



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El papel de los factores transcripcionales NapA y SrrA en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Ariann Elizabeth Mendoza Martínez

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

Dra. Rosa Estela Navarro
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Mayo, 2019



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.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son subproductos del metabolismo aerobio	8
La respuesta antioxidante	10
La respuesta antioxidante es un proceso altamente conservado y regulado a través de diversas proteínas sensibles al estado redox intracelular	14
En <i>Escherichia coli</i> el factor transcripcional OxyR es sensible a modificaciones de oxido-reducción	15
En las levaduras, los factores transcripcionales AP-1 juegan un papel primordial en la respuesta antioxidante	15
En mamíferos, el factor transcripcional Nrf2 es regulador de la respuesta antioxidante	17
En los hongos filamentosos los factores transcripcionales tipo AP-1 están involucrados en diversos procesos	18
<i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio	19
Reproducción asexual	20
Reproducción sexual	20
Los factores transcripcionales NapA y SrrA en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular en el hongo <i>Aspergillus nidulans</i>	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos Particulares	25
RESULTADOS	26
<i>A. nidulans</i> contiene genes que codifican para proteínas con posible actividad de Prx-1Cys y Prx-2Cys	27

La mutante <i>ΔprxA</i> muestra una sensibilidad al estrés oxidante muy similar a la de la mutante <i>ΔnapA</i>	30
La proteína PrxB tiene una contribución menor que PrxA en la respuesta antioxidante, tanto en esporas asexuales como en el micelio	31
PrxA es una proteína altamente abundante que se localiza en todo el citoplasma	34
La mutante PrxAC61S es sensible al estrés oxidativo	35
La acumulación nuclear de NapA depende de PrxA	37
NapA, PrxA y PrxB están involucrados en procesos del desarrollo sexual y asexual	38
PrxB es necesaria para asimilación de arabinosa y etanol como únicas fuentes de carbono	39
TpxA esta involucrada en la resistencia a HU	41
SrrA interacciona con diversas proteínas en ausencia y presencia de H ₂ O ₂	43
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	56
Cepas, medios y condiciones de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	56
Eliminación de los genes mediante la técnica de “double joint PCR” y transformación de <i>A. nidulans</i>	56
Eliminación de los genes <i>prxA</i> , <i>prxB</i> , <i>AN3687</i> y <i>AN4301</i>	57
Generación de las fusiones <i>PrxA::GFP</i> y <i>PrxAC61S::GFP</i>	60
Extracción de DNA	62
Microscopía	62
Cuantificación del número de esporas/cm ²	63
Generación de dobles y triples mutantes mediante cruza sexuales	63
Tabla 1. Proteínas que se unen a SrrA en condiciones normales de crecimiento	66
Tabla 2. Proteínas que se unen a SrrA en presencia de H ₂ O ₂	68
Tabla 3. Proteínas que se unen a SrrA en ausencia o presencia de H ₂ O ₂	75
Tabla 4. Cepas utilizadas en este trabajo	76

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	78
BIBLIOGRAFÍA	79
PUBLICACIONES	85

Agradecimientos

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 (UNAM). Se agradece el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González durante la realización de este trabajo.

La elaboración del trabajo fue posible gracias al financiamiento de los proyectos IN208916, IN200719 y IV200519 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM), y los proyectos CONACYT CB-2014-01-238492, Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-I-319 y CONACYT-DFG 277869, así como al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para asistir a los congresos “13th European Conference on Fungal Genetics-2016” en Paris, Francia y “XII International Fungal Biology Conference-2017” en Incheon, Corea del Sur.

Se agradece a las Unidades de Microscopía, Biología Molecular y de cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Abreviaturas

FT - Factor transcripcional
Prx - Peroxirredoxinas
ERO - Especies reactivas del oxígeno
 O_2^- - Anión superóxido
 H_2O_2 - Peróxido de hidrógeno
HO - Radical hidroxilo
 OH^- - Anión hidroxilo
NOX - NADPH oxidasas
SOD - Superóxidos dismutasas
CAT - Catalasa
Gpx - Peroxidasas dependientes de glutatión
GST - S-transferasa de glutatión
Trx - Tiorredoxina
 C_p - Cisteína peroxidativa
 C_R - Cisteína resolutive
Prx-1Cys – Peroxirredoxinas que contienen únicamente la C_p
Prx-2Cys - Peroxirredoxinas que contienen la C_p y la C_R
-SOH - Ácido sulfénico
-SO₂H - Ácido sulfínico
-SO₃H - Ácido sulfónico
Srx - Sulforedoxinas
TrxR - Tiorredoxina reductasa
cNRD – Región N- terminal rica en cisteínas
cCRD - Región C- terminal rica en cisteínas
HK - cinasas sensoras
RR - Regulador de la respuesta
Hpt - Fosfotransferasa
HSF - Heat Shock Factor
Md - Menadiona
t-BOOH
RNR - Ribonucleótido reductasa
HU - Hidroxiurea

Resumen

En este trabajo mostramos que NapA y SrrA son dos factores transcripcionales (FT) que participan en dos vías independientes de la respuesta antioxidante en el hongo *Aspergillus nidulans*. NapA es un FT de la familia AP-1, la cual incluye a los FT Yap1 y Pap1. Al igual que sus ortólogos, NapA se acumula en el núcleo en presencia de H₂O₂. Sin embargo, esta acumulación también se observó en presencia de menadiona, estrés osmótico y en ausencia de glucosa. En el ciclo asexual, NapA es necesario para la producción de niveles normales de conidias y esencial para la resistencia de estas al H₂O₂. Durante el desarrollo sexual NapA actúa como regulador negativo de la formación de cuerpos fructíferos o cleistotecios. Las mutantes $\Delta napA$ son incapaces de utilizar la arabinosa, la fructosa y el etanol como fuentes de carbono. Estos datos son consistentes con el análisis transcriptómico obtenido de esporas asexuales, en donde, NapA se requiere para la regulación de al menos 214 genes, entre los cuales se encuentran *alcR*, *alcA* y *aldA*, que codifican para proteínas involucradas en la asimilación del etanol como fuente de carbono. En levaduras, los ortólogos de NapA se activan a través de diferentes peroxirredoxinas (Prx). En este trabajo eliminamos los 7 genes que codifican para peroxirredoxinas en *A. nidulans*. Las mutantes sencillas carentes de *prxA*, *napA* o ambos genes muestran los mismos patrones de sensibilidad al estrés oxidante, indicando que de las 7 peroxirredoxinas, únicamente PrxA funciona en la misma vía que NapA durante la respuesta antioxidante. Sin embargo, encontramos que durante el desarrollo sexual y asexual, así como durante el crecimiento en diversas fuentes de carbono, NapA podría ser activado de manera diferencial a través de PrxA o PrxB. Por otro lado, SrrA es un FT, ortólogo de Skn7 en *S. cerevisiae*, el cual participa como regulador de la respuesta dentro de una vía de relevo de fosfato. En esta levadura, la interacción de Yap1 y Skn7 es necesaria para la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Sin embargo, en *A. nidulans*, las mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta napA$ presentan diferentes fenotipos de sensibilidad al estrés oxidativo, así como durante el desarrollo sexual y asexual. Adicionalmente, entre los datos de interactoma de SrrA no se detectó a NapA. Sin embargo, se detectó que SrrA interacciona con 308 proteínas en presencia o ausencia de H₂O₂. Nuestros resultados muestran que en los hongos filamentosos NapA regula no solamente la respuesta antioxidante, sino diversos aspectos del desarrollo, el metabolismo

Abstract

Aspergillus nidulans transcription factors (TFs) SrrA and NapA are part of two independent pathways related to antioxidant response. The TF NapA is a member of AP-1 family, which includes fungal Yap1 and Pap1 TFs. Just like Yap1 and Pap1 orthologs, NapA accumulates in the nucleus in presence of H₂O₂, a behavior also observed in the presence of menadione, osmotic stress or glucose starvation. NapA is essential to H₂O₂ resistance and normal conidia production, seemingly, it represses sexual development and regulates the pigmentation of the cleistothecia. By showing that $\Delta napA$ mutants are unable to grow in arabinose, fructose and ethanol, we uncovered a novel role of NapA in carbon utilization. These data are consistent with a transcriptomic analysis showing that during conidial development NapA is required for the regulation of at least 214 genes, including ethanol utilization genes *alcR*, *alcA* and *aldA*, as well as other genes involved, transcriptional regulation, drug detoxification and secondary metabolism. The redox-regulated TFs of the bZIP AP1 family, such as Yap1 and Pap1 from the budding and fission yeasts, respectively, are activated by peroxiredoxin proteins (Prxs) to regulate the antioxidant response. Here, we analysed a divergent group of 7 peroxirexins. Only the lack of PrxA results in phenotypes similar to those seen in mutants lacking NapA. Furthermore, $\Delta prxA \Delta napA$ double mutants show the same oxidative stress sensibility. Our results suggest that PrxA and PrxB could alternate the activation of NapA during growth in different carbon sources and in the sexual and asexual development. On the other hand, the TF SrrA contains a heat-shock-like DNA-binding domain and is closely related to Skn7 from *S. cerevisiae*. In yeast, about half of the genes regulated by Yap1 require its interaction with transcription factor Skn7. Nonetheless, in *A. nidulans* the $\Delta napA$ and $\Delta srrA$ spores and mycelia displayed different patterns and phenotypes during development. Besides that, the SrrA interactome, not includes NapA, but we found a total of 308 proteins binding to SrrA in the absence and presence of H₂O₂. Our results show that in filamentous fungi NapA besides regulated the antioxidant response also is involved in development processes, secondary metabolism and carbon utilization.

Introducción

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son subproductos del metabolismo aerobio

Una de las características más destacadas de algunos organismos es la capacidad de utilizar el oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones, durante la respiración aerobia. En los organismos aerobios más del 90% del O_2 consumido se reduce directamente a agua (H_2O) por el complejo IV de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Ott, Gogvadze, Orrenius, & Zhivotovsky, 2007). La reducción incompleta del O_2 a H_2O da lugar a la formación de compuestos intermedios y altamente reactivos, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). Se ha establecido que en las células eucariotas, más del 90% de las ERO se producen en la mitocondria (Skulachev, 2012), principalmente por la fuga de electrones en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Mailloux & Harper, 2012). Los electrones que escapan interaccionan con el O_2 para generar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual posteriormente, espontánea o enzimáticamente, es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 puede aceptar un electrón más y dividirse en un radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y en un anión hidroxilo (OH^-). Finalmente el HO^{\cdot} interacciona con un electrón y un protón más para formar H_2O . En los sistemas biológicos, esta última reacción se realiza a través de átomos de hidrógeno tomados de diferentes biomoléculas como las proteínas y los lípidos, resultando en el inicio de una cadena de procesos de oxidación que pueden llevar al estrés oxidativo, condición en la que existe un desequilibrio entre la generación de ERO y la habilidad de la célula para descomponerlas o neutralizar su reactividad, es decir, la capacidad celular antioxidante.

Además de las mitocondrias, las ERO también se pueden producir en la célula por diversas enzimas, tales como la xantina oxidasa, las ciclooxigenasas, lipooxigenasas, mieloperoxidasas, aldehído oxidadas y enzimas del tipo citocromo P-450 (Finkel, 2011). La contribución relativa de estas fuentes de ERO varía de acuerdo al tipo celular (Holmstrom & Finkel, 2014). La participación de las ERO en procesos fisiológicos se ha demostrado a través de las enzimas NADPH oxidadas (NOX), las cuales generan $O_2^{\cdot-}$

mediante la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno (Aguirre & Lambeth, 2010). En un principio esta familia de enzimas se relacionó con la inactivación de bacterias y otros agentes invasores a través de células del sistema inmune en los animales. Sin embargo, posteriormente las NOX se encontraron en células que no pertenecen al sistema inmune, en donde la producción de ERO es controlada de forma espacio-temporal para cumplir con funciones específicas, como la proliferación de células del sistema nervioso central (Dickinson, Peltier, Stone, Schaffer, & Chang, 2011) o bien en el folículo tiroideo, en donde, la síntesis de la hormona tiroidea involucra reacciones enzimáticas de óxido-reducción, dependientes de la presencia de H₂O₂ generado por las enzimas NOX4, y las oxidasas DUOX1 y DUOX2 (Miembros de la familia NOX). La desregulación en la expresión o en la actividad de estas oxidasas se ha relacionado con alteraciones en los nódulos tiroideos y con procesos cancerígenos (Carvalho & Dupuy, 2013). Se han identificado homólogos de NOX, los cuales están ampliamente distribuidos en plantas y hongos filamentosos (Aguirre & Lambeth, 2010). La relación entre la actividad de NOX y la diferenciación celular en los hongos se estableció en *Aspergillus nidulans*, en donde NoxA es necesaria para la formación de cuerpos fructíferos durante el ciclo sexual (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas, & Aguirre, 2003). Resultados similares se observaron en *P. anserina* (Malagnac, Lalucque, Lepere, & Silar, 2004), *N. crassa* (Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin, Hansberg, & Aguirre, 2008) y en *Botrytis cinerea*, en donde NoxA y NoxB son necesarias para la diferenciación del esclerotio (Segmuller et al., 2008).

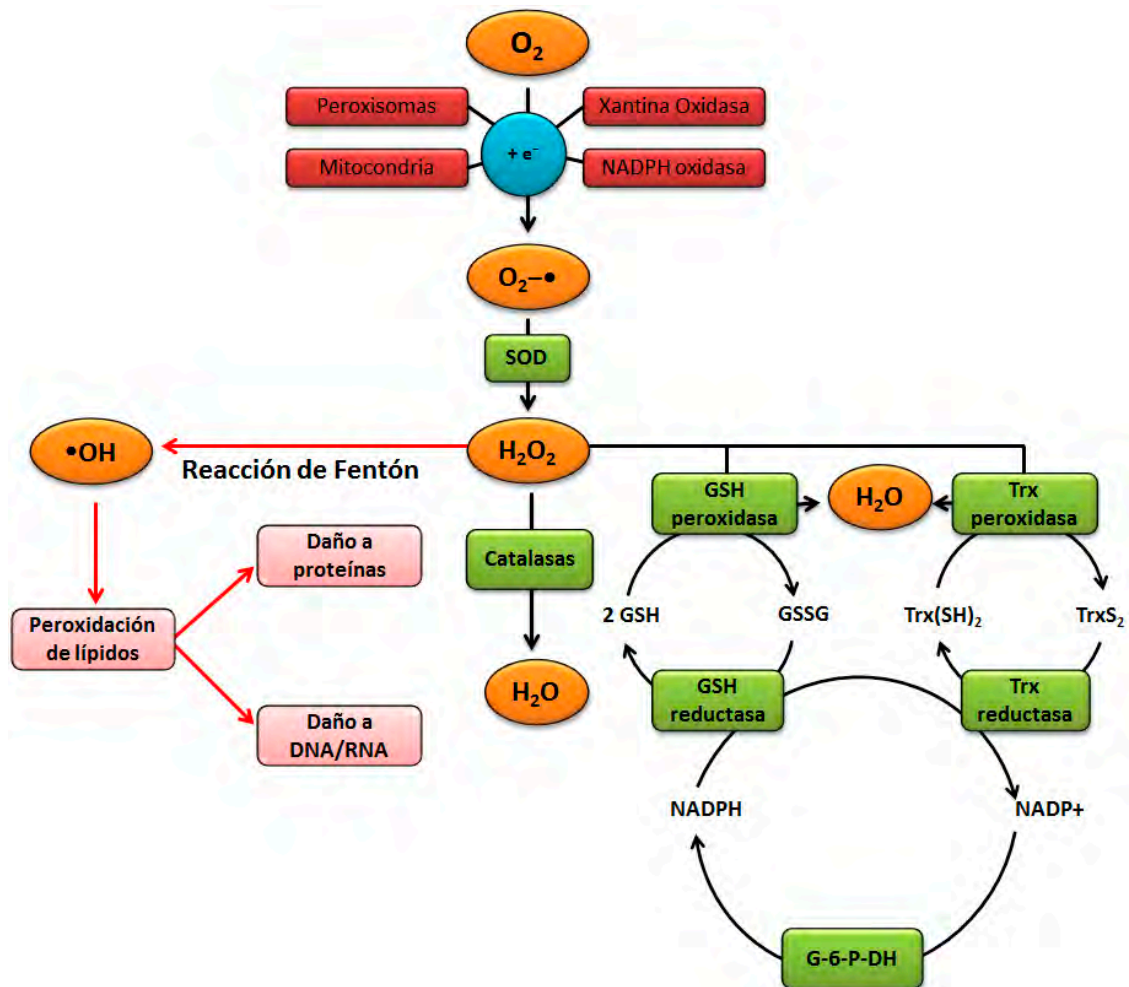


Figura 1. Los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos trabajan conjuntamente para mantener el equilibrio redox de la célula. El anión superóxido puede producirse tanto por enzimas como la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas, como por fugas de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial o por reacciones enzimáticas en otros orgánulos. El $O_2^{\cdot-}$ puede dismutar de manera espontánea o por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 se descompone en H_2O y O_2 mediante la acción de las enzimas catalasa (CAT) ó las peroxidasas de glutatión y/o tiorredoxinas. La toxicidad del H_2O_2 reside en su capacidad para reaccionar con metales de transición para así generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Sin embargo, también es capaz de directamente afectar la actividad de diversas proteínas, mediante la oxidación de cisteínas específicas. El $\cdot OH$ es la más reactiva de las ERO y reacciona con biomoléculas, generando daño a proteínas, lípidos, ADN o ARN (Modificado de (H. Li, Horke, & Forstermann, 2013).

La respuesta antioxidante

A través de la evolución, los organismos aerobios desarrollaron diversas estrategias para neutralizar la toxicidad de las ERO y mantenerlas en concentraciones bajas. Colectivamente a todos estos procesos se les denomina la respuesta antioxidante. Los sistemas antioxidantes se dividen principalmente en dos categorías: sistemas enzimáticos

y no enzimáticos. Entre los sistemas enzimáticos encontramos a las superóxidos dismutasas (SOD), las catalasas (CAT), las peroxidasas de glutatión (Gpx), las S-transferasas de glutatión (GST), las tiorredoxinas (Trx) y las peroxirredoxinas (Prx). Mientras que entre los sistemas no enzimáticos se encuentran los compuestos que reaccionan directamente con los agentes oxidantes, tales como la vitamina C, la vitamina E, el β -caroteno, el ácido úrico, los fenoles, los furfurales, las furanonas, moléculas con grupos tiol, tales como el glutatión y el ácido lipoico, algunos pigmentos como los carotenoides y las melaninas (K. J. Davies, 2000). En condiciones de homeostasis, los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos trabajan conjuntamente para mantener el equilibrio redox de la célula (Fig. 1).

Las SOD son enzimas que descomponen al $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 , utilizando metales de transición en su sitio activo. En mamíferos, hay tres tipos de SOD: Cu^{2+}/Zn^{2+} citoplasmática, Mn^{3+} mitocondrial y la Cu^{2+}/Zn^{2+} extracelular (Che, Wang, Li, Wang, & Zheng, 2016).

El H_2O_2 formado por la SOD se puede dismutar a H_2O por las CAT y otras enzimas como las Gpx y las Prx.

Las CAT son enzimas homotetraméricas que reducen al H_2O_2 a expensas de la oxidación/reducción reversible del hierro en su grupo hemo (Halliwell, 2006). No requieren ningún cofactor y suelen poseer una afinidad (Km) moderada por el O_2 y ser muy eficientes (alta kCAT). Las Gpx utilizan el poder reductor del glutatión, un tripéptido que consiste en L-g-glutamyl-L-cistein-glicina, para descomponer el H_2O_2 y producir H_2O . La actividad de la Gpx requiere dos equivalentes de reducción, por lo tanto se necesitan dos moléculas de GSH para formar GS-GS durante la reducción del H_2O_2 a H_2O ; posteriormente la reducción del GS-GS se lleva a cabo mediante la enzima glutatión reductasa, la cual utiliza como poder reductor al NADPH, permitiendo así la reactivación de la Gpx (K. J. Davies, 2000).

Las Prx son enzimas ubicuas de la familia de las peroxidasas dependientes de grupos tiol que descomponen peróxidos en la célula. Se caracterizan por la presencia de cisteínas en el sitio activo y no requieren de un cofactor para su actividad. De acuerdo a sus estados oligoméricos, interface y localización de las cisteínas catalíticas, existen seis subfamilias

de Prx (Prx1, Prx5, Prx6, Tpx, PrxQ y AhpE) (Nelson et al., 2011). También se pueden dividir en tres clases (típica de 2-Cys, atípica de 2-Cys y de 1-Cys) según el mecanismo para descomponer el H_2O_2 . Las Prx típicas 2-Cys, se presentan como homodímeros anti-paralelos, con dos sitios activos. La cisteína peroxidativa (C_p) reduce el H_2O_2 y forma ácido sulfénico (-SOH), el cual en una reacción de condensación con otra cisteína (C_R) (cerca del C-terminal del otro monómero) con la que forma un puente disulfuro que, posteriormente, es reducido por las Trxs o por el glutatión. Las Prx-2 atípicas Cys, presentan un mecanismo similar al Prx típicas 2-Cys, sin embargo dado que se encuentran en monómeros, las cisteínas que participan en la reacción de condensación para formar el puente disulfuro se encuentran en el mismo polipéptido. Para las Prx-1Cys al tener únicamente una cisteína, el -SOH generado en la reacción con peróxidos es reducido directamente por un donador de electrones con un grupo tiol, como las tiorredoxinas o el glutatión (Wood, Schroder, Robin Harris, & Poole, 2003) (Fig. 2).

Como se observa en la Fig. 2, en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 , la C_p puede sufrir diversos niveles de oxidación, una sobre-oxidación y una hiperoxidación. En el caso de la sobre-oxidación la C_p pasa de -SOH a $-SO_2H$ (ácido sulfínico), reacción que es reversible gracias a las sulforedoxinas (Srx), las cuales reducen al $-SO_2H$ utilizando Mg^{2+} y ATP como cofactores (Biteau, Labarre, & Toledano, 2003). La hiperoxidación se lleva a cabo cuando el $-SO_2H$ pasa a $-SO_3H$ (ácido sulfónico), proceso que es irreversible y que causa la inactivación de la enzima.

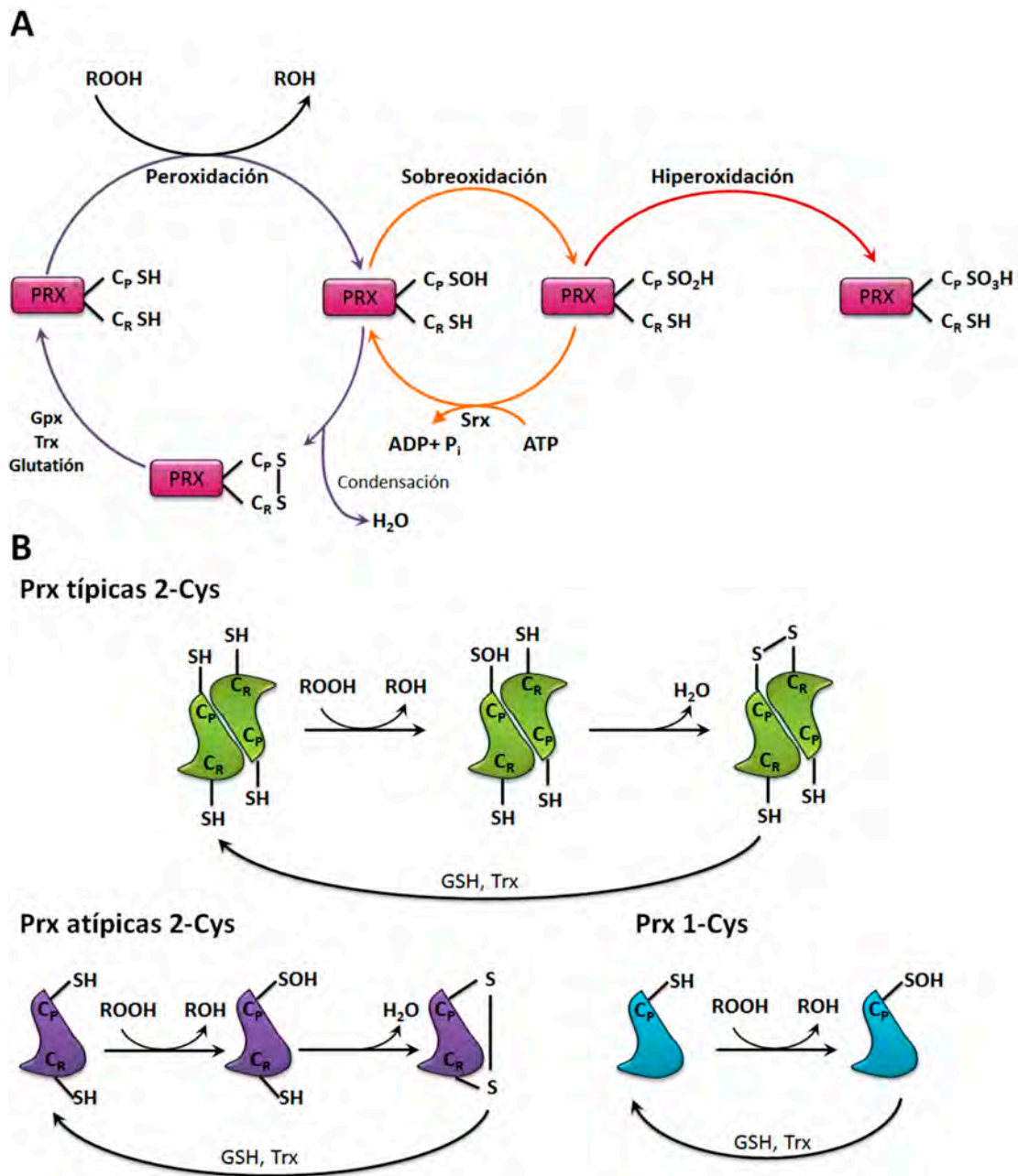


Figura 2. Las peroxirredoxinas (PRX) son enzimas de la familia de las peroxidases, las cuales descomponen peróxido, utilizando cisteínas específicas en el sitio activo. A) Durante la peroxidación, el grupo tiol (-SH) de la cisteína peroxidativa (C_P) es oxidada por peróxido (ROOH) formando ácido sulfénico (-SOH), el cual en una reacción de condensación (liberación de una molécula de agua) con otra cisteína (C_R) forman un puente disulfuro que posteriormente es reducido por una fuente donadora de electrones, como el GSH o la Trx. Sin embargo, el -SOH de la C_P también puede recibir otro átomo de oxígeno y formar ácido sulfínico (-SO₂H), en un proceso denominado sobre oxidación, y el cual es reversible a través de la enzima Srx cuya actividad es dependiente de ATP. Por último, el -SO₂H puede aceptar otro átomo de oxígeno para formar ácido sulfónico (-SO₃H) de manera irreversible, causando la inactivación de la enzima. **B)** Las PRX típicas 2-Cys forman dímeros anti paralelos, en donde la C_P oxidada, de un monómero, reacciona con el residuo C_R del otro monómero adyacente para formar el puente disulfuro. Las PRX atípicas 2-Cys, la C_P oxidada forma un puente disulfuro con la C_R en el mismo monómero. En las PRX 1-Cys, la C_P oxidada es reducida directamente a través de un donador de electrones externo, como el GSH o la Trx.

Las Trx , junto con la TrxR (tioredoxina reductasa) y el NADPH juegan un papel en el mantenimiento de la homeostasis redox. La Trx presenta cisteínas conservadas que reaccionan con puentes disulfuro presentes en otras proteínas intercambiando dichos puentes, lo que resulta en una proteína reducida y una Trx oxidada. Posteriormente la Trx oxidada es reducida por la TrxR, utilizando al NADPH como coenzima (S. Lee, Kim, & Lee, 2013). Por último, la poza del NADPH se mantiene vía la reducción del NADP⁺ mediante varias enzimas de la vía de las pentosas, tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa Fig. 1. (Lushchak, 2014).

La respuesta antioxidante es un proceso altamente conservado y regulado a través de diversas proteínas sensibles al estado redox intracelular

Durante el estrés oxidativo, los organismos usualmente bloquean programas de crecimiento y biosíntesis primaria, para activar respuestas que previenen o neutralizan los efectos negativos de las ERO. Esta reprogramación celular inicia con la percepción celular de las ERO, e incluye la transducción de esta señal a través de una o varias rutas, y la inducción o represión de genes relacionados con la respuesta antioxidante. La inducción de este sistema incrementa la capacidad para eliminar las ERO creando así un “loop” de control de retroalimentación negativa. Estos mecanismos de respuesta al estrés se encuentran altamente conservados desde bacterias hasta mamíferos. La influencia de las ERO en los procesos fisiológicos está basada en su habilidad para modificar la actividad de proteínas sensibles a condiciones redox. En presencia de ERO el dominio sensible de la proteína se oxida de manera reversible. La consecuencia del cambio oxidante es la iniciación de eventos acoplados a la modificación de la actividad de proteínas río abajo y/o factores transcripcionales. Los organismos contienen varios residuos sensibles a la modificación por óxido/reducción, muchos de estos mecanismos son mediados por la oxidación de residuos de cisteína, debido a que su grupo sulfhidrilo puede oxidarse de manera reversible formando puentes disulfuro intra- o inter-moleculares, afectando la estructura y función de diversas proteínas.

En Escherichia coli el factor transcripcional OxyR es sensible a modificaciones de oxido-reducción

Alrededor de 1990 se encontró una vía de respuesta antioxidante en *E.coli*, OxyR, inicialmente descrita en *Salmonella typhimurium* (Morgan, Christman, Jacobson, Storz, & Ames, 1986; Storz, Christman, Sies, & Ames, 1987) y posteriormente en *E. coli* (Tartaglia, Storz, & Ames, 1989). OxyR es un factor transcripcional de la familia de LysR (Christman, Storz, & Ames, 1989), la cual es una familia de reguladores transcripcionales, en procariotes, que tienen una estructura conservada: en el N- terminal se encuentra un motivo hélice-giro-hélice y un motivo de oligomerización en el C-terminal. En presencia de estrés oxidante, OxyR lleva a cabo un cambio conformacional, resultado de la oxidación de dos cisteínas (Cys199 y Cys 208) (Aslund, Zheng, Beckwith, & Storz, 1999) que produce un puente disulfuro intra-molecular. Esto aumenta la afinidad de OxyR por sus regiones promotoras y de esta forma promueve la expresión de diversos genes implicados en la respuesta antioxidante, como son los genes de peroxidasas, enzimas para reparar centros de hierro-azufre y el mantenimiento de grupos tiol, entre otros (Fig.3) (Zheng et al., 2001).

En las levaduras, los factores transcripcionales AP-1 juegan un papel primordial en la respuesta antioxidante

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia de estrés oxidante, el factor transcripcional Yap1, se acumula en el núcleo, en donde induce la expresión de aproximadamente 100 genes relacionados con la respuesta antioxidante (Kuge & Jones, 1994). Yap1 es un factor transcripcional de la familia AP-1, cuya oxidación es dependiente de la peroxirredoxina de dos cisteínas Gpx3. En respuesta al H₂O₂, la Cys-598 de Yap1, forma un puente disulfuro con la cisteína oxidada Cys-36 de la proteína Gpx3/Ybp1 (Delaunay, Pflieger, Barrault, Vinh, & Toledano, 2002). El puente disulfuro intermolecular entre Gpx3-Yap1 inmediatamente se convierte en un puente disulfuro intramolecular entre las Cys-598 y Cys303 de la proteína Yap1. Esto trae como consecuencia un cambio conformacional en la proteína, Yap1, que oculta su señal NES (NES, Nuclear Export Signal) y por lo tanto su interacción con la exportina Crm1

(Delaunay, Isnard, & Toledano, 2000), lo cual causa la acumulación nuclear de Yap1 (Fig. 3).

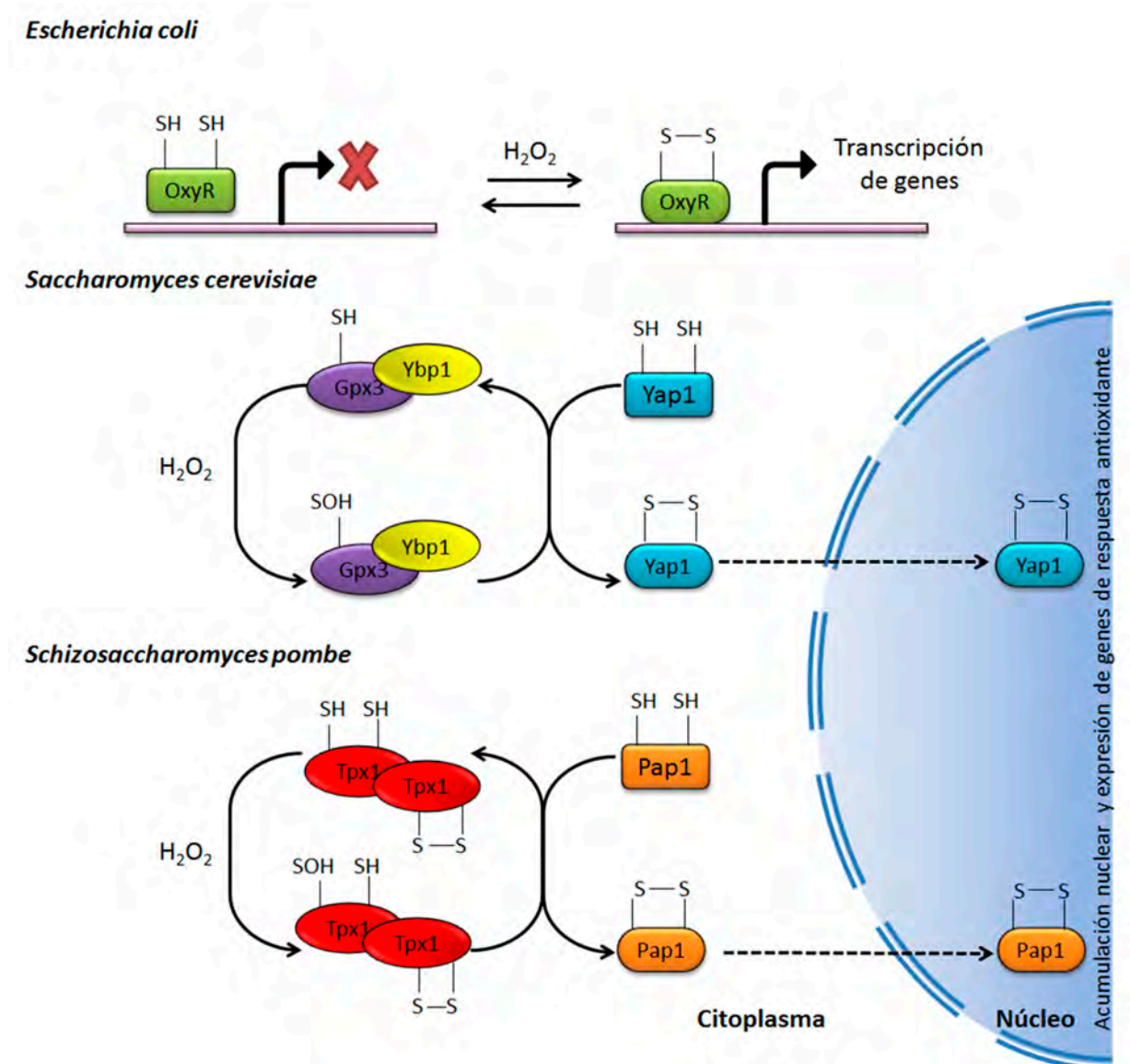


Figura 3. OxyR, Yap1 y Pap1 son factores transcripcionales capaces de percibir el H_2O_2 e iniciar la respuesta antioxidante. En condiciones basales de crecimiento, OxyR se encuentra unido con baja afinidad a sus regiones promotoras. En presencia de H_2O_2 , el grupo tiol de la Cys199 de OxyR se oxida a ácido sulfénico el cual posteriormente forma un puente disulfuro con la Cys208 causando un cambio conformacional en OxyR y aumentando su afinidad por sus regiones promotoras y un incremento en la transcripción de los genes que regula. En la levadura *S. cerevisiae* en presencia de H_2O_2 , Gpx3 pasa la señal de oxidación a Yap1 a través de un puente de disulfuro intermolecular, el cual resulta en un puente disulfuro intramolecular en Yap1 y un cambio de conformación que oculta su señal de exportación nuclear, causando la acumulación de Yap1 en el núcleo y el aumento de la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Un caso similar se presenta en *S. pombe* en donde Tpx1 transfiere la señal de oxidación al factor transcripcional Pap1.

