



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Las proteínas de la familia Yop1/DP1 y su papel en
el desarrollo sexual de hongo filamentoso
*Podospora anserina***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARIME NAID NACHÓN GARDUÑO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES
2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Nachón
Garduño
Karime Naid
+52 55 55386724
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309208154
2. Datos del tutor
Dr.
Carlos Leonardo
Peraza
Reyes
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Hermelinda Margarita
Villegas
Ríos
4. Datos del sinodal 2
Dr. Genaro
Vázquez
Victorio
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván
6. Datos del sinodal 4
Dra.
María Soledad
Funes
Argüello
7. Datos del trabajo escrito
Las proteínas de la familia Yop1/DP1 y su papel en el desarrollo sexual del hongo filamentoso *Podospora anserina*
108 páginas
2016

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Investigación realizada gracias al Programa-UNAM-DGAPA-PAPIIT IA201815.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios sobre el trabajo presentado: a la Dra. Hermelinda Margarita Villegas, al Dr. Genaro Vázquez Victorio, al Dr. Sigfrido Sierra Galván y a la Dra. María Soledad Funes Argüello.

A los investigadores del Instituto de Fisiología Celular: al Dr. Jesús Aguirre Linares, al Dr. Roberto Coria Ortega y al Dr. Wilhelm Hansberg Torres por su apoyo en la infraestructura necesaria para la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por su apoyo técnico y discusión constantes durante la realización del trabajo.

Al Dr. Philippe Silar del Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (LIED) en el Instituto Interdisciplinario de Investigación Energética de París (PIERI) por el apoyo y discusión especializado en el organismo modelo utilizado para este trabajo.

A los alumnos del Laboratorio 101 Oriente del IFC por el apoyo durante el proyecto: Antonio de Jesús López Fuentes, Jorge Luis Castillo Canizáles, Andrea Harumi Takano Rojas, Francisco Manuel Amezola Chávez, Claudia Ziri3n Mart3nez y Cinthya Garc3a Nieves.

CONTENIDO

RESUMEN -----	1
1. INTRODUCCIÓN -----	2
1.1. El retículo endoplásmico -----	2
1.1.1. Dominios estructurales y funcionales -----	2
1.1.2. Distribución del RE en hongos filamentosos -----	5
1.2. El papel de la familia de proteínas Yop1/DP1 en la estructura del RE -----	6
1.2.1. Mecanismos que generan y mantienen la curvatura de la membrana en los diferentes dominios del RE -----	6
1.2.2. Las familias de reticulones y Yop1/DP1 -----	9
1.3. Interacciones entre el RE y otros organelos -----	11
1.3.1. Sitios de contacto entre membranas intracelulares -----	11
1.3.2. Interacciones RE-peroxisomas -----	13
1.3.3. Interacciones RE-mitocondrias -----	14
1.3.4. Fisión mitocondrial y peroxisomal -----	15
1.4. El hongo <i>Podospora anserina</i> como modelo celular -----	16
1.4.1. <i>Podospora anserina</i> en el laboratorio -----	16
1.4.2. Ecología y ciclo de vida -----	19
1.4.3. La senescencia y el envejecimiento de <i>P. anserina</i> -----	25
2. ANTECEDENTES -----	28
3. JUSTIFICACIÓN -----	30
4. HIPÓTESIS -----	30
5. OBJETIVOS -----	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS -----	32
6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo -----	32
6.1.1. Cepas de <i>P. anserina</i> utilizadas y medios de cultivo para su crecimiento -----	32

6.1.2.	Plásmidos para la construcción de casetes de delección y complementación genética -----	33
6.2.	Identificación de posibles genes codificantes para proteínas de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> mediante análisis bioinformáticos-----	33
6.2.1.	Identificación de genes codificantes <i>YOP1</i> y <i>YOP2</i> para proteínas de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> por comparación de secuencias de aminoácidos ----	33
6.2.2.	Análisis bioinformáticos para determinar los dominios hidrofóbicos de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> -----	34
6.2.3.	Alineamientos múltiples con ortólogos de <i>YOP1</i> y <i>YOP2</i> de <i>P. anserina</i> para la identificación de dominios conservados estructurales o funcionales -----	34
6.3.	Generación de cepas mutantes de <i>P. anserina</i> con delecciones de genes de la familia Yop1/DP1 -----	35
6.3.1.	Diseño de oligonucleótidos para la construcción de los casetes de delección para los genes <i>YOP1</i> y <i>YOP2</i> de <i>P. anserina</i> -----	35
6.3.2.	Generación de los casetes de delección para <i>YOP1</i> y <i>YOP2</i> -----	36
6.3.3.	Formación de protoplastos para la transformación de <i>P. anserina</i> -----	37
6.3.4.	Transformación de <i>P. anserina</i> -----	38
6.3.5.	Purificación de las transformantes primarias para obtener cepas mutantes monocarióticas de ambos tipos sexuales -----	38
6.3.6.	Obtención de dobles y triples mutantes -----	39
6.4.	Verificación de la obtención de las cepas mutantes -----	40
6.4.1.	Extracción de ADN de <i>P. anserina</i> -----	40
6.4.2.	Verificación de las mutantes de <i>Δyop1</i> y <i>Δyop2</i> por PCR -----	40
6.5.	Caracterización de las cepas de <i>P. anserina</i> durante el desarrollo -----	41
6.5.1.	Ensayos de longevidad -----	41
6.5.2.	Análisis del micelio aéreo, los ascogonios y los espermacios -----	42
6.5.3.	Análisis de la progresión sexual y de la formación de ascosporas -----	42
6.5.4.	Cuantificación de los defectos en el desarrollo de las ascas -----	43

6.5.5. Microscopía de fluorescencia -----	44
6.6. Ensayos de complementación genética de las cepas -----	44
7. RESULTADOS -----	45
7.1. Identificación y estructura de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> ----	45
7.1.1. YOP1 y YOP2: Proteínas de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> -----	45
7.1.2. Predicción de los dominios transmembranales de YOP1 y YOP2 de <i>P. anserina</i> y su conservación en los ortólogos de la familia Yop1/DP1 -----	47
7.2. Obtención de las mutantes $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ -----	52
7.2.1. Obtención de los casetes de delección para <i>YOP1</i> y <i>YOP2</i> -----	52
7.2.2. Obtención de las cepas transformantes primarias $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ -----	54
7.2.3. Obtención de las cepas transformantes primarias $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ -----	55
7.3. Caracterización de cepas $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ durante el desarrollo somático de <i>P. anserina</i> -----	59
7.3.1. El crecimiento de <i>P. anserina</i> en distintas fuentes de carbono no se altera en ausencia de YOP1, YOP2 y RTN1 -----	59
7.3.2. Defectos en la pigmentación del micelio somático en la mutante $\Delta yop2$ -----	61
7.3.3. Mutantes de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> sin alteraciones en su longevidad -----	63
7.4. Caracterización de cepas $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ durante el desarrollo sexual de <i>P. anserina</i> -----	65
7.4.1. Disminución en la abundancia del micelio aéreo en la mutante $\Delta yop2$ -----	65
7.4.2. Morfología anormal de los núcleos en el micelio aéreo de la mutante $\Delta yop2$ y la formación de ascogonios y espermacios -----	67
7.4.3. Formación de ascosporas curvadas en ausencia de YOP2 -----	70
7.4.4. Algunas ascosporas mutantes jóvenes carentes de YOP2 presentan alteraciones morfológicas en los núcleos -----	74
8. DISCUSIÓN -----	77
8.1. YOP1 y YOP2 como parte de la familia Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> -----	77

8.2. Posibles causas de la falta de un fenotipo visible en la mutante <i>Δyop1</i> -----	78
8.3. Falta de producción de melanina en la mutante <i>Δyop2</i> -----	78
8.4. Envejecimiento típico en las mutantes del reticulón y las proteínas Yop1/DP1 de <i>P. anserina</i> -----	80
8.5. Defectos en la morfología de núcleos y ascosporas por las interacciones con el cuerpo polar del huso acromático -----	80
8.6. Regulación de YOP1 sobre YOP2 -----	81
9. CONCLUSIONES -----	83
10. ANEXO -----	84
11. REFERENCIAS -----	91

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un sistema continuo de membranas con dominios que incluyen la envoltura nuclear y una red de cisternas y túbulos interconectados, la cual lleva a cabo interacciones multifuncionales con la membrana plasmática y todos los organelos. Se ha demostrado que la elevada curvatura de los túbulos y bordes de las cisternas del RE es generada y mantenida, entre otras proteínas, por dos familias de proteínas integrales de membrana que incluyen a los reticulones (Rtn) y a Yop1/DP1, que a su vez son necesarias para el anclaje y/o estabilización del complejo del poro nuclear y el correcto funcionamiento de los cuerpos polares del huso acromático. En el laboratorio, utilizamos al hongo filamentoso *Podospora anserina* como modelo para estudiar la dinámica e interacción de organelos como las mitocondrias y peroxisomas durante el desarrollo, que junto con los endosomas dependen en gran manera del RE, por lo que como primer acercamiento para entender la participación de este organelo durante el desarrollo, estudiamos el papel de las proteínas de la familia Yop1/DP1 durante el desarrollo somático y sexual de *P. anserina*. Identificamos dos genes codificantes para proteínas de la familia Yop1/Dp1 de *P. anserina* (YOP1 y YOP2), de los cuales producimos las mutantes $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ mediante recombinación homóloga, donde se sustituyó del gen silvestre por un gen que marcador que confiere resistencia a un antibiótico. La cepa $\Delta yop2$ mostró defectos en la melanización del micelio bajo estrés por frío y en la morfología de los núcleos y de las ascosporas, mientras que la cepa carente de YOP1 resultó no tener por sí sola un papel preponderante en el desarrollo sexual del hongo *P. anserina*; sin embargo, su eliminación conjunta con YOP2 corrigió (i.e. la melanización y la presencia de núcleos alargados) o agravó (el porcentaje de ascas anormales) los defectos generados en ausencia de YOP2. Nuestros resultados indican que diferentes etapas del desarrollo de *P. anserina* dependen de distintas proteínas que predeciblemente estructuran el RE, lo que podría indicar una acción concertada de estas proteínas a lo largo del desarrollo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El retículo endoplásmico.

1.1.1. Dominios estructurales y funcionales.

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo heterogéneo y dinámico exclusivo de los eucariontes; está constituido por un sistema continuo de membrana con distintos dominios estructurales que engloban un mismo lumen (Esser & Wendland, 2016; Friedman & Voeltz, 2011). Por microscopia electrónica se han descrito dos grandes dominios: RE rugoso (RER) y RE liso (REL), donde la principal diferencia es la presencia o ausencia de ribosomas respectivamente (Shibata *et al.*, 2006). Sin embargo, respecto al sitio que ocupan en la célula y las estructuras que adquiere su membrana, se han descrito con más detalle el dominio de la envoltura nuclear interna y externa (ENI y ENE) y el dominio periférico compuesto por una red poligonal irregular de cisternas y túbulos interconectados con uniones en tres direcciones (fig. 1) (Esser & Wendland, 2016; Hu *et al.*, 2008; Friedman & Voeltz, 2011).

Los túbulos, caracterizados por poseer una elevada curvatura, emanan normalmente a partir de las cisternas y pueden estar conectados entre ellos por uniones de tres vías (Shemesh *et al.*, 2014). Las cisternas semejan vesículas colapsadas en forma de disco (Friedman & Voeltz, 2011), o bien, son dos superficies membranales que se posicionan paralelamente una sobre otra y que se conectan en los bordes cuya curvatura es comparable con la de los túbulos. Así, el grosor típico de las cisternas se encuentra entre los 60 y 100 nm (Shibata *et al.*, 2006) y el radio de los túbulos entre 15-25 nm (Shemesh *et al.*, 2014). La envoltura nuclear, a pesar de su apariencia esférica, está formada por cisternas con membranas una sobre otra a 40-50 nm de distancia que conforman la envoltura nuclear externa e interna, unidas en áreas con una

elevada curvatura donde se encuentran los poros nucleares (Goyal & Blackstone, 2013) o donde se insertan los cuerpos polares del huso acromático (Casey *et al.*, 2012).

El RE es esencial para la secreción de las proteínas, ya que es el sitio donde se sintetizan, se modifican, y se controla su calidad para finalmente ser proteínas tanto solubles como integrales de membrana. El lumen del RE difiere del citosol en iones, condiciones redox y en proteínas chaperonas lo que provee un ambiente óptimo para el plegamiento, maduración, prevención de agregaciones y modificaciones co-traduccionales y post-traduccionales de proteínas. La estabilidad de las proteínas se ve favorecida por la formación de puentes disulfuro y la adición de glicanos que provee el RE. Las proteínas mal plegadas y oligómeros no ensamblados son retro-traslocados hacia el citosol para su degradación en el proteosoma, acción que se conoce como “degradación asociada al RE” (Ellgaard & Helenius, 2003). Una vez correctamente plegadas las proteínas, conformeros residentes del RE se posicionan en los sitios de salida, donde se comienzan a formar vesículas de secreción por el ensamblaje de COPII que median el tráfico del RE al aparato de Golgi (Chen *et al.*, 2013). Así mismo, el RE es importante en señalización, metabolismo de carbohidratos, desintoxicación, almacenamiento y homeostasis de Ca^{2+} (el cual es un ión con funciones en algunas cascadas de señalización) y de síntesis y distribución de esteroides y lípidos (English & Voeltz, 2013; Esser & Wendland, 2016; Friedman & Voeltz, 2011), también promueve el sistema de endomembranas por medio de la vesiculación o yuxtaposición de membranas (Schrader *et al.*, 2015), por lo que además mantiene interacciones multifuncionales con la membrana plasmática, el aparato de Golgi, endosomas, gotas lipídicas, mitocondrias y peroxisomas (Elbaz & Schuldiner, 2011; Friedman & Voeltz, 2011). El RE es también el organelo donde reside la enzima integral de membrana glucosa-6-fosfatasa, con su sitio catalítico hacia el lumen, por lo que la reacción final de la gluconeogénesis se lleva a cabo en el interior del RE (Lehninger *et al.*, 2008).

La estructura, la proporción y las interacciones del RE son esenciales para distintas funciones celulares y fisiológicas en cada organismo y tipo celular (Friedman & Voeltz, 2011; Chen *et al.*, 2013); por ejemplo, las cisternas proliferan en las células especializadas en secreción, como las pancreáticas, mientras que la red tubular se extiende en células especializadas en almacenamiento y liberación de Ca^{2+} intracelular, desintoxicación, síntesis lipídica y metabolismo de carbohidratos (Friedman & Voeltz, 2011; Goyal & Blackstone, 2013; Shemesh *et al.*, 2014) e incluso, en células nerviosas, puede sobresalir dentro de las puntas de las dendritas y axones (Sackmann, 2014), por lo que mutaciones en la proteínas estructurales del RE pueden provocar paraplejia espástica hereditaria (Chen *et al.*, 2013), que conforma un grupo de enfermedades genéticas neurodegenerativas.

Por otro lado, el RE puede sufrir cambios morfológicos provocados por señales celulares o durante el ciclo celular y la diferenciación (Friedman & Voeltz, 2011; Shemesh *et al.*, 2014). En 2009, se reportaron cambios en las proporciones morfológicas del RE durante la mitosis en células animales (Lu *et al.*, 2009), pero aún no se conocen los mecanismos de estos cambios ni sus efectos en las interacciones del RE con otros organelos durante la mitosis o la meiosis. Sin embargo, se sabe que en la mitosis cerrada (como ocurre en los hongos) es necesaria una distribución adecuada de los poros nucleares dada por proteínas estructurales del RE (Zhang & Oliferenco, 2013) y que el volumen nuclear no aumenta hasta poco antes de su fisión, por lo que sufre un incremento rápido del 26% del área de la envoltura nuclear donde el RE puede funcionar como la reserva para esta expansión (Gonzalez *et al.*, 2009).

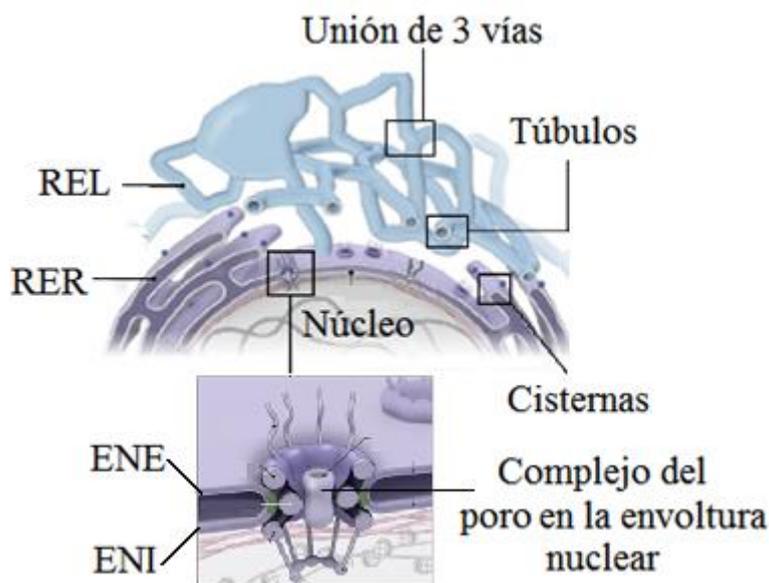


Figura 3. Dominios estructurales del RE. . El RE posee tres grandes dominios: 1) el RE liso (REL) formado principalmente por una red tubular y algunas cisternas; 2) el RE rugoso (RER) compuesto por cisternas continuas al núcleo en el cual se posicionan los ribosomas y 3) la envoltura nuclear externa e interna (ENE y ENI) (modificado de Goyal & Blackstone, 2013).

1.1.2. Distribución del RE en hongos filamentosos.

La distribución del RE periférico puede variar dependiendo el organismo: en mamíferos, la red interconectada de cisternas y túbulos se extiende a lo largo de todo el volumen celular, mientras que en levaduras se encuentra sólo cerca de la membrana plasmática, por lo que se conoce como RE cortical (REc) (Goyal & Blackstone, 2013). Sin embargo, la distribución del RE en hongos filamentosos, aunque se esparce por todo el citoplasma, en un micelio septado es más compleja. A lo largo de la zona distal al ápice de la hifa, el RE se distribuye homogéneamente por el citoplasma; en cambio, existe una discontinuidad en la distribución de la red del RE en las zonas flanqueantes al segundo compartimento (zona apical y tercer compartimento), lo que indica que éste posee una unidad de gradiente independiente. Tanto la zona apical como el segundo compartimento poseen una concentración de la red del RE que decrece gradualmente hacia las zonas basales cercanas al septo (fig. 2 A y B), mientras que un nuevo gradiente orientado por la polaridad, emerge de las ramificaciones (fig. 2 C). El resto de la hifa presenta una distribución más homogénea de la red del RE. En cuanto a la relación

del RE y los septos, dos líneas paralelas de túbulos se posicionan a lo largo de cada uno evitando la obstrucción del poro pero con cierta interacción para la comunicación intercelular (fig. 2 B) (Maruyama *et al.*, 2006).

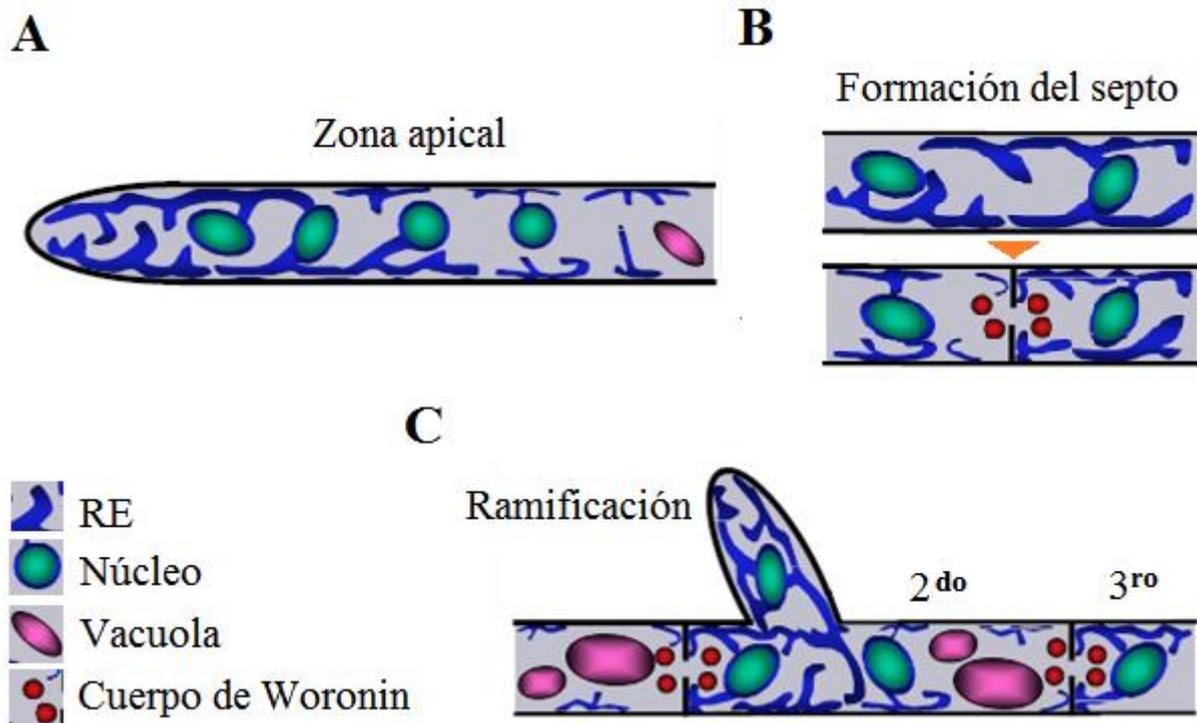


Figura 2. Distribución celular del RE en el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae*. La zona apical y el segundo compartimento de la hifa poseen un gradiente descendente en la distribución de la red del RE (A y C). Este gradiente se establece después de la formación del septo, donde un par de túbulos de RE del nuevo compartimento se alinean sin obstruir el poro (B). Una distribución homogénea se establece en las ramificaciones (C) hasta la formación de un nuevo septo. La distribución en las zonas distales al ápice no presentan este gradiente (modificado de Maruyama *et al.*, 2006).

1.2. El papel de la familia de proteínas Yop1/DP1 en la estructura del RE.

1.2.1. Mecanismos que generan y mantienen la curvatura de la membrana en los diferentes dominios del RE.

La curvatura de la membrana del RE está presente en los túbulos, en bordes y fenestraciones de las cisternas, en los poros nucleares (fig. 3) (Friedman & Voeltz, 2011) e incluso podría

presentarse en conexiones helicoidales entre cisternas apiladas (Shemesh *et al.*, 2014). Las variaciones en esta curvatura permiten, además de generar las distintas morfologías, mantener la continuidad e identidad del RE (English & Voeltz, 2013; Goyal & Blackstone, 2013). Dicha curvatura puede generarse por asimetría lipídica entre monocapas o por proteínas que curven la membrana directa o indirectamente. Sin embargo, para que se genere una elevada curvatura como la presente en el RE, la asimetría lipídica, ya sea generada indirectamente por proteínas o no, tendría que ser mayor a la esperada por la composición normal de lípidos en una célula, por lo que el mecanismo más plausible para generar la elevada curvatura y las distintas morfologías del RE es mediado directamente por proteínas, las cuales utilizan a su vez tres mecanismos principales: 1) El primero involucra proteínas que ejercen fuerza mecánica sobre la membrana lipídica (Shibata *et al.*, 2009). Túbulos con reducida curvatura pueden ser aislados de reservas membranosas por motores moleculares mientras se desplazan por el citoesqueleto, por lo que a la par de la polimerización o despolimerización de éste (microtúbulos en mamíferos y actina en levaduras) los túbulos pueden avanzar y alargarse o retroceder y disminuir su longitud (Friedman & Voeltz, 2011, Hu *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). Sin embargo, el citoesqueleto no es esencial para mantener o generar la red tubular del RE (Friedman & Voeltz, 2011) ya que se pueden generar túbulos *in vitro* en ausencia de éste (Dreier & Rapoport 2000). 2) El segundo mecanismo es mediante el andamiaje curvado que interactúa con la bicapa a lo largo de una superficie forzando a la membrana a adoptar la misma forma curva. Para ello, se requiere que la proteína tenga una mayor rigidez que la membrana y que la energía de acoplamiento sea mayor a la energía de flexión de la membrana. 3) El tercer mecanismo consiste en inserciones hidrofóbicas (acuñamiento), donde proteínas integrales de membrana insertan dominios hidrofóbicos en la monocapa superior de la membrana, lo que perturba el arreglo de los lípidos generando así una curvatura local (Shibata *et al.*, 2009).

En 2006, se descubrieron dos familias de proteínas integrales de membrana, conservadas en todos los eucariontes, que incluyen los reticulones y Yop1/DP1 (Voeltz *et al.*, 2006) que combinan los mecanismos de andamiaje y acuñamiento (Shibata *et al.*, 2010). La sobreexpresión de estas familias de proteínas en levaduras (Rtn1p y Yop1p) resulta en la formación de largos túbulos de RE sin ramificaciones, mientras que su eliminación conlleva a la pérdida de la red tubular, por lo que una cantidad suficiente pueden mantener la estructura del RE (Voeltz *et al.*, 2006) pero su abundancia determina el balance entre las distintas morfologías, reflejándose en la proporción de túbulos y cisternas (Friedman & Voeltz, 2011; Shemesh *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha observado que estas proteínas son también necesarias para el anclaje y/o estabilización del complejo del poro nuclear (Dawson *et al.*, 2009) y el correcto funcionamiento de los cuerpos polares del huso acromático en hongos, equivalentes al centrosoma en eucariontes que llevan a cabo mitosis abierta (Casey *et al.*, 2012).

Sin embargo, no sólo estas dos familias de proteínas tienen un papel en mantener la morfología en el RE. La red tubular necesita de la maquinaria de fusión conformada por una familia de GTPasas integrales de membrana llamadas atlastinas (Sey1p en levaduras), que interactuando con los reticulones y Yop1/DP1 llevan a cabo la fusión homotípica de túbulos del RE (fig. 3 B), por lo que promueven la formación de la red por uniones de tres vías manteniendo la estructura del RE durante la dinámica celular y su rearrreglo por el citoesqueleto (Friedman & Voeltz, 2011; Chen *et al.*, 2012). También se ha descrito que las proteínas lunapark (Lnp1p en levaduras) son también necesarias para la formación de la red tubular trabajando sinérgicamente con los reticulones y Yop1/DP1 residiendo en las uniones de tres vías (fig. 3 A). Se ha observado que Sey1p es necesaria para la localización de Lnp1p en las uniones de tres vías y que además regula negativamente la interacción Lnp1p-Rtn1p,

mientras que Lnp1 actúa como antagonista de Sey1 equilibrando de alguna manera la fusión del RE (Chen *et al.*, 2012).

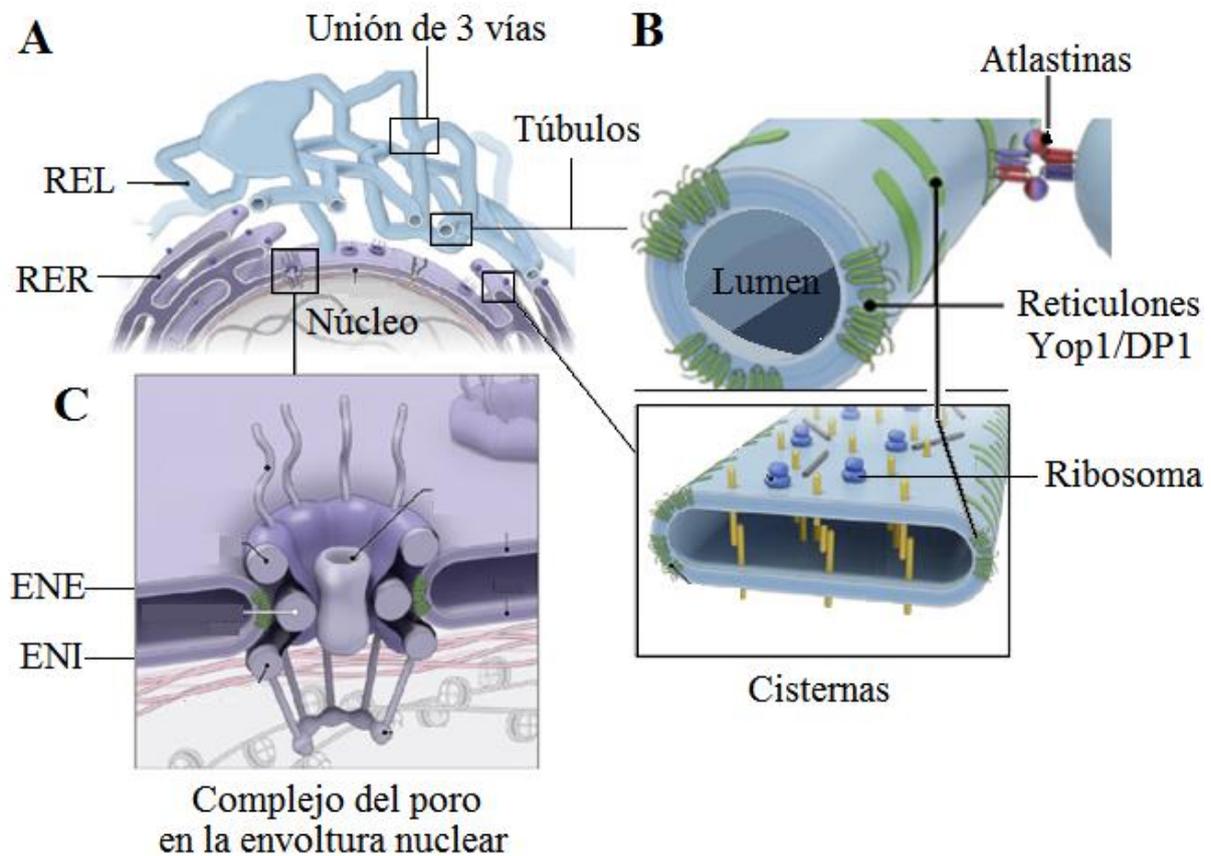


Figura 3. Dominios estructurales del RE y la ubicación de las familias de reticulones y Yop1/DP1 en las membranas con elevada curvatura. (A). Las familias de los reticulones y Yop1/DP1 mantienen la morfología de todos los dominios del RE posicionándose en las zonas de alta curvatura. Así, éstas se encuentran en los bordes y fenestraciones de las cisternas (B), en la EN donde se posicionan los complejos del poro nuclear o los cuerpos polares del huso acromático (C) y como arcos a todo lo largo de los túbulos del RE periférico (B). Otras proteínas que tienen un papel en mantener la morfología de la red tubular del RE son 1) las atlastinas, las cuales llevan a cabo la fusión homotípica de membranas (B) y 2) las lunapark que se encuentran en las uniones de tres vías (A) trabajando en sinergia con los reticulones y Yop1/DP1 (modificado de Goyal & Blackstone, 2013).

1.2.2. Las familias de reticulones y Yop1/DP1.

Las familias de proteínas “morfogénicas” del RE, que incluyen a los reticulones (Rtn) y a Yop1/DP1 (levadura/ mamífero), no están relacionadas en secuencia pero ambas poseen una región de ~200 aminoácidos (Hu, *et al.*, 2008) con dos dominios hidrofóbicos transmembranales de ~30-35 aminoácidos (Hu, *et al.*, 2011), uno en la región del carboxilo y el otro en la región del amino, que se encuentran separados entre ellos por un *link* soluble

orientado hacia el citoplasma (English & Voeltz, 2013). La estructura de estas proteínas de membrana no ha sido determinada pero se han descrito proyecciones de su estructura y posición en la bicapa lipídica, donde al parecer forman un pasador hidrofóbico en la membrana del RE (Voeltz *et al.*, 2006) en forma de “W” con una pequeña exposición al lumen (Hu *et al.*, 2011), donde cada dominio se caracteriza por un doble cruce transmembranal dado por dos α -hélices (fig. 3 B y fig. 4).

