



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La función del complejo de ubiquitinación
peroxisomal en la biogénesis de los peroxisomas y el
desarrollo sexual del hongo *Podospora anserina*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

CLAUDIA ZIRIÓN MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES
CIUDAD.UNIVERSITARIA,.CD..MX.,,2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Zirión
Martínez
Claudia
55 27 01 74 18
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
413032520

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.
Genaro
Vázquez
Victorio

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Hermelinda Margarita
Villegas
Ríos

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

7. Datos del trabajo escrito

La función del complejo de ubiquitinación peroxisomal en la biogénesis de los peroxisomas y el desarrollo sexual del hongo *Podospora anserina*
p. 54
2018

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Fernando Suaste Olmos por su ayuda técnica constante en el laboratorio y por la generación de cepas utilizadas para este trabajo.

A los doctores Jesús Aguirre Linares, Wilhelm Hansberg Torres, Francisco Torres Quiroz y Paola Moreno Álvarez y a los miembros de sus laboratorios por facilitarnos equipo de laboratorio y apoyo.

A los miembros del jurado, Dra. María Soledad Funes Argüello, Dr. Genaro Vázquez Victorio, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos y Dra. Laura Kawasaki Watanabe por su cuidadosa revisión del trabajo y sus valiosos comentarios.

A los miembros del laboratorio Aldo Meizoso Huesca, Antonio López Fuentes, Francisco Amezola Chávez, Harumi Takano Rojas, Jorge Castillo Canizales, Karime Nachón Garduño y Rafal Navarro Espíndola.

A Harumi Takano Rojas, Sofía Zirión Martínez, María Zirión Martínez, Claudia Martínez Urrea y Antonio Zirión Quijano por su ayuda en la realización de este trabajo y en la vida.

A Leonardo Peraza Reyes por su incomparable enseñanza.

Esta investigación fue realizada en el laboratorio del Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, con claves de proyectos: IA201815 e IA203317. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
<i>PODOSPORA ANSERINA</i>	7
PEROXISOMAS	9
ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	19
SECUENCIAS GENÉTICAS	20
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO, FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS Y TRANSFORMACIÓN	20
DELECIONES GENÉTICAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	20
COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA.....	21
CITOLOGÍA	21
MICROSCOPÍA	22
RESULTADOS	23
CREACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA CEPA Δ PEX22 DE <i>P. ANSERINA</i>	23
PEX4 Y PEX22 SE REQUIEREN PARA LA UTILIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y LA FORMACIÓN DE MICELIO AÉREO	25

LA AUSENCIA DE PEX4 Y PEX22 NO AFECTA LA FORMACIÓN DE LAS MEMBRANAS PEROXISOMALES	26
PEX4 Y PEX22 SE REQUIEREN EN LA IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ PEROXISOMAL	27
EL COMPLEJO DE UBIQUITINACIÓN ES NECESARIO EN EL INICIO DE LA MEIOSIS	36
COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS MUTANTES	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	44
ANEXO.....	45
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

Los peroxisomas son organelos de membrana sencilla presentes en la mayoría de las células eucariotas. Sus funciones más conservadas son la β -oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno, sin embargo, existen diversos procesos en distintos organismos que se llevan a cabo en los peroxisomas. Las funciones de estos organelos dependen de las proteínas que contienen en su matriz, las cuales son introducidas postraduccionalmente desde el citosol. Se conocen principalmente dos rutas de importación de proteínas (mediadas por dos receptores distintos), que son muy similares entre los organismos pero que tienen diferencias en algunos de sus componentes. De forma general consisten en lo siguiente: un receptor soluble reconoce en el citosol a una proteína que presenta en su secuencia una señal de localización peroxisomal; posteriormente se une el receptor a proteínas membranales del organelo y se transloca a la matriz peroxisomal junto con la proteína que transporta; aquí se separan y el receptor se exporta al citosol, lo que le permite continuar con nuevas rondas de importación. La exportación del receptor requiere de la ubiquitinación del mismo, proceso que se lleva a cabo por la enzima PEX4, que es activada y anclada a la membrana del organelo por PEX22. Ambas proteínas forman el complejo de ubiquitinación.

En el hongo filamentoso *Podospora anserina* se han estudiado varias de las proteínas que componen las vías de importación y se ha observado que la ausencia de algunas de ellas, en cruces homócigas, provoca defectos en el desarrollo sexual del hongo, particularmente en el momento previo a la cariogamia, ocasionando esterilidad. Este fenotipo no se observa en ausencia de los receptores de ambas vías, pero sí en ausencia de una proteína muy similar a uno de ellos, que entra a los peroxisomas y sale de ellos de forma dependiente de su ubiquitinación. Esto sugiere que esta proteína es el receptor de una tercera vía de importación peroxisomal en *P. anserina*, que es esencial para su desarrollo sexual.

En *P. anserina* el complejo de ubiquitinación peroxisomal no ha sido caracterizado. En esta investigación estudiamos a las proteínas PEX4 y PEX22 para definir su función como factores de biogénesis peroxisomal y entender su participación en el desarrollo sexual, y así completar nuestro conocimiento de los componentes de la presunta vía de importación peroxisomal necesaria para la meiosis.

INTRODUCCIÓN

Podospora anserina

Podospora anserina es un ascomiceto filamentoso que pertenece al orden Sordariales al igual que los organismos *Sordaria macrospora* y *Neurospora crassa*. Es un hongo coprófilo; vive en el excremento de animales herbívoros donde se nutre de la materia vegetal que no fue degradada por estos. Sus esporas son ingeridas por los animales y el paso por el tracto digestivo facilita su germinación. Gracias a su facilidad de cultivo y corto tiempo generacional, y más recientemente por tener su genoma completamente secuenciado (Espagne *et al.*, 2008), ha sido utilizado como modelo biológico desde principios del siglo XX para estudiar procesos como la formación de ascosporas, la fusión hifal, la degradación de biomasa, la incompatibilidad vegetativa, la senescencia, la meiosis y la fisiología mitocondrial y peroxisomal, entre otros (Silar, 2013).

P. anserina es un hongo bipolar cuyos loci de tipo sexual se conocen como *MAT+* y *MAT-* (Debuchy y Coppin, 1992). Generalmente tiene un sistema de apareamiento pseudohomotático, ya que sus esporas tienen un núcleo haploide de cada tipo sexual y generan un micelio heterocariótico. En el 1 % de las ascas se forman esporas uninucleadas que dan lugar a un micelio homocariótico con un solo tipo sexual y por lo tanto un apareamiento heterotático. No se le conoce reproducción por esporas asexuales (Silar, 2013).

Su ciclo de vida comienza con la germinación de las ascosporas; el micelio crece y genera las estructuras sexuales femeninas y masculinas, independientemente de su tipo sexual. El gameto masculino es una célula uninucleada llamada espermacio cuya única función es la fertilización. El gametangio femenino denominado ascogonio, está formado por una hifa multinucleada que se enrolla alrededor de sí misma, de la cual surge una hifa llamada tricógina que tiene tropismo por las feromonas que liberan los espermacios del tipo sexual opuesto. Alrededor del ascogonio las hifas circundantes forman una envoltura, al conjunto se le conoce como protoperitecio; después de la fertilización éste madura y se convierte en un ascoma llamado peritecio (Peraza-Reyes y Malagnac, 2016). La fertilización se lleva a cabo entre una hifa tricógina y un espermacio; el núcleo masculino llega al ascogonio y junto con el resto de los núcleos se divide varias veces. En el ascogonio cenocítico se diferencian células ascogoniales con núcleos de ambos tipos sexuales; éstas se alargan y curvan produciendo una célula con forma de gancho conocida como crozier. En el crozier se da simultáneamente la mitosis de los dos núcleos, uno de cada tipo sexual, y en la parte superior se delimita una célula dicariótica unida a dos células uninucleadas que

posteriormente se fusionan y dan lugar a más croziers. La célula dicariótica superior se convierte en el asca (meiocito), en la que se produce la cariogamia entre los núcleos de tipo sexual opuesto, con esto se genera la única célula diploide en la vida del hongo. En ella se lleva a cabo la meiosis y una mitosis post-meiótica; los ocho núcleos resultantes se empaquetan en cuatro ascosporas binucleadas con ambos tipos sexuales en el 99% de las ascas, o en tres esporas binucleadas y dos uninucleadas en el 1 % de las ascas (Fig. 1)(Zickler *et al.*, 1995; Silar, 2013).

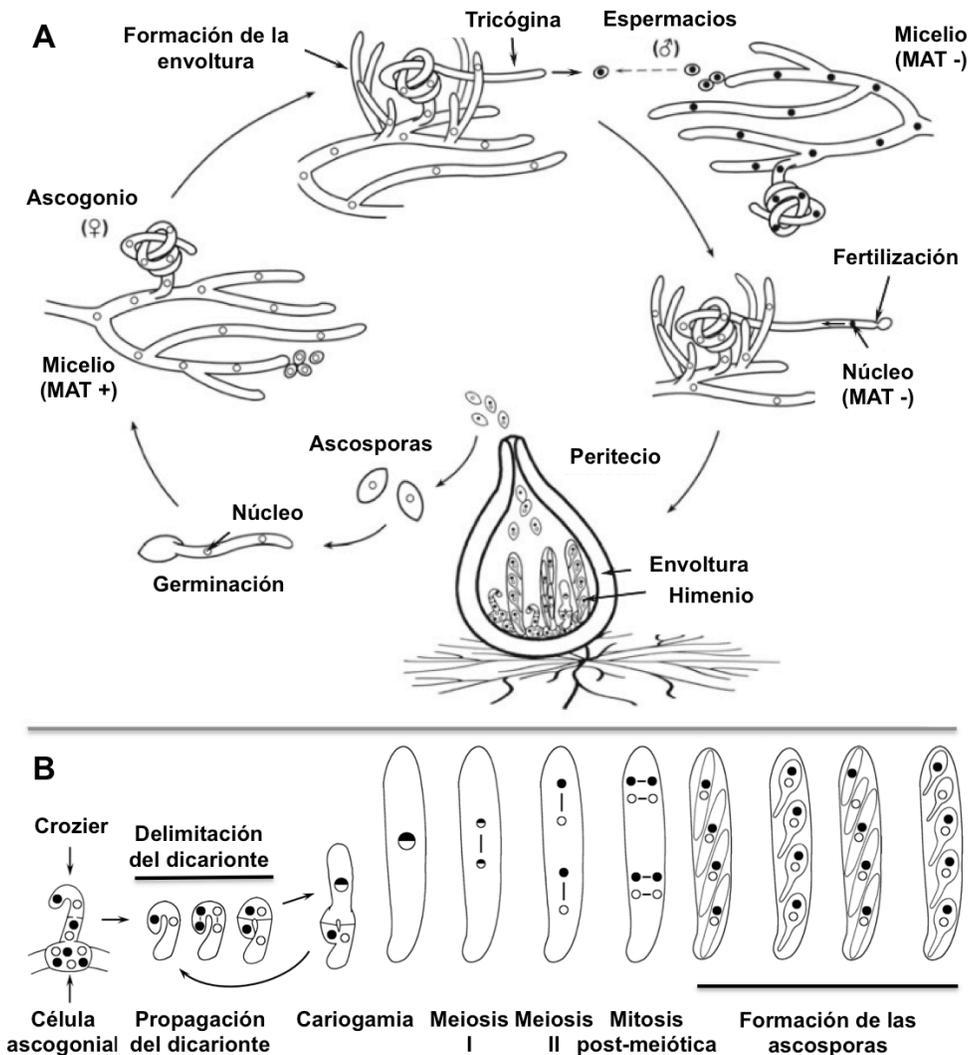


Fig. 1. Ciclo de vida de *P. anserina*. A) Esquema que muestra el ciclo de vida de *P. anserina* desde la germinación de las ascosporas hasta la formación del peritecio. B) Esquema de los eventos que se llevan a cabo en el peritecio después de la fertilización y la proliferación de núcleos; desde la formación de la célula ascogonial y el crozier hasta la formación de las ascosporas. Se muestra la formación de dos tipos de ascas: uno con esporas binucleadas y otro con esporas tanto binucleadas como uninucleadas. Modificado de Peraza-Reyes y Malagnac, 2016.

Peroxisomas

Los peroxisomas son organelos delimitados por una sola membrana que se encuentran en casi todas las células eucariotas, con excepciones como los espermatozoides, los eritrocitos y algunos protistas anaerobios. Las funciones peroxisomales que están conservadas en todos los organismos son la β -oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (Deb y Nagotu, 2017). La β -oxidación permite la utilización de ácidos grasos como fuente de energía y como fuente de carbono en los organismos que realizan el ciclo del glioxilato. En los hongos además provee precursores para la producción de melanina, un pigmento presente en las esporas sexuales que es necesario para su germinación (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). En algunos organismos la β -oxidación se lleva a cabo tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias, un ejemplo es el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Hynes *et al.*, 2008); en *P. anserina* los ácidos grasos de cadena muy larga (por ejemplo el ácido oleico) comienzan su oxidación en los peroxisomas y se transportan a las mitocondrias, donde se terminan de degradar (Boisnard *et al.*, 2009). Varias de las enzimas que participan en el metabolismo peroxisomal producen peróxido de hidrógeno durante sus reacciones; los peroxisomas contienen enzimas antioxidantes, como catalasas y peroxidasas, que degradan las especies reactivas de oxígeno y así evitan que el exceso de las mismas provoque daño celular oxidante (Wang *et al.*, 2015).

Los peroxisomas además, tienen diversas funciones puntuales en algunas especies y tipos celulares. En los hongos, algunas de ellas son el ciclo del glioxilato, la síntesis de algunos metabolitos secundarios, los metabolismos del metanol, las aminas y las purinas (Deb y Nagotu, 2017) y la producción de moléculas señalizadoras (Tripathi *et al.*, 2016). También, los peroxisomas han demostrado tener papeles importantes en el desarrollo, la diferenciación, la morfogénesis y el envejecimiento en diferentes organismos (Terlecky y Titorenko, 2009; Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013; Nyathi y Baker, 2006; Berger *et al.*, 2016). Algunos ejemplos son la transición de fase levaduriforme a micelio en *Yarrowia lipolytica* (Titorenko *et al.*, 1997), la regulación de la transición entre las fases que infectan a distintos hospederos de *Trypanosoma brucei* (Szöör *et al.*, 2010), la espermatogénesis de *Drosophila melanogaster* (Chen *et al.*, 2009) y el reconocimiento de gametofitos de *Arabidopsis thaliana* (Boisson-Dernier *et al.*, 2008).

Durante un tiempo se pensó que los peroxisomas eran organelos semi-autónomos como las mitocondrias y los cloroplastos, que únicamente se producen por crecimiento y división de organelos pre-existentes. Sin embargo, recientemente se ha descrito una forma complementaria

de biogénesis¹ que liga a los peroxisomas con el sistema de endomembranas, ya que se ha descubierto que algunas proteínas de la membrana peroxisomal (PMPs) se insertan en la membrana del retículo endoplásmico (ER) y se agregan en dominios que se desprenden en forma de vesículas pre-peroxisomales (Agrawal y Subramani, 2016). Esto introdujo al modelo de crecimiento y división la idea de que las vesículas pre-peroxisomales lo que hacen es fusionarse a los peroxisomas pre-existentes, enriqueciéndolos con más PMPs y lípidos de membrana. Sin embargo, existen otros dos modelos que constituyen dos tipos de biogénesis *de novo*. El modelo de fusión de vesículas indica que se forman dos tipos de vesículas, con juegos de PMPs complementarios, que se fusionan para dar peroxisomas con todas las PMPs, que maduran con la importación de proteínas de matriz. Y el modelo de reintroducción de peroxisomas postula que vesículas pre-peroxisomales de un solo tipo salen del ER con algunas PMPs y maduran gradualmente con la inserción de más PMPs y la introducción de proteínas de matriz (Fig. 2) (Hettema *et al.*, 2014). Recientemente se ha encontrado evidencia en mamíferos, de que algunas vesículas pre-peroxisomales provienen de las mitocondrias (Sugiura *et al.*, 2017). El debate actualmente se centra en responder cuál es la forma de distribución de las PMPs más relevante fisiológicamente (Mayerhofer, 2016).

A los factores de biogénesis peroxisomal, es decir, las proteínas implicadas en la formación de membranas peroxisomales y la importación de proteínas de matriz, y a las proteínas implicadas en el control de la abundancia, tamaño y herencia peroxisomales, se les denomina peroxinas y se abrevian con el acrónimo Pex (Distel *et al.*, 1996).

Para que se inserten a la membrana las PMPs sintetizadas en el citosol, éstas deben tener una señal de localización peroxisomal membranal que es reconocida por Pex19, una chaperona citosólica que estabiliza a estas proteínas y se ancla a la membrana peroxisomal a través de Pex3; esta interacción permite la inserción de la PMP a la membrana. Pex3 y Pex19 son las únicas peroxinas conservadas cuya ausencia provoca una falta de membranas peroxisomales (Mayerhofer, 2016).

¹ Hasta la fecha, la biogénesis peroxisomal en los hongos es entendida de forma más completa en las levaduras y por lo tanto la descripción de los procesos estará basada en los conocimientos sobre *Saccharomyces cerevisiae*, a menos que se indique otra cosa.

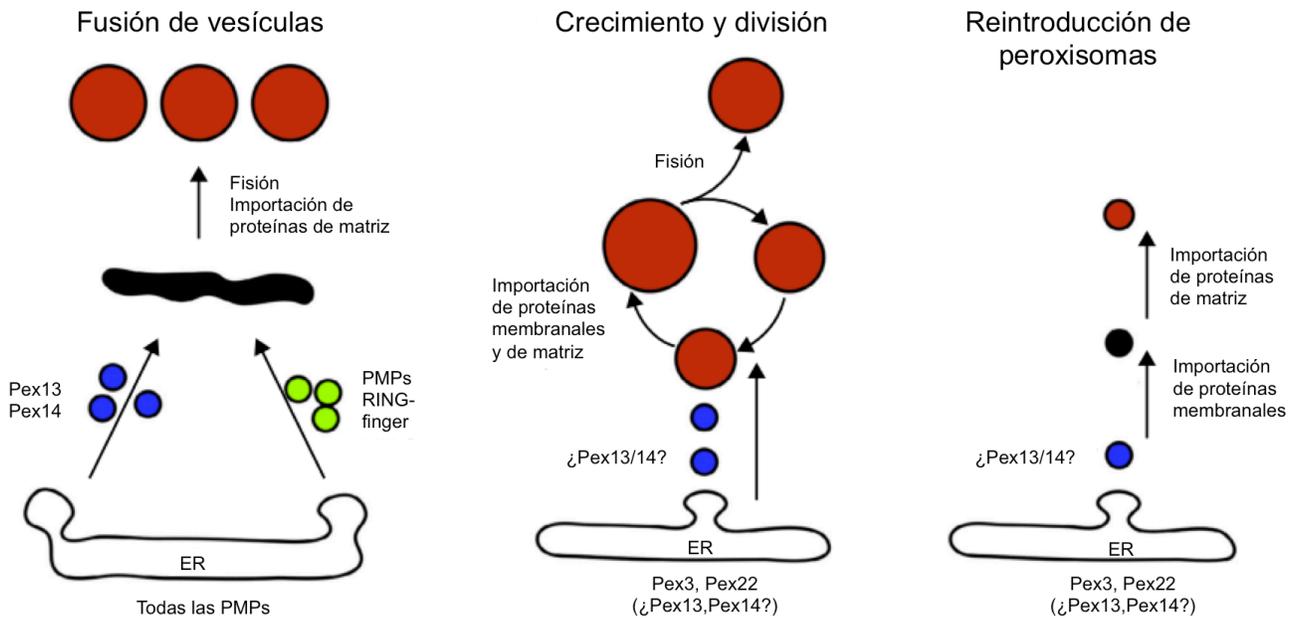


Fig. 2. Modelos de biogénesis peroxisomal. Se muestran tres modelos de biogénesis peroxisomal en los que se señala el origen de las vesículas pre-peroxisomales (en azul y verde) y la hipotética forma de distribución de algunas peroxinas membranales. Modificado de Hetteima *et al.*, 2014.