Un caso similar sucede en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, con el factor transcripcional Pap1. En este caso, la peroxiredoxina Tpx1 juega un papel similar al de Gpx3 en *S. cerevisiae*. Así, en presencia del H₂O₂, una cisteína conservada en Tpx1 se oxida a ácido sulfénico. Posteriormente la Cys-SOH se condensa con otra cisteína que se encuentra en la región C-terminal de Pap1 para formar un puente disulfuro intermolecular. El puente intermolecular que se forma lo resuelve otro residuo de cisteína en Pap1, generando un puente disulfuro intramolecular que afecta la estructura de la proteína y trae como consecuencia su acumulación nuclear y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Vivancos et al., 2005).

En mamíferos, el factor transcripcional Nrf2 es regulador de la respuesta antioxidante

En mamíferos, el factor transcripcional Nrf2 (NF-E2 related factor 2) pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. Nrf2 trabaja conjuntamente con la proteína Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1). Keap1 tiene tres dominios principales: un N-terminal BTB (broad complex, tramtrack, and bric-a-brac), una región de unión y un dominio C-terminal Kelch. El dominio BTB está implicado en la homodimerización de Keap1 (Zipper & Mulcahy, 2002), mientras que la región de unión es un dominio rico en cisteínas (D. D. Zhang & Hannink, 2003) necesario para la función de Keap1, mientras que el dominio C-terminal contiene seis secuencias Kelch necesarias para unión a Nrf2 (X. Li, Zhang, Hannink, & Beamer, 2004). Keap1 contiene 27 residuos de cisteínas, de las cuales la Cys 151, Cys 288 y Cys 297 presentan reactividad agentes oxidantes (Eggler, Liu, Pezzuto, van Breemen, & Mesecar, 2005).

Bajo condiciones normales de crecimiento, Keap1 es una proteína represora que se une a Nrf2 para mantenerlo en el citoplasma y marcarlo para su degradación vía proteosoma, mediante la interacción directa de Keap1 con el complejo E3 de la ubiquitin ligasa, formado por CUL3 y RBX1.

En respuesta a un estrés oxidante, la Cys 151 de Keap1 se oxida, formando un puente disulfuro con la Cys151 de otra subunidad del dímero, lo cual hace imposible su interacción con Nrf2 (Fourquet, Guerois, Biard, & Toledano, 2010). Esto causa la

acumulación del factor de transcripción en el núcleo y la consecuente inducción de genes relacionados con procesos de respuesta antioxidante, crecimiento celular, apoptosis, respuesta inflamatoria y degradación proteica a través de la vía de ubiquitinación (Motohashi et al. 2002). Fig. 4.

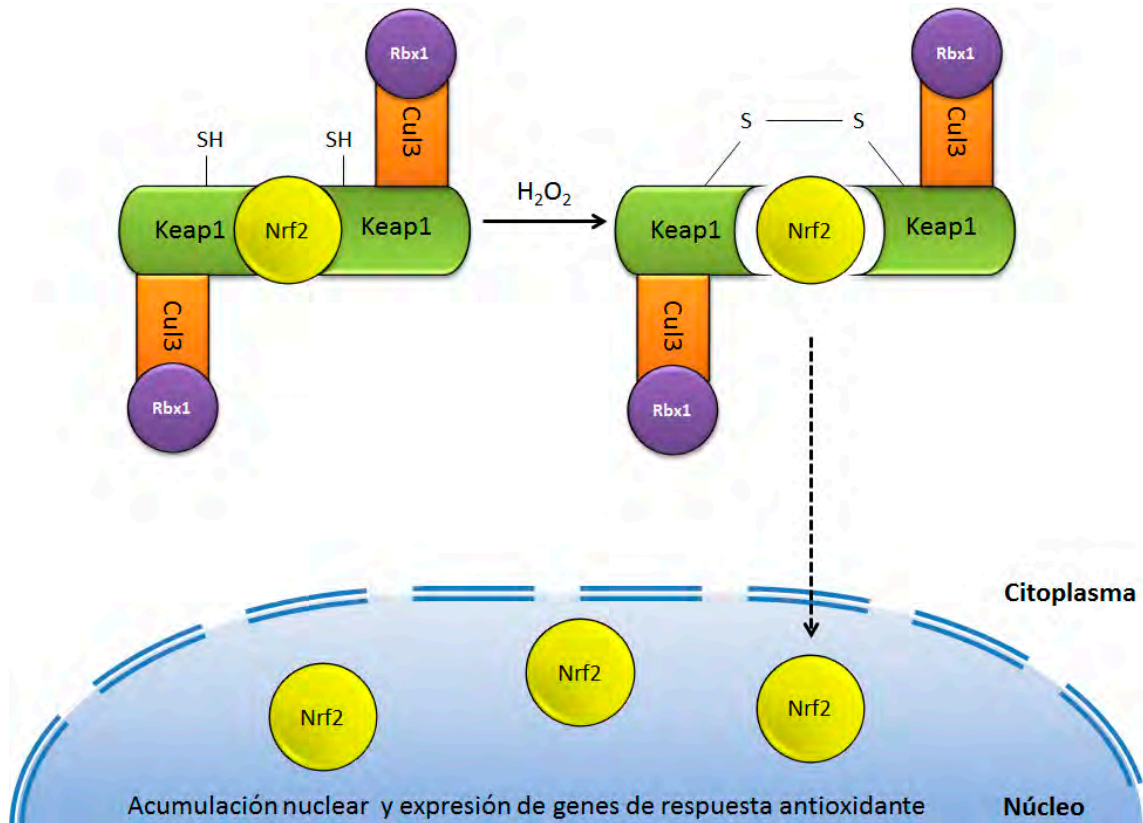


Figura 4. En mamíferos la regulación de Nrf2 a través de Keap1 es dependiente del estado redox. En condiciones normales Nrf2 se une al dímero de Keap1, lo cual favorece su degradación vía proteosoma. En presencia de H₂O₂, las Cys151 de cada monómero de Keap1 forman un puente disulfuro, el cual conlleva a un cambio conformacional en Keap1, impidiendo su interacción con Nrf2, liberándolo y permitiendo la acumulación nuclear de Nrf2 y la transcripción de genes que codifican para proteínas de la respuesta antioxidante.

En los hongos filamentosos los factores transcripcionales tipo AP-1 están involucrados en diversos procesos

Los factores transcripcionales tipo AP-1 (ortólogos de Yap1 y Pap1) se encuentran altamente conservados en los hongos filamentosos lo que ofrece una herramienta para evaluar el papel de las ERO y la respuesta antioxidante en diversos procesos como el desarrollo y la diferenciación celular, la virulencia y la interacción con otros organismos.

Debido a su importancia económica, diversos estudios se han centrado en los hongos patógenos, en donde se encontró que CHAP1 de *Cochiobolus heterostrophus* (Lev et al., 2005), YapA de *Talaromyces marneffei* (Dankai, Pongpom, Youngchim, Cooper, & Vanittanakom, 2016), Fgap1 de *Fusarium graminearum* (Montibus et al., 2013), Yap1 de *Ustilago maydis* (Molina & Kahmann, 2007), Moap1 de *Magnaporthe oryzae*, AaAP1 de *Alternaria alternata* (Lin, Yang, & Chung, 2009) y CgAP1 de *Colletotrichum gloeosporioides* (Sun, Wang, & Tian, 2016) son necesarios para la respuesta antioxidante causada por el H₂O₂ y otros agentes oxidantes. Sin embargo, únicamente en *C. gloeosporioides*, *T. marneffei*, *M. oryzae* y *A. alternata* estos factores transcripcionales son esenciales para el proceso de virulencia. Sin embargo, el endo-simbionte *Epichloë festucae* únicamente las esporas de las mutantes mostraron sensibilidad al H₂O₂ mientras que durante el proceso de infección, a pesar de que se observa una acumulación nuclear de YapA, no se ve afectado el proceso de endo-simbiosis (Cartwright & Scott, 2013). En hongos patógenos oportunistas como *Aspergillus fumigatus* (Lessing et al., 2007), *Cryptococcus neoformans* (Paul, Doering, & Moye-Rowley, 2015) y *Candida albicans* (Brown et al., 2014), los factores transcripcionales ortólogos a Yap1 son esenciales para el proceso de virulencia y resistencia al estrés oxidante, mientras que en el hongo *Aspergillus parasiticus* las mutantes no presentan ninguna alteración en el proceso de infección (Reverberi et al., 2008). A pesar del estudio de estos FT en diversos hongos de importancia médica y alimentaria, aún no se ha podido determinar cuál es la vía de activación de estas proteínas en presencia de estrés oxidante. Partiendo del proceso de activación de Yap1 en levaduras, se eliminaron los genes homólogos de GPX3 (GpxC) y TPX1 (TpxA) en el hongo biotrófico *Epichloë festucae*; sin embargo, no se observó ninguna alteración en la localización nuclear de YapA en mutantes sencillas o dobles (Cartwright & Scott, 2013).

***Aspergillus nidulans* como modelo de estudio**

Los hongos filamentosos se han utilizado ampliamente como modelos de estudio, ya que permiten el estudio de diversos procesos de biología celular, genética clásica y desarrollo. *Aspergillus nidulans* es un hongo filamentosos ascomiceto que se encuentra muy relacionado con otras especies de *Aspergillus* de importancia médica e industrial y

además posee diversas características que lo hacen un buen modelo experimental. Dentro de estas características se encuentra la facilidad para su manipulación. Puede transformarse con DNA el cual se puede introducir en su genoma mediante recombinación heteróloga u homóloga y adicionalmente posee múltiples marcadores de selección, lo que lo hace un excelente modelo para estudios de genética clásica y molecular (Todd, Davis, & Hynes, 2007). *A. nidulans* es un excelente modelo para evaluar el impacto de las ERO en la diferenciación celular a través del monitoreo de la formación de estructuras especializadas durante el ciclo de vida, el cual, principalmente, presenta dos estrategias de reproducción: asexual y sexual (S. C. Lee, Ni, Li, Shertz, & Heitman, 2010).

Reproducción asexual

La reproducción asexual se caracteriza por la formación de esporas asexuales o conidias a través de la producción de estructuras especializadas llamadas conidióforos. El desarrollo asexual se inicia cuando el micelio se expone al aire (Adams, Wieser, & Yu, 1998) o la limitación de nutrientes (Skromne, Sanchez, & Aguirre, 1995). En una interfase aérea, la conidiación comienza con la formación de una célula pie a partir de una hifa, la cual da origen al tallo del conidióforo que crece por extensión apical hacia la fase aérea. Cuando ha alcanzado cierta longitud, la punta del talo se hincha para formar una vesícula multinucleada a partir de la cual se producen múltiples yemas uninucleadas llamadas mótulas. En el extremo apical de la mótula se producen otras gemaciones, para producir dos células uninucleadas conocidas como fiálides, de las cuales se producen múltiples cadenas de esporas asexuales o conidias. Las esporas asexuales, se producen por divisiones mitóticas repetidas cada conidia es uninucleada y todas comparten la misma dotación genética que el micelio homocariótico. En presencia de nutrientes las esporas germinan a través de un periodo inicial de crecimiento isodiamétrico, seguido por la formación de un tubo germinal alargado.

Reproducción sexual

El ciclo sexual involucra la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, los cuales se inducen en condiciones de limitación de oxígeno o por ausencia de luz (Champe, Nagle, & Yager, 1994; Hoffmann, Wanke, Lapaglia, & Braus, 2000). La formación de éstos cuerpos fructíferos involucra plasmogamia, la formación de un dicarion, la fusión de dos núcleos y finalmente la maduración del cleistotecio. Así mismo, la formación de ascosporas en el interior del cleistotecio involucra el desarrollo coordinado de dos tipos de tejido diferentes: el tejido central, compuesto de células ascógoneas que dan lugar a las ascas y ascosporas, y un tejido externo que consiste en una red de hifas estériles que rodean a las ascas dentro del cleistotecio. El núcleo diploide dentro de cada ascospora realiza una sola división mitótica, esto da como resultado ocho ascosporas maduras binucleadas (Martinelli, 1994).

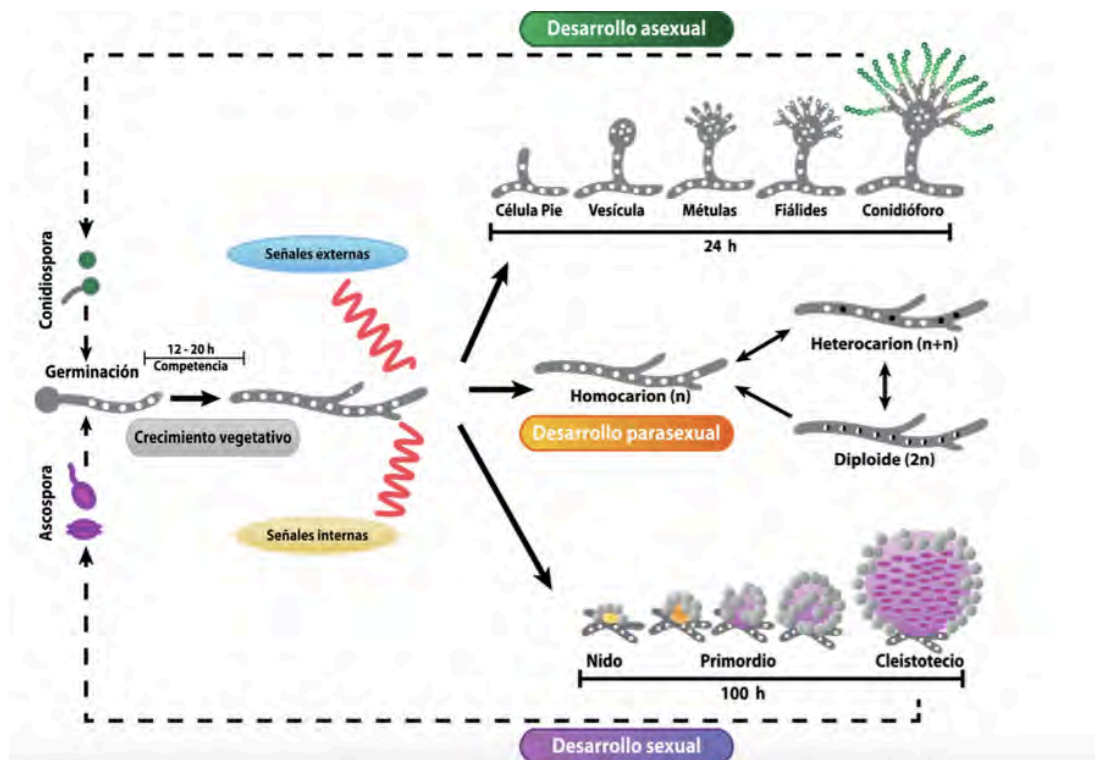


Figura 5. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. En presencia de nutrientes las esporas (sexuales o asexuales) forman un tubo germinal que crece apicalmente hasta formar un conjunto de hifas multinucleadas, llamadas micelio. Dependiendo de las diversas señales ambientales *A. nidulans* puede realizar sus diferentes ciclos de vida. Cuando el micelio se expone al aire, ocurre primero la diferenciación asexual, la cual culmina con la formación de esporas asexuales a través del conidióforo. Mientras que el ciclo sexual se caracteriza primero por la formación de las células Hülle, posteriormente durante el ciclo sexual homotálico se produce un cruzamiento o autofecundación para generar los cuerpos fructíferos (cleistotecios) que producen miles de esporas sexuales o ascosporas. En el ciclo parasexual, se forma un heterocarion como resultado de la fusión de hifas de distintos individuos, seguido de la fusión nuclear para formar hifas diploides. La haploidía se restaura mediante la pérdida al azar de cromosomas, lo cual genera un individuo diferente a los haploides parentales, (modificado de Bayram y Braus, 2011).

Numerosas células redondas rodean al cleistotecio, denominadas células de Hülle. Su función hasta el momento se desconoce, pero se ha sugerido que desempeñan un papel importante durante el desarrollo y la maduración del cleistotecio (Champe et al., 1994; Hermann, Kurtz, & Champe, 1983). *A. nidulans* es un hongo homotálico, lo que significa que puede auto-fertilizarse, pero también pueden realizarse cruces entre homocariones con núcleos genéticamente diferentes (Casselton & Zolan, 2002).

Los factores transcripcionales NapA y SrrA en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*

En *A. nidulans* NapA es el ortólogo de Yap1 en *S. cerevisiae*, posee un dominio bZIP y regiones terminales amino (cNRD) y carboxilo ricas (cCRD) en residuos de cisteína. Las mutantes $\Delta napA$ presentan alta sensibilidad al estrés oxidativo causado por H₂O₂ y menadiona (Md).

Por otro lado, *A. nidulans* tiene otra vía de respuesta al estrés oxidante, compuesta por un sistema de relevo. En los hongos, el sistema de relevo de fosfatos incluye una HK (Histidine Kinases, cinasas sensoras) híbrida, la cual se autofosforila en el dominio de cinasa de histidina transfiriendo posteriormente el grupo fosfato a un dominio receptor interno. El grupo fosfato es trasladado después hacia la Hpt y finalmente al RR (Chauhan & Calderone, 2008; Chauhan, Latge, & Calderone, 2006). En *A. nidulans* el sistema de relevo de fosfatos está integrado por aproximadamente quince cinasas sensoras (HKs) (Galagan et al., 2005), dos reguladores de la respuesta (RR), SrrA y SskA, y una fosfotransferasa (Hpt), YpdA (Furukawa, Hoshi, Maeda, Nakajima, & Abe, 2005). En lo que respecta a la función del sistema de relevo de fosfatos, SrrA se considera un ortólogo de Skn7 y de Prr1, en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, respectivamente; contiene un dominio de unión a DNA tipo HSF (Heat Shock Factor) y un dominio receptor altamente conservado en donde se encuentra el residuo de aspartato que participa en el sistema de relevo de fosfatos (Fig. 6).

Tanto las mutantes $\Delta napA$ como las $\Delta srrA$ muestran sensibilidad al H₂O₂ y a otros compuestos que generan estrés oxidativo como el *t*-BOOH y el paraquat. Sin embargo, el grado de sensibilidad es diferente, como también lo es la morfología de las mutantes.

Mientras que las mutantes en *srrA* muestran una esporulación asexual muy deficiente y producen pigmentos de identidad desconocida, las mutantes en *napA* poseen una esporulación y un crecimiento aparentemente normales, pero muestran una diferenciación sexual incrementada. Esto sugiere que SrrA y NapA tienen tanto funciones en común como por separado.

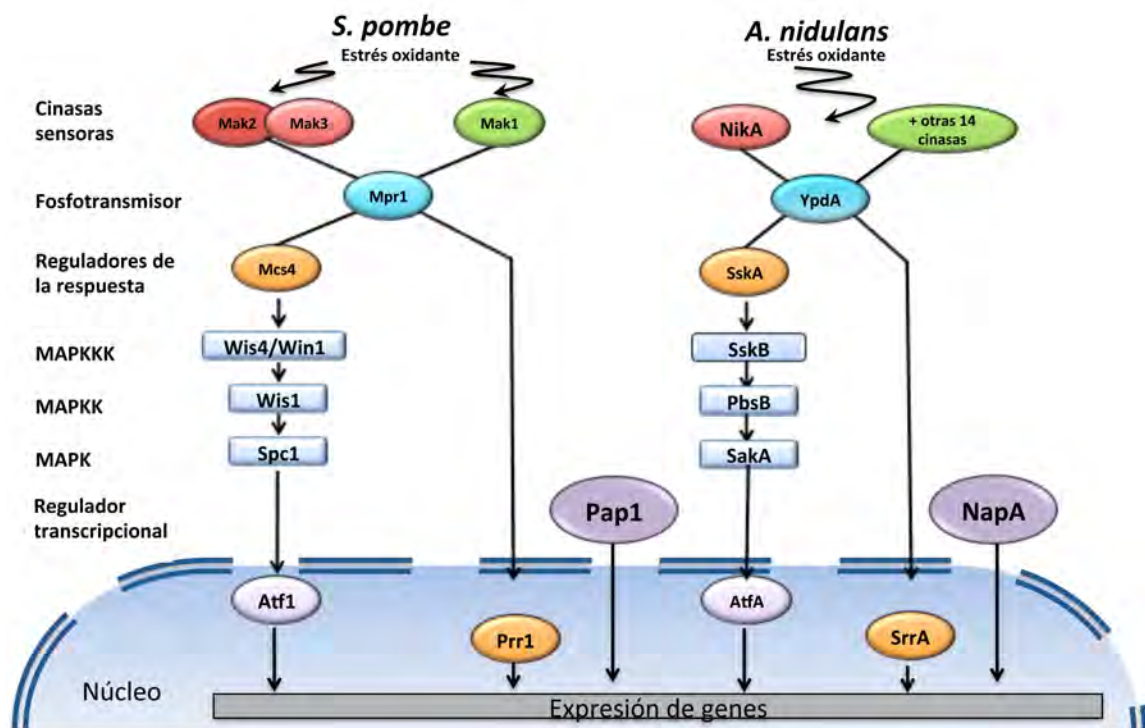


Figura 6. Las vías de señalización involucradas en la activación de la respuesta antioxidante se encuentran conservadas entre *Aspergillus nidulans* y *Schizosaccharomyces pombe*. *S. pombe* posee tres cinasas sensoras, de las cuales Mak 2 y 3 tienen que ver con la respuesta al estrés oxidante, transfiriendo la señal a través de Mpr1 y Mcs4, en donde este regulador de la respuesta es capaz de iniciar la señalización de la vía ortóloga de Hog1 (Spc1). Mientras que Prr1 se activa a través de la HK Mak 1-Mpr1 de forma independiente a la vía de Spc1/Atf1. La vía del factor transcripcional, Pap 1 actúa de manera paralela, a las descritas anteriormente, y su acumulación en el núcleo depende de la oxidación de cisteínas específicas. Por otro lado, *A. nidulans* contiene 15 cinasas sensoras, un fosfotransmisor, YpdA y dos reguladores de la respuesta, SskA y SrrA. En presencia de estrés oxidante, la activación de la cascada de MAP cinasas se lleva a través del regulador de la respuesta SskA, mientras que SrrA actúa directamente como un factor transcripcional. NapA es un ortólogo de Pap1 cuyo papel en la respuesta antioxidante se describe en este trabajo.

Planteamiento del problema

En levaduras, los FT de la familia AP-1 son los reguladores centrales de la respuesta antioxidante. En presencia de H_2O_2 , Yap1 en *S. cerevisiae* y Pap1 en *S. pombe* son oxidados a través de las peroxirredoxinas Gpx3 y Tpx1, respectivamente, lo cual conlleva a la acumulación nuclear de los FT y a la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante. En *A. nidulans*, al igual que en otros hongos filamentosos, aún se desconoce la vía de oxidación de NapA en presencia de H_2O_2 y otros agentes que causan su acumulación nuclear. *A. nidulans* tiene seis proteínas con actividad de Prx-1Cys dependiente de tiorredoxina (codificadas por los genes AN10223, AN3973, AN8692, AN8080, AN3687 y AN4301) y una peroxirredoxina dependiente de glutatión (codificada por el gen AN2846). Hasta el momento, no se ha evaluado el papel de alguna de estas Prx en la activación de NapA, así como su contribución en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular.

Por otro lado, en presencia de estrés oxidante, Yap1 y Pap1 forman heterodímeros con los factores transcripcionales Skn7 y Prr1, respectivamente. En *A. nidulans*, SrrA está involucrado en la respuesta antioxidante y el desarrollo celular, sin embargo, hasta ahora no se ha explorado la posible interacción física entre SrrA y NapA.

Hipótesis

Proponemos que bajo estrés oxidante NapA recibe la señal de oxidación, a través de una peroxirredoxina, ocasionando su acumulación nuclear. En el núcleo, NapA y SrrA son capaces de interactuar entre sí y de regular la inducción de genes relacionados con la respuesta antioxidante, tanto de manera conjunta como individualmente.

Objetivo General

Determinar la vía de activación, el interactoma y la localización de NapA en presencia de estrés oxidante. Evaluar el papel de NapA en la diferenciación celular (durante el desarrollo asexual y sexual del hongo), así como el transcriptoma dependiente de NapA.

Objetivos Particulares

- 1.- Determinar la contribución NapA en la respuesta al estrés oxidante y la diferenciación celular a través de la generación de mutantes $\Delta napA$.
- 2.- Construir una fusión *napA::gfp* para determinar la localización de NapA en presencia de estrés oxidante.
- 3.- Evaluar los genes cuya expresión depende de NapA mediante un análisis transcriptómico.
- 4.- Generar mutantes nulas en las 7 peroxirredoxinas y evaluar su participación en la activación del factor transcripcional NapA, en presencia de estrés oxidante y durante la diferenciación celular.
- 5.- Determinar la interacción entre los factores transcripcionales NapA y SrrA mediante espectrometría de masas.

Resultados

En el trabajo publicado durante mi Doctorado determinamos el papel de NapA en la respuesta antioxidante, para lo cuál se generó la mutante $\Delta napA$ y se evaluó su fenotipo en presencia de estrés oxidante causado por H_2O_2 y menadiona. Encontramos que la mutante $\Delta napA$ es altamente sensible a estos compuestos oxidantes, incluso más que una mutante sencilla $\Delta srrA$, lo cual sugiere que estos factores transcripcionales participan en diferentes vías de respuesta antioxidante. A través de la fusión $napA::gfp$ se determinó la acumulación nuclear de NapA en presencia de H_2O_2 y menadiona. Posteriormente en la búsqueda del activador de NapA se eliminaron los genes que codifican para las Prx-1Cys TpxA y TpxB (con una identidad de 32 y 31% a Tpx1 en *S. pombe*, respectivamente) y GpxA (con una identidad del 44% a Gpx3 de *S. cerevisiae*). Ni las mutantes sencillas $\Delta tpxA$, $\Delta tpxB$ y $\Delta gpxA$, dobles $\Delta tpxA$, $\Delta tpxB$ ni la triple mutante $\Delta tpxA$ $\Delta tpxB$ $\Delta gpxA$ presentaron sensibilidad al H_2O_2 ni a la Md, sin embargo, la cuádruple mutante $\Delta tpxA$ $\Delta tpxB$ $\Delta gpxA$ $\Delta napA$ presentó una ligera disminución en la sensibilidad al H_2O_2 comparada con la mutante sencilla $\Delta napA$. Esto indica que las tres Prx-1Cys tienen una contribución menor en la respuesta antioxidante y ninguna de ellas podría mediar la activación de NapA.

Al igual que en levaduras, esta proteína presenta una localización nuclear en presencia de estrés oxidativo causado por H_2O_2 y Md a bajas concentraciones, sin embargo por primera vez reportamos esta misma acumulación en otros tipos de estrés como en ausencia de glucosa, la presencia de etanol como fuente de carbono y estrés osmótico. Por otro lado, NapA también está involucrada en diversos procesos de desarrollo celular, mutantes $\Delta napA$ presentan una sobre-inducción del ciclo sexual, ya que produce aproximadamente 3 veces más estructuras sexuales que una cepa silvestre, mientras que durante el ciclo asexual la mutante $\Delta napA$ produce 50% menos esporas asexuales que una cepa silvestre. Notablemente, la mutante $\Delta napA$ es incapaz de crecer en arabinosa, fructosa y etanol como fuentes de carbono. Lo anterior coincide con datos de transcriptómica, donde se muestra que NapA regula la expresión de al menos 204 genes durante la conidiación, los cuales incluyen a diversos genes necesarios para la asimilación de distintas fuentes de carbono como: *aldA* (gen codificante para la aldehído

deshidrogenasa), *alcA* (Gen que codifica a la alcohol deshidrogenasa) y *alcR* (Gen que codifica a un FT involucrado en la regulación positiva del regulón de etanol) (Mendoza-Martinez, Lara-Rojas, Sanchez, & Aguirre, 2017). El archivo correspondiente de la publicación se encuentra adjunto al final de la tesis.

A. *nidulans* contiene genes que codifican para proteínas con posible actividad de Prx-1Cys y Prx-2Cys

Después de la caracterización de NapA en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular en *A. nidulans*, decidimos centrarnos en la vía de activación de NapA en presencia de estrés oxidante, para lo cual realizamos una búsqueda en el genoma del hongo para encontrar, mediante BLAST, genes que codifiquen a proteínas con actividad de Prx, posteriormente se realizó un árbol filogenético con el software figtree para determinar la distancia evolutiva entre las Prx de levadura y las Prx de algunos hongos filamentosos. Como se observa en el árbol filogenético de la Fig. 7, TpxA, y la proteína codificada por el gen AN3973 (TpxB) se encuentran en un clado cercano al de la Tpx1. En otro clado se encuentran dos Prx codificadas por los genes AN8692 (PrxA) y AN8080 (PrxB), mismas que poseen, entre ellas, un porcentaje de identidad del 67%.

Como se observa en el alineamiento de la Fig. 8, PrxA y PrxB tienen una extensión menor en el C-terminal, en comparación con las proteínas TpxA y TpxB, además, presentan otra cisteína conservada (circulo blanco, cisteínas rojas) que también se encuentran en la Prx Ahp1 de *S. cerevisiae*, la cual hace algunos años se clasificaba como una Prx-1Cys, debido a que mediante análisis de alineamientos, únicamente se había identificado la C_p (Cys62) conservada, sin embargo, no se encontraba la C_R cerca del C-terminal; en el 2012 Lian y colaboradores, usando cristalografía, se caracterizó la formación del puente disulfuro entre la C_p conservada y una cisteína localizada cerca del N-terminal, la Cys31, en presencia de t-BOOH con la C_p (Lian et al. 2012). Estos datos mostraron por primera vez que las Prx pueden tener diferentes re-arreglos de la C_R. Lo anterior, podría sugerir que los hongos filamentosos podrían tener Prx-2Cys, posiblemente con un cambio en la posición de la C_R.

Al igual que Ahp1, PrxA y PrxB contienen una C_p (C61) conservada cerca del dominio N-terminal, Fig.7 (rombo negro) y otra cisteína (C31), localizada antes de la C_p, la cual alinea con la C_R de Ahp1 (C, en rojo). Estos datos nos sugieren que PrxA y PrxB son Prx-2Cys.

Por último, *A. nidulans* tiene otras dos proteínas en 2 clados independientes codificadas, por los genes AN4301 y AN3687 las cuales, al igual que TpxA y TpxB, solo presentan de manera conservada la C_p, Fig. 7 y 8 .

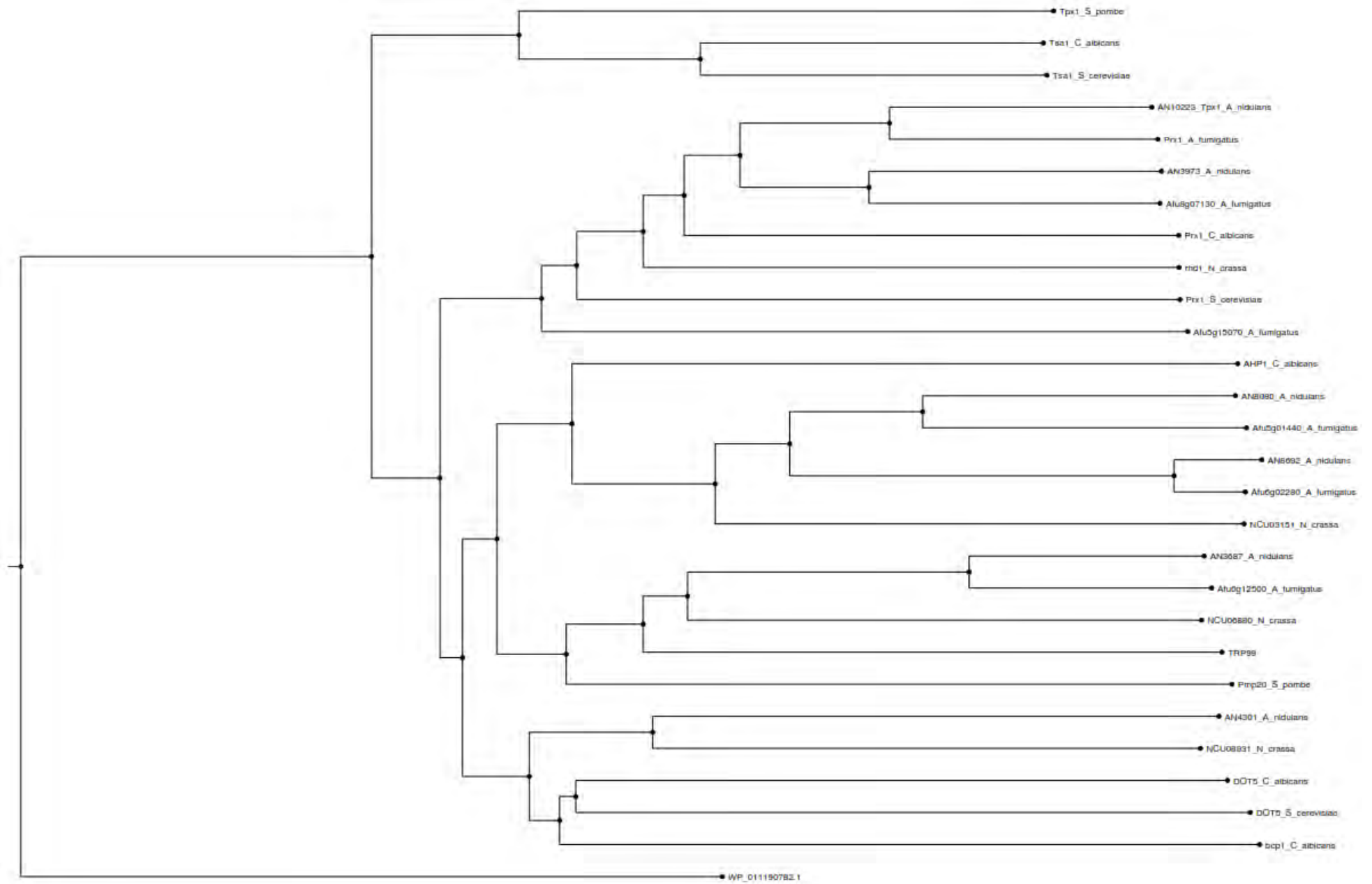


Figura 7. *Aspergillus nidulans* tiene seis proteínas con posible función de PRXs y las cuales se agrupan en clados distintos al de las PRXS-2 Cys de levaduras. El cladograma presenta dos clados principales, que dividen a las PRX-2 Cys de las levaduras y las PRXS de los hongos filamentosos. Para el análisis se realizó un alineamiento de estas proteínas con el programa T-coffee (Notredame C., et al., 2000) el árbol se realizó con la paquetería Figtree.

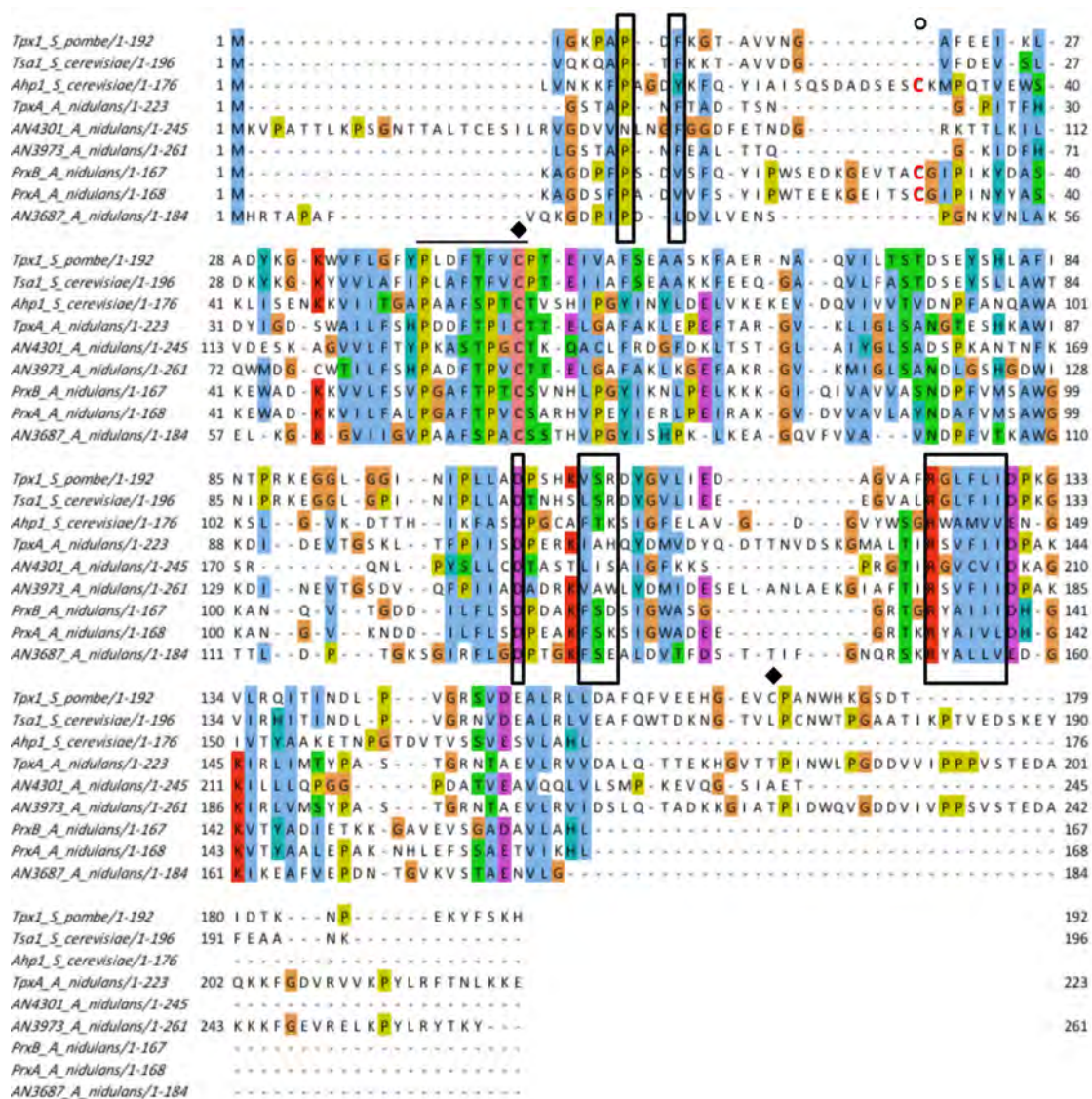


Figura 8. *Aspergillus nidulans* posee peroxidoxinas con dos cisteínas. Los alineamientos se realizaron con el programa T-coffee (Notredame C., et al., 2000), utilizando la secuencia de la Prx-2Cys Tpx1 de *S. cerevisiae* y las secuencias de las Prx en *A. nidulans* (AN10223, AN3973, AN8692, AN8080, AN3687 y AN4301), las PRX-1Cys de *C. albicans* (Ahp1) y *Magnaporthe oryzae* (MGG_02710T0), los recuadros negros indican residuos característicos de la familia Prx.