En los reticulones, cada secuencia hidrofóbica es muy corta para atravesar la bicapa dos veces pero muy larga para atravesarla una sola vez (English & Voeltz, 2013). Por otro lado, Yop1/DP1 posee los residuos de aminoácidos suficientes para atravesar la bicapa del RE y se ha descrito que además posee una α -hélice anfipática muy conservada en dominio C-terminal (fig. 4) que interactúa fuertemente con membranas cargadas negativamente y que es necesaria para para la formación de túbulos (Brady *et al.*, 2014).

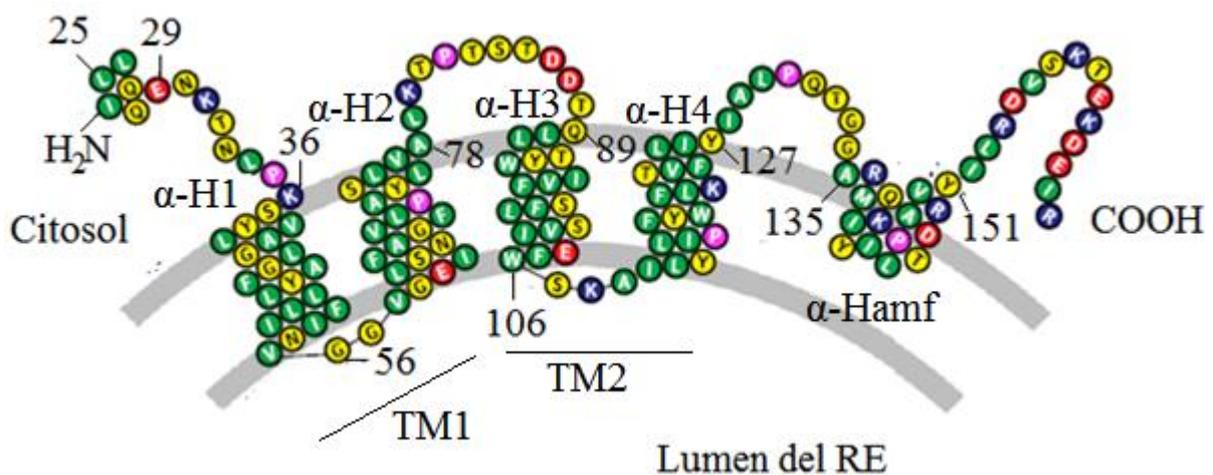


Figura 4. Esquema del modelo topológico de los dominios homólogos de Yop1p de *S. cerevisiae* propuesto por Brady, *et al.* El modelo muestra dos dominios que atraviesan completamente la membrana del RE (TM), cada uno mediante dos las α -hélices (α -H) con dos pequeñas exposiciones al lumen y un dominio anfipático (α -Hamf) el cual muestra interacción con la monocapa superior del RE. La naturaleza química de los aminoácidos se indican con diferentes colores: ácidos (rojo), básicos (azul), polaridad neutra (amarillo), hidrofóbicos/no polares (verde) y prolina (rosa). Las moléculas que se indican con un número de residuo se refieren al conjunto de aminoácidos que forman las estructuras secundarias de Yop1p. Modelo basado en mediciones biofísicas de Yop1p y del dominio anfipático (modificado de Brady *et al.*, 2014).

Hasta ahora, se conoce que ambas familias comparten una topología que les confiere una función de acuñamiento en el segmento hidrofóbico N-terminal y que la estructura de pasador podría crear un incremento del 10% en la superficie de la monocapa exterior respecto a la interior (Voeltz *et al.*, 2006), provocando una curvatura positiva (Chen *et al.*, 2013) o negativa en una posición contraria (Shemesh *et al.*, 2014) y que para terminar por lograr la elevada curvatura en el RE, estas proteínas forman andamiajes relacionándose en homo- y hetero-oligómeros (English & Voeltz, 2013; Hu *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2006) en forma de arcos y no en forma de anillos o espirales, lo que permite una difusión de lípidos y proteínas por la membrana del RE. Estos arcos, en sólo 10% de la superficie pueden generar túbulos casi perfectos (Hu *et al.*, 2011).

Cabe resaltar que Yop1 pertenece también a la superfamilia TB2-DP1-HVA22, que incluye a miembros de una amplia variedad de eucariontes como a la familia TB2/DP1 (suprimida en poliposis), se ha asociado a la poliposis adenomatosa familiar severa en humano cuando la proteína es suprimida (Grodén, *et al.*, 1991), una enfermedad hereditaria autosómica dominante oncológica y a la proteína vegetal HVA22 (inducida por ácido abscísico) que presenta similitud con TB2/DP1, y se piensa que es una proteína que regula negativamente la muerte celular y de la vacuolación mediadas por giberelina (Guo & David Ho, 2008; InterPro: protein sequence analysis & classification, *The European Bioinformatics Institute*).

1.3. Interacciones entre el RE y otros organelos.

1.3.1. Sitios de contacto entre membranas intracelulares.

Las células eucariontes poseen compartimentos delimitados por membranas llamados organelos, los cuales tienen su propia identidad bioquímica dada por su papel en el metabolismo y sus proteínas residentes (Schrader *et al.*, 2015; Rowland & Voeltz, 2012). A

su vez, cada organelo posee distintos dominios que separan físicamente actividades metabólicas potencialmente incompatibles (López-Crisosto *et al.*, 2015). Para el bienestar celular, todos los organelos deben trabajar en armonía, coordinación y comunicación para realizar funciones sinérgicamente y mantener la homeostasis celular (Rowland & Voeltz, 2012). La complejidad de la comunicación intracelular incluye: interacción metabólica, regulación de muerte celular programada y supervivencia, defensa contra patógenos, intercambio de metabolitos (Schrader *et al.*, 2015), vías de señalización, tráfico vesicular (Shai *et al.*, 2015) y por sitios de contacto entre membranas (por interacciones proteína-proteína o proteína-lípido) regulados en tiempo y espacio (Rowland & Voeltz, 2012; Schrader *et al.*, 2015; Shai *et al.*, 2015; López-Crisosto *et al.*, 2015). Los sitios de contacto entre membranas intracelulares sugieren que factores ubicados en diferentes organelos pueden unirse y llevar a cabo funciones adicionales (Rowland & Voeltz, 2012).

Por microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia *in vivo* y tomografía de resolución nanométrica, se ha descubierto que el RE tubular forma abundantes sitios de contacto con la membrana plasmática, las mitocondrias, los peroxisomas, los endosomas, las gotas lipídicas y el aparato de Golgi (Elbaz & Schuldiner, 2011). Estos sitios de contacto son regiones enriquecidas en lípidos y proteínas donde dos membranas se encuentran estrechamente unidas pero no fusionadas, manteniendo así la identidad de cada organelo (Rowland & Voeltz, 2012; Schrader *et al.*, 2015). Se ha observado que la distancia entre cada membrana es tan corta que el contacto puede estar dado por interacciones proteína-proteína o proteína-lípidos (Shai *et al.*, 2015). Además, estas uniones son altamente estables ya que las membranas involucradas se mantienen unidas durante la dinámica celular, por lo que el tráfico de organelos no afecta su integridad. Algunos sitios de contacto del RE son extensos, aunque en su mayoría son discretos cubriendo por ejemplo, 2-5% de la superficie de una mitocondria de tamaño promedio y 3-5% de endosomas en células de mamíferos, por lo que

es posible que se trate de interacciones redundantes aunque podrían tener alguna función específica (Phillips & Voeltz, 2016).

Las funciones que se les ha atribuido a los sitios de contacto son en general: la regulación de un organelo sobre otro, el tráfico bidireccional de moléculas sin depender del tiempo de difusión por el citosol, control de biosíntesis lipídica, señalización de Ca^{2+} , optimización de rutas biosintéticas y respuestas celulares que requieren más de un organelo, herencia de organelos que no pueden formarse *de novo* y división de organelos, donde el RE marca el sitio donde se va a llevar a cabo la división (Friedman *et al.*, 2011; Shai *et al.*, 2015).

1.3.2. Interacciones RE-peroxisomas.

Los peroxisomas dependen de las interacciones con la membrana plasmática y diferentes organelos como mitocondrias, gotas lipídicas y cloroplastos (en plantas), para llevar a cabo funciones anabólicas y catabólicas. Por ejemplo, para completar la oxidación de los productos de la β -oxidación (donde se produce acetyl-CoA a partir de lípidos, lo que contribuye a la formación de ATP) y del ciclo del glioxilato (donde se produce oxalacetato a partir de lípidos, lo que contribuye a la formación de glucosa) producidos en los peroxisomas, éstos son transportados a la mitocondria para finalizar en el ciclo del ácido cítrico, además de compartir el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por rutas metabólicas similares, por lo que ambos organelos mantienen una interacción metabólica importante (Wanders *et al.*, 2016). Las interacciones particulares por sitios de contacto entre ambos organelos tienen diversas funciones: 1) Maduración de peroxisomas jóvenes y anterior a su fisión por la llegada de lípidos y algunas proteínas peroxisomales provistas por el RE (Koch *et al.*, 2005); 2) herencia peroxisomal, donde la peroxina Pex30 está presente tanto en la membrana de los peroxisomas como en el RE y que interacciona con Inp1 formando así un complejo de anclaje al RE que mantiene una población particular de peroxisomas en la célula madre antes de la

división celular, (Knoblach *et al.* 2013; Shai *et al.*, 2015; Schrader *et al.*, 2015); 3) regulación negativa de la proliferación peroxisomal por la interacción entre Pex30, los reticulones y Yop1 (Shai *et al.*, 2015); 4) dinámica peroxisomal y 5) intercambio vital de enzimas y moléculas clave relacionadas con metabolismo de lípidos, como la síntesis de esterofosfolípidos que comienza en peroxisomas y termina en el RE (Schrader *et al.*, 2015), ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, ácidos biliares e isoprenoides.

1.3.3. Interacciones RE-mitocondrias.

Las interacciones por sitios de contacto entre las mitocondrias y el RE (MAM) se llevan a cabo cuando la membrana del RE se asocia con la membrana exterior de las mitocondrias. Estos sitios se encuentran enriquecidos con proteínas de la biosíntesis de lípidos, y están relacionados con funciones como: 1) biosíntesis de glicerofosfolípidos, donde la fosfatidilserina sintetizada en el RE se transporta a la mitocondria que posee las enzimas para su conversión a fosfatidiletanolamida y que finalmente es convertida a fosfatidilcolina en el RE (Schrader *et al.*, 2015; Lang *et al.*, 2015); 2) señalización con Ca^{2+} , el cual puede encontrarse en alta concentración en la interfase de la interacción, lo que regula la fisiología mitocondrial y por tanto, mantiene la homeostasis de la energía celular; 3) supervivencia o apoptosis por respuesta al estrés de proteínas mal plegadas, donde el RE detiene la traducción y activa chaperonas, lo que requiere de mucha energía; por lo que, para maximizar la producción de ATP, se incrementan los sitios de contacto ER/mitocondria que conlleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial, activando las enzimas que determinan la velocidad del ciclo de Krebs (isocitrato deshidrogenasa) y por tanto, un aumento en la fosforilación de ADP, determinando la salida del estrés del RE o la muerte celular por una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial; 4) dinámica mitocondrial y 5) fuente de origen de

membranas para la formación del autofagosoma sobre mitocondrias dañadas (Schrader *et al.*, 2015).

Un tipo particular de interacción RE-mitocondrias en levaduras, se da por la estructura de encuentro del retículo endoplásmico y mitocondria (ERMES, por sus siglas en inglés) (Kornmann & Walter, 2010), compuesto por la proteína de membrana Mmm1 en RE, las proteínas de la membrana exterior Mdm10 y Mdm34 en mitocondrias, la proteína citosólica Mdm12 y la GTPasa de unión a Ca^{2+} Gem1 que regula el tamaño y número de complejos ERMES (Kornmann *et al.* 2011; López-Crisosto *et al.*, 2015). La interacción mediante el complejo ERMES permite 1) intercambio redundante de lípidos; 2) el ensamblaje de proteínas con estructura de barril β en la membrana externa mitocondrial por Mdm10; 3) herencia y dinámica mitocondrial, exceptuando la fisión y 4) autofagia (Kornmann & Walter, 2010; Lang *et al.*, 2015).

1.3.4. Fisión mitocondrial y peroxisomal.

La fusión y fisión de las mitocondrias y la fisión los peroxisomas genera distintas morfologías en ellos, como las esféricas, los túbulos y las redes reticulares de túbulos interconectados. Estos eventos regulan el número, volumen, tamaño y contenido de estos organelos, lo que es de vital importancia para su funcionamiento y herencia (Shrader & Yoon, 2007). Ambos organelos comparten elementos en la maquinaria de fisión como Fis1 y DLP1/Drp1 (mamíferos/levaduras). Fis1 es una proteína anclada por la cola a la membrana que funciona como factor de anclaje para la dinamina Drp1 que ejecuta la fisión en ambos organelos. Dicha interacción es mediada por la proteína adaptadora Mdv1 que a su vez recluta a Drp1. Por otro lado, en el peroxisoma, Pex11 tiene dos funciones, ya que es requerida para la elongación de este organelo antes de la fisión (Schrader, *et al.*, 1998) y concentra a Fis1 en los sitios de división (Koch, *et al.*, 2005; Kornmann & Walter, 2010). El RE marca la mayoría de los sitios

de fisión en mitocondrias, donde ocurre una constricción (fig. 5) (Friedman, *et al.*, 2011; English & Voeltz, 2013) que facilita la formación de la hélice de Drp1 que escinde a la mitocondria (Friedman *et al.*, 2011 Rowland & Voeltz, 2012). Un proceso semejante podría estar ocurriendo también en los peroxisomas; sin embargo no se ha corroborado experimentalmente. Además de marcar el punto de fisión en las mitocondrias, las interacciones RE-mitocondria están implicadas en la distribución de las mitocondrias en la célula y la distribución del ADN mitocondrial (ADNmt) (Murley *et al.* 2013).

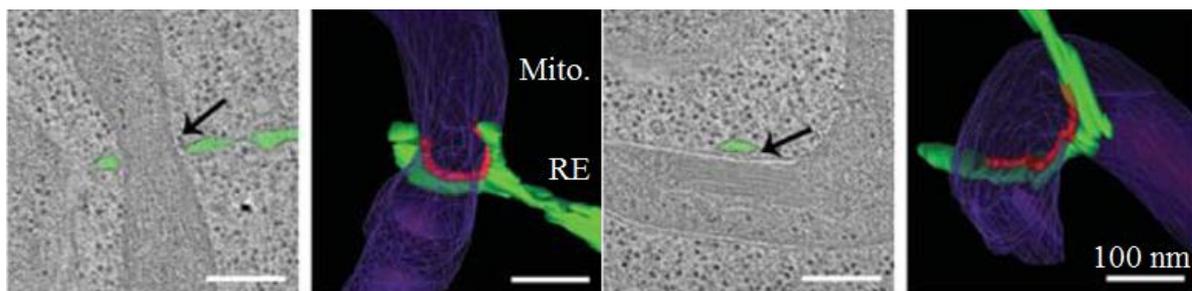


Figura 5. Tomografía de microscopía electrónica de sitios de contacto entre el RE y la mitocondria en las zonas de constricción mitocondrial. Un túbulo del RE (verde) tiene contacto (rojo) alrededor de una mitocondria (morado) en el sitio de constricción (modificado de Friedman *et al.*, 2011).

1.4. El hongo filamentoso *Podospora anserina* como modelo celular.

1.4.1. *Podospora anserina* en el laboratorio.

Entre todas las especies de hongos que existen, pocas son utilizadas como organismos modelo, siendo *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* las especies de hongos filamentosos más estudiados. Además de éstos, el hongo filamentoso *Podospora anserina* es un modelo con el genoma secuenciado (fig. 6). El genoma de las cepas “S”, “s” (utilizadas comúnmente para mapeo genético) y “T” (con múltiples polimorfismos respecto a las cepas anteriores), incluyendo su ADNmt, así como una base de datos sobre marcadores de

secuencia expresados (ESTs) en diferentes estadios del desarrollo están disponibles en el sitio web de “*Podospora anserina* Genome Project”: <http://podospora.igmors.u-psud.fr>.

Las características generales del genoma de *P. anserina* son: 1) Una extensión de 35.5-36 Mb divididas en 7 cromosomas; 2) un contenido de GC del 52.02%; 3) posee 10,635 secuencias codificantes (CDS del inglés “coding sequence”), cuya expresión se ha demostrado, en su mayoría, por ensayos de microarreglos; 4) comparte 6,800 genes con *N. crassa*, con un promedio de identidad del 60% en las regiones codificantes de sus ortólogos, y 5) existe una región que incluye 37 genes que flanquean el locus de identidad sexual (locus Mat, del inglés “mating type”) donde no ocurre recombinación durante la meiosis (Espagne *et al.*, 2008; Silar, 2013). Aunado a la genética de este hongo que facilita su uso experimental, *P. anserina* es utilizado como organismo modelo debido a que presenta un ciclo generacional 2 a 3 veces más rápido que los modelos antes mencionados. Asimismo, este hongo permite efectuar estudios de envejecimiento y es un modelo óptimo para la investigación sobre el desarrollo sexual, los priones y otras unidades hereditarias no convencionales, la transducción de señales y la diferenciación celular, degradación de biomasa vegetal, fusión celular e incompatibilidad vegetativa (donde se forma el heterocarionte por incompatibilidad genética de un *loci* específico), interacciones con otros hongos, fisiología mitocondrial, traducción, metabolismo secundario, formación de ascosporas, fusión de hifas y análisis genéticos (Silar, 2013).

promedio de 7 mm al día y a partir del tercer día comienza a diferenciar los gametos sexuales masculinos o espermacios que consisten en células uninucleadas y gametos sexuales femeninos o ascogonios que se forman por el auto-enrollamiento de hifas del micelio somático. *P. anserina* es un hongo heterotálico, por lo que para llevar a cabo cruza sexuales se requiere fertilizar los ascogonios de una cepa con espermacios de una cepa del sexo opuesto. Tras ser fertilizados los ascogonios se desarrollan en cuerpos fructíferos (peritecios) dentro de los cuales se forman las esporas sexuales (ascosporas) después de cuatro días (Silar, 2013). Estas esporas pueden observarse, aislarse y manipularse para realizar una gran diversidad de análisis genéticos (Labarère & Bernet, 1979). En el medio estándar de crecimiento, la eficiencia de germinación de las ascosporas es muy baja, siendo del 1% si son recolectadas y separadas homogéneamente sobre el medio de cultivo y del 0.01% si no lo son recolectadas y separadas, lo que puede deberse a que en la naturaleza germinan después de su paso por el tracto digestivo de algún herbívoro. En el laboratorio, es suficiente con recolectarlas con una aguja de una a una y sembrarlas en un medio con acetato de amonio y Bacto Peptona para conseguir una eficiencia de germinación cercana del 100% (Silar, 2013). El método para obtener mutantes de *P. anserina* es la transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG). Se han construido varios vectores que permiten el uso de marcadores de selección comunes, como aquellos que confieren resistencia a antibióticos como la higromicina B, la nourseotricina, la fleomicina y la geneticina (Silar, 2013).

1.4.2. Ecología y ciclo de vida.

Podospora anserina (Ces. Ex Rabenhorst) Niessl, 1883 (Matsushima, 1975), es un hongo filamentoso del phylum Ascomycota, familia Lasiosphaeriaceae, subphylum Pezizomycotina orden Sordariales, subclase Sordariomycetidae y clase Sordariomycetes (Index Fungorum, 2016). Es un hongo saprófito que crece y se desarrolla en el estiércol, aunque existe un

reporte de que podría vivir como endófito (residente dentro de tejidos vegetales sin causar ningún efecto aparente) (Matasyoh *et al.*, 2011). Se ha encontrado en muchas regiones del Norte y Sur de Europa, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, etc., en las heces de muchas especies de herbívoros, por lo que se considera que *P. anserina* es un hongo cosmopolita. Este hongo tiene ciertas peculiaridades en su ciclo de vida: 1) Sólo se conoce su reproducción sexual; 2) sufre senescencia, aunque en la naturaleza no alcanza un crecimiento suficiente para presentarla y 3) fructifica al final de la sucesión ecológica del estiércol por la posesión de un mecanismo antagónico que elimina la competencia llamado interferencia hifal en el que *P. anserina* altera estructuralmente las hifas de la competencia frenando su desarrollo, además de que su repertorio enzimático degrada polisacáridos, como la lignina (componente de las paredes secundarias de células vegetales), que se metabolizan posteriormente a la degradación de carbohidratos simples (Silar, 2013).

El ciclo de vida de *P. anserina* (fig. 7) en sentido estricto es heterotálico, el cual comienza con la germinación de las ascosporas después de haber pasado por el tracto digestivo de un herbívoro, de las que crece un micelio septado que invade el sustrato. Por un lado existen esporas monocarióticas que al germinar producen un micelio con un solo tipo sexual, cuyos gametos necesitan el encuentro físico con gametos del sexo opuesto para completar el ciclo. Por otro lado, otras ascosporas del mismo ascoma se comportan como las de un hongo pseudohomotálico que portan dos núcleos (dicarióticas); en la naturaleza las ascosporas dicarióticas son más abundantes y sus núcleos usualmente poseen tipo sexual opuesto (*mat+* y *mat-*), por lo que producen un micelio autofértil. Ambos micelios son capaces de producir los dos gametos sexuales. Tras su formación, los ascogonios, se rodean de hifas hasta conformar estructuras multicelulares llamadas protoperitecios. Estas hifas proveen protección al ascogonio mientras sucede su fertilización, y posteriormente formarán la envoltura del peritecio maduro (Espagne *et al.*, 2008; Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). La

fertilización ocurre después de que una hifa especializada proveniente del ascogonio –la hifa tricógina– es atraída hacia un espermacio del sexo opuesto mediante las feromonas producidas por éste. La fertilización ocurre por la fusión entre ambas células, tras la cual el núcleo del microconidio migra al interior del ascogonio, donde posteriormente se replica sincrónicamente con los núcleos del ascogonio (Casselton, 2002). A partir de esta estructura se forman una serie de células dicarióticas denominadas hifas ascógenas, a partir de las cuales se desarrollan las ascas, iniciando con una curvatura cerca del ápice denominadas croziers, en las que un par de núcleos de sexo opuesto migran hacia la parte superior de los mismos, ubicándose en la parte curvada de este tipo celular (fig. 8). Después de mitosis coordinadas, la formación de un par de septos produce tres células en el crozier: una binucleada en la parte superior y dos flanqueantes uninucleadas. Las dos células uninucleadas se fusionan y forman un nuevo crozier que propaga el estado dicariótico, mientras que la célula de la parte superior lleva a cabo la cariogamia y se diferencia en una asca o meiocito, debido a que en éste también se lleva a cabo la meiosis. Una mitosis post-meiótica da lugar a ocho núcleos que son empaquetados por pares en cuatro nuevas células que se forman dentro del asca original. Esto resulta en la formación de cuatro ascosporas binucleadas, cuyos núcleos poseen generalmente tipo sexual opuesto. Las ascosporas maduran dentro del asca materna, de la que posteriormente son expulsadas para su dispersión (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013; Esser & Wendland, 2016). Por otro lado, en el 5% de las ascas, una de las esporas binucleadas es reemplazada por dos esporas uninucleadas (monocariótica), lo que da origen a cepas homocarióticas (Labarère & Bernet, 1979). La posibilidad de obtener esporas tanto dicarióticas como monocarióticas es de gran utilidad para efectuar diversos análisis genéticos en este hongo.

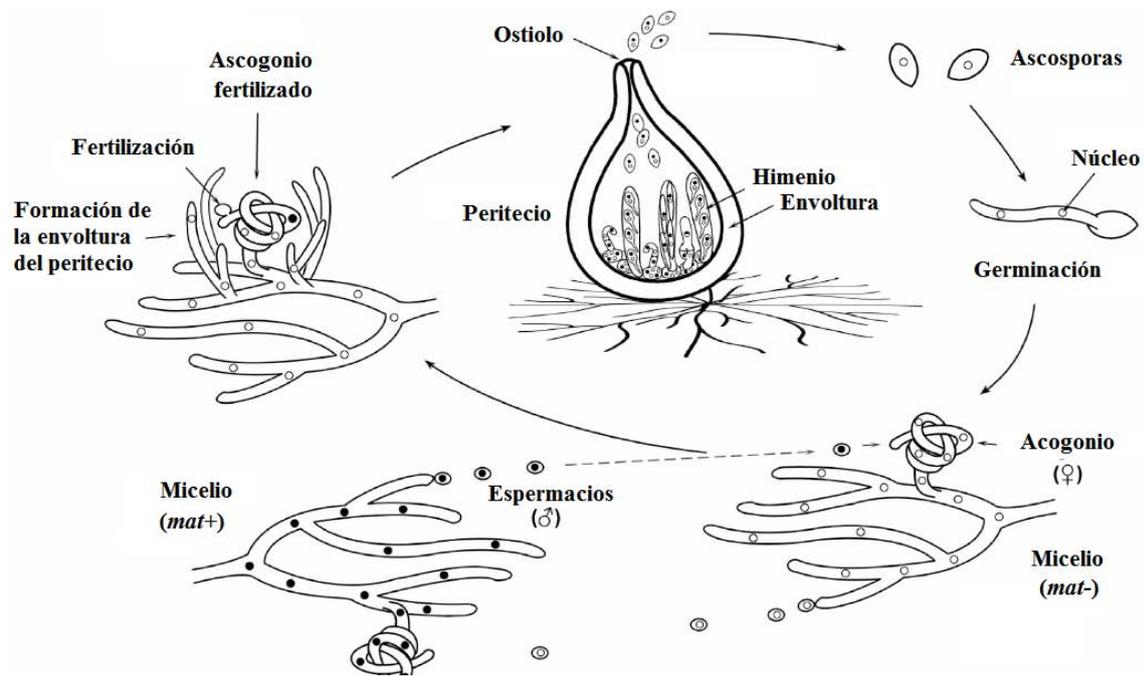


Figura 7. Ciclo de vida del hongo pseudohomotático *P. anserina*. La germinación de una ascospora monocariótica da lugar a un micelio de un solo tipo sexual (*mat+* o *mat-*) que forma ambas estructuras reproductoras (ascogonios y espermacios). La fertilización se da cuando un espermacio se fusiona con la hifa tricógina de un ascogonio del sexo opuesto. Por otra parte, el ascogonio recluta hifas vegetativas del micelio a partir del cual se formó para producir la envoltura del peritecio (también llamado peridio). A partir de ésta se diferencian células estériles especializadas, las paráfisis y perífisis (no ilustradas), mientras que del ascogonio fertilizado se desarrolla el himenio, en el que se forman las células (ascas) donde ocurre la cariogamia, la meiosis y la formación de las ascosporas (modificado de Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013).

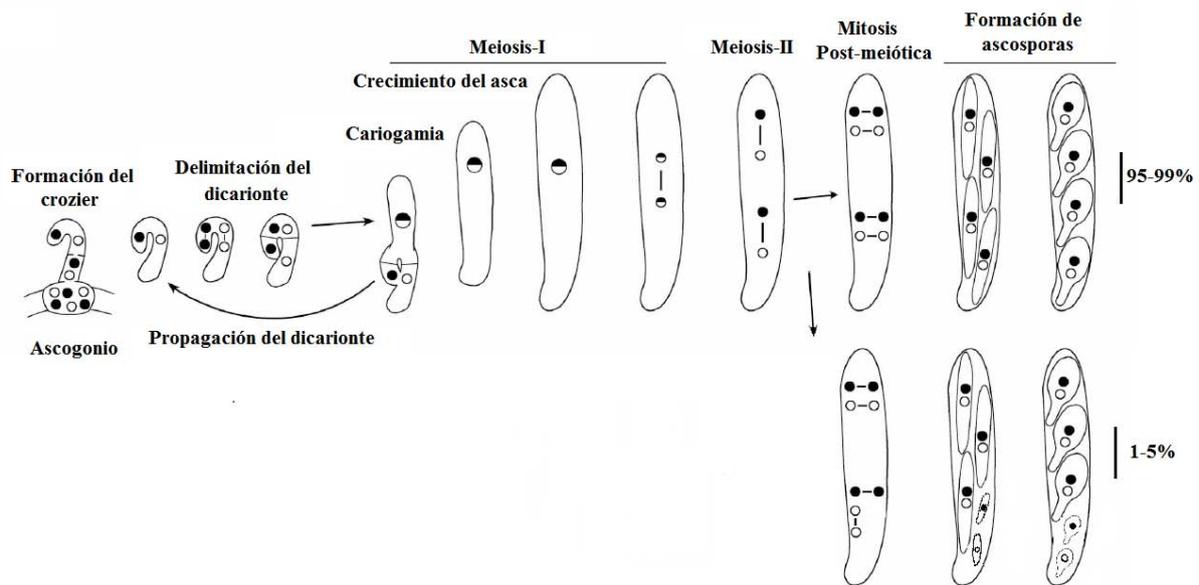


Figura 8. La formación de las ascosporas de *P. anserina*. La formación de las esporas sexuales ocurre dentro de los peritecios y resulta de la compartamentación de los núcleos derivados de la cariogamia y la meiosis. En primer lugar, a partir del ascogonio fertilizado (los círculos pequeños de distinto color representan núcleos de diferente origen parental) se forma una célula dicariótica (hifa ascógena) en cuya parte superior (el crozier) ocurre la cariogamia y donde surge un asca (el meiocito). Por su parte, las células basal y terminal de cada crozier se fusionan para diferenciar un nuevo crozier. Este proceso se repite en la parte inferior de cada nueva asca, resultando en una propagación de la etapa dicariótica. Seguido a la cariogamia ocurren las dos divisiones meióticas con un eje de división vertical. Una mitosis post-meiótica en un eje horizontal da lugar a ocho núcleos que son, posteriormente, empaquetados en cuatro ascosporas dicarióticas en el 95-99% de los casos. En el 1-5% de las ascas el cambio de orientación de uno de los husos mitóticos da lugar a dos esporas uninucleadas pequeñas en lugar de una espora dinucleada. Esto resulta en la formación de ascas con tres ascosporas dicarióticas grandes y dos homocarióticas pequeñas (modificado de Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013).

Una segunda característica de gran utilidad para el análisis y mapeo genético en *P. anserina* es la formación de dos tipos de ascas: pre-reducidas o de segregación de primera división (SPD) y ascas post-reducidas o segregación de segunda división (SSD) (fig. 9). En cruces heterocigas para un gen determinado, las ascas pre-reducidas se originan de una meiosis en la que no ocurrió recombinación entre este gen y su centrómero, por lo que cada mitad del asca en cuanto a núcleos es homogénea (dos esporas poseen, cada una, dos núcleos con el mismo alelo, y las dos restantes poseen el alelo contrario) En las ascas post-reducidas ocurre un evento de recombinación entre el gen y su centrómero, produciendo cuatro esporas

heterocarióticas (cada espora posee dos núcleos que portan alelos distintos). La proporción de cada evento depende de la distancia del gen determinado a su centrómero. Así, los eventos SPD permiten un primer acercamiento al mapeo de los genes relacionado con la cercanía a su centrómero, mientras que los eventos SSD proporcionan información respecto a la dominancia o recesividad de diferentes alelos (Silar, 2013).