Una vez que se han insertado a la membrana todas las PMPs, se importan al peroxisoma las proteínas que realizarán sus funciones en la matriz del organelo. Los peroxisomas, al igual que las mitocondrias, son capaces de importar a su matriz proteínas sintetizadas en el citosol, pero a diferencia de ellas, en los peroxisomas las proteínas pueden entrar completamente plegadas e incluso oligoméricas (Hasan *et al.*, 2013). La mayoría de las proteínas de matriz peroxisomal tiene una señal de localización peroxisomal (PTS), existen dos de ellas. La secuencia de residuos de aminoácidos SKL, o algunas variantes de ésta, en el extremo C-terminal forma la PTS1 y es reconocida por el receptor Pex5, gracias las repeticiones tetratricopéptido (TPR) que éste tiene en la mitad C-terminal. La secuencia consenso (R/K)-(L/V/I)- X₅-(H/Q)-(L/A) en el extremo N-terminal forma la PTS2, que se asocia a las repeticiones triptófano-ácido aspártico del receptor Pex7 (Emmanouilidis *et al.*, 2016). Mientras que Pex5 puede realizar el proceso de importación por sí solo, la vía de importación de PTS2 requiere de dos componentes. Pex7 es el receptor que cumple la función de la mitad C-terminal de Pex5 (reconocimiento de la proteína) y necesita de un co-receptor que cumpla la función de la mitad N-terminal de Pex5 (transporte); en *Saccharomyces cerevisiae* Pex18 y Pex21 son los co-receptores, parcialmente redundantes entre sí, de Pex7 y en los hongos filamentosos y otras levaduras es Pex20 (Schäfer *et al.*, 2004). Existen

proteínas que sin una PTS pueden ser importadas a los peroxisomas, por ejemplo Pox1 (acil-CoA oxidasa) de *S. cerevisiae* se asocia a Pex5 fuera del dominio TPR (Klein *et al.*, 2002) y FOX2 (hidratasa-deshidrogenasa-epimerasa de la β -oxidación) de *P. anserina* depende de PEX5 pero su forma de asociación al receptor es desconocida (Boisnard *et al.*, 2009), otras proteínas son importadas gracias a su asociación con una proteína que sí tiene PTS. Cuando hay defectos, como la ausencia de receptores y co-receptores, que impiden la importación de proteínas a la matriz peroxisomal las membranas se mantienen vacías y se les conoce como remanentes peroxisomales.

Una vez que se asocian en el citosol el receptor y la proteína de matriz, este complejo se une al complejo de anclaje en la membrana peroxisomal, formado por Pex13, Pex14 y en algunas especies proteínas específicas como Pex17 en *S. cerevisiae* y PEX14/17 en *P. anserina*. La translocación de la proteína a la matriz peroxisomal se realiza a través de un poro transitorio; recientemente se demostró en *S. cerevisiae* que se forman dos poros distintos, uno lo componen Pex5 y Pex14 para las proteínas con PTS1 y el otro Pex14, Pex17 y Pex18 para las proteínas con PTS2, el receptor Pex7 no forma parte de este poro. El primero es un poro que se abre hasta 9 nm de diámetro y el segundo está constitutivamente abierto con un diámetro de aproximadamente 4.7 nm (Montilla-Martínez *et al.*, 2015). También se ha propuesto que el mecanismo de translocación está acoplado y depende de la exportación de los receptores (Schliebs *et al.*, 2010, Hensel *et al.*, 2011), que se explicará a continuación. Una vez que la proteína ha llegado a la matriz se separa del receptor, el mecanismo por el que se lleva a cabo esta separación no está del todo comprendido, hay evidencia de que en la levadura metilotrófica *Komagataella (Pichia) pastoris* la liberación depende del estado redox del peroxisoma y de la proteína intraperoxisomal Pex8 (Ma *et al.*, 2013).

La localización de los receptores y co-receptores de estas vías de importación está regulada por ubiquitinación. La ubiquitinación es una modificación postraducciona en la que se añade la proteína ubiquitina (Ub) de 76 residuos de aminoácidos a una proteína sustrato. La ubiquitinación se puede dar de muchas formas: se pueden añadir una o varias moléculas de ubiquitina al mismo sustrato (monoubiquitinación o multimonoubiquitinación, respectivamente) o se pueden añadir al sustrato cadenas de diversas topologías formadas por varias ubiquitinas (poliubiquitinación). Según las marcas que se coloquen, la remoción de las mismas y las proteínas de unión a ellas, estas modificaciones postraduccionales pueden inducir en los sustratos una gran variedad de destinos, como lo son la degradación proteosomal o lisosomal y las regulaciones de

interacciones entre proteínas, de la actividad y de la localización de la proteína (Komander y Rape, 2012).

La ubiquitinación se realiza mediante una cascada de reacciones en la que se necesitan 3 enzimas: E1 (ubiquitín-activadora), E2 (de conjugación) y E3 (ubiquitín-ligasa). La cascada comienza con la activación de la Ub, donde la E1 forma un enlace tioéster entre una cisteína de su extremo N-terminal y el grupo carboxilo de la última glicina de la Ub, es una reacción dependiente de ATP en la que se forma un intermediario de Ub adenilada. Posteriormente la Ub pasa de la E1 a formar un enlace tioéster con la E2 y finalmente la ligasa E3 transfiere la Ub de la E2 a un residuo de lisina, mediante un enlace isopeptídico, de la proteína sustrato o de otra Ub si se está construyendo una cadena (Zamudio-Arroyo *et al.*, 2012) (Fig. 3).

La mayoría de las ubiquitinaciones se realizan en residuos de lisina de la proteína sustrato, sin embargo, algunas proteínas se ubiquitan mediante enlaces tioéster en residuos de cisteína. Este es el caso de la monoubiquitinación del receptor Pex5 y los co-receptores Pex18 y Pex20 (Williams *et al.*, 2007, Hensel *et al.*, 2011, León y Subramani, 2007). La E1 que participa en todos los tipos de ubiquitinación en levaduras es Uba1 (Platta *et al.*, 2014).

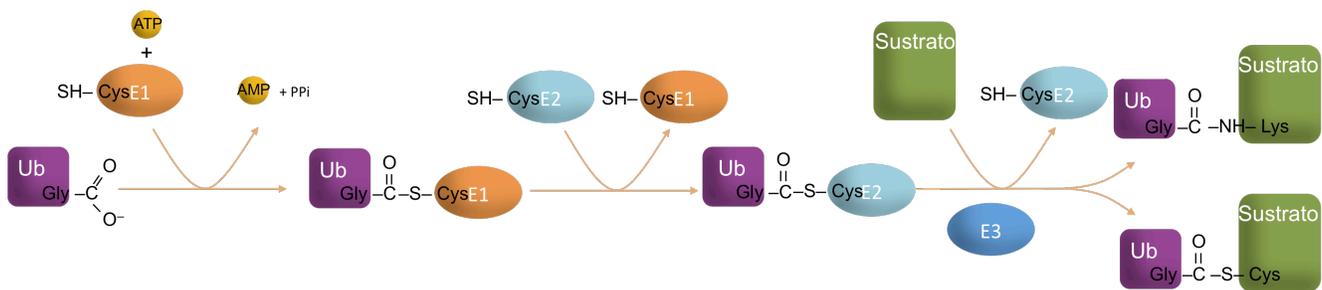


Fig. 3. Reacciones en la cascada de ubiquitinación. Se muestra la formación de sustratos monoubiquitinados mediante enlaces isopeptídico (arriba) y tioéster (abajo).

Para la monoubiquitinación de Pex5, Pex18 y Pex20, que se realiza en cisteínas conservadas, la E2 que participa es Pex4, una peroxina periférica que es anclada a la membrana del organelo por la peroxina membranal Pex22 (Koller *et al.*, 1999) y activada por ella. Se piensa que la activación que proporciona Pex22 se debe a que permite el posicionamiento necesario de Pex4 en relación con el receptor/co-receptor para la ubiquitinación de su cisteína blanco (Williams *et al.*, 2011). A este par de peroxinas se les conoce como complejo de ubiquitinación. En los hongos filamentosos se descubrió un gen ortólogo de Pex4 pero no uno de Pex22. Sin embargo, en estos hongos existe un gen llamado “Pex22-like” que no es un ortólogo de Pex22 pero codifica a una proteína que

posee un dominio transmembranal y un sitio de unión a Pex4 (Kiel *et al.*, 2006), (ver alineamientos en el anexo (Figs. S1 y S2)). En el ascomiceto filamentoso *Colletotrichum orbiculare* se estudió este gen y se demostró que sí corresponde a una proteína funcionalmente equivalente a Pex22 de las levaduras, ya que restaura el fenotipo silvestre en la cepa $\Delta pex22$ de *S. cerevisiae* (Kubo *et al.*, 2015). En *P. anserina* este gen no ha sido estudiado hasta esta investigación y le llamaremos PEX22.

La actividad de ubiquitín-ligasa en las rutas de importación peroxisomal la llevan a cabo las peroxinas del complejo RING-finger que pertenecen a una enorme familia de ligasas-E3 con dominio RING. Dentro del complejo, Pex10 media la interacción entre Pex2 y Pex12; las tres son necesarias para la actividad enzimática ya que solamente en el complejo completo son estables (El Magraoui *et al.*, 2012, Agne *et al.*, 2003), sin embargo, para la monoubiquitinación, las proteínas con actividad predominante son Pex10 y Pex12 (Platta *et al.*, 2009, El Magraoui *et al.*, 2013).

La monoubiquitinación en las cisteínas conservadas de Pex5 y Pex18 o Pex20 provoca que estas proteínas sean exportadas de la membrana peroxisomal hacia el citosol, en una forma dependiente de ATP, por el complejo de dislocación; formado por las proteínas AAA (ATPasas Asociadas a varias Actividades celulares) Pex1 y Pex6 y su proteína de anclaje a la membrana peroxisomal Pex26 (en mamíferos y hongos filamentosos) y Pex15 (en levaduras). Así, los receptores regresan al citosol y se utilizan en rondas de importación posteriores (Fig. 4) (Platta *et al.*, 2008).

Se ha observado que en ausencia del reciclaje dependiente de monoubiquitinación (por falta de funcionamiento del complejo de ubiquitinación o del de dislocación) se lleva a cabo un mecanismo de poliubiquitinación en lisinas conservadas de Pex5, Pex18 y Pex20 que induce la exportación y degradación del receptor y co-receptores por el proteasoma 26S (Kiel *et al.*, 2005, León *et al.*, 2006). Esta poliubiquitinación no depende de Pex4 como E2, sino de Ubc4, pero sí del complejo RING-finger como E3 (El Magraoui *et al.*, 2013, Liu y Subramani, 2013, Platta *et al.*, 2016).

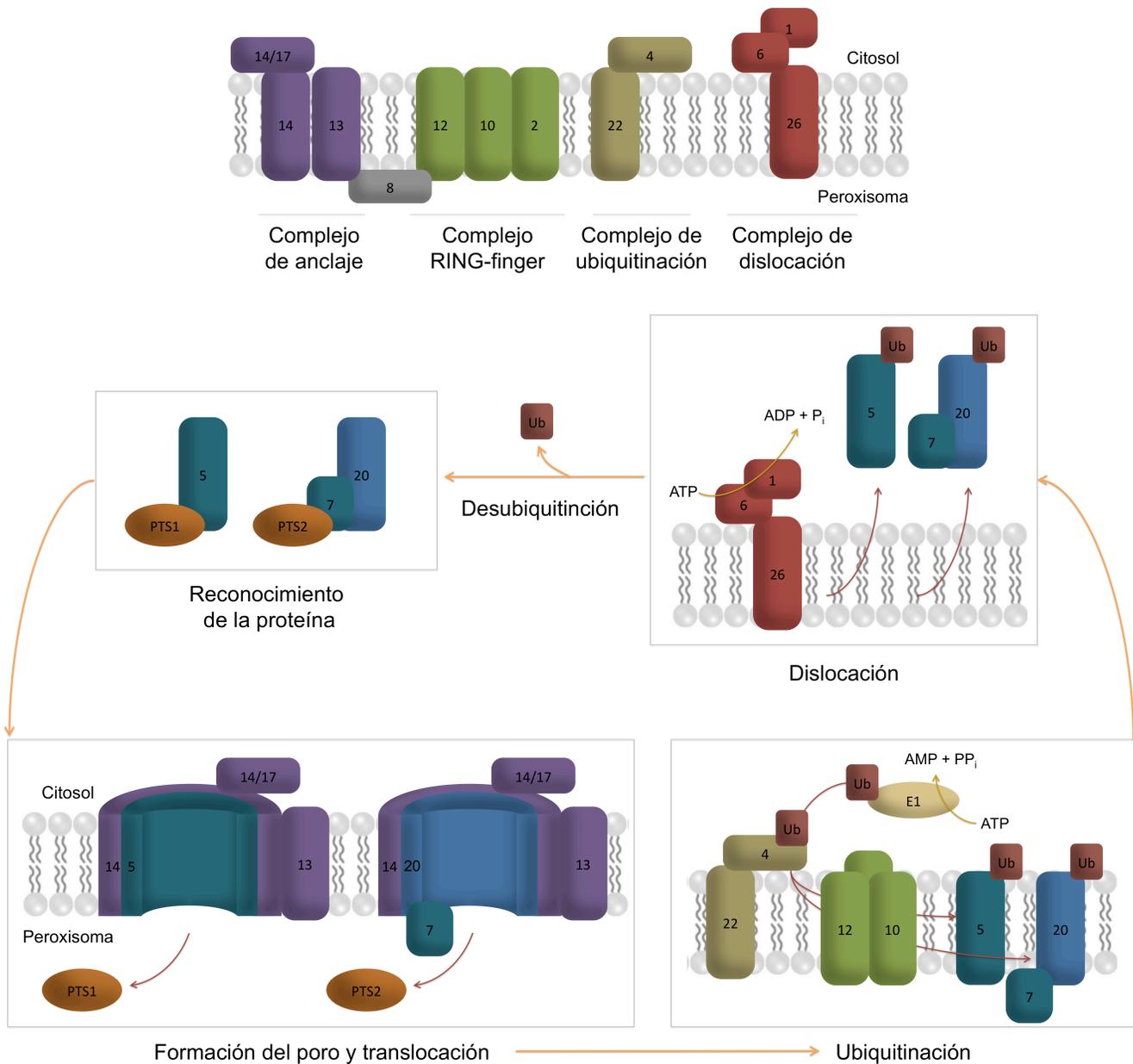


Fig. 4. Rutas de importación peroxisomal PTS1 y PTS2 de *P. anserina*. Arriba se muestran las peroxinas membranales y asociadas, y los complejos de los que son parte. Abajo se muestran los pasos principales de la importación: 1) El reconocimiento en el citosol de las proteínas con PTS por los receptores; 2) la asociación de los receptores/co-receptor con el complejo de anclaje, la formación de los poros, la translocación y la liberación de la proteína a la matriz peroxisomal; 3) la ubiquitinación de PEX5 y PEX20; 4) la dislocación de los mismos y finalmente su desubiquitinación. Sólo se muestra el número de cada peroxina. Ub: ubiquitina.

ANTECEDENTES

Los peroxisomas son organelos muy dinámicos que cambian su función, abundancia, distribución, tamaño y forma durante el desarrollo y bajo ciertos estímulos ambientales y fisiológicos (Takano *et al.*, 2016). En el hongo *P. anserina* se ha encontrado que los peroxisomas juegan un papel fundamental durante el desarrollo sexual, ya que existe una fina regulación de la dinámica del organelo, y porque se ha observado que varias de las proteínas involucradas en la importación peroxisomal son necesarias para la fertilidad del hongo.

El primer descubrimiento que ligó a los peroxisomas con el desarrollo sexual en *P. anserina* fue que la ausencia de PEX2 (anteriormente CAR1) provoca un fenotipo recesivo que consiste en el bloqueo total del desarrollo sexual desde el momento previo a la cariogamia. En las cepas con este fenotipo se observa una formación completa y una morfología normal de los croziers, sin embargo, no se lleva a cabo la cariogamia ni la formación de meiocitos, ni ninguno de los pasos posteriores, y en su lugar hay una proliferación de croziers dicarióticos (Fig. 5) (Simonet y Zickler, 1972). Se sabe que el defecto no se debe a la imposibilidad de la cariogamia misma, ya que la cariogamia en el micelio vegetativo es posible en estas cepas (Berteaux-Lecellier *et al.*, 1995). Se hipotetiza que el fenotipo proviene de un defecto en la inducción de la meiosis, ya que hay cepas mutantes en las que se afecta directamente el reconocimiento nuclear y la cariogamia y aún así son capaces de llevar a cabo meiosis haploide y formación de esporas uniparentales (Zickler *et al.*, 1995).

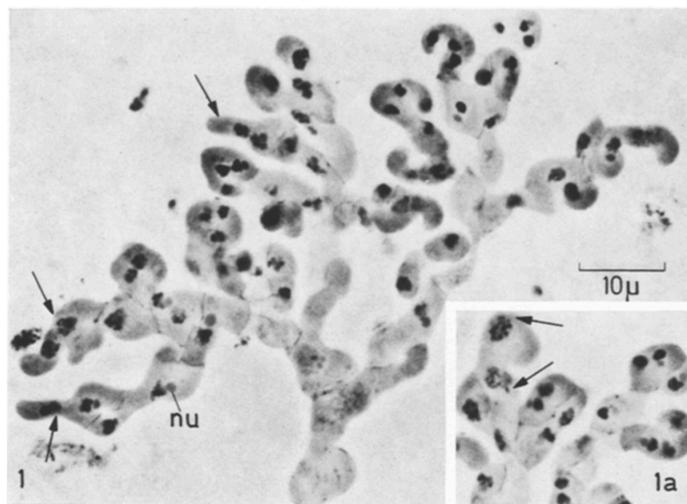


Fig. 5. Fenotipo de la mutante de *pex2*. 1) Micrografía óptica en la que se observa la proliferación de croziers en lugar de la formación de meiocitos, las flechas apuntan a las células apicales. 1a) Las flechas apuntan a dos núcleos en profase mitótica. nu: nucleolo. Tomado de Simonet y Zickler, 1972.

Las proteínas de *P. anserina*, conocidas hasta este momento, cuya ausencia provoca la interrupción del desarrollo sexual en la etapa dicariótica, son PEX3 y PEX19, las peroxinas del complejo RING-finger, PEX13 del complejo de anclaje y el co-receptor PEX20. El hecho de que estas proteínas sean necesarias para la biogénesis de los peroxisomas o pertenezcan a las rutas de importación peroxisomal sugiere que la meiosis de *P. anserina* requiere de la importación de alguna proteína a la matriz peroxisomal. Sin embargo, una ruta de importación necesitaría de un receptor, y la ausencia de los receptores conocidos, PEX5 y PEX7, no generan el bloqueo del desarrollo sexual. La proteína conocida que podría cumplir con la función de receptor es PEX20, ya que comparte características con Pex5, tanto estructurales (Einwächter *et al.*, 2001) como en el hecho de que su actividad está regulada por ubiquitinación (Léon *et al.*, 2006). Con esto se ha llegado a la formulación de la hipótesis de que PEX20 es el receptor de al menos una proteína cuya importación a la matriz peroxisomal permite la inducción de la meiosis de *P. anserina*. Esta vía de importación utilizaría a PEX13 en la formación del poro transitorio, pero no a PEX14 y PEX14/17; y estaría regulada por la ubiquitinación en una forma dependiente del complejo RING-finger (Peraza-Reyes *et al.*, 2011).

En *P. anserina* no se han estudiado los componentes de los complejos de ubiquitinación y dislocación ni PEX8. En el presente trabajo estudiamos a los genes que presuntamente codifican a PEX4 y PEX22 de *P. anserina* para ampliar nuestro conocimiento sobre los componentes necesarios en una ruta de importación peroxisomal funcional y para conocer su relevancia durante el desarrollo sexual. Con este estudio buscamos apoyar la hipótesis de la existencia de una nueva ruta de importación peroxisomal regulada por la ubiquitinación del receptor, de la cual depende el desarrollo sexual de *P. anserina*.