La mutante $\Delta prxA$ muestra una sensibilidad al estrés oxidante muy similar a la de la mutante $\Delta napA$

Para determinar si alguna de estas cuatro proteínas podrían actuar como activador de NapA, se llevó a cabo la eliminación de los genes que codifican para cada una de ellas. En levaduras, se ha reportado que las mutantes carentes de las peroxidoxinas que llevan a cabo la activación de Yap1 (Delaunay et al., 2002) o Pap1 (Veal et al., 2004; Vivancos et

al., 2005) presentan sensibilidad al estrés oxidativo, por ello, realizamos pruebas de sensibilidad al H₂O₂, Md y t-BOOH, en esporas asexuales. En la Fig. 9 observamos que la eliminación de los genes *prxB*, *AN3687* y *AN4301* no tiene ningún efecto en la sensibilidad al H₂O₂ y a la Md, en las concentraciones probadas.

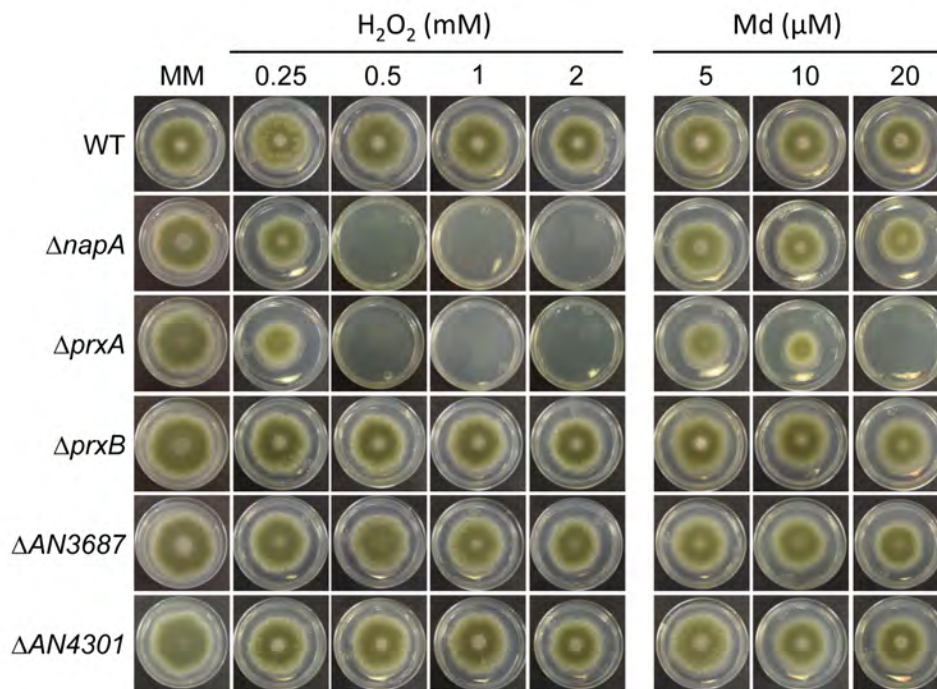


Figura 9. La peroxirredoxina PrxA se requiere para la resistencia al H₂O₂ y la menadiona (Md). Conidiosporas (1X10³) de las cepas 11035 (WT), TFL15 (*ΔnapA*), TAM32 (*ΔprxA*), TAM30 (*ΔprxB*), TAM36 (*ΔAN3687*) y TAM37 (*ΔAN4301*) se sembraron en cajas de MM con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y menadiona (Md). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C.

Por el contrario, las mutantes *ΔprxA* presentan una sensibilidad al H₂O₂ semejante a la de la mutante *ΔnapA*, mientras que muestra una mayor sensibilidad a la Md. Este resultado sugiere que PrxA podría activar a NapA y jugar además un papel directo en la descomposición de la Md.

La proteína PrxB tiene una contribución menor que PrxA en la respuesta antioxidante, tanto en esporas asexuales como en el micelio

Para realizar un análisis más exhaustivo de las mutantes *ΔprxA* y *ΔprxB*, estas se transfirieron a un fondo isogénico amarillo, en donde las mutantes resultantes obtuvieron ligeras diferencias en sus patrones de sensibilidad (Fig. 10), con respecto a las mutantes originales (Fig. 9), posiblemente debido a las diferentes auxotrofías presentes en cada

grupo de cepas. Sin embargo, en ambos fondos genéticos, las esporas de las mutantes $\Delta prxA$ y $\Delta napA$ presentan una sensibilidad muy similar al H_2O_2 , la Md y el t -BOOH. Mientras que la mutante $\Delta prxB$ únicamente es sensible a la concentración más alta de t -BOOH probada (0.5 mM). Una mutante doble $\Delta prxA \Delta napA$ presentó un patrón de sensibilidad igual al de una mutante $\Delta napA$, indicando que estas 2 proteínas podrían actuar en la misma vía.

Notablemente, una mutante doble $\Delta prxA \Delta prxB$ muestra un incremento en la sensibilidad al estrés oxidante, ya que es incapaz de crecer en 0.25 mM de H_2O_2 y 10 μM de Md. La triple mutante $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ muestra una sensibilidad al H_2O_2 igual al de la mutante $\Delta prxA \Delta prxB$, sin embargo, es más sensible a la Md, siendo incapaz de crecer en presencia de 5 μM de Md. En conjunto, estos resultados sugieren que solo PrxA se requiere para la activación de NapA y que PrxA y PrxB parecen jugar un papel directo en la descomposición del H_2O_2 y la Md, aunque PrxB es importante solo cuando PrxA no esta presente.

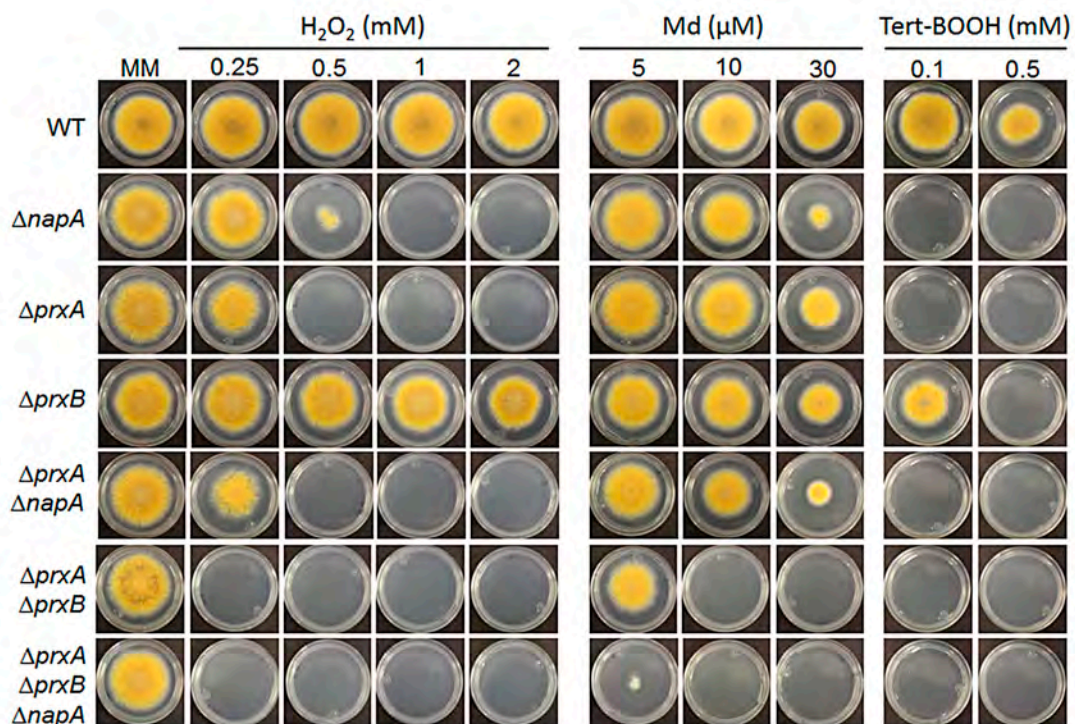


Figura 10. En esporas asexuales PrxA y NapA juegan un papel primordial en la respuesta antioxidante. Conidiosporas (1×10^3) de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM31 ($\Delta prxA \Delta napA$), CAM32 ($\Delta prxA \Delta prxB$) y CAM34 ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$) se sembraron en cajas de MM con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y menadiona (Md). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C.

Dado que las conidias y el micelio representan dos estados del desarrollo totalmente distintos, decidimos probar la sensibilidad de nuestras mutantes durante la fase de crecimiento micelial. Como se observa en la Fig. 11, el micelio de todas las cepas, incluida la cepa silvestre, resultó altamente sensible al t-BOOH, lo cual indica que la resistencia a este compuesto se induce durante la conidiación, en un proceso que depende de PrxA y NapA y en menor medida de PrxB. Al igual que las conidias, la mutante $\Delta prxB$ muestra una ligera sensibilidad al estrés oxidante causado por el H_2O_2 y la Md. Aunque el micelio de la mutante $\Delta prxA$ (crece hasta 3 mM) resultó ligeramente más resistente al H_2O_2 que el de la mutante $\Delta napA$ (crece hasta 2 mM), la mutante doble $\Delta prxA \Delta napA$ mostró un fenotipo de sensibilidad al H_2O_2 y al Md muy semejante al la mutante $\Delta napA$, apoyando nuevamente la idea de que NapA y PrxA actúan en la misma vía. La inactivación simultánea de $prxA$ y $prxB$ incrementa la sensibilidad a la Md, ya que no crece en ninguna de las concentraciones probadas. Mientras que en la triple mutante la sensibilidad al H_2O_2 se ve ligeramente aumentada, ya que su crecimiento es casi nulo en 1 mM. Estos resultados indican que, en micelio, PrxB juega un papel menor en la respuesta al estrés oxidante, el cual se hace evidente solo en ausencia de PrxA y NapA.

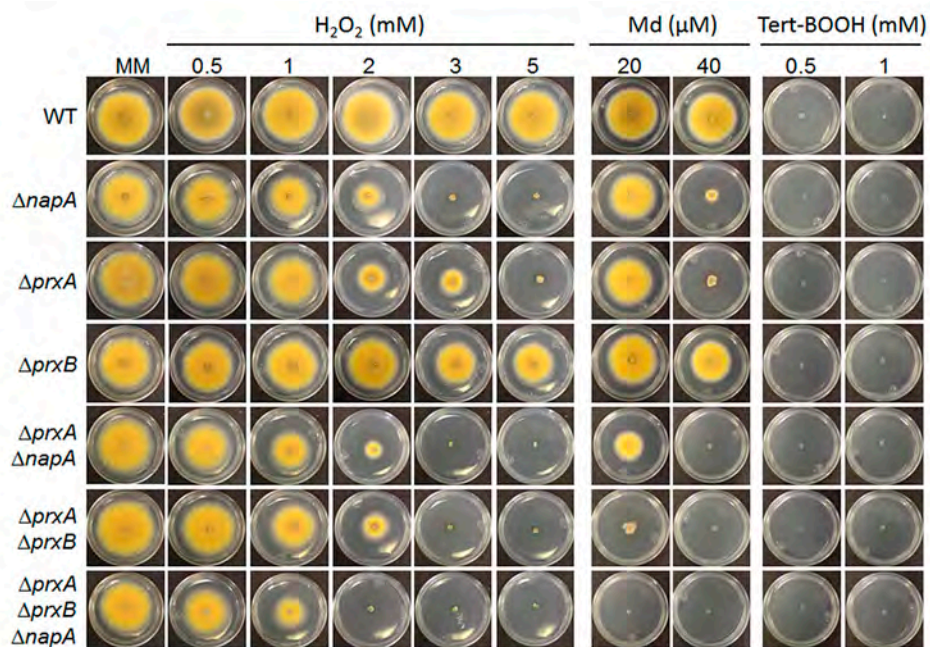


Figura 11. En micelio, PrxA y NapA son necesarias para la respuesta antioxidante. Micelio de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM31 ($\Delta prxA \Delta napA$), CAM32 ($\Delta prxA \Delta prxB$) y CAM34 ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$) se sembraron en cajas de MM con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y menadiona (Md). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C.

PrxA es una proteína altamente abundante que se localiza en todo el citoplasma

Posteriormente y dado que los resultados anteriores sugieren que PrxA esta involucrada en la activación de NapA durante el estrés oxidativo. Nos preguntamos en dónde y cuándo se expresa PrxA, así como si el H₂O₂ altera su localización o expresión. Para resolver estas preguntas, se generó una cepa que expresa a la proteína PrxA marcada con GFP, bajo su propio promotor. La Fig. 12, muestra que la construcción PrxA::GFP no afecta la función antioxidante de la proteína, ya que la cepa que expresa a *prxA::gfp* tiene un crecimiento similar a la cepa WT, en presencia de estrés oxidante. Posteriormente, utilizando microscopia de epifluorescencia, Fig. 13, observamos que la proteína PrxA::GFP se expresa en altos niveles y de manera homogénea en toda la célula, en ausencia y en presencia de H₂O₂. Resultados similares se encontraron en *A. fumigatus*, en donde el ortólogo de PrxA, Aspf3, se localiza en grandes cantidades en extractos citosólicos en esporas, germinulas y micelio (Diaz-Arevalo, Bagramyan, Hong, Ito, & Kalkum, 2011).

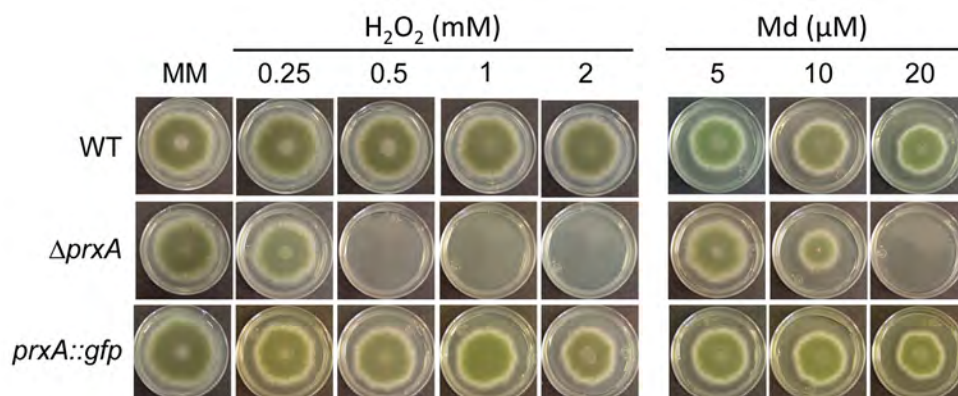


Figura 12. La etiqueta de PrxA::GFP no afecta sus funciones antioxidantes. Conidiosporas (1×10^3) de las cepas 11035 (WT), TAM32 ($\Delta prxA$) y CAM34 (*prxA::gfp*) se sembraron en cajas de MM con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y menadiona (Md). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C.

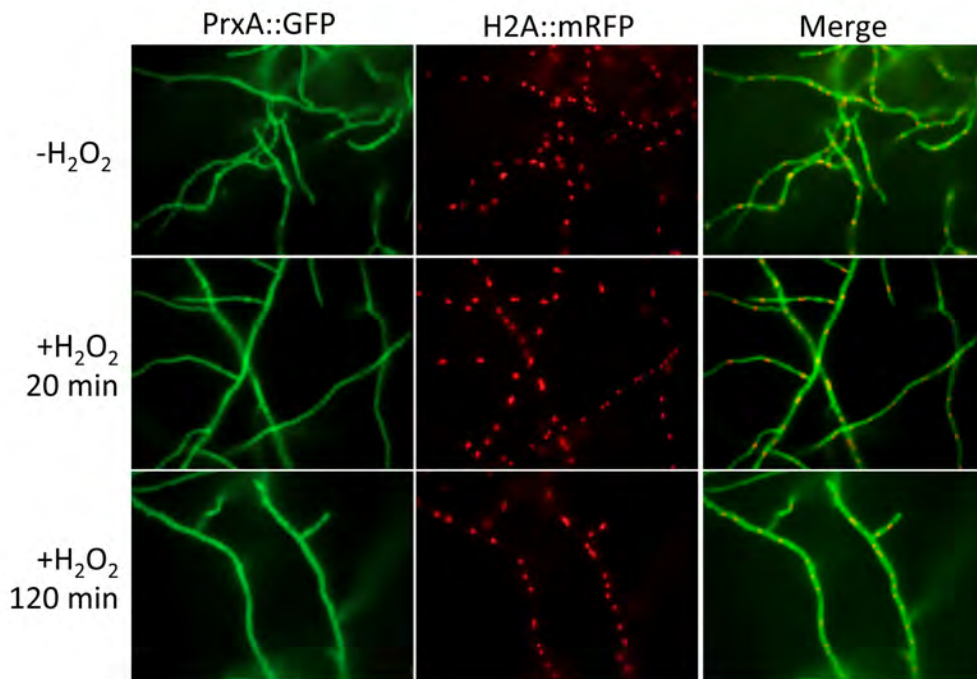


Figura 13. La localización de PrxA no se afecta por la presencia de H₂O₂. Conidiosporas (1X10³) de las cepas CAM34 (*prxA::gfp*) se crecieron por 18 h en MM y después se expusieron a 2 mM H₂O₂ durante los tiempos indicados (0–120 min). Las muestras se observaron *in vivo* usando microscopía de fluorescencia.

La mutante PrxAC61S es sensible al estrés oxidativo

PrxA y PrxB son ortólogas de Ahp1 de *S. cerevisiae*, la cual es una Prx-2Cys, con un arreglo de cisteínas diferente, donde la C_P se presenta en el N-terminal, justo antes de la C_R. A pesar de este re-arreglo, las Cys31 (C_P) y la Cys62 (C_R) forman un puente disulfuro en presencia de H₂O₂ y son esenciales para la actividad catalítica de Ahp1, mutantes puntuales en estas cisteínas, presentan una disminución considerable en la descomposición del *t*-BOOH (Lian et al. 2012). Durante el curso de este trabajo, se reportó que en *A. nidulans*, PrxA (Xia et al., 2018) y en *A. fumigatus*, Aspf3 (Hillmann et al., 2016), presentan un arreglo de las C_P y la C_R, similar a Ahp1. Mutaciones de estas cisteínas conservadas llevan una disminución en la actividad catalítica en presencia de H₂O₂ y *t*-BOOH *in vitro*. Para analizar esto *in vivo* y evaluar el papel de la Cys61 (C_P) en la actividad antioxidante de PrxA, construimos la fusión PrxAC61S::GFP misma que utilizamos para reemplazar el gen silvestre de *prxA*. La presencia de la mutación puntual se comprobó por secuenciación de DNA (Fig. S5) y posteriormente analizamos la sensibilidad de la mutante al estrés oxidante. Como se observa en la Fig. 14A, la mutante

*prxA*C61S::GFP presenta una sensibilidad al estrés oxidante semejante al de la mutante $\Delta prxA$. Mientras que etiquetar PrxA con GFP (PrxA::GFP) no afecta la actividad antioxidante de la enzima. Sin embargo, el hecho de que los fenotipos de sensibilidad al estrés tanto en la cepa $\Delta prxA$ como la *prxA*::C61S son semejantes podría sugerir que la mutación puntual en C61 hace inestable a la proteína provocando su degradación. Para descartar esta posibilidad observamos la cepas bajo el microscopio de epifluorescencia y concluimos que no existen diferencias en la intensidad de fluorescencia (cantidad de proteína) o en su localización subcelular en presencia o ausencia del H₂O₂. Por lo que se concluye que la C61 es esencial para la función de PrxA. Fig. 14B

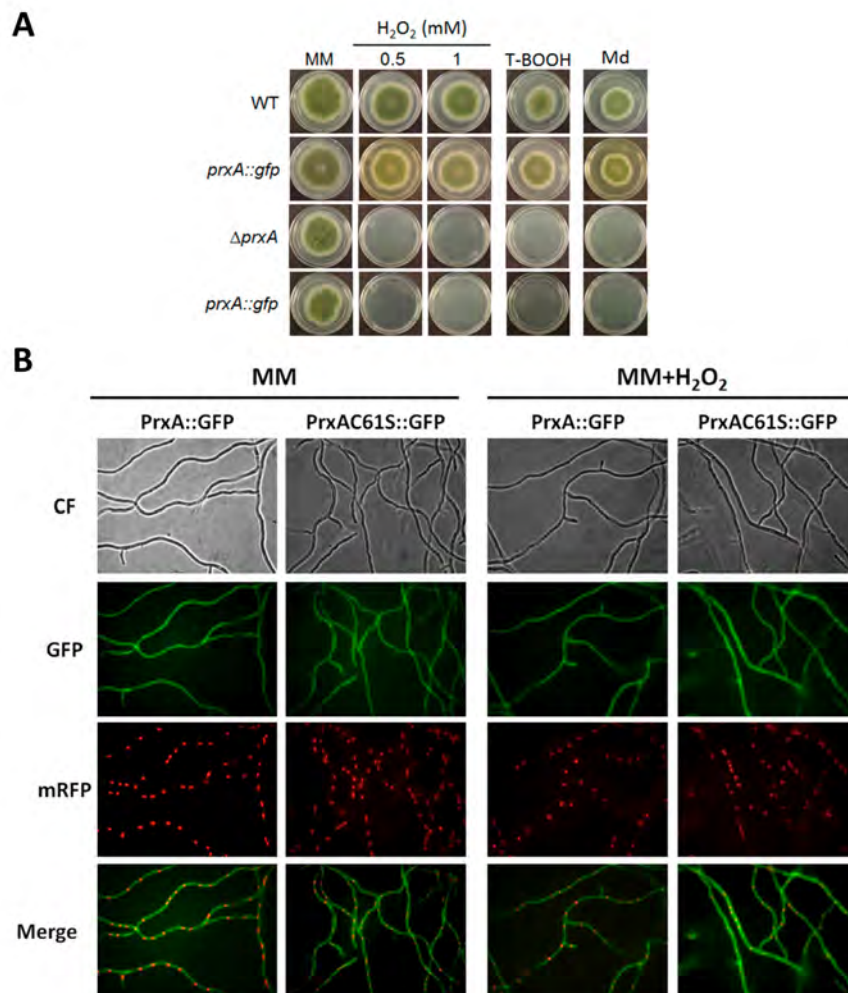


Figura 14. La Cys61 de PrxA es necesaria para la resistencia al estrés oxidativo causado por H₂O₂, Md y t-BOOH. A) Conidiosporas (1X10³) de las cepas 11035 (WT), TAM32 ($\Delta prxA$), TAM34 (*prxA::gfp*) y TAM40 (*prxA C61S::gfp*) se sembraron en cajas de MM con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y menadiona (Md). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C. **B)** Conidiosporas (1X10³) de las cepas TAM34 (*prxA::gfp*) y TAM40 (*prxA C61S::gfp*) se crecieron por 18 h en MM y después se expusieron a 2 mM H₂O₂ durante los tiempos indicados (0–120 min). Las muestras se observaron *in vivo* usando microscopía de fluorescencia.

La acumulación nuclear de NapA depende de PrxA

En levaduras, mutantes *Δgpx3* y *Δtpx1* en presencia de H₂O₂, no muestran una localización nuclear de los factores transcripcionales Yap1 y Pap1, respectivamente (Calvo et al., 2013; Delaunay et al., 2000), con lo cual se concluyó que estas Prx, en presencia de estrés oxidante, son necesarias para la activación y localización nuclear de estos factores transcripcionales. Para determinar si PrxA funciona como sensor y traductor de la señal de oxidación en la vía de NapA, se determinó la localización de NapA en presencia de H₂O₂, tanto en un fondo WT como en un fondo *ΔprxA*. En la Fig. 15, observamos que la localización nuclear de NapA se ve afectada en ausencia de PrxA, lo cual apoya su papel de activador de NapA. Es necesario confirmar esta observación con mayor resolución y detectando los núcleos de manera independiente. También es necesario hacer el experimento en condiciones de privación de nutrientes y estrés osmótico, condiciones que también inducen la localización nuclear de NapA (Mendoza-Martínez, Lara-Rojas, Sánchez, & Aguirre, 2017).

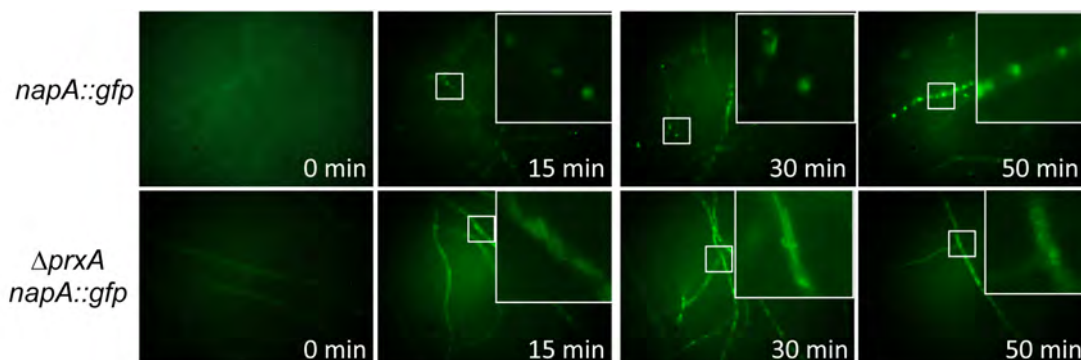


Figura 15. La localización de NapA se altera en un fondo *ΔprxA*. Conidiosporas (1×10^3) de las cepas CAM20 (*napA::gfp*) y CAM33 (*ΔprxA napA::gfp*) se crecieron por 18 h en MM y posteriormente se expusieron a 2 mM H₂O₂ durante los tiempos indicados (0–50 min). Las muestras se observaron *in vivo* usando microscopía de epifluorescencia

NapA, PrxA y PrxB están involucrados en procesos del desarrollo sexual y asexual

Dado que hemos propuesto que las ERO funcionan como reguladores de la diferenciación celular, decidimos evaluar el papel de las Prx, durante el desarrollo asexual y sexual del hongo, especialmente porque la mutante $\Delta napA$ produce alrededor del 50% menos esporas asexuales que una cepa silvestre (Mendoza-Martínez et al., 2017). En la Fig. 16 se observa esta misma reducción en la esporulación de las mutantes $\Delta napA$, $\Delta prxA$, $\Delta prxA \Delta napA$ y $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ (alrededor del 50%), lo cual sugiere que PrxA y NapA regulan la conidiación a través de una misma vía. Mientras que en una mutante $\Delta prxB$ la conidiación también está disminuida (75%), pero en menor medida y dicho fenotipo se ve ligeramente potenciado por la inactivación simultánea de PrxA (61%). Esto indica que PrxA-NapA juegan un papel más importante en la regulación de la conidiación, pero que PrxA y PrxB contribuyen a la conidiación de manera independiente.

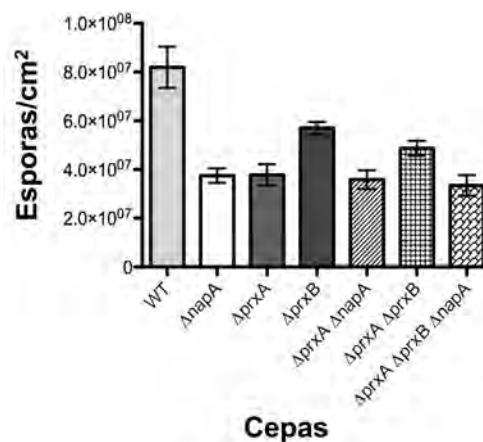


Figura 16. PrxA y NapA regulan la conidiación a través de la misma vía, mientras que PrxB regula la conidiación de manera independiente de PrxA. Conidiosporas (1×10^3) de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM31 ($\Delta prxA \Delta napA$), CAM32 ($\Delta prxA \Delta prxB$) y CAM34 ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$) se sembraron en cajas de MM PABA e incubaron por 4 días a 37 °C. Posteriormente se colectaron las conidias totales y se contaron. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

Con respecto al ciclo sexual, y de acuerdo con lo reportado previamente, los resultados en la Fig.17 muestran que la mutante $\Delta napA$ presenta un incremento en la producción de estructuras sexuales (cleistotecios), aunque de menor tamaño, en comparación con la cepa silvestre. Resultados similares se obtuvieron para las mutantes sencillas $\Delta prxA$, $\Delta prxB$, las dobles $\Delta prxA \Delta napA$, $\Delta prxA \Delta prxB$ y la triple mutante $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ (7A). Por otro

lado, se sabe que los cleistotecios jóvenes producidos por una mutante $\Delta napA$ son poco pigmentados (Mendoza-Martínez et al. 2017). Un fenotipo muy semejante se observó en las mutantes $\Delta prxA$ y $\Delta prxA \Delta napA$, indicando nuevamente una relación epistática entre $prxA$ y $napA$. Notablemente, un fenotipo mas exacerbado se observó en las mutantes $\Delta prxB$, $\Delta prxA \Delta prxB$ y $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ (Fig. 17B).

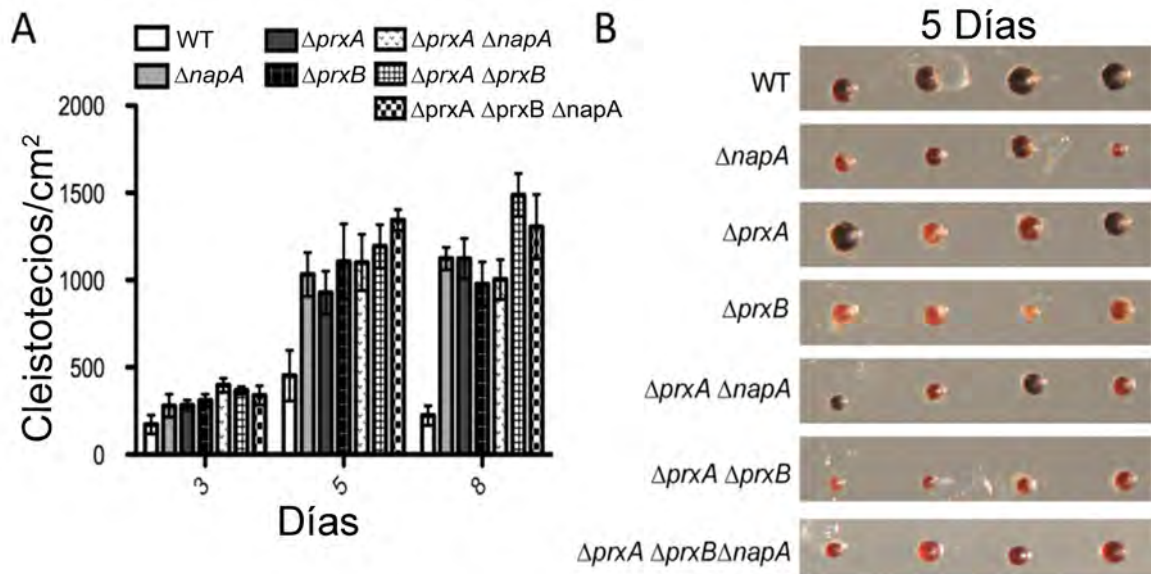


Figura 17. NapA, PrxA y PrxB regulan diferencialmente la formación de cuerpos fructíferos y su pigmentación. Conidiosporas de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM31 ($\Delta prxA \Delta napA$) CAM32 ($\Delta prxA \Delta prxB$) y CAM34 ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$) se crecieron y se indujeron para ciclo sexual según lo reportado (Kawasaki et al., 2002). El número total de cleistotecios por cuadrante fue determinada bajo un microscopio de disección y usada para calcular el número de cleistotecios por cm^2 . Barras representan error estándar de la media (SEM). **(B)** La eliminación de $napA$, $prxA$ y $prxB$ causa la producción de cleistotecios poco pigmentados.

PrxB es necesaria para asimilación de arabinosa y etanol como únicas fuentes de carbono

Por otra parte, dado que NapA esta involucrada en la transcripción de diversas enzimas necesarias para la asimilación de arabinosa, fructosa y etanol como fuente de carbono, evaluamos el crecimiento de las mutantes sencillas, dobles y triples en estos medios.

En la Fig. 18 se observa que la mutante $\Delta napA$ no crece en arabinosa, fructosa o etanol como fuentes de carbono, una mutante $\Delta prxA$ es capaz de asimilar estas fuentes de carbono y crecer en todas ellas, mientras que las mutantes $\Delta prxA \Delta napA$ y $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ se comportan como la mutante sencilla $\Delta napA$.

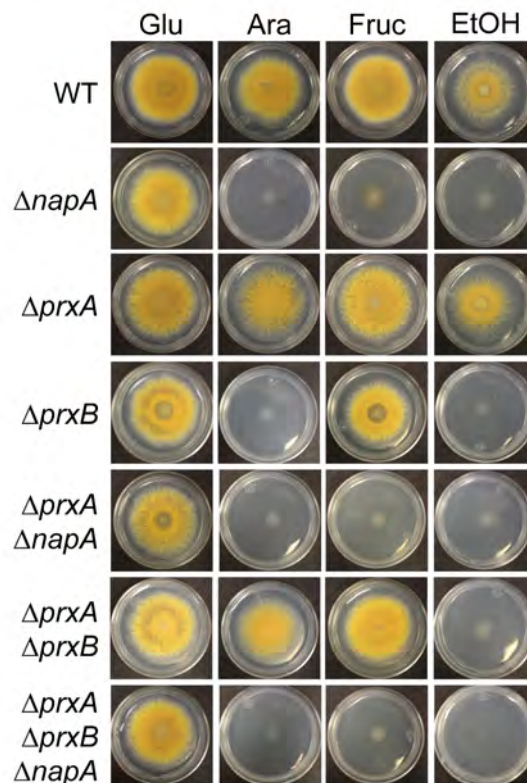


Figura 18. NapA y PrxB son necesarias para la asimilación de arabinosa y etanol como fuente de carbono. Conidiosporas (1X10³) de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM31 ($\Delta prxA \Delta napA$) CAM32 ($\Delta prxA \Delta prxB$) y CAM34 ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$) se sembraron en cajas de MM adicionadas con diferentes fuentes de glucosa (Glu), arabinosa (Ara), fructosa (Fruc), etanol (EtOH) y glucosa más alcohol alílico (Glu+ AA). Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37 °C.

Hasta ahora este es el único fenotipo en el que los genes *prxA* y *napA* no muestran una relación epistática y claramente muestra que PrxA no se requiere para la función de NapA para la utilización de estas fuentes de carbono. Mientras que la mutante $\Delta prxB$ es incapaz de asimilar la arabinosa y el etanol como fuentes de carbono, pero crece en fructosa. Inesperadamente, la inactivación de *prxA* recupera la capacidad de la mutante $\Delta prxB$ para crecer en arabinosa, de una manera todavía dependiendo de *napA*. Estos resultados indican que PrxB y NapA se requieren de manera independiente para crecer en arabinosa y sugieren que en ausencia de PrxA y PrxB se activa una vía capaz de reemplazar la función de PrxB en el proceso.

