



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**El papel de la proteína de fisión FIS1 en la dinámica  
peroxisomal y el desarrollo del hongo filamentoso  
*Podospora anserina***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANDREA HARUMI TAKANO ROJAS**



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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018**



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.

**1. Datos del alumno**

Takano  
Rojas  
Andrea Harumi  
65834104  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
308507382

**2. Datos del tutor**

Dr.  
Carlos Leonardo  
Peraza  
Reyes

**3. Datos del sinodal 1**

Dra.  
María Soledad  
Funes  
Argüello

**4. Datos del sinodal 2**

Dr.  
Jesús  
Aguirre  
Linares

**5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
María Luisa  
Escobar  
Sánchez

**6. Datos del sinodal 4**

Dra.  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe

**7. Datos del trabajo escrito**

El papel de la proteína de fisión FIS1 en la dinámica peroxisomal y el desarrollo del hongo filamentoso *Podospora anserina*.  
55p  
2018

## Índice

<b>Agradecimientos</b>	5
<b>Resumen</b>	6
<b>Introducción</b>	7
<b>Antecedentes</b>	13
<b>Hipótesis</b>	15
<b>Objetivo</b>	15
<b>Objetivos particulares</b>	15
<b>Materiales y métodos</b>	16
Cepas de <i>P. Anserina</i> y medios de cultivo	16
Extracción de DNA y transformación de las cepas de <i>P. Anserina</i>	16
Obtención de cepas que expresan proteínas fluorescentes	16
Obtención de la cepa <i>Δfis1</i>	17
Caracterización molecular de la cepa <i>Δfis1</i> y obtención de las cepas <i>Δfis1</i> con marcadores fluorescentes	17
Mediciones de la movilidad y el tamaño peroxisomal en la cepa silvestre	18
Caracterización de la morfología y la dinámica peroxisomal en el crecimiento vegetativo	18
Morfología y dinámica peroxisomal en condiciones de crecimiento estándar	18
Morfología y dinámica peroxisomal en ácido oleico	18
Morfología y dinámica peroxisomal con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18
Morfología y dinámica peroxisomal a 4°C	19
Morfología y dinámica peroxisomal a 37°C	19
Caracterización de la localización y la morfología peroxisomal en estructuras sexuales	19
Caracterización del desarrollo de ascosporas, porcentaje de maduración y anormalidad	20
Ensayo de complementación genética	20
<b>Resultados</b>	21
Los peroxisomas son organelos sumamente dinámicos	21
Los peroxisomas en las hifas pueden responder a condiciones de estrés metabólico o fisiológico	22
FIS1 es una proteína que participa en la fisión peroxisomal	23
La dinámica peroxisomal en condiciones de estrés está alterada por la ausencia de FIS1	25
Los defectos observados se revierten con la reintroducción del gen <i>FIS1</i>	25
La ausencia de FIS1 afecta la formación de las ascosporas	28
Los microconidios en la cepa <i>Δfis1</i> presentan menos peroxisomas que la cepa silvestre	30
El número, forma y localización de los peroxisomas cambia durante el desarrollo temprano de las ascas	31
La ausencia de FIS1 afecta la segregación nuclear durante la meiosis	33
La ausencia de FIS1 afecta la segregación nuclear durante la mitosis post-meiótica	35
FIS1 es necesaria durante la diferenciación de las ascosporas	36
<b>Discusión de resultados</b>	39
<b>Conclusiones</b>	46
<b>Anexo</b>	47
<b>Referencias</b>	50

## Tabla de abreviaturas

---

AO	Ácido oleico
DAPI	4',6-diamidino-2-finilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMP	Proteína de membrana peroxisomal
PTS1	Señal de importación peroxisomal 1
PTS2	Señal de importación peroxisomal 2
ROS	Especies reactivas del oxígeno

---

## **Agradecimientos**

Al Dr. Leonardo Peraza, por el invaluable bagaje de conocimientos que siempre tuvo el gusto y la paciencia de compartírnos. Por hacernos sentir en casa y por recordarnos constantemente lo apasionante que es la ciencia.

A los miembros del jurado, Dra. Soledad Funes Argüello, Dr. Jesús Aguirre Linares, Dra. María Luisa Escobar Sánchez y Dra. Laura Kawasaki Watanabe, por sus valiosos comentarios en la consolidación de este trabajo escrito.

Al Dr. Jesús Aguirre Linares y el Dr. Wilhelm Hansberg Torres, por facilitarnos equipo sin el que esta investigación no habría sido posible. A Fernando García Hernández por su asesoría con el uso del microscopio confocal y al Dr. Fernando Suaste Olmos por su constante preocupación por mantener el laboratorio ordenado y funcional.

A los miembros del Laboratorio 101-Ote: Karime Nachón, Antonio López, Jorge Castillo, Claudia Zirión, Aldo Meizoso y Rafal Navarro por su apoyo y valiosa retroalimentación durante el desarrollo de esta investigación.

A Claudia Zirión, César Requena y Francisco Amezola, por más razones de las que cabe enumerar en este espacio.

Esta investigación fue realizada con el apoyo del Proyecto de Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-I-319 del Secaniz y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IA201815.

## Resumen

Los peroxisomas son organelos sumamente versátiles y dinámicos cuyas funciones más conservadas son el metabolismo de ácidos grasos y la homeostasis de especies reactivas del oxígeno. En *Podospora anserina*, se ha identificado que los peroxisomas tienen un papel importante en diferentes etapas del desarrollo sexual. Para comprender mejor la función y la regulación de los peroxisomas durante el ciclo de vida de este hongo, estudiamos la dinámica peroxisomal en la cepa silvestre a lo largo de todo el desarrollo y generamos la cepa mutante *Δfis1*, afectada en la maquinaria de fisión de este organelo.

En la cepa silvestre, observamos que la dinámica, morfología y número de peroxisomas está finamente regulada durante el crecimiento vegetativo y a lo largo del desarrollo sexual del hongo. Al evaluar el crecimiento de la cepa silvestre en diferentes condiciones de estrés metabólico y fisiológico, observamos que los peroxisomas son capaces de responder dinámicamente a estas condiciones, modificando su morfología, tamaño y número. Por otra parte evaluamos la función de la proteína FIS1, la cual es una proteína anclada por el extremo C-terminal, que forma parte de la maquinaria de fisión mitocondrial y peroxisomal. Su ausencia resulta en la formación de peroxisomas alargados y afecta la morfología y dinámica de los peroxisomas en todos los tipos celulares. Como consecuencia de estos defectos, tanto la distribución de los peroxisomas en el micelio, como su segregación durante la diferenciación de los microconidios, se ve afectada.

Durante el desarrollo sexual, observamos que las cruces de la cepa carente de FIS1 producen, en un porcentaje elevado, ascas con defectos en el número, tamaño y forma de las ascosporas. Análisis citológicos detallados mostraron que la ausencia de FIS1 produce defectos de segregación peroxisomal tanto en las células dicarióticas como en los meiocitos tempranos. Asimismo, observamos que en ausencia de FIS1 el arreglo de los husos acromáticos está afectado durante la meiosis y en la mitosis post-meiótica que precede a la diferenciación de ascosporas. Esto resulta en un defecto de segregación nuclear, que incide en la compartimentación de las ascosporas, generando esporas con números anormales de núcleos y ascas con números anormales de esporas. Aunado a ello, observamos defectos en la morfología de las esporas, por lo que, adicional a la progresión nuclear, FIS1 también se requiere durante la diferenciación de las ascosporas.

Nuestros resultados reflejan una participación compleja de FIS1 durante el desarrollo. Los defectos observados en *P. Anserina* en la cepa *Δfis1* pueden deberse a la alteración de la dinámica peroxisomal, de la dinámica mitocondrial o de ambas. Asimismo, la alteración en la dinámica puede estar afectando a los organelos a nivel estructural, metabólico y/o energético, por lo que es necesario el desarrollo de diversas líneas de investigación para esclarecer con precisión los diferentes procesos que son modulados por FIS1 y que resultan importantes durante el desarrollo sexual.

## Introducción

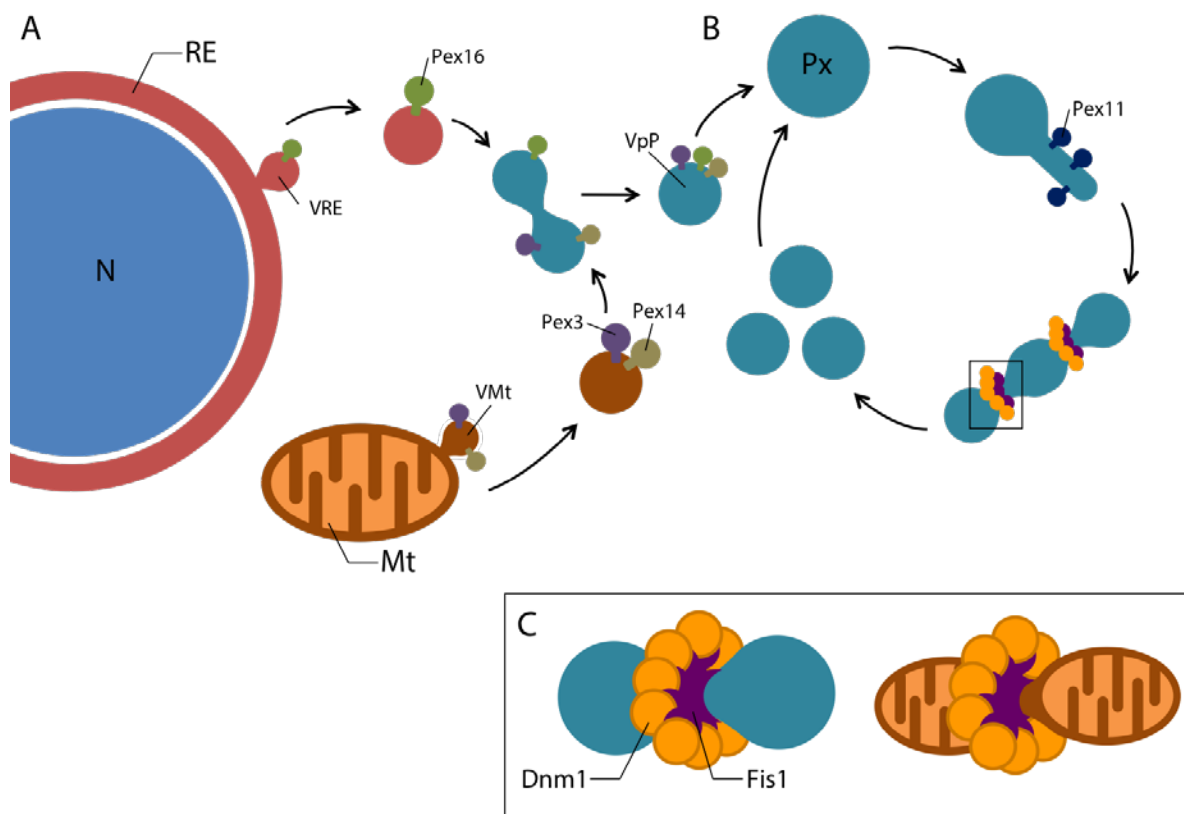
En el modelo tradicional de la célula eucarionte, los organelos eran percibidos como unidades discretas que llevaban a cabo funciones específicas en compartimentos bien delimitados. El desarrollo de la investigación en biología celular, biología molecular y bioquímica, ha abierto ampliamente este panorama. Actualmente, sabemos que los organelos son sumamente dinámicos y que están en constante interacción, lo que les permite llevar a cabo una amplia variedad de funciones. Más aún, se ha demostrado que los organelos son entidades versátiles, cambiantes, capaces de responder ante las condiciones de estrés externas y permitir una repuesta fisiológica de la célula (Schrader e Islinger, 2016). Los peroxisomas son organelos de una membrana, son sumamente dinámicos y, aunque hay una amplia caracterización de sus funciones –muy variadas entre organismos e incluso entre tipos celulares de un mismo organismo (Deb y Nagotu, 2017)-, es poco lo que se ha caracterizado con respecto a su dinámica y los efectos de la alteración de dicha dinámica en los procesos de desarrollo.

Los peroxisomas son organelos presentes en casi todos los organismos eucariontes, sus funciones más conservadas son el metabolismo de ácidos grasos mediante la  $\beta$ -oxidación, y la homeostasis de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Peraza-Reyes et al., 2010). Sin embargo, estos organelos presentan una amplia diversidad funcional, que es claramente representada en el grupo de los hongos. En ellos, los peroxisomas presentan enzimas involucradas en la asimilación del metanol, la síntesis de biotina y metabolitos secundarios, y se sabe que son importantes durante el crecimiento y el desarrollo (Deb y Nagotu, 2017). Asimismo, en los hongos ascomicetos septados, una subpoblación de peroxisomas se diferencia para conformar los cuerpos de Woronin, encargados de bloquear los poros de estos septos cuando las hifas del hongo sufren daños mecánicos (Peraza-Reyes et al., 2010).

A pesar de su amplia diversidad funcional, los peroxisomas presentan las mismas rutas de biogénesis en los eucariontes en que se encuentran: *de novo* y a partir de la fisión de peroxisomas preexistentes. La biogénesis *de novo* consiste en la formación de vesículas pre-peroxisomales a partir del retículo endoplásmico, que contienen algunas de las proteínas de membrana peroxisomal (PMPs) necesarias para la inserción de otras PMPs y para la importación de proteínas de matriz (Agrawal y Subramani, 2016). Recientemente, se describió que en cepas de fibroblastos de mamífero carentes de peroxisomas, éstos pueden formarse por la fusión de vesículas derivadas del retículo endoplásmico que contienen el factor de biogénesis peroxisomal (peroxina) Pex16 y vesículas mitocondriales que contienen Pex3 y Pex14, conformando así vesículas pre-peroxisomales (Fig.1<sup>a</sup>) (Sugiura et al., 2017). Estas vesículas maduran al importar las proteínas necesarias para llevar a cabo el metabolismo peroxisomal. Para ello, requieren una maquinaria de importación que se localiza en la membrana del



organelo. Las proteínas que se importan a la matriz del peroxisoma presentan una señal de importación peroxisomal (PTS) 1 que es reconocida por Pex5, o PTS2, que es reconocida por Pex7 junto con su co-receptor Pex20 (Kim y Hettema, 2015). El receptor, unido a la proteína de matriz, es reconocido por el complejo de translocación en el peroxisoma (Pex13, Pex14 y Pex17). La proteína cargo se translocan a la matriz peroxisomal, separándola del receptor, que se mantiene en la membrana (Meinecke et al., 2010). El receptor es monoubiquitinado y liberado por el complejo de dislocación (Pex1, Pex6 y Pex26) para reutilizarse en el citosol. La monoubiquitinación está mediada por Pex4 y Pex22, junto con el complejo RING-finger: Pex2, Pex10 y Pex12, que se encuentran unidos al complejo de translocación por Pex8. El receptor también puede ser poliubiquitinado para ser degradado por el proteasoma (Platta et al., 2016).



**Fig. 1 Modelos de biogénesis peroxisomal.** (A) La formación *de novo* de los peroxisomas. Los peroxisomas se pueden formar a partir del retículo endoplásmico mediante vesículas que contienen algunas peroxinas de la membrana peroxisomal. En mamíferos, vesículas derivadas del RE que contienen la peroxina Pex16, se fusionan con vesículas derivadas de las mitocondrias, que contienen a Pex3 y Pex14, para dar lugar a las vesículas pre-peroxisomales que maduran en peroxisomas al importar las proteínas de su matriz. (B) La formación de peroxisomas a partir de peroxisomas pre-existentes. Los peroxisomas también pueden proliferar por fisión. La proteína Pex11 deforma la membrana y favorece el anclaje de la proteína de fisión Fis1 que recluta a Dnm1. Oligómeros de Dnm1 forman un anillo de constricción alrededor de la membrana y fisionan la membrana peroxisomal. (C) Esta maquinaria participa en la fisión peroxisomal y mitocondrial (Ver detalles en el texto). Abreviaciones: N: núcleo; RE: retículo endoplásmico; VRE: vesícula del retículo endoplásmico; Mt: mitocondria; VMt: vesícula de la mitocondria; VpP: vesícula pre-peroxisomal; Px: peroxisoma.

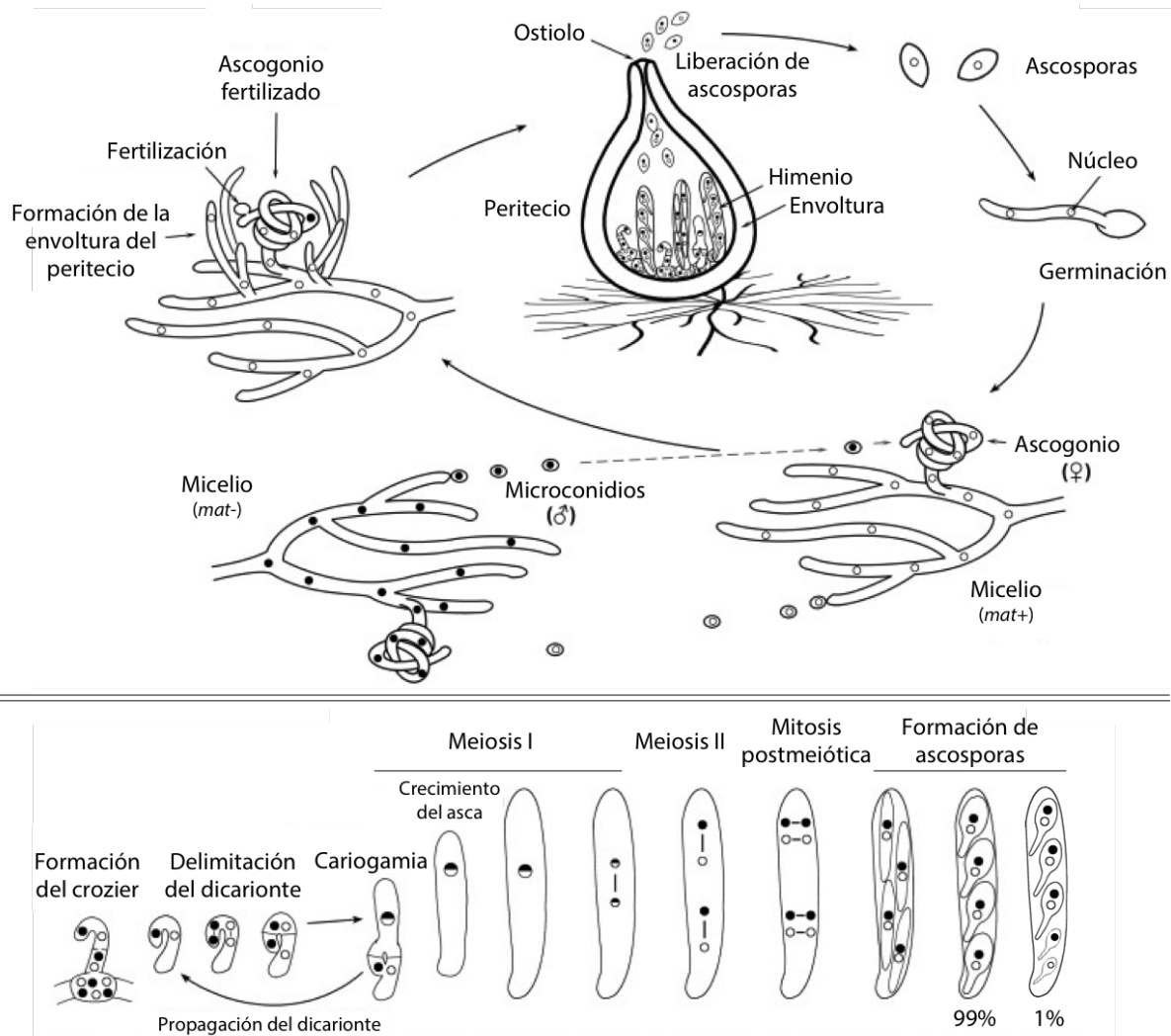
Los peroxisomas maduros pueden formar nuevos peroxisomas a partir de su fisión, este proceso requiere la deformación y el alargamiento de la membrana peroxisomal, mediado por las proteínas de la familia Pex11 (Schrader et al., 2015), que además favorecen el anclaje de la maquinaria de fisión (Fig.1B). Las proteínas que conforman esta maquinaria participan también en la fisión mitocondrial: Fis1 y Dnm1 (Drp1 en mamíferos) (Nagotu et al., 2010), así como los adaptadores Mdv1/Caf4 identificados en *Hansenula polymorpha* y *Saccharomyces cerevisiae* (Nagotu et al., 2008; Motley et al., 2008) y Mff, MiD49 y MiD51 en mamíferos (Gandre-Babbe y van der Bliek, 2008; Osellame et al., 2016). La proteína Fis1 se inserta en la membrana peroxisomal por su extremo C-terminal, mientras que su extremo N-terminal presenta un dominio tetratricopeptídico con el que interactúa con las proteínas adaptadoras (Suzuki et al., 2003; Suzuki et al., 2005). En *S. cerevisiae*, los adaptadores reclutan a Dnm1 y regulan su interacción con Fis1. Dnm1 es la GTPasa que lleva a cabo la fisión de la membrana peroxisomal y mitocondrial a partir de la formación de un anillo de constricción (Fig.1C) (Mozdy et al., 2000; Schrader et al., 2015). En mamíferos, los adaptadores en conjunto con Drp1 forman un complejo de ensamblaje que permite la regulación del proceso de fisión, por lo que la función de las proteínas adaptadoras va más allá del reclutamiento de Drp1 (Koirala et al., 2013).

