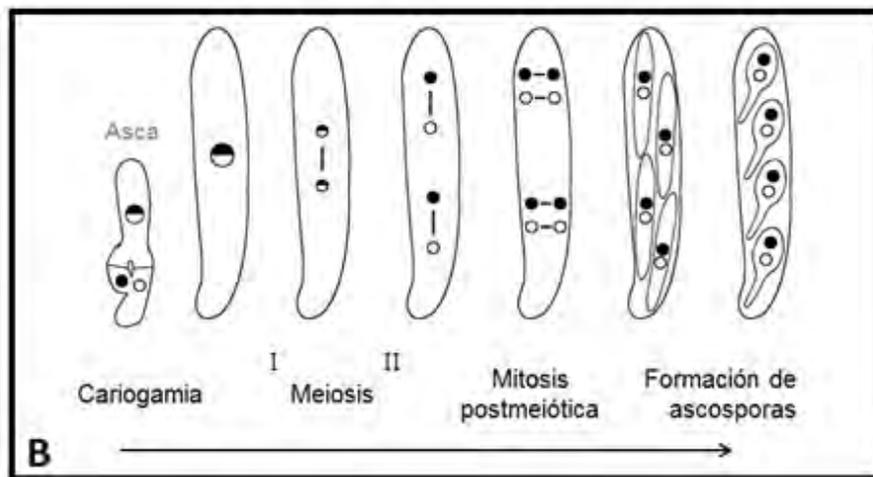
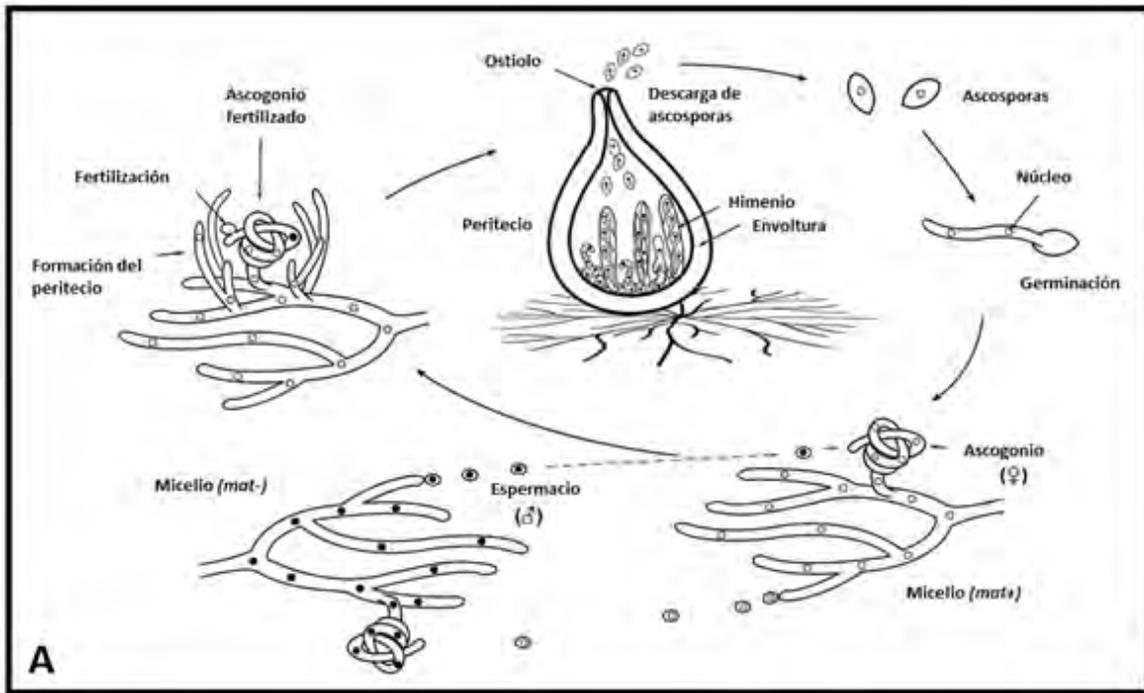


Figura 3. Ciclo de vida en *Podospora anserina*. A) El ciclo de vida de *P. anserina* comienza con la germinación de las ascosporas, las cuales desarrollarán un micelio (*MAT+* o *MAT-*) con capacidad de formar las estructuras sexuales (ascogonios y espermacios). La fertilización de un ascogonio por un espermacio del sexo complementario da lugar a los peritecios, los ascomas donde se desarrollan el tejido fértil (himenio) en que se formarán las ascas (meiocitos) con las esporas sexuales (ascosporas). B) Esquema del desarrollo meiótico que lleva a la formación de las ascosporas en *P. anserina*. La flecha negra indica el sentido de la progresión del desarrollo sexual, comenzando con la cariogamia (formación del estado diploide, $2n$), seguido de la meiosis I y meiosis II, la cual se da en sentido vertical y favorece la formación de cuatro núcleos haploides (n). Inmediatamente, pero en sentido

horizontal, se da la mitosis post-meiótica la cual finaliza con ocho núcleos haploides (n). Finalmente, se da un agrupamiento de los núcleos cercanos que conformarán a las cuatro ascosporas dicarióticas (n+n), las cuales usualmente contienen las versiones complementarias de los genes del tipo sexual (ver el texto para los detalles) (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013).

Durante este proceso, la mayoría de las ascosporas generadas son binucleadas y sus núcleos usualmente contienen las versiones alternativas de los genes del tipo sexual, por lo cual estas ascosporas generan un micelio dicariótico que puede formar ascogonios y espermacios de ambos tipos sexuales y es, por lo tanto, susceptible de autofertilizarse (desarrollo pseudohomotálico) (Wendland, 2015). Sin embargo, un porcentaje de aproximadamente 1% de sus esporas binucleadas (grandes) es remplazada por dos esporas uninucleadas (pequeñas), las cuales dan lugar a un micelio homocariótico de un solo tipo sexual cuyos gametos solo pueden ser fertilizados por células del tipo sexual opuesto (desarrollo heterotálico) (P Silar, 2013). En el laboratorio, ambos tipos de ascosporas, tanto dicarióticas como monocarióticas, se pueden obtener y aislar fácilmente; lo que permite realizar una gran diversidad de análisis genéticos.

Asimismo, *P. anserina* es considerado un modelo experimental de fácil manipulación (Espagne et al., 2008), ya que presenta ciertas ventajas con respecto a otros hongos filamentosos, entre las que destacan: (1) presencia de senescencia, por lo que por muchos años se ha utilizado como modelo de envejecimiento (Malagnac, Klapholz, & Silar, 2007; C. Q. Scheckhuber & Osiewacz, 2008); (2) es favorable para estudios de biorremediación, ya que presenta una gran maquinaria enzimática para degradar desde celulosa hasta la lignina; (3) es un hongo no patógeno (Harms, Schlosser, & Wick, 2011; P. Silar et al., 2011); (4) durante su desarrollo sexual se puede estudiar la diferenciación de muchos tipos celulares; (5) presenta morfogénesis de estructuras multicelulares complejas; (6) tiene estructuras subcelulares

fácilmente observables (mitocondrias, peroxisomas, núcleos, cromosomas), por lo que se puede estudiar con detalle la dinámica de estos organelos; (7) en este hongo ha sido posible estudiar el progreso nuclear a lo largo del desarrollo sexual (cariogamia, meiosis, mitosis, etc.) (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013; C. Q. Scheckhuber, Rodel, & Wustehube, 2008; P Silar, 2013); y (8) el genoma de *P. anserina* se encuentra secuenciado, está bien anotado y cuenta con una base de datos con toda la información, bibliografía y protocolos para trabajar con él (P. Silar, 2013).

III. ANTECEDENTES

El retículo endoplásmico es un organelo esencial para el funcionamiento óptimo de la célula. Para comprender su morfología, es necesario estudiar los elementos que favorecen el mantenimiento y regulación de sus dominios estructurales, tales como las proteínas de la familia de los reticulones, la familia DP1/Yop1, las atlastinas y las proteínas lunapark. Estos elementos han sido estudiados en diversos organismos que incluyen animales, plantas y hongos levaduriformes (Chen et al., 2013). En lo que respecta a la diversidad de los reticulones y sus funciones, estas proteínas se han encontrado en todas las especies de eucariontes en que se han buscado, como *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus* sp. y algunos mamíferos (Shibata et al., 2008), y se han identificado ortólogos de sus genes en los genomas de organismos representativos de los principales linajes eucariontes (Oertle, Klinger, Stuermer, & Schwab, 2003). Esto indica que los reticulones son una familia de proteínas altamente conservadas. Asimismo, en algunas especies existen varias isoformas de reticulones; por ejemplo, en los mamíferos existen cuatro genes que codifican para proteínas de reticulón (*RTN1*, *RTN2*, *RTN3* y *RTN4/Nogo*), los cuales a su vez codifican numerosas isoformas (RTN1A-C, RTN2A-C, RTN3A y -B, y RTN4/NogoA-C) que son generadas mediante empalme alternativo de exones y usando diferentes promotores. Comparativamente, en *S. cerevisiae* existen dos genes de reticulón (*RTN1* y *RTN2*), cada uno de ellos codifica una proteína (Rtn1p y Rtn2p); mientras que en *C. elegans* únicamente existe un gen de reticulón (*ret-1*), el cual codifica tres diferentes isoformas de la proteína (nRTN-A, nRTN-B y nRTN-C) (Westrate et al., 2015).

En estudios *in vitro* se ha reportado que las proteínas de reticulón son capaces de generar una curvatura en las membranas lipídicas

(Voeltz, Prinz, Shibata, Rist, & Rapoport, 2006). Asimismo, se ha reportado que la sobreproducción de ciertas isoformas de estas proteínas, en animales, plantas y levaduras, favorecen el alargamiento de las zonas tubulares y el decremento de las zonas laminares del RE (Shibata et al., 2008); mientras que la ausencia de las proteínas de reticulón genera el efecto contrario, es decir, un decremento de las zonas tubulares y un incremento en las zonas laminares (Tolley et al., 2010; Tolley et al., 2008; Voeltz et al., 2006). Esto fue confirmado con el modelo de generación e interconversión de la morfología del RE (Shemesh et al., 2014), con lo cual se ha corroborado que los reticulones son necesarios y suficientes para promover el arreglo tubular del RE (Westrate et al., 2015).

A nivel fisiológico, se ha demostrado que algunos de los efectos generados por la eliminación de los reticulones en levaduras, están relacionados con una reducción del crecimiento, mientras que la delección de los genes ortólogos de Rtn1P y Yop1p en *C. elegans* provoca un decremento de un 60% en la viabilidad embrionaria, sugiriendo que el correcto arreglo tubular del RE es funcionalmente importante en los eucariontes (Audhya, Desai, & Oegema, 2007; Shibata et al., 2008; Voeltz et al., 2006). Asimismo, en mamíferos se ha demostrado que los reticulones participan en la remodelación del RE que incluye la transformación entre cisternas y túbulos asociada al ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear durante la división celular (Puhka et al., 2012).

Otros estudios demuestran que los reticulones participan en el tráfico vesicular entre RE y Golgi (Wakana et al., 2005), facilitan el intercambio de lípidos entre RE y mitocondrias (Voss et al., 2012), participan en los sitios de fisión con los endosomas (Rowland et al., 2014; van der Goot & Gruenberg, 2014) y participan en el bloqueo de la herencia de RE cuando se presenta estrés del RE en la célula (Pina,

Fleming, Pogliano, & Niwa, 2016). Todos estos hallazgos subrayan la importancia de estudiar la arquitectura del RE, revelando que por medio de sus diversos dominios estructurales este organelo tiene la capacidad de interactuar y comunicarse con otras estructuras subcelulares, con las cuales contribuye al desarrollo celular (Knoblach & Rachubinski, 2013). Por lo tanto, el estudio de mutantes con defectos en la morfología del RE puede proveer nuevos e importantes conocimientos sobre cómo la dinámica del mismo participa en el desarrollo de los eucariontes (Chen et al., 2013). El hongo micelial *P. anserina* provee un modelo experimental óptimo en el cual se puede elucidar la importancia que tiene el mantenimiento estructural del RE en procesos del desarrollo complejos. A su vez, dada la gran cantidad de información que se ha generado en este hongo sobre la función y la regulación de la actividad de otros organelos durante el desarrollo –notablemente peroxisomas y mitocondrias– se puede proveer información relevante sobre la contribución de la dinámica y las interacciones del RE durante el desarrollo. Por ejemplo, en este hongo se ha comprobado que durante el desarrollo meiótico se requiere de una regulación precisa de la dinámica y el ensamblaje de los peroxisomas y que los defectos en estos procesos generan alteraciones en eventos clave del desarrollo sexual, como la cariogamia, el inicio de la meiosis, la segregación de los núcleos meióticos y la distribución de los núcleos postmeióticos en las esporas sexuales. Asimismo, la morfogénesis de las ascomas y la maduración y germinación de las esporas sexuales también dependen de este organelo (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). Sin embargo, así como en los hongos miceliales en general, en *P. anserina* no se sabe cómo se regula la estructura del RE, ni la participación que este proceso tiene sobre el desarrollo.

No obstante, ha sido evidente que los reticulones forman parte indispensable del arreglo tubular del RE e intervienen en la formación de

las zonas de contacto con otros organelos, como las mitocondrias y los peroxisomas (English & Voeltz, 2013), participan en el ensamblaje de los complejos del poro nuclear (Casey, Chen, Novick, Ferro-Novick, & Wente, 2015; Casey et al., 2012) y en el establecimiento del uso mitótico durante la división nuclear (Dawson, Lazarus, Hetzer, & Wente, 2009; Goyal & Blackstone, 2013). Por ello, como primer enfoque para entender la regulación estructural del RE y su importancia durante el desarrollo celular, se analizó como es que los defectos provocados por la eliminación genética de los reticulones afectan el desarrollo de *P. anserina*.

IV. HIPÓTESIS

El retículo endoplásmico es un organelo que desempeña funciones fundamentales dentro del sistema de endomembranas de la célula, en la organización y la dinámica de la envoltura nuclear, y en el establecimiento de las interacciones interorganelares celulares. Por ello, el mantenimiento del arreglo estructural de este organelo – en el que los reticulones concebiblemente participan- debe ser determinante para el desarrollo del hongo *P. anserina*.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar los efectos de las alteraciones del arreglo del retículo endoplásmico generadas por la ausencia de los reticulones en el desarrollo del hongo filamentoso *Podospora anserina*.

Objetivos particulares:

- ❖ Identificar los posibles genes codificantes para las proteínas de la familia de los reticulones (RTN) de *Podospora anserina*.
- ❖ Determinar el efecto que la ausencia de los reticulones genera durante la fase somática en *P. anserina*.
- ❖ Determinar los efectos de la ausencia de los reticulones en el desarrollo sexual de *P. anserina*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis bioinformáticos.

1.1. Análisis de secuencias para la identificación y caracterización de las proteínas RTN.

Este proceso involucró:

1.1.1. Identificación de las proteínas RTN de *P. anserina*.

A partir de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces Genome Database, SGD*, <http://www.yeastgenome.org/>) se localizó la secuencia de residuos de aminoácidos de las proteínas de reticulón Rtn1p y Rtn2p de esta levadura (Westrate et al., 2015). Con ellas se realizó una búsqueda de secuencias con alta similitud en la base de datos del genoma de *P. anserina* (Espagne et al., 2008) utilizando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, y se recuperaron las secuencias de acuerdo a su valor-e de corte significativo ≥ 0.005 . También, se realizó el *BLAST* empleando como secuencia de búsqueda a AN5404.2 de *Aspergillus nidulans*, Cwl1 de *Neurospora crassa*, *RTN1* de *Schizosaccharomyces pombe* y RTN3-A1 de *Homo sapiens*. En todos estos análisis, se descartó a las proteínas putativas con un valor-e ≥ 0.005 .

1.1.2. Comparación de los ortólogos de la proteína RTN en diversos genomas fúngicos.

Empleando el algoritmo de predicción *MaRiO pipeline* (Pereira, Denise, & Lespinet, 2014) de proteínas ortólogas del programa *FUNGIpath* (<http://fungipath.i2bc.paris-saclay.fr/index.php>) (Grossetete, Labedan, & Lespinet, 2010) se realizó una búsqueda a partir de la proteína identificada mediante los análisis de *BLAST* como Pa_1_22550, la proteína putativa RTN1 de *P. anserina*. Este algoritmo también identifica genes parálogos, lo que nos permitió confirmar la

existencia de un único gen para la familia de los reticulones en *P. anserina*.

1.1.3. Dominios presentes en la proteína putativa RTN1.

Los dominios presentes en la proteína putativa RTN1 de *P. anserina* fueron determinados utilizando la base de datos de dominios conservados de proteínas (CDD) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

1.1.4. Análisis de secuencias de proteínas ortólogas.

Las secuencias de proteínas ortólogas de la familia de los reticulones de diferentes organismos eucariontes fueron obtenidas de la base de datos de proteínas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los números de acceso de las secuencias utilizadas fueron los siguientes: Rtn1p de *S. cerevisiae* (NP_010519), AN5404.2 de *A. nidulans* (XP_663008), Cwl1 de *N. crassa* (XP_011394177), RTN1 de *S. pombe* (NP_00101878), RTN3-A1 de *Homo sapiens* (BAD96618) y la proteína like-reticulo-B17 de *Arabidopsis thaliana* (NP_179649). Los alineamientos de las secuencias de proteínas se hicieron con el algoritmo *ClustalW* presente en el programa *Bioedit 7.0* (Hall, 2005), el cual utilizó el algoritmo *BLOSUM62* para calcular la identidad y similitud de secuencias globales por pares. Asimismo, este programa fue utilizado para obtener los datos de identidad y similitud entre sus secuencias de residuos de aminoácidos, así como para determinar sus perfiles de hidrofobicidad con base en el índice hidropaticidad de Kyte & Doolittle (1982).

1.1.5. Marcadores de secuencia expresados (EST).

Los datos de *EST* en diferentes estadios del desarrollo de *P. anserina* fueron obtenidos del proyecto de secuenciación del genoma de este hongo (P Silar, 2013).

1.2. Diseño de las secuencias de los oligonucleótidos.

Los análisis de las secuencias de nucleótidos y proteínas se realizaron con los programas *Bioedit 7.0* (Hall, 2005) y *Serial Cloner* (V.2.6.1.), mientras que las secuencias genómicas se analizaron mediante el programa *ARTEMIS* (Carver et al., 2005). La secuencia de los oligonucleótidos fue diseñada con ayuda del programa Primer 3 (Untergasser et al., 2007).

2. Generación de las cepas mutantes de delección de *RTN1*.

Para generar la construcción de delección de *RTN1*, se siguió la técnica de PCR de fusión (P Silar, 2013). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se aprecia en la Tabla 2 (Ver apéndice).

Primero, se llevó a cabo la amplificación de los extremos 5´ y 3´ para la construcción del alelo adyacente. Para amplificar el extremo 5´ de 620 pb se utilizaron los oligonucleótidos hph-rtn-5r (*reverse*) y rtn5f (*forward*); para el extremo 3´ de 702 pb se utilizaron los oligonucleótidos rtn3r (*reverse*) y hphp-rtn-3f (*forward*). En ambos casos se utiliza de templado el DNA genómico de *P. anserina* cepa Wt+ y la DNA polimerasa *taq/platinum*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos con los siguientes pasos: 94 °C por 45 segundos para desnaturalizar, 65 °C por 45 segundos para alinear, 72 °C por un minuto para polimerizar y, una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

Segundo, se llevó a cabo la amplificación del gen *HPH*, codificante para la resistencia a higromicina. Para amplificar el *cassette* resistente a higromicina (C´) de 2.8 Kb se utilizaron los oligonucleótidos rtn-hph-r (*reverse*) y rtn-hph-f (*forward*). En esta reacción se usa como templado el DNA del plásmido pBC-Hygro y la DNA polimerasa *Primer Star*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 98 °C por 10 segundos, 15 ciclos con los siguientes pasos: 98 °C por 10 segundos para desnaturalizar, 55 °C por 15 segundos para alinear, 68 °C por 3 minutos para polimerizar, 20 ciclos con los siguientes pasos: 98 °C por 10 segundos para desnaturalizar,

60 °C por 15 segundos para alinear, 68 °C por 3 minutos para polimerizar y, una extensión final de 10 minutos a 68 °C.

