



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La proteína PxdA en el transporte y la función peroxisomal durante el crecimiento y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
L.Q.I. Daniela Campiño Arias

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Jesús Aguirre Linares, Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. Leonardo Peraza Reyes, Instituto de Fisiología Celular
Dr. Juan Pablo Pardo, Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria, CD. MX. Abril, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 107 Oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del proyecto IV200519 (PAPIIT-UNAM) y CONACYT-DFG 277869.

Agradezco a los miembros del comité tutor quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo, el cual estuvo conformado por:

Dr. Jesús Aguirre Linares (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dr. Leonardo Peraza Reyes (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dr. Juan Pablo Pardo (Facultad de Medicina, UNAM)

Agradezco al jurado que fue conformado por:

Presidente: Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg Torres

Vocal: Dra. Rosa Estela Navarro González

Vocal: Dra. Eria Rebollar Caudillo

Vocal: Dr. Mario Alberto Serrano Ortega

Secretario: Dr. Luis Cardenas Torres

Agradezco al valioso apoyo de la Bióloga Alma Olivia Sánchez Gonzáles por el acompañamiento y apoyo técnico brindado desde mi llegada al laboratorio. A la Unidad de Imagenología del IFC-UNAM, a la Dra. Verónica Garrido Bazán por el grandioso apoyo con la microscopía confocal.

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanas, mis sobrinos y los demás miembros de mi familia, que estando lejos estuvieron apoyándome y llenándome de fuerza, amor y confianza en todo momento.

A mis amigos y amigas, tanto los de acá como los que están lejos, que me han acompañado en cada uno de mis pasos, por cada palabra de motivación y por el apoyo incondicional que me han brindado.

A Vero, Emilio, Fabián, Nallely y Ulises, que hicieron de mi estancia en el laboratorio un lugar lleno de alegría.

Al Dr. Jesús y a Olivia por cada enseñanza, paciencia y dedicación.

Índice

Resumen	1
Introducción.....	2
1 Los peroxisomas como organelos multifacéticos	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Funciones de los peroxisomas.....	4
1.3 Los peroxisomas y su importancia en el mantenimiento del equilibrio entre la producción y la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ERO)	6
2 La biogénesis de los peroxisomas	9
3 Los peroxisomas y su relación con otros organelos celulares	12
4 El transporte endosomal	14
4.1 PxdA, una proteína de unión para el transporte de los peroxisomas a través de los endosomas	16
5 <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio	18
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Materiales y Métodos	23
Resultados.....	38
1. La eliminación de la proteína PxdA afecta el movimiento y distribución de los peroxisomas.	38
2. Las mutantes $\Delta pxdA$ muestran defectos en el crecimiento y la diferenciación celular asexual y sexual.	40
3. El gen <i>pxdA</i> se requiere para el crecimiento y desarrollo asexual normales.	43
4. La carencia de la proteína PxdA resulta en una mayor producción de cuerpos fructíferos (cleistotecios) durante el desarrollo sexual, los cuales se colapsan en baja humedad y muestran una menor producción de esporas meióticas.	46
5. La mutante $\Delta pxdA$ no es sensible al estrés oxidante causado por el H ₂ O ₂ o la menadiona.	54
6. La falta de movimiento peroxisomal no afecta notablemente la distribución de las mitocondrias, el retículo endoplásmico o la proteína DnmA	55

7. La carencia de la proteína PxdA no afecta la herencia mitocondrial ni la herencia del retículo endoplásmico durante el desarrollo asexual en el hongo.....	59
8. La carencia de movimiento peroxisomal sí afecta la herencia de los peroxisomas durante la formación de las esporas asexuales.....	62
Discusión	64
Conclusiones.....	71
Perspectivas	72
Referencias bibliográficas	73

Acrónimos y abreviaturas

AGCL: Ácidos grasos de cadena larga

AGCML: Ácidos grasos de cadena muy larga

CL: Cuerpos lipídicos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ET: Endosomas tempranos

MIT: Mitocondria

MM: Medio mínimo

mRNA: RNA mensajero

PMP: proteínas de membrana peroxisomal

PX: Peroxisoma

RE: Retículo endoplásmico

RNA: Ácido ribonucleico

Resumen

Los peroxisomas son organelos que tienen importantes funciones en la fisiología celular, entre las que se destacan la β -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de lípidos especializados, la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la síntesis de metabolitos secundarios. Originalmente, los peroxisomas se consideraron compartimentos aislados con funciones específicas. Sin embargo, recientemente se ha observado que hay una gran interacción entre los peroxisomas (PX), los endosomas tempranos (ET), los cuerpos lipídicos (CL), el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias (MIT). En el hongo *Aspergillus nidulans*, los PX son transportados por los ET a través del citoesqueleto de microtúbulos. Este transporte depende de la proteína PxdA, la cual une a los PX con los ET. Sin embargo, se desconoce si los defectos en el movimiento peroxisomal afectan la interacción de los PX con otros organelos celulares, y si tienen efecto sobre el crecimiento y la diferenciación celular en los hongos. En este trabajo generamos mutantes carentes de la proteína PxdA ($\Delta pxdA$) y los caracterizamos con respecto a la distribución de los PX durante el crecimiento, el desarrollo y la dinámica mitocondrial. Asimismo, determinamos los patrones de crecimiento y diferenciación asexual y sexual en dichas mutantes. Nuestros resultados muestran que la carencia de PxdA no afecta notablemente el número de PX en glucosa o en oleato como fuente de carbono, pero sí afecta la distribución, ya que hay una mayor acumulación de los PX en la punta de las hifas. Dicha acumulación no afecta notablemente la distribución de las MIT o de la dinamina DnmA, la cual se requiere para la división mitocondrial y peroxisomal. Sin embargo, la carencia de PxdA causa una disminución en el crecimiento radial, la esporulación asexual y la herencia de los PX durante la formación de las esporas asexuales. En comparación con la cepa silvestre, las mutantes $\Delta pxdA$ producen un mayor número de cuerpos fructíferos (cleistotecios) durante el desarrollo sexual. Sin embargo, dichos cleistotecios se colapsan en un ambiente de baja humedad y forman una gran cantidad de tejido ascógeno que no se diferencia, lo cual se traduce en una muy baja producción de esporas meióticas. Estos resultados sugieren que la distribución celular de los PX juega un papel importante en el crecimiento y la diferenciación celular de *Aspergillus nidulans*.

Introducción

1 Los peroxisomas como organelos multifacéticos

1.1 Generalidades

Las células eucariotas presentan una compartimentalización de sus componentes que permiten separar diversos procesos celulares. Los organelos son compartimentos celulares que se encuentran rodeados por una membrana que permite aislar su contenido del citosol. Los peroxisomas (PX) son organelos celulares que poseen una membrana bilipídica y que, en su gran mayoría, presentan forma esférica u ovoidal con un tamaño aproximado de 0.1-1.0 μm de diámetro. Sin embargo, el número y forma de los PX varía según la etapa del desarrollo, el tipo de metabolismo o diferentes condiciones ambientales (Sacanelles, 2008). Los PX se describieron por primera vez en 1954 por Rhodin (Rhodin, 1954). Posteriormente De Duve descubrió varios tipos de PX (De Duve y Baudhuin, 1966), denominados en conjunto como microcuerpos: glucosomas, glioxisomas y PX (Sacanelles, 2008), que difieren entre sí por adaptaciones a algunas funciones metabólicas. Los glucosomas se encuentran en organismos de la clase Kinetoplastea, grupo de protistas flagelados, como el tripanosoma, que contienen enzimas para la conversión de glucosa en 3-fosfoglicerato y otras enzimas involucradas en la reutilización de las purinas. Los glioxisomas difieren en que contienen enzimas encargadas del ciclo del glioxilato y se encuentran principalmente en plantas, hongos y algunos protistas. En hongos filamentosos, estos diversos tipos de PX, también incluye a los cuerpos de Woronin que provienen de los PX y se encuentran en estrecha asociación con el poro septal, que lo ocluyen cuando ocurren daños en las hifas, evitando la pérdida de grandes cantidades de citoplasma (Markham *et al.*, 1987).

Cuando Christian De Duve identificó en estos corpúsculos de células de mamífero algunas enzimas como oxidasas y catalasas involucradas en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, los nombró PX (De Duve y Baudhuin, 1966); este contenido diverso de enzimas, sustratos y cofactores, provoca que se formen matrices densas que pueden formar núcleos cristaloides

electrodensos (**Figura 1**). Los PX generalmente son esféricos, pero pueden mostrar formas alargadas o incluso pueden formar retículos en algunos tipos de células y en ciertas condiciones ambientales (Grabenbauer *et al.*, 2000). Además, estos organelos se encuentran relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos (Lodhi y Semenkovich, 2014), ya que se ha observado que el proceso de β -oxidación de ácidos grasos en mamíferos y en hongos se lleva a cabo tanto en las mitocondrias (MIT) como en los PX (Wanders *et al.*, 2010), mientras que en plantas y levaduras este proceso ocurre principalmente en los PX (Masterson y Wood, 2001).

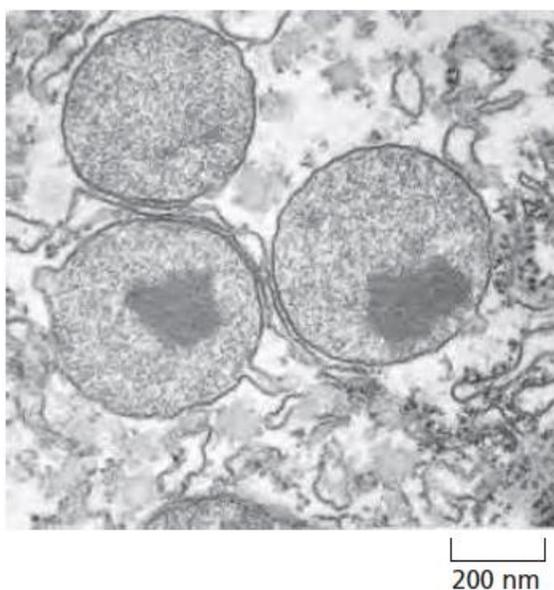


Figura 1. Micrografía electrónica de tres PX en células de hígado de ratón. Los PX se encuentran en todas las células eucariotas y se destacan en las micrograffas electrónicas debido a la presencia de un núcleo cristaloide (Alberts *et al.*, 2008).

La descomposición de los ácidos grasos en los PX conduce a la formación de H_2O_2 y otras especies reactivas del oxígeno (ERO), incluidos los radicales superóxido y el radical hidroxilo. Por lo tanto, se requiere de una serie de enzimas antioxidantes que permitan mantener el equilibrio entre la producción y la eliminación del H_2O_2 , como las catalasas y las peroxirredoxinas.

Los PX contienen proteínas de membrana, como las peroxinas, que están encargadas de la biogénesis y la maduración de los PX, y proteínas de la matriz como enzimas metabólicas y de desintoxicación (Lodhi y Semenkovich, 2014). Sin embargo, hoy en día se conocen muchas otras funciones, en las cuales los PX juegan un papel fundamental para el metabolismo (**Figura 2**).

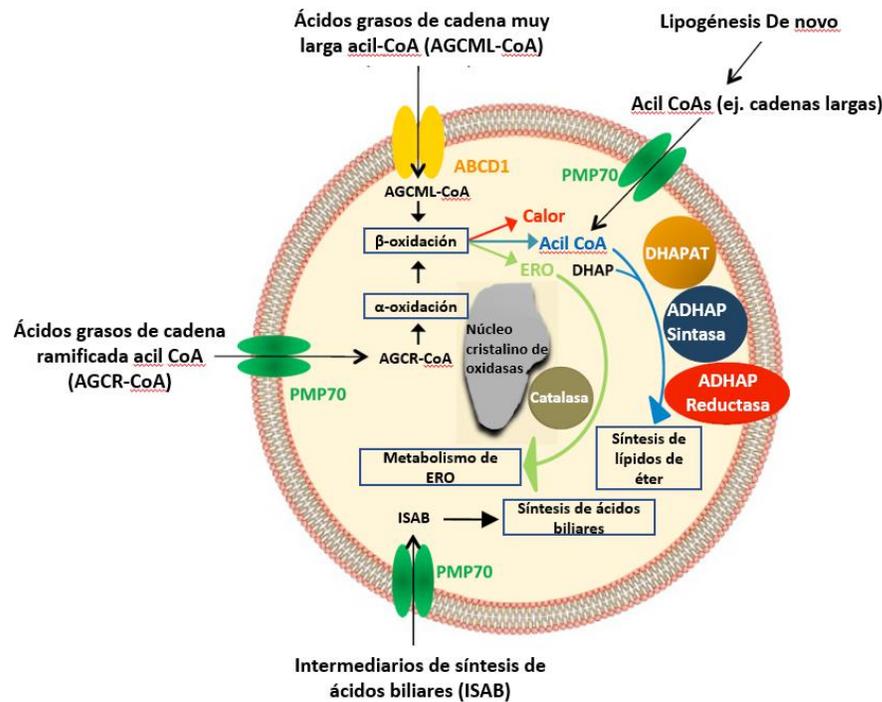


Figura 2. El peroxisoma es un organelo que juega un papel importante en el metabolismo.

Las principales funciones metabólicas de los PX en las células eucariotas incluyen la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, y la eliminación del H_2O_2 . En células de animales se ha observado que participan en la α -oxidación de los ácidos grasos de cadena ramificada, la síntesis de ácidos biliares y de fosfolípidos unidos a éter. Los PX en muchos tipos de células, pero no en todos,

contienen un núcleo cristalino denso de oxidasas (Modificado de Lodhi y Semenkovich, 2014).

1.2 Funciones de los peroxisomas

Las funciones de los peroxisomas varían según el tipo de célula y la etapa del desarrollo, este último aplicado tanto para animales como para otros eucariotas. En la mayoría de los eucariotas se requieren para la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y la degradación, por catalasa, del peróxido de hidrógeno (Farré *et al.*, 2019) (**Figura 2**). En los hongos son importantes para la utilización de determinadas fuentes de carbono como los ácidos grasos de cadena larga, la patogénesis, y una parte del metabolismo secundario. Por otro lado, en células de mamíferos se ha observado que participan en la α -oxidación de ácidos grasos específicos (**Figura 2**), el catabolismo de poliaminas, prostaglandinas, eicosanoides y en la biosíntesis de esteroides y plasmalógenos. Estos últimos son críticos para la formación de mielina y el desarrollo del cerebro (contribuyen más del 80% del contenido de fosfolípidos en la materia blanca del cerebro) (Sacanelles, 2008). Debido a esto, se ha comprobado que las deficiencias de PX provocan graves enfermedades en humanos, como errores en la respuesta antiviral (Dixit *et*

al., 2010), cáncer (Dahabieh *et al.*, 2018), y anomalías neurodegenerativas como el síndrome de Zellweger (Eckert y Erdmann, 2003).

En el hongo *Aspergillus nidulans* se ha demostrado que la β -oxidación ocurre tanto en los PX como en las MIT (Maggio-Hall y Keller, 2004). Se ha observado que mutantes incapaces de llevar a cabo la β -oxidación peroxisomal presentan una inhibición parcial del crecimiento en ácidos grasos de cadena larga (C18:1) como fuente de carbono, sin que su crecimiento en ácidos grasos de cadena corta (C4-C6) se vea afectado. Tal es el caso de mutantes carentes del gen *foxA*, el cual codifica una proteína con actividad de 2-enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa peroxisomal, homóloga de la proteína multifuncional Fox2p de *S. cerevisiae*. En los hongos los PX poseen una amplia versatilidad y dinamismo funcional. Además de los papeles compartidos con la mayoría de eucariotas, en los hongos filamentosos los PX participan en otras vías metabólicas como la biosíntesis de metabolitos secundarios como los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas) (Bartoszewska *et al.*, 2011), la biosíntesis de biotina y de sideróforos (Wu *et al.*, 2021), la asimilación del metanol (van der Klei *et al.*, 2006) y se requieren para la diferenciación de las estructuras infecciosas como los apresorios (Kimura *et al.*, 2001).

Existe otra clase de PX que no cumple funciones metabólicas, a los cuales se les ha nombrado cuerpos de Woronin. Estos presentan funciones mecánicas de taponamiento para evitar el “sangrado” citoplásmico de las hifas y de esta forma prevenir la muerte del micelio. En *Neurospora crassa*, aparecen como cuerpos hexagonales en la célula y, tras el daño celular, tapan los poros septales después de unos segundos (Jedd y Chua, 2000).

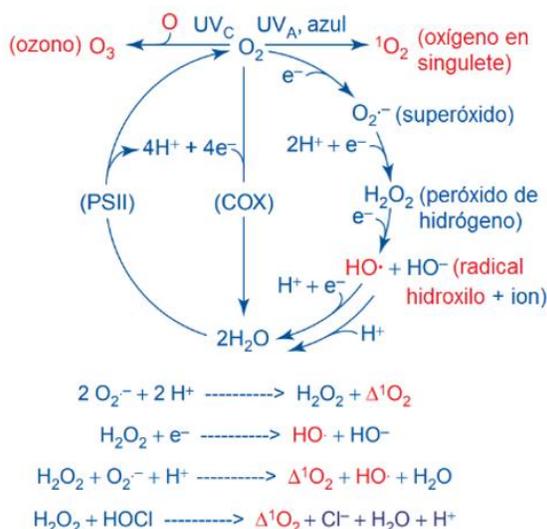
Los PX tienen una función importante en el desarrollo de los hongos filamentosos, así como en la formación de esporas sexuales y asexuales. Los PX pueden facilitar la canalización de nutrientes desde estructuras multicelulares diferenciadas asexuales, como en el hongo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* en el cual los cuerpos fructíferos (denominados apotecios) consisten en grandes estructuras en forma de copa formadas por un disco donde se incrustan los tejidos sexuales; en este hongo la apotecia no surge del micelio, sino de una segunda estructura multicelular diferenciada conocida como esclerocio (estructuras asexuales que son como agregados de hifas densamente empaquetados) (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). Por otro lado, durante el desarrollo sexual, los hongos han agotado los nutrientes externos

disponibles y por ende pasan a una fase estacionaria. Esto hace que se requieran de los nutrientes de reserva (carbohidratos y lípidos) que contienen las células vegetativas que crecieron previamente, lo que da como resultado unas células diferenciadas necesarias para la formación de los cuerpos fructíferos, durante el ciclo sexual (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). Los lípidos de reserva que tienen los hongos filamentosos se encuentran almacenados principalmente como triacilgliceroles en los CL, que son derivados del RE y tienen comunicación directa con las MIT y los PX (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013).

1.3 Los peroxisomas y su importancia en el mantenimiento del equilibrio entre la producción y la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ERO)

El consumo de oxígeno molecular (O_2) es indispensable para llevar a cabo los procesos metabólicos de los organismos aerobios, como la producción de energía en forma de ATP en la fosforilación oxidativa y en donde el O_2 participa como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria. En este proceso, se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) como subproductos. Las ERO se forman a partir de la excitación del O_2 o de su reducción parcial (Aguirre *et al.*, 2005) (**Figura 3**).

(A) Mecanismos de producción de ERO



(B) Eliminación de O_2^- y H_2O_2

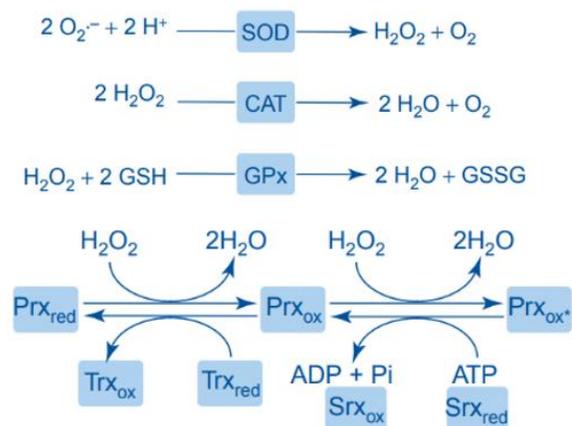


Figura 3. Mecanismos de producción de ERO y de eliminación del superóxido y el peróxido de hidrógeno. (A) Las ERO se pueden producir por excitación (O , 1O_3 , 1O_2) o por reducción (O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$) del O_2 . Las especies en rojo son más reactivas.

El O_2 se genera por el fotosistema II (PSII) en las plantas, cianobacterias y la mayoría de las algas y es reducido por la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (COX). El superóxido sólo reacciona consigo mismo, con el óxido nítrico y con otros radicales. El peróxido de hidrógeno reacciona con algunas de las cisteínas de algunas proteínas y los centros hierro-azufre de ciertas proteínas. No obstante, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden formar espontáneamente oxígeno en singulete y radical hidroxilo, que son mucho más reactivos. Se muestran las principales reacciones del oxígeno en singulete y del peróxido de hidrógeno. (B) El superóxido es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno es descompuesto por las catalasas (CAT), las peroxidases, como la glutatión peroxidasa (GPx), y por las peroxirredoxinas (Prx). El grupo tiol de una cisteína sensible en una Prx se oxida en ácido sulfénico (Prx_{ox}), el cual es reducido por una tiorredoxina reducida (Trx_{red}). El ácido sulfénico en la Prx_{ox} puede ser oxidado por el peróxido de hidrógeno a ácido sulfínico; el cual puede ser reducido nuevamente a ácido sulfénico por la sulfirredoxina reducida (Srx_{red}) y ATP (Modificado de Aguirre *et al.*, 2005).

El O_2 en su estado basal (conocido también como estado de triplete) es capaz de recibir un electrón adicional, formando el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (**Figura 3**), ya sea mediante NADPH oxidasas (NOX), el catabolismo de las purinas mediada por la enzima xantina oxidasa, o la cadena de transporte de electrones en las MIT (Aguirre *et al.*, 2005). La producción de superóxido ocurre principalmente en el sitio de la coenzima Q de la NADH deshidrogenasa (NADH DH) en el Complejo I, aunque también se ha documentado su producción en los complejos II y III pero en menor proporción (Kehrer *et al.*, 2010). El superóxido reacciona con pocos compuestos biológicos, esto debido a su rápida dismutación que es llevada a cabo fisiológicamente por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Winterbourn, 2020), generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (**Figura 3**). El H_2O_2 es por lo tanto el producto de dos electrones adicionados al O_2 en su proceso de reducción, tiene cierta permeabilidad a través de las membranas. Puede reaccionar con metales de transición, especialmente Cu^{+2} y Fe^{+2} , produciendo el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el cual reacciona con casi cualquier molécula biológica, provocando daños celulares (**Figura 4**). Así, las ERO se encuentran relacionadas con daños al DNA, las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares, y también se han implicado en procesos de carcinogénesis, de neurodegeneración (Dexter *et al.*, 1994), aterosclerosis (Harrison *et al.*, 2003), diabetes (Newsholme *et al.*, 2016) y de envejecimiento (Haigis y Yankner, 2010; Vigneron y Vousden, 2010). Todo esto indica una delicada relación entre la producción y la eliminación de ERO en los organismos. El término estrés oxidante se utiliza para designar el desequilibrio debido al aumento en los niveles de las ERO o a una disminución de la capacidad antioxidante celular.

Notablemente, también se ha descrito la importancia de las ERO como señales utilizadas por las células para regular el crecimiento, la diferenciación celular, la inmunidad, la muerte celular, la

transducción de señales y el transporte de iones (Aguirre *et al.*, 2005). Es así como en diferentes organismos, la presencia de las ERO y la inducción de mecanismos antioxidantes se encuentran relacionados con el desarrollo de estos.

Los PX participan en la producción y degradación de las ERO, debido a que la oxidación de diversos sustratos se realiza mediante oxidasas consumidoras de O_2 que producen estas especies reactivas de oxígeno. Estos organelos cuentan con actividad de catalasa y de otras enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, algunas peroxirredoxinas y las Cu/Zn-SOD y Mn-SOD superóxido dismutasas (**Figura 3** panel B, **Figura 4**) (Bonekamp *et al.*, 2009). La catalasa, la glutatión peroxidasa y la peroxirredoxina V (PMP20) participan en la eliminación del H_2O_2 .

Además, dentro de los PX también se producen especies reactivas de nitrógeno (ERN) durante el proceso de oxidación de la L-arginina a óxido nítrico (Bonekamp *et al.*, 2009), en células animales.

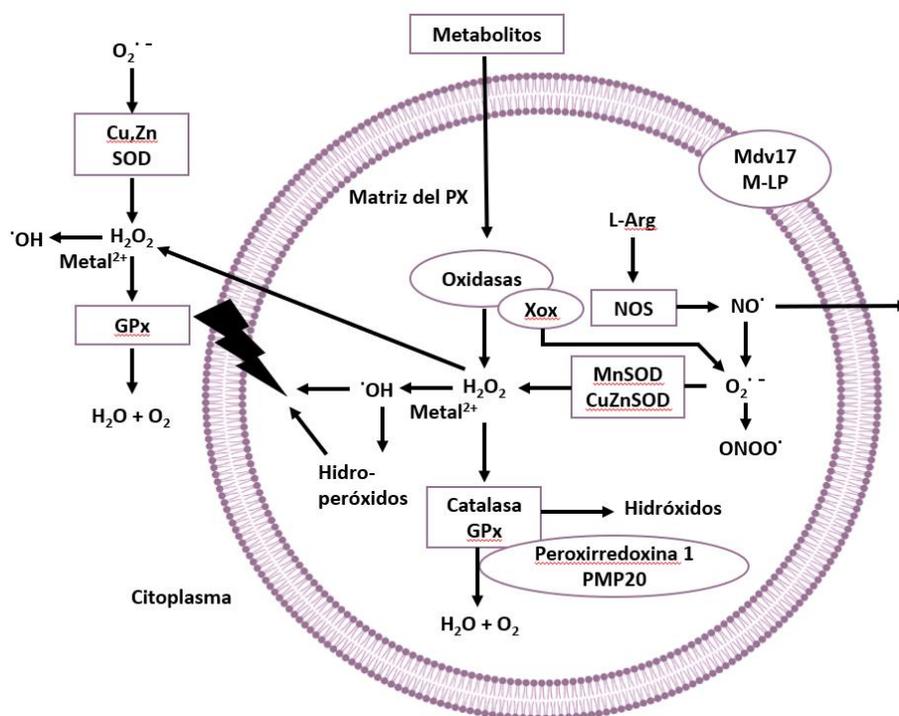


Figura 4. Esquema de la producción y eliminación de las ERO en los PX: El H_2O_2 es producido principalmente por diversas oxidasas peroxisomales (por ejemplo la Acil-CoA oxidasa que participa en la β -oxidación de los ácidos grasos). El H_2O_2 se descompone por la catalasa y la glutatión-peroxidasa (GPx) o se convierte en radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Los radicales hidroxilo pueden dañar la membrana peroxisomal por peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados. Los hidroperóxidos formados en este proceso se pueden descomponer mediante la glutatión-peroxidasa. Los aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$) generados por oxidasas

peroxisomales (por ejemplo, la xantina oxidasa (XOx)) son eliminados por la superóxido-dismutasa de manganeso (MnSOD) y por la superóxido-dismutasa de cobre-zinc (CuZnSOD). En células animales, la óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación de L-arginina (L-Arg) a óxido nítrico (NO·) y citrulina. NO· puede reaccionar con los radicales $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), que se descompone en presencia del glutatión. La peroxiredoxina 1 y la PMP20 están involucradas en la degradación del H_2O_2 . Mpv17 y M-LP (Mpv17-like protein), proteínas de membrana peroxisomal, están implicadas en la regulación del metabolismo de las ERO y en la regulación de las enzimas antioxidantes, MnSOD y GPx, en mamíferos (Iida *et al.*, 2006) (Modificado de Schrader y Fahimi, 2006).