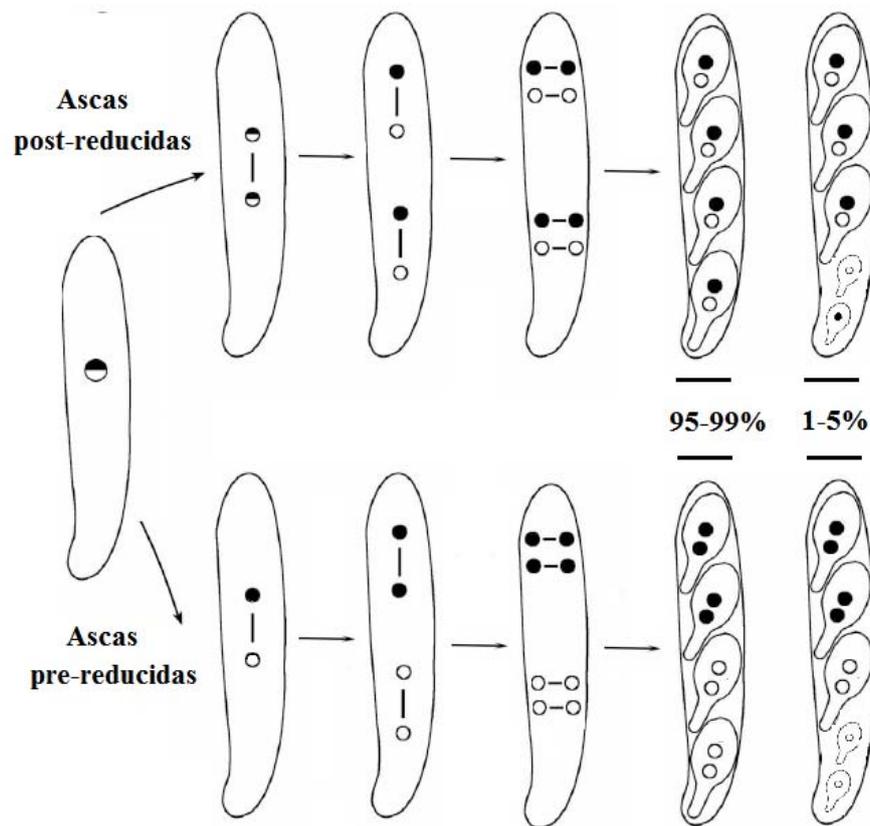


Figura 9. Formación de ascas post- y pre-reducidas. El mapeo de genes en *P. anserina* se ve facilitado por una segregación diferencial en las ascas. Si ocurre una segregación de segunda división meiótica (ascas post-reducidas), en un asca con cuatro ascosporas todas contendrán núcleos con ambos alelos de un gen de interés, mientras que en ascas de cinco esporas cada una de las esporas pequeñas contendrá un alelo distinto. La aparición de este tipo de ascas aumenta en función de la lejanía del gen a su centrómero. En el caso de la segregación de primera división (ascas pre-reducidas), un alelo definido de un gen de interés sólo se encontrará en dos de las cuatro esporas de un asca, mientras que en las ascas de cinco esporas dos de ellas presentarán un alelo y las tres restantes (una binucleada y dos uninucleadas) el alelo opuesto. La presencia de ascas pre-reducidas aumenta en función de la cercanía del gen a su centrómero (modificado de Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013; Silar, 2013).

1.4.3. La senescencia y el envejecimiento de *P. anserina*.

En 1935, Georges Rizet describió un fenómeno de envejecimiento en *P. anserina* llamado “senescencia”, lo que ocurría en menos de un mes de crecimiento, y solía ocurrir en promedio hasta los 25 días (Esser & Wendland, 2016). El envejecimiento celular puede ser definido como la disminución del potencial celular para proliferar y/o diferenciarse dado por causas intrínsecas, lo que puede culminar en la muerte celular. Aunado a esto, las células senescentes, son aquellas que han alcanzado el mayor número de divisiones. Es posible estudiar estos fenómenos en los hongos filamentosos debido a que están entre lo unicelular y multicelular por la presencia de septos que separan dos células en una misma hifa pero que a su vez permiten el flujo citoplasmático a través de un poro en el mismo septo.

Después de la germinación de una ascospora, el micelio se puede dividir en distintos explantes, los cuales pueden presentar longevidades distintas. Sin embargo, con réplicas del experimento en las mismas condiciones, la curva de supervivencia se conserva para todas las ascosporas con el mismo genotipo, por lo que es común presentar datos de este tipo con promedios y desviaciones estándar. La longevidad puede ser expresada como el tiempo requerido para que un cultivo presente senescencia, sin embargo, en *P. anserina* existe otra unidad de medida: la distancia que cubre el micelio durante ese mismo tiempo (Silar, *et al*, 2001).

Antes de la senescencia, en *P. anserina* se puede observar que 1) a un nivel macroscópico la velocidad de crecimiento disminuye, ocurre una pérdida de la fertilidad y aparece y aumenta una pigmentación verde olivo en el micelio (Silar, *et al*, 2001; Scheckhuber & Osiewacz, 2008); 2) microscópicamente disminuyen las ramificaciones laterales de la hifas y éstas se hinchan y revientan; 3) ultramicroscópicamente cambia el arreglo del sistema membranal intracelular lo que incluye a las mitocondrias, RE y núcleo y se acumulan ribosomas libres; 4) bioquímicamente se acumula lipofuscina (pigmento de células dañadas) por defectos

metabólicos lisosomales y 5) molecularmente ocurren modificaciones en el ADNmt (Silar *et al.*, 2001).

La longevidad es controlada por factores externos y genéticos. En primer lugar, las condiciones de crecimiento (temperatura, luz, medio de cultivo, etc.) influyen en la longevidad. Por ejemplo, una mayor temperatura puede llevar a la disminución de la longevidad y viceversa. Asimismo, un periodo corto de incubación a 36 °C al comienzo de la senescencia puede extender la longevidad; o bien, el uso de azúcares que permiten la represión catabólica disminuirla (y viceversa), por lo que el uso diferencial de medios de cultivo no permite llegar a un consenso de longevidad en ciertas mutantes. En segundo lugar, los genomas mitocondrial y nuclear pueden tener también efectos en la longevidad. En micelio joven, el ADNmt está constituido por una molécula circular de 100 kb que codifican para ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y proteínas de la cadena respiratoria. Dado que *P. anserina* es un aerobio obligado, la desaparición del ADNmt es una causa de muerte. Rearreglos en el genoma mitocondrial —en su mayoría amplificaciones extra cromosómicas— están asociadas al envejecimiento de *P. anserina*; muchos de estos rearrreglos consisten en secuencias repetidas de ADNmt arregladas en grupos multiméricos de plásmidos, conocidas como ADN de senescencia (ADNsen) por su presencia en cepas senescentes de *P. anserina* (Jamet-Vierny *et al.*, 1980), donde la molécula de ADNmt desaparece y es reemplazada por estas moléculas (Silar *et al.*, 2001). En cuanto al genoma nuclear, se ha calculado que 600-3,000 genes afectan la senescencia de *P. anserina* de los cuales se han estudiado pocos como la traducción citosólica, importe de proteínas a la mitocondria, cadena respiratoria, la homeostasis del cobre y la disminución de telómeros (la cual no ocurre durante la senescencia de *P. anserina*) (Silar *et al.*, 2001).

Actualmente existe una colección de cepas mutantes de *P. anserina* con mayor longevidad que la silvestre. Un primer grupo de mutantes está afectado en la respiración mitocondrial,

donde el complejo enzimático citocromo oxidasa (COX) está ausente o dañado y en las que *P. anserina* no muere ya que puede seguir con la respiración mitocondrial con una oxidasa alterna resistente a cianuro (AOX), donde la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) se ve disminuida; sin embargo, la sobreexpresión de AOX en esta mutante restaura la senescencia silvestre ya que se recuperan los niveles de ROS producidos (Lorin, *et al*, 2001). Otros grupos de mutantes con alta longevidad son aquellas en las que la importación de proteínas a las mitocondrias tiene un impacto en la estabilización del ADNmt, donde no se acumula ADNsen; y dos grupos más en las que se eliminan metacaspasas involucradas en apoptosis (Scheckhuber & Osiewacz, 2008); y en las que se induce de la autofagia (Knuppertz *et al.*, 2014). La gran mayoría de estas mutaciones no producen un “envejecimiento sano” debido a fuertes defectos fenotípicos como disminución de la velocidad de crecimiento y fertilidad (Scheckhuber & Osiewacz, 2008).

2. ANTECEDENTES

Se ha reportado que diferentes proteínas peroxisomales o peroxinas (PEX) de biogénesis de membrana e importación de proteínas a la matriz peroxisomal son requeridos para diferentes etapas del desarrollo sexual de *P. anserina*, como la formación y mantenimiento de los peritecios y la formación, maduración y germinación de las esporas sexuales (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). Así, en el desarrollo de *P. anserina*, la importación de proteínas al peroxisoma, todas las peroxinas del complejo RING-finger (PEX2, PEX10 y PEX12), son requeridas para la formación de meiocitos (ascas), específicamente PEX2 es necesaria para la cariogamia. En cuanto al complejo de docking (PEX3, PEX14 y PEX14/17), PEX14 es necesaria para la importación de proteínas después de la primera metafase meiótica y en las ascosporas; PEX14/17 se requiere para la metafase I de la meiosis y PEX13 para el desarrollo del meiocito (asca), ya que su ausencia bloquea la meiosis. Las peroxinas implicadas en la biogénesis de las membranas peroxisomales, PEX3 y PEX19, también se requieren para la formación de meiocitos (Peraza-Reyes *et al.*, 2011; Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). Durante el desarrollo meiótico de *P. anserina*, es también de gran importancia la regulación precisa tanto de la dinámica (en cuanto al tamaño, número y localización de este organelo), como del ensamblaje (cambios en el estado funcional de la maquinaria de importación peroxisomal) de los peroxisomas que intervienen en la modulación de la cariogamia, el inicio de la meiosis y la segregación de núcleos mitóticos en las esporas sexuales (Peraza-Reyes & Berteaux, 2013). Además, se conoce que funciones mitocondriales específicas son también requeridas para la progresión meiótica en *P. anserina* como la presencia de la citrato sintetasa mitocondrial (CIT1) (Ruprich-Robert *et al.*, 2002) y el gen nuclear-mitocondrial RMP1 cuya expresión y localización subcelular es regulada durante

todo el desarrollo y es requerido para la progresión de la meiosis y la correcta formación de las ascosporas (Contamine *et al.*, 2004). Además, la dinámica y función de las mitocondrias puede ser afectada por defectos peroxisomales específicos (Baumgart *et al.*, 2001; Bonnet *et al.*, 2006; Ruprich-Robert *et al.*, 2002) dada su interacción metabólica.

En cuanto a la longevidad, se ha caracterizado una mutante de *P. anserina* relacionada con dinámica mitocondrial con una esperanza de vida de 244 hasta 1,000 días que presenta “envejecimiento sano” donde la morfología del micelio, la pigmentación y velocidad de crecimiento son comparables con la silvestre. Esta mutante tiene ausente una proteína involucrada en la fisión mitocondrial DNM1, donde la pronunciada liberación de ROS como peróxido de hidrógeno y la fragmentación de las mitocondrias filamentosas presentes en una cepa silvestre en senescencia es retrasada debido tal vez a una resistencia celular a la inducción de la apoptosis (Scheckhuber *et al.*, 2007). Por otro lado, la mutante de la NADH cinasa en *P. anserina* (PaNdk1) también presenta una mayor esperanza de vida además de estabilidad en el ADNmt; sin embargo, presenta defectos somáticos y sexuales, por lo que no aumenta su longevidad de manera saludable (El-Khoury & Sainsard-Chanet, 2010).

Es importante recordar que la formación, función y dinámica peroxisomal y mitocondrial dependen en gran manera del RE (Shai *et al.*, 2015; Shrader & Yoon, 2007; Shrader *et al.*, 1998; English & Voeltz, 2013), así como el ensamblaje de los poros nucleares y cuerpos polares del huso dependen de proteínas del RE como los reticulones y Yop1 (Casey *et al.*, 2012). Además de la importancia del RE en la secreción de proteínas, éste también interviene en el ensamblaje de complejos de señalización de importancia para el desarrollo de *P. anserina* (Lacaze *et al.*, 2015). Es por lo anterior que como primer acercamiento para entender el papel del RE durante el desarrollo y cómo las interacciones entre organelos se organizan durante el mismo proceso, estudiamos el papel de las proteínas de la familia Yop1/DP1 durante el desarrollo sexual de *P. anserina*.

3. JUSTIFICACIÓN

El RE es un organelo que posee distintos dominios, cada uno con un amplio número de funciones celulares. Sin embargo se conoce poco sobre la formación de los dominios tanto funcionales como estructurales y de interacción, así como sobre su regulación y sobre el efecto del deterioro de su organización durante el desarrollo. El presente trabajo pretende generar información sobre el impacto que la disrupción de la organización del RE tiene durante la progresión del desarrollo en hongo filamentoso *P. anserina* como modelo celular.

4. HIPÓTESIS

Alteraciones en la morfología y/o en la organización del RE, en las que participa la familia de proteínas Yop1/DP1, evidenciarán su relevancia en el desarrollo somático y la diferenciación celular en el desarrollo sexual del hongo *P. anserina*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar los efectos de la ausencia de las proteínas de la familia Yop1/DP1 en el desarrollo del hongo filamentoso *P. anserina*.

5.2. Objetivos particulares

- Identificar los posibles genes de *P. anserina* que codifican para proteínas de la familia Yop1/DP1.
- Determinar los efectos de la ausencia de los genes de Yop1/DP1 durante el desarrollo somático de *P. anserina*.
- Determinar cómo la ausencia de los genes de Yop1/DP1 afecta el desarrollo sexual de *P. anserina*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo.

6.1.1. Cepas de *P. anserina* utilizadas y medios de cultivo para su crecimiento.

Esta investigación se llevó a cabo con la cepa “S” de *P. anserina*, cuyo genoma ha sido secuenciado (Espagne *et al.*, 2008). No obstante, en los experimentos de transformación y recombinación homóloga, se utilizó la cepa *Δku70* (Gandía *et al.*, 2016), la cual está afectada en la vía de reparación del ADN en la recombinación por unión de extremos homólogos, lo que facilita la inserción del ADN por recombinación homóloga (Gandía *et al.*, 2016).

Las cepas de *P. anserina* crecieron en laboratorio en medio mínimo M2 con dextrina como única fuente de carbono (anexo 10.2.1). En los experimentos de tasa de crecimiento, las cepas se inocularon en medio M2 y en medios donde la dextrina fue reemplazada por ácido oleico (0.05% de ácido oleico en 0.2% de Tween 40, usado como emulsificante) (anexo 10.2.3) o por papel celofán (i.e. celulosa) (anexo 10.2.2) como única fuente de carbono. La tasa de crecimiento de estos cultivos fue determinada midiendo el radio de las colonias individuales cada 24 horas por 4 días (en 4 experimentos independientes). Los protoplastos para la transformación de *P. anserina* fueron generados mediante la inoculación de pequeños implantes de la cepa *Δku70* en medio líquido para protoplastos (medio M2 con 5 g/L de extracto de levadura) (anexo 10.2.4). Posterior a la transformación de protoplastos, éstos se inocularon en 5 mL de medio de cobertura (constituido en un 75% por RG y en 25% por sorbitol 0.8 M) y finalmente vertidos sobre medio RG (M2 con 20% de glucosa) (anexo 10.2.5) con el antibiótico correspondiente (concentraciones en anexo 10.2.9).

Las ascosporas, producto de las cruces sexuales, fueron recuperadas en medio de agar (10 % de cloruro de sodio) (anexo 10.2.6) y germinadas en medio GYE el cual incluye Bacto Peptona (15 %) y acetato de amonio (4.4 %) (anexo 10.2.7). Las cepas mutantes verificadas se almacenaron a -70 °C en explantes de 2x2x2 mm en 1 mL de medio líquido RG permitiendo que las cepas se congelen y descongelen repetidas veces para su uso en el laboratorio sin afectar su vigorosidad hasta por 20 años.

6.1.2. Plásmidos para la construcción de casetes de delección y complementación genética.

El gen *hph* de *Escherichia coli* (el cual confiere resistencia a higromicina B) (Gritz & Davies, 1983) y el gen *NAT1* de *Streptomyces noursei* (que confiere resistencia a nourseotricina) (Krügel *et al.*, 1993) fueron obtenidos de los plásmidos pBC-Hygro y pPAPI-509, respectivamente. Por otro lado, los plásmidos utilizados para amplificar las secuencias flanqueantes de los genes de la familia Yop1/DP1 y para la complementación genética fueron GA0AA178CD11 para Pa_2_5730 (*YOP1*) y GA0AA301B08 para Pa_4_3260 (*YOP2*).

Todos los plásmidos se obtuvieron de la Biblioteca de ADN genómico de *P. anserina*, *Genoscope* (Espagne *et al.*, 2008).

6.2. Identificación de posibles genes codificantes para proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina* mediante análisis bioinformáticos.

6.2.1. Identificación de genes codificantes *YOP1* y *YOP2* para proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina* por comparación de secuencias de aminoácidos.

A partir de una secuencia de aminoácidos de la proteína Yop1p de *Saccharomyces cerevisiae*, tomada de *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), se realizaron búsquedas por alineamientos y comparación de secuencias de aminoácidos empleando el

algoritmo *BLAST* (*Basic Local Aligmen Search Tool*) en la base de datos del genoma de *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>). Así, se determinó que *P. anserina* posee los genes codificantes Pa_2_5730 (*YOP1*) para la proteína YOP1 y Pa_4_3260 (*YOP2*) para otra proteína de la familia Yop1/DP1, la cual denominamos YOP2. Una vez obtenidos estos datos, se realizó una búsqueda de dominios conservados en *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), con las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas.

6.2.2. Análisis bioinformáticos para determinar los dominios hidrofóbicos de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina*.

Se realizaron análisis para determinar los dominios hidrofóbicos para cada una de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina* con tres diferentes algoritmos disponibles en línea: TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) y TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>). Cada programa predijo los rangos de aminoácidos correspondientes a cada uno de los dominios transmembranales para cada proteína de la familia Yop1/DP1.

6.2.3. Alineamientos múltiples con ortólogos de YOP1 y YOP2 de *P. anserina* para la identificación de dominios conservados estructurales o funcionales.

Se realizaron análisis mediante *BLAST* empleando como secuencias de búsqueda las proteínas YOP1 y YOP2 de *P. anserina* en la base de datos de *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar los genes ortólogos de éstas en el mamífero *Homo sapiens*, la planta *Arabidopsis thaliana* y los hongos *Ustilago maydis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias para YOP1 y YOP2 con la herramienta *COBALT* de *NCBI*. Con los alineamientos

resultantes se obtuvieron perfiles de hidrofobicidad generados con el método general de Kyte & Doolittle en *BioEdit.7.0.0*.

6.3. Generación de cepas mutantes de *P. anserina* con deleciones de genes de la familia Yop1/DP1.

6.3.1 Diseño de oligonucleótidos para la construcción de los casetes de deleción para los genes *YOP1* y *YOP2* de *P. anserina*.

Para llevar a cabo la deleción de *YOP1* y *YOP2* de *P. anserina*, la secuencia codificante de cada uno de estos genes fue sustituida con recombinación homóloga por un gen marcador que confiere resistencia a un antibiótico (nourseotricina e higromicina, respectivamente).

Para que se lleve a cabo eficientemente el reemplazo de un gen determinado por recombinación homóloga en *P. anserina*, es necesario amplificar cerca de 700 pb de las secuencias flanqueantes (5' UTR y 3' UTR) del gen de interés y posteriormente fusionarlas a los extremos del gen marcador que se insertará en el *locus* correspondiente. Estas construcciones fueron generadas por PCR de fusión (Silar, 2013) (fig 8).

Para cada deleción se diseñaron oligonucleótidos para amplificar: 1) ~700 pb río arriba del extremo 5' de cada gen (designados yopX-5F y yopX-5R, donde X indica el gen correspondiente), 2) ~700 pb río abajo del extremo 3' de cada gen (designados yopX-3F y yopX-3R), y 3) el gen marcador selectivo: *NAT1* para la deleción de *YOP1* (oligonucleótidos nour-F y nour-R) y *hph* para la deleción de *YOP2* (oligonucleótidos hph-F y hph-R). Estos oligonucleótidos fueron diseñados mediante el software en línea *Primer3Plus* (<http://primer3plus.com/>) empleando la secuencia genómica de *P. anserina* y de los plásmidos correspondientes (Biblioteca de ADN genómico de *P. anserina*, Genoscope, Espagne *et al.*, 2008). Para permitir la fusión por PCR de las secuencias flanqueantes (5' y 3') de cada gen

(*YOP1* y *YOP2*) a su respectivo gen marcador, se diseñaron oligonucleótidos híbridos donde la secuencia contigua a la fase codificante del gen (*yopX*-5R y *yopX*-3F) fue fusionada por su extremo 5' a la secuencia nucleotídica complementaria de los cebadores que permiten amplificar los genes marcadores selectivos (y viceversa) (fig. 10 y anexo 10.1.1).

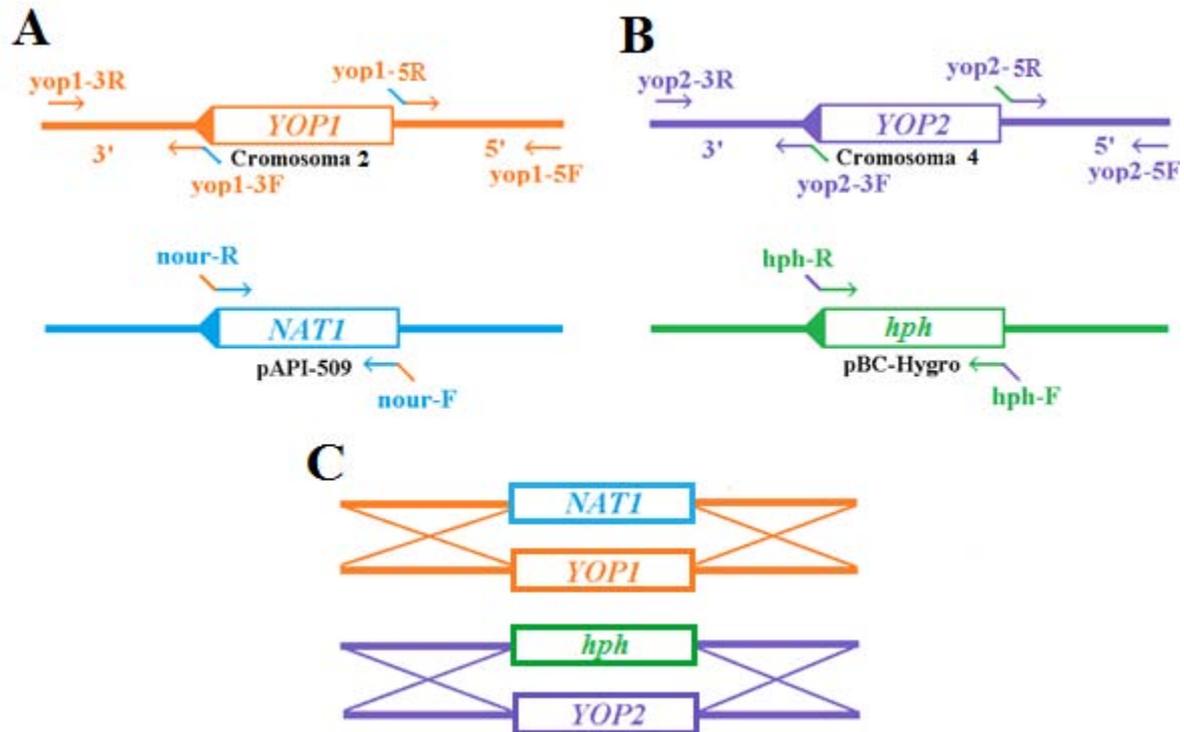


Figura 10. Estrategia experimental para efectuar la delección de *YOP1* y *YOP2* de *P. anserina*. Construcción de los casetes de delección de *YOP1* (A) y *YOP2* (B). Las secuencias flanqueantes y el gen *YOP1* en la cadena complementaria del cromosoma 2 de *P. anserina* son representadas por el color naranja mientras el plásmido pAPI-509 y el gen que confiere resistencia a nourseotricina se representan en color azul (A). Las secuencias flanqueantes y gen *YOP2* en la cadena complementaria del cromosoma 4 de *P. anserina* se ilustran en morado y el plásmido pBC-Hygro con el gen para la resistencia a higromicina en color verde (B). Las flechas representan los oligonucleótidos sencillos (un color) e híbridos (dos colores). C. Sustitución de los genes silvestres *YOP1* y *YOP2* por los casetes con los marcadores selectivos *NATI* y *hph* por recombinación homóloga en *P. anserina*.

6.3.2. Generación de los casetes de delección para *YOP1* y *YOP2*.

Los genes marcadores *NATI* y *hph* fueron amplificados por PCR empleando como templado los plásmidos pAPI-509 y pBC-Hygro, respectivamente, mientras que los extremos flanqueantes (5' y 3') de los genes *YOP1* y *YOP2* se amplificaron a partir de los plásmidos GA0AA178CD11 y GA0AA301B08 (Biblioteca de ADN genómico de *P. anserina*,

Genoscope, Espagne *et al.*, 2008), , respectivamente (ver pares de oligonucleótidos utilizados y tamaño de las secuencias amplificadas en anexo 10.1.2).

Para cada deleción, los tres productos de PCR fueron purificados mediante geles de electroforesis utilizando el sistema *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido), y posteriormente empleados como templado en reacciones de PCRs de fusión con los oligonucleótidos yopX-5F y yopX-3R. Los productos de PCR finales fueron purificados mediante geles de electroforesis. Dado que la eficiencia de amplificación de la construcción del casete de deleción de *YOP1* fue clonado en el vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega, Madison, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor. A continuación, la estructura del casete fue corroborada evaluando su perfil de digestión con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *EcoRI*. Finalmente, el casete de deleción de *YOP1* fue liberado del vector utilizando las enzimas de restricción *AdnI* y *NotI* y, tras ser purificado mediante geles de electroforesis, fue utilizado para transformar a *P. anserina*. Por su parte, la constricción del casete de deleción de *YOP2* obtenida por PCR de fusión fue purificada mediante geles de electroforesis y usada directamente para transformar a *P. anserina*.

6.3.3. Formación de protoplastos para la transformación de *P. anserina*.

Cinco colonias de dos días de crecimiento de la cepa $\Delta ku70$ de *P. anserina* fueron maceradas con 5 μ L de agua estéril e inoculadas en matraces Fernbach con 250 mL de medio líquido para protoplastos (anexo 10.2.4). Posterior a una incubación por dos días a 27 °C, se filtró el micelio con un embudo Buchner con gasa estéril y se lavó con TPS1. El micelio fue pesado y recuperado en TPS1 (anexo 10.3.1) a una concentración de 1g (peso húmedo) / mL. Su pared celular fue digerida con 40mg/mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma, St. Louis Missouri, EUA) por 2 horas a 37 °C. El micelio digerido se filtró con TPS1 a 4 °C y los

protoplastos recuperados se lavaron por centrifugación a 3,200 rpm por 10 minutos dos veces con TPS1 y una vez más con TPC (anexo 10.3.2). El botón final se recuperó en 3-5 mL de TPC. Posteriormente, los protoplastos se cuantificaron en una cámara de Neubauer y la concentración de los mismos se ajustó a $1,5 - 2 \times 10^6$ protoplastos/mL. Finalmente se almacenaron en alícuotas de 200 μ L -70 °C hasta su uso.

6.3.4. Transformación de *P. anserina*.

Para cada transformación una alícuota de 200 μ L de protoplastos *Δku70* fue descongelados en hielo y sometida a un coque térmico de 48 °C por 5 minutos. Posteriormente se incubó por 30 segundos en hielo y se le añadieron aproximadamente 5 μ g de ADN del casete de delección diluido en 20 μ L de agua. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se le agregó 1.5 mL de PEG 4000 4, pH 7.5 (anexo 10.3.3) y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Se repartieron los protoplastos en tubos con medio de cobertura RG, se agitaron suavemente y se vertieron en cajas Petri con medio selectivo RG (con el antibiótico correspondiente). Las transformantes primarias fueron recuperadas en medio M2 selectivo. Después de 5-6 días de incubación en la oscuridad a 27 °C. Posteriormente, el evento de reemplazo génico esperado fue verificado por PCR (sección 6.4.2).

6.3.5. Purificación de las transformantes primarias para obtener cepas mutantes monocarióticas de ambos tipos sexuales.

Para obtener cepas con todos los núcleos mutantes para el gen *YOP1* o *YOP2* y silvestres para el gen *KU70*, se realizaron cruza sexuales de las transformantes primarias (TP), por la cepa silvestre. De la descendencia de cada cruza, se recuperaron únicamente las esporas uninucleadas y se determinó el genotipo de interés por los marcadores de resistencia

correspondientes y por verificación por PCR (sección 6.4.2). Finalmente, se determinó el tipo sexual de cada una de las esporas seleccionadas para los experimentos posteriores.

6.3.6. Obtención de dobles y triples mutantes.

Para obtener cepas con las deleciones de *YOP1* y *YOP2* simultáneamente, así como cepas de doble y triple deleción de estos genes y de *RTN1* (el gen codificante para la proteína de la familia de los de reticulones de *P. anserina*), se realizaron las cruzas heterocigas $\Delta yop1$ x $\Delta yop2$, $\Delta yop1$ x $\Delta rtn1$, $\Delta yop2$ x $\Delta rtn1$ y $\Delta yop1\Delta yop2$ x $\Delta rtn1$ y de la descendencia de éstas se aislaron cepas monocarióticas con los marcadores selectivos correspondientes a cada deleción (tabla 1) en ambos tipos sexuales. En el caso de cruzas sexuales que involucraron deleciones efectuadas con un mismo marcador selectivo (i.e. la deleción de *RTN1* se efectuó con el gen *hph*, López-Fuentes A., *et al*, resultados sin publicar), la segregación de los marcadores fue determinada mediante ascas pre-reducidas.

Tabla 1. Patrón de resistencia para la selección de dobles y triples mutantes.

Mutante	Resistencia a nourseotricina	Resistencia a higromicina
<i>Δyop1Δyop2</i>	+	+
<i>Δyop1Δrtn1</i>	+	+
<i>Δyop2Δrtn1</i>	-	+
		(pre-reducida)
<i>Δyop1Δyop2Δrtn1</i>	+	+
		(pre-reducida)

6.4. Verificación de la obtención de cepas mutantes.

6.4.1. Extracción de ADN de *P. anserina*.

Se sembraron 19 implantes del hongo en medio M2 con una capa superficial del celofán y se incubaron en oscuridad a 27 °C por dos días. Se recuperó el micelio que creció sobre la capa de celofán, se congeló a -70 °C durante 10 minutos y se liofilizó durante 40 minutos. Se pulverizó el micelio seco, se agregaron 500 µL de EDTA pH 8 con SDS al 0.2% y se incubó a 70 °C por 15 minutos. Posteriormente, se colocaron 50 µL de acetato de potasio 5 M, se incubó a 4 °C por 30 minutos y se centrifugó a 18,312 x g por 10 minutos para eliminar restos de micelio y proteínas precipitadas. Al sobrenadante se le agregaron 200 µL de fenol-cloroformo, se centrifugó a 18,312 x g por 5 min y se recuperó la fase acuosa. A ésta se le añadió 200 µL de cloroformo, se centrifugó a 18,312 x g 5 min y se recuperó nuevamente la fase acuosa. El ADN se precipitó con 1 mL de etanol al 100%, se centrifugó a 18,312 x g 5 min, y el botón recuperado fue lavado con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 9,860 x g 5 min. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar el botón durante 30 minutos a temperatura ambiente y el ADN se disolvió en aproximadamente 100 µL de agua estéril.