Tercero, se generó el alelo adyacente por PCR de fusión con los productos purificados con el kit de purificación de PCR en gel de agarosa (*GE-Healthcare*). Para realizar el PCR de fusión y generar la construcción de 4.1 Kb (4122 pb) se utilizaron los oligonucleótidos *rtn-3r* (*reverse*) y *rtn-5f* (*forward*). En esta reacción se usa como templado los PCR purificados 5', 3' y C' en una relación molar 1:1:3 respectivamente y la DNA polimerasa *PFU*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos con los siguientes pasos: 94 °C por 45 segundos para desnaturalizar, 60 °C por 45 segundos para alinear, 72 °C por 8.5 minutos para polimerizar y, una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

El producto final del PCR de fusión fue purificado con el mismo kit de purificación en gel de electroforesis (*GE-Healthcare*) y fue usado para transformar a una cepa *Δku70*. De esta transformación, se seleccionaron cepas primarias resistentes a higromicina, las cuales fueron verificadas por PCR de revisión. Esta revisión, también se llevó a cabo con las cepas purificadas *Δrtn1* (*MAT+* y *MAT-*) obtenidas mediante cruces por la WT.

Las reacciones de PCR de revisión, se llevaron a cabo en 20 ó 25 µl de volumen total y fueron colocadas en un termociclador para llevar a cabo la amplificación del DNA, de acuerdo a los siguientes pasos:

Primero, se realizó el PCR de revisión del reemplazo completo de *rtn1* por *hph*. Para realizar este PCR de revisión, se utilizaron los oligonucleótidos *rtn-5ch* (*reverse*) y *rtn-3ch* (*forward*). La longitud esperada de la amplificación son 2.9 Kb en cepas sin la integración del *cassette* y de 4.4 Kb en cepas con integración de la construcción. En esta reacción se usa como templado de manera independiente DNA genómico de *P. anserina* de las cepas *Wt+*, *Δrtn1+*, *Δrtn1-* y primeras

transformantes. En este caso se usó la DNA polimerasa **Go-taq**, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 95 °C por 2 minutos, 25 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 segundos para desnaturalizar, 60 °C por 30 segundos para alinear, 72 °C por 4 minutos para polimerizar y, una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Segundo, para realizar los PCR de revisión de integración de la deleción, que amplifican el extremo 5´ de 1875 pb se utilizaron los oligonucleótidos hph-rc (**reverse**) y rtn-5ch (**forward**); para el extremo 3´ de 1582 pb se utilizaron los oligonucleótidos rtn-3ch (**reverse**) y hph-fc (**forward**). Mientras que, para realizar los PCR de revisión donde no se encuentra la integración del **cassette**, se utiliza para la amplificación del extremo 5´ de 988 pb, los oligonucleótidos 5-rtn (**reverse**) y rtn-5ch (**forward**) y, para el extremo 3´ de 1046 pb se utilizaron los oligonucleótidos rtn-3ch (**reverse**) y 3rtn (**forward**). En estas reacciones se usa como templado de manera independiente DNA genómico de ***P. anserina*** de la cepas **Wt+**, **Δ rtn1+**, **Δ rtn1-** y primeras transformantes y la DNA polimerasa **Go-taq**, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 95 °C por 2 minutos, 25 ciclos con los siguientes pasos: 95 °C por 30 segundos para desnaturalizar, 57 °C por 30 segundos para alinear, 72 °C por 2 minutos para polimerizar y, una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Nota: Las imágenes recuperadas de los geles de electroforesis de los PCRs mostrados fueron tomadas con ayuda del foto documentador **AlphaDigiDoc™.

3. Técnicas de biología molecular.

3.1. Purificación de productos de PCR.

La purificación de productos de PCR y de los plásmidos de ***E. coli*** se llevó a cabo con el kit de purificación de PCR en gel de agarosa (**GE-**

Healthcare) y el kit de extracción de DNA *Spin* miniprep y microcentrífuga (*QIAGEN*). El procedimiento se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2. Almacenamiento de cepas y plásmidos.

Todas las cepas de hongos y bacterias fueron almacenadas a -70 °C. Las cepas de *P. anserina*, son recolectadas de medio M2 con 2 días de crecimiento en obscuridad, a 27 °C y 85% de humedad, y son almacenadas en un vial con 1 mL de medio RG líquido (Ver apéndice). Las cepas y plásmidos de *E. coli* fueron almacenadas en medio LB con 20% de glicerol (Ver apéndice).

4. Transformación de *Escherichia coli*.

4.1. Células competentes de *E. coli* usando cloruro de calcio (CaCl₂).

Use una colonia de *E. coli* desarrollada en un medio LB sólido (Ver apéndice) e incubada a 37 °C por 16-20 horas, fue transferida a un tubo con 15 ml de medio LB líquido (Ver apéndice) y se deja incubar a 37 °C toda la noche. Posterior a este tiempo, con ayuda de una celda de espectrofotómetro se midió la absorbancia de 1 mL del cultivo revisando que su densidad óptica (D.O.) sea igual a 1.0. Se midió 100 mL de medio LB y se añadieron 5 mL del cultivo previo, logrando una densidad óptica de 0.05. Se pusieron a crecer a 37 °C por 3 horas y agitación. Se midió la densidad óptica repetidamente hasta llegar a una **D.O. ≤0.4. Se separó** en dos tubos para centrifuga de 50 mL del medio y se centrifugó a 2700 g x 10 minutos a 4 °C. Se retira el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 30mL de CaCl₂-MgCl₂. Se volvió a centrifugar a 2700 g x 10 minutos a 4 °C. Una vez más se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 2 mL de CaCl₂ frío. Se adicionó 280 µL de DMSO y se dejó en hielo por 15 minutos. Se realizaron alícuotas de 200 µL y se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C.

4.2. Transformación para células competentes de *E. coli* con CaCl_2 .

Se tomó una alícuota de 200 μl y se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml. Se adicionó 10 μl con no más de 50 ng del plásmido a transformar pBC-Hygro, pSM334 o pGA0AA237CB11 (Tabla 1) y se colocó en hielo por 30 minutos. Inmediatamente se colocó en una parrilla a 42 °C por 1.5 minutos y posteriormente se trasladó a hielo por 1 minuto. A continuación se añadió 1 ml de medio LB (Ver apéndice) y se dejó incubar a 37 °C por 1 hora. Al finalizar este tiempo se realizó un plaqueo en cajas Petri con medio selectivo a diferentes concentraciones (50, 100 y 250 μl) y se incubó a 37 °C por 12 horas.

5. Extracción de DNA de *P. anserina*.

En una caja con medio M2 se colocó un papel celofán estéril. Sobre este se realizó un inculo con la cepa deseada $\Delta Ku 70$, $\Delta rtn1$ o Wt, se dejó crecer el micelio en oscuridad por 3 días y posteriormente se recuperó con ayuda de una espátula estéril. Todo el micelio recuperado se almacenó en un tubo de centrifuga de 1.5 mL y se liofilizó por un tiempo de 1.5 horas en el Savant. Una vez seco el micelio se trituró con una espátula hasta conseguir un polvo fino. A continuación se resuspendió con 500 μL de la solución EDTA (50 mM, pH 8) con SDS (0.2%) y se incubó por 15 minutos a 70 °C. Se prosiguió adicionando 50 μL de acetato de potasio 5 M para precipitar proteínas y se colocó los tubos por 30 minutos en hielo. Después de este paso se centrifugó durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en tubos limpios, para su posterior adición de 200 μl de fenol/cloroformo (1:1). Se centrifugó por 5 minutos y se recuperó la fase acuosa. En ésta, se adicionó 200 μL de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a 13 mil r.p.m. En este paso se recuperó la fase acuosa hasta la marca de proteínas y se debe colocó 1 mL de etanol al 100%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este último paso, pero ahora adicionando alcohol al 70%. Luego de centrifugar, se dejó

secar para perder todo el etanol y finalmente se resuspendió la muestra en 50 μ L de TE 1X estéril (pH 8). Las muestras fueron cuantificadas utilizando un *nanodrop*.

6. Transformación de *P. anserina*.

6.1. Formación de protoplastos.

Se realizó un precultivo en medio M2 de la cepa deseada $\Delta Ku 70$, $\Delta rtn1$ o WT (Tabla 1) y se dejó crecer en oscuridad a 27 °C por dos días. Posteriormente se recuperaron las colonias en un tubo Falcon con 5 mL de agua estéril y se fragmentó el contenido usando un desmembrador u homogenizador. El contenido se vació en un matraz Fernbach con medio líquido Fiolexroux (Ver apéndice) y se incubó por dos días a 27 °C en presencia de luz. Posterior al tiempo de incubación, se tomó el matraz y se filtró el contenido utilizando un embudo estéril con gasa, adicionando 200 mL de buffer TPS1 frío (Ver apéndice). Se colectó el micelio y se midió su peso total, a continuación se añadió la misma cantidad de gramos de micelio pero en mL de buffer TPS1. Se calculó la cantidad exacta de enzima para degradar pared celular (40 mg/mL) de Glucanex o *Lysing Enzymes* de *Trichoderma harzianum*, y se dejó incubar con agitación a 100 r.p.m., 37 °C por 3 horas. Al finalizar este tiempo se prosiguió con los lavados de TPS1 y TPC (ver apéndice) que estaban fríos. Con ayuda de un embudo y gasa se filtró la muestra incubada utilizando de 25-50 mL de TPS1 y se centrifugó por 10 minutos a 32000 r.p.m. Se recuperó el *pellet*, el cual se volvió a resuspender en 10 mL de buffer TPS1 y se volvió a centrifugar 10 minutos a 32000 r.p.m. Se repite este paso, pero ahora se resuspende el *pellet* en 5 mL de TPC. Finalmente el *pellet* se resuspende en TPC dependiendo de su tamaño y se guardaron alícuotas de 200 μ L cada una a -70 °C. Las muestras fueron revisadas y cuantificadas utilizando la cámara de *Neubauer* para conocer su concentración.

6.2. Transformación de protoplastos de *P. anserina*.

Se tomó una alícuota de protoplastos $\Delta Ku70$ de 200 μ L por transformación, se calentó por 5 minutos a 48 °C e inmediatamente se trasladó a hielo por 30 s. Posteriormente se agregó el DNA molde con una concentración ~5 μ g/ml. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se colocó de 1.5- 2mL de PEG pH 7.5 (Ver apéndice) y se mezcló cuidadosamente. Se dejó incubar por 15 minutos y se adicionó 5 mL del medio RG con estabilizador osmótico top agar (Ver apéndice) a 42 °C. Finalmente, antes de que éste gelificara se vertió a cajas Petri con medio de recuperación RG con el antibiótico correspondiente (Ver apéndice) y se incubó las cajas de tres a seis días en oscuridad. Se verificó día con día la aparición de transformantes primarias.

7. Cepas y plásmidos

Las características de las cepas y plásmidos utilizados en el trabajo se describen a continuación:

Tabla 1. Cepas de *P. anserina* y plásmidos utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo y propiedades	Referencia
<i>E. coli</i>		
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StR end A1 <i>nupG</i>)	Invitrogen
<i>P. anserina</i>		
WT S(+)	Cepa silvestre con tipo sexual MAT+	(P. Silar, 2013)
WT S(-)	Cepa silvestre con tipo sexual MAT-	(P. Silar, 2013)
$\Delta Ku70$ (+)	Cepa mutante carente del gen <i>ku70</i> y tipo sexual MAT+	(El-Khoury et al., 2008)
$\Delta rtn1$ (1)	Transformante primaria en contexto $\Delta ku70+$	Este trabajo
$\Delta rtn1$ (2)	Transformante primaria en contexto $\Delta ku70+$	Este trabajo
$\Delta rtn1$ (3)	Transformante primaria en contexto $\Delta ku70+$	Este trabajo
$\Delta rtn1$ (4)	Transformante primaria en contexto $\Delta ku70+$	Este trabajo
$\Delta rtn1$ (5)	Transformante primaria en contexto $\Delta ku70+$	Este trabajo
$\Delta rtn1$ (+)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y tipo sexual	Este trabajo

MAT+		
<i>Δrtn1</i> (-)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y tipo sexual	Este trabajo
MAT-		
<i>Δrtn1^c</i> (+)(Cepas 1-24)	Transformantes primarias en contexto <i>Δrtn1</i> +, con integración ectópica del plásmido 3Kb (GA0AA237CB11)	Este trabajo
Plásmidos		
PBC-Hygro	Confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> . Contiene el gen <i>hph</i> que confiere resistencia a higromicina en <i>P. anserina</i>	(P Silar, 1995)
Psm334	Confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> . Contiene el gen <i>G418</i> que confiere resistencia a geneticina en <i>P. anserina</i>	Robert Debuchy, Institute de Biologie Integrative de la cellule, NCRS.
GA0AA237CB11	Fragmento de 3kb del genoma de <i>P. anserina</i> , contiene el gen <i>RTN1</i>	Genoscope, Francia (Espagne et al., 2008)

8. Medios y condiciones de cultivo.

Para apreciar el crecimiento y el envejecimiento de *P. anserina* se utilizó el medio M2 con dextrina (Ver apéndice). Estos cultivos se realizaron a 27 °C con una humedad relativa del 85% y se mantuvieron en la obscuridad.

8.1. Medios de crecimiento.

Para evaluar la asimilación de diferentes fuentes de carbono y observar el crecimiento en estrés peroxisomal por ácidos grasos; la dextrina del medio M2 fue remplazada del medio de cultivo por ácido oleico (M0+AO) o celulosa (M0+Celofán) como únicas fuentes de carbono y ácidos grasos (Ver apéndice). Estos cultivos se mantuvieron

en oscuridad de tres a cinco días, tiempo en el que se midió la longitud y se observó la pigmentación de las colonias.

** Nota: Las imágenes del crecimiento y envejecimiento de las colonias fueron tomadas con una cámara *Canon EOS Rebel T5 (EF-S 18-55 III)* y analizadas en un fondo negro con iluminación.

8.2. Envejecimiento.

Para determinar la longevidad se midió la distancia promedio en cm desde la germinación de la ascospora, hasta la parte apical de la punta de las hifas (en cuya región ocurre la senescencia). Este procedimiento se realizó por triplicado en cada una de las cepas de interés dejando crecer por 10 días.

8.3. Cruzas sexuales.

En las cruzas sexuales de *P. anserina* se utilizó el medio M2 con dextrina (Ver apéndice). Estos cultivos se realizaron a 27 °C con una humedad relativa del 85% y se mantuvieron en presencia de luz continua. La fertilización se llevó a cabo a los 3 días de crecimiento. El tipo sexual de una cepa se determinó tras confrontarla en una cruce sexual ante una cepa silvestre (Wt) de un tipo sexual conocido (*MAT+* o *MAT-*).

8.4. Recolección y germinación de las ascosporas.

A los cuatro días de fertilización de las cruces sexuales, se recuperaron las esporas expulsadas por los peritecios en medio MA (Ver apéndice). Posterior a su recolección fueron aisladas, separadas y trasladadas con ayuda de una aguja de disección a un medio GYE (Ver apéndice). Se incubaron en oscuridad hasta su germinación.

8.5. Medio para la regeneración de protoplastos.

Los protoplastos fueron regenerados en medio RG con dextrina (Ver apéndice). Estos cultivos se realizaron a 27 °C con una humedad relativa del 85% y se mantuvieron en oscuridad por seis días (Ver materiales y método sección 6).

8.6. Medios selectivos

Para evaluar la resistencia de las mutantes generadas, los medios de cultivo M2 y RG fueron adicionados de Higromicina B (75 µg/mL) o Geneticina (100 µg/mL) (Ver apéndice).

9. Análisis citológicos y microscopía

9.1. Observación de la distribución nuclear en el micelio.

Se colocó una capa delgada de medio M2 en una caja Petri y se implantó las cepas deseadas WT o *Δrtn1*. Se dejó crecer por un día y posteriormente se colocó un cubreobjetos con un ángulo de ~ 45° para que el micelio creciera sobre él. Al día siguiente se retiró el mismo, adicionándole 200 µl de solución DAPI y se dejó reposar por 10 min en oscuridad. Posteriormente se lavó con solución de glucosa y se dejó reposar por 3 minutos antes ser revisadas en el microscopio de fluorescencia.

9.2. Estructuras sexuales.

9.2.1. Fijación de peritecios y tinción de ascosporas.

Para la fijación de peritecios en láminas, primero se colocó en cajas Petri de vidrio una lámina de papel cera, se lavaron laminillas utilizando alcohol y se limpiaron con ayuda de *Kimwipes*, posteriormente, se colocó a cada una 15 µL de poli-lisina con tritón 10% (Ver apéndice), se esperó 10 minutos y se enjuagó con agua desionizada y al finalizar se retiró el exceso. Las laminillas se almacenaron las laminillas en la caja Petri con papel cera en oscuridad y a temperatura ambiente hasta secar completamente. Posteriormente, de una crusa sexual que fue colocada y fertilizada a los tres y cuatro días en presencia de luz, se recuperaron los *septums* de 10-20 peritecios y se colocaron en una placa para tinción *mazzini*. Se adicionó 485 µL de paraformaldehído (PAF) y 15 µl de tritón 10% por 10 minutos para fijar y posteriormente se retira el exceso de PAF, dejando los *septums* en la placa y se lavó con 500 µL de PBS 1X. Se transfirieron las muestras a un portaobjetos siliconado y se colocó un

cubreobjetos con poli-lisina, con ayuda de una aguja de punta achatada se aplastaron las muestras para que se adhirieran. A continuación se tomó la laminilla y se lavó con 250 μ L de PBS + TX, se retiró el exceso y se añadió 250 μ L de PEM + Lisolectina dejando en oscuridad a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se lavó con 250 μ L de PBS + TX (Ver apéndice). A continuación, para llevar a cabo la tinción de DAPI de las esporas de las ascas en los peritecios, se añadió 250 μ L de PBS+DAPI+TX a las muestras en la laminilla siliconada por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó con dH₂O y se montó entre un porta y un cubreobjetos a los cuales se añadió una gota de 10 μ l de *vectashield*. Se aseguró de no dejar burbujas en la muestra y fueron sellados con barniz de uñas. Finalmente las laminillas fueron almacenadas a -4 °C hasta su posterior visualización en el microscopio óptico de fluorescencia.

9.3. Microscopia de fluorescencia

Las imágenes del microscopio óptico de fluorescencia (*Nikon e600*) fueron tomadas con la cámara *ANDORTM-NEO scMOS* y analizadas con el programa *image J*. Para las tinciones con DAPI de las esporas, se realizaron *Stacks* y fueron visualizadas con la opción <<*Z- Project*>> a intensidades máximas y almacenadas en *8bits*. Fueron modificadas a color Cyan utilizando la opción <<*lookuptables*>>.

10. Ensayos de complementación genética.

El ensayo de complementación está basado en la técnica de transformación de protoplastos (Ver materiales y métodos sección 6.2) presentando las siguientes modificaciones:

1. Se utilizó una alícuota de protoplastos *Δ rtn1 (MAT+)* de 200 μ L por transformación.
2. Se adicionó como DNA molde el plásmido GA0AA237CB11, el cual tiene una extensión de 3 Kb y únicamente contiene el gen *RTN1* (flanquea la región codificante por \approx 750 pb de sus regiones 5' y 3') y el

plásmido pSM334 que confiere resistencia a geneticina, en una proporción molar 3:1 respectivamente.

3. Las transformantes primarias adquiridas fueron seleccionadas y colocadas en medio M2 en el cual se induce su cruza sexual con la cepa ***Δrtn1*** MAT-. Posterior a los tres días de fertilización se analiza la formación de peritecios, así como el desarrollo de ascas y esporas las cuales son cuantificadas para confirmar que el fenotipo mostrado en la mutante se restablece por complementación. Se comparan con cruza sexuales homocigas de las cepas Wt+ x Wt-, ***Δrtn1+*** x ***Δrtn1-*** y cruza heterocigas Wt+ x ***Δrtn1-*** y Wt- x ***Δrtn1+*** de *P. anserina*.

VII. RESULTADOS

1.- Identificación de las proteínas de la familia de los reticulones de *Podospora anserina*.

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* posee dos genes que codifican para proteínas de reticulón, *RTN1* y *RTN2* (Westrstrate et al., 2015). Para identificar los genes codificantes para reticulones de *P. anserina*, realizamos una búsqueda en el genoma de este hongo de los genes codificantes para proteínas con alta similitud a Rtn1p de *S. cerevisiae* (Figura 4, ver también el alineamiento en la Figura 8) utilizando el algoritmo *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*).