La fisión peroxisomal es necesaria para la regulación de diversos procesos celulares: el crecimiento en diversas fuentes de carbono requiere la proliferación peroxisomal para su metabolismo, como es el caso del ácido oleico en diversos organismos (Gurvitz y Rottensteiner, 2006) o el metanol en levaduras metilótrofas como *H. Polymorpha* y *Pichia pastoris* (Deb y Nagotu, 2017). La proliferación también es un proceso previo a la división celular, que permite la herencia de peroxisomas a las células hijas (Fagarasanu et al., 2007). La degradación selectiva de peroxisomas o pexofagia permite eliminar poblaciones de peroxisomas en respuesta a condiciones del ambiente celular, sin embargo, depende de procesos de fisión previos (Mao et al., 2014; Manivannan et al., 2013). Deficiencias en la proliferación peroxisomal se han asociado con enfermedades en mamíferos (Schrader et al., 2012), y alteraciones en la virulencia en hongos como *Magnaporthe oryzae* (Zhong et al., 2016).

*P. anserina* es un hongo filamentoso del grupo de los ascomicetos y es el modelo biológico en el que se desarrolló esta investigación. En él, se han observado diversos defectos en distintas etapas del desarrollo asociadas a alteraciones en la biogénesis peroxisomal y a la importación de proteínas peroxisomales (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). Particularmente, la ausencia de varias de las peroxinas que conforman la maquinaria de importación impide la inducción de la meiosis durante la reproducción sexual. Esto, aunado a la facilidad de manejo de este hongo, a la velocidad con que completa su ciclo de vida y a la disponibilidad de su secuencia genómica completa (Silar, 2013;

Paoletti y Saupe, 2008), lo hacen un modelo muy atractivo para el estudio de la dinámica peroxisomal.

*P. anserina* presenta los tipos sexuales *MAT+* y *MAT-*, las cepas de cada tipo sexual desarrollan estructuras sexuales masculinas (los microconidios) y femeninas (los ascogonios), a partir de la diferenciación de las hifas vegetativas, pero la fertilización se lleva a cabo únicamente entre un ascogonio y un microconidio de diferente tipo sexual (Grognet et al., 2014; Bennet y Turgeon, 2016) (Fig.2). Las hifas que rodean al ascogonio forman una estructura protectora alrededor del mismo y en conjunto constituyen al protoperitecio, que una vez fertilizado madura en un peritecio dentro del cual se desarrollarán las ascas (meiocitos) y ascosporas (esporas sexuales derivadas de la meiosis). Dentro del peritecio se desarrolla una hifa con forma de gancho llamada crozier, donde se localizan dos núcleos, uno de cada tipo sexual. Los núcleos llevan a cabo una mitosis y, al mismo tiempo, se forman dos septos que compartimentan el crozier en tres células: las células basal y lateral, que presentan un núcleo cada una, y la célula central, en la que se aíslan dos núcleos de tipos sexuales opuestos. Aquí se lleva a cabo la cariogamia o fusión de núcleos, e inmediatamente después comienza la meiosis. Finalmente, una mitosis post-meiótica da lugar a ocho núcleos haploides, cuatro de cada tipo sexual. Las esporas se forman compartimentando dos núcleos de tipo sexual opuesto dentro de cada espora, lo que resulta en cuatro ascosporas con dos núcleos cada una (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013; Bennett y Turgeon, 2016). Sin embargo, en un porcentaje bajo, se forman ascas con cinco esporas, dos uninucleadas y tres con dos núcleos, resultado de la dirección en que se da la última división mitótica (Silar, 2013).



**Fig. 2 Ciclo de vida de *P. Anserina*.** Arriba: *P. Anserina* es un hongo heterotálico con dos tipos sexuales (*mat+* y *mat-*). La fertilización se da entre un microconidio y un ascogonio de tipos sexuales opuestos. Una vez fertilizado, se forma un peritecio y dentro de éste se forman las ascosporas. Abajo: La formación de las ascosporas comienza con la diferenciación de un crozier, donde se lleva a cabo una división mitótica y se compartimentan dos núcleos de tipo sexual opuesto. La célula que contiene el par de núcleos se diferencia en un asca, donde se lleva a cabo la cariogamia, meiosis y, finalmente, una mitosis postmeiótica. Las esporas presentan dos núcleos de tipo sexual opuesto, aunque en un bajo porcentaje se forman tres esporas dicarióticas y un par de esporas uninucleadas. (Imagen de Takano-Rojas et al., 2016).

Como se mencionó previamente, en *P. Anserina* las cepas carentes de las peroxinas que participan en la importación de proteínas (*Apex1*, *Apex2*, *Apex4*, *Apex6*, *Apex8*, *Apex10*, *Apex12*, *Apex13*, *Apex20*, *Apex22* y *Apex26*) están afectadas en la inducción de la meiosis, de modo que en cruza homocigas de estas cepas se forman los croziers, pero no se lleva a cabo la cariogamia (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013 y Suaste-Olmos et al., 2018). En el caso de *Apex5* y *Apex7*, la meiosis continúa, pero se presenta una distribución nuclear incorrecta, con deficiencias en la orientación de los husos acromáticos durante la segunda división meiótica y/o durante la mitosis post-meiótica, lo que resulta en esporas anucleadas o con números anormales de núcleos (Peraza-Reyes y Berteaux-

Lecellier, 2013; Bonnet et al., 2006). Aunado a ello, en *Δpex5* la morfología y distribución mitocondrial también está afectada (Bonnet et al., 2006).

A partir de estas observaciones y de los defectos que se han descrito como resultado de deficiencias en la maquinaria de fisión, nos preguntamos si la eliminación de FIS1 tendría implicaciones en el crecimiento vegetativo y desarrollo sexual de *P.Anserina*.

## Antecedentes

Los efectos de la ausencia de la proteína DNMI en *P. Anserina* han sido estudiados previamente mediante la eliminación del gen *DNMI*. En ausencia de esta proteína, se reportó una morfología alargada en las mitocondrias durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, en cultivos senescentes, se observaron mitocondrias fragmentadas tanto en la cepa silvestre, como en la cepa carente de DNMI, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de fisión independiente de esta proteína al menos en colonias longevas (Scheckhuber et al., 2007). Asimismo, se reportó para la cepa *Δdnm1* que, tanto en *P. Anserina* como en *S. cerevisiae*, hay un incremento significativo en la esperanza de vida. Este efecto se asoció a las alteraciones en la dinámica mitocondrial y su papel en la liberación de citocromo *c*, que precede a la inducción del programa apoptótico en la célula (Scheckhuber et al., 2007). En estudios posteriores se observó que en *P. Anserina* la esperanza de vida disminuye con la sobreexpresión de DNMI o de DNMI y FIS1 en conjunto (Scheckhuber et al., 2008). Sin embargo, aunque los autores no reportan alteraciones importantes en la morfología y la tasa de crecimiento del micelio, ni en la fertilidad de ninguno de los dos tipos sexuales, sí reportan una menor frecuencia de germinación de ascosporas en *Δdnm1* con respecto a la cepa silvestre (Scheckhuber et al., 2007).

En 2015, Lefevre y colaboradores generaron una proteína quimérica fusionando el extremo N-terminal de Fis1 y el extremo C-terminal de Pex15 de *S. Cerevisiae*, anclando Fis1 a los peroxisomas, pero no a las mitocondrias. Al comparar la esperanza de vida, que se extiende de manera importante en ausencia de Fis1, se determinó que no había una diferencia significativa entre la cepa *Δfis1*, en la que tanto mitocondrias como peroxisomas se encontraban afectados, y en la cepa con la construcción Fis1-Pex15, donde sólo la fisión mitocondrial estaba afectada (Lefevre et al., 2015). Estos resultados sugieren que el incremento en la esperanza de vida es resultado de la alteración de la dinámica peroxisomal y no de la mitocondrial.

En conjunto, las investigaciones previas sobre la proteína Fis1 han estado enfocadas particularmente en el estudio de la dinámica mitocondrial y sus efectos a nivel vegetativo y de envejecimiento, sin embargo, el trabajo de Lefevre, sugiere que al menos algunos de los efectos observados podrían ser resultado de la alteración en la dinámica peroxisomal. Estos resultados, en conjunto con los defectos que se han descrito en las cepas carentes de factores de biogénesis peroxisomal en *P. Anserina* (Bonnet et al., 2006; Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013), sugieren que la maquinaria de fisión peroxisomal y mitocondrial podría tener una función importante en el desarrollo vegetativo y sexual de *P. Anserina*, lo que hace relevante su estudio.

El presente trabajo representa la primera caracterización del efecto que genera la ausencia de Fis1 para *P. Anserina*, así como de los efectos de la alteración de la maquinaria de fisión en la dinámica peroxisomal y el primero que reporta los defectos a nivel de desarrollo sexual.

**Hipótesis**

La proteína FIS1 participa en la fisión peroxisomal y su ausencia altera la dinámica de este organelo. Esta proteína es necesaria durante el desarrollo sexual en *P. Anserina*.

**Objetivo**

Determinar los efectos de la ausencia de la proteína de fisión mitocondrial y peroxisomal, FIS1, en la dinámica peroxisomal y durante el crecimiento vegetativo y el desarrollo sexual de *P. Anserina*.

**Objetivos particulares**

- Determinar el papel de FIS1 en la dinámica peroxisomal.
- Caracterizar la dinámica peroxisomal en *P. Anserina* durante todo su ciclo de vida.
- Identificar las alteraciones durante el ciclo de vida de *P. Anserina* en ausencia de la proteína FIS1.



## **Materiales y métodos**

### **Cepas de *P. Anserina* y medios de cultivo**

La cepa silvestre “S” de *P. Anserina* fue facilitada por R. Debuchy (I2BC, Orsay, Francia). La secuencia genómica completa de este hongo puede encontrarse en <http://podospora.igmors.u-psud.fr>. Para su crecimiento, se utilizó medio de cultivo M2 con dextrina o ácido oleico como fuentes de carbono y medio G para la germinación de ascosporas, en ambos casos a 27°C. Los protoplastos para la transformación de cepas se obtuvieron de implantes de la cepa  $\Delta ku70$  (El-Khoury et al., 2008) en medio M2YE. Esta cepa presenta una inactivación de la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), lo que aumenta la frecuencia de recombinación homóloga y facilita la sustitución del gen silvestre por el casete de delección (Gandía et al., 2016). Los medios y antibióticos utilizados pueden consultarse en el Anexo y en [podospora.igmors.u-psud.fr/methods.php](http://podospora.igmors.u-psud.fr/methods.php).

### **Extracción de DNA y transformación de las cepas de *P. Anserina***

El DNA de las cepas se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita en Coppin-Raynal et al.(1989). Brevemente, se liofilizó el micelio de cada cepa de interés, posteriormente se trató con EDTA (50mM, pH 8, SDS 0.2%) y acetato de potasio (5M) para precipitar proteínas. Los ácidos nucleicos fueron obtenidos usando fenol-cloroformo (1:1). El DNA se extrajo añadiendo etanol y se dejó secar para, finalmente, resuspenderse en agua libre de nucleasas.

La metodología para la transformación de protoplastos se realizó de acuerdo conCoppin-Raynal et al.(1989). Brevemente, los protoplastos se sometieron a choque térmico (48°C) durante 5 minutos y posteriormente se añadió el DNA del casete de delección y se incubó en PEG 60% (polietilenglicol 4000) durante 15 minutos. Para la regeneración de los protoplastos se utilizó medio RG con el antibióticocorrespondiente y se incubaron de 5-8 días a 27°C. Finalmente, se verificó la identidad de las cepas obtenidas mediante PCR.

### **Obtención de cepas que expresan proteínas fluorescentes**

La cepa con el marcador fluorescente *GFP-PTS1::ble*, fue proporcionada por Veronique Berteaux-Lecellier (CRIOBE, CNRS, Polinesia francesa). Consiste en una construcción con el promotor de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), seguido del gen codificante para la proteína verde fluorescente (*EGFP*, del plásmido pEGFP1), unido en su extremo 3' a la secuencia de localización peroxisomal (PTS1). Esta construcción se introdujo en el plásmido pPaBle que presenta el gen *ble* que confiere resistencia a la fleomicina (Ruprich-Robert et al., 2002). El plásmido fue utilizado para transformar protoplastos de la cepa silvestre.

La cepa *FOX2::mCherry::hph* fue generada en el laboratorio por Fernando Suaste Olmos. Esta cepa presenta la secuencia mCherry unida al extremo 3' del gen endógeno *FOX2*. La construcción con la que se generó esta cepa consiste en  $\approx 700$  pares de bases (pb) de la región codificante de *FOX2*, excluyendo el codón de paro, unido al cassette mCherry-Hyg<sup>R</sup>, que presenta la secuencia codificante de mCherry, seguida del gen de resistencia a higromicina y  $\approx 680$  pb de la región 3'UTR de *FOX2*. El producto de PCR se insertó por recombinación homóloga mediante la transformación de protoplastos de la cepa *Δku70*. Las transformantes se recuperaron en medio suplementado con higromicina B (75 mg/mL) y su inserción en el locus correcto fue verificada por análisis de PCR.

### **Obtención de la cepa *Δfis1***

La cepa *Δfis1* fue generada por Jorge Luis Castillo Canizales, para obtenerla, construyó un casete de delección con el gen marcador *nat1* de *Streptomyces noursei* que confiere resistencia a la nourseotricina (obtenido del plásmido pAPI509, derivado de pAPI508 (El-Khoury et al., 2008), flanqueado por  $\approx 700$  pb de las regiones 5'UTR y 3'UTR de *FIS1*. Cada segmento se obtuvo individualmente con oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia genómica de *P. Anserina* y dichos segmentos se unieron mediante un PCR de fusión (Kuwayama et al., 2002). Esta construcción fue utilizada para reemplazar genéticamente el gen *FIS1*, mediante transformación y recombinación homóloga de protoplastos de la cepa *Δku70*. Las transformantes primarias se seleccionaron por su resistencia al antibiótico en medios suplementados con nourseotricina (40  $\mu$ g/mL) y se obtuvieron en un contexto monocariótico *KU70+* realizando cruza con la cepa silvestre.

### **Caracterización molecular de la cepa *Δfis1* y obtención de las cepas *Δfis1* con marcadores fluorescentes**

Se confirmó la sustitución genética a partir de PCRs con DNA de las transformantes purificadas, obtenido de acuerdo con la metodología descrita previamente. Los PCRs permitieron determinar la ausencia del gen *FIS1* y la presencia del gen *nat1* en el sitio de interés (la lista de oligonucleótidos utilizados y condiciones de PCR pueden consultarse en el Anexo).

Las cepas *Δfis1* con marcadores fluorescentes (*Δfis1::NAT1 GFP-PTS1::bley* *Δfis1::NAT1 FOX2::mCherry::hph*) se obtuvieron mediante las cruza sexuales heterocigas *Δfis1* x *GFP-PTS1::ble* y *Δfis1* x *FOX2::mCherry::hph*, a partir de las cuales se identificaron y aislaron esporas monocarióticas. Las cepas obtenidas se inocularon en medio con fleomicina (40  $\mu$ g/mL) o higromicina (75  $\mu$ g/mL), respectivamente, para determinar la presencia de los marcadores de interés (la lista de cepas y plásmidos puede consultarse en el Anexo).

### **Mediciones de la movilidad y el tamaño peroxisomal en la cepa silvestre**

Se realizaron observaciones de la cepa silvestre en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular. Se tomaron fotografías cada 0.38-3s o cada 20s para registrar el movimiento de los peroxisomas. La velocidad de éstos se determinó midiendo la distancia recorrida por un peroxisoma durante al menos 5 cuadros consecutivos, en función del tiempo entre cada uno de ellos. Para determinar el diámetro de los peroxisomas, se realizaron proyecciones en el plano z, obteniendo imágenes cada 0.2  $\mu\text{m}$ . El análisis de las imágenes se realizó en el software Zen 2012 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

### **Caracterización de la morfología y la dinámica peroxisomal en el crecimiento vegetativo**

Se realizaron cinco ensayos para evaluar la morfología y dinámica peroxisomal de las cepas silvestre y mutante. La observación de las cepas se realizó por microscopía de fluorescencia, utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 y se recuperaron imágenes representativas de cada condición de crecimiento mediante una cámara Neo Andor sCMOS. El análisis de las imágenes se realizó en el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

#### **Morfología y dinámica peroxisomal en condiciones de crecimiento estándar**

Se observó la morfología y la dinámica peroxisomal en condiciones estándar de crecimiento, utilizando medio MM con dextrina como fuente de carbono, tras un día de incubación a 27°C en oscuridad. Para la observación, se realizaron cortes de 1cm<sup>2</sup> del medio, abarcando una colonia completa. Se colocó el agar con la colonia sobre un portaobjetos, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada sobre la colonia y se colocó el cubreobjetos. La observación se realizó de la parte más distal de la colonia hacia el centro. El mismo procedimiento fue utilizado para la observación de colonias en otras condiciones, introduciendo las variaciones pertinentes. En cada caso, se observaron al menos 5 colonias de cada cepa.

