



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

La función del complejo de unión entre la mitocondria y el retículo endoplásmico (ERMES) en el desarrollo del hongo *Podospora anserina*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Melisa Selene Álvarez Sánchez

TUTOR PRINCIPAL

Carlos Leonardo Peraza Reyes  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Jesús Aguirre Linares  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Roberto Hernández Fernández  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Enero, 2021



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.

**Álvarez Sánchez Melisa Selene**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 19 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**La función del complejo de unión entre la mitocondria y el retículo endoplásmico (ERMES) en el desarrollo del hongo Podospora anserina**", dirigida por el/la Dr(a). **Peraza Reyes Carlos Leonardo**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Halphen Diego
VOCAL	Coria Ortega Roberto
VOCAL	Aguilar Osorio José Guillermo
VOCAL	Torres Quiroz José Francisco
SECRETARIO	Sánchez Nieto Sobeida

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2020



**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**  
**Coordinadora**

*A mis padres*

## **Agradecimientos**

Este trabajo no habría sido posible sin la asistencia de varias personas, del equipo del Instituto de Fisiología Celular y de programas de apoyo a la ciencia.

Por esto, quiero expresar mi reconocimiento y gratitud:

A mi tutor, Leonardo Peraza, por haberme enseñado un mundo académico totalmente diferente al que estaba acostumbrada a ver.

A los miembros de mi comité, Jesús Aguirre Linares y Roberto Hernández Fernández, por haberme enseñado lecciones académicas y de vida.

A los miembros de mi jurado, ya que gracias a su minuciosa lectura, la calidad de este escrito mejoró muchísimo.

A Fernando Suaste Olmos por el apoyo técnico y académico brindados.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular el haber hecho posible la captura de muchos momentos mágicos.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por haber facilitado muchos experimentos.

Al CONACyT por la beca que me fue otorgada para la realización de este estudio (CVU 97020).

Al PAPIIT-DGAPA por los donativos IA203317 e IV200519 y al FONCICYT por el donativo 2277869, que hicieron posible la realización de mis experimentos.

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Contactos entre membranas</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2. Funciones de ERMES en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>13</b>
<b>1.3. Funciones de ERMES en hongos filamentosos</b> .....	<b>17</b>
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Modelo de estudio</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. La dinámica de organelos en <i>P. anserina</i></b> .....	<b>21</b>
<b>III. Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>IV. Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>22</b>
<b>V. Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1. Cepas y condiciones de crecimiento</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2. Análisis bioinformáticos</b> .....	<b>24</b>
5.2.1. Identificación de los genes del complejo ERMES en el genoma de <i>P. anserina</i> y alineamiento de secuencias homólogas .....	24
5.2.2. Obtención del modelo tridimensional de PaMdm10 .....	24
<b>5.3. Técnicas de Biología molecular</b> .....	<b>25</b>
5.3.1. Estrategia para la modificación genética de <i>MDM10</i> y <i>MMM1</i> .....	25
5.3.2. Extracción de DNA genómico de <i>P. anserina</i> .....	27
5.3.3. Extracción de DNA de plásmido.....	28
5.3.4. Reacciones de PCR.....	28
5.3.5. Purificación de productos de PCR.....	29
5.3.6. Corrimiento electroforético .....	30
<b>5.4. Transformación de <i>P. anserina</i></b> .....	<b>30</b>
5.4.1. Preparación de protoplastos .....	30
5.4.2. Transformación de protoplastos .....	30
<b>5.5. Obtención de cepas</b> .....	<b>31</b>
<b>5.6. Desarrollo sexual</b> .....	<b>31</b>
5.6.1. Análisis a 27°C .....	31
5.6.2. Análisis tras choque térmico .....	32
<b>5.7. Análisis del crecimiento vegetativo</b> .....	<b>32</b>
<b>5.8. Citología</b> .....	<b>33</b>
5.8.1. Análisis del grosor de hifas, de localización de septos, de frecuencia y orientación de ramificaciones y de localización de vacuolas .....	33
5.8.2. Análisis de las mitocondrias .....	33
5.8.3. Análisis del retículo endoplásmico.....	33
5.8.4. Análisis de los peroxisomas .....	34
<b>5.9. Microscopía</b> .....	<b>34</b>
<b>5.10. Análisis estadísticos</b> .....	<b>34</b>
<b>VI. Resultados</b> .....	<b>35</b>

6.1. El genoma de <i>P. anserina</i> contiene una copia de cada gen del complejo ERMES.....	35
6.2. El residuo sustituido en Mdm10 <sup>L420P</sup> está conservado en hongos filamentosos .....	36
6.3. El residuo sustituido en el producto de <i>mdm10-1</i> se encuentra en la penúltima lámina del barril β .....	36
6.4. Eliminación genética de <i>MDM10</i> y <i>MMM1</i> .....	37
6.5. Etiquetado de las proteínas Mdm10 y Mmm1 con mTFP y mCherry .....	39
6.6. La alteración de Mdm10 ocasiona defectos en el crecimiento ....	41
6.7. La alteración de Mdm10 no afecta el grosor de las hifas.....	43
6.8. Mdm10 <sup>L420P</sup> afecta el posicionamiento de los septos .....	44
6.9. La disfunción de Mdm10 no afecta la frecuencia ni la orientación de las ramificaciones .....	45
6.10. Mdm10 es necesaria para la agrupación apical de las vacuolas	46
6.11. Mdm10 es necesaria para el mantenimiento de la morfología mitocondrial.....	47
6.12. La fusión y fisión mitocondriales ocurren en la mutante <i>mdm10-1</i> .....	49
6.13. Mdm10 es importante para el mantenimiento de la estructura del RE.....	50
6.14. La alteración de Mdm10 afecta la localización de los núcleos ..	53
6.15. La dinámica peroxisomal depende de Mdm10.....	54
6.16. La alteración de Mdm10 afecta el desarrollo sexual .....	57
VII. Discusión .....	60
VIII. Conclusiones.....	65
IX. Perspectivas .....	65
Referencias.....	66

## Figuras

Figura 1.1. Contactos entre membranas heterotípicas.....	12
Figura 1.2. Topología y localización del complejo ERMES.....	13
Figura 2.1. Ciclo de vida de <i>P. anserina</i> .....	21
Figura 5.1. Estrategia de "Double Joint PCR" para la eliminación de los genes <i>MDM10</i> y <i>MMM1</i> de <i>P. anserina</i> .....	26
Figura 5.2. Estrategia de "Double Joint PCR" para la construcción de versiones de los genes <i>MDM10</i> y <i>MMM1</i> que expresen proteínas etiquetadas con mTFP y mCherry.....	27

Figura 6.1. El residuo de leucina en la posición 420 de Mdm10 de <i>P. anserina</i> está conservado en especies de hongos filamentosos utilizados como modelos de estudio.....	36
Figura 6.2. Modelo tridimensional de Mdm10 de <i>P. anserina</i> basado en la estructura cristalográfica de Tom40 de <i>N. crassa</i> .....	37
Figura 6.3. Construcciones genéticas para la eliminación de <i>MDM10</i> y <i>MMM1</i> .....	38
Figura 6.4. Construcciones genéticas para generar versiones de Mdm10 y Mmm1 etiquetadas con mTFP.....	40
Figura 6.5. Construcción genética para generar una versión de Mdm10 etiquetada con mTFP.....	41
Figura 6.6. La cepa <i>mdm10-1</i> es termosensible.....	42
Figura 6.7. La alteración de la función de Mdm10 no afecta el grosor de las hifas.....	44
Figura 6.8. La alteración de Mdm10 afecta el posicionamiento de los septos.....	45
Figura 6.9. Mdm10 no está involucrada en la formación ni en la orientación de las ramificaciones.....	46
Figura 6.10. La disposición de las vacuolas es diferente en las cepas S y <i>mdm10-1</i> .....	48
Figura 6.11. La morfología mitocondrial de la cepa <i>mdm10-1</i> es anormal.....	49
Figura 6.12. Mdm10 no es indispensable para la fusión ni para la fisión mitocondrial.....	51
Figura 6.13. La disposición de los parches apicales de RE depende de Mdm10.....	52
Figura 6.14. La disfunción de Mdm10 afecta la morfología del retículo endoplásmico.....	53
Figura 6.15. Mdm10 es necesaria para la correcta localización nuclear.....	55
Figura 6.16. La distribución de los peroxisomas no se afecta en las mutantes <i>mdm10-1</i> .....	56
Figura 6.17. La dinámica peroxisomal depende de Mdm10.....	57
Figura 6.18. Los defectos en el desarrollo del tejido vegetativo de	



los peritecios de la mutante <i>mdm10-1</i> afectan el desarrollo sexual.....	59
Figura 6.19. Mdm10 es necesaria para el desarrollo sexual normal.....	60

## Tablas

Tabla 5.1. Cepas utilizadas en este estudio.....	23
Tabla 5.2. Plásmidos utilizados en este estudio.....	28
Tabla 5.3. Pares de oligonucleótidos utilizados para la eliminación y fusión de genes.....	28
Tabla 6.1. Características de los genes que codifican los componentes esenciales del complejo ERMES en <i>P. anserina</i> , su tamaño en pb y número de residuos de aminoácidos de sus productos proteicos.....	35
Tabla 6.2. Porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los miembros esenciales de ERMES de <i>P. anserina</i> y los de <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> y <i>N. crassa</i> .....	36
Tabla 6.3. Tasa de crecimiento (mm/h) de las cepas S y <i>mdm10-1</i> a 27 y 37 °C en medio que contiene dextrina y en medio que contiene ácido oleico.....	43

## Resumen

Los organelos celulares establecen interacciones físicas a través de uniones moleculares, que desempeñan varias funciones en la regulación de la actividad de los organelos. Una de las uniones identificadas que conecta el retículo endoplásmico (RE) con las mitocondrias en los hongos es ERMES (complejo de unión entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias). Este complejo proteínico está compuesto por cuatro subunidades: Mdm10, Mdm12, Mdm34 y Mmm1 y está involucrado en el intercambio de lípidos y de calcio, en el ensamblaje de proteínas mitocondriales, en la fisión, fusión, motilidad y mitofagia mitocondriales. En todas las especies estudiadas, la ausencia de cualquiera de las subunidades de ERMES provoca alteraciones en la morfología y en la distribución del DNA mitocondriales. Además, en todas las especies estudiadas, la ausencia del complejo causa defectos en el crecimiento, que pueden ser moderados como en *Neurospora crassa*, o muy graves como en *Aspergillus fumigatus*. Sin embargo, la contribución de ERMES a la dinámica de organelos no mitocondriales y al desarrollo sexual ha sido poco considerada. Trabajo previo ha mostrado que las proteínas que dirigen la fisión peroxisomal y mitocondrial así como algunas proteínas que regulan la estructura del RE están involucradas en el desarrollo sexual de *Podospora anserina*, ya que su eliminación afecta el desarrollo sexual. Estas observaciones sugieren que la función de estos organelos está coordinada durante este proceso. Buscamos determinar el papel del complejo ERMES en este proceso y en la regulación de la dinámica mitocondrial, del RE y peroxisomal mediante el análisis de una cepa termosensible con una mutación puntual en *MDM10*. Esta mutante tiene defectos en el crecimiento, así como vacuolas, septos y núcleos mal localizados. La morfología mitocondrial, del RE y peroxisomal también está alterada. Aunque Mdm10 no es esencial para el comienzo de la cariogamia o meiosis, la formación de los gametangios femeninos (ascogonios) está retrasada y el desarrollo sexual está alterado. Estos resultados indican que el complejo ERMES también está involucrado en la regulación de la dinámica de las vacuolas, de los núcleos, del RE y de los peroxisomas y en el desarrollo sexual.

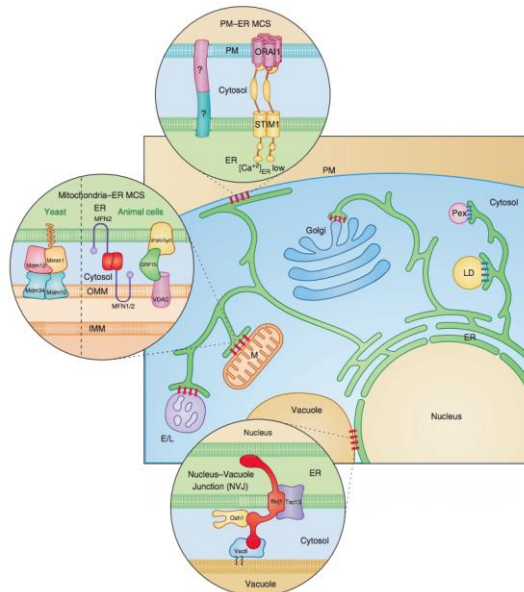
## Abstract

Cell organelles establish physical interactions through molecular tethers, which perform several functions in the regulation of organelle activity. One of the identified tethers that connects the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria in fungi is ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure). This protein complex is composed of four subunits: Mdm10, Mdm12, Mdm34, and Mmm1, and is involved in lipid and calcium exchange, mitochondrial protein assembly, fission, motility, and mitophagy. In all studied species, the absence of any of the ERMES subunits provokes alterations in mitochondrial morphology and mtDNA distribution. In addition, absence of any member of the complex causes growth defects, which may be moderate as in *Neurospora crassa*, to very severe as in *Aspergillus fumigatus*. However, the contribution of ERMES to non-mitochondrial organelle dynamics, and sexual development has been poorly addressed. Previous work has shown that the proteins driving peroxisome and mitochondrial fission as well as some proteins regulating ER structure are involved in the sexual development of *Podospora anserina*, where their elimination affects meiotic development. These observations suggest that the function of these organelles is coordinated during this process. We sought to determine the role of the ERMES complex in this process and in the regulation of mitochondria, ER and peroxisome dynamics by analyzing a temperature sensitive strain with a point mutation in *MDM10*. This mutant has growth defects, and mislocated vacuoles and septa. Mitochondrial, ER and peroxisome morphology is also altered. Although Mdm10 is not essential for karyogamy or meiosis initiation, female gametangia (ascogonia) formation is delayed and sexual development is impaired. These results indicate the ERMES complex is also involved in the regulation of vacuole, nuclei, ER, and peroxisome dynamics and sexual development.

# I. Introducción

## 1.1. Contactos entre membranas

La característica distintiva de la célula eucarionte es la presencia de organelos membranosos. Estos organelos son compartimentos subcelulares delimitados por membranas que realizan tareas bioquímicas específicas en un medio apropiado. Debido a esta compartimentación, es necesaria la existencia de rutas de comunicación que permitan que estos organelos intercambien señales químicas y metabolitos. Existe evidencia que indica que estas funciones son llevadas a cabo en sitios en los que hay conexiones físicas entre los organelos (Figura 1.1.) (ver revisiones de Wu *et al.*, 2018, Phillips y Voeltz, 2016, Elbaz y Schuldiner, 2011).

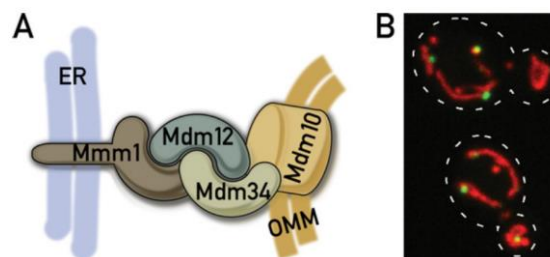


**Figura 1.1. Contactos entre membranas heterotípicas.** Representación esquemática de una célula eucarionte que muestra algunos de los complejos que se han identificado hasta ahora, que forman contactos entre organelos. El RE está en contacto con la membrana plasmática así como con múltiples organelos: mitocondrias, vacuolas (en levaduras y plantas), lisosomas (en animales), endosomas, peroxisomas, aparato de Golgi y gotas lipídicas. Imagen tomada de Elbaz y Schuldiner, 2011.

La interacción de las mitocondrias y el retículo endoplásmico ha sido de las más estudiadas. ERMES (ER-mitochondria encounter structure) es uno de los complejos involucrados en establecer esta interacción. Sus funciones se describen a continuación.

## 1.2. Funciones de ERMES en *Saccharomyces cerevisiae*

La participación del complejo ERMES de *S. cerevisiae* en el establecimiento de contactos entre las mitocondrias y el RE fue descrita por primera vez por Kornmann *et al.* en 2009. Este complejo está formado por cuatro subunidades: Mmm1, Mdm10, Mdm12 y Mdm34 y forma uniones moleculares entre el RE y la mitocondria. Mmm1 está insertada en la membrana del RE, mientras que Mdm10 es un barril  $\beta$  que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. La interacción de estas dos proteínas se da a través de las proteínas Mdm12 y Mdm34. Mdm12 es una proteína citosólica y Mdm34 se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa (Figura 1.2). La ausencia de cualquiera de estas subunidades impide el ensamblaje del complejo y altera tanto la morfología como la respiración mitocondrial (Berger *et al.*, 1997; Burgess *et al.*, 1994; Sogo y Yaffe 1994). Se ha observado que estos defectos se pueden revertir sustancialmente mediante la expresión de un enlace sintético (ChiMERA) (Voss *et al.*, 2012; Kornmann *et al.*, 2009).



**Figura 1.2. Topología y localización del complejo ERMES.** (A) Mmm1 y Mdm10 son proteínas de membrana; la primera está en la membrana del RE, mientras que Mdm10 es un barril  $\beta$  embebido en la membrana externa mitocondrial. Mdm12 es una proteína citosólica y Mdm34 es una proteína asociada a la membrana externa mitocondrial. (B) El complejo ERMES se localiza en sitios discretos dentro de la célula. Detección de la fluorescencia emitida por Mdm34 etiquetada con GFP junto con la de un marcador mitocondrial (rojo). Michel y Kornmann, 2012.

La conexión física entre el retículo endoplásmico y la mitocondria cumple con varias funciones fisiológicas, una de éstas consiste en el intercambio de lípidos. La mayoría de los fosfolípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico y se transportan a otros organelos a través de vesículas y de moléculas encargadas de establecer contactos entre organelos. Este intercambio es necesario para la biogénesis mitocondrial y para la misma

síntesis de lípidos. Por ejemplo, la descarboxilación de la fosfatidilserina para obtener fosfatidiletanolamina es llevada a cabo por la enzima Psd1, que se encuentra en la membrana interna mitocondrial (Voss *et al.*, 2012; Kornmann *et al.*, 2011; Daum y Vance, 1997).

Las conexiones entre el RE y las mitocondrias también promueven el intercambio de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), lo cual es muy importante ya que muchas enzimas mitocondriales dependen de este elemento. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial participa en los mecanismos que desencadenan la apoptosis, por lo que su transferencia está finamente regulada (Pinton *et al.*, 2008; Rizzuto *et al.*, 1993).

Mdm10 también es necesaria para la biogénesis de proteínas mitocondriales a través de su interacción con el complejo SAM (Sorting and Assembly Machinery), que se encarga de ensamblar barriles  $\beta$ , importados por el complejo TOM (Translocase of the Outer Membrane), en la membrana externa mitocondrial. De hecho, Mdm10 también está involucrada en el ensamblaje del complejo TOM y se ha propuesto que promueve la liberación del precursor de su principal componente, Tom40, del complejo SAM. De esta manera, se permite su ensamblaje en el complejo TOM (Ellenreider *et al.*, 2016; Yamano *et al.*, 2010; Meisinger *et al.*, 2004).

Existe un modelo que explica la interacción dinámica de Mdm10 con los complejos SAM y ERMES; éste propone que, una vez que Mdm10 se libera del complejo SAM, Tom7 se une a la región del barril  $\beta$  que estaba en contacto con SAM, de esta manera impide que se vuelva a asociar a este complejo y favorece su traslado a ERMES. Tom7 permanece unida a Mdm10 tras su unión a ERMES, ya que la región de Mdm10 que hace contacto con ERMES está en el lado opuesto de la que interacciona con Tom7. Sin embargo, Tom7 no es una subunidad esencial de ERMES, al igual que Gem1, de la cual se habla a continuación (Ellenreider *et al.*, 2016).

El otro miembro no esencial de ERMES, Gem1 (su ortólogo en mamíferos se conoce como Miro), es una GTPasa de la familia Rho. Esta proteína colocaliza con el complejo ERMES y parece tener un papel regulatorio, ya que su ausencia no compromete el ensamblaje del complejo pero reduce el número de sitios en donde éste se localiza. Estos sitios se identifican como focos de fluorescencia cuando uno de los componentes del

complejo es etiquetado con una proteína fluorescente. De igual manera, la ausencia de Gem1 aumenta el tamaño de estos focos, lo cual sugiere que tiene un papel en la estabilización del complejo. La falta de Gem1 también afecta la respiración y la morfología mitocondriales (Kornmann *et al.*, 2011; Frederick *et al.*, 2004).

Se ha visto que ERMES colocaliza con el complejo de división mitocondrial asociado al retículo endoplásmico (ER-associated Mitochondrial Division o ERMD) durante el proceso en el que los túbulos del RE marcan los sitios de división mitocondrial. Tras la fisión, ERMES permanece en el punto de escisión de una de las mitocondrias recién divididas. Se piensa que Gem1 facilita la separación de la mitocondria hija del segmento del RE que participa en dicha división (Murley *et al.*, 2013; Friedman *et al.*, 2011).

ERMES también está situado en sitios de contacto entre las membranas mitocondriales y en la inmediación de los nucleoides mitocondriales. Es posible que contribuya a la distribución equitativa del DNA mitocondrial entre las mitocondrias hijas, ya que lo pierden frecuentemente en ausencia de ERMES (Meeusen y Nunnari, 2003; Hobbs *et al.*, 2001).

Asimismo, se ha reportado que Mmm1, Mdm10 y Mdm12 son necesarias para la asociación de las mitocondrias a los filamentos de actina, debido a que su ausencia causa defectos en la motilidad mitocondrial (Boldogh *et al.*, 2003; Boldogh *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 1998). También hay evidencia que indica que ERMES se asocia al complejo iniciador de la nucleación de actina Arp2/3 a través de Puf3 (García-Rodríguez *et al.*, 2007).