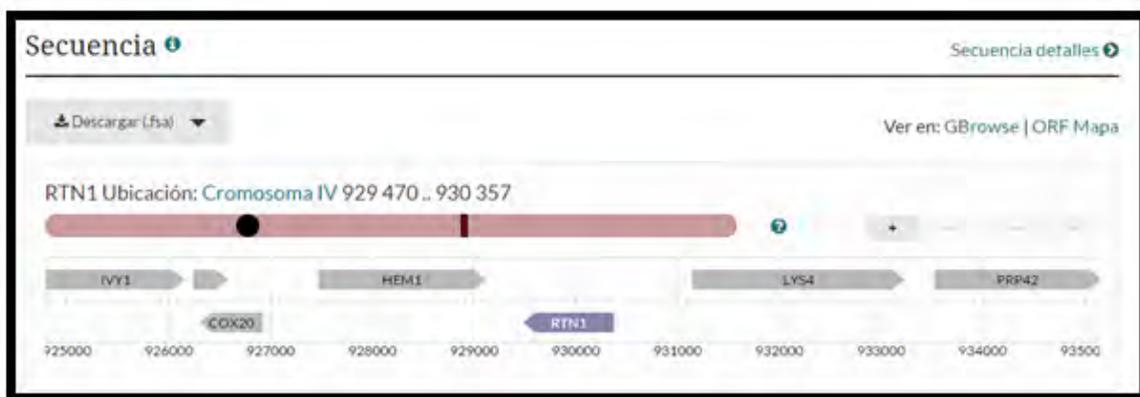


Figura 4. Ubicación genómica del gen RTN1 de *S. cerevisiae*. El gen RTN1 de *S. cerevisiae* se localiza en el cromosoma IV y codifica para una proteína de 295 residuos de aminoácidos. Tomado de <*The Saccharomyces Genome Database*> <http://www.yeastgenome.org>

Este análisis arrojó una única proteína putativa con un valor e significativo ($6e-07$), cuyo gen se localiza en el cromosoma 1 de *P. anserina* (Figura 5-A). Esta proteína ha sido denominada Pa_1_22550 en la base de datos del genoma de *P. anserina* y se encuentra anotada en el *GenBank* bajo el No. de acceso XP_001906573. Asimismo, realizamos el mismo análisis empleando como secuencia de búsqueda a Rtn2p de *S. cerevisiae* u ortólogos de reticulones de otros linajes eucariontes, incluyendo a la proteína AN5404.2 de *Aspergillus nidulans*, Cwl1 de *Neurospora crassa*, *RTN1* de *Schizosaccharomyces pombe* y RTN3-A1 de *Homo sapiens*. En todas ellas, el

valor e fue mayor o igual a 0.005. A partir de estos datos, nombramos a la proteína putativa de *P. anserina*, como RTN1, la cual presenta una longitud de 323 residuos de aminoácidos estructurados en 5 exones (Figura 5-B).

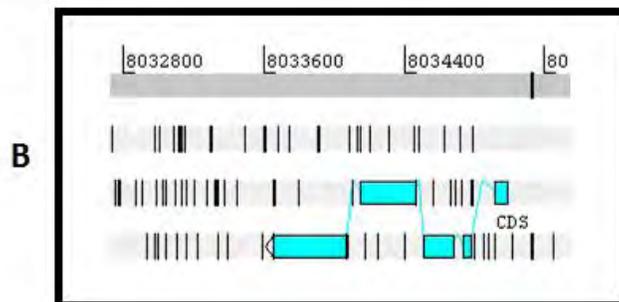
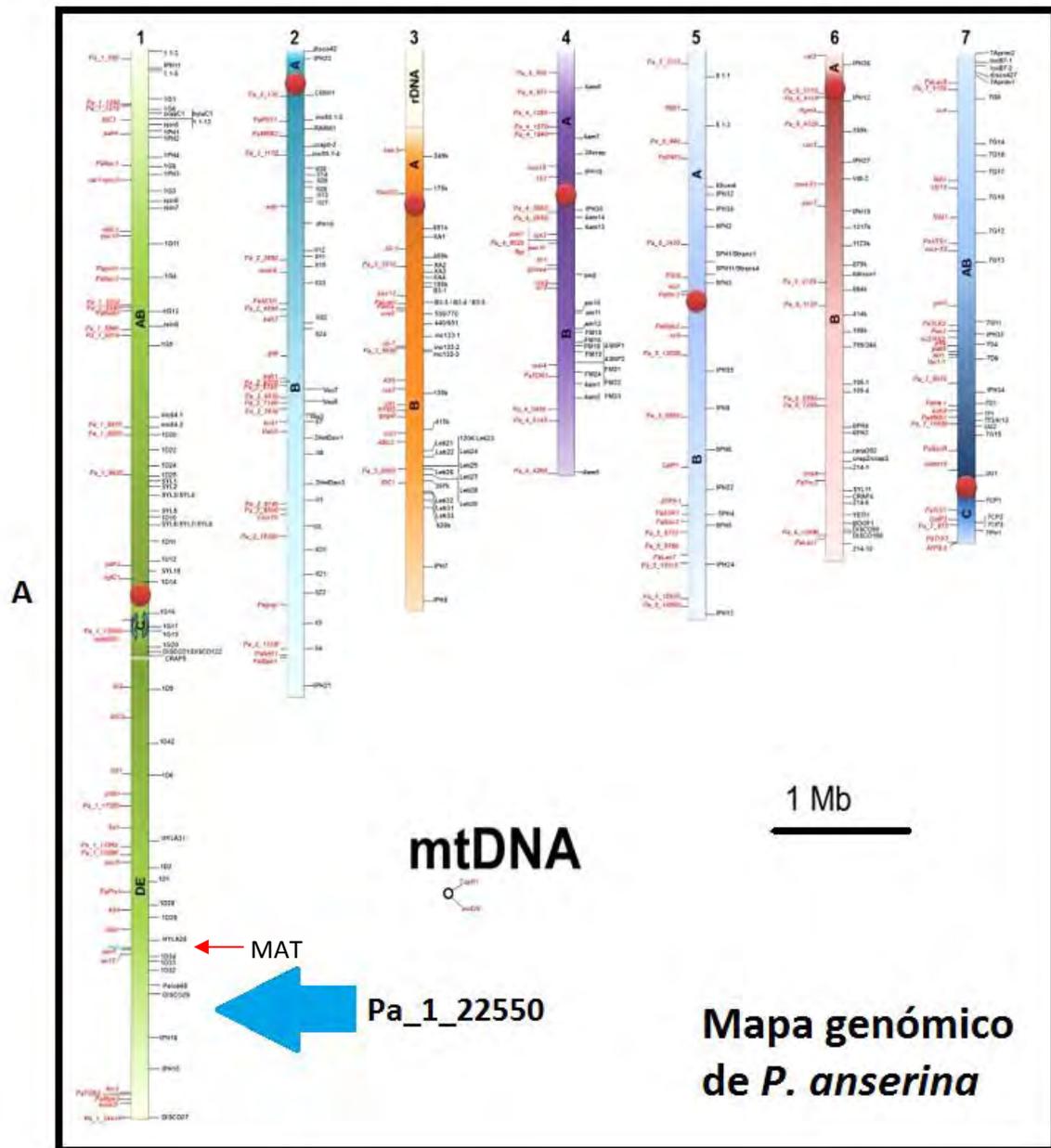


Figura 5. Mapa genómico de *Podospora anserina*. A) El genoma de *P. anserina* está conformado por siete cromosomas y una molécula de DNA mitocondrial (mtDNA). En el cromosoma 1, se indica con una flecha azul la posición del gen Pa_1_22550 y con una roja la posición del locus *MAT*. B) Constitución del gen estructural para la proteína RTN1 (la línea gris representa la hebra del DNA que contiene al gen *RTN1* y en azul se ilustra la distribución de los exones en los tres posibles marcos de lectura).

Los datos fueron corroborados, al analizar la existencia de una única proteína de reticulón con las relaciones de ortología de RTN1 en los genomas fúngicos empleando el programa *FUNGIpath* (*Grossetete et al., 2010*) (Figura 6). Estos análisis indicaron la presencia de un solo gen putativo codificante para una proteína de reticulón en el genoma de *P. anserina*. De manera interesante, estos análisis mostraron que, salvo pocas excepciones (como *Cochliobolus sativus*, *Neurospora crassa* y *Gibberella zeae*), la mayoría de los hongos presenta en su genoma un solo gen codificante para proteínas de la familia de los reticulones, en contraste con los animales y las plantas en los cuales podemos encontrar más de un gen con muchas isoformas posibles (Di Sano, Bernardoni, & Piacentini, 2012).



Phylum	Subphylum	Class	Species	Proteins	
Ascomycota	Perizomycotina	Orbiliomycetes	<i>Actinobotrya oligospora</i>	1	
		Perizomycetes	<i>Tuber melanosporum</i>	1	
		Dothideomycetes	<i>Alternaria brassicicola</i>	1	
			<i>Baudouinia compniacensis</i>	1	
			<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	1	
			<i>Cochliobolus sativus</i>	1	
				2	
			<i>Hysterium pulicare</i>	1	
			<i>Lentopharia maculans</i>	1	
			<i>Mycosphaerella pini</i>	1	
			<i>Mycosphaerella popalorum</i>	1	
			<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	1	
			<i>Pseudocercospora fibensis</i>	1	
			<i>Pyrenophora teres</i>	1	
			<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	1	
			<i>Rhizidhysterium rubrum</i>	1	
			<i>Setosphaeria turcica</i>	1	
			<i>Zymoseptoria tritici</i>	1	
			Eurotiomycetes	<i>Asellomyces capsulatus</i>	1
				<i>Asellomyces dermatitidis</i>	1
				<i>Aspergillus aculeatus</i>	1
				<i>Aspergillus carbonarius</i>	1
				<i>Aspergillus clavatus</i>	1
				<i>Aspergillus flavus</i>	1
				<i>Aspergillus niger</i>	1
				<i>Aspergillus oryzae</i>	1
				<i>Aspergillus terreus</i>	1
				<i>Coccidioides immitis</i>	1
				<i>Coccidioides posadasii</i>	1
				<i>Emericella nidulans</i>	1
				<i>Neosartorya fischeri</i>	1
				<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1
				<i>Paracoccidioides sp. lotzii</i>	1
				<i>Penicillium chrysogenum</i>	1
				<i>Penicillium marneffei</i>	1
		<i>Talaromyces stipitatus</i>		1	
		<i>Uncinocarpus reesii</i>		1	
		Lecanoromycetes		<i>Cladonia gracis</i>	1
		Leotiomycetes		<i>Botryotinia fucicola</i>	1
				<i>Geomyces destructans</i>	1
				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1
		Sordariomycetes		<i>Acremonium aleophilum</i>	1
				<i>Chaetomium globosum</i>	1
				<i>Colletotrichum bignoniinum</i>	1
				<i>Cyphonectria parasitica</i>	1
			<i>Epichloe festucae</i>	1	
			<i>Fusarium oxysporum</i>	1	
			<i>Geosmannomyces graminis</i>	1	
			<i>Gibberella roseiformis</i>	1	
				2	
			<i>Gibberella zeae</i>	1	
				2	
			<i>Glomerella graminicola</i>	1	
			<i>Magnaporthe oryzae</i>	1	
			<i>Magnaporthe poae</i>	1	
			<i>Myceliophthora thermophila</i>	1	
			<i>Nectria haematococca</i>	1	
			<i>Neurospora crassa</i>	1	
				2	
			<i>Neurospora discreta</i>	1	
			<i>Neurospora tetrasperma</i>	1	
			<i>Podospora anserina</i>	1	
			<i>Sordaria macrospora</i>	1	
			<i>Thielavia terrestris</i>	1	
			<i>Trichoderma atroviride</i>	1	
			<i>Trichoderma reesei</i>	1	
			<i>Trichoderma virens</i>	1	
			<i>Verticillium albo-atrum</i>	1	

Figura 6. Análisis de proteínas ortólogas y parálogas de los reticulones en diversos genomas fúngicos. Los ortólogos de RTN1 en los hongos cuyo genoma ha sido secuenciado fueron identificados mediante el programa *FUNGIpath* (únicamente se muestran los hongos del subphylum Pezizomycotina). Se muestra el único gen codificante para una proteína de reticulón en *P. anserina* (cuadro rojo). Nótese la existencia de parálogos de *RTN1* en especies como *N. crassa* y *G. zeae*. Generado en <FUNGIpath v.4.0> <http://fungipath.i2bc.paris-saclay.fr>

Por otra parte, realizamos una búsqueda en la base de datos de marcadores de secuencia expresados (*EST*) en el genoma de *P. anserina* y encontramos once *EST* en micelio, un *EST* en peritecios jóvenes, dos *EST* en peritecios maduros y un *EST* en ascosporas en germinación. Esto demuestra, que RTN1 es un gen que se transcribe y se expresa en diferentes fases del desarrollo.

Para caracterizar a la proteína RTN1 de *P. anserina*, se realizó un análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos, utilizando la base de datos de dominios conservados de proteínas (*CDD*), en la cual se reveló, la presencia de un dominio de la superfamilia de los reticulones, conocido como *RHD* (Figura 7), este dominio se encuentra entre el aminoácido 76 y el 235.

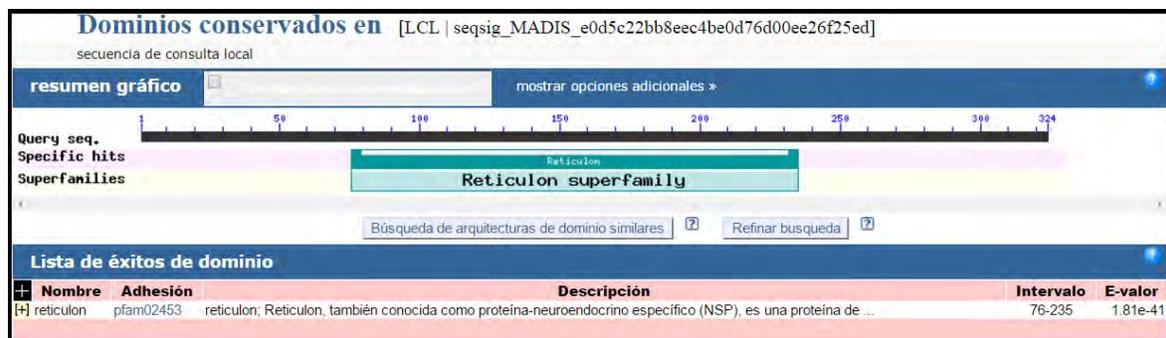


Figura 7. Identificación de los dominios conservados en la proteína RTN1 de P. anserina. La proteína RTN1 de *P. anserina* (conformada por 323 residuos de aminoácidos) presenta un dominio de la superfamilia de los reticulones localizado entre los aminoácido 76 y 235. Análisis realizado en la base de datos de dominios de proteínas conservados (CDD) del NCBI.

Para conocer más sobre la estructura del reticulón de *P. anserina*, la secuencia de los residuos de aminoácidos de los dominios transmembranales fue alineada con las de reticulones de otros organismos eucariontes modelo, entre los que se encuentran animales, plantas y hongos (Figura 8).

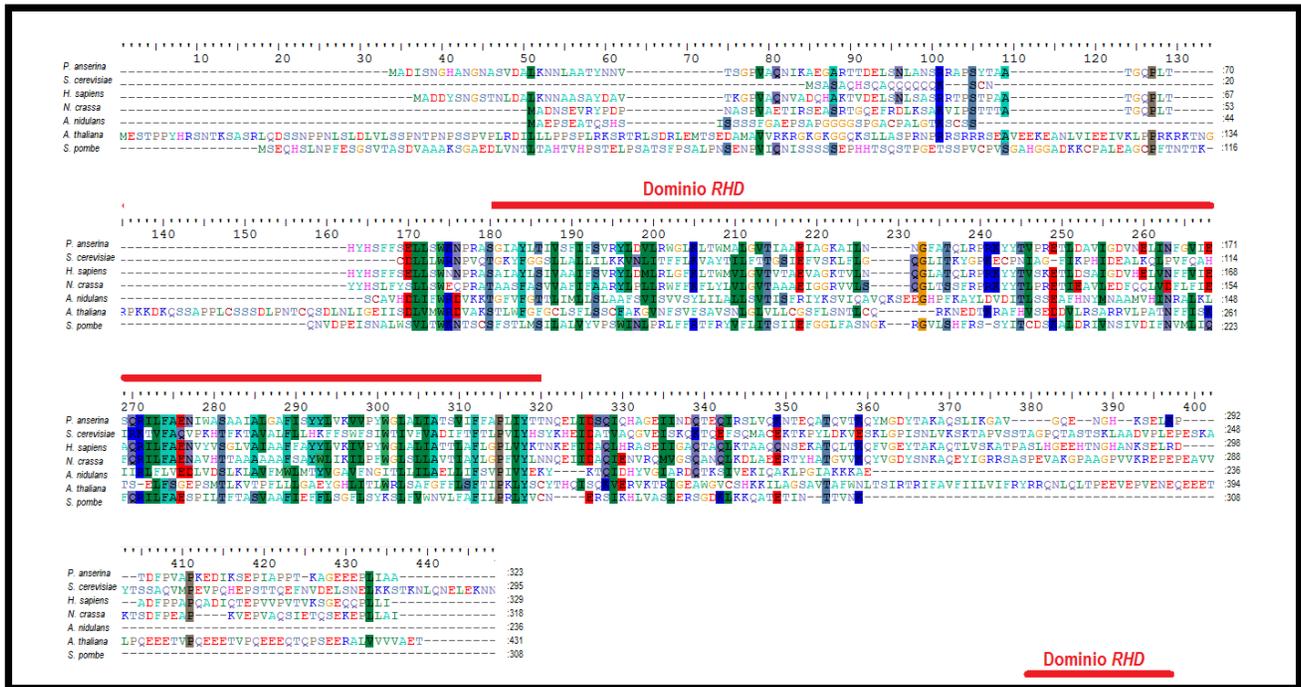


Figura 8. Alineamiento de RTN1 con proteínas de reticulón representativas de animales, plantas y hongos. La secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína RTN1 de *P. anserina* fue alineada con los reticulones *RTN1* de *S. cerevisiae*, *Cwl1* de *N. crassa*, AN504.2 de *A. nidulans*, RTN3-A1 de *H. sapiens*, *RTN1* de *S. pombe* y la proteína *like-Reticulo-B17* de *A. thaliana*. Se indica con una línea roja la región de mayor similitud correspondiente a los segmentos transmembranales del dominio RHD.

Este alineamiento, muestra que la proteína RTN1 de *P. anserina*, presenta una identidad del 15% y una similitud del 33%, con la proteína *RTN1* de *S. cerevisiae*. Mientras que, en otros hongos filamentosos, como *N. crassa*, la identidad y la similitud alcanzan valores de 62% y 79% respectivamente. Finalmente, efectuamos un análisis de hidrofobicidad en el cual se comparó la secuencia de los residuos de aminoácidos de la proteína RTN1 de *P. anserina*, con las secuencias de

residuos de aminoácidos reportadas en otros hongos y, observamos que a pesar de los bajos porcentajes de identidad y similitud, reportados en hongos como *S. cerevisiae*, la localización de los segmentos transmembranales esperados se encuentra conservada (Figura 9).

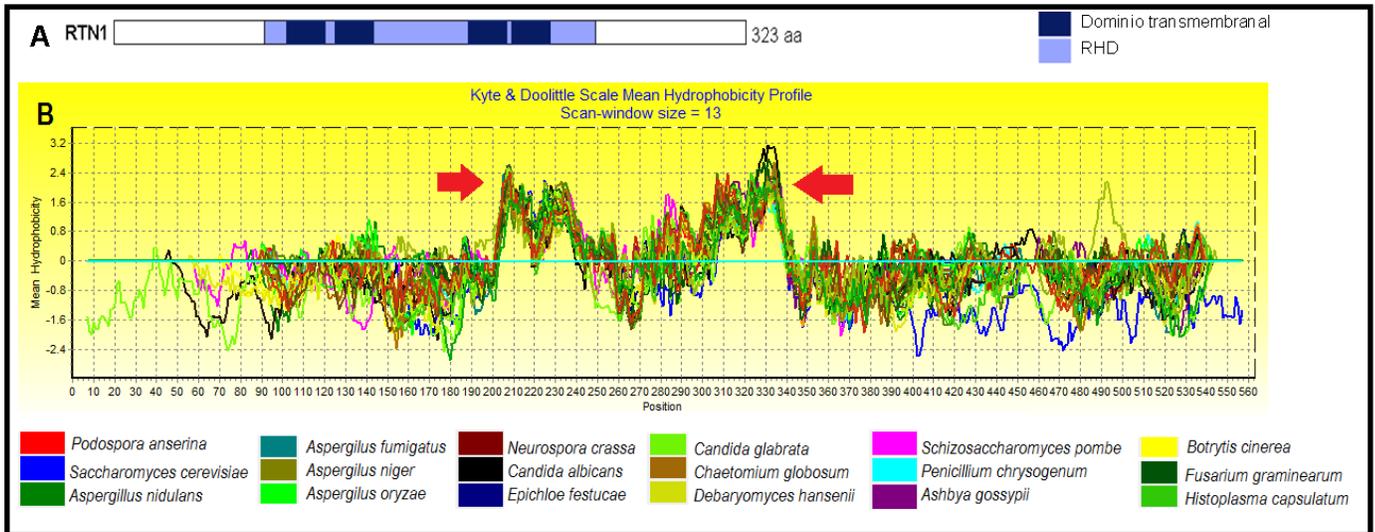


Figura 9. Análisis de los perfiles de hidrofobicidad de las proteínas de la familia de los reticulones en distintos hongos. A) Representación de los dominios transmembranales y del dominio *RHD* presentes en la proteína RTN1 de *P. anserina*. B) Perfil de hidrofobicidad de los reticulones de diferentes hongos. Las secuencias de residuos de aminoácidos de los reticulones fueron alineadas y sus perfiles de hidrofobicidad, determinados con base en la escala de *Kyte-Doolittle*, fueron comparados. Los segmentos transmembranales son señalados con flechas.