#### **Morfología y dinámica peroxisomal en ácido oleico**

Se colocaron injertos de las cepas en medio de crecimiento AOM que cuenta con ácido oleico como única fuente de carbono, se tomaron colonias con un día de crecimiento en incubación a 27°C. La observación se realizó de acuerdo a los parámetros mencionados previamente.

#### **Morfología y dinámica peroxisomal con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Las cepas se colocaron en medio MM. Previo a la observación, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM sobre la colonia y se colocó el portaobjetos 2 minutos después de la aplicación.

Las cepas se observaron en intervalos cortos (10-15 minutos) para evitar efectos debidos a la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ante la exposición prolongada a luz intensa.

### **Morfología y dinámica peroxisomal a 4°C**

Se colocaron las cepas en medio MM y se incubaron durante un día a 27°C. Posterior a este tiempo de incubación, se colocaron en refrigeración a 4°C durante 12 horas. La observación de las cepas se realizó en intervalos cortos (10-15 minutos), en portaobjetos sujetos a un enfriamiento previo para evitar efectos debidos al aumento de la temperatura.

### **Morfología y dinámica peroxisomal a 37°C**

Se colocaron las cepas en medio MM y se incubaron durante un día a 27°C. Previo a la observación, se colocaron a 37°C durante 1 hora en una cámara húmeda. La observación de las cepas se realizó en intervalos cortos (10-15 minutos) para evitar efectos debidos a la disminución de temperatura. No se realizaron ensayos con mayor tiempo de exposición a esta temperatura para evitar la desecación del medio de crecimiento.

### **Caracterización de la localización y la morfología peroxisomal en estructuras sexuales**

La observación de ascogonios y microconidios se realizó colocando injertos de las cepas en medio M2. Tras un día de incubación a 27°C en iluminación, se colocaron cubreobjetos inclinados a 45° en el borde de las colonias para recuperar el micelio aéreo. Se dejaron crecer las colonias en incubación durante 24 horas más y se recuperaron los cubreobjetos, se analizaron al microscopio colocando sobre los portaobjetos con 20 µL de agua.

Para la observación de los estadios posteriores (croziers, meiocitos y ascosporas), se extrajeron células sexuales de los peritecios de las cepas silvestre y mutante con el marcador fluorescente *FOX2::mCherry*. Éstas se fijaron con paraformadehído 7.4% y se tiñeron los núcleos y el material genético mitocondrial con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 0.5µg/mL). Los microtúbulos se tiñeron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti- $\alpha$ -tubulina (Anti-alpha Tubulin antibody Abcam, DM1A ab80779) (1:1200), con el que se incubaron una noche a 37°C, seguido de anticuerpo secundario de burro anti-“ratón” acoplado a fluoresceína (Fluorescein (FITC) AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Jackson 715-095-150), siguiendo la metodología descrita en Thompson-Coffe y Zickler (1994).

### **Caracterización del desarrollo de ascosporas, porcentaje de maduración y anormalidad**

Los ensayos de reproducción sexual se realizaron colocando las cruces homocigotas de las cepas silvestre y mutante en medio M2, durante 3 días a 27°C con iluminación. Se fertilizaron y se dejaron crecer 3 días más en las mismas condiciones. A partir del tercer día, se obtuvieron los tejidos internos (*centra*) de 5-7 peritecios y se observaron en el microscopio; se cuantificó el número de ascas maduras (considerando como asca madura aquella con al menos dos esporas melanizadas) y el número de ascas normales (es decir, aquellas con 4 esporas del mismo tamaño o 5 esporas, 3 grandes y 2 chicas). La cuantificación se realizó hasta 7 días después de la fertilización; el experimento se repitió tres veces para cada cruce.

### **Ensayo de complementación genética**

Se realizó la complementación genética para verificar que los fenotipos observados fueran resultado de la delección del gen *FISI*. Se reinsertó ectópicamente el plásmido GA0AA364BH06 (Biblioteca genómica de *P. Anserina* Genoscope, Francia; Espagne et al., 2008), que contiene el gen *FISI* silvestre, mediante co-transformación de protoplastos de la cepa  $\Delta fis1::NAT1 FOX2::GFP::hph mtCherry::ble$ , junto con el plásmido pSM334\_Geneticin (R. Debuchy I2BC, Orsay, Francia).

Se comparó cualitativamente el crecimiento de las cepas silvestre,  $\Delta fis1$  y  $\Delta fis1$  complementada, en medio M2 y AO. Se verificó por microscopía de fluorescencia la recuperación de la morfología peroxisomal en las cepas complementadas tras un día de crecimiento en medio M2, siguiendo la metodología descrita previamente.

## Resultados

### Los peroxisomas son organelos sumamente dinámicos

Nuestra primera aproximación para el estudio de la dinámica peroxisomal fue su caracterización en la cepa silvestre en condiciones estándar de crecimiento (medio M2, 27°C). Ésta se realizó utilizando una cepa que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) unida a la secuencia de localización peroxisomal PTS1 (GFP-PTS1) con un promotor constitutivo, lo que permitió la visualización de los peroxisomas por microscopía confocal.

Los peroxisomas de las hifas en crecimiento de la cepa silvestre presentan una morfología mayoritariamente esférica, con un diámetro entre 0.43-1.31  $\mu\text{m}$  (promedio  $0.75 \pm 0.16 \mu\text{m}$ ,  $n=90$ ), sin embargo, se observa ocasionalmente una fracción de peroxisomas que presentan una morfología alargada, más variable en tamaño (Fig.1).

En esta cepa, los peroxisomas se encuentran en constante movimiento. Se observó que la mayoría de los peroxisomas se mueven con movimientos vibratorios con una velocidad promedio de  $222 \pm 104 \text{ nm/s}$  ( $n=90$ ). El movimiento general de éstos se da en la dirección del crecimiento de la hifa a una velocidad global relativamente constante, en promedio,  $39 \pm 21 \text{ nm/s}$  ( $n=65$ ). Se observan también movimientos rápidos, que abarcan una distancia más amplia y que ocurren hacia la punta de las hifas (movimiento acrópeto) o en sentido inverso (basípeto). En el 70% de los casos, un mismo peroxisoma presenta movimiento en ambas direcciones y la frecuencia con que ocurren movimientos en uno u otro sentido, es similar. Asimismo, la distancia y velocidad son similares independientemente de su dirección (Tabla 1).

**Tabla 1. Movilidad de los peroxisomas en la cepa silvestre.**

<b>Movimientos lentos</b>	<b>Velocidad promedio <math>\pm</math> DE</b>	
Movimientos cortos	$39 \pm 21 \text{ nm/s}$	
Movimientos saltatorios	$222 \pm 104 \text{ nm/s}$	
<b>Movimientos rápidos</b>	<b>Distancia promedio <math>\pm</math> DE</b>	<b>Velocidad promedio <math>\pm</math> DE</b>
Acrópeto	$9.8 \pm 6.2 \mu\text{m/s}$	$1.5 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$
Basípeto	$9.4 \pm 3.5 \mu\text{m/s}$	$1.4 \pm 0.4 \mu\text{m/s}$

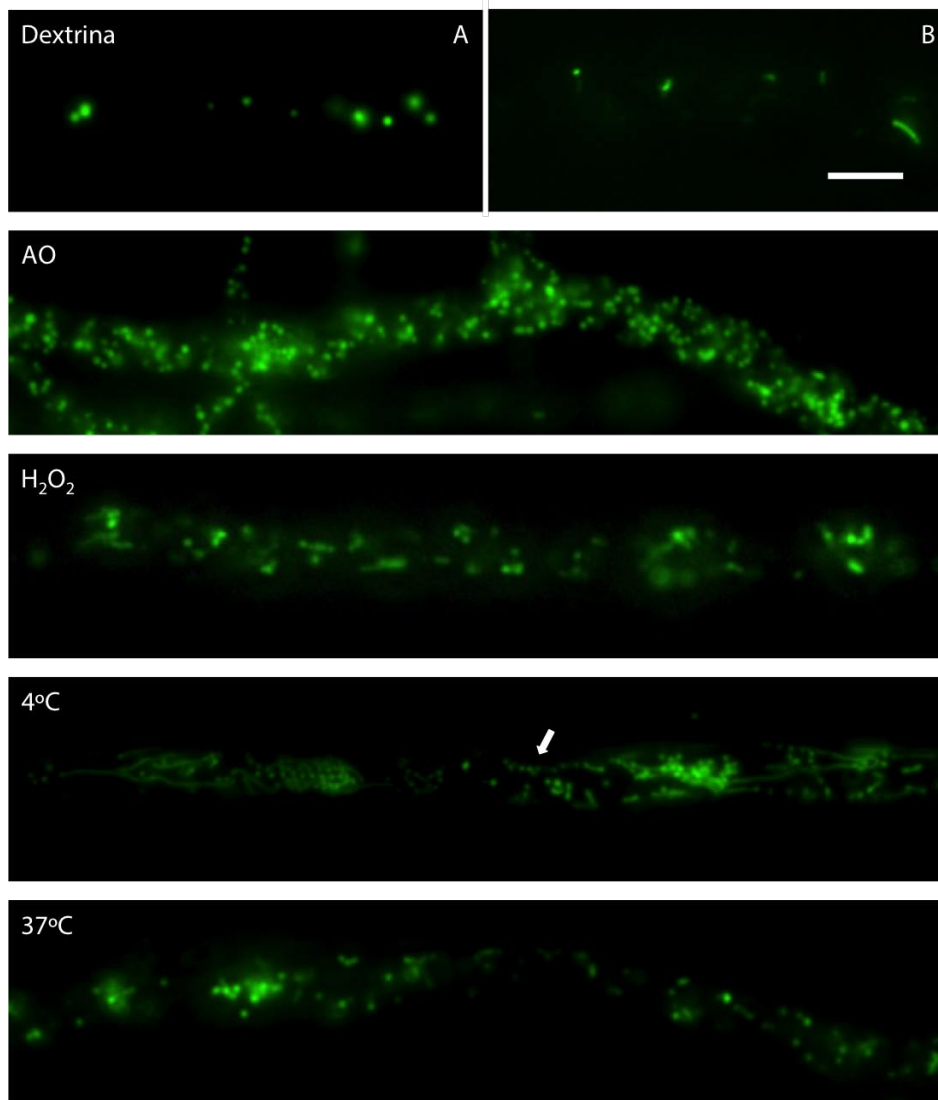
A raíz de estos resultados, concluimos que los peroxisomas en las hifas del micelio en condiciones de crecimiento estándar son sumamente dinámicos.

### **Los peroxisomas en las hifas pueden responder a condiciones de estrés metabólico o fisiológico**

Entre las funciones más conservadas de los peroxisomas, se encuentran el metabolismo de los ácidos grasos y la homeostasis de especies reactivas del oxígeno. En condiciones que requieren la actividad peroxisomal, éstos tienden a proliferar, por lo que se evaluó la morfología y la proliferación peroxisomal del hongo tras un día de crecimiento en medio con ácido oleico como única fuente de carbono (AO). Se observó un evidente incremento en la cantidad y tamaño de los peroxisomas (Fig.1, AO) con respecto a las colonias que crecieron en medio con dextrina.

Para evaluar si este mismo incremento se observaba en condiciones de estrés oxidativo, se adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$  50mM a una colonia tras un día de crecimiento en medio estándar rico en dextrina. En estas condiciones, se observó un alargamiento de los peroxisomas (Fig.1,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que alcanzan una longitud promedio de  $1.68 \pm 0.6\mu\text{m}$  (n=150). Se evaluaron otras dos condiciones de estrés para observar las variaciones en la morfología peroxisomal; colonias crecidas durante 24 horas en condiciones estándar se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 horas o a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora. En el primer caso, se observó un alargamiento significativo de los peroxisomas, cuyas longitudes se registraron entre 1.03 y  $8.05\mu\text{m}$ , con un promedio de  $2.85 \pm 1.5\mu\text{m}$  (n=102). Además, se observa un gran número de peroxisomas organizados en un arreglo de “collar de perlas”, que podrían corresponder a las constricciones de la membrana peroxisomal que anteceden a la fisión (Fig.1,  $4^\circ\text{C}$ ). La exposición a  $37^\circ\text{C}$  se realizó únicamente durante una hora para evitar la desecación del medio y del hongo. En estas condiciones, se observó un ligero incremento en el número de peroxisomas, sin embargo, el efecto es menor al que se observa durante el crecimiento en medio AO (Fig.1,  $37^\circ\text{C}$ ).

Los peroxisomas en la cepa silvestre son capaces de responder dinámicamente ante condiciones de estrés externas. La respuesta varía según las condiciones a las que esté expuesta la colonia y se observan los cambios más drásticos durante el crecimiento en ácido oleico y en crecimiento a  $4^\circ\text{C}$ .



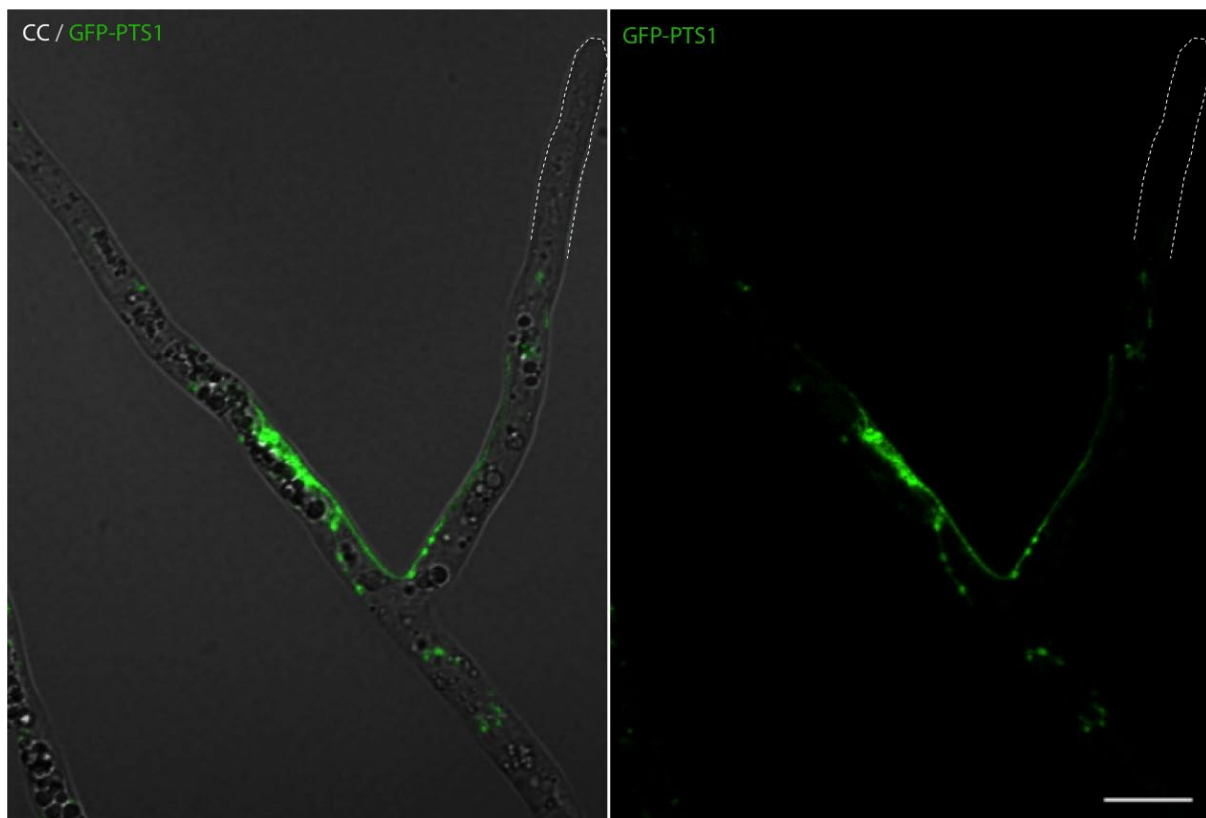
**Fig. 1 Los peroxisomas son organelos versátiles y dinámicos.** Se observaron colonias completas por microscopía de fluorescencia tras 24 horas de crecimiento a 27°C. Previo a las observaciones, las colonias con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(50mM) se incubaron durante 2 minutos con el compuesto; las colonias a 4°C se incubaron durante 12 horas y las colonias a 37°C se incubaron durante una hora en cámara húmeda. (A)En crecimiento en medio con dextrina como fuente de carbono, los peroxisomas en las hifas son mayoritariamente esféricos; (B) ocasionalmente se observa una morfología alargada. Los peroxisomas tienden a proliferar en medio con ácido oleico (AO) y se elongan al agregar peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a la colonia. A 4°C, se observan filamentos peroxisomales de gran tamaño; la flecha indica un arreglo en “collar de perlas”. A 37°C hay una ligera proliferación, menor que en AO. Escala: 5µm.

### **FIS1 es una proteína que participa en la fisión peroxisomal**

Tras la observación de los peroxisomas en la cepa silvestre pudimos concluir que éstos son muy dinámicos y modifican su morfología ante diferentes condiciones de estrés. A continuación nos preguntamos si una alteración en la maquinaria de fisión peroxisomal afectaría esta dinámica y si el hongo sería capaz de seguir modificando su morfología. Para ello, generamos una cepa carente de FIS1, una proteína que participa en la maquinaria de fisión peroxisomal y mitocondrial. Una vez que



se verificó la cepa, los peroxisomas se visualizaron mediante GFP-PTS1, FOX2-mCherry o FOX2-GFP. Con los tres marcadores se observó el mismo fenotipo en todas las condiciones evaluadas. Al observar la morfología peroxisomal de la cepa  $\Delta fis1$  en medio de crecimiento estándar, observamos que está significativamente afectada. A diferencia de los peroxisomas esféricos que se observan en la cepa silvestre, en ausencia de FIS1 los peroxisomas son alargados y no tienen una distribución homogénea en la hifa (Fig.2). Sin embargo, siguen siendo estructuras dinámicas, aunque su movilidad está restringida por el tamaño de la masa peroxisomal. Aunado a ello, es común observar peroxisomas filamentosos atorados en los puntos de ramificación de las hifas y largos segmentos de hifas sin peroxisomas, mientras que en la cepa silvestre su distribución es homogénea a lo largo del micelio(Fig.2).