ERMES también participa en la eliminación selectiva de las mitocondrias por autofagia (mitofagia). Los miembros de este complejo colocalizan con Atg8, que es una proteína que marca los sitios a partir de los cuales crecen los autofagosomas y promueve su maduración. Además, se acumulan autofagosomas inmaduros durante la inducción de la mitofagia en ausencia de ERMES (Böckler y Westermann, 2014).

Recientemente, también se ha descubierto que ERMES tiene un papel en la interacción entre los peroxisomas y las mitocondrias (PerMit). Se ha visto que el 30% de los peroxisomas de células en la fase de crecimiento logarítmico tardía y el 20% en la fase de crecimiento estacionario se encuentran yuxtapuestos a las mitocondrias (Mattiuzzi *et al.*, 2015; Cohen *et al.* 2014).

Además, existe evidencia de una interacción física de la subunidad Mdm34 y la proteína Pex11, la cual se encuentra en la membrana externa peroxisomal y está involucrada en la tubulación y alargamiento de los peroxisomas, así como en el reclutamiento de la maquinaria de fisión (Mattiuzzi *et al.*, 2015; Tower *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2003; Rottensteiner *et al.*, 2003). Otro estudio muestra que Mmm1, Mdm10 y Mdm12 tienen un papel en la regulación del número de peroxisomas; la sobreexpresión de *MMM1*, aunada a la ausencia de Mdm10 o de Mdm12, da como resultado un aumento en el número de peroxisomas por célula. Se cree que Mdm10 y Mdm12 regulan el número de peroxisomas mediante mecanismos diferentes, ya que la eliminación genética de *MMM1* reestablece la población normal de peroxisomas en el contexto de una cepa  $\Delta mdm12$  pero no en el de una  $\Delta mdm10$  (Esposito *et al.*, 2019). La degradación de los peroxisomas por autofagia (pexofagia) también depende del complejo ERMES (Liu *et al.*, 2019).

Es posible que la ausencia del complejo ERMES no sea letal en *S. cerevisiae* debido a que es capaz de llevar a cabo un metabolismo "anaeróbico" y a que existen contactos y vías redundantes. De hecho, los defectos asociados a la disfunción mitocondrial pueden ser corregidos por ciertas mutaciones puntuales dominantes en el gen *VPS13* (Vacuolar Protein Sorting 13). Las sustituciones D716H y L1627S en *Vps13* suprimen los defectos del crecimiento causados por la ausencia de Mmm1 o Mdm10. La primera sustitución también recupera la red tubular de mitocondrias y la estabilidad del DNAm. Sin embargo, estas versiones de *Vps13* no reestablecen la población normal de peroxisomas causada por la ausencia de Mdm10 ni de Mdm12 (Esposito *et al.*, 2019; Lang *et al.*, 2015). También se ha observado que la sobreexpresión de los genes *MCP1* o *MCP2*, cuya función está relacionada con el mantenimiento de la morfología mitocondrial, suprime los defectos en el crecimiento de las cepas  $\Delta mmm1$ ,  $\Delta mdm10$ ,  $\Delta mdm12$  y  $\Delta mdm34$ . Su sobreexpresión también reestablece la estabilidad de los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria ocasionados por la falta de Mdm10, pero no revierte los defectos el ensamblaje de las proteínas de la membrana externa mitocondrial ni reestablece el contenido normal de peroxisomas en cepas carentes de Mdm10 o Mdm12 (Esposito *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2013).



### 1.3. Funciones de ERMES en hongos filamentosos

En el hongo patógeno humano *Aspergillus fumigatus*, la ausencia de *MMM1* o de *MDM34* es letal y la de *MDM10* o *MDM12* ocasiona defectos severos en el crecimiento. La represión de estos genes, ocasiona defectos en el crecimiento del micelio y en la morfología mitocondrial, sin embargo, la reproducción asexual no es afectada. La represión de estos genes también tiene como consecuencia un cambio en la morfología de las mitocondrias; en lugar de alargada, ésta se vuelve amorfa y más grande en la mayoría de los casos. Estas mitocondrias gigantes son casi inmóviles y están acompañadas por unas cuantas mitocondrias pequeñas que se desplazan muy rápidamente. La distribución del DNAm también es anormal; se forman agregados de nucleoides en las mitocondrias gigantes, mientras que las mitocondrias pequeñas pierden su DNAm (Geißel *et al.*, 2017).

En *Aspergillus nidulans*, la disrupción del gen *MDMB* en cultivos crecidos a 37 °C, no ocasiona un cambio drástico en el fenotipo con respecto a la cepa silvestre, sino que solamente ocasiona una ligera compactación de las hifas. En contraste, a 20 °C las colonias crecen un poco más lento. A 37°C, las mutantes nulas en *MDMB*, muestran un fenotipo mitocondrial silvestre, en cambio a 20°C, el 90% de las mitocondrias son grandes, redondas e inmóviles (Koch *et al.*, 2003).

En *Neurospora crassa*, mutaciones en *MMM1* dan lugar a defectos en el crecimiento y causan esterilidad. En cambio, la alteración de *MDM12* ocasiona defectos muy leves y la ausencia de *MDM10* ninguno (Peokisch *et al.*, 2017; Wideman *et al.*, 2013, 2010). Tanto en *A. fumigatus* como en *N. crassa* el papel de *Mmm1* parece ser más relevante que el de las otras proteínas (Geißel *et al.*, 2017; Wideman *et al.*, 2013, 2010).

En *Podospora anserina* se caracterizó una cepa con una mutación puntual en el gen *MDM10*. Este alelo mutante, llamado *mdm10-1*, se aisló en el contexto genético *as1-4*. *AS1* es un gen que codifica una proteína ribosomal citosólica. La expresión de su versión mutante (*as1-4*) causa la muerte prematura del hongo. El alelo *mdm10-1*, permite la supresión de este fenotipo.

A través de cruzas genéticas, se recuperaron cepas con únicamente la mutación supresora. La secuencia del gen mutante *mdm10-1* mostró que la mutación responsable de la supresión de la muerte prematura es la sustitución de la leucina 420 por una prolina, localizada 28 residuos antes del carboxilo terminal (Mdm10<sup>L420P</sup>) (Jamet-Vierny *et al.*, 1997).

La mutación *mdm10-1* ocasiona una alteración en la germinación, un decremento en el volumen del micelio aéreo y una considerable disminución en el crecimiento que se exagera con el aumento de la temperatura. A 35°C, se observa un severo defecto en el crecimiento del micelio, a 27°C se observa una pequeña disminución y a 18°C, no se detectan diferencias con respecto a la cepa silvestre. Además, la mutación *mdm10-1*, modifica la duración de vida del hongo. Esta cepa fue complementada al introducirle un cósmido con el alelo *MDM10* silvestre (Jamet-Vierny *et al.*, 1997).

En cultivos de la cepa con el alelo mutante *mdm10-1* crecidos a 35°C, las mitocondrias teñidas con el colorante 4-Di-1-ASP (4- (4- (dimetilamino) estiril) -N-metilpiridinio yoduro) (DASPMI) de la cepa con el alelo mutante *mdm10-1* muestran un tamaño gigante y una forma redondeada. En la mayoría de los compartimentos de las hifas de cultivos crecidos a 27°C, al igual que en *A. fumigatus* y *A. nidulans*, se encuentran dos poblaciones de mitocondrias: una de mitocondrias normales o alargadas y otra de mitocondrias gigantes. A 18°C las mitocondrias son normales (Jamet-Vierny *et al.*, 1997).

## II. Antecedentes

### 2.1. Modelo de estudio

*P. anserina* un hongo filamentoso pseudohomotático que pertenece a al phylum Ascomycota del reino Fungi. Se utiliza como modelo de estudio debido a que es un sistema conveniente para la manipulación y selección genética y para realizar análisis moleculares.

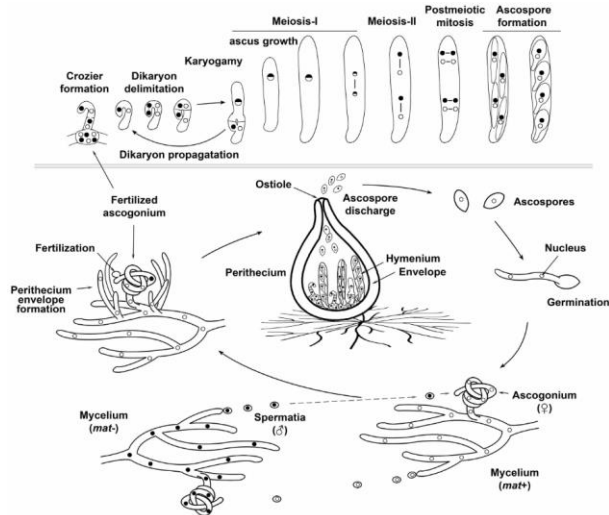
El micelio de *P. anserina* es típico de la subdivisión Pezizomycotina. Su formación comienza con la germinación de una ascospora, de la cual se habla más adelante. Conforme el talo va madurando, se diferencia en diferentes tipos de hifas que se ramifican y anastomosan rápidamente; con el tiempo estos

procesos originan una red interconectada de hifas que se llama micelio. En las hifas también se van formando septos. Estas estructuras contienen un poro central asociado a cuerpos de Woronin, que son peroxisomas modificados y están involucrados en la regulación del flujo protoplásmico a través de dicho poro. El diámetro de los poros es variable, esto sugiere que tienen diferentes funciones. Las hifas líderes, que están creciendo en el borde de las colonias, tienen un diámetro que varía entre los 4 y 6  $\mu\text{m}$ , y contienen una región de agrupación vacuolar que se forma aproximadamente a partir de los 30  $\mu\text{m}$  del ápice. En la región central de las colonias se acumulan pigmentos y se forman hifas aéreas que se elevan debido a que están cubiertas por hidrofobinas. En este micelio se diferencian tanto órganos femeninos como masculinos, que se describen con detalle a continuación (Silar, 2020).

La reproducción sexual de este ascomiceto filamentoso se lleva a cabo en cuerpos fructíferos multicelulares, llamados peritecios, que consisten en tejidos de origen sexual (himenio), rodeados por tejidos de origen materno. Su formación se lleva a cabo de la siguiente manera: los órganos femeninos o ascogonios surgen a partir de una hifa vegetativa curva, la cual atrae más hifas vecinas que finalmente forman una capa protectora alrededor de la primera; esta capa de hifas se convierte en la cubierta del peritecio después de la fertilización. Los ascogonios son fertilizados por células especializadas llamados espermacios o microconidios. Los ascomicetos heterotálicos poseen dos tipos sexuales definidos genéticamente: *mat+* y *mat-*. El micelio de cualquiera de los dos tipos sexuales forma ascogonios y microconidios, pero la fertilización solamente ocurre entre estructuras sexuales del tipo sexual opuesto. Los ascogonios tienen hifas especializadas llamadas tricóginas que muestran tropismo hacia las feromonas producidas por microconidios del tipo sexual opuesto. Eventualmente, esta atracción ocasiona una fusión o plasmogamia entre la hifa tricógina y el microconidio, tras la cual, el núcleo masculino viaja hasta el ascogonio. Los núcleos masculinos y femeninos sufren varias divisiones mitóticas dentro del ascogonio antes de formar las células de linaje meiótico. Después se forman estructuras en forma de gancho llamadas croziers. Cada crozier tiene tres células: una binucleada en la parte superior, que contiene un núcleo de cada tipo sexual (dicarion) y dos células uninucleadas adyacentes a la binucleada. Las dos células uninucleadas se

unen y producen más croziers dicarióticos, mientras que la célula binucleada sufre cariogamia y se convierte en un asca, en la que se lleva a cabo la meiosis (meiocito). Los cuatro núcleos haploides derivados de la meiosis sufren una mitosis. Después, se empaquetan los núcleos vecinos no hermanos en cuatro ascosporas binucleadas (Figura 2.1, panel superior). Estas ascosporas maduran dentro del asca hasta que son expulsadas. Debido a que el locus *mat* segrega durante la segunda división meiótica y a que se empaquetan los núcleos no hermanos (con respecto a la mitosis postmeiótica) en pares, cada ascospora contiene un núcleo de cada tipo sexual, que después de la germinación produce micelio heterocariótico con la capacidad de autofertilizarse (pseudohomotálico). Sin embargo, en el 0.1% de las ascas, la orientación del huso acromático durante la mitosis postmeiótica de uno de los núcleos haploides se da de manera paralela al eje mayor del asca, es decir, de manera perpendicular a la orientación más frecuente. Esto tiene como resultado el empaquetamiento individual de dos núcleos, es decir, la formación de dos ascosporas uninucleadas y de tres binucleadas. Cuando las esporas uninucleadas germinan, producen micelio monocariótico, el cual no puede autofertilizarse debido a que tiene un solo tipo sexual (Figura 2.1) (Silar, 2013).

Es relativamente sencillo seleccionar cepas modificadas con marcadores de selección a partir de ascosporas uninucleadas, así como observar las estructuras implicadas en el desarrollo sexual. Esta última es otra de las características que hacen que *P. anserina* sea un modelo atractivo para llevar a cabo estudios genéticos y para estudiar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo sexual.



**Figura 2.1. Ciclo de vida de *P. anserina*.** La descripción del esquema se encuentra en el texto. Imagen tomada de Peraza-Reyes y Berteaux, 2013.

## 2.2. La dinámica de organelos en *P. anserina*

Nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios para entender la coordinación de la actividad que existe entre los organelos celulares durante el desarrollo vegetativo y sexual. Se han estudiado la dinámica y función de los peroxisomas, de las mitocondrias, de los endosomas y del RE utilizando como modelo el hongo filamentoso *P. anserina*.

Es necesaria la correcta actividad de los peroxisomas y de las mitocondrias durante el desarrollo sexual para la progresión normal de la meiosis en *P. anserina*. En ausencia de algunos factores involucrados en la biogénesis peroxisomal, como Pex5 y Pex7, que actúan como receptores en la importación de proteínas a la matriz peroxisomal, no se lleva a cabo un desarrollo sexual normal (Bonnet *et al.*, 2006). También se sabe que la ausencia de un posible tercer receptor peroxisomal, Pex20, impide la inducción de la meiosis en *P. anserina* (Suaste-Olmos *et al.*, 2018).

Tanto la dinámica peroxisomal como la mitocondrial están reguladas por las proteínas de su maquinaria de fisión Fis1 y Dnm1. La eliminación genética de cualquiera de las dos proteínas afecta la división de ambos organelos durante la fase somática y, además, altera la segregación de los peroxisomas. Estas dos proteínas también son necesarias para el desarrollo meiótico; tanto la ausencia de Fis1 como Dnm1 afecta la diferenciación de las ascosporas, es

decir que la fase meiótica del desarrollo sexual, depende de la correcta actividad de la maquinaria proteica que controla la dinámica y función de los peroxisomas y mitocondrias (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020).

Recientemente, también se ha demostrado que el desarrollo meiótico también depende de la función de las proteínas que determinan la estructura del retículo endoplásmico. La ausencia de Rtn1, la cual es una proteína que pertenece a la familia de los reticulones, ocasiona una orientación aberrante del huso meiótico que tiene como resultado una segregación desigual de los núcleos (López-Fuentes *et al.*, en preparación).

Estas observaciones sugieren que los peroxisomas, las mitocondrias y el RE actúan de manera coordinada durante la fase vegetativa y en el desarrollo sexual, por lo que planeamos estudiar la contribución de ERMES a esta coordinación interorganelar.

### **III. Hipótesis**

El complejo ERMES tiene un papel importante en el desarrollo de *P. anserina*, tanto en la fase vegetativa como en el desarrollo sexual. La perturbación de la función o ausencia de alguno de sus componentes tendrá como consecuencia una alteración en la forma, distribución y/o abundancia de las mitocondrias, del retículo endoplásmico y de los peroxisomas, así como una alteración en el desarrollo sexual que se verá reflejada en el desarrollo de los meiocitos.

### **IV. Objetivo general**

Estudiar la función de la subunidad Mdm10 del complejo ERMES en el desarrollo de *P. anserina*.

#### **Objetivos particulares**

Determinar la participación de Mdm10 en la dinámica de las mitocondrias, del RE y de los peroxisomas de *P. anserina*.

Determinar la participación de Mdm10 en el desarrollo sexual de *P. anserina* y en particular, en el desarrollo de los meiocitos.

## V. Materiales y métodos

### 5.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *P. anserina* utilizadas en este estudio (Tabla 5.1) se obtuvieron a partir de la cepa silvestre S (Rizet y Engelmann, 1949), cuyo genoma ha sido secuenciado por Espagne *et al.*, 2008.

El medio mínimo de cultivo M2 contiene 1.1% de dextrina como fuente de carbono. El medio con ácido oleico contiene 0.05% de éste en lugar de dextrina, más 0.2% de TWEEN 40 que actúa como emulsificador. Las ascosporas germinaron en medio GYE con 0.5% de extracto de levadura y 0.6% de acetato de amonio. Los protoplastos se regeneraron en medio RG que contiene 20.5% de sacarosa como estabilizador osmótico. Se agregó fleomicina (40 µg/mL), hygromicina B (30 µg/mL), nourseotricina (40 µg/mL) o un análogo de la geneticina (G418, 100 µg/mL) al medio M2 o RG en los casos necesarios. Los cultivos crecieron a 27°C, 33°C o a 37°C. La composición detallada de los medios se encuentra en la página <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/>

**Tabla 5.1. Cepas utilizadas en este estudio.**

Cepa	Descripción	Fuente
S	<i>mat+/mat-</i>	Rizet y Engelmann 1949
$\Delta ku70$	<i>mat+</i>	El-Khoury <i>et al.</i> , 2008
<i>mdm10-1</i>	<i>Mdm10<sup>L420P</sup>; mat+</i>	Jamet-Vierny <i>et al.</i> , 1997
$\Delta mat$	Carece de locus <i>mat</i> completo, que determina el tipo sexual	Coppin <i>et al.</i> , 1993
FS130	<i>IDH1::mCherry; mat+</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
FS131	<i>IDH1::mCherry; mat-</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
AL120	<i>BiP::GFP; mat+</i>	López-Fuentes <i>et al.</i> , 2020
AL125	<i>BiP::GFP; mat-</i>	López-Fuentes <i>et al.</i> , 2020
MA25	<i>mdm10-1; IDH1::mCherry; mat+</i>	Este trabajo
MA29	<i>mdm10-1; BiP::GFP; mat+</i>	Este trabajo
MA30	<i>mdm10-1; BiP::GFP; mat+</i>	Este trabajo
MA23	<i>mdm10-1; BiP::GFP; mat-</i>	Este trabajo
MA31	<i>mdm10-1; BiP::GFP; mat-</i>	Este trabajo

---

MA57	<i>BiP::GFP; IDH1::mCherry;</i>	Este trabajo
	<i>mat+</i>	
MA54	<i>BiP::GFP; IDH1::mCherry;</i>	Este trabajo
	<i>mat-</i>	
MA51	<i>mdm10-1; BiP::GFP;</i>	Este trabajo
	<i>IDH1::mCherry; mat-</i>	
FS23	<i>FOX2::GFP; mat+</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
FS24	<i>FOX2::GFP; mat-</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
MA76	<i>mdm10-1; FOX2::GFP;</i>	Este trabajo
	<i>mat+</i>	
RN1	<i>FOX2::GFP;</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
	<i>IDH1::mCherry; mat+</i>	
RN5	<i>FOX2::GFP;</i>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
	<i>IDH1::mCherry; mat-</i>	
MA66	<i>mdm10-1; FOX2::GFP;</i>	Este trabajo
	<i>IDH1::mCherry; mat-</i>	

---

## 5.2. Análisis bioinformáticos

### 5.2.1. Identificación de los genes del complejo ERMES en el genoma de *P. anserina* y alineamiento de secuencias homólogas

Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de las subunidades del complejo ERMES de *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, que se encuentran en la base de datos de NCBI, para identificar sus homólogos en el genoma de *P. anserina* (Espagne *et al.*, 2008) con los programas BLAST (Camacho *et al.*, 2009) y FUNGIpath (Grossetête *et al.*, 2010). Con los mismos algoritmos se identificaron homólogos en otras especies de hongos. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó con la herramienta de alineamiento múltiple MUSCLE 3.8 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

### 5.2.2 Obtención del modelo tridimensional de PaMdm10

Para obtener el modelo de PaMdm10 se utilizó la herramienta SWISS-MODEL Workspace (Waterhouse *et al.*, 2018) y para visualizarlo se utilizó el programa Swis-PdbViewer (Guex *et al.*, 2009). Debido a que no se ha determinado la estructura tridimensional de PaMdm10, el modelo usó como molde la

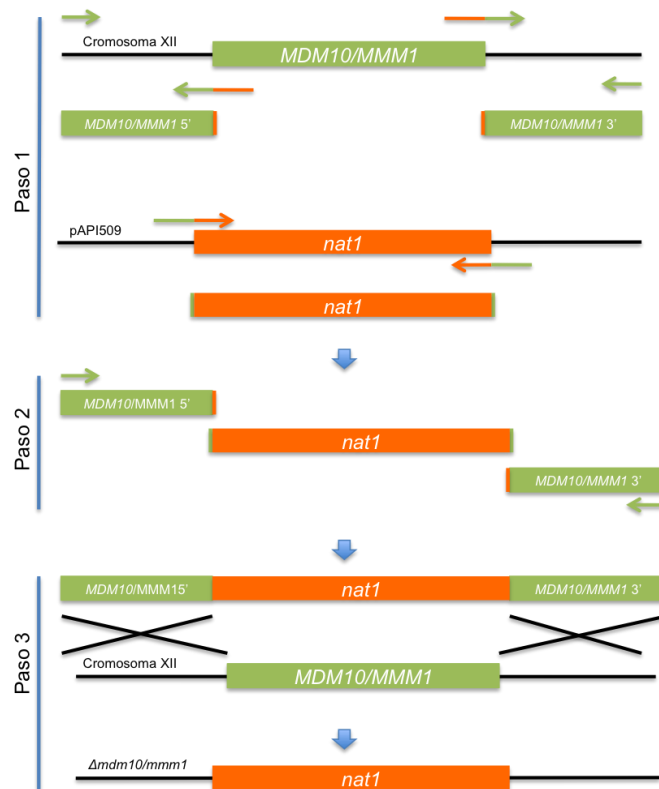


estructura tridimensional de Tom40 de *N. crassa* obtenida mediante criomicroscopía electrónica (Bausewein *et al.*, 2017).