2.- Generación de cepas mutantes de delección del gen *RTN1* de *P. anserina*.

Para estudiar la función de RTN1 en *P. anserina* generamos cepas mutantes de delección en las que el marco de lectura abierta del gen *RTN1* fue reemplazado por recombinación homóloga por un marcador selectivo. Para ello se llevó a cabo la construcción de un *cassette* que contiene un gen (*hph*) que confiere resistencia al antibiótico higromicina flanqueado por ≈ 700 pb de las regiones que flanquean el marco de lectura abierto de *RTN1* (Figura 10) (Ver los detalles experimentales en la sección 2 de Materiales y métodos). Esta construcción fue empleada

para transformar protoplastos de una cepa $\Delta ku70$ de *P. anserina*, en la cual se impide la recombinación no homóloga (El-Khoury et al., 2008) y además, las cepas transformadas pueden ser recuperadas por su resistencia a la higromicina. En experimentos independientes se obtuvo un total de 5 colonias resistentes a higromicina, en tres de ellas, verificamos por PCR el reemplazo de *rtn1* por *hph*. El análisis por PCR de la verificación de una de estas cepas se muestra en la Figura 11.

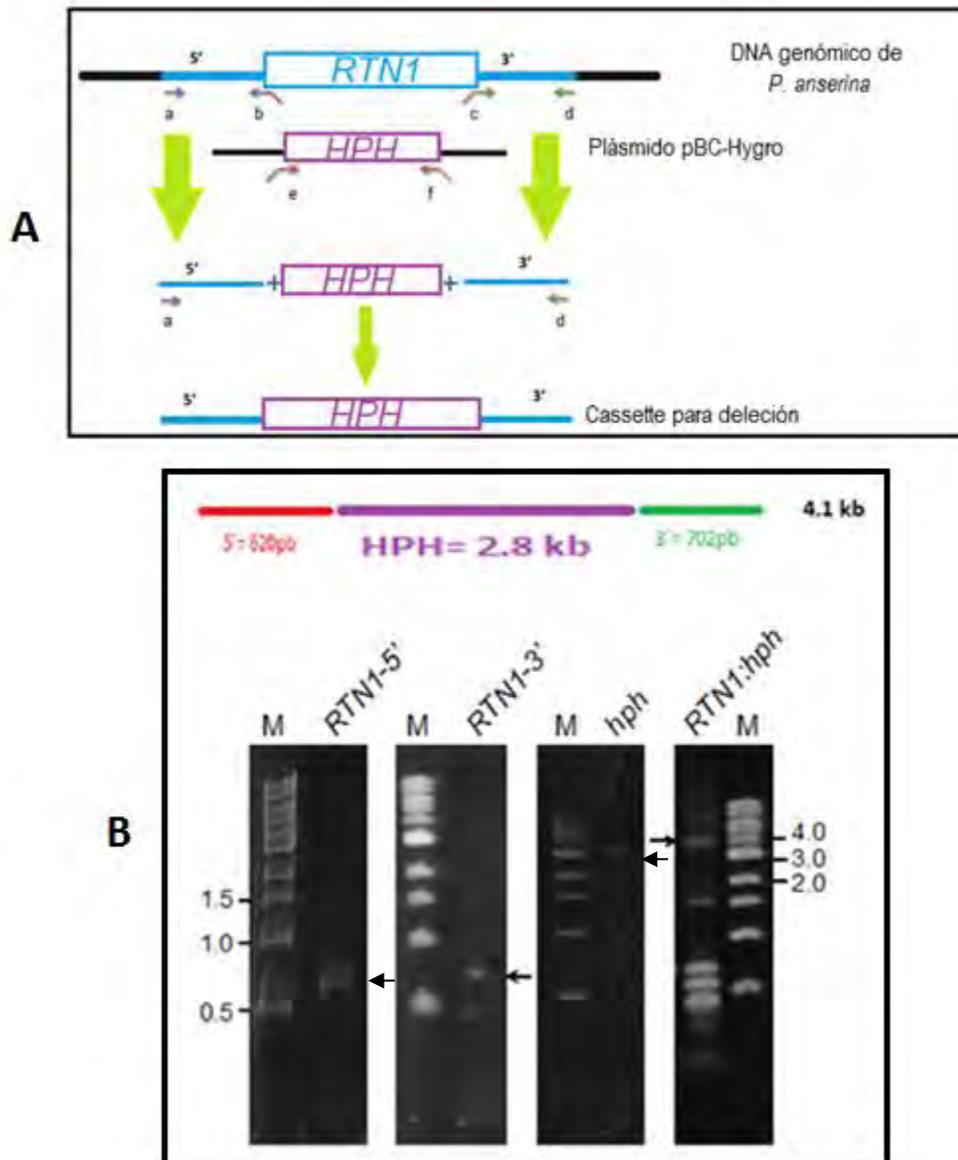


Figura 10. Construcción del *cassette* para la delección de *RTN1*. A) Esquema del *cassette* diseñado para generar la mutación $\Delta rtn1$ (los incisos a-f indican los

oligonucleótidos utilizados para cada uno de los PCR, ver apéndice) y en B) Revisión en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos en cada PCR. M= marcador de peso molecular 1 Kb; RTN1-5', fragmento 5' de 620 pb; RTN1-3', fragmento 3' de 702 pb; hph, fragmento de 2.8 Kb; RTN1:hph, *cassette* de la fusión de *hph* flanqueado por los extremos 5' y 3' de *RTN1*, 4.1 Kb.

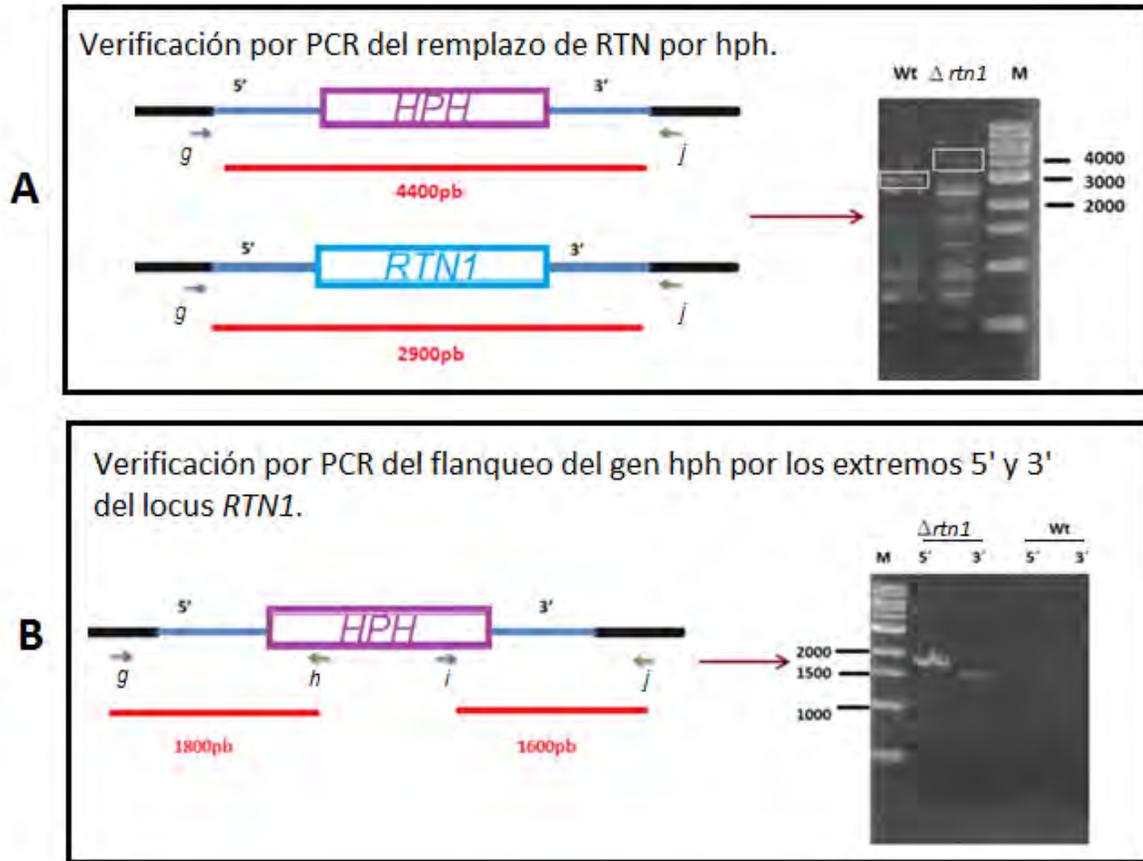


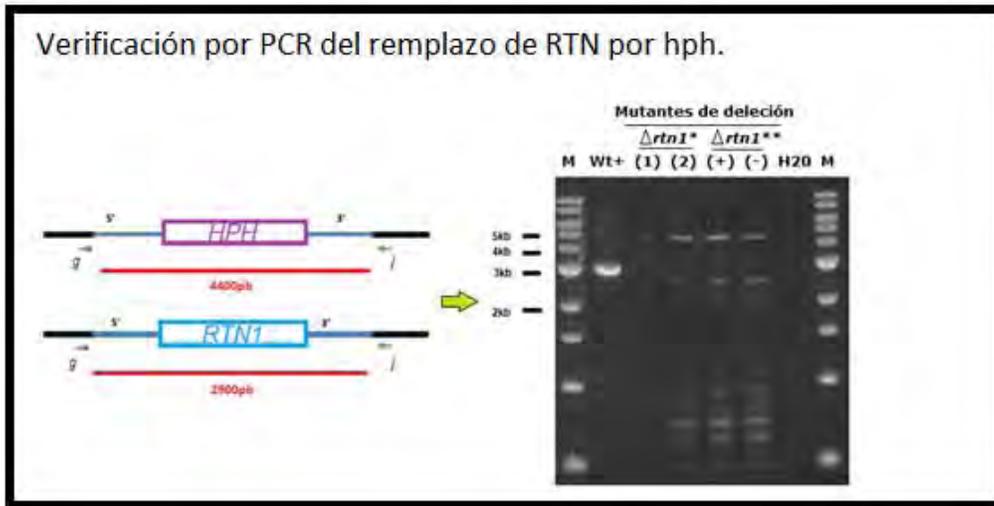
Figura 11. Verificación por PCR de la delección $\Delta rtn1$ en una cepa transformante primaria. A) A la izquierda, diagrama del locus *RTN1* esperado tras el reemplazo de la fase codificante del gen por el gen marcador *hph* (arriba) y del locus *RTN1* silvestre (abajo). A la derecha, amplificación por PCR del locus *RTN1* de una cepa silvestre (Wt, fragmento esperado de 2900 pb) y de una mutante $\Delta rtn1$ (4400 pb). Los recuadros indican las bandas de amplificación del DNA esperadas, mientras que las no señaladas indican bandas de amplificación inespecíficas. B) A la izquierda, diagrama del locus *RTN1* esperado para las cepas de delección $\Delta rtn1$ mostrando los cebadores para verificar el flanqueo del gen *hph* por los extremos 5' y 3' del locus *RTN1*. A la derecha, amplificación por PCR de los extremos 5' (1800 pb) y 3' (1600 pb) flanqueantes del gen *hph* en una cepa de delección $\Delta rtn1$. En los carriles 4 y 5 (Wt) se muestran los controles de las respectivas reacciones de amplificación con DNA de una

cepa silvestre. Los incisos g-j indican los oligonucleótidos utilizados en cada uno de los PCRs de revisión, ver apéndice; M, Marcador de peso molecular, 1 Kb.

A continuación generamos cepas ***Δrtn1*** purificadas por medio de cruza sexuales entre la cepa silvestre (Wt) y las mutantes primarias. Para ello, se recuperó la delección ***Δrtn1*** en el contexto genético ***KU70⁺*** a partir de las esporas monocarióticas descendientes. Éstas se obtuvieron en ambos tipos sexuales (***MAT⁺*** y ***MAT⁻***). Cabe señalar que, de manera consistente con la ubicación de ***RTN1*** en el cromosoma 1 aledaño al locus ***MAT*** (Figura 5-A), se observó un porcentaje de cosegregación del 32.69% entre el locus ***RTN1*** y el locus ***MAT*** (n=52 esporas monocarióticas, recolectadas de 24 ascas). Finalmente, en las cepas purificadas se corroboró por PCR de revisión, que la mutación generada fuera la correcta (Figura 12).

Verificación por PCR del remplazo de RTN por hph.

A



Verificación por PCR del flanqueo del gen hph por los extremos 5' y 3' del locus *RTN1*.

B

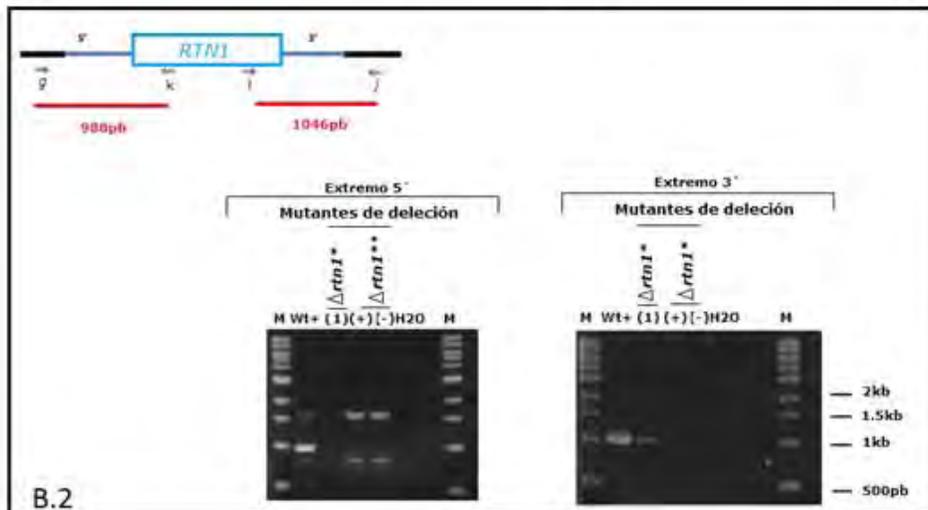
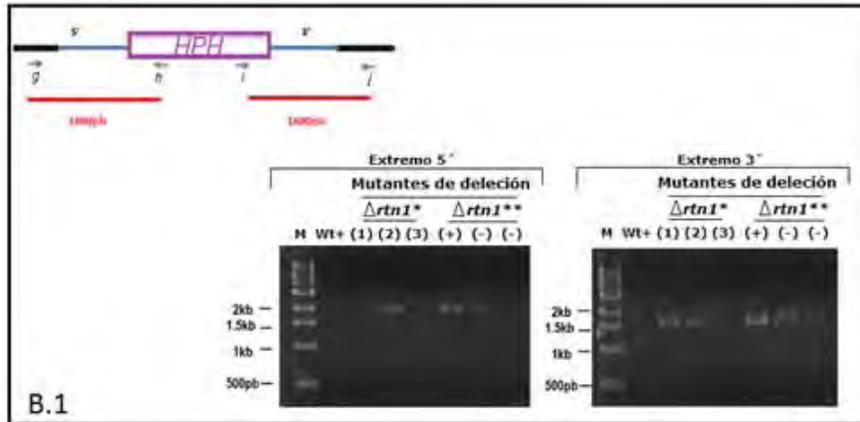


Figura 12. Verificación por PCR de la delección $\Delta rtn1$ en cepas mutantes purificadas ($MAT+$ y $MAT-$).

A) A la izquierda, diagrama del locus *RTN1* esperado tras el reemplazo de la fase codificante del gen por el gen marcador *hph* (arriba) y del locus *RTN1* silvestre (abajo). A la derecha, amplificación por PCR del locus *RTN1* de una cepa silvestre (Wt, fragmento esperado de 2900 pb), dos mutantes primarias $\Delta rtn1^*$ y dos mutantes purificadas $\Delta rtn1^{**}$ ($MAT+$ y $MAT-$) (4400 pb). B.1) A la izquierda, diagrama del locus *RTN1* esperado para las cepas de delección $\Delta rtn1$ mostrando los cebadores para verificar el flanqueo del gen *hph* por los extremos 5' y 3' del locus *RTN1*. A la derecha, amplificación por PCR de los extremos 5' (1800 pb) y 3' (1600 pb) flanqueantes del gen *hph* en una cepa de delección $\Delta rtn1$. En el carril 2 (Wt) y los carriles 3, 4 y 5 ($\Delta rtn1^*$) se muestran los controles de las respectivas reacciones de amplificación con DNA de una cepa silvestre y transformantes primarias, mientras que en los carriles 6, 7 y 8 ($\Delta rtn1^{**}$) se muestran las reacciones de amplificación con DNA en cepas purificadas $\Delta rtn1$ ($MAT+$ y $MAT-$). B.2) A la izquierda, diagrama del locus *RTN1* esperado para las cepas silvestres mostrando los cebadores para verificar el flanqueo del gen *RTN1* por los extremos 5' y 3' del locus *RTN1*. A la derecha, amplificación por PCR de los extremos 5' (988 pb) y 3' (1046 pb) flanqueantes del gen *RTN1* en una cepa sin delección $\Delta rtn1$. En los carriles 2 (Wt) y 3 ($\Delta rtn1^*$) se muestran las respectivas reacciones de amplificación con DNA de una cepa silvestre y transformante primaria, mientras que en los carriles 4 y 5 ($\Delta rtn1^{**}$) se muestran los controles de las reacciones de amplificación con DNA en cepas purificadas $\Delta rtn1$ ($MAT+$ y $MAT-$). Los incisos g-I indican los oligonucleótidos utilizados en cada uno de los PCRs de revisión, ver apéndice; M, Marcador de peso molecular, 1 Kb; H₂O, control negativo usando agua como templado.

3.- Caracterización de las mutantes de delección $\Delta rtn1$ de *P. anserina*.

3.1.- La fase somática de las mutantes de delección $\Delta rtn1$ de *P. anserina*.

Posteriormente, se estudió el efecto que la ausencia de RTN1 genera durante la fase vegetativa (somática) del desarrollo de *P. anserina*. Para ello se analizó el fenotipo de las cepas $\Delta rtn1$ de ambos tipos sexuales. En primer lugar, observamos que la ausencia de RTN1 no afecta el crecimiento, ni la pigmentación, ni la formación de micelio aéreo de este hongo en condiciones de cultivo estándar (27°C),

empleando medio M2 con dextrina como única fuente de carbono (Figura 13-B).

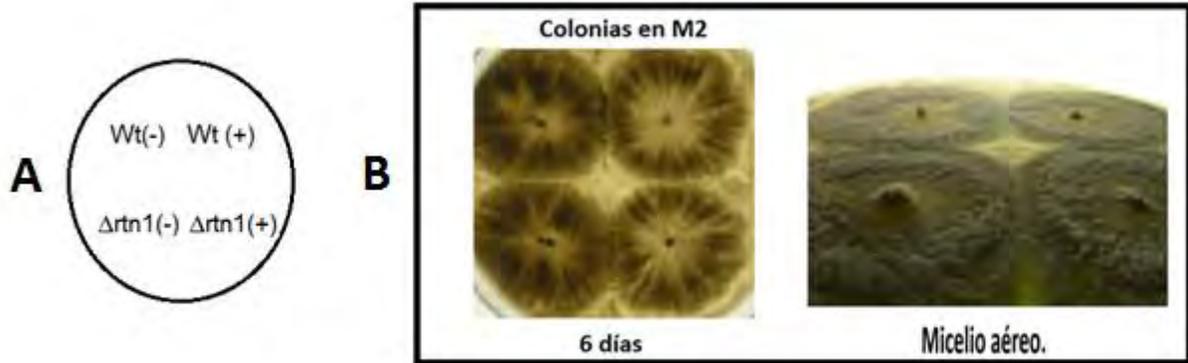


Figura 13. El crecimiento, la pigmentación y la formación del micelio aéreo en las mutantes de delección $\Delta rtn1$ de *P. anserina*. A) Distribución de las cepas utilizadas (se indica con + y - el tipo sexual de cada una). B) A la izquierda, colonias de 6 días de crecimiento con una pigmentación uniforme. A la derecha, formación de micelio aéreo en cada una de las colonias.