6.4.2. Verificación de las mutantes de *Δyop1* y *Δyop2* por PCR.

Para verificar la inserción del casete de delección en el *locus* esperado se diseñaron oligonucleótidos complementarios a secuencias flanqueantes de los *loci* *YOP1* y *YOP2* (externas a las secuencias flanqueantes empleadas para efectuar la delección por recombinación homóloga), así como las secuencias internas de la región codificante de *YOP1* y *YOP2* o de los genes marcadores *NAT1* y *hph* (fig. 11 y anexo 10.1.1). Mediante estos oligonucleótidos se verificó: (i) la dimensión del *locus* esperado tras reemplazar la fase codificante del gen respectivo con el marcador selectivo, (ii) la eliminación de la secuencia

codificante del gen respectivo y la presencia del gen marcador selectivo enmarcado por las regiones flanqueantes (iii) 5' y (iv) 3' del *locus* respectivo (ver pares de oligonucleótidos utilizados y tamaño de las secuencias amplificadas en anexo 10.1.3).

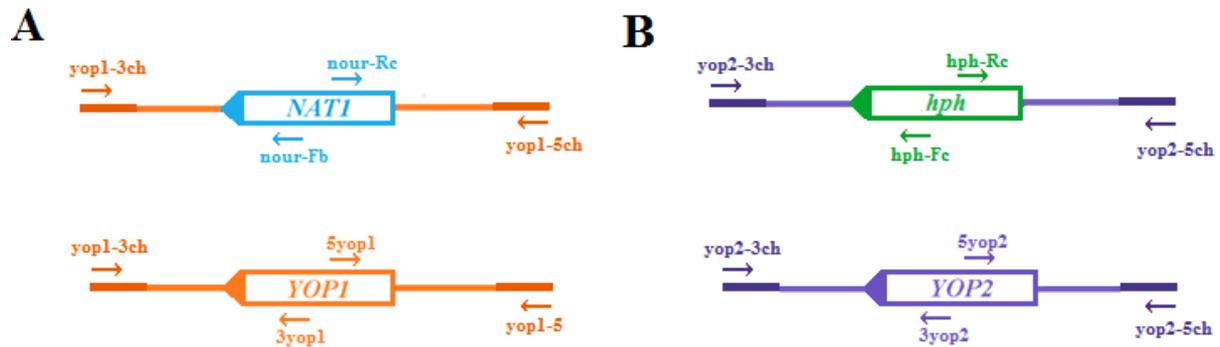


Figura 11. Estrategia experimental para efectuar la verificación de la inserción de los casetes de delección de *YOP1* y *YOP2* en *P. anserina*. Las secuencias flanqueantes y el gen *YOP1* en la cadena complementaria del cromosoma 2 de *P. anserina* son representadas por el color naranja mientras el plásmido pAPI-509 y el gen que confiere resistencia a nourseotricina se representan en color azul (A). Las secuencias flanqueantes y gen *YOP2* en la cadena complementaria del cromosoma 4 de *P. anserina* se ilustran en morado y el plásmido pBC-Hygro con el gen para la resistencia a higromicina en color verde (B). Las flechas representan los oligonucleótidos complementarios a secuencias 1) fuera del casete de delección en los cromosomas correspondientes y 2) dentro de la secuencia codificante del gen marcador o del gen silvestre.

6.5. Caracterización de cepas mutantes de *P. anserina* durante el desarrollo.

6.5.1. Ensayos de longevidad.

Para estudiar el envejecimiento de *P. anserina*, se determinó la longevidad de las cepas monocarióticas a partir de la germinación de una ascospora. Para ello, se obtuvieron ascosporas monocarióticas de los genotipos de interés a partir de la descendencia de cruza silvestres y de cruza heterocigas entre cepas mutantes relevantes y la cepa silvestre. Todas las esporas utilizadas para determinar la longevidad fueron del tipo *MAT+*.

Esporas independientes se sembraron en medio GYE y se tomaron dos implantes del centro de cada colonia. Cada implante se inoculó en una orilla de cajas Petri de 82 mm de diámetro con medio M2 (5.5g de dextrina/L) y se midió el radio de cada colonia cada 24 horas. Una

vez que la colonia alcanzó el borde de la caja Petri, un implante proveniente del borde de la colonia (de un radio determinado) fue inoculado en una caja de medio nuevo. La longevidad fue definida como la distancia promedio en centímetros del punto de inoculación de una espora al borde de la colonia cuando el crecimiento se arresta. Cada experimento consistió de al menos 3 réplicas independientes.

6.5.2. Análisis del micelio aéreo, los ascogonios y los espermacios.

Para analizar la formación de gametos y gametangios de *P. anserina*, se inocularon implantes de las cepas de interés en medio M2 y se incubaron en luz a 27 °C por dos días. A continuación, se introdujeron cubreobjetos de forma inclinada (aproximadamente 160°) en el medio de cultivo cerca del borde de cada colonia y se permitió que éstas crecieran 12 horas más. Tras este tiempo, se analizó la formación de ascogonios y microconidios en el micelio aéreo que se desarrolló sobre los cubreobjetos por microscopía de contraste de fases. Para analizar la distribución nuclear, a los cubreobjetos con micelio aéreo, se les añadieron 200 µL de 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI) =0.75 µg/mL en PBS 1X por 10 minutos. Se lavó la muestra con 1 mL de PBS 1X y se observó la distribución de los núcleos al microscopio de fluorescencia.

6.5.3. Análisis de la progresión sexual y de la formación de ascosporas.

Para analizar la diferenciación de los distintos tipos celulares del desarrollo sexual, así como la progresión nuclear es estas células, las estructuras sexuales provenientes del interior de peritecios de 5 días después de la fertilización fueron fijadas y montadas en laminillas para hacer preparaciones permanentes. Para cada preparación, los *centra* (el tejido interno de cada peritecio que contiene las células sexuales) provenientes de 5 peritecios fueron fijados en 500 µL de paraformaldehído al 7.4% por 10 minutos. Tras retirar el paraformaldehído, las

estructuras sexuales se lavaron con 500 μ L de PBS y se transfirieron a un cubreobjetos cubierto con poli-Lisina. Los cubreobjetos fueron esparcidos en su superficie con Poli-Lisina (Bromohidrato de poli.Lisina, Sigma) al 0.1%, se dejaron reposar por 10 minutos, se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar por 12 horas en oscuridad. Una vez que las estructuras sexuales se transfirieron un cubreobjetos siliconizado al de poli-Lisina (lo que se facilitó al ejercer presión sobre ellos), las estructuras sexuales adheridas a la laminilla se lavaron con 250 μ L de PBS + TX. Posteriormente se incubaron con 250 μ L de PEM + lisolecitina en la oscuridad 1 hora a 37 °C y finalmente se tiñieron por 15 minutos a temperatura ambiente con 250 μ L de PBS + TX + DAPI. Las laminillas se lavaron con agua desionizada y se montaron en un portaobjetos con 15 μ L de medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, California, USA). Finalmente, cada laminilla fue sellada por todos sus aristas con barniz de uñas y se observaron al microscopio de fluorescencia.

6.5.4. Cuantificación de los defectos en el desarrollo de las ascas.

Se realizaron cruza homócigas silvestre x silvestre, mutante x mutante (*Δyop1*, *Δyop2*, *Δyop1Δyop2*, *Δyop1Δrtn1*, *Δyop2Δrtn1* y *Δyop1Δyop2Δrtn1*) y heterócigas silvestre x mutante. Para cada cruza, se tomó el *centrum* de 5 peritecios de un diámetro similar a los cuatro y cinco días después de la fertilización y se observaron al microscopio óptico cerca de 150 ascas por cruza. Se cuantificó el porcentaje de ascas con una distribución normal de ascosporas con 4 esporas del mismo tamaño o 5 esporas con 3 esporas del mismo tamaño y 2 más pequeñas, así como el porcentaje de ascas que presentaron esporas alteradas morfológicamente.

6.5.5. Microscopía de fluorescencia.

Los análisis de microscopía de fluorescencia se realizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 en un aumento de 100x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Andor Technologies Neo sCMOS con un lente Nikon C-0.6x. Las micrografías fueron procesadas usando el programa *Image J* (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA).

6.6. Ensayos de complementación genética de las cepas.

Los análisis de complementación genética de la cepa *Δyop2* se realizaron mediante experimentos de cotransformación. Para ello, protoplastos de la cepa *Δyop2* fueron transformados simultáneamente con el plásmido PMS334, que confiere resistencia a geneticina, y con el plásmido GA0AA301B08 portador del alelo silvestre del gen *YOP2*. De la transformación, se recuperaron las cepas resistentes a geneticina y se determinó el restablecimiento del fenotipo silvestre en ellas.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación y estructura de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina*.

7.1.1. YOP1 y YOP2: Proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina*.

La comparación de la secuencia de los 180 aminoácidos que conforman la proteína Yop1p de *S. cerevisiae*, permitió identificar dos genes en el genoma de *P. anserina* ya que arrojó valores estadísticos que fueron suficientemente significativos para considerar que ambos codifican para proteínas que pertenecen a la familia de Yop1/DP1: 1) El gen Pa_2_5730 con un *Bit score* de 339 y un *E value* de $2e-94$ y 2) el gen Pa_4_3260 con un *Bit score* de 70 y un *E value* de $2e-13$. Se determinó que *P. anserina* posee el gen Pa_2_5730 (*YOP1*), ubicado en el cromosoma 2 lejos del centrómero y que predeciblemente codifica para la proteína YOP1 con 168 aminoácidos, y el gen Pa_4_3260 (el cual denominamos *YOP2*), ubicado en el cromosoma 4 cerca del centrómero y que codifica para otra proteína de la familia Yop1/DP1 con 356 aminoácidos, la cual denominamos YOP2.

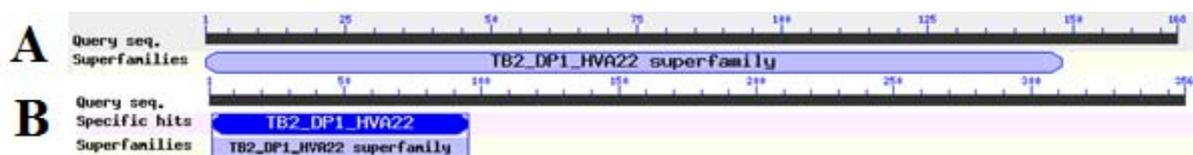


Figura 12. Dominios de la superfamilia de proteínas TB2-DP1-HVA22 de YOP1 y YOP2 de *P. anserina*. A. La proteína YOP1 de *P. anserina* está comprendida casi en su totalidad por un dominio de la superfamilia TB2-DP1-HVA22 B. La tercera parte de la proteína YOP2 de *P. anserina* tiene un dominio de la superfamilia TB2-DP1-HVA22, mientras que el resto de la proteína no presenta dominios conocidos.

Por otro lado, la búsqueda de dominios conservados determinó que ambas proteínas poseen dominios pertenecientes a la superfamilia de proteínas TB2-DP1-HVA22. Dicho dominio abarca casi la totalidad de la proteína YOP1, mientras que en YOP2 este dominio corresponde a los primeros 78 aminoácidos de la proteína, que son seguidos por 278 aminoácidos hacia el carboxilo, en cuya secuencia no se predice ningún dominio conocido (fig. 12). Específicamente, el dominio TB2-DP1-HVA22 de YOP1 se encuentra entre los residuos de aminoácidos 1-148, para YOP2 va del 2-95 y para Yop1p de *S. cerevisiae* del 1-180. La comparación de estos rangos de secuencias por pares en NCBI determinó el porcentaje de identidad y similitud únicamente en la región del dominio conservado (tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de identidad y similitud del dominio TB2/DP1/HVA22 de YOP1 y YOP2 de *P. anserina* y Yop1p de *S. cerevisiae*.

Proteínas	% identidad	% similitud
YOP1-YOP2	38	60
YOP1-Yop1p	40	61
YOP2-Yop1p	42	61

7.1.2. Predicción de los dominios transmembranales de YOP1 y YOP2 de *P. anserina* y su conservación en los ortólogos de la familia Yop1/DP1.

Análisis para identificar α -hélices transmembranales (TMs) con distintos algoritmos indican en su mayoría que YOP1 posee un dominio típico TB2-DP1-HVA22 con cuatro regiones hidrofóbicas que se embeben en la membrana estructurando un pasador en forma de “W” con ambos extremos terminales orientados hacia el citoplasma y con dos pequeñas secuencias entre cada par de regiones hidrofóbicas en contacto predeciblemente con el lumen del RE (fig. 13). Este arreglo concuerda para *P. anserina* con las predicciones de Voeltz (2006), Hu *et al.* (2011) y Brady *et al.* (2014), que describen a Yop1p de *S. cerevisiae* como una proteína integral de membrana capaz de atravesar completamente la bicapa lipídica varias veces. Los mismos análisis indican en su mayoría que YOP2 alberga un dominio atípico con tres regiones hidrofóbicas en la región N-terminal con ambos extremos terminales con orientación hacia el citoplasma y que al igual que YOP1 atraviesan la bicapa lipídica completamente; YOP2 posee además una secuencia larga de aminoácidos con funciones y dominios desconocidos en la región carboxilo pero que dichos algoritmos predicen su localización en la cara citoplasmática de la membrana en la que está embebida (fig. 14).

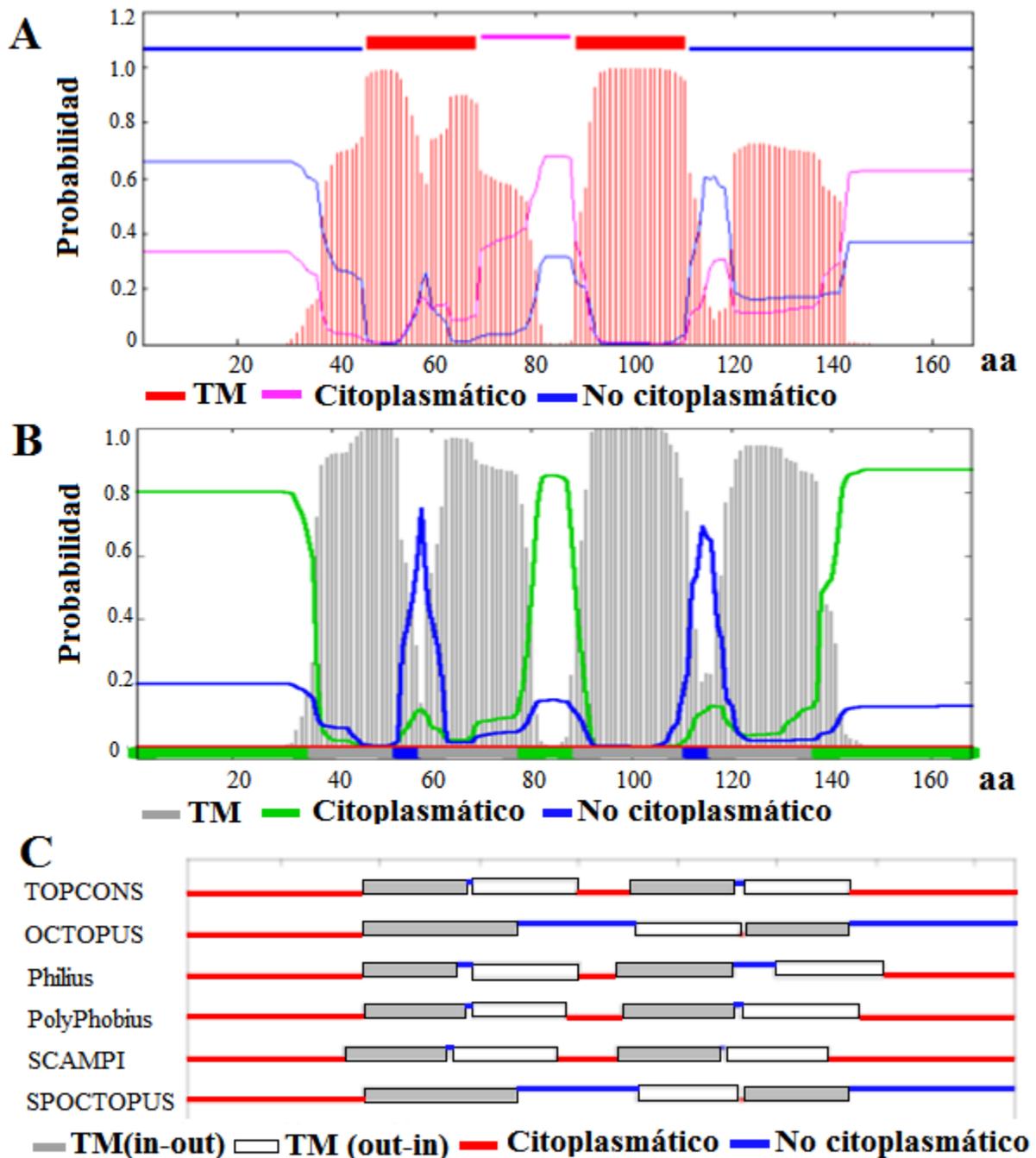


Figura 13. Análisis de la hidrofobicidad de la proteína YOP1 de *P. anserina*. **A.** El algoritmo TMHMM predice sólo dos dominios transmembranales (TM) (segmentos rojos en la línea superior); sin embargo, en el gráfico se puede observar que existe una probabilidad (>0.6) de que YOP1 cuente con cuatro dominios TMs. **B.** Predicción de Phobius que indica claramente los cuatro dominios TMs con los extremos terminales de la proteína hacia el citoplasma y las pequeñas regiones en el lumen y citoplasma que permiten los giros en la topología en forma de “W” de YOP1. **C.** Predicción de TOPCONS que incluye a otros algoritmos en la misma gráfica que en su mayoría predicen la misma topología que Phobius. Las escalas indican la probabilidad (eje de las abscisas) para cada residuo de aminoácidos (eje de las ordenadas) de pertenecer a una α -hélice TM y si ésta y otros residuos son citoplasmáticos o no citoplasmáticos.

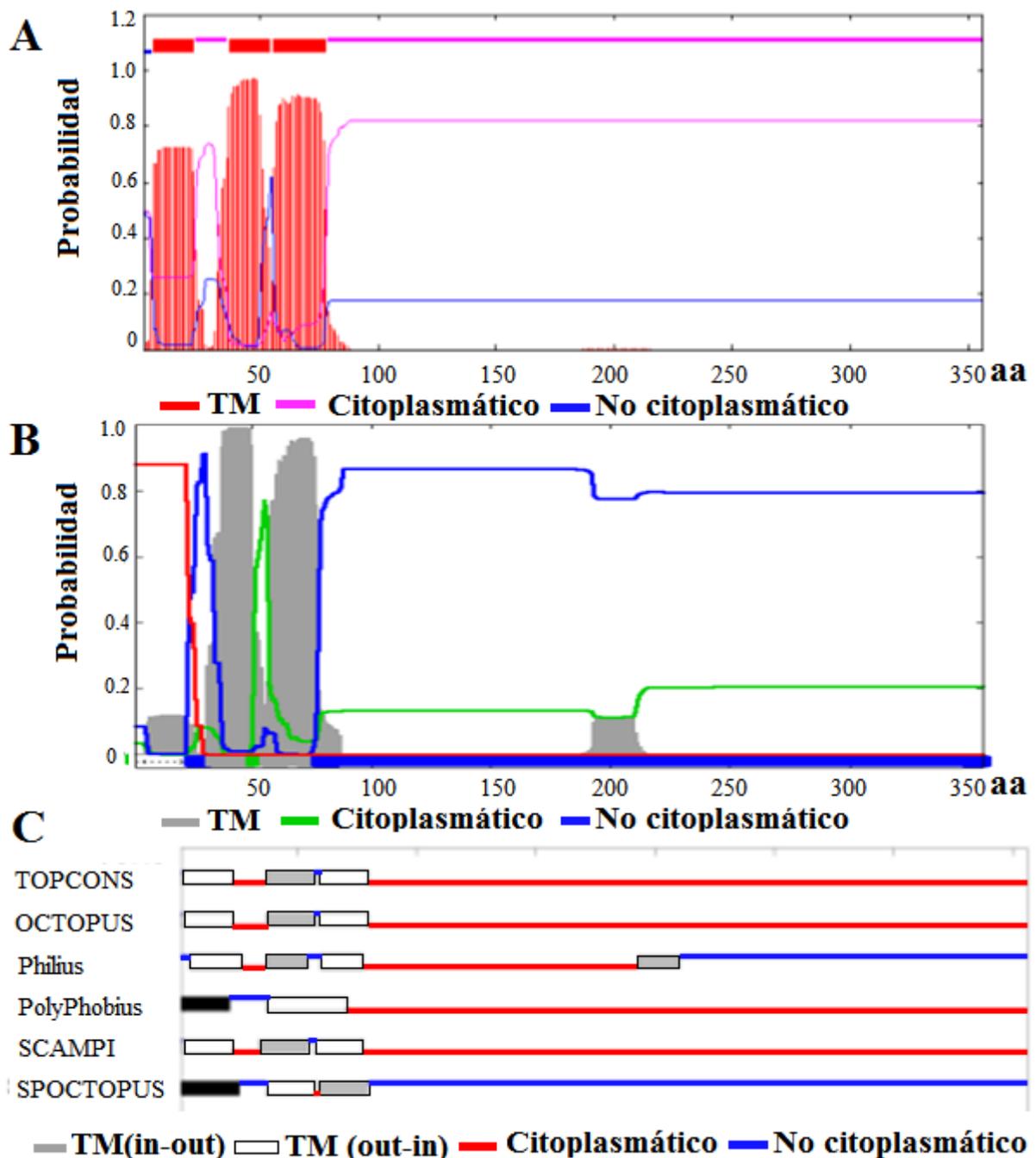


Figura 14. Análisis de la hidrofobicidad de la proteína YOP2 de *P. anserina*. **A.** Predicción de TMHMM que indica la presencia de tres dominios TMs en la región N-terminal y la orientación de ambos extremos hacia el citoplasma y una pequeña secuencia con orientación hacia el lumen entre los dominios TMs 2 y 3. **B.** Predicción de Phobius que identifica sólo dos dominios TMs y determina la orientación de ambos extremos terminales hacia el lumen. **C.** Predicción de TOPCONS incluye a otros algoritmos en la misma gráfica que en su mayoría predicen una orientación de los extremos terminales hacia el citoplasma y tres dominios TMs en la región N-terminal y una larga secuencia de aminoácidos sin alguna predicción TM más que con el algoritmo de Phobius. Las escalas indican la probabilidad (eje de las abscisas) para cada residuo de aminoácidos (eje de las ordenadas) de pertenecer a una α -hélice TM y si ésta y otros residuos son citoplasmáticos o no citoplasmáticos.

Un perfil hidrofóbico de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) del alineamiento de aminoácidos de YOP1 y YOP2 de *P. anserina* indica (al igual que los algoritmos anteriores) la posición de las secuencias TMs del dominio TB2-DP1-HVA22 para cada una (fig. 15 A). YOP1 posee el dominio en el centro de la proteína mientras que YOP2 en la región amino (fig. 15 B).

Un alineamiento múltiple de las proteínas ortólogas de YOP1 y YOP2 de *P. anserina* en hongos, plantas y animales (fig. 16) y un perfil de hidrofobicidad del mismo (fig. 17) muestran la conservación de los dominios TMs y su identidad y similitud.

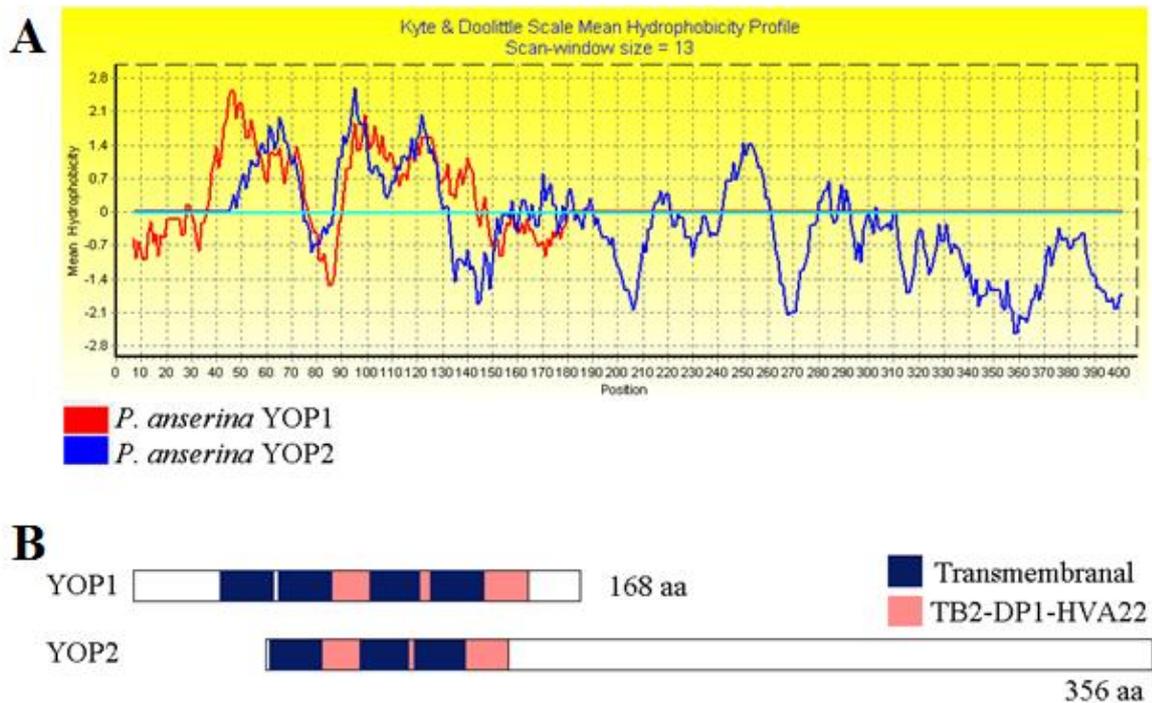


Figura 15. Perfil de hidrofobicidad de YOP1 y YOP2 de *P. anserina*. **A.** Perfil de hidrofobicidad de las secuencias de aminoácidos alineadas de YOP1 y YOP2 con base en la escala de Kyte y Doolittle. **B.** Modelo consenso de la estructura de YOP1 y YOP2 en donde se muestran los dominios TB2-DP1-HVA22 y las α -hélices TMs.

Figura 16. Alineamiento de proteínas de la familia de YOP1 de hongos, plantas y animales. Las regiones conservadas del dominio de la familia Yop1/DP1 (azul) y la identidad (rojo) entre los residuos de aminoácidos en cada organismo.

<i>P. anserina</i> YOP2	1	---MFDIFAKLLSSIAS-----FLFPLFASYKALKTS--DPAQLTP---WLMYVVVLACALLVESWTEWFL	58
<i>P. anserina</i> YOP1	1	[40]LGSVALYFFLILLNLGG--QLLTNIAGFVIPGYYSLGALFSA--DKHDDTQ---WLTYYVVVFSFPTVLESFIS-VV	108
<i>S. cerevisiae</i> Yop1p	1	[40]AGLGFAYLLLIFINVGvGEILSNFAGFVLPAYLSLVALKTP--TSTDQTQ---LLTYWVIVFSVLSVIEFWSKAIL	111
<i>U. maydis</i> 11096	1	[44]IGAFGIFTLVFFFNIAA--GFLTNLGFFVPAYFSLKALESP--QPQDDIQ---WLTYYVVVFGMFTFLETFINIVL	113
<i>U. maydis</i> 11541	1	-----MALVLLHLPT-LALNAAATLVYPLYSSYKAVTSSktSLPDMEV---WLVYVSVFACWTLLESVFGFLW	64
<i>H. sapiens</i> TB2	1	[44]IALGVIGLVALLVFGYgaSLLCNLIGFGYPAYISIKAIESP--NKEDDTQ---WLTYYVVYGVFSIAEFFSDIFL	115
<i>A. thaliana</i> HVA22d	1	MDKFWTFLTALHSGAGP-----IVMLLYPLASVIAMEST--TKVDDEQ---WLAYWIIYSFLSLTELILQSLI	64
<i>A. thaliana</i> HVA22E	1	MTKLWTSLSALHSLAGP-----VVMLLYPLASVIAIESP--SKVDDEQ---WLAYWILYSFLTLSELILQSLI	64
<i>A. thaliana</i> HVA22	1	-----MVLGYAYPAYECYKTV-E-K--NRPEIEQIrfWCQYWIIVLAULTVFERVGDVAV	50
<i>P. anserina</i> YOP2	59	CWIPFYAYLRFFFLYLVLVLP-QTQGARYIYEEYVHPRLEENETAIEELIASAHDRLLKAAGVAYLKQAI EYLKTN[225]	356
<i>P. anserina</i> YOP1	109	YWVPFYFTKFIKIFLLWLSLP-SFKGAEIIFRSFLAPT-----LSRHFQTSGSTASGLRAKADLHTE	168
<i>S. cerevisiae</i> Yop1p	112	YLIPFYWFLKTVFLIYIALP-QTGGARMYQKIVAPLTDRIYLR--DVSKEKDEIRASVNEASKATGASVH--	180
<i>U. maydis</i> 11096	114	YYVPWYTIKTLAIWMLLP-QTQGAKMYSKVIRPAF-----LTTQKTVHQANASTPAAPAETH--	172
<i>U. maydis</i> 11541	65	SWLPFYEFRLLFNIWLVP-QTRGATYIYTNHLHPFLQSNQQIDAWIEDAKRNVKAKMDSLGLLSAWSGG[209]	346
<i>H. sapiens</i> TB2	116	SWFPFYIYLKCGFLWCMAPsPSNGAELLYKRIIRPFLKHESQMDSVVKDLKDKAKETADAITKEAKKATVNL[8]	197
<i>A. thaliana</i> HVA22d	65	EWIPFYWTVKLVFVAVLVLVLP-QFQGAIFYNRVREQFKKHGVL RSTHSPKPKNILHSIFPHREGHEAHS--	135
<i>A. thaliana</i> HVA22E	65	EWIPFYWTVKLVFVAVLVLVLP-QFRGAIFYNKVREQFKKYGIL-----KPKVEHQAE-----	116
<i>A. thaliana</i> HVA22	51	SWPMPYSEAKLAFFIYLWYP-KTRGTTYVYESFFRPYLSOHENDIDHLSLELRTRAGDMAVIYWRVASYGOTR[162]	285

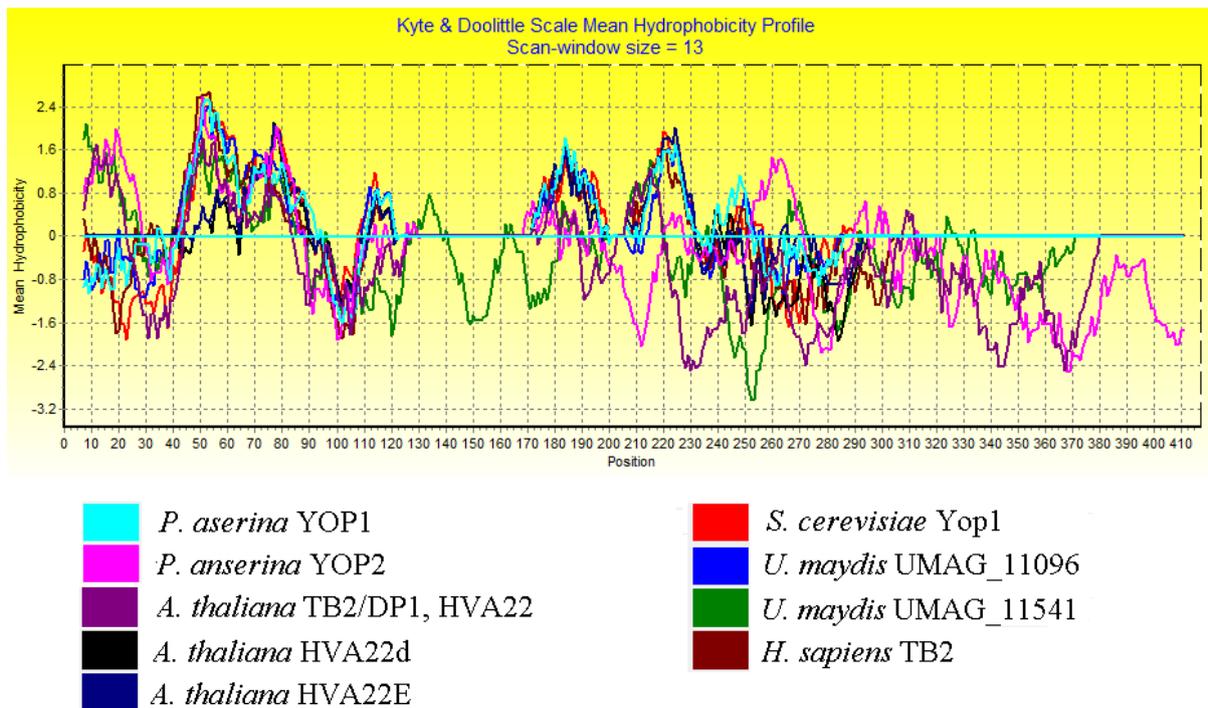


Figura 17. Perfil de hidrofobicidad de proteínas de la familia de YOP1 de hongos, plantas y animales. Proteínas YOP1 y YOP2 representativas fueron alineadas como en la figura 15 y sus perfiles de hidrofobicidad fueron comparados. Las regiones con los dominios Yop1/DP1, HVA22 muestran perfiles de hidrofobicidad semejantes.