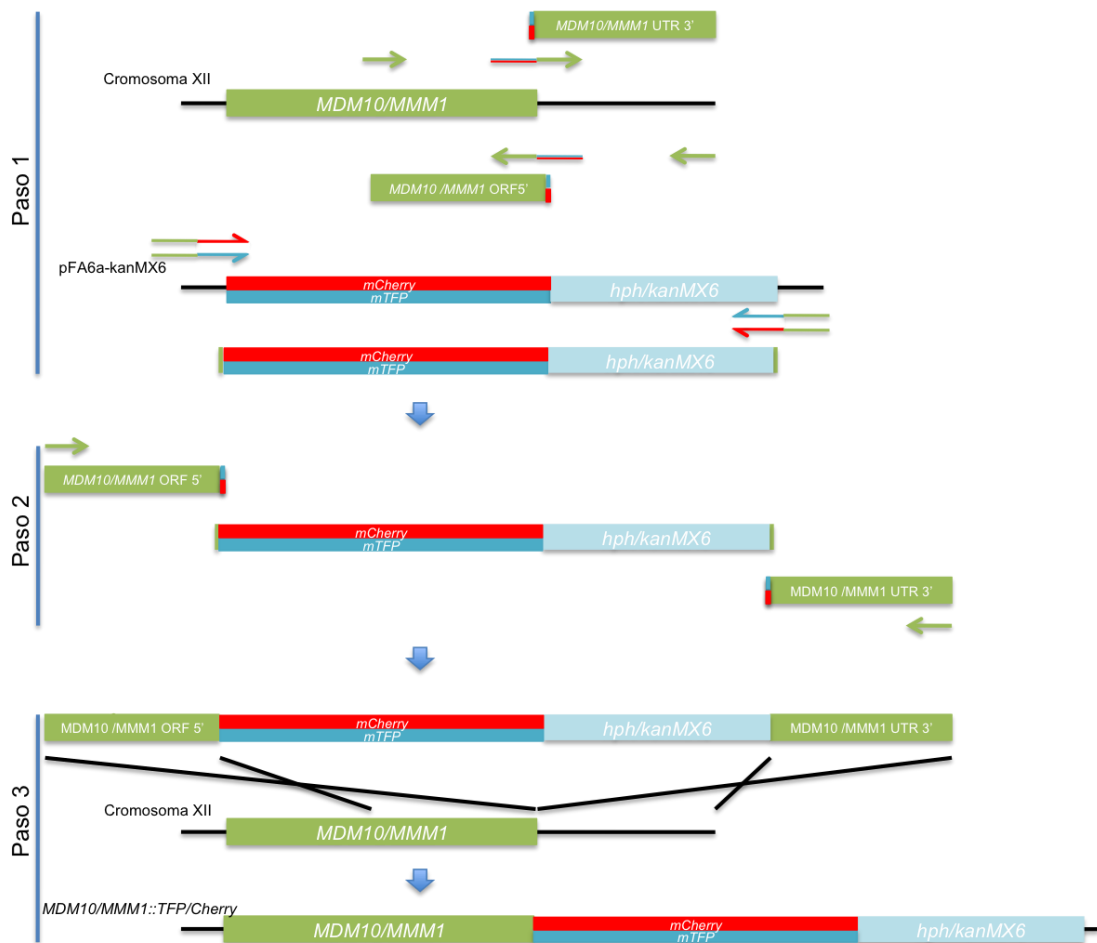
### 5.3. Técnicas de Biología molecular

#### 5.3.1 Estrategia para la modificación genética de *MDM10* y *MMM1*

La eliminación y fusión de los genes se hizo mediante la técnica "Double Joint PCR", que consiste en la amplificación de las regiones 5' y 3' que flanquean la región que se desea eliminar y de la secuencia que se va a utilizar para reemplazarla (Yu *et al.*, 2004). En el caso de la eliminación genética, esta última secuencia es un marcador de selección. En el caso en que se desea obtener una proteína etiquetada, se incluyen las secuencias codificantes de la proteína fluorescente, de una secuencia bisagra y de un marcador de selección. La secuencia del gen *nat1*, que se utilizó como marcador de la eliminación genética, se amplificó a partir del plásmido pAPI509 (Tabla 5.3 y Figura 5.1). La secuencia bisagra, el gen *mTFP* (monomeric teal fluorescent protein) y el marcador de resistencia a geneticina *kanMX6*, se amplificaron a partir del plásmido pFA6a-kanMX6. El gen *mCherry*, la secuencia bisagra y el módulo de resistencia a higromicina *hph*, se amplificaron a partir del plásmido pUC-Cherry-Hyg<sup>R</sup> (Tabla 5.2 y Figura 5.2). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de DNA (Tabla 5.3) le añadieron secuencias adaptadoras, tanto a los amplicones 5' y 3' como a las secuencias de inserción, para permitir su complementariedad y por lo tanto, su fusión en una segunda reacción de PCR.



**Figura 5.1. Estrategia de "Double Joint PCR" para la eliminación de los genes *MDM10* y *MMM1* de *P. anserina*.** Se amplificaron las regiones 5' y 3' adyacentes al ORF de interés y del gen de resistencia a nourseotricina (*nat1*) a partir de DNA genómico de la cepa S *mat+* de *P. anserina* y de DNA del plásmido pAPI509 respectivamente. Estos fragmentos se utilizaron como molde para una segunda reacción de PCR que permitió obtener el producto final, es decir la fusión de los tres. Esta construcción se utilizó para reemplazar el ORF del gen *MDM10/MMM1* por el marcador selectivo mediante recombinación homóloga.



**Figura 5.2. Estrategia de "Double Joint PCR" para la construcción de versiones de los genes *MDM10* y *MMM1* que expresen proteínas etiquetadas con mTFP y mCherry.** Se amplificaron las regiones 5' y 3' adyacentes al codón de paro, es decir el fragmento 3' del ORF del gen de interés (excluyendo el codón de paro) y otro de la secuencia UTR 3' que se encuentra después de éste, así como del gen *mCherry* o *mTFP* fusionado con una secuencia bisagra y seguido del marcador de selección *hph* o *kanMX6* (este último fue derivado del gen *kan* de *E. coli*). Los primeros dos fragmentos fueron amplificados a partir de DNA genómico de la cepa *S mat+* de *P. anserina*, mientras que los genes *mCherry* y *mTFP* se amplificaron a partir de los plásmidos pUC-Cherry-Hyg<sup>R</sup> y pFA6a-kanMX6 respectivamente. Estos fragmentos se utilizaron como molde para una segunda reacción de PCR que permitió obtener el producto final, es decir la fusión de los tres. Estas construcciones se integraron al genoma de *P. anserina* mediante recombinación homóloga.

### 5.3.2. Extracción de DNA genómico de *P. anserina*

El micelio de un cultivo de 48 h se congeló a -70°C y después se liofilizó durante 1.5 h luego se trituró y resuspendió en 500 µL de una solución que contenía 50 mM de EDTA pH 8 y 0.2% de SDS. Se incubó durante 15 min a 70°C.

Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M para precipitar proteínas y se incubó en hielo durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se centrifugó la muestra durante 10 min a 14549  $\times$  g. Al sobrenadante se agregó 1  $\mu$ L de RNAsa (10 ng/mL) y se incubó durante 10 min a 37°C. Después se agregaron 200  $\mu$ L de fenol/cloroformo (1:1). Se mezcló vigorosamente hasta que la solución se volvió blanquecina. Se volvió a centrifugar durante 5 min a la misma velocidad. Luego se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo a la fase acuosa. Se volvió a centrifugar la muestra durante 5 min a la misma velocidad. Posteriormente, se agregó 1 mL de etanol puro a la fase acuosa, se centrifugó otros 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el mismo proceso con etanol al 70%. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ L de TE pH 8.

### 5.3.3. Extracción de DNA de plásmido

El DNA de los plásmidos listados en la Tabla 5.2 se extrajo a partir de células de *E. coli* de la cepa TOP10, con el estuche comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit” de la compañía QIAGEN (Hilden, Alemania).

**Tabla 5.2. Plásmidos utilizados en este estudio.**

Nombre	Descripción	Fuente
pAPI509	Derivado de pAPI508 (El-Koury <i>et al.</i> , 2008); Nou <sup>R</sup>	Navarro-Espíndola <i>et al.</i> , 2020
pUC-Cherry-Hyg <sup>R</sup>	Hyg <sup>R</sup>	Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
pFA6a-kanMX6	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ), Geneticina/G418 <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> /P. <i>anserina</i> )	Longtine <i>et al.</i> , 1998

### 5.3.4. Reacciones de PCR

Se utilizó la enzima AccPrime Pfx de la compañía Invitrogen (Carlsbad, California), para amplificar los fragmentos de DNA siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3. Pares de oligonucleótidos utilizados para la eliminación y fusión de genes.**

Nombre	Secuencia	Amplicón	Tamaño (pb)
mdm10-5F nour-mdm10-5R	GATTTCCGGACAAGTCAGTGTGGGC GAAGCATTATCAGGGTCTCCTCAATGCAGACCTG	Región 5' de <i>MDM10</i>	767

nour-mdm10-3F	GTATTCAACATTTCCGTGTAATGCCACGAGGAATG	Región 3' de <i>MDM10</i>	793
mdm10-3R	AAGCGCAACTACCACTACTGCAGAG		
mdm10-nour-F	CAGGTCTGCATTGAGGAGACCCTGATAAATGCTTC	Gen <i>nat1</i>	1501
mdm10-nourR	CATTCCTCGTGGGCATTACACGGAAATGTTGAATAC		
mdm10-5F	GATTTCCGGACAAGTCAGTGTGGGGC	Fusión de los fragmentos para la eliminación de <i>MDM10</i>	2993
mdm10-3R	AAGCGCAACTACCACTACTGCAGAG		
mdm10-orf-F	AATACGGGAGTCGAGGGGCTTACTC	Región 5' del codón de paro de <i>MDM10</i> (ORF)	777
pfa6-mdm10-Ru	TAATTAACCCGGGGATCCGAGAAGAGTATTGCACTTCCA		
pfa6-mdm10-Fu	GTTTAAACGAGCTCGAATTCGAAGACGGCTGTTAATGC	Región 3' del codón de paro de <i>MDM10</i> (UTR)	808
mdm10-3R	AAGCGCAACTACCACTACTGCAGAG		
mdm10-pfa6-F2	TGGAAGTGCAATACTCTTCTCGGATCCCCGGGTTAA	Gen <i>mTFP</i> , secuencia bisagra y gen <i>kanMX6</i>	2435
mdm10-pfa6-R1	GCATTAACAGCCGTCTTTCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC		
mdm10-orf-F	AATACGGGAGTCGAGGGGCTTACTC	Región 5' del codón de paro de <i>MDM10</i> (ORF)	774
lkt-mdm10Ru	TAAACCAGCACCGTCACCAGAAGAGTATTGCACTTCCA		
hph-mdm10-Fu	TCCGAGGGCAAAGGAATAGAAGACGGCTGTTAATGC	Región 3' del codón de paro de <i>MDM10</i> (UTR)	806
mdm10-3R	AAGCGCAACTACCACTACTGCAGAG		
mdm10-lkt-F	TGGAAGTGCAATACTCTTCTGGTGACGGTGCTGGTTA	Gen <i>mCherry</i> , secuencia bisagra y gen <i>hph</i>	2555
mdm10-hph-Ru	GCATTAACAGCCGTCTTCTATTCCCTTGGCCCTCGGA		
mdm10-orf-F	AATACGGGAGTCGAGGGGCTTACTC	Fusión de los fragmentos para etiquetar a Mdm10 con <i>mTFP</i> y <i>mCherry</i>	3942, 4063
mdm10-3R	AAGCGCAACTACCACTACTGCAGAG		
mmm1-5F	GGTACAGGGGCTGAGACATGTTGAG	Región 5' de <i>MMM1</i>	860
nour-mmm1-5R	GAAGCATTTATCAGGGTGCCTGCTCAAGAAATTCG		
nour-mmm1-3F	GTATTCAACATTTCCGTGCTCATCTCCAAAGTCCCG	Región 3' de <i>MMM1</i>	730
mmm1-3R	ACGCGCGTTTATGAAGGGTATCATG		
mmm1-nourF	CGAATTTCTTGAGCAGCGACCCTGATAAATGCTTC	Gen <i>nat1</i>	1501
mmm1-nourR	CGGGACTTTGGAGATGAGCACGGAAATGTTGAATAC		
mmm1-5F	GGTACAGGGGCTGAGACATGTTGAG	Fusión de los fragmentos para la eliminación de <i>MMM1</i>	3023
mmm1-3R	ACGCGCGTTTATGAAGGGTATCATG		
mmm1-orf-F	ACCCTGACCATTGGCTCGATTCTTG	Región 5' del codón de paro de <i>MMM1</i> (ORF)	949
pFA6-mmm1-Ru	TAATTAACCCGGGGATCCGTGTAGGCATGTCGATGCC		
pFA6-mmm1-Fu	GTTTAAACGAGCTCGAATTCGACGGTTACAATCTGGA	Región 3' del codón de paro de <i>MMM1</i> (UTR)	765
mmm1-3R	ACGCGCGTTTATGAAGGGTATCATG		
1-pFA6-F2	GGCATCGACATGCCTACACGGATCCCCGGGTTAATTA	Gen <i>mTFP</i> , secuencia bisagra y gen <i>kanMX6</i>	2435
1-pFA6-R1	TCCAGATTGTAACCGTCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC		
mmm1-orf-F	ACCCTGACCATTGGCTCGATTCTTG	Fusión de los fragmentos para etiquetar a Mmm1 con <i>mTFP</i>	4071
mmm1-3R	ACGCGCGTTTATGAAGGGTATCATG		

### 5.3.5. Purificación de productos de PCR

Los productos de las reacciones de PCR se purificaron con el estuche

comercial “Illustra GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit” de la compañía GE healthcare Life Sciences (Chicago, EUA).

### **5.3.6. Corrimiento electroforético**

Se verificó la integridad e identidad del DNA extraído y purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## **5.4. Transformación de *P. anserina***

### **5.4.1. Preparación de protoplastos**

Se inoculó micelio fragmentado a un medio M2 líquido, suplementado con 2.5 mg/mL de extracto de levadura, con micelio fragmentado. Se incubó durante tres días a 27°C. Se colectó el micelio filtrando el cultivo a través de gasa. Se lavó con solución TPS1 (0.6 M sacarosa, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Se pesó el micelio colectado y se agregó una cantidad equivalente en mL de TPS1 con Glucanex (40 mg/mL). Se digirió durante 2-3 h a 37°C. Se separaron los protoplastos del micelio no digerido a través de gasa y se concentraron mediante centrifugación a 1652 × g. Se lavaron dos veces con TPS1 y una vez con TPC (0.6 M sacarosa, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH 7.5). La pastilla obtenida se resuspendió en TPC y se determinó la concentración de protoplastos con un hemocitómetro. Se transformaron inmediatamente o almacenaron a -70°C.

### **5.4.2. Transformación de protoplastos**

Los protoplastos se sometieron a un choque térmico de 48°C durante 5 min, después se transfirieron a hielo durante 30 segundos. Luego se agregaron entre 3 y 6 µg de DNA en un volumen máximo de 10 µL por cada 100 µL de protoplastos. Se mezcló suavemente la mezcla por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se añadió una solución de PEG (60% polietilenglicol 4000, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH7.5), se mezcló suavemente y se volvió a incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron 5 mL de RG sin antibiótico a la muestra, se mezcló un par de veces por inversión y se vació sobre medio RG selectivo. Se incubó a

27°C en condiciones de oscuridad durante 3-6 días o hasta detectar colonias (Coppin-Raynal *et al.*, 1989).

## 5.5. Obtención de cepas

Se obtuvieron esporas uninucleadas (homocarióticas) *mdm10-1* mediante cruza genética para obtener cepas con una duración de vida normal para evitar que los resultados fueran afectados por procesos tempranos de senescencia. Las cepas *mdm10-1* que expresan proteínas fluorescentes *ldh1-mCherry*, *ER-GFP* y *Fox2-GFP* también fueron obtenidas mediante cruza genética. Estas cruza se realizaron creciendo cepas de tipos sexuales opuestos en medio M2, durante 72 h, a 27°C y bajo luz constante para inducir la conidiación. Al cabo de este tiempo, se esparcieron los microconidios para favorecer la fertilización de los ascogonios, agregando 2 mL de agua estéril al cultivo. A partir de otras 72 h de incubación en las mismas condiciones, se colectaron las esporas proyectadas por los peritecios. Las cepas se aislaron a partir de las esporas uninucleadas provenientes de ascas de 5 esporas.

## 5.6. Desarrollo sexual

### 5.6.1. Análisis a 27°C

Los análisis del desarrollo sexual se llevaron a cabo en cruza sexuales de cepas homocarióticas. Las cruza sexuales se realizaron haciendo crecer cepas homocarióticas y heterocarióticas para *MDM10* y *mdm10-1* de tipos sexuales opuestos en el mismo medio de cultivo, o bien, cepas heterocarióticas portadoras de núcleos de tipo sexual opuesto, durante 3 (cepas S y *mdm10-1*), 4, 5 o 6 días (cepas *mdm10-1*) antes de la fertilización. Para la obtención de mosaicos tricarióticos, primero se generaron cepas dicarióticas portadoras de un núcleo mutante para *MDM10* (*mdm10-1*) y silvestre para el locus *mat* (*i. e.*, *mdm10-1 mat+* o *mdm10-1 mat-*) y de un núcleo silvestre para *MDM10*, así como una cepa adicional con una delección del locus *mat* completo (*MDM10<sup>+</sup> Δmat*). Para obtener estas cepas se fragmentó el micelio de cultivos jóvenes en crecimiento ( $\leq 3$  cm) de las cepas homocarióticas con los genotipos correspondientes. Después se mezcló el micelio fragmentado de cada cepa

fértil para que, mediante anastomosis, se fusionaran sus hifas. Este micelio dicariótico (*mdm10-1 mat+/MDM10<sup>+</sup> Δmat*) se confrontó con micelio de una cepa monocariótica *mdm10-1* de tipo sexual complementario (*i. e.*, *mdm10-1 mat-*), para efectuar una cruce sexual entre ellas, como se describió con anterioridad. Como controles, se efectuaron cruces entre cepas portadoras de núcleos silvestres para *MDM10* y *mat* en contextos tanto heterócigos (*i. e.*, *MDM10<sup>+</sup> mat-* × *mdm10-1 mat+/MDM10<sup>+</sup> Δmat*) como homócigos (*i. e.*, *MDM10<sup>+</sup>mat+/MDM10<sup>+</sup>Δmat* × *MDM10<sup>+</sup> mat-*) para *MDM10*. Cuatro días posteriores a la fertilización, se extrajeron las ascas sexuales del interior de los peritecios (el himenio) de estas cruces para su análisis. Para determinar el número de ascas normales se evaluó el número y la morfología de las esporas en ascas maduras. Se consideraron como normales las ascas que tenían 4 esporas del mismo tamaño (binucleadas), las que tenían 3 esporas binucleadas y 2 pequeñas (uninucleadas) y las que tenían 2 esporas binucleadas y 4 uninucleadas. Se realizaron 3 experimentos independientes analizando por lo menos 100 ascas por cepa, de 6 peritecios diferentes.

### **5.6.2. Análisis tras choque térmico**

Ya que las mutantes *mdm10-1* son termosensibles, también analizamos su desarrollo sexual ante diferentes tratamientos térmicos, para ello se hicieron crecer como se describió en el punto anterior pero, tras un día de haber inducido la fertilización, se sometieron un choque térmico de 33°C. Al cabo de 12 h, se regresaron a 27°C, donde permanecieron hasta el final del ensayo. Se analizaron las ascas después de 5 días de la fertilización debido a que el choque ocasionó un ligero retraso en el desarrollo de las esporas. Se analizaron por lo menos 100 ascas por cepa, de 6 peritecios diferentes.

### **5.7. Análisis del crecimiento vegetativo**

El crecimiento del micelio se analizó midiendo el radio de las colonias cada 24 h durante 4 días. Para evitar posibles efectos del almacenamiento o envejecimiento, los explantes de micelio utilizados para inocular las colonias analizadas provenían siempre de micelio joven en crecimiento ( $\leq 3$  cm). La tasa de crecimiento corresponde a la pendiente de la parte recta de la curva de



crecimiento. Para cada cepa, se llevó a cabo el análisis 3 veces en M2 a 27°C, 2 veces en ácido oleico a 27°C y una vez en M2 a 37°C.

## **5.8. Citología**

Las imágenes de células *in vivo* se obtuvieron de colonias de cultivos de 24 h en medio M2 que tenía 0.55% de dextrina y 2% agarosa en lugar de agar. Los explantes de micelio utilizados para inocular las colonias analizadas provenían siempre de micelio joven en crecimiento ( $\leq 3$  cm). Las observaciones se llevaron a cabo en el plano medio de las hifas líderes de al menos tres colonias independientes, salvo las de los peroxisomas, que solamente se llevó a cabo en una sola colonia. Para los análisis, se utilizaron las micrografías originales.