Asimismo, también evaluamos el efecto que la ausencia de RTN1 tiene en el crecimiento del hongo en medios con polisacáridos complejos, como la celulosa (cuya utilización depende de la vía secretoria) (Figura 14-B y C), como única fuente de carbono; o bien, con ácidos grasos como el ácido oléico (cuya utilización depende de la función peroxisomal) (Figura 14B y C). Observamos que no se aprecian diferencias de crecimiento entre las cepas control (Wt+ y Wt-) y las mutantes de delección $\Delta rtn1$ (*MAT+* y *MAT-*), independientemente de la fuente de carbono (dextrina, celulosa o ácido oleico). De igual forma, tampoco se observaron diferencias en la densidad de las colonias ni en sus patrones de ramificación.

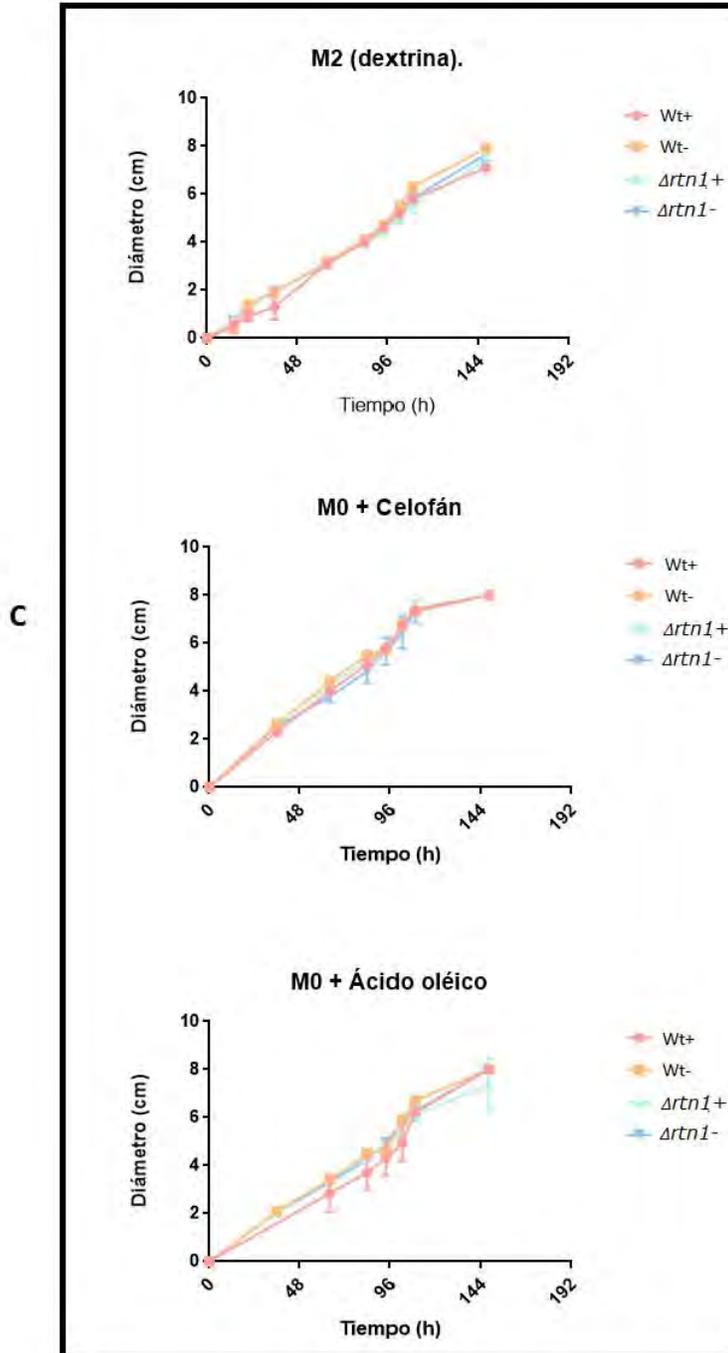
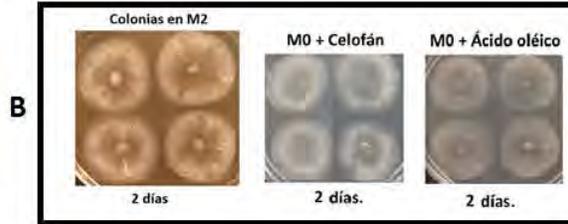
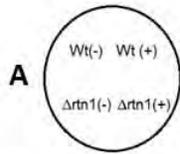


Figura 14. Evaluación del crecimiento de las mutantes *Δrtn1* en medios con polisacáridos complejos y ácidos grasos. A) Distribución de las cepas utilizadas (se indica con + y - el tipo sexual de cada una). B) Colonias creciendo en medio mínimo con dextrina (M2, izquierda), con celulosa (M0+celofán, centro) o con ácido oléico (M0+ácido oléico, derecha) como única fuente de carbono. C) Curvas de crecimiento de cada una de las cepas (Wt+, Wt-, *Δrtn1+* y *Δrtn1-*) en medios con diferentes fuentes de carbono (arriba, dextrina ; al centro, celulosa; abajo, ácido oléico).

Por otra parte, determinamos si la esperanza de vida de *P. anserina* se veía afectada por la ausencia de RTN1. Para ello se realizaron pruebas de envejecimiento en medio M2, por diez días y se encontró que de manera general no se ve afectado el envejecimiento. **En estas condiciones, las cepas *Δrtn1+* y *Δrtn1-* comenzaron a morir,** después de los 6.55 cm de radio y 6.15 cm de radio respectivamente, mientras que la Wt- sobrevivió, hasta alcanzar 6.27 cm de radio (Figura 15).

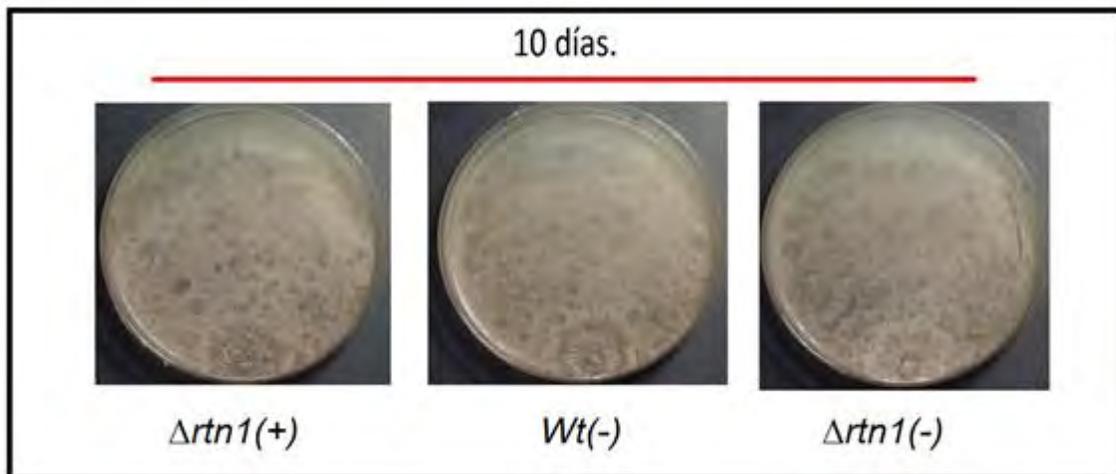


Figura 15. Determinación del envejecimiento de las mutantes *Δrtn1* de *P. anserina*. El micelio del centro de colonias obtenidas de ascosporas monocarióticas de las cepas silvestres (Wt, centro, sólo se muestra una cepa *MAT-*), *Δrtn1 MAT+* (izquierda) y *Δrtn1 MAT-* (derecha) fue empleado para inocular cajas de Petri con medio M2 y el tiempo en que las hifas del borde de las colonias generadas murieron fue determinado.

También analizamos la distribución de los núcleos en las hifas aéreas mediante microscopía de fluorescencia. Sin embargo, no observamos alteraciones de los mismos a lo largo de ellas (Figura 16A) y, finalmente se analizó si la ausencia de RTN1 afecta la formación de gametangios femeninos. Sin embargo, no encontramos alguna evidencia que demuestre una mala formación en ellos (Figura 16-B).

Nuestros resultados, para la caracterización de la fase somática en mutantes de delección *Δrtn1* de *P. anserina*, demuestran que la ausencia de la proteína RTN1, no genera un fenotipo que altere esta parte del desarrollo en el hongo.

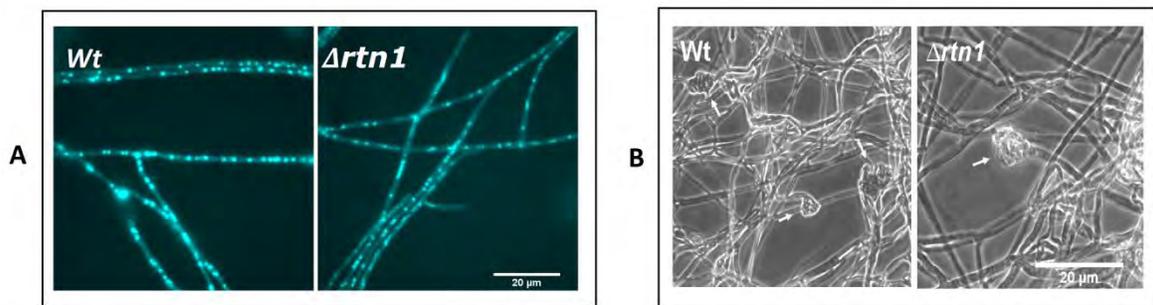


Figura 16. La distribución nuclear en el micelio aéreo y la formación de los ascogonios en las cepas mutantes *Δrtn1*. A) Tinción con DAPI mostrando la distribución de los núcleos en el micelio aéreo. B) Formación de gametangios femeninos (ascogonios, señalados con flechas). En cada caso se compara la cepa silvestre (Wt+) y la mutante (*Δrtn1*+).

3.2.- La fase sexual del desarrollo de las mutantes de delección *Δrtn1* de *P. anserina*.

Con las cepas de delección purificadas *Δrtn1 MAT+* y *MAT-* se analizó cómo la ausencia de RTN1 afecta el desarrollo sexual de este hongo. Para ello analizamos tanto la formación de los peritecios, como los eventos involucrados en la progresión del desarrollo sexual, incluyendo la formación de las células dicarióticas (croziers), los meiocitos (ascas) y las esporas sexuales (ascosporas). Todos estos procesos fueron analizados tanto en cruzas sexuales homócigas de

Δ rtn1, como en cruzas heterocigas de esta mutante con una cepa silvestre.

En primer lugar observamos que los ascogonios de una cepa *Δ rtn1* son capaces de ser fertilizados tanto por espermacios silvestres como por espermacios *Δ rtn1*, independientemente de su tipo sexual (siempre y cuando sean de tipo sexual compatible). Asimismo, además de ser capaces de fertilizar ascogonios *Δ rtn1*, los espermacios *Δ rtn1* fueron capaces de fertilizar ascogonios silvestres. Estos resultados indican que RTN1 no se requiere para la plasmogamia o fertilización durante el desarrollo sexual. También observamos que las cepas *Δ rtn1* tienen una correcta formación de peritecios tanto en cruzas homocigas como heterocigas, donde no se observaron diferencias en el tiempo de formación de los peritecios ni en su estructura o su patrón de distribución. Esto indica que la morfogénesis de las fructificaciones sexuales tampoco depende de RTN1.

Tras la maduración de los peritecios, las ascosporas formadas en su interior son proyectadas activamente al exterior de éstas, lo que permite su dispersión. Evaluamos este proceso y observamos que, tanto las ascosporas formadas en cruzas homocigas de *Δ rtn1*, como las formadas en cruzas heterocigas de esta mutante por una cepa silvestre, son capaces de ser expulsadas.

Sin embargo, al analizar con detalle los procesos de formación de las ascas y las ascosporas observamos que éstos se ven comprometidos en ausencia de RTN1. En contraste con el desarrollo sexual de una cepa silvestre, en donde el 98% de las ascas produce cuatro ascosporas dicarióticas de un mismo tamaño, el número y tamaño de las esporas producidas dentro de las ascas de cruzas homocigas *Δ rtn1* fue alterado de forma notable. En estas cruzas fue posible observar un alto número de ascas en las cuales solo se formaron dos o tres esporas (Figura 17-C y

E) las cuales a su vez, presentan un mayor tamaño que las ascosporas silvestres. Este tipo de ascas no fue observado en las cruza silvestres (Figura 17-A). También, aunque en menor proporción, fue posible apreciar en cruza homocigas *Δrtn1*, la presencia de ascas completamente melanizadas o ascas con una sola espora (Figura 17-D y F).

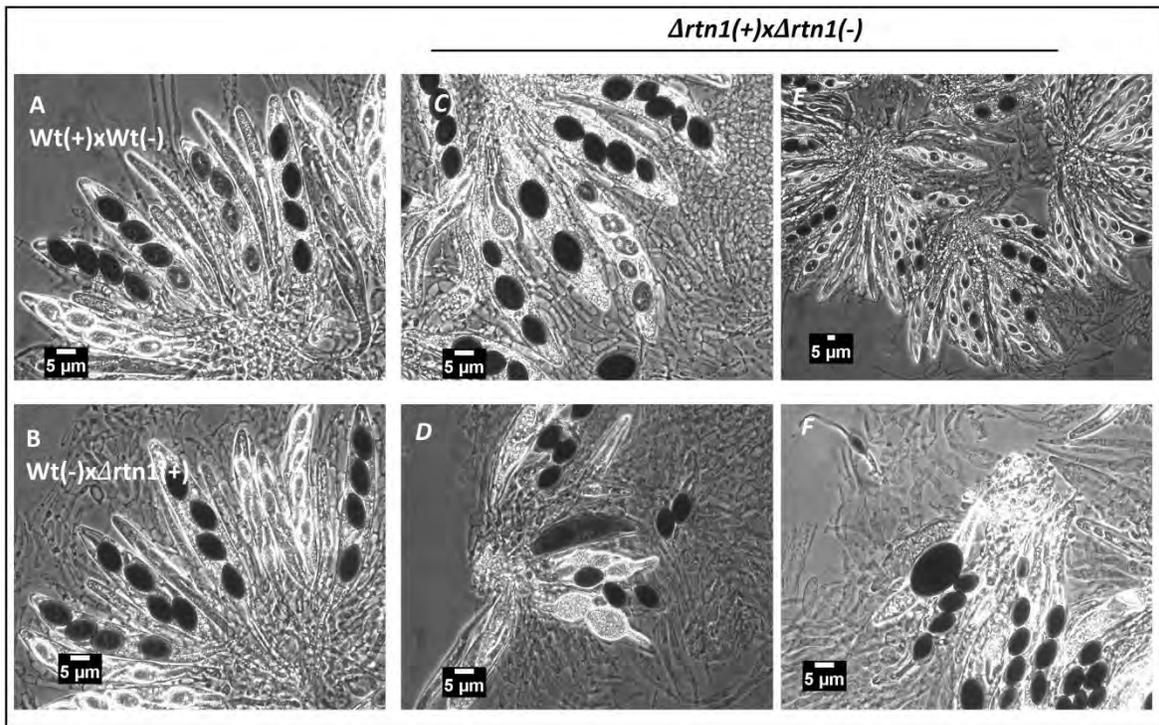


Figura 17. RTN1 es requerida para la correcta formación de las ascosporas. En la imagen se aprecia las estructuras sexuales formadas en el interior de peritecios derivados de una cruce sexual homociga silvestre (A), una cruce heterociga entre las cepa silvestre y *Δrtn1* (B), y de cruza homocigas *Δrtn1* (C-F). En la cruce silvestre y heterociga (silvestre x *Δrtn1*) se aprecia una formación normal de ascosporas (4 ascosporas de un mismo tamaño en cada asca). Por el contrario, en las cruza homocigas *Δrtn1* se aprecian ascas con un número y tamaño diferente de ascosporas en cada una, formación de ascas con dos y tres ascosporas (C y E), ascas con forma de banana (melanizadas) (D) y esporas gigantes (F).

Para apreciar la magnitud de este defecto cuantificamos el porcentaje de ascas con alteraciones con respecto al de la cepa silvestre. Es importante mencionar que en una cepa silvestre es posible observar, con una frecuencia del 1%, ascas con 5 esporas (tres esporas

dicarióticas y dos esporas monocarióticas de menor tamaño) así como, con una frecuencia incluso menor, ascas con 6 esporas (dos esporas dicarióticas y cuatro esporas monocarióticas pequeñas). Sin embargo en estas ascas, el tamaño de las esporas dicarióticas y monocarióticas, respectivamente, siempre es equivalente. Razón por la cual, únicamente consideramos como ascas anormales aquellas que presentaran en su interior, tres esporas, dos esporas o cuatro esporas de tamaños no equivalentes. Tras 6 experimentos independientes, en los cuales analizamos entre 75 a 112 ascas (recolectadas entre 6-8 peritecios, de cuatro días de desarrollo), observamos que el porcentaje de ascas anormales va desde el 21.15% al 24% (Figura 18-A) y en promedio, la formación de las ascosporas fue anormal en el 22.48%, con una desviación estándar (D.S.) de 1.52% de las ascas (Figura 18-B).

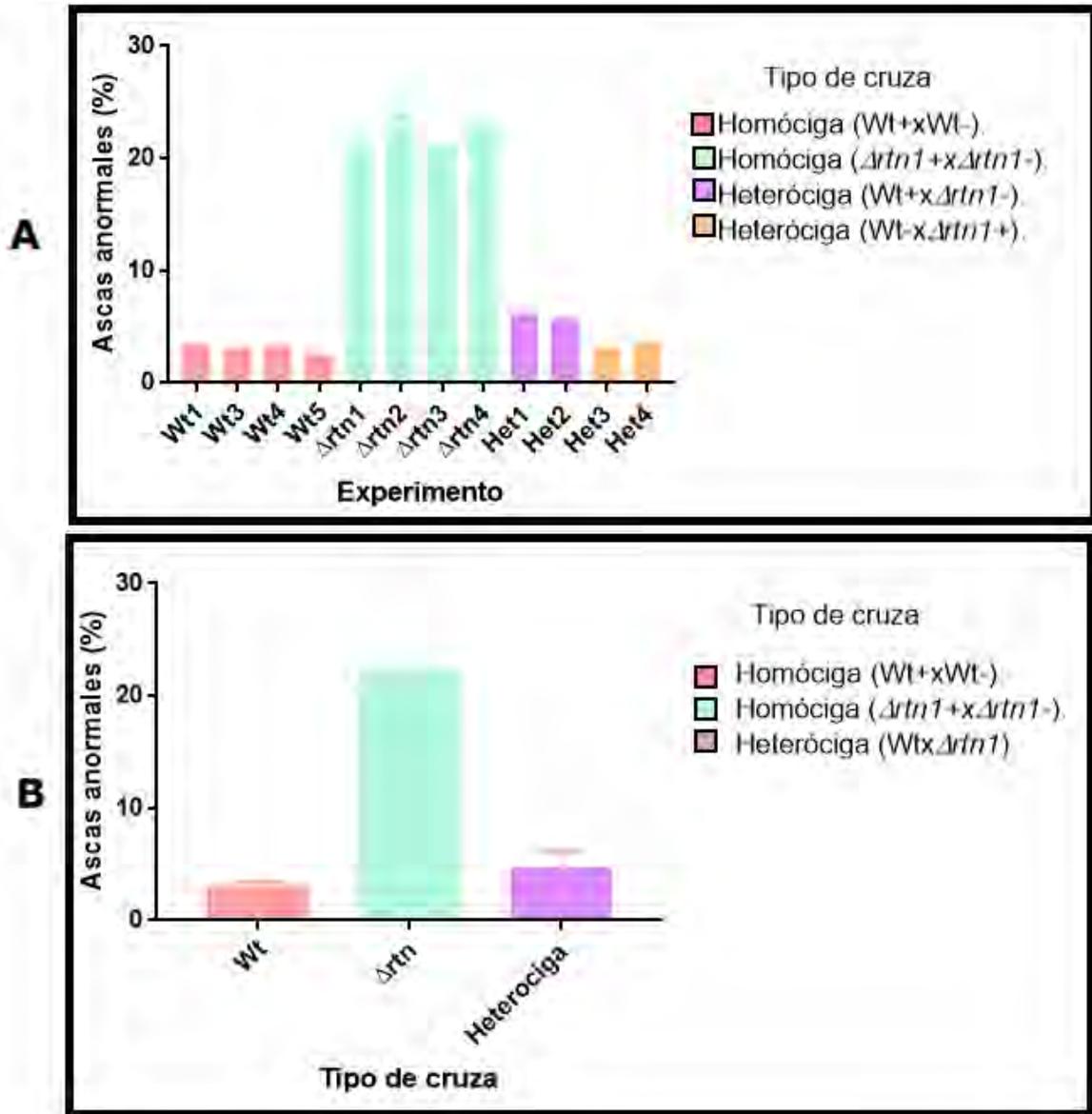


Figura 18. Cuantificación de los defectos en la formación de las ascas durante el desarrollo sexual de las mutantes *Artn1*. A) Porcentaje de ascas anormales formadas por las cepas *Artn1* en cruces homocigas y heterocigas (con una cepa silvestre) cada clase en el eje de las abscisas corresponde a un experimento independiente en el que se evaluaron entre 75-120 ascas por experimento. En las cruces heterocigas, el porcentaje de ascas anormales se determinó a partir de los peritecios formados en las cepas *MAT+* (i.e. actuando como la contraparte femenina de las cruces sexuales). B) Promedio de ascas defectuosas para cada tipo de cruce en (A) (las barras indican D.S.).