2 La biogénesis de los peroxisomas

La biogénesis y la maduración de los PX está mediada por proteínas denominadas peroxinas, codificadas por los genes PEX. Los PX, a diferencia de otros organelos celulares como la MIT o los cloroplastos, no contienen DNA ni una maquinaria independiente para la síntesis de proteínas, por lo tanto, las proteínas peroxisomales son codificadas en el núcleo y sintetizadas en el citoplasma. Este proceso de biogénesis de los PX es esencial y existen varios trastornos y enfermedades producidas por falta de PX o por deficiencias en el metabolismo en el cual están implicados estos organelos. Los defectos atribuidos a una deficiencia del PX incluye diversos grupos de complementación del síndrome de Zellweger (Eckert y Erdmann, 2003) y otras anomalías neurodegenerativas. Además, las alteraciones en la biogénesis de los PX, son la causa de diversos padecimientos en humanos que llevan a la muerte durante la infancia (Sacanelles, 2008).

La membrana de los PX contiene proteínas de membrana peroxisomal (PMP), las cuales son primordialmente proteínas de transporte de metabolitos y proteínas peroxisomales, llamadas genéricamente peroxinas (Smith y Aitchison, 2013).

El proceso de formación de los PX consta del ensamblaje de la membrana peroxisomal, la importación de proteínas a la matriz y la multiplicación de los organelos. Durante los últimos años, la biogénesis de los PX ha sido un tema controvertido, sin embargo, se ha demostrado que la biogénesis de los PX puede ocurrir mediante dos vías: los PX se pueden formar *de novo* a través de la fusión heterotípica de vesículas que surgen del RE y a través del crecimiento y división (fisión) de los PX preexistentes, y ambas vías coexisten en la célula (Smith y Aitchison, 2013) (**Figura 5**).

En el proceso de formación *de novo* de los PX se producen vesículas provenientes del RE, mediante un mecanismo de transporte vesicular. Estas vesículas son heterotípicas, lo que indica que hay dos clases de vesículas pre-peroxisomales que contienen diferentes peroxinas, las cuales se fusionan una vez generadas por el RE. En los estudios realizados en fibroblastos por Sugiura y colegas (2017) se comprobó que, en fibroblastos de mamíferos carentes de PX, los receptores de importación esenciales Pex3 y Pex14 se dirigen a las MIT, los cuales se liberan posteriormente en estructuras vesiculares pre-peroxisómicas. La maduración de estas vesículas pre-peroxisómicas que contienen Pex3 y Pex14 provenientes de las MIT requieren la fusión con vesículas derivadas del RE que llevan Pex16, lo que proporciona la maquinaria de importación completa. Estos hallazgos demuestran la naturaleza híbrida de los PX generados *de novo*, expandiendo sus vínculos funcionales con las MIT (**Figura 5**).

Para llevar a cabo la incorporación de proteínas para la maduración del peroxisoma, es necesario que las vesículas heterotípicas se fusionen, ya que cada una de ellas contiene subcomplejos de la maquinaria de importación (proteínas del complejo de acoplamiento y del complejo de ubiquitilación RING). La fusión parece ser selectiva y las vesículas pre-peroxisómicas no pueden fusionarse con los PX maduros, una restricción que podría asegurar las proporciones molares correctas de los componentes de la maquinaria de importación en los PX maduros (Smith y Aitchison, 2013).

Posterior a la fusión de vesículas, se inicia el proceso de maduración que se da a través de fusión con otras vesículas que surgen del RE (diferentes a las mencionadas anteriormente) (Smith y Aitchison, 2013) y la síntesis de las PMP que se lleva a cabo en los ribosomas del citosol, las cuales son transportadas a las membranas de los PX. Este proceso de incorporación de las PMP depende de las peroxinas Pex3 y Pex19 (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). Por otro lado, la importación de proteínas hacia el espacio luminal de los PX se basa en un segundo grupo de peroxinas asociadas a la membrana del peroxisoma que forman colectivamente el complejo de importación y las peroxinas Pex5 y Pex7, que funcionan como chaperonas reconociendo una secuencia PTS1 y PTS2, respectivamente, en las proteínas que son sintetizadas en el citosol y se dirigen hacia el lumen peroxisomal (Smith y Aitchison, 2013).

El mecanismo de fisión es la otra vía de generación de los PX, la cual está mediada por la peroxina Pex11 (PexK en *A. nidulans*), una proteína conservada que recluta la maquinaria

encargada de la división de los PX. En esta maquinaria participan factores involucrados en la división de las MIT, incluidas la proteína relacionada con dinamina Dnm1, conocida como Drp1 en células animales y DnmA en *A. nidulans*, una GTPasa que se ensambla en la superficie de las MIT y de los PX y es esencial para la división de estos organelos. También se encuentran las proteínas que interactúan con Dnm1, como la de fisión mitocondrial Fis1 y el factor de fisión mitocondrial (MFF) (Smith y Aitchison, 2013). Los mecanismos moleculares de la fisión peroxisomal constan de varios pasos. Primero, Pex11 (PEX11 β en mamíferos) se activa mediante una fosforilación que facilita la interacción con Fis1 (Knoblach y Rachubinski, 2010) y media la tubulación de los PX. El estado oligomérico de Pex11 (monomérico versus dimérico) es sensible al estado redox celular y esto podría coordinar la división de los PX en la maduración (Smith y Aitchison, 2013). Posteriormente, las proteínas que interactúan con Dnm1 ancladas a la membrana se enriquecen en la membrana alargada del peroxisoma. A continuación, la membrana se contrae y Dnm1, reclutada del citosol por las proteínas que interactúan con ésta, promueven la escisión de la membrana para formar nuevos PX (**Figura 5**).

M. Hynes y colegas (2008) cancelaron los genes codificantes para algunas proteínas peroxinas, demostrando que las mutantes nulas pueden crecer en acetato como fuente de carbono, pero su crecimiento se ve afectado en ácidos grasos de cadena larga. Además, mostraron también la importancia de los PX para la germinación de los conidios, donde las mutantes carentes de peroxinas muestran una tasa reducida de germinación, un crecimiento inicial más lento, y un tamaño de colonia más pequeño en comparación con las cepas silvestres, incluso en medio con glucosa como fuente de carbono.

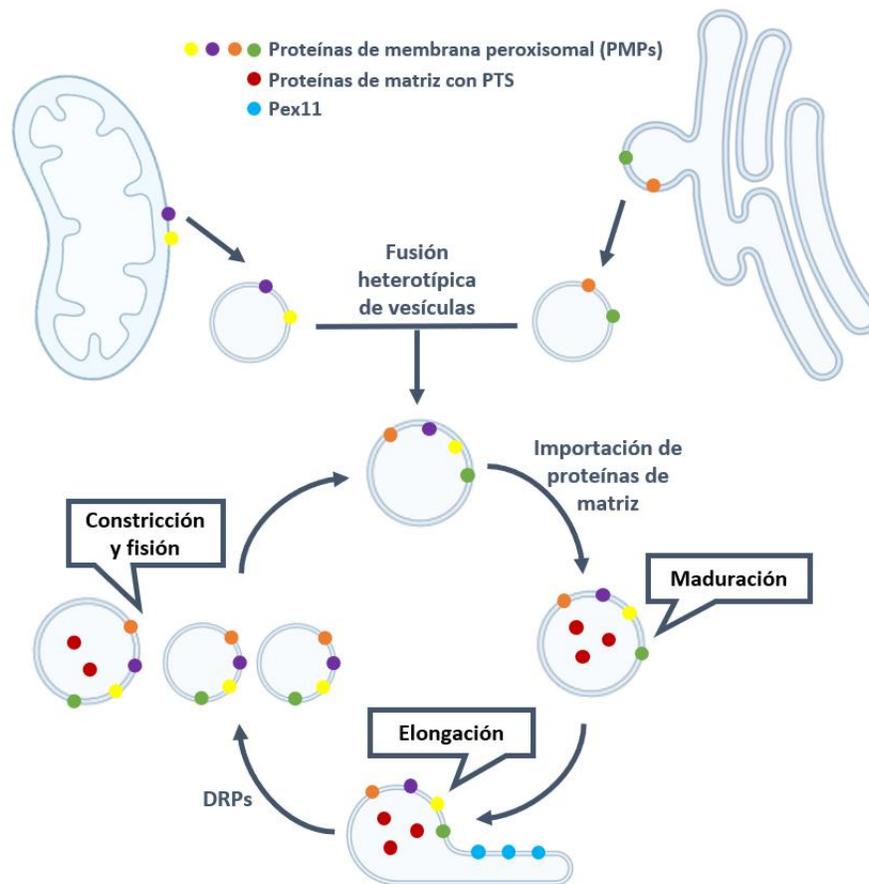


Figura 5. Modelo de biogénesis de los PX. Los PX se forman *de novo* a partir del RE y las MIT a través de la gemación y la fusión heterotípica de vesículas. Estas vesículas contienen proteínas peroxinas que permiten la importación de otras PMP a la membrana peroxisomal. En los PX tempranos se importan proteínas de la matriz y esto induce la formación de los PX maduros. Los PX maduros se pueden multiplicar por crecimiento, con proteínas y membranas del RE y por fisión mediada por Pex11. Este evento de fisión comienza por la remodelación y elongación de la membrana causada por Pex11. La extensión alargada crece y adquiere las proteínas que interactúan con Drp1, se contrae la membrana y esto facilita la fisión para la generación de los nuevos PX (Modificado de Smith y Aitchison, 2013; Sugiura *et al.*, 2017).

3 Los peroxisomas y su relación con otros organelos celulares

Debido a las funciones que los PX cumplen en el metabolismo, la mayoría de las vías involucradas requieren de una interacción con otros organelos celulares como las MIT, el RE y los CL. De hecho, la proximidad de estos organelos es un requisito para la transferencia de

intermediarios metabólicos, aunque algunos metabolitos también se pueden transportar a través de vesículas. Los mecanismos mediante los cuales se mantienen los sitios de contacto de membrana entre distintos organelos es un tema de estudio actual que permitirá comprender patologías de algunas enfermedades como la distrofia retiniana (degeneración de la retina con progresión a ceguera) que surge de una variante patogénica del complejo ACBD5 peroxisomal, que es necesario para los puntos de contacto con el retículo. La leucodistrofia progresiva, el dismorfismo facial y los niveles plasmáticos elevados de AGCML (ácidos grasos de cadena muy larga) son otras patologías asociadas con la pérdida de estos sitios de contacto (Sargsyan y Thoms, 2020).

Las imágenes de microscopía electrónica de los PX de hongos, plantas y mamíferos demuestran que las membranas peroxisomales se yuxtaponen con las de otros organelos, principalmente el RE, la membrana plasmática, los CL, los cloroplastos y las MIT (Schrader *et al.*, 2013). El RE forma vesículas para el proceso de maduración de los PX, pero también se ha observado que hay una transferencia no vesicular de fosfolípidos hacia los PX, un mecanismo bidireccional que puede regular la cantidad y composición de los lípidos en las membranas peroxisomales (Shai *et al.*, 2016). Por otro lado, en la levadura las uniones PX-RE también son fundamentales para la herencia peroxisomal durante el proceso de gemación, en el cual los sitios de contacto se dan a través de la peroxina Pex3 peroxisomal y la peroxina Pex3 en el RE, unidas por Inp1. Este sitio de unión permite que algunos PX se queden en la célula madre mientras que otros son transportados a la célula hija por Myo2 a través de filamentos de actina (Shai *et al.*, 2016).

Los PX y las MIT comparten también la misma maquinaria de fisión, lo que sugiere una división coordinada bajo ciertas condiciones y exige un reclutamiento organizado de las proteínas implicadas en este proceso (Shai *et al.*, 2016).

Debido a la participación de los PX en el metabolismo de los lípidos, se han observado sitios de contacto entre estos organelos y los CL, en un proceso mediado por la peroxina Pex5, lo que permite que la lipasa ATGL se dirija a los sitios de contacto y lleve a cabo la lipólisis en presencia de señales de ayuno (Kong *et al.*, 2020).

4 El transporte endosomal

A medida que las células crecen y se multiplican, se requiere que los componentes celulares se vayan distribuyendo adecuadamente. Estas funciones espaciales y mecánicas dependen del citoesqueleto, un sistema de filamentos que se clasifica en tres familias: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios (Alberts *et al.*, 2008). Los hongos filamentosos tienen un crecimiento polarizado y forman hifas bastante largas, por lo tanto, se requiere de un buen transporte de organelos a través del citoesqueleto para sostener un crecimiento rápido y polarizado.

Los microtúbulos son polímeros polarizados de aproximadamente 25 nm de diámetro compuestos por dímeros de una proteína globular, llamada tubulina (α -tubulina y β -tubulina) (Alberts *et al.*, 2008). Esta polaridad intrínseca de los microtúbulos se da por un extremo negativo, también conocido como centro de nucleación, mientras que el extremo positivo constituye el sitio de polimerización. Tanto en las levaduras como en los hongos filamentosos, una estructura incrustada en la membrana nuclear conocida como cuerpo del polo del huso (SPB, por sus siglas en inglés) actúa como centro organizador de microtúbulos (Xiang y Plamann, 2003). La polimerización de los microtúbulos en *A. nidulans* se inicia en los septos y una subclase de los PX están relacionados con la formación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) septal. La proteína asociada a MTOC, ApsB, interactúa con la proteína HexA de los cuerpos de Woronin y entra en los PX a través de una secuencia de dirección peroxisomal PTS2 (Zekert *et al.*, 2010).

Para poder llevar a cabo la distribución de los componentes celulares durante el crecimiento y en las diferentes etapas del metabolismo, existen dos clases de proteínas motoras que se mueven a través de microtúbulos, las dineínas y las kinesinas. Estas moléculas se encargan del desplazamiento de diferentes componentes como organelos o vesículas, las últimas que pueden ser secretoras o ET (Alberts *et al.*, 2008). Los diferentes miembros de la familia de las kinesinas llevan cargas específicas a lo largo de los microtúbulos hacia el polo positivo, mientras que miembros de las dineínas transportan su carga desde la periferia celular hacia los extremos negativos yuxtenucleares de los microtúbulos ubicados en el MTOC (Walenta *et al.*, 2001).

En *A. nidulans* han demostrado la movilidad bidireccional que tienen los ET a través de la maquinaria de transporte por microtúbulos, mediada por los motores citoplasmáticos dineína/NudA y cinesina-3a/UncA (Egan *et al.*, 2012), donde la proteína HookA funciona como adaptadora para la vinculación de los ET a la dineína, para el movimiento de larga distancia (**Figura 6**) (Zhang *et al.*, 2014). Adicionalmente, se han encontrado que diversos adaptadores moleculares unen diferentes cargos con los ET y es así como los PX, CL, y el RE dependen de una proteína que permita su unión con los ET para el movimiento intracelular en los hongos filamentosos (Guimaraes *et al.*, 2015; Salogiannis, Egan, y Reck-Peterson, 2016).

Los ET participan en la vía endocítica, siendo éstos los primeros compartimentos que aceptan la carga entrante internalizada desde la membrana plasmática. Al fusionarse con vesículas endocíticas y vacuolas digestivas producen los endosomas tardíos. En los hongos filamentosos es importante el mantenimiento de esta vía endocítica para el crecimiento de la hifa (Shaw *et al.*, 2011). Para evitar el exceso de compuestos de la membrana y de proteínas implicadas en la fusión de vesículas, se realiza un proceso de reciclaje de membrana apical donde los ET hace parte de esto mediante la vía de endocitosis compensadora. Por estas razones el Spitzenkörper, un centro de suministro de vesículas que se encuentra en el ápice del crecimiento de la mayoría de los hongos filamentosos, tiene detrás una región que se denomina como collar de endocitosis subapical necesaria para el crecimiento de la hifa (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2011).

Por otro lado, los ET también se han caracterizado por ser cotransportadores de mRNA con ribosomas asociados a su superficie. En *Ustilago maydis* reportaron que Rrm4 funciona como una proteína clave para este transporte de los mRNA, con el fin de distribuir correctamente mRNA y las proteínas a lo largo de la hifa, cuando ésta se encuentra en crecimiento (Jankowski *et al.*, 2019).

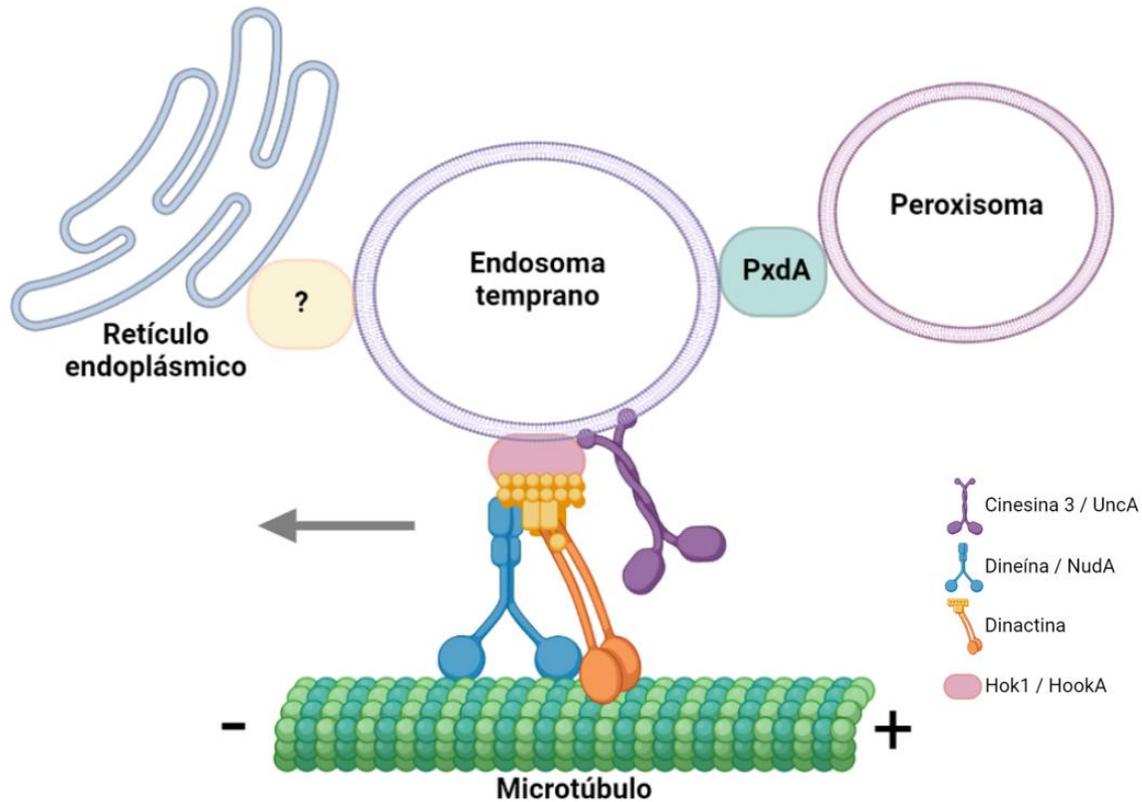


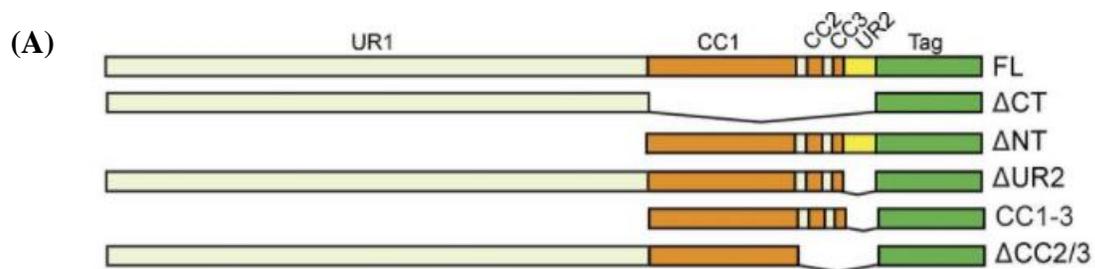
Figura 6. Modelo del transporte endosomal en hongos filamentosos. Los ET son transportados por los microtúbulos a través de un mecanismo coordinado entre las proteínas motoras y asociadas. Estos organelos, además de sus funciones intrínsecas de degradación y endocitosis, cumplen funciones de vehículos para cotransportar diferentes proteínas, mRNA, ribosomas, PX, y RE, a través de la maquinaria de microtúbulos. Este modelo representa un consenso de los datos reportados en *U. maydis* y *A. nidulans* (Guimaraes *et al.*, 2015; Salogiannis, Egan, y Peterson, 2016; Salogiannis y Reck-Peterson, 2016).

4.1 PxdA, una proteína de unión para el transporte de los peroxisomas a través de los endosomas

PxdA (AN1156) es una proteína con una región “coiled-coil” necesaria para la distribución y el movimiento de largo alcance de los PX a través de la hifa (**Figura 6**). Esta proteína se co-localiza con los ET, los cuales migran junto con los PX. Las mutantes nulas en el gen *pxdA* tienen defectos en el movimiento de los PX y por lo tanto en la distribución de estos mismos, pero no en el movimiento de los ET o los núcleos (Salogiannis, Egan, y Peterson, 2016), lo cual causa además una acumulación de los PX en la punta de la hifa en mutantes carentes del gen (**Figura 7**, panel B). PxdA es una proteína de 2,236 aminoácidos que contiene un tramo de ~600-aa de

dominios de espirales (CC1-3), flanqueados por una gran región no caracterizada N-terminal (UR1) y una región no caracterizada C-terminal mucho más pequeña (UR2) (**Figura 7**, panel A). Los estudios realizados por Salogiannis y colegas sugieren que solo se requiere la región CC (CC1-3) de PxdA para la distribución y movilidad de los PX; además, se comprobó que CC2/3 es fundamental para la localización de PxdA en los ET y que la unión de PxdA a los ET es necesaria para la distribución y el movimiento adecuados de los PX (Salogiannis, Egan, y Peterson, 2016). Aún no se conocen los detalles de la unión, pero se estima que la región coiled-coil actúa como una ligadura física que se acopla a los ET a través de un domino BAR (proteínas citosólicas Bin/Amphiphysin/Rvs) (Salogiannis y Reck-Peterson, 2016), capaz de unirse a las superficies curvas como las membranas bilipídicas por medio de unos residuos cargados positivamente en su lado cóncavo, a través de interacciones electrostáticas (Van Weering y Cullen, 2014).

Un estudio reciente reporta que el movimiento de los PX depende de otra proteína adicional, una fosfatasa denominada DipA (Salogiannis *et al.*, 2021). Las mutantes carentes de esta fosfatasa presentan el mismo fenotipo en la movilidad de los PX que una mutante carente de *pxdA*. DipA es una metalofosfatasa que participa en el desarrollo asexual en los hongos interactuando con la denedilasa DenA/Den1 en puntos móviles en el citoplasma.



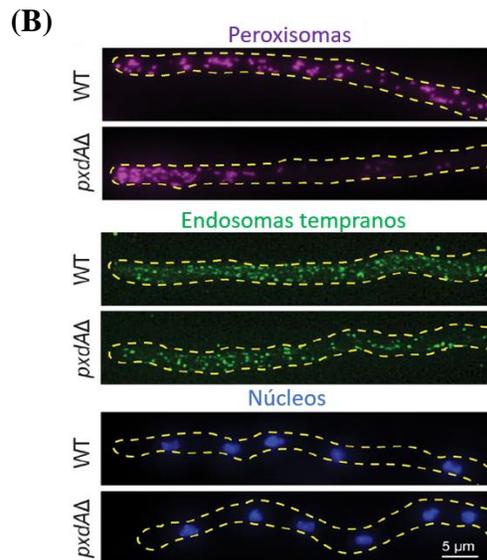


Figura 7. La proteína PxdA es importante para el movimiento de los PX a través de los microtúbulos. (A) Esquema de diferentes construcciones realizadas en estudios previos utilizadas para analizar la estructura-función de PxdA. UR1 (blanco) y UR2 (amarillo) están en los extremos N y C, respectivamente. Las regiones pronosticadas de la bobina en espiral (CC1, 2 y 3) se indican en naranja. La región en espiral de PxdA (naranja) es necesaria y suficiente para la motilidad del peroxisoma y el autostop endosomal. (B) Las mutantes nulas de PxdA con los PX, ET y núcleos marcados con proteínas fluorescentes, indican que la deficiencia de esta proteína sólo afecta al movimiento de los PX.

Las características fenotípicas de una mutante carente del gen *pxdA* indican su importancia en el movimiento y distribución de los PX a través de largas distancias. Sin embargo, la importancia del movimiento de los PX durante el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans* no ha sido determinada con anterioridad, por lo que en este trabajo decidimos abordar estas preguntas.

5 *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso homotálico (Pontecorvo *et al.*, 1953) que pertenece al género de los hongos ascomicetos estrictamente aerobios, ubicuos en la naturaleza. Su gran diversidad metabólica permite el estudio de procesos catabólicos y biosintéticos. Además, su fácil manipulación genética, ha permitido realizar estudios que han contribuido a entender un amplio abanico de procesos biológicos. El crecimiento vegetativo que presenta es de tipo apical perpolarizado que permite la formación de largos filamentos denominados hifas, y muestra ramificación lateral en los compartimentos celulares más posteriores de la hifa. Las células vegetativas de *A. nidulans* son sincicios nucleados, donde cada núcleo contiene la misma

información genética, a excepción de los casos específicos de heterocariones que poseen núcleos genéticamente diferentes.

A. nidulans tiene en total 8 cromosomas (Clutterbuck A.J., 1969), un genoma relativamente pequeño (30 Mb) completamente secuenciado y disponible en el Aspergillus Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org/>). En el ciclo de vida de este hongo, se pueden diferenciar tres fases de desarrollo (**Figura 8**): vegetativa, sexual y parasexual. La fase de vida vegetativa inicia con la germinación de una espora asexual (conidio) o sexual (ascospora), que da lugar a la formación de hifas tubulares que crecen por extensión apical hiperpolarizada, y forman un entramado de hifas interconectadas, a lo que se le denomina micelio, el cual en un medio sólido se expande simétricamente formando colonias de forma más o menos radial. Además, durante el proceso de diferenciación celular, se forman hifas aéreas especializadas o conidióforos, encargados de la esporulación asexual. Durante la diferenciación celular se da la formación de una célula alargada, denominada tallo, que se ancla al medio con una célula pie. Este tallo se alarga por extensión apical, de forma similar al crecimiento vegetativo, a una altura cercana de los 100 μm (Krijgheld *et al.*, 2013). En la punta del tallo se produce un hinchamiento que forma una vesícula en la que se llevan a cabo múltiples divisiones nucleares (Adams y Yu, 1998) para la formación de las mótulas. En cada mótula se producen otras gemaciones que originan de dos a tres células uninucleadas llamadas fiálides (Pontecorvo *et al.*, 1953), las cuales son las generadoras de grandes cadenas de conidios a través de gemaciones sucesivas (Adams y Yu, 1998).