TpxA esta involucrada en la resistencia a HU

Posteriormente, para determinar el papel de las otras Prx en distintos tipos de estrés, se realizaron pruebas de estrés de pared (Calcofluor 10µg/mL), estrés osmótico (NaCl 1M y Sorbitol 1.2M) estrés de replicación (Hidroxiurea 5 y 15 mM) y al fungicida fluidioxonil (5 µg/mL). Sin embargo, todas las cepas muestran sensibilidad al fluidioxonil y ninguna parece afectarle el estrés de pared, el estrés osmótico y de replicación, Fig. 19. Aunque en la cepa TpxA se observa una disminución en la esporulación, en presencia de HU 15 mM. En *S. cerevisiae*, Tsa1, ortólogo de TpxA, esta involucrada en la regulación de la de la velocidad de la horquilla de replicación a través de la regulación de los niveles de síntesis de dNTPs (Weids & Grant, 2014).

Tpx1 es un competidor, de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) (enzima encargada de la síntesis dNTPs), ya que ambas proteínas dependen del poder reductor de las Trx para su funcionamiento. En este estudio se propone que a pesar de que las enzimas Trx1 y Trx3 tienen mayor afinidad por la Tpx1, durante el estrés oxidante Tpx1 se reduce por Yap1, lo que permite que Trx1 y Trx3 se encarguen de mantener a RNR reducida y así evitar alteraciones en la velocidad de la horquilla de replicación (Boronat et al., 2017). Por otro lado, en mamíferos, la PRDX2 se asocia con un complejo de protección de la replicación, denominado TIMELESS-TIPIN, cuya disociación conlleva a una disminución en la velocidad de la horquilla de replicación. Cuando el genoma se expone a las ERO, la oxidación de los oligómeros de PRDX2 causan la disociación del complejo TIMELESS-TIPIN del replisoma, lo cual conlleva a disminución de la velocidad de la horquilla de replicación (Gomez-Gonzalez & Aguilera, 2017).

Todos estos datos sugieren que las peroxiredoxinas actúan como “puentes” entre el estrés oxidativo y la velocidad de replicación para mantener la integridad del genoma y la regulación del ciclo celular. Sin embargo, el mecanismo podría ser diferente en hongos filamentosos, ya que en presencia de H₂O₂, PrxA estaría pasando la señal de oxidación NapA. Para evaluar el posible papel de TpxA en la respuesta a hidroxiurea (HU), podría evaluarse su localización subcelular en presencia y ausencia de HU.

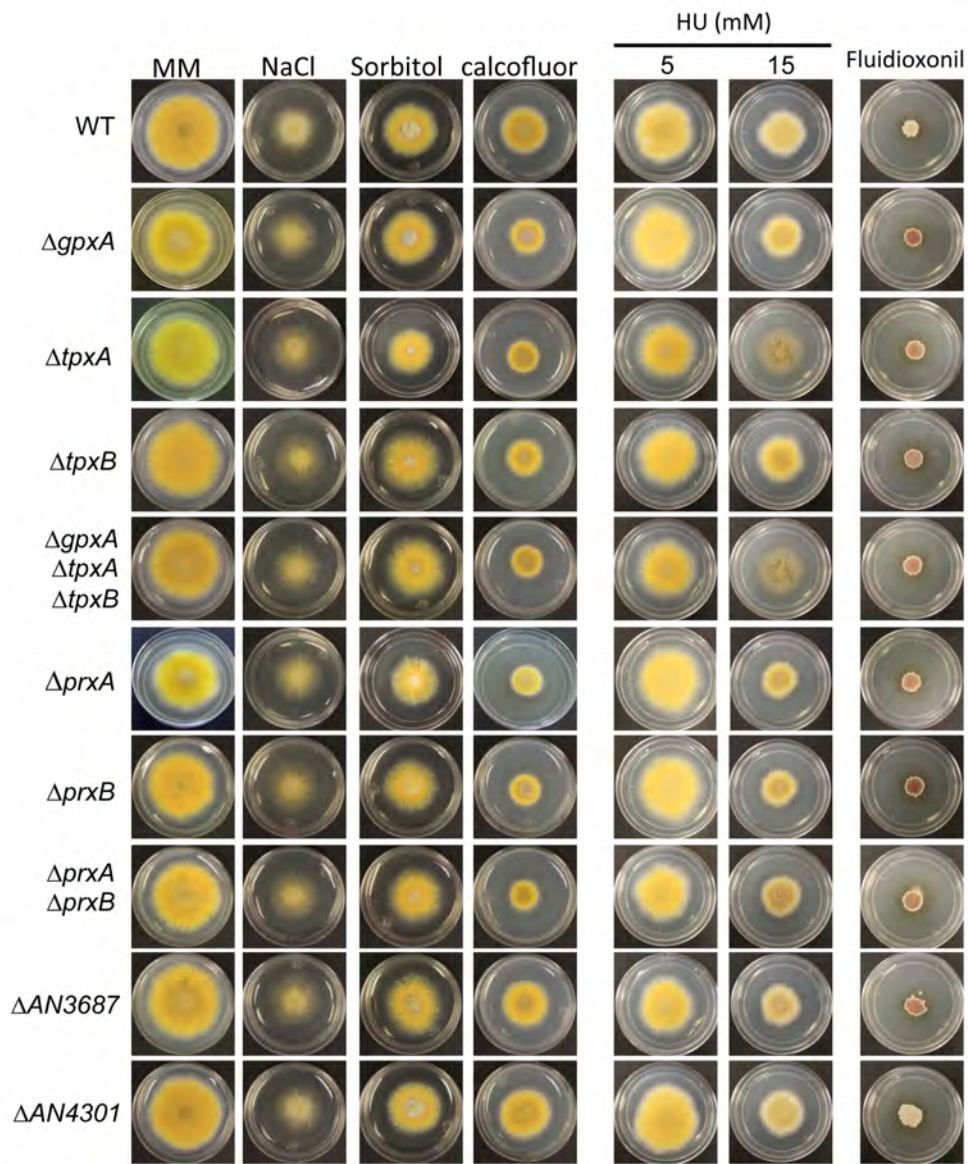


Figura 19. La esporulación de la mutante $\Delta tpxA$ disminuye en presencia de HU. Conidiosporas (103) de las cepas CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM11 ($\Delta gpxA$), CAM13 ($\Delta tpxA$), CAM19 ($\Delta tpxB$), CAM15 ($\Delta gpxA$ $\Delta tpxA$ $\Delta tpxB$), CAM29 ($\Delta prxA$), CAM30 ($\Delta prxB$), CAM32 ($\Delta prxA$ $\Delta prxB$), CAM42 ($\Delta AN3687$) y CAM43 ($\Delta AN4301$) se sembraron en cajas de MM con NaCl, sorbitol, calcofluor, hidroxihurea (HU) y fluidioxonil. Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37°C.

SrrA interacciona con diversas proteínas en ausencia y presencia de H₂O₂

SrrA es un factor transcripcional involucrado en la respuesta antioxidante ortólogo a Skn7 y Prr1 en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, específicamente (Vargas-Perez, Sanchez, Kawasaki, Georgellis, & Aguirre, 2007). En levaduras, la interacción física entre Prr1 y Pap1-oxidado incrementa la afinidad de Pap1 por los promotores de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Mientras que en *A. nidulans* la interacción física, *in vivo*, entre ambos factores transcripcionales se comprobó a través de la técnica de complementación biomolecular (Lara-Rojas, Mendoza-Martínez y Aguirre, sin publicar). Adicionalmente, mediante la técnica de GFP-trap, analizamos el interactoma de NapA y SrrA en ausencia y presencia de estrés oxidante. Para ello, se marcaron con GFP las dos proteínas de interés, sustituyendo los genes silvestres *napA* y *srrA* por *napA::gfp* y *srrA::gfp*, respectivamente. Una vez obtenidas las cepas de interés, éstas se crecieron en medio líquido por 22 h, en donde las muestras con estrés se sometieron a un tratamiento de 2 mM de H₂O₂ (concentración final) durante 2h. Posteriormente se llevó a cabo una purificación proteica por inmunoprecipitación de la GFP, en donde los extractos purificados se corrieron en un gel desnaturalizante de acrilamida, el cual después fue digerido con tripsina. Los péptidos se extrajeron y se separaron del gel de la acrilamida usando cromatografía líquida de fase inversa.

Por último, los péptidos cromatográficamente separados fueron ionizados a través de nano-electrospray y transferidos dentro del espectrómetro de masas. Los datos del espectrómetro de masas se analizaron primero con el software Max Quant (<http://www.biochem.mpg.de/5111795/maxquant>) y posteriormente con el software Perseus (<http://www.biochem.mpg.de/5111810/perseus>), ambos de libre acceso. Los datos se depuraron de contaminantes potenciales y posteriormente se llevó a cabo la identificación de cada péptido. Finalmente, se eligieron aquellos péptidos que se encontraron representados al menos 3 veces en ambas replicas independientes.

En el caso de NapA, dada su baja expresión fue imposible obtener resultados confiables de su interactoma. Sin embargo, en el caso de SrrA fue posible determinar los péptidos a los cuales se une en ausencia y presencia de H₂O₂. La Fig. 20A esquematiza que SrrA interacciona con un total de 308 proteínas (100%), de las cuales un 19.8% se unen en condiciones normales de crecimiento, mientras que en presencia de estrés oxidante el

porcentaje de proteínas de unión a SrrA se incrementa a un 68.8%. Así mismo, un 11.4%, de estos péptidos se mantienen unidos a SrrA de manera independiente de la presencia o ausencia de estrés, en los cuales, únicamente se observa un cambio en el número de proteínas unidas a SrrA, el cual se encuentra graficado en la Fig. 20C.

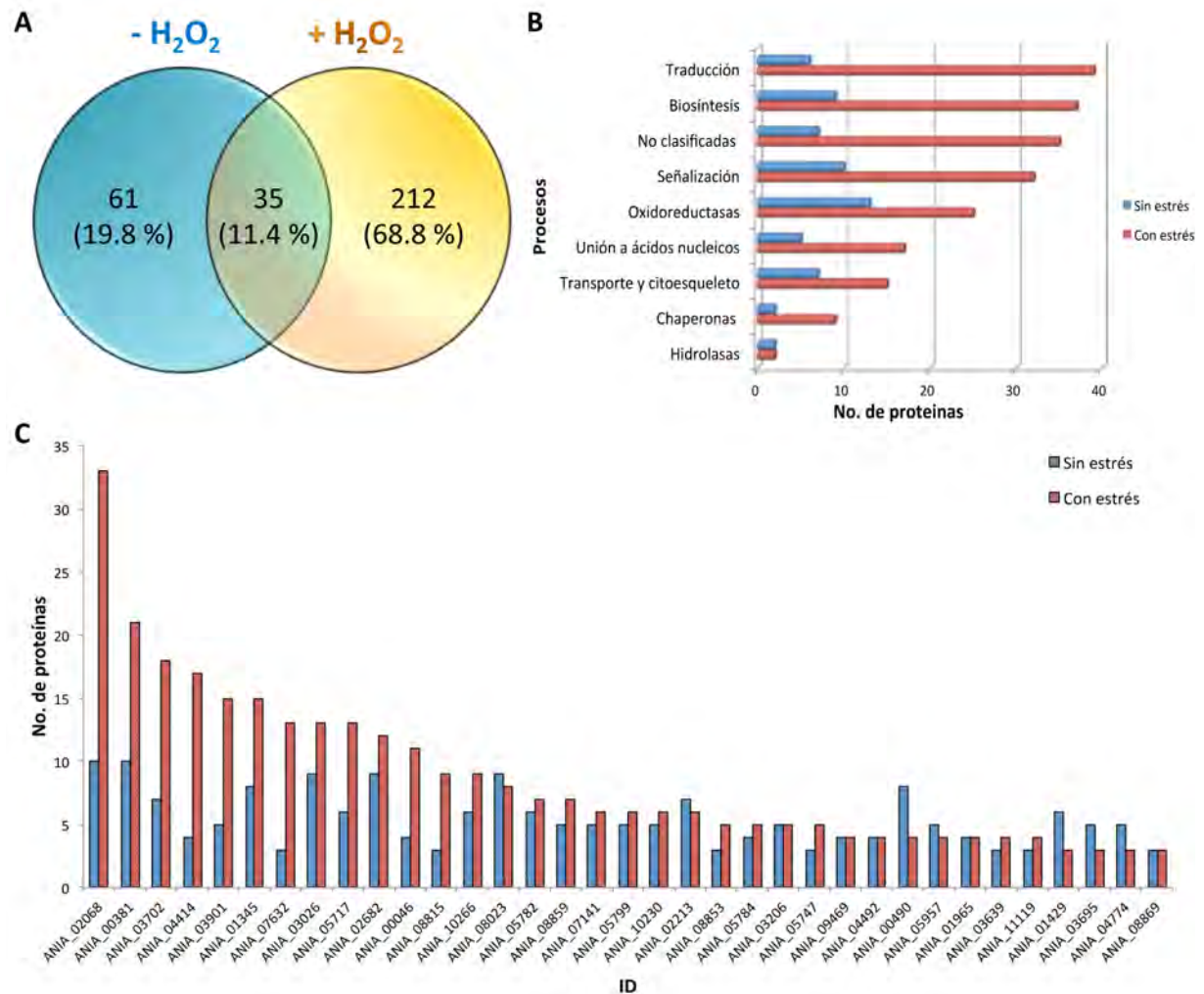


Figura 20. A) SrrA interacta con un total de 308 proteínas en presencia y ausencia de H₂O₂. Se inocularon por duplicado 2X10⁶ esporas/mL de las cepas *srrA::gfp* (TAM11). Los cultivos se crecieron a 37°C durante 22h. Posteriormente se añadió H₂O₂ a una concentración final de 2 mM por 2h. Al término, los cultivos se congelaron y se pulverizaron para posteriormente realizar el “pull down” anti-GFP. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida. Cada uno de los pozos se corto y se digirió con tripsina. Finalmente las muestras se enviaron al espectrómetro de masas. Los datos se analizaron utilizando los software Max Quant y Perseus. **B) En presencia de estrés oxidante, la unión de proteínas unidas a SrrA se incrementa.** **C) Los 35 péptidos unidos constitutivamente a SrrA, solo muestran cambio en el número de péptidos entre las condiciones de sin estrés y con estrés.**

Por otro lado, en la Fig. 20B observamos que la transición de condiciones normales a las condiciones de estrés oxidante, incrementa el número de proteínas unidas a SrrA de 61 a 212. Dentro de estas proteínas con las que interacciona SrrA, en ninguna de las dos condiciones se encuentra NapA, lo cual quiere decir que no existe interacción entre ambos factores transcripcionales o bien su interacción es débil y se pierde durante la purificación proteica.

A pesar de ello, observamos que SrrA se une a gran variedad de proteínas relacionadas con procesos de biosíntesis, señalización, traducción, oxidoreductasas, de unión a ácidos nucleicos, transporte, componentes de citoesqueleto, chaperonas e hidrolasas. En la Fig. 20B, observamos que SrrA, en condiciones de estrés oxidante incrementa, mayoritariamente, su unión a proteínas relacionadas con procesos de traducción, entre las cuales encontramos varias aminoacil-tRNA sintetasas como: la triptofanilo-tRNA sintetasa (ANIA_10475), valil-tRNA sintetasa (ANIA_10195), glutamil-tRNA sintetasa (ANIA_08224), isoleucil-tRNA sintetasa (ANIA_00705) y aspartil-tRNA sintetasa. Las aminoacil-tARN sintetasas son enzimas que participan durante la elongación de la traducción, cargando a las moléculas de aminoácidos, los cuales posteriormente son colocados a lo largo del RNA mensajero y finalmente unidos por medio de enlaces peptídicos para formar proteínas. Hasta el momento no se ha reportado la interacción física de SrrA o alguno de sus ortólogos a estos tRNA, sin embargo en levaduras, la unión de proteínas como Mod5 a los tRNA conlleva a un silenciamiento, a través del impedimento de la unión de los tRNA a los péptidos nacientes (Pratt-Hyatt et al., 2013); por otro lado, la formación de complejos de tRNA y proteínas incrementa su eficiencia catalítica facilitando el reconocimiento y la unión de los tRNAs cognatos (Hausmann & Ibba, 2008). Estos datos sugieren que SrrA podría estar actuando como regulador de la expresión a nivel post-transcripcional.

Por otro lado, entre las proteínas relacionadas con procesos de respuesta antioxidante que se unen a SrrA en presencia de H₂O₂, se encuentra PrxB. Anteriormente habíamos planteado que el fenotipo hipersensible al estrés oxidativo de una triple mutante *ΔprxA ΔprxB ΔnapA* podría sugerir que PrxA activa la vía de NapA, mientras que PrxB podría estar activando otras vías de respuesta al estrés como la de SrrA y una posibilidad es a través de la oxidación de cisteínas presentes en este factor transcripcional. En *S. cerevisiae*, únicamente, la mutante que presenta un cambio puntual de 3 cisteínas del dominio receptor de Skn7 mostró una ligera sensibilidad en placas con estrés oxidativo (He, Mulford, & Fassler, 2009). Estos datos

sugieren, una posible regulación de óxido-reducción, conjunta, entre varias cisteínas localizadas a lo largo de Skn7. Al igual que Skn7, SrrA contiene estas 3 cisteínas conservadas en su dominio receptor, lo cual sugiere que estas un papel importante de estos residuos en la regulación redox. Para comprobar esta hipótesis, podríamos mutar cada una de estas cisteínas en SrrA y evaluar su crecimiento en H₂O₂. Así mismo, para corroborar los datos del interactoma se podría realizar una co-inmunoprecipitación y detectar ambas proteínas mediante Western blot, evaluando si esta interacción es dependiente de la oxidación de cisteínas utilizando las mutantes puntuales en las cisteínas de SrrA.

Otra de la proteínas que interacciona con SrrA en presencia de estrés oxidante es la ribonucleótido di fosfato reductasa RnsA, la cual es ortóloga de RNR1 de *S. cerevisiae* y está involucrada en la síntesis de dNTPs. Para comprobar alguna relación epistática entre SrrA y RnsA, llevamos a cabo la eliminación del gen *rnsA*, sin embargo, como se ha reportado en todos sus ortólogos, la mutante es no viable, ya que únicamente se obtuvieron cepas en heterocariones (datos no mostrados).

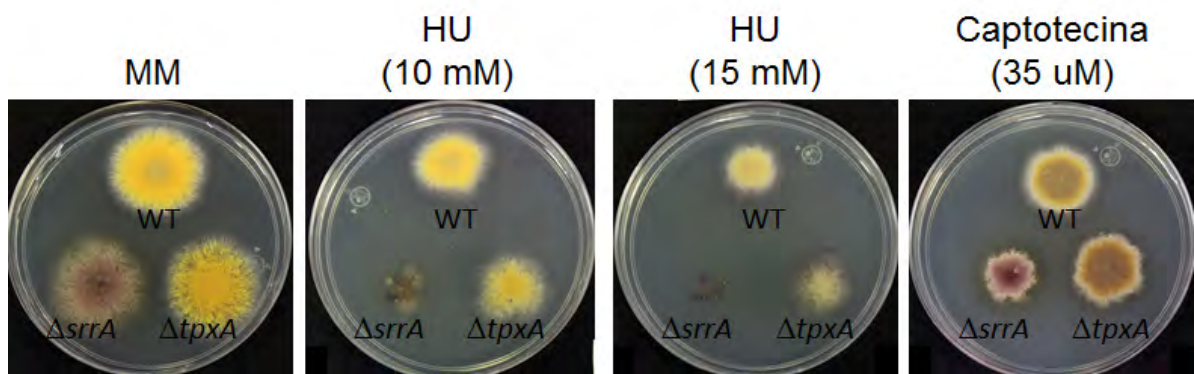


Figura 21. SrrA es sensible a HU. Conidiosporas (1×10^3) de las cepas CLK43 (WT), CAM13 ($\Delta tpxA$) y TsrrA se sembraron en cajas de MM adicionadas con HU (hidroxiurea) y captotecina a las concentraciones indicadas. Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37°C.

Posteriormente evaluamos el crecimiento de la mutante $\Delta srrA$ y $\Delta tpxA$ en presencia de HU, como se observa en la Fig. 21, la mutante $\Delta srrA$ es altamente sensible a HU, lo cual es inusual, ya que la HU es un inhibidor altamente selectivo para las RNR de clase I.

Hace algunos años se pensaba que HU causaba muerte celular a través de la depleción de los niveles de dNTPs y el arresto de la horquilla de replicación sin embargo, Davies BW y colaboradores demostraron que bajo tratamiento con HU la célula induce rápidamente respuestas de protección a la estabilidad del genoma. Al mismo tiempo, se incrementa la

toma de hierro y las toxinas, lo cual causa la síntesis de proteínas incompletas y el incremento de generación de anión superóxido, causando estrés oxidante (B. W. Davies et al., 2009). En *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que la HU suprime la actividad de varias metaloproteasas, como las catalasas, debido a la unión directa de la HU a la enzima (Juul et al., 2010). *A. nidulans*, las mutantes en $\Delta srrA$ y $\Delta napA$ no presentan una inducción en la actividad de la catalasa B en presencia de H_2O_2 (Mendoza-Martinez et al., 2017; Vargas-Perez et al., 2007). A pesar de que ambos factores transcripcionales son necesarios para la presencia de catalasa B, la mutante $\Delta napA$ no es sensible a la HU, lo cual indica que la sensibilidad de la mutante $\Delta srrA$ puede deberse a la posible interacción física que encontramos entre SrrA y RnrA.

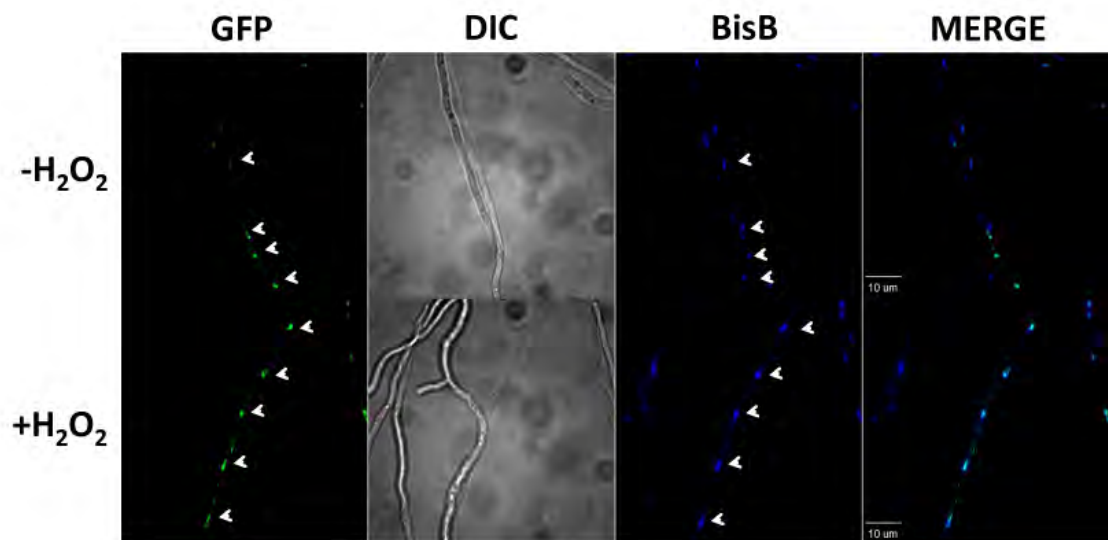


Figura 22. SrrA se encuentra constitutivamente en el núcleo en presencia o ausencia de H_2O_2 . Se inocularon 2×10^3 esporas en medio líquido suplementado con PABA. Los cultivos se incubaron por 20 h. Posteriormente se realizó una tinción con bis benzimide por 20 minutos y por último se adicionó H_2O_2 a una concentración final de 2mM. Las flechas indican la localización de SrrA::GFP en el núcleo. Barra 10 μ m.

Posiblemente la unión de la respuesta antioxidante con los mecanismos que involucran la estabilidad del genoma ha sido una estrategia conservada durante la evolución, como se ha observado en levaduras con Tpx1 y Rnr1, así como en mamíferos con la PRDX2. La unión de un factor transcripcional involucrado en la respuesta antioxidante, como SrrA con RnsA es un caso análogo a estos mecanismo, en los que se opta por la conservación del genoma ante situaciones de estrés oxidante.

Hasta el momento se han descrito proteínas con localización nuclear que interactúan con SrrA, lo cual concuerda con el hecho de que SrrA es una proteína con localización nuclear constitutiva, (Fig. 22) que concuerda con los datos encontrados en las levaduras *S. cerevisiae* (Brown, Bussey et al. 1994) y *S. pombe* (Toone, Kuge et al. 1998, Castillo, Ayte et al. 2002), indicando que la localización nuclear constitutiva de SrrA y sus ortólogos se encuentra conservada.

Sin embargo, como se observa en las gráficas (Fig. 20) y las tablas (1 y 2) del interactoma, SrrA se une a proteínas cuya localización subcelular es fuera del núcleo, en las tablas 1 y 2 podemos observar, incluso, péptidos de localización mitocondrial, como la codificada por el gen ANIA_02977, la cual es una posible proteína mitocondrial acarreadora de fosfatos o la codificada por el gen ANIA_01281, que codifica para una subunidad del complejo TIM44, así como estas proteínas se encuentran muchas otras involucradas en procesos fuera del núcleo y cuyo No. péptidos encontrados en ambas réplicas biológicas hace descartar la idea de una contaminación.

En la Fig. 22, se observa una acumulación puntual de SrrA, en ausencia y presencia de H₂O₂, la cual co-localiza con la marca nuclear de BisB, sin embargo, en la imagen del empalme de ambas señales (merge), podemos observar que existen pequeñas señales de SrrA::GFP que no co-localizan con la señal nuclear, lo cual sugiere que SrrA podría encontrarse en otro compartimento celular, además del núcleo.

Hasta el momento no existen reportes de una localización o función adicional, fuera del núcleo, del factor transcripcional SrrA ni algún otro de sus ortólogos. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, Skn7 cambia su localización nuclear a citosólica, en respuesta a hipoxia, lo cual podría plantear la posibilidad de este factor transcripcional de cambiar su localización nuclear ante diferentes estímulos ambientales.

Discusión

Las Prx son proteínas involucradas en diversos procesos, de hecho son consideradas proteínas con propiedades “Moon light”, es decir, proteínas que presentan más de una función. En levaduras, la hiperoxidación de Tsa1 causa la inactivación de su función antioxidante, sin embargo, los oligómeros hiperoxidados de Tsa1 interactúan con las chaperonas Hsp70 y la Hsp104 para promover la disgregación de proteínas mal plegadas (Hanzen et al., 2016; Jang et al., 2006), así mismo también se ha propuesto que el oligómero hiperoxidado también inhibe la progresión del ciclo celular (Phalen et al., 2006) y el envejecimiento a través de la regulación de la actividad de fosfatasa específicas para alterar la traducción de señales, bajo condiciones de estrés oxidativo (Turner-Ivey et al., 2013). Estos datos nos indican que las Prx se encargan, de diversas formas, de evitar el daño celular en presencia de estrés oxidante y que el estado de oxidación de las Prx modula estas múltiples funciones. En el 2013 Barry Scott y colaboradores propusieron que los hongos filamentosos carecían de Prx-2 Cys, sin embargo, el descubrimiento de las distintas posiciones que pueden presentar la C_R en las Prx, como es el caso de Ahp1 (Lian et al., 2012), ha llevado a replantear las diferentes subfamilias de Prx presentes en hongos filamentosos y sus distintas funciones.

Nuestros resultados indican que PrxA podría activar a NapA durante el estrés oxidante causado por H₂O₂, Md y *t*-BOOH, mientras que la mínima contribución de PrxB en la respuesta antioxidante, únicamente, se puede observar en las mutantes dobles ($\Delta prxA \Delta prxB$) y la triple mutante ($\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$). Sin embargo, la ligera sensibilidad de la mutante $\Delta prxB$ podría sugerir que PrxB también puede activar a NapA. De acuerdo con esta interpretación, PrxA y PrxB serían funcionalmente intercambiables y sus distintos papeles serían resultado de una expresión diferencial. Aunque aún no conocemos los patrones de expresión de los genes correspondientes, una forma de poner a prueba esta hipótesis consiste en intercambiar los promotores de dichos genes. Otra posibilidad es que los fenotipos de sensibilidad aditiva en las dobles y triples mutantes con fondo $\Delta prxB$ (Fig. 10 y 11), indican una interacción genética negativa entre las vías de PrxA-NapA y PrxB. En *S. pombe*, en presencia de H₂O₂ la mutante $\Delta tpx1$ presenta una disminución en la fosforilación de Sty1, lo cual sugiere que Tpx1 esta involucrada en la activación de esta vía (Veal et al., 2004).

Mientras que en *S. cerevisiae*, una mutante carente de las 8 Prx no es capaz de iniciar la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Fomenko et al., 2011), en conjunto, estos datos sugieren que las peroxidasas perciben y transfieren las señales de oxidación a diversas vías de respuesta antioxidante. Una posibilidad es que PrxA únicamente esta involucrada en la activación de la vía de NapA, mientras que PrxB podría estar implicada en la activación de otras vías de respuesta antioxidante, como la de SakA. Para comprobar esta hipótesis es necesario evaluar si en la mutante $\Delta prxB$ existe una alteración en la fosforilación de SakA en presencia de estrés oxidante.

Adicionalmente, también se debe considerar que las Prx, además de funcionar como transductores de señales de oxidación, también funcionan como proteínas antioxidantes, las cuales son altamente específicas y eficientes para descomponer peróxidos y peroxinitritos (Bryk, Griffin, & Nathan, 2000), a pesar de que las Prx se inhiben por su propio sustrato (Peróxidos), su alta eficiencia catalítica se debe a que son proteínas altamente abundantes en la célula; en las levaduras se estima que las Prx son 50 veces más abundantes que las Gpx y 500 veces más abundantes que las catalasas (Ghaemmaghami et al., 2003; Karplus, 2015). En *A. nidulans*, dado que PrxA es altamente abundante en el micelio (Fig. 13), es posible que en presencia de H_2O_2 , parte de PrxA reduce el H_2O_2 y pasa la señal de oxidación a NapA, mientras que la otra parte actúa directamente como proteína antioxidante, cuya forma oxidada es reducida por la tiorredoxina reductasa. Lo anterior explicaría el ligero aumento de sensibilidad en las mutantes $\Delta prxA$ y $\Delta prxA \Delta napA$ con respecto a la mutante $\Delta napA$ (Figs. 9 y 10).

Por otro parte, nuestros resultados durante la diferenciación celular nos sugieren que PrxA activa a NapA durante la conidiación y el ciclo sexual, mientras que PrxB podría activar a NapA durante la síntesis de la melanina del cleistotecio, lo cual refuerza la interpretación de que PrxA y PrxB serían funcionalmente intercambiables y sus distintos papeles serían resultado de una expresión diferencial. Otra posibilidad es que NapA puede ser activada de manera diferencial por ambas Prx. En *S. cerevisiae*, dos Prx de distinto tipo pueden activar a Yap1. Así, en presencia de H_2O_2 , Gpx3/Ybp1 es el activador principal de Yap1, mientras que Tsa1 (peroxiredoxina dependiente de tiorredoxina) también puede oxidar a Yap1 cuando Ybp1 no esta presente (Ross et al. 2000). Por otro lado, la otra peroxiredoxina dependiente de tiorredoxina, Ahp1, es capaz de activar a Cad1 (parálogo de Yap1) en presencia de alquil

hidroperóxidos (Iwai, Naganuma, and Kuge 2010). Incluso, Yap1 presenta diversas formas de oxidación (a través de sus dominios ricos en cisteínas), dependiendo de la naturaleza química de la molécula activadora (Ross et al. 2000), estos datos nos sugieren que NapA podría ser activada de distintas formas y por distintas peroxiredoxinas (PrxA y PrxB), dependiendo del estímulo presentado. En *A. fumigatus*, el ortólogo de PrxA, Aspf3, es esencial para la respuesta al H₂O₂ y el *t*-BOOH (Hillmann et al. 2016), mientras que Prx1, ortólogo de TpxA, es necesaria para la resistencia al paraquat, la menadiona y la viabilidad de la germinulas en presencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Rocha et al., 2018). Estos datos nos indican que en *A. fumigatus* Aspf3 y Prx1 se complementan funcionalmente para responder a diferentes tipos de estrés, lo cual parece suceder en *A. nidulans*.

En cuanto a la posible interacción de NapA con el FT SrrA, dada la baja expresión de NapA, en condiciones normales de crecimiento y en estrés, no fue posible determinar su interactoma, sin embargo, los resultados del interactoma de SrrA nos indican que no existe interacción entre ambos factores transcripcionales, tanto en ausencia como en presencia de estrés. Sin embargo, existe la posibilidad de que a pesar de que no haya una interacción física entre ambos FT, estos podrían estarse uniendo en distintas zonas del mismo promotor. Para poner a prueba esta hipótesis podríamos evaluar la expresión de algunos genes que codifican a proteínas de actividad antioxidante en mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta napA$ sencillas y dobles.

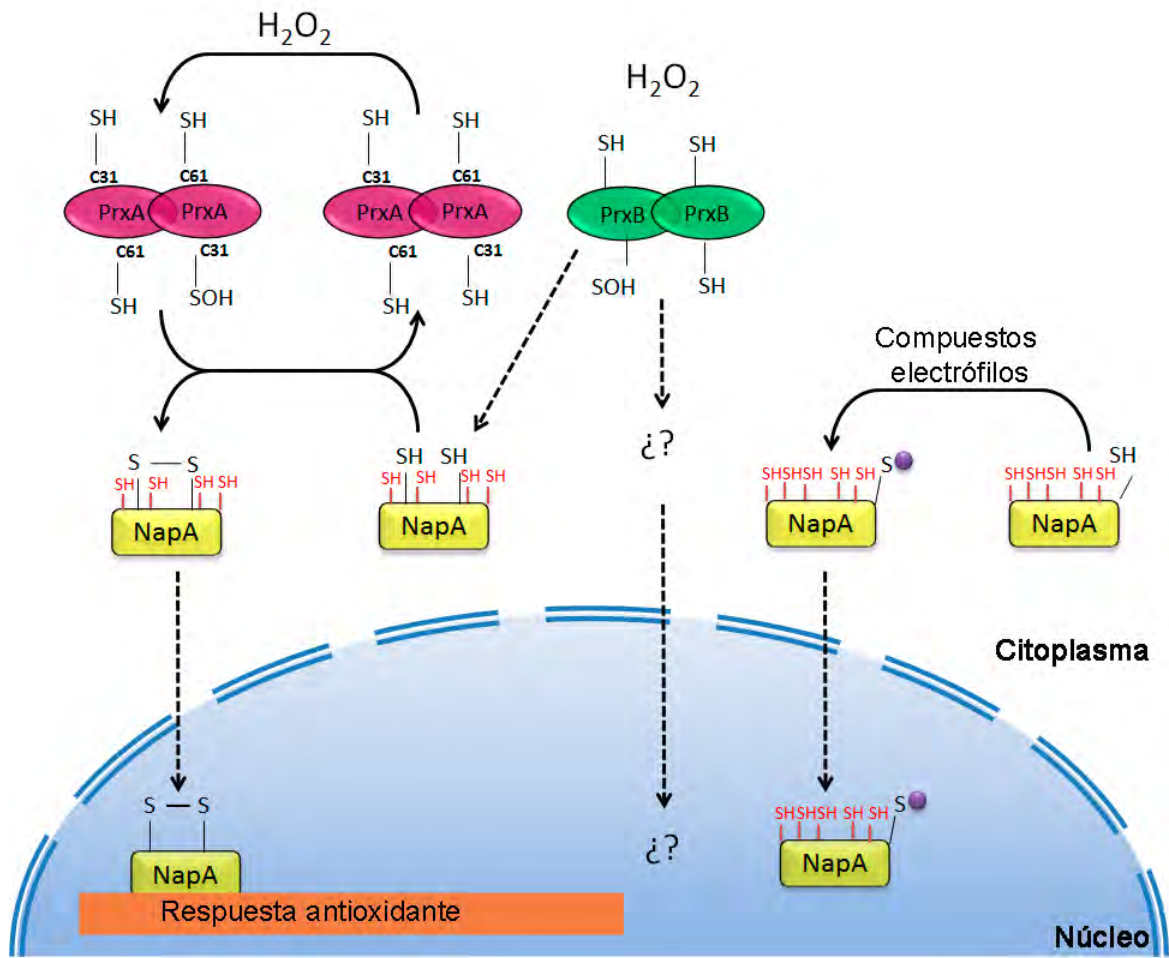


Figura 23. Posible modelo de la activación de NapA a través de PrxA, en presencia de estrés oxidante. En presencia de H_2O_2 y Md, PrxA sufre una oxidación a nivel de la Cys61, posteriormente esta señal de oxidación se transfiere a una cisteína conservada de NapA, lo cual conlleva a la formación de un puente disulfuro intramolecular en NapA y su consecuente acumulación nuclear, así como el inicio de la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Mientras que, PrxB participa en la respuesta antioxidante como transductor de señales de oxidación a través de una vía paralela a NapA. NapA puede sufrir diferentes oxidaciones en sus 6 cisteínas conservadas, lo cual resulta en diferentes cambios conformacionales y la activación de la transcripción de diferentes set de genes. En el caso de los compuestos electrófilos, estos reaccionan y se unen con las cisteínas de NapA, ocultando su señal de exportación nuclear.