### **5.8.1. Análisis del grosor de hifas, de localización de septos, de frecuencia y orientación de ramificaciones y de localización de vacuolas**

El grosor de las hifas se midió a una distancia del ápice de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ . Se utilizó la longitud del eje medio de las hifas analizadas para realizar análisis ulteriores. Se dividió el número de ramificaciones entre la longitud de hifa analizada para obtener la frecuencia de ramificaciones. Para analizar su orientación, se consideraron como anormales las ramificaciones que formaban un ángulo mayor a 90° con respecto al eje medio de la hifa líder. Se consideró que las vacuolas estaban mal localizadas si no formaban agrupaciones a partir de 20  $\mu\text{m}$  del ápice que abarcaran por lo menos 20  $\mu\text{m}$  de longitud de la hifa.

### **5.8.2. Análisis de las mitocondrias**

Para observar la morfología mitocondrial se utilizó la subunidad no catalítica de la isocitrato deshidrogenasa 1 (Ihd1) etiquetada con mCherry, que se localiza en la matriz mitocondrial, expresada desde su locus endógeno (Suaste-Olmos *et al.*, 2018).

### **5.8.3. Análisis del retículo endoplásmico**

Para observar el retículo endoplásmico se utilizó la proteína RE-GFP (GFP flanqueada por la secuencias de localización y de retención (KDEL) del retículo endoplásmico de la chaperona BiP o Kar2, cuya secuencia está integrada ectópicamente en el genoma de *P. anserina* (López-Fuentes *et al.*, 2020). Las

imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ. Se estableció el umbral para detectar los dominios apicales de RE. Su número y área correspondientes fueron determinados con el analizador de partículas incluido en este programa.

#### **5.8.4. Análisis de los peroxisomas**

Para observar los peroxisomas se utilizó la proteína Fox2-GFP expresada desde su locus endógeno. Se analizó la distribución de los peroxisomas obteniendo el perfil de fluorescencia del eje medio de la hifa. Para analizar la densidad de peroxisomas se calculó la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por área de cada hifa. Las imágenes fueron procesadas de la misma manera que las del RE.

### **5.9. Microscopía**

La obtención de imágenes fue realizada en un microscopio Nikon Eclipse E600 con una cámara neo Andor sCMOS o con un microscopio confocal invertido con escaneo de láser Zeiss LSM-800 equipado con una cámara de temperatura controlada (a 27°C o a 37°C). En el microscopio confocal se utilizó un objetivo de inmersión en aceite PlanApochromat 63x/1.4 y las longitudes de onda 405, 488 y 561 nm para obtener las imágenes. Las imágenes del campo claro se tomaron utilizando el módulo Electronically Switchable Illumination and Detection (ESID). Para los videos, se tomaron simultáneamente imágenes de los canales utilizados (GFP y mCherry). Las imágenes fueron procesadas con el paquete FIJI de ImageJ (NIH, Bethesda, EU) (Schneider *et al.*, 2010) o con el software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

### **5.10. Análisis estadísticos**

Para determinar si las diferencias entre las cepas S y *mdm10-1* eran significativas, se realizaron pruebas t de Student. Para esto, se utilizaron los datos obtenidos de al menos 3 colonias independientes, a excepción del análisis de los peroxisomas, en este caso se utilizaron los datos de hifas de una sola colonia. Tanto los análisis estadísticos como las gráficas se realizaron con el programa Prism 6.

## VI. Resultados

### 6.1. El genoma de *P. anserina* contiene una copia de cada gen del complejo ERMES

Se identificaron los genes homólogos a *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* y *MDM34* de *S. cerevisiae* y *S. pombe* en el genoma de *P. anserina* (Tabla 6.1.) para verificar que tuviera los genes del complejo ERMES. También se calculó el porcentaje de similitud entre los genes de *P. anserina* y sus homólogos en otros hongos utilizados como modelo de estudio (Tabla 6.2.) utilizando los algoritmos BLAST y FUNGIpath ya que esta semejanza podría correlacionarse con la función de sus productos proteicos. Hay una mayor similitud entre los genes de *P. anserina* y los de los hongos filamentosos seleccionados que los de las levaduras debido a que pertenecen a la misma subdivisión (Pezizomycotina). Tanto *P. anserina* como *N. crassa* forman parte de la clase Sordariomycetes, esta estrecha relación filogenética explica la gran semejanza entre sus genes homólogos.

**Tabla 6.1. Características de los genes que codifican los componentes esenciales del complejo ERMES en *P. anserina*, su tamaño en pb y número de residuos de aminoácidos de sus productos proteicos.**

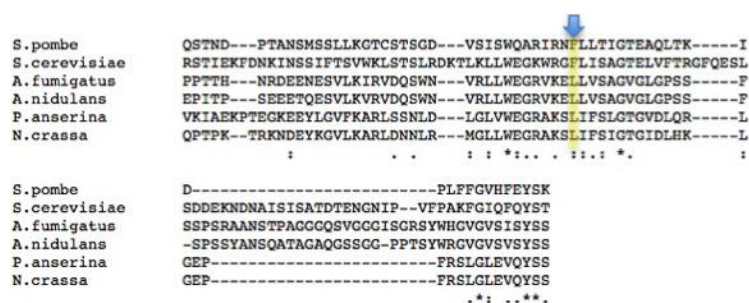
Gen	Cromosoma	Locus	Pb	Residuos de a.a. del polipéptido
<i>MMM1</i>	7	350	236	412
<i>MDM10</i>	7	1600	344	448
<i>MDM12</i>	1	220	650	550
<i>MDM34</i>	7	170	632	544

**Tabla 6.2. Porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los miembros esenciales de ERMES de *P. anserina* y los de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *N. crassa*.**

Polipéptido	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Mmm1	42	45	78	43	38
Mdm10	35	33	67	33	27
Mdm12	62	63	62	28	35

## 6.2. El residuo sustituido en Mdm10<sup>L420P</sup> está conservado en hongos filamentosos

Se realizó un alineamiento de algunos polipéptidos ortólogos a PaMdm10 para determinar si el aminoácido sustituido en la proteína Mdm10<sup>L420P</sup> codificada por el alelo *mdm10-1* está conservado en otras especies de hongos (Figura 6.1). Este residuo está conservado en la subdivisión Pezizomycotina pero no en Saccharomycotina ni en Taphrinomycotina.



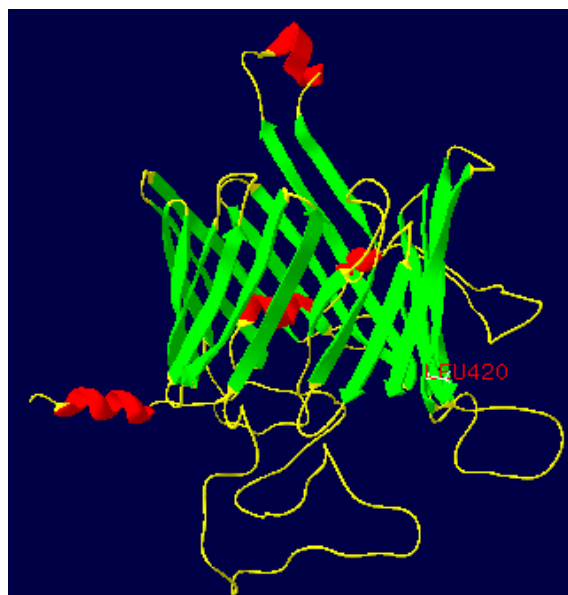
**Figura 6.1. El residuo de leucina en la posición 420 de Mdm10 de *P. anserina* está conservado en especies de hongos filamentosos utilizados como modelos de estudio.**

Alineamiento de la región C terminal de las secuencias de a. a. de proteínas codificadas por genes homólogos a *MDM10* de *P. anserina* que muestra (en amarillo) el residuo sustituido en el polipéptido codificado por el alelo mutante *mdm10-1*. Alineamiento realizado con MUSCLE 3.8.

## 6.3. El residuo sustituido en el producto de *mdm10-1* se encuentra en la penúltima lámina del barril $\beta$

Para determinar la estructura de PaMdm10 y encontrar el sitio en que se encuentra la sustitución L410P, se elaboró un modelo tridimensional de PaMdm10 utilizando como molde la estructura cristalográfica de Tom40 de *N. crassa* con el programa Swiss-Model Workplace (Figura 6.2). El modelo muestra que PaMdm10 está conformada por un barril  $\beta$  de 19 cruces transmembranales, varias hélices  $\alpha$  y numerosas regiones de estructura no repetitiva. De acuerdo a este modelo, las hélices de su región C terminal atraviesan el poro, de tal manera que esta región se encuentra en el espacio

intermembranal de la mitocondria. El extremo amino también está orientado hacia el espacio intermembranal (Shiota *et al.*, 2015). El residuo 420 se encuentra en la penúltima lámina del barril, muy cerca de la región intermembranal, así que es posible que su sustitución afecte el ensamblaje de este barril  $\beta$ .

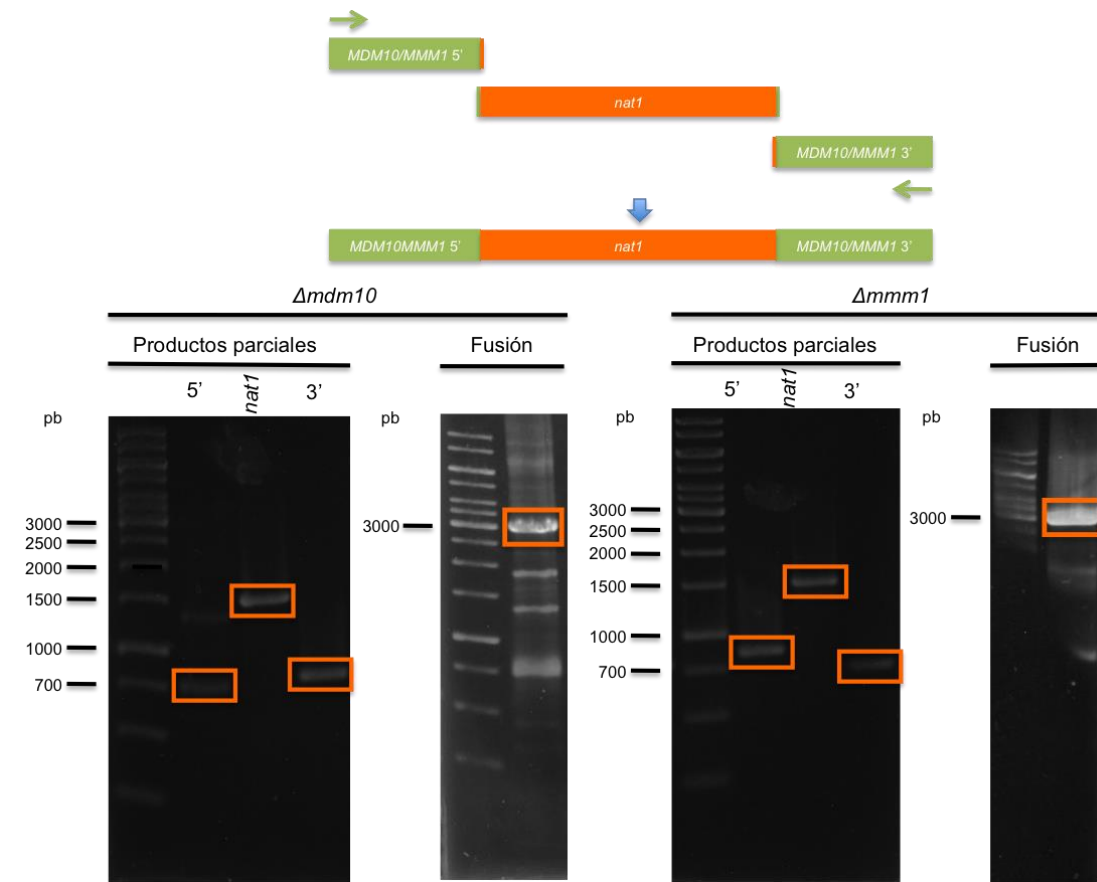


**Figura 6.2. Modelo tridimensional de Mdm10 de *P. anserina* basado en la estructura cristalográfica de Tom40 de *N. crassa*.** Mdm10 está conformado por un barril  $\beta$  de 19 cruces transmembranales, varias hélices  $\alpha$  y largas asas formadas por regiones de estructuras no repetitivas. La región N terminal tiene varias hélices  $\alpha$  que predeciblemente atraviesan el poro del barril del citosol al espacio intermembranal. El residuo sustituido en la mutante *mdm10-1* (L420P) se encuentra en la penúltima lámina  $\beta$ . Las hélices  $\alpha$  se muestran en rojo, las láminas  $\beta$  en verde y las estructuras no repetitivas en amarillo. Elaborado con SWISS-MODEL Workspace.

#### 6.4. Eliminación genética de *MDM10* y *MMM1*

Para entender el papel del complejo ERMES en el desarrollo de *P. anserina*, se intentaron eliminar los genes *MDM10* y *MMM1*. En primer lugar se obtuvieron los productos de PCR parciales para generar las construcciones  $\Delta mdm10$ , es decir las amplificaciones de las regiones 5' y 3' adyacentes a los genes *MMM10* y *MMM1* y el casete portador del marcador selectivo (gen *nat1*). Se realizó una segunda reacción de PCR utilizando estos fragmentos como molde para generar el producto final, es decir, la fusión de ambos genes

(Figura 6.3).



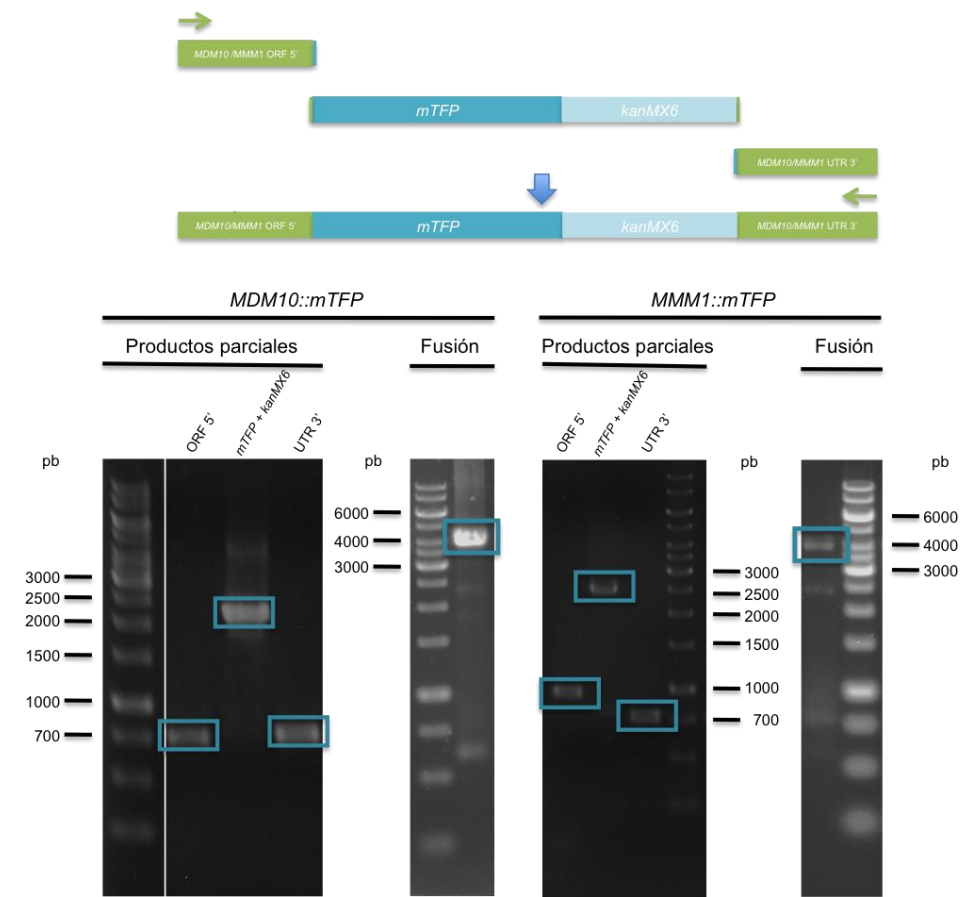
**Figura 6.3. Construcciones genéticas para la eliminación de *MDM10* y *MMM1*.** En la parte superior se muestra un esquema de los productos parciales (fragmentos 5' y 3' adyacentes a los genes de interés y casete *nat1*) y de sus fusiones que se utilizarán para sustituir los genes *MDM10* y *MMM1* de *P. anserina*. En la parte de abajo se muestran los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio que corresponden a dichos fragmentos y fusiones después de su separación por electroforesis gels de agarosa al 1%.

Los productos de fusión de cada construcción fueron purificados y empleados para transformar la cepa  $\Delta ku$  de *P. anserina*. Se obtuvo una transformante primaria para  $\Delta mdm10$  y tres para  $\Delta mmm1$  después de numerosos intentos de transformación. Sin embargo, no se ha verificado si la eliminación de los genes de interés fue exitosa. Debido a la dificultad para obtener colonias transformadas, es probable que estos genes sean esenciales. Es posible que estas transformantes primarias hayan logrado crecer gracias a que provienen de protoplastos multinucleados, en los que uno o más núcleos no integraron la secuencia introducida y compensaron los defectos

ocasionados por el o los núcleos transformados.

## 6.5. Etiquetado de las proteínas Mdm10 y Mmm1 con mTFP y mCherry

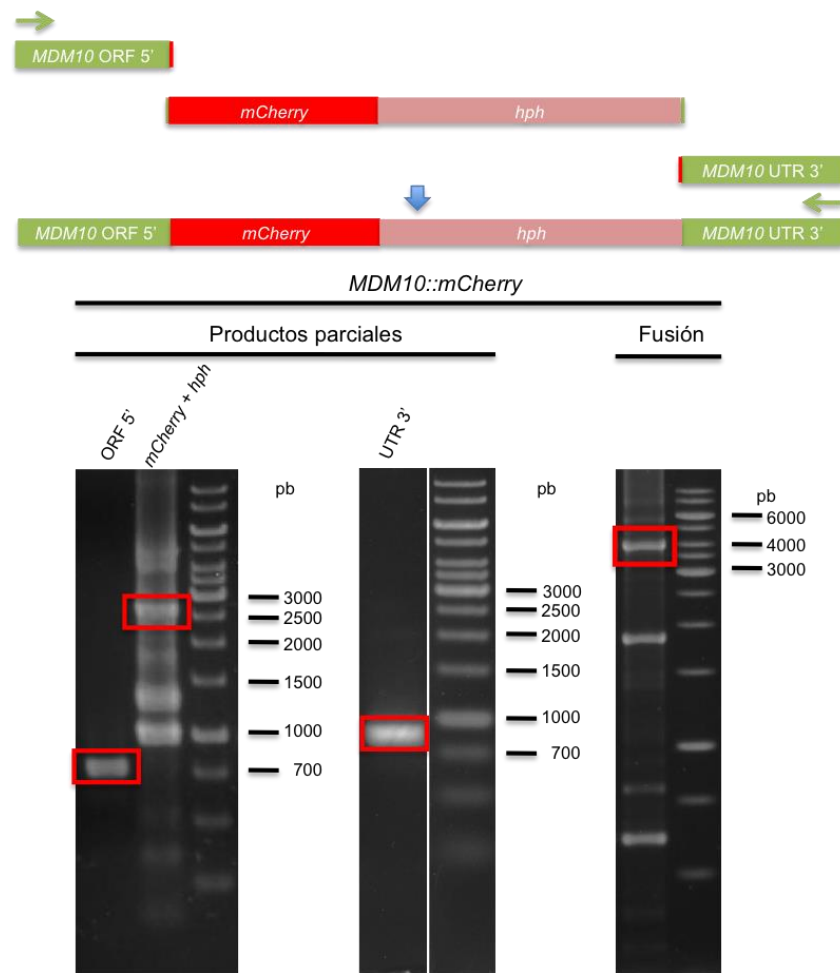
Para observar la localización del complejo ERMES durante el desarrollo de *P. anserina*, se etiquetaron las subunidades Mdm10 y Mmm1 con proteínas fluorescentes. Para esto, se obtuvieron las construcciones genéticas que codifican las versiones etiquetadas con mTFP de Mdm10 y Mmm1 (Figura 6.4) así como la versión de Mdm10 etiquetada con mCherry (Figura 6.5).



**Figura 6.4. Construcciones genéticas para generar versiones de Mdm10 y Mmm1 etiquetadas con mTFP.** En la parte superior se muestra un esquema de los productos parciales (fragmentos 5' y 3' adyacentes a los codones de paro y el gen *mTFP* y el marcador de selección, *kanMX6* y de sus fusiones que se utilizarán para generar versiones de *MDM10* y *MMM1* que expresen la etiqueta fluorescente mTFP. En la parte de abajo se muestran los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio que corresponden a dichos fragmentos y fusiones después de su separación por electroforesis

geles de agarosa al 1%.

Se obtuvieron numerosas transformantes primarias con la resistencia esperada (geneticina) tras transformar protoplastos *S mat+* con DNA de la construcción para etiquetar la proteína Mdm10 con mTFP. Sin embargo, las colonias crecieron pobremente y su propagación fue imposible, por ello no se pudo verificar si los genes respectivos se integraron correctamente. También se obtuvieron numerosas transformantes primarias que posiblemente hayan integrado la construcción *MMM1::mTFP* en su genoma, sin embargo no se han analizado.