**Fig. 2 La ausencia de FIS1 afecta la morfología y distribución de los peroxisomas en las hifas.** Se visualizaron los peroxisomas en hifas de la cepa  $\Delta fis1$  mediante microscopía confocal, tras un día de crecimiento en condiciones estándar. En el panel izquierdo se muestra un empalme del campo claro (CC) y los peroxisomas marcados con la proteína GFP-PTS1, el panel derecho muestra únicamente los peroxisomas. En los puntos de ramificación de las hifas, los peroxisomas suelen atorarse, dando lugar a una distribución heterogénea en el micelio. Las líneas punteadas señalan una sección de hifa sin peroxisomas. Escala: 10 $\mu$ m.

En la cepa  $\Delta fis1$ , los peroxisomas son filamentosos y presentan una distribución heterogénea en las hifas durante el crecimiento vegetativo. Estas observaciones nos permiten inferir que la proteína FIS1 participa en la fisión peroxisomal del hongo *P. Anserina*.

### **La dinámica peroxisomal en condiciones de estrés está alterada por la ausencia de FIS1**

En la cepa silvestre la morfología peroxisomal se modifica en diferentes condiciones de estrés, por lo que observamos los peroxisomas de la cepa  $\Delta fis1$  en las condiciones previamente analizadas. Al igual que en la cepa silvestre, en medio AO, a pesar de no poder fisionarse, hay una mayor masa peroxisomal con respecto a lo que se observa en las hifas en medio rico en dextrina. Además, se observan peroxisomas esféricos unidos entre sí por largos filamentos peroxisomales (Fig.3, AO). En las colonias de  $\Delta fis1$  a 4°C se observan filamentos peroxisomales más largos que en cualquiera de las otras condiciones (Fig.3, 4°C). En estrés oxidativo y durante el crecimiento a 37°C, la morfología y distribución peroxisomal están afectadas por la ausencia de FIS1 (Fig.3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 37°C). Estos resultados indican que los peroxisomas pueden responder a las condiciones de estrés externas aún en ausencia de la maquinaria de fisión, sin embargo, esta respuesta se ve limitada por la alteración de la dinámica peroxisomal.

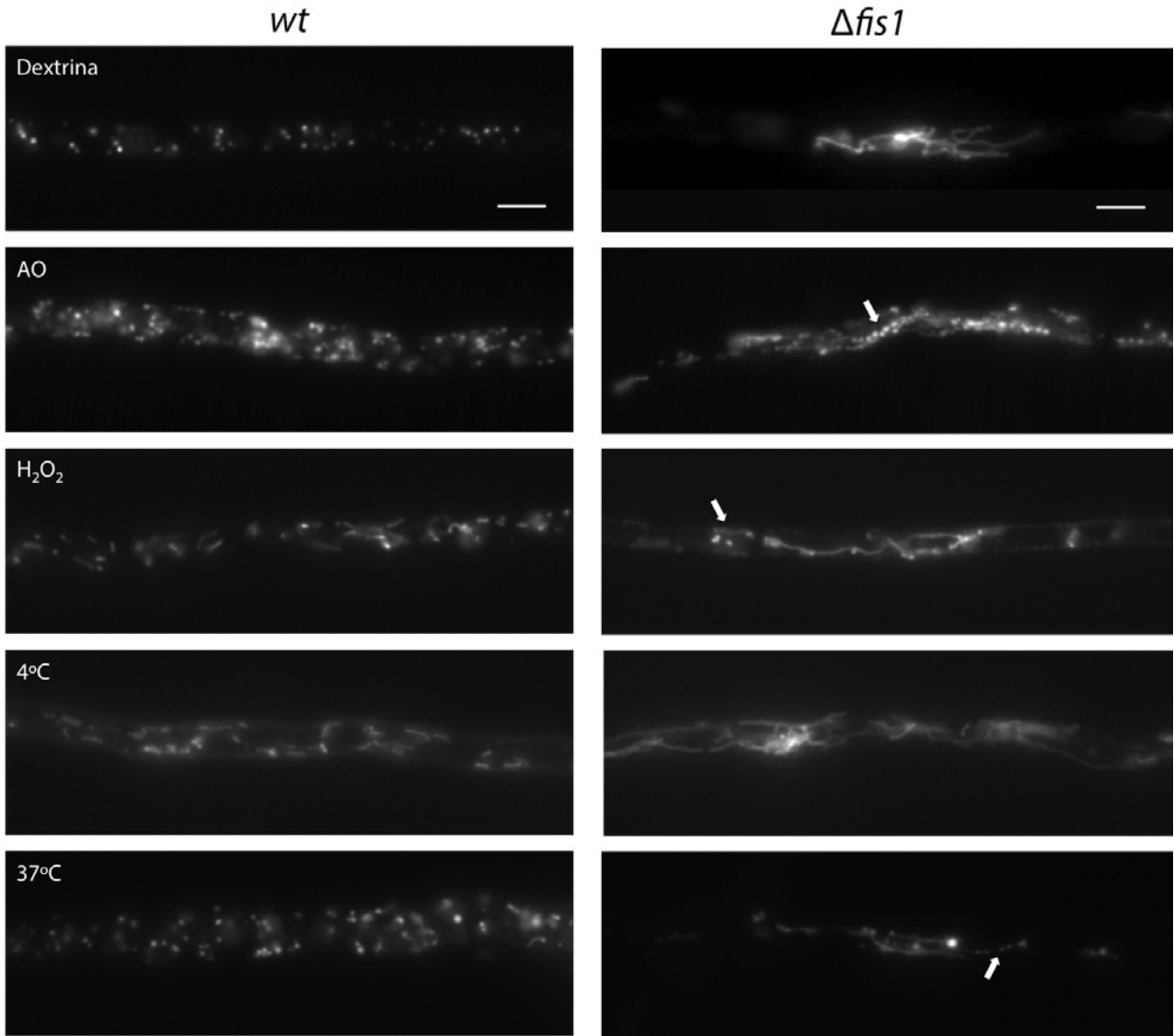
Es importante mencionar que, aunque la mayoría de los peroxisomas están afectados por la ausencia de FIS1, en todas las condiciones llegan a encontrarse peroxisomas con una morfología esférica, similar a la que se observa en la cepa silvestre, que pueden resultar de la biogénesis *de novo*. Asimismo, es común encontrar peroxisomas en arreglo de “collar de perlas” que no llegan a separarse y que se mueven conjuntamente en las hifas. Este arreglo, aunque también se observa en la cepa silvestre, es menos común y culmina con la formación de peroxisomas independientes.

### **Los defectos observados se revierten con la reintroducción del gen FIS1**

Para confirmar que los cambios observados en la morfología y dinámica peroxisomal fueran resultado de la ausencia de FIS1, se realizó una complementación genética de la cepa  $\Delta fis1$  mediante la integración ectópica del plásmido GA0AA364BH06 que contiene el gen *FIS1* de *P. Anserina*.

En medio M2 y AO, las colonias de la cepa  $\Delta fis1$  presentan un crecimiento más lento con respecto a la silvestre, así como una menor producción de micelio aéreo (Fig.4<sup>a</sup>); este fenotipo se revierte en la cepa complementada. Asimismo, los defectos en la morfología y dinámica peroxisomal se revierten con la reintroducción del gen silvestre *FIS1* (Fig.4B).

Estas observaciones confirman que los defectos observados en el crecimiento vegetativo y en la dinámica peroxisomal son resultado de la ausencia de FIS1.

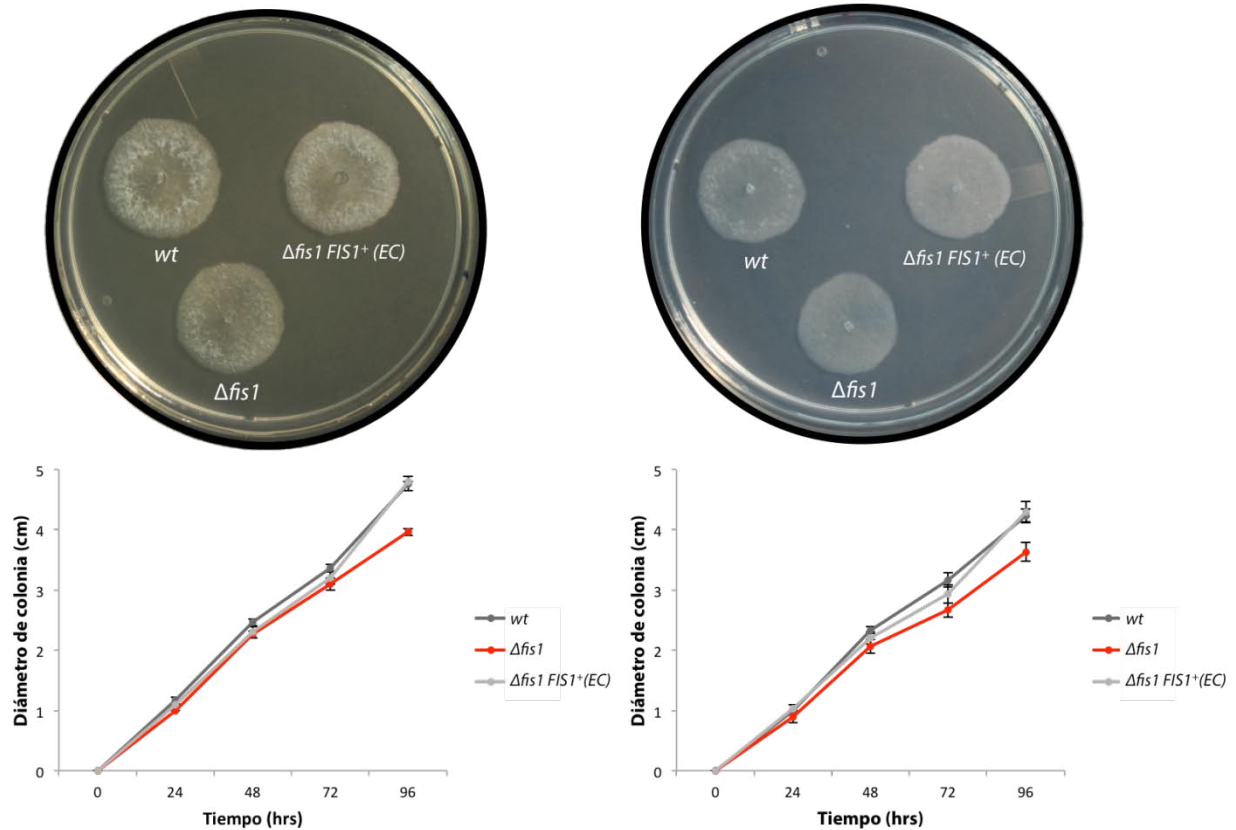


**Fig. 3 La dinámica peroxisomal en condiciones de estrés está afectada en la cepa  $\Delta fis1$ .** Los peroxisomas se observaron con la proteína FOX2 unida al marcador fluorescente mCherry, en colonias de un día de crecimiento a 27°C, bajo las condiciones analizadas previamente. La ausencia de FIS1 altera la morfología peroxisomal en todas las condiciones analizadas. En ausencia de FIS1, los peroxisomas son sumamente alargados, se agregan en cúmulos y/o forman arreglos de “collar de perlas” (flechas). La masa peroxisomal aumenta en condiciones que inducen la proliferación peroxisomal (AO). Los filamentos más largos se observaron a 4°C. Escala: 5µm.

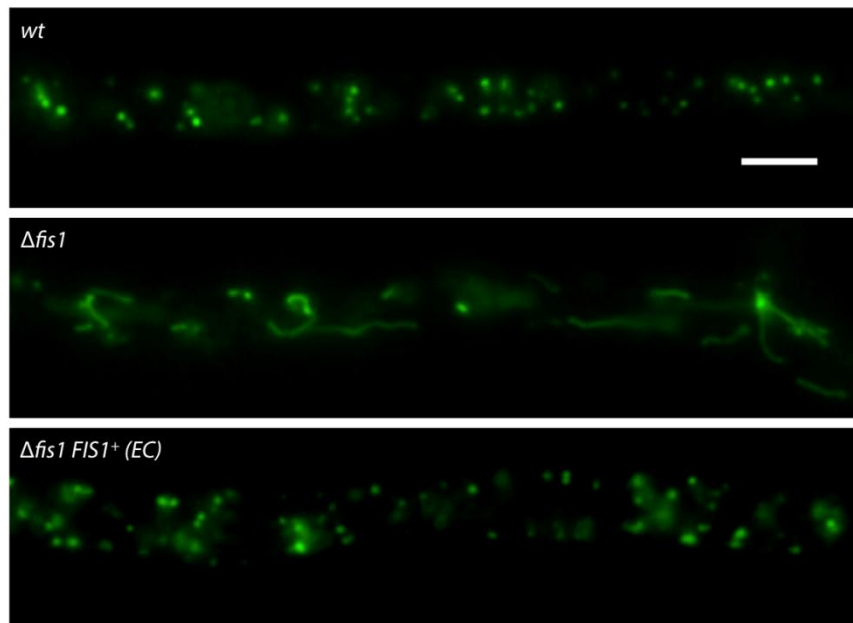
A

Dextrina

Ácido oleico



B



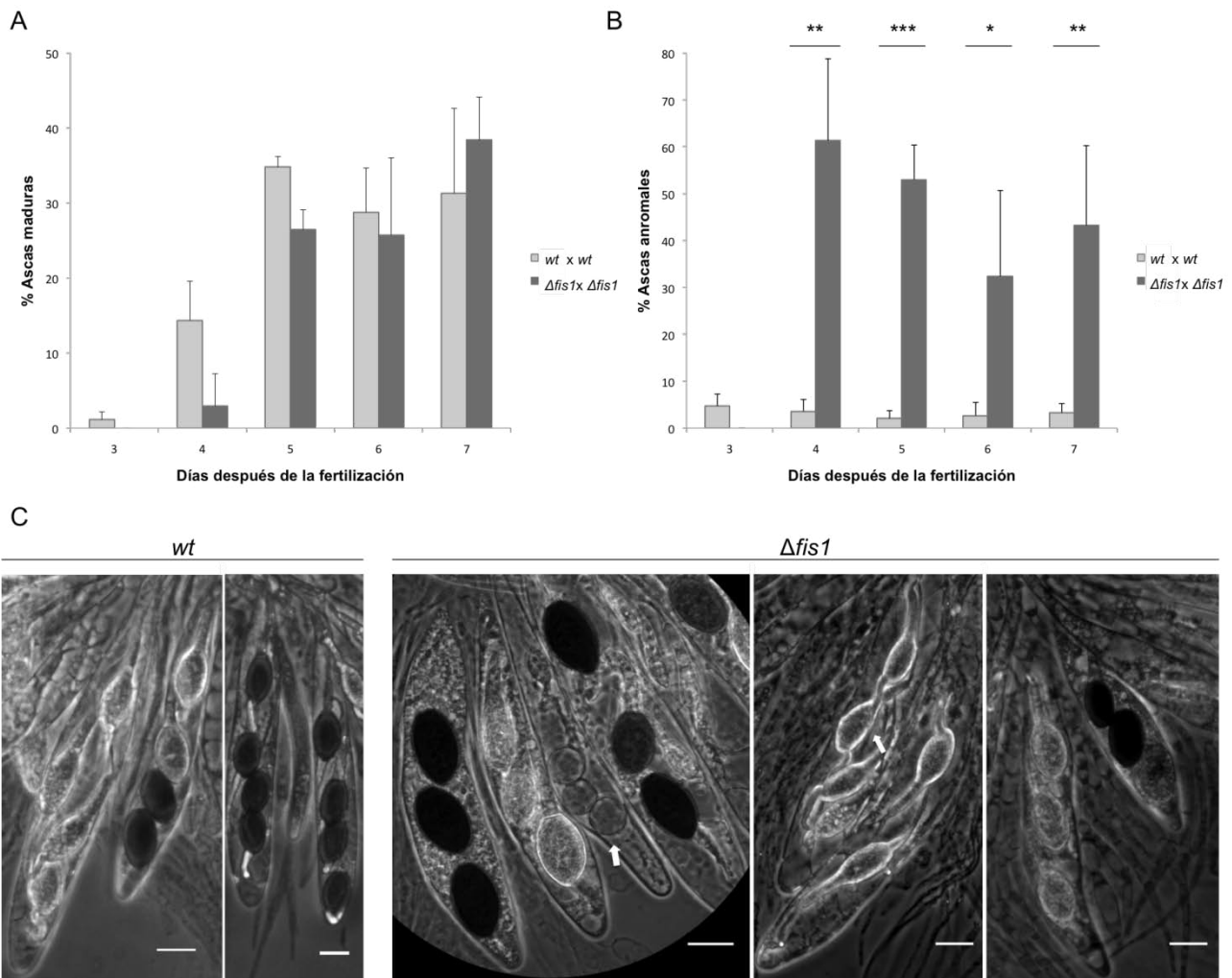
**Fig. 4** El fenotipo de la cepa  $\Delta fis1$  se revierte al complementar la cepa con el gen silvestre *FIS1*. (A) Las cepas complementadas ectópicamente recuperan su crecimiento normal en medio estándar y en medio AO, fotografías a 2 días de crecimiento. Las gráficas muestran el diámetro de las colonias de las cepas silvestre,  $\Delta fis1$  y complementada; cada experimento se repitió tres veces, las barras indican la desviación estándar. La cepa  $\Delta fis1$  presenta un crecimiento ligeramente retrasado en ambos medios. (B) La morfología peroxisomal en condiciones de crecimiento estándar se recupera con la reintroducción del gen *FIS1*. Escala: 5  $\mu$ m.

### **La ausencia de FIS1 afecta la formación de las ascosporas**

Una vez que observamos los efectos de la ausencia de FIS1 en la dinámica y morfología peroxisomal durante el crecimiento vegetativo, nos preguntamos si estas alteraciones tendrían algún efecto durante el desarrollo sexual. Para ello, realizamos cruces de las cepas silvestre y  $\Delta fis1$  y observamos las ascas de 3 a 7 días después de la fertilización.

En la cepa silvestre comienzan a observarse ascas maduras (es decir, que presentan al menos dos esporas) a partir del tercer día después de la fertilización, su porcentaje aumenta en los dos días subsecuentes y se mantiene relativamente constante durante los días 5 a 7 después de la fertilización. En la cepa carente de FIS1, el desarrollo de las ascas está ligeramente retrasado. Al tercer día tras la fertilización, la cruce homocigota de  $\Delta fis1$  no presenta ningún asca madura y al cuarto día el porcentaje es bajo con respecto a la silvestre (Fig.5<sup>a</sup>). Además, las ascas en esta cepa son anormales en la forma y, más frecuentemente, en el número de esporas que presentan (Fig.5C). La cepa silvestre produce ascas con 4 esporas del mismo tamaño o, en un porcentaje de  $\approx 1\%$ , ascas con 5 esporas, 3 grandes y dos chicas (Silar, 2013). Sin embargo, en ausencia de FIS1, se observan ascas con 2 o 3 esporas, ascas con 4 esporas de diferente tamaño e incluso ascas con 6 esporas. Al cuantificar este defecto, observamos que el número de ascas anormales, que se mantiene por debajo del 10% en la cepa silvestre, aumenta hasta más de 40% en la mutante, lo que representa una diferencia significativa (Fig.5B).