HIPÓTESIS

Las proteínas PEX4 y PEX22 de *P. anserina* componen el complejo de ubiquitinación peroxisomal, el cual participa en las rutas de importación de proteínas de matriz peroxisomal y es necesario para la iniciación de la meiosis en este hongo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Definir la función de PEX4 y PEX22 en la biogénesis de los peroxisomas y en el desarrollo sexual de *P. anserina*.

Objetivos particulares

Estudiar el fenotipo de las mutantes $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ en la formación de la membrana peroxisomal, la inserción de proteínas membranales y la importación de proteínas a la matriz peroxisomal.

Analizar el fenotipo de las mutantes $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ durante la fase vegetativa y el desarrollo sexual de *P. anserina*.

MATERIALES y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *P. anserina* utilizadas en este estudio provienen de la cepa silvestre "S" (Espagne *et al.*, 2008). La cepa $\Delta ku70$ (El-Khoury *et al.*, 2008) fue provista por Robert Debuchy (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette, Francia). Las cepas silvestres que expresan GFP-PTS1 y PTS2-GFP y la cepa $\Delta pex5$ (Bonnet *et al.*, 2006) fueron provistas por Véronique Berteaux-Lecellier (CRIOBE, CNRS, Polinesia Francesa). Las cepas $\Delta pex10$ y la que expresa GFP-PEX2 fueron generadas en un estudio previo (Peraza-Reyes *et al.*, 2008). La cepa $\Delta pex4$ y las que expresan FOX2-mCherry y PEX14-GFP fueron generadas por Fernando Suaste Olmos en nuestro laboratorio (Suaste-Olmos *et al.*, 2018). La cepa $\Delta pex22$ fue generada en este estudio.

La composición de los medios de cultivo se menciona en el anexo. Las colonias se sembraron, a partir de explantes de colonias previas, en placas Petri con medio M2 (medio estándar con dextrina como fuente de carbono), MM (M2 para microscopía) o AO (medio con ácido oleico como fuente de carbono), según el experimento, y crecieron durante 24 o 48 horas a 27 °C en oscuridad y 80% de humedad. Los cultivos son almacenados temporalmente a 4 °C y para reservas a largo plazo a -80 °C en medio RG líquido (medio con sacarosa como estabilizador osmótico). Para realizar cruza sexuales se colocaron explantes de las dos cepas deseadas, de tipo sexual opuesto, en medio M2 y se dejaron crecer durante 4 días con iluminación, para fertilizar se colocaron 2 ml de agua estéril esparcida sobre el medio, 3 días después se colocó sobre el medio una placa Petri invertida con medio MA en el que se colectaron las ascosporas expulsadas, posteriormente se seleccionaron y se recuperaron en medio G adicionado con extracto de levadura (GYE) para su germinación. Para rastrear los marcadores de selección y así obtener cepas con el genotipo deseado, las colonias provenientes de esporas aisladas se replicaron en medios M2 con antibióticos añadidos: fleomicina (25 µg/ml), geneticina (G418 sulfato, 100 µg/ml), nourseotricina (40 µg/ml) o higromicina B (75 µg/ml para construcciones derivadas de pBC-Hygro, o 30 µg/ml para construcciones derivadas de pUCHygro).

Para formar protoplastos el micelio se cultivó en M2 líquido con extracto de levadura (M2YE). Después de la transformación los protoplastos se regeneraron, dando lugar a las cepas transformantes primarias, en medio RG con el antibiótico correspondiente añadido (véanse concentraciones anteriores). Los métodos de estudio de *P. anserina* están descritos en el sitio <http://podospora.igmors.u-psud.fr>.

Secuencias genéticas

Las secuencias genéticas de *PEX4* (Pa_1_9240) y *PEX22* (Pa_6_4620) se obtuvieron de la secuencia del genoma de *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr>) y las secuencias de las proteínas de la base de datos del GeneBank con los números de acceso CDP23277.1 y CDP30493.1, respectivamente.

Extracción de DNA genómico, formación de protoplastos y transformación

Para aislar DNA genómico de *P. anserina* se puso a crecer a la cepa de interés en una hoja de celofán sobre M2, el micelio se cosechó raspándolo del celofán con una espátula, se liofilizó y se pulverizó para realizar la extracción de DNA con fenol-cloroformo de acuerdo con el método descrito en Coppin-Raynal *et al.* (1989).

Los protoplastos se generaron, a partir de micelio cultivado en M2YE de cada cepa a transformar, por digestión con enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y la transformación se realizó con polietilenglicol mediante el método descrito en Brygoo y Debuchy (1985).

Deleciones genéticas, plásmidos y oligonucleótidos

Las deleciones genéticas se generaron mediante el reemplazo del marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés por un gen marcador de selección que confiere resistencia a un antibiótico en particular. El reemplazo se dio por recombinación homóloga en los sitios que flanquean al ORF. *PEX4* fue reemplazado por el gen *hph* de *Escherichia coli*, que se obtuvo por PCR del plásmido pBC-Hygro, provisto por Philippe Silar (Universidad París Diderot, París, Francia). *PEX22* fue reemplazado por *nat1* de *Streptomyces noursei* que se obtuvo por PCR del plásmido pAPI509 (derivado de pAPI508; El-Khoury *et al.*, 2008) y fue provisto, al igual que el plásmido pSM334-Geneticin para realizar las complementaciones genéticas, por Robert Debuchy (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette, Francia). Los casetes para el reemplazo genético se generaron por PCR de doble unión (Kuwayama *et al.*, 2002) y consistieron en el gen marcador de selección flanqueado por ≈ 700 pb de las secuencias flanqueantes 5' y 3' del ORF correspondiente, obtenidas por PCR del DNA genómico de la cepa silvestre de *P. anserina*. Los productos finales de las PCR de fusión fueron purificados a partir de geles de agarosa y usados directamente para transformar protoplastos de la cepa $\Delta ku70$, cepa utilizada para realizar transformaciones de *P. anserina* ya que en ella se favorece la recombinación homóloga (El-Khoury *et al.*, 2008). Con las transformantes obtenidas se realizaron cruza

sexuales con la cepa silvestre y así las deleciones genéticas fueron recuperadas en el fondo genético *KU70+* en cepas homocarióticas de cada uno de los tipos sexuales. Se verificó con PCR que los reemplazos genéticos se hubieran efectuado correctamente; que el gen marcador de selección esté presente en el locus adecuado y que no exista el ORF original. Todos los oligonucleótidos utilizados se enlistan en el anexo.

Complementación genética

Para complementar genéticamente las cepas con deleciones se les introdujo ectópicamente (EC) una copia silvestre del gen ausente. *PEX4* provino del plásmido GA0AA328DB09 (librería de DNA genómico de *P. anserina*, Genoscope, Francia), el fragmento de DNA que contiene el gen *PEX22* provino de una PCR en la que se usó DNA genómico como molde. El plásmido o producto de PCR, que contiene el gen de interés, fue utilizado directamente para cotransformar con el vector pSM334_Genticin la cepa mutante que expresa FOX2-mCherry. Las transformantes resistentes a geneticina fueron analizadas con respecto a la importación de FOX2-mCherry y el desarrollo sexual.

Citología

Las células del ciclo sexual fueron fijadas en paraformaldehído 7.4% y los núcleos teñidos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato, Molecular Probes, Eugene, OR) (0.5 µg/ml), como se describe en Thompson-Coffe y Zickler (1994). Las micrografías de células vivas fueron obtenidas a partir de colonias individuales de la cepa de interés crecidas durante 24 horas en MM en placas Petri (Takano-Rojas *et al.*, 2016). Para analizar la importación peroxisomal de proteínas en micelio se obtuvieron cepas homocarióticas con el fondo genético de interés y la expresión de las proteínas fluorescentes necesarias según el experimento, para esto se realizaron cruzas de la cepa de interés con cepas que expresan las proteínas; FOX2-mCherry, PEX14-GFP, GFP-PEX2 y GFP-PTS1 (GFP fusionada en el extremo C-terminal al tripéptido SKL; Ruprich-Robert *et al.*, 2002) y de la descendencia se seleccionaron las cepas buscadas. Para analizar la importación peroxisomal de proteínas en esporas se realizaron cruzas de las cepas de interés con la cepa silvestre que expresa PTS2-GFP (GFP fusionada en el extremo N-terminal a la secuencia PTS2 de la tiolasa peroxisomal de *P. anserina*; Bonnet *et al.*, 2006); las esporas se observaron tres días después de la fertilización.

Microscopía

Las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse E600 con una cámara Neo Andors CMOS refrigerada, con un microscopio láser confocal Zeiss LSM-800 usando un objetivo de inmersión Plan-Apocromático 63x/1.4 y láseres de 405, 488 y 561 nm y con un microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de inmersión en agua 63x y láseres de 488 nm (Argón) y 543 nm (Helio/Neón). Para la microscopía confocal de células vivas las imágenes de todos los canales fueron tomadas simultáneamente. Las imágenes de proyecciones de máxima intensidad de células fijadas fueron generadas a partir de imágenes de secciones-z tomadas con microscopía confocal a intervalos de 0.43 μm a lo ancho de todo el volumen celular.

Las imágenes fueron procesadas utilizando el paquete FIJI (Schindelin *et al.*, 2012) para ImageJ (Schneider *et al.*, 2012)(NIH, Bethesda, EUA) o el programa ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El análisis de abundancia de peroxisomas se realizó en imágenes de microscopía confocal del plano medio de hifas en crecimiento (15 hifas de al menos 3 colonias independientes por cepa), en las que usando el programa ZEN 2012 se contó el número de peroxisomas de tres regiones consecutivas de 140 μm de largo a partir de la punta, se calculó el área de la hifa en cada región y con ella la cantidad de peroxisomas por μm^2 . Los valores P se calcularon utilizando pruebas de t de Student de dos colas de dos muestras independientes.

RESULTADOS

Creación y verificación de la cepa $\Delta pex22$ de *P. anserina*

Con el fin de estudiar la función de la proteína PEX22 de *P. anserina* creamos una cepa mutante con la delección del gen que presuntamente la codifica. El gen *PEX22* fue sustituido por el gen *NAT1*, que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina. Para esto construimos un casete génico con el gen *NAT1* y las secuencias que flanquean a *PEX22* en los extremos 5' y 3' (Fig. 6). Este casete lo introdujimos en protoplastos de la cepa $\Delta ku70$ MAT + de *P. anserina*, en la que se favorece la recombinación homóloga (El-Khoury *et al.*, 2008), y recuperamos colonias resistentes a nourseotricina, en las que el casete se introdujo por recombinación homóloga incorporando el gen *NAT1* en el locus de *PEX22*.

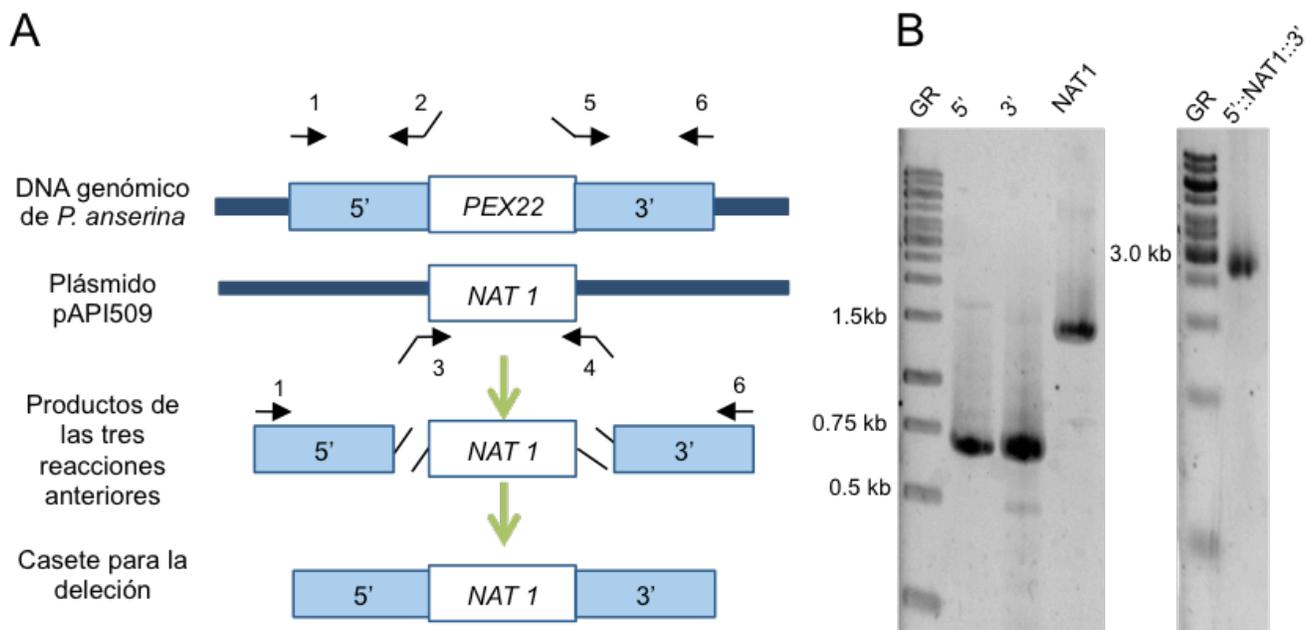


Fig. 6. Construcción del casete para la delección de *PEX22*. A) Esquema con los pasos que se siguieron para realizar la construcción: tres reacciones iniciales (con los oligonucleótidos representados por flechas, los números indican los nombres que aparecen en el anexo), con las que se obtuvieron los productos 5' (682 pb), 3' (683 pb) y *NAT1* (1,468 pb), que fueron purificados y utilizados en una PCR de doble unión que produjo el casete completo (2,833pb). B) Geles de electroforesis (agarosa 0.3 %) con los productos de las 4 PCR. Marcador de peso molecular *Gene Ruler* 1kb (GR).

A partir de una de las colonias transformantes resistentes a nourseotricina, mediante una cruce sexual con la cepa silvestre, adquirimos cepas homocarióticas $\Delta pex22$ de cada tipo sexual sin la mutación de $\Delta ku70$. Extrajimos DNA de estas cepas y de la silvestre para realizar PCRs con las que confirmamos que la delección se dio correctamente (Fig. 7).

Para estudiar al complejo de ubiquitinación en su totalidad, además de la cepa $\Delta pex22$ generada para este estudio, utilizamos la cepa $\Delta pex4$ que fue creada y verificada por el Dr. Fernando Suaste Olmos (verificación por PCR en Fig. S3 en el anexo).

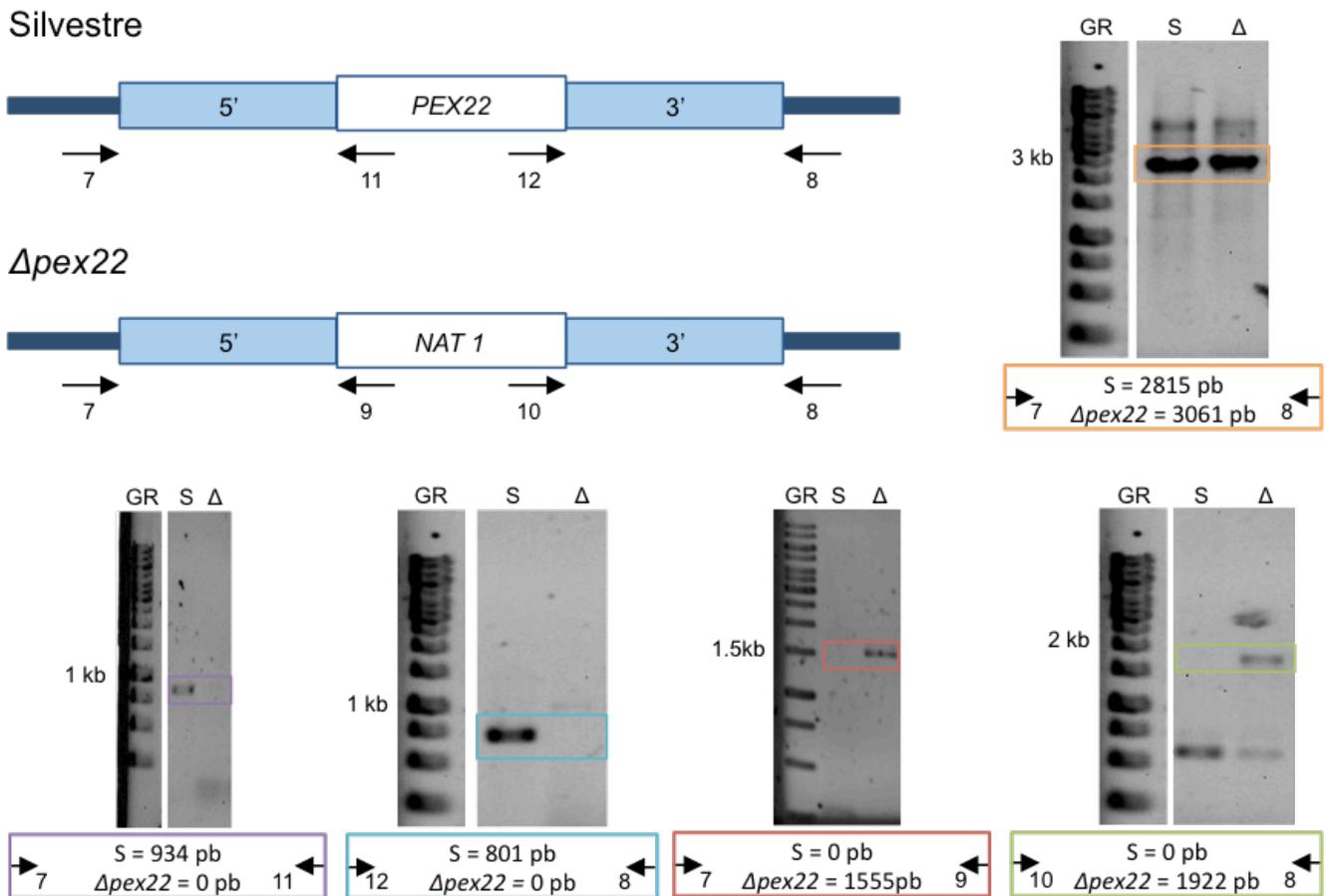


Fig. 7. Verificación de la delección de *PEX22* por PCR. Se muestran esquemas del DNA (locus: Pa_6_4620) de la cepa silvestre (S) y de la cepa $\Delta pex22$ (Δ) con los sitios donde se hibridan los oligonucleótidos utilizados (representados por flechas, los números indican los nombres que aparecen en el anexo). Se muestran geles de electroforesis (agarosa 0.3 %) con los productos de PCR de las 5 reacciones que se realizaron, debajo de ellos se indican los oligonucleótidos que se utilizaron y los pesos moleculares predichos de los productos obtenidos. El marcador de peso molecular es *Gene Ruler* 1kb (GR).

PEX4 y PEX22 se requieren para la utilización de ácidos grasos y la formación de micelio aéreo

Para conocer si PEX4 y PEX22 tienen función de factores de biogénesis peroxisomal lo primero que investigamos fue la capacidad de utilizar ácidos grasos como fuente de carbono en las cepas que carecen de estas proteínas. Encontramos que, al igual que las mutantes que carecen de otras peroxinas (Peraza-Reyes *et al.*, 2008, Peraza-Reyes *et al.*, 2011), las cepas $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ son incapaces de crecer en medio con ácido oleico como única fuente de carbono. Esto es consistente con el hecho de que sus peroxisomas no sean totalmente funcionales. Otro rasgo que encontramos en $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ fue la falta de micelio aéreo cuando crecen en medio estándar que tiene dextrina como única fuente de carbono (Fig. 8).