**Figura 6.5. Construcción genética para generar una versión de Mdm10 etiquetada con mTFP.** En la parte superior se muestra un esquema de los productos parciales (fragmentos 5' y 3' adyacentes al codón de paro y el casete que contiene el gen *mCherry* y el marcador de selección) y de su fusión que se utilizará para generar una versión de *MDM10* que expresen la etiqueta fluorescente *mCherry*. En la parte de abajo se muestran los productos

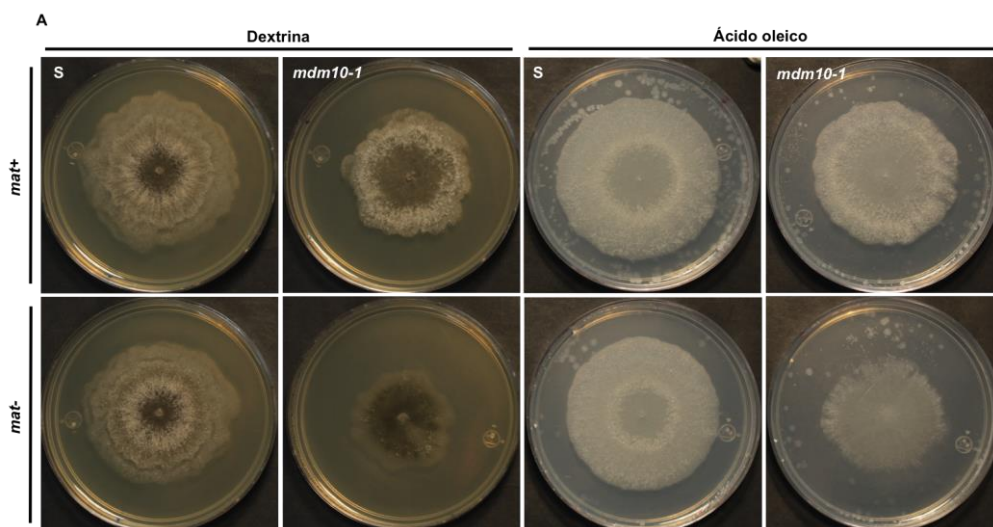


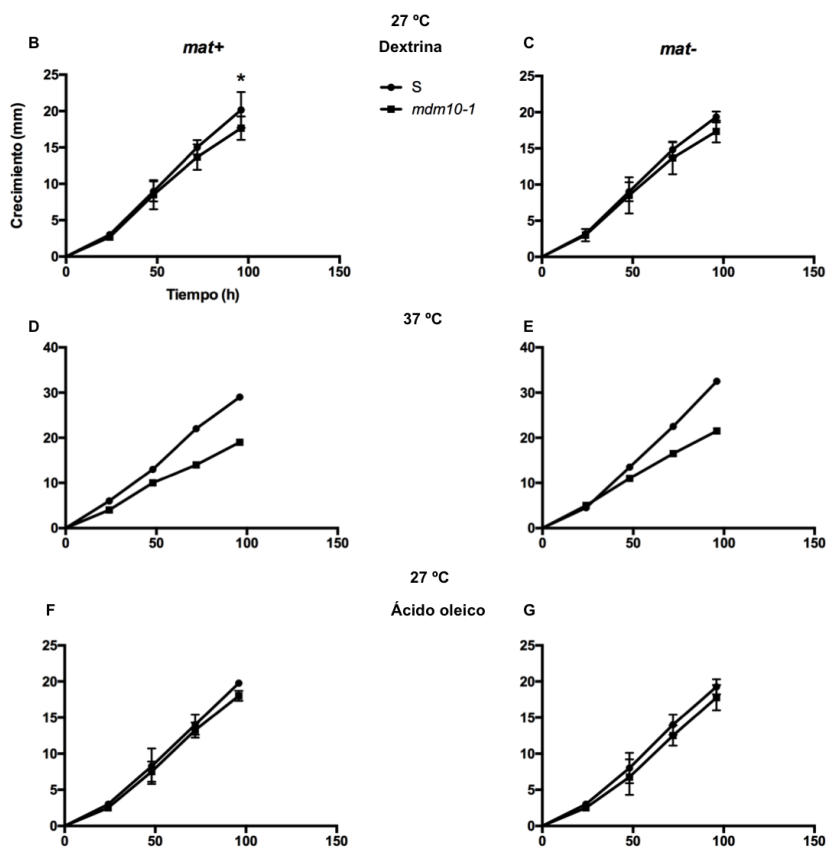
de PCR que corresponden a dichos fragmentos y fusiones después de su separación por electroforesis geles de agarosa al 1%.

En el caso del etiquetado de Mdm10 con mCherry, sucedió lo mismo que con mTFP; el crecimiento extremadamente pobre de las colonias imposibilitó su propagación y, por lo tanto, su análisis molecular. Esto indica que las etiquetas en el C terminal de Mdm10 parecen afectar severamente la función de la proteína.

## 6.6. La alteración de Mdm10 ocasiona defectos en el crecimiento

Para evaluar los defectos que la alteración de Mdm10 ocasiona en el crecimiento vegetativo, éste se cuantificó en medios con dextrina y en medio con ácido oleico ya que se ha reportado que algunas funciones de ERMES varían dependiendo de la fuente de carbono (Mattiuzzi *et al.*, 2015). Las cepas con el alelo *mdm10-1* tienen defectos en el crecimiento a 27°C y a 37°C: las colonias tienen una menor densidad de micelio vegetativo y aéreo (Figura 6.6 A) y presentan una disminución en la tasa de crecimiento que se acentúa con el aumento de la temperatura (Figura 6.6 B-G). La disminución en la tasa de crecimiento es mucho mayor a 37°C que a 27°C en el medio que contiene dextrina. En el medio que contiene ácido oleico, la disminución en la tasa de crecimiento es muy pequeña a 27°C (Tabla 6.3).





**Figura 6.6. La cepa *mdm10-1* es termosensible.** (A) Fotografías de colonias de 4 días de crecimiento a 27°C. Se observa una moderada reducción en el tamaño de las colonias mutantes en medios que contienen dextrina o ácido oleico como únicas fuentes de carbono, pero sobre todo, una considerable disminución en el micelio aéreo. Las manchas blancas del medio que contiene ácido oleico son de este compuesto. (B-G) Curvas de crecimiento en medio que contiene dextrina a 27°C (B-C) y 37°C (D-E) y que contiene ácido oleico a 27°C (F-G) a lo largo de 4 días, de las cepas S y *mdm10-1*. Promedio del crecimiento  $\pm$  DE de tres experimentos independientes a 27°C en medio que contiene dextrina; La diferencia estadística es  $*P < 0.05$  según la prueba t de Student para muestras pareadas. Valores obtenidos en un experimento a 37°C en medio que contiene dextrina y promedio  $\pm$  DE de dos experimentos independientes a 27°C en ácido oleico.

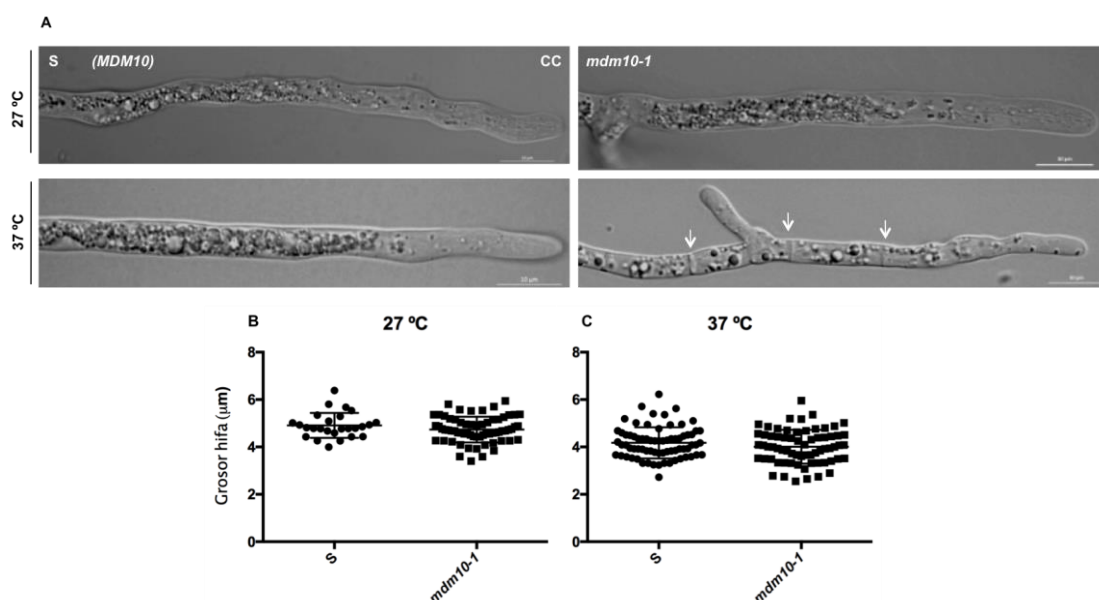
**Tabla 6.3. Tasa de crecimiento (mm/h) de las cepas S y *mdm10-1* a 27 y 37 °C en medio que contiene dextrina y en medio que contiene ácido oleico.**

Medio	Temperatura	Tipo sexual	S	<i>mdm10-1</i>	Diferencia (%)
Dextrina	27°C	<i>mat+</i>	0.25	0.2292	8.32
		<i>mat-</i>	0.2431	0.2222	8.59

Ácido oleico	37°C	<i>mat+</i>	0.3333	0.25	24.92
		<i>mat-</i>	0.375	0.2292	38.88
	27°C	<i>mat+</i>	0.2292	0.224	2.26
		<i>mat-</i>	0.2292	0.2083	9.11

## 6.7. La alteración de Mdm10 no afecta el grosor de las hifas

Debido a que la disfunción de Mdm10 afecta la tasa de crecimiento, es posible que también afecte el desarrollo vegetativo de otras formas, como el grosor de las hifas. Sin embargo, esta característica no es significativamente diferente en la cepa *mdm10-1* de la cepa silvestre en ninguna de las temperaturas probadas. Cabe resaltar que las hifas son más delgadas a 37 °C que a 27 °C en ambas cepas (Figura 6.7).

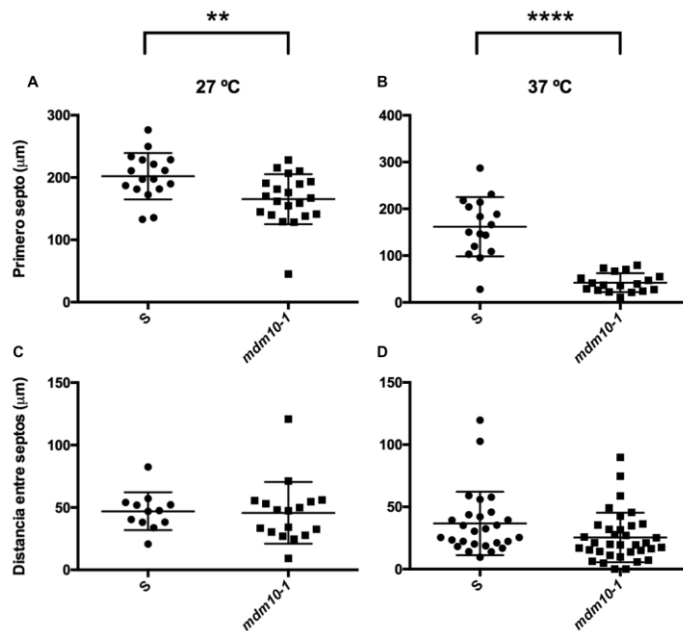


**Figura 6.7. La alteración de la función de Mdm10 no afecta el grosor de las hifas.** Fotografías de microscopía confocal de regiones apicales de las cepas S y *mdm10-1*, a 27°C y 37°C. (A) Las regiones apicales (primeros 90 µm aproximadamente) de las hifas en crecimiento de *P. anserina* generalmente carecen de septos, tienen una región de

agrupación vacuolar a partir de aproximadamente los 34  $\mu\text{m}$  y ocasionalmente presentan ramificaciones. Las regiones apicales de la cepa *mdm10-1* raramente tienen septos a 27°C pero frecuentemente los presentan a 37°C; ocasionalmente están ramificadas y al igual que las silvestres, generalmente tienen una zona bien definida de acumulación vacuolar a 27°C a partir de los 32  $\mu\text{m}$  aproximadamente, al igual que las silvestres, pero a 37°C la mayoría de las hifas tienen las vacuolas dispersas. (B, C) Grosor de hifas de las cepas S y *mdm10-1* a 27°C (B) y 37°C (C). Aunque el grosor de las hifas tiende a ser ligeramente menor en la cepa *mdm10-1*. La diferencia no es significativa en ninguna de las dos condiciones de temperatura según la prueba t de Student para muestras no pareadas;  $n \geq 26$  a 27°C;  $n \geq 67$  a 37°C.

### **6.8. Mdm10<sup>L420P</sup> afecta el posicionamiento de los septos**

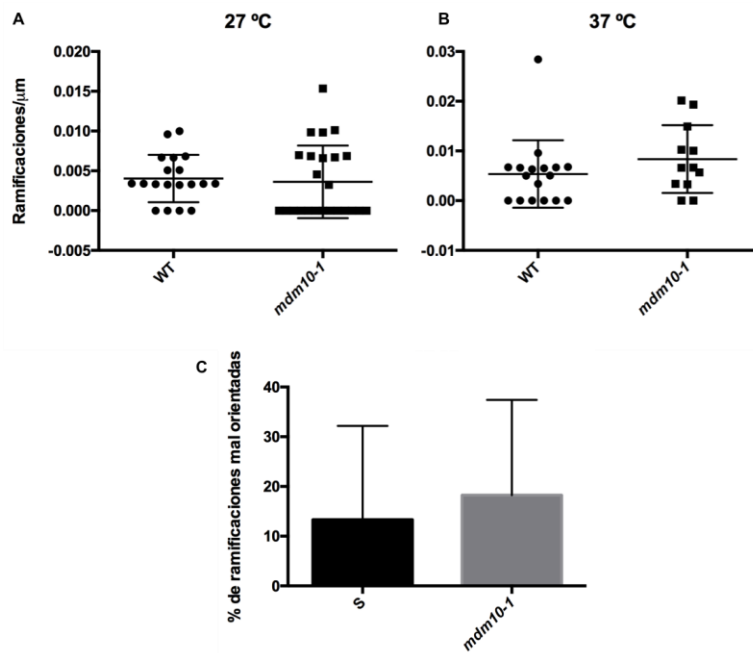
Generalmente, en los primeros 90  $\mu\text{m}$  de las hifas silvestres, no hay septos. En promedio, el primer septo se encuentra a los  $202 \pm 37.16 \mu\text{m}$  ( $n=17$ ) del ápice a 27°C y a los  $161.8 \pm 63.39 \mu\text{m}$  ( $n=16$ ) a 37°C. Sin embargo, en la cepa *mdm10-1* es muy frecuente encontrar septos a una distancia menor; en promedio el primer septo se encuentra a  $157.75 \pm 40.18 \mu\text{m}$  ( $n=21$ ) a 27°C y a  $38 \pm 17.28 \mu\text{m}$  ( $n=18$ ) a 37°C. Esta distancia es significativamente diferente de la silvestre en ambas condiciones de temperatura (Figura 6.8 A, B). Aunque haya una ligera disminución en el promedio de la distancia que existe entre los demás septos en la cepa *mdm10-1*, esta diferencia no es significativa (Figura 6.8 C, D).



**Figura 6.8. La alteración de Mdm10 afecta el posicionamiento de los septos.** (A, B) Distancia entre el ápice y el primer septo. Existe una diferencia significativa en la distancia a la que se encuentra el primer septo del ápice a 27°C (A) y a 37°C (B);  $n \geq 17$  a 27°C;  $n \geq 16$  a 37°C. Las diferencias estadísticas son  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001$  según la prueba t de Student para muestras no pareadas. (C, D) Distancia entre septos. No existe una diferencia significativa en la distancia que separa los septos según la prueba t de Student para muestras no pareadas;  $n \geq 12$  a 27°C;  $n \geq 27$  a 37°C.

## 6.9. La disfunción de Mdm10 no afecta la frecuencia ni la orientación de las ramificaciones

Como el crecimiento y el posicionamiento de los septos están afectados en la mutante *mdm10-1*, también se analizó la frecuencia de las ramificaciones en los primeros 200-300 µm de sus hifas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre (Figura 6.9 A, B). También se comparó el porcentaje de las ramificaciones mal orientadas, ya que, a 37°C no es raro encontrar ramificaciones de este tipo en la cepa *mdm10-1* (Figura 6.7 A). Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas en este caso (Figura 6.9 C). Este análisis no se realizó en hifas de cultivos crecidos a 27°C debido a que, a esta temperatura, la frecuencia de ramificaciones en las primeros 200 µm es muy baja.

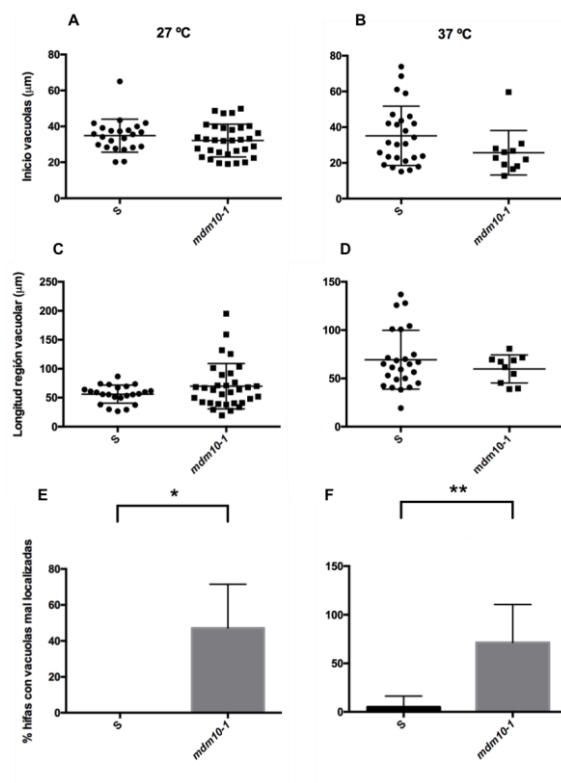


**Figura 6.9. Mdm10 no está involucrada en la formación ni en la orientación de las ramificaciones.** (A, B) La frecuencia de las ramificaciones en la cepa *mdm10-1* no es diferente de la silvestre según la prueba t de Student para muestras no pareadas a 27°C (A) ni a 37°C (B);  $n \geq 19$  a 27°C;  $n \geq 12$  a 37°C. (C) El porcentaje de ramificaciones mal orientadas no es diferente en las cepas analizadas a 37°C. Cuatro experimentos independientes con una  $n \geq 3$ . Prueba t de Student para muestras no pareadas.

## 6.10. Mdm10 es necesaria para la agrupación apical de las vacuolas

A 27°C, las hifas líderes de la cepa silvestre tienen una región de vacuolas acumuladas de  $55.96 \pm 15.54 \mu\text{m}$  de longitud, que inicia a los  $34 \pm 9.16 \mu\text{m}$  ( $n=23$ ) del ápice, en promedio. A 27°C, las hifas líderes de la cepa *mdm10-1*, frecuentemente también tienen esta región que inicia los  $32.53 \pm 10.55 \mu\text{m}$  y tiene una extensión de  $69.73 \pm 39.28 \mu\text{m}$  ( $n=33$ ), en promedio. A 37°C, en las hifas silvestres esta agrupación inicia a los  $33.58 \pm 16.25 \mu\text{m}$  del ápice y tiene una extensión de  $69.32 \pm 30.52 \mu\text{m}$  ( $n=26$ ), en promedio. La región vacuolar de las escasas hifas mutantes que tienen ese patrón de localización a 37°C inicia a los  $25.7 \pm 12.48 \mu\text{m}$  y mide  $59 \pm 14.53 \mu\text{m}$  ( $n=10$ ), en promedio. No se encontraron diferencias significativas en la distancia del ápice a la zona en que se empiezan a encontrar las vacuolas ni en la extensión de esta región entre

las cepa S y *mdm10-1* en ninguna de las dos temperaturas (Figura 6.10 A-D). En cambio, la diferencia en el porcentaje de hifas con vacuolas mal localizadas sí es significativa entre las dos cepas (Figura 6.10 E-F).