Por otra parte, también evaluamos la formación de las ascosporas en ascas derivadas de cruces heterocigas de la cepa mutante *Artn1* por

la silvestre. Estos experimentos se efectuaron evaluando la formación de las ascas en cruzas en las que la mutante ***Δrtn1*** fungió tanto como pareja femenina (fertilizada por espermacios silvestres) como masculina (fertilizando ascogonios silvestres). En estas cruzas heterocigas, en las cuales analizamos entre 91 a 106 ascas (recolectadas entre 6-8 peritecios de cuatro días de desarrollo), observamos que el porcentaje de ascas anormales, para una crusa $Wt+x\Delta rtn1-$, se encuentra entre el 5.76% al 6.18%. A su vez, en una crusa heterociga $Wt-x\Delta rtn1+$, el porcentaje de ascas anormales va desde el 3.09% al 3.63% (Figura 18-A). Posteriormente, unimos estos resultados para generar el promedio grupal de las cruzas heterocigas y encontramos que, la formación de las ascosporas fue anormal en un 4.67%, con una D.S. de 1.53% de las ascas (Figura 18B).

Estos resultados sugieren que el fenotipo de las mutantes ***Δrtn1*** se debe a una función de RTN1 en el desarrollo del asca previa a la celularización de las ascosporas (previo a que las ascosporas sean autónomas), e indican que este fenotipo es recesivo, razón por la cual, únicamente se aprecian defectos en las cruzas homocigas ***Δrtn1***.

Los resultados anteriores son consistentes con defectos en la segregación de los núcleos durante el desarrollo meiótico/post-mitótico del hongo. Por ello, para entender mejor la función de RTN1 durante el desarrollo sexual, evaluamos la distribución de los núcleos a lo largo de éste. Por medio de una tinción con DAPI, se aprecia que en contraste con la cepa silvestre *Wt*, donde siempre hay cuatro esporas con dos núcleos cada una (Figura 19-A y B), en las mutantes de cruzas homocigas ***Δrtn1***, encontramos ascas anormales de cuatro esporas, dos de ellas con tres núcleos y dos más con un núcleo cada una (Figura 19-C). A su vez, encontramos ascas anormales de tres esporas, con dos núcleos en dos de ellas y una con cuatro núcleos (Figura 19D).

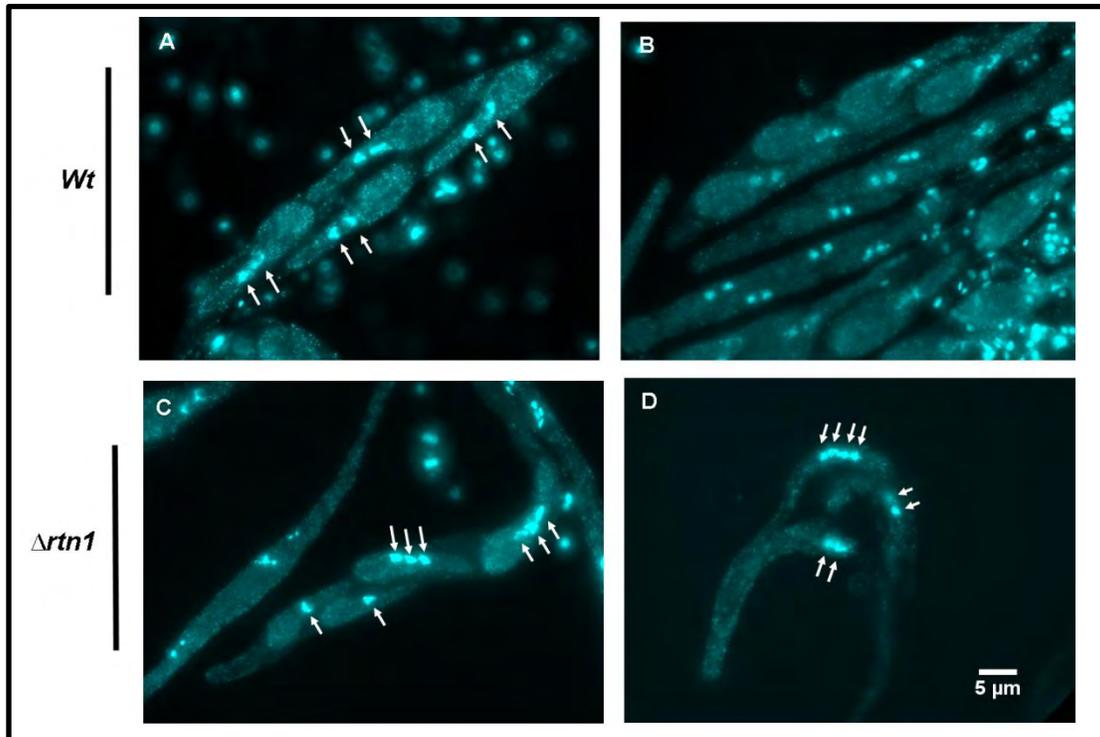
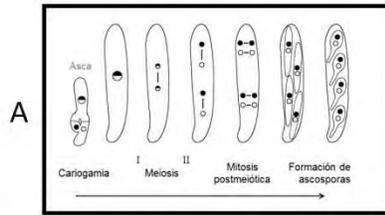


Figura 19. La ausencia de RTN1 afecta la distribución nuclear de las ascosporas. En una cruce sexual entre cepas silvestres, en cada asca los núcleos derivados de la meiosis se dividen mitóticamente y los ocho núcleos resultantes son distribuidos en cuatro ascosporas binucleadas (A y B, nótese en B la presencia de ascas en diferentes estadios de desarrollo, portando todas ellas ascosporas binucleadas). Por el contrario, las ascas formadas en cruces homocigas entre mutantes $\Delta rtn1$ presentan una distribución nuclear alterada (C y D). En los ejemplos ilustrados se puede observar la formación de cuatro ascosporas con una distribución nuclear desigual (C, dos esporas con tres núcleos y dos esporas con un solo núcleo), o bien, la formación de un número reducido de esporas con un número aberrante de núcleos (D, dos esporas binucleadas y una espora con cuatro núcleos). Los núcleos y el DNA mitocondrial fueron teñidos con DAPI. Las flechas señalan núcleos.

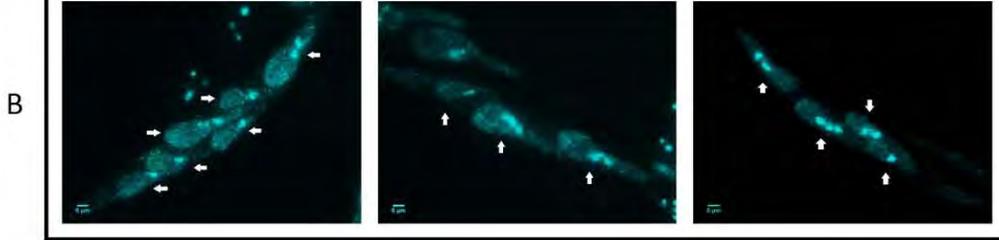
Lo anterior sugiere, que la distribución anormal de los núcleos en las esporas formadas en cruces $\Delta rtn1$, es producto de una mala segregación del material genético al interior de las ascas. Como ejemplo de esto, observamos que a diferencia de la cepa Wt donde los ocho núcleos generados al concluir la mitosis-postmeiótica se asocian en pares (Figura 19-B), en las cepas $\Delta rtn1$ los núcleos de las ascosporas no se encuentran asociados en pares (Figura 20B). A su vez, es posible ver una mala segregación del material genético incluso en etapas del desarrollo como la mitosis-postmeiótica (Figura 20-C), la meiosis II y la

meiosis I (Figura 20D-E) y asimismo, es posible observar que los cromosomas homólogos de una cepa *Δrtn1* en metafase de meiosis-I, se encuentran mal distribuidos (Figura 20-D). Es importante indicar, que a pesar de la presencia de ascosporas anormales en la mutante *Δrtn1*, todas ellas son capaces de germinar igual que las ascosporas silvestres.

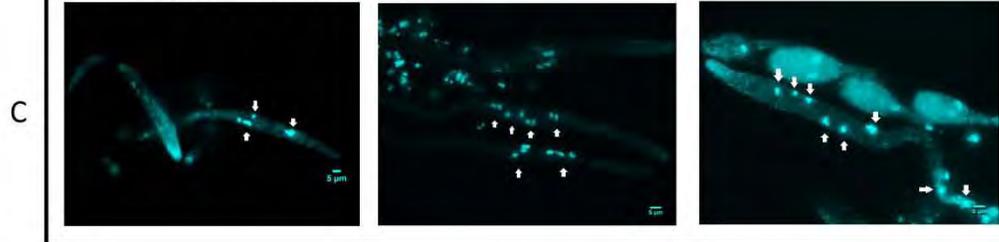


Artn1

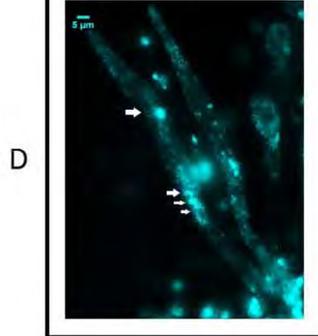
Formación de ascoporas.



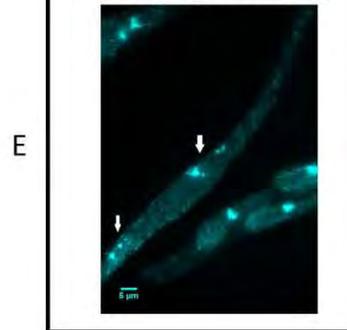
Mitosis post-meiótica.



Meiosis II.



Meiosis I (Anafase I).



Meiosis I (Metafase I).

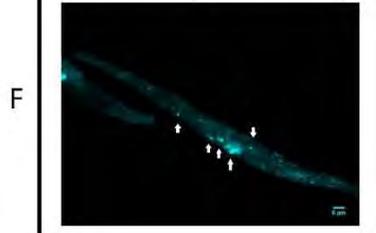


Figura 20. La ausencia de RTN1 afecta la segregación nuclear durante el desarrollo meiótico. A) Esquema del desarrollo meiótico que lleva a la formación de las ascosporas en *P. anserina*. La flecha negra indica el sentido de la progresión del desarrollo sexual. B) Ejemplos de ascas formadas en cruza homocigas $\Delta rtn1$ en las que los núcleos derivados de la meiosis no se segregan correctamente (imágenes izquierda y derecha) o se pierden durante la segregación nuclear (centro, nótese la distribución de solo siete núcleos en tres ascosporas) (las flechas blancas indican ascosporas). C) Ascas mutantes $\Delta rtn1$ en mitosis post-meiótica, con una distribución anormal de núcleos (flechas blancas). D) Asca mutante $\Delta rtn1$ al final de la segunda división meiótica con una distribución anormal de núcleos (flechas blancas, nótese como tres núcleos se agregan y se mantienen alejados del cuarto núcleo derivado de la meiosis). E) Asca mutante $\Delta rtn1$ con una mala segregación cromosomal en la meiosis-I (Anafase-I) (nótese el agrupamiento desigual de los cromosomas en los extremos del eje de la primera división meiótica, flechas blancas) F) Asca mutante $\Delta rtn1$ con mala distribución de cromosomas homólogos en meiosis-I (Metafase-I) (Flechas blancas).

4.- Ensayos de complementación genética de las mutantes de delección $\Delta rtn1$ de *P. anserina*.

Para confirmar que el fenotipo observado en las cepas mutantes $\Delta rtn1$ se debe, en efecto, a la ausencia de *RTN1*, efectuamos experimentos de complementación genética en los que evaluamos si la introducción ectópica de un alelo silvestre del gen *RTN1* era capaz de corregir los defectos en el desarrollo sexual de las cepas $\Delta rtn1$. Para ello llevamos a cabo experimentos de co-transformación en los que la cepa $\Delta rtn1$ (*MAT+*) fue transformada con un plásmido portador del gen *RTN1* junto con un plásmido que confiere resistencia a la geneticina. Durante este ensayo, se obtuvieron un total de 24 cepas transformadas resistentes a la geneticina $\Delta rtn1^c$ (+). De éstas las cepas C9, C12, C19, C23 y C24 no lograron crecer adecuadamente en medio M2. Mientras que la cepa C17 creció en medio M2, pero posteriormente no se logró fertilizar, por lo cual estas seis cepas fueron descartadas. Las 18 cepas restantes, fueron cruzadas por la cepa $\Delta rtn1$ (*MAT-*) y en ellas se analizó la formación de las ascas (Figura 21). De manera semejante a nuestros resultados previos, cuando la cepa $\Delta rtn1$ (*MAT-*) fue cruzada

por una cepa silvestre (Figura 21, cruce heterociga) solo el 1.26% de las ascas fue anormal, mientras que cuando la misma cepa fue cruzada con una mutante *Δrtn1 (MAT+)* cerca del 20% de las ascas presentó defectos (Figura 21). En este experimento no se observaron ascas anormales en una cruce entre cepas silvestres. Por su parte, cuando la cepa *Δrtn1 (MAT-)* fue cruzada con cada una de las 18 transformantes *Δrtn1 (MAT+)* resistentes a geneticina, observamos que en 11 de ellas el porcentaje de ascas anormales fue comparable con el de las cruces homocigas de *Δrtn1* (8.47 - 29.2%). Sin embargo, las 7 restantes presentaron un porcentaje de ascas anormales comparable con el obtenido en nuestros experimentos tanto en cruces heterocigas como silvestres (entre el 0.83 y el 3.77%). Estos porcentajes también son equiparables con los reportados en la literatura para las cruces silvestres de *P. anserina* ~1 % (P Silar, 2013). De manera global, estos resultados indican que en el 38.88% de las cotransformantes el fenotipo silvestre fue reestablecido, lo que es consistente con los porcentajes reportados en otros ensayos de complementación (Ait Benkhali et al., 2013); los cuales son obtenidos, comparando el número de cepas complementadas entre el número total de cotransformantes. Con los datos obtenidos en el ensayo de complementación es posible afirmar que el fenotipo apreciado en las mutantes *Δrtn1*, es ocasionado por la ausencia de la proteína RTN1, la cual, únicamente genera cambios fenotípicos evidentes en la fase sexual del desarrollo del hongo *P. anserina*.

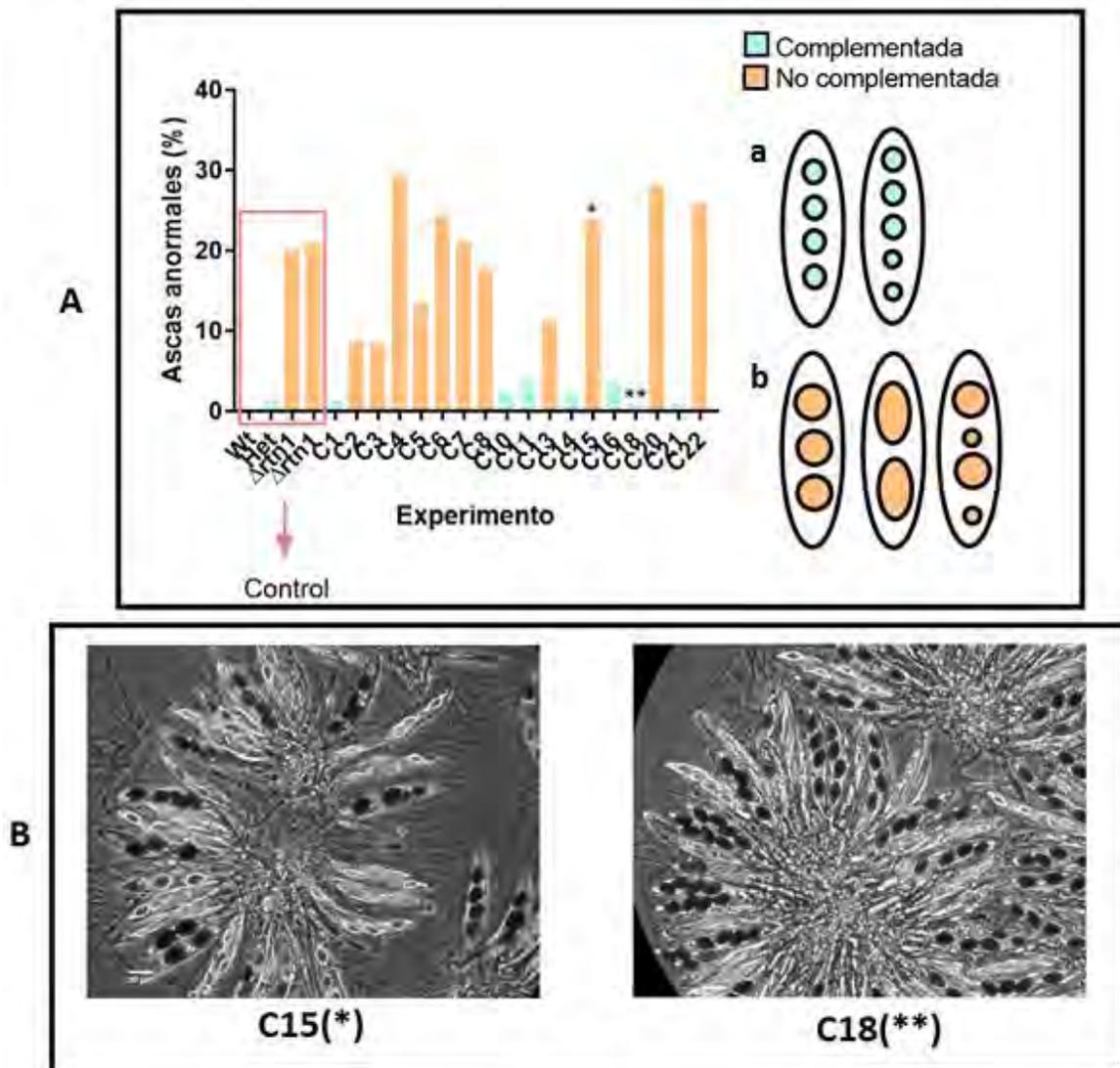


Figura 21. Ensayo de complementación genética de las cepas $\Delta rtn1$. A) La cepa $\Delta rtn1$ fue co-transformada con un plásmido portador de un alelo silvestre *RTN1* y un plásmido que confiere resistencia a la geneticina. Las transformantes resistentes a geneticina obtenidas (indicadas como C en el histograma) fueron cruzadas con una cepa $\Delta rtn1$ y el porcentaje de ascas anormales formadas en estas cruza fue determinado (eje y, izquierda). Como controles se realizaron cruza homocigas silvestre (Wt) y $\Delta rtn1$, así como una cruza heterociga Wt x $\Delta rtn1$ (Het). A la derecha, se indica el tipo de ascas consideradas como normales (a) y anormales (b). Nótese que en un número significativo de cepas (indicadas en verde) el porcentaje de ascas anormales se redujo a niveles equiparables con los de una cruza heterociga. B) Ejemplos de las ascas formadas por una cepa no complementada (C15*) y una complementada (C18**).