A. nidulans es un hongo homotálico, lo que significa que los sexos no están separados y por lo tanto puede llevar a cabo el desarrollo sexual sin la necesidad de cruzarse con una pareja compatible (Krijgheld *et al.*, 2013). Este proceso se inicia aproximadamente 50 horas después de la germinación de los conidios en respuesta a diversos estímulos y cambios ambientales, como la hipoxia y la limitación de ciertos nutrientes en el medio. La formación de células Hülle, células nodrizas globosas y multinucleadas, es el primer signo del desarrollo sexual. Estas células tienen el papel de proveer protección y nutrición para la formación de los cuerpos fructíferos. Luego de la formación de las células Hülle, las hifas se fusionan para formar un dicarion, este proceso se denomina anastomosis, dando origen a un micelio heterocariótico en el caso de que los individuos que se fusionen tengan diferentes genotipos u homocariótico si es

una autofertilización. Posteriormente, una población de células dicarióticas se origina a partir de un evento de fusión de una sola célula y da lugar a un solo cleistotecio (cuerpos fructíferos del ciclo sexual). Las células Hülle rodean las células dicarióticas y forman un nicho muy compacto. Dentro de las últimas ramificaciones de las hifas dicarióticas, que representan a las ascas jóvenes, ocurren los eventos de fusión nuclear. Esto es seguido inmediatamente por una meiosis y una mitosis postmeiótica, resultando en ocho núcleos. Estos núcleos se separan uno de otro por membranas y dan origen a 8 ascosporas con un pigmento rojo. Los cleistotecios son estructuras multicelulares, pigmentados y redondos que contienen estas ascosporas (esporas sexuales) dentro de bolsas denominadas ascas (**Figura 8**). Los cleistotecios pueden contener de 1,000 a más de 10,000 ascosporas, dependiendo de si son producto de la autofecundación o de la cruce de dos cepas distintas. Una segunda mitosis postmeiótica hace que las ascosporas sean binucleadas (Krijgsheld *et al.*, 2013).

El ascomiceto filamentoso, *A. nidulans*, es un buen modelo biológico para el estudio de los PX debido a que posee una versatilidad funcional de estos organelos (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013) y, teniendo en cuenta que los PX se transportan en este hongo a través de los microtúbulos, también facilita el estudio de los mecanismos de transporte basados en este componente del citoesqueleto debido a su crecimiento polarizado (Egan et al., 2012). Además, *A. nidulans* tiene la capacidad de crecer en ácidos grasos como única fuente de carbono, lo que produce la proliferación de los PX en respuesta al oleato (Garrido-Bazán et al., 2020) facilitando el estudio del comportamiento de estos organelos.

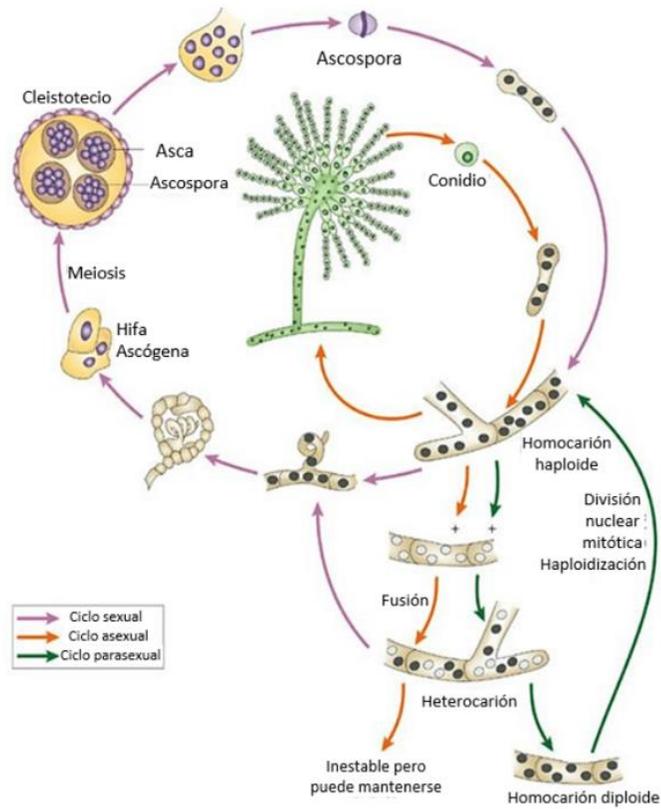


Figura 8. El ciclo de vida de *A. nidulans*. El ciclo de vida de *A. nidulans* se constituye por el crecimiento vegetativo y dos grandes procesos de diferenciación: el asexual, que se señala con flechas naranjas en la imagen y que culmina con la formación del conidióforo, y el sexual que se señala con flechas lila y que culmina con la formación de los cleistotecios. El crecimiento vegetativo resulta en la formación de un entramado de hifas llamado micelio, en el cual ocurre un primer evento de diferenciación con la formación del micelio aéreo seguido de la diferenciación asexual. (Modificado de Al-saigh, 2013)

Hipótesis

La correcta distribución de los peroxisomas, mediada por la proteína PxdA, es necesaria para el crecimiento y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*

Objetivo general

Determinar el papel de la proteína PxdA en la distribución celular de los peroxisomas, la distribución del retículo endoplásmico y las mitocondrias en el crecimiento y la diferenciación celular en *A. nidulans*.

Objetivos particulares

1. Determinar si el número, la dinámica y distribución de los peroxisomas afecta el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans*, mediante la obtención y caracterización de mutantes $\Delta pxdA$, con peroxisomas marcados.
2. Caracterizar la distribución y morfología del retículo endoplásmico, las mitocondrias y la proteína DnmA en mutantes $\Delta pxdA$.

Materiales y Métodos

Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *Aspergillus nidulans*.

Las cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1. Todas las cepas se cultivaron en medio mínimo (MM) (Hill y Kafer, 2001) con glucosa al 1 % y los suplementos requeridos para cada una de las cepas; los medios sólidos se prepararon con agar al 1.25 % y se incubaron a 37°C. Los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura en agitación a 300 rpm. Los medios de cultivo y el material usado se esterilizaron previamente a 121°C por 20 minutos.

Tabla 1. Cepas de *A. nidulans* empleadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen
11035	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB veA1</i>	M. Hynes, Nayak <i>et al.</i> , 2006
RPA520	<i>yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::AfpYRO]; [HH1::TagBFP::Afribo]; [TagGFP2::rabA::AfpYrG]; pyrG89; pyroA4; pabaA1; nkuAΔ::argB</i>	Tan K. <i>et al.</i> , 2014
TDC01	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔpxdA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	Este trabajo. 11035 transformada con la construcción <i>ΔpxdA::AfpYrG</i> contenida en el plásmido pDC1
TDC02	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔpxdA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	Este trabajo. 11035 transformada con la construcción <i>ΔpxdA::AfpYrG</i> contenida en el plásmido pDC1
CDC01	<i>yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::AfpYRO]; [HH1::TagBFP::Afribo]; [TagGFP2::rabA::AfpYrG]; pyrG89; pabaA1; ΔpxdA::AfpYrG nkuAΔ::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de TDC01 X RPA520

CDC02	<i>yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::Afpyro]; pyrG89; pabaA1; ΔpxdA::AfpyrG nkuAΔ::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de TDC01 X RPA520
CLK43	<i>pabaA1 yA2 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , (2002)
TDV1	<i>pabaA1 yA2 gpdA(p)::tom20::GFP::phleo veA1</i>	Este trabajo. CLK43 transformada con el plásmido pTom-GFP
CDV1	<i>pyrG89 pyroA4 gpdA(p)::tom20::GFP::phleo Δnkua::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de TVD1 X 11035
A26	<i>biA1, veA1</i>	FGSC (Fungal Genetics Stock Center)
TDC03	<i>gpdA(p)::BIP::GFP::phleo biA1, veA1</i>	Este trabajo. Cepa A26 transformada con el plásmido pAM01 (pBIP-GFP)
CDC03	<i>pabaA1 yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::Afpyro]; gpdA(p)::tom20::GFP::phleo; pyrG89; pabaA1; ΔpxdA::AfpyrG nkuAΔ::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X CDV1
TVG5	<i>pyrG89 pyroA4 dnmA::GFP::AfpyrG Δnkua::bar veA1</i>	Garrido (2020), sin publicar
CDC04	<i>yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::Afpyro]; dnmA::GFP::AfpyrG; pyrG89; pabaA1; ΔpxdA::AfpyrG nkuAΔ::argB veA1^a</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X TVG5
CDC05	<i>yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::Afpyro]; gpdA(p)::BIP::GFP::phleo; pyrG89; pabaA1; ΔpxdA::AfpyrG veA1^b</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X TDC03
CDC07	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 ΔpxdA::AfpyrG Δnkua::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de TDC01 X CLK43

CDC08	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 ΔpxdA::AfpYrG veA1</i>	Este trabajo. Progenie de TDC01 X CLK43
CDC09	<i>pabaA1 yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::AfpYrO]; gpdA(p)::tom20::GFP::phleo nkuAΔ::argB veA1</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X CDV1
CDC10	<i>pabaA1 yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::AfpYrO]; dnmA::GFP::AfpYrG nkuAΔ::argB veA1^a</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X TVG5
CDC11	<i>pabaA1 yA::[gpdA(p)::mCherry::FLAG-PTS1::AfpYrO]; gpdA(p)::BIP::GFP::phleo veA1^b</i>	Este trabajo. Progenie de CDC02 X TDC03

^a Podría contener *ΔnkuA::bar*

^b Podría contener *ΔnkuA::argB*

Extracción del DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a través de un cultivo del micelio del hongo de 14 a 16 horas de crecimiento a 37°C en medio líquido sin agitación. Para esto se inocularon esporas en medio líquido con suplementos en cajas de Petri. Luego de 12 horas de crecimiento estas esporas germinan y forman una película de micelio, el cual se recolectó y se secó en papel absorbente y se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL con un balín metálico pequeño. Esto se llevó a -70°C para congelarlas por una hora y posteriormente pulverizar el micelio en el TissueLyser (Qiagen, Hilden, Alemania) a 50 Hz por 3 minutos. A continuación, se adicionó 500 µL de buffer de lisis (50 mM Tris, pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1 % mercaptoetanol) y las muestras se calentaron a 65°C por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 100 µL de acetato de potasio 8 M invirtiendo de 8 a 10 veces los tubos para homogenizar, y se procedió a centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos en una microcentrífuga. Se separó el sobrenadante en tubos nuevos y se adicionaron 300 µL de isopropanol frío. Luego se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, y el pellet resultante fue lavado con soluciones de etanol a diferentes concentraciones, primero a 75% y posteriormente al 95% de etanol y cada uno de estos lavados fue procedido de una centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspendió en agua y se cuantificó por espectrofotometría de microvolumen usando un Nanodrop TM 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Eliminación del gen AN1156 (*pxdA*)

Se generó un vector para la eliminación del gen nativo AN1156 (ver esquema del vector en la **Figura 9**, panel **B**). Para esto, se utilizó el kit de clonación de InFusion® HD Cloning de Clontech (Cat#639649, Lot#1509499A) utilizando el protocolo indicado por el fabricante, el cual se realiza en un solo paso con cada uno de los productos de PCR que tienen en sus secuencias finales fragmentos para recombinación homóloga (se recomiendan entre 15 a 20 pb de región homóloga):

- a. Se usaron los cebadores VectForpxdA y VectRevpxdA (ver Tabla 2 de oligonucleótidos) para, por medio de PCR inversa, generar un fragmento lineal de 2,880 pb (**Figura 9**, panel **C**) del vector, tomando como templado el plásmido parental pMT-mRFP1 (**Figura 9**, panel **A**).
- b. Se usaron los cebadores 5primaForpxdA y 5primaRevpxdA (Tabla 2) para, utilizando DNA genómico de *A. nidulans*, amplificar una región de 1,499 pb río arriba del ORF PxdA (5'pxdA); y los cebadores 3primaForpxdA y 3primaRevpxdA para amplificar 1,499 pb río abajo de dicho ORF (3'pxdA). El marcador *pyrG* (*AfpyrG*) de *Aspergillus fumigatus* se amplificó con los cebadores pyrGForpxdA y pyrGRevpxdA, utilizando el plásmido PFNO3 como templado (**Figura 9**, panel **C**). Los cebadores utilizados contienen secuencias complementarias que permiten ensamblar los productos de PCR y clonar el producto final en el vector In-Fusion® HD, en una sola reacción.
- c. La clonación por InFusion® se hizo teniendo en cuenta las relaciones molares de los productos 5'pxdA y 3'pxdA con el marcador selectivo y el vector en una relación 2:2:2:1, respectivamente. La reacción se llevó a cabo por 15 minutos a 50°C, y el plásmido final esperado se muestra en la **Figura 9**, panel **B**.

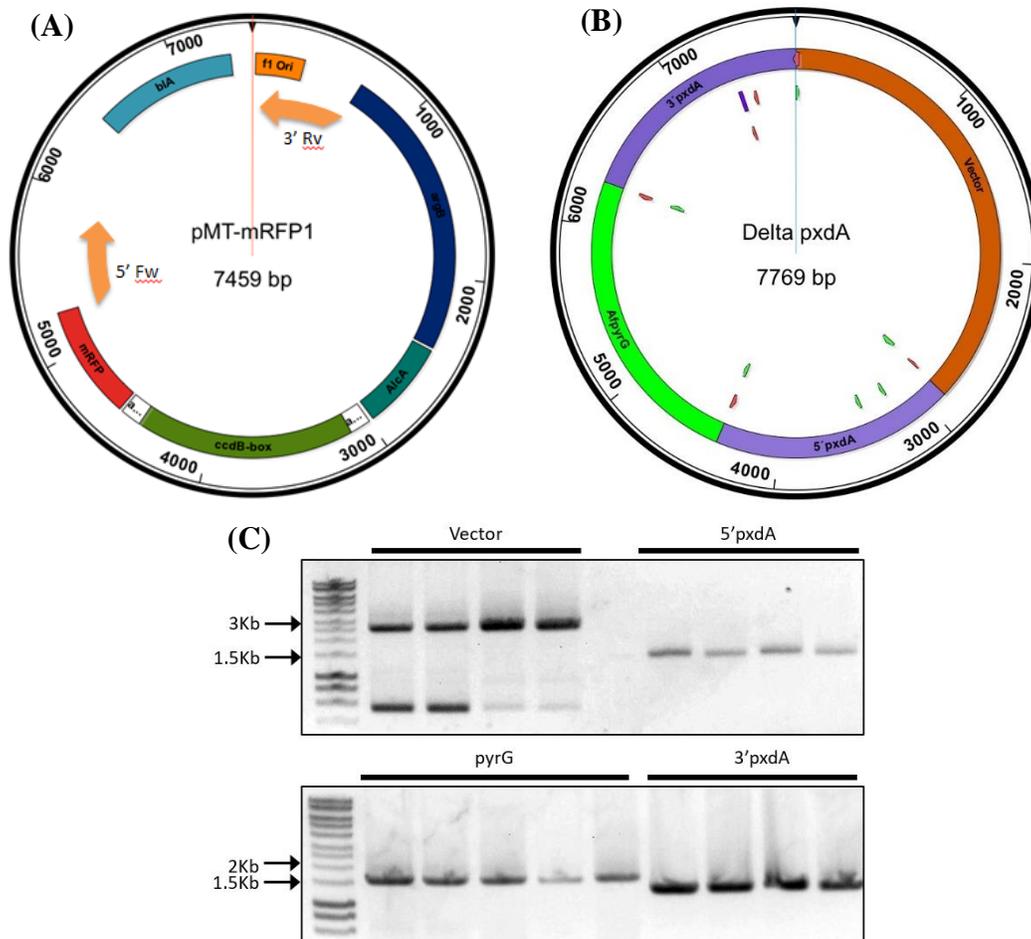


Figura 9. Mapa del plásmido parental, la construcción deseada y los productos de PCR utilizados para obtener el vector final para la cancelación del gen *pxdA*. (A) Esquema del plásmido parental pMT-mRFP1. Con las flechas se indican los oligonucleótidos divergentes empleados para obtener un vector lineal. En azul claro se muestra el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*. Fuera del gen a clonar se encuentra en azul oscuro el gen *argB*, que complementa la auxotrofia a arginina de cepas de *A. nidulans* con la mutación *argB2*; el promotor del gen inducible *alcA* en azul turquesa; y la etiqueta roja fluorescente mRFP. (B) Esquema del plásmido pDC1 ($\Delta pxdA$) esperado, en el cual se muestra el esqueleto del vector en color naranja, proveniente del parental mostrado en (A) en el cual se mantienen el gen *bla* y el origen de replicación *flOri*. Tamaño completo del vector esperado es de 7,769 pb. (C) Productos de amplificación. Para el esqueleto del vector parental con los oligonucleótidos indicados con las flechas en (A), se obtuvo un fragmento de 2,880 pb. Para las regiones río arriba y abajo del ORF a deletar (5' *pxdA* y 3' *pxdA*), se obtuvieron fragmentos de 1,449pb, y de 1,891 pb para el marcador selectivo *AfpyrG* (*pyrG* en la imagen). Los productos se purificaron y se usaron para la clonación direccional usando InFusion® HD Cloning.

- d. Las bacterias *E. coli* de la cepa TOP10 se utilizaron para la transformación a través de un procedimiento de debilitamiento de membrana y un choque térmico, como se describe a continuación: se mezclaron 2 μL del producto de la “ligación” InFusion con 50 μL de KCM (KCl 100 mM, CaCl 230 mM y MgCl₂ 50 mM esterilizado por filtrado y almacenado en alícuotas de 1.5 mL a -20°C), para posteriormente adicionar esta solución a 50 μL de células competentes *E. coli* TOP10. Se incubó en hielo por 30 minutos para proceder a realizar un choque térmico a 42°C por 2 minutos, y luego se adicionaron 500 μL de medio líquido LB a temperatura ambiente y se incubó por 1 hora en agitación a 37°C . Posteriormente, se adicionaron 70 μL a una caja con medio sólido LB con 0.1 mg/mL de ampicilina (antibiótico para seleccionar las bacterias que llevan el plásmido) y se incubaron a 37°C por 14 horas. Se observó el crecimiento de aproximadamente 30 colonias, 8 de las cuales se tomaron para picar e inocular 4 mL de medio líquido LB con 0.1 mg/mL de ampicilina y se creció durante 14 horas con agitación a 37°C .
- e. Una vez obtenidas las bacterias en el medio líquido, se realizó el procedimiento de extracción del plásmido para su comprobación según la técnica especificada por QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN.
- f. El plásmido resultante se confirmó mediante digestión con la enzima de restricción HindIII, dando el patrón de bandas esperado (5,818 pb, 1,602 pb, 219 pb y 133 pb, ver **Figura 10**). A este plásmido se le nombró pDC1.

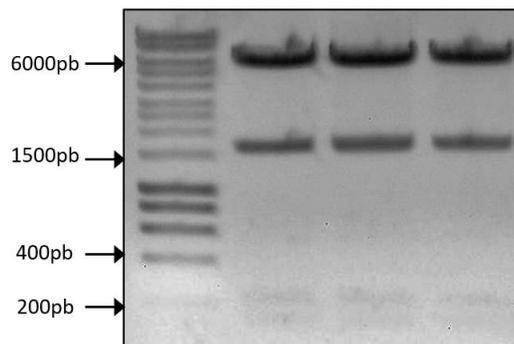


Figura 10. Comprobación del plásmido pDC1. Digestión realizada con la enzima de restricción HindIII a los plásmidos extraídos de tres colonias de bacterias transformadas. De acuerdo con los cuatro cortes específicos esperados, se observa el patrón de bandas de 5,818 pb, 1,602 pb, 219 pb y 133 pb (las bandas de 133 y 219 pb se ven leves en la parte inferior del gel). Se seleccionó uno de estos plásmidos y se nombró como pDC1.

Una vez confirmado el plásmido con la construcción $\Delta pxdA::Afp yrG$ (pDC1), se realizó un PCR con los cebadores NestForpxdA1 y NestRevpxdA1 para obtener un producto lineal de 4,085 pb, el cual se utilizó para transformar la cepa 11035 de *A. nidulans*, según se describe a continuación, y se obtuvieron dos transformantes nombradas TDC1 y TDC2.

Tabla 2. Oligonucleótidos de DNA utilizados en este trabajo

Cebadores	Secuencia
NestForpxdA1	CACGGAAGGTTGGTCAATCATTACC
NestRevpxdA1	CCTAGAAGTTCTAACCCCGGCTCTTGG
NestForpxdA2	CGCTCCGCCAATTCGCCGCGACTCG
NestRevpxdA2	CCTAGCCAGCAAGCAGACTACTTGG
VectForpxdA	GGTACCCAGCTTTTGTTCCTT
VectRevpxdA	GGCCGCCACCGCGGTGGA
5primaForpxdA	GCTCCACCGCGGTGGCGGCCTACGTACTGTAAAATAACCTTCTCT
5primaRevpxdA	TGTTTGAGGCCGTGTTTGGCTGTGGATCTT
pyrGForpxdA	GCCAAACACGGCCTCAAACAATGCTCTTCACCC
pyrGRevpxdA	TCTATCGGTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATG
3primaForpxdA	CCTCTCAGACTACCGATAGACTGTCTATAATCTTC
3primaRevpxdA	GGGAACAAAAGCTGGGTACCGCCAACCTTCCGCGTCAG
5DignkuA	GATGCTGTCCTTTTTGCC
3DignkuA	GCTGAAGAGTGCGAGACG
pGFPTomF	CTCGCCCTTGCTCACTTCGACACCGTGGTGGTCAG
pGFPTomR	TGAGCAGACATCACCATGAAGACCTCAACGTTGGCC
pGFPVF	GGTGATGTCTGCTCAAGCGG
pGFPVR	GTGAGCAAGGGCGAGGAGC

Tabla 3. Vectores utilizados en este trabajo

Vector	Descripción	Referencia
pMT-mRFP1	Contiene el gen <i>argB</i> como marcador de selección, el promotor inducible <i>alcA</i> para el control de la expresión y la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente. Confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> .	Toews <i>et al.</i> (2004)
pDC1	Contiene la construcción <i>pxdA::AfpYrG</i>	Este trabajo. Derivado del plásmido pMT-mRFP1
pAM01 (pBIP-GFP)	Contiene la construcción <i>gpdA(p)::BIP::GFP::phleo</i> (<i>gpdA(p)::KDEL BiP::GFP</i>)	Meizoso, López y Peraza, (2020)
pTOM20	Contiene la construcción <i>gpdA(p)::tom20::GFP::phleo</i>	Este trabajo. Derivado del plásmido pAM01 (pBIP-GFP)

Transformación de *A. nidulans* por electroporación de esporas

Para la generación de células electrocompetentes se utilizó el protocolo de Sánchez y Aguirre, (1996), procedimiento en el cual se sembraron 8 cajas a confluencia con medio mínimo y los suplementos requeridos para la cepa 11035 (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) y se incubaron a 37°C durante 6 a 7 días. Luego se rasparon las cajas con hisopos y se suspendieron en agua destilada estéril, recolectando todos los conidios de todas las cajas en dos tubos Falcon estériles. Se procedió a centrifugar a 6,000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante para luego adicionar 12 mL de agua estéril a cada tubo. Los conidios se resuspendieron y se concentraron en un tubo Falcon, para volver a centrifugar. Este procedimiento se repitió 5 veces. Finalmente, se resuspendieron los conidios en 2 mL de agua y se cuantificaron en la cámara de Neubauer, para calcular un total de 1×10^7 conidios/mL que fueron inoculadas en medio mínimo líquido más suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo). Se incubaron a 37°C con agitación (300 rpm) por dos horas. Posteriormente, los conidios se colectaron en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 15 mL de agua para concentrar las esporas. Se centrifugó nuevamente, y se decantó dejando un poco de agua para evitar la pérdida de esporas. Se procedió

a lavar los conidios con agua estéril fría en cada tubo (aproximadamente 50 mL de agua para cada uno), resuspendiendo las esporas y centrifugando nuevamente a las mismas condiciones. Se hizo este proceso tres veces. Después se decantó lo más posible de agua y se adicionaron 12.5 mL de solución buffer de pretratamiento frío (100 mL YED: extracto de levadura 1% y glucosa 1%, HEPES 20 mM, pH ajustado a 8.0 con Tris 100 mM) a cada tubo. Se suspendieron las esporas y se incubaron en agitación (100 rpm) a 30°C durante 1 hora. Luego se centrifugaron las muestras y se retiró el sobrenadante cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente se agregó 1 mL de solución amortiguador de electroporación frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 270 mM sacarosa, 1 mM acetato de litio) a cada tubo, se resuspendieron bien los conidios y se distribuyeron en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se congelaron a -70°C.

Ya obtenidas las células electrocompetentes se procedió a realizar la electroporación, para esto se descongelaron las células electrocompetentes en hielo y se hicieron alícuotas de 50 µL de células, a cada una de las cuales se adicionó aproximadamente 1 µg de DNA purificado. Para el control negativo se usaron 50 µL de células y 10 µL de agua estéril. Se mezcló bien realizando pipeteos lentos evitando hacer burbujas y después se incubó en hielo por 15 minutos. Cada una de las soluciones se pasaron a una celda de electroporación “0.2 cm cuvette” (Biorad, No. Cat. 1652086). Y se electroporaron a las siguientes condiciones: voltaje de 1.0kV, resistencia de 400Ω y capacitancia de 25µF, en el Gene Pulser II y el Controlador Pulser II (Biorad, Hercules, CA). Luego de la electroporación se adicionó 1 mL de YEG frío (extracto de levadura 1% y glucosa 1%) a la celda, se resuspendió bien y se pasó a un tubo estéril de 10 mL (este proceso se realizó con cada alícuota con la construcción y el control). Los tubos se incubaron a 30°C por 1.5 horas a 100 rpm. Finalmente, cada tubo se plaqueó a confluencia en tres placas con medio mínimo y requerimientos excepto aquel para el que se busca complementar la auxotrofia. Se dejaron secar y se incubaron a 37°C.

Cuantificación del número de conidios/cm²

Se recolectaron conidios de cajas a confluencia crecidas por 6 días de la cepa de interés. De estos conidios se inocularon 1×10^4 en el centro de placas con medio mínimo más suplementos, y se crecieron a 37°C por 6 días, teniendo en cuenta que al tercer y sexto días se determinó el

diámetro y el área de cada colonia. Se recolectaron los conidios de cada colonia con un hisopo en 10 mL de agua estéril, haciendo varios barridos con el mismo hisopo sobre la colonia para asegurar que se recolectaran todos los conidios. Este total de conidios se concentró en un volumen final de 1 mL y se cuantificó haciendo diluciones con agua y contando en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico, para obtener el número de conidios/mL. Con el dato del área se realizó el cálculo del número de conidios/cm².