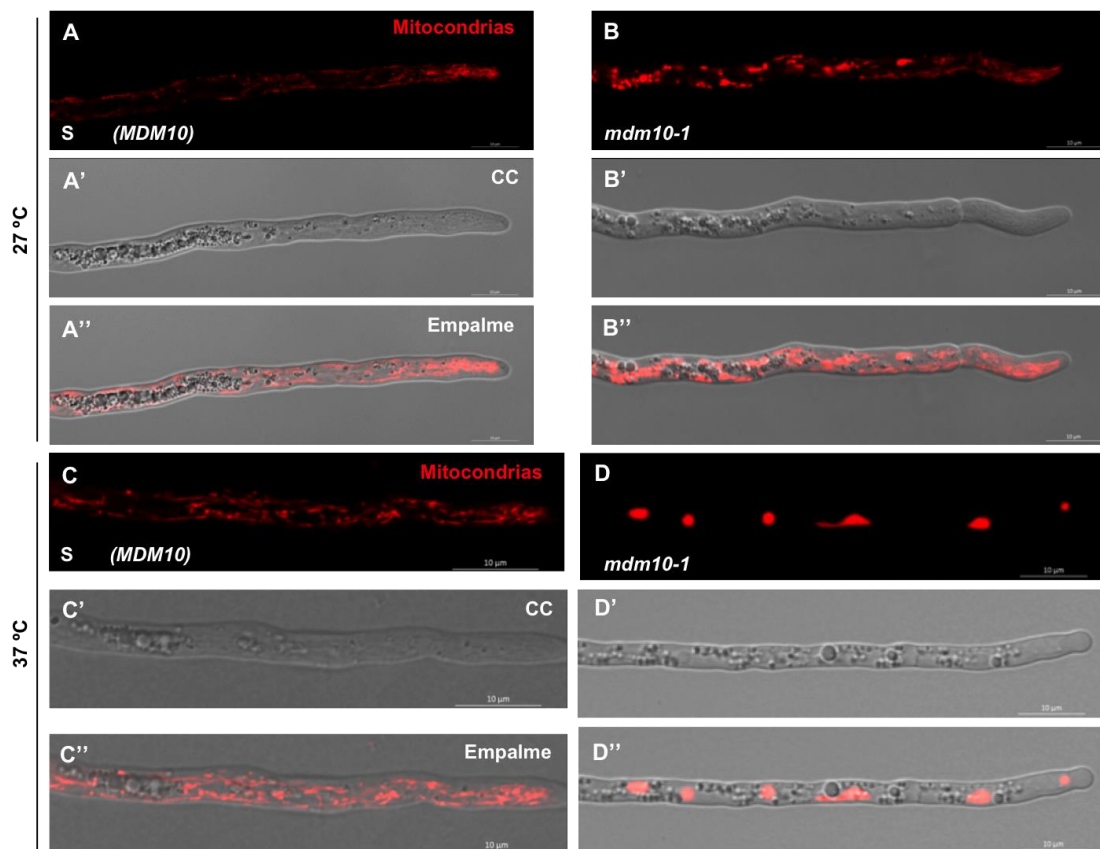


**Figura 6.10. La disposición de las vacuolas es diferente en las cepas S y *mdm10-1*.** (A, B) Distancia a la que inicia la región vacuolar con respecto al ápice. No difiere significativamente en la cepa *mdm10-1* de la S a 27°C (A) ni a 37°C (B). (C, D) Extensión de la región vacuolar. No hay diferencias significativas en la extensión de esta región entre las cepas S y *mdm10-1* a 27°C (C) ni a 37°C (D) según la prueba t de Student para muestras no pareadas.  $n \geq 23$  a 27°C;  $n \geq 10$  a 37°C. (E, F) Porcentaje de hifas con vacuolas mal localizadas. Tanto a 27°C (E) como a 37°C (F) hay una diferencia significativa en este porcentaje. Cuatro experimentos independientes con  $n \geq 4$  a 27°C; cinco experimentos independientes con  $n \geq 5$  a 37°C. Las diferencias estadísticas son  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  según la prueba t de Student para muestras no pareadas.

## 6.11. Mdm10 es necesaria para el mantenimiento de la morfología mitocondrial

Debido a que el objetivo de este trabajo era evaluar el papel de la subunidad Mdm10 del complejo ERMES en la dinámica mitocondrial, se evaluó la

morfología mitocondrial en las cepas *mdm10-1*, se obtuvieron cepas que expresan en su locus una versión de *ldh1* etiquetada con mCherry, en el contexto genético *mdm10-1*. Cabe mencionar que la proteína *ldh1* es la subunidad no catalítica de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), enzima que se encuentra en la matriz mitocondrial y participa en el ciclo de Krebs (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). La morfología mitocondrial normal consiste en una red interconectada de mitocondrias alargadas (Figura 6.11 A), sin embargo, en cambio la cepa *mdm10-1* la morfología mitocondrial es heterogénea: en cultivos crecidos a 27°C, las hifas tienen mitocondrias alargadas en la región apical, pero en promedio, a partir de los  $80.59 \pm 51.63 \mu\text{m}$  ( $n=12$ ) también se encuentran mitocondrias grandes y redondas (Figura 6.11 B). En cambio, a 37°C, la cepa silvestre tiene una red mitocondrial muy similar a la observada a 27°C (Figura 6.11 C), pero en la cepa *mdm10-1* solamente hay mitocondrias gigantes (Figura 6.11 D). Estas observaciones coinciden con las reportadas por Jamet-Vierny *et al.*, 1997.



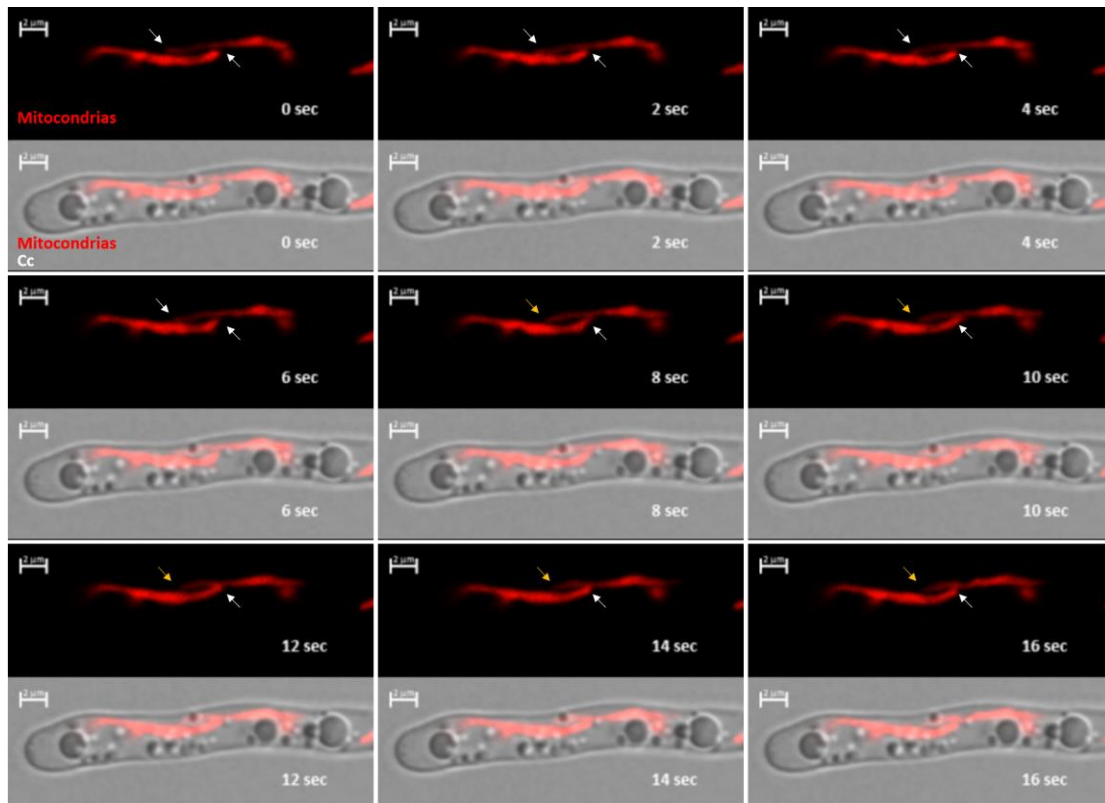
**Figura 6.11.** La morfología mitocondrial de la cepa *mdm10-1* es anormal. Fotografías de microscopía confocal de los primeros  $\approx 90 \mu\text{m}$  apicales de hifas en crecimiento a 27°C (A-B) y



37°C (C-D) de las cepas S (A, C) y *mdm10-1* (B, D). (A-B) A 27°C, la región apical de la cepa S presenta una red interconectada de mitocondrias alargadas (A), en cambio la cepa *mdm10-1* tiene dos poblaciones: unas alargadas o con apariencia silvestre, que se encuentran predominantemente en la región más cercana al ápice y otras grandes y redondeadas que se localizan en la región más distal (B). (C-D) A 37°C las mitocondrias de la cepa S son alargadas, al igual que a 27°C (C), mientras que en la cepa *mdm10-1* la red mitocondrial está colapsada y todas las mitocondrias son grandes y generalmente redondas (D). Las comillas simples (') y las comillas dobles (") denotan las fotografías correspondientes al campo claro (CC) y al empalme mitocondrias/CC, respectivamente.

## **6.12. La fusión y fisión mitocondriales ocurren en la mutante *mdm10-1***

Dado que el fenotipo mitocondrial es más severo a 37°C que a 27°C y que algunas mitocondrias son morfológicamente similares a las silvestres a 27°C, la fusión y fisión se estudiaron a 37°C. En estas condiciones observamos mitocondrias muy distantes (e. g. Figura 6.11 D) y no encontramos continuidad entre ellas, indicando que en la mutante *mdm10-1* hay fisión mitocondrial. También se detectaron algunos eventos subsecuentes de fusión y fisión en la cepa *mdm10-1*, es decir que ocurrían en una misma región de la mitocondria (Figura 6.12); esto coincide con estudios realizados en otros modelos (Abrisch *et al.*, 2020) y muestra que la fusión mitocondrial también ocurre en ausencia de Mdm10. Sin embargo, dado que en general las mitocondrias se encuentran muy distantes entre sí, la detección de estos eventos es difícil y no se puede cuantificar su frecuencia. Aunque Mdm10 no parece ser absolutamente necesaria para que ocurra la fusión y fisión mitocondriales, no podemos descartar que la frecuencia con la que estos fenómenos esto ocurran disminuya.

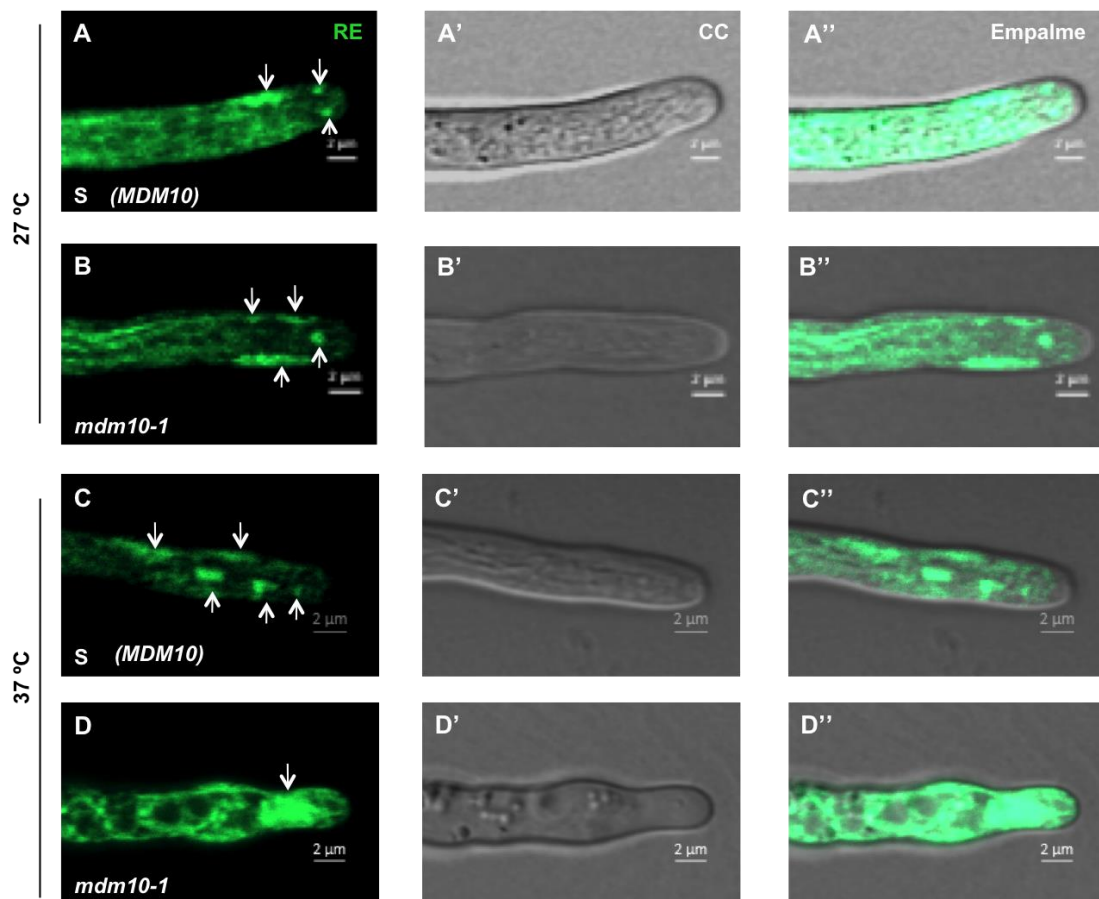


**Figura 6.12. Mdm10 no es indispensable para la fusión ni para la fisión mitocondrial.** Región apical de hifa (primeros  $\approx 30 \mu\text{m}$ ) de la cepa *mdm10-1*, en el transcurso de 18 s, proveniente de un cultivo crecido a  $37^\circ\text{C}$ , que muestra dos eventos de fusión mitocondrial (flechas blancas). Uno de estos es seguido por una fisión mitocondrial (flechas amarillas).

### 6.13. Mdm10 es importante para el mantenimiento de la estructura del RE

Como la alteración de la subunidad Mdm10 del complejo ERMES afecta la morfología mitocondrial, es posible que también tenga algún efecto sobre los demás organelos con los que se asocia. Para explorar esta posibilidad, se analizaron cepas que expresan ectópicamente una proteína marcadora del retículo endoplásmico, tanto en el contexto genético silvestre como en el mutante. La proteína marcadora utilizada contiene a GFP flanqueada por las secuencias de localización y de retención del RE de la chaperona BiP/KAR2 y su expresión está regulada por el promotor constitutivo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans* (López-Fuentes *et al.*, 2020). Se encontraron visibles diferencias en la morfología de los subcompartimentos que corresponden a un dominio pleomórfico apical que se encuentra en las

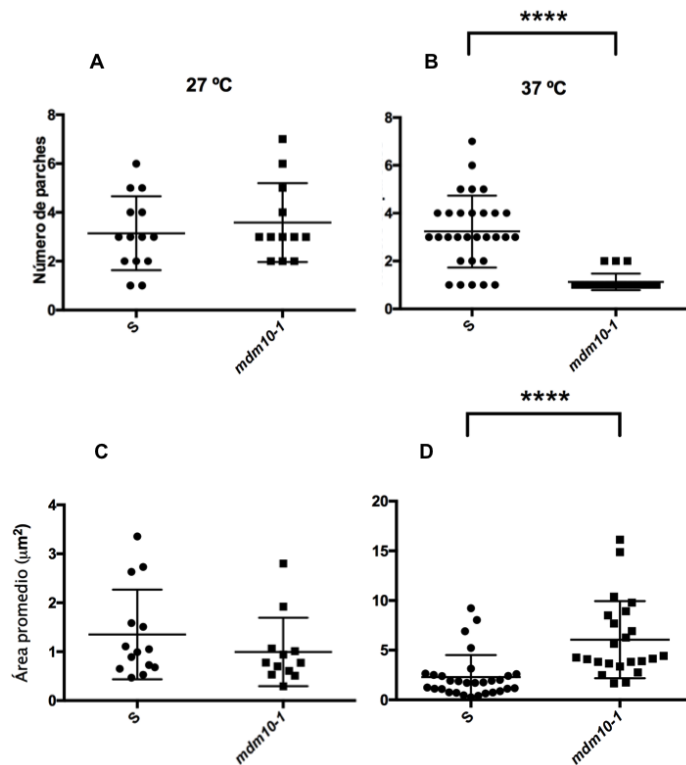
hifas en crecimiento. A 27°C, estos subcompartimentos o parches se encuentran en los primeros 15 µm apicales, miden entre 1 y 4 µm de longitud y 1-1.5 µm de ancho, están interconectados con el RE periférico y son altamente dinámicos; con frecuencia se fusionan y fragmentan. Su estructura y localización sugieren que estos parches son cisternas especializadas en la región de crecimiento polarizado de las hifas (López-Fuentes *et al.*, 2020). A 37°C, este dominio no se ha caracterizado, pero las observaciones sugieren que se comportan de manera muy similar. A 27°C, en la cepa *mdm10-1*, estos parches se parecen mucho a los de la cepa S (Figura 6.13 A, B). A 37°C, la cepa S forma parches muy parecidos a los observados a 27°C, aunque ligeramente más grandes (Figura 6.13 C), en cambio, en la cepa *mdm10-1*, generalmente se forma un solo parche muy grande y estático por hifa (Figura 6.13 D).

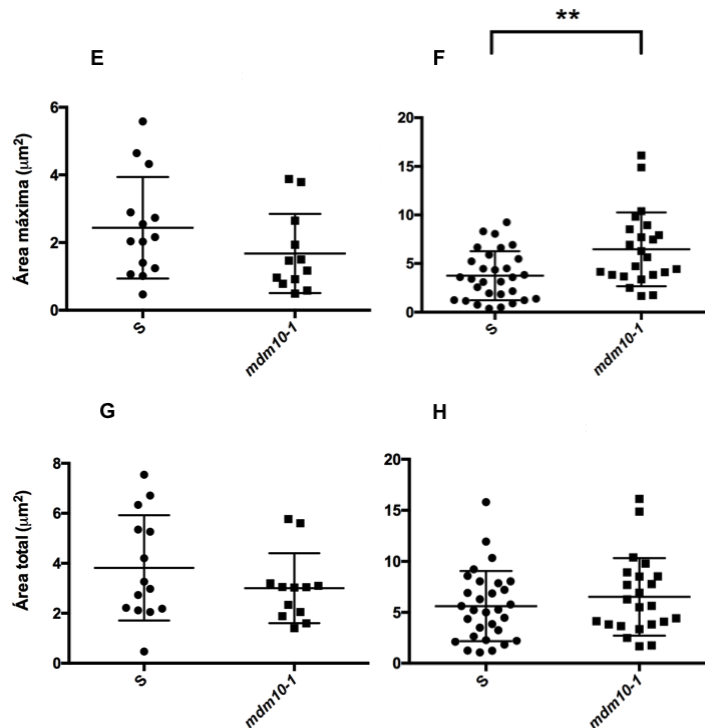


**Figura 6.13. La disposición de los parches apicales de RE depende de Mdm10.** Fotografías de microscopía confocal de los primeros  $\approx 20$  µm del ápice de hifas en crecimiento a 27°C (A-B) y 37°C (C-D) de las cepas S (A, C) y *mdm10-1* (B, D) que expresan la proteína fluorescente ER-GFP. (A-B) A 27°C la morfología del dominio pleomórfico apical

del RE de la cepa S consiste generalmente de varios parches interconectados con el RE periférico (A) al igual que en la cepa *mdm10-1* (B). (C-D) A 37°C, la disposición y dinámica de los parches en la cepa S es similar que a 27°C (C), en cambio en la cepa *mdm10-1* la disposición de este subcompartimento está severamente afectada ya que en la mayoría de los casos se observa un solo parche muy grande y estático (D). Las comillas simples (') y las comillas dobles (") denotan imágenes tomadas en campo claro (CC) y al empalme RE/Cc, respectivamente.

Para analizar cuantitativamente estas diferencias, se estimó el número y el área de estos parches. Se encontraron diferencias significativas en el número, el área promedio y el área máxima a 37°C pero no a 27°C (Figura 6.14 A-F). El área ocupada por estos parches en la hifa es equivalente entre las cepas mutante y silvestre en ambas condiciones (Figura 6.14 G, H). Estos resultados indican que la disfunción de Mdm10 y por lo tanto también del complejo ERMES, afecta la estructura del retículo endoplásmico.



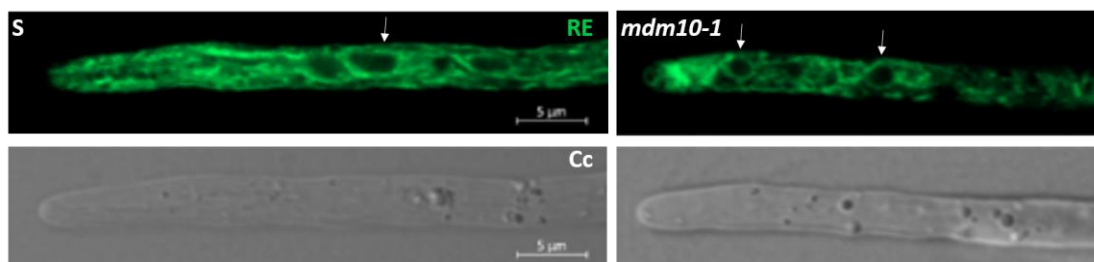


**Figura 6.14. La disfunción de Mdm10 afecta la morfología del retículo endoplásmico.** (A-B) La disfunción de Mdm10 no afecta significativamente número de parches a 27°C (A) pero sí a 37°C (B). (C-D) El promedio del área de los parches no está significativamente afectado a 27°C (C) pero sí a 37°C (D). (E-F) El área del parche más grande no es significativamente diferente a 27°C (E) pero sí a 37°C (F). (G, H) El área total de los parches es equivalente en ambas cepas tanto a 27°C (G) como a 37°C (H).  $n \geq 12$  a 27°C;  $n \geq 23$  a 37°C. Las diferencias estadísticas son  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001$  según la prueba t de Student para muestras no pareadas.