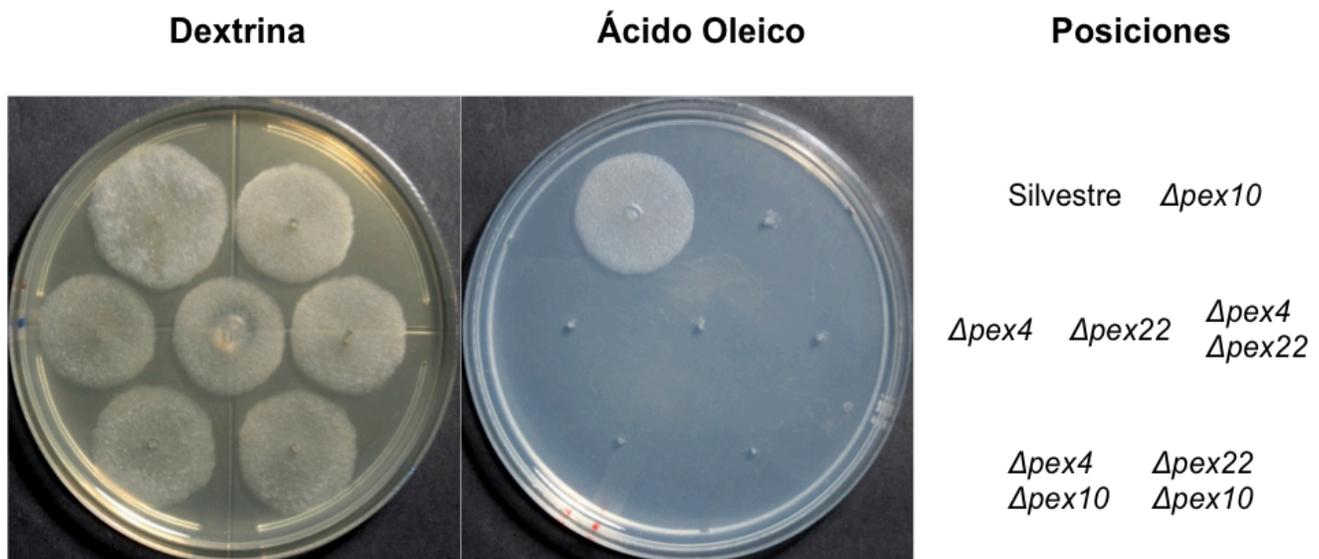


Fig. 8. Crecimiento de las cepas. Crecimiento de las cepas tras 48 horas de incubación en medios con dextrina o ácido oleico como única fuente de carbono. A la derecha se indican los genotipos de las cepas en la posición correspondiente. Se muestra que en dextrina las cepas con ausencia de una o más peroxinas presentan menos micelio aéreo que la cepa silvestre y son incapaces de crecer cuando su única fuente de carbono es un ácido graso de cadena muy larga. Se muestra el crecimiento de las cepas mencionadas en el texto anterior y de cepas que se presentarán más adelante.

La ausencia de PEX4 y PEX22 no afecta la formación de las membranas peroxisomales

Para estudiar el papel del PEX4 y PEX22 en la biogénesis de los peroxisomas, primero buscamos si se requieren para la formación de las membranas peroxisomales y la inserción de sus proteínas membranales. Para esto observamos la localización de una proteína integral de membrana peroxisomal: PEX14 (fusionadas a la proteína fluorescente GFP). Observamos que en las cepas carentes de PEX4 o PEX22, al igual que en la cepa silvestre, PEX14-GFP (Fig. 9) se localiza en puntos distribuidos a lo largo de las hifas con el patrón con el que se ha descrito a los peroxisomas de *P. anserina* en condiciones estándar (Takano-Rojas *et al.*, 2016) y a los remanentes peroxisomales en cepas afectadas en la importación de proteínas de matriz (Peraza-Reyes *et al.*, 2011). Esto significa que la formación de las membranas peroxisomales y la inserción de sus proteínas membranales, al menos PEX14, no son afectadas por la ausencia de PEX4 ni de PEX22.

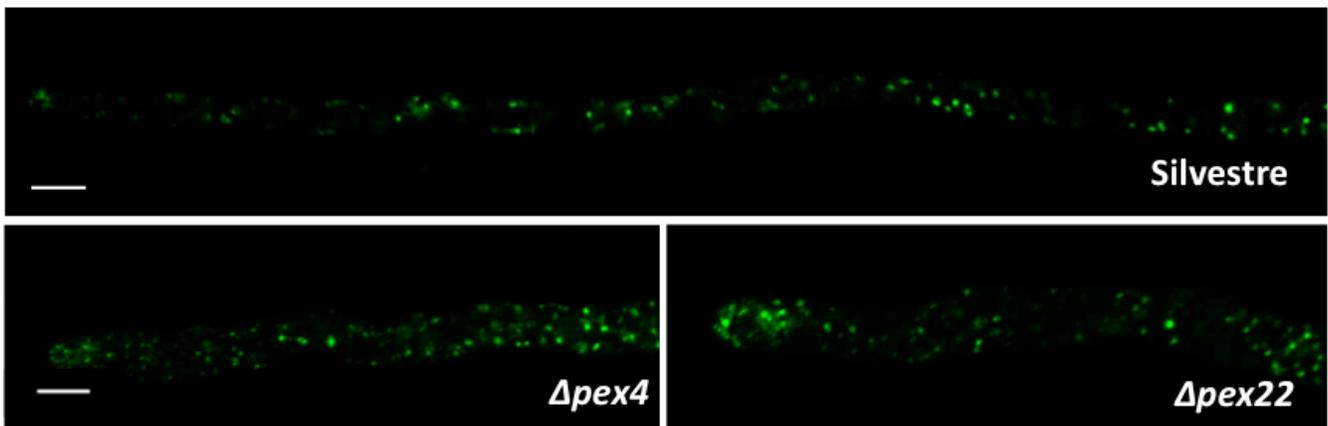


Fig. 9. Localización de PEX14-GFP en hifas de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Colonias de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ que expresan la proteína PEX14-GFP crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía confocal. En las tres cepas PEX14-GFP se localiza en puntos distribuidos a lo largo de las hifas, lo que coincide con un patrón peroxisomal. Barras de escala: 5 μm , la barra en la imagen de $\Delta pex4$ corresponde también a la de $\Delta pex22$.

PEX4 y PEX22 se requieren en la importación de proteínas de matriz peroxisomal

Posteriormente buscamos si PEX4 y PEX22 se necesitan para la importación de proteínas de matriz peroxisomal. Para esto primero observamos la localización de PTS2-GFP (una proteína fluorescente fusionada a la PTS2) en las ascosporas provenientes de cruzas heterocigas entre la cepa silvestre, que expresa la proteína mencionada, y una de las cepas mutantes. En una cruzada realizada de esta manera, el gen de PTS2-GFP y los loci mutados de *PEX4* o *PEX22* pueden distribuirse de varias maneras en las ascosporas. Para realizar este análisis escogimos ascas en las cuales las 4 ascosporas expresaran PTS2-GFP y solamente 2 de ellas tuvieran genotipo mutante. En estas ascas encontramos dos esporas con genotipo silvestre (en ambos núcleos) y dos esporas con genotipo mutante (en ambos núcleos), en las primeras observamos que la PTS2-GFP es introducida a los peroxisomas y en las segundas observamos que se localiza en el citosol (Fig. 10). Esto indica que en ausencia de cualquiera de las dos proteínas de estudio se abate la importación mediada por PEX7/PEX20.

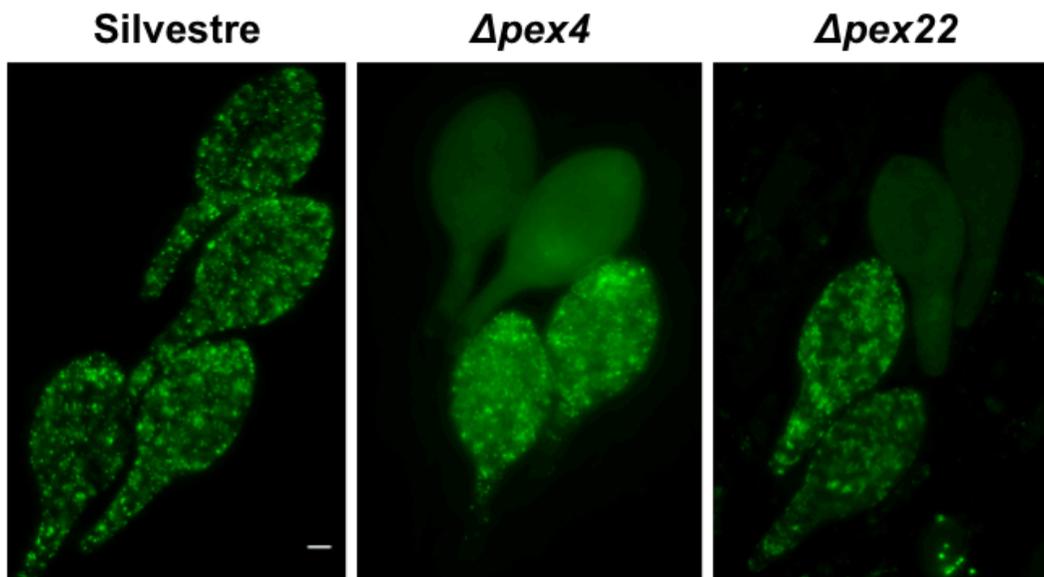


Fig. 10. Localización de PTS2-GFP en ascosporas. Se realizaron cruzas de una cepa silvestre que expresa la proteína reportera PTS2-GFP con las cepas silvestre, *Δpex4* y *Δpex22*, después de tres días desde la fertilización se observó el himenio con microscopía de fluorescencia. En la cruzada silvestre se observan las cuatro ascosporas de un asca con importación peroxisomal de PTS2-GFP. En las cruzas heterocigas se observan dos esporas (abajo), que recibieron los núcleos silvestres, con la proteína en los peroxisomas y otras dos esporas (arriba), que recibieron los núcleos mutantes, con la proteína en el citosol. Barra de escala: 5 μ m.

Posteriormente investigamos la localización de dos proteínas que son importadas por PEX5; FOX2 fusionada a la proteína fluorescente mCherry y GFP-PTS1, proteína fluorescente exógena fusionada a la PTS1. Para esto primero corroboramos que la localización peroxisomal de FOX2 requiere de PEX5 como receptor (Fig. 11), ya que anteriormente no se había investigado la localización de esta proteína en el micelio de *P. anserina* (Bonnet *et al.*, 2006). Habiendo confirmado esto, observamos la ubicación de FOX2-mCherry y GFP-PTS1 en el micelio de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Las hifas de la cepa silvestre presentan ambas proteínas localizadas por completo en puntos discretos, iguales a los observados con PEX14-GFP y PTS2-GFP. Por el contrario, en ausencia de PEX4 o PEX22 la GFP-PTS1 se ubica únicamente en el citosol, mientras que FOX2-mCherry se encuentra tanto en el citosol como en puntos similares a los que se observan en la cepa silvestre (Fig. 12).

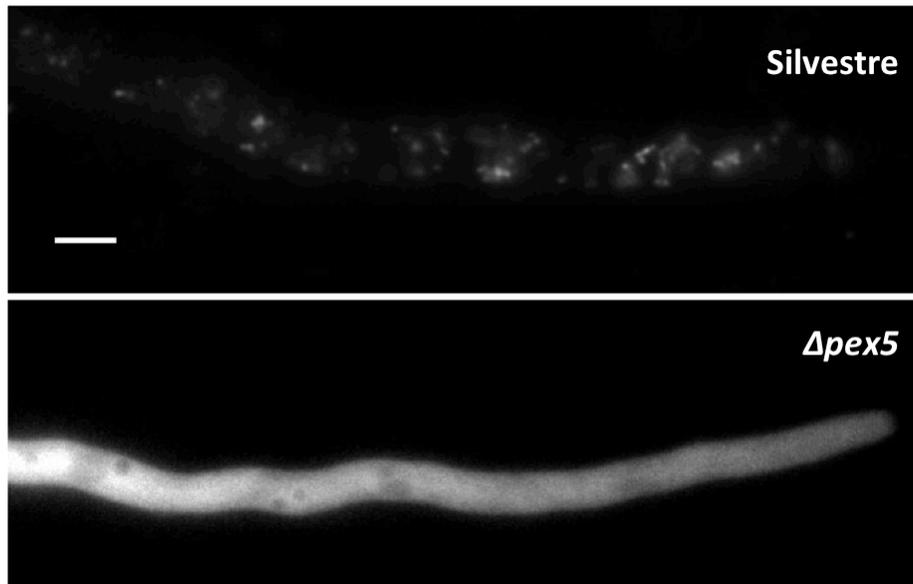


Fig. 11. Localización de FOX2-mCherry en el micelio de la cepa silvestre y $\Delta pex5$. Colonias de las cepas silvestre y $\Delta pex5$ que expresan la proteína FOX2-mCherry crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía de fluorescencia. Se muestra que en la cepa silvestre esta proteína se localiza en los peroxisomas mientras que en ausencia de PEX5 se localiza en el citosol, lo que indica que el receptor PEX5 es necesario para su importación. Barra de escala: 5 μ m.

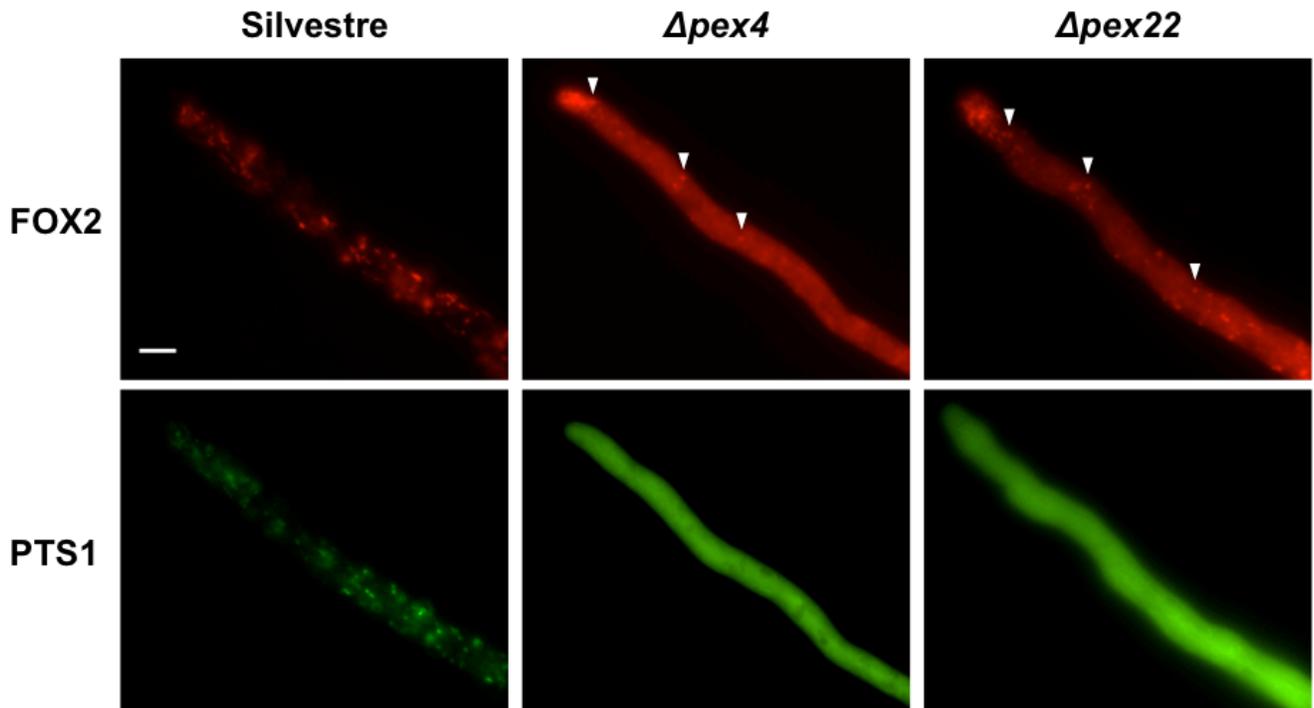


Fig. 12. Localización de GFP-PTS1 y FOX2-mCherry en micelio de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Colonias de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ que expresan las proteínas de fusión GFP-PTS1 y FOX2-mCherry crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía de fluorescencia. En la cepa silvestre la localización de ambas proteínas es peroxisomal, mientras que en las cepas mutantes la GFP-PTS1 es citosólica y FOX2-mCherry es parcialmente citosólica y parcialmente se localiza en puntos (puntas de flecha). Barra de escala: 5 μ m.

Para saber si los puntos en los que se encuentra ubicada FOX2-mCherry en las cepas mutantes son peroxisomas u otras estructuras celulares observamos con microscopía confocal micelio de cepas $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ que expresan FOX2-mCherry y PEX14-GFP, y analizamos si hay colocalización en la fluorescencia de estas proteínas. En las mutantes encontramos que todos los puntos que se observan con FOX2-mCherry también tienen PEX14-GFP y por lo tanto son peroxisomas, pero también observamos que en las cepas mutantes y en la silvestre no todos los peroxisomas, detectables con PEX14-GFP, tienen FOX2-mCherry (Fig. 13). Esto lo corroboramos marcando a los peroxisomas con una segunda proteína de membrana peroxisomal, GFP-PEX2, en la cepa silvestre y $\Delta pex22$, los resultados fueron los mismos que con PEX14-GFP (Fig. 14). Lo que en algunas imágenes se observa como acumulaciones de peroxisomas en la punta de las hifas no es un fenómeno representativo de las cepas mutantes y también lo hemos observado en la cepa silvestre.

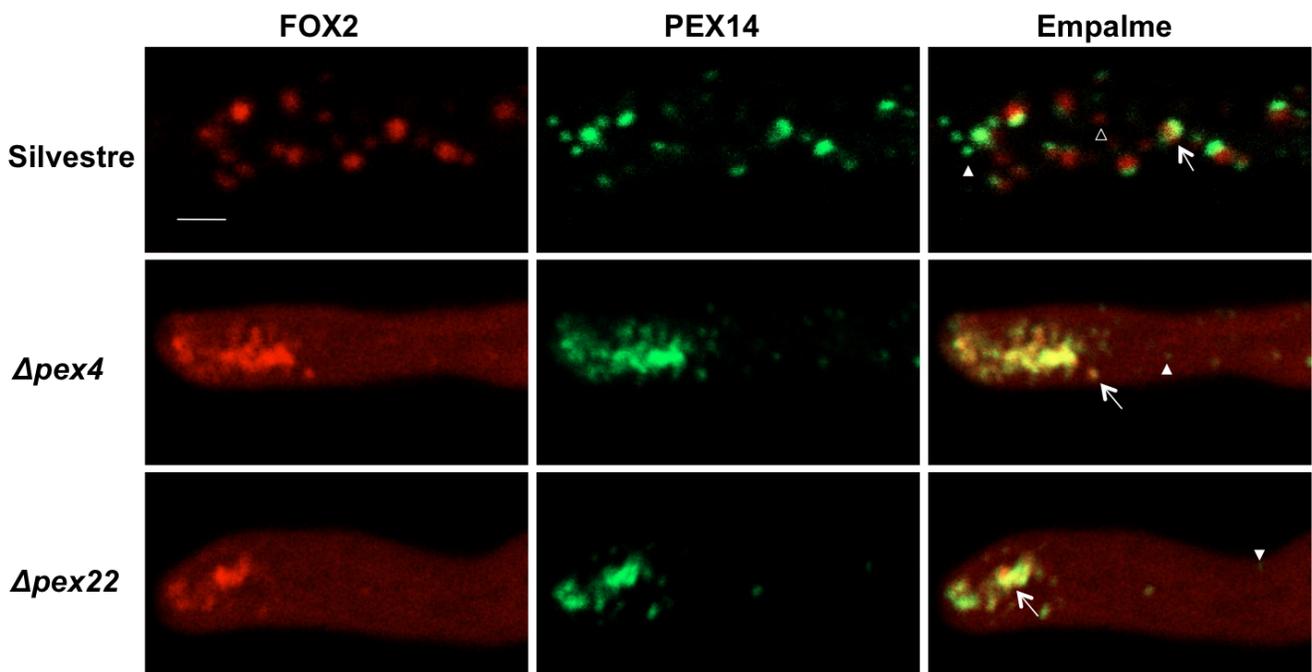


Fig. 13. Localización de FOX2-mCherry y PEX14-GFP en micelio de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Colonias de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ que expresan las proteínas de fusión PEX14-GFP y FOX2-mCherry crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía confocal. Se observa que los puntos en los que se encuentra FOX2-mCherry también contienen a PEX14-GFP (flecha) (con algunas excepciones en la cepa silvestre (punta de flecha vacía)), sin embargo, se aprecia que algunos de los peroxisomas, con PEX14-GFP, no contienen a FOX2-mCherry (punta de flecha blanca). Barra de escala: 2 μ m.