La función que se le ha atribuido a las proteínas de la familia Yop1/DP1 probablemente se lleve a cabo por el dominio TB2-DP1-HVA22. Así, como Yop1p tiene un papel comprobado en conferir una alta curvatura a la membrana del RE de *S. cerevisiae* (Voeltz *et al.*, 2006), YOP2 de *P. anserina* podría estar implicada en una función similar debido a la presencia de un dominio homólogo al de Yop1p, sin embargo no se le ha atribuido una función adicional o específica en *P. anserina* relacionada con su dominio carboxilo.

7.2. Obtención de las mutantes $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$.

7.2.1. Obtención de los casetes de delección para *YOP1* y *YOP2*.

Una vez hechos los análisis que determinan a YOP1 y YOP2 como parte de la familia de Yop1/DP1, se procedió a la eliminación de los genes codificantes de ambas proteínas para determinar los efectos de su ausencia en el desarrollo de *P. anserina*. Para el casete de delección de *YOP1* se obtuvieron los extremos flanqueantes 3' UTR, 5' UTR del gen Pa_2_5730 y el gen marcador *NAT1*; mientras que para *YOP2* se obtuvieron los extremos flanqueantes 3' UTR, 5' UTR del gen Pa_3260 y el gen marcador *HPH*. Usando como templado los tres fragmentos correspondientes, se logró obtener los casetes de delección para *YOP1* y *YOP2* de *P. anserina* (fig. 18 y 19, respectivamente). Además, se clonó el casete de delección de *YOP1* en el vector de 3 kb pGEM-T® Easy, resultando en un vector de 5.8 kb digerido en un patrón esperado con *EcoRI* que confirma la presencia del casete de delección (fig. 20).

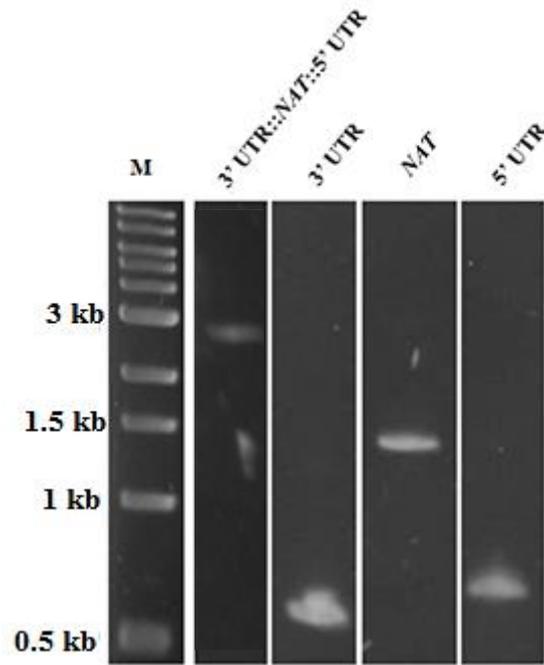


Figura 18. Construcción del casete de deleción de YOP1. Geles de electroforesis con los productos de PCR purificados de la fusión del casete de deleción de *YOP1* (2,793 pb), el extremo 3' UTR (589 pb), el gen *NAT1* (1,466 pb) y el extremo 5' UTR (738 pb). Las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos del anexo 10.1.1.

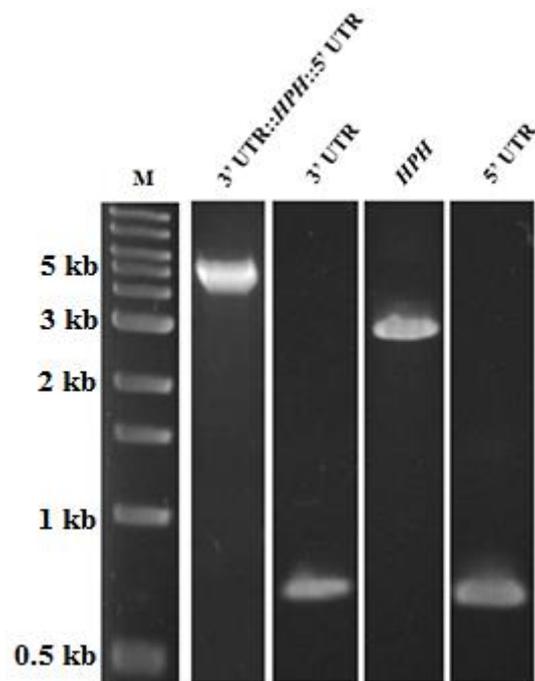


Figura 19. Construcción del casete de deleción de YOP2. Geles de electroforesis con los productos de PCR purificados de la fusión del casete de deleción de *YOP2* (4,177 pb), el extremo 3' UTR (666 pb), el gen *HPH* (2,822 pb) y el extremo 5' UTR (689 pb). Las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos del anexo 10.1.1.

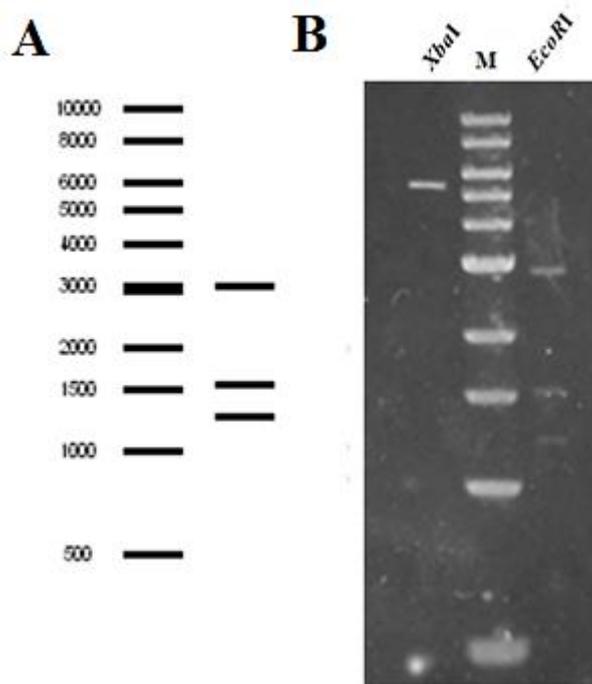


Figura 20. Digestiones de pGEM-T® Easy + casete de delección de *YOP1*.

A. Predicción de la digestión de pGEM-T® Easy + casete de delección de *YOP1* con *EcoRI* con el marcador 1 kb Ladder de New England BioLabs®. **B.** Gel de electroforesis con el plásmido linearizado con *XbaI* (5.8 kb) y de los fragmentos de la digestión (3, 1.5 y 1.3 kb) con *EcoRI* que confirman la presencia del casete de delección dada su similitud con la predicción.

7.2.2. Obtención de las cepas transformantes primarias *Δyop1* y *Δyop2*.

Tras transformar una cepa *Δku70* de *P. anserina* se obtuvieron cuatro transformantes primarias (TP) *Δyop1* y once *Δyop2*, de las cuales se eligieron tres para su verificación por PCR. Todas las cepas verificadas resultaron positivas para la presencia del casete de delección en el *locus* correcto, aunque algunas de ellas resultaron portadoras también de núcleos silvestres (fig. 21).

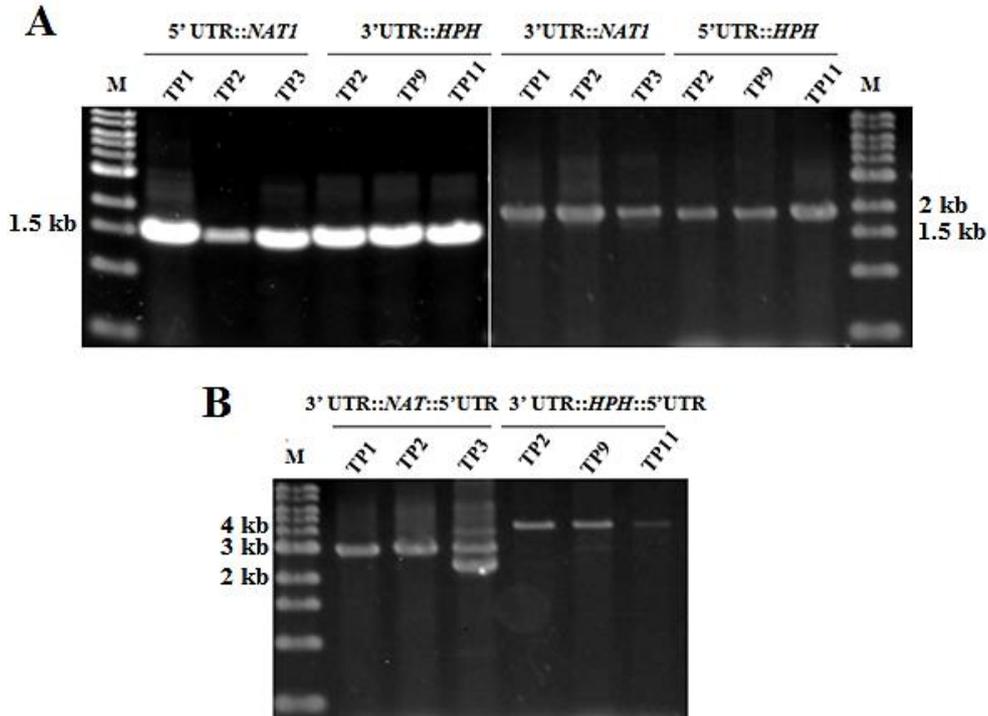


Figura 21. Verificación por PCR de las transformantes primarias (TP) $\Delta ku70\Delta yop1$ y $\Delta ku70\Delta yop2$. **A.** Gel de electroforesis de los productos de PCR que muestran que los genes *NAT1* (izquierda) y *hph* (derecha) están flanqueados por los extremos 5' (5'UTR) y 3' (3'UTR) de los loci *YOP1* y *YOP2*, respectivamente. **B.** Amplificación por PCR de los loci *YOP1* y *YOP2* en los que la fase codificante de cada gen fue reemplazada por los marcadores selectivos respectivos. La cepa TP3 presenta un fragmento de menor tamaño que corresponde al locus *YOP1* silvestre e indica la presencia de núcleos silvestres en la misma cepa. Las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos del anexo 10.1.1.

7.2.3. Obtención de cepas purificadas $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$, y de dobles y triples mutantes de delección.

Se obtuvieron cuatro cepas $\Delta yop1$ y cinco cepas $\Delta yop2$ purificadas a partir de cruces de cada transformante primaria verificada por la cepa silvestre designada con la clave "KN" seguida por un número (tabla 3). La verificación por PCR confirma la presencia del casete de delección y la ausencia del gen silvestre en las cepas $\Delta yop1$ KN17 y KN19 y en las cepas $\Delta yop2$ KN12, KN13 y KN15 (fig. 22 y 23, respectivamente). Posteriormente, se realizaron cruces heterocigas entre las cepas anteriores para generar la doble mutante $\Delta yop1\Delta yop2$ y con la cepa $\Delta rtn1$ (elaborada por Antonio de Jesús López Fuentes y disponible en el laboratorio),

para la obtención de dobles y triples mutantes $\Delta yop1\Delta rtn1$, $\Delta yop2\Delta rtn1$ y $\Delta yop1\Delta yop2\Delta rtn1$ que también recibieron un nombre clave (tabla 3).

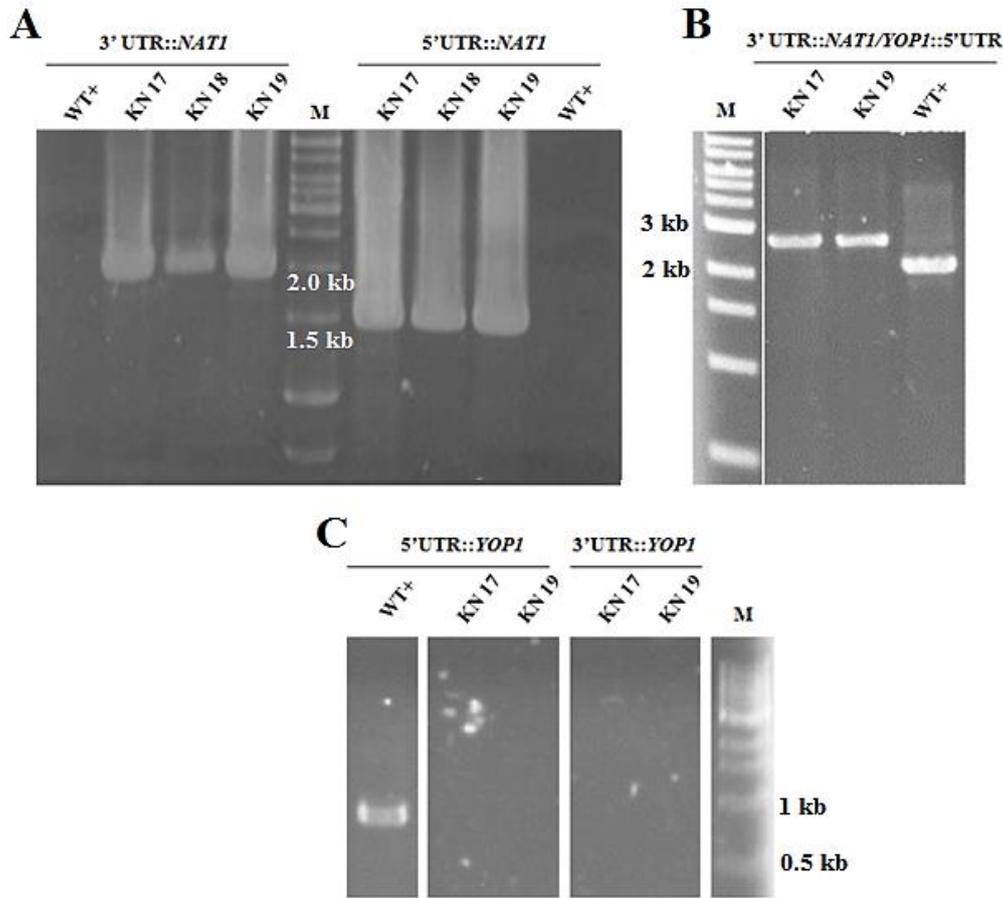


Figura 22. Verificación por PCR de las cepas purificadas $\Delta yop1$. **A.** Amplificaciones por PCR del gen *NATI* flanqueado por el extremo 3' (3'UTR, 1,928 pb, izquierda) y 5' (5'UTR, 1,385 pb, derecha) del locus *YOP1*. La especificidad de las reacciones de PCR se corroboró mediante ADN de una cepa silvestre (WT+), en que el gen marcador *NATI* está ausente. **B.** Amplificación por PCR del locus *YOP1* de las cepas silvestres y $\Delta yop1$. Nótese que el reemplazo de la fase codificante del gen *YOP1* por el marcador *NATI* genera un aumento en el tamaño del locus de 2,144 pb (locus silvestre) a 2,836 pb. **C.** Amplificación del un fragmento del extremo 5' del gen *YOP1* en la cepa silvestre (893 pb) y la ausencia de éste junto con el extremo 3' en las cepas purificadas $\Delta yop1$. Las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos del anexo 10.1.1.

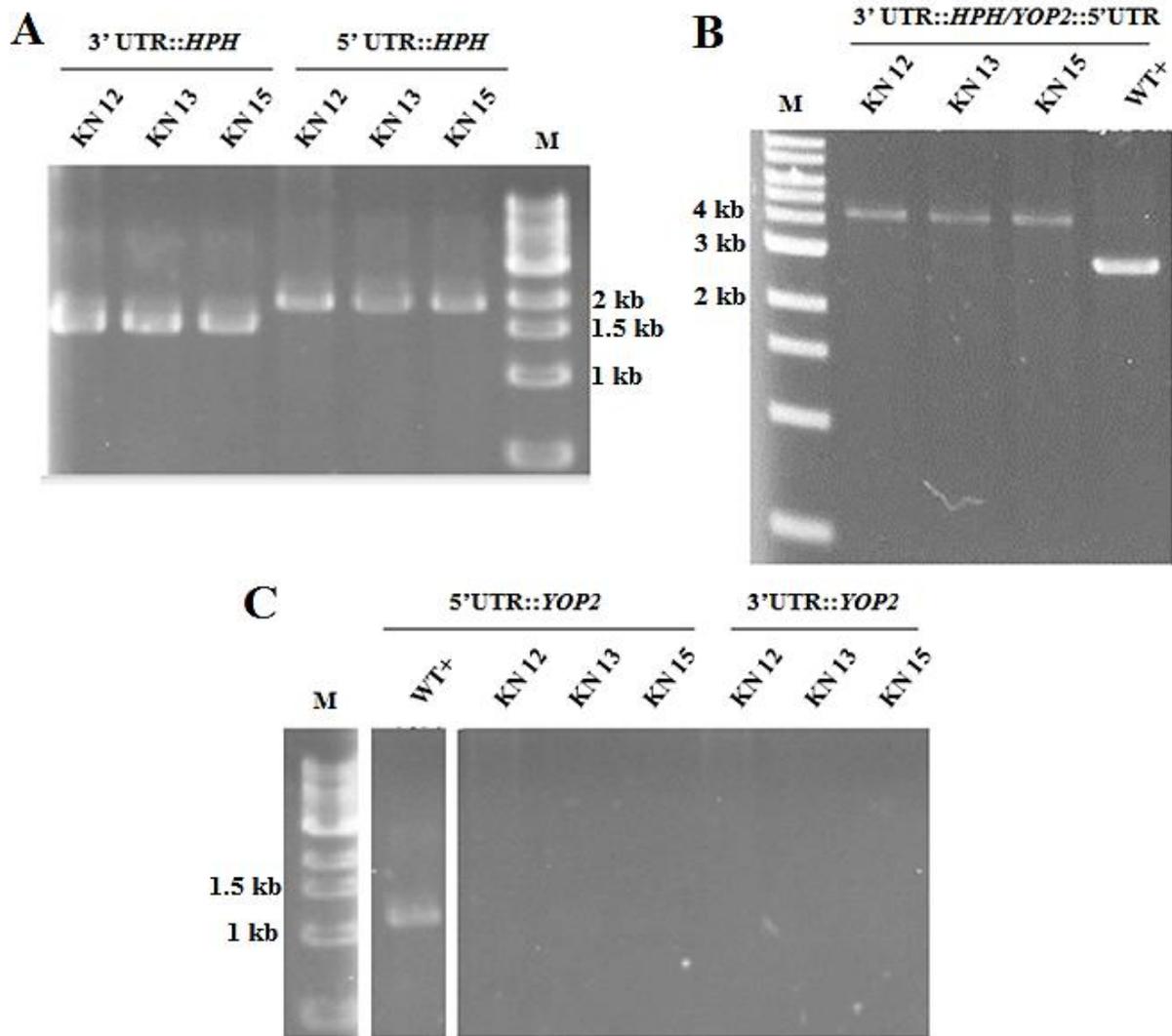


Figura 23. Verificación por PCR de las cepas purificadas $\Delta yop2$. **A.** Amplificaciones por PCR del gen *hph* flanqueado por el extremo 3' (3'UTR, 1,471 pb, izquierda) y 5' (5'UTR, 1,719 pb, derecha) del locus *YOP2*. **B.** Amplificación por PCR del locus *YOP2* de las cepas silvestres y $\Delta yop2$. Nótese que el reemplazo de la fase codificante del gen *YOP2* por el marcador *hph* genera un aumento en el tamaño del locus de 2,684 pb (locus silvestre) a 4,217 pb. **C.** Amplificación de un fragmento del extremo 5' del gen *YOP1* en la cepa silvestre (1,189 pb) y la ausencia de éste junto con el extremo 3' en las cepas purificadas $\Delta yop2$. Las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos del anexo 10.1.1.

Tabla 3. Cepas purificadas con mutaciones $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$. Nombres clave, genotipos, crucea (♀=ascogonios; ♂=espermacios) desde la cual se purificó y tipo sexual.

Nombre clave	Genotipo	Cruza (♀x♂)	MAT
KN11	<i>Δyop2::HPH</i>	TP11 x WT(+)	-
KN12	<i>Δyop2::HPH</i>	TP11 x WT(+)	+
KN13	<i>Δyop2::HPH</i>	TP14 x WT(+)	+
KN14	<i>Δyop2::HPH</i>	TP14 x WT(+)	-
KN15	<i>Δyop2::HPH</i>	TP12 x WT(+)	-
KN17	<i>Δyop1::NAT1</i>	TP3 x WT(+)	+
KN18	<i>Δyop1::NAT1</i>	TP2 x WT(+)	-
KN19	<i>Δyop1::NAT1</i>	TP2 x WT(+)	+
KN20	<i>Δyop1::NAT1</i>	TP2 x WT(+)	+
KN21	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN14 x KN17	+
KN22	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN17 x KN14	+
KN23	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN17 x KN14	-
KN24	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN17 x KN14	+
KN25	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN19 x KN15	-
KN26/2	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN19 x KN15	+
KN27	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH</i>	KN22 x KN25	-
KN28	<i>Δyop2::HPH; Δrtn1::HPH</i>	KN13 x <i>Δrtn1</i>	-
KN29	<i>Δyop2::HPH; Δrtn1::HPH</i>	KN13 x <i>Δrtn1</i>	+
KN30/2	<i>Δyop1::NAT1; Δrtn1::HPH</i>	KN19 x <i>Δrtn1</i>	-
KN31/2	<i>Δyop1::NAT1; Δrtn1::HPH</i>	KN17 x <i>Δrtn1</i>	+
KN35/2	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH; Δrtn1::HPH</i>	KN25 x <i>Δrtn1</i>	-
KN36/2	<i>Δyop1::NAT1; Δyop2::HPH; Δrtn1::HPH</i>	KN25 x <i>Δrtn1</i>	+

7.3. Caracterización de cepas *Δyop1* y *Δyop2* durante el desarrollo somático de *P. anserina*.

7.3.1. El crecimiento de *P. anserina* en distintas fuentes de carbono no se altera en ausencia de YOP1, YOP2 y RTN1.

La dextrina fue utilizada como fuente de carbono para medir el crecimiento estándar de *P. anserina*. Se ha reportado que en este medio *P. anserina* crece de manera continua 7 mm cada 24 horas y lleva a cabo la formación de ambas estructuras reproductoras (Silar, 2013). Dada la relación del RE con la vía secretoria de la célula, y su interacción y participación en la formación de los peroxisomas, el uso de otras fuentes de carbono como celulosa o ácido oléico podrían indicar efectos de las mutaciones en la secreción y funcionamiento peroxisomas respectivamente. Sin embargo, las cepas mutantes carentes de YOP1, YOP2, además de las dobles y triples mutantes de ambos tipos sexuales, no mostraron un defecto en la tasa de crecimiento en las distintas fuentes de carbono (fig. 24). Cada día, las cepas *MAT+* crecieron en promedio $0.6 \text{ cm} \pm 0.01$ (n=36) en dextrina, $0.6 \text{ cm} \pm 0.01$ (n=36) en ácido oléico y $0.72 \text{ cm} \pm 0.008$ (n=36) en celulosa, mientras que las cepas *MAT-* crecieron $0.65 \text{ cm} \pm 0.2$ en dextrina, 0.6 ± 0.06 en ácido oléico y $0.73 \text{ cm} \pm 0.02$ en celulosa, por lo que el sexo no tiene ningún efecto en su crecimiento. El patrón de crecimiento fue similar, todas las cepas de *P. anserina* formaron colonias de mayor tamaño en celulosa y de un mismo tamaño pero menor que el anterior en dextrina y ácido oleico. El patrón radial de crecimiento (fig. 25) permaneció similar a la silvestre en todas las cepas mutantes de *P. anserina*.

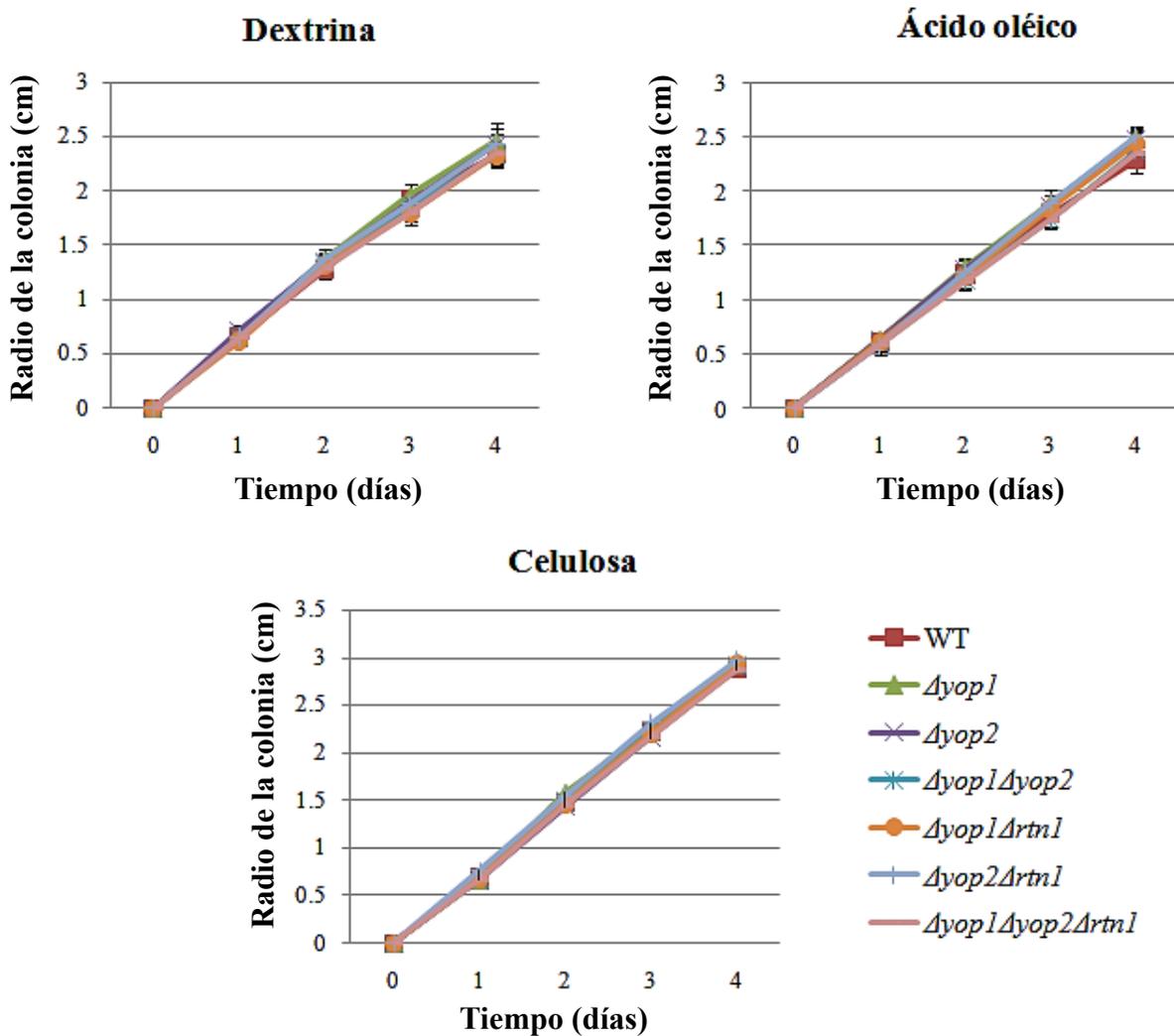


Figura 24. Tasa de crecimiento de *P. anserina* en distintas fuentes de carbono. Todas las cepas carentes de YOP1, YOP2 y RTN1 presentaron una tasa de crecimiento similar al de la cepa silvestre en dextrina, ácido oléico y celulosa como fuentes carbonó. En cuatro días, cada una de las cepas de *P. anserina* creció un promedio de 2.4 cm \pm 0.05 en dextrina, 2.4 cm \pm 0.08 en ácido oleico y 2.9 cm \pm 0.03 en celulosa; n=63.

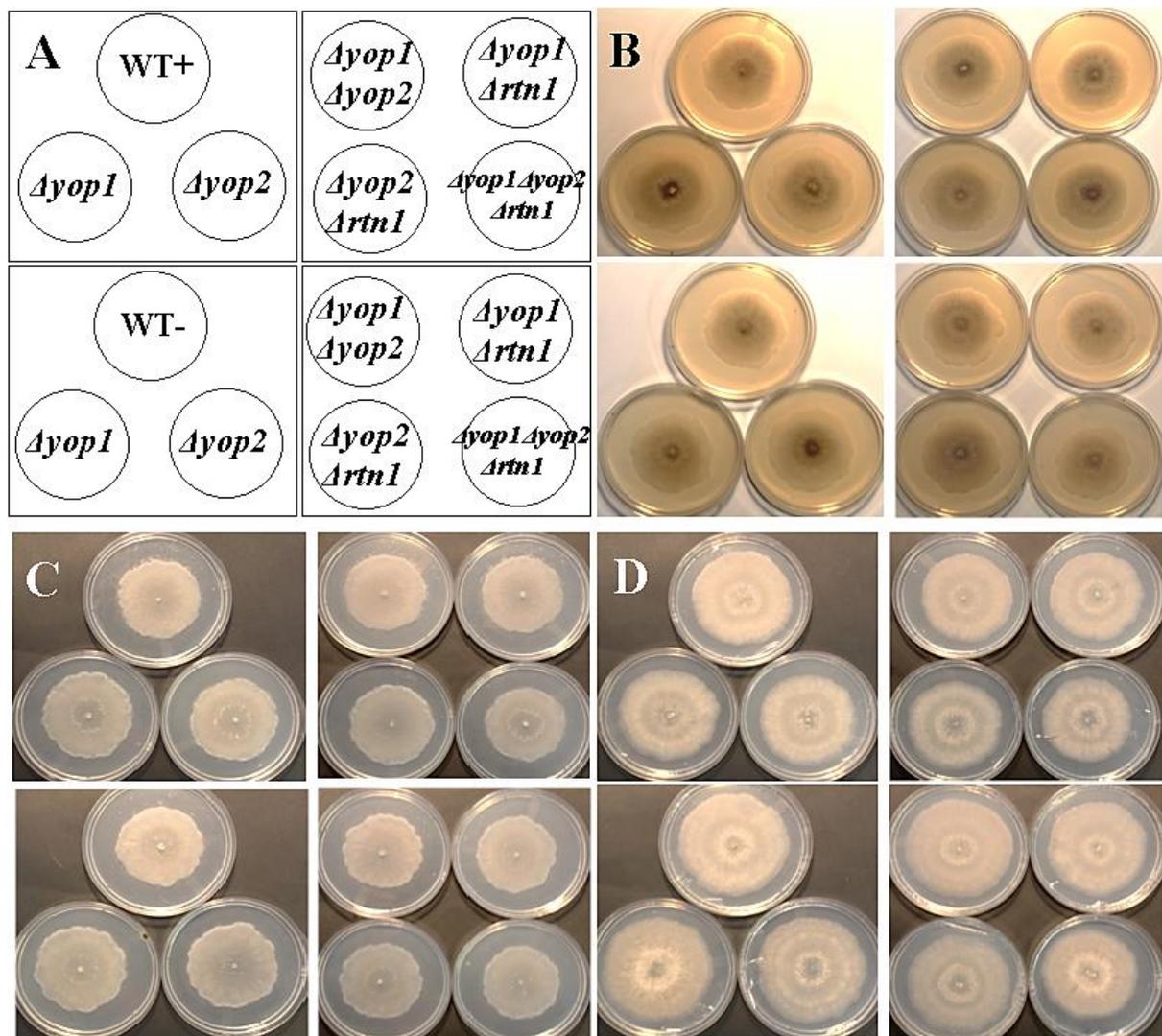


Figura 25. Patrón radial de crecimiento de *P. anserina* en distintas fuentes de carbono. El patrón radial de crecimiento de todas las cepas carentes de YOP1, YOP2 y RTN1(A) no difiere de una cepa silvestre en dextrina (B), ácido oléico (C) ni celulosa (D) como fuentes de carbono.