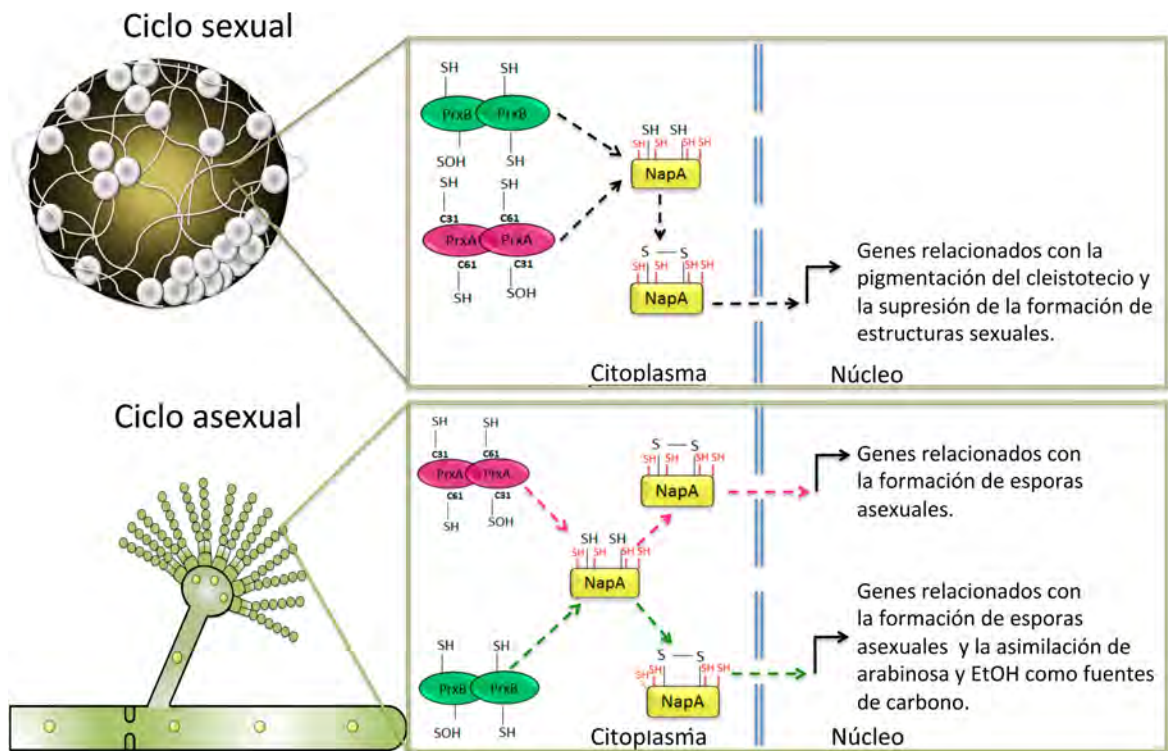


Figura 24. Durante el desarrollo, las ERO se generan de manera controlada, funcionando como moléculas señalizadoras para iniciar diversos procesos de la diferenciación celular. En el ciclo sexual, NapA es activada, a través de PrxA y PrxB, y en el núcleo induce la expresión de genes relacionados con la pigmentación del cleistotecio y la supresión de la formación de estos cuerpos fructíferos. Mientras que durante el ciclo asexual, la vía de PrxA-NapA (líneas rosas) está involucrada en la formación de esporas asexuales y la vía de PrxB-NapA (líneas verdes) induce la expresión de genes relacionados con la asimilación de fuentes alternativas de carbono como la arabinosa y el etanol (EtOH).

Conclusiones

1. Los factores transcripcionales NapA y SrrA participan en la respuesta antioxidante y actúan de manera diferencial para contender con el estrés oxidante, tanto en esporas como en micelio.
2. NapA está involucrado en procesos de desarrollo celular. Durante el ciclo sexual NapA tiene un papel represor en la formación de cuerpos fructíferos. Mientras que en el ciclo asexual NapA es necesaria para la formación de esporas asexuales.
3. El análisis transcriptómico en la mutante $\Delta napA$ reveló la participación de NapA dentro de la represión por catabolito. En donde la expresión de las enzimas ADH, ALDH y Xilitol deshidrogenasa disminuyen en ausencia de NapA, y como consecuencia, el etanol y la arabinosa no pueden ser metabolizados en un fondo genético carente de este factor transcripcional.
4. PrxA y PrxB son peroxirredoxinas de dos cisteínas, homólogas de Ahp1 de *S. cerevisiae*.
5. La vía PrxA-NapA y PrxB son parte central de la respuesta antioxidante y actúan de manera diferencial para contender con el estrés oxidativo.
6. La carencia de PrxB, PrxA y NapA resulta en una mayor producción de cuerpos fructíferos, posiblemente debido a un incremento intracelular de las ERO, lo cual apoya la idea de que las ERO regulan la diferenciación celular.
7. PrxA es una proteína abundante durante el ciclo asexual que muestra una localización citosólica y su actividad *in vivo* depende de la cisteína 61.
8. La vía PrxA-NapA y PrxB son necesarias para la esporulación asexual normal.
9. Debido a baja expresión de NapA, no fue posible realizar su interactoma, tanto en condiciones de crecimiento como en presencia de H_2O_2 . Sin embargo, los datos de interactoma de SrrA no muestran unión a NapA en ninguna de las condiciones probadas.
10. SrrA presenta predominantemente una localización nuclear en ausencia y presencia de estrés oxidante. En el núcleo, SrrA interactúa con RnsA y ambas son necesarias para la resistencia a hidroxiduro.

Perspectivas

1. Dado que nuestros experimentos de enfoque genético sugieren que PrxA se encuentra en la misma vía que NapA se debe confirmar que NapA no se acumula en el núcleo en mutantes $\Delta prxA$ y PrxAC61S::GFP, con mayor resolución y detectando los núcleos de manera independiente. También es necesario hacer estos experimentos en condiciones de privación de nutrientes y estrés osmótico, condiciones que también inducen la localización nuclear de NapA. Así mismo es importante determinar el papel de las Cys 31 (C_R) en la actividad de PrxA y en la localización nuclear de NapA.
2. Encontramos que PrxA y PrxB de manera alternada podrían estar activando a NapA como resultado de una expresión diferencial. Para comprobar esta hipótesis es necesario intercambiar el ORF de *prxA* bajo el promotor de *prxB* y viceversa.
3. La mínima contribución de PrxB en la respuesta antioxidante, puede deberse a su participación en otra vía de señalización, paralela a NapA, como es el caso del factor transcripcional SrrA. Dado que los datos de interactoma de SrrA muestran una asociación física entre este FT y PrxB, se debe analizar la posible participación de PrxB en esta vía de respuesta antioxidante. Así como evaluar el estado de fosforilación de la MPKKK, Saka en los fondos $\Delta prxA$ y $\Delta prxB$.
4. Corroborar los datos de interacción entre SrrA y RnsA mediante la técnica de Pull-down. Evaluar si la interacción de SrrA con RnsA es dependiente del sistema del sistema de relevo de fosfatos. Para ello, se deben analizar mutantes puntuales en el aspartato conservado de SrrA.

Materiales y métodos

Cepas, medios y condiciones de crecimiento de *A. nidulans*

Se cultivó a *Aspergillus nidulans* en medio mínimo (Y. Zhang, Lamm, Pillonel, Lam, & Xu) (Hill, 2001), con 1% de glucosa más los suplementos necesarios para cada cepa. Los medios sólidos se prepararon con 1.25% de agar y se incubaron a 37° C, mientras que los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura y 300 rpm de agitación. Los medios de cultivo y el material utilizado se esterilizaron por autoclave a 121° C por 15 min. Las cepas se inocularon con un número conocido de conidiosporas. Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

Las pruebas de sensibilidad a los diferentes tipos de estrés, se realizaron inoculando 1×10^3 esporas /20 μ L o un fragmento de micelio cortado del borde de una colonia de 5 días de crecimiento. Las sales para las pruebas de estrés osmótico y las diferentes fuentes de glucosa se añadieron antes de esterilizar los medios. Para las pruebas de estrés oxidativo, la menadiona, el paraquat y el metilglioxal se esterilizaron por filtración, al igual que el *t*-BOOH y el H₂O₂ que se añadieron al medio antes de que solidificara ($\approx 50^\circ$ C). Las cajas con H₂O₂ se prepararon y sembraron el mismo día o 24 h después como máximo. Debido a que el H₂O₂ puede reaccionar con componentes presentes en el medio, la concentración en las cajas no se puede estimar con exactitud. Para asegurar la reproducibilidad del experimento el mismo medio con H₂O₂ se uso para comparar las diferentes cepas.

Eliminación de los genes mediante la técnica de “double joint PCR” y transformación de *A. nidulans*

Las construcciones generadas para la eliminación de los genes se realizaron utilizando la técnica de “double joint PCR” (Yu et al., 2004). En reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) separadas, usando ADN genómico como templado, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1.5 Kb río arriba y río abajo del ORF a eliminar. Así también, se amplificó la secuencia codificante de los marcadores selectivos *AfpyrG*, *AfriboB* o *AfpyroA* de *Aspergillus fumigatus*, según el caso. Las secuencias amplificadas se purificaron en

columnas QIAquick® PCR Purification Kit y posteriormente se fusionaron en una cuarta PCR. Las construcciones generadas se purificaron por columnas QIAquick® PCR Purification antes de utilizarlas para transformar las cepa 11035 de *A. nidulans*. Se espera que las construcciones con el marcador de selección reemplacen al gen de interés mediante un evento de doble recombinación homóloga. La transformación se realizó mediante las técnicas de fusión de protoplastos o electroporación de conidias electrocompetentes (O. Sanchez & Aguirre, 1996; O. Sanchez, Navarro, & Aguirre, 1998). Las transformantes obtenidas se analizaron por PCR diagnóstica.

En la tabla 2, se enlistan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. La eliminación de los genes *gpxA*, *tpxA* y *tpxB* se describió previamente (Mendoza-Martínez et al. 2017).

Eliminación de los genes *prxA*, *prxB*, AN3687 y AN4301

Utilizando DNA genómico como templado se amplificaron en reacciones de PCR separadas, el fragmento 5' *prxA* con los oligos 5' *prxA* For y 5' *prxA* Rev (tabla 2). Para generar el fragmento 3' *prxA* se utilizaron los oligos 3' *prxA* For y 3' *prxA* Rev. Además del gene *AfpYrG* de *A. fumigatus* como marcador selectivo. Los productos se fusionaron en una cuarta PCR utilizando los oligos *PrxA* Nd For y *PrxA* Nd Rev para obtener un producto final *prxA*3'-*AfpYrG*-*prxA*5' de 5 kb que se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035, la cual, presenta un alelo mutante del gen *nkuA*, que trae como consecuencia la anulación de la recombinación no-homóloga, aumentando la eficiencia en la selección de eventos de recombinación homóloga en la integración del ADN (Nayak et al., 2006). Se obtuvieron 8 transformantes, en las cuales el reemplazó del gen *prxA* por el marcador *AfpYrG* se confirmó mediante PCR. De las 8 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 1, a la cual se denominó TAM32 y se utilizó en experimentos posteriores (Fig. S1 y tabla 1).

Para la eliminación del gen *prxB* se utilizó como marcador el gen de *AfRiboB*, el fragmento 5' de *prxB* se amplificó con los oligos 5' AN8080 For y 5' AN8080 Rev (tabla 2). Para generar el fragmento 3' *prxB* se utilizaron los oligos 3' AN8080 For y 3'

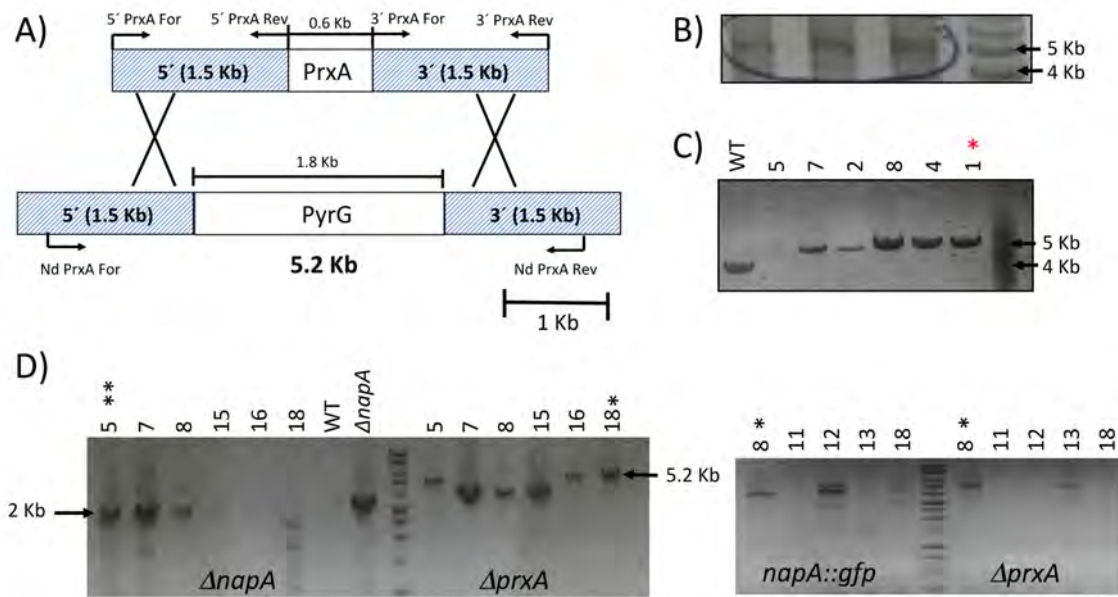


Figura S1. PCR diagnóstica para la eliminación del gen *prxA*. A) Como marcador de eliminación del gen *prxA* se utilizó el gen *AfpYrG* de *A. fumigatus*. B) El producto de fusión 5' *prxA*-*AfpYrG*-3' *prxA*, con un peso aproximado de 5 Kb, se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. C) Se obtuvieron 8 transformantes, en las cuales el reemplazo del gen *prxA* por el marcador *AfpYrG* se confirmó mediante PCR, utilizando los oligos Nd *prxA* for y 3' *PrxA* rev. De las 8 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 1 (asterisco), a la cual se denominó TAM32 y se utilizó en experimentos posteriores. D) Para la generación de las mutantes dobles $\Delta prxA \Delta napA$, $\Delta prxA napA::gfp$ se realizaron cruces sexuales entre mutantes sencillas de cada fondo. Posteriormente se seleccionaron aquellas con fondo isogénico con auxotrofia a PABA. Por último cada fondo fue comprobado mediante PCR, utilizando los oligos 5For *napA* y *pyrG* rev para identificar el fondo $\Delta napA$, los oligos Nd *prxA* for y 3' *PrxA* rev para el fondo $\Delta prxA$, por último se utilizaron los oligos *NapA* GSP1 *pyrG* rev para identificar el fondo *napA::gfp*. Los dos asteriscos del panel izquierdo indican la doble mutante $\Delta prxA \Delta napA$ la cual se nombró CAM31. En el panel de la derecha, los asteriscos indican la doble mutante $\Delta prxA napA::gfp$, a la cual se le denominó CAM33.

AN8080 Rev. Los productos se fusionaron utilizando los AN8080 Nd For y AN8080 Nd Rev para obtener un producto final *prxB*-*AfRiboB*-*prxB* de 5.3 kb que se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. Se obtuvieron 4 cepas transformantes, las cuales se confirmaron por PCR y se eligió a la número 1 (TAM30), para experimentos posteriores (Fig. S2).

Para la eliminación del gen AN3687 el fragmento 5' se amplificó con los oligos 5' AN3687 For y 5' AN3687 Rev (tabla 2). Para generar el fragmento 3' AN3687 se utilizaron los oligos 3' AN3687 For y 3' AN3687 Rev. Además del gen *AfpYrG* de *A. fumigatus* como marcador selectivo. Los productos se fusionaron en una cuarta PCR utilizando los oligos AN3687 Nd For y AN3687 Nd Rev para obtener un producto final AN3687-*AfpYrG*-AN3687 de 5 kb que se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. Se obtuvieron 5 transformantes en las cuales el reemplazo del gen AN3687 por el marcador *AfpYrG* se

confirmó mediante PCR. De las 5 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 3, se denominó TAM36 para utilizarla en experimentos posteriores.

En el caso del gen AN4301, se utilizó como marcador de eliminación al gen *AfRiboB* de *A. fumigatus*. El fragmento 5' AN4301 se amplificó con los oligos 5' AN4301 For y 5' AN4301 Rev (tabla 2). Para generar el fragmento 3' AN4301 se utilizaron los oligos 3' AN4301 For y 3' AN4301 Rev. Los productos se fusionaron utilizando los AN4301 Nd For y AN4301 Nd Rev para obtener un producto final AN4301-AfRiboB-AN4301 de 5 kb que se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. Se obtuvieron 2 cepas transformantes, las cuales se confirmaron por PCR y se eligió a la número 1 (TAM37), para experimentos posteriores (Fig. S3).

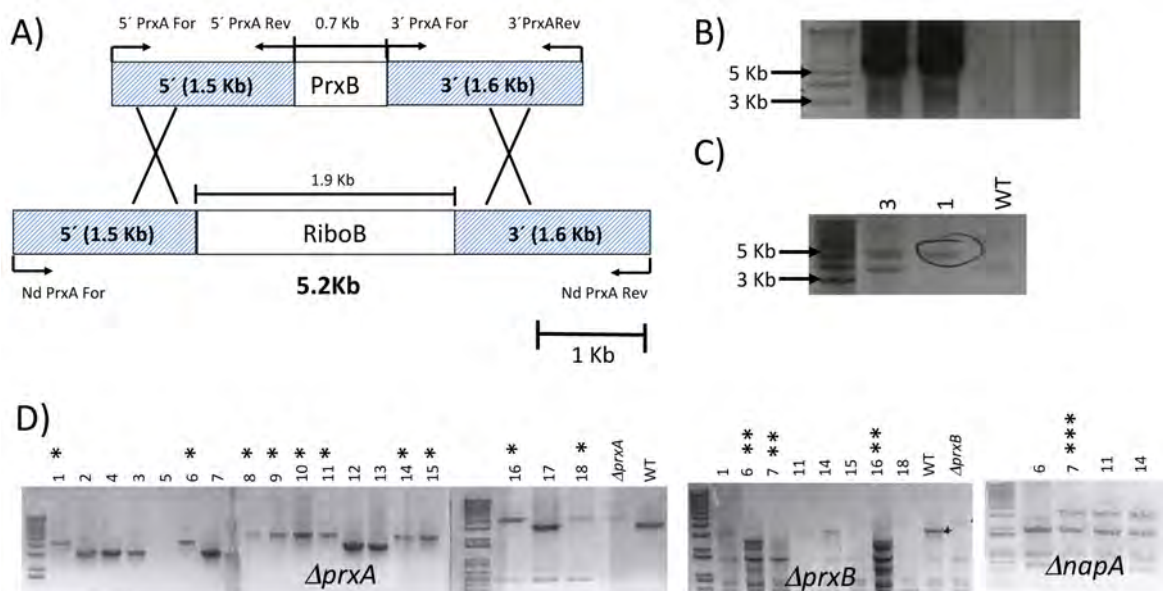


Figura S2. PCR diagnóstica para la delección del gen *prxB*. A) Como marcador de eliminación del gen *prxA* se utilizó el gen *AfRiboB* de *A. fumigatus*. B) El producto de fusión 5'-*prxB*-*AfRiboB*-3'-*prxB*, con un peso aproximado de 5 Kb, se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. C) Se obtuvieron 4 transformantes, en las cuales el reemplazó del gen *prxB* por el marcador *AfpyrG* se confirmó mediante PCR, utilizando los oligos Nd *prxB* for y 3'PrxB rev. De las 4 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 1 (asterisco), a la cual se denominó TAM30 y se utilizó en experimentos posteriores. D) Para la generar las mutantes dobles $\Delta prxA \Delta prxB$, y la triple mutante $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ se realizaron cruza sexuales entre mutantes sencillas de cada fondo. Posteriormente se seleccionaron aquellas con fondo isogénico con auxotrofia a PABA. Por último cada fondo fue comprobado mediante PCR, utilizando los oligos 5For *napA* y *pyrG* rev para identificar el fondo $\Delta napA$, los oligos Nd *prxA* for y 3'PrxA rev para el fondo $\Delta prxA$, por último se utilizaron los oligos Nd *prxB* for y 3'PrxB rev para identificar el fondo $\Delta prxB$. El número de asteriscos indica los fondos sencillos, dobles y triples.

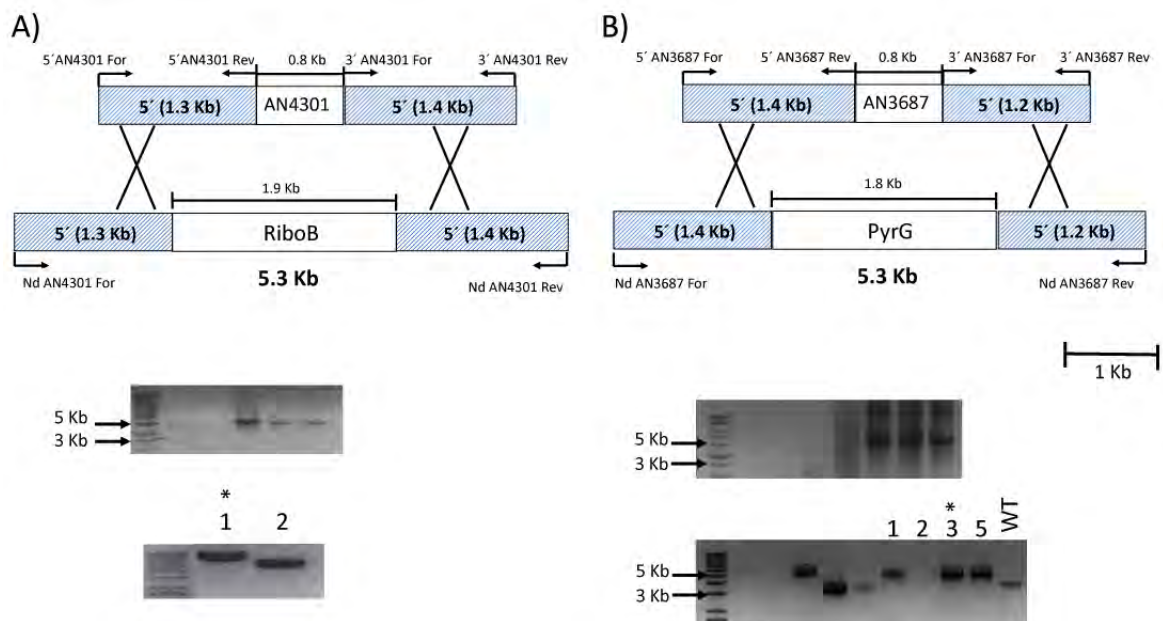


Figura S3. PCR diagnósticas para la delección de los genes AN4301 y AN3687. A) Como marcador de eliminación del gen *AN4301* se utilizó el gen *AfriboB* de *A. fumigatus*. El producto de fusión 5'AN4301-*AfriboB*-3'-AN4301, con un peso aproximado de 5 Kb, se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. Se obtuvieron 2 transformantes, en las cuales el reemplazó del gen *AN4301* por el marcador *AfriboB* se confirmó mediante PCR. De las 2 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 1 (asterisco), a la cual se denominó TAM37 y se utilizó para experimentos posteriores. B) Como marcador de eliminación del gen *AN3687* se utilizó el gen *AfpYrG* de *A. fumigatus*. El producto de fusión 5'AN3687-*AfpYrG*-3'-AN3687, con un peso aproximado de 5 Kb, se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. Se obtuvieron 5 transformantes, en las cuales el reemplazó del gen *AN3687* por el marcador *AfpYrG* se confirmó mediante PCR. De las 5 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 3 (asterisco), a la cual se denominó TAM36 y se utilizó para experimentos posteriores.

Generación de las fusiones *PrxA::GFP* y *PrxAC61S::GFP*

Para fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) la región C-terminal de la proteína PrxA, se generaron por separado tres productos de PCR de acuerdo a lo reportado anteriormente (Yang et al., 2004). Primero se amplificó un fragmento de la región 5' río arriba del codón de término de la traducción (Oligos: GSP1 PrxAGFP y GSP2 PrxAGFP). Segundo, se amplificó un fragmento de la región 3' de aproximadamente 2 Kb inmediatamente río abajo del codón de término (Oligos: GSP3 PrxAGFP y GSP4 PrxAGFP). Tercero, la secuencia codificante de la GFP y el marcador selectivo *AfpYrG* (Oligos: GFP1 y GFP2) se amplificaron usando como templado el plásmido PFNO3 (Nayak et al., 2006). Los fragmentos se purificaron y se fusionaron por PCR utilizando los oligos PrxAGFP For Nd y PrxAGFP Rev Nd, lo que permitió generar la construcción que se utilizó para transformar por electroporación (O.

Sanchez et al., 1998) la cepa TRJ7. La doble recombinación resulta en el reemplazo del gen silvestre *prxA* por la construcción *prxA::gfp*. Se obtuvieron 3 transformantes, las cuales se analizaron por PCR diagnóstico, se eligió a la transformante No. 1 a la cual se denominó TAM34 y se utilizó en experimentos posteriores.

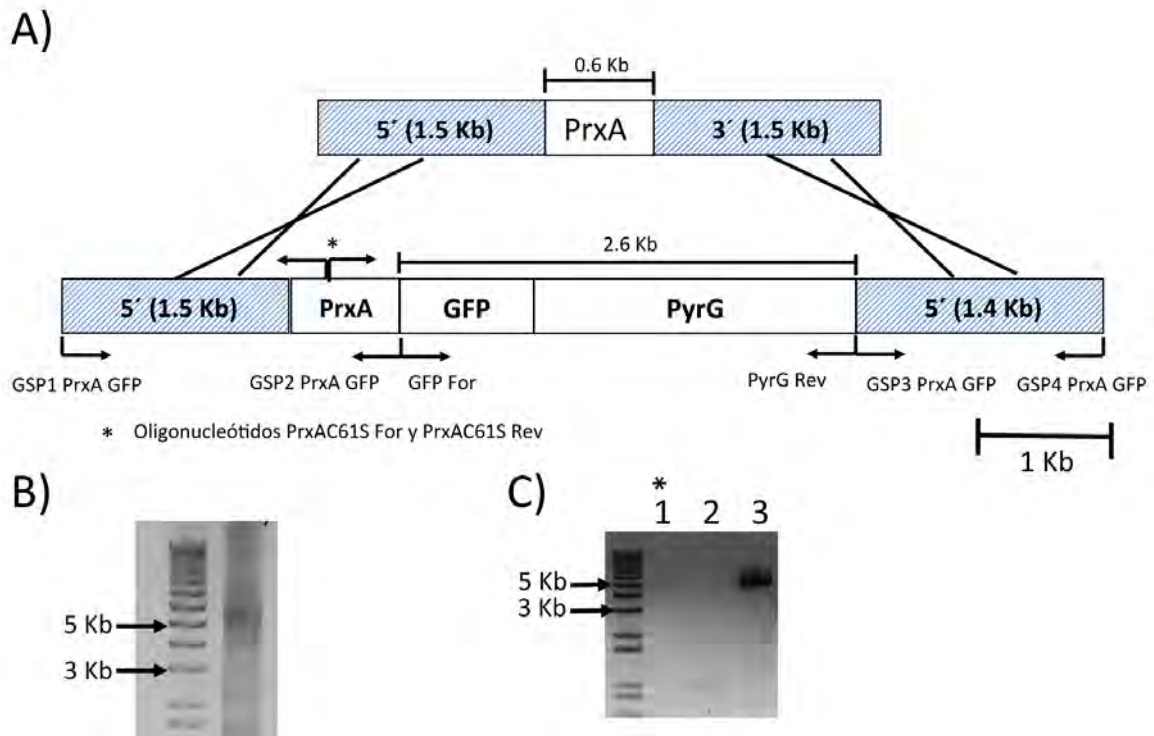


Figura S4. PCR diagnósticas para la delección de los genes AN4301 y AN3687. A) Para fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) la región C-terminal de la proteína PrxA, se generaron por separado tres productos de PCR. B) El producto de fusión final *prxA-GFP-PyrG-3'UTR* (5.2Kb), se utilizó para transformar por electroporación la cepa TRJ7. Se obtuvieron 3 transformantes, el marcaje con GFP se confirmó mediante PCR. De las 3 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No. 1 (asterisco), a la cual se denominó TAM34 y se utilizó para experimentos posteriores.

Para el caso de la construcción *PrxAC61S::GFP*, utilizando DNA genómico de una cepa WT como templado se amplificó un fragmento de la región desde 5' río arriba del codón de término de la traducción hasta el intercambio de la secuencia de C61 (Oligos: GSP1 *PrxAGFP* y *PrxAC61S Rev*). Posteriormente utilizando como templado ADN genómico de una cepa *PrxA::GFP*, se re amplificó la secuencia de cambio C61S con el oligo *PrxAC61S For* hasta 2 Kb abajo dela región 3' del gen. Los productos se fusionaron utilizando los oligos *PrxAGFP For Nd* y *PrxAGFP Rev Nd* para obtener un producto final *PrxAC61S-GFP-3'prxA* de 5.5 kb, que se utilizó para transformar por electroporación la cepa CAM39. Se

obtuvieron 5 cepas transformantes, las cuales se confirmaron por PCR y se mandaron a secuenciar. Se eligió a la cepa número 1 (TAM34), para experimentos posteriores (Fig. S4).

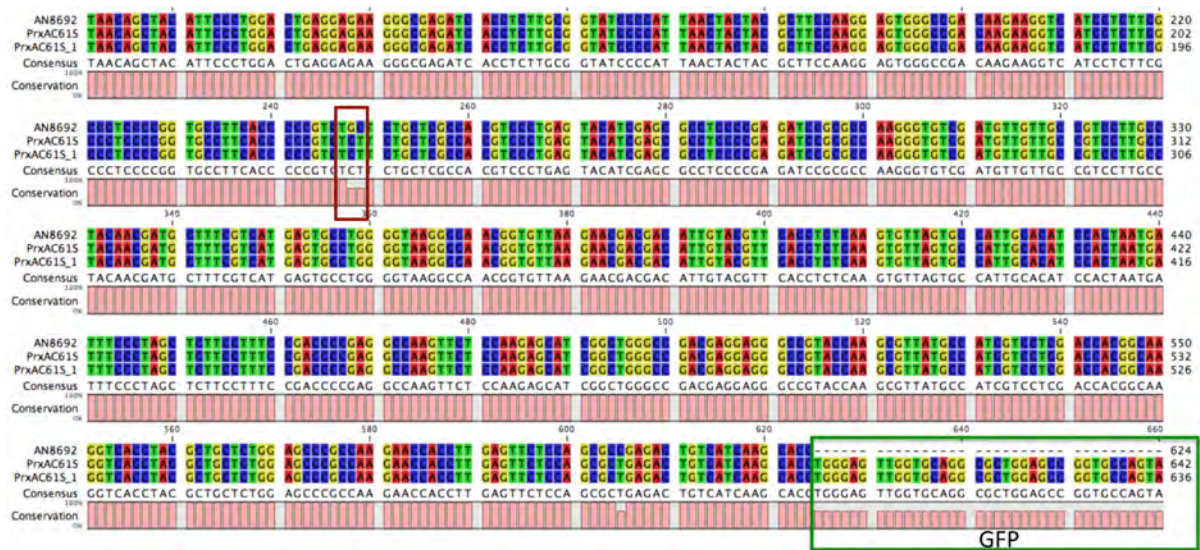


Figura S5. Secuenciación de las cepas transformantes PrxAC61S 1 y PrxAC61S 2. Se extrajo DNA de las cepas transformantes No. 1 y 2, de las cuales se amplificó un producto de 5.2 Kb, utilizando los oligos Nd prxA for y Nd prxA rev. El producto se mando a secuenciar utilizando el oligo PrxABFP For. El recuadro rojo indica el cambio TGC (cisteína) por TCT (serina); mientras que el recuadro verde indica la secuencia de GFP en el C-terminal. Se eligió la No.1 para trabajos posteriores.

Extracción de DNA

Se utilizaron las conidias de las diferentes cepas seleccionadas para inocular aproximadamente 30 mL de MM líquido en caja Petri y se incubaron durante 12 horas sin agitación a 37°C. La película de micelio se colectó y se secó en papel absorbente, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido. El micelio congelado se secó al vacío durante 4 horas y se pulverizó con ayuda de una espátula. El DNA se obtuvo de acuerdo al protocolo (Timberlake, 1980).

Microscopía

Para realizar la detección *in vivo* de la fluorescencia en condiciones de estrés, en las cepas NapA::GFP, se utilizaron 2 estrategias, cuyos resultados fueron reproducibles: en la primera, se germinaron esporas de las cepas sobre cubreobjetos en medio de cultivo líquido, con los suplementos necesarios de 12 a 15 h a 37° C. Después, los cubreobjetos se transfirieron a

MM con H₂O₂ durante 30 min. La segunda estrategia, consistió de inocular por punto en cajas Petri esporas e incubarlas a 37° C por 12 h. Posteriormente, se les agregó MM líquido conteniendo o no H₂O₂ durante 30 min y se incubaron a temperatura ambiente. Después, se retiró el MM líquido y se cortó un fragmento de agar al tamaño del cubreobjetos y se montó en un portaobjetos. A los cubreobjetos se les retiró el exceso de medio, se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio NIKON Eclipse E600, para detectar la fluorescencia.

Cuantificación del número de esporas/cm²

Las conidias (1x10³) de las distintas cepas se inocularon en medio mínimo y se incubaron a 37°C durante cinco días y al término de este tiempo se determinó el diámetro y área de cada colonia. Posteriormente cada caja se raspó con un cotonete estéril y con una solución estéril de Tween al 0.1%. El total de las esporas recolectadas de cada colonia se re suspendieron en 10 mL de solución de Tween en tubos Falcón de 10 mL. Se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. Los pellets de las esporas se re suspendieron en 2 mL de agua estéril y se cuantificó el número de esporas/mL. Con el dato del área se realizó el cálculo del número de esporas/cm².

Generación de dobles y triples mutantes mediante cruza sexuales

Para la generar las mutantes dobles $\Delta prxA \Delta napA$, $\Delta prxA \Delta prxB$ y la triple mutante $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$ se realizaron cruza sexuales entre cada una de las mutantes sencillas generadas previamente en el laboratorio (CFL7, TAM30 y TAM32). Para ello ambos padres se inocularon aproximadamente 0.5 cm uno frente a otro en medio mínimo con todos los suplementos necesarios para cada cepa y se incubaron por 2 días a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se cortaron los pedazos en donde existe unión entre las hifas de ambos padres y se colocaron en MM para después ser incubadas por 2 días a 37°C. Posteriormente se cerraron perfectamente las cajas con cinta y se incubaron otros 5 días a 37°C. Después de la incubación, los cuerpos fructíferos o cleistotecios se aislaron y se limpiaron. Posteriormente se transfirieron a un tubo con 1mL de agua, estéril, en donde se fragmentaron para dejar salir las ascosporas (esporas sexuales) y generar así una suspensión de ascosporas. Esta suspensión se sembró en medio mínimo-paba con el fin de obtener cepas en un fondo

genético similar al de la cepa silvestre CLK43 (auxótrofas a ácido p-aminobenzóico y con esporas color amarillo). Las placas se incubaron a 37°C por tres días para después seleccionar los cleistotecios híbridos.

La doble mutante $\Delta prxA \Delta napA$ se generaron mediante la cruce TAM31 ($\Delta prxA$) x CFL07 ($\Delta napA$), en donde, la mutación $\Delta napA$ se confirmó por PCR, amplificando el marcador de eliminación *AfpyrG* de *A. fumigatus*. Mientras que, para la identificación del fondo $\Delta prxA$, se utilizaron los oligos Nested, los cuales amplifican una banda de 1 Kb mayor en presencia del gen de eliminación *AfpyrG*. También se identificó el fondo *nkuA+* utilizando los oligos 3Dig-nkuA y 5Dig-nkuA. La cepa No.17 fue seleccionada y nombrada CAM31 para utilizarla en experimentos posteriores.

Para el caso de la doble $\Delta prxA \Delta prxB$ y la triple $\Delta prxA \Delta prxB \Delta napA$, se realizó la cruce TAM30 ($\Delta prxB$) x CAM31 en donde el fondo $\Delta prxB$ fue confirmado mediante los oligos AN8080 Nd For y AN8080 Nd Rev, los cuales amplifican una banda de 1 Kb mayor en presencia del gen de deleción *AfRiboB*, mientras que los fondos $\Delta prxA$ y $\Delta napA$, fueron identificados como se explica anteriormente. De igual forma, se identificó el fondo *nkuA+* utilizando los oligos 3Dig-nkuA y 5Dig-nkuA.