Cuantificación del número de cleistotecios/cm²

Se recolectaron esporas de cajas a confluencia crecidas por 6 días de la cepa de interés. De estas esporas se inocularon 1×10^5 en 5 mL de medio mínimo con glucosa al 2% y 0.625% de agar DIFCO, más los suplementos requeridos por la cepa, en un tubo Falcon preincubado a una temperatura de entre 40 y 45°C. Se agitaron en vortex e inmediatamente se vertieron sobre cajas de Petri que contienen 20 mL de medio mínimo (2% de glucosa y 1.25% de agar DIFCO más suplementos) y que estaban pre-incubadas a 37°C. Posteriormente se incubaron por 12 horas, al cabo de las cuales se sellaron con cinta adhesiva con el propósito de limitar el oxígeno molecular e inducir el ciclo sexual. Para determinar el número de cleistotecios, se tomaron muestras con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro al octavo día después de haber sellado herméticamente las cajas (Laura Kawasaki et al., 2002). Se divide el sacabocado en 4 partes iguales, y se realiza el conteo de cantidad de cleistotecios en ese fragmento. Finalmente, con el dato del área se realizó el cálculo del número de cleistotecios/cm².

Ensayo de resistencia al estrés oxidante

Se recolectaron esporas de cajas a confluencia crecidas por 6 días de la cepa de interés. De estas esporas se inocularon 1×10^4 en el centro de placas con medio mínimo más suplementos, y con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y menadiona. La adición de estos agentes oxidantes se realizó luego de la esterilización del medio mínimo con suplementos a una temperatura de alrededor de 50°C, previo a verter el medio en las cajas de Petri. Las cajas se inocularon a 37°C por 5 días, al término de los cuales se determinó el diámetro de crecimiento de cada colonia.

Ensayos de crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Se recolectaron esporas de cajas a confluencia crecidas por 6 días de la cepa de interés. De estas esporas se inocularon 1×10^4 en el centro de placas con medio con diferentes fuentes de carbono (glucosa, oleato) más suplementos, y se inocularon a 37°C por 6 días, teniendo en cuenta que al tercer y sexto días se determinó el diámetro de las colonias.

Obtención de mutantes $\Delta pxdA$ con peroxisomas, mitocondrias, retículo endoplásmico o DnmA marcados

- Marcaje de PX con la proteína fluorescente mCherry:

La cepa RPA520 expresa la fusión *mCherry::FLAG-PTS1* desde el promotor constitutivo *gpdA* (Tan *et al.*, 2014). Esta construcción se encuentra integrada en el gen *yA* que codifica para una enzima (lacasa) necesaria para convertir el pigmento amarillo intermediario en la coloración verde madura de los conidios (O'Hara y Timberlake, 1989). Además, la cepa RPA520 contiene una etiqueta TagGFP fusionada a Rab5/RabA, marcando los endosomas; y una etiqueta TagBFP fusionada a la histona H1, para marcar los núcleos.

Para la obtención de una cepa con fondo genético $\Delta pxdA$ con los PX marcados con mCherry, se realizó una cruce entre la transformante TDC01 ($\Delta pxdA$) y la cepa RPA520 (ver Tabla 1 para genotipos), de la cual se obtuvo una progenie que fue seleccionada y purificada para la obtención de las cepas CDC01 y CDC02, ambas con PX marcados con mCherry, y la CDC01 con PX, endosomas y núcleos marcados (ver Tabla 1).

- Marcaje de retículo endoplásmico con la proteína fluorescente GFP:

Para etiquetar el retículo endoplásmico se usó el plásmido pAM01 (pBIP-GFP) (López-Fuentes *et al.*, 2020) que tiene la construcción *gpdA(p)::BIP::GFP::phleo*, donde el fragmento *GFP* se encuentra flanqueado por las señales de retención y dirección de retículo endoplásmico BiP, y a través del promotor constitutivo *gpdA* se expresa para marcaje del retículo a través de la proteína fluorescente GFP (**Figura 11**). Con este plásmido se transformó la cepa A26 y se

obtuvieron 7 transformantes. Se seleccionó la cepa TDC03 con el RE marcado, lo cual se comprobó por microscopía.

Posteriormente, para introducir el alelo *gpdA(p)::BIP::GFP::phleo* en un fondo genético $\Delta pxdA$, se realizó la cruce de la cepa TDC03 con la cepa CDC02 ($\Delta pxdA$ *mCherry::FLAG-PTS1*). La progenie obtenida de la cruce se analizó en el microscopio de epifluorescencia y se comprobó que contuvieran la señal GFP y mCherry, seleccionando la cepa CDC05 que tiene PX y RE marcados.

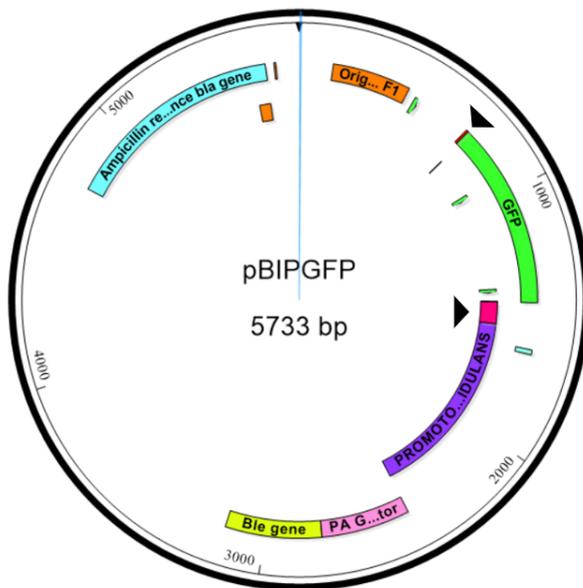


Figura 11. Esquema del plásmido pAM01 (pBIPGFP). Se muestra el gen *GFP* flanqueado por las señales de retención (fragmento pequeño en rojo que se indica con la flecha superior) y dirección del retículo endoplásmico BiP (fragmento rosa que se indica con la flecha inferior). El promotor constitutivo es *gpdA* de *A. nidulans* (violeta). Se muestra también la secuencia del gen *Ble* con su promotor constitutivo que otorga resistencia a la fleomicina.

- Marcaje de mitocondrias con la proteína fluorescente GFP:

Se generó un vector para el marcaje de las mitocondrias con la proteína fluorescente GFP unida a la secuencia de la proteína TOM20 que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Para esto, se utilizó el kit de clonación de InFusion® HD Cloning de Clontech (Cat#639649, Lot#1509499A) mencionado anteriormente.

- a. Se usaron los cebadores pGFPVF y pGFPVR para, por PCR inversa, generar un fragmento lineal de 5,622 pb utilizando como templado el vector parental (pBIPGFP sin secuencias de retención ni BIP, descrito en **Figura 12**, panel A) que fue modificado

previamente del vector pAM01 (pBIP-GFP) (López-Fuentes *et al.*, 2020), descrito anteriormente.

- b. Se usaron los cebadores pGFPTomF y pGFPTomR para, utilizando DNA genómico de *A. nidulans*, amplificar la región de 632 pb que corresponde al gen AN0559 que codifica un componente del complejo TOM (translocasa de la membrana externa mitocondrial) obteniendo un producto denominado TOM20. Los cebadores utilizados contienen secuencias complementarias que permiten ensamblar los productos de PCR y clonar el producto final en el vector In-Fusion® HD, en una sola reacción.
- c. La clonación por InFusion® se hizo teniendo en cuenta las relaciones molares de los productos TOM20 con el vector en una relación 2:1, respectivamente. La reacción se llevó a cabo por 15 minutos a 50°C, y el plásmido final esperado se muestra en la **Figura 12**, panel **B**.
- d. Se utilizaron las bacterias *E. coli* de la cepa TOP10 para el proceso de transformación con debilitamiento de membrana, como se describió anteriormente. En este caso se usó el producto de la “ligación” Infusion que contiene la construcción TOM20::GFP.
- e. Una vez obtenidas las bacterias en el medio líquido, se realizó procedimiento de extracción del plásmido para su comprobación según la técnica especificada por QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN.
- f. El plásmido resultante se confirmó mediante digestión con la enzima de restricción NcoI, dando el patrón de bandas esperado (1,800 pb, 4,454 pb). A este plásmido se le nombró pTOM-GFP.
- g. La cepa WT CLK43 se transformó con el plásmido pTom-GFP. Se obtuvieron 6 transformantes, de las cuales se seleccionó la transformante TDV1 que fue confirmada por el marcaje de las MIT a través de microscopía de epifluorescencia. Posteriormente, fue necesario realizar una cruce con la cepa 11035 para cambiar el fondo genético, obteniendo de la progenie seleccionada a la cepa CDV1 que fue cruzada luego con la cepa CDC02, para obtener progenie *ApxdA* con PX y MIT marcados. Se seleccionó la cepa CDC03.

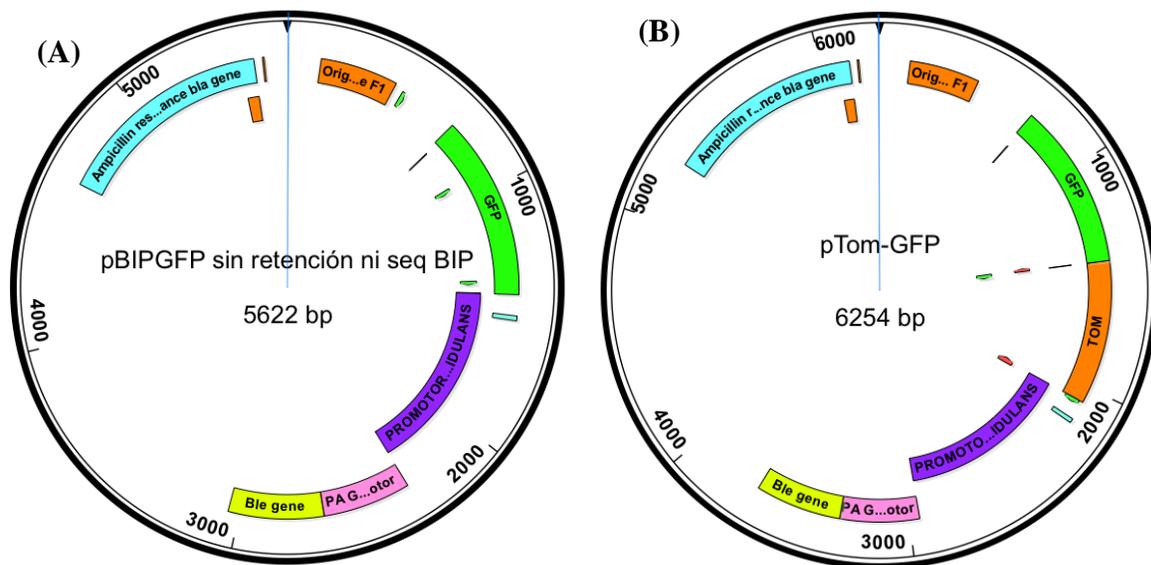


Figura 12. Mapa del plásmido parental pAM01 (pBIP-GFP) sin la secuencia de retención ni la secuencia BiP dirigidas al retículo endoplásmico, y la construcción deseada para marcar las MIT con proteína fluorescente GFP. (A) Esquema del plásmido parental (sin secuencia de retención ni secuencia BiP del plásmido pAM01 (pBIP-GFP) dirigida a retículo endoplásmico). En azul claro se muestra el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*. En amarillo se encuentra el gen *ble* bajo el control del promotor *gpdA* de *P. anserina* que se encuentra en rosa. En violeta se encuentra el promotor *gpdA* de *A. nidulans*. En verde la etiqueta de la proteína fluorescente GFP. En naranja se encuentra el origen de replicación *f1Ori*. (B) Esquema del plásmido pTOM-GFP esperado, en el cual se muestra el esqueleto tomado del vector parental mostrado en (A) con la secuencia de la proteína TOM20 unida a GFP. Tamaño completo del vector esperado es de 6,254 pb.

- Marcaje de DnmA con la proteína fluorescente GFP:

Se usó la cepa TVG5 que contiene el alelo *dnmA::GFP::AfpYrG* para realizar una cruce con la cepa CDC02 ($\Delta pxdA$). La progenie obtenida se analizó con microscopía de epifluorescencia y se seleccionó una cepa que tuviera un fondo genético $\Delta pxdA$, confirmada por PCR, que además tuviera el alelo *mCherry::FLAG-PTS1* para marcaje de PX y la proteína DnmA marcada con GFP. La cepa se llamó CDC04 (ver Tabla 1 para genotipo completo).

Microscopía

Las imágenes de microscopía se capturaron en experimentos *in vivo*. Para las observaciones realizadas por microscopía de epifluorescencia se usó un microscopio Nikon Eclipse E600 y una cámara Neo Andor Scmos con sistema de enfriamiento. Las imágenes obtenidas se procesaron empleando el programa ImageJ. Para las observaciones realizadas por microscopía confocal se utilizó el equipo Zeiss LSM 800 y para la edición de estas se utilizó el programa ZEISS ZEN.

Resultados

1. La eliminación de la proteína PxdA afecta el movimiento y distribución de los peroxisomas.

Para caracterizar los fenotipos provocados por la carencia de la proteína PxdA, se generaron mutantes $\Delta pxdA$, en las cuales se eliminó el gen *pxdA* (AN1156) a través de recombinación homóloga, utilizando el gen *AfpyrG* como marcador selectivo (**Figura 13**, panel A). Con el fragmento 5' *pxdA*-*AfpyrG*-3' *pxdA* (ver Materiales y Métodos) se transformó la cepa de *A. nidulans* 11035 y se obtuvieron dos transformantes nombradas TDC01 y TDC02, las cuales se confirmaron como mutantes $\Delta pxdA$ mediante PCR diagnóstica (**Figura 13**, panel B).

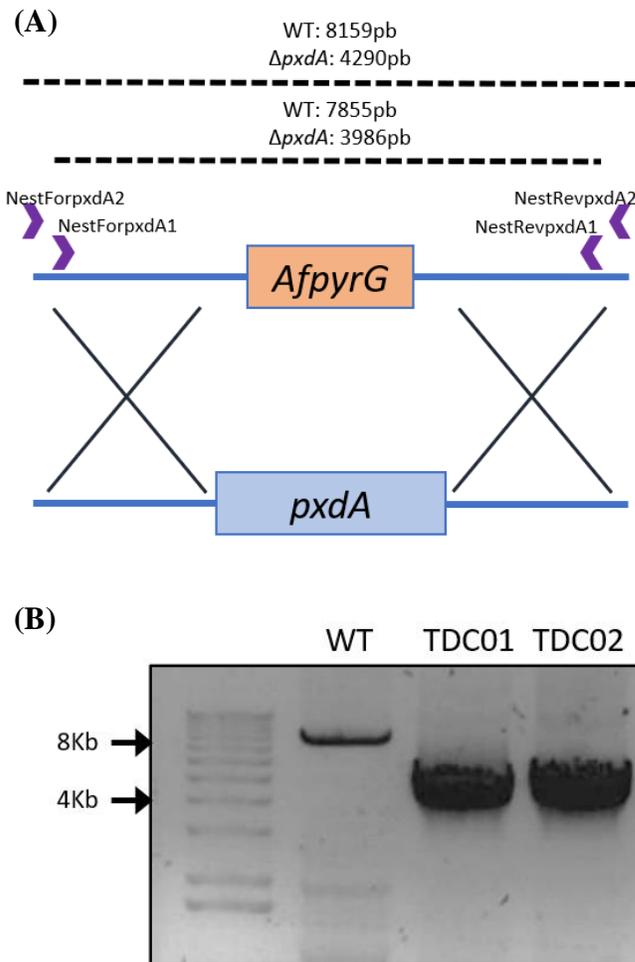


Figura 13. Obtención de las mutantes $\Delta pxdA$ TDC01 y TDC02. (A) Esquema de integración del marcador selectivo *AfpyrG* a través de la recombinación homóloga de secuencias río arriba y río abajo del gen *pxdA*. Se indica el tamaño de los productos de PCR esperados con los cebadores *NestForpxdA1* y *NestRevpxdA1* que muestran el tamaño del gen insertado, y los productos de PCR con los cebadores *NestForpxdA2* y *NestRevpxdA2* que corresponden al producto de confirmación con oligonucleótidos externos al gen insertado, utilizando como templado el DNA de la cepa receptora (WT) o de las cepas mutantes. (B) Resultado de las reacciones de PCR diagnóstica utilizando los cebadores *NestForpxdA2* y *NestRevpxdA2* y el DNA de la cepa receptora (WT) o de las transformantes TDC01 y TDC02 como templado. Se observan el tamaño de los fragmentos esperados para la mutación $\Delta pxdA$ (4290pb) y para la cepa silvestre o WT (8159pb).

Para la obtención de mutantes $\Delta pxdA$ con los PX marcados, se cruzó la transformante TDC01 con la cepa RPA520 (Tan *et al.*, 2014) que contiene los PX marcados con la proteína *mCherry::FLAG-PTS1* expresada desde el promotor constitutivo *gpdA*, construcción que se encuentra integrada en el gen *yA*. Además, la cepa RPA520 contiene núcleos y endosomas marcados, con una etiqueta de TagGFP fusionada a Rab5/RabA, marcando los endosomas; y una etiqueta TagBFP fusionada a la histona H1, para marcar los núcleos. De esta cruce se obtuvo progenie isogénica con los marcadores genéticos *yA* (esporas amarillas y los PX marcados con mCherry) y *pabaA1* (auxotrofia para ácido p-aminobenzoico). El DNA de distintos individuos de esta progenie con los ET, los PX y/o los núcleos marcados con fluorescencia, se utilizó como templado en reacciones de PCR diagnóstica con los cebadores NestForpxdA1 y NestRevpxdA1 para confirmar la eliminación del gen *pxdA* (Figura 14).

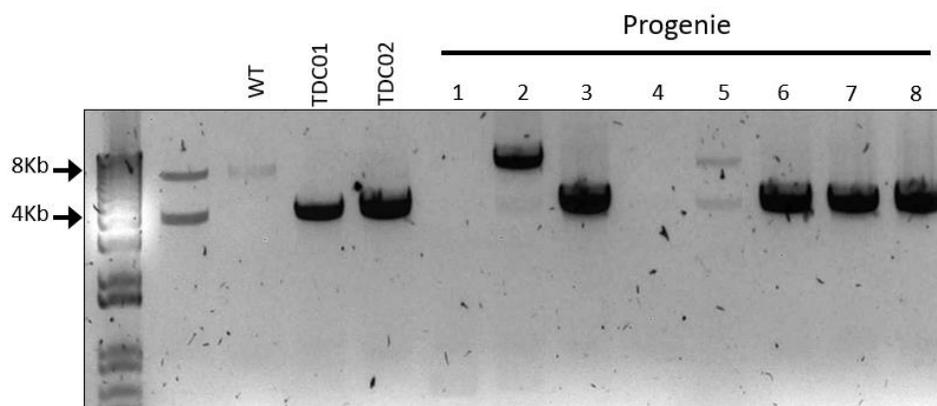


Figura 14. Confirmación de la mutación $\Delta pxdA$ por PCR diagnóstica en la progenie seleccionada de las cruces TDC01 X RPA. Se utilizó el DNA de la progenie de la cruce de las cepas TDC01 X RPA indicada como templado y los cebadores NestForpxdA1 y NestRevpxdA1 en las reacciones de PCR diagnóstica. Se observan los fragmentos del tamaño esperados para la mutación $\Delta pxdA$ (3,986 pb) y para el gen silvestre *pxdA* (WT, 7,855 pb).

Se seleccionaron las cepas 7 y 8 y se renombraron como CDC01 y CDC02, respectivamente (ver genotipos completos en la Tabla 1). Para comprobar que el fenotipo celular de la mutante obtenida coincidiera con lo reportado por Reck-Peterson y colaboradores (2016), se realizó un análisis de microscopía confocal para observar el comportamiento y la distribución de los PX en las mutantes carentes de la proteína PxdA. En la **Figura 15** se muestra la distribución de los PX en la cepa silvestre RPA520 (WT) en comparación con la cepa CDC01 ($\Delta pxdA$). Los resultados muestran que hay una mayor cantidad de PX acumulados en la punta de las hifas de

las mutantes $\Delta pxdA$. Este resultado coincide con lo reportado previamente por Reck-Peterson *et al* (2016), en donde la carencia de la proteína PxdA causó que los PX se acumularan en la punta de las hifas, debido a la falta del movimiento y la distribución de estos organelos a través del citoesqueleto de los microtúbulos.

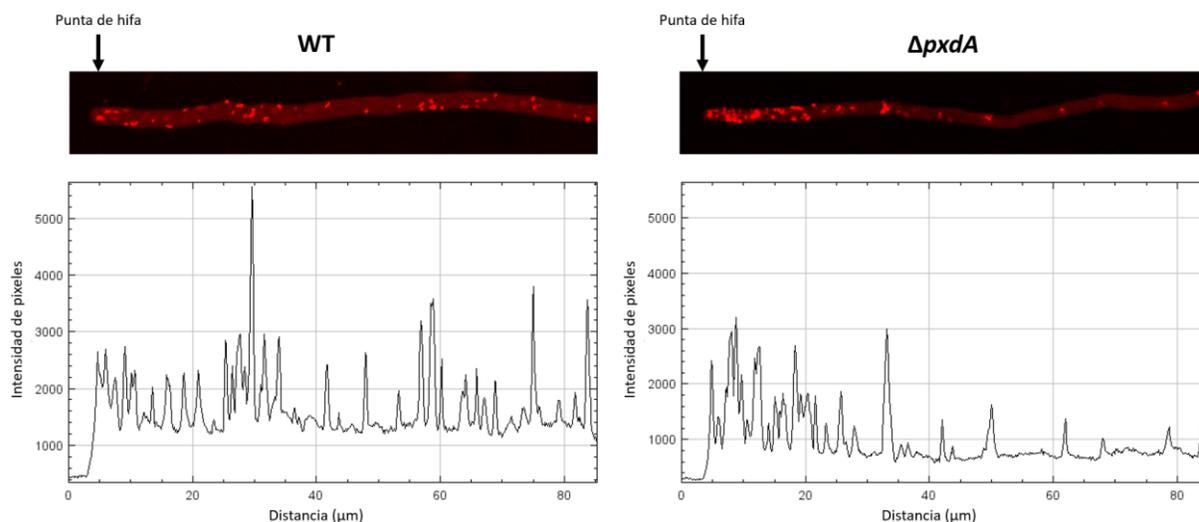


Figura 15. Distribución de los PX en la cepa silvestre RPA520 y la mutante $\Delta pxdA$ CDC01. La parte superior muestra imágenes de microscopía confocal de hifas en crecimiento, en las cuales se pueden observar en rojo los PX marcados con mCherry. Los paneles inferiores muestran la fluorescencia relativa en gráficos bidimensionales que indican las intensidades de pixeles a lo largo de la distancia dentro de la imagen. El eje x representa la distancia y el eje y indica la intensidad de los pixeles promediada verticalmente que muestra la cantidad de fluorescencia a lo largo de las hifas de ambas cepas. Las cepas crecieron en MM con glucosa suplementado con ácido p-aminobenzoico durante 18 horas. Las flechas en el lado izquierdo de las imágenes del panel superior indican la punta de cada hifa.

2. Las mutantes $\Delta pxdA$ muestran defectos en el crecimiento y la diferenciación celular asexual y sexual.

En el trabajo reportado por Reck-Peterson *et al* (2016) no se indica que las mutantes $\Delta pxdA$ tengan algún otro defecto además de la falta de transporte de los PX a través del citoesqueleto de los microtúbulos. Sin embargo, nosotros observamos que las mutantes $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 formaban colonias un poco menos pigmentadas y con bordes más blancos (**Figura 16**),

sugiriendo una menor conidiación, dado que el color amarillo está dado por la pigmentación de los conidios. Por lo cual, decidimos llevar a cabo una caracterización más detallada de los efectos de la eliminación de PxdA en el crecimiento y la diferenciación celular. Para ello analizamos la distribución de los PX y la morfología de la colonia de ocho individuos obtenidos de la cruce TDC01 X RPA520. Los resultados en la **Figura 17**, muestran que los individuos 1, 2, 4, y 5 tienen una distribución normal de los PX y un crecimiento similar al de una cepa WT. Por el contrario, los individuos 3, 6, 7 y 8, en los cuales se comprobó la presencia de la mutación $\Delta pxdA$ por PCR (**Figura 14**), muestran una mayor acumulación de los PX en las puntas de las hifas y una menor pigmentación de las colonias, las cuales forman bordes blancos. Estos resultados indican que la carencia de la proteína PxdA no sólo afecta el movimiento de los PX, sino también la morfología de la colonia y muy posiblemente la esporulación asexual.

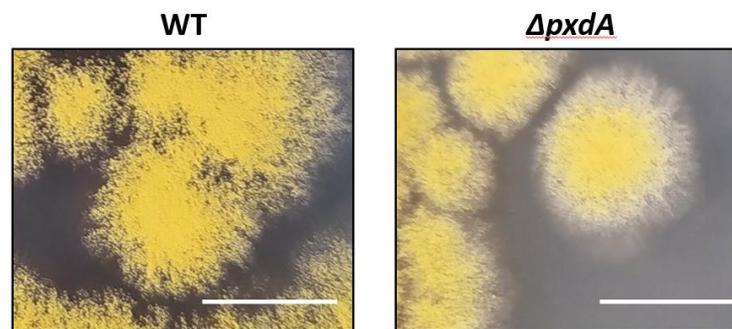


Figura 16. Las mutantes $\Delta pxdA$ muestran diferencias en el crecimiento y la esporulación comparadas con una cepa silvestre (WT). La cepa silvestre RPA520 y la mutante $\Delta pxdA$ CDC01 se crecieron a partir de conidios aislados durante 3 días en MM-glucosa suplementado con ácido p-aminobenzoico y se fotografiaron al término de estos días. La barra blanca corresponde a 1 cm.