7.3.2. Defectos en la pigmentación del micelio somático en la mutante *Δyop2*.

Mientras que la mutante *Δyop1* pigmentó el micelio al igual que la silvestre (fig. 25 A), la mutante sencilla *Δyop2* y la doble mutante *Δyop2Δrtn1* mostraron defectos en la pigmentación (melanización) inducida por frío en colonias de dos días de crecimiento en oscuridad (fig. 25 B); sin embargo, este fenotipo se rescata al eliminar *YOP1* en ambas cepas (fig. 26 C y D). La introducción ectópica de un alelo silvestre del gen *YOP2* en la mutante

Δyop2 restablece la pigmentación en el micelio (fig. 27), lo que confirma que el fenotipo es causado por la ausencia de la proteína YOP2 en *P. anserina*.

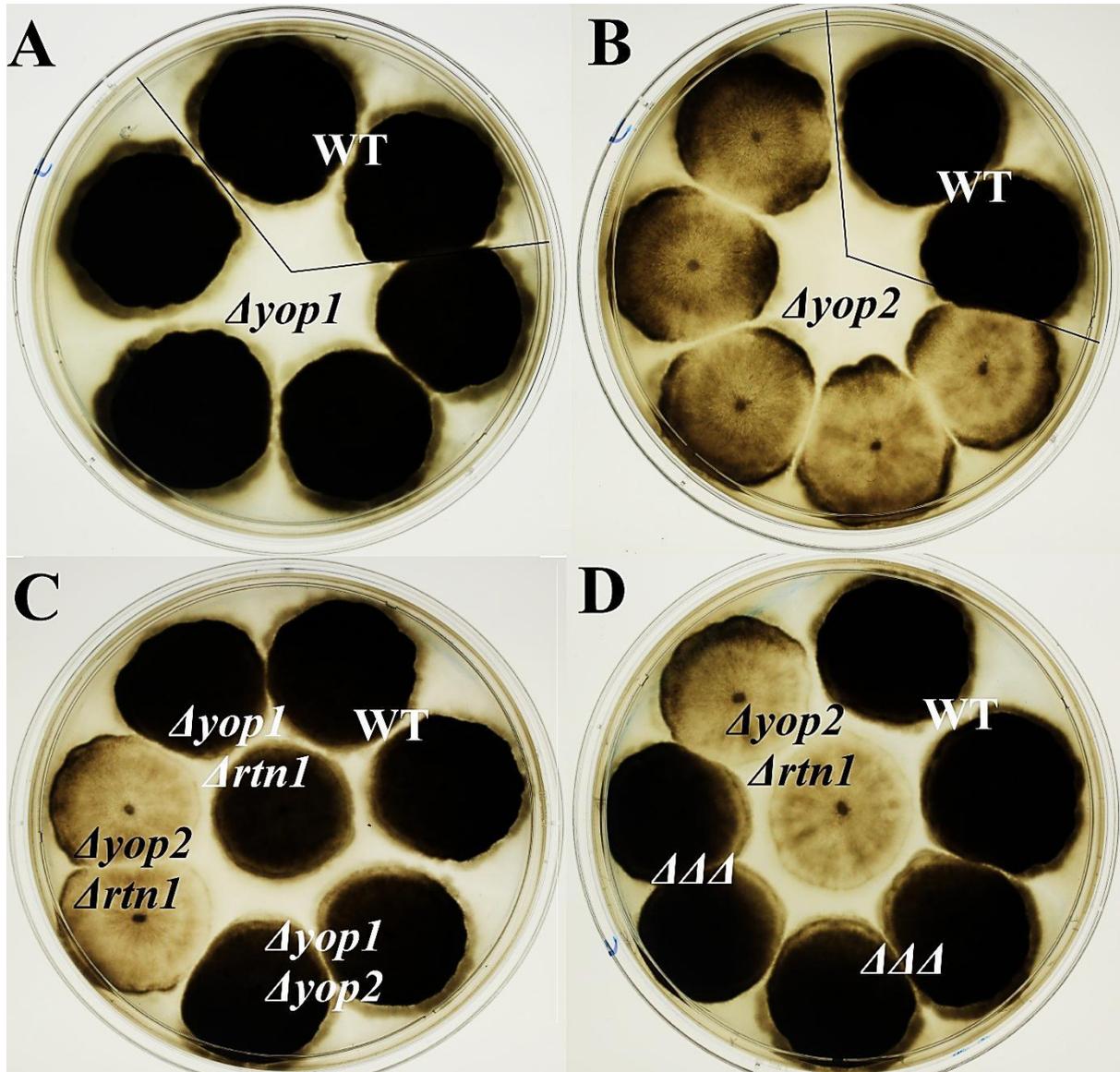


Figura 26. Defectos en la pigmentación del micelio en ausencia de YOP2.

Las cepas silvestres se pigmentan casi en su totalidad en respuesta al frío, dando un aspecto negro en el área interna y verde oscuro en el margen de la colonia. Las diferentes cepas mutantes de *Δyop1* se pigmentan al igual que la silvestre (A), mientras que las cepas mutantes *Δyop2* y *Δyop2Δrtn1* presentan sólo una pigmentación en el centro de la colonia (en el punto de inóculo) y una pigmentación tenue en el resto, excepto en las zonas cercanas al borde de la caja de Petri (nótese que la pigmentación tenue se mantiene en los bordes cercanos a otra colonia) (B, C y D). Por otro lado, la ausencia de YOP1 en las mutantes *Δyop2Δyop1* y *Δyop1Δyop2Δrtn1* ($\Delta\Delta\Delta$) rescata el defecto de pigmentación (C y D). El fenotipo de falta de pigmentación en la mutante *Δyop2* se observa claramente desde los 30 días de almacenamiento, aunque las fotografías fueron tomadas después de dos meses de almacenamiento a 4 °C.

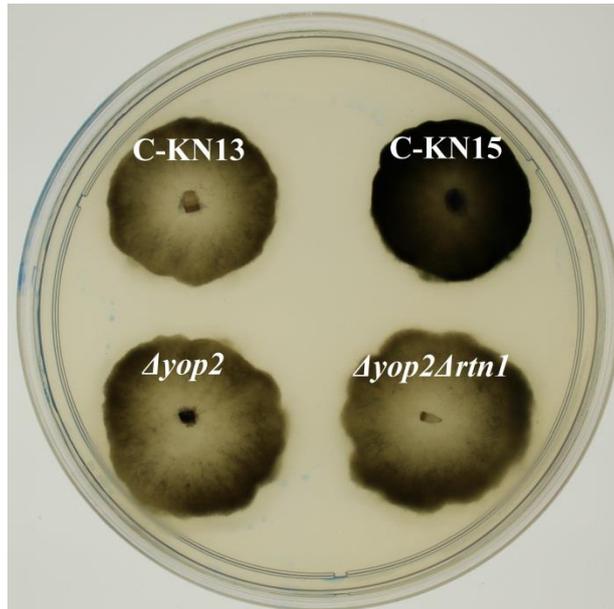


Figura 27. Complementación del fenotipo de la pigmentación en $\Delta yop2$. Por inserción ectópica de un alelo silvestre del gen *YOP2*, se complementaron las cepas KN13 y KN15, de las cuales sólo una muestra el rescate de la falta de pigmentación pigmentación presente en las cepas $\Delta yop2$ y $\Delta yop2\Delta rtn1$.

7.3.3. Mutantes de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina* sin alteraciones en su longevidad.

Los ensayos para determinar si el envejecimiento de *P. anserina* es afectado por la ausencia de las proteínas estructurales del RE no mostraron alteraciones en la longevidad o en la senescencia de las cepas mutantes respecto a la silvestre (fig. 28). La tasa de crecimiento de todas las cepas se mantuvo similar hasta el comienzo de la senescencia, donde se observó una disminución del crecimiento de todas las cepas. Esta disminución fue más notoria para la cepa doble mutante $\Delta yop1\Delta rtn1$, sin embargo, ésta no fue significativa. Asimismo, una de las cepas $\Delta yop2 \Delta yop2-13$ complementadas con el alelo silvestre *YOP2+* ($\Delta yop2-13$) mostró una disminución de su crecimiento en esta etapa, mas la cepa $\Delta yop2$ no mostró alteración. A pesar de esta variación, el crecimiento de todas las cepas continuó hasta los 20 días y para el día 23 el borde de la colonia de todas ellas perdió su capacidad de crecimiento.

La relación entre el día de muerte y la distancia de crecimiento (cm) fue ligeramente diferente para cada cepa (fig.29). Las cepas con menor crecimiento final fueron la cepa mutante $\Delta yop1\Delta rtn1$ (9.3 cm \pm 0.7) y la cepa complementada $\Delta yop2-13$ (10.56 cm \pm 1.9) las cuales

murieron a los 20.5 ± 0.5 y 22 ± 0.82 días, respectivamente. El crecimiento final del resto de las cepas osciló entre los $11.6 \text{ cm} \pm 1.5$ y $13.6 \text{ cm} \pm 0.94$, y el día de muerte entre 19 ± 2.2 y 23.3 ± 0.43 . El tiempo (días) y la distancia (cm) transcurridos desde que las cepas fueron inoculadas hasta su muerte, no presentaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de las cepas silvestres y mutantes. Dichos rangos representan un envejecimiento típico en *P. anserina*, que crece aproximadamente 11 cm en menos de un mes, por lo que las mutaciones de la familia de los reticulones y/o Yop1/DPI no afectan el envejecimiento o la senescencia de este hongo en estas condiciones experimentales.

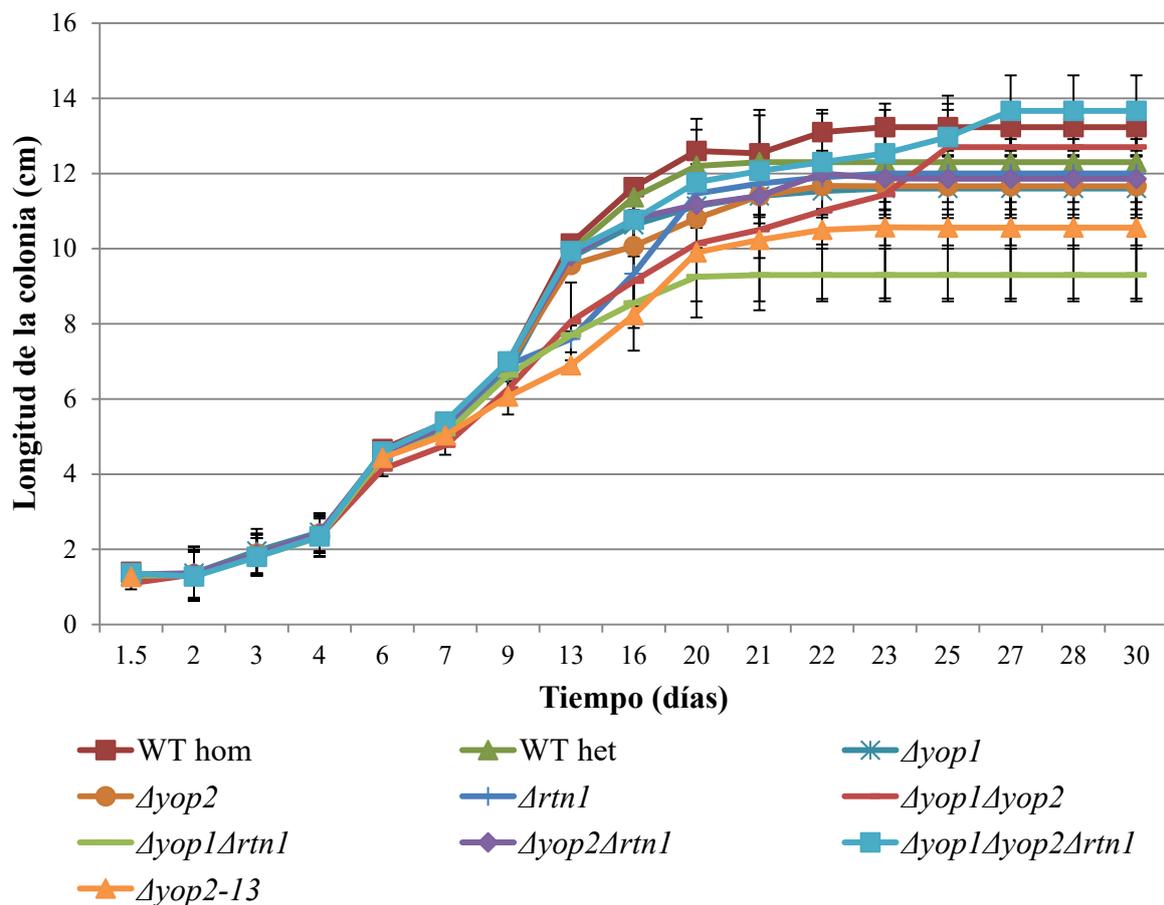


Figura 28. Gráfica del crecimiento y el envejecimiento de las mutantes del reticulón y las proteínas Yop1/DPI de *P. anserina*. Los cultivos de cada uno de los fenotipos indicados fueron obtenidos de ascosporas homocarióticas y su tasa de crecimiento determinada en medio M2. El punto en que el borde de las colonias pierde capacidad de crecer fue determinado y representó el día de muerte. No se observaron diferencias significativas en el día de muerte o el crecimiento de las mutantes respecto a la cepa silvestre. Los controles correspondieron a cepas silvestres obtenidas de una cruce homociga silvestre x silvestre (WT hom) y de una cruce heterociga silvestre x $\Delta yop1$ (WT het). Para cada una de las cepas, los experimentos independientes fueron n=3.

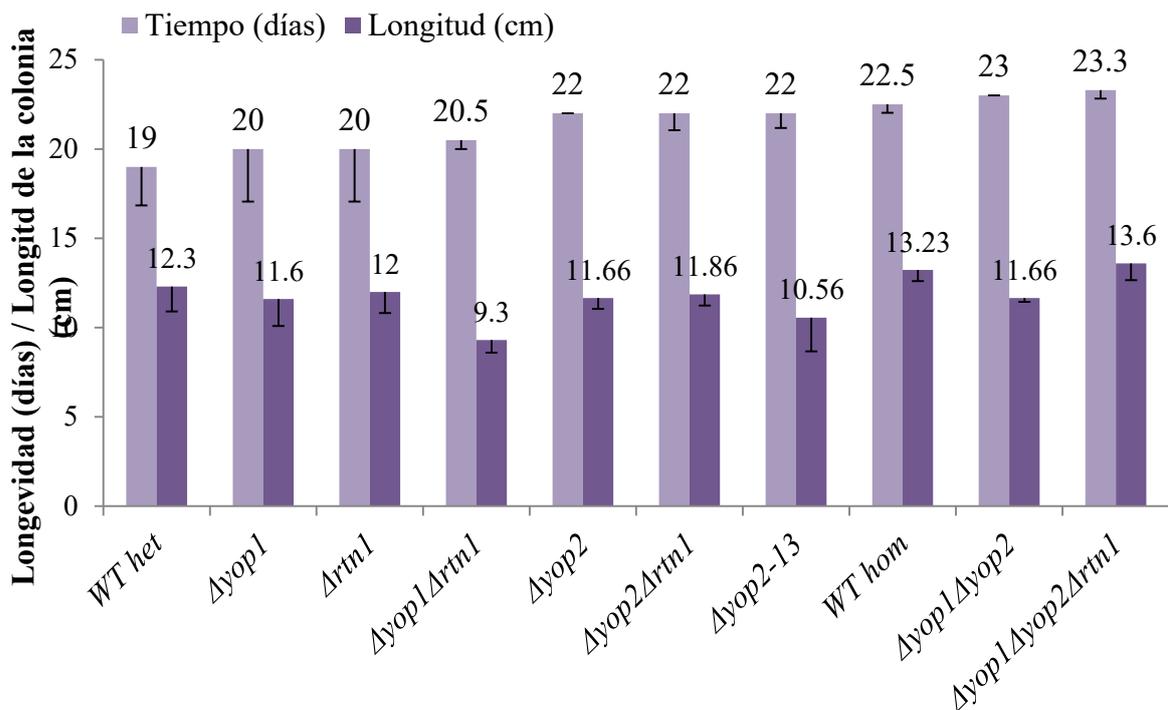


Figura 29. Relación entre el día de muerte y el crecimiento de cepas mutantes en el reticulón y las proteínas Yop1/DPI de *P. anserina*. En promedio, las cepas vivieron 21.5 días \pm 2.64 y crecieron 11.37 cm \pm 1.7.

7.4. Caracterización de cepas $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ durante el desarrollo sexual de *P. anserina*.

7.4.1. Disminución en la abundancia del micelio aéreo en la mutante $\Delta yop2$.

Pasados tres días de crecimiento con exposición continua a la luz, *P. anserina* desarrolla un micelio aéreo con geotropismo negativo, en donde se forman las estructuras reproductoras (ascogonios y espermacios). En una cepa silvestre el micelio aéreo se distribuye de manera abundante, en forma de un anillo ancho en la periferia de la parte superior una colonia color verde olivo (fig. 30). En todas las mutantes carentes de YOP1, YOP2 y RTN1 la abundancia del micelio aéreo se vio disminuida cualitativamente, aunque en la mutante sencilla $\Delta yop2$ y en la doble mutante $\Delta yop2\Delta rtn1$ la disminución fue más drástica (fig. 30 B y C). La adición

ectópica del gen codificante para YOP2 rescató este fenotipo y el hongo recuperó la densidad de micelio aéreo al nivel que una cepa silvestre (fig. 31), lo que confirma que el fenotipo afectado es causante de la mutación del gen *YOP2*. Por otro lado, también observamos que el fenotipo de la mutante *Δyop1* fue epistático al de *Δyop2* y *Δyop2Δrtn1* en las mutantes *Δyop1Δyop2* y *Δyop1Δyop2Δrtn1* (fig. 30 B y D). Asimismo observamos una pigmentación normal de la colonia de la mutante *Δyop2* lo que puede deberse a la exposición continua a la luz.

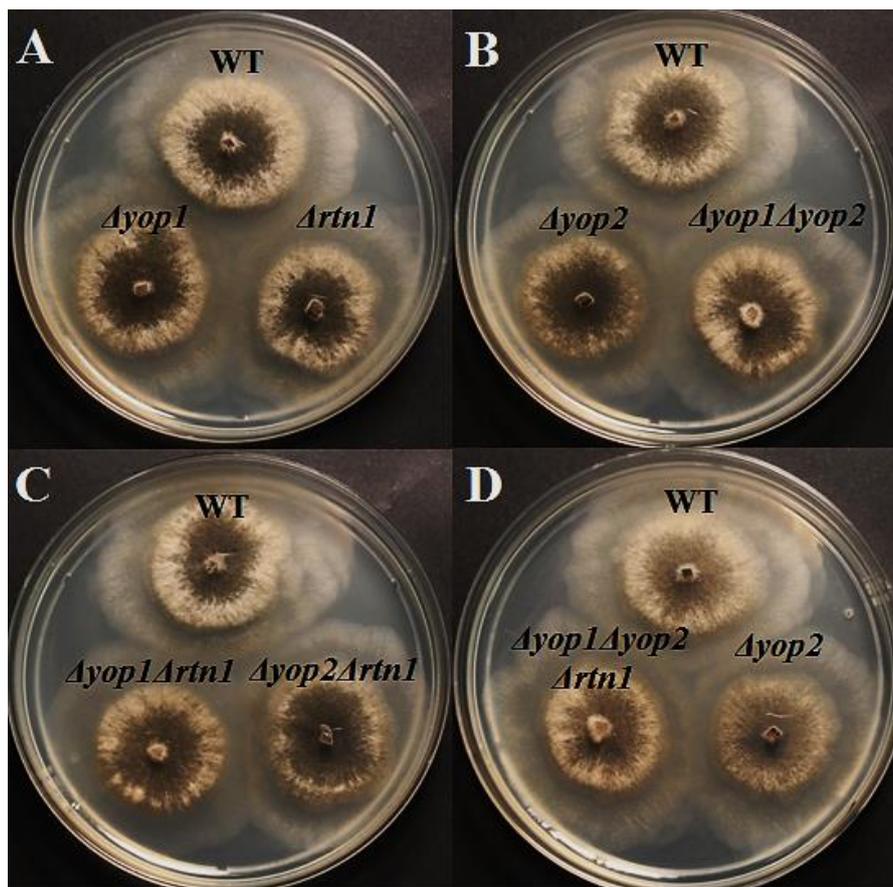


Figura 30. Formación de micelio aéreo en las colonias de mutantes de las familias de los reticulones y Yop1/DP1. Las cepas *Δyop1* y *Δrtn1* presentan una densidad de micelio aéreo muy similar al silvestre (A), mientras que las mutantes *Δyop2* y *Δyop2Δrtn1* presentan una disminución drástica de este micelio (B y C). El fenotipo de la cepa *Δyop1* fue epistático al de *Δyop2* y *Δyop2 Δrtn1*, produciéndose en las cepas *Δyop1Δyop2* y *Δyop1Δyop2Δrtn1* una densidad de micelio aéreo semejante al de la cepa *Δyop1* (B y D).

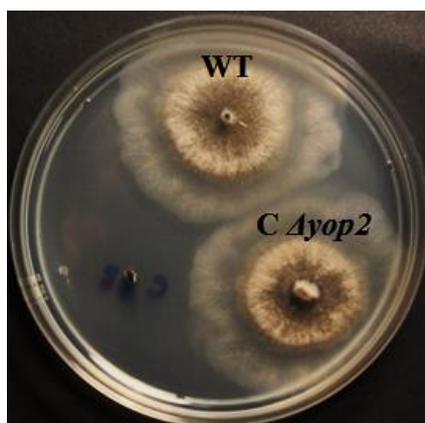


Figura 31. Complementación del fenotipo de formación de micelio aéreo de la mutante. La complementación de la cepa *Δyop2* con la adición de un alelo silvestre del gen *YOP2* ectópicamente restablece la abundancia del micelio aéreo al nivel del de una cepa silvestre.

7.4.2. Morfología anormal de los núcleos en el micelio aéreo de la mutante *Δyop2* y la formación de ascogonios y espermacios.

En un experimento preliminar, el micelio aéreo de las cepas silvestre, *Δyop1* y *Δyop1Δyop2* presentaron núcleos esféricos y otros un tanto alargados, mientras que la mutante *Δyop2* aunque también presentó gran número de este tipo de núcleos, además se observaron núcleos más alargados que los de la cepa silvestre, los cuales son más notables cerca del ápice de las hifas (fig. 32).

En otro experimento preliminar, la formación de los ascogonios y los espermacios no se encontró afectada en ninguna de las mutantes de la familia *Yop1/DP1* (fig. 33). Sin embargo, dado que la mutante *Δyop2* no produce la misma cantidad de micelio aéreo que la silvestre, ésta presentó ascogonios al parecer de un tamaño menor que la silvestre, por lo que su formación podría estar retrasada en relación con la formación del micelio aéreo. Por su parte, la formación y tamaño de los espermacios permaneció totalmente normal en estas cepas.

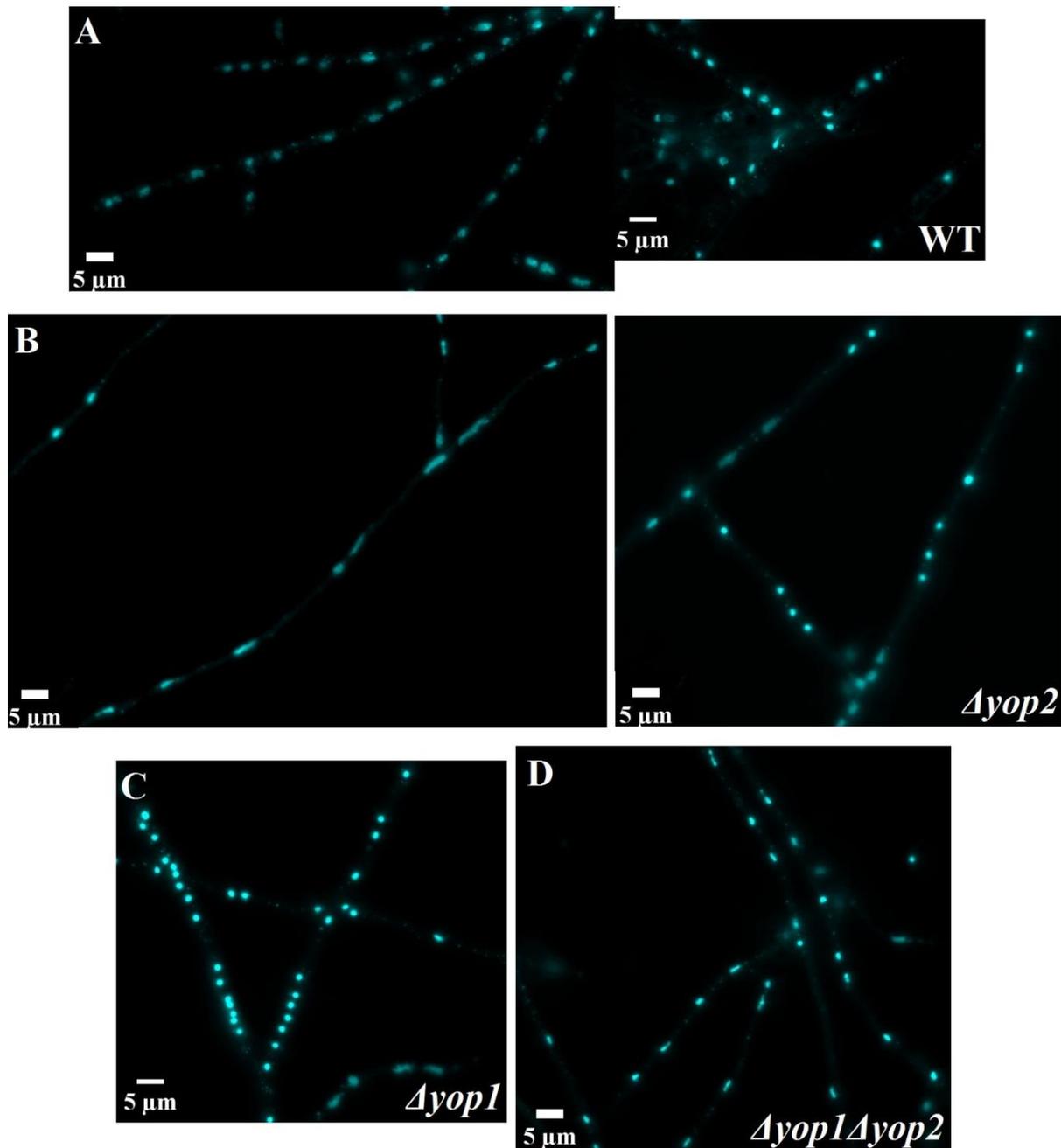


Figura 32. Núcleos alargados en el micelio aéreo de $\Delta yop2$. A. El micelio aéreo de la cepa silvestre de *P. anserina* presenta núcleos esféricos (derecha) y en algunas regiones núcleos alargados (izquierda). B. La morfología nuclear en la mutante $\Delta yop2$ es semejante a la de la silvestre (derecha), exceptuando regiones cerca del ápice de la hifa, donde se encuentran núcleos más alargados (izquierda). Este fenotipo no se observó en las cepas $\Delta yop1$ (C), ni en la cepa $\Delta yop1\Delta yop2$ (D).

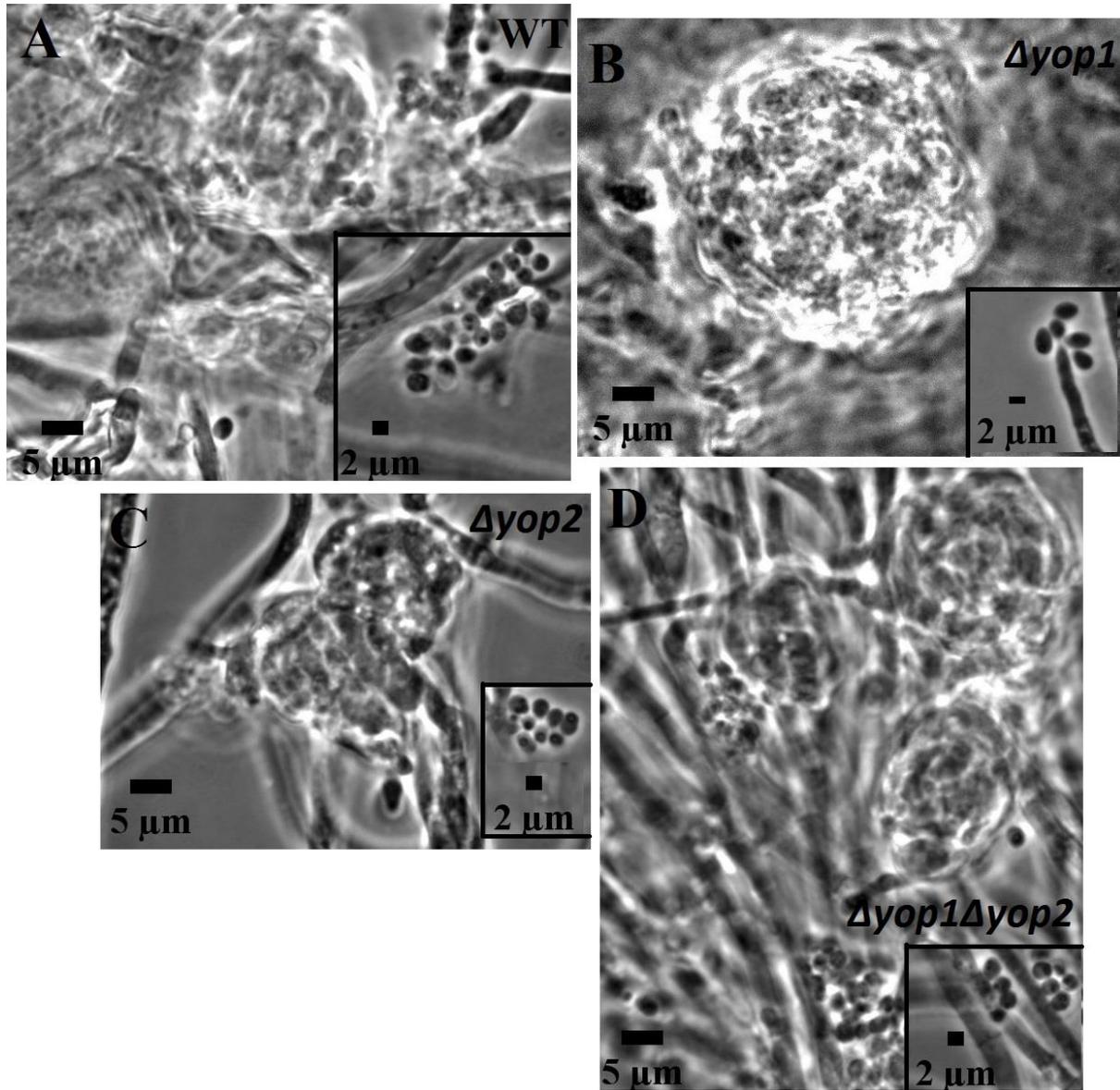


Figura 33. La formación de los ascogonios en la mutante carente de YOP2.
 Los espermacios de todas las cepas son formados con normalidad, mientras que la formación de ascogonios se ve afectada en cuanto a su tamaño en la mutante $\Delta yop2$ (C), en comparación con la cepa silvestre (A) y la cepa $\Delta yop1$ (B). La mutante $\Delta yop1\Delta yop2$ presentó también una disminución en el tamaño de los ascogonios (D).