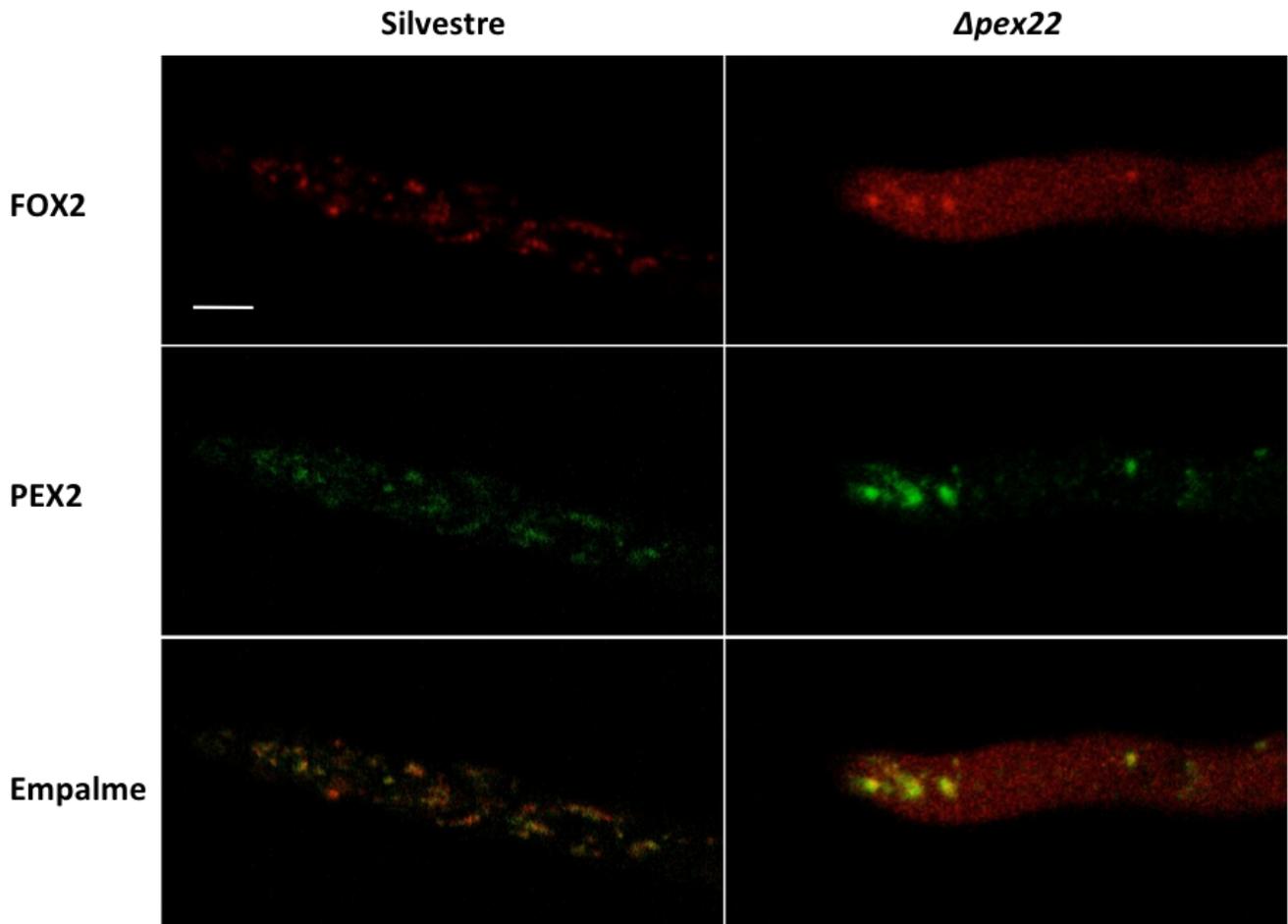


Fig. 14. Localización de GFP-PEX2 y FOX2-mCherry en micelio de las cepas silvestre y $\Delta pex22$. Colonias de las cepas silvestre y $\Delta pex22$ que expresan las proteínas de fusión GFP-PEX2 y FOX2-mCherry crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía confocal. En la cepa silvestre se logra identificar a los peroxisomas con ambas proteínas y en la cepa mutante se observó, al igual que con PEX14-GFP, que los puntos que se ven con FOX2-mCherry también se ven con GFP-PEX2, pero no todos los puntos con GFP-PEX2 tienen FOX2-mCherry. Barra de escala: 5 μ m.

Además notamos que la abundancia de los peroxisomas que tienen FOX2-mCherry es mayor en la parte apical de las hifas (los primeros 140 μm desde la punta), que en el siguiente segmento (140 μm a 280 μm), y mayor en éste que en el siguiente (280 μm a 420 μm) en las cepas mutantes (Fig. 15). En la cepa silvestre es muy claro que los peroxisomas con FOX2-mCherry se distribuyen a lo largo de toda la hifa. Nuestros datos sugieren que esta distribución de los peroxisomas con FOX2-mCherry no se debe a una localización alterada de los peroxisomas en las cepas mutantes, ya que la distribución de los peroxisomas con PEX14-GFP no presenta este patrón y es más homogénea (Fig. 16).

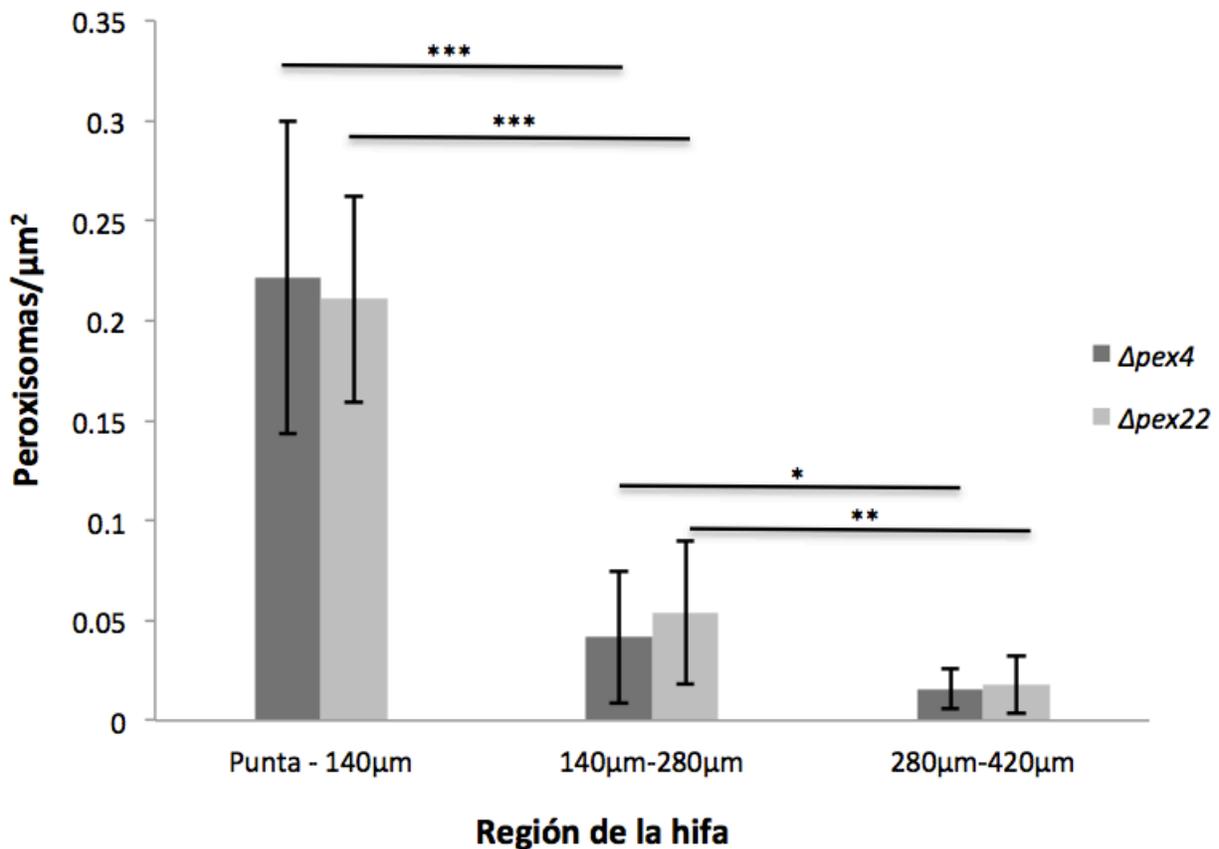


Fig. 15. Cuantificación de los peroxisomas con FOX2-mCherry a lo largo de las hifas de $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Se realizó la cuantificación de los peroxisomas en imágenes de microscopía confocal del plano medio de 3 segmentos consecutivos de 140 μm de largo en hifas de colonias crecidas en MM por 24 horas de las cepas $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Se midió el área de la hifa en cada segmento y se calculó la cantidad de peroxisomas por μm^2 , se realizó una prueba de *t* de Student de dos muestras independientes y se encontró una diferencia significativa entre el primer segmento y el segundo en $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ ($***p < 0.0001$) y entre el segundo y el tercero en $\Delta pex22$ ($**p < 0.0019$) y $\Delta pex4$ ($*p < 0.01$). En el histograma los valores que se muestran son el promedio \pm desviación estándar, $n=15$.

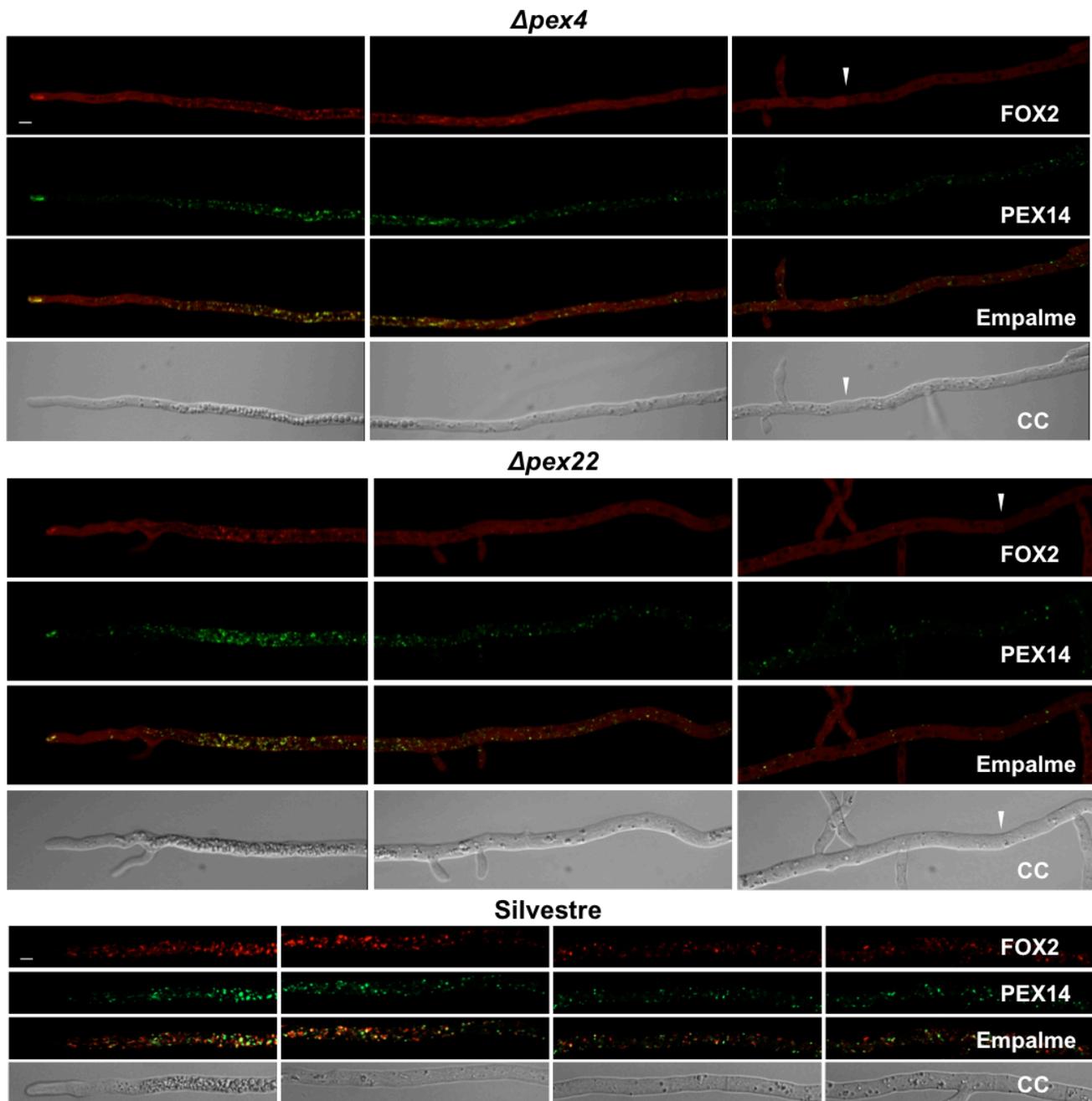


Fig. 16. Localización de FOX2-mCherry y PEX14-GFP a lo largo de las hifas de cepas silvestre, *Δpex4* y *Δpex22*. Colonias de las cepas silvestre, *Δpex4* y *Δpex22* que expresan FOX2-mCherry y PEX14-GFP crecieron en MM durante 24 horas y fueron observadas con microscopía confocal. Se observa que en las cepas mutantes los peroxisomas con FOX2-mCherry son más abundantes en la punta de las hifas que en los segmentos distales mientras que los peroxisomas que tienen PEX14-GFP se distribuyen a lo largo de toda la hifa y que en las cepas mutantes hay un septo a partir del cual disminuye la intensidad de la fluorescencia citosólica (punta de flecha). Barras de escala: 5 μ m.

Posteriormente observamos la localización de las proteínas importadas por PEX5 en células sexuales (solo en los croziers ya que el fenotipo en el desarrollo sexual de las mutantes impide que se observen las etapas posteriores, ver más adelante). Encontramos que en los croziers de cruza homóciga de la cepa mutante $\Delta pex22$ también hay una importación parcial de FOX2-mCherry (99.3 % de los croziers analizados, n=152) y una importación casi nula de GFP-PTS1 (5.9 %) (Fig. 17).

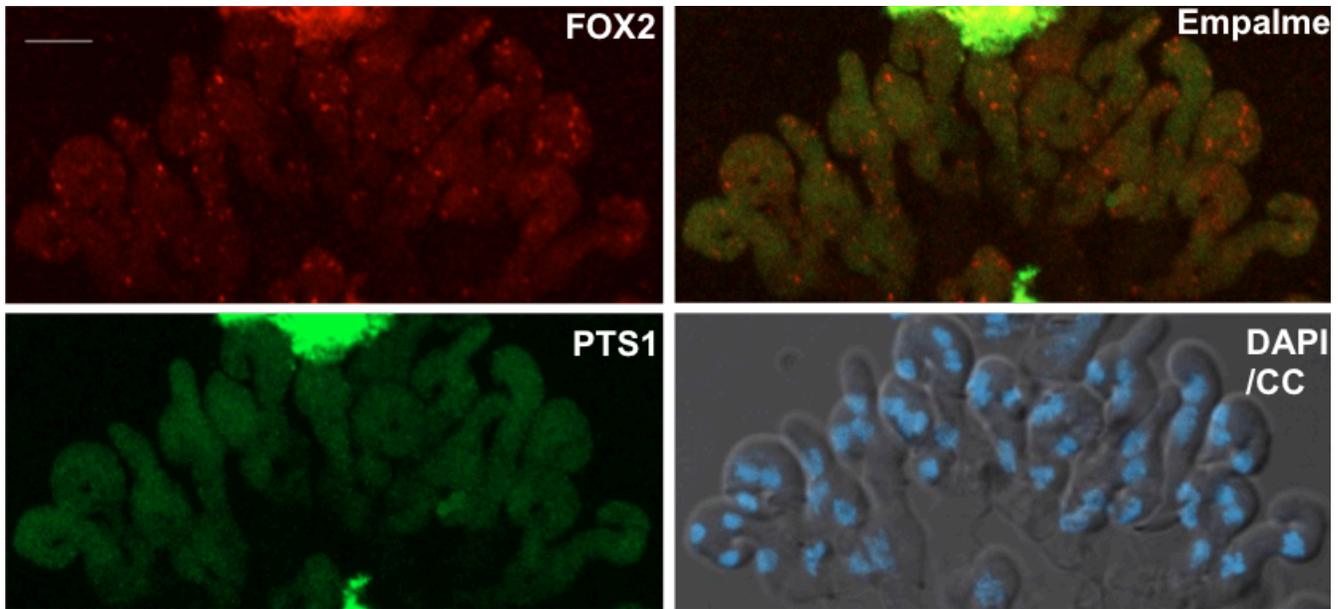


Fig. 17. Localización de FOX2-mCherry y GFP-PTS1 en los croziers de una cruza homóciga de $\Delta pex22$. Se muestran proyecciones de máxima intensidad de imágenes de microscopía confocal de croziers fijados obtenidos de una cruza homóciga entre cepas $\Delta pex22$ que expresan FOX2-mCherry y GFP-PTS1. FOX2-mCherry es peroxisomal y citosólica y GFP-PTS1 sólo citosólica. A la derecha se tienen imágenes empalmadas de FOX2-mCherry con GFP-PTS1 y de la tinción de DAPI con el campo claro (CC). Barra de escala: 5 μ m.

Sabemos que el complejo RING-finger, compuesto por Pex2, Pex10 y Pex12, actúa en más cascadas de ubiquitinación además de la que es dependiente de Pex4/Pex22. Por lo tanto, para saber si algún otro mecanismo de ubiquitinación, en el que podría participar el complejo RING-finger, está permitiendo que se importe FOX2-mCherry a algunos peroxisomas en las cepas $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$, observamos la localización de esta proteína en la cepa $\Delta pex10$ y en las cepas dobles mutantes $\Delta pex4\Delta pex10$ y $\Delta pex22\Delta pex10$ (el fenotipo en el crecimiento de estas cepas se mostró en la Fig. 8). Encontramos que en ausencia de PEX10 se abate por completo la localización de FOX2-mCherry en peroxisomas y que la delección de *PEX10* es epistática sobre la de *PEX4* y *PEX22* (Fig. 18). Estos resultados indican que se requiere de la actividad de PEX10 para que se dé la localización peroxisomal parcial de FOX2 que encontramos en ausencia de PEX4 y PEX22.

Realizamos una cepa doble mutante $\Delta pex4\Delta pex22$ para evaluar la interacción genética entre *PEX4* y *PEX22*. Observamos que el fenotipo de esta cepa es idéntico al de las mutantes sencillas en su crecimiento vegetativo (Fig. 8) y en la importación de FOX2-mCherry (Fig. 18) esto concuerda con que PEX4 y PEX22 actúen en un complejo cuya función requiere de ambas proteínas y por lo tanto que sean los componentes del complejo de ubiquitinación en *P. anserina*.