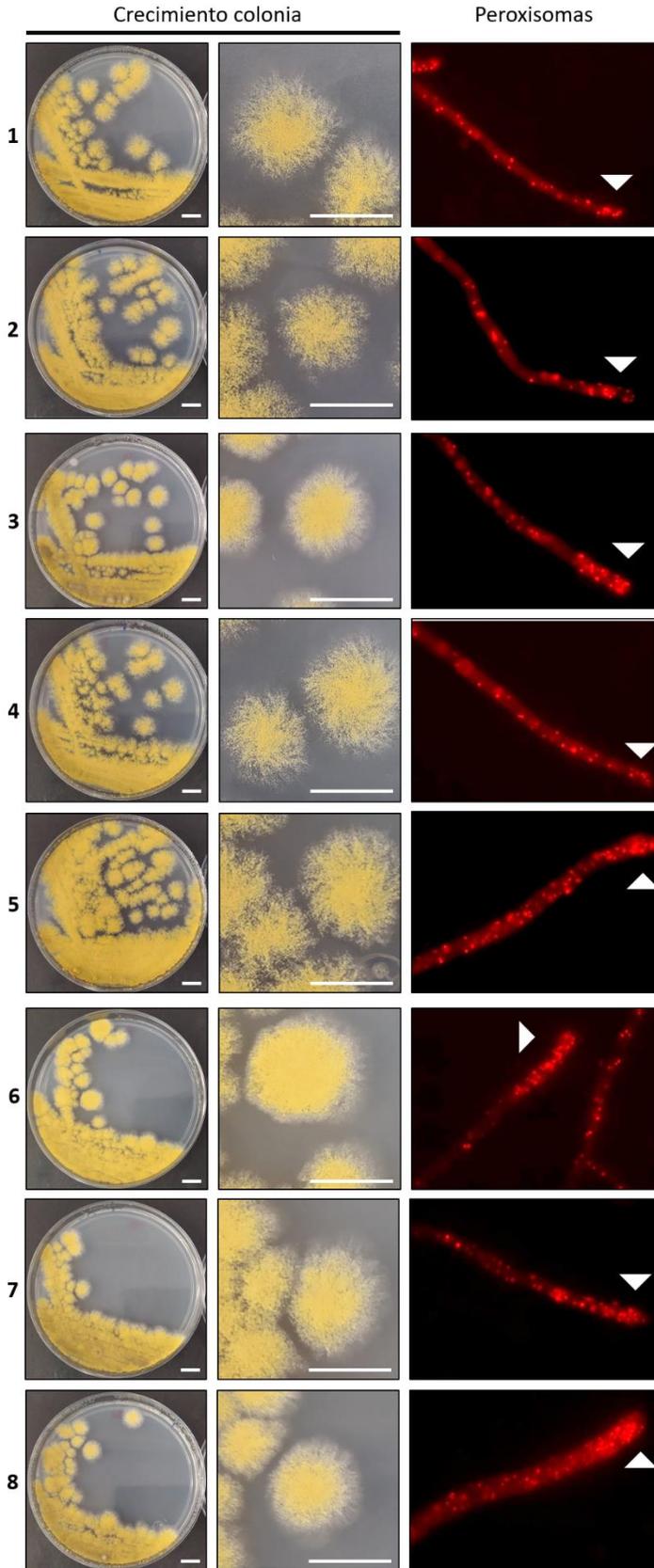


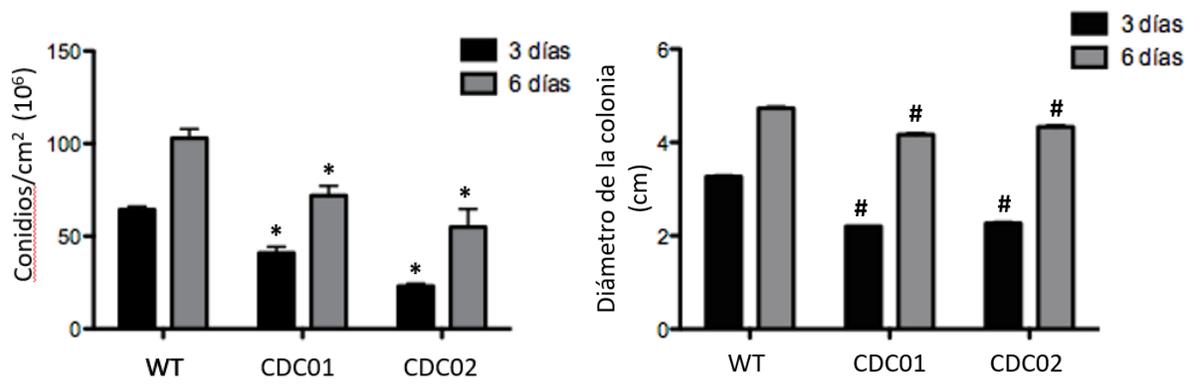
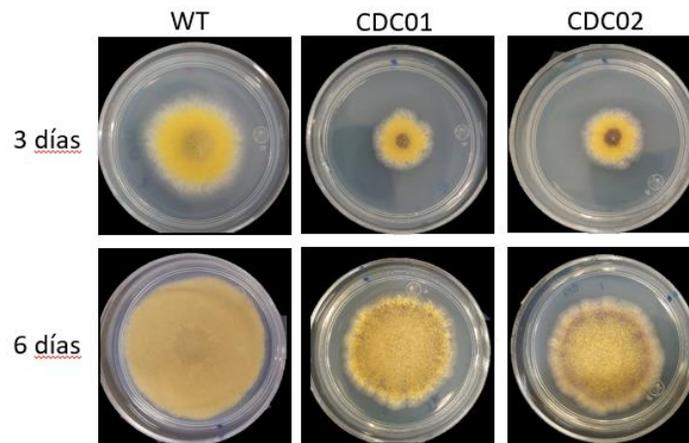
Figura 17. La cancelación de *pxdA* afecta la morfología y la pigmentación de las colonias.

Se analizó la morfología de las colonias y la distribución de los PX en ocho individuos producto de la cruce TDC01 X RPA520. Los individuos 1, 2, 4, y 5 presentan un crecimiento similar al de una cepa WT y una distribución normal de los PX. Los individuos 3, 6, 7 y 8 presentan menor pigmentación y bordes blancos en las colonias, así como una acumulación de los PX en la punta de la hifa. La progenie indicada se creció a partir de conidios aisladas durante 3 días en MM-glucosa suplementado con ácido p-aminobenzoico y se fotografiaron al término de estos días. La barra blanca corresponde a 1 cm. Las flechas blancas indican las puntas de las hifas.

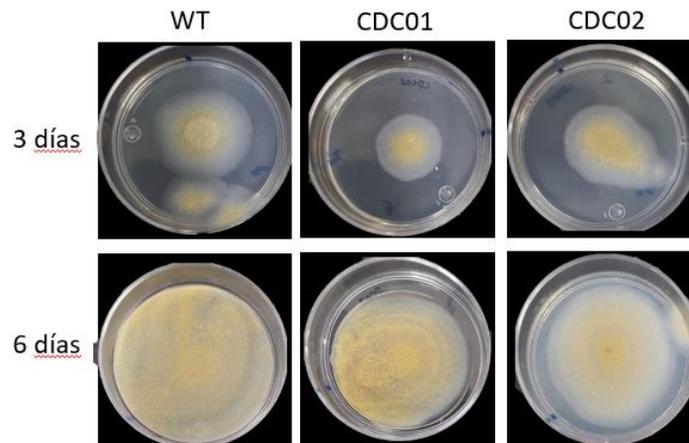
3. El gen *pxdA* se requiere para el crecimiento y desarrollo asexual normales.

Dado que los resultados anteriores indicaban que la carencia de la proteína PxdA afecta no sólo el movimiento de los PX, sino también la morfología de la colonia y muy posiblemente la esporulación asexual, decidimos cuantificar estos parámetros a lo largo del tiempo. En la **Figura 18**, panel A se observa que en presencia de glucosa, las mutantes $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 muestran una clara disminución en el crecimiento radial. Al mismo tiempo se observó una disminución de aproximadamente 40% en la producción de esporas asexuales (conidios), con respecto a la cepa silvestre. Cuando el mismo experimento se llevó a cabo en oleato como fuente de carbono, una condición que induce la proliferación de los PX (Garrido-Bazán *et al.*, 2020), se observó una menor reducción en el crecimiento radial y en la conidiación, con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados indican que la eliminación del movimiento peroxisomal afecta negativamente tanto el crecimiento como la esporulación asexual.

(A)



(B)



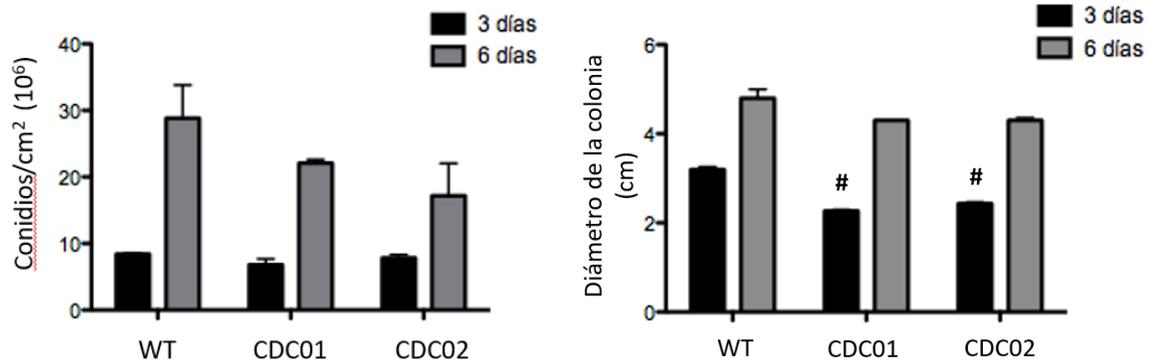


Figura 18. Las mutantes $\Delta pxdA$ muestran una reducción en el crecimiento y la esporulación asexual. (A) Se inocularon 1×10^4 esporas de las cepas silvestre RPA520 y las cepas $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02. Los conidios formados por las cepas WT y mutantes fueron recolectados luego del crecimiento en MM-glucosa y de la incubación a 37°C durante 3 y 6 días. Se recolectaron las esporas totales por colonia, se contaron y se dividió el recuento por el área de la colonia para determinar el número de conidios por centímetro cuadrado. Se indica el gráfico de la cuantificación de las esporas totales por área de colonia en el panel de la izquierda que contiene barras negras y grises (cuantificación a los 3 y 6 días, respectivamente). En el panel de la derecha se muestra gráfico de diámetros de las colonias que contiene barras negras y grises (cuantificación a los 3 y 6 días, respectivamente). Los gráficos muestran la media de tres experimentos independientes, las barras indican la desviación estándar. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($*p < 0.05$) y ($\#p < 0.001$). Se indican diferencias significativas entre las cepas $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 respecto a la cepa silvestre WT en el crecimiento en MM-glucosa. (B) El mismo ensayo se llevó a cabo en oleato como fuente de carbono. Los datos se analizaron con el método ANOVA de una vía y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($*p < 0.05$) y ($\#p < 0.001$). Se observa una reducción en la formación de esporas de las cepas $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 a los 6 días respecto a la cepa silvestre WT en MM-oleato. No se presentan diferencias significativas en la cuantificación de esporas totales por área de colonia, como se indica en el panel de la izquierda que contiene barras negras y grises (cuantificación a los 3 y 6 días, respectivamente), entre las cepas $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 respecto a la cepa silvestre WT en el crecimiento en MM-oleato. En el panel de la derecha se muestra gráfico de diámetros de las colonias que contiene barras negras y grises (cuantificación a los 3 y 6 días, respectivamente), y se observan diferencias en el tamaño (diámetro) de las colonias $\Delta pxdA$ CDC01 y CDC02 respecto a la cepa silvestre WT en el crecimiento.

4. La carencia de la proteína PxdA resulta en una mayor producción de cuerpos fructíferos (cleistotecios) durante el desarrollo sexual, los cuales se colapsan en baja humedad y muestran una menor producción de esporas meióticas.

Para el análisis del desarrollo sexual se realizó una cruce de la transformante TDC01 con la cepa WT CLK43 (ver Tabla 1 para genotipos). De la progenie obtenida se extrajo DNA de distintos individuos y se utilizaron como templado en reacciones de PCR diagnóstica con los cebadores NestForpxdA1 y NestRevpxdA1 para confirmar la eliminación del gen *pxdA* (**Figura 19**, panel **A**). De esta progenie se seleccionaron dos colonias, cepas CDC07 y CDC08, que contienen la mutación $\Delta pxdA$ y a las cuales se les analizó si tenían el gen *nkuA* con los cebadores 5DignkuA y 3DignkuA (**Figura 19**, panel **B**), dado que en el laboratorio se usan cepas con mutación $\Delta nkuA$ para eliminar la recombinación no-homóloga.

Los conidios de la cepa CLK43 y de la mutante CDC08 se utilizaron para producir cultivos a confluencia los cuales se colocaron en hipoxia, para inducir el ciclo sexual, según se especifica en materiales y métodos. Los cultivos se fotografiaron a los 3, 6 y 8 días y a los 8 días se cuantificó el número de cleistotecios por cm^2 . A los 3 días se observó que la mutante $\Delta pxdA$ produjo una menor cantidad de conidióforos que la cepa silvestre y una mayor cantidad de células Hülle (Sohn y Yoon, 2002), las cuales se observan como cúmulos de células ligeramente pigmentadas, en comparación con la cepa silvestre CLK43. Este resultado indica que el desarrollo sexual se encuentra adelantado en la mutante $\Delta pxdA$. Consistente con esto, a los 6 días se observó un mayor número de cuerpos fructíferos en la mutante que en la cepa silvestre y finalmente a los 8 días se cuantificaron los cleistotecios y se comprobó que la carencia de PxdA resulta en la mayor producción de cuerpos fructíferos (aproximadamente un 30% más) (**Figura 20**).

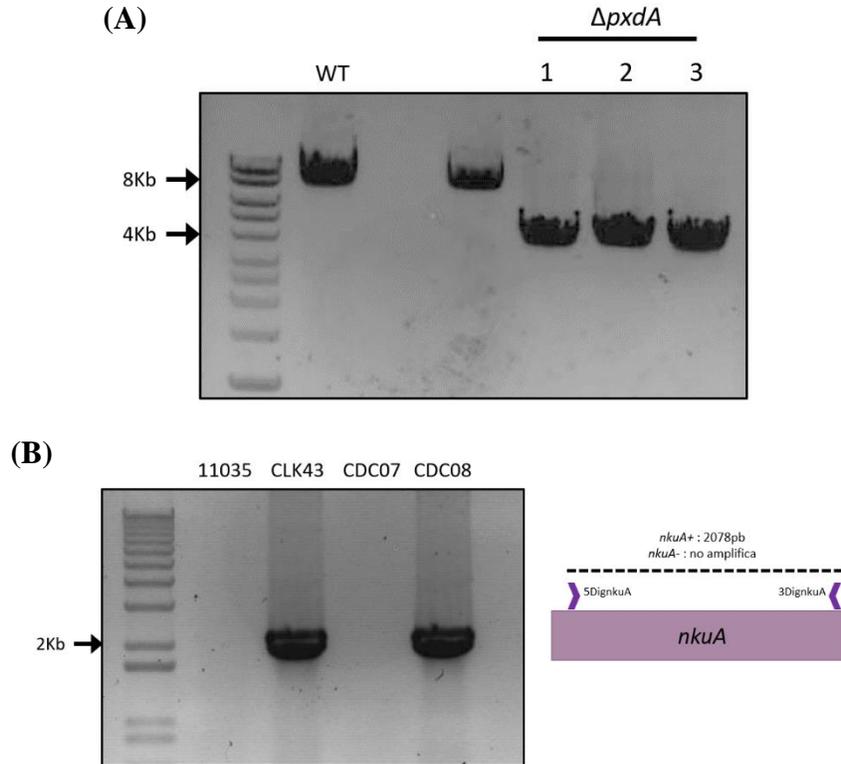


Figura 19. Confirmación de la mutación $\Delta pxdA$ por PCR diagnóstica en progenie selecta de las cruza TDC01 X CLK43, y comprobación de la presencia del gen $\Delta nkuA$. (A) Se utilizó el DNA de la progenie de la cruce de las cepas TDC01 X CLK43 indicada como templado y de la cepa silvestre CLK43 (WT) con los cebadores NestForpxdA1 y NestRevpxdA1 en reacciones de PCR diagnóstica. Se observan los fragmentos característicos de la mutación $\Delta pxdA$ (3986pb) y del gen silvestre $pxdA$ (WT, 7855pb). Las cepas 1 y 2 se nombraron CDC07 y CDC08, respectivamente. (B) Comprobación de la presencia de $nkuA$. Los productos de PCR obtenidos a partir del DNA genómico de dos cepas silvestres 11035 y CLK43 (de las cuales se conoce previamente que la cepa 11035 tiene mutación $\Delta nkuA$ y la CLK43 es $nkuA+$), y el DNA de las cepas $\Delta pxdA$ CDC07 y CDC08. Se llevaron a cabo las reacciones con los cebadores 5DignkuA y 3DignkuA. En el esquema de la derecha se observa la amplificación del producto de 2,078 pb cuando la cepa contiene el gen $nkuA$, mientras que si la cepa es $\Delta nkuA$ no se obtiene producto. De las cepas analizadas, la CDC07 es $\Delta nkuA$ y la CDC08 es $nkuA+$.

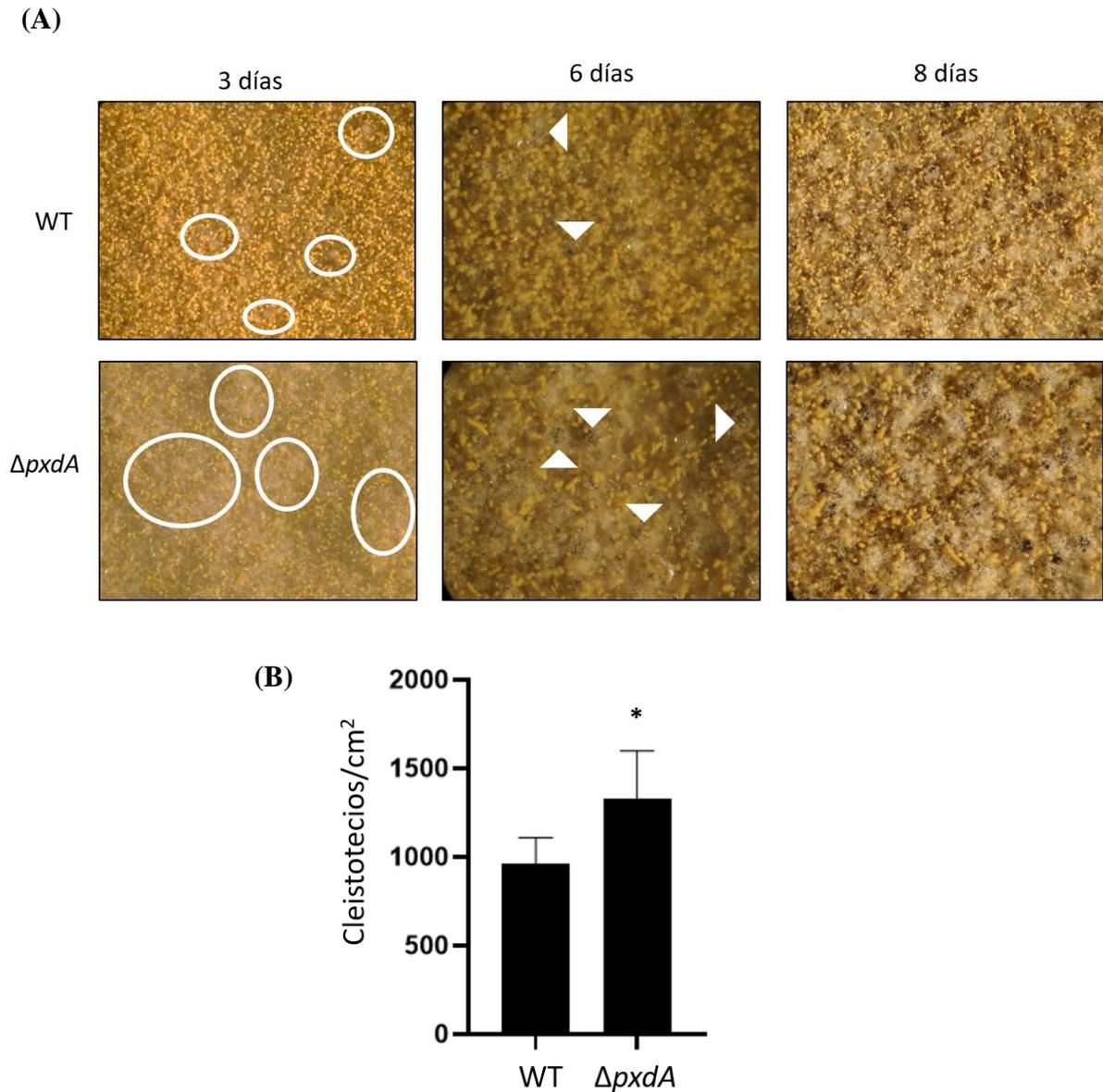


Figura 20. La carencia de PxdA causa una mayor producción de células Hülle y de cleistotecios. (A) Formación de células Hülle y cleistotecios de las cepas silvestre CLK43 (WT) y $\Delta pxdA$ CDC08. A los 3 días se observa una formación de conidióforos en la cepa CLK43 (WT) (los círculos indican una pequeña cantidad de células Hülle), mientras que en la cepa mutante se observan pocos conidióforos y múltiples agregados de células Hülle (círculos en las zonas donde se observan mejor estos cúmulos). A los 6 días se observa la formación de cleistotecios, los cuales se encuentran maduros en la mutante (flechas). A los ocho días ya están completamente maduros los cleistotecios y se ve una mayor cantidad en la mutante. (B) Cuantificación de la cantidad de cleistotecios por área. Los datos se obtuvieron a los 8 días de incubación en condiciones hipóxicas. Se muestra la media de tres experimentos independientes, las barras indican la desviación estándar. Datos analizados con la prueba de comparación de medias de grupos independientes *t* test por Mann Whitney, datos estadísticamente significativos se indican con asterisco (* $p < 0.05$).

También se evaluó el tamaño de los cleistotecios formados por la mutante $\Delta pxdA$ CDC08, en comparación con la cepa silvestre CLK43 (**Figura 21**). Como se observa en la **Figura 21**, tanto la cepa silvestre como la mutante presentan una heterogeneidad en los tamaños de los cleistotecios. Por lo tanto, se cuantificaron la cantidad de cleistotecios diferenciándolos por el tamaño (menor a 100 μm , entre 100 y 150 μm y mayores a 150 μm) encontrando que hay una mayor producción de cleistotecios mayores a 100 μm en la mutante (**Figura 21**, panel **B**). Cuando se pasaron los cleistotecios de la mutante a una regla para determinar su tamaño, se observó un cambio en la forma y estructura de éstos cuando se aíslan y se encuentran en un ambiente seco, lo que no ocurre con los cleistotecios de la cepa WT (**Figura 21**, panel **A** parte inferior). Se observó que los cuerpos fructíferos de la mutante se colapsaban al transferirlos a un ambiente seco.

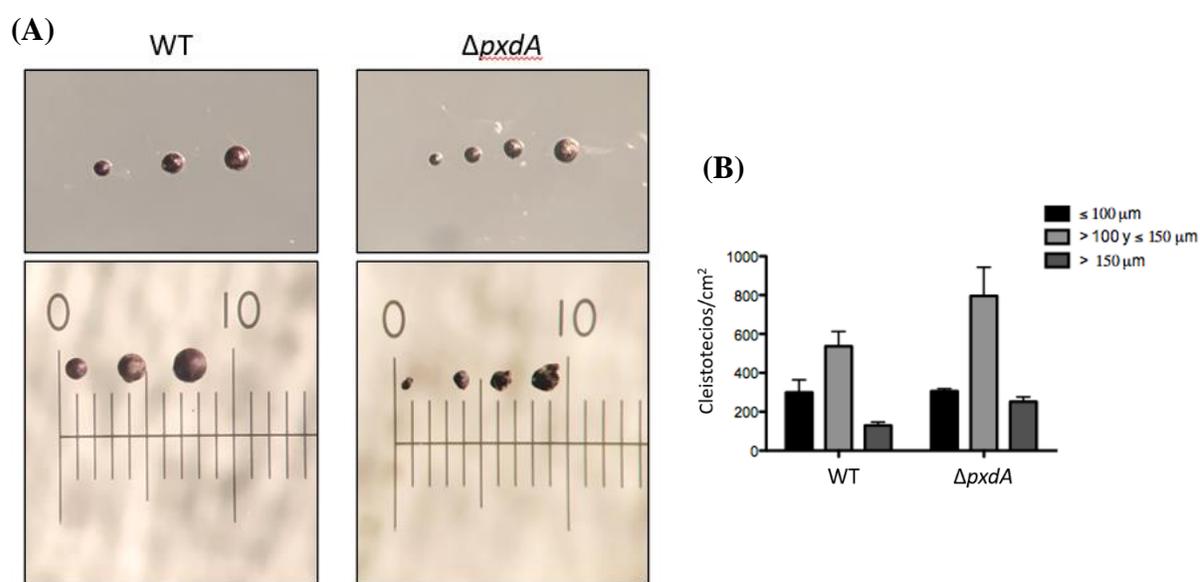


Figura 21. Los cuerpos fructíferos (cleistotecios) generados por la mutante $\Delta pxdA$ se colapsan en un ambiente seco. (A) Los cleistotecios de la cepa WT CLK43 presentan una forma en esfera perfecta, mientras que los de la cepa $\Delta pxdA$ CDC08 se colapsan cuando se transfieren a un ambiente seco. Escala de la regla de 0-10 corresponde a 1mm. En el panel superior los cleistotecios de ambas cepas se encuentra en medio mínimo. (B) Los cleistotecios aislados de la cepa silvestre CLK43 y de la cepa $\Delta pxdA$ CDC08 presentan diferentes tamaños. La cuantificación de los cleistotecios indica que hay mayor presencia de cleistotecios de tamaño superior a 100 μm para la mutante $\Delta pxdA$ en comparación con la cepa silvestre. Se muestra la media de tres experimentos independientes: las barras indican la desviación estándar. Datos analizados con la prueba de comparación de medias de grupos independientes t test por Mann Whitney ($p < 0.05$) no son significativos.

Para confirmar estos hallazgos sin manipular los cleistotecios, los cultivos utilizados para inducir el ciclo sexual se dejaron secar a temperatura ambiente y después se observaron a las 24 y 48 horas. Como se observa en la **Figura 22**, en contraste con la cepa silvestre, los cleistotecios de la mutante $\Delta pxdA$ se observaron totalmente colapsados.

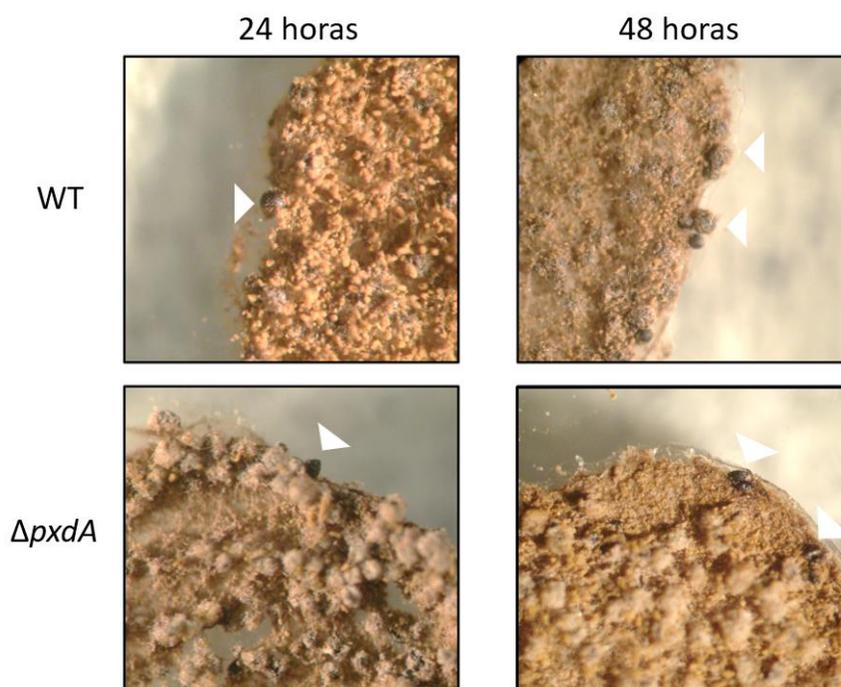


Figura 22. Los cuerpos fructíferos generados por la mutante $\Delta pxdA$ se colapsan sin ser manipulados, cuando se encuentran en un ambiente con poca humedad. Los ensayos se realizaron en una caja de Petri sin agar, en la cual se ubicaron cortes de los cultivos de desarrollo sexual de la cepa silvestre CLK43 y de la $\Delta pxdA$ CDC08. El medio se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas. En las fotos se observan los cleistotecios de la cepa silvestre redondos y compactos, mientras que los de la mutante $\Delta pxdA$ se ven aplastados y achatados.