7.4.3. Formación de ascosporas curvadas en ausencia de YOP2.

La forma oval de las ascosporas silvestres se mantiene en la mutante *Δyop1*, pero se ve alterada en las cepas carentes de YOP2, dando como resultado que cierto porcentaje de ascas contengan esporas curvadas. Este mismo defecto se observó en la doble mutante *Δyop1Δyop2* (fig. 34 A, B y D). Por otra parte, el fenotipo de formación de ascosporas de *Δyop2* fue recesivo, ya que no se observó en cruza heterocigas WT x *Δyop2* (fig. 34 C). En el laboratorio se ha estudiado a la par de estas mutantes el fenotipo de la mutante sencilla del reticulón de *P. anserina* RTN1, la cual presenta ascas con un número y tamaño de esporas anormal, provocado por una distribución de núcleos errada (López-Fuentes A., *et al*, resultados sin publicar). Mientras que la doble mutante de *Δyop1Δyop2* presenta únicamente el fenotipo de la mutante sencilla *Δyop2* (fig. 35 A), las mutantes *Δyop2Δrtn1* y *Δyop1Δyop2Δrtn1* presentan ambos fenotipos de las mutantes sencillas de *Δrtn1* y de *Δyop2*, resultando en ascas con esporas desiguales en número, tamaño y con morfología curvada (fig. 35 B y C),

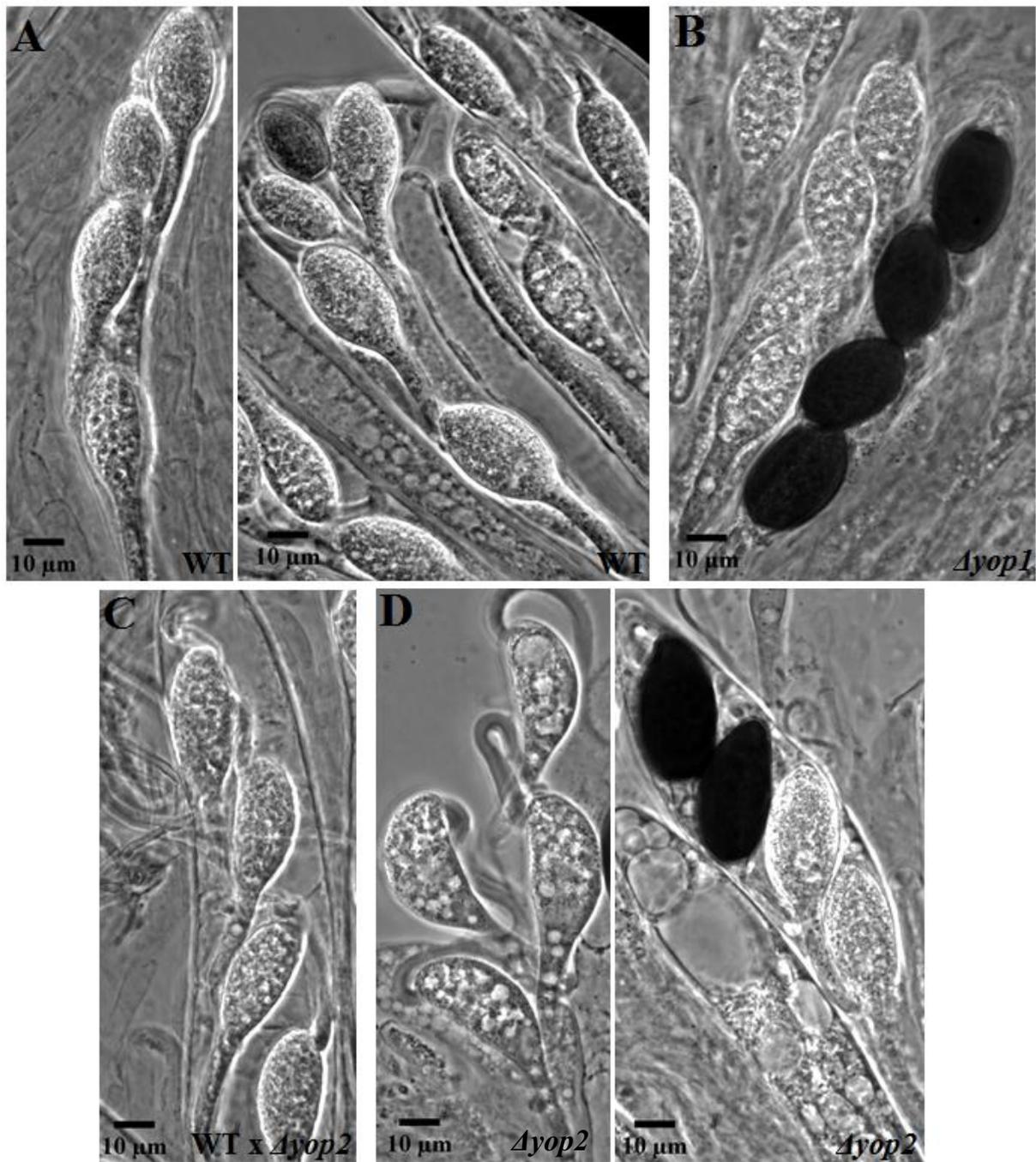


Figura 34. Ascas de las mutantes $\Delta yop1$ y $\Delta yop2$ de *P. anserina*. **A.** Ascas silvestres inmaduras con cuatro y cinco ascosporas ovales. **B.** Cruza homociga de $\Delta yop1$ con ascosporas normales en ascas maduras e inmaduras. **C.** Cruza heterociga de $\Delta yop2$ sin defectos en la forma de las ascosporas. **D.** Esporas inmaduras (cinco días después de la fertilización) (izquierda) y maduras (seis días después de la fertilización) (derecha), con forma curvada en una cruza homociga de $\Delta yop2$.

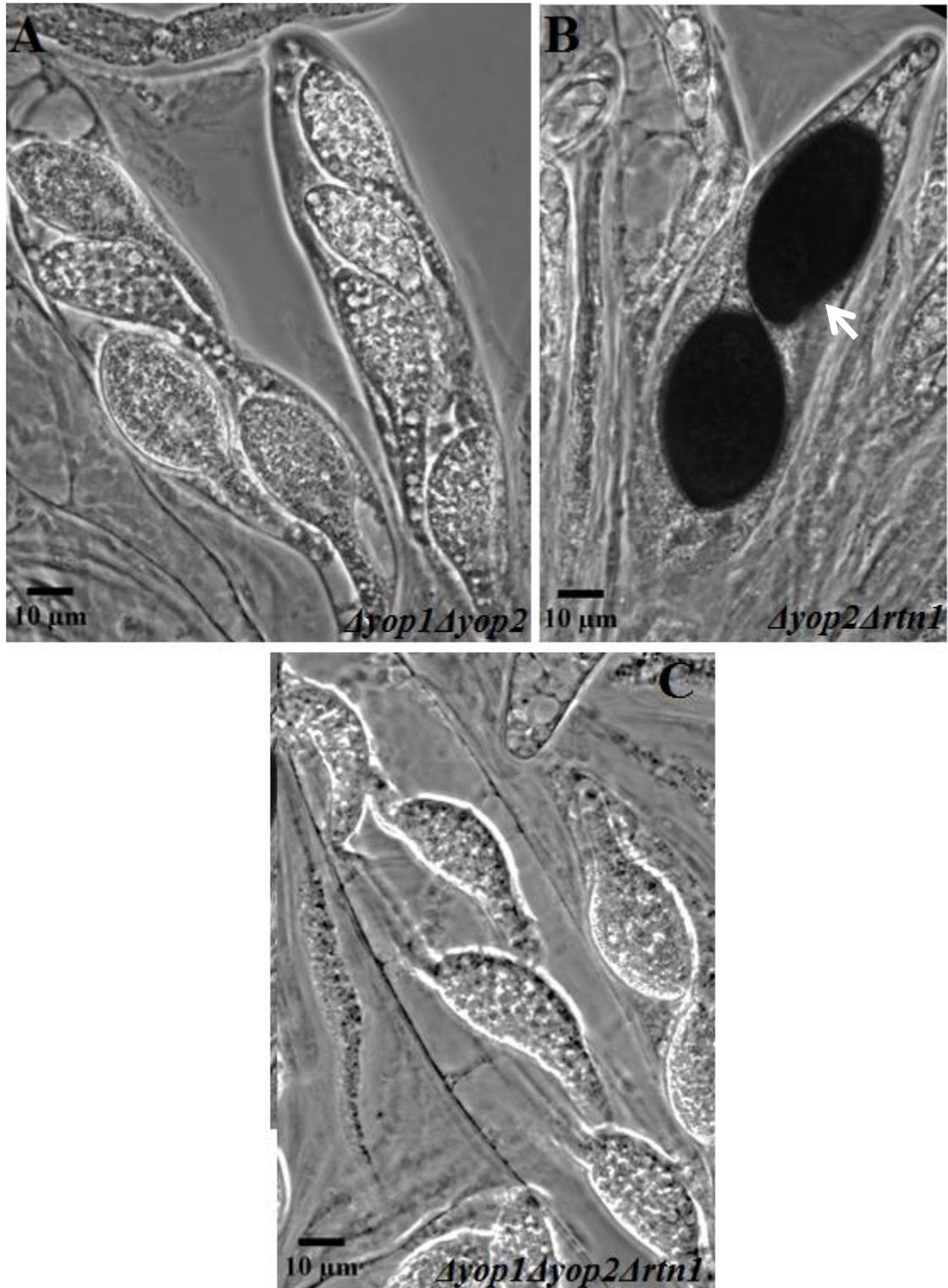


Figura 35. Ascas de mutantes múltiples carentes de diferentes proteínas de las familias de los reticulones y Yop1/DP1 en *P. anserina*. **A.** Mutante $\Delta yop1\Delta yop2$ con ascosporas curvadas. **B.** Asca de la mutante $\Delta yop2\Delta rtn1$ con un número y tamaño anormal de ascosporas. Este defecto es igual al observado en la mutante sencilla $\Delta rtn1$ y con esporas curvadas (flecha) debido a la mutación $\Delta yop2$. **C.** Mutante $\Delta yop1\Delta yop2\Delta rtn1$ con el mismo fenotipo que la doble mutante $\Delta yop2\Delta rtn1$.

A los cinco días después de la fertilización, cruza homocigas de *Δyop2* contienen 19.5% ±1.4 de ascas (n= 433) con al menos una espora de forma curvada, mientras que en una cruza silvestre no se forman esporas curvadas, y en una cruza heterociga WT x *Δyop2* sólo 2.6% ±2.9 de ascas son curvadas (n= 447). El porcentaje de ascas con esporas curvadas aumentó significativamente (*p-value* < 0.01) en la doble mutante *Δyop1Δyop2*, con 28.7% ±2.9 (n= 256). Por otro lado, se cuantificó también el porcentaje de ascas con esporas curvadas en cruza heterocigas *Δyop2* por *Δyop2YOP2+*. Las cepas *Δyop2YOP2+* utilizadas se obtuvieron de los ensayos de complementación genética de dos cepas *Δyop2*, las cuales fueron transformadas con un vector poseedor del alelo silvestre *YOP2+* (C-KN13 y C-KN15) (fig. 36). El porcentaje de ascas curvadas, producto de la cruza de *Δyop2* por C-KN15, fue significativamente menor (10.1% ±3.3, n= 157, *p-value* < 0.01) que el producido por las cruza homocigas de *Δyop2*, a diferencia del porcentaje que presentó la cruza *Δyop2* por C-KN13, el cual se acercó al valor obtenido por la cruza homociga de *Δyop2* con un 21.2% ±5.3 de ascas curvadas (n= 172). Al igual que otros fenotipos (fig. 26), la complementación genética de *YOP2* sólo se observa en la transformante C-K15, lo que sugiere que en la transformante c-KN13 el gen de *YOP2* no se integró o no se expresa correctamente. A pesar de que la disminución de ascas curvadas que presenta C-KN15 no representa una restauración total del fenotipo silvestre, ya sea debido a su condición dicariótica (con una mezcla de núcleos complementados y mutantes) o debido al nivel de expresión dado por la inserción del gen silvestre al genoma de la mutante, esta cepa contribuye a la confirmación de que el fenotipo es causado por la ausencia de *YOP2* ya que la disminución de ascas curvadas es estadísticamente significativa así como también lo es el pequeño porcentaje de una cruza heterociga. Por otro lado, cabe la posibilidad de que la cuantificación de las ascas con esporas curvadas se esté subestimando debido a la posición que adoptan las esporas sobre la preparación, donde el ángulo con el defecto podría estar invisible para el observador.

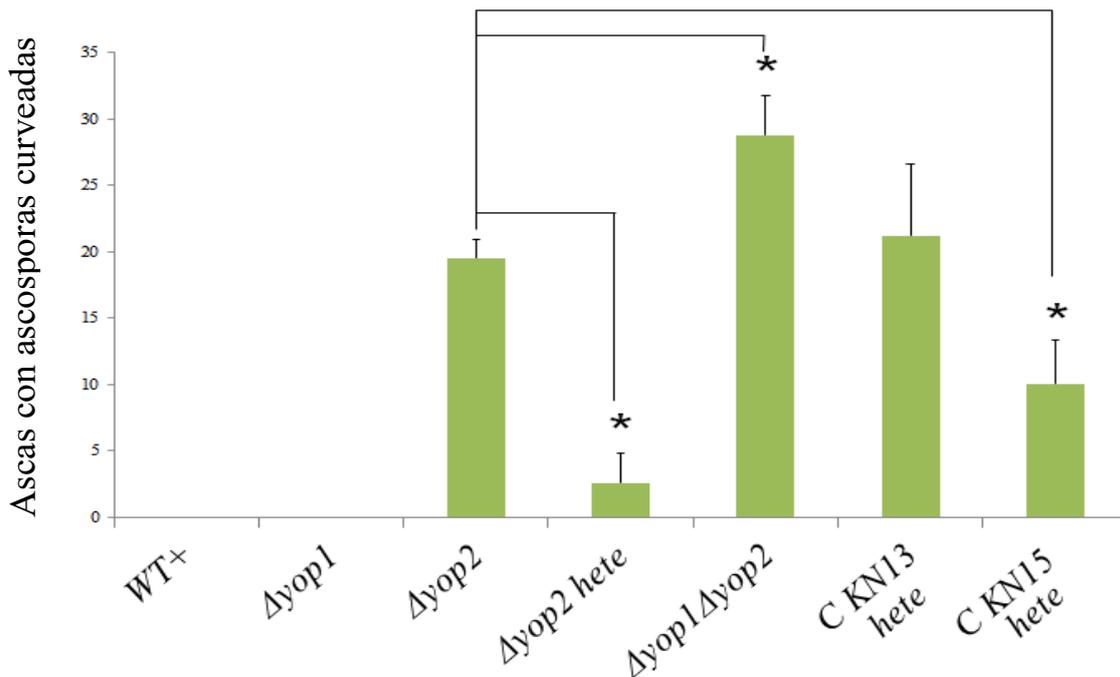


Figura 36. Porcentaje de ascas con esporas curvadas producidas en las mutantes de las proteínas Yop1/DPI de *P. anserina*. La mutante $\Delta yop1$ al igual que la cepa silvestre, no presentó ninguna ascospora con morfología curvada. La cruce heterociga de $\Delta yop2$ por la silvestre ($\Delta yop2$ hete) presentó 2.6% de ascas con ascoporas curvadas, mientras que una cruce homociga presentó el 19.5%. El porcentaje de ascas curvadas la cepa carente de YOP2 se redujo en una cruce heterociga de $\Delta yop2$ por en la cepa complementada $\Delta yop2$ C-K15 (10.1%), pero no con la cepa C-KN13. Finalmente, la doble mutante $\Delta yop1\Delta yop2$ presentó 9.2% más de ascas curvadas que $\Delta yop2$.
**p-value* < 0.01.

7.4.4. Algunas ascoporas mutantes jóvenes carentes de YOP2 presentan alteraciones morfológicas en los núcleos.

A continuación analizamos la forma y distribución nuclear en relación con la alteración de la forma de las esporas en la mutante $\Delta yop2$ mediante preparaciones fijas de ascas teñidas con DAPI. En estas preparaciones se observaron ascoporas maduras en forma de cuchara, lo que podría ser la morfología tridimensional de las ascoporas de esta mutante (fig. 37). Las ascoporas jóvenes silvestres, poseen únicamente dos núcleos (fig. 38 A y B). Este número no se vio alterado en la cepa $\Delta yop2$; sin embargo, la morfología de éstos se vio afectada en algunas de las esporas curvadas, en donde se observaron núcleos con una forma alargada (fig. 38 C-F). Este fenotipo también se observó en la doble mutante $\Delta yop1\Delta yop2$ (no mostrado).

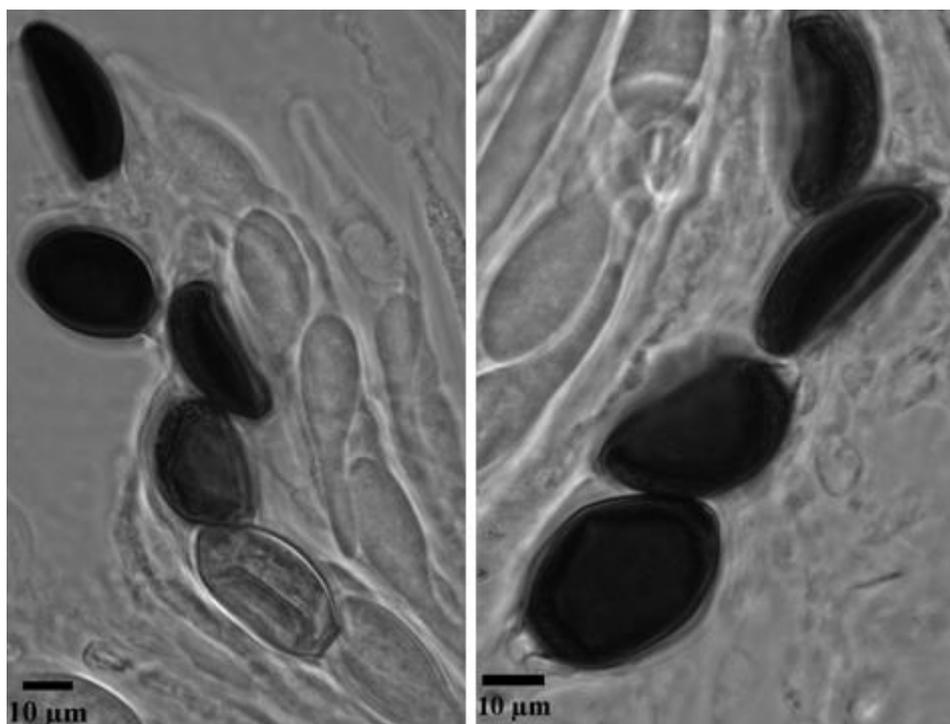


Figura 37. Morfología tridimensional de esporas curvadas de la mutante $\Delta yop2$. Las preparaciones fijas de ascas de *P. anserina* permitieron observar una morfología tridimensional del fenotipo curvado de las ascosporas de la mutante carente de YOP2.

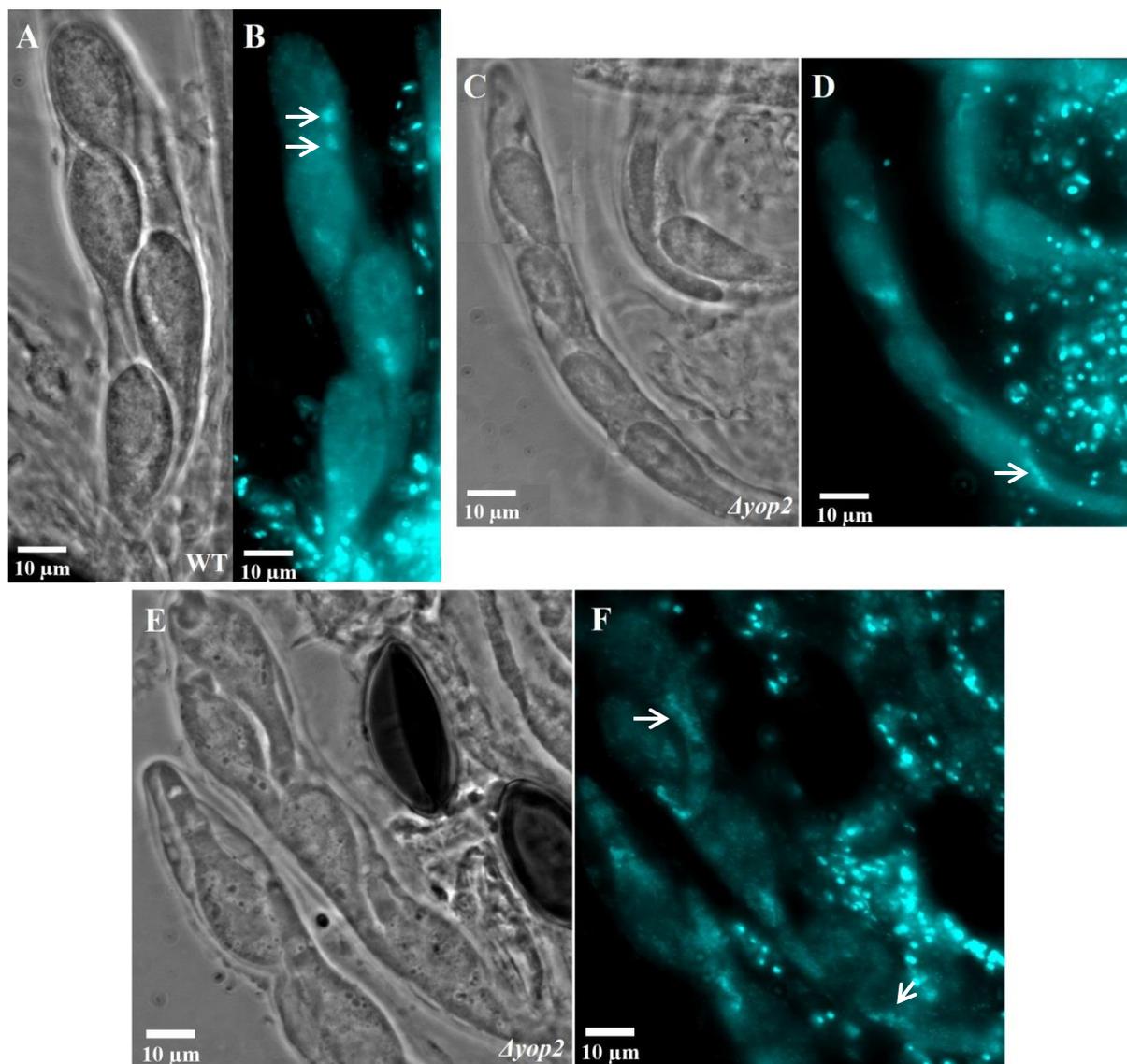


Figura 38. Análisis de distribución nuclear de las cepas silvestre y mutante $\Delta yop2$ de *P. anserina*.
 En un asca silvestre de cuatro ascosporas (contraste de fases, **A**), se observan dos núcleos con una forma circular por espора (núcleos teñidos con DAPI, **B**), mientras que en la cepa $\Delta yop2$ (contraste de fases, **C** y **E**) se observa el mismo número de núcleos con una morfología alargada en algunas de las esporas curvadas (núcleos teñidos con DAPI, **D** y **F**).

8. DISCUSIÓN

La ausencia de las proteínas de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina* (YOP1 y YOP2) conlleva a distintos fenotipos durante el desarrollo somático y sexual en este hongo. La eliminación de YOP2 genera defectos en la melanización del micelio bajo estrés por frío y en la morfología de núcleos y de las ascosporas, mientras que la eliminación de YOP1 por sí sola no genera defectos observables; sin embargo, su eliminación conjunta con YOP2 corrige (i.e. la melanización y la presencia de núcleos alargados) o agrava (el porcentaje de ascas anormales) los defectos generados en ausencia de YOP2.

8.1. YOP1 y YOP2 como parte de la familia Yop1/DP1 de *P. anserina*.

La proteína de *P. anserina* (YOP1) que presentó mayor similitud con Yop1p de *S. cerevisiae*, y que representa su ortólogo funcional, resultó no tener por sí sola un papel preponderante en el desarrollo sexual de este hongo filamentoso. Sin embargo, identificamos una segunda proteína que forma parte de la familia de proteínas de Yop1/DP1 y que es necesaria para el desarrollo de este hongo. Esta proteína, que decidimos denominar YOP2, presenta claramente un dominio de la familia Yop1/DP1, sin embargo, este dominio es atípico y podría representar una variante reducida de él. Para corroborar que YOP2 está involucrada en estructurar el RE, hace falta confirmar por microscopía su localización en el RE, así como determinar cómo el arreglo de este organelo se ve afectado en ausencia de YOP2, no obstante, la interacción genética que presenta con YOP1 relaciona indirectamente a YOP2 con el RE. Por otra parte, más de la mitad de esta nueva proteína está constituida por un segmento en el que no fue posible identificar ningún dominio con función o estructura conservados. Es posible que esta parte de la proteína desempeñe una función desconocida, y

que podría no estar relacionada con estructurar el RE. Sin embargo, la presencia de interacciones genéticas –tanto positivas como negativas– entre *YOP2* y los otros genes que predeciblemente codifican las proteínas involucradas en determinar el arreglo tubular del RE (el reticulón RTN1 y YOP1) es consistente con una participación de estos genes en un proceso común que involucra el RE.

8.2. Posibles causas de la falta de un fenotipo visible en la mutante *Δyop1*.

La falta de un fenotipo visible en la mutante *Δyop1* puede deberse a una redundancia de su función estructural en el RE, ya que junto con la familia de los reticulones (Voeltz, *et al*, 2006), las atlastinas (Orso *et al.*, 2009) y las proteínas de la familia de lunapark que residen en las uniones de tres caminos (Chen *et al.*, 2012) contribuyen a estructurar la red de este organelo a lo largo de toda la célula. Al igual que se observó en nuestra investigación en *P. anserina*, se ha reportado un fenotipo similar en las mutantes sencillas y dobles de la levadura *S. cerevisiae* carentes de las proteínas de la familia de los reticulones y de Yop1/DP1 no tienen defectos en su crecimiento. Sin embargo, cuando simultáneamente se elimina Lnp1p (lunapark) en estas mutantes, el crecimiento de esta levadura se ve significativamente afectado (Chen *et al.*, 2012). Esto sugiere que el arreglo del RE depende de la actividad de varias proteínas. La ausencia de YOP1 en *P. anserina* podría no alterar la morfología del RE o presentar cambios que no afectan el crecimiento y ciertas funciones del organismo debido a la presencia de las distintas proteínas que contribuyen a la curvatura de la membrana del RE y a la formación de la red poligonal de este organelo.

8.3. Falta de producción de melanina en la mutante *Δyop2*.

A pesar de que se sabe que la mayoría de los hongos filamentosos, incluido *P. anserina*, producen melanina por la vía de la poliacétido sintasa (PKS) (Coppin & Silar, 2007), no está

claro cómo ocurre su biosíntesis y la deposición de los gránulos extracelulares; aunque, en un estudio reciente con *Aspergillus fumigatus* se ha reportado que el tráfico de endosomas es crítico para la melanización de los hongos –al menos para los que utilizan la vía de la PKS– al igual que en vertebrados. En dicho estudio, observaron que las enzimas relacionadas con los pasos tempranos de la biosíntesis de este biopigmento son reclutadas a endosomas que posteriormente forman cuerpos multivesiculares (CMV), en un proceso de secreción atípico. Por otro lado, las enzimas de los pasos tardíos, junto con los precursores formados por las enzimas tempranas, son secretadas y concentradas en la pared celular (Upadhyay *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior, se ha observado en células de mamíferos que la distribución y segregación de las proteínas de la vía endocítica depende del reclutamiento de túbulos del RE a los dominios tubulares de los endosomas, lo cual promueve la fisión del endosoma por una maquinaria desconocida (Rowland *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que la nexina Mvp1 de *A. fumigatus* posee el dominio Bin-Amphiphysin-RVS (BAR) el cual puede oligomerizarse y conferir curvatura a las membranas de los endosomas (Upadhyay *et al.*, 2016), por lo que las regiones tubulares de los endosomas formadas por nexinas podrían llevar en su interior enzimas de los pasos tempranos para la biosíntesis de melanina en los hongos y así permitir su reciclaje, posterior a la fisión del endosoma por la intervención del RE. Así, si YOP2 estuviese involucrado en formar el RE tubular, el tránsito y la distribución de las proteínas tempranas de la vía de biosíntesis, y/o las tardías, podría ser regulada por YOP2, su ausencia podría disminuir los metabolitos intermediarios para la producción de melanina por la falta del reciclaje de las proteínas biosintéticas.

Sin embargo, ya que este fenotipo sólo se observa en micelio sometido a estrés con hipotermia, la participación de YOP2 en este proceso podría sólo relacionarse con determinadas condiciones fisiológicas, como la respuesta a estrés.

8.4. Envejecimiento típico en las mutantes del reticulón y las proteínas Yop1/DP1 de *P. anserina*.

La función y la dinámica (notablemente los procesos de fisión) de los organelos como los peroxisomas y mitocondrias son fundamentales en la regulación del envejecimiento en los hongos (Scheckhuber *et al.*, 2007). Dada la importancia del RE en la dinámica peroxisomal y mitocondrial (incluyendo la fisión mitocondrial), supusimos que la alteración estructural del RE podría repercutir en el envejecimiento de *P. anserina*. Sin embargo, tras eliminar las proteínas estructurales del RE no observamos alteraciones en este proceso. Con una red del RE predeciblemente sin daños morfológicos significativos, como los presentes en mutantes sencillas y dobles de *yop1Δ* y *rtn1Δ* de *S. cerevisiae* (Chen *et al.*, 2012), la dinámica de peroxisomas y mitocondrias asistida por los túbulos del RE podría no ser afectada y por tanto el hongo *P. anserina* podría envejecer con normalidad.

8.5. Defectos en la morfología de núcleos y ascosporas por las interacciones con el cuerpo polar del huso acromático.

Se ha observado en *S. cerevisiae* que Yop1p y Rtn1p interactúan con Ndc1p, un factor esencial para el ensamblaje del cuerpo polar del huso acromático y de los poros nucleares (Casey *et al.*, 2012; Dawson *et al.*, 2009), por lo que la mutación sencilla de *YOP1* en *P. anserina* podría no mostrar un defecto en el ensamblaje de dichos complejos sin antes eliminar simultáneamente el gen *RTN1*. En cambio, la ausencia de únicamente *YOP2* da como resultado la formación de núcleos alargados tanto en regiones hifales cercanas al ápice —donde ocurre un mayor número de divisiones nucleares—, como en algunas ascosporas durante su maduración. Esto podría indicar que los poros nucleares y/o los cuerpos polares del huso acromático, los últimos indispensables para la mitosis cerrada en hongos, podrían no estar ensamblándose correctamente, en ausencia de *YOP2* de *P. anserina*. La morfogénesis

de las ascosporas es orquestada por los cuerpos polares de huso acromático que, tras actuar como centros de reclutamiento de vesículas (Neiman, 2011). La formación de las membranas de las ascosporas por la fusión de vesículas puede verse afectada en cierta manera, lo que refuerza la suposición de que YOP2 tiene un papel en el correcto ensamblaje de los cuerpos polares del huso acromático, dado el fenotipo de esporas curvadas.