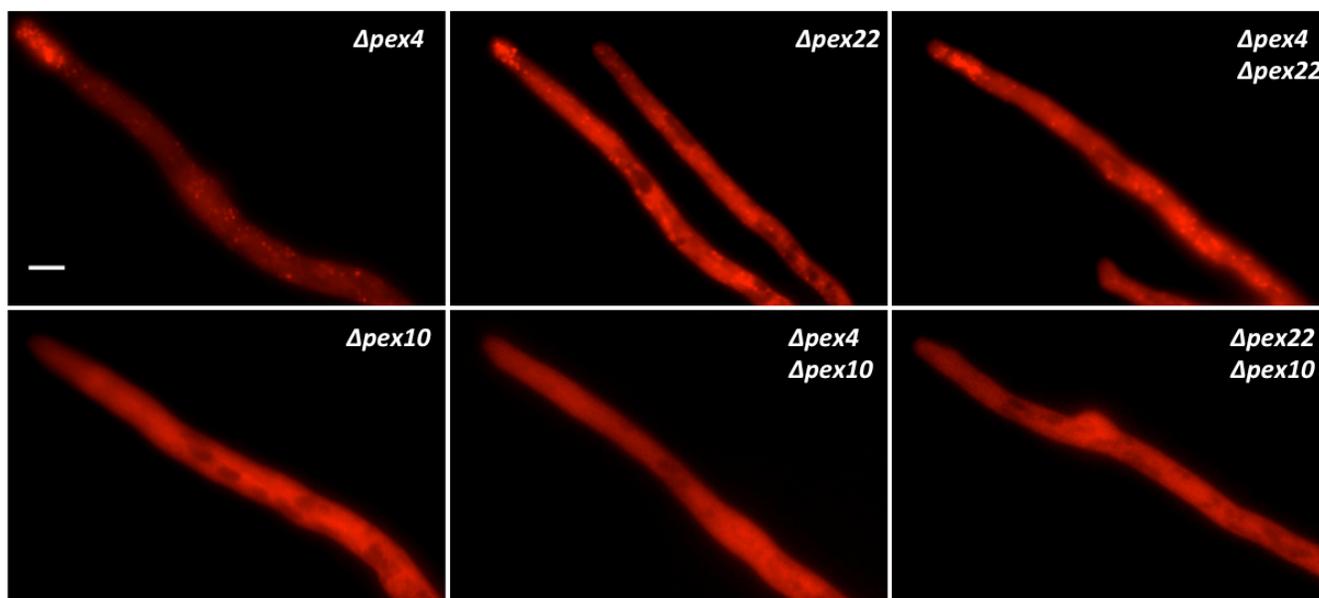


Fig. 18. Localización de FOX2-mCherry en hifas de cepas carentes de complejo de ubiquitinación y PEX10. Colonias de las cepas $\Delta pex4$, $\Delta pex10$, $\Delta pex22$, $\Delta pex4\Delta pex22$, $\Delta pex4\Delta pex10$ y $\Delta pex22\Delta pex10$ crecieron en MM durante 24 horas y fueron observadas con microscopía de fluorescencia. En las cepas mutantes sencillas y doble de *PEX4* y *PEX22* se observa la localización peroxisomal y citosólica de FOX2-mCherry; mientras que en todas las cepas con la delección de *PEX10*, FOX2-mCherry es totalmente citosólica. Barra de escala: 5 μ m.

El complejo de ubiquitinación es necesario en el inicio de la meiosis

Una vez que confirmamos que los genes *PEX4* y *PEX22* de *P. anserina* sí codifican proteínas que tienen función de factores de biogénesis peroxisomal, que participan en ambas vías de importación y que realizan una actividad común; examinamos su papel en la reproducción sexual. Para esto realizamos cruzas heterócigas entre la cepa silvestre y cada una de las mutantes y cruzas homócigas. Observamos que en las cruzas heterócigas, el desarrollo sexual es igual que en las cruzas entre cepas silvestres excepto porque en las heterócigas las ascosporas con genotipo mutante que se producen son de color más claro que las silvestres (datos no mostrados). Por el contrario, en las cruzas homócigas, tanto de $\Delta pex4$ como de $\Delta pex22$, el desarrollo sexual se detiene en la etapa dicariótica y no se producen meiocitos ni ascosporas (Fig. 19). Este fenotipo recesivo es el mismo que se presenta cuando *P. anserina* carece de los genes *PEX2*, *PEX3*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX19* y *PEX20* (Peraza-Reyes *et al.*, 2011).

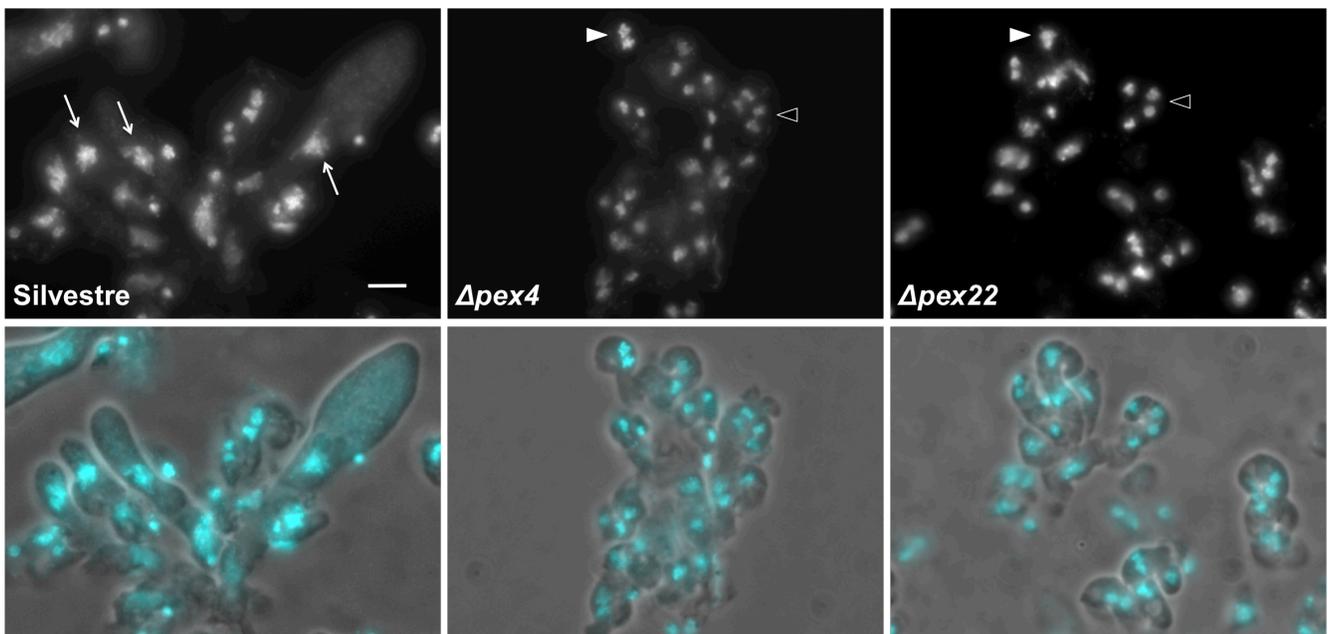


Fig. 19. Desarrollo sexual de las cepas mutantes del complejo de ubiquitinación. Se muestran proyecciones de máxima intensidad de imágenes de microscopía de fluorescencia de croziers fijados y teñidos con DAPI obtenidos después de tres días de la fertilización de cruzas homócigas de cepas silvestres, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$. Se observa que en la cruce de cepas silvestres se producen croziers y meiocitos en los que se aprecia un núcleo grande diploide (flechas). Por el contrario en las cruces de las mutantes sólo se producen croziers con dos (puntas de flecha blancas) o cuatro (puntas de flecha vacías) núcleos haploides. En las imágenes de arriba se observa el material genético teñido con DAPI y en las de abajo la tinción con DAPI empalmada con el campo claro. Barra de escala: 5 μ m.

Complementación genética de las cepas mutantes

Finalmente, para corroborar que el fenotipo observado en las cepas mutantes se debe a la falta de los componentes del complejo de ubiquitinación, realizamos la complementación genética de las cepas mutantes con sus respectivos alelos silvestres. La complementación de *PEX22* se realizó en este estudio y la de *PEX4* fue realizada por Fernando Suaste Olmos. A cada una de las cepas mutantes se le introdujo ectópicamente (EC) el gen correspondiente. Para esto se transformaron protoplastos de la cepa mutante introduciendo un plásmido o fragmento de PCR que contiene el gen silvestre y simultáneamente un plásmido con un gen que confiere resistencia al antibiótico geneticina. El gen de interés y el gen marcador de resistencia se introducen en el genoma en uno o varios sitios desconocidos. Rastreamos a las transformantes por su resistencia a la geneticina y comprobamos si se restablece el fenotipo silvestre. Observamos el fenotipo de las cepas complementadas con respecto a la importación de FOX2-mCherry (Fig. 20) y al desarrollo sexual (Fig. 21); en ambas cepas en los dos aspectos se restableció el fenotipo silvestre.

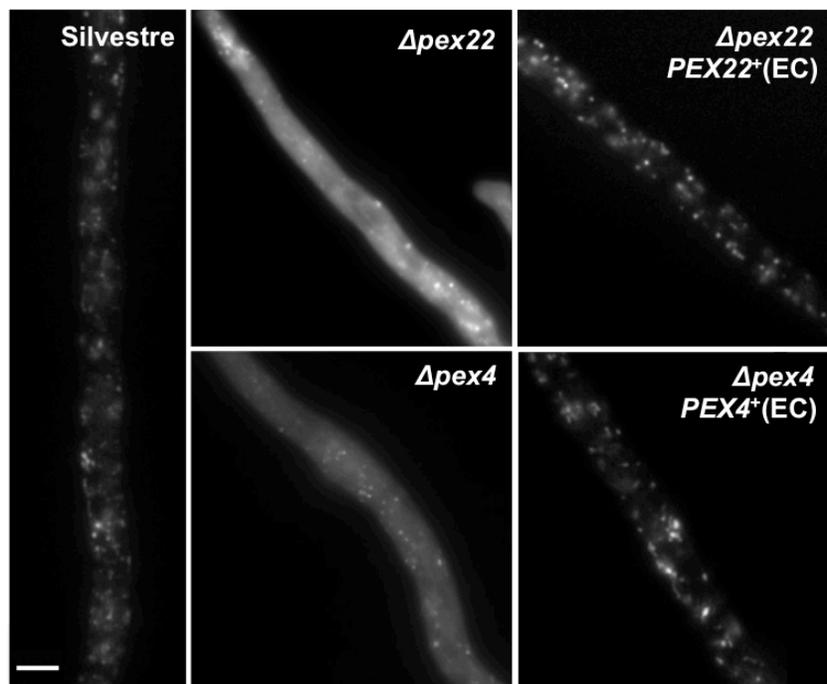


Fig. 20. Localización de FOX2-mCherry en las cepas $\Delta pex4$, $\Delta pex22$ y las mutantes complementadas genéticamente. Colonias de las cepas silvestre, $\Delta pex4$, $\Delta pex22$, $\Delta pex4$ PEX4⁺(EC) y $\Delta pex22$ PEX22⁺(EC) que expresan la proteína FOX2-mCherry crecieron durante 24 horas en medio MM y fueron observadas con microscopía de fluorescencia. En las cepas mutantes se observa a FOX2-mCherry en el citosol y en algunos peroxisomas, mientras que en las cepas complementadas la proteína sólo se ubica en los peroxisomas, al igual que en la silvestre. Barra de escala: 5 μ m.

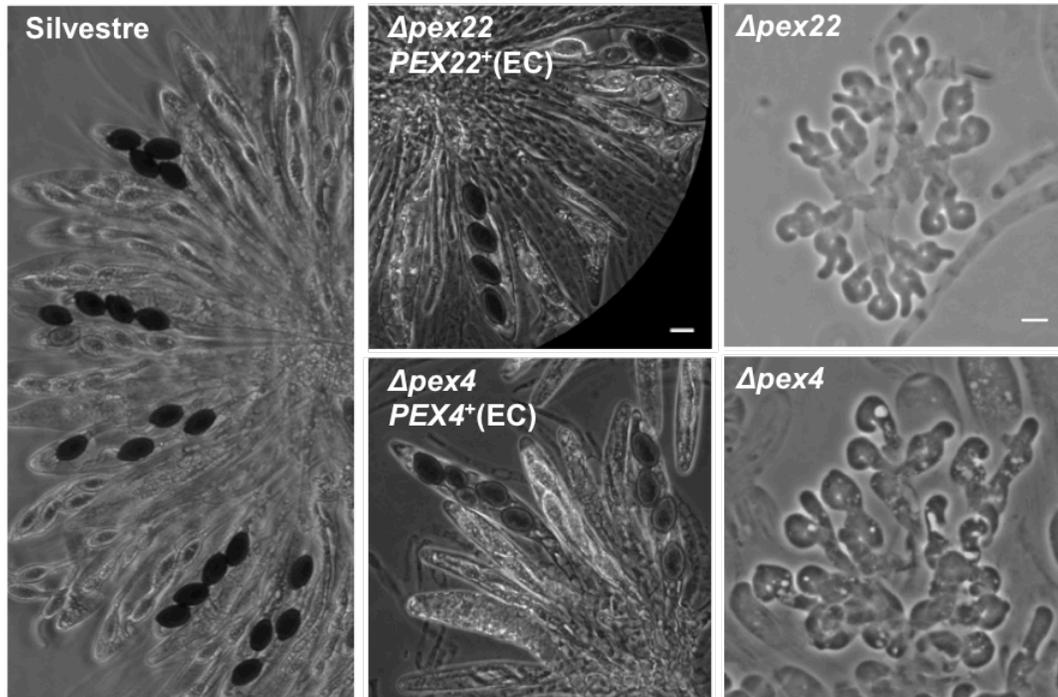


Fig. 21. Desarrollo sexual de las cepas $\Delta pex4$, $\Delta pex22$ y las mutantes complementadas genéticamente. Se muestra el himenio de las cruces homócigas de las cepas silvestre, $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ y de las cruces $\Delta pex4$ pcon $\Delta pex4PEX4^+(EC)$ y $\Delta pex22$ con $\Delta pex22PEX22^+(EC)$ después de 4 días desde la fertilización. Los genes insertados ectópicamente restablecen el fenotipo silvestre permitiendo la iniciación de la meiosis y la formación de las ascospora. Barra de escala en los paneles de la derecha: 5 μm ; y de la izquierda y el centro: 20 μm .

DISCUSIÓN

Estudiamos a las proteínas que forman el complejo de ubiquitinación peroxisomal de *P. anserina* y encontramos que PEX4 y PEX22 son peroxinas que, como esperábamos, no participan en la biogénesis de las membranas peroxisomales y sí actúan en conjunto en la importación de proteínas de la matriz peroxisomal, por lo tanto se requieren para la utilización de ácidos grasos de cadena muy larga, la pigmentación de las ascosporas, la formación de micelio aéreo y el desarrollo sexual.

Nuestros resultados muestran que en ausencia del complejo de ubiquitinación, la importación de proteínas mediante las vías PTS1 y PTS2 está abatida, sin embargo, la de la proteína FOX2, una proteína sin PTS, no está totalmente inhabilitada. En otros organismos se han observado dos causas distintas que permiten que se dé la importación parcial de proteínas cuando el reciclaje del receptor está alterado: en *Trypanosoma brucei*, se ha sugerido que cuando Pex4 no realiza la monoubiquitinación del receptor Pex5 hay otras enzimas E2 que la sustituyen (Gualdrón-López *et al.*, 2013) y en *K. pastoris* existe un mecanismo de poliubiquitinación y degradación de Pex20, que restituye parcialmente su función cuando se interrumpe su reciclaje (Kiel *et al.*, 2005; León *et al.*, 2006; León y Subramani, 2007). Cualquiera de estos dos mecanismos podría estar permitiendo la importación parcial de FOX2 en *P. anserina*; esto concuerda con nuestro hallazgo de que en ausencia de PEX10 se abate esta importación, ya que el complejo RING-finger es necesario para cualquiera de los dos tipos de ubiquitinación.

Aún considerando que la importación parcial se puede deber a una ubiquitinación alternativa de PEX5, permanece la pregunta de por qué el rescate parcial de la importación lo vemos en FOX2 y no en GFP-PTS1. Sabemos que estas proteínas difieren en su información de localización peroxisomal, y por lo tanto en la forma en la que se asocian con el receptor PEX5. Un ejemplo de una proteína sin PTS reconocida por Pex5, es Pox1 de *S. cerevisiae*, ésta se une a la región N-terminal del receptor (Klein *et al.*, 2002; Schäfer *et al.*, 2004) y no en los dominios TPR de la región C-terminal, como lo hacen las proteínas con PTS1. Si FOX2 se asocia a PEX5 de esta manera es posible que existan en la región C-terminal de PEX5 residuos de aminoácidos ubiquitinables (Cys o Lys), que queden expuestos cuando PEX5 está unido a FOX2, pero que no sean accesibles cuando PEX5 está asociado a proteínas con PTS1 (Fig. 22). Un análisis de predicción de los sitios de ubiquitinación de *Pa*PEX5 con el programa UbPred (<http://www.ubpred.org>), indica que la lisina en la posición 575 podría ser sustrato de ubiquitinación (con un grado de confianza de 0.66). Esta

lisina y 3 cisteínas,8 que también se encuentran en la región C-terminal, podrían ser ubiquitinadas, ya sea por la presencia de otras enzimas E2 de conjugación o de un mecanismo de poliubiquitinación, cuando PEX5 se une a FOX2 y no a una PTS1, y así proveer un rescate parcial de la importación cuando el reciclaje del receptor está alterado por la ausencia del complejo de ubiquitinación. Por otra parte, sabemos que el dominio N-terminal de PEX5 es la región de la proteína que lleva a cabo la actividad de translocación de proteínas a través de la membrana peroxisomal (Schäfer *et al.*, 2004; Montilla-Martínez *et al.*, 2015). Por ello, es posible que la conformación del canal de translocación sea diferente al estar la región N-terminal de PEX5 ocupada por una proteína sin PTS1 y la regulación de su actividad podría tener distintos requerimientos. Los resultados obtenidos, junto con las consideraciones anteriores, sugieren que la ubiquitinación del receptor es necesaria para la importación de las proteínas a la matriz peroxisomal, esto coincide con el modelo de importación dirigida por exportación propuesto por Schliebs *et al.* (2010).

Observamos además que tanto en la cepa silvestre como en las mutantes analizadas, no todos los peroxisomas, identificables por la presencia de PEX14-GFP, contienen FOX2-mCherry, esto indica que en las hifas de *P. anserina* existen distintas poblaciones de peroxisomas que podrían tener distintas selectividades de importación de proteínas (Liu *et al.*, 2011; Smith y Aitchison, 2013). También vemos que en el micelio de las mutantes $\Delta pex4$ y $\Delta pex22$ los peroxisomas que se encuentran en los segmentos más cercanos a la punta son los que contienen FOX2, esto coincide con que en esta zona vemos la fluorescencia citosólica más intensa, lo que sugiere que ahí se sintetiza más FOX2, o que se degrada más en los segmentos subapicales, y por lo tanto hay más proteína disponible para ser importada a los peroxisomas que se encuentran más cerca de la punta. Por otro lado, existe en las hifas un flujo citoplásmico constante hacia la zona de crecimiento de la célula, que provoca que los peroxisomas tiendan a situarse en la zona apical, a menos que existan mecanismos de transporte activo que los distribuyan al resto de la hifa (Lin *et al.*, 2016), esto podría estar favoreciendo que encontremos cada vez menos peroxisomas con FOX2 hacia el centro de las colonias.