VIII. DISCUSIÓN

Las proteínas de reticulón son una familia de proteínas conservadas en los eucariontes que tienen un papel importante en estructurar el RE (Oertle & Schwab, 2003; Shibata et al., 2008). Sin embargo, aún se sabe poco sobre cómo estas proteínas intervienen en el desarrollo celular. En este trabajo identificamos a la única proteína de reticulón –RTN1– de *P. anserina* (Figura 5), la cual conserva el dominio *RHD* (Figura 7) y los segmentos transmembranales representativos de la familia de los reticulones (Figura 9), y demostramos que ella es necesaria para la correcta progresión del desarrollo meiótico. Esta proteína representa el primer reticulón caracterizado en un hongo filamentoso.

Para comprender el papel de la proteína de reticulón RTN1 de *P. anserina*, la cual predeciblemente participa en la arquitectura del RE (Voeltz & Barr, 2013), se generaron cepas mutantes de delección *Δrtn1* *MAT+* y *MAT-*, en las cuales analizamos tanto la fase somática, como la fase sexual del desarrollo de *P. anserina*.

En primer lugar, estudiamos la función de RTN1 durante la fase somática de *P. anserina*. Se ha demostrado que las proteínas de reticulón interactúan con los componentes del exocisto y podrían intervenir en la secreción de vesículas (De Craene et al., 2006). Asimismo, se ha implicado a estas proteínas en la organización de los sitios de salida del RE (Okamoto et al., 2012), y en el transporte vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Wakana et al., 2005). Por ello, pensamos que RTN1 podría estar implicado en el proceso de secreción de proteínas de *P. anserina*. Evaluamos la capacidad de crecimiento del hongo en medios con diferentes azúcares complejos (dextrina y celulosa) como fuentes de carbono, pues *P. anserina* presenta una eficiente secreción enzimática que le permite degradar dichos elementos (Harms et al., 2011; P. Silar et al., 2011).

Sin embargo, no observamos defectos fenotípicos asociados a la ausencia de RTN1 (Figura 14). Por otra parte, se conoce que la formación de *novo* de los peroxisomas es dependiente del RE (Kim et al., 2006; Lam et al., 2010), y recientemente se ha demostrado que la biogénesis, la dinámica y proliferación de los peroxisomas se encuentra regulada por los reticulones (Brocard & Hartig, 2014; David et al., 2013; Mast et al., 2016a), de manera que evaluamos la capacidad de utilizar ácido oléico, pues las mutantes de *P. anserina* afectadas en la biogénesis peroxisomal muestran un defecto en el crecimiento en dicha fuente de carbono (Berteaux-Lecellier et al., 1995). Sin embargo, la ausencia de RTN1 no modificó el crecimiento en este ácido graso, por lo que estos resultados nos indican que la formación y regulación peroxisomal tampoco se encuentra afectada.

Al mismo tiempo, apreciamos que durante la fase somática de las mutantes *Δrtn1*, la ausencia de la proteína RTN1 no genera modificaciones en la pigmentación del hongo (Figura 13). En muchos hongos, la pigmentación se da por la presencia de melanina, la cual está regulada por un proceso de tráfico de endosomas (Upadhyay et al., 2016). A su vez, el tráfico de los endosomas está coordinado por los sitios de contacto que se crean en la red tubular del RE (Rowland et al., 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en ausencia de RTN1 la red tubular del RE de *P. anserina* durante la fase somática no se encuentra alterada de manera que repercuta en la función de, por lo menos, los endosomas implicados en la melanización micelial.

En lo que respecta al envejecimiento, *P. anserina* es un hongo que, a diferencia de otros, presenta un límite de crecimiento vegetativo definido por un proceso de senescencia de sus células apicales (Bernhardt, Hamann, & Osiewacz, 2014; Horwitz, Mukherjee, Mukherjee, & Kubicek, 2013; Malagnac et al., 2007; C. Q. Scheckhuber

& Osiewacz, 2008). A nivel celular, se ha demostrado que la senescencia en los hongos involucra una reorganización de algunos organelos (Bernhardt, Müller, Reichert, & Osiewacz, 2014; C. Scheckhuber et al., 2007), e incluso en levaduras se ha demostrado que la esperanza de vida aumenta al inhibir la fisión peroxisomal (Lefevre, Kumar, & van der Klei, 2015). Sin embargo, en nuestras mutantes ***Δrtn1*** no se afectó el envejecimiento en nuestras condiciones experimentales ya que no se observó muerte celular temprana, por el contrario, las mutantes ***Δrtn1*** vivieron igual que una cepa silvestre (Figura 15).

La presencia de marcadores de secuencia expresados (***EST***) de ***RTN1*** en hifas vegetativas de ***P. anserina*** indica que el gen ***RTN1*** se expresa durante la fase somática. Sin embargo, la ausencia de la proteína RTN1 no afecta ni el crecimiento, ni la pigmentación, ni el envejecimiento de ***P. anserina***. Esto sugiere que el arreglo del RE no se modifica drásticamente en ausencia de esta proteína, lo que podría indicar que existen otras proteínas, como la familia DP1/Yop1 o lunapark, que podrían estar supliendo las funciones de RTN1 (Shibata et al., 2009). De acuerdo con el modelo de generación e interconversión de la morfología del RE (Shemesh et al., 2014), estas proteínas podrían impedir que la ausencia de RTN1 genere un aumento en la formación de cisternas del RE. De manera similar en otros modelos como ***S. cerevisiae***, se ha reportado que las mutantes de delección ***Δrtn1***, al igual que la mutante doble ***Δrtn1Δyop1*** o ***Δrtn2Δyop1***, no presentan defectos en la estructura de su RE (Voeltz et al., 2006), ni en su crecimiento. Sin embargo, el crecimiento se ve afectado cuando la mutante ***Δrtn1*** está acompañada de una mutación en lunapark (***Δlnp1***), así como en las mutantes de triple (***Δlnp1Δrtn1Δyop1***) y cuádruple (***Δlnp1Δrtn1Δrtn2Δyop1***) delección de los genes codificantes para proteínas estructurales del RE (Chen, Novick, & Ferro-Novick, 2012).

Asimismo, evaluamos si la ausencia de RTN1 de *P. anserina* afecta la formación de estructuras sexuales, tales como los ascogonios, espermacios, peritecios, meiocitos (ascas) o las ascosporas. Es importante señalar que, de acuerdo con el análisis de *EST*, el gen *RTN1* también se expresa durante la fase sexual del desarrollo.

Durante la fase somática y en presencia de luz, comienza a diferenciarse el micelio aéreo, en el cual se producen los ascogonios y los espermacios, cuya formación inicia el desarrollo de sexual de *P. anserina*. Subsecuentemente, la fertilización de un ascogonio por un espermacio (de tipo sexual complementario) resulta en la formación de los peritecios, las estructuras multicelulares donde el desarrollo sexual se lleva a cabo. Observamos que la ausencia de la proteína RTN1 no afectó la diferenciación de estas estructuras (Figura 13). No obstante, sorpresivamente, la progresión del desarrollo sexual dentro de los peritecios se vio comprometida al eliminar esta única proteína de reticulón. El fenotipo generado con la ausencia de RTN1 indica que la correcta segregación nuclear tanto a lo largo del desarrollo meiótico como post-meiótico depende del reticulón de *P. anserina* (Figura 17). Sin embargo, este defecto no se observó en todas las ascas ya que en cerca del 75% de ellas no se detectaron anomalías en su desarrollo (Figura 18). Los ensayos de complementación genética de las mutantes *Δrtn1* demostraron que en un número significativo de cepas la reintroducción de un alelo silvestre de *RTN1* es capaz de restablecer la formación de ascas a niveles comparables con los de la cepa silvestre, donde la formación de ascas anormales es de alrededor del 1% (P Silar, 2013). Sin embargo, en algunas cepas complementadas el porcentaje de ascas anormales disminuyó, mas no se corrigió al nivel de la cepa silvestre (*i.e.* las cepas C2, C3, C5 y C13 en la Figura 21). Dada la naturaleza ectópica de la integración del gen *RTN1* en este experimento, es posible que en estas cepas parcialmente complementadas los niveles de

expresión de **RTN1** sean diferentes de los de **RTN1** endógeno, lo que indicaría que la abundancia de esta proteína es importante para el correcto desarrollo meiótico/post-meiótico. Al igual que en la fase vegetativa, la deficiencia de RTN1 en algunos meiocitos podría ser compensada por otras proteínas estructurales del RE.

Es importante señalar que durante el desarrollo sexual observamos defectos en la segregación nuclear tanto en las dos divisiones meióticas como en las divisiones mitóticas que les siguen (Figura 19). Sin embargo, en la fase somática no se observó que los núcleos sufrieran una alteración a lo largo de las hifas (Figura 16). Esto sugiere que la proteína RTN1 ejerce un punto clave para que ocurra la correcta segregación y acomodo del material genético sólo durante la fase de desarrollo sexual en *P. anserina*. Este fenómeno podría estar relacionado con una expresión diferencial de las diferentes proteínas estructurales del RE durante el desarrollo o bien, con una constitución específica de la maquinaria involucrada en la segregación nuclear durante el desarrollo sexual.

Por su parte, es interesante observar que los defectos en la biogénesis peroxisomal generan un fenotipo semejante al de las cepas ***Δrtn1*** (Bonnet et al., 2006; Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). Sin embargo, dado que las mutantes ***Δrtn1*** no muestran un déficit de crecimiento en ácido oléico, es poco probable que estos defectos se deban a la alteración de la biogénesis peroxisomal. No obstante, una situación opuesta también es posible; es decir, los defectos peroxisomales podrían afectar el arreglo del RE (involucrando a RTN1), y por ende, el desarrollo meiótico. De forma consistente con esta hipótesis, se ha demostrado que diversos defectos en la biogénesis peroxisomal afectan la abundancia y el arreglo del RE (Dirkx et al., 2005). De hecho, en *P. anserina* hay evidencias de que algunas mutantes peroxisomales, como las carentes de PEX5 y PEX7, que

presentan defectos en la progresión de la meiosis, también tienen defectos en el arreglo y la forma de sus núcleos (Bonnet et al., 2006).

La función precisa que desempeña RTN1 durante el desarrollo meiótico es, sin embargo, aún poco clara. Se conoce que el RE sufre modificaciones asociadas a la sobreexpresión o supresión de las diferentes proteínas que conforman sus dominios estructurales (Shemesh et al., 2014), y existe evidencia de que en los mamíferos ocurre una transformación progresiva entre las láminas y los túbulos del RE que está relacionada con la estructuración de la envoltura nuclear durante la división celular (Puhka et al., 2012). Asimismo, existe evidencia de que las proteínas de reticulón, junto con las de la familia de DP1/Yop1, participan en el anclaje del complejo del poro nuclear (Dawson et al., 2009), así como en el ensamblaje y posicionamiento correcto de los cuerpos polares del huso acromático (**SPB**) en la mitosis de *S. cerevisiae*. De hecho, las mutantes *Artn1Δyop1* muestran anomalías en la estructura de los **SPB**, lo cual trae como consecuencia un decremento en su tamaño y desorientación del huso mitótico con respecto al eje de división celular (Casey et al., 2012). Asimismo, en los hongos ascomicetos, incluyendo *S. pombe* y *S. cerevisiae*, se ha demostrado que los **SPB** cumplen una función importante para reclutar a elementos como *Spo2*, *Spo13* o *Spo15*, que llevan a cabo el ensamblaje de la membrana de las esporas durante su formación (Nakase et al., 2008; Neiman, 2011). Con base en estas evidencias, es posible hipotetizar que el posicionamiento de los **SPB** de *P. anserina* depende de las modificaciones que ocurren en el arreglo del RE y de la envoltura nuclear (Shemesh et al., 2014), o bien, que la proteína RTN1 participe directamente en el ensamblaje de los **SPB** en la envoltura nuclear durante el desarrollo meiótico de *P. anserina*.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se identificó y caracterizó el gen codificante para la única proteína RTN1 en el hongo filamentoso *Podospora anserina*.

Se determinó, que la ausencia de la proteína RTN1, perteneciente a la familia de los reticulones, no modifica el fenotipo de la fase somática en *P. anserina*.

La ausencia de RTN1 altera el desarrollo sexual del hongo. La ausencia de esta proteína afecta la segregación nuclear en los meiocitos (las ascas), lo que provoca que en ellos se forme un porcentaje alto de ascosporas anormales; las cuales tienen defectos en su tamaño y número, así como en la distribución del material genético.

Esta investigación ofrece la primera evidencia de que una proteína estructural del RE –RTN1– se requiere para la progresión nuclear durante el desarrollo sexual.

X. PERSPECTIVAS

Nuestra investigación no ha mostrado la estructura que adopta el retículo endoplásmico tras la ausencia de la proteína de reticulón RTN1 en *P. anserina*, por lo cual un estudio exhaustivo del arreglo conformacional de este organelo por medio de proteínas fluorescentes permitiría, por una parte, corroborar que RTN1 participa en la estructuración del RE en este hongo. Asimismo, este análisis permitiría esclarecer si existe una topología diferente del RE durante la fase somática y la fase sexual del hongo, de manera dependiente de RTN1. Además, un análisis comparativo de la estructura del RE y de la distribución de otros organelos, como los peroxisomas y las mitocondrias, podría proporcionar información relevante sobre las interacciones del RE en la célula. Finalmente, la caracterización de otras proteínas estructurales del RE, como las pertenecientes a la familia DP1/Yop1, atlastinas y lunapark, mediante el estudio de mutantes de doble o triple delección de sus genes permitiría entender mejor la dinámica e importancia del RE en el hongo filamentoso *P. anserina*. Más aún, estudios de sobre-expresión de genes codificantes para proteínas como TMEM33 o TMEM170A, que interactúan directamente con los

reticulones y actúan de manera antagónica a ellos (Christodoulou et al., 2016; Urade et al., 2014), o análisis sobre la distribución del huso acromático y los SPB, nos permitirían entender mejor el proceso de la meiosis -a nivel molecular- en que RTN1 está implicado.

XI. APÉNDICE

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para este estudio

Nombre	Secuencia	Descripción
rtn-5f	gtgaccgcaggtagctgaagaaaga	Oligonucleótido forward para amplificar extremo 5´ para la construcción del cassette de delección (a).
hph-rtn-5r	atgattcttctcgcttccggcggggattattggta	Oligonucleótido reverse para amplificar extremo 5´ para la construcción del cassette de delección (b).
hph-rtn-3f	ccttctttctagctagaggagcaaggcttccttcgac	Oligonucleótido forward para amplificar extremo 3´ para la construcción del cassette de delección (c).
rtn-3r	gctgtctgagctcgtcctttcgta	Oligonucleótido reverse para amplificar extremo 3´ para la construcción del cassette de delección (d).
rtn-hph-f	taccaataatccccgccggaagcgagaagaatcat	Oligonucleótido forward para amplificar el gen hph para la construcción del cassette de delección (e).
rtn-hph-r	gtcgaaggaagccttgctcctctagctagaaagaag	Oligonucleótido reverse para amplificar el gen hph para la construcción del cassette de delección (f).
rtn-5ch	gagagagagccaaggcac	Oligonucleótido forward para confirmar la delección en el extremo 5´ de las mutantes Δrtn1 (g).
hph-rc	gcggtgagttcaggcttt	Oligonucleótido reverse para confirmar la delección en el extremo 5´ de las mutantes Δrtn1 (h).
hph-fc	cgccgatagtggaaccg	Oligonucleótido forward para confirmar la delección en el extremo 3´ de las mutantes

<i>Δrtn1</i> (i).		
rtn-3ch	cacgtatctcggtcagcc	Oligonucleótido reverse para confirmar la deleción en el extremo 3´ de las mutantes
<i>Δrtn1</i> (j).		
5rtn	aggtcacaggtggagagg	Oligonucleótido reverse para amplificar gen RTN1 en el extremo 5´ (k).
3rtn	tgaccagaccgagcagat	Oligonucleótido forward para amplificar gen RTN1 en el extremo 3´ (l).

Soluciones Stock.

Acetato de potasio 5 M (30mL).....14.71 g

Antibióticos.

Ampicilina.....10 mg/mL

Geneticina..... 100 mg/mL

Higromicina.....250 mg/mL

CaCl₂ (1 M, 250 ml).....36.75 g

DAPI.....1 mg/mL

EDTA (0.5M, 500mL, pH8).....73.05 g

EDTA + SDS 0.2% (30 mL)

EDTA (50 mM).....3 mL

SDS (10%).....0.6 mL

Fenol cloroformo.....1:1 (v/v)

Gel de agarosa 1% con TBE 1X (500 ml).

Agarosa.....5 g

Se preparan 500 mL de agarosa y en cada uso se calienta, colocando en la cámara de electroforesis la cantidad necesaria una vez que su temperatura baja y antes de que gelifique.

MgCl₂ (0.1 M).....20.33 g

Oligoelementos (elementos traza).

Ácido Cítrico, 1H₂O.....5 g

Sulfato de Zinc (ZnSO₄, 7H₂O).....5 g

Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O.....1 g

CuSO₄, 5H₂O.....250 mg

MnSO₄, 1H₂O.....50 mg

Ácido bórico (H₃BO₃, anhidro).....50 mg

Molibdato de sodio (Na₂MoO₄, 2H₂O).....50 mg

Cloroformo.....1 gota

Paraformaldehido (PAF) (10mL)

PAF.....0.74 g

EGTA (0.44 M).....0.23 mL

MgCl₂ (0.5 M).....0.2 mL

PIPES (pH 6.9).....1.8 mL

Disolver a baño maría a 60 °C x 1 Hora.

PEM (10 mL).

PIPES (0.5 M).....1.8 mL

EGTA (0.44 M).....0.227 mL
MgCl₂ (0.5 M).....0.2 mL
H₂O.....7.7 mL

PBS 10X (100 mL).

Na₂HPO₄ (1.6 M).....50 mL
NaH₂PO₄, 2H₂O (0.4 M).....50 mL
NaN₃.....0.5 g

Poli-L-lisina

Disolver 1 mg de poli-L-lisina en 1mL de tritón 0.05%

SDS 10% (100 mL).....10 g

Solución 1:

KH₂PO₄.....50 g (m/v)

Solución 2:

K₂HPO₄.....60 g (m/v)

Solución 3:

MgSO₄.....50 g (m/v)

Solución 4:

Urea.....100 g (m/v)

Solución A:

Na₂HPO₄ (0.5 M).....89 g (m/v)

Solución B:

KH₂PO₄ (0.5 M).....68 g (m/v)

Sorbitol (0.8M 200mL).....29.1g

Tris-base (1M, pH 8, 500mL).....60.55g (m/v)

Tritón 10%.

Diluir la solución Triton100X de Merck, 10 veces para obtener una solución de tritón 10X, se debe agitar vigorosamente para obtener una solución transparente que se conserva a temperatura ambiente.

Vitaminas.

Biotina + Tiamina.....200 mg/l(c/u)

Buffers.

TPS1 (1L).

Sacarosa.....200g

Na₂HPO₄ (5 mM).....10 mL

KH₂PO₄ (45 mM).....90 mL

TPC (1L).

Sacarosa 0.6 M.....205.38 g

CaCl₂ (10 mM).....10 mL

Tris (10 mM, pH 7.5).....10 mL

TBE (Stock 5X)

Tris base.....54 g

Ácido bórico.....27.5 g

EDTA (pH 8.0) 0.5 M.....20 mL

TE (10X)ⁱ (100 mL)

Tris-Cl (100 mM).....10 mL

EDTA (10 mM, pH 8.0).....2 mL

Medios de cultivo utilizados.

Luria Bertuni (LB) ⁱ

1) Sólido

LB Agar *Ultrapure*.....35 gm/L

Se esteriliza en autoclave y de ser el caso, se añaden los antibióticos necesarios para volverlo selectivo una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C y se vacía 30 ml en cajas Petri.

2) Líquido

LB *Broth Ultrapure*.....20 gm/L

Se esteriliza en autoclave y de ser el caso, se añaden los antibióticos necesarios para volverlo selectivo una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C.

Adición de antibióticos para medios selectivos:

Ampicilina.....25 µg/mL

M2ⁱ

Solución 1.....5 mL

Solución 2.....5 mL

Solución 3.....5 mL

Solución 4.....5 mL

Vitaminas (Biotina + Tiamina).....0.5 mL

Oligoelementos.....1 mL

Dextrina.....22 g

Agar.....12.5 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C y se vacía 30 ml en cajas Petri.