Extracción de proteínas

El extracto crudo de proteínas se obtuvo de la extracción de micelio en crecimiento con el buffer B300 (300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 % glicerol, 1 mM EDTA, 0.1 % NP-40), suplementado con 1.5 ml/L de 1 M DTT, “Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free” (Roche), 3 ml/L 0.5 M Benzamidina, 10 ml/L de inhibidores de fosfatasa (100 mM NaF, 50 mM NaVanadate, 800 mM β -glycerolephosphate) y 10 ml/L 100 mM PMSF.

GFP-trap

La inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con GFP se realizó con “GFP-trap-A” (CHOMOTEK). Las proteínas se extrajeron de 5mL de micelio pulverizado, al cual se le adicionó 5 mL de Buffer B300. El extracto crudo fue incubado con 40 μ L de GFP-trap-A. Después de dos horas de incubación a 4°C las perlas de GFP-trap-A se separaron del extracto

total mediante centrifugación. Por último las perlas de GFP-trap-A se separaron de las proteínas mediante calor y los extractos proteicos se cargaron en un SDS-PAGE, el cual posteriormente fue teñido con coomasie.

LC-MS/MS

Las piezas de gel de poliacrilamida teñidos con coomassie fueron digeridas con tripsina, usando “Sequencing Grade Modified Trypsin” (Promega). Los péptidos digeridos se extrajeron y se separaron a través de cromatografía líquida en fase reversa con el sistema “*RSLCnano Ultimate 3000*” (Thermo Scientific) seguido de la identificación de la masa utilizando el espectrómetro de masas “*Orbitrap Velos Pro*” (Thermo Scientific). Los péptidos cromatográficamente separados se ionizaron mediante electrospray utilizando el espectrómetro de masas *Orbitrap Velos Pro* (Thermo Scientific) y continuamente transferidos al espectrómetro de masas. La identificación de cada uno de los datos de MS/MS2 se realizó con el software MaxQuant y Perseus.

Tabla 1. Proteínas que se unen a SrrA en condiciones normales de crecimiento

ID (Gen codificante)	Función	No. de péptidos
Oxidoreductasas		
alcA ANIA_08979	Alcohol deshidrogenasa 1 (EC 1.1.1.1) (ADH I)	15
ANIA_03829	Posible proteína no caracterizada, Succinato semialdehído deshidrogenasa	9
lysA ANIA_02873	Sacaropina deshidrogenasa (formación de L-lisina)	9
ANIA_10901	Posible glicina deshidrogenasa	8
ANID_20019	OxiB, subunidad II de la citocromo C oxidasa	6
ANIA_05629	NADH-ubiquinona oxidoreductasa	5
cprA ANIA_00595	NADPH citocromo P450 reductasa	5
ANIA_00179	Proteína no caracterizada, posible oxidoreductasa, deshidrogenasa de cadena corta	5
ANIA_11008	Escualeno epoxidasa, proteína no caracterizada	4
ANIA_05610	Alfa-aminoadipato reductasa	4
sodA AN0241	Superoxido dismutasa	4
ANIA_05577	Superóxido dismutasa	3
AN1805	Anhidrasa carbónica	3
Traducción		
ANIA_06368	Arginil-ARN sintetasa	7
ANIA_05741	Proteína estructural del Ribosoma	4
ANIA_08867	Seril-tARN sintetasa	4
ANIA_06146	Proteína estructural del Ribosoma	3
ANIA_11419	Posible proteína estructural del 60S ribosomal	3
ANIA_09157	Glutamil-tARN sintetasa	3
Transporte y componentes del citoesqueleto		
ANIA_02120	Posible subunidad beta-4 de la importina karipferina (JCVI)	8
sfh5 ANIA_08233	Proteína de transporte de fosfatidilinositol	5
ANIA_02977	Posible proteína mitocondrial acarreadora de fosfatos	4
ANIA_03813	Posible transportador transmembranal de iones de cobre	3
ANIA_06080	Mediador de vesículas de transporte, coatómero	3
ANIA_04171	Proteína con dominio PH, ensamblaje de actina	3
ANIA_01281	Subunidad translocasa de TIM44	3
Hidrolasas		
ANIA_04956	Acetolactato sintasa	8
ANIA_06066	Posible hidrolasa de la familia Isocorismatasa	5
Chaperonas		
ANIA_03134	Proteína 1 del Copmplejo T; chaperonina	4
ANIA_00858	Proteína de choque térmico	4

Unión a ácidos nucleicos

ANIA_08274	Posible proteína involucrada en la replicación del ADN mitocondrial	7
ANIA_10257	Posible proteína de unión a ARN con dominio KH	7
ANIA_10276	Proteína con dominio RNP, unión a RNA	6
ANIA_10103	Proteínas del grupo de alta movilidad, con unión a ADN y RNA	5
dbp5 AN7659	Helicasa de ARN dependiente de ATP	4
Señalización		
ANIA_08770	Acetilglutamato cinasa, proteína no caracterizada	11
ANIA_10710	Fosfomanomutasa con un papel en el mantenimiento de la polaridad celular (glicosilación de proteínas)	8
ANIA_05872	Subunidad tipo alfa del proteosoma	6
ANIA_00943	Subunidad g F1Fo- ATP sintetasa mitocondrial	5
ANIA_05666;mpkC	Proteína cinasa MPKA	4
cmkA AN2412	Proteína cinasa dependiente de Calcio/calmodulina	4
rasA AN0182	Posible proteína Ras	4
sakA AN1017	MAP cinasa	4
ANIA_08702	Enzima conjugadora de ubiquitina	3
pphA AN6391	Subunidad catalítica PP2A de proteína fosfatasa de serina/treonina	3
Biosíntesis		
gua1 ANIA_05566	GMP sintetasa, hidrólisis de la glutamina	6
ANIA_00797	Posible proteína trifuncional implicada en la biosíntesis de histidina	6
ANIA_08706	Posible N-acetiltransferasa con un posible papel en la biosíntesis de quitina	5
ANIA_07430;hisHF	Posible glutamino aminotransferasa	5
ANIA_01194	Adenilil fosfosulfato cinasa, involucrada en la asimilación de sulfato	4
ANIA_06645	Posible 8-amino-7-oxonanoato sintasa con posible papel en la biosíntesis de CoA y pantotenato	3
ANIA_05130	Posible coproporfirinogeno III oxidasa involucrado en la síntesis del grupo hemo	3
cysB AN8057	Cisteína sintetasa	3
fprA AN3598	Posible petidil-prolil-cis-transisomerasa	3
No clasificadas		
ANIA_01378	Proteína no clasificada	11
ANIA_00906	Proteína no clasificada	7
ANIA_08346	Proteína no clasificada	6
AN0415.2	Proteína no clasificada	4
ANIA_04430	Proteína no clasificada	4
ANIA_05969	Proteína no clasificada	3
ANIA_01608	Proteína no clasificada	3

Tabla 2. Proteínas que se unen a SrrA en presencia de H₂O₂

ID (Gen codificante)	Función	No. de péptidos
Oxidoreductasas		
ANIA_8979	Alcohol deshidrogenasa	46
ANIA_07600	Posible sulfito reductasa hemoproteína-subunidad beta, oxidoreductasa ferredoxina	45
ANIA_05886	3-Isopropilmalato deshidratasa	24
ANIA_02343	Posible proteína de la familia nitroreductasa	24
ANIA_10220	Citocromo c peroxidasa mitocondrial	23
ANIA_04380	Ribonucleosida-difosfato reductasa	22
ANIA_00443	Posible alcohol deshidrogenasa que contiene zinc, proteína no caracterizada	17
ANIA_03830	Hipotética treonina deshidratasa, proteína no caracterizada	16
ANIA_06346	Hipotética dihidroxi-ácido deshidratasa	11
ANIA_08547	Glucosa-metanol-colina oxidoreductasa. Proteína no caracterizada	10
ANIA_06753	Posible oxidorreductasa de flavina dependiente de NADH	9
ANIA_02208	Oxidoreductasa conservada	9
ANIA_05670	Subunidad NADH-ubiquinona oxidorreductasa 213 kDa. Los ortólogos tienen un papel en el ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	8
ANIA_02846	Glutación peroxidasa	7
ANIA_00297	Posible NADH-quinona oxidorreductasa Pst2	7
ANIA_08080	PrxB, peroxirredoxina	6
ANIA_11094	Hipotética oxidoreductasa. Proteína no caracterizada	6
ANIA_05716	Proteína de dominio CBS y PB1. Supuesta inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa con un papel previsto en el metabolismo de las purinas	6
ANIA_0432	NADH-citocromo b5 reductasa 2	5
ANIA_06699	Posible subunidad alfa de flavoproteína de transferencia de electrones	4
ANIA_00932	Hipotética glutación reductasa. Proteína no caracterizada	4
ANIA_07575	C-3 esteroil deshidrogenasa / C-4 descarboxilasa	4
ANIA_02694	Oxidorreductasa, familia de la cadena corta deshidrogenasa / reductasa	4
ANIA_6246	Citocromo c	3
ANIA_3593	Metiltioribulosa-1-fosfato deshidratasa	3
Traducción		
ANIA_03823	Proteína S21 ribosomal 40S	15
ANIA_01228	Proteína ribosomal 60S	13
ANIA_00570	Proteína ribosomal L26	13
ANIA_05997	Proteína ribosomal 40S	11
ANIA_10130	Posible proteína ribosomal 40S. Proteína no caracterizada	11
ANIA_07354	Proteína ribosomal 60S	11
ANIA_05713	Posible proteína del complejo T, subunidad eta	11
ANIA_07350	Factor de iniciación de traducción. Proteína no caracterizada	9
ANIA_06632	Proteína ribosomal S28e	7

ANIA_04452	60S proteína ribosomal L36	7
ANIA_03824	Fenilalanil-tRNA sintetasa	7
ANIA_03706	40S proteína ribosomal S10b. Proteína no caracterizada.	6
ANIA_04015	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 5A-2	6
ANIA_06060	Posible subunidad del factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF-4F	5
ANIA_10765	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad G	5
ANIA_04086	Fenilalanil-tARN sintetasa, subunidad beta. Proteína no caracterizada.	5
ANIA_11411	Los ortólogos tienen actividad fenilalanina-tARN ligasa.	5
ANIA_11411	40S proteína ribosomal S29	5
ANIA_03744	Posible proteína mitocondrial ribosomal DAP3	5
ANIA_02080	Posible factor de liberación de la traducción eRF3	5
ANIA_02775	Posible subunidad del factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF2A	4
ANIA_0641	Homólogo de proteína tumoral controlado de forma traduccional	4
ANIA_10922	50S subunidad ribosomal L30. Proteína no caracterizada	3
ANIA_02992	Factor de iniciación de la traducción 2 beta. Proteína no caracterizada	3
ANIA_01802	Pequeña ribonucleoproteína nuclear SmD2	3
ANIA_00470	Posible 30S proteína ribosomal S7. Proteína no caracterizada	3
ANIA_09304	Posible Factor de elongación de la traducción subunidad gamma eEF-1B.	3
ANIA_06842	Subunidad ribosomal grande mitocondrial YmL35	3
ANIA_05996	Proteína ribosomal P2 ácida 60S / alérgeno Asp F 8. Los ortólogos tienen actividad activadora de la proteína cinasa, constituyente estructural de la actividad del ribosoma, papel en la traducción citoplásmica, regulación positiva de la actividad de la proteína cinasa y localización citosólica de la subunidad ribosomal grande	3
ANIA_5745	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad J	3
ANIA_1270	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad H	3
ANIA_4787	60S proteína ribosomal L37	3
Transporte y componentes del citoesqueleto		
ANIA_6257	Proteína de transporte de proteínas sec31	23
ANIA_07594	Proteína de dominio DUF636	19
ANIA_01177	Subunidad beta del coatómero, localización en membrana	12
ANIA_06058	Proteína de dominio DUF833	9
ANIA_02210	Transporte ABC. Transcripción río arriba en respuesta a la camptotecina	8
ANIA_00306	Posible subunidad del complejo ARP 2/3. Los ortólogos tienen un papel en la nucleación de la actina mediada por el complejo Arp2 / 3 y en el complejo de la proteína Arp2 / 3, la localización del parche cortical de actina	8
ANIA_09149	Posible proteína del dominio C2 unido a la membrana involucrada en procesos de transporte. Proteína no caracterizada	6
ANIA_03122	Proteínas recubiertas de clatrina. Proteína no caracterizada	5
ANIA_0327	Helicasa tipo RuvB 2. Tiene dominios con un posible papel en el transporte transmembrana y componente integral de la localización de la membrana	5
ANIA_03147	Proteína hipotética HET-C. Proteína no caracterizada. Los ortólogos (s) tienen un papel en el transporte de glucolípidos, la patogénesis y la	4

	localización intracelular	
ANIA_01401	Exportina 1. Proteína no caracterizada	4
ANIA_00879	Proteína de dominio DUF1014	4
ANIA_11898	Importación del espacio intermembrana mitocondrial y proteína de ensamblaje 40	3
ANIA_08762	Proteína de dominio UPF0041. Los ortólogos tienen actividad transportadora transmembrana de piruvato, papel en el transporte transmembrana de piruvato mitocondrial y membrana mitocondrial, localización en membrana plasmática	3
ANIA_7441	Proteína 4 relacionada con la actina	3
Hidrolasas		
ANIA_09235	Posible hidrolasa de la familia isocorismatasa. Proteína no caracterizada. Tiene dominio (s) con actividad catalítica y papel en el proceso metabólico	8
ANIA_11005	Probable Xaa-Pro aminopeptidasa. Tiene dominio (s) con posible actividad de hidrolasa y también en el proceso celular	3
Chaperonas		
ANIA_2530	Proteína de choque térmico	14
ANIA_05602	Co-chaperona, proteína no caracterizada	12
ANIA_10351	Aspartil aminopeptidasa, proteína no caracterizada, involucrada en la respuesta celular a drogas, chaperona mediadora de plegamientos proteicos	12
ANIA_02149	Proteína del complejo T, subunidad alfa	11
ANIA_10778	Homólogo 1 Dnaj, localización mitocondrial	9
ANIA_05781	Proteína de choque térmico. Proteína no caracterizada	9
ANIA_07143	Posible ribosoma asociado a la chaperona..	8
ANIA_03555	Proteína de choque térmico 30 kDa	4
ANIA_06921	Posible co-chaperona. Los ortólogos tienen actividad de unión a la chaperona, papel en la regulación negativa de la unión al ADN, regulación positiva del mantenimiento de los telómeros a través de la telomerasa, plegamiento de proteínas, regulación de la actividad de la telomerasa y citoplasma, localización del núcleo	3
Unión a ácidos nucleicos		
ANIA_5931	Helicasa de ARN dependiente de ATP	17
ANIA_00242	Factor transcripcional	16
ANIA_1971	RuvB helicasa	11
ANIA_06341	Coronina. Posible papel en el montaje de parche de actina	10
ANIA_3469	Histona H2B	9
ANIA_04546	Proteína de unión a ARN del dominio KH. Los ortólogos tienen actividad de unión a la región rica en AU 3'-UTR de mRNA y su papel en la estabilización de mRNA mediada por 3'-UTR, regulación negativa de la cascada MAPK	8
ANIA_09080	Posible L-PSP endoribonucleasa. Proteína no caracterizada.	6
ANIA_06705	Componente del complejo remodelador de cromatina RSC	6
ANIA_7659	ATP-dependiente de ARN helicasa dbp5	4
ANIA_01635	Posible proteína de empalme de ARNm (Prp39)	4
ANIA_10053;ANIA_10071	Posible proteína de unión a ARN. Proteína no caracterizada	4

ANIA_01256	Posible RNasa L inhibidor de la superfamilia ABC. Proteína no caracterizada	3
ANIA_10164	Proteína de unión a ARN poliadenilada nuclear y citoplasmática pub1. Proteína no caracterizada	3
ANIA_08055	Posible proteína de unión a ARN.	3
ANIA_06707	Posible helicasa	3
ANIA_04562	Posible factor de transcripción BZIP	3
ANIA_02751	Posible proteína asociada a la topoisomerasa II	3

Señalización

ANIA_10797;ANIA_10805	Posible lipasa, proteína no caracterizada	23
ANIA_06505	Correpresor transcripcional, proteína no caracterizada	12
ANIA_04080	Posible proteína de unión a GTP. Proteína no caracterizada	10
ANIA_2412	Calcio/Proteína cinasa dependiente de calmodulina	10
ANIA_04775	Posible subunidad reguladora de partículas del proteasoma	10
ANIA_5740	Proteína de unión a GTP	10
ANIA_04563	Posible caseína cinasa I. Proteína no caracterizada	9
ANIA_10337	Posible subunidad reguladora de partículas del proteasoma. Proteína no caracterizada	9
ANIA_07687	Posible receptor de la translocasa de la membrana externa mitocondrial	8
ANIA_5566	GMP sintasa. Glutamina aminotransferasa	8
ANIA_02756	Predicción de la proteína de unión a la actina con similitud a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sla2p; Esencial para la germinación conidial.	8
ANIA_04085	Proteína fosfatasa 2a subunidad reguladora de 65 kd. Proteína no caracterizada	7
ANIA_10030	Hipotética serina proteasa. Proteína no caracterizada	7
ANIA_08268	NTF2 y proteína de dominio RRM. Posible proteína de unión RasGAP SH3 que contiene dominios NTF2 y RRM; expresión reducida después de la exposición a farnesol.	7
ANIA_7540	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad D	7
ANIA_02761	Ubiquitina-proteína ligasa. Ubiquitina portadora proteína. Proteína no caracterizada	7
ANIA_01757	Subunidad alfa del proteasoma	7
ANIA_06510	Subunidad del receptor de importación mitocondrial	6
ANIA_00084	Posible proteína activadora de GTPasa específica de rango.	6
ANIA_1017	Proteína cinasa activada por mitógeno hog1	6
ANIA_05529	Papel en la polaridad celular. Componente de la vía de señalización RAM, se cree que el complejo MobB / CotA cinasa regula el crecimiento de la polaridad celular manteniendo la homeostasis del calcio celular	5
ANIA_01700	Posible subunidad reguladora del proteasoma 26S Rpn2	5
ANIA_10540	Posible dipeptidil peptidasa. Proteína no caracterizada	4
ANIA_00347	Ras GTPasa similar a RAB11B. Proteína no caracterizada	4
ANIA_04862	Ran específico de la proteína activadora de GTPasa An-RanGAP	4
ANIA_04591	Posible fosfoglucomutasa. Proteína no caracterizada	3
ANIA_03019	Posible subunidad reguladora de partículas del proteasoma. Proteína no caracterizada	3
ANIA_10198	Proteína de la familia de la oligopeptidasa	3

ANIA_10281	Proteína Serina/Treonina fosfatasa	3
	TINC. Proteína identificada por la interacción de dos híbridos con cinasa NimA; TinC es citoplásmico en toda la interfase y también está presente en los núcleos durante la mitosis	
ANIA_09067		3
ANIA_01485	Caseína cinasa II	3
ANIA_6391	Subunidad catalítica de serina / treonina-proteína fosfatasa PP2A	3
Biosíntesis		
ANIA_0565	Carbamoiltransferasa aspartato	75
ANIA_04550	Posible Aspartyl-tARN sintetasa Dps1	39
ANIA_02918	Proteína del complejo T, subunidad delta	30
ANIA_10475	Posible Triptofanilo-tRNA sintetasa, proteína no caracterizada	19
ANIA_01752	Posible dihidrolipo	19
	Posible dihidrolipoamida S-succiniltransferasa, proteína no caracterizada	
ANIA_03466		18
ANIA_10170	Los ortólogos tienen actividad ATPasa y localización del citoplasma	18
	Posible polipéptido AROM pentafuncional con 3-deshidroquinato sintasa, 3-deshidroquinato deshidratasa, shikimato 5-deshidrogenasa, shikimato cinasa y EPSP sintasa; tiene un papel previsto en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos	
ANIA_0708		18
	Posible Valyl-tRNA sintetasa, proteína no caracterizada actividad de ligasa	
ANIA_10195		16
	Posible proteína fosfatasa involucrada en la biogenesis de la pared celular	
ANIA_01158		16
	Glutamil-tRNA sintetasa, proteína no caracterizada. Tiene actividad de glutamato trna ligasa, papel en la aminoacilación de glutamil trna y localización en citoplasma	
ANIA_08224		15
ANIA_01911	Pirofosforilasa GDP-mannosa, proteína no caracterizada	15
ANIA_06014	Posible activador de ácidos grasos Faa4, Proteína no caracterizada	13
	Fosfoserina aminotransferasa, proteína no caracterizada. La abundancia de esta proteína decrece en presencia de estrés por menadiona	
ANIA_10298		12
ANIA_07436	Proteína disulfuro isomerasa	12
ANIA_00705	Isoleucil-tRNA sintetasa, citoplasmática	10
ANIA_01913	Lisina-tRNA ligasa	9
	Posible proteína accesoria de ureasa. Proteína de unión al níquel involucrada en la utilización de la urea como fuente de nitrógeno	
ANIA_00232		9
ANIA_08709	Aspartato aminotransferasa	8
ANIA_10526	Arginina metiltransferasa	7
ANIA_0648	Indol-3-glicerol fosfato sintasa	7
	Sintetasa de polipropileno. Supuesta enzima bifuncional con un papel en el metabolismo de los esteroides	
ANIA_08012		7
ANIA_07146	Posible Esterol 24-c-metiltransferasa	7
	Corismato sintetasa. Posible papel en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	
ANIA_05731		7
ANIA_01380	Metionil-tARN sintetasa	7
ANIA_0893	Adenilosuccinato sintetasa	7
	Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa, con un papel previsto en la biosíntesis de la familia de aminoácidos aromáticos; proteína expresada en niveles aumentados en un mutante hapX frente a una tipo salvaje; Reacción inhibida por la fenilalanina	
ANIA_00354		6

ANIA_0651	Subunidad alfa de la proteína de unión a nucleótidos de guanina	6
ANIA_11499	Proteína que contiene el dominio de la cadena épsilon de la ATP sintasa mitocondrial	5
ANIA_01606	Anexina unión a Calcio	5
ANIA_10519	Posible subunidad reguladora de partículas del proteasoma (RpnF). Proteína no caracterizada	4
ANIA_02733	Uroporfirinógeno descarboxilasa. Involucrada en el proceso biosintético del hemo	4
ANIA_09401	Posible enoil reductasa mitocondrial. Proteína no caracterizada	4
ANIA_06168	Enzima malica	4
ANIA_05820	Cistationina beta-sintasa	4
ANIA_03626	Fosforibosil-aminoimidazol carboxilasa. Proteína no caracterizada	3
ANIA_00106	Proteína cinasa C, requerido para el nivel de crecimiento de tipo salvaje, la integridad de la pared celular y la biosíntesis de penicilina	3
ANIA_10489	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo FKBP; expresión reducida después de la exposición a farnesol	3
ANIA_2284	5-aminolevulinato sintasa, mitocondrial	3
ANIA_06731	Ácido esteárico desaturasa, convierte el ácido palmítico y el ácido esteárico en ácido palmitoleico y ácido oleico	3
ANIA_06075	Fenilalanina amoniaco-liasa. Papel en el proceso catabólico de L-fenilalanina, proceso biosintético y localización del citoplasma	3
ANIA_02440	Ribosa 5-fosfato isomerasa A	3
ANIA_1769	3'(2'),5'-bifosfato nucleotidasa	3
ANIA_8979	Posible ATP sintasa cadena delta, mitocondrial. Proteína no caracterizada	3
ANIA_07600	Posible tirosil-tARN sintetasa. Papel en la aminoacilación del tirosil-ARNt y localización en citoplasma	3
ANIA_05886	Probable Xaa-Pro aminopeptidasa. Prolidasa específica para la escisión de dipéptidos X-Pro	3

No clasificadas

ANIA_05028	Proteína no clasificada	55
ANIA_05206	Proteína no clasificada	33
ANIA_03226	Proteína no clasificada	31
ANIA_06126	Proteína no clasificada	31
ANIA_01638	Proteína no clasificada	31
ANIA_05563	Proteína no clasificada	29
ANIA_02943	Proteína no clasificada	15
ANIA_05803	Proteína no clasificada	8
ANIA_02012	Proteína no clasificada	8
ANIA_05823	Proteína no clasificada	8
ANIA_00579	Proteína no clasificada	7
ANIA_02917	Proteína no clasificada	7
ANIA_08021	Proteína no clasificada	6
ANIA_07177	Proteína de dominio WW.	6
ANIA_05667	Proteína no clasificada	6
ANIA_05604	Proteína no clasificada	5
ANIA_8674.2	Proteína no clasificada	5
ANIA_05154	Proteína no clasificada	5

ANIA_03330	Proteína no clasificada	5
ANIA_02164	Proteína no clasificada	5
ANIA_01288	Proteína no clasificada	5
ANIA_00753	Proteína no clasificada	5
ANIA_11543	Proteína no clasificada	4
ANIA_00745	Proteína no clasificada	4
ANIA_10069	Proteína no clasificada	4
ANIA_9512.2	Proteína no clasificada	4
ANIA_07892	Proteína no clasificada	4
ANIA_07262	Proteína no clasificada	4
ANIA_04575	Proteína no clasificada	4
ANIA_10079;ANIA_1 0103	Posible proteína de la caja HMG. Proteína no caracterizada	4
ANIA_00646	Proteína no clasificada	3
ANIA_01152	Proteína no clasificada	3
ANIA_08022	Proteína no clasificada	3
ANIA_7484	Proteína no clasificada	3
ANIA_01370	Proteína no clasificada	3

Tabla 3. Proteínas que se unen a SrrA en ausencia o presencia de H₂O₂

ID(Gen codificante)		Sin estrés	Con estrés
ANIA_02068	Proteína efectora de unión a RNA Scp160 (Ortólogo de AFUA_2G04700)	10	33
ANIA_00381	Posible subunidad beta, proteína 1 del complejo T, chaperona (ortólogo de AFUA_1G01740)	10	21
ANIA_03702	Leucil-ARN sintetasa	7	18
ANIA_04414	Difosfomevalonato descarboxilasa	4	17
ANIA_03901	Posible ácido láctico deshidrogenasa	5	15
ANIA_01345	Proteína S23 de la subunidad 40S ribosomal	8	15
ANIA_07632	Formaldehido deshidrogenasa	3	13
ANIA_03026	Subunidad alfa del coatómero	9	13
ANIA_05717	Karioferina, crecimiento normal de la hifa y desarrollo normal de las esporas	6	13
ANIA_02682	Hipotética oxidoreductasa; Proteína no caracterizada	9	12
ANIA_00046	Histidil-tARN sintetasa mitocondrial	4	11
ANIA_08815	Hipotética oxidoreductasa; Proteína no caracterizada	3	9
ANIA_10266	Posible proteína activadora de ubiquitinación	6	9
ANIA_08023	Proteína no clasificada	9	8
ANIA_05782	Proteína de la familia fumarilacetoacetato hidrolasa	6	7
ANIA_08859	Aspartocinasa	5	7
ANIA_07141	Aldehido deshidrogenasa	5	6
ANIA_05799	Glutamato-5-semialdehido deshidrogenasa	5	6
ANIA_10230	MTA fosforilasa, implicada en la unión a ARNm	5	6
ANIA_02213	Posible subunidad regulatoria Rpt2 del proteosoma	7	6
ANIA_08853	Factor eucariotico liberador de péptidos; supresor de mutaciones sin sentido	3	5
ANIA_05784	Posible subunidad beta del núcleo del proteosoma	4	5
ANIA_03206	Proteína no clasificada	5	5
ANIA_05747	Proteína no clasificada	3	5
ANIA_09469	Proteína ribosomal 50S	4	4
ANIA_04492	Subunidad regulatoria del proteosoma	4	4
ANIA_00490	CTP sintetasa, metabolismo de las pirimidinas	8	4
ANIA_05957	Aminotransferasa, involucrada en la ramificación de cadenas de aminoácidos	5	4
ANIA_01965	Fosforibosil difosfato sintetasa isoforma 4, involucrado en el metabolismo de histidina	4	4
ANIA_03639	Proteína no clasificada	3	4
ANIA_11119	Proteína no clasificada	3	4
ANIA_01429	Posible colina oxisasa (CodA)	6	3
ANIA_03695	Antranilato sintasa, biosíntesis en aminoácidos aromáticos	5	3
ANIA_04774	Sirohemo sintetasa, involucrada en la biosíntesis de metionina	5	3
ANIA_08869	Posible uracilo fosforibosiltransferasa, involucrado en el metabolismo de pirimidinas	3	3

Tabla 4. Cepas utilizadas en este trabajo

Strain	Genotype	Source
TAM 16 <i>ΔgpxA</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 srrA::GFP::AfpyrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct SrrA-GFP-AfpyrG
TAM 17 <i>ΔtpxA</i>	<i>pyrG89 ΔtpxA::AfpyrG pyroA4 ΔnkuA::argB riboB2 veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct TpxA-AfpyrG-TpxA
TAM 19 <i>ΔtpxB</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔtpxB::AfRiboB ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct TpxB-RiboB-TpxB
TAM 22 <i>ΔmsnA</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔmsnA::AfRiboB ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct MsnA-RiboB-MsnA
TAM 23 <i>msnA::gfp 1</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar srrA::gfp::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct MsnA-GFP-AfpyrG
TAM 24 <i>msnA::gfp 5</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar srrA::gfp::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct MsnA-GFP-AfpyrG
TAM30 <i>ΔprxB 1</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔprxB::AfRiboB ΔnkuA::argB</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct PrxB-RiboB-PrxB
TAM31 <i>ΔprxB 3</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔprxB::AfRiboB ΔnkuA::argB</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct PrxB-RiboB-PrxB
TAM32 <i>ΔprxA 1</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔprxA::AfpyrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct PrxA-PyrG-PrxA
TAM33 <i>ΔprxA 7</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔprxA::AfpyrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct PrxA-PyrG-PrxA
TAM34 <i>prxA::gfp</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar prxA::gfp::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct PrxA-GFP-AfpyrG
TAM35 <i>prxA::stag</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar prxA::stag::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct PrxA-Stag-AfpyrG
TAM36 <i>ΔAN3687</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔAN3687::AfpyrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct AN3687-PyrG-AN3687
TAM37 <i>ΔAN4301</i>	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔAN4301::AfRiboB ΔnkuA::argB</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct AN4301-RiboB-AN4301
TAM38 <i>sodA::gfp 2</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar sodA::gfp::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct Soda-GFP-AfpyrG
TAM39 <i>sodA::gfp 4</i>	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio ΔnkuA::bar sodA::gfp::AfpyrG veA1</i>	This work, TRJ7 transformed with PCR construct Soda-GFP-AfpyrG
CAM 11 <i>ΔgpxA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB veA1^b</i>	This work, progeny from TAM16 X CLK43
CAM 12 <i>ΔgpxA ΔtpxA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB ΔtpxA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM11 X TAM17
CAM 13 <i>ΔtpxA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔtpxA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CAM11 X TAM17
CAM 14 <i>ΔgpxA ΔtpxA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB ΔtpxA::AfpyrG ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM12 X TFL9
CAM 15 <i>ΔgpxA ΔtpxA ΔtpxB</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB ΔtpxB::AfriboB ΔtpxA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM12 X TAM19
CAM 16 <i>ΔgpxA ΔtpxA ΔTpxB ΔnapA</i>	<i>PabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB ΔtpxB::AfriboB ΔtpxA::AfpyrG ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM14 X TAM19
CAM 17 <i>ΔalcA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔalcA::AfriboB veA1^b</i>	This work, progeny from TAM20 X CLK43
CAM 18 <i>ΔalcA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔalcA::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM17 X TFL9
CAM 19 <i>ΔalcA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔalcA::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM17 X TFL9

CAM 20 <i>ΔtpxB</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔtpxB::AfriboB veA1^b</i>	This work, progeny from TAM19 X CFL7
CAM 21 <i>ΔtpxB ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔtpxB::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from TAM19 X CFL7
CAM 22 <i>ΔsrkA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔsrkA::AfpyroA ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,c}</i>	This work, progeny from TFL19 X CFL7
CAM 24 SrrA::GFP	<i>pabaA1 yA2 srrA::gfp::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from TAM11 X CLK43
CAM 25 <i>ΔgpxA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM14 X TAM19
CAM 26 <i>ΔtpxA ΔtpxB</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔtpxB::AfriboB ΔtpxA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM14 X TAM19
CAM 27 <i>ΔgpxA ΔtpxB ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::RiboB ΔtpxB::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM14 X TAM19
CAM 28 <i>ΔsodA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔsodA::AfpyrG ΔnapA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CAH13 X TFL9
CAM 29 <i>ΔprxA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CFL7 X TAM32
CAM 30 <i>ΔprxB</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxB::AfriboB veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CFL7 X TAM30
CAM 31 <i>ΔprxA ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG ΔnapA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CFL7 X TAM32
CAM 32 <i>ΔprxA ΔprxB</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG ΔprxB::AfriboB veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM31 X TAM30
CAM 33 <i>ΔprxA napA::gfp</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG ΔnapA::gfp::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CAM02 X TAM32
CAM 34 <i>ΔprxA ΔprxB ΔnapA</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG ΔprxB::AfriboB ΔnapA::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM31 X TAM30
CAM 35 <i>ΔprxA ΔprxB napA::gfp</i>	<i>pabaA1 yA2 ΔprxA::AfpyrG ΔprxB::AfriboB napA::gfp::AfpyrG veA1^{a,b}</i>	This work, progeny from CAM32 X TFL14
CAM 36 <i>ΔsrrA napA::gfp</i>	<i>pabaA1 yA2 napA::gfp::AfpyrG ΔsrrA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from TFL14 X TSrrA
CAM 37 <i>ΔnapA srrA::gfp</i>	<i>pabaA1 yA2 srrA::gfp::AfpyrG ΔnapA::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from CFL7 X TAM11
CAM 38	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::argB H2A::mRFP::ptrA veA1^{a,c}</i>	This work, progeny from 11035 X TRJ6
CAM 39	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB H2A::mRFP::ptrA veA1^{a,b,c}</i>	This work, progeny from 11035 X TRJ6
CAM 40	<i>pyroA4 ΔnkuA::argB H2A::mRFP::ptrA veA1^c</i>	This work, progeny from 11035 X TRJ6
CAM 41	<i>pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB H2A::mRFP::ptrA veA1^{b,c}</i>	This work, progeny from 11035 X TRJ6
CAM 42 <i>ΔAN3687</i>	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 pyro4 riboB2 ΔAN3687::AfpyrG veA1^a</i>	This work, progeny from TAM36 X CLK43
CAM 43 <i>ΔAN4301</i>	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔAN4301::AfRiboB ΔnkuA::argB</i>	This work, progeny from TAM37 X CLK43
CAM 44		
CAM 45		
CAM 46		
CAM 47		
CAM 48		

- a) It may contain PyrG89 mutation
- b) It may contain RiboB2 mutation
- c) It may contain PyroA4 mutation

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Primers	Secuencia (5'-3')
5'For-napA	CGATGTGAGAAAGGCACG
5Dig-nkuA	GATGCTGTCCTTTTTGCC
3Dig-nkuA	TACCCAGAGCGCGATAC
pyrG forward	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
pyrG reverse	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
5Ribo	CTGGCTCGTTTTGATCACATGG
6Ribo	GCGCTGCAGAACCGTTACATG
5' AN8080 For (<i>ΔprxB</i>)	GACCACGCCTCAGCCCAG
5' AN8080 Rev (<i>ΔprxB</i>)	TAATCCCATGTGATCAAACGAGCCAGTTTGTGAATATTAGATCAAGAATTGGAATG
3' AN8080 For (<i>ΔprxB</i>)	CACACTCATGTAACGGTTCTGCAGCGCAGGACTGGTGATAAAGGTGTTTAGCTT
3' AN8080 Rev (<i>ΔprxB</i>)	TGCAGCCTGGATGATTGGG
AN8080 Nd For	GAAGGCAGCAATGAGCACCA
AN8080 Nd Rev	TGTGCGCGGACTGACAGG
5' PrxA For	ATCCTGACTAAAAGAGGGGTAAAGAATA
5' PrxA Rev	AGGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCTGTGTAAGATAGTGGTTGTTGGTTGG
3' PrxA For	ACGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACTTTGACGAACTATTGACAGACCGT
3' PrxA Rev	ACCCCAAGCATCGTCTCCC
PrxA Nd For	CGTACGCTGCCGTTTCTTGA
PrxA Nd Rev	CGCGATTCCGAAAGTGGAG
5' AN3687 For	GCAACTGGAGAGTGAACAGTCAG
5' AN3687 Rev	AGGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCGGTAGTTTTGGAATTGATCAAAATGA
3' AN3687 For	ACGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACATAGGGTAAACTACACCAGCAAATTG
3' AN3687 Rev	TTCGTGCGGTATTTCGTTATCACAT
AN3687 Nd For	GTCTAGCACGATTCTGGCATT
AN3687 Nd Rev	CGAGCTGGCGGTCTATGTCC
5' AN4301 For	ACAGAGGTGGCAAAGGGGG
5' AN4301 Rev	CCCATGTGATCAAACGAGCCAGGTAAGCGGGAGTTTTGCTGTGC
3' AN4301 For	CTCATGTAACGGTTCTGCAGCGCAGTTTTTCCGGTGTGGTTTTA
3' AN4301 Rev	TCGTACGCACCATGTTTATACTG
AN4301 Nd For	AGCTTGATTTCTTAAAGGCTTATTCA
AN4301 Nd Rev	CAAAGGTGCGGCAAGGATA
GSP1 PrxAGFP	CCAACAAAGGGCGGTCG
GSP2 PrxAGFP	CTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCCAGGTGCTTGATGACAGTCTCG
GSP3 PrxAGFP	CATCAGTGCCTCCTCTCAGACTTTGACGAACTATTGACAGACCG
GSP4 PrxAGFP	GCACCCCTAGCACCCTCGC
PrxAGFP For Nd	ACCTTGAGGTTGCATGAATAGC
PrxAGFP Rev Nd	CGTTTCTTGAATTTCCGGTTCC
PrxAC61S Rev	GAGCAGAAGAGACGGGGGT
PrxAC61S For	ACCCCGTCTCTTCTGCTCG