## 6.14. La alteración de Mdm10 afecta la localización de los núcleos

La envoltura nuclear forma parte del retículo endoplásmico y en nuestro laboratorio se ha demostrado que es posible detectarla con el marcador ER-GFP (López-Fuentes, en preparación) definida por un patrón característico de estructuras grande y circulares. En numerosas hifas de la cepa *mdm10-1*, a 37°C, se observaron estas estructuras en la región apical, que probablemente sean envolturas nucleares, ya que son circulares y tienen el tamaño de los núcleos de *P. anserina*. Esto no se observó en la cepa silvestre a la misma temperatura (Figura 6.15). Estas estructuras se observaron en la región subapical de las hifas de la cepa mutante, localizadas en promedio a

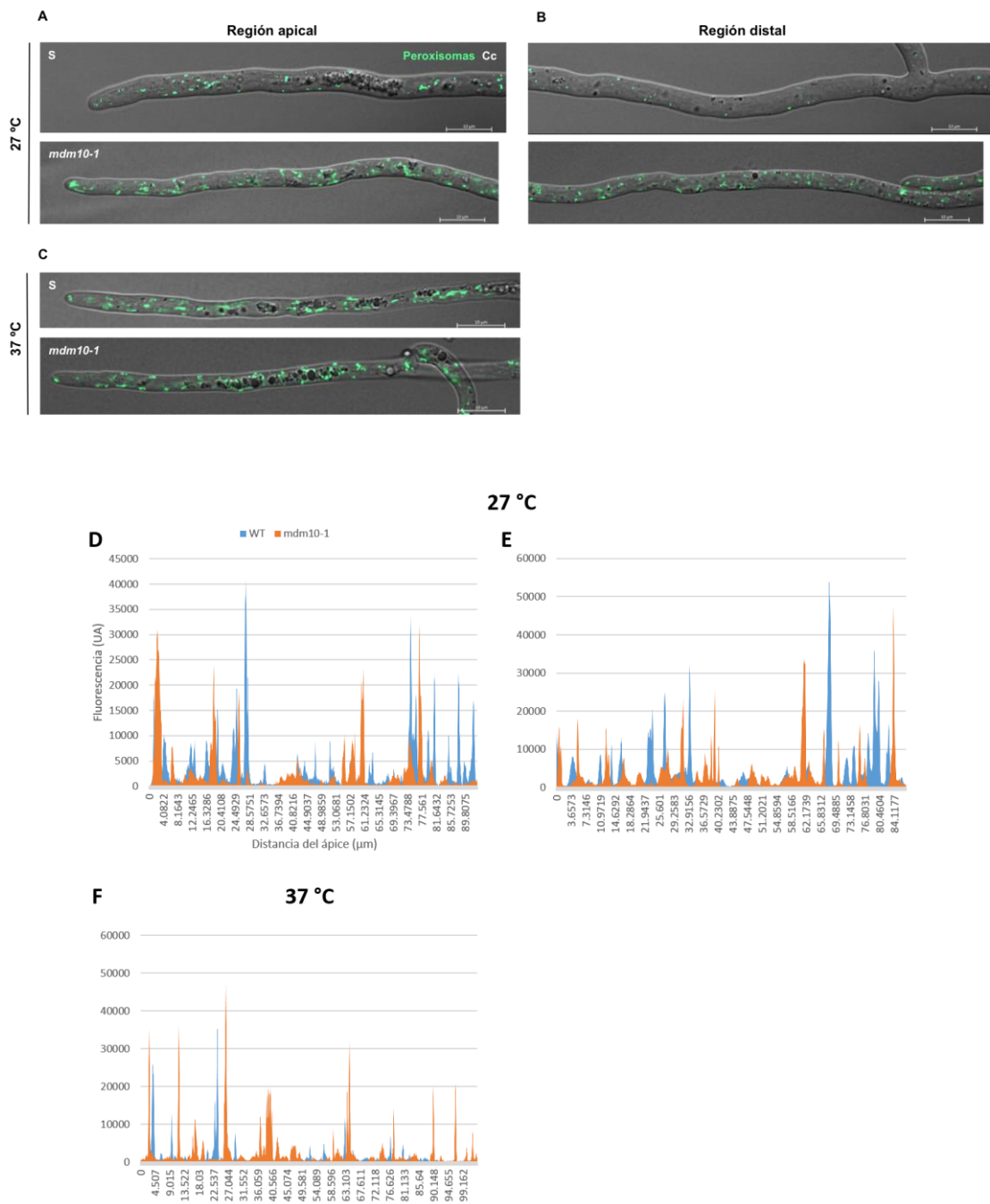
12.06±4.83  $\mu\text{m}$  (n=9) del ápice, mientras que en la silvestre éstas se observaron a 26.27±13.98  $\mu\text{m}$  (n=13). Esto sugiere que Mdm10 es necesaria para que los núcleos se localicen correctamente. En conjunto con los análisis de los subcompartimentos apicales del RE periférico, esto muestra que la disposición de los diferentes dominios de RE depende del complejo ERMES.



**Figura 6.15. Mdm10 es necesaria para la correcta localización nuclear.** Se observan envolturas nucleares muy cerca del ápice en las hifas *mdm10-1* a 37°C marcadas con ER-GFP (flechas), en cambio, en las hifas silvestres se encuentran más alejadas de éste.

### 6.15. La dinámica peroxisomal depende de Mdm10

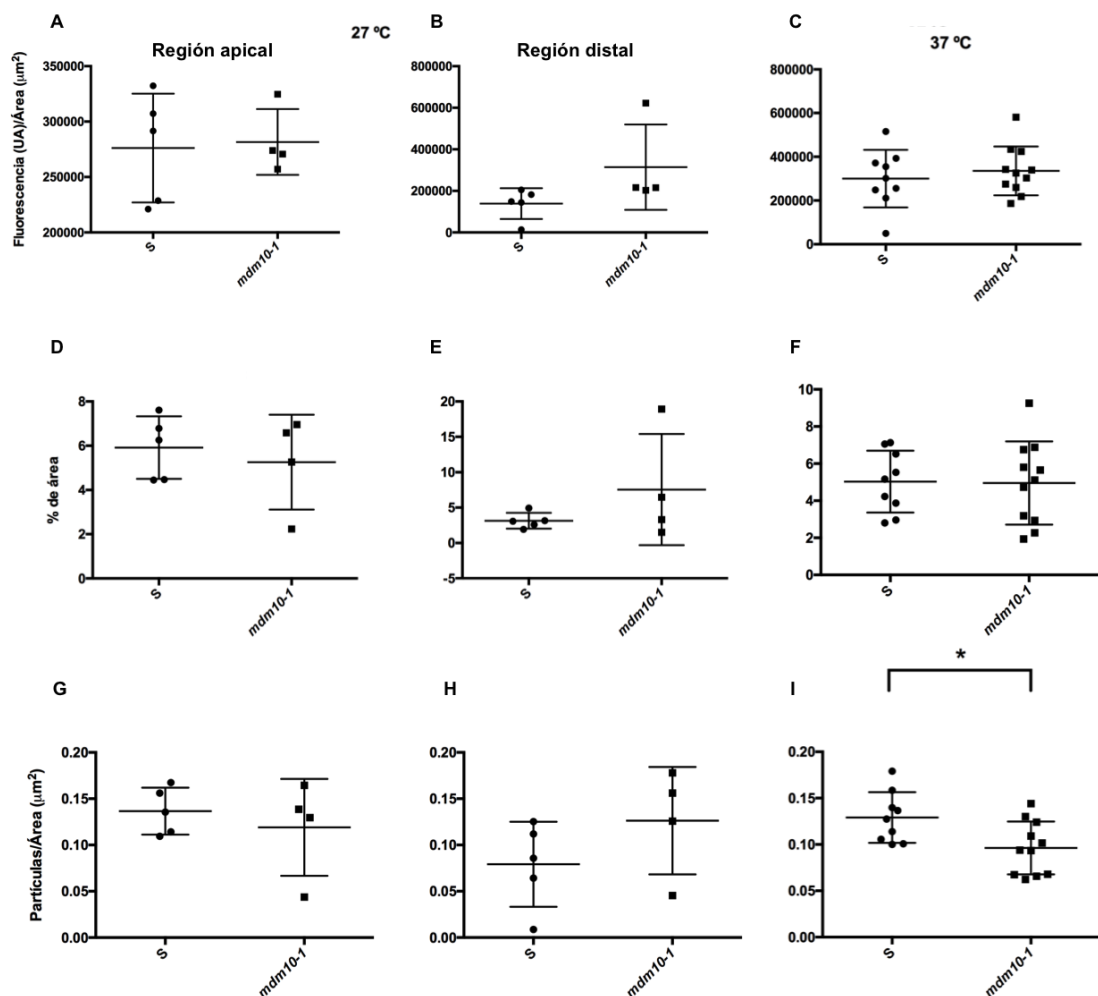
Recientemente, se ha estudiado el papel del complejo ERMES en la morfología, localización y abundancia de los peroxisomas en *S. cerevisiae*. Para descubrir el papel de ERMES en la dinámica de los peroxisomas en *P. anserina*, se analizaron cepas que expresan la proteína de la matriz peroxisomal Fox2 etiquetada con GFP desde su sitio cromosomal endógeno, en el contexto silvestre y mutante (*mdm10-1*). Ya que la morfología de las mitocondrias en la mutante *mdm10-1* cambia en las diferentes regiones hifales, analizamos por separado la región apical de la distal a 27°C (Figura 6.16 A-C). Se realizó un perfil de fluorescencia a lo largo de las hifas para analizar la distribución de los peroxisomas (En la Figura 6.16 D-F se muestran perfiles representativos de hifas S y *mdm10-1*). Sin embargo, no se notó que la disfunción de Mdm10 ocasionara un cambio en la localización de los peroxisomas.



**Figura 6.16. La distribución de los peroxisomas no se afecta en las mutantes *mdm10-1*.** (A-C) Microscopía confocal de hifas de las cepas S y *mdm10-1* que expresan Fox2-GFP. Por lo menos en la región apical, no parece haber diferencias en la distribución de los peroxisomas a 27°C ni a 37°C. (D-F) Perfil de fluorescencia de hifas representativas de las cepas S y *mdm10-1* a 27°C (D, E) y a 37°C (F).

Por otra parte, se determinó la fluorescencia por unidad de área hifal, para ver si había un cambio en la densidad de peroxisomas. Sin embargo, tampoco se detectaron diferencias entre las hifas mutantes y las silvestres (Figura 6.17 A-C). Más aún, como un segundo parámetro para estimar la

densidad poblacional de los peroxisomas, se calculó el porcentaje del área ocupada por estos organelos, pero tampoco se encontraron diferencias (Figura 6.17 D-E). Finalmente, se estimó el número de peroxisomas, determinando el número de partículas marcadas con Fox2-GFP en ambas cepas y se encontró que la cepa mutante tiene menos peroxisomas que la silvestre en la región apical (Figura 6.17 G-I). Esto sugiere que la masa total de peroxisomas no se afecta por la mutación de *mdm10*, sin embargo, esta mutación sí altera el número de organelos en que esta masa está distribuida. Esto sugiere que Mdm10 está involucrada en la fisión peroxisomal.



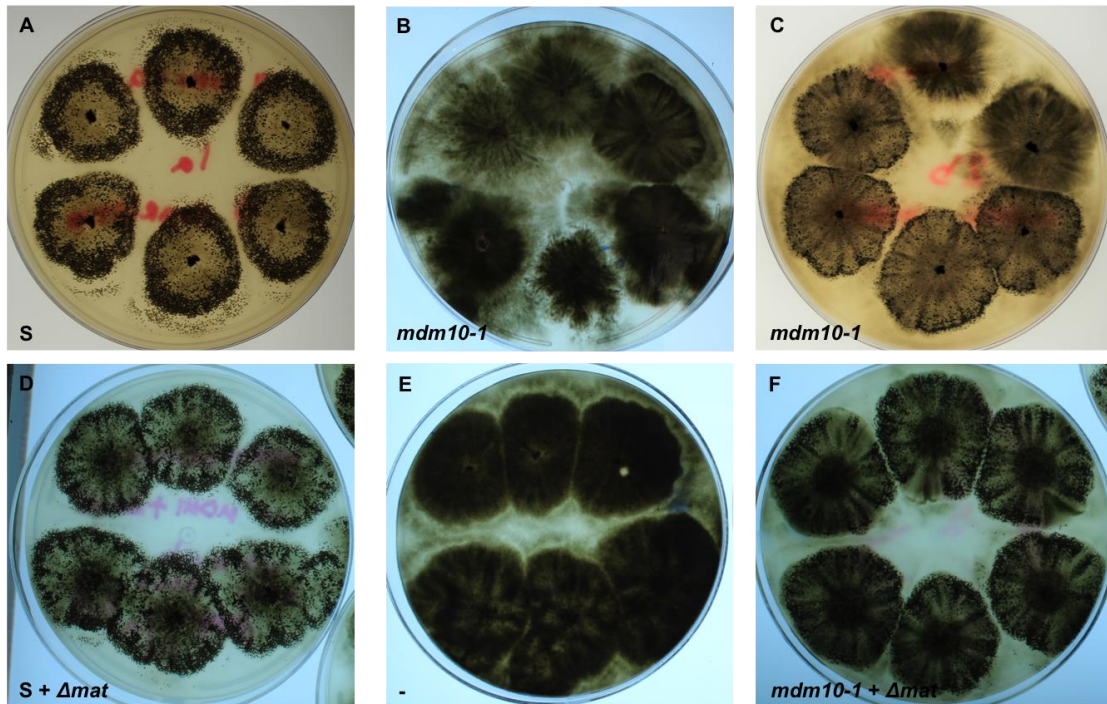
**Figura 6.17. La dinámica peroxisomal depende de Mdm10.** (A-C) Cuantificación de fluorescencia de Fox2-GFP por unidad de área. La fluorescencia de la cepa *mdm10-1* es equivalente a la silvestre en ambas condiciones de temperatura. (D-F) Cuantificación del área total ocupada por peroxisomas. Esta área es muy similar entre las cepas mutante y silvestre en ambas temperaturas. (G-I) Cuantificación del número de peroxisomas. La alteración de Mdm10 da como resultado una disminución en el número de peroxisomas a



37°C (l).  $n \geq 4$  a 27°C;  $n \geq 9$  a 37°C. La diferencia estadística es  $*P < 0.05$  según la prueba t de Student para muestras no pareadas.

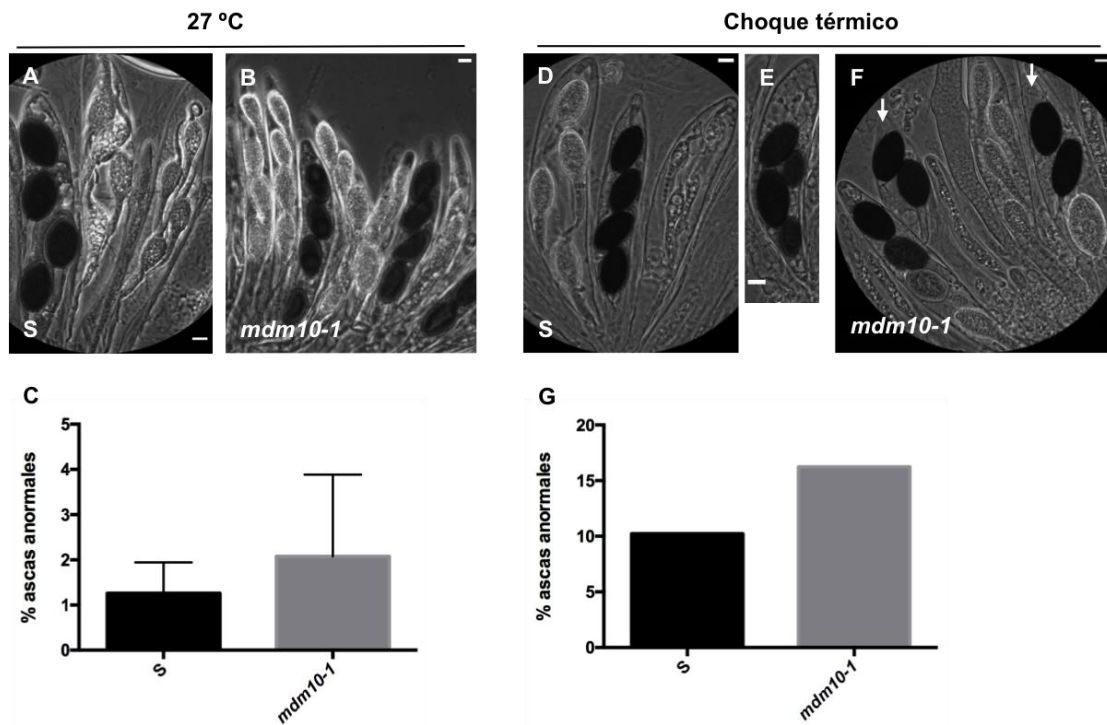
## 6.16. La alteración de Mdm10 afecta el desarrollo sexual

Para analizar el efecto de la mutación en *mdm10-1* en el desarrollo sexual del hongo, efectuamos cruzas sexuales homocigas ( $MDM10^+ \times MDM10^+$ ;  $mdm10-1 \times mdm10-1$  y heterocigas ( $MDM10^+ \times mdm10-1$ ) para *MDM10* y *mdm10-1*. Es importante recordar que cualquiera de los dos tipos sexuales forma tanto ascogonios como microconidios, así que las cepas de un tipo sexual pueden actuar como contraparte femenina y masculina. Sin embargo, la fertilización solamente ocurre entre estructuras de distinto tipo sexual. En las cruzas homocigas observamos que no se formaron peritecios (fructificaciones que se forman tras la fertilización de los ascogonios) en el micelio de la cepa *mdm10-1* (Figura 6.18 A, B). En las cruzas heterocigas sí se formaron en el micelio S ( $MDM10^+$ ) pero no en el mutante (datos no mostrados). Esto sugiere que la cepa *mdm10-1* no es fértil como partícipe femenino pero sí como masculino a los 3 días de crecimiento, ya sea porque todavía no tiene ascogonios o porque no pueden madurar incluso tras haber sido fertilizados. Así que, para determinar si esto se debía a un retraso en la formación de ascogonios, se fertilizaron cultivos de cepas homocarióticas de más de 3 días (4, 5 y 6 días). Los cultivos fertilizados al sexto día formaron peritecios, aunque muchos menos que el micelio silvestre (Figura 6.18 C). Esto quiere decir que el defecto en el crecimiento vegetativo retrasa la formación de los ascogonios y por consiguiente afecta el desarrollo sexual.



**Figura 6.18. Los defectos en el desarrollo del tejido vegetativo de los peritecios de la mutante *mdm10-1* afectan el desarrollo sexual.** (A-F) Cruzas sexuales homocigas después de 4 días de la fertilización. (A-B) Cruzas sexuales homocigas para *MDM10*<sup>+</sup> (S) (A) y *mdm10-1* (B) fertilizadas a los 3 días de crecimiento. (C) Cruza sexual homociga para *mdm10-1* fertilizada después de 6 días de crecimiento. Las cepas *mdm10-1* no formaron fructificaciones cuando se fertilizaron a los 3 días de crecimiento, pero sí al hacerlo a los 6 días; sin embargo, se formaron menos peritecios que en las cruza silvestres. (D-F) Cruzas sexuales de mosaicos tricarióticos. (D) La cruza sexual control homociga para *MDM10*, portadora de núcleos *Δmat* (i. e., *MDM10*<sup>+</sup> *mat*<sup>+</sup>/*MDM10*<sup>+</sup> *Δmat* × *MDM10*<sup>+</sup> *mat*<sup>-</sup>) es indistinguible de la cruza homociga para *MDM10* (A). (E) Cruza sexual *MDM10*<sup>+</sup> *mat*<sup>-</sup> × *MDM10*<sup>+</sup> *Δmat* que comprueba la esterilidad de la cepa *Δmat*, que al no poder fertilizar ni ser fertilizada, es incapaz de formar fructificaciones. (F) Cruza sexual homociga para *mdm10-1* complementada con núcleos *MDM10*<sup>+</sup> *Δmat* (i. e., *mdm10 mat*<sup>+</sup>/*MDM10*<sup>+</sup> *Δmat* × *MDM10*<sup>+</sup> *mat*<sup>-</sup>). La cepa estéril *Δmat* que tiene el alelo silvestre *MDM10* reestablece el desarrollo vegetativo normal de los peritecios.

En el himenio (tejido fértil) de estos peritecios se encontraron numerosas ascas normales, así como esporas que fueron capaces de madurar y de ser expulsadas de los peritecios (Figura 6.19 A, B). La diferencia en el porcentaje de ascas anormales entre las cepas S y *mdm10-1* no fue significativa (Figura 6.19 C). Esto indica que el desarrollo sexual puede transcurrir incluso tras la mutación de *MDM10* a 27°C.



**Figura 6.19. Mdm10 es necesaria para el desarrollo sexual normal.** (A, B) Imágenes representativas de ascas producidas en cruces homocigas silvestres (A) y mutantes (B) después de 4 días de la fertilización. (C) La diferencia en el porcentaje de anomalía no es significativa en las condiciones habituales de crecimiento. Se compararon los porcentajes de anomalía entre las cepas S y *mdm10-1* ( $n \geq 100$ ) de tres experimentos independientes con la prueba t de Student para muestras pareadas. (D-F) Ascas al 5º día de haber fertilizado los ascogonios, de cultivos sometidos a un choque térmico de 33°C en etapas tempranas de su desarrollo sexual. En la cepa silvestre, la mayoría de las ascas silvestres fueron normales (D) pero se encontró una frecuencia mayor de anomalías con respecto a las condiciones normales de crecimiento (E). (F) La cepa *mdm10-1* formó abundantes ascas anormales tras el choque térmico. (G) El porcentaje de ascas anormales de la cepa *mdm10-1* es 6% mayor que el de la cepa S. La barra de la escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

En experimentos de mosaicos tricarióticos se obtuvieron resultados consistentes con un defecto en el desarrollo de los tejidos vegetativos que constituyen los peritecios. Estos experimentos consisten en evaluar el desarrollo sexual en un contexto que involucra 3 núcleos genéticamente diferentes: dos núcleos mutantes para *MDM10* portadores de alelos silvestres y de tipo sexual opuesto para el locus *mat* (*i. e.*, *mdm10-1 mat+* y *mdm10-1 mat-*), así como un núcleo silvestre para *MDM10* portador de una delección del locus *mat* completo (*i. e.*, *MDM10<sup>+</sup>  $\Delta$ mat*). Al carecer del locus *mat*, este último

núcleo no puede participar en eventos de fertilización y, por ende, no interviene en el desarrollo de los tejidos fértiles de los peritecios (el himenio); sin embargo, es capaz de proveer un alelo silvestre de *MDM10* que puede corregir los defectos generados por la mutación *mdm10-1* en el desarrollo de los tejidos vegetativos de las fructificaciones sexuales. Así, en estos experimentos se observó que la presencia de los núcleos *MDM10<sup>+</sup> Δmat* fue capaz de corregir tanto el retraso en el desarrollo sexual de las mutantes *mdm10-1* como la abundancia de los peritecios formados en ellas (Figura 6.18 D-F). Estas observaciones sugieren que, adicionalmente al retraso en la formación de ascogonios, el desarrollo de los tejidos vegetativos involucrados en la diferenciación de los peritecios también depende de *MDM10*. En estos experimentos tampoco se encontraron defectos significativos en el desarrollo del himenio (datos no mostrados).