M0 + ácido oleico (AO) ⁱ.

Solución 1	5 mL
Solución 2	5 mL
Solución 3	5 mL
Solución 4	5 mL
Vitaminas (Biotina + Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos	1 mL
Ácido oleico	0.5 mL
Tween 40	2 mL
Agar	12.5 g

Se disuelve el ácido oleico con el Tween 40 en 1/5 del volumen final (descontar del volumen final) por 1hr a temperatura ambiente con agitación. Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C y se vacía 30 ml en cajas Petri.

M0 + celofanⁱ.

Solución 1	5 mL
Solución 2	5 mL

Solución 3.....	5 mL
Solución 4.....	5 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos.....	1 mL
Agar.....	12.5 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave junto con películas de papel celofán del diámetro de la caja Petri (de manera independiente). Posteriormente se añaden las vitaminas una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C y se vacía 30 ml en cajas Petri, una vez gelificado se coloca sobre el medio la película de papel celofán.

Medio de germinación GYEⁱ.

Acetato de amonio (440 g/L).....	10 mL
BactoPeptona.....	15 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar.....	13 g

Esterilizar y agitar bien después de la esterilización, vaciando 25mL por caja Petri.

Tapas de agar (MA) ⁱ.

Agar.....	20 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	10 g

Se esteriliza en autoclave y se vacía inmediatamente de 10-15 mL por caja Petri.

Medio líquido para protoplastos (*Fiolexroux*).ⁱ

Solución 1.....	5 mL
Solución 2.....	5 mL
Solución 3.....	5 mL
Solución 4.....	5 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos.....	1 mL
Extracto de levadura.....	5 g
Dextrina.....	22 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7- 7.1, se reparte en matraces Fernbach (250 ml c/u) y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C.

Medio para bacterias Luria Bertuni (LB) ⁱ.

Medios de regeneración para transformación de protoplastos.

RGⁱ.

Solución 1.....	5 mL
Solución 2.....	5 mL
Solución 3.....	5 mL
Solución 4.....	5 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos.....	1 mL
Dextrina.....	22 g
Sacarosa (0.58M).....	200 g

Agar.....10 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60 °C y se vacía 3ml en cajas Petri. Si se desea preparar RG líquido únicamente no se agrega agar.

Polietilen glicol (PEG) (50 ml).

Polietilen glicol 4000 60% (m/v)..... 30 g

10 mM CaCl₂.....5 ml (stock 100 mM)

10 mM Tris pH 7.5.....1 ml (stock 0.5 M)

Top agar (1L).

Medio RG.....75% (v/v)

Sorbitol 0.8M.....25% (v/v)

El medio RG se calienta en baño maría para poderse mezclar con el sorbitol cuando ambos son líquidos. Posteriormente se vierten juntos de 10-15 mL en la caja Petri con medio RG sólido.

XII. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1. Tablas.

Tabla 1. Cepas de P. anserina y plásmidos utilizadas en este estudio...... 39

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para este estudio 79

2. Figuras.

Figura 1. Arquitectura del retículo endoplásmico en una célula 11

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 min a 120 °C y 1.5atm.

Figura 2. Modelo de la conformación de las proteínas estructurales del retículo endoplásmico.	20
Figura 3. Ciclo de vida en <i>Podospora anserina</i>	23
Figura 4. Ubicación genómica del gen <i>RTN1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	45
Figura 5. Mapa genómico de <i>Podospora anserina</i>	47
Figura 6. Análisis de proteínas ortólogas y parálogas de los reticulones en diversos genomas fúngicos.....	49
Figura 7. Identificación de los dominios conservados en la proteína <i>RTN1</i> de <i>P. anserina</i>	49
Figura 8. Alineamiento de <i>RTN1</i> con proteínas de reticulón representativas de animales, plantas y hongos	50
Figura 9. Análisis de los perfiles de hidrofobicidad de las proteínas de la familia de los reticulones en distintos hongos.....	51
Figura 10. Construcción del cassette para la delección de <i>RTN1</i>	52
Figura 11. Verificación por PCR de la delección $\Delta rtn1$ en una cepa transformante primaria	53
Figura 12. Verificación por PCR de la delección $\Delta rtn1$ en cepas mutantes purificadas (MAT+ y MAT-).....	56
Figura 13. El crecimiento, la pigmentación y la formación del micelio aéreo en las mutantes de delección $\Delta rtn1$ de <i>P. anserina</i>	57
Figura 14. Evaluación del crecimiento de las mutantes $\Delta rtn1$ en medios con polisacáridos complejos y ácidos grasos	59
Figura 15. Determinación del envejecimiento de las mutantes $\Delta rtn1$ de <i>P. anserina</i>	59
Figura 16. La distribución nuclear en el micelio aéreo y la formación de los ascogonios en las cepas mutantes $\Delta rtn1$	60
Figura 17. <i>RTN1</i> es requerida para la correcta formación de las ascosporas	62
Figura 18. Cuantificación de los defectos en la formación de las ascas durante el desarrollo sexual de las mutantes $\Delta rtn1$	64
Figura 19. La ausencia de <i>RTN1</i> afecta la distribución nuclear de las ascosporas.....	66
Figura 20. La ausencia de <i>RTN1</i> afecta la segregación nuclear durante el desarrollo meiótico	69
Figura 21. Ensayo de complementación genética de las cepas $\Delta rtn1$	71

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430-2437.
- Agrawal, G., Joshi, S., & Subramani, S. (2011). Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9113-9118. doi: 10.1073/pnas.1018749108
- Agrawal, G., & Subramani, S. (2016). De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochim Biophys Acta*, 1863(5), 892-901. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.014

- Ait Benkhali, J., Coppin, E., Brun, S., Peraza-Reyes, L., Martin, T., Dixelius, C., . . . Debuchy, R. (2013). A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. *PLoS Genet*, *9*(7), e1003642. doi: 10.1371/journal.pgen.1003642
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*, 1-1342.
- Armesto, R. A., Díaz, J. L. D., Peromingo, J. D., González, A. R., Mao, M. C., & Martínez, F. D.-L. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicía Clínica*, *72*(1), 7-17.
- Audhya, A., Desai, A., & Oegema, K. (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, *178*(1), 43-56. doi: 10.1083/jcb.200701139
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., . . . Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, *77*(6), 895-907.
- Bernhardt, D., Hamann, A., & Osiewacz, H. D. (2014). The role of mitochondria in fungal aging. *Curr Opin Microbiol*, *22*, 1-7.
- Bernhardt, D., Müller, M., Reichert, A. S., & Osiewacz, H. D. (2014). Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusion reduces mitophagy and shortens replicative lifespan. *Sci Rep*, *5*, 7885-7885.
- Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson-Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., & Simonet, J. M. (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell*, *81*(7), 1043-1051.
- Bishop, W. R., & Bell, R. M. (1988). Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annual review of cell biology*, *4*(1), 579-606.
- Boldogh, I. R., & Pon, L. A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol*, *17*(10), 502-510. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.008
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boissard, S., Bourdais, A., & Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Mol Microbiol*, *62*(1), 157-169. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05353.x
- Borkovich, K. A., & Ebbole, D. J. (2010). *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, DC: ASM Press.
- Brocard, C., & Hartig, A. (2014). *Molecular Machines Involved in Peroxisome Biogenesis and Maintenance*: Springer.
- Carlile, M. J. (1995). *The success of the hypha and mycelium*. Londres: Chapman & Hall.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, *21*(16), 3422-3423.
- Casey, A. K., Chen, S., Novick, P., Ferro-Novick, S., & Wentz, S. R. (2015). Nuclear pore complex integrity requires Lnp1, a regulator of cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, *26*(15), 2833-2844. doi: 10.1091/mbc.E15-01-0053
- Casey, A. K., Dawson, T. R., Chen, J., Friederichs, J. M., Jaspersen, S. L., & Wentz, S. R. (2012). Integrity and function of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body depends on connections between the membrane proteins Ndc1, Rtn1, and Yop1. *Genetics*, *192*(2), 441-455. doi: 10.1534/genetics.112.141465
- Chen, S., Novick, P., & Ferro-Novick, S. (2012). ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Sey1p and the Lunapark family member Lnp1p. *Nat Cell Biol*, *14*(7), 707-716. doi: 10.1038/ncb2523
- Chen, S., Novick, P., & Ferro-Novick, S. (2013). ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, *25*(4), 428-433. doi: 10.1016/j.ceb.2013.02.006

- Cherepanova, N., Shrimal, S., & Gilmore, R. (2016). N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, *41*, 57-65.
- Christodoulou, A., Santarella-Mellwig, R., Santama, N., & Mattaj, I. W. (2016). Transmembrane protein TMEM170A is a newly discovered regulator of ER and nuclear envelope morphogenesis in human cells. *J Cell Sci*, *129*(8), 1552-1565. doi: 10.1242/jcs.175273
- D'Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R., & Miller, E. A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1833*(11), 2464-2472.
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*, *44*(2), 233-242.
- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., . . . Brocard, C. (2013). A combined approach of quantitative interaction proteomics and live-cell imaging reveals a regulatory role for endoplasmic reticulum (ER) reticulon homology proteins in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Proteomics*, *12*(9), 2408-2425. doi: 10.1074/mcp.M112.017830
- Dawson, T. R., Lazarus, M. D., Hetzer, M. W., & Wente, S. R. (2009). ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation. *J Cell Biol*, *184*(5), 659-675. doi: 10.1083/jcb.200806174
- De Craene, J. O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, . . . Novick, P. (2006). Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, *17*(7), 3009-3020. doi: 10.1091/mbc.E06-01-0080
- Di Sano, F., Bernardoni, P., & Piacentini, M. (2012). The reticulons: guardians of the structure and function of the endoplasmic reticulum. *Exp Cell Res*, *318*(11), 1201-1207. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.03.002
- Dirkx, R., Vanhorebeek, I., Martens, K., Schad, A., Grabenbauer, M., Fahimi, D., . . . Baes, M. (2005). Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology*, *41*(4), 868-878. doi: 10.1002/hep.20628
- El-Khoury, R., Sellem, C. H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M. F., Debuchy, R., & Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Curr Genet*, *53*(4), 249-258. doi: 10.1007/s00294-008-0180-3
- English, A. R., & Voeltz, G. K. (2013). Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *5*(4), a013227. doi: 10.1101/cshperspect.a013227
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B. M., . . . Silar, P. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Genome Biol*, *9*(5), R77. doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r77
- Fribley, A., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2009). Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*, *559*, 191-204. doi: 10.1007/978-1-60327-017-5_14
- Friedman, J. R., & Voeltz, G. K. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol*, *21*(12), 709-717. doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.004
- Geydan, T. D., Debets, A. J., Verkley, G. J., & van Diepeningen, A. D. (2012). Correlated evolution of senescence and ephemeral substrate use in the Sordariomycetes. *Mol Ecol*, *21*(11), 2816-2828. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05569.x
- Gidalevitz, T., Stevens, F., & Argon, Y. (2013). Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1833*(11), 2410-2424.
- Glick, B. S., & Nakano, A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *25*, 113-132. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421
- Goyal, U., & Blackstone, C. (2013). Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta*, *1833*(11), 2492-2498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.009

- Grossetete, S., Labedan, B., & Lespinet, O. (2010). FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC Genomics*, *11*, 81. doi: 10.1186/1471-2164-11-81
- Hall, T. (2005). BioEdit 7.0. 5. *North Carolina State University, Department of Microbiology*. Available via <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Hanada, K. (2010). Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *86*(4), 426-437.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, *9*(3), 177-192. doi: 10.1038/nrmicro2519
- Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., & Kubicek, C. P. (2013). *Genomics of soil-and plant-associated fungi*: Springer.
- Johnson, N., Powis, K., & High, S. (2013). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1833*(11), 2403-2409.
- Kim, P. K., Mullen, R. T., Schumann, U., & Lippincott-Schwartz, J. (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol*, *173*(4), 521-532. doi: 10.1083/jcb.200601036
- Knoblach, B., & Rachubinski, R. A. (2013). Doing the math: How yeast cells maintain their peroxisome populations. *Commun Integr Biol*, *6*(6), e26901. doi: 10.4161/cib.26901
- Kornmann, B., & Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*, *123*(Pt 9), 1389-1393. doi: 10.1242/jcs.058636
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, *157*(1), 105-132.
- Ladinsky, M. S., Mastrorade, D. N., McIntosh, J. R., Howell, K. E., & Staehelin, L. A. (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol*, *144*(6), 1135-1149.
- Lam, S. K., Yoda, N., & Schekman, R. (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(50), 21523-21528. doi: 10.1073/pnas.1013397107
- Lefevre, S. D., Kumar, S., & van der Klei, I. J. (2015). Inhibition of peroxisome fission, but not mitochondrial fission, increases yeast chronological lifespan. *Cell Cycle*, *14*(11), 1698-1703. doi: 10.1080/15384101.2015.1029685
- Malagnac, F., Klapholz, B., & Silar, P. (2007). PaTrx1 and PaTrx3, two cytosolic thioredoxins of the filamentous ascomycete *Podospora anserina* involved in sexual development and cell degeneration. *Eukaryot Cell*, *6*(12), 2323-2331. doi: 10.1128/EC.00083-07
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., & Rothman, J. E. (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, *58*(2), 329-336.
- Mast, F. D., Jamakhandi, A., Saleem, R. A., Dilworth, D. J., Rogers, R. S., Rachubinski, R. A., & Aitchison, J. D. (2016a). Peroxins Pex30 and Pex29 Dynamically Associate with Reticulons to Regulate Peroxisome Biogenesis from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*, *291*(30), 15408-15427. doi: 10.1074/jbc.M116.728154
- Mast, F. D., Jamakhandi, A., Saleem, R. A., Dilworth, D. J., Rogers, R. S., Rachubinski, R. A., & Aitchison, J. D. (2016b). Peroxins Pex30 and Pex29 Dynamically Associate with Reticulons to Regulate Peroxisome Biogenesis from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M116.728154
- Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in Biochemical Sciences*, *23*(1), 10-14.

- Nakase, Y., Nakamura-Kubo, M., Ye, Y., Hirata, A., Shimoda, C., & Nakamura, T. (2008). Meiotic spindle pole bodies acquire the ability to assemble the spore plasma membrane by sequential recruitment of sporulation-specific components in fission yeast. *Mol Biol Cell*, *19*(6), 2476-2487.
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *189*(3), 737-765. doi: 10.1534/genetics.111.127126
- Oertle, T., Klingler, M., Stuermer, C. A., & Schwab, M. E. (2003). A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J*, *17*(10), 1238-1247. doi: 10.1096/fj.02-1166hyp
- Oertle, T., & Schwab, M. E. (2003). Nogo and its parTners. *Trends Cell Biol*, *13*(4), 187-194.
- Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R., & Nakano, A. (2012). High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, *125*(14), 3412-3420.
- Peraza-Reyes, L. (1997). *Algunas consideraciones fisiológicas acerca del efecto que tiene el pH en la regeneración y reversión de células de Aspergillus sp. carentes de pared celular*. (Licenciatura), Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Peraza-Reyes, L. (2005). *Caracterización genética y enzimática de una catalasa peroxidasa de Neurospora crassa*. (Doctorado), UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
- Peraza-Reyes, L., & Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Front Physiol*, *4*, 244. doi: 10.3389/fphys.2013.00244
- Pereira, C., Denise, A., & Lespinet, O. (2014). A meta-approach for improving the prediction and the functional annotation of ortholog groups. *BMC Genomics*, *15 Suppl 6*, S16. doi: 10.1186/1471-2164-15-S6-S16
- Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(2), 69-82. doi: 10.1038/nrm.2015.8
- Pina, F. J., Fleming, T., Pogliano, K., & Niwa, M. (2016). Reticulons Regulate the ER Inheritance Block during ER Stress. *Dev Cell*, *37*(3), 279-288. doi: 10.1016/j.devcel.2016.03.025
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2001). The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide - induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl - 2 action. *EMBO J*, *20*(11), 2690-2701.
- Puhka, M., Joensuu, M., Vihinen, H., Belevich, I., & Jokitalo, E. (2012). Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Mol Biol Cell*, *23*(13), 2424-2432. doi: 10.1091/mbc.E10-12-0950
- Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H., & Prinz, W. A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *Journal of Cell Biology*, *173*(1), 107-119. doi: 10.1083/jcb.200510084
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., . . . Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, *280*(5370), 1763-1766.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., . . . Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, *185*(7), 1209-1225. doi: 10.1083/jcb.200811005
- Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2014). ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell*, *159*(5), 1027-1041. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.023
- Scheckhuber, C., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nyström, T., & Osiewacz, H. (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol*, *9*(1), 99-105.

- Scheckhuber, C. Q., & Osiewacz, H. D. (2008). *Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing. *Mol Genet Genomics*, *280*(5), 365-374. doi: 10.1007/s00438-008-0378-6
- Scheckhuber, C. Q., Rodel, E., & Wustehube, J. (2008). Regulation of mitochondrial dynamics-- characterization of fusion and fission genes in the ascomycete *Podospora anserina*. *Biotechnol J*, *3*(6), 781-790. doi: 10.1002/biot.200800010
- Shemesh, T., Klemm, R. W., Romano, F. B., Wang, S., Vaughan, J., Zhuang, X., . . . Rapoport, T. A. (2014). A model for the generation and interconversion of ER morphologies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(49), E5243-5251. doi: 10.1073/pnas.1419997111
- Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2009). Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *25*, 329-354. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113324
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., & Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, *126*(3), 435-439. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.019
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2008). The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *283*(27), 18892-18904. doi: 10.1074/jbc.M800986200
- Silar, P. (1995). Two new easy to use vectors for transformations. *Fungal Genet. Newsl*, *42*(73), 27.
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology *Genomics of Soil-and Plant-Associated Fungi* (Vol. 36, pp. 283-309): Springer.
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: from laboratory to biotechnology *Genomics of Soil-and Plant-Associated Fungi* (pp. 283-309): Springer.
- Silar, P., Dairou, J., Coccagn, A., Busi, F., Rodrigues-Lima, F., & Dupret, J. M. (2011). Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nat Rev Microbiol*, *9*(6), 477. doi: 10.1038/nrmicro2519-c1
- Smith, M. L., Bruhn, J. N., & Anderson, J. B. (1992). The Fungus *Armillaria-Bulbosa* Is among the Largest and Oldest Living Organisms. *Nature*, *356*(6368), 428-431. doi: 10.1038/356428a0
- Tolley, N., Sparkes, I., Craddock, C. P., Eastmond, P. J., Runions, J., Hawes, C., & Frigerio, L. (2010). Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules in vivo. *Plant J*, *64*(3), 411-418. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04337.x
- Tolley, N., Sparkes, I. A., Hunter, P. R., Craddock, C. P., Nuttall, J., Roberts, L. M., . . . Frigerio, L. (2008). Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic*, *9*(1), 94-102. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00670.x
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, *35*(suppl 2), W71-W74.
- Upadhyay, S., Xu, X., Lowry, D., Jackson, J. C., Roberson, R. W., & Lin, X. (2016). Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell Rep*, *14*(11), 2511-2518. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.059
- Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y., & Sakisaka, T. (2014). Identification and characterization of TMEM33 as a reticulon-binding protein. *Kobe J Med Sci*, *60*(3), E57-65.
- van der Goot, F. G., & Gruenberg, J. (2014). Close encounter of the third kind: the ER meets endosomes at fission sites. *Dev Cell*, *31*(6), 673-674. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.008
- van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., & Tabak, H. F. (2012). Biochemically Distinct Vesicles from the Endoplasmic Reticulum Fuse to Form Peroxisomes. *Cell*, *149*(2), 397-409. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.054
- Vance, J. E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, *265*(13), 7248-7256.

- Voeltz, G. K., & Barr, F. A. (2013). Cell organelles. *Curr Opin Cell Biol*, 25(4), 403-405. doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.001
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., & Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573-586. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.047
- Voss, C., Lahiri, S., Young, B. P., Loewen, C. J., & Prinz, W. A. (2012). ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*, 125(Pt 20), 4791-4799. doi: 10.1242/jcs.105635
- Wakana, Y., Koyama, S., Nakajima, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Tani, K., . . . Tagaya, M. (2005). Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(4), 1198-1205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.012
- Wang, Y., Mattson, M. P., & Furukawa, K. (2002). Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J Neurochem*, 82(4), 945-952.
- Wendland, J. (2015). *Growth, Differentiation and Sexuality* (Springer Ed. Third Edition ed. Vol. I). Copenhagen, Denmark: Springer International Publishing Switzerland 2016.
- Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2015). Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem*, 84, 791-811. doi: 10.1146/annurev-biochem-072711-163501