Bibliografía

- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 35-54.
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic Biol Med*, 49(9), 1342-1353. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6161-6165.
- Biteau, B., Labarre, J., & Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425(6961), 980-984. doi: 10.1038/nature02075
- Boronat, S., Domenech, A., Carmona, M., Garcia-Santamarina, S., Bano, M. C., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2017). Lack of a peroxiredoxin suppresses the lethality of cells devoid of electron donors by channelling electrons to oxidized ribonucleotide reductase. *PLoS Genet*, 13(6), e1006858. doi: 10.1371/journal.pgen.1006858
- Brown, A. J., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M. D., Yin, Z., . . . Leach, M. D. (2014). Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol*, 217(Pt 1), 144-155. doi: 10.1242/jeb.088930
- Bryk, R., Griffin, P., & Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, 407(6801), 211-215. doi: 10.1038/35025109
- Calvo, I. A., Boronat, S., Domenech, A., Garcia-Santamarina, S., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2013). Dissection of a redox relay: H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-thioredoxin cycle. *Cell Rep*, 5(5), 1413-1424. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.027
- Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W., & Aguirre, J. (2008). NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 7(8), 1352-1361. doi: 10.1128/EC.00137-08
- Cartwright, G. M., & Scott, B. (2013). Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*. *Eukaryot Cell*, 12(10), 1335-1348. doi: 10.1128/EC.00129-13
- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2013). Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *Eur Thyroid J*, 2(3), 160-167. doi: 10.1159/000354745
- Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet*, 3(9), 683-697. doi: 10.1038/nrg889
- nrg889 [pii]
- Champe, S. P., Nagle, D. L., & Yager, L. N. (1994). Sexual sporulation. *Prog Ind Microbiol*, 29, 429-454.
- Chauhan, N., & Calderone, R. (2008). Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi. *Infect Immun*, 76(11), 4795-4803. doi: IAI.00834-08 [pii]
- 10.1128/IAI.00834-08

- Chauhan, N., Latge, J. P., & Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol*, *4*(6), 435-444. doi: nrmicro1426 [pii]
10.1038/nrmicro1426
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. Y., & Zheng, X. F. S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today*, *21*(1), 143-149. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.001
- Christman, M. F., Storz, G., & Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(10), 3484-3488.
- Dankai, W., Pongpom, M., Youngchim, S., Cooper, C. R., Jr., & Vanittanakom, N. (2016). The yapA Encodes bZIP Transcription Factor Involved in Stress Tolerance in Pathogenic Fungus *Talaromyces marneffeii*. *PLoS One*, *11*(10), e0163778. doi: 10.1371/journal.pone.0163778
- Davies, B. W., Kohanski, M. A., Simmons, L. A., Winkler, J. A., Collins, J. J., & Walker, G. C. (2009). Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, *36*(5), 845-860. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.024
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, *50*(4-5), 279-289. doi: 10.1080/713803728
- Delaunay, A., Isnard, A. D., & Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J*, *19*(19), 5157-5166. doi: 10.1093/emboj/19.19.5157
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., & Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, *111*(4), 471-481.
- Diaz-Arevalo, D., Bagramyan, K., Hong, T. B., Ito, J. I., & Kalkum, M. (2011). CD4⁺ T cells mediate the protective effect of the recombinant Asp f3-based anti-aspergillosis vaccine. *Infect Immun*, *79*(6), 2257-2266. doi: 10.1128/IAI.01311-10
- Dickinson, B. C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D. V., & Chang, C. J. (2011). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nat Chem Biol*, *7*(2), 106-112. doi: 10.1038/nchembio.497
- Eggler, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B., & Mesecar, A. D. (2005). Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(29), 10070-10075. doi: 10.1073/pnas.0502402102
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, *194*(1), 7-15. doi: 10.1083/jcb.201102095
- Fomenko, D. E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., . . . Gladyshev, V. N. (2011). Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(7), 2729-2734. doi: 10.1073/pnas.1010721108
- Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D., & Toledano, M. B. (2010). Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem*, *285*(11), 8463-8471. doi: 10.1074/jbc.M109.051714

- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., & Abe, K. (2005). Aspergillus nidulans HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol*, *56*(5), 1246-1261. doi: MMI4605 [pii] 10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., . . . Birren, B. W. (2005). Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A. fumigatus and A. oryzae. *Nature*, *438*(7071), 1105-1115. doi: 10.1038/nature04341
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., . . . Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, *425*(6959), 737-741. doi: 10.1038/nature02046
- Gomez-Gonzalez, B., & Aguilera, A. (2017). The need to regulate replication fork speed. *Science*, *358*(6364), 722-723. doi: 10.1126/science.aaq0678
- Halliwel, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, *97*(6), 1634-1658. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Hansen, S., Vielfort, K., Yang, J., Roger, F., Andersson, V., Zamarbide-Fores, S., . . . Nystrom, T. (2016). Lifespan Control by Redox-Dependent Recruitment of Chaperones to Misfolded Proteins. *Cell*, *166*(1), 140-151. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.006
- Hausmann, C. D., & Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev*, *32*(4), 705-721. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00119.x
- He, X. J., Mulford, K. E., & Fassler, J. S. (2009). Oxidative stress function of the Saccharomyces cerevisiae Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell*, *8*(5), 768-778. doi: 10.1128/EC.00021-09
- Hermann, T. E., Kurtz, M. B., & Champe, S. P. (1983). Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of Aspergillus nidulans. *J Bacteriol*, *154*(2), 955-964.
- Hill, T. W., and E. Käfer. (2001). Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newslett*, *48*, 20-21.
- Hillmann, F., Bagramyan, K., Strassburger, M., Heinekamp, T., Hong, T. B., Bzymek, K. P., . . . Kalkum, M. (2016). The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of Aspergillus fumigatus. *Sci Rep*, *6*, 33396. doi: 10.1038/srep33396
- Hoffmann, B., Wanke, C., Lapaglia, S. K., & Braus, G. H. (2000). c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in Aspergillus nidulans. *Mol Microbiol*, *37*(1), 28-41. doi: mmi1954 [pii]
- Holmstrom, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(6), 411-421. doi: 10.1038/nrm3801
- Jang, H. H., Kim, S. Y., Park, S. K., Jeon, H. S., Lee, Y. M., Jung, J. H., . . . Lee, S. Y. (2006). Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions. *FEBS Lett*, *580*(1), 351-355. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.030

- Juul, T., Malolepszy, A., Dybkaer, K., Kidmose, R., Rasmussen, J. T., Andersen, G. R., . . . Andersen, S. U. (2010). The in vivo toxicity of hydroxyurea depends on its direct target catalase. *J Biol Chem*, *285*(28), 21411-21415. doi: 10.1074/jbc.M110.103564
- Karplus, P. A. (2015). A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic Biol Med*, *80*, 183-190. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.009
- Kuge, S., & Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J*, *13*(3), 655-664.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, *50*(4), 1241-1255.
- Lee, S., Kim, S. M., & Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, *18*(10), 1165-1207. doi: 10.1089/ars.2011.4322
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., & Heitman, J. (2010). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(2), 298-340. doi: 10.1128/MMBR.00005-10
- Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., & Brakhage, A. A. (2007). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell*, *6*(12), 2290-2302. doi: 10.1128/EC.00267-07
- Lev, S., Hadar, R., Amedeo, P., Baker, S. E., Yoder, O. C., & Horwitz, B. A. (2005). Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryot Cell*, *4*(2), 443-454. doi: 10.1128/EC.4.2.443-454.2005
- Li, H., Horke, S., & Forstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*, *34*(6), 313-319. doi: S0165-6147(13)00048-5 [pii] 10.1016/j.tips.2013.03.007
- Li, X., Zhang, D., Hannink, M., & Beamer, L. J. (2004). Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J Biol Chem*, *279*(52), 54750-54758. doi: 10.1074/jbc.M410073200
- Lian, F. M., Yu, J., Ma, X. X., Yu, X. J., Chen, Y., & Zhou, C. Z. (2012). Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. *J Biol Chem*, *287*(21), 17077-17087. doi: 10.1074/jbc.M112.357368
- Lin, C. H., Yang, S. L., & Chung, K. R. (2009). The YAP1 homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Mol Plant Microbe Interact*, *22*(8), 942-952. doi: 10.1094/MPMI-22-8-0942
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, *224*, 164-175. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016

- Mailloux, R. J., & Harper, M. E. (2012). Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab*, 23(9), 451-458. doi: 10.1016/j.tem.2012.04.004
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., & Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol*, 41(11), 982-997. doi: 10.1016/j.fgb.2004.07.008
- Martinelli, S. D. (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Prog Ind Microbiol*, 29, 33-58.
- Mendoza-Martinez, A. E., Lara-Rojas, F., Sanchez, O., & Aguirre, J. (2017). NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response, Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol*, 8, 516. doi: 10.3389/fmicb.2017.00516
- Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell*, 19(7), 2293-2309. doi: 10.1105/tpc.107.052332
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M. N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2013). The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 8(12), e83377. doi: 10.1371/journal.pone.0083377
- Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G., & Ames, B. N. (1986). Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(21), 8059-8063.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., . . . Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557-1566.
- Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., & Fetrow, J. S. (2011). Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins*, 79(3), 947-964. doi: 10.1002/prot.22936
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922. doi: 10.1007/s10495-007-0756-2
- Paul, S., Doering, T. L., & Moye-Rowley, W. S. (2015). *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. *Fungal Genet Biol*, 74, 1-9. doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.015
- Phalen, T. J., Weirather, K., Deming, P. B., Anathy, V., Howe, A. K., van der Vliet, A., . . . Heintz, N. H. (2006). Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J Cell Biol*, 175(5), 779-789. doi: 10.1083/jcb.200606005
- Pratt-Hyatt, M., Pai, D. A., Haeusler, R. A., Wozniak, G. G., Good, P. D., Miller, E. L., . . . Engelke, D. R. (2013). Mod5 protein binds to tRNA gene complexes and affects local transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(33), E3081-3089. doi: 10.1073/pnas.1219946110
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., . . . Fabbri, A. A. (2008). Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved

- in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot Cell*, 7(6), 988-1000. doi: 10.1128/EC.00228-07
- Rocha, M. C., de Godoy, K. F., Bannitz-Fernandes, R., Fabri, J., Barbosa, M. M. F., de Castro, P. A., . . . Malavazi, I. (2018). Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Sci Rep*, 8(1), 12314. doi: 10.1038/s41598-018-30108-2
- Sanchez, O., & Aguirre, J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newslett*, 43, 48-51.
- Sanchez, O., Navarro, R. E., & Aguirre, J. (1998). Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet*, 258(1-2), 89-94.
- Segmuller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J., & Tudzynski, P. (2008). NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(6), 808-819. doi: 10.1094/MPMI-21-6-0808
- Skromne, I., Sanchez, O., & Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene. *Microbiology*, 141 (Pt 1), 21-28.
- Skulachev, V. P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*, 28(2), 283-289. doi: 10.3233/JAD-2011-111391
- Storz, G., Christman, M. F., Sies, H., & Ames, B. N. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 8917-8921.
- Sun, Y., Wang, Y., & Tian, C. (2016). bZIP transcription factor CgAP1 is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genet Biol*, 95, 58-66. doi: 10.1016/j.fgb.2016.08.006
- Tartaglia, L. A., Storz, G., & Ames, B. N. (1989). Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J Mol Biol*, 210(4), 709-719.
- Timberlake, W. E. (1980). Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol*, 78(2), 497-510. doi: 0012-1606(80)90349-8 [pii]
- Todd, R. B., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc*, 2(4), 811-821. doi: nprot.2007.112 [pii] 10.1038/nprot.2007.112
- Turner-Ivey, B., Manevich, Y., Schulte, J., Kistner-Griffin, E., Jezierska-Drutel, A., Liu, Y., & Neumann, C. A. (2013). Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer. *Oncogene*, 32(45), 5302-5314. doi: 10.1038/onc.2012.624
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., & Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 6(9), 1570-1583. doi: 10.1128/EC.00085-07

- Veal, E. A., Findlay, V. J., Day, A. M., Bozonet, S. M., Evans, J. M., Quinn, J., & Morgan, B. A. (2004). A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell*, *15*(1), 129-139. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.021
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., AYTE, J., Toledano, M. B., & Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(25), 8875-8880. doi: 10.1073/pnas.0503251102
- Weids, A. J., & Grant, C. M. (2014). The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. *J Cell Sci*, *127*(Pt 6), 1327-1335. doi: 10.1242/jcs.144022
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, *28*(1), 32-40.
- Xia, Y., Yu, H., Zhou, Z., Takaya, N., Zhou, S., & Wang, P. (2018). Peroxiredoxin System of *Aspergillus nidulans* Resists Inactivation by High Concentration of Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidative Stress. *J Microbiol Biotechnol*, *28*(1), 145-156. doi: 10.4014/jmb.1707.07024
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P., . . . Osmani, S. A. (2004). Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, *3*(5), 1359-1362. doi: 3/5/1359 [pii] 10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, *41*(11), 973-981.
- Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, *23*(22), 8137-8151.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pilonel, C., Lam, S., & Xu, J. R. (2002). Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol*, *68*(2), 532-538.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., & Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, *183*(15), 4562-4570. doi: 10.1128/JB.183.15.4562-4570.2001
- Zipper, L. M., & Mulcahy, R. T. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem*, *277*(39), 36544-36552. doi: 10.1074/jbc.M206530200

Publicaciones



NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response, Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*

OPEN ACCESS

Ariann E. Mendoza-Martínez, Fernando Lara-Rojas †, Olivia Sánchez and Jesús Aguirre *

Edited by:
Alex Andrianopoulos,
University of Melbourne, Australia

Reviewed by:
Kap-Hoon Han,
Woosuk University, South Korea
Olaf Kniemeyer,
Leibniz Institute for Natural Product
Research and Infection Biology-Hans
Knoell Institute, Germany
Miguel Penalva,
Centro de Investigaciones Biológicas
(CSIC), Spain

***Correspondence:**
Jesús Aguirre
jaguirre@ifc.unam.mx

† Present Address:
Fernando Lara-Rojas,
Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, Mexico

Specialty section:
This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 19 December 2016

Accepted: 13 March 2017

Published: 30 March 2017

Citation:
Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F,
Sánchez O and Aguirre J (2017) NapA
Mediates a Redox Regulation of the
Antioxidant Response, Carbon
Utilization and Development in
Aspergillus nidulans.
Front. Microbiol. 8:516.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00516

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico

The redox-regulated transcription factors (TFs) of the bZIP AP1 family, such as yeast Yap1 and fission yeast Pap1, are activated by peroxiredoxin proteins (Prxs) to regulate the antioxidant response. Previously, *Aspergillus nidulans* mutants lacking the Yap1 ortholog NapA have been characterized as sensitive to H₂O₂ and menadione. Here we study NapA roles in relation to TFs SrrA and AtfA, also involved in oxidant detoxification, showing that these TFs play different roles in oxidative stress resistance, catalase gene regulation and development, during *A. nidulans* life cycle. We also uncover novel NapA roles in repression of sexual development, normal conidiation, conidial mRNA accumulation, and carbon utilization. The phenotypic characterization of $\Delta gpxA$, $\Delta tpxA$, and $\Delta tpxB$ single, double and triple peroxiredoxin mutants in wild type or $\Delta napA$ backgrounds shows that none of these Prxs is required for NapA function in H₂O₂ and menadione resistance. However, these Prxs participate in a minor NapA-independent H₂O₂ resistance pathway and NapA and TpxA appear to regulate conidiation along the same route. Using transcriptomic analysis we show that during conidial development NapA-dependent gene expression pattern is different from canonical oxidative stress patterns. In the course of conidiation, NapA is required for regulation of at least 214 genes, including ethanol utilization genes *alcR*, *alcA* and *aldA*, and large sets of genes encoding proteins involved in transcriptional regulation, drug detoxification, carbohydrate utilization and secondary metabolism, comprising multiple oxidoreductases, membrane transporters and hydrolases. In agreement with this, $\Delta napA$ mutants fail to grow or grow very poorly in ethanol, arabinose or fructose as sole carbon sources. Moreover, we show that NapA nuclear localization is induced not only by oxidative stress but also by growth in ethanol and by carbon starvation. Together with our previous work, these results show that Saka-AtfA, SrrA and NapA oxidative stress-sensing pathways regulate essential aspects of spore physiology (i.e., cell cycle arrest, dormancy, drug production and detoxification, and carbohydrate utilization).

Keywords: ROS, cleistothecia, secondary metabolism, iron scavenging, germination

INTRODUCTION

The proposed role of reactive oxygen species (ROS) as essential cell differentiation signals (Hansberg and Aguirre, 1990; Aguirre et al., 2005) led us to study the mechanisms by which eukaryotic cells detoxify ROS, using the model fungus *Aspergillus nidulans*. To perceive and transmit oxidative stress signals, fungi utilize phosphorelay systems connected to MAP kinases specialized in transducing stress signals or SAPKs. *Schizosaccharomyces pombe* paradigmatic SAPK Sty1/Spc1 has been characterized as a MAPK involved in cell-cycle control (Shiozaki and Russell, 1995) that is activated by osmotic (Millar et al., 1995; Degols et al., 1996), oxidative (Degols et al., 1996), heat shock (Nguyen and Shiozaki, 1999), nitrogen limitation (Shiozaki and Russell, 1996), and UV light (Degols and Russell, 1997) stress. As indicated in Figure S1 and Table S1, the phosphorelay system linked to Sty1/Spc1 is composed by histidine kinases (HK) Mak1, Mak2, and Mak3 (Buck et al., 2001), the phosphotransfer protein (HPt) Mpr1 and the response regulator (RR) Mcs4. Sty1/Spc1 in turn regulates transcription factor Atf1. Despite the architecture similarity to *Saccharomyces cerevisiae* Sln1-Ypd1-Ssk1-Hog1 system (de Nadal et al., 2011), *S. pombe* phosphorelay transmits oxidative, not osmotic stress signals (Nguyen et al., 2000). A second phosphorelay component, the transcription factor Prr1 is also required for oxidative stress responses, independently of Sty1/Spc1 (Quinn et al., 2011). In addition to Atf1 and Prr1, transcription factor Pap1, a homolog of *S. cerevisiae* Yap1 (Moye-Rowley et al., 1989), is critical for the antioxidant response in this fungus. The oxidation signal is perceived by different peroxiredoxins or Prxs and then transmitted to Pap1 or Yap1, which once oxidized accumulate in the nucleus to regulate the expression of multiple genes involved in the antioxidant response.

All peroxiredoxins belong to a conserved family of peroxidases that reduce peroxide and contain a conserved “peroxidatic” cysteine. Peroxides oxidize this Cys to sulphenic acid, which then reacts with another “resolving” Cys to form a disulfide bond, subsequently reduced by a suitable electron donor to complete a catalytic cycle. Prxs are classified into 2-Cys, atypical 2-Cys and 1-Cys families. 2-Cys are homodimeric and contain peroxidatic and resolving Cys residues in the same subunit. However, the disulfide bond is formed between two different subunits. In atypical 2-Cys an intermolecular disulfide is formed within the same subunit. 1-Cys Prxs form a disulfide with a resolving Cys present in other proteins or small thiol molecules (Rhee, 2016). Until now, typical 2-Cys Prxs have not been found in filamentous fungi. The role of *S. cerevisiae* peroxiredoxin Gpx3 in Yap1 activation, which also requires Yap1-binding protein Ybp1, was the first description of Prx function in H₂O₂ sensing (Delaunay et al., 2002). However, under certain conditions peroxiredoxin Tsa1 can also mediate Yap1 activation by H₂O₂ (Tachibana et al., 2009). In *S. pombe*, the 2-Cys peroxiredoxin Tpx1 transmits the redox signal to Pap1 (Vivancos et al., 2004, 2005).

A. nidulans contains 15 HKs and the function of most of them is unknown. Genetic evidence indicates that HK NikA transmits osmotic stress and fungicide signals to (HPt) YpdA and

to SrkA RR, which is coupled to the SAPK Saka/HogA (Han and Prade, 2002; Kawasaki et al., 2002), as well as to the SAPK-independent RR SrrA (Hagiwara et al., 2007; Vargas-Perez et al., 2007). Upstream MAPKK PbsB and MAPKKK SskB regulate Saka (Furukawa et al., 2005), which is able to replace Sty1/Spc1 functions in *S. pombe*, and in *A. nidulans* is phosphorylated in response to multiple types of stress, including osmotic, oxidative (Kawasaki et al., 2002), nutrient starvation (Lara-Rojas et al., 2011) and hypoxia (Sánchez and Aguirre, unpublished). Stress-activated Saka translocates to the nucleus, where it interacts with transcription factor AtfA, required for induction of multiple genes and both, Δ sakA and Δ atfA mutants are sensitive to oxidative stress (Lara-Rojas et al., 2011). Additionally, Saka and AtfA are required for osmotic-induced gene expression (Hagiwara et al., 2009).

TF SrrA is also needed for oxidative stress resistance (Vargas-Perez et al., 2007) and both, Saka and SrrA play important roles during development. Saka represses sexual development and is activated during asexual development (Kawasaki et al., 2002). Δ sakA intact conidia progressively lose their viability and this is consistent with the fact that phosphorylated Saka accumulates in asexual spores (conidia) in an AtfA-dependent manner, and its dephosphorylation is necessary for germination to take place (Lara-Rojas et al., 2011). Likewise, Δ srrA mutants show severely decreased asexual sporulation and produce conidia that very rapidly lose their viability (Vargas-Perez et al., 2007). In addition to transcription factors (TFs) AtfA and SrrA, the Yap1/Pap1 functional homolog NapA has been shown to be required for resistance to H₂O₂ in *A. nidulans* (Asano et al., 2007). Unrelated protein AN8863, putatively involved in nucleosome assembly, was later also referred to as NapA (Araújo-Bazan et al., 2008). Here we keep using NapA to name the *A. nidulans* Yap1/Pap1 homolog (AN7513) because it has been used this way in other publications (Lessing et al., 2007; Thön et al., 2010), and because the name “ap” preceded by the first letter of the species name (i.e., *nidulans* apA) has been widely used in many other filamentous fungi, where the role of Yap1/Pap1 homologs in oxidative stress resistance has been demonstrated (Lessing et al., 2007; Qiao et al., 2008; Temme and Tudzynski, 2009; Tian et al., 2011; Cartwright and Scott, 2013). Notably, in several plant pathogens Yap1/Pap1 homologs are involved not only in regulation of the antioxidant response but also in plant virulence (Molina and Kahmann, 2007; Guo et al., 2011; Huang et al., 2011).

Here we compared the relative contribution of (TFs) AtfA, SrrA and NapA to the antioxidant response and development in *A. nidulans* and uncovered novel NapA roles in regulation of sexual and asexual development, carbon utilization and gene regulation during asexual sporulation.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Media, Growth Conditions, and Catalase Activity Determination

The *A. nidulans* strains used in this work are listed in Table S2. All strains were grown at 37°C in glucose minimal (MM) nitrate medium (Hill and Käfer, 2001), plus supplements. Δ napA

strains in a *veA*⁺ background were obtained from sexual crosses with strain FGSCA4. The presence of wild type *veA* allele was confirmed by PCR using genomic DNA from selected progeny and the primers *veA*forward and *veA*reverse, as reported (Han et al., 2010). Menadione was filter sterilized and like H₂O₂, added to agar medium at 50°C before solidification. H₂O₂-containing plates were used the day they were prepared or stored at 4°C for no more than 24 h. Since H₂O₂ can react with medium components, the actual concentration in plates cannot be estimated. To ensure experimental reproducibility, the same batch of H₂O₂ containing medium was used when comparing different strains. Spore suspensions containing 1 × 10³ or 1 × 10⁴ conidia were used to inoculate plates by dropping the suspension on the center of plates containing different stressors or media. Higher H₂O₂ resistance is observed at higher spore densities, presumably due to the high catalase A activity levels found in conidia (Navarro et al., 1996; Navarro and Aguirre, 1998). For catalase activity, 30 μg of total protein extracts prepared from conidia or mycelia were separated on native polyacrylamide gels to determine catalase activity as reported (Navarro et al., 1996; Kawasaki et al., 1997). Briefly gels are incubated in 5% methanol with shaking for 5 min and then rinsed with tap water 3 times. After this, the gel is incubated in a 0.03% hydrogen peroxide solution (100 μl of commercial 30% solution in 100 ml of deionized water) for 5 min and rinsed with water. Finally, the gel is incubated in the staining solution until the bands of activity are visible. The staining solution is made by mixing equal volumes of a 2% (w/v) FeCl₃ solution and a 2% (w/v) K₃Fe(CN)₆. The different catalases were mapped before using single, double and triple mutants affected in *catA*, *catB*, and *catC* genes (Kawasaki and Aguirre, 2001).

Deletion of *napA*, *gpxA*, *tpxA*, *tpxB* and *alcA* Genes, and Tagging of NapA

Genomic DNA was used as template to produce the gene-deletion constructs by double joint PCR (Yu et al., 2004). For *napA* gene (AN7513) replacement construct, the *napA* ORF was amplified with primers 5' For-*napA* and 5' Rev-*napA* (see Table S3). The 3' *napA* fragment was amplified with primers 3' For-*napA* and 3' Rev-*napA*. *Aspergillus fumigatus pyrG* marker was amplified with primers *pyrG*forward and *pyrG*reverse, using plasmid PFNO3 as template (Nayak et al., 2006). The three fragments were purified, mixed and used in a fusion PCR with primers 5' nest-*napA* and 3' nest-*napA*. The final 4900 bp *napA*-*AfpyrG*-*napA* cassette was purified and used to transform *A. nidulans* strain 11035 by electroporation (Sanchez and Aguirre, 1996; Sánchez et al., 1998). Five *PyrG*⁺ transformants were obtained and analyzed by Southern blot to confirm the elimination of *napA*. After confirming the proper deletion event (Figure S2), strain TFL9 was chosen and crossed with strain CLK43 to get rid of the *kuA* deletion, and progeny strain CFL7 was confirmed by PCR and used in further experiments.

To delete the *gpxA* gene (AN2846), primer pairs 5'For-*gpxA*/5'Rev-*gpxA* and 3'For-*gpxA*/3'Rev-*gpxA* were used to amplify *gpxA* 5' and 3' regions, respectively. Primers 5'For-nested *gpxA* and 3'Rev-nested *gpxA* were used to obtain the final

fusion product. *A. fumigatus riboB* marker was amplified with primers 5Ribo and 6Ribo, using plasmid pAfriboPstE1Skt(ssp1)-37 as template (Nayak et al., 2006). The 5000 bp *gpxA*-AfriboB-*gpxA* cassette was purified as before and used to transform *A. nidulans* strain 11035 by electroporation. Twenty *RiboB*⁺ transformants were obtained, and analyzed by PCR to confirm the elimination of *gpxA* (Figure S3). Six transformants contained the expected event. Strain TAM16 was crossed with strain CLK43 and progeny strain CAM11 was confirmed by PCR and used in further experiments.

A similar strategy was used to delete the *tpxA* gene (AN10223). Primer pairs 5'For-*tpxA*/5'Rev-*tpxA* and 3'For-*tpxA*/3'Rev-*tpxA* were used to amplify *tpxA* 5' and 3' regions, respectively. *A. fumigatus pyrG* marker was amplified with primers *pyrG*forward and *pyrG*reverse, using plasmid PFNO3 as template (Nayak et al., 2006). The 3483 bp fusion *tpxA*-*AfpyrG*-*tpxA* PCR product obtained with primers 5' nest *tpxA* and 3' nest *tpxA* was used to transform strain 11035 by electroporation. 15 transformants obtained were analyzed by PCR, and 4 transformants were confirmed (Figure S3). Transformant 6 was named TAM17, crossed with strain CLK43 and progeny strain CAM13 confirmed by PCR and chosen for additional experiments.

To delete *tpxB* gene (AN3973), primer pairs 5'For-*tpxB*/5'Rev-*tpxB* and 3'For-*tpxB*/3'Rev-*tpxB* were used to amplify *tpxB* 5' and 3' regions, respectively. The *A. fumigatus pyrG* marker was amplified as before and the 3483 bp fusion PCR product obtained with primers 5' nest *tpxB* and 3' nest *tpxB* was used to transform strain 11035 by electroporation. 4 transformants out of 5 obtained were confirmed by PCR (Figure S3). Transformant 4 was named TAM19, crossed with strain CLK43 and progeny strain CAM19 used in further experiments.

The *alcA* deletion construct containing the *riboB* gene, as a selective marker, was generated using primers 5'For-*alcA* and 5'Rev-*alcA* for 5' region and 3'For-*alcA* and 3'Rev-*alcA* for the 3' region. *A. fumigatus riboB* marker was amplified with primers 5Ribo and 6Ribo as before. The 4167 bp band obtained with primers NestFor*alcA* and NestRev*alcA* was used to transform strain 11035 by electroporation. Six transformants contained the expected event (Figure S4). Transformant TAM20 was crossed with strain CLK43 and progeny strain CAM17 was confirmed by PCR and chosen for further experiments. Sexual crosses generated double, triple and quadruple mutants, as indicated in Table S2.

To generate NapA::GFP C-terminal construct, three PCR products were used. First, 5' and entire *napA* ORF were amplified with primers GSP1*napA* and GSP2*napA*. Second, a 3' *napA* fragment was amplified with primers GSP3*napA* and GSP4*napA*. Third, GFP and *A. fumigatus pyrG* marker were amplified with primers GFP1*napA* and GFP2*napA* as before. Purified fragments were used in a fusion PCR with primers GSP1*napA* and GSP4*napA*. The 6625 bp *napA*-GFP-*AfpyrG* cassette was used to transform *A. nidulans* strain A1155 by electroporation. Transformant TFL14 strain was confirmed by PCR and used for further experiments (Figure S5).

Microscopy

Fluorescence microscopy images were captured *in vivo*. Spores from NapA::GFP strain were grown for 18 h on coverslips containing liquid glucose-MM at 37°C with no shaking. After this, samples were shifted to the same medium with or without 2 mM H₂O₂, incubated for 0–120 min and observed using a NIKON Eclipse E600 microscope to detect DAPI and GFP fluorescence. Images were captured with a cooled camera Neo Andor sCMOS. For DAPI staining, samples of conidia or mycelia were fixed in methanol/acetone for 10 min, washed in water and stained for 5 min with 0.1 mg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Transcriptomic Analysis

Conidia from 6-day old cultures from strains CLK43 (WT) and CFL7 ($\Delta napA$) were collected and washed 3 times with 10 ml of cold water. Excess liquid was removed by centrifugation and conidia were immediately frozen with liquid nitrogen. Total RNA was extracted by cryogenic grinding using the Tissue Lyser (Qiagen) and purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. RNA integrity number (RIN) for RNA quality was generated using the Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent technologies). Two independent samples from each strain (Biological replicates) were processed for cDNA synthesis using Illumina's kit TrueSeqV2 and sequenced at the next-generation sequencing core facility at IBT-UNAM, using Illumina's platform. An average of 10168 reads of 72 bp per sample were obtained, representing nearly 96.3% *A. nidulans* genome lengths. Biological replicates showed a good level of correlation ($r_{0.966}$ for WT and $r_{0.968}$ for $\Delta napA$). Differential gene expression was inferred based on total mapping counts using the EdgeR package. Genes showing a value of log fold change (LFC) ≥ 2 and a false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 were considered as differentially expressed (DE). The differential expression analysis was deposited under the GEO identifier GSE94747, as part of the BioProject PRJNA373914. The sequencing raw reads for all experiments were deposited in the SRA database under the SRP099165 identifier.

Real-Time PCR

Total RNA was isolated using the Plant RNA purification kit (Quiagen) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase Turbo DNA-free kit (Ambion). The RNA integrity (RIN) and concentration were determined using the 2200 TapeStation (Agilent Genomics). 1 μ g of RNA was used to synthesize cDNA templates for PCR amplification, using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The expression of each gene was measured using 1:10 cDNA sample dilutions. Specific primers used for RT-PCR (Table S3) were devised to produce cDNA amplicons around 130 pb. To estimate genomic DNA contamination, primers were designed to amplify a larger product, including an intron of each gene, from a genomic template. RT-PCR products were observed in 2% agarose gels.

Triplicates from each sample were performed. RT-PCR was done using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX kit (Invitrogen). RT-PCR was performed in a StepOne

Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The program used included an initial UDG incubation for 2 min at 50°C, followed by a 2 min denaturation step at 95°C, and 40 amplification cycles at 95°C for 15 s, followed by 30 s at 60°C. For relative quantification, we used the Ct comparative method and the data was analyzed with StepOne Software V2.3 (Applied Biosystems), using histone 2B (H2B) gene (AN3469) as reference.

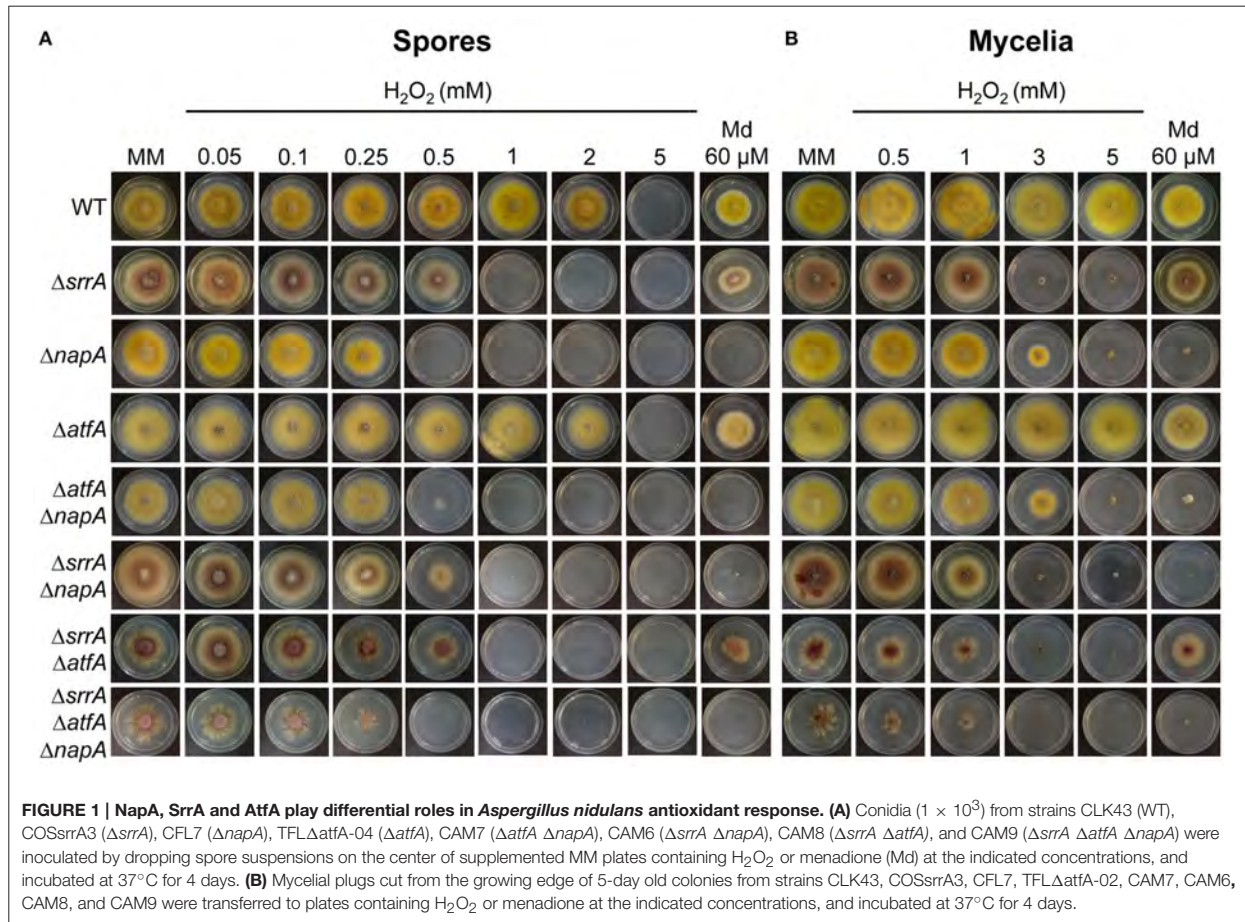
RESULTS

TFs NapA, SrrA, and AtfA Play Differential Roles in *A. nidulans* Antioxidant Response

Previous work has shown that (TFs) SrrA (Vargas-Perez et al., 2007), AtfA (Lara-Rojas et al., 2011) and NapA (Asano et al., 2007) are involved in *A. nidulans* antioxidant response. To analyse the relative contribution of each TF in this process, we compared the sensitivity of conidia and mycelia from $\Delta napA$, $\Delta srrA$, and $\Delta atfA$ mutants to H₂O₂ and menadione. Results show that conidia from $\Delta napA$ mutant were the most sensitive to H₂O₂ followed by $\Delta srrA$ and $\Delta atfA$ mutants, while only $\Delta napA$ mutants were sensitive to menadione (Figure 1A). In contrast, the same assay carried out with mycelia showed a slightly higher H₂O₂ sensitivity for $\Delta srrA$ mutants followed by $\Delta napA$, while the *atfA* mutant was as resistant to H₂O₂ as the WT strain. Again only the $\Delta napA$ mutant was sensitive to menadione (Figure 1B).