Estos resultados indican que la ausencia de la proteína FIS1 afecta procesos implicados directa o indirectamente con la formación de ascosporas en *P. Anserina*, particularmente su número, forma y tamaño.



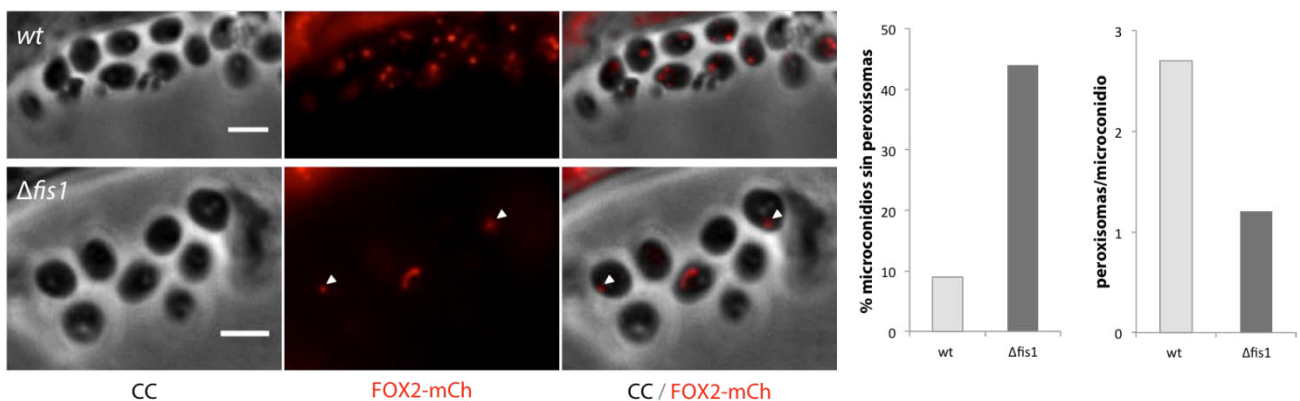
**Fig. 5 La cepa  $\Delta fis1$  presenta defectos en la maduración y el desarrollo de las ascosporas.** Se realizaron cruces 29ecanizan29s de las cepas silvestre y  $\Delta fis1$  y se cuantificó la madurez y porcentaje de anomalía de las ascas durante los cinco días posteriores a la fertilización. (A) En la cepa carente de FIS1, las ascas tienen un retraso en la maduración, éste es más evidente durante los días 3 y 4 después de la fertilización. (B) En la cepa silvestre, el porcentaje de ascas que presentan anomalías es cercano o menor a 10%, mientras que en la cepa  $\Delta fis1$  este porcentaje aumenta hasta más de 40%. Un análisis estadístico t de Student confirma que la diferencia entre estos valores es significativa (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ); no se tomó en cuenta la diferencia a los 3 días, ya que no hay ascas maduras en  $\Delta fis1$  que permitan la comparación. Los experimentos se repitieron 3 veces, cada día se cuantificaron al menos 60 ascas de cada cruce. Las barras sobre las gráficas indican la desviación estándar. (C) En ascas de la cepa silvestre se observan predominantemente ascas con 4 esporas del mismo tamaño. En ausencia de FIS1, se observan números anormales de esporas y, en algunos casos, alteraciones en la forma y tamaño (flechas). Escala: 20  $\mu$ m.

## Los microconidios en la cepa $\Delta fis1$ presentan menos peroxisomas que la silvestre

Para determinar el origen de los defectos observados en la formación de las esporas sexuales, evaluamos la localización y dinámica peroxisomal durante la progresión del desarrollo sexual de *P. Anserina*.

El desarrollo sexual comienza con la diferenciación de las estructuras reproductivas: los ascogonios y los microconidios, que corresponden a los gametangios femeninos y masculinos, respectivamente. En la cepa silvestre ambos presentan peroxisomas esféricos, con similitud morfológica a los que se observan en las hifas vegetativas (Fig.6, no se muestra para ascogonios). Los microconidios presentan entre uno y seis peroxisomas (promedio 2.7, n=93) redondeados o ligeramente alargados, aunque en un porcentaje del 9%, no presentan ninguno. En la cepa  $\Delta fis1$ , el promedio de peroxisomas es menor con respecto a la cepa silvestre (1.23, n=114) y el porcentaje de microconidios que no presentan peroxisomas, asciende a 44%.

En ausencia de FIS1, tanto ascogonios como microconidios presentan peroxisomas predominantemente alargados, aunque de menor longitud que los que se observan en las hifas vegetativas. Es importante mencionar que muchos de los peroxisomas en estas estructuras son esféricos aún en ausencia de FIS1 (Fig.6); esto, al igual que en las hifas, puede resultar de la formación *de novo*.



**Fig. 6** En  $\Delta fis1$  está afectada la morfología y número de peroxisomas en los microconidios. Se observaron los microconidios del micelio aéreo tras 4 días de crecimiento en medio estándar. Los microconidios en la cepa silvestre presentan entre 1 y 6 peroxisomas esféricos (n=93, promedio 2.7), aunque en ocasiones (9%) no presentan ninguno. En la cepa  $\Delta fis1$  los peroxisomas son alargados; el número de peroxisomas disminuye (n=114, promedio 1.23), mientras que el porcentaje de microconidios sin peroxisomas aumenta (44%). Se observan microconidios con peroxisomas esféricos (flechas). Escala: 3 $\mu$ m.

## **El número, forma y localización de los peroxisomas cambia durante el desarrollo temprano de las ascas**

Para caracterizar a los peroxisomas en la cepa silvestre e identificar si los defectos de formación de las ascosporas observados en las cepas  $\Delta fis1$  están asociados a problemas de segregación nuclear durante las diferentes etapas del ciclo sexual posteriores a la fertilización, se realizaron muestras fijas de las cepas silvestre y  $\Delta fis1$  que presentan el marcador peroxisomal  $FOX2::mCherry$  y se tiñó el material genético con DAPI.

Una vez que se lleva a cabo la fertilización del ascogonio por un microconidio, se forma el peritecio, dentro del cual se llevará a cabo el desarrollo de las ascas a partir de un crozier. En el crozier, dos núcleos, uno de cada tipo sexual, se segregan en una célula especializada (célula dicariótica), donde posteriormente se lleva a cabo la cariogamia. Durante estos procesos, los peroxisomas en la cepa silvestre están distribuidos homogéneamente en los croziers y su morfología es esférica. Tras la cariogamia, la célula dicariótica se diferencia en un asca temprana y se lleva a cabo la meiosis. En esta etapa, los peroxisomas tienden a ser más abundantes en la punta del asca (Fig.7<sup>a</sup>).

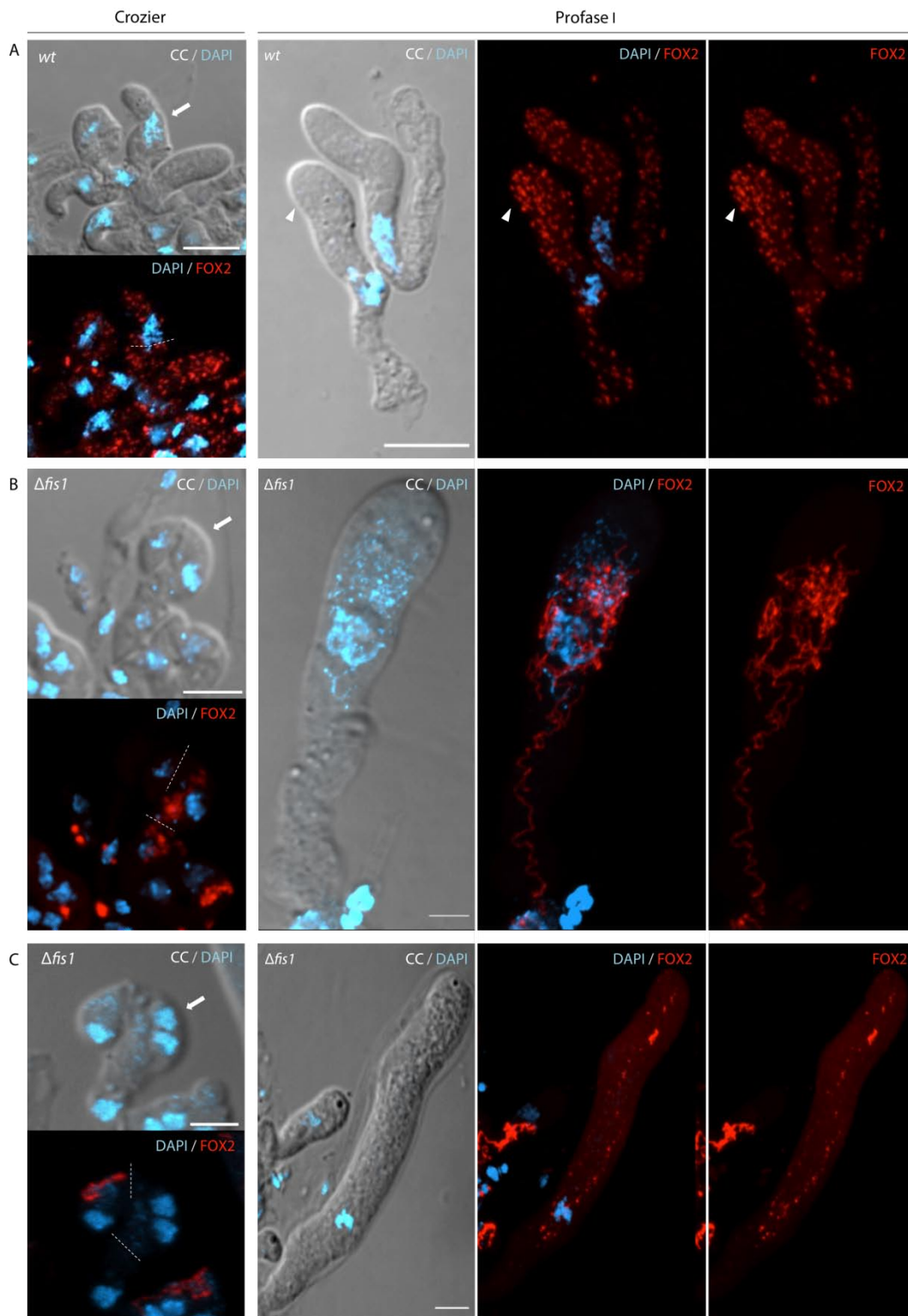
Durante la profase I de la meiosis en la cepa carente de FIS1, se observan ascas con peroxisomas sumamente alargados (Fig.7B) y ascas con pocos peroxisomas, pero cuya morfología es esférica. Cuando se da este último caso, se observa también fluorescencia citosólica del marcador peroxisomal  $FOX2::mCherry$  (Fig.7C).

Es posible que las ascas con peroxisomas esféricos provengan de células dicarióticas que no heredan peroxisomas (Fig.7C) durante la compartimentación del crozier y por lo tanto se formen *de novo* durante el desarrollo temprano del asca. La fluorescencia citosólica en este caso sería resultado de la proteína  $FOX2::mCherry$  que no ha sido importada a los peroxisomas recién formados.

Por otro lado, las células dicarióticas que sí heredan peroxisomas (Fig.7B) generarían ascas con peroxisomas cuya morfología está afectada por la ausencia de FIS1, ya que no hay formación *de novo*.

Mientras que en la cepa silvestre observamos que la dinámica y distribución peroxisomal están finamente reguladas, para la cepa  $\Delta fis1$  observamos casos en los que la célula dicariótica puede o no heredar peroxisomas. Sin embargo, en ambos casos, la distribución de los peroxisomas en el crozier y el asca se ve afectada por la ausencia de la proteína de fisión.





**Fig. 7 Algunas células dicarióticas no heredan peroxisomas en ausencia de FIS1.** (A) En la cepa silvestre, los croziers presentan peroxisomas esféricos, distribuidos homogéneamente. Cuando comienza la profase de la primera división de la meiosis, los peroxisomas tienden a localizarse predominantemente en la punta del asca (punta de flecha). En la cepa carente de FIS1, se observan dos casos: (B) la célula dicariótica (flecha) hereda peroxisomas y en el desarrollo temprano del asca ésta presenta peroxisomas alargados; o (C) la célula dicariótica no hereda peroxisomas y el asca presenta peroxisomas esféricos y fluorescencia citosólica de la proteína peroxisomal *FOX2::mCherry*. Las líneas punteadas indican la ubicación de los septos que delimitan la célula dicariótica. El material genético se tiñó con DAPI. Escala: 2 $\mu$ m.

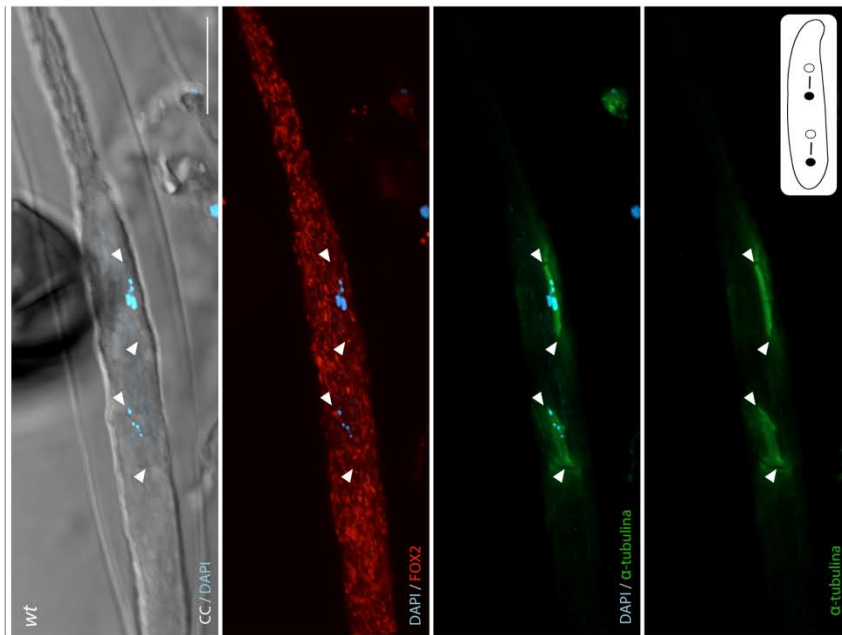
### **La ausencia de FIS1 afecta a la segregación nuclear durante la meiosis**

En la cepa silvestre, la meiosis resulta en la formación de cuatro núcleos haploides, que subsecuentemente se dividen por mitosis para resultar en 8 núcleos. Hacia la anafase de la primera división meiótica, los peroxisomas modifican su morfología y tienden a ser ligeramente alargados, con una distribución homogénea en el asca (Fig.8). Esta morfología se mantiene hasta el final de la segunda división meiótica e incluso en el desarrollo temprano de las esporas (Takano-Rojas et al., 2016). En la mutante, a lo largo de todo el desarrollo del asca, los peroxisomas suelen estar muy desorganizados y se observan cúmulos de filamentos peroxisomales que no se distribuyen homogéneamente, sino que se localizan en zonas específicas en el asca (Fig.8).

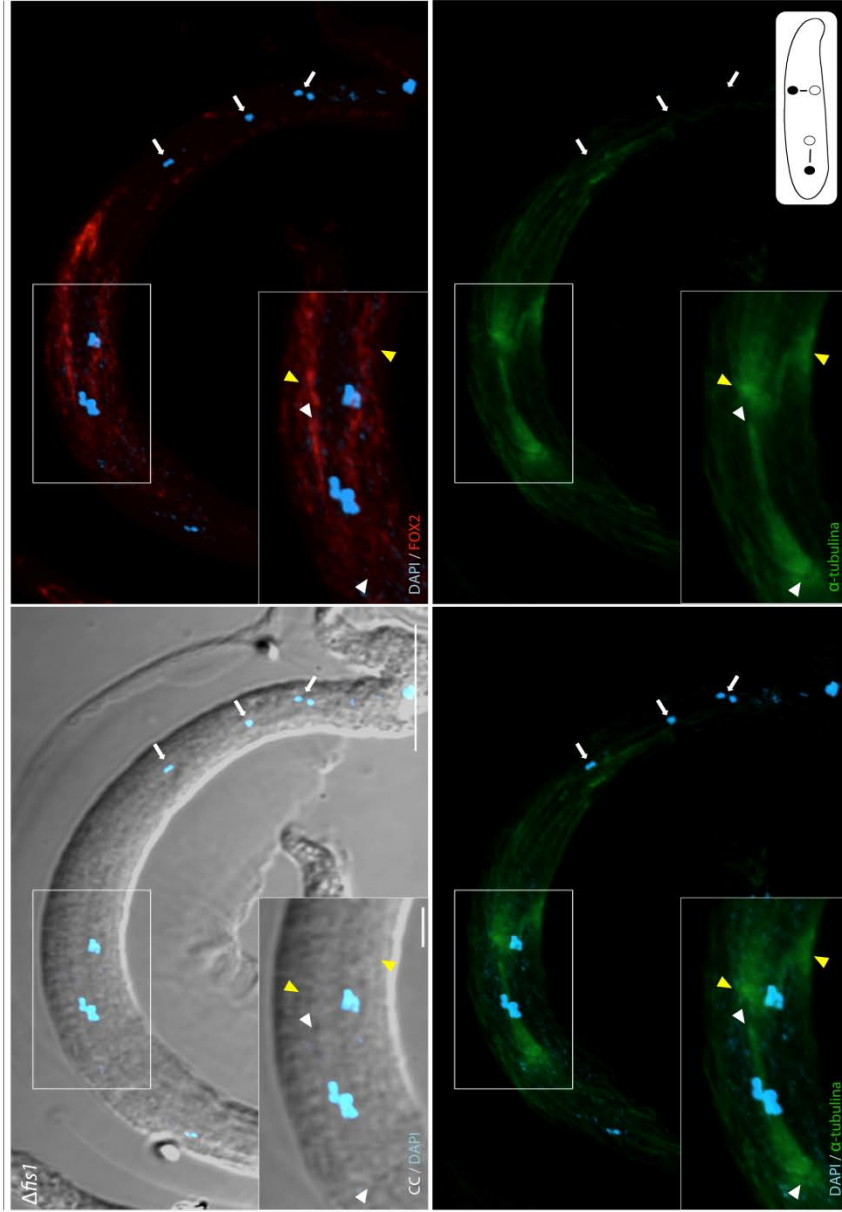
Previamente, observamos que en la cepa  $\Delta fis1$  las ascas mostraban números anormales de esporas en un porcentaje alto. Este defecto puede estar asociado a una alteración en la distribución nuclear, mismo que podría resultar del arreglo de los husos acromáticos durante la meiosis o en la mitosis post-meiótica. Para comprobarlo, teñimos las muestras con anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina y observamos que la orientación de los husos acromáticos en la cepa carente de FIS1 está afectada con respecto a la silvestre.