Teniendo en cuenta que la carencia del gen *pxdA* genera una reproducción sexual prematura y la producción de cuerpos fructíferos frágiles, se realizaron ensayos para observar la formación de las esporas sexuales o ascosporas. Para ello se reventaron los cleistotecios de la cepa silvestre CLK43 y de la mutante $\Delta pxdA$ CDC08 y se observaron bajo el microscopio. En la **Figura 23** se observa que los cleistotecios de la cepa silvestre (WT) liberaron una gran cantidad de ascosporas, mientras que los cleistotecios de la mutante $\Delta pxdA$ liberaron una gran cantidad de tejido ascógeno amorfo y muy pocas ascosporas. Esto es más evidente en el acercamiento de la **Figura 23** panel **B**.

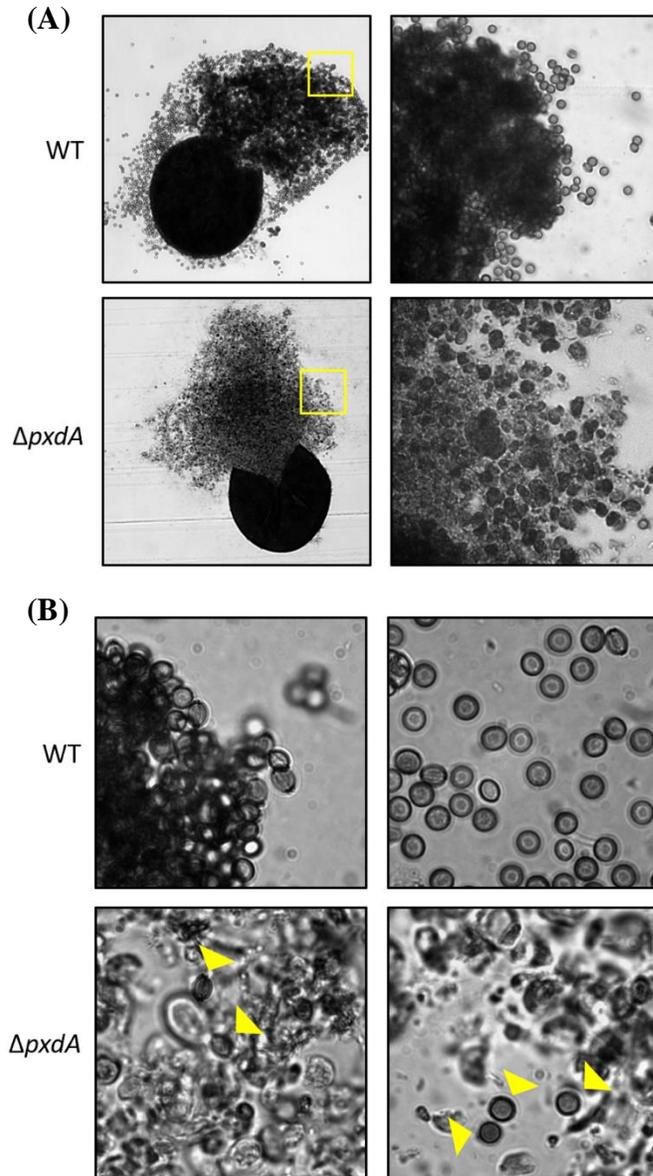


Figura 23. La carencia del gen *pxdA* causa una menor producción de esporas sexuales (A) Los cleistotecios de las cepas CLK43 (WT) y CDC08 ($\Delta pxdA$) se aislaron de cultivos a los 8 días de desarrollo y se observaron al microscopio luego de ser aplastados para extraer el tejido ascógeno y las ascosporas. Las imágenes de la parte derecha corresponden al acercamiento del recuadro mostrado en los paneles de la izquierda. (B) Acercamiento (100X) en el microscopio para mostrar las ascosporas. Las flechas amarillas indican las pocas ascosporas observadas en el campo de la muestra de la mutante $\Delta pxdA$.

Estos defectos en el desarrollo sexual se comprobaron en las mutantes $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04, las cuales son progenie de la cruce TDC01 X RPA520 y de CDC02 X TVG5, respectivamente (**Figura 24**).

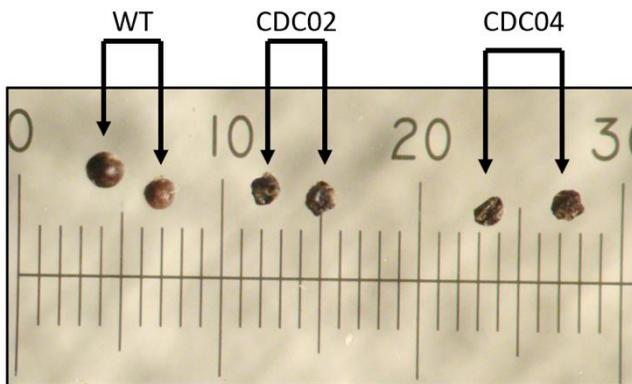
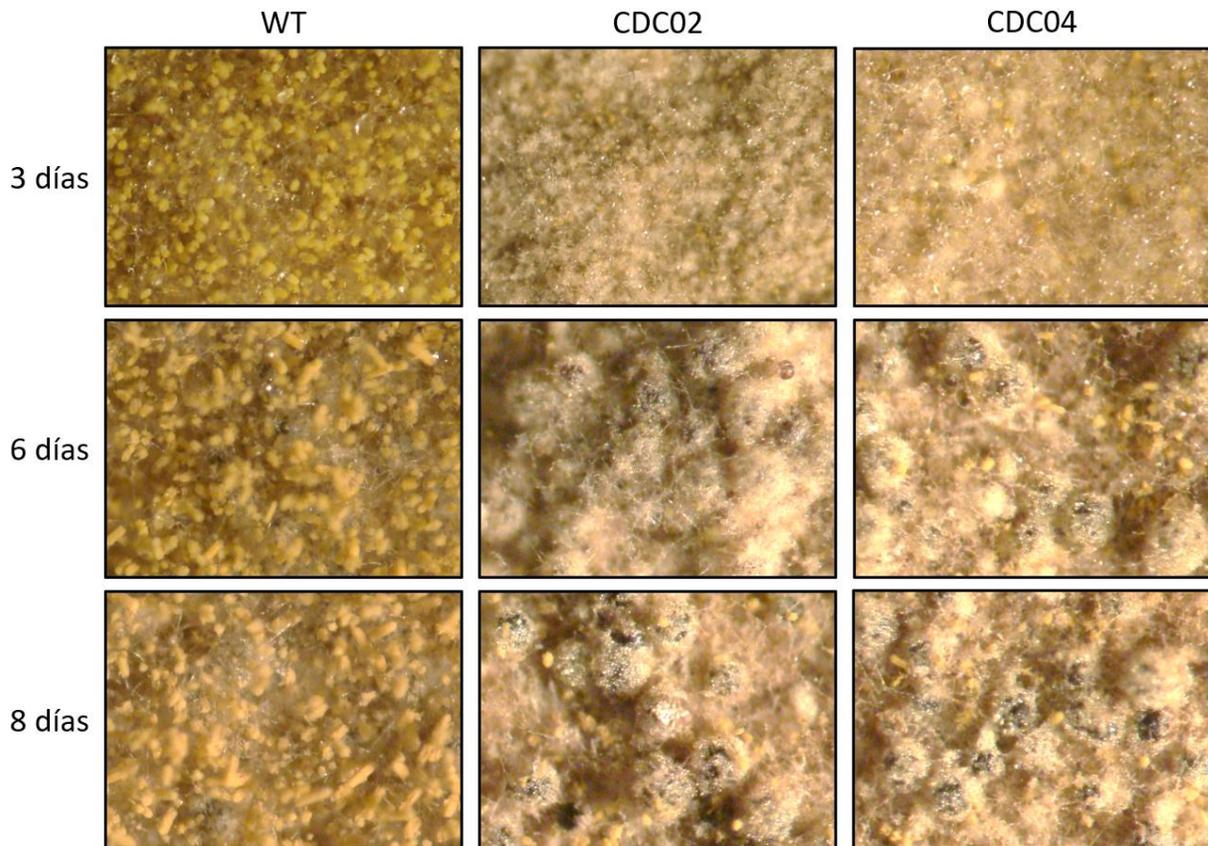


Figura 24. Las mutantes $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04 también muestran un desarrollo sexual prematuro y forman cleistotecios frágiles, que se colapsan en un ambiente seco. Ensayo de la caracterización del desarrollo sexual realizados en la cepa silvestre CLK43 y en las mutantes $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04. A los 3 días se observa una formación de conidióforos en la

cepa CLK43 (WT) con poca cantidad de células Hülle, mientras que en las cepas mutantes se observan pocos conidióforos y múltiples agregados de células Hülle (de la misma forma cómo se describió con la cepa CDC08 en la Figura 19). A los 6 días se observa la formación de cleistotecios, los cuales se encuentran maduros en la mutante. A los ocho días ya están completamente maduros los cleistotecios y se ve una mayor cantidad en la mutante. En la imagen de la parte inferior se observan los cleistotecios de las mutantes colapsados en un ambiente seco.

Debido a que hay una disminución notoria en la cantidad de ascosporas producidas en la mutante $\Delta pxdA$ comparada con la cepa silvestre (**Figura 23**) se realizó el mismo análisis de las ascosporas en el microscopio con las cepas $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04 comparadas con la cepa silvestre CLK43 (datos no mostrados). Los resultados fueron similares a los obtenidos con la mutante $\Delta pxdA$ CDC08, por lo que se procedió a realizar un ensayo de viabilidad de estas ascosporas. En este ensayo se tomó un cleistotecio de la cepa silvestre WT CLK43 y se reventó en 1 mL de agua estéril, de la cual se sembraron 20 μ L en una caja de Petri con MM-glucosa y suplementos; para las mutantes se tomó un cleistotecio de cada una y se reventó en 250 μ L de agua estéril, de la cual se sembraron 50 μ L en una caja de Petri en las mismas condiciones. Los resultados indican una disminución de la cantidad de ascosporas viables en las mutantes comparadas con la cepa silvestre (**Figura 25**).

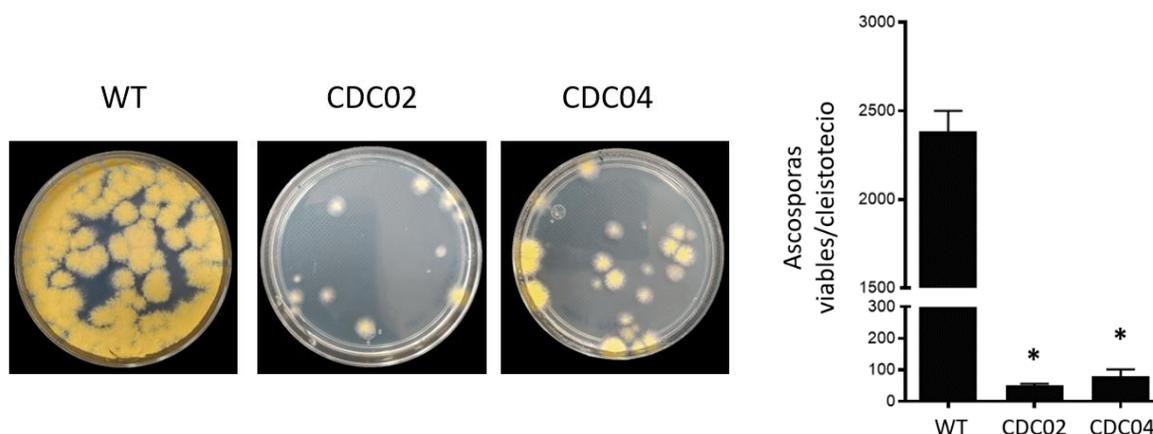


Figura 25. Disminución en la viabilidad de las ascosporas producidas por mutantes $\Delta pxdA$, en comparación con una cepa silvestre. Los cleistotecios obtenidos de las cepas silvestre WT CLK43 y las cepas mutantes $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04 se reventaron en agua estéril para generar una suspensión de ascosporas, las cuales se usaron para inocular placas con MM-glucosa y se incubaron a 37°C durante 3 días. Las ascosporas de la cepa silvestre se diluyeron en 1:50 y las de las cepas mutantes en 1:5 y se inocularon en placas de agar con 50 μ L de cada dilución. El panel izquierdo muestra las colonias generadas por dichas ascosporas. El panel derecho muestra el total de las ascosporas viables por cada cleistotecio. Los gráficos muestran la media de tres experimentos independientes; las barras indican la desviación estándar. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (* $p < 0.001$). Se indican diferencias significativas entre las cepas $\Delta pxdA$ CDC02 y CDC04 respecto a la cepa silvestre WT.

Estos resultados muestran que la carencia de la proteína PxdA tiene efectos dramáticos en el desarrollo sexual en *A. nidulans*, lo cual no ha sido descrito en estudios previos.

5. La mutante $\Delta pxdA$ no es sensible al estrés oxidante causado por el H_2O_2 o la menadiona.

El estado redox intracelular se encuentra relacionado con los PX en células animales. Sin embargo, muchos hongos carecen de catalasa peroxisomal (no tienen una señal PTS1 de reconocimiento peroxisomal) como en el caso de *N. crassa* (Schliebs *et al.*, 2006), pero hay evidencia de hongos que contienen catalasas peroxisomales, como el gen *catC* en *A. nidulans* que codifica una catalasa de subunidad pequeña con una secuencia de direccionamiento peroxisomal que está estrechamente relacionada con otros hongos, animales y arqueas (Kawasaki y Aguirre, 2001). Por tal razón, decidimos explorar la sensibilidad de las mutantes $\Delta pxdA$ al estrés oxidante. Estos ensayos se realizaron usando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (3, 4 y 6 mM) y menadiona (60 y 100 μ M). Los resultados en la **Figura 26** muestran que la carencia de PxdA no causa una mayor sensibilidad al estrés oxidante.

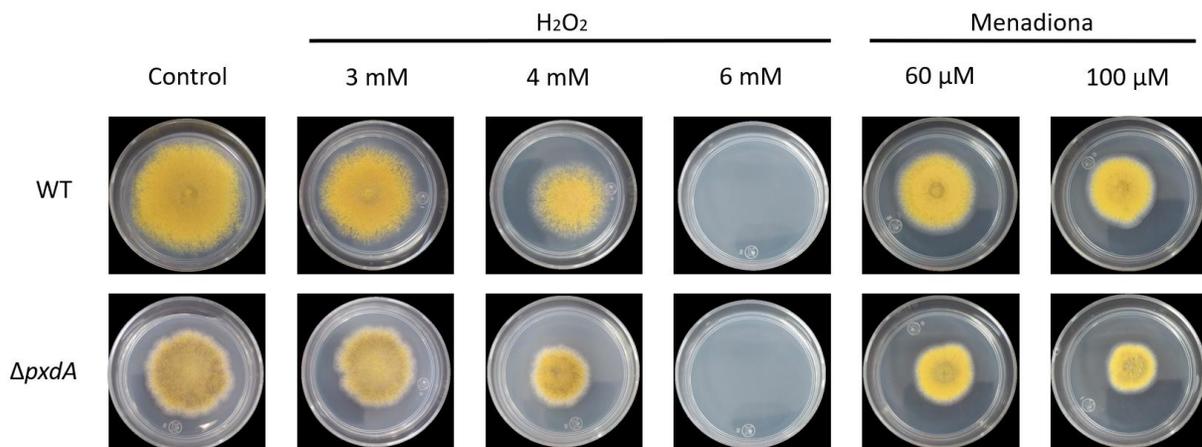


Figura 26. Las mutantes $\Delta pxdA$ no son más sensibles al H_2O_2 o la menadiona. (A) Crecimiento radial de la cepa silvestre RPA520 y la mutante CDC02 ($\Delta pxdA$) en MM-glucosa a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno o de menadiona. El inóculo fue de 1×10^5 esporas para cada caso.

6. La falta de movimiento peroxisomal no afecta notablemente la distribución de las mitocondrias, el retículo endoplásmico o la proteína DnmA

Para determinar si la carencia de la proteína PxdA afecta la dinámica y morfología de otros organelos, además de los PX, o de la proteína DnmA encargada de la fisión mitocondrial y peroxisomal, se procedió a obtener cepas $\Delta pxdA$ con las MIT, el RE o la proteína DnmA marcados con proteínas fluorescentes. Para el marcaje de las MIT en un fondo $\Delta pxdA$, primero se obtuvo la cepa TDV1, en la cual se marcó la membrana externa mitocondrial con la construcción Tom20-GFP (ver Materiales y Métodos). Posteriormente la cepa CDV1, obtenida de la cruce TDV1 X 11035, se cruzó con la mutante $\Delta pxdA$ CDC02 y se analizó la progenie mediante microscopía de epifluorescencia para detectar la presencia de las MIT marcadas y mediante PCR detectar la mutación $\Delta pxdA$ (**Figura 27**). Se seleccionó la cepa CDC03 para estudios posteriores.

Para el marcaje del retículo endoplásmico en un fondo $\Delta pxdA$ se transfectó la cepa A26 con el plásmido pAM01 (pBIP-GFP) (López-Fuentes *et al.*, 2020) que tiene la construcción $gpdA(p)::BIP::GFP::phleo$, donde el fragmento GFP se encuentra flanqueado por las señales de retención y dirección de retículo endoplásmico BiP, obteniendo así la cepa TDC03, que se analizó por microscopía para la detección del RE marcado. Luego se realizó la cruce de la cepa TDC03 con la mutante $\Delta pxdA$ CDC02, seleccionando la cepa CDC05 que tiene el fondo genético $\Delta pxdA$ (**Figura 27**) con los PX y el RE marcados.

Para el marcaje de la dinamina DnmA en un fondo $\Delta pxdA$, se generó una cruce entre las cepas CDC02 y TVG5, en la cual DnmA está marcada con GFP (Garrido, 2021). Se analizó la progenie mediante microscopía confocal para detectar la presencia de DnmA-GFP y mediante PCR para detectar la mutación $\Delta pxdA$ (**Figura 27**) y se seleccionó la cepa CDC04 (ver Materiales y métodos).

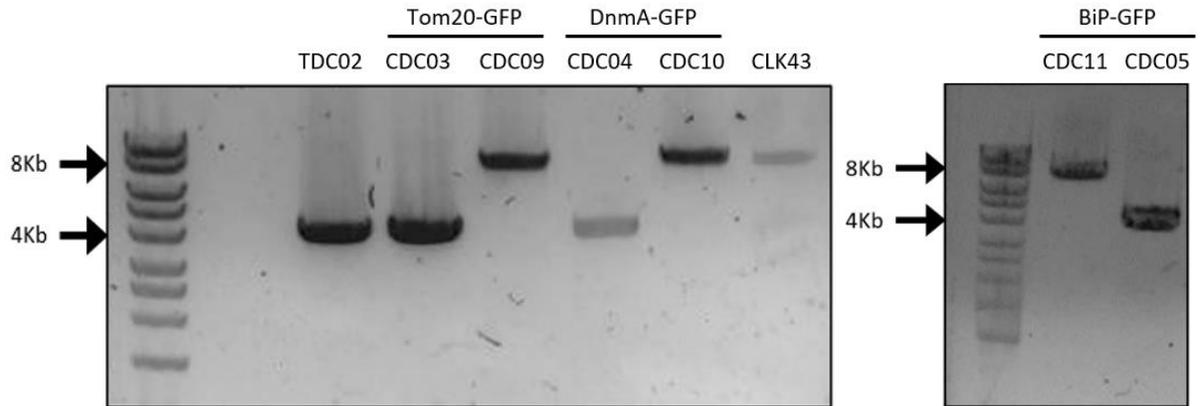


Figura 27. Confirmación de la mutación $\Delta pxdA$ por PCR diagnóstica en cepas con mitocondrias (Tom20-GFP), retículo endoplásmico (BiP-GFP), y DnmA (DnmA-GFP) etiquetados. Se muestran los controles con la cepa WT CLK43 y la mutante $\Delta pxdA$ TDC02. Las cepas CDC03, CDC04 y CDC05 contienen las etiquetas correspondientes para cada caso y la mutación $\Delta pxdA$. Las cepas CDC09, CDC10 y CDC11 corresponden a cepas que no tienen la mutación $\Delta pxdA$ pero contienen las etiquetas correspondientes para ser analizadas por microscopía posteriormente como cepas WT para control.

La **Figura 28** (panel **A**) muestra imágenes representativas de microscopía confocal de la cepa silvestre CDC09 y la mutante $\Delta pxdA$ CDC03, en las que se puede observar la distribución de las MIT y los PX. En general, no observamos que la carencia de movimiento de los PX o su acumulación en la punta afecte la morfología o la distribución de las MIT. Además, se realizó el ensayo en un medio con oleato como fuente de carbono, que produce una proliferación de los PX. Los datos analizados indican que no existe gran diferencia entre las MIT de la mutante CDC03 ($\Delta pxdA$) en comparación con la cepa silvestre (**Figura 28**, panel **B**).

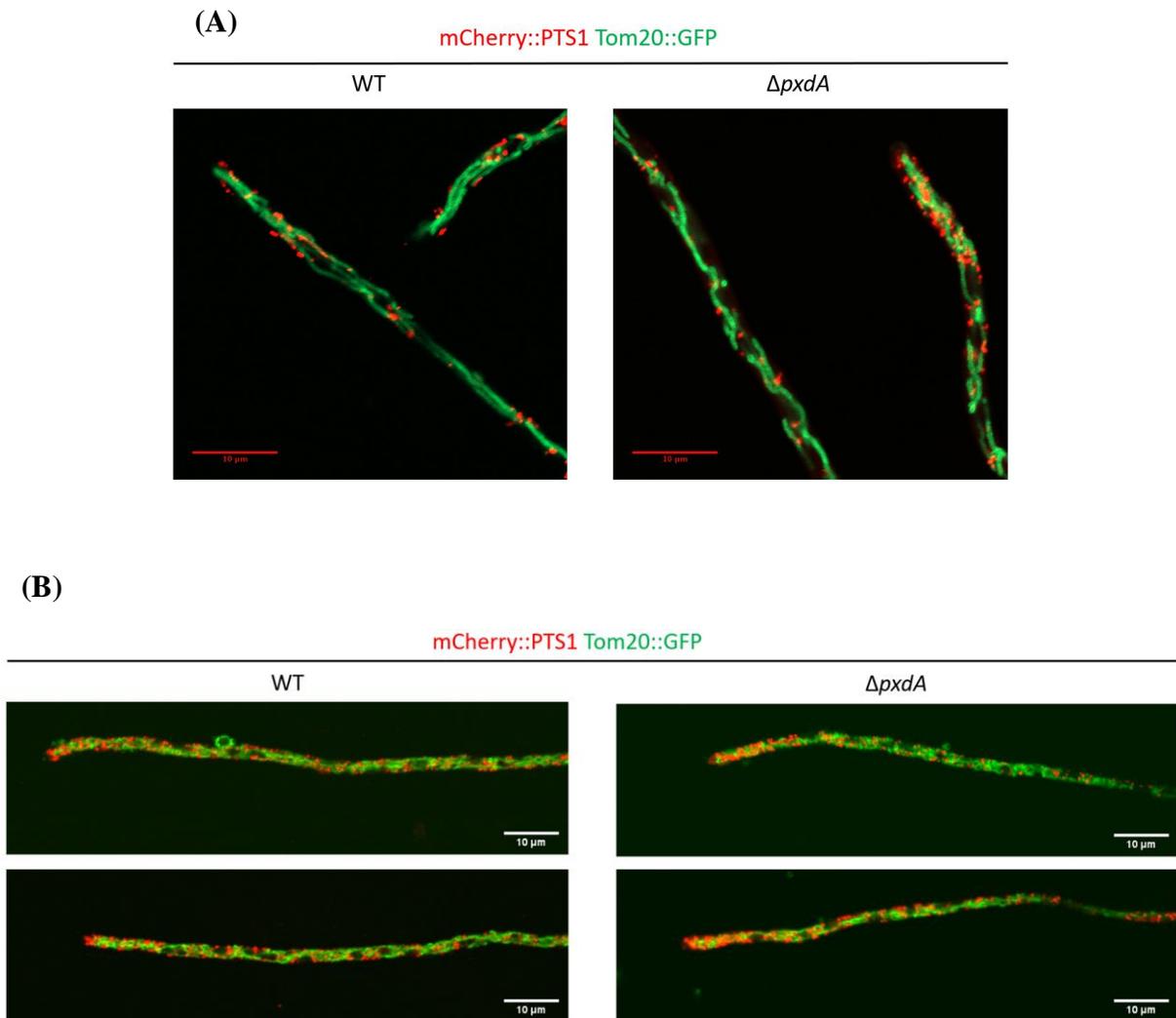


Figura 28. La distribución y morfología de las mitocondrias en las hifas no se ve alterada por la carencia de PxdA. (A) Las cepas silvestre CDC09 y mutante ($\Delta pxdA$) CDC03 en MM-glucosa se analizaron por microscopía confocal para observar la distribución de los PX (mCherry) y las MIT (GFP). (B) Se hicieron crecer las mismas cepas silvestre CDC09 y mutante ($\Delta pxdA$) CDC03 en MM-oleato.

La **Figura 29** muestra imágenes representativas de microscopía confocal de la cepa silvestre CDC11 y la mutante $\Delta pxdA$ CDC05 en las que se puede observar la distribución del RE y los PX en las hifas en crecimiento. Como se ha reportado en otros hongos (López-Fuentes *et al.*, 2020) el RE está un poco más acumulado en la punta de las hifas y se logra observar tanto en la cepa silvestre como en la mutante una mayor colocalización entre el RE y los PX cuando estos se acumulan también en la punta. Sin embargo, tampoco se observa que la carencia de

movimiento de los PX o su acumulación en la punta afecte de manera notable la morfología o la distribución del RE.