Pex5

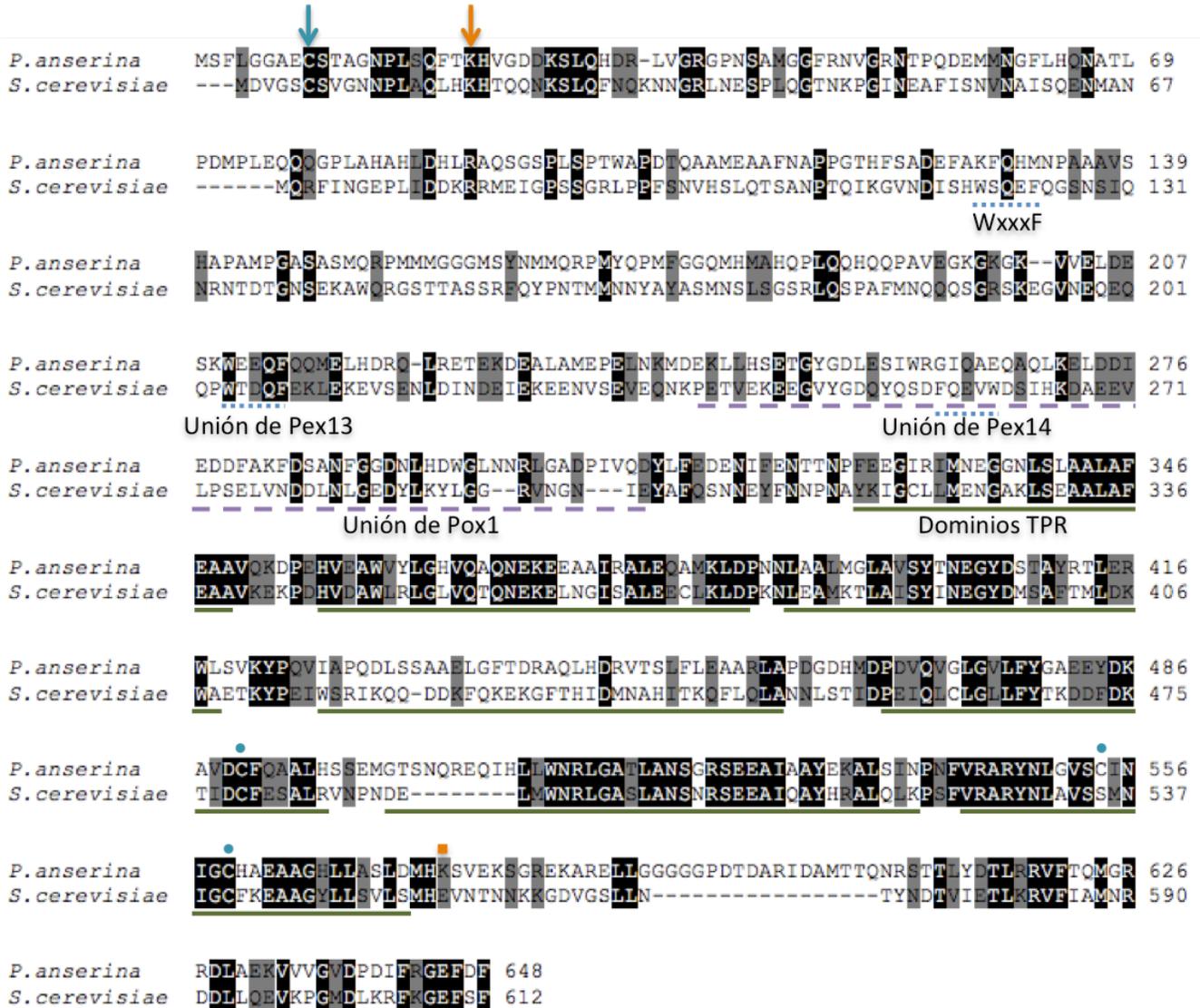


Fig. 22. Alineamiento de las secuencias proteínicas de PEX5 de *P. anserina* y *S. cerevisiae*. Para la secuencia de *S. cerevisiae* se señala con líneas punteadas los motivos WxxxF (en uno de ellos se une Pex13 y en otro Pex14), con línea de guiones se muestra la región donde Pox1 se une a Pex5 y con líneas continuas los dominios TPR. Se señala con flechas la cisteína (azul) y la lisina (naranja) conservadas donde se realizan la mono y poliubiquitinación, respectivamente. Para la secuencia de *P. anserina* se señala con puntos las Cys 490, 554 y 559 y con un cuadro la Lys 575, que podrían ser blancos de una ubiquitinación alternativa cuando PEX5 se une a FOX2. Los números de acceso de las secuencias en el GeneBank son: *P. anserina* ABH10692.1 y *S. cerevisiae* ABH10692.1.

En varios hongos se ha descrito la participación de los peroxisomas en el desarrollo sexual, que consiste principalmente en la utilización de ácidos grasos como nutrientes de reserva durante la formación de los cuerpos fructíferos. Sin embargo, *P. anserina* es el único hongo en el cual se ha observado que los peroxisomas son indispensables para la reproducción sexual al afectar directamente el desarrollo meiótico (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). En *P. anserina* se ha visto que la ausencia de distintas peroxinas altera el desarrollo sexual en distintas etapas, lo cual indica que los peroxisomas participan en más de una actividad celular relacionada con la reproducción sexual. La ausencia de PEX5 no impide el desarrollo sexual completo, sin embargo, lo afecta de forma importante ya que en cruces de una cepa $\Delta pex5$ se producen pocos y pequeños peritecios, hay un retraso en las etapas de la meiosis y se forman ascas anormales y ascosporas con una cantidad anormal de núcleos y con bajas tasas de expulsión y germinación. La ausencia del receptor PEX7 provoca un fenotipo similar al de $\Delta pex5$ pero todos los defectos del desarrollo sexual se presentan en menor grado (Bonnet *et al.*, 2006). Otras investigaciones en *P. anserina* sugieren que la composición de proteínas de matriz peroxisomal está regulada a lo largo del desarrollo sexual ya que los componentes del importómero PEX14 y PEX14/17 no se requieren de igual manera en las distintas etapas (Peraza-Reyes *et al.*, 2011).

Con esta investigación descubrimos que las peroxinas PEX4 y PEX22 de *P. anserina* se requieren para la meiosis de la misma forma que PEX3, PEX19, PEX2, PEX10, PEX12, PEX13 y PEX20. De manera simultánea a esta investigación en el laboratorio se descubrió que las proteínas PEX8, PEX1, PEX6 y PEX26 también se requieren para la meiosis, todos estos resultados en conjunto fueron publicados en Suaste-Olmos *et al.* (2018). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una tercera ruta de importación con la cual se lleva a la matriz peroxisomal por lo menos a una proteína cuya localización peroxisomal permite la cariogamia y la meiosis. Toda la información que tenemos indica que esta ruta tiene al receptor PEX20 que circula entre el citosol y el peroxisoma, que se ancla a la membrana por medio de PEX13 y cuyo reciclaje depende de la monoubiquitinación, realizada por PEX4/PEX22 como E2 y el complejo RING-finger como E3, y de la dislocación mediada por PEX1, PEX6 y PEX26; además utiliza a PEX8 en la interacción entre PEX13 y el complejo RING-finger (Fig. 23).

Aunque el fenotipo que observamos aparentemente presenta un bloqueo en la cariogamia, que imposibilita la continuidad del desarrollo sexual, existe evidencia de que el defecto no se debe a un obstáculo en la cariogamia misma, puesto que por una parte las cepas mutantes $\Delta pex2$ (anteriormente $\Delta car1$) son capaces de realizar cariogamia durante la fase vegetativa (Berteaux-

Lecellier *et al.*, 1995), esto quiere decir que la cariogamia en sí misma no está afectada, y por otra parte, existen defectos que aunque directamente impidan la cariogamia no impiden la meiosis, ya que en estos casos ésta se lleva a cabo de forma haploide (Zickler *et al.*, 1995, Vasnier *et al.*, 2014). Por lo tanto, el fenotipo que observamos en *P. anserina* cuando carece de ciertas peroxinas sugiere que los peroxisomas participan en un evento que permite que se establezca el cambio de ciclo mitótico a la meiosis, aspecto apoyado por el hecho de que en el fenotipo observado los núcleos se reproducen por mitosis indefinidamente, en lugar de detener su proliferación.

Por el momento no tenemos información que nos permita conocer puntualmente la actividad celular necesaria para el desarrollo sexual en la que participan los peroxisomas. Para comenzar a indagar sobre esta actividad es necesario buscar las proteínas que interactúan con PEX20 y, previendo que PEX20 no sea directamente el receptor de la nueva vía sino co-receptor de un receptor desconocido, buscar las proteínas que están en la matriz peroxisomal cuando los receptores PEX5 y PEX7 no están presentes.

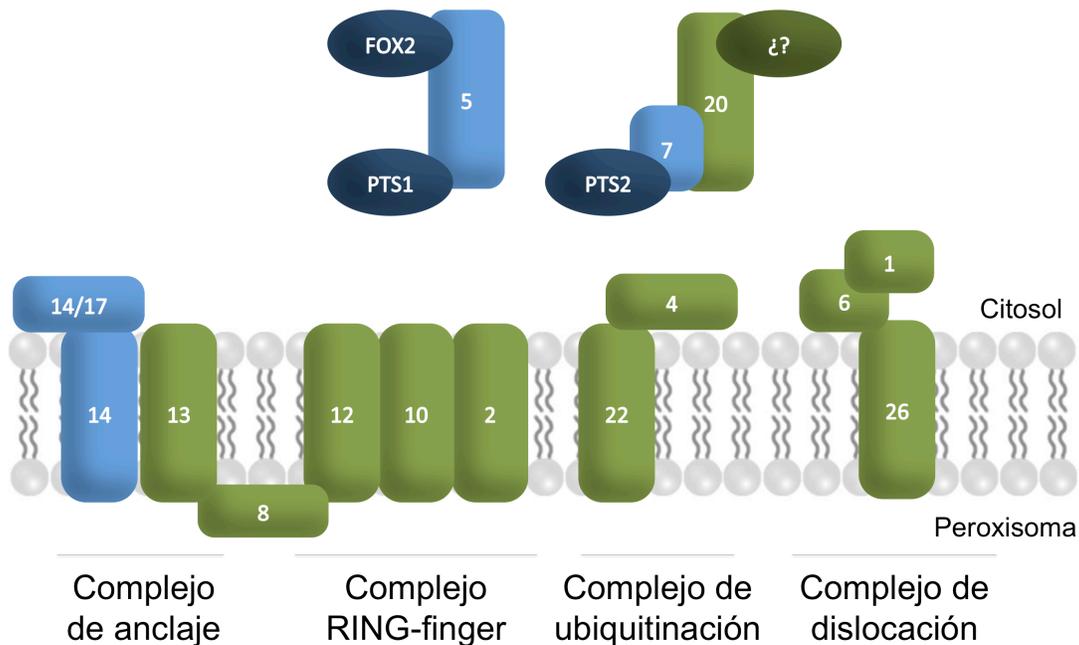


Fig. 23. Peroxinas de las rutas de importación peroxisomales necesarias para la meiosis en *P. anserina*. En el esquema se muestran todas las peroxinas de *P. anserina* involucradas en la importación de proteínas a la matriz peroxisomal y las proteínas que transportan (sólo se indica el número de la peroxina correspondiente). Las proteínas necesarias para la meiosis se muestran en verde (verde claro las peroxinas y oscuro la proteína desconocida) y las que no son necesarias en azul (azul claro las peroxinas y oscuro las proteínas de matriz peroxisomal).

CONCLUSIONES

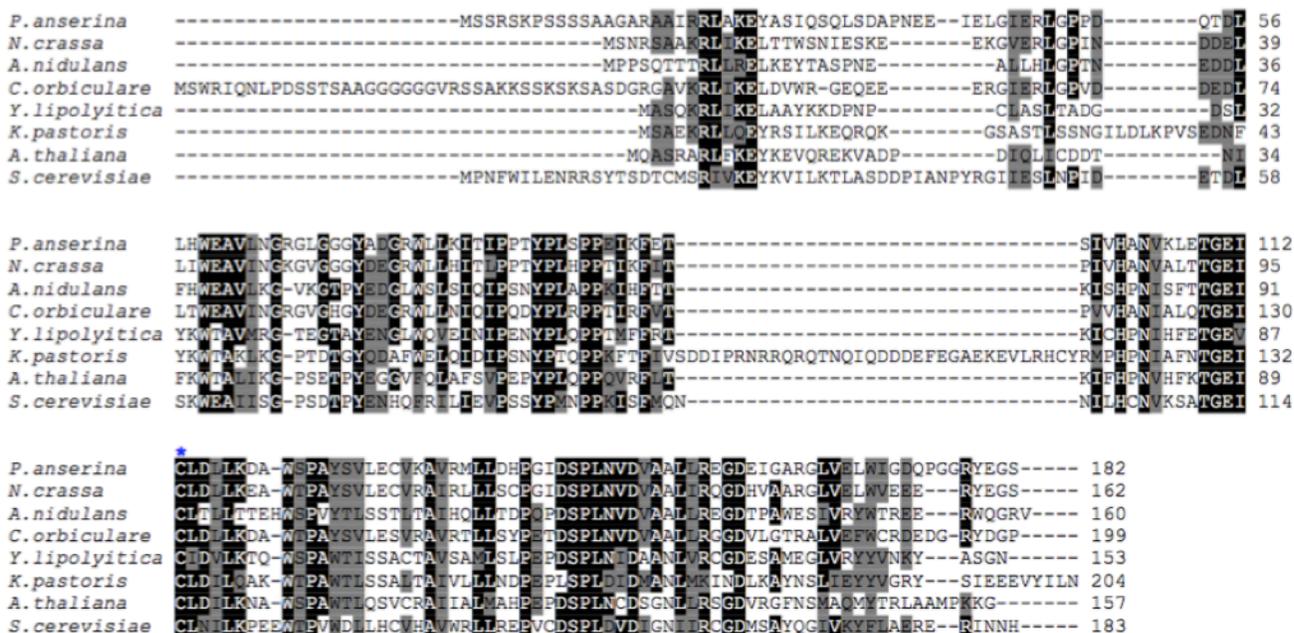
Los genes *PEX4* y *PEX22* de *P. anserina* codifican proteínas con actividad de factores de biogénesis peroxisomal que participan en un proceso común dentro de las vías de importación de proteínas peroxisomales, pero no en la formación de las membranas peroxisomales.

En *P. anserina* la importación peroxisomal de las proteínas con PTS1 depende totalmente de *PEX4* y *PEX22*, mientras que la importación de la proteína *FOX2* solo depende parcialmente de estas proteínas.

PEX4 y *PEX22* son peroxinas necesarias para la iniciación de la meiosis en *P. anserina*.

ANEXO

Pex4



Pex22

Fig. S1. Alineamiento de la secuencia proteínica de PEX4 de *P. anserina* con ortólogos representativos de otros hongos y plantas. Se indica con un asterisco la cisteína del sitio activo y con una línea la región de unión a Pex22 de *S. cerevisiae* (Williams et al., 2012). Los números de acceso de las secuencias en GenBank son: *P. anserina* CDP23277.1, *Neurospora crassa* EAA34737.1, *Aspergillus nidulans* CBF79830.1, *C. orbiculare* ENH88331.1, *Yarrowia lipolytica* CAG79130.1, *K. pastoris* AAA53634.1, *Arabidopsis thaliana* NP_001031939.1 y *S. cerevisiae* AAS56102.1.

Pex22/Pex22-like

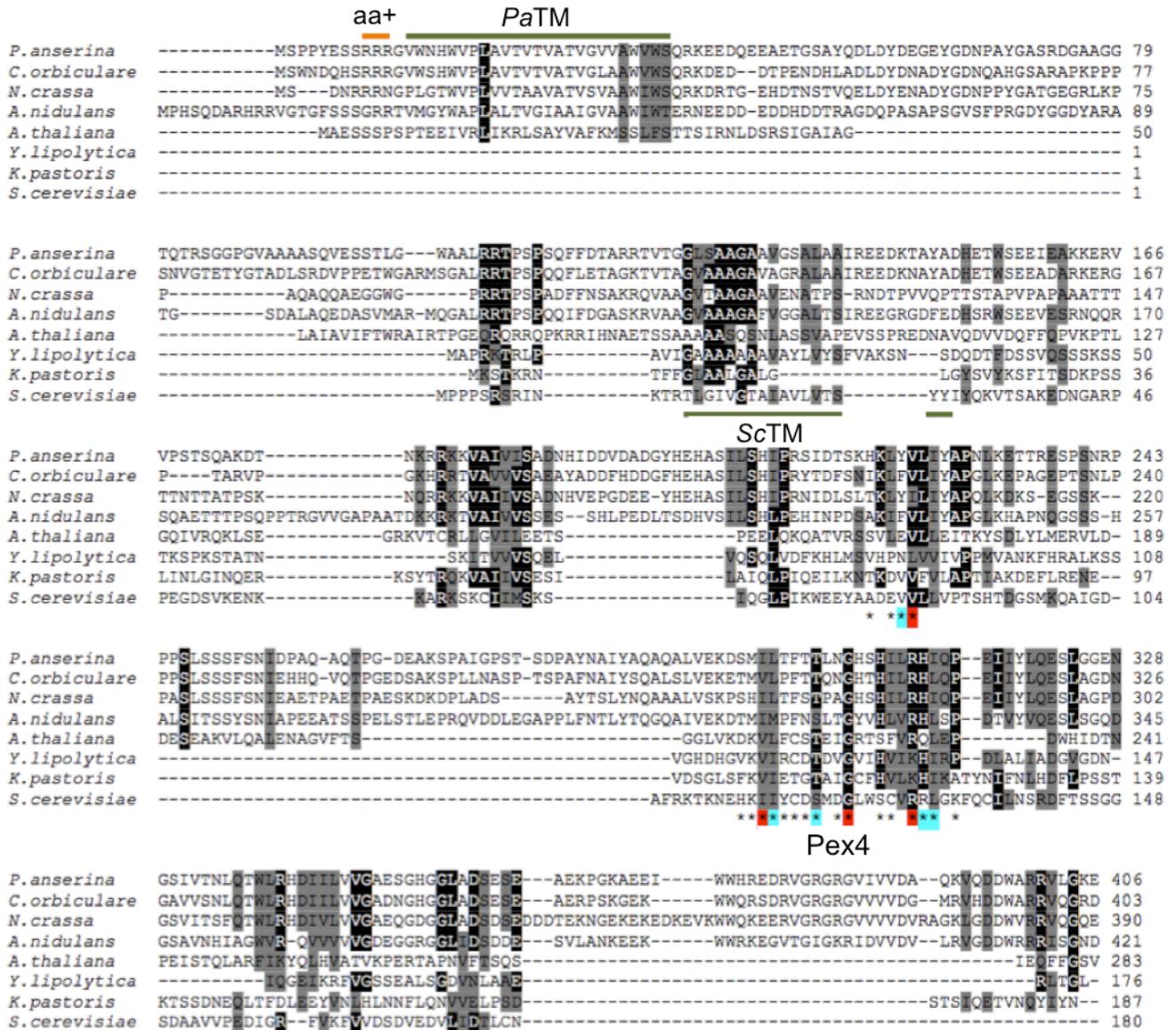


Fig. S2. Alineamiento de la secuencia proteínica de PEX22 de *P. anserina* con PEX22 y Pex22-like de plantas y hongos filamentosos y levaduriformes representativos. El dominio transmembranal (TM) predicho de PEX22 de *P. anserina* (*Pa*) se indica con una línea arriba de la secuencia (predicción realizada con Philius, <http://topcons.cbr.su.se/>), y el TM conocido de *S. cerevisiae* (*Sc*) con una línea debajo de la secuencia (Williams *et al.*, 2012). Además se indican con una línea los residuos de aminoácidos cargados positivamente (aa+) de *P. anserina* previos al TM que en *K. pastoris* son necesarios para la localización de la proteína (Koller *et al.*, 1999). Los residuos de aminoácidos que en *S. cerevisiae* intervienen en la interacción con Pex4 (Williams *et al.*, 2012) están marcados con asteriscos, están resaltados con rojo los que son idénticos entre *S. cerevisiae* y *P. anserina* y en azul los que son similares. Los números de acceso en GenBank son: *P. anserina* CDP30493.1, *C. orbiculare* ENH87037.1, *N. crassa* EAA26537.2, *A. nidulans* EAA66006.1, *A. thaliana* OAP04891.1, *Y. lipolytica* CAG77876.2, *K. pastoris* AAD45664.1 y *S. cerevisiae* AAS56493.1.