Durante la segunda división de la meiosis, los husos acromáticos en la cepa silvestre están orientados longitudinalmente dentro del asca (Fig.8 Ver esquema inferior). Sin embargo, en la cepa  $\Delta fis1$ , observamos ascas en donde uno de los husos meióticos se orienta longitudinalmente dentro del asca, al igual que en la silvestre, mientras que el segundo se orienta en el eje transversal de la misma (Fig.8 Ver esquema inferior). Esto puede indicar que el arreglo de los microtúbulos implicados en la división nuclear está afectado por la ausencia de FIS1. Aunado a este defecto, se observan remanentes de material genético dispersos en la célula, que posiblemente corresponden a fragmentos de cromosomas o a material genético mitocondrial (Fig.8).

Anafase de la meiosis II



Metafase de la meiosis II



**Fig. 8 La orientación de los husos meióticos está afectada en la cepa  $\Delta fis1$ .** En la cepa silvestre, la segunda división meiótica se lleva a cabo en el eje longitudinal de la hifa, como se muestra en el esquema inferior. En la imagen se muestra la anafase de esta división. Las puntas de flecha indican la posición aproximada de los dos pares de cuerpos polares de los husos meióticos. En la cepa carente de FIS1, uno de los husos acromáticos está orientado longitudinalmente (puntas de flecha blancas), mientras que el segundo muestra una orientación transversal (puntas de flecha amarillas), ver esquema inferior. La imagen corresponde a la metafase de la segunda división meiótica. En  $\Delta fis1$  se observan remanentes de material genético dispersos en la célula (flechas). Los peroxisomas en la cepa silvestre están distribuidos homogéneamente en el asca, mientras que en la cepa carente de FIS1 son alargados y se concentran en un área del asca. En  $\Delta fis1$  el panel interno corresponde a la ampliación del cuadro en la figura principal. Escala: 10 $\mu$ m. Panel interno: 1 $\mu$ m.

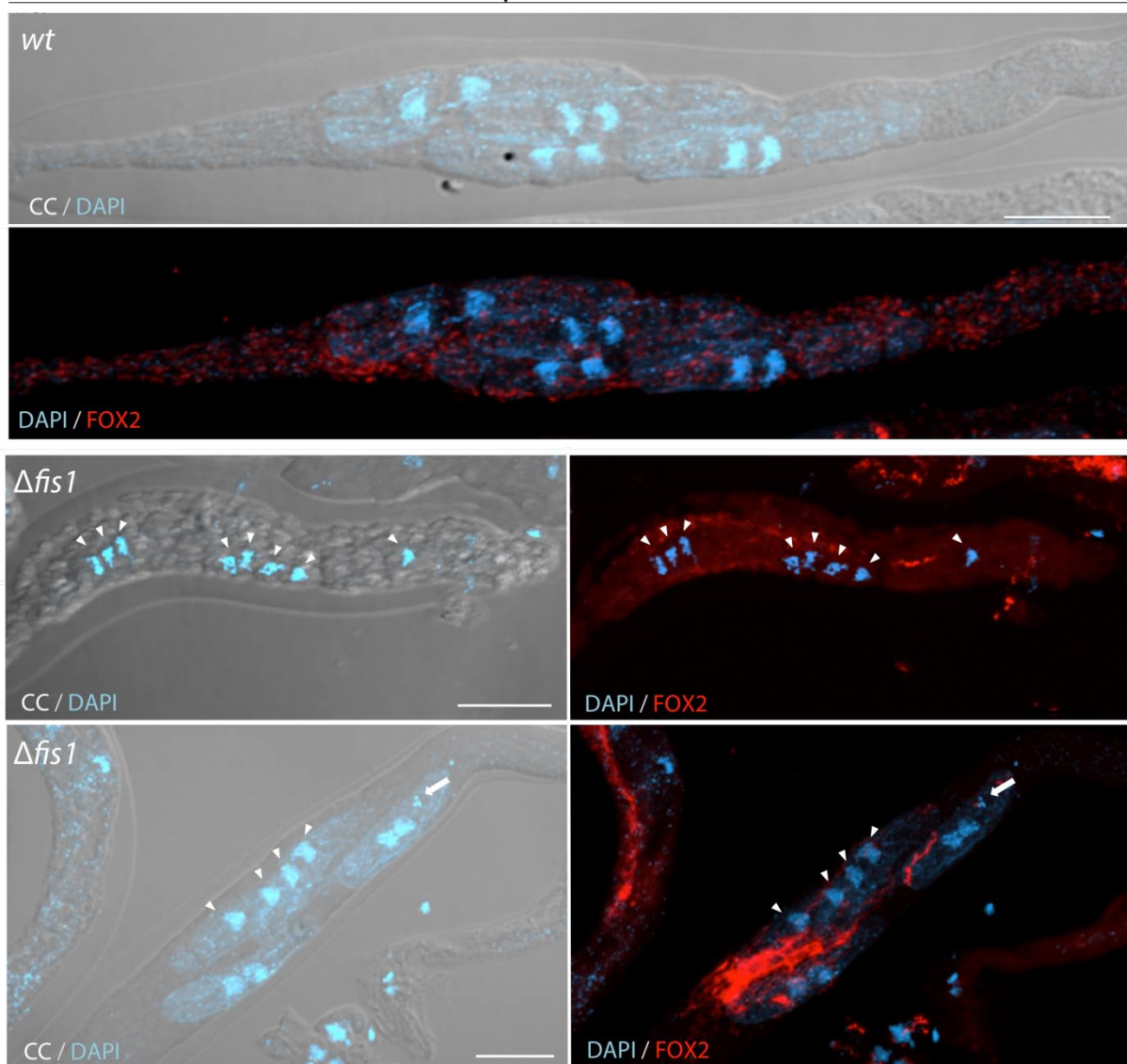
### **La ausencia de FIS1 afecta la segregación nuclear durante la mitosis post-meiotica**

Una vez que se completa la meiosis, se lleva a cabo una mitosis post-meiótica que da lugar a ocho núcleos organizados en pares, a partir de los cuáles se forman las esporas (Fig.9). En *S. cerevisiae*, la formación de las esporas comienza con el reclutamiento de vesículas hacia los cuerpos polares del núcleo (equivalentes funcionales de los centrosomas en animales). Las vesículas se fusionan, formando una doble membrana que se expande hasta cubrir completamente cada uno de los núcleos, dando lugar a la membrana de la prospora. La membrana interna conforma la membrana plasmática de la prospora, mientras que la membrana externa se degrada conforme se sintetiza la pared de la espora. Este proceso resulta en la formación de cuatro esporas maduras (Neiman, 2005). Mientras que en *S. cerevisiae* este proceso ocurre durante la meiosis II, en *P. Anserina* se da tras la mitosis post-meiótica. En este hongo, la membrana de la prospora se forma alrededor de cada par de núcleos de tipo sexual opuesto y resulta en la formación de cuatro esporas binucleadas (Beckett y Wilson, 1968; Beckett et al., 1968).

En ausencia de FIS1, la segregación nuclear durante la mitosis post-meiótica está afectada, y resulta en una distribución anormal de núcleos (Fig.9). Durante la formación de las esporas, la posición de los núcleos en el asca resulta en un empaquetamiento anormal de los mismos, de modo que hay números anormales de núcleos por espora y/o ascas con números anormales de esporas (Fig.10).

Al igual que durante la meiosis, en la mitosis post-meiótica es común observar un remanente de material genético en alguno de los extremos del asca, sin embargo, no es claro si se trata de fragmentos cromosomales o nucleoides mitocondriales (Fig.8 y 9).

## Mitosis post-meiótica



**Fig. 9** En  $\Delta fis1$  los núcleos no se distribuyen correctamente durante la mitosis post-meiótica. En la cepa silvestre los núcleos se organizan en pares claramente distinguibles que se empaquetan en cuatro ascosporas. La distribución de los peroxisomas es homogénea en toda el asca. En ausencia de FIS1, los núcleos presentan una distribución anormal. Arriba se observa un asca con un grupo de tres núcleos, uno de cuatro y un núcleo aislado (puntas de flecha). Abajo se observan dos pares de núcleos bien separados, mientras que los otros cuatro (puntas de flecha) no segregan correctamente. Además, se observa un remanente de material genético (flecha). Los peroxisomas, además de formar una red extremadamente alargada, no tienen una distribución homogénea en el asca. Escala: 5  $\mu$ m.

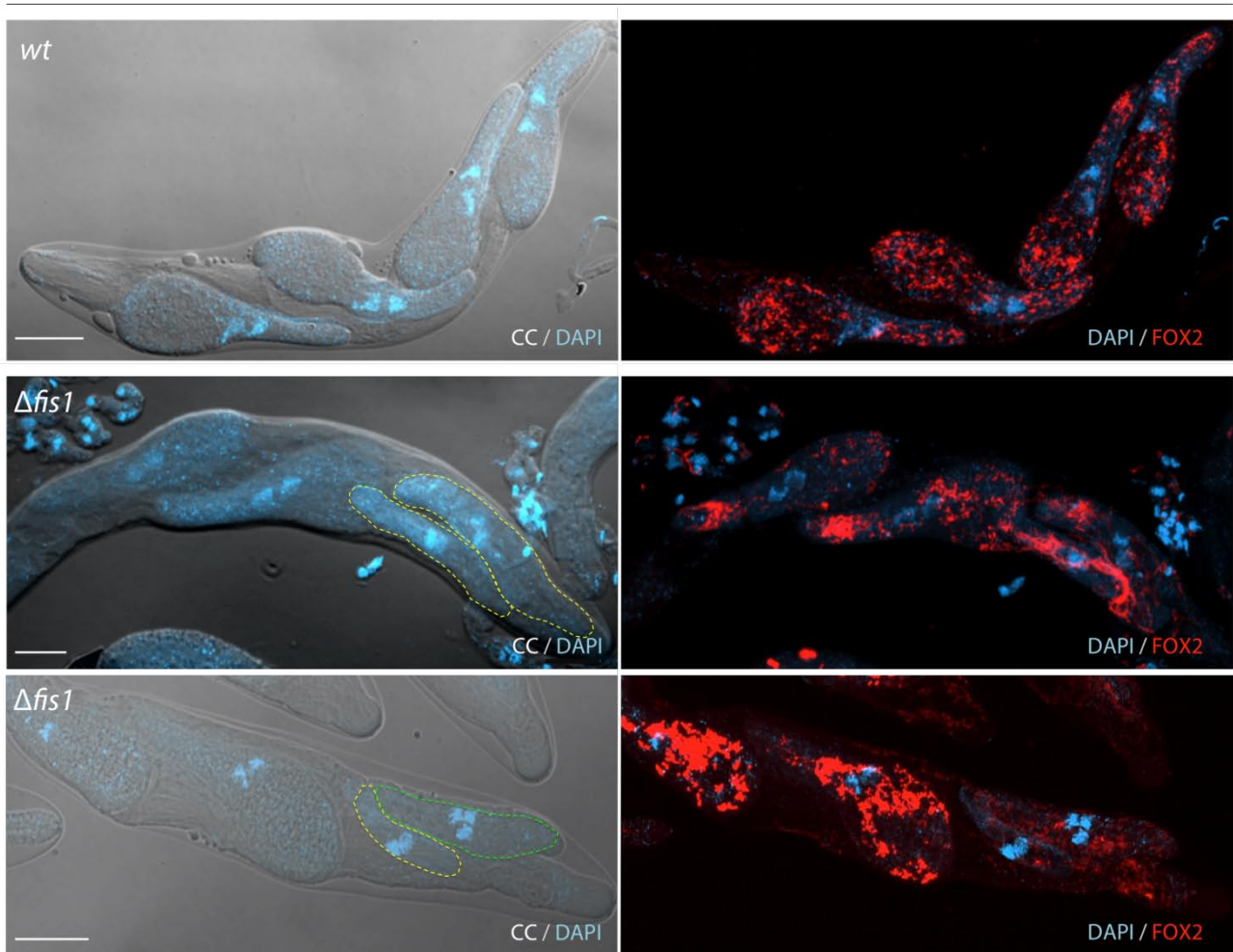
### **FIS1 es necesaria durante la diferenciación de las ascosporas.**

Durante la diferenciación de las cuatro ascosporas en la cepa silvestre, los peroxisomas recuperan su morfología esférica y están distribuidos homogéneamente dentro de cada espora. Por el contrario, en la cepa  $\Delta fis1$  se observan peroxisomas alargados formando extensas redes o agrupados en cúmulos dentro de las esporas (Fig.10). Asimismo, esta cepa presenta esporas con números anormales de



núcleos (Fig.10), que resultan de los problemas de segregación durante la meiosis y la mitosis post-meiótica. Aunado a ello, hay casos en los que la segregación nuclear es correcta, pero las esporas presentan problemas de morfogénesis (Fig.10). Por lo tanto, además de la segregación nuclear *per se*, el proceso de formación de ascosporas también está afectado por la ausencia de FIS1.

#### Diferenciación de ascosporas



**Fig. 10 La ausencia de FIS1 afecta a la distribución nuclear y a la morfología de las ascosporas durante su formación.** La cepa silvestre presenta cuatro ascosporas del mismo tamaño, cada una con dos núcleos. Los peroxisomas tienen una distribución homogénea dentro de cada una de las esporas. En la cepa carente de FIS1, se observan esporas con defectos en su morfología (esporas delimitadas con línea punteada) y esporas con morfología normal. Hay casos en los que la morfología de la espora es anormal, pero presenta dos núcleos (línea punteada amarilla) y casos en los que tanto la morfología como el número de núcleos están afectados (línea punteada verde), lo que indica que la segregación nuclear y la formación de ascosporas son procesos independientes, pero ambos son afectados por la ausencia de FIS1. Las esporas de la cepa  $\Delta fis1$  presentan peroxisomas alargados, dispuestos en redes o agregados de cúmulos peroxisomales. Escala: 5 $\mu$ m.

En conjunto, la ausencia de FIS1 afecta a la dinámica peroxisomal durante todo el ciclo de vida y en todos los tipos celulares. Durante el desarrollo sexual, la cepa  $\Delta fis1$  está afectada en la segregación nuclear durante la meiosis y durante la mitosis post-meiótica, lo que resulta en esporas con números anormales de núcleos. Asimismo, esta cepa presenta un defecto durante la diferenciación de las ascosporas, que resulta en la formación de esporas con morfología anormal, independientemente del número de núcleos que presenten.

## Discusión de resultados

Nuestro análisis del arreglo de los peroxisomas en *P. Anserina* reveló que éstos son organelos esféricos, de entre 0.43-1.31  $\mu\text{m}$  de diámetro. En mamíferos, el diámetro de los peroxisomas se ha reportado entre 0.1-1  $\mu\text{m}$  (Schrader y Fahimi, 2008), sin embargo, dado que son organelos sumamente versátiles, éstos varían de acuerdo con las condiciones del medio (Smith y Aitchison, 2013). Particularmente, se ha reportado en diversos organismos un incremento en el número y tamaño de los peroxisomas cuando la célula se encuentra en un medio rico en ácidos grasos (Smith y Aitchison, 2013; Meijer et al., 2010; Smith et al., 2000), esto coincide con el fenotipo observado en colonias silvestres de *P. Anserina* en ácido oleico. La proliferación peroxisomal que se observa en estas condiciones está relacionada con el papel que cumplen los peroxisomas en el metabolismo de los ácidos grasos. La expresión de varios genes que codifican para las proteínas implicadas en la  $\beta$ -oxidación se induce en medio rico en ácido oleico y, de manera similar, se induce la expresión de la proteína Pex11, que participa en la proliferación peroxisomal mediante la fisión (Gurvitz y Rottensteiner, 2006). Al adicionar  $\text{H}_2\text{O}_2$  a colonias de *P. Anserina* en medio de crecimiento estándar esperaríamos una respuesta similar, debido a la implicación de este organelo en la homeostasis de ROS. Sin embargo, bajo esta condición se observaron peroxisomas ligeramente alargados. Esta morfología ha sido reportada previamente en células COS-7 y fue asociada a la etapa de alargamiento de la membrana peroxisomal previa a su fisión (Smith y Aitchinson, 2013). Asimismo, en *Arabidopsis thaliana* se describió el proceso de fisión peroxisomal iniciado por elongaciones en la membrana, que tienen una morfología similar a la que se observa en *P. Anserina* con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En *A. Thaliana*, se observó que la elongación era seguida por la formación de constricciones y, finalmente, la fisión (Rodríguez-Serrano et al., 2016). Si bien es posible que se trate, en efecto, del alargamiento previo a la fisión, llama la atención que predomine con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y no de ácido oleico, por lo que podría tratarse de respuestas específicas para cada requerimiento metabólico. Esta hipótesis se robustece al evaluar la morfología que se observa a 4°C, en donde los peroxisomas son sumamente alargados y son frecuentes los arreglos en “collar de perlas”. En condiciones de bajas temperaturas, las colonias de *P. Anserina* se 39ecanizan; para ello, requieren los precursores acetyl-CoA o malonil-CoA, ambos producidos durante la  $\beta$ -oxidación (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013; Boisnard et al., 2009), de modo que a 4°C la proliferación peroxisomal podría ser necesaria para la obtención de estos productos. Sin embargo, la morfología que observamos es diferente con respecto a las colonias expuestas a medio rico en ácido oleico o a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que sugiere que los peroxisomas responden de manera específica a las condiciones de estrés metabólico y fisiológico a las que estén expuestos.



El movimiento de los peroxisomas es necesario para mantener homogeneidad a lo largo de las hifas, así como para facilitar las interacciones con otros organelos y realizar adecuadamente el metabolismo celular (Guimaraes et al., 2015). En *P. Anserina*, como en otros hongos filamentosos, observamos dos tipos de movimientos: movimientos saltatorios que ocurren a corta distancia y que en conjunto tienden a seguir la dirección de crecimiento de la hifa, y movimientos rápidos de larga distancia, que se dan en ambas direcciones del eje longitudinal de la hifa. Aquellos cuya movilidad es lenta, tienen una velocidad global similar a la del crecimiento de la hifa, por lo que es probable que su movimiento resulte del flujo del citoplasma. Los movimientos de larga distancia están mediados por la maquinaria de kinesinas y dineínas que transitan sobre los microtúbulos y son las encargadas del tráfico de peroxisomas y otros organelos (Kural et al., 2005). Recientemente, Guimaraes y colaboradores describieron que en *U. Maydis* los movimientos no ocurren directamente a través de estos motores moleculares, sino que los peroxisomas, gotas lipídicas y el retículo endoplásmico se mueven sobre endosomas tempranos, a los que se unen mediante adaptadores específicos (Guimaraes et al., 2015). En el caso de los peroxisomas, se identificó el adaptador PxdA en *A. Nidulans* (Salogiannis et al., 2016). Aunado a ello, se propuso un modelo según el cual los movimientos cortos de los peroxisomas son resultado de la turbulencia en el citoplasma, causada por los rápidos movimientos de los endosomas sobre los microtúbulos con sus respectivos cargos (Lin et al., 2016; Steinberg, 2016).