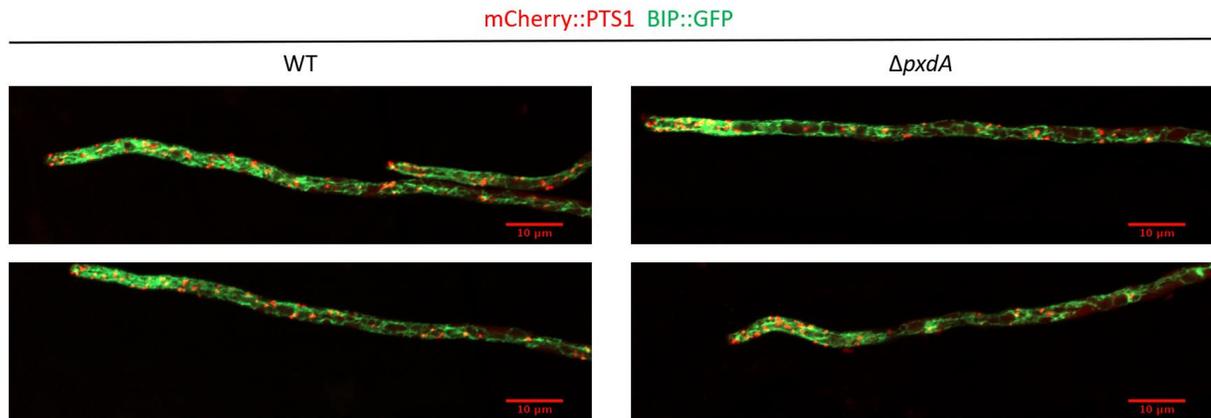


Figura 29. La distribución y morfología del retículo endoplásmico en las hifas no se ve alterada por la carencia de PxdA. Las cepas silvestre CDC11 y mutante ($\Delta pxdA$) CDC05 se hicieron crecer en MM-glucosa y se analizaron por microscopía confocal para la distribución de los PX (mCherry) y del RE (GFP).

En la **Figura 30** se muestran imágenes de microscopía confocal de la cepa WT CDC10 y de la mutante $\Delta pxdA$ CDC04, la cual contiene los PX marcados con mCherry y la dinamina DnmA, involucrada en la división mitocondrial y peroxisomal, marcada con GFP. En la cepa WT, DnmA se observa como un conjunto de puntos verdes distribuidos a lo largo de toda la hifa, los cuales en pocos casos colocalizan con los PX. En la mutante $\Delta pxdA$ se observa la misma distribución a pesar de la mayor concentración de los PX en la punta (**Figura 30**, panel A). Esto indica que el mecanismo de distribución de la proteína DnmA no se afecta por el movimiento o distribución de los PX. Debido a que la división peroxisomal depende mayoritariamente de la dinamina DnmA, cuando el hongo se hace crecer en ácidos grasos largos como fuente de carbono, como el oleato, que induce la proliferación de los PX, se analizó si esto afectaría la distribución de la dinamina. Los resultados muestran que hay una mayor colocalización de la proteína DnmA (GFP) con los PX (mCherry) en la cepa silvestre WT CDC10, y en la cepa carente del movimiento peroxisomal ($\Delta pxdA$, CDC04) se observan varios puntos de contacto con mayor proporción en la zona apical de la hifa (**Figura 30**, panel B).

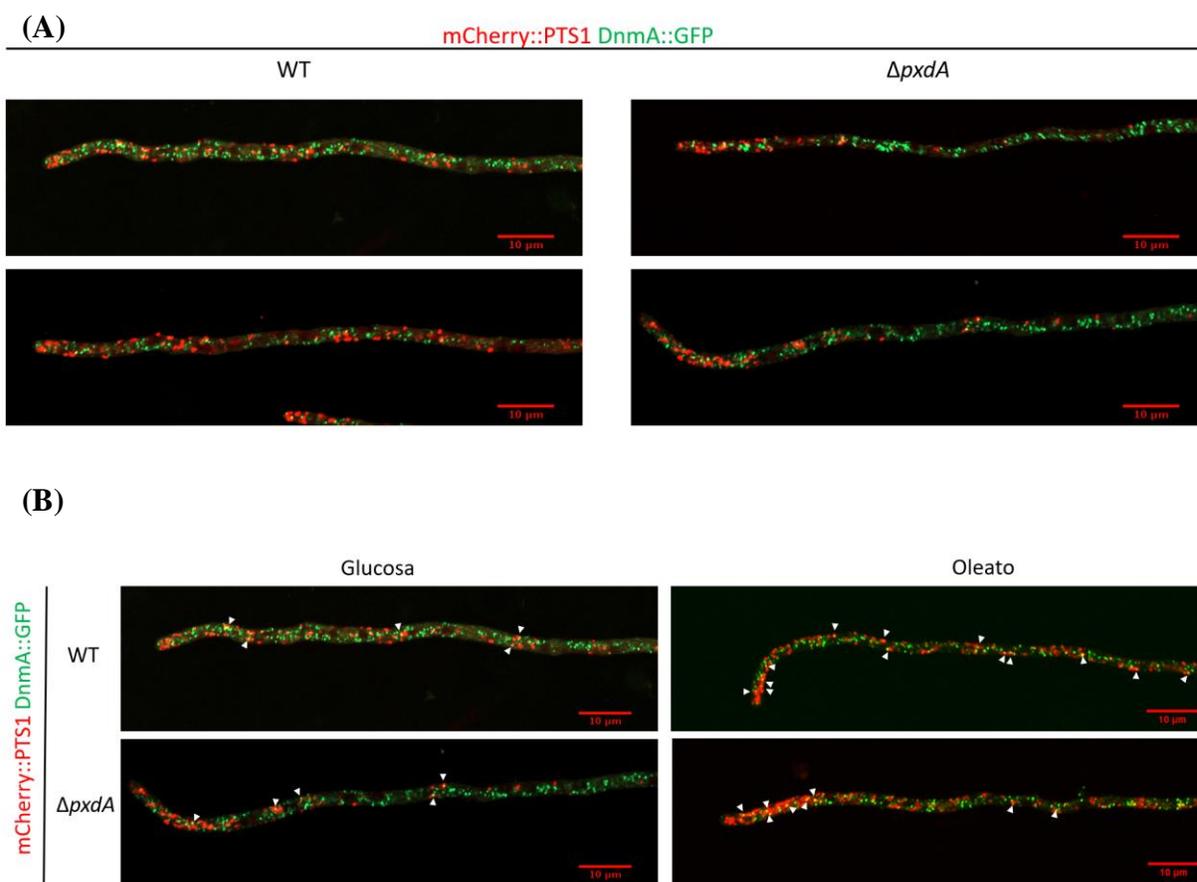


Figura 30. La distribución y morfología de la dinamina DnmA no se ve alterada por la carencia de PxdA. (A) Las cepas silvestre CDC10 y mutante ($\Delta pxdA$) CDC04 se hicieron crecer en MM-glucosa y se analizaron por microscopía confocal para la distribución de los PX (mCherry) y la DnmA (GFP). (B) Ensayo con MM-glucosa y MM-oleato. Se analizaron los puntos de contacto de la proteína DnmA (GFP) con los PX (mCherry) que se indican con flechas blancas.

7. La carencia de la proteína PxdA no afecta la herencia mitocondrial ni la herencia del retículo endoplásmico durante el desarrollo asexual en el hongo

Dado que los PX se encuentran estrechamente relacionados metabólicamente con las MIT, además de compartir la misma maquinaria de división, se exploró la herencia de las MIT durante la conidiación en las cepas mutantes $\Delta pxdA$ CDC03 y de tipo silvestre CDC09. Como se muestra en la **Figura 31** panel A, los conidios de tipo silvestre contienen múltiples MIT, al igual que se muestra en los conidios de las mutantes $\Delta pxdA$. Para observar un poco más de cerca el proceso de conidiación, se comparó la morfología mitocondrial en los conidióforos de tipo silvestre WT

CDC09 y en las mutantes $\Delta pxdA$ CDC03. Las observaciones con microscopía confocal indican que las MIT se heredan normalmente durante la formación de las mótulas y las fiálides, indicando que la carencia de la proteína PxdA no presenta cambios significativos en la distribución de las MIT durante la herencia en el desarrollo asexual (**Figura 31**, panel **B**).

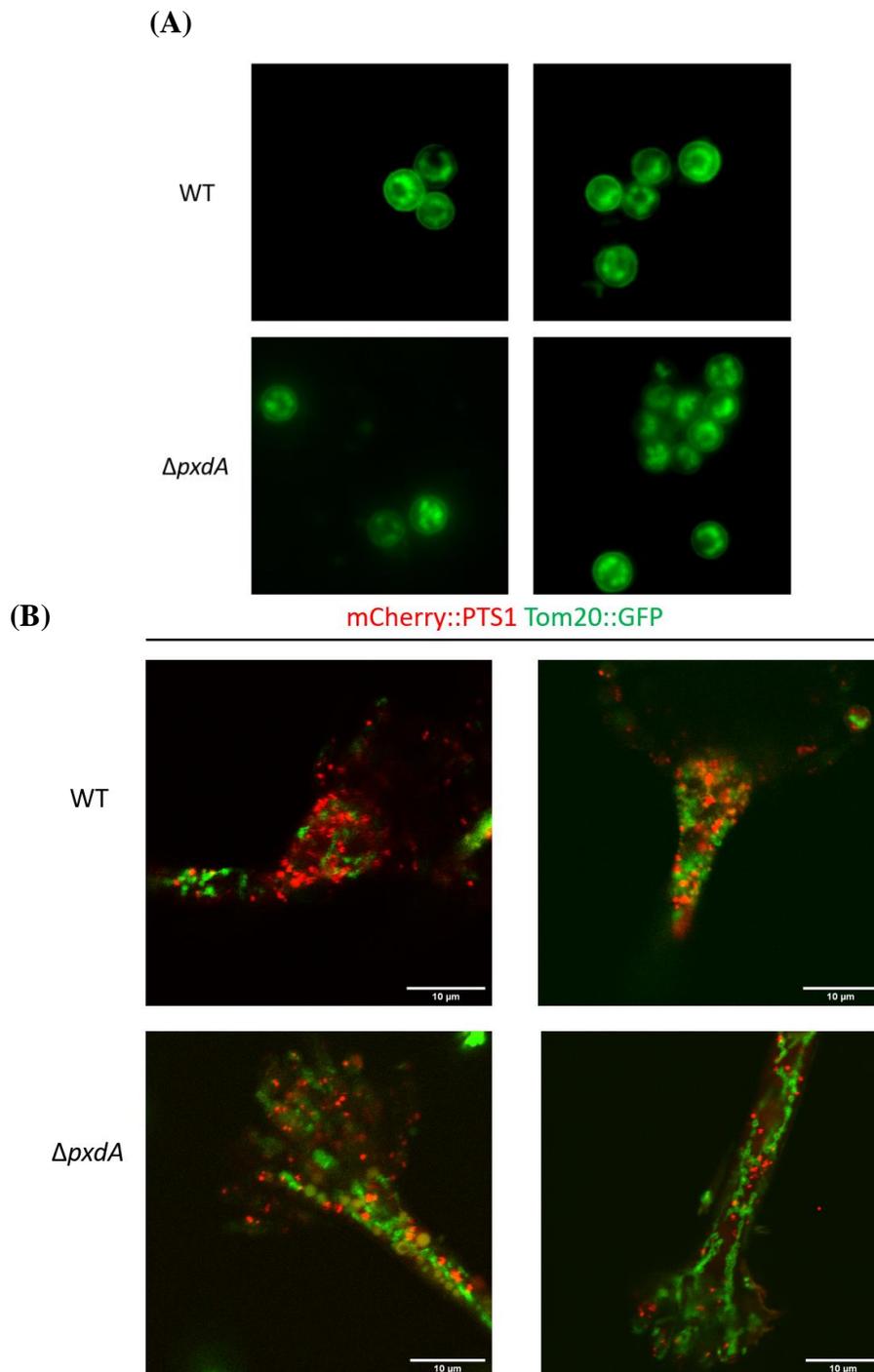


Figura 31. La herencia mitocondrial durante el desarrollo asexual no se afecta en las mutantes *ApxdA*. (A) Se observan conidios aislados de las cepas CDC09 (WT) y CDC03 (*ApxdA*) mediante microscopía de epifluorescencia, luego del crecimiento a los dos días en MM-glucosa. (B) Conidióforos de las mismas cepas en las mismas condiciones. Micrografías tomadas mediante microscopía confocal. MIT marcadas con GFP, y PX con mCherry.

Teniendo en cuenta la importancia de los sitios de contacto entre los PX y el RE para la regulación negativa de la motilidad de los PX en la herencia de los PX de células madre a células hijas, como en el caso de las levaduras en las que se ha visto la retención de los PX a través del anclaje con el RE (C. Chen *et al.*, 2020), se exploró la morfología del retículo endoplásmico durante el desarrollo asexual en cepas mutantes *ApxdA* CDC05 y de tipo silvestre CDC11. Se compararon los conidióforos formados por las cepas mencionadas, y se realizaron las observaciones a través de microscopía confocal. Estos resultados indican que el RE en la cepa silvestre WT se encuentra distribuido a través de las métulas y las fiálides y se logran observar algunos conidios que contienen parte de este organelo. Estas mismas observaciones se presentan en la mutante *ApxdA*, en la cual no se presentan cambios notables durante la distribución del RE en el desarrollo asexual (**Figura 32**).

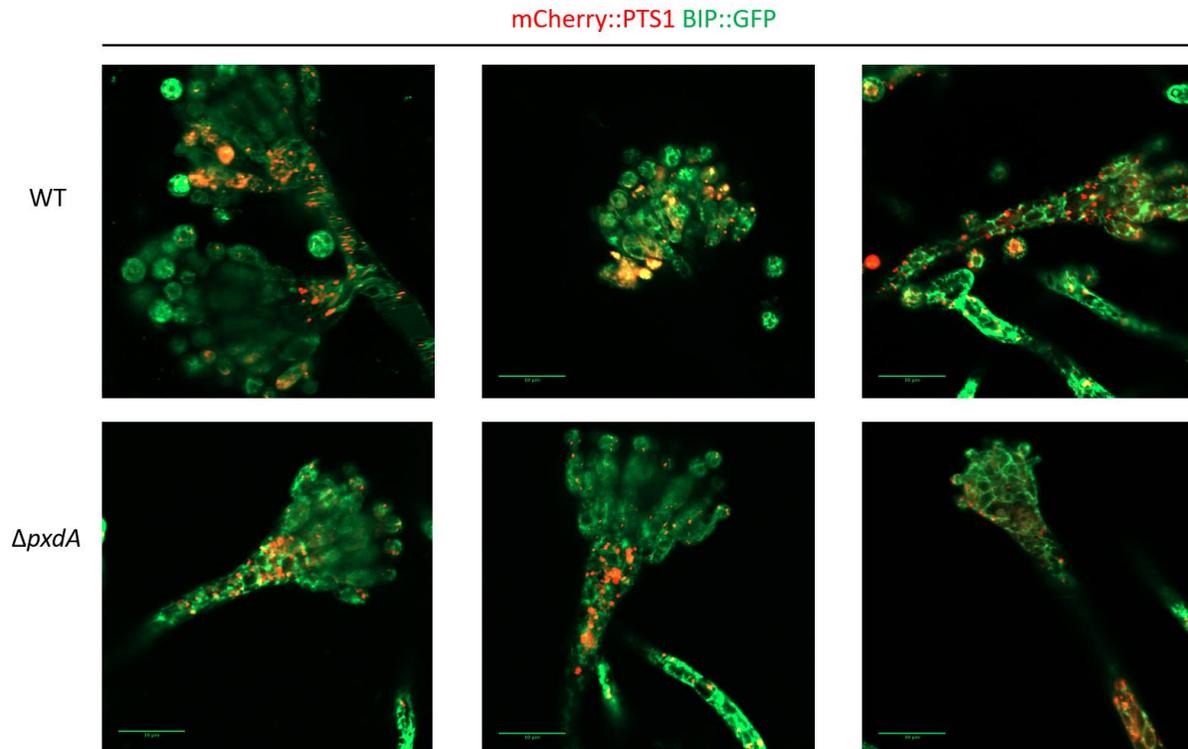
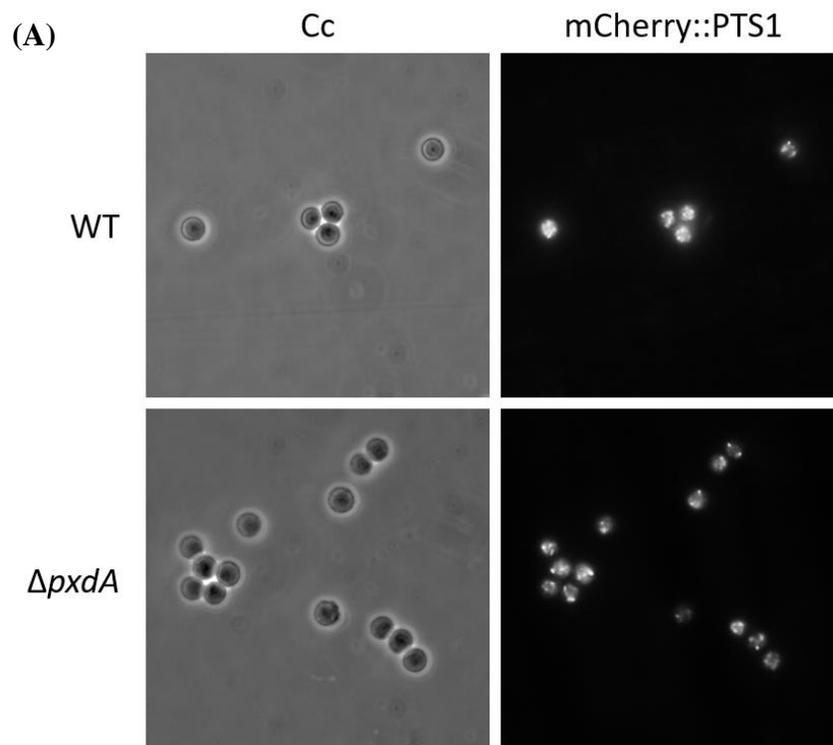


Figura 32. La herencia del retículo endoplásmico no se afecta durante la conidiación en una mutante *ΔpxdA*. Conidióforos de las cepas silvestre WT CDC11 y *ΔpxdA* CDC05 se colectaron a los dos días de crecimiento en MM-glucosa. El RE con GFP

y los PX con mCherry se logran observar a través de microscopía confocal. El RE en ambas cepas se encuentra presente en las métulas, las fiálides, y en los conidios.

8. La carencia de movimiento peroxisomal sí afecta la herencia de los peroxisomas durante la formación de las esporas asexuales.

Se realizó un análisis microscópico para contar el número de los PX en los conidios de la mutante $\Delta pxdA$ CDC02 en comparación con la cepa silvestre RPA520. El ensayo cuantitativo se llevó a cabo utilizando cien esporas de cada cepa (**Figura 33**, panel **A**). Los resultados muestran que, aunque el número de los PX por espora en la cepa silvestre puede variar entre 2-9, la mayoría posee entre 5-6 PX. En la mutante $\Delta pxdA$ el número de PX por espora puede variar entre 1-7. Sin embargo, la mayoría de los conidios $\Delta pxdA$ poseen entre 2-4 PX (**Figura 33**, panel **B** y **C**). Estos resultados indican que la falta de movimiento peroxisomal en la mutante $\Delta pxdA$ resulta en una menor herencia de los PX a los conidios y sugiere que los microtúbulos son un componente importante en la herencia de los organelos y las estructuras que son cotransportados con los endosomas.



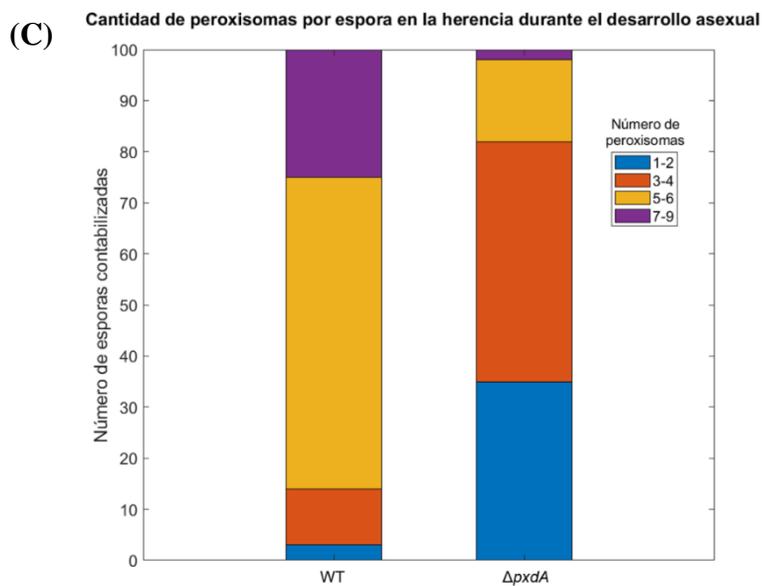
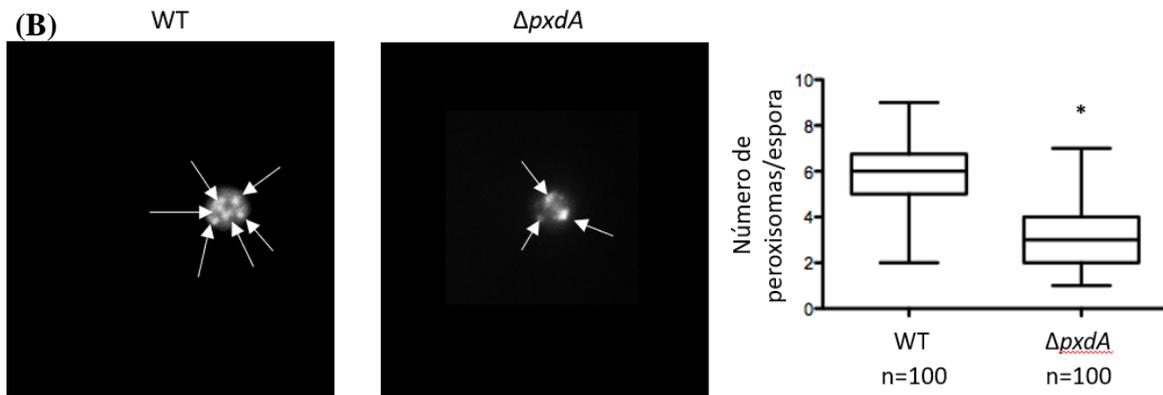


Figura 33. Las mutantes $\Delta pxdA$ presentan una menor herencia de los PX durante el ciclo asexual. (A) Se hicieron crecer las cepas silvestre RPA520 (WT) y $\Delta pxdA$ CDC02 en MM-glucosa por 3 días a 37°C. Se tomaron conidios en un portaobjetos con 5 μ L de agua y se observaron utilizando microscopía de epifluorescencia. Los PX están marcados con la proteína roja fluorescente mCherry unida a la secuencia peroxisomal PTS1. Cc indica campo claro. (B) Acercamiento de conidios obtenidos de la misma forma. Las flechas blancas indican los PX contabilizados en los conidios mostrados. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del conteo total que se llevó a cabo en cien conidios para la cepa silvestre RPA520 (WT) y cien conidios para la cepa $\Delta pxdA$ CDC02. La caja del centro para cada muestra indica la media de los datos, con un valor de 6 PX por espora para la cepa WT y 3 PX por espora para la mutante $\Delta pxdA$. Datos analizados con la prueba de comparación de medias de grupos independientes *t* test por Mann Whitney, datos estadísticamente significativos se indican con asterisco (* $p < 0.05$). (C) Gráfico de barras apiladas que muestran el porcentaje del número de PX por espora en cepas silvestre WT RPA520 y $\Delta pxdA$ CDC02. Se calcularon los datos con el conteo de PX en cien esporas para la cepa silvestre y cien esporas para la cepa mutante. Cada color representa valores diferentes de la cantidad de PX por espora (azul, 1 a 2 peroxisomas; rojo, 3 a 4; amarillo, 5 a 6; violeta, 7 a 9).

Discusión

La proteína PxdA en el crecimiento y el desarrollo asexual de *A. nidulans*

El transporte vesicular que se lleva a cabo a través del citoesqueleto es fundamental para el buen funcionamiento, crecimiento y mantenimiento celular (Revisión Riquelme *et al.*, 2018). Este mecanismo de distribución espacio-temporal de los diversos organelos, proteínas, y del mRNA, requiere de la unión a dineínas y kinesinas, las proteínas motoras que unen los cargos para el transporte basado en el citoesqueleto de microtúbulos. En este trabajo demostramos que la proteína PxdA es crucial para el crecimiento y desarrollo de *A. nidulans*. Anteriormente se había demostrado que esta proteína es necesaria para la unión entre los PX y los ET y para coordinar así el desplazamiento de ambos organelos, mediante la proteína HookA, a través de los microtúbulos (Salogiannis, Egan, y Reck-Peterson, 2016; Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, en estos estudios no se describieron otros efectos de la ausencia de PxdA. El hecho de que la carencia de PxdA cause defectos en la herencia peroxisomal durante la esporulación asexual (**Figura 33**) y una reducción en la producción de esporas, así como una reducción en el crecimiento radial (**Figura 16**, **Figura 17** y **Figura 18**) indica que el transporte apropiado de los PX está ligado al crecimiento y desarrollo en los hongos.

En este trabajo demostramos que las cepas $\Delta pxdA$ presentan una disminución en el número de conidióforos y conidios (**Figura 18**). En otros hongos, también se ha relacionado la disminución de la esporulación asexual con la falta de PX o la producción de los PX no funcionales debido a fallas en la importación de las proteínas de la matriz. En *Metarhizium robertsii*, mutantes carentes del gen *MrPEX33*, el cual codifica para la peroxina MrPEX33 relacionada con el complejo de importación de las proteínas hacia la matriz del PX, presentan una disminución significativa en la formación de conidios. Esto se acompaña de la regulación a la baja de varios genes necesarios para la conidiación, tales como *wetA*, *abaA* y *brlA* (Z. Wang *et al.*, 2021). Otros estudios, en *Magnaporthe oryzae*, donde se eliminaron las peroxinas homólogas Pex13 y Pex14 (MoPEX13 y MoPEX14), se demostró la importancia de la biogénesis de los PX en la patogenicidad. Además, se encontró que las mutantes $\Delta mopex13$ forman colonias más pequeñas, con pocas hifas aéreas y una producción reducida de conidios en comparación con la cepa silvestre, así como una pérdida completa de la patogenicidad del hongo (J. Y. Wang *et al.*, 2019). Nuestros datos muestran que, en glucosa, las mutantes $\Delta pxdA$ tienen una clara disminución en

el crecimiento radial y una disminución de aproximadamente 40% en la producción de esporas asexuales (conidios), con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, en un medio con oleato las mutantes $\Delta pxdA$ muestran un crecimiento radial semejante al de una cepa silvestre (**Figura 18**), mientras que las mutantes que carecen por completo de PX muestran un crecimiento muy reducido en ácidos grasos como fuente de carbono (Hynes *et al.*, 2008). Es posible que la proliferación de los PX, que ocurre en presencia de oleato (Garrido-Bazán *et al.*, 2020; Valenciano *et al.*, 1996, 1998) pueda compensar la falta de movimiento de dichos organelos causado por la falta de la proteína PxdA. En todo caso, es notable que la sola falta de movimiento peroxisomal tenga algunos efectos semejantes a los causados por la carencia o falta de funcionalidad de dichos corpúsculos.