Alternativamente, se ha demostrado que la expansión de la membrana nuclear depende del balance en la actividad de las proteínas que estructuran el RE, incluyendo los reticulones y las proteínas de la familia de Yop1 (Anderson & Hetzer, 2008), por lo que YOP2 podría ser importante en regular las transiciones morfológicas del RE en regiones hifales y tipos celulares específicos.

Por otro lado, la autofagia del RE es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular y, aunque los mecanismos por los que ocurre la regulación de este proceso aún no son claros, en recientes estudios se ha observado en células humanas que miembros de una familia específica de proteínas relacionadas con los reticulones, FAM134B, son receptores del RE que facilitan la degradación de este organelo por autofagia. Este proceso regula el volumen y la estructura del RE, por lo que las células sin esta proteína presentan núcleos y un RE expandido (Khaminets *et al.*, 2015). Si el dominio desconocido en función de YOP2 tuviera alguna relación con la regulación de la autofagia del RE de *P. anserina*, esto explicaría la deformación nuclear en algunos núcleos de ascosporas y ciertas regiones del micelio cerca del ápice de las hifas.

8.6. Regulación de YOP1 sobre YOP2.

A pesar de la falta de un fenotipo distinto al silvestre de la mutante sencilla $\Delta yop1$, la combinación de esta mutación junto con $\Delta yop2$ permitió establecer la presencia de interacciones genéticas entre ellas. En primer lugar, los fenotipos presentes en el desarrollo

somático dados por la ausencia de YOP2 son rescatados por la eliminación de YOP1, donde se recupera la falta de producción de melanina bajo estrés por frío, la abundancia de micelio aéreo y la morfología esférica de sus núcleos. La razón por la cual *Δyop1* suprime estos fenotipos de *Δyop2* no es clara; sin embargo, la ausencia de ambas proteínas en la célula podría generar una respuesta de compensación –que podría involucrar, por ejemplo, la sobreproducción de otras proteínas estructurales del RE– que no se genera en ausencia de únicamente YOP2. En segundo lugar, en el desarrollo sexual ocurre lo contrario, ya que la formación de las ascas anormales en la mutante *Δyop2* es acentuado cuando se elimina en conjunto el gen *YOP1*, por lo que ambas proteínas pueden tener funciones comunes en estructurar el RE y la envoltura nuclear durante el desarrollo sexual. Actualmente, desconocemos la localización intracelular de las proteínas de la familia de Yop1 en *P. anserina*, así como su distribución a lo largo del desarrollo. Asimismo, tampoco conocemos el fenotipo que la ausencia de estas proteínas genera directamente en la morfología del RE. Experimentos encaminados a estudiar estos aspectos de la función de las proteínas de la familia de Yop1 podrían ser determinantes para comprender la función precisa que estas proteínas desempeñan durante el desarrollo de *P. anserina*.

9. CONCLUSIONES

- ✓ *Podospora anserina* posee dos proteínas de la familia Yop1/DP1: YOP1 y YOP2.
- ✓ YOP1 no es requerida para su desarrollo somático y sexual de *P. anserina*.
- ✓ La ausencia de YOP2 presenta defectos en la producción de melanina bajo estrés por frío y en la morfología nuclear de regiones hifales específicas del micelio aéreo, así como de cierto número de ascosporas. Mas aún, el proceso de diferenciación de estas células *per se* también depende de YOP2.
- ✓ Los defectos generados por la ausencia de YOP2 se agravan o corrigen en ausencia simultánea de YOP1, implicando que ambas proteínas participan en diferente medida a lo largo del desarrollo de *P. anserina*.
- ✓ RTN1 se requiere en una etapa distinta del desarrollo sexual, y la ausencia simultánea de las tres proteínas que estructuran el RE conlleva múltiples defectos en el desarrollo.
- ✓ Nuestros resultados indican que diferentes etapas del desarrollo de *P. anserina* dependen de distintas proteínas que predeciblemente estructuran el RE, lo que podría indicar una acción concertada de estas proteínas a lo largo del desarrollo.

10. ANEXO

10.1. Tablas de oligonucleótidos y fragmentos de PCR.

10.1.1 Oligonucleótidos para generación de casetes de delección de los genes *YOP1* y *YOP2* y la verificación de las cepas mutantes. Los oligonucleótidos híbridos que permiten la fusión por PCR contienen dos secuencias contiguas que corresponden al gen *YOPX* (mayúsculas) y al gen marcador (minúsculas).

Nombre	Secuencia
yop1-3F	GTATTCAACATTTCCGTGt
yop1-3R	cggttgctggacctctc TGTAAGTGCAGATAGACAACTGGAG
nour-F	acaccggctagcagcatcACCCTGATAAATGCTTC
nour-R	gagaggtccagcaaccgaCACGGAAATGTTGAATAC
yop1-5F	CCACGAAACCAGAGAATTGGATGTC
yop1-5R	GAAGCATTATCAGGGTgatgctgctagccggtgt
yop2-3F	CCTTCTTTCTAGCTAGAGGcagcaggatcaacaacgaga
yop2-3R	CTTCCCCTCCCCAAACAAAAGAAAT
hph-F	cgccaacataccggatcaGGAAGCGAGAAGAATCAT
hph-R	tctcgttgttgatcctgctgCCTCTAGCTAGAAAGAAGG
yop2-5F	ACGATGGAGATGGATATGTGGTTGG
yop2-5R	ATGATTCTTCTCGCTTCctgatccggtatggttggcg
yop1-3ch	TGAGGGAGAAGAAATCGC
yop1-5ch	GACTGAACCAGAAATGCC
nour-Fb	CGACATCTCATCTTCCTG
nour-Rc	GTTGACGTTGGTGACCT
3yop1	CTTCAAGTAAGCTGCTGC
5yop1	TCGAGGTTGATGAGAACG
yop2-3ch	TCGTGGTAGGCGAAAAGG
yop2-5ch	AAGGCGATGACAGGAACG
hph-Fc	AGCCGATAGTGGAAACCG
hph-Rc	GCGGTGAGTTCAGGCTTT
3yop2	TCCAAGAGCCGGTCAGAG
5yop2	GGGCGTACCAGCAGAGAA

10.1.2. Pares de oligonucleótidos utilizados para la construcción de los casetes de delección de *YOP1* y *YOP2*. Se muestra la longitud esperada de cada secuencia amplificada en pb.

Fracción	Oligonucleótidos	pb
3' UTR (<i>YOP1</i>)	yop1-3F::yop1-3R	589
<i>NAT1</i>	nour-F::nour-R	1,466
5' UTR (<i>YOP1</i>)	yop1-5F::yop1-5R	738
3' UTR:: <i>NAT1</i> ::5' UTR	yop1-5F::yop1-3R	2,793
3' UTR (<i>YOP2</i>)	yop2-3F::yop2-3R	666
<i>HPH</i>	hph-F::hph-R	2,822
5' UTR (<i>YOP2</i>)	yop2-5F::yop2-5R	689
3' UTR:: <i>HPH</i> ::5' UTR	yop2-5F::yop2-3R	4,177

10.1.3. Pares oligonucleótidos utilizados para PCRs de verificación de las cepas mutantes *Δyop1* y *Δyop2*. Oligonucleótidos que permiten verificar: 1) la presencia del casete de delección correspondiente, 2) la ausencia de los genes *YOP1* y *YOP2* en las cepas mutantes y 3) la presencia de los genes *YOP1* y *YOP2* en la cepa silvestre. Se muestra la longitud esperada para cada secuencia amplificada en pb.

Fracción	Oligonucleótidos	pb en mutante	pb en silvestre
3' UTR:: <i>NAT1</i>	yop1-3ch::nour-Fb	1,928	-
5' UTR:: <i>NAT1</i>	yop1-5ch::nour-Rc	1,385	-
3' UTR:: <i>NAT1/YOP1</i> ::5' UTR	yop1-3ch::yop1-5ch	2,836	2,144
3' UTR:: <i>HPH</i>	yop2-3ch::hph-Fc	1,471	-
5' UTR:: <i>HPH</i>	yop2-5ch::hph-Rc	1,719	-
3' UTR:: <i>HPH/YOP2</i> ::5' UTR	yop2-3ch::yop2-5ch	4,217	2,684
3' UTR:: <i>YOP1</i>	yop1-3ch::3yop1	-	1,010
5' UTR:: <i>YOP1</i>	yop1-5ch::5yop1	-	893
3' UTR:: <i>YOP2</i>	yop2-3ch::3yop2	-	971
5' UTR:: <i>YOP2</i>	yop2-5ch::5yop2	-	1,189

10.2 Medios de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se siguieron las siguientes instrucciones básicas:

1) Adicionar los componentes en el orden de la receta, salvo las vitaminas biotina y tiamina (50 µg/L de cada una), las cuales se agregan después de la esterilización y a una temperatura máxima de 60 °C, 2) disolver la dextrina en agua caliente antes de adicionarse a la mezcla, 3) ajustar el pH a 7.0 y aforar con agua desionizada a 1L, 4) esterilizar en autoclave por 20 minutos a 120 °C, 5). Verter 30 mL de medio por cada caja Petri.

Los medios de cultivo a partir del anexo 10.2.1 hasta 10.2.5 requieren de la adición de KH_2PO_4 (250 mg/L), K_2HPO_4 (300 mg/L), MgSO_4 (250 mg/L) y urea (500 mg/L) más una solución de oligoelementos (anexo 10.2.8)

10.2.1 Medio mínimo M2

Dextrina ----- 11 g

Agar ----- 12.5 g

10.2.2 M0 + celulosa

Agar ----- 12.5 g

Colocar círculos de celofán del tamaño de la caja Petri sobre el medio solidificado.

10.2.3 M0 + ácido oléico

Ácido oléico ----- 500 µL

Tween 40 ----- 2 mL

Agar ----- 12.5 g

10.2.4 Medio líquido para protoplastos

Dextrina ----- 11 g

Extracto de levadura ----- 5 g

10.2.5 RG

Dextrina ----- 11 g

Sacarosa (0.58 M) ----- 200 g

Agar ----- 10 g

10.2.6 Tapas con MA

Cloruro de sodio ----- 10 g

Agar ----- 20 g

10.2.7 GYE

Acetato de amonio ----- 4.4g

Bacto Peptona ----- 15 g

Agar ----- 13 g

10.2.8. Oligoelementos (500 mL)

Ácido cítrico, 1 H₂O ----- 2.5 g

ZnSO₄, 7 H₂O ----- 2.5 g

Fe (NH₄)₂ (SO₄), 6 H₂O --- 0.5 g

CuSO₄, 5 H₂O ----- 125 mg

MnSO₄, 1 H₂O ----- 25 mg

H₃BO₃, anhidro ----- 25 mg

Na₂MoO₄, 2 H₂O ----- 25 mg

Cloroformo ----- una gota

10.2.9. Antibióticos (concentración final en el medio de cultivo)

Higromicina B ----- 75 µg/mL

Nourceotrina (ClonNat) ----- 40 µg/mL

Geneticina (G418) ----- 100 µg/mL

Ampicilina ----- 20 µg/mL

10.3 Soluciones para protoplastos y transformación.

10.3.1. TPS1 (1 L)

KH₂PO₄ (0.5 M) ----- 90 mL

Sacarosa ----- 200 g

Na₂HPO₄ (0.5 M) ----- 10 mL

Que contiene:

Na₂HPO₄ ----- 0.89 g

Na₂HPO₄, 7 H₂O ----- 0.134 g

Na₂HPO₄, 12 H₂O ----- 0.179 g

10.3.2. TPC (200 mL)

Sacarosa ----- 41.07 g

Cloruro de calcio ----- 0.29 g

Tris (pH 7.5) ----- 0.24 g

10.3.3. PEG 4000, pH 7.5 (100 mL)

Polietilenglicol 4000----- 60 g

Cloruro de calcio 100 mM --- 5 mL

Tris 0.5 M----- 1 mL

10.4 Soluciones para citología.

10.4.1. PEM (20 mL)

PIPES (100 Mm, pH 6.9) ----- 18 mL

EGTA (500 mM) ----- 1 mL

Cloruro de magnesio (500 mM) - 1 mL

10.4.2. PAF (10 mL)

Paraformaldehído ----- 0.74 g

PEM ----- 10 mL

10.4.3. Poli-Lisina

Poli-Lisina (Sigma, P 1524) ---- 1 mg

Triton 10% ----- 10 μ L

10.4.4. LISOLECITINA (1 mL)

Lisolecitina ----- 2 mg

PEM ----- 1 mL

10.4.5. PBS 10X (100 mL)

Na₂HPO₄ (1.6 M) ----- 50 mL

NaH₂PO₄ , 2 H₂O (0.4 M) --- 50 mL

NaN₃ ----- 0.5 g

Diluir con agua desionizada a 1X para soluciones de trabajo.

10.4.6. PBS + TX (50 mL)

PBS 10X ----- 5 mL

Triton 10% ----- 500 µL

10.4.7. PBS + TX + DAPI (2 mL)

DAPI (1mg/mL) ----- 1.5 µL

PBS + TX ----- 2 mL

11. REFERENCIAS

- Anderson Daniel J., and Hetzer Martin W. (2008). **Reshaping of the nuclear reticulum limits the rate for nuclear envelope formation.** *Journal of Cell Biology*, 182(5): 911-924; doi: 10.1083/jbc.200805140.
- Baumgart Eveline, Vanhorebeek Ilse, Grabenbauer Markus, Borgers Marcel, Declercq Peter E., Fahimi H. Dariush, and Baes Myriam. (2001). **Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse).** *American Journal of Pathology*, 159(4): 1477-1494; doi: 10.1016/S0002-9440(10)62534-5.
- Brady Jacob P., Claridge Jolyon K., Smith Peter G., and Schnell Jason R. (2014). **A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7):E639-48; doi:10.1073/pnas.1415882112.
- Bonnet Sébastien, Michelakis Evangelos D., Porter Christopher J., Andrade-Navarro Miguel A., Thébaud Bernard, Bonnet Sandra, Haromy Alois, Harry Gwyneth, Moudgil Rohit, McMurtry M. Sean, Weir E. Kenneth, Archer Stephen L. (2006). **An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension.** *Circulation*, 113(22):2630-41; doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008.
- Casselton Lorna A. (2002). **Mate recognition of fungi.** *Nature Publishing Group, Heredity*, 88:142-147; doi: 10.1038/sj/hdy/6800035.
- Casey Amanda K., Dawson T. Renee, Chen Jingjing, Friederichs Jennifer M., Jaspersen Sue L., and Wentle Susan 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): 41-455; doi: 10.1534/genetics.112.141465.

- Chen Shuliang, Novick Peter, and Ferro-Novick Susan. (2012). **ER network formation requires a balance of dynamin-like GTPase Sey1p and the Lunapark family member Lnp1.** *Nature Cell Biology*, 14(7):707-16; doi: 10.1038/ncb2523.

- Chen Shuliang, Novick Peter, and Ferro-Novick Susan. (2013). **ER structure and function.** *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4):428-33; doi: 10.1016/j.ceb.2013.02.006.

- Contamine Véronique, Zickler Denise, and Picard Marguerite (2004). **The *Podospora rmp1* gene implicated in nucleus-mitochondria cross-talk encodes an essential protein whose subcellular location is developmentally regulated.** *Genetics*, 166(1):135-50; doi: 10.1534/genetics.166.1.135.

- Coppin Evelyne, and Silar Philippe. (2007). **Identification of PaPKS1, a polyketide synthase involved in melanine formation and its use as a genetic tool in *Podospora anserina*.** *Mycological Research*, 111(8):901-908; doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.011.

- Dawson T. Renee, Lazarus Michelle D., Hetzer Martin W., and Wentz Susan R. (2009) **ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation.** *The Journal of Cell Biology*, 184(5):659-675; doi: 10.1083/jcb.200806174.

- Dreier Lars, and Rapoport Tom A. (2000). ***In vitro* formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction.** *Journal of Cell Biology*, 148(5):883-898; doi: 10.1083/jbc.148.5.883.

- Elbaz Yael, and Schuldiner Maya. (2011). **Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites.** *Trend in Biochemical Sciences*, 36(11):616-623; doi: 10.1016/j.tibs.2011.08.004.

- El-Khoury Riyad, and Sainsard-Chanet Annie. (2010). **Deletion of the mitochondrial NADH kinase increases mitochondrial DNA stability and life span in filamentous fungus**

Podospora anserina. *Experimental Gerontology*, 45(7-8):543-9; doi: 10.1016/j.esger.2010.01.012

- Ellgaard Lars and Helenius Ari. (2003). **Quality control in the endoplasmic ureticulum**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3):181-191; doi: 10.1038/nrm1052.

- English Amber R., and Voeltz Gia K, (2013). **Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4):a013227; doi: 10.1101/cshperspect.a013227.

- Espagne Eric, Lespinet Oliver, Malagnac Fabienne, Da Silva Corinne, Jaillon Oliver, Porcel Betina M., Couloux Arnaud, Aury Jean-Marc, Ségurens Béatrice, Poulain Julie, Anthouard Véronique, Grossetete Sandrine, Khalili Hamid, Coppin Evelyne, Déquard-Chablat Michelle, Picard Marguerite, Contamine Véronique, Arnaise Sylvie, Bourdais Anne, Berteaux-Lecellier Véronique, Gautheret Daniel, de Vries Ronald P., Battaglia Evy, Coutinho Pedro M., Danchin Etienne GJ, Henrissat Bernard, Khoury Riyad EL, Sainsard-Chanet Annie, Boivin Antoine, Pinan-Lucarré Bérangère, Sellem Carole H., Debuchy Robert, Wincker Patrick, Weissenbach Jean and Silar Philippe. (2008). **The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina***. *Genome Biology*, 9(5):R77; doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r77.

- Esser Karl and Wendland Jürgen. (2016) **The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Volume I: Growth, differentiation and sexuality**. 3th ed. *Springer*. 521 pp; doi 10.1007/978-3-319-25844-7.

- Friedman Jonathan R., Lackner Laura L., West Matthew, DiBenedetto Jared R., Nunnari Jodi, and Voeltz Gia, (2011). **ER tubules mark sites of mitochondrial division**. *Science*, 334(6054):358-362; doi: 10.1126/science.1207385.

- Friedman Jonathan R., and Voeltz Gia K. (2011). **The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network.** *Trends in Cell Biology*, 21(12):709-717; doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.004.
- Gandía Mónica, Xu Shaomei, Font Cristina, and Marcos José F. (2016). **Disruption of ku70 involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*.** *Fungal Biology*, 120(3):317-23; doi: 10.1016/j.funbio.2015.11.001.
- Gonzalez Yanira, Meerbrey Kristen, Chong Jennifer, Torii Yoshihiro, Padte Neal N., and Sazer Shelley. (2009). **Nuclear shape, growth and integrity in the closed mitosis of fission yeas depend on the Ran-GTPase system, the spindle pole body and the endoplasmic reticulum.** *Journal of Cell Science*, 22(Pt 14):2464-72; doi: 10.1242/jcs.049999.
- Goyal Uma, and Blackstone Craig. (2013). **Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(11):2492-2498; doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.009.
- Gritz Linda, and Davies Julian. (1983). **Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene*, 25(2-3):179-88; doi: 10.1016/0378-1119(83)90223-8.
- Groden Joanna, Thliveris Andrew, Samowits Wade, Carlson Mary, Gelbert Lawrence, Albertsen Hans, Joslyn Geoff, Stevens Jeff, Spirio Lisa, Robertson Margaret, Sargeant Leslie, Krapcho Karen, Wolff Erika, Burt Randall Hughes J. P., Warrington Janet, McPherson John, Wasmuth John, Le Paslier denis, Abderrahim Hadi, Cohen Daniel, Leppert Mark, and Whithe Ray. (1991). **Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.** *Cell*, 66(3):589-600, doi: 10.1016/0092-8674(81)90021-0.

- Guo Woei-Jiun, and David Ho Tuan-Hua. (2008). **An abasic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells.** *Plant Physiology*, 147(4):1710-22; doi: 10.1114/pp108.120238.
- Hu Junjie, Prinz William A., and Rapoport Tom A. (2011). **Weaving the web of ER tubules.** *Cell*, 147(6):1226-1231; doi:10.1016/j.cell.2011.11.022.
- Hu Junjie, Shibata Yoko, Voss Christiane, Shemesh Tom, Li Zongli, Coughlin Margaret, Kozlov Michael M., Rapoport Tom A., and Prinz William A. (2008). **Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules.** *Science*, 319(5867):1247-50; doi: 10.1126/science.1153634.
- Jamet-Vierny Corinne, Begel Odile, and Belcour León. (1980). **Senescence in *Podospora anserine*: amplification of mitochondrial DNA sequence.** *Cell*, 21(1):189-94; doi: 10.1016/0092-8674(80)90126-9.
- Khaminets Aliaksandr; Heinrich Theresa, Mari Muriel, Grumati Paolo, Huebner Antjr K., Akatsu Masato, Liebmann Lutz, Stolz Alexandra, Nietzsche Sandor, Koch Nicole, Mauthe Mario, Katona Istvan, Qualmann Britta, Weis Joachim, Reggiori Fulvio, Kurth Ingo, Hübner Christian A. and Dikic Ivan. (2015). **Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy.** *Nature*, 522(7556):354-8; doi: 10.1038/nature14498.
- Knoblach Barbara, Sun Xuejun, Coquelle Nicolas, Fagarasanu Andrei, Poirier Richard L., and Rachubinski Richard A. (2013). **An ER-peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast.** *The EMBO Journal*, 32(18):2439-53; doi: 10.1038/emboj.2013.170.
- Knuppertz Laura, Hamann Andrea, Pampaloni Francesco, Stelzer Ernst, and Osiewacz Heinz D. (2014). **Identification of autophagy as a longevity-assurance mechanism in the ageing model *Podospora anserina*.** *Autophagy*, 10(5):822-834; doi: 10.4161/auto.28148.

- Koch Annett, Yoon Yisang, Bonekamp Nina A., McNiven Mark A., and Schrader Michael. (2005). **A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells.** *Molecular Biology of the Cell*; 16(11):5077-86; doi:10.1091/mbc.E05-02-0159.
- Kornmann Benoît, Osman Christof, and Walter Peter. (2011). **The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 108(34):14151-6; doi: 10.1073/pnas.1111314108.
- Kornmann Benoît, and Walter Peter. (2010). **ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology.** *Journal of Cell Science*; 123(Pt 9):1389-93; doi: 10.1242/jcs.058636.
- Krügel Hans, Fiedler Gisela, Smith Colin, and Baumberg Simon. (1993). **Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gen *natI* from *Streptomyces noursei*.** *Gene*, 127(1):127-131; doi: 10.1016/0378-1119(93)90627-F.
- Kyte Jack, and Doolittle Russell F. (1982). **A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.** *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105-132; doi: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Labarère Jacques, and Bernet Jean. (1979). **A pleiotropic mutation affecting protoperithecium formation and ascospore outgrowth in *Podospora anserina*.** *Journal of General Microbiology*, 113:19-27; doi: 10.1099/00221287-113-1-19.
- Lacaze Isabelle, Lalucque Hervé, Siegmund Ulrike, Silar Philippe, and Brun Sylvain. (2015). **Identification of Nox/Pro41 as the homologue of the p22^{phox} NADPH oxidase subunit in fungi.** *Molecular Biology*, 95(6):1006-1024; doi: 10.1111/mmi.12876.
- Lang Alexander, John Peter Arun T., and Kornmann Benoît. (2015). **ER-mitochondria contact sites in yeast:beyond the myths of ERMES.** *Current Opinion in Cell Biology*, 35:7-12; doi: 10.1016/j.ceb.2015.03.002.

- Lehninger Albert., Nelson David L, and Cox Michael M. (2008). **Principles of biochemistry**. 5th ed., *W. H. Freeman and Company*, 1158 pp.
- López-Crisosto Camila, Bravo-Sagua Roberto, Rodríguez-Peña Marcelo, Mera Claudia, Castro Pablo F., Quest Andrew F. G., Rothermel Beverly A., Cifuentes Mariana, and Lavandero Sergio. (2015). **ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases**. *Biochimica and Biophysica Acta*; 1852(10 Pt A):2096-105; doi: 10.1016/j.bbadis.
- Lorin Séverine, Dufour Eric, Boulay Jocelyne, Begel Odile, Marsy Sophie, and Sainsard-Chanet Annie. (2001). **Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina***. *Molecular Microbiology*, 42(5):1259-67; doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02690.
- Lu Lei, Ladinsky Mark S., and Kirchhausen Tom. (2009). **Cisternal organization of the endoplasmic reticulum during mitosis**. *Molecular Biology of the Cell*, 20(15):3471-3480; doi: 0.1091/mbc.E09-04-0327.
- Matasyoh Josphat C., Dittrich Birger, Schueffler Anja, and Laatsch Hartmut. (2011). **Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospora sp.* against the malaria vector *Anopheles gambiae***. *Parasitology Reserch*, 108(3):561-566; doi: 10-1007/s00436-010-2098-1.
- Maruyama J., Kikuchi S., and Kitamoto K. (2006) **Differential distribution of the endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae***. *Fungal Genetics Biology*, 43:642–654; doi:10.1016/j.fgb.2005.11.007.
- Matsushima Takashi. (1975). **Icones microfungorum a Matsushima lectorum**. *University of Michigan*, 209 pp.
- Murley Andrew, Lackner Laura L. Osman Christof, West Matthew, Voeltz Gia K., Walter Peter, and Nunnari Jodi. (2013). **ER-associated mitochondrial division links the**

distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *eLife*; 2:e00422; doi: 10.7554/eLife.00422.

- Neiman Aaron M. (2011). **Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**

Genetics, 189:737-765; doi: 10.1534/genetics.111.127126.

- Orso Genny, Pendin Diana, Liu Song, Tosetto Jessica, Moss Tyler J., Faust Joseph E., Micaroni Massimo, Egorova Anastasia, Martinuzzi Andrea, McNew James A., and Daga Andrea. (2009). **Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin.** *Nature*, 460(7258):978-983; doi: 10.1038/nature08280.

- Peraza-Reyes Leonardo, Arnaise Sylvie, Zickler Denise, Coppin Evelyne, Debuchy Robert, and Berteaux-Lecellier Véronique. (2011). **The importomer peroxins are differentially required for peroxisome assembly and meiotic development in *Podospora anserina*: insights into a new peroxisome import pathway.** *Molecular Microbiology*, 82(2):365-377; doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07816.x.

- Peraza-Reyes Leonardo, Berteaux-Lecellier Véronique. (2013). **Peroxisomes and sexual development in fungi.** *Frontiers in physiology*, 4(244):1-16; doi: 10.3389/fphys.2013.00244.

- Phillips Melissa J, and Voeltz Gia K. (2016). **Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2):69-82; doi: 10.1038/nrm.2015.8.

- Rowland Ashley A., Chitwood Patrick J., Phillips Melissa J., and Voeltz Gia. (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.

- Rowland Ashley A., and Voeltz Gia K. (2012). **Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10):607-25; doi: 10.1038/nrm3440.
- Ruprich-Robert Gwenaël, Zickler Denise, Berteaux-Lecellier Véronique, Vélot Christian, and Picard Marguerite. (2002). **Lack of mitochondrial citrate synthase discloses a new meiotic checkpoint in a strict aerobe.** *The EMBO Journal*, 21(23): 6440–6451; doi: 10.1093/emboj/cdf632.
- Sackmann Erich. (2014). **Endoplasmatic reticulum shaping by generic mechanisms and protein-induced spontaneous curvature.** *Advances in Colloid and Interface Science*, 208:153–160; doi: 10.1016/j.cis.2014.02.006.
- Schrader Michael, Godinho Luis F., Costello Joseph L, and Islinger Markus. (2015). **The different facets of organelle interplay – an overview of organelle interactions.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3:56; doi: 10.3389/fcell.2015.00056.
- Schrader Michael, Reuber Bernadette E., Morrell James C., Jiménez-Sánchez Gerardo, Obie Cassandra, Stroh Tina A., Valle David, Schoroer Trina A., and Gould Stephenn J. (1998). **Expression of PEX11 β mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli.** *The Journal of Biological Chemistry*, 6;273(45):29607-14; doi: 10.1074/jbc.273.45.29607.
- Schrader Michael, and Yoon Yisang. (2007). **Mitochondria and peroxisomes: are the “Big Brother” and “The Little Sister” closer than assumed?** *Bioessays*, 29(11):1105-14; doi/10.1002/bies.20659
- Shai Nadav, Schuldiner Maya, and Zalckvar Einat. (2015). **No peroxisome is an island — Peroxisome contact sites.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(5):1061-9; doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.016.

- Shemesh Tom, Klemm Robin W., Romano Fabian B., Wang Songyu, Vaughan Joshua, Zhuang Xiaowei, Tukachunsky Hanna, Kozlov Michael M., and Rapoport Tom A. (2014). **A model for the generation and interconversion of ER morphologies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49):E5243-51; doi: 10.1073/pnas.1419997111.
- Shibata Yoko, Hu Junjie, Kozlov Michael M., and Rapoport Tom A. (2009). **Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25:329-54; doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113324.
- Shibata Yoko, Shemesh Tom, Prinz William A., Palazzo Alexander F., Kozlov Michael M., and Rapoport Tom A. (2010). **Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER.** *Cell*, 143(5):774-88; doi: 10.1016/j.cell.2010.11.007.
- Shibata Yoko, Voeltz Gia K., and Rapoport Tom A. (2006). **Rough sheets and smooth tubules.** *Cell*, 126(3):435-439; doi:10.1016/j.cell.2006.07.019.
- Scheckhuber Christian Q., and Osiewacz Heinz D. (2008). ***Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing.** *Molecular Genetic Genomic*, 280:365374; doi: 10.1007/s00438-0378-6.
- Scheckhuber C. Q., Erjavec N., Tinazli A., Hamann A., Nyström T., and Osiewacz H. D. (2007). **Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models.** *Nature Cell Biology*, 9(1):99-105; doi: 10.1038/ncb1524.
- Silar Philippe, Lalucque Hervé, and Vierny Corinne. (2001). **Cell degeneration in the model system *Podospora anserina*.** *Biogerontology*, 2(1):1-17; doi: 10-1023/A:101000081627.
- Silar Philippe. (2013). ***Podospora anserina*: From laboratory to biotechnology.** *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi, Soil Biology*, 36:283-309; doi: 10.1007/978-3-642-39339-6_12.

- Upadhyay Srijana, Xu Xinping, Lowry David, Jackson Jennifer C., Roberson Rober W., and Lin Xiaorong. (2016). **Subcellular compartmentalization and trafficking of the biosynthetic machinery for fungal melanin.** *Cell Reports*, 14(11):2511-8; doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.059.
- Voeltz Gia K., Prinz William A., Shibata Yoko, Rist Julia M., and Rapoport Tom A. (2006). **A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum.** *Cell*, 124(3):573-86; doi: 10.1016/j.cell.2005.11.047.
- Wanders Roland J. A., Waterham Hans R., and Ferdinandusse Sacha. (2016). **Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and endoplasmic reticulum.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3:83; doi: 10.3389/fcell.2015.00083.
- Zhang Dan, and Oliferenko Snezhana. (2013). **Tts1, the fission yeast homologue of the TMEM33 family, functions in NE remodeling during mitosis.** *Molecular Cell Biology*, 25(19):2970-83; doi: 10.1091/mbc.E13-12-0729.