A partir de la observación de los peroxisomas en la cepa silvestre, concluimos que éstos son organelos sumamente dinámicos, capaces de moverse a lo largo de las hifas, manteniendo una distribución homogénea. Asimismo, son organelos versátiles, que responden a diversas condiciones de estrés metabólico o fisiológico.

En ausencia de la proteína de fisión, FIS1, los peroxisomas presentan una morfología sumamente alargada, lo que confirma la participación de esta proteína en la maquinaria de fisión peroxisomal. Nuestras observaciones coinciden con el fenotipo reportado previamente para esta mutante en *S. cerevisiae* (Kuravi et al., 2006; Motley et al., 2008), *H. Polymorpha* (Nagotu et al., 2008), *A. Thaliana* (Zhang y Hu, 2008) y mamíferos (Kobayashi et al., 2007). En estos organismos y, particularmente, en hongos levaduriformes, se ha reportado también una disminución en el número de peroxisomas por célula (Lefevre et al., 2015). En *P. Anserina*, aunque no se cuantificaron los peroxisomas por célula, es común encontrar largas regiones de hifas sin peroxisomas. Este fenotipo coincide con lo que se reportó para la distribución de mitocondrias en la cepa  $\Delta dnm1$  (Scheckhuber et al., 2007). Al evaluar el crecimiento de la cepa silvestre y  $\Delta fis1$  en medio estándar y medio AO, se observa un retraso de aproximadamente 24 horas en el crecimiento de las colonias carentes de FIS1, mismo que se mantiene durante el resto del desarrollo sexual. En *M. Oryzae* y *Aspergillus fumigatus*,

se ha reportado un crecimiento vegetativo más lento en ausencia de Fis1 o de Fis1 y Dnm1, respectivamente (Khan et al., 2015; Neubauer et al., 2015). Este retraso podría ser resultado de problemas en el metabolismo por la distribución heterogénea de peroxisomas y mitocondrias en el micelio. Khan y colaboradores, asociaron el defecto de crecimiento, así como la producción de un menor número de conidios y defectos en la virulencia de *M. Oryzae*, a alteraciones en la dinámica mitocondrial y sus posibles implicaciones en el metabolismo del carbono (Khan et al., 2015).

En la cepa  $\Delta fis1$ , se observan cambios en la masa peroxisomal ante diferentes condiciones de estrés. Particularmente, se aprecia un aumento de la masa peroxisomal al exponer las colonias a medio AO y una elongación exacerbada de los peroxisomas al colocarse en crecimiento a 4°C. Esto indica que los peroxisomas, a pesar de estar afectados en su dinámica, son capaces de responder a diferentes requerimientos metabólicos o fisiológicos. Sin embargo, su respuesta está limitada por la pérdida de versatilidad morfológica, resultado de la alteración en la maquinaria de fisión peroxisomal.

Al evaluar el desarrollo sexual de *P. Anserina* en la cepa mutante, observamos que tanto las células del micelio, como las estructuras que se diferencian durante el desarrollo (microconidios, ascogonios, crozier, ascas y ascosporas), presentan peroxisomas predominantemente alargados. Esto indica que la proteína se expresa en todos los tipos celulares y a lo largo de todo el ciclo de vida del hongo. Sin embargo, en todos estos tipos celulares encontramos también peroxisomas esféricos, similares a los que se observan en la cepa silvestre. Dado que los peroxisomas pueden formarse *de novo* a partir del retículo endoplásmico, es posible que la población de peroxisomas esféricos tenga este origen. Este puede ser el caso particularmente en las células que se compartimentan y no heredan peroxisomas alargados, como en los microconidios, crozier y ascosporas. En células que sí heredan peroxisomas, puede tratarse de un proceso de fisión adicional, independiente de FIS1, como es el caso de la proteína Vps1 en *S. cerevisiae*. Esta proteína lleva a cabo la fisión peroxisomal en condiciones de crecimiento en glucosa y su anclaje a la membrana peroxisomal es independiente de Fis1 (Nagotu et al., 2010). Sin embargo, no se han identificado homólogos de esta proteína en *P. Anserina* y en hongos que sí presentan homólogos, como *H. Polymorpha* y *A. Nidulans*, no se ha identificado que Vps1 participe en la fisión peroxisomal (Nagotu et al., 2010; Tarutani et al., 2001).

En las ascas tempranas, fue posible distinguir entre ascas con peroxisomas sumamente alargados y ascas con fluorescencia citosólica y peroxisomas esféricos. Suponemos que las primeras resultan de croziers que heredan peroxisomas alargados, mientras que las segundas resultan de croziers que no heredan peroxisomas y en los que se forman *de novo*, sin embargo, es necesario realizar un análisis más detallado de esta etapa del desarrollo para poder describir los procesos de herencia y biogénesis peroxisomal que tienen lugar. Es importante recalcar que, de la misma forma en que se identificaron estructuras que no heredan peroxisomas (microconidios y croziers), es posible que haya estructuras

que no heredan mitocondrias, ya que la mutante afecta también la dinámica de este organelo. En este caso, dado que las mitocondrias no cuentan con una maquinaria de biogénesis *de novo*, las células carentes de mitocondrias serían inviables. Asimismo, es importante considerar que, aún en células que sí heredan peroxisomas, su segregación está alterada y es desigual, lo que podría tener efectos durante la germinación de la espora y en el crecimiento del hongo, particularmente si consideramos un escenario similar para las mitocondrias.

Observamos que en los microconidios hay un incremento importante en el porcentaje de éstos que no presentan peroxisomas con respecto a la silvestre. Esto pone en evidencia un efecto sobre la herencia de los peroxisomas a las nuevas células, que puede ser resultado de la distribución heterogénea que tiene el organelo en las hifas vegetativas de las cuáles se diferencian los microconidios. Aquellas hifas que no presenten peroxisomas, no podrán heredarlos a sus estructuras reproductivas. Por otra parte, si la diferenciación se da en una sección de la hifa que sí presenta peroxisomas, pero éstos están afectados morfológicamente por la ausencia de FIS1, es posible que el tamaño de los filamentos peroxisomales impida su herencia a las células sexuales. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, la fisión mitocondrial es un proceso importante previo a la división celular, ya que garantiza que tanto la célula madre como la hija tengan mitocondrias (Böckler et al., 2017). Un proceso análogo podría ocurrir en las células que se diferencian en *P. Anserina*, tanto para las mitocondrias como para los peroxisomas.

En el análisis de la cepa carente de FIS1, observamos que los planos de división de los núcleos durante el desarrollo meiótico no coinciden con los de la cepa silvestre. Durante la primera división de la meiosis, observamos algunos husos acromáticos que se organizan en el eje transversal de la hifa, al contrario de la cepa silvestre, donde su organización es en el eje longitudinal. Los husos acromáticos están afectados en la segunda división meiótica y durante la mitosis post-meiótica. Es incierta la forma en que la alteración de la dinámica peroxisomal y mitocondrial puede afectar la organización de los microtúbulos y particularmente de los husos acromáticos, sin embargo, al menos en el caso de los peroxisomas, algunas investigaciones previas pueden ser útiles para esbozar una hipótesis. En algunos hongos filamentosos, además de la diversidad de funciones metabólicas que cumplen los peroxisomas, puede distinguirse una clase de peroxisomas, los cuerpos de Woronin, que se caracterizan por la abundancia de la proteína Hex1 en su matriz. Los cuerpos de Woronin son peroxisomas especializados encargados de sellar los septos de las hifas cuando éstas sufren daños mecánicos, evitando así la pérdida de citoplasma y la muerte celular (Maruyama y Kitamoto, 2013). En *A. nidulans* se identificó que la proteína ApsB, asociada a los centros organizadores de microtúbulos (MTOC) de los cuerpos polares del núcleo y de los septos, interactúa con HexA (homóloga de la proteína Hex1 de *Neurospora crassa*) y es importada a los cuerpos de Woronin vía

PTS2. A partir de sus observaciones, los autores de esta investigación propusieron que los peroxisomas funcionan como transporte para algunas proteínas que conforman el MTOC, particularmente en los septos y que estos peroxisomas corresponden a una clase que, como los cuerpos de Woronin, cumplen funciones más allá del metabolismo (Zekert et al., 2010). Aunque la evidencia no es concluyente, si una asociación equivalente ocurre con los MTOCs de los cuerpos polares del núcleo, que se requieren para la segregación cromosómica durante la meiosis y mitosis (Jaspersen y Winey, 2004), esto podría explicar las alteraciones que se observan en los microtúbulos en ausencia de FIS1.

Otra posibilidad que se menciona es que los peroxisomas funjan como puntos de ensamblaje de los MTOC, o que catalicen reacciones necesarias para la función de los mismos (Zekert et al., 2010). Si existen peroxisomas especializados que cumplan cualquiera de estas funciones, íntimamente relacionadas con la organización de los microtúbulos, es posible que la alteración de la maquinaria de fisión impida: a) la formación de peroxisomas con contenido proteínico específico para cumplir estas funciones o, b) el transporte de estos organelos a los sitios de la célula donde son requeridos.

Aunado a esto, en queratinocitos de rata se describió que, durante las primeras fases de la mitosis, los peroxisomas están usualmente asociados a los microtúbulos y, particularmente, alrededor de los cuerpos polares, mientras que en la telofase rodean a los núcleos de cada célula hija. Sin embargo, en ausencia de la proteína Pex11 $\beta$ , que participa en la elongación de la membrana peroxisomal previa a su fisión, los peroxisomas presentan varias alteraciones: no se asocian a los cuerpos polares, presentan una segregación desigual en las células hijas, la duración de la mitosis se extiende de  $69\pm 24$  min. A  $118\pm 47$  min., el inicio de la mitosis se retrasa, y el plano en el que se dividen los núcleos suele presentar una rotación (Asare et al., 2017). Los autores proponen que los efectos observados sean resultado de una alteración en la asociación de los peroxisomas con los microtúbulos y proponen la existencia de un punto de control (*checkpoint*) durante el inicio de la mitosis, que dependa de la localización de los organelos para asegurar su correcta segregación a las células hijas (Asare et al., 2017). Si los cuerpos polares del núcleo mantienen interacciones cercanas con los peroxisomas, la alteración en la dinámica de éstos últimos puede incidir directamente sobre la organización de los microtúbulos y afectar el plano de división nuclear, como vimos en esta investigación y como reportaron Asare y colaboradores. Estos efectos pueden deberse a la alteración estructural o metabólica de los peroxisomas en ausencia de determinadas proteínas de la maquinaria de fisión, o puede tratarse, como propone el grupo de Asare, de puntos de control para asegurar la segregación de los organelos.

Además de la rotación del plano de división de los núcleos, notamos también que es común encontrar conglomerados de material genético dispersos en el asca. Si los microtúbulos están

afectados por la ausencia de FIS1, es posible que, durante las divisiones nucleares, queden segmentos cromosómicos dispersos. Sin embargo, también es posible que se trate de material genético mitocondrial, dado que este organelo también está afectado. Este defecto no ha sido reportado previamente en mutantes afectadas en la fisión peroxisomal o mitocondrial, por lo que es necesario llevar a cabo otros experimentos para determinar el origen de estos remanentes de material genético.

Como resultado de la alteración en el plano de división, los núcleos no quedan correctamente posicionados dentro del asca, lo cual genera una compartimentación errónea de éstos en las esporas. Así, se observan frecuentemente esporas con uno o tres núcleos, este fenotipo se ha reportado previamente para las mutantes  $\Delta pex5$  y  $\Delta pex7$ , los receptores para la importación de proteínas a la matriz peroxisomal (Bonnet et al., 2006).

Dado que la falta de estas proteínas podría resultar en un desbalance metabólico, es posible que los efectos que se observan en  $\Delta fis1$  sean también resultado de una alteración en el metabolismo. La manera en que los cambios morfológicos de los organelos afectan a las tasas metabólicas no ha sido estudiada extensamente por las dificultades técnicas que implica, sin embargo, se sabe que ante variaciones en el volumen o la conectividad de un organelo, su metabolismo interno cambia como resultado de la diferencia de concentración de los sustratos necesarios para llevarse a cabo (Lizana et al., 2008). En el caso de la mutante  $\Delta fis1$ , es probable que el metabolismo interno tanto de los peroxisomas como de las mitocondrias se encuentre alterado por la formación de largos filamentos en ambos organelos. Esta alteración podría ser suficiente para generar los defectos fenotípicos observados durante la reproducción sexual, particularmente si la relación entre los peroxisomas y/o mitocondrias con los microtúbulos tiene un carácter metabólico o energético. Y podría explicar que las colonias tengan un crecimiento menor tanto en medio estándar de crecimiento, como en medio AO.

Las ROS, producidas tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas, funcionan como moléculas señalizadoras que desencadenan procesos celulares específicos. En ovocitos de mamíferos, por ejemplo, se ha identificado que las concentraciones de ROS intracelular, que se ven modificadas por la liberación de  $Ca^{2+}$ , determinan si la célula continúa la meiosis o si lleva a cabo apoptosis (Tiwari et al., 2016). En hongos filamentosos se ha identificado su importancia para procesos de diferenciación celular, como el caso de *A. Fumigatus*, en el que se requiere la producción de ROS para la diferenciación de conidióforos (Chi y Craven, 2016). En *N. Crassa* se ha detectado un aumento en los niveles de ROS al inicio de cada etapa de la diferenciación celular durante el desarrollo de conidios (Hansberg, 1993). En otros hongos se han identificado rutas bioquímicas para procesos de muerte celular programada que dependen de la concentración de ROS (Gonçalves et al.,

2017); otros ejemplos de procesos de desarrollo mediados por las concentraciones de ROS pueden consultarse en la revisión de Aguirre y colaboradores (2005). Dado que los peroxisomas y las mitocondrias son los organelos en los que se producen y eliminan ROS, una alteración en su dinámica podría afectar su metabolismo y éste a su vez podría tener un efecto sobre procesos celulares como la reproducción sexual o la diferenciación.

Durante las diferentes etapas del desarrollo sexual, se observó en la cepa silvestre que la población de peroxisomas es variable, mientras que hay etapas de proliferación, también se observan etapas en las que la cantidad de peroxisomas disminuye drásticamente. La eliminación selectiva de peroxisomas o pexofagia, es un proceso que permite eliminar este organelo de la célula cuando las condiciones no requieren una población abundante de los mismos, así como para remover organelos dañados (Zhang y Liu, 2017). En *S. cerevisiae*, se describió que tanto para la pexofagia, como para la mitofagia (la degradación selectiva de mitocondrias), los procesos de fisión son necesarios para obtener organelos de un tamaño que permita su eliminación (Mao et al., 2014). Asimismo, en *H. Polymorpha*, ante diversas condiciones de estrés, los niveles de ROS en los peroxisomas tienden a aumentar y pueden causar daño oxidativo en las proteínas de la matriz peroxisomal. La división asimétrica de los peroxisomas permite formar agregados de proteína dañinos para la célula y eliminarlos mediante pexofagia (Manivannan et al., 2013). Tanto la pexofagia como la mitofagia se ven afectados en ausencia de la proteína de fisión FIS1, lo que posiblemente incide en el metabolismo y el desarrollo celular de *P. Anserina*.

En conjunto, los efectos que se observan a nivel de desarrollo sexual en *P. Anserina* en ausencia de FIS1, parecen ser resultado de una alteración compleja, tanto de los peroxisomas como de las mitocondrias. Dicha alteración puede comenzar a afectar desde niveles estructurales, por el tamaño que adquieren los organelos al no poder fisionarse; hasta niveles metabólicos, por los cambios en las tasas metabólicas dentro de los organelos y las implicaciones que esto tiene en el crecimiento y desarrollo sexual. Asimismo, vale la pena considerar que, al afectar a las mitocondrias, es posible que haya desequilibrios energéticos que también tengan un papel importante en las alteraciones que observamos.

## Conclusiones

Los peroxisomas son organelos versátiles y dinámicos, capaces de responder de manera específica a diferentes condiciones de estrés metabólico o fisiológico. La dinámica, morfología y localización de este organelo está finamente regulada durante el desarrollo sexual.

La proteína FIS1 participa en la fisión peroxisomal y su ausencia afecta a todos los tipos celulares.

La cepa  $\Delta fis1$  presenta defectos en la orientación del huso acromático durante la meiosis y en la mitosis post-meiótica. Esto resulta en alteraciones durante la segregación nuclear, generando ascas con esporas afectadas en su número, forma y tamaño.

Los defectos observados en ausencia de FIS1 pueden ser resultado de afectaciones estructurales, metabólicas o energéticas que resulten de la alteración en la dinámica peroxisomal y/o mitocondrial.

Esta investigación confirma la participación de la proteína FIS1 en la fisión peroxisomal y pone en evidencia sus efectos durante el desarrollo sexual de *P. Anserina*. Asimismo, abre las puertas a una infinidad de preguntas por responder, y deja entrever la complejidad de la maquinaria celular y su fina regulación durante el desarrollo.

## Anexo

### Oligonucleótidos utilizados para generar el casete de delección *Δfis1*

Nombre	Secuencia
Fis1-5F	CTGCTTTTTTGAAGGGGGCAGTGGAG
Fis1-3R	CAGCAGCAACTTGTCTGATTGCCA
Nour-Fis1-3F	GTATTCAACATTTCCGTGGATAACGACAGCAAGGGC
Fis-Nour-R	GCCCTTGCTGTCGTTATCCACGGAAATGTTGAATAC
Nour-Fis1-5R	GAAGCATTTTATCAGGGTTGTCATGGTGGGCAAAC
Fis-Nour-F	GTTTTGCCACCATGACAACCCTGATAAATGCTTC

### Oligonucleótidos utilizados para la confirmación de la cepa *Δfis1*

Nombre	Secuencia
Fis1-5ch-F	GATTGTGTGGCGGATTAG
Fis1-3ch-R	TATCATCCTTAGCGCGAA
Nour Rc	GTTGACGTTGGTGACCT
Nour Fb	CGACATCTCATCTTCCTG

### Condiciones de PCR de confirmación\*

Fis1-5ch-F / Fis1-3ch-R			Fis1-5ch-F / Nour Rc y Nour Fb / Fis1-3ch-R		
95°C	2 min		95°C	2 min	
95°C	1 min		95°C	1 min	
59°C	1 min	x35	59°C	1 min	x35
72°C	1 min 30 s		72°C	1 min 30 s	
72°C	5 min		72°C	5 min	

\*Las PCRs se realizaron con enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), con las concentraciones de reactivos recomendadas por el proveedor.