Se ha reportado que, al igual que la carencia de PxdA, la carencia de la fosfatasa DipA también afecta el transporte de los PX y que DipA se une a los ET de una manera dependiente de PxdA (Salogiannis *et al.*, 2021). Esta dependencia y la co-localización de ambas proteínas, indican que se requiere de una asociación de PxdA con DipA para el movimiento en conjunto con los PX. En un análisis fosfoproteómico realizado en nuestro grupo de trabajo, se encontró que tanto la fosfatasa DipA como la proteína PxdA parecen estar reguladas por fosforilación, en respuesta al H_2O_2 . Se encontró que de trece fosfositos detectados en DipA, el H_2O_2 induce la desfosforilación de ocho y la aparición de un nuevo fosfosito. Por otro lado, de doce fosfositos detectados en PxdA, cuatro se desfosforilaron en presencia del H_2O_2 (Carrasco-Navarro y Aguirre, 2021). Esto sugiere que la desfosforilación de la fosfatasa DipA inducida por el H_2O_2 podría resultar en su activación y desfosforilación de PxdA. No está claro el efecto que dicha desfosforilación pueda tener en la función de PxdA. Una posibilidad sería que inactive a la proteína y de esta manera desacople el movimiento de los PX del de los ET. En este trabajo no encontramos diferencias significativas en el crecimiento de las mutantes $\Delta pxdA$ en MM con H_2O_2 a diferentes concentraciones (**Figura 26**). Sin embargo, no analizamos la posibilidad de que el H_2O_2 pueda restringir el movimiento peroxisomal. En cualquier caso, la importancia de la fosforilación de DipA y de PxdA, quedan por definirse.

La carencia de *pxdA* afecta el desarrollo sexual

Nuestros resultados muestran que la falta de la proteína PxdA, lo cual impide la distribución normal de los PX, afecta el proceso de diferenciación sexual en al menos dos niveles. En primer lugar, las mutantes $\Delta pxdA$ forman cleistotecios (cuerpos fructíferos) frágiles, que se colapsan inmediatamente en un ambiente carente de humedad (**Figura 21**, **Figura 22** y **Figura 24**). Esto sugiere que el movimiento peroxisomal es importante para la producción y/o la distribución de los componentes de la pared celular, durante la formación de los cleistotecios, lo que podría estar relacionado también con deficiencias en el metabolismo relacionado con los PX. En estudios previos se ha demostrado que los defectos en los PX trae consigo una cantidad de deficiencias metabólicas en diferentes niveles, como en *A. alternata* (Wu *et al.*, 2021) en el cual recientemente se reportó que afectar la importación de proteínas de la matriz peroxisomal altera la integridad de la pared celular, la cual está compuesta principalmente por quitina, β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y manoproteínas. Dado que la quitina y el glucano de la pared celular de los hongos pueden derivarse del acetyl-CoA, y teniendo en cuenta que este se produce principalmente en los PX (Chen *et al.*, 2016), es posible que los defectos en la función peroxisomal puedan producir deficiencias en la integridad de la pared celular. Así, mutantes de *M. oryzae* carentes de las peroxinas MoPEX5, MoPEX6 y MoPEX19, con defectos en la función peroxisomal, son sensibles a los agentes perturbadores de pared celular, como el rojo Congo y el calcofluor (Chen *et al.*, 2016). Por otro lado, en ascomicetos como *A. nidulans*, *Podospora anserina* y *Neurospora crassa* se sabe que la formación de los cuerpos fructíferos sexuales se ve afectada cuando se compromete la biogénesis del peroxisoma (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). En el caso de *A. nidulans*, los defectos en el sistema de importación PTS1 de proteínas de la matriz peroxisomal conducen a la producción de cleistotecios pequeños en cruza homocigóticas y a una reducción significativa de la conidiación (Hynes *et al.*, 2008).

En un segundo nivel, la carencia de la proteína PxdA llevó a la formación de un menor número de esporas sexuales o ascosporas (**Figura 23**), muchas de las cuales resultaron no viables (**Figura 25**). Durante la reproducción sexual se llevan a cabo cambios en la arquitectura y en los procesos de diferenciación celular que implican una coordinación espacio-temporal entre varios eventos del desarrollo celular y la progresión a través de la cariogamia y la meiosis. Los PX parecen jugar un papel importante para la orquestación de estos procesos del desarrollo (Peraza-Reyes

y Berteaux-Lecellier, 2013). Esto podría estar relacionado con el agotamiento de nutrientes externos, que es el momento donde ocurre frecuentemente la reproducción sexual en los hongos, y donde se requiere la traslocación de nutrientes por medio de las células vegetativas preexistentes para la formación de los cuerpos fructíferos. Estos nutrientes son proporcionados por el micelio vegetativo a través de compuestos de reservas tales como los lípidos. Los lípidos se acumulan en la fase vegetativa que precede al desarrollo sexual y luego se oxidan por la β -oxidación en los PX para producir, junto con el ciclo del glioxilato, intermediarios energéticos y biosintéticos para apoyar la formación de cuerpos fructíferos sexuales, como se ha demostrado en el patógeno de los cereales *Gibberella zeae* (anamorfo: *Fusarium graminearum*) (Guenther *et al.*, 2009). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que se afecte el proceso de generación de estos compuestos biosintéticos para el desarrollo sexual en mutantes que no puedan transportar a los PX.

Además, durante la formación de ascosporas se han evidenciado cambios morfológicos de los PX, los cuales en su mayoría son pequeños y esféricos y se encuentran poblando las ascas tempranas. Luego de que estos alcanzan su longitud final, los PX muestran una morfología alargada, desde el final de la división meiótica hasta las primeras etapas de formación de las ascosporas (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). De igual forma, los cambios también se presentan en cuanto al número y la distribución de los PX durante la progresión de las diferentes etapas del desarrollo sexual. Estos organelos son relativamente escasos en las células dicarióticas, pero proliferan en las ascas de rápido crecimiento. La segunda proliferación peroxisomal se lleva a cabo en la formación de las ascosporas y produce ascosporas repletas de PX antes de su maduración (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). Esto implica una regulación simultánea de la dinámica y la biogénesis de los PX con el desarrollo sexual en los hongos. En *P. anserina* la eliminación de cualquier peroxina del complejo de RING-finger (importación de proteínas de matriz peroxisomal) o del exportómero, bloquea el inicio del desarrollo meiótico (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). Es así como una mutante carente de PEX2 (peroxina del complejo RING-finger), deficiente para la importación de casi todas las proteínas peroxisomales, no puede realizar el cambio del ciclo mitótico al meiótico (Bonnet *et al.*, 2006). Por otra parte, las peroxinas de importación de proteínas a la matriz peroxisomal, PEX5 y PEX7, y las peroxinas de acoplamiento PEX14 y PEX14/17, no parecen necesarias para el desarrollo sexual antes de la formación de meiocitos (Suaste-Olmos *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque las mutantes

carentes de los genes *pex5* y *pex7* puedan hacer el desarrollo meiótico, producen cuerpos fructíferos (peritecios en *P. anserina*) más pequeños y en menor cantidad que la cepa silvestre (Bonnet *et al.*, 2006). La misma carencia de estas peroxinas conlleva a anomalías mitocondriales en las hifas vegetativas que son consistentes con la dinámica mitocondrial alterada, datos que sugieren que existe una posible interacción entre los PX y MIT durante el desarrollo sexual (Bonnet *et al.*, 2006; Navarro-Espíndola *et al.*, 2020).

Todos estos reportes son consistentes con el hecho de que la carencia del movimiento de los PX afecte el proceso del desarrollo sexual. Sin embargo, se requiere de mayor investigación para determinar los mecanismos mediante los cuales, la imposibilidad de transportar a los PX, puede relacionarse con la formación y maduración de los cleistotecios y la producción de ascosporas viables.

No se presentan cambios dramáticos en la morfología y/o distribución de otros organelos celulares en mutantes incapaces de mover los PX

Una forma común de comunicación entre organelos es a través de los sitios de contacto físico donde se unen las membranas de los organelos, lo que facilita el intercambio de moléculas pequeñas y la señalización intracelular (Shai *et al.*, 2016). Muchos de los contactos de membrana requieren una regulación dinámica, ya que no se requieren permanentemente y deben adaptarse a las necesidades cambiantes de la célula.

Se ha reportado que durante el proceso de herencia peroxisomal en *S. cerevisiae*, algunos PX se retienen en la célula madre mientras otros son heredados. Esta herencia regulada está mediada por dos complejos que actúan en las interfaces RE-PX (retículo endoplásmico y peroxisomas), uno que permite la retención de PX en la célula madre y otro que promueve su segregación hacia la gema. El complejo de anclaje consiste en Pex3, peroxina que reside tanto en PX como en el RE, y el factor de herencia de PX, Inp1. Se sugirió que esta unión mantiene los PX en las células madre. De hecho, en las células que carecen de unión RE-PX, los PX se acumulan en las células hijas (Shai *et al.*, 2016). Por otro lado, el movimiento dirigido de los PX de madre a hija durante la división implica la unión de los PX a los cables de actina mediante la interacción de la miosina II con el factor específico de PX, Inp2 (Smith y Aitchison, 2013).

Además, estos contactos RE-PX también regulan la proliferación de PX. Se ha reportado que la peroxina Pex30 se encuentra regulando negativamente la proliferación peroxisomal. Pex30 se localiza principalmente en los contactos RE-PX y se convierte en parte de un complejo con reticulones Rtn1, Rtn2 y Yop1, proteínas integrales de la membrana que doblan la bicapa de fosfolípidos en la parte externa para permitir la división y estabilización de los túbulos curvados del RE. Pex30 es la única peroxina en la levadura *S. cerevisiae* cuya secuencia de aminoácidos termina con un motivo de dilisina de recuperación de RE (-KKXX). La presencia de este motivo sugiere un mecanismo para asegurar la presencia de proteínas Pex30p en la membrana del RE (David *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha evidenciado la importancia de los sitios de contacto entre el RE y otros organelos, como los PX y las MIT, los cuales se requieren para el transporte de la mayoría de los lípidos desde el RE hacia dichos organelos, debido a que los PX y las MIT no pueden sintetizar todos los lípidos que necesitan para funcionar y, por lo tanto, dependen de esta transferencia (Silva *et al.*, 2020). Estos sitios de contacto ocurren a través del complejo ERMES, el cual comprende cuatro proteínas: la proteína de la membrana externa mitocondrial Mdm10, la proteína Mmm1 residente en RE y dos proteínas de la membrana periférica, Mdm34 y Mdm12. Con la excepción de Mdm10, las proteínas ERMES contienen un dominio SMP (dominio de unión a lípidos mitocondriales similar a la sinaptotagmina, que contienen una estructura muy conservada que consta de un dominio transmembrana N-terminal, un conector y dos dominios C-terminales sensibles al calcio) (Esposito *et al.*, 2019). Esto permite el intercambio de fosfolípidos esenciales con el RE. En estudios realizados para la detección del patrón de localización subcelular de Pex11 en levadura, se observó que esta localización y la morfología de los PX se vio profundamente afectada por mutaciones en un grupo de genes que engloba a *MDM10*, *MDM12* y *MDM34*, que codifican los componentes mitocondriales y citosólicos del complejo ERMES. La cancelación de estos genes provocó un patrón de localización de Pex11 específicamente alterado, mientras que la cancelación de *MMM1*, el gen que codifica el cuarto componente del complejo, no afectó el fenotipo ni la morfología de los PX. También se encontró que la peroxina Pex11 y Mdm34 interactúan físicamente y que Pex11 juega un papel en el establecimiento de los sitios de contacto entre PX y MIT a través del complejo ERMES (Mattiuzzi Ušaj *et al.*, 2015).

Debido a estas interacciones entre MIT-PX-RE, se consideró que la falta de movimiento de los PX podría afectar parte de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en estos organelos y/o afectar su morfología o distribución celular. Sin embargo, de manera cualitativa, no se detectaron diferencias evidentes en la morfología y la distribución de las MIT ni del RE en las mutantes $\Delta pxdA$. De igual forma, tampoco se detectaron cambios en la distribución de la proteína DnmA, necesaria para la división de las MIT y PX. Esto sugiere que el movimiento de las MIT y del RE es independiente del movimiento peroxisomal y que algunos PX logran mantener sus interacciones con las MIT y el RE mediante los complejos proteicos asociados a los puntos de contacto o “tethering complexes” mencionados anteriormente.

Conclusiones

- PxdA, una proteína que acopla el movimiento de los peroxisomas a los endosomas a través del citoesqueleto de microtúbulos, se requiere para el desarrollo vegetativo normal de *Aspergillus nidulans*, dado que su ausencia resulta en una disminución en el crecimiento radial y la esporulación asexual.
- La eliminación de *pxdA* ocasiona defectos en la herencia asexual de los peroxisomas, causando en promedio una menor cantidad de estos organelos en los conidios, en comparación con una cepa silvestre.
- El ciclo sexual se ve afectado por la carencia de la proteína PxdA, ya que esto provoca una mayor producción de cuerpos fructíferos (cleistotecios) que se colapsan en baja humedad y muestran una menor producción de esporas meióticas, muchas de ellas no viables.
- La ausencia de PxdA no altera de manera notable la morfología o distribución celular de las mitocondrias, el retículo endoplásmico o la proteína de división mitocondrial/peroxisomal, DnmA.

Perspectivas

- Estudiar si existe algún defecto en el crecimiento de las mutantes $\Delta pxdA$ en condiciones de ayuno debido a la importancia de los cuerpos lipídicos y su estrecha relación con los peroxisomas durante la β -oxidación de ácidos grasos en el ayuno.
- Comprobar de manera estadística que los defectos en el movimiento de peroxisomas no afectan la morfología y la distribución del retículo endoplásmico y las mitocondrias.
- Comparar los defectos observados por la carencia del movimiento de los peroxisomas con los defectos presentados por la carencia de peroxisomas cuando se elimina el gen *pexC* u otro involucrado con la biogénesis de este organelo.

Referencias bibliográficas

- Adams, T. H., Yu, J. H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current Opinion in Microbiology*, 1(6), 674–677. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80114-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80114-8)
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Al-saigh, R. (2013). Development of a new in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model simulating human pharmacokinetics for studying the effect of antifungal drugs and their combination against *Aspergillus* species (PhD Thesis). *University of Babylon*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30626.43200>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell, 6th Edition. In *Medicine & Science in Sports & Exercise* (Vol. 40, Issue 9). <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e318185ce9d>
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 67(4), 891–905. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x>
- Bartoszewska, M., Opaliński, Ł., Veenhuis, M., van der Klei, I. J. (2011). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1921–1931. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0664-y>
- Bonekamp, N. A., Völkl, A., Fahimi, H. D., Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *BioFactors*, 35(4), 346–355. <https://doi.org/10.1002/biof.48>
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boissard, S., Bourdais, A., Berteaux-Lecellier, V. (2006). The

- peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Molecular Microbiology*, 62(1), 157–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05353.x>
- Carrasco-Navarro, U., Aguirre, J. (2021). H₂O₂ induces major phosphorylation changes in critical regulators of signal transduction, gene expression, metabolism and developmental networks in *aspergillus nidulans*. *Journal of Fungi*, 7(8), 12–15. <https://doi.org/10.3390/jof7080624>
- Chen, C., Li, J., Qin, X., Wang, W. (2020). Peroxisomal Membrane Contact Sites in Mammalian Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00512>
- Chen, X. L., Wang, Z., Liu, C. (2016). Roles of Peroxisomes in the Rice Blast Fungus. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9343417>
- Clutterbuck A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63(2), 317–327.
- Dahabieh, M. S., Di, E., Jangal, M., Goncalves, C., Witcher, M., Braverman, N. E., Sonia, V. (2018). BBA - Reviews on Cancer Peroxisomes and cancer : The role of a metabolic specialist in a disease of aberrant metabolism. *BBA - Reviews on Cancer*, 1870(1), 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.004>
- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., Schummer, A., Erdmann, R., Warscheid, B., Brocard, C. (2013). A combined approach of quantitative interaction proteomics and live-cell imaging reveals a regulatory role for endoplasmic reticulum (ER) Reticulon Homology Proteins in peroxisome biogenesis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(9), 2408–2425. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017830>
- De Duve, C., Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46(2), 323–357. <https://doi.org/10.1152/physrev.1966.46.2.323>
- Dexter, D. T., Holley, A. E., Flitter, W. D., Slater, T. F., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., Marsden, C. D. (1994). Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian

- substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Movement Disorders*, 9(3), 380–380.
<https://doi.org/10.1002/mds.870090328>
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S. Y., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., Nibert, M. L., Superti-Furga, G., Kagan, J. C. (2010). Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity. *Cell*, 141(4), 668–681.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.018>
- Eckert, J. H., Erdmann, R. (2003). Peroxisome biogenesis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 147(March), 75–121.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.701>
- Egan, M. J., McClintock, M. A., Reck-peterson, S. L. (2012). Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 637–645.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.10.003>
- Esposito, M., Denmat, S. H. Le, Delahodde, A. (2019). Contribution of ERMES subunits to mature peroxisome abundance. *PLoS ONE*, 14(3), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214287>
- Farré, J., Mahalingam, S. S., Proietto, M., Subramani, S. (2019). Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Reports*, 20(1).
<https://doi.org/10.15252/embr.201846864>
- Garrido-Bazán, V., Pardo, J. P., Aguirre, J. (2020). DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission, and Regulate Mitochondrial Function, ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00837>
- Garrido, V. (2021). Las cinasas sensoras de estrés SakA y MpkC y las proteínas DnmA y FisA, en la respuesta al estrés oxidativo, la dinámica mitocondrial y la diferenciación celular en *Aspergillus nidulans* (Tesis doctoral). UNAM.
- Grabenbauer, M., Sätzler, K., Baumgart, E., Fahimi, H. D. (2000). Three-Dimensional Ultrastructural Analysis of Peroxisomes in HepG2 Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*,

32(1–3), 37–49. <https://doi.org/10.1385/cbb:32:1-3:37>

- Guenther, J. C., Hallen-Adams, H. E., Bücking, H., Shachar-Hill, Y., Trail, F. (2009). Triacylglyceride metabolism by *Fusarium graminearum* during colonization and sexual development on wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(12), 1492–1503. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1492>
- Guimaraes, S. C., Schuster, M., Bielska, E., Dagdas, G., Kilaru, S., Meadows, B. R. A., Schrader, M., Steinberg, G. (2015). *Peroxisomes , lipid droplets , and endoplasmic reticulum “ hitchhike ” on motile early endosomes*. 1–10. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505086>
- Haigis, M. C., Yankner, B. A. (2010). The Aging Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.002>
- Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, 91(3 SUPPL.), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)03144-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)03144-2)
- Hill, T. W., Kafer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports*, 48(1), 20–21. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173>
- 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(3), 1355–1369. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.085795>
- Iida, R., Yasuda, T., Tsubota, E., Takatsuka, H., Matsuki, T., Kishi, K. (2006). Human Mpv17-like protein is localized in peroxisomes and regulates expression of antioxidant enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.008>
- Jankowski, S., Pohlmann, T., Baumann, S., Müntjes, K., Devan, S. K., Zander, S., Feldbrügge, M. (2019). The multi PAM 2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport . *EMBO Reports*, 20(9), 1–15. <https://doi.org/10.15252/embr.201847381>

- Jedd, G., Chua, N. H. (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology*, 2(4), 226–231. <https://doi.org/10.1038/35008652>
- Kawasaki, L., Aguirre, J. (2001). Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1434–1440. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1434-1440.2001>
- Kawasaki, Laura, Sánchez, O., Shiozaki, K., Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 45(4), 1153–1163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x>
- Kehrer, J. P., Robertson, J. D., Smith, C. V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Comprehensive Toxicology: Second Edition*, 1–14, 277–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>
- Kimura, A., Takano, Y., Furusawa, I., Okuno, T. (2001). *Peroxisomal Metabolic Function Is Required for Appressorium-Mediated Plant Infection by Colletotrichum lagenarium*. 13(August), 1945–1957.
- Knoblach, B., Rachubinski, R. A. (2010). Phosphorylation-dependent activation of peroxisome proliferator protein PEX11 controls peroxisome abundance. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6670–6680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094805>
- Kong, J., Ji, Y., Jeon, Y. G., Han, J. S., Han, K. H., Lee, J. H., Lee, G., Jang, H., Choe, S. S., Baes, M., Kim, J. B. (2020). Spatiotemporal contact between peroxisomes and lipid droplets regulates fasting-induced lipolysis via PEX5. *Nature Communications*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14176-0>
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Veluw, G. J. Van, Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Lodhi, I. J., Semenkovich, C. F. (2014). Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular

- signaling. *Cell Metabolism*, 19(3), 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002>
- López-Fuentes, A. de J., Meizoso-Huesca, A., Peraza-Reyes, L. (2020). An endoplasmic reticulum domain is associated with the polarized growing cells of *Podospora anserina* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*, 137(October 2019), 103338. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103338>
- Maggio-Hall, L. A., Keller, N. P. (2004). Mitochondrial β -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1173–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04340.x>
- Markham, P., Campus, K., Hill, C. (1987). *Woronin bodies of filamentous fungi*. 46, 1–11.
- Masterson, C., Wood, C. (2001). Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation capacities of organs from a non-oilseed plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1479), 1949–1953. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1783>
- Mattiazzi Ušaj, M., Brložnik, M., Kaferle, P., Žitnik, M., Wolinski, H., Leitner, F., Kohlwein, S. D., Zupan, B., Petrovič, U. (2015). Genome-wide localization study of yeast pex11 identifies peroxisome-mitochondria interactions through the ERMES complex. *Journal of Molecular Biology*, 427(11), 2072–2087. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.004>
- Navarro-Espíndola, R., Suaste-Olmos, F., Peraza-Reyes, L. (2020). Dynamic regulation of peroxisomes and mitochondria during fungal development. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–30. <https://doi.org/10.3390/jof6040302>
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., De Bittencourt, P. I. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24), 4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- O’Hara, E. B., Timberlake, W. E. (1989). Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus. *Genetics*, 121(2), 249–254. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.2.249>
- Peraza-Reyes, L., Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, 4 SEP(September), 1–16.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00244>

Pontecorvo, G., Roper, J. A., Chemmons, L. M., Macdonald, K. D., Bufton, A. W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5, 141–238.

Sacanelles, R. S. (2008). *Peroxisomas: organelos polifacéticos*. 27(3), 85–92.

Salogiannis, J., Christensen, J. R., Songster, L. D., Aguilar-maldonado, A., Spang, A. (2021). PxdA interacts with the DipA phosphatase to regulate peroxisome hitchhiking on early endosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 32. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-08-0559>

Salogiannis, J., Egan, M. J., Peterson, S. L. R. (2016). *Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA*. February. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512020>

Salogiannis, J., Egan, M. J., Reck-Peterson, S. L. (2016). Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *Journal of Cell Biology*, 212(3), 289–296. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512020>

Salogiannis, J., Reck-peterson, S. L. (2016). Hitchhiking: A Non-Canonical Mode of Microtubule-Based Transport. *Trends in Cell Biology*, xx, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.005>

Sánchez, O., Aguirre, J. (1996). Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. *Fungal Genetics Reports*, 43(1), 48–51. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1317>

Sargsyan, Y., Thoms, S. (2020). Staying in Healthy Contact: How Peroxisomes Interact with Other Cell Organelles. *Trends in Molecular Medicine*, 26(2), 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.012>

Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W. H., Veenhuis, M., Rottensteiner, H. (2006). A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell*, 5(9), 1490–1502. <https://doi.org/10.1128/EC.00113-06>

- Schrader, M., Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>
- Schrader, M., Grille, S., Fahimi, H. D., Islinger, M. (2013). Peroxisome Interactions and Cross-Talk with Other Subcellular Compartments in Animal Cells. In L. A. del Río (Ed.), *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism* (pp. 1–22). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_1
- Shai, N., Schuldiner, M., Zalckvar, E. (2016). No peroxisome is an island - Peroxisome contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(5), 1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.016>
- Shaw, B. D., Chung, D. W., Wang, C. L., Quintanilla, L. A., Upadhyay, S. (2011). A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biology*, 115(6), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.010>
- Silva, B. S. C., DiGiovanni, L., Kumar, R., Carmichael, R. E., Kim, P. K., Schrader, M. (2020). Maintaining social contacts: The physiological relevance of organelle interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(11), 118800. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118800>
- Smith, J. J., Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 803–817. <https://doi.org/10.1038/nrm3700>
- Sohn, K. T., Yoon, K. S. (2002). Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology*, 30(3), 117. <https://doi.org/10.4489/myco.2002.30.3.117>
- Suaste-Olmos, F., Ziri6n-Mart6nez, C., Takano-Rojas, H., Peraza-Reyes, L. (2018). Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(4), 572–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.003>
- Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J., McBride, H. M. (2017). Newly born peroxisomes are a hybrid

- of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*, 542(7640), 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature21375>
- Tan, K., Roberts, A. J., Chonofsky, M., Egan, M. J., Reck-Peterson, S. L. (2014). A microscopy-based screen employing multiplex genome sequencing identifies cargo-specific requirements for dynein velocity. *Molecular Biology of the Cell*, 25(5), 669–678. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0557>
- Valenciano, S., De Lucas, J. R., Pedregosa, A., Monistrol, I. F., Laborda, F. (1996). Induction of β -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology*, 166(5), 336–341. <https://doi.org/10.1007/s002030050392>
- Valenciano, S., De Lucas, J. R., Van Der Klei, I., Veenhuis, M., Laborda, F. (1998). Characterization of *Aspergillus nidulans* peroxisomes by immunoelectron microscopy. *Archives of Microbiology*, 170(5), 370–376. <https://doi.org/10.1007/s002030050655>
- van der Klei, I. J., Yurimoto, H., Sakai, Y., Veenhuis, M. (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1453–1462. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.016>
- Van Weering, J. R. T., Cullen, P. J. (2014). Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 31, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.015>
- Vigneron, A., Vousden, K. H. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging*, 2(8), 471–474. <https://doi.org/10.18632/aging.100189>
- Walenta, J. H., Didier, A. J., Liu, X., Krämer, H. (2001). The Golgi-associated Hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *Journal of Cell Biology*, 152(5), 923–934. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.923>
- Wanders, R. J. A., Ferdinandusse, S., Brites, P., Kemp, S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.01.001>

- Wang, J. Y., Li, L., Chai, R. Y., Qiu, H. P., Zhang, Z., Wang, Y. L., Liu, X. H., Lin, F. C., Sun, G. C. (2019). Pex13 and Pex14, the key components of the peroxisomal docking complex, are required for peroxisome formation, host infection and pathogenicity-related morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Virulence*, *10*(1), 292–314. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1598172>
- Wang, Z., Feng, J., Jiang, Y., Xu, X., Xu, L., Zhou, Q., Huang, B. (2021). MrPEX33 is involved in infection-related morphogenesis and pathogenicity of *Metarhizium robertsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(3), 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11071-3>
- Winterbourn, C. C. (2020). Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*, *6*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0101-8>
- Wu, P.-C., Chen, Y.-K., Yago, J. I., Chung, K.-R. (2021). Peroxisomes Implicated in the Biosynthesis of Siderophores and Biotin, Cell Wall Integrity, Autophagy, and Response to Hydrogen Peroxide in the Citrus Pathogenic Fungus *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*, *12*(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645792>
- Xiang, X., Plamann, M. (2003). Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(6), 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.009>
- Zekert, N., Veith, D., Fischer, R. (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryotic Cell*, *9*(5), 795–805. <https://doi.org/10.1128/EC.00058-10>
- Zhang, J., Qiu, R., Arst, H. N., Peñalva, M. A., Xiang, X. (2014). HookA is a novel dynein-early endosome linker critical for cargo movement in vivo. *Journal of Cell Biology*, *204*(6), 1009–1026. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308009>