Como tampoco los defectos en el desarrollo vegetativo de la cepa *mdm10-1* son muy dramáticos a 27°C, es posible que la pérdida de la función de Mdm10<sup>L420P</sup> a esta temperatura no sea lo suficientemente severa como para ocasionar defectos significativos en el desarrollo meiótico. Así que los cultivos se sometieron a un tratamiento térmico de 33°C, tras un día de haberlos fertilizado, para observar los efectos que una severa disfunción de Mdm10 ocasiona. Es importante mencionar que después de fertilizar los cultivos, éstos se sometieron a un choque térmico relativamente breve (12 h), porque a más de 30°C, no se lleva a cabo la fertilización ni el desarrollo sexual en *P. anserina*. Se analizaron ascas tras 5 días (normalmente se analizan al 4º día) de haber fertilizado los ascogonios debido a que el choque térmico ocasionó un retraso en la formación de las esporas. En ascas de cruza homocigas silvestres, no fue raro encontrar anomalías (10.22%), aunque la cepa *mdm10-1* tenía muchas más (16.24%) (Figura 6.19 F-I). Sin embargo, se necesitarían más repeticiones de este ensayo para hacer un análisis estadístico.

## VII. Discusión

Se han realizado estudios detallados del complejo ERMES en *S. cerevisiae*

pero no se ha explorado con detenimiento en hongos filamentosos. En *S. cerevisiae* se ha observado que este complejo tiene numerosas funciones: está involucrado en el intercambio de lípidos y calcio, en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, en la motilidad mitocondrial, en la fisión mitocondrial, en la segregación del DNA mitocondrial y en la regulación de la población peroxisomal. En hongos filamentosos, solamente se han estudiado las funciones que este complejo desempeña en el mantenimiento de la red mitocondrial y del DNA mitocondrial, así como su contribución a la importación de proteínas mitocondriales. Tanto en *S. cerevisiae* como en hongos filamentosos, la ausencia de determinadas subunidades del complejo ERMES ocasiona defectos en el crecimiento que van desde muy graves hasta prácticamente imperceptibles. En *P. anserina*, los defectos en el crecimiento de la mutante termosensible *mdm10-1* son moderados a 27°C y muy graves a 37°C, en medio de cultivo que contiene dextrina. Cuando se usa ácido oleico como fuente de carbono, los defectos a 27°C son menores, lo que quiere decir que el metabolismo de los ácidos grasos no está afectado en esta mutante y que la biogénesis peroxisomal o la reorganización metabólica inducida por este medio permite compensar la disfunción mitocondrial en cierta medida. Probablemente esto podría también estar relacionado con la capacidad de los peroxisomas de reducir las especies reactivas de oxígeno producidas en grandes cantidades por las mitocondrias defectuosas (López-Huertas *et al.*, 2000). Estas especies reactivas son formadas por la fuga de electrones derivada de la inestabilidad de los complejos de la cadena respiratoria. Esta inestabilidad se le puede atribuir principalmente a la pérdida del DNA mitocondrial, ocasionada por el desensamblaje del complejo ERMES (Meeusen y Nunnari, 2003; Hobbs *et al.*, 2001). En este escenario, no se tienen los genes de muchos componentes de los complejos respiratorios, lo que imposibilita su reemplazo cuando ocurre un daño y se liberan electrones que producen especies reactivas dañinas para la célula. Además, la importación de las subunidades sintetizadas fuera de la mitocondria también está comprometida, ya que Mdm10 también forma parte del complejo SAM, que se encarga de ensamblar barriles  $\beta$  en la membrana mitocondrial externa. Entre estos barriles se encuentra Tom40, el cual importa la mayoría de las proteínas mitocondriales. Por si fuera poco, la alteración de la dinámica de las

mitocondrias, de la cual se habla más adelante, impide que los segmentos mitocondriales en buen estado se fusionen con aquellos que no están dañados y los repolaricen (Abrisch *et al.*, 2020). La eliminación de este mecanismo de rescate exacerba aún más la disfunción mitocondrial.

Si bien la fisión y fusión pueden ocurrir en la mutante *mdm10-1*, (probablemente debido a la existencia de otros complejos de unión entre el RE y las mitocondrias como el EMC (Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex), la disposición de sus mitocondrias muestra que su interconectividad está afectada. En cambio, en las mutantes de la maquinaria de fisión  $\Delta fis1$  y  $\Delta dnm1$ , también se generan mitocondrias gigantes, pero en estos casos estos organelos anormales están inmersos en una red muy densa de mitocondrias interconectadas (Navarro-Espíndola, 2020).

El colapso de la red mitocondrial, que tiene como consecuencia la pérdida de conectividad y el distanciamiento entre las mitocondrias, observado en las regiones distales a 27°C y en la totalidad de la hifa a 37°C, se puede atribuir a que la composición lipídica y proteica de las membranas mitocondriales está alterada y a que existe una deficiencia de calcio en las mitocondrias: este catión es necesario para llevar a cabo varios procesos mitocondriales. También es probable que ERMES cumpla con una función estructural, ya que en la levadura *S. cerevisiae* se han corregido parcialmente los defectos de su ausencia con enlaces sintéticos. Es llamativo que a 27°C, la región cercana al ápice tenga mitocondrias normales y que las regiones más alejadas tengan mitocondrias anormales. Es posible que el ápice sea una región de biogénesis de moléculas y organelos y que la proteína Mdm10<sup>L420P</sup> recién sintetizada sea un poco más estable que después de haber transcurrido unos minutos u horas. Así que, por esta razón, el ápice tiene una red mitocondrial prácticamente normal a esta temperatura. De manera interesante, también se han observado diferentes defectos en la disposición de las mitocondrias en las distintas regiones de las hifas en las mutantes carentes de las proteínas de fisión Fis1 y Dnm1 (Navarro-Espíndola *et al.* 2020), lo que también indica que existe una regulación diferencial de la dinámica mitocondrial a lo largo de las hifas.

En el caso del retículo endoplásmico, se observa un patrón semejante; los parches apicales de las hifas mutantes en *mdm10-1* a 27°C no difieren

significativamente de los silvestres, pero a 37°C son completamente distintos. Una posible explicación es que este complejo tenga una función estructural en el RE que le permita organizarse de tal manera que se formen estos subcompartimentos. En *S. cerevisiae* existe evidencia de la interacción genética entre *RTN1*, *YOP1* y los cuatro genes del complejo ERMES que apoya esta explicación (Voss *et al.*, 2012). Los productos de *RTN1* y *YOP1* están involucrados en inducir la curvatura de la membrana del retículo y se les atribuye la formación de túbulos y de poros nucleares (Shemesh *et al.*, 2014; English y Voeltz, 2013). Aunque es probable que también tengan un papel en la formación de cisternas, ya que en *P. anserina* se ha observado que en ausencia de Yop1 no se forman los parches apicales y que tanto Rtn1 como Yop2 se encuentran predominantemente en estas estructuras. Además, la mitocondria tiene un papel importante en la síntesis de lípidos que, de ser afectado, podría contribuir a la desestabilización de la estructura del RE.

Se ha observado que la localización y división de los núcleos regulan la distribución de septos en *A. nidulans* (Wolkow *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1994). Por ello, es probable que en la cepa *mdm10-1*, las mitosis de los núcleos cercanos al ápice induzcan la formación de septos más cercanos a éste. Es posible que Mdm10 tenga un papel importante, no solamente en la disposición de los parches apicales, sino también en la de otros dominios de RE, como las envolturas nucleares. De igual forma, existe la posibilidad de que, en la cepa mutante, la velocidad a la que los núcleos se dividen no disminuya tanto (o no lo haga) como sucede con el crecimiento de las hifas. Esto tiene como resultado una acumulación de núcleos más cerca del ápice, debido a que, en hongos filamentosos, la mitosis ocurre en regiones apicales y en compartimentos que están sufriendo procesos de diferenciación (Katz y Rosenberger, 1971).

Se desconoce la razón de que exista una agrupación de vacuolas cerca del ápice en las hifas líderes, posiblemente se deba a que ayudan a degradar compuestos fagocitados y partes dañadas de las células para obtener material de construcción nuevo para el crecimiento polarizado. En *A. nidulans* se sabe que el complejo HOPS (Seals *et al.*, 2000) se encarga de establecer uniones homotípicas entre vacuolas, es posible que este complejo también sea el encargado de mantener estas vacuolas juntas en esta región en *P. anserina*.

En ausencia de Mdm10, la localización vacuolar está significativamente afectada. Como se dijo con anterioridad, ciertas mutaciones en el gen de una proteína involucrada en la formación de enlaces entre vacuolas y mitocondrias (Vps13) puede suprimir el defecto en la morfología mitocondrial ocasionado por la falta de Mdm10. Así que, esto sugiere que otros enlaces pueden compensar hasta cierto punto la falta de ERMES. La deslocalización de las vacuolas podría ser un mecanismo de compensación que incrementa la interacción entre organelos, permitiendo el flujo lipídico y de otros metabolitos entre el RE y las mitocondrias de manera indirecta. También es posible que las especies reactivas de oxígeno producto de la disfunción mitocondrial, ocasionen tantos daños que se requieran vacuolas en muchas más partes de la célula para degradar los organelos y moléculas dañadas.

Los resultados de los análisis de peroxisomas deben ser tomados con cautela, ya que el tamaño de la muestra es muy pequeño. Sin embargo, es probable que la falta de ERMES ocasione un alargamiento y disminución en el número de peroxisomas. Esto podría estar relacionado con la interacción que los componentes del complejo ERMES establecen con Pex11, una proteína que es necesaria para la fisión y proliferación peroxisomal (Tower *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2003; Rottensteiner *et al.*, 2003). Al disociarse de las mitocondrias y al haber más Pex11 libre, éste puede inducir una morfología más alargada de los peroxisomas. Como ambos organelos comparten la maquinaria de fisión, es posible que sea necesaria la interacción de Pex11 con el complejo ERMES para reclutar a dicha maquinaria y que la ausencia de su asociación dificulte la fisión peroxisomal.

Es probable que el retraso en la formación de ascogonios se deba a una carencia energética causada por la disfunción mitocondrial derivada de la falta de Mdm10. La escasez de peritecios maduros también apoya esta suposición. Sin embargo, se forma una población abundante de microconidios sin retraso alguno, esto podría indicar que el proceso de formación de estas células debe ser mucho menos demandante energéticamente que el de formar ascogonios y peritecios. Las ascas con esporas de tamaño y número irregular formadas tras el choque térmico indican que Mdm10 y, por lo tanto el complejo ERMES, están involucrados en el desarrollo sexual. Estas anomalías podrían estar asociadas a defectos en la progresión nuclear y/o en la diferenciación de las



esporas durante el desarrollo meiótico y postmeiótico (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). Sin embargo, se necesitan más réplicas de este ensayo para corroborar este resultado.

## VIII. Conclusiones

La disfunción de Mdm10 y por lo tanto del complejo ERMES, afecta el crecimiento vegetativo y la morfología mitocondrial, como se había reportado con anterioridad. Asimismo, esta disfunción afecta la estructura del RE, en particular la de las cisternas apicales. También se altera la distribución de las vacuolas, el posicionamiento de los septos y de los núcleos en la región apical de las hifas. Es probable que Mdm10 tenga un papel en la regulación del número de peroxisomas, posiblemente a través de la inhibición de su fisión. De igual manera, es probable que el desensamblaje del complejo ERMES afecte la progresión del desarrollo sexual.

## IX. Perspectivas

Verificar si los genes *MDM10* y *MMM1* son esenciales, determinar si el etiquetado con *mCherry* y *mTFP* afecta su función. De ser así, será necesario implementar estrategias alternativas de marcaje (*e. g.*, el etiquetado en el extremo N-terminal de las proteínas) para determinar la localización del complejo ERMES y tener más herramientas para estudiar sus funciones.

Analizar el crecimiento vegetativo a 37°C en un medio de cultivo que contenga ácido oleico para confirmar si la biogénesis peroxisomal compensa parcialmente la disfunción mitocondrial, así como analizar las interacciones genéticas de *MDM10* con *PEX11*.

Observar la estructura de las cisternas apicales del RE con el marcador Yop2-GFP en el contexto genético *mdm10-1*. La estructura del RE de la doble mutante  $\Delta yop1$  *mdm10-1* también proporcionaría información interesante al respecto.

Estudiar con más detalle la distribución nuclear mediante la observación directa de los núcleos (*e. g.*, mediante la generación de cepas con núcleos

marcados fluorescentemente) de las hifas en crecimiento de la cepa mutante.

Debido a que la población peroxisomal es heterogénea, sería importante realizar más observaciones de peroxisomas con otro marcador (e. g., uno de la membrana peroxisomal) además de con Fox2-GFP, en medio conteniente dextrina y ácido oleico.

La contribución de ERMES a la yuxtaposición entre peroxisomas y mitocondrias solamente se ha explorado en *S. cerevisiae*, así que es necesario obtener más información al respecto en un modelo multicelular como *P. anserina*.

Falta mucho para entender el papel de ERMES en el desarrollo sexual; para empezar, sería necesario realizar más ensayos de cruza sexuales para obtener datos que se puedan analizar estadísticamente y también observar la progresión nuclear en las diferentes etapas del desarrollo sexual en el contexto *mdm10-1*.

Mdm10 está involucrada en varios procesos, por esto sería importante eliminar únicamente las funciones que desempeña como subunidad del complejo ERMES; en *S. cerevisiae* se identificaron las regiones de Mdm10 que interaccionan con este complejo (Ellenreider *et al.*, 2016). Así que, si también se identificaran en *P. anserina*, se podrían mutar los residuos de aminoácidos de estos sitios para disociar a Mdm10 de ERMES sin afectar sus otras funciones.

## Referencias

Abrisch, R. G. *et al.* (2020). Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *J Cell Biol*, 219(4), e201911122.

Bausewein, T. *et al.* (2017). Cryo-EM structure of the TOM core complex from *Neurospora crassa*. *Cell*, 170, 693-700.

Berger, K. H. *et al.* (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol*, 136(3), 545-53.

Böckler, S. y Westermann, B. (2014). Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev Cell*, 28, 450-58.

Boldogh, I. R. *et al.* (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1 and Mdm10p. *Cell Biol*, 141, 1371-81.

Boldogh, I. R. *et al.* (2001). Arp 2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based motility in yeast. *PNAS*, 98, 3162-67.

Boldogh, I. R. *et al.* (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell*, 14, 4618-27.

Bonnet, C. *et al.*, (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Mol Microbiol*, 62(1), 157-69.

Burgess, S. M. *et al.* (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol*, 126(6), 1375-91.

Camacho, C. *et al.* (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421-30.

Cohen, Y. *et al.* (2014). Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Mol Biosyst*, 10(7), 1742-48.

Coppin, E. *et al.* (1993). Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. *Mol Gen Genet*, 241, 409-14.

Coppin-Raynal, E. *et al.* (1989). Transformation by integration in *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet*, 219, 270-6.

Elbaz, Y. y Schuldiner M. (2011). Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Cell Press*, 36(11), 616-22.

El-Khoury, R. *et al.*, (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet*, 53, 249-258.

Ellenreider, L. *et al.* (2016). Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. *Nature Communications*, 7, 13021.

English, A. R. y Voeltz, G. K. (2013). Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspects Biol*, 5(4), a013227.

Espagne *et al.* (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus

*Podospora anserina*. *Genom Biol*, 9, R77

Esposito, M. *et al.* (2019). Contribution of ERMES subunits to mature peroxisome abundance. *Plos ONE*, 14(3), e0214287.

Esser, K. (1974). *Podospora anserina*. En King, E.C. (Ed.). *Handbook of Genetics*, vol. I (p. 531). New York, Plenum Press.

Friedman, J. R. *et al.* (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334(41), 358-62.

García-Rodríguez *et al.* (2007). Puf3p, a Pumilo family RNA binding domain, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Bio*, 176(2), 197-207.

Geißel, B. *et al.* (2017). The ER-mitochondria encounter structure contributes to hyphal growth, mitochondrial morphology and virulence of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 307, 37-43.

Grossetête, S. *et al.* (2010). FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC genomics*, 11, 81.

Guex *et al.* (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*, 30, S162-S173.

Harris, S. D. *et al.* (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutant defective cytokinesis. *Genetics*, 136, 517-32.

Hobbs, A. E. *et al.* (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids, and required for mtDNA stability. *J Cell Biol*, 152, 401-10.

Jamet-Vierny, C. *et al.* (1997). Mutations in genes encoding the mitochondrial outer membrane proteins Tom70 and Mdm10 of *Podospora anserina* modify the spectrum of mitochondrial DNA rearrangements associated with cellular death. *Mol Cell Biol*, 17(11), 6359-66.

Kats, D. y Rosenberger, R. F. (1971). Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: Effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *J Bacteriol*, 198, 184-90.

Koch, K. V. *et al.* (2003). Deletion of *mdmB* Impairs Mitochondrial Distribution and Morphology in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 55, 114-124.

Kornmann, B. *et al.* (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325, 477-81.

Kornmann, B. *et al.* (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum–mitochondria connections. *PNAS*, 108, 14151-6.

Kornmann, B. y Walter P. (2010). ERMES-mediated ER mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*, 123, 1389-93.

Lang, A. B. *et al.*, (2015). ER-mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 7-12.

Lang, A. B. *et al.* (2015). ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. *J Cell Biol*, 210(6), 883-90.

Liu, W. *et al.* (2019). Endoplasmic Reticulum-Mitochondria contacts are required for pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *SAGE*, 2, 1-10-

Longtine, M. S. *et al.* (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 953-961.

López-Fuentes, A. *et al.* (2020). An endoplasmic reticulum domain is associated with the polarized growth cells of *Podospora anserina* hyphae. *Fungal Genet Biol*, 137, 103338.

López-Huertas, E. *et al.* (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *Embo J*, 19(24), 6770-77.

Mattiazzi, M. *et al.* (2015). Genome-wide localization study of yeast Pex11 identifies peroxisome-mitochondria interactions through the ERMES complex. *J Mol Biol*, 427(11), 2027-87.

Meisinger, C. *et al.* (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*, 7, 61-71.

Meeusen, S. y Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol*, 163, 503-10.

Michel, A. H. y Kornmann, B. (2012). *Biochem Soc Trans*, 40, 445–50.

Murley, A. *et al.* (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*, e00422.

Navarro-Espíndola *et al.* (2020). Distinct contributions of the peroxisome-mitochondria fission machinery during sexual development of the fungus *Podospora anserina*. *Front Microbiol*, 11, 640.

Peraza-Reyes, L. y Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(2), 69-82. 12.

Phillips, M. y Voeltz G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev*, 17, 69-82.

Pinton, P. *et al.* (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria  $Ca^{2+}$  transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27, 6407-18.

Rizet, G. y Engelmann C. (1949). Contribution à l'étude génétique d'un ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina*. *Rehm Rev Cytol Biol Veg*, 11, 201–304.

Rizzuto R. *et al.* (1993). Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to  $IP_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262, 744-47.

Rottensteiner, H. *et al.* (2003). Conserved function of Pex11p and the novel Pe25p and Pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell*, 14(10), 4316-28.

Seals, D. F. *et al.* (2999). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *PNAS*, 97(17), 9402-7.

Shemesh, T. *et al.* (2014). A model for the generation and interconversion of ER morphologies. *PNAS*, 11(49), E5243-51.

Shiota T. *et al.* (2015). Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science*, 349(6255), 1544-8.

Silar, P. (2013). Chap 11 *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology. In Horwitz, B. H., *et al.* (Eds.). *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi* (pp. 283-309). Berlin, Heidelberg: Springer.

Silar, P. (2020). *Podospora anserina*. 978-2-9555841-2-5. hal-02475488

Sogo, L. F. y Yaffe M. P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*, 126(6), 1361-73.

Suaste-Olmos, F. *et al.* (2018). Meiotic development in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor machinery. *Mol Cell Res*, 1865(4), 572-86.

Takano-Rojas, H. *et al.* (2016). Peroxisome dynamics during development of the fungus *Podospora anserina*. *Mycologia*, 108(3), 590-602.

Tam, Y. Y. *et al.* (2003). Pex11-related proteins in peroxisome dynamics: a role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in

*Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 14(10), 4089-102.

Tan, T. *et al.* (2013). Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J Cell Sci*, 126, 3563-74.

Tower, R. J. *et al.* (2011). The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast. *Mol Biol Cell*, 22(10), 1727-38.

Voss C., *et al.* (2012). ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*, 125, 4791-99.

Waterhouse A. *et al.* (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acid Res*, 46, W396-W303.

Wideman, J. G. *et al.* (2013). Analysis of mutations in *Neurospora crassa* ERMES components reveals specific functions related to  $\beta$ -barrel protein assembly and maintenance of mitochondrial morphology. *PloS One*, 8, e71837.

Wideman, J. G. *et al.*, (2010). Roles of the Mdm10, Tom7, Mdm12, and Mmm1 proteins in the assembly of mitochondrial outer membrane proteins in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*, 21, 1725-36.

Wolkow, T. D. *et al.* (1996). Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J Cell Sci*, 109, 2179-88.

Wu H. *et al.* (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science*, 361(6401), eaan5835.

Yamano K. *et al.* (2010). Tom7 regulates Mdm10- mediated assembly of the mitochondrial import channel protein Tom40. *J Biol Chem*, 285, 41222-31.

Yu J. *et al.* (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet and Biol*, 41, 973-81.