### Lista de cepas de *Podospira anserina*

Genotipo	Referencia
<i>S</i>	Espagne et al., 2008
<i>GFP-PTS1::ble</i>	Ruprich-Robert et al., 2002
<i>FOX2::mCherry::hph</i>	Suaste-Olmos et al., 2018
<i>FOX2::GFP::hph</i>	Suaste-Olmos et al., 2018
<i>Δfis1::NAT1</i>	Esta investigación
<i>Δfis1::NAT1 GFP-PTS1::ble</i>	Esta investigación
<i>Δfis1::NAT1 FOX2::mCherry::hph</i>	Esta investigación
<i>Δfis1::NAT1 FOX2::GFP::hph</i>	Esta investigación
<i>Δfis1::NAT1 FOX2::GFP::hph mtCherry::ble (FIS1)<sup>EC</sup></i>	Esta investigación



## Lista de plásmidos

Plásmido	Gen de interés	Referencia
pUC-Hygro	<i>hph</i>	Ruprich-Robert et al., 2002
pBC-Hygro	<i>hph</i>	Silar, 1995
pEGFP1	<i>EGFP</i>	Clontech
pPaBle	<i>ble</i>	Ruprich-Robert et al., 2002
pAPI509	<i>nat1</i>	El-Khoury et al., 2008
pUC-Cherry	<i>mCherry</i>	Suaste-Olmos et al., 2018
pUC-GFP	<i>EGFP</i>	Suaste-Olmos et al., 2018
pSM334_Geneticin	<i>gen</i>	Flaherty et al., 2003
GA0AA364BH06	<i>FIS1</i>	Espagne et al., 2008

## Medios

Medio M2	(1L)	Medio AO	(1L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50g/L)	5 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50g/L)	5 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (60g/L)	5 mL	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (60g/L)	5 mL
MgSO <sub>4</sub> (50g/L)	5 mL	MgSO <sub>4</sub> (50g/L)	5 mL
Urea (100g/L)	5 mL	Urea (100g/L)	5 mL
Biotina/Tiamina (200mg/L c/u)	0.5 mL	Biotina/Tiamina (200mg/L c/u)	0.5 mL
Elementos traza	1 mL	Elementos traza	1 mL
Dextrina	11 g	Ácido oleico	0.5 mL
Agar	12.5 g	Tween 40	2 mL
ddH <sub>2</sub> O	980 mL	Agar	12.5 g
		ddH <sub>2</sub> O	980 mL
<p>Se disuelve la dextrina en agua caliente y se adicionan el resto de los componentes, excepto la biotina/tiamina. Se ajusta el pH a 7.0</p> <p>Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 120°C. La biotina y timina, así como los antibióticos, se añaden después de esterilizar, cuando la temperatura del medio sea menor a 60°C.</p>		<p>Se disuelve el ácido oleico y el Tween 40 en 1/5 del volumen final de agua durante 1 hora en agitación constante. Se adicionan el resto de los componentes de la mezcla, excepto la biotina/tiamina. Se ajusta el pH a 7.0</p> <p>Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 120°C. La biotina y timinase añaden después de esterilizar, cuando la temperatura del medio sea menor a 60°C.</p>	

<b>Medio M2 para microscopía (MM)</b>	<b>(1L)</b>	<b>Medio AO para microscopía (AOM)</b>	<b>(1L)</b>
Igual que medio M2, excepto:		Igual que medio AO, excepto:	
Dextrina	5.5 g	Agar	30 g
Agar	30 g		
<b>Medio RG</b>	<b>(1L)</b>	<b>Medio líquido para protoplastos (M2YE)</b>	<b>(1L)</b>
Igual que medio M2, excepto:		Igual que medio M2, excepto:	
Sacarosa (0.58M)	200 g	Extracto de levadura	5 g
		Sin agar	
<b>Medio de germinación (G)</b>	<b>(1L)</b>	<b>Tapas de agar (MA)</b>	<b>(1L)</b>
Acetato de amonio	10 mL	Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Bactopeptona	15 g	Agar	20 g
Extracto de levadura	5 g	ddH <sub>2</sub> O	1 L
Agar	13 g		
ddH <sub>2</sub> O	1 L		

### Antibióticos

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración</b>
Higromicina B (para pBC-Hygro)	75 µg/mL
Higromicina B (para pUC-Hygro)	20 µm/mL
Fleomicina	25 µm
Nourseotricina	40 µm
Geneticina	100 µm

## Referencias

- Agrawal, G., & Subramani, S. (2016). De novo peroxisome biogenesis: evolving concepts and conundrums. *BBA*, 14(11), 892–901. <https://doi.org/10.1111/obr.12065>.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D. & Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 12(3), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Asare, A., Leverage, J., & Fuchs, E. (2017). Coupling organelle inheritance with mitosis to balance growth and differentiation. *Science*, 355, 6324–6329. <https://doi.org/10.1126/science.aah4701>
- Bennett, R. J., & Turgeon, B. G. (2016). Fungal sex : The Ascomycota. *Microbiology Spectrum*, 4(5), 1–28. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0005-2016>
- Beckett, A., Barton, R., & Wilson, I. (1968). Fine structure of the wall and appendage formation in ascospores of *Podospora anserina*. *Journal of General Microbiology*, 53, 89–94. <https://doi.org/10.1099/00221287-53-1-89>
- Beckett, A., & Wilson, I. (1968). Ascus Cytology of *Podospora anserina*. *Journal of General Microbiology*, 53, 81–87. <https://doi.org/10.1099/00221287-53-1-81>
- Böckler, S., Chelius, X., Hock, N., Klecker, T., Wolter, M., Weiss, M., Braun, R. & Westermann, B. (2017). Fusion, fission and transport control asymmetric inheritance of mitochondria and protein aggregates. *Journal of Cell Biology*, 216(8), 2481–2498. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611197>
- Boisnard, S., Espagne, E., Zickler, D., Bourdais, A., Riquet, A., & Berteaux-Lecellier, V. (2009). Peroxisomal ABC transporters and  $\beta$ -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.006>
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boisnard, S., Bourdais, A., & Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Molecular Microbiology*, 62(1), 157–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05353.x>
- Chi, M. H., & Craven, K. D. (2016). RacA-mediated ROS signaling is required for polarized cell differentiation in conidiogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*, 11(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149548>
- Coppin-Raynal, E., Picard, M., & Arnais, S. (1989). Transformation by integration in *Podospora anserina* - III. Replacement of a chromosome segment by a two-step process. *Molecular & General Genetics*, 219, 270–276. <https://doi.org/10.1007/BF00261187>
- Deb, R., & Nagotu, S. (2017). Tissue and cell versatility of peroxisomes : An evolving concept. *Tissue and Cell*, 49(2), 209–226. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.03.002>
- El-Khoury, R., Sellem, C. H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M. F. P. M., Debuchy, R., & Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Current Genetics*, 53(4), 249–258. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0180-3>
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B. M., Couloux, A., Aury, J., Ségurens, B., Poulain, J., Anthouard, V., Grossetete, S., Khalili, H., Coppin, E., Déquard-Chablat, M., Picard, M., Contamine, V., Arnais, S., Bourdais, A., Berteaux-Lecellier, V., Gautheret, D., P de Vries, R., Battaglia, E., Coutinho, P., Danchin, E., Henrissat, B., El-Khoury, R., Sainsard-Chanet, A., Boivin,

- A., Pinan-Lucarré, B., Sellem, C., Debuchy, R., Wincker, P., Weissenbach, J. & Silar, P. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biology*, 9(5), R77.1-R77.22. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., & Rachubinski, R. A. (2007). Maintaining peroxisome populations: A story of division and inheritance. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 321–344. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123456>
- Flaherty, J. E., Pirttilä, A. M., Bluhm, B. H. & Woloshuk, C. P. (2003) PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticilloides*. *Applied Environmental Microbiology*, 69(9), 5222-5227. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5222-5227.2003>
- Gandía, M., Xu, S., Font, C., & Marcos, J. F. (2016). Disruption of ku70 involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Fungal Biology*, 120(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.001>
- Gandre-Babbe, S. & van der Bliek, A. (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Cell Biology*, 16(6): 2402-2412. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1287>
- Gonçalves, A. P., Heller, J., Daskalov, A., Videira, A., & Glass, N. L. (2017). Regulated forms of cell death in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 8(Sep), 1837-1857. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01837>
- Grognet, P., Bidard, F., Kuchly, C., Ho Tong, L. C., Coppin, E., Benkhali, J. A., Couloux, A., Wincker, P., Debuchy, R. & Silar, P. (2014). Maintaining two mating types: Structure of the mating type locus and its role in heterokaryosis in *Podospora anserina*. *Genetics*, 197(May), 421-432. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159988>
- Guimaraes, S. C., Schuster, M., Bielska, E., Dagdas, G., Kilaru, S., Meadows, B. R. A., Schrader, M. & Steinberg, G. (2015). Peroxisomes, lipid droplets, and endoplasmic reticulum “hitchhike” on motile early endosomes. *Journal of Cell Biology*, 211(5), 945–954. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505086>
- Gurvitz, A., & Rottensteiner, H. (2006). The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1392–1402. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.011>
- Hansberg, W., de Groot, H. & Sies, H. (1993) reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 287-293. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90025-P](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90025-P)
- Jaspersen, S. L., & Winey, M. (2004). The budding yeast spindle pole body: Structure, duplication, and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.022003.114106>
- Khan, I. A., Ning, G., Liu, X., Feng, X., Lin, F., & Lu, J. (2015). Mitochondrial fission protein MoFis1 mediates conidiation and is required for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Microbiological Research*, 178, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.002>
- Kim, P. K., & Hettema, E. H. (2015). Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1176–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.005>

- Kobayashi, S., Tanaka, A. & Fujiki, Y. (2007) Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Experimental Cell Research*, 313(8), 1675-1686.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.028>
- Koirala, S., Guo, Q., Kalia, R., Bui, H. T., Eckert, D. M., Frost, A., & Shaw, J. M. (2013). Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), E1342–E1351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300855110>
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Gohta, G., Gelfand, V., & Selvin, P. (2005). Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: A tug-of-war or coordinated movement? *Science*, 308, 1469–1473.  
<https://doi.org/10.1126/science.1108408>
- Kuravi, K., Nagotu, S., Krikken, A. M., Sjollem, K., Deckers, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 119(19), 3994–4001.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.03166>
- Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H., & Tanaka, Y. (2002). PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Research*, 30(2), 2e–2. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.e2>
- Lefevre, S. D., Kumar, S., & van der Klei, I. J. (2015). Inhibition of peroxisome fission, but not mitochondrial fission, increases yeast chronological lifespan. *Cell Cycle*, 14(11), 1698–1703.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1029685>
- Lin, C., Schuster, M., Guimaraes, S. C., Ashwin, P., Schrader, M., Metz, J., Hacker, C., Gurr, S. & Steinberg, G. (2016). Active diffusion and microtubule-based transport oppose myosin forces to position organelles in cells. *Nature Communications*, 7(May), 11814–11828. <https://doi.org/10.1038/ncomms11814>
- Lizana, L., Bauer, B., & Orwar, O. (2008). Controlling the rates of biochemical reactions and signaling networks by shape and volume changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4099–4104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709932105>
- Manivannan, S., De Boer, R., Veenhuis, M., & Van Der Klei, I. J. (2013). Lumenal peroxisomal protein aggregates are removed by concerted fission and autophagy events. *Autophagy*, 9(7), 1044–1056.  
<https://doi.org/10.4161/auto.24543>
- Marek, E.T., Schardl, C. L. & Smith, D. A. (1989) Molecular transformation of *Fusarium solani* with an antibiotic resistance marker having no fungal DNA homology. *Current Genetics*, 15(6), 421-428. <https://doi.org/10.1007/BF00376799>
- Maruyama, J., & Kitamoto, K. (2013). Expanding functional repertoires of fungal peroxisomes: Contribution to growth and survival processes. *Frontiers in Physiology*, 4 (July), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00177>
- Mao, K., Liu, X., Feng, Y., & Klionsky, D. J. (2014). The progression of peroxisomal degradation through autophagy requires peroxisomal division. *Autophagy*. <https://doi.org/10.4161/auto.27852>
- Meijer, W. H., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J. A. K. W., van den Berg, M. A., Lascaris, R., Bovenberg, R. A. L. & van der Klei, I. J. (2010). Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5702–5709.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02327-09>

- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., & Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biology*, *12*(3), 273–277. <https://doi.org/10.1038/ncb2027>
- Motley, A. M., Ward, G. P., & Hettema, E. H. (2008). Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *Journal of Cell Science*, *121*(PT 10), 1633–1640. <https://doi.org/10.1242/jcs.026344>
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., & Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *Journal of Cell Biology*, *151*(2), 367–380. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.367>
- Nagotu, S., Krikken, A. M., Otzen, M., Kiel, J. A. K. W., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2008). Peroxisome fission in *Hansenula polymorpha* requires Mdv1 and Fis1, two proteins also involved in mitochondrial fission. *Traffic*, *9*(9), 1471–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00772.x>
- Nagotu, S., Veenhuis, M., & Van der Klei, I. J. (2010). Divide et impera: The dictum of peroxisomes. *Traffic*, *11*(2), 175–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01019.x>
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *189*, 737–765. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127126>
- Neubauer, M., Zhu, Z., Penka, M., Helmschrott, C., Wagener, N., & Wagener, J. (2015). Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: Therapeutic and evolutionary implications. *Molecular Microbiology*, *98*(5), 930–945. <https://doi.org/10.1111/mmi.13167>
- Osellame, L. D., Singh, A. P., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Stojanovski, D., Ramachandran, R., & Ryan, M. T. (2016). Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, *129*(11), 2170–2181. <https://doi.org/10.1242/jcs.185165>
- Paoletti, M., & Saupe, S. J. (2008). The genome sequence of *Podospora anserina*, a classic model fungus. *Genome Biology*, *9*(5), 5–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-223>
- Peraza-Reyes, L., Espagne, E., Arnais, S., & Berteaux-Lecellier, V. (2010). Peroxisomes in Filamentous Fungi. In K. A. Borkovich & D. J. Ebbole (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. Washington, DC: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch15>
- Peraza-Reyes, L., & Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, *4*, 244–260. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00244>
- Platta, H. W., Brinkmeier, R., Reidick, C., Galiani, S., Clausen, M. P., & Eggeling, C. (2016). Regulation of peroxisomal matrix protein import by ubiquitination. *BBA Molecular Cell Research*, *1863*(5), 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.010>
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Sanz-Fernández, M., Hu, J., & Sandalio, L. M. (2016). Peroxisomes Extend Peroxules in a Fast Response to Stress via a Reactive Oxygen Species-Mediated Induction of the Peroxin PEX11a. *Plant Physiology*, *171*(3), 1665–1674. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00648>
- Ruprich-Robert, G., Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., & Picard, M. (2002). Identification of six loci in which mutations partially restore peroxisome biogenesis and/or alleviate the metabolic defect of pex2 mutants in *Podospora*. *Genetics*, *161*(3), 1089–1099.

- Salogiannis, J., Egan, M. J., & Reck-Peterson, S. L. (2016). Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *Journal of Cell Biology*, 212(3), 289–296. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512020>
- Scheckhuber, C. Q., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nyström, T., & Osiewacz, H. D. (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models, 9(1), 99-105. <https://doi.org/10.1038/ncb1524>
- Scheckhuber, C. Q., Rödel, E., & Wüstehube, J. (2008). Regulation of mitochondrial dynamics - Characterization of fusion and fission genes in the ascomycete *Podospora anserina*. *Biotechnology Journal*, 3(6), 781–790. <https://doi.org/10.1002/biot.200800010>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2008). The peroxisome: Still a mysterious organelle. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), 421–440. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0396-9>
- Schrader, M., Bonekamp, N. A., & Islinger, M. (2012). Fission and proliferation of peroxisomes. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1343–1357. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.014>
- Schrader, M., Costello, J. L., Godinho, L. F., Azadi, A. S., & Islinger, M. (2015). Proliferation and fission of peroxisomes — An update. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863(5), 971-983. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.024>
- Schrader, M., & Islinger, M. (2016). Editorial: Molecular Mechanisms and Physiological Significance of Organelle Interactions and Cooperation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(December), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00145>
- Silar, P. (1995) Two new easy-to-use vectors for transformations. *Fungal Genetics Reports*, 42, 73. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1353>
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology. En B. A. Horwitz, P. Mukherjee, M. Mukherjee, & C. Kubicek (Eds.), *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*. *Soil Biology*. Berlin: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39339-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39339-6_12)
- Smith, J. J., Brown, T. W., Eitzen, G. A., & Rachubinski, R. A. (2000). Regulation of peroxisome size and number by fatty acid  $\beta$ -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 20168–20178. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909285199>
- Smith, J. J., & Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(12), 803–817. <https://doi.org/10.1038/nrm3700>
- Steinberg, G. (2016). The mechanism of peroxisome motility in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 97, 33–35. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.10.006>
- Suaste-Olmos, F., Ziri6n-Mart6nez, C., Takano-Rojas, H. & Peraza-Reyes, L. (2018) Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *BBA – Molecular Cell Research*, 1865(2018), 572-586. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.003>
- Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J., & McBride, H. M. (2017). Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*, 542(7640), 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature21375>

- Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *Journal of Molecular Biology*, 334(3), 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.064>
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N., & Youle, R. J. (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21444–21452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414092200>
- Takano-Rojas, H., Zickler, D., Peraza-Reyes, L., & Zickler, D. (2016). Peroxisome dynamics during development of the fungus *Podospora anserina*. *Mycologia*, 108(3), 590–602. <https://doi.org/10.3852/15-112>
- Tarutani, Y., Ohsumi, K., Arioka, M., Nakajima, H., & Kitamoto, K. (2001). Cloning and characterization of a gene (*vpsA*) from *Aspergillus nidulans* encoding a small GTPase involved in vacuolar biogenesis. *Gene*, 268, 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00626-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00626-1)
- Thompson-Coffe, C., & Zickler, D. (1994). How the cytoskeleton recognizes and sorts nuclei of opposite mating type during sexual cycle in filamentous ascomycetes. *Developmental Biology*, 165, 257–271. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1251>
- Tiwari, M., Prasad, S., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2016). Calcium signaling during meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 976–981. <https://doi.org/10.1002/jcp.25670>
- Zekert, N., Veith, D., & Fischer, R. (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryotic Cell*, 9(5), 795–805. <https://doi.org/10.1128/EC.00058-10>
- Zhang, X. C., & Hu, J. P. (2008). FISSION1A and FISSION1B proteins mediate the fission of peroxisomes and mitochondria in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 1(6), 1036–1047. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn056>
- Zhang, J., & Liu, T. (2017). Energy charge as an indicator of pexophagy in *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*, 8(May), 963–970. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00963>
- Zhong, K., Li, X., Le, X., Kong, X., Zhang, H., Zheng, X., Wang, P., & Zhang, Z. (2016). MoDnm1 dynamin mediating peroxisomal and mitochondrial fission in complex with MoFis1 and MoMdv1 is important for development of functional appressorium in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 12(8), e1005823.