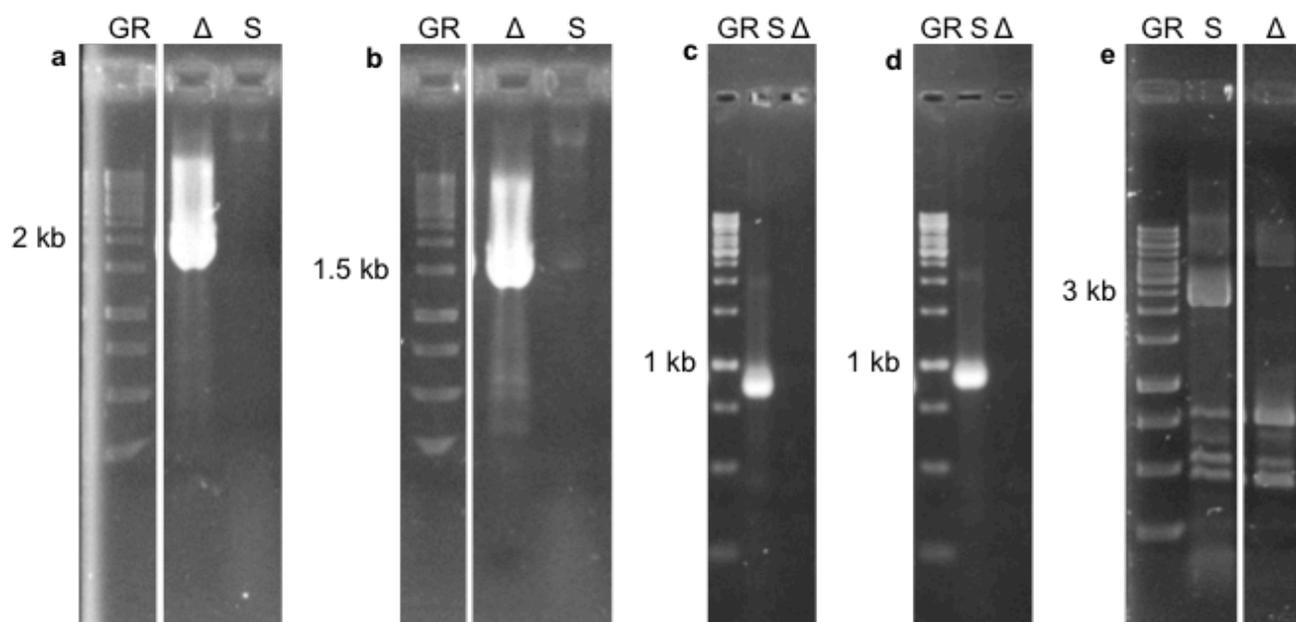


Fig. S3. Verificación de la delección de *PEX4*. Imágenes de los geles de electroforesis con los productos de las PCR que se realizaron para verificar la delección de *PEX4* con el DNA genómico de *P. anserina* silvestre (S) como control y el de la cepa $\Delta pex4(\Delta)$. El marcador de peso molecular es *Gene Ruler* 1kb (GR). a) Amplificación del segmento 5' con oligonucleótidos que hibridan en el gen *hph* y fuera de la construcción: en la cepa silvestre 0 pb y en $\Delta pex4$ 1,838 pb. b) Amplificación del segmento 3' con oligonucleótidos que hibridan en el gen *hph* y fuera de la construcción: en la cepa silvestre 0 pb y en $\Delta pex4$ 1,529 pb. c) Amplificación del segmento 5' con oligonucleótidos que hibridan en el ORF de *PEX4* y fuera de la construcción: en la cepa silvestre 867 pb y en $\Delta pex4$ 0 pb. d) Amplificación del segmento 3' con oligonucleótidos que hibridan en el ORF de *PEX4* y fuera de la construcción: en la cepa silvestre 913 pb y en $\Delta pex4$ 0 pb. e) Amplificación de todo el locus con oligonucleótidos que hibridan fuera de la construcción: en la cepa silvestre 2,284 pb y en $\Delta pex4$ 4,284 pb.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en este estudio para realizar la delección de *PEX22*.

	Nombre	Secuencia	Uso: obtención de
1	pex22-5F	GAATCTGAGTCACCAGAAGCCAGCC	5' y casete
2	nour-pex22-5R	GAAGCATTTATCAGGGTTGGTGATGTTGCGATCGA	5'
3	pex22-nour-F	TCGATCGCAACATCACCAACCCTGATAAATGCTTC	<i>NAT1</i>
4	pex22-nour-R	ATCACTCGGGCTGTTTTTCACGGAAATGTTGAATAC	<i>NAT1</i>
5	nour-pex22-3F	GTATTCAACATTTCCGTGAAAACAGGCCCGAGTGAT	3'
6	pex22-3R	GAGGCTGATGCTTGAATCGATGGGG	3' y casete

Tabla 4: Cepas utilizadas

Genotipo	Referencia
Silvestre	Espagne <i>et al.</i> , 2008
$\Delta ku70::gen$	El-Khoury <i>et al.</i> , 2008
GFP-PTS1::ble	Bonnet <i>et al.</i> , 2006
PTS2-GFP::ble	Peraza-Reyes <i>et al.</i> , 2008
FOX2-mCherry::hph	Peraza-Reyes <i>et al.</i> , 2008
PEX14-GFP::hph	Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
GFP-PEX2::ble	Peraza-Reyes <i>et al.</i> , 2008
$\Delta pex5::ble$	Bonnet <i>et al.</i> , 2006
$\Delta pex10::hph$	Peraza-Reyes <i>et al.</i> , 2008
$\Delta pex4::hph$	Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ PEX14-GFP::ble	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ PEX14-GFP::ble	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex5::ble$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
GFP-PTS1::ble FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ GFP-PTS1::ble FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ GFP-PTS1::ble FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
FOX2-mCherry::hph PEX14-GFP::ble	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ FOX2-mCherry::hph PEX14-GFP::ble	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ FOX2-mCherry::hph PEX14-GFP::ble	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
FOX2-mCherry::hph GFP-PEX2::ble	Este estudio
$\Delta pex22::nat1$ FOX2-mCherry::hph GFP-PEX2::ble	Este estudio
$\Delta pex4::hph$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex10::hph$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ $\Delta pex10::hph$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ $\Delta pex10::hph$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ $\Delta pex22::nat1$ FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex4::hph$ PEX4 ^(EC) ::gen FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018
$\Delta pex22::nat1$ PEX22 ^(EC) ::gen FOX2-mCherry::hph	Este estudio; Suaste-Olmos <i>et al.</i> , 2018

Tabla 5: Abreviaturas

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Ectópico
ER	Retículo endoplásmico
GFP	Proteína verde fluorescente
kb	Kilobases
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEX	Peroxina
PMP	Proteína de membrana peroxisomal
PTS	Señal de localización peroxisomal
TPR	Repeticiones tetratricopéptido
Ub	Ubiquitina

REFERENCIAS

- Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., ... Kunau, W. H. (2003). Pex8p: An intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Molecular Cell*, 11, 635-646.
- Agrawal, G., y Subramani, S. (2016). De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863, 892-901.
- Berger, J., Dorninger, F., Forss-Petter, S., y Kunze, M. (2016). Peroxisomes in brain development and function . *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863, 934-955.
- Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson-Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., y Simonet, J. (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger Syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell*, 81, 1043-1051.
- Boisnard, S., Espagne, E., Zickler, D., Bourdais, A., Riquet, A. L., y Berteaux-Lecellier, V. (2009). Peroxisomal ABC transporters and β -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 55-66.
- Boisson-Dernier, A., Frietsch, S., Kim, T. H., Dizon, M. B., y Schroeder, J. I. (2008). The Peroxin Loss-of-Function Mutation abstinence by mutual consent Disrupts Male-Female Gametophyte Recognition. *Current Biology*, 18, 63-68.
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boisnard, S., Bourdais, A., y Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Molecular Microbiology*, 62, 157-169.
- Brygoo, Y., y Debuchy, R. (1985). Transformation by integration in *Podospora anserina* - I. Methodology and phenomenology. *Molecular & General Genetics*, 200, 128-131.
- Chen, H., Liu, Z., y Huang, X. (2009). Drosophila models of peroxisomal biogenesis disorder: Peroxins are required for spermatogenesis and very-long-chain fatty acid metabolism. *Human Molecular Genetics*, 19, 494-505.
- Coppin-Raynal, E., Picard, M., y Arnaise, S. (1989). Transformation by integration in *Podospora anserina* III. Replacement of a chromosome segment by a two-step process. *Molecular Genetics and Genomics*, 219, 270-276.
- Deb, R., y Nagotu, S. (2017). Versatility of peroxisomes: An evolving concept. *Tissue and Cell*, 49, 209-226.
- Debuchy, R., y E. Coppin, (1992). The mating types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of the fertilization domains. *Molecular & General Genetics*. 233, 113-121.
- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S. J., Blobel, G., Crane, D. I., Cregg, J. M., ... Veenhuis, M. (1996). Mini-Review A Unified Nomenclature for Peroxisome Biogenesis Factors. *Journal of Cell Biology*, 135, 1-3.
- Einwächter, H., Sowinski, S., Kunau, W. H., y Schliebs, W. (2001). *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO Reports*, 2, 1035-1039.
- El-Khoury, R., Sellem, C. H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M. F. P. M., Debuchy, R., y Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the Filamentous fungus *Podospora anserina*. *Current Genetics*, 53, 249-258.
- El Magraoui, F., Bäumer, B. E., Platta, H. W., Baumann, J. S., Girzalsky, W., y Erdmann, R. (2012). The RING-type ubiquitin ligases Pex2p, Pex10p and Pex12p form a heteromeric complex that displays enhanced activity in an ubiquitin conjugating enzyme-selective manner. *FEBS Journal*, 279, 2060-2070.
- El Magraoui, F., Brinkmeier, R., Schrötter, A., Girzalsky, W., Müller, T., Marcus, K., ... Platta, H. W. (2013). Distinct ubiquitination cascades act on the Peroxisomal Targeting Signal Type 2 Co-receptor Pex18p. *Traffic*, 14, 1290-1301.

- Emmanouilidis, L., Gopalswamy, M., Passon, D. M., Wilmanns, M., y Sattler, M. (2016). Structural biology of the import pathways of peroxisomal matrix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863, 804–813.
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Silva, C. Da, Jaillon, O., Porcel, B. M., ... Silar, P. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biology*, 9, R77.
- Gualdrón-López, M., Chevalier, N., Van Der Smissen, P., Courtoy, P. J., Rigden, D. J., y Michels, P. A. M. (2013). Ubiquitination of the glycosomal matrix protein receptor PEX5 in *Trypanosoma brucei* by PEX4 displays novel features. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833, 3076–3092.
- Hasan, S., Platta, H. W., y Erdmann, R. (2013). Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Frontiers in Physiology*, 4, 1–12.
- Hensel, A., Beck, S., El Magraoui, F., Platta, H. W., Girzalsky, W., y Erdmann, R. (2011). Cysteine-dependent ubiquitination of Pex18p is linked to cargo translocation across the peroxisomal membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 43495–43505.
- Hettema, E. H., Erdmann, R., van der Klei, I. J., y Veenhuis, M. (2014). Evolving models for peroxisome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 25-30.
- Hynes, M. J., Murray, S. L., Khew, G. S., & Davis, M. A. (2008). Genetic Analysis of the Role of Peroxisomes in the Utilization of Acetate and Fatty Acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 178, 1355–1369.
- Kiel, J. A. K. W., Emmrich, K., Meyer, H. E., y Kunau, W. H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 1921–1930.
- Kiel, J. A. K. W., Veenhuis, M., y van der Klei, I. J. (2006). PEX genes in fungal genomes: Common, rare or redundant. *Traffic*, 7, 1291–1303.
- Klein, A. T. J., Van Den Berg, M. V., Bottger, G., Tabak, H. F., y Distel, B. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25011–25019.
- Koller, A., Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Rangell, L., Keller, G. A., y Subramani, S. (1999). Pex22p of *Pichia pastoris*, Essential for Peroxisomal Matrix Protein Import, Anchors the Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Pex4p, on the Peroxisomal Membrane. *Journal of Cell Biology*, 146, 99–112.
- Komander, D., y Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Reviews of Biochemistry*, 81, 203–29.
- Kubo, Y., Fujihara, N., Harata, K., Neumann, U., Robin, G. P., y OConnell, R. (2015). *Colletotrichum orbiculare* FAM1 encodes a novel woronin body- associated pex22 peroxin required for appressorium-mediated plant infection. *mBio*, 6, e01305-15.
- Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H., y Tanaka, Y. (2002). PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Research*, 30, 1–5.
- Léon S., Zhang, L., Mcdonald, W. H., Yates Iii, J., Cregg, J. M., y Subramani, S. (2006). Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *Journal of Cell Biology*, 172, 67–78.
- Léon, S., y Subramani, S. (2007). A conserved cysteine residue of *Pichia pastoris* Pex20p is essential for its recycling from the peroxisome to the cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 7424–7430.
- Lin, C., Schuster, M., Guimaraes, S. C., Ashwin, P., Schrader, M., Metz, J., ... Steinberg, G. (2016). Active diffusion and microtubule-based transport oppose myosin forces to position organelles in cells. *Nature Communications*, 7, 11814.
- Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., y Jedd, G. (2011). Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Developmental Cell*, 21, 457–468.
- Liu, X., y Subramani, S. (2013). Unique requirements for mono-and polyubiquitination of the peroxisomal targeting signal co-receptor, Pex20. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 7230–7240.

- Ma, C., Hagstrom, D., Polley, S. G., y Subramani, S. (2013). Redox-regulated cargo binding and release by the peroxisomal targeting signal receptor, Pex5. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 27220–27231.
- Mayerhofer, P. U. (2016). Targeting and insertion of peroxisomal membrane proteins: ER trafficking versus direct delivery to peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863, 870–880.
- Montilla-Martinez, M., Beck, S., Klümper, J., Meinecke, M., Schliebs, W., Wagner, R., y Erdmann, R. (2015). Distinct pores for peroxisomal import of PTS1 and PTS2 proteins. *Cell Reports*, 13, 1–9.
- Nyathi, Y., y Baker, A. (2006). Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1478–1495.
- Peraza-Reyes, L., Zickler, D., y Berteaux-Lecellier, V. (2008). The Peroxisome RING-finger complex is required for meiocyte formation in the fungus *Podospora anserina*. *Traffic*, 9, 1998–2009.
- Peraza-Reyes, L., Arnaise, S., Zickler, D., Coppin-Raynal, E., Debuchy, R., y Berteaux-Lecellier, V. (2011). The importomer peroxins are differentially required for peroxisome assembly and meiotic development in *Podospora anserina*: Insights into a new peroxisome import pathway. *Molecular Microbiology*, 82, 365–377.
- Peraza-Reyes, L., y Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, 4, 1–16.
- Peraza-Reyes, L. y Malagnac, F. (2016) Sexual Development in Fungi. En J. Wendland (Ed.Vol.) Growth, differentiation and sexuality (3ra ed.) de la serie: Esser, K (Ed.) The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research ,407- 455, *Springer*.
- Platta, H. W., Debelyy, M. O., El Magraoui, F., y Erdmann, R. (2008). The AAA peroxins Pex1p and Pex6p function as dislocases for the ubiquitinated peroxisomal import receptor Pex5p. In *Seventh International Meeting on AAA Proteins*, 99–104.
- Platta, H. W., Magraoui, F. El, Bäumer, B. E., Schlee, D., Girzalsky, W., y Erdmann, R. (2009). Pex2 and Pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 5505–5516.
- Platta, H. W., Hagen, S., Reidick, C., & Erdmann, R. (2014). The peroxisomal receptor dislocation pathway: To the exportomer and beyond. *Biochimie*, 98, 16–28.
- Platta, H. W., Brinkmeier, R., Reidick, C., Galiani, S., Clausen, M. P., y Eggeling, C. (2016). Regulation of peroxisomal matrix protein import by ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863, 838–849.
- Ruprich-Robert, G., Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., y 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, 1089–1099.
- Schäfer, A., Kerssen, D., Veenhuis, M., Kunau, W. H., y Schliebs, W. (2004). Functional similarity between the peroxisomal PTS2 receptor binding protein Pex18p and the N-terminal half of the PTS1 receptor Pex5p. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 8895–906.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–82.
- Schliebs, W., Girzalsky, W., y Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 11, 885–890.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9.
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From laboratory to biotechnology. En B. A. Horwitz (Ed.), *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, 283–309, *Springer*.
- Simonet, J.-M., y Zickler, D. (1972). Mutations affecting meiosis in *Podospora anserina*. *Chromosoma*, 37, 327–351.

- Smith, J. J. y Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 14, 803–817.
- Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J., y McBride, H. M. (2017). Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*. 000, 1-4.
- Szőor, B., Ruberto, I., Burchmore, R., y Matthews, K. R. (2010). A novel phosphatase cascade regulates differentiation in *Trypanosoma brucei* via a glycosomal signaling pathway. *Genes & Development*, 24, 1306–1316.
- Suaste-Olmos, F., Ziri6n-Mart6nez, C., Takano-Rojas, H., y Peraza-Reyes, L. (2018). Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865, 572–586.
- Takano-Rojas, H., Zickler, D., y Peraza-Reyes, L. (2016). Peroxisome dynamics during development of the fungus *Podospora anserina*. *Mycologia*, 108, 590–602.
- Terlecky, S. R. y Titorenko, V. I. (2009) Introduction: New roles for the peroxisome in cell development, differentiation, morphogenesis, and aging. in Terlecky, S. R. Y Titorenko, V. I. (eds.) *Emergent Functions of the Peroxisome*, *Research Signpost*, 1-4.
- Thompson-Coffe, C., s Zickler, D. (1994). How the Cytoskeleton Recognizes and Sorts Nuclei of Opposite Mating Type during the Sexual Cycle in Filamentous Ascomycetes. *Developmental Biology*, 165, 257–271.
- Titorenko, V. I., Ogrzydziak, D. M., y Rachubinski, R. A. (1997). Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 5210–5226.
- Tripathi, D. N., y Walker, C. L. (2016). The peroxisome as a cell signaling organelle. *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 109-112.
- Vasnier, C., de Muyt, A., Zhang, L., Tesse, S., Kleckner, N. E., Zickler, D., y Espagne, E. (2014). Absence of SUN-domain protein Slp1 blocks karyogamy and switches meiotic recombination and synapsis from homologs to sister chromatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), E4015–E4023.
- Wang, X., Li, S., Liu, Y., y Ma, C. (2015). Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biology*, 4, 104–108.
- Williams, C., Van Den Berg, M., Sprenger, R. R., y Distel, B. (2007). A Conserved Cysteine Is Essential for Pex4p-dependent Ubiquitination of the Peroxisomal Import Receptor Pex5p. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22534–22543.
- Williams, C., Van Den Berg, M., Panjikar, S., Stanley, W. A., Distel, B., y Wilmanns, M. (2011). Insights into ubiquitin-conjugating enzyme/ co-activator interactions from the structure of the Pex4p:Pex22p complex. *The EMBO Journal*, 31, 391–402.
- Zamudio-Arroyo, J. M., Pe6a-Rangel, M. T., y Riesgo-Escobar, J. R. (2012). La ubiquitinaci6n: un sistema de regulaci6n dinámico de los organismos. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biol6gicas*, 15(2), 133–141.
- Zickler, D., Arnaise, S., Coppin, E., Debuchy, R., y Picard, M. (1995). Altered mating-type identity in the fungus *Podospora anserina* leads to selfish nuclei, uniparental progeny, and haploid meiosis. *Genetics*, 140, 493–503.