To further dissect NapA, SrrA, and AtfA contribution to the antioxidant response, we used $\Delta napA$, $\Delta srrA$, and $\Delta atfA$ single mutants to perform sexual crosses and obtain double and triple mutants, which were confirmed by PCR analysis (not shown). Results in Figure 1A show that conidia from double and triple mutants did not show additive phenotypes and those carrying the $\Delta napA$ deletion were as sensitive to H₂O₂ and menadione as the single $\Delta napA$ mutant, except in the case of the $\Delta srrA \Delta napA$ strain whose H₂O₂ sensitivity was similar to the one displayed by the $\Delta srrA$ mutant (Figure 1A). In the test performed with mycelia, double and triple mutants carrying the $\Delta srrA$ deletion behaved as the single $\Delta srrA$ mutant (Figure 1B). Notably, $\Delta srrA$ mutant growth defects (Vargas-Perez et al., 2007) are enhanced by the presence of the $\Delta atfA$ deletion, as colonies from $\Delta srrA \Delta atfA$ mutants show a higher decrease in growth and highly irregular colony borders. These growth and conidiation defects were even more drastic in the mutant lacking the 3 TFs (Figures 1A,B).

These results show that TFs NapA, SrrA, and AtfA play different roles at different stages of *A. nidulans* life cycle. For H₂O₂ spore resistance NapA plays a more prominent role than SrrA, which in turn is more important than AtfA. For mycelial H₂O₂ resistance SrrA is somewhat more critical than NapA, while AtfA plays no role in this process, and only NapA is necessary for menadione resistance in both spores and mycelia. During vegetative growth, neither NapA nor AtfA are individually required for normal radial growth. However, $\Delta srrA$ mutant growth defects are enhanced by the deletion of AtfA, indicating that AtfA contributes to normal radial growth. SrrA is almost essential for normal conidiation, NapA is needed for full conidiation (see further) and AtfA is dispensable for the



process. Regarding conidial function, SrrA and AtfA are critical for conidial viability, and NapA is necessary for the accumulation of multiple mRNAs in conidia (see further).

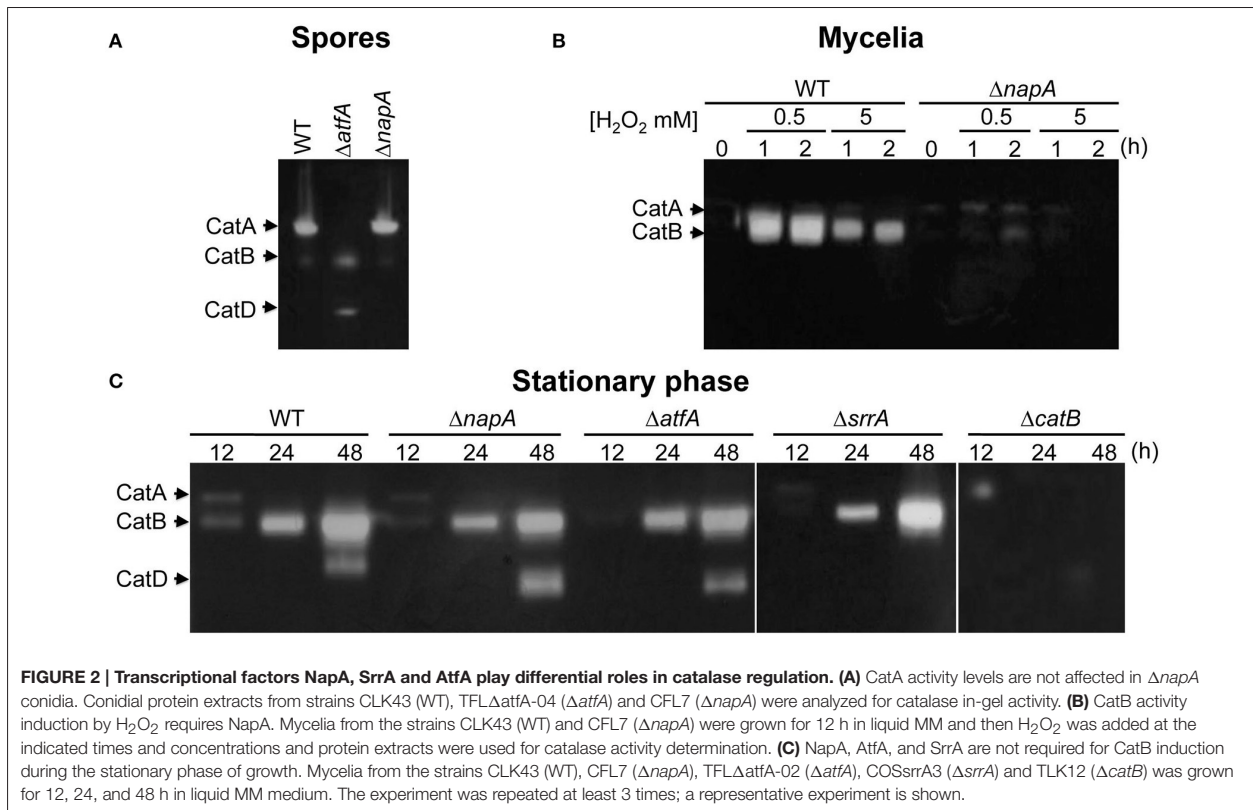
NapA, SrrA, and AtfA Regulate Different Catalase Genes

To further understand NapA roles in the antioxidant response, we compared the H₂O₂ sensitivity of conidia from mutants lacking NapA, the spore-specific catalase CatA (Navarro et al., 1996; Navarro and Aguirre, 1998) or the mycelium inducible catalase CatB (Kawasaki et al., 1997). Notably, Δ napA conidia were much more sensitive to H₂O₂ than Δ catA conidia, while Δ catB conidia showed only a minor sensitivity at 4 mM H₂O₂ (Figure S6). As shown in **Figure 2A**, the presence of CatA activity was completely dependent on AtfA, while being independent of NapA. In contrast, H₂O₂ induction of mycelial catalase CatB was largely dependent on both NapA (**Figure 2B**) and SrrA (Vargas-Perez et al., 2007). Since CatB is also highly induced during the stationary phase of growth (Kawasaki and Aguirre, 2001), we asked if NapA, SrrA or AtfA were required for this induction. Unexpectedly, none of these TFs was needed for this process. However, the induction of catalase-peroxidase

CatD/CpeA activity (Kawasaki and Aguirre, 2001; Scherer et al., 2002) required of SrrA (**Figure 2C**). In summary, these results show that NapA and SrrA are both required for CatB induction by H₂O₂, AtfA is required for CatA expression in conidia and none of them is required for CatB induction during the late stationary phase of growth. This and SrrA regulation of CatD/CpeA activity (Kawasaki and Aguirre, 2001) confirm the differential roles that these TFs perform during *A. nidulans* antioxidant response.

NapA Localizes in Nuclei in Response to Oxidative Stress

The high sensitivity of Δ napA conidia to H₂O₂, not explained by a simple lack of spore catalase activity (**Figure 2A**), suggests that NapA is required for other conidial functions, including those involved in resistance to menadione. It is well known that *S. cerevisiae*, *S. pombe* and other fungal NapA homologs show nuclear accumulation when oxidized in response to H₂O₂. Peroxiredoxins Gpx3 and Tpx1 perceive the oxidation signal and relay it to Yap1 and Pap1, respectively. To determine NapA localization we introduced a GFP tag at its C-terminus and showed that the H₂O₂ resistance of the corresponding strain



was not affected (Figure S5), indicating the functionality of this NapA::GFP fusion. Then we analyzed NapA::GFP localization using different H₂O₂ concentrations. Initially, we found a very low basal signal of NapA::GFP expressed from the *napA* promoter, which increased in nuclei after 30 min of treatment with different H₂O₂ concentrations (not shown). Under these conditions 2 mM was the minimum concentration needed to induce NapA::GFP nuclear accumulation and therefore we used this concentration for a time-course analysis. As seen in **Figure 3A**, NapA::GFP starts to show nuclear localization after 20 min of treatment, which gradually increases up to 120 min. When after this time the H₂O₂ treatment was stopped by transferring mycelia to a medium lacking H₂O₂, it took 6 h to observe that NapA::GFP was no longer observed in nuclei, showing instead a cytoplasm localization. This indicates that under these conditions NapA-mediated adaptation to oxidative stress is a relatively slow process. Since $\Delta napA$ mutants are sensitive to menadione, we also determined if menadione was able to induce NapA::GFP nuclear localization. Indeed, 10 μ M menadione induced NapA nuclear accumulation after a 90 min treatment (**Figure 3B**).

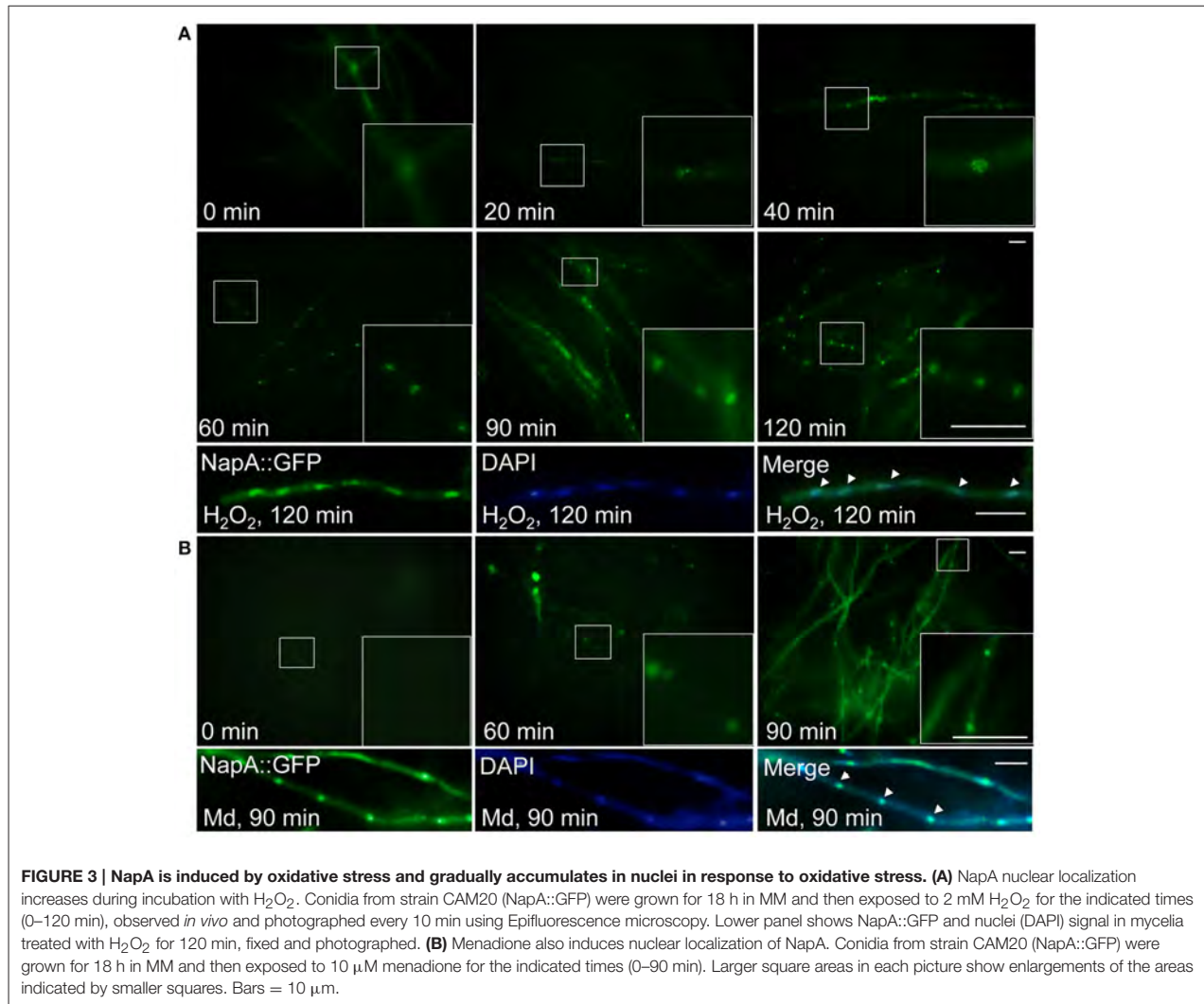
NapA Function in the Antioxidant Response Is Independent of Peroxiredoxins GpxA, TpxA, and TpxB

As indicated before, *S. cerevisiae* peroxiredoxin Gpx3 and *S. pombe* Tpx1 relay the oxidation signal to Yap1 and Pap1,

respectively. To determine if homologous peroxiredoxins were involved in NapA function, we searched the *A. nidulans* genome and found genes AN2846, AN10223, and AN3973 (Oh et al., 2010), which according to their closest homolog in *S. cerevisiae* are named as *gpxA* (Thön et al., 2010), *tpxA* and *tpxB*, respectively. We generated strains in which one of these peroxiredoxin genes was deleted and by sexual crosses generated triple as well as quadruple mutants containing the $\Delta napA$ deletion. In sharp contrast to $\Delta napA$ mutants, mutants lacking either a single or all 3 peroxiredoxins were not sensitive to H₂O₂ or menadione. However, the simultaneous inactivation of the 3 peroxiredoxins resulted in an enhancement of the sensitivity to H₂O₂ caused by the inactivation of NapA (**Figure 4**). This suggests that these 3 proteins might play a partially redundant minor function in H₂O₂ resistance, different from NapA.

NapA Is Involved in Developmental Regulation

$\Delta napA$ mutants did not show any obvious defects except that they seemed to develop more and paler cleistothecia than the WT strain. To examine this in more detail, we induced sexual development in confluent cultures and determined the number of cleistothecia as reported before (Kawasaki et al., 2002). Indeed a $\Delta napA$ mutant produced about 3 times more cleistothecia than the WT strain (**Figure 5A**). Notably, $\Delta napA$ young cleistothecia were white, while older cleistothecia developed



some pigmentation (**Figure 5B**). When observed under the microscope, it became clear that $\Delta napA$ cleistothecia are not pigmented (**Figure 5C**, right panel) but produce pigmented ascospores, which are viable (not shown). *A. nidulans veA* gene encodes a member of a fungal protein family required for cleistothecium formation (Kim et al., 2002) and regulation of secondary metabolism (Bayram et al., 2008). Since our laboratory strains contain a *veA1* allele that causes higher production of conidia and lower numbers of cleistothecia (Käfer, 1965), we also evaluated $\Delta napA$ sexual development phenotypes in the presence of a wild-type *veA* allele. As expected, results show higher numbers of cleistothecia in *veA*⁺ strain FGSC4 and even higher in $\Delta napA veA$ ⁺ strains. Again, young cleistothecia were not pigmented, while older cleistothecia were non-pigmented but produced pigmented ascospores (not shown). Likewise, the presence of wild type *veA* gene did not modify $\Delta napA$ oxidative stress sensitivity. These results indicate that NapA

represses sexual development and is needed for the expression of genes, possibly a polyketide synthetase gene, associated with the synthesis of cleistothecial melanin. When conidiation levels were determined, we found that a $\Delta napA$ mutant produced half of the conidia of the WT strain (**Figure 6**), indicating that NapA plays a role in the conidiation process. We also examined the conidiation levels of single, double and triple peroxiredoxin mutants. As shown in **Figure 6**, the inactivation of *gpxA* and *tpxB* had a very minor impact in conidiation. In contrast, the inactivation of *tpxA* reduced conidiation to levels similar to those observed in $\Delta gpxA \Delta tpxA \Delta tpxB$ and $\Delta napA$ mutants. Moreover, a quadruple $\Delta gpxA \Delta tpxA \Delta tpxB \Delta napA$ mutant showed conidiation numbers slightly higher than those seen in single $\Delta tpxA$ and $\Delta napA$ mutants, indicating that TpxA and NapA functions in conidiation are not additive and therefore suggesting that these two proteins work in the same conidiation pathway. Notably, *tpxA* orthologs are induced by H₂O₂ and

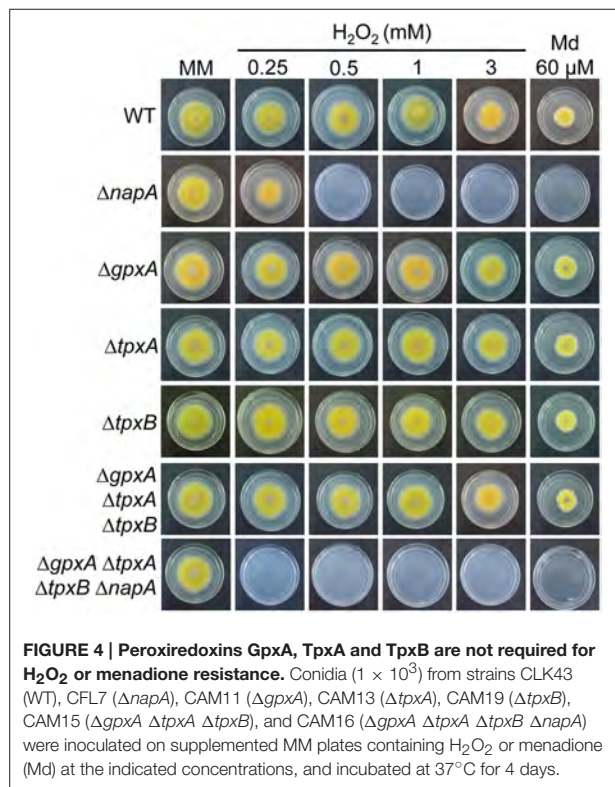


FIGURE 4 | Peroxiredoxins GpxA, TpxA and TpxB are not required for H₂O₂ or menadione resistance. Conidia (1×10^3) from strains CLK43 (WT), CFL7 ($\Delta napA$), CAM11 ($\Delta gpxA$), CAM13 ($\Delta tpxA$), CAM19 ($\Delta tpxB$), CAM15 ($\Delta gpxA \Delta tpxA \Delta tpxB$), and CAM16 ($\Delta gpxA \Delta tpxA \Delta tpxB \Delta napA$) were inoculated on supplemented MM plates containing H₂O₂ or menadione (Md) at the indicated concentrations, and incubated at 37°C for 4 days.

regulated by NapA homologs AfYap1 and Bap1 in *A. fumigatus* (Lessing et al., 2007) and *Botrytis cinerea* (Temme and Tudzynski, 2009), respectively. These results suggest that TpxA plays NapA independent and dependent roles in oxidative stress resistance and conidiation, respectively.

NapA Is Required for Gene Regulation in Conidia

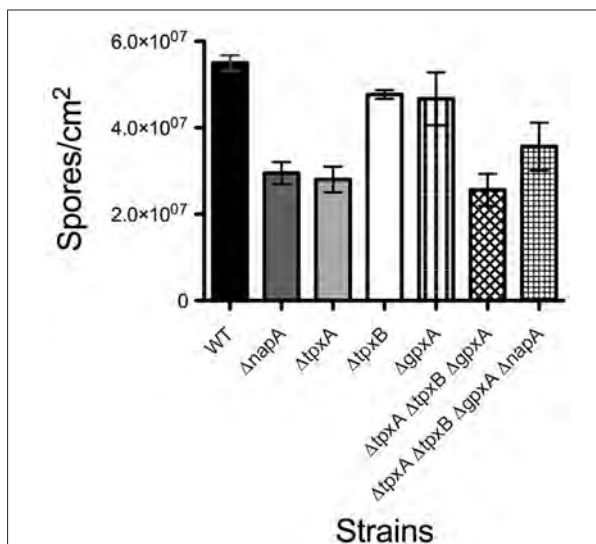
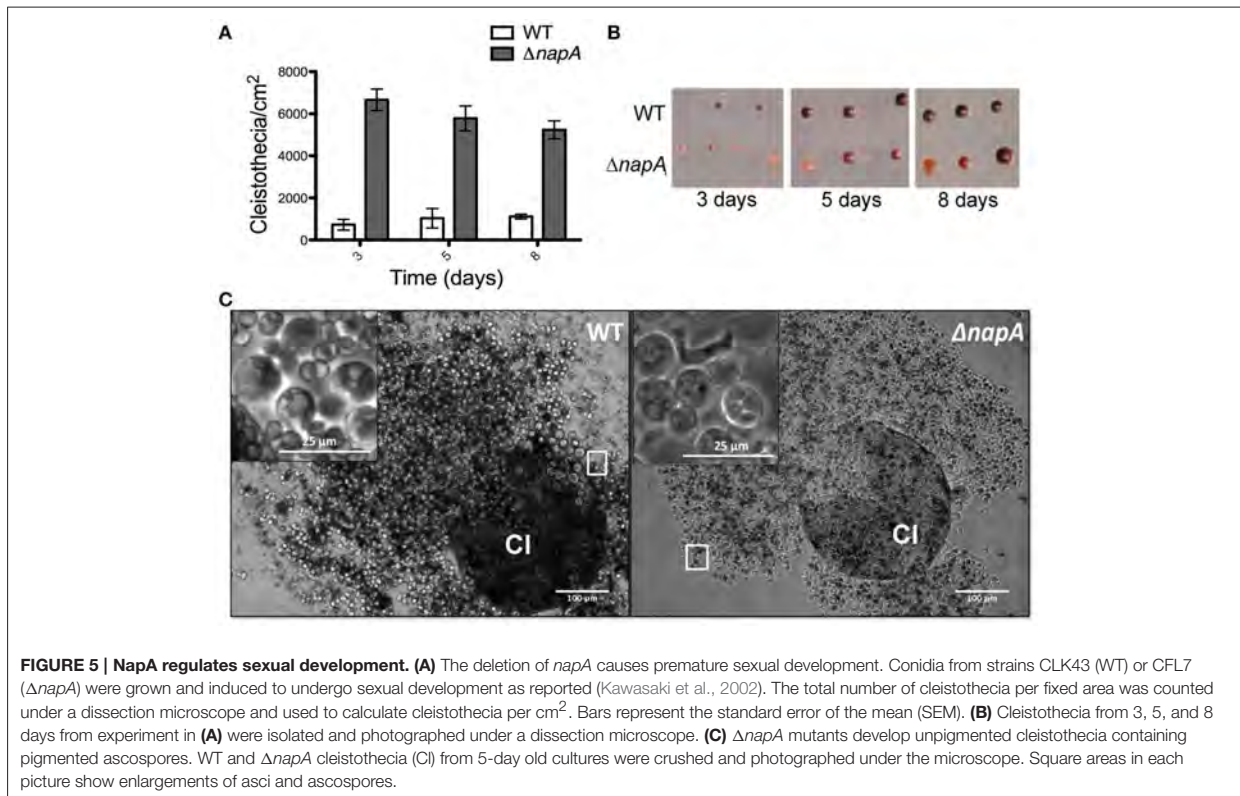
To address the role of NapA in the production of fully functional conidia, we decided to carry out a transcriptomic analysis. For this, we isolated total RNA from $\Delta napA$ and WT intact conidia from 6-day old colonies. Two independent samples from each strain (Biological replicates) were processed for cDNA synthesis and DNA sequencing using Illumina's platform. An average of 10168 reads of 72 bp per sample representing nearly 96.3% *A. nidulans* genome lengths per sample were obtained. The two biological replicates showed a good level of correlation ($r_{0.966}$ for WT and $r_{0.968}$ for $\Delta napA$) and principal component analysis showed a clear separation between $\Delta napA$ and WT samples. Results show changes in the expression of 284 genes with a logFC differences higher than 1.5 but lower than 2 (Table S4) and 214 genes with logFC changes higher than 2 (Tables 1, 2). The following analysis will be based mostly on these 214 genes, from which 13 genes were up regulated and 201 were down regulated in $\Delta napA$ conidia, as compared to WT conidia. Using gene ontology (GO) enrichment analysis, *Aspergillus* genome database AspGD (Cerqueira et al., 2014) and

manual annotations, we grouped the genes regulated by NapA as shown in Tables 1, 2.

Our results show that the number of genes negatively regulated by NapA is small (13), compared with the number of genes positively regulated by NapA (201). Among genes most highly repressed by NapA, there is the putative HET (heterokaryon incompatibility) containing domain protein AN7834, the cysteine-rich secreted protein AN7836 and the putative ABC transporter AN7839, which seems to represent the only NapA-regulated ABC-type transporter. In addition, this group includes genes for 3 additional putative transporters (MSF type), 2 oxidoreductases, 1 hydrolase, 1 acetyltransferase, 1 protein with a nucleoside phosphorylase domain and 2 proteins with no identifiable domains (Figure 7A, Table 1).

Among the 201 genes positively regulated by NapA (Figure 7B, Table 2), 12 encode putative (TFs) not yet characterized in *A. nidulans*, most of them belonging to the Zn(2)-Cys(6) DNA-binding domain family. Remarkably, 46 genes encode different types of oxidoreductases, including multiple monooxygenases, dehydrogenases, several members of the P450 cytochrome drug detoxifying enzyme family and the catalase peroxidase CatD/CpeA (AN7388). Other genes encode proteins with lipase, peptidase and other hydrolytic activities. 32 genes encode putative membrane proteins involved in the transport of sugars, drugs, amino acids, metals or other metabolites, 21 of which are members of the major facilitator superfamily (MSF). 29 genes encode proteins with predicted or confirmed hydrolytic enzyme activity. Notably, several of these are related to the hydrolysis of plant cell-wall complex carbohydrates, such as putative cutinase AN10346, alpha-amylase AN3402, endo-beta-1,6-glucanase AN3777, xylanase AN3613, endo-polygalacturonase AN6656, xylosidase AN7275, beta-1,4-endoglucanase AN2388, while xylose inducible alpha-galactosidase *aglC*/AN8138, alpha-xylosidase *agdD*/AN7505, putative beta-glucosidase *bglH*/AN3903, putative alpha-amylase *amyC*/AN4507 were detected as NapA regulated with logFC values between 2 and 1.5 (Table 2 and Table S4). Other hydrolases like putative beta-lactamases AN5422 and AN1826 might be related to antibiotic degradation.

Twenty eight genes encode proteins that have recognizable domains but did not belong to the previous categories. Among these, AN2587 shows the highest LogFC value (8.7), and encodes a putative membrane protein with a cysteine-rich CFEM domain, recently shown to be involved in Fe³⁺ heme acquisition (Nasser et al., 2016). This and the fact NapA also regulates ferric reductase AN7981, putative heme binding protein AN2778 and NRPS SidC (AN0607, siderophore biosynthesis; Table S4) genes supports a NapA role in iron acquisition. Also notable is NapA regulation of several genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites (Tables 2 and Table S4), such as sterigmatocystin (*stcU*/AN7806), penicillin (*ipnA*/AN2622), monodictyphenone and prenyl xanthenes (Bok et al., 2009; Sanchez et al., 2011; Andersen et al., 2013) (*xptB*/AN12402, *mdpB*/AN10049, *mdpC*/AN0146 and *mdpD*/AN0147), all with clear antimicrobial activity. Other genes are involved in the biosynthesis of asperfuranone (*afpE*/AN1034) or unknown metabolites (PKS AN11191). In contrast, NapA has been reported to repress



the production of secondary metabolites in *A. parasiticus* (Reverberi et al., 2008) and *A. nidulans* (Yin et al., 2013) during growing conditions, suggesting that NapA regulates secondary metabolism in opposite ways during growth and conidiation. Finally, NapA regulates at least 54 genes encoding hypothetical proteins with no recognizable domains (**Figure 7B**, **Table 2**).

In summary, our transcriptomic results support a model in which during conidiation NapA regulates functions associated with the successful germination of conidia in natural environments. In the case of *A. nidulans* saprophytic life style this would include a large group of enzymes to degrade plant complex carbohydrates, proteins to transport the corresponding derived sugars and enzymes needed to transform them into acetyl-CoA. NapA also regulates the production of secondary metabolites, such as penicillin, which would prevent growth from competing organisms, as well as enzymes and transporters to detoxify drugs produced by competitors. In the same line, NapA regulates enzymes and proteins involved in iron scavenging, such as those involved in siderophore biosynthesis, iron reduction and transport, and heme acquisition. As such functions are also important during pathogenic interactions, we propose that these and not NapA ROS-detoxification roles, might be relevant for NapA critical virulence roles (Molina and Kahmann, 2007; Guo et al., 2011; Huang et al., 2011), specially when conidia mediate the infection process.

TABLE 1 | Up regulated transcripts in $\Delta napA$ conidia.

Gene	LogFC	Description	Domains
OXIDOREDUCTASES			
AN8449	-2.1	Putative role in nitrate assimilation	Oxidoreductase molybdopterin binding domain,Mo-co oxidoreductase dimerisation domain,Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain,Oxidoreductase FAD-binding domain,Oxidoreductase NAD-binding domain
AN8329	-2.0	Putative glucose oxidase-related protein	GMC oxidoreductase
TRANSPORTER ACTIVITY			
AN7839	-7.9	Conserved hypothetical protein	ABC transporter transmembranal, Vacuolar glutathione S-conjugate transporter
AN2475	-2.4	MFS monosaccharide transporter	SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family,Major Facilitator Superfamily, Sugar (and other)
AN5323	-2.1	MFS sugar transporter	Major Facilitator Superfamily, Major Facilitator Superfamily, Sugar (and other)
AN7796	-2.0	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
HYDROLASES			
AN9027	-2.7	Conserved hypothetical protein	Hydrolase activity, metallo-beta-lactamase superfamily
UNCLASSIFIED			
AN7834	-10.1	Conserved hypothetical protein	Heterokaryon incompatibility HET domain
AN7836	-9.4	Cysteine-rich secreted protein	Not found
AN3384	-2.4	Conserved hypothetical protein	Acetyltransferase family, possible role in trichothecene biosynthesis
AN3557	-2.0	Nucleoside metabolic process	Nucleoside phosphorylase
HYPOTHETICAL PROTEINS WITH NO IDENTIFIED DOMAIN			
AN2838	-2.6	Conserved hypothetical protein	Not found
AN0020	-2.3	Conserved hypothetical protein	Not found

NapA Is Required for *alc* Gene Expression and the Utilization of Ethanol, Arabinose, and Fructose as Sole Carbon Sources

It called our attention that the mRNA levels of genes *alcR* (AN8978; Table S4), *alcA* (AN8979), *alcU* (AN8982; Table S4) and *aldA* (AN0554), all members of the well-studied ethanol system (Fillinger and Felenbok, 1996), were clearly reduced in $\Delta napA$ conidia. The ethanol system is composed by genes *alcP*, *alcR*, *alcO*, *alcA*, *alcM*, *alcS*, and *alcU*, all clustered in chromosome VII and *aldA* located in chromosome VIII. *alc* genes share the same regulation, being strongly induced by the physiological inducer acetaldehyde and the non-physiological inducer 2-butanone (Flipphi et al., 2002). They are also subject to strict control by the transcriptional activator AlcR and are repressed by glucose via the CreA repressor (Fillinger and Felenbok, 1996). However, only AlcR, alcohol dehydrogenase I AlcA, and aldehyde dehydrogenase AldA are required for ethanol utilization, and the specific function of the other *alc* genes is unknown. Yet, AlcS is a membrane protein with homology to acetate transporters that is nevertheless dispensable for growth on ethanol, acetaldehyde or acetate (Flipphi et al., 2006). Therefore, we decided to confirm *alcR*, *alcA* and *aldA* expression results by using qPCR. Results in Figure 7C show that indeed, the accumulation of the corresponding mRNAs in conidia depends on NapA.

To test the physiological significance of NapA-mediated *alc* gene regulation, we examined the ability of $\Delta napA$ mutants to grow on ethanol as sole carbon source. As control we included a *creA*^{d204} mutant, which shows derepressed expression of *alcA* in the presence of glucose (Shroff et al., 1996). Since AlcA transforms allyl alcohol (AA) into the toxic compound

acrolein, this *creA* mutant is unable to grow on glucose plus AA (Figures 8A,B). Notably, $\Delta napA$ conidia and mycelia were unable to grow on ethanol, supporting NapA function in proper *alcA* expression. However, the $\Delta napA$ mutant was also unable to grow on glucose plus AA (Figures 8A,B). AA/acrolein causes oxidative stress and induces Yap1 activation in *S. cerevisiae* (Kwolek-Mirek et al., 2009; Golla et al., 2015) and therefore it might result particularly toxic for the $\Delta napA$ mutant. To test this, we generated $\Delta alcA$ and $\Delta napA \Delta alcA$ mutants and examined them for ethanol utilization and AA resistance. As seen in Figure 8C, the $\Delta alcA$ mutant is not sensitive to H₂O₂ and is unable to grow on ethanol and is fully resistant to AA. In contrast, a $\Delta napA \Delta alcA$ mutant is sensitive to H₂O₂, unable to grow on ethanol and more sensitive to AA than the $\Delta alcA$ mutant, supporting the idea that $\Delta napA$ mutants are *per se* more sensitive to AA. The failure to grow in 1% ethanol was not remediated by the presence of the antioxidant N-acetylcysteine (5 mM) suggesting that such failure is related to the reduced expression of the *alc* genes. However, it cannot be excluded that this might be also related to an increased ethanol sensitivity of the $\Delta napA$ mutants. In summary, these results show that NapA is required for expression of the *alc* regulon during asexual development and for growth on ethanol, adding a new level of regulation to the well known pathway.

These results prompted us to determine if NapA and TrrR and AtfA were also required for conidia germination and growth on ethanol or other alternative carbon sources. As seen in Figure 9, NapA was also required for arabinose and fructose utilization, while SrrA was partially required for glycerol utilization and AtfA was dispensable for the utilization of other carbon sources tested. These results indicate that NapA plays

TABLE 2 | Down regulated transcripts in *ΔnapA* conidia.

Gene	LogFC	Description	Domains
DNA BINDING			
AN8426	3.3	Conserved hypothetical protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain, Fungal specific transcription factor dor
AN3769	3.0	C6 transcription factor	Fungal specific transcription factor domain
AN7118	2.9	Putative transcription factor	Fungal specific transcription factor domain, Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster dor Zinc finger, C ₂ H ₂ type
AN8103	2.8	Putative transcription factor	Zn(II)2Cys6 transcription factor
AN4720	2.5	conserved hypothetical protein	Zinc finger, C ₂ H ₂ type
AN10897	2.4	C6 zinc finger domain-containing protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain
AN7061	2.3	Conserved hypothetical protein	Fungal specific transcription factor domain, Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster dor
AN11831	2.3	Conserved hypothetical protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain, Fungal specific transcription factor dor
AN4626	2.3	Putative Zn(II)2Cys6 transcription factor	Has domain(s) with predicted RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, zinc ion binding activity, role in regulation of transcription, DNA-templated and nucleus localization
AN8666	2.2	C6 finger domain-containing protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain
AN7346	2.0	Conserved hypothetical protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain, Fungal specific transcription factor dor
AN2667	2.0	C6 transcription factor	Fungal specific transcription factor domain
OXIDOREDUCTASES			
AN7418	5.5	FAD monooxygenase	With predicted FAD binding, oxidoreductase activity and role in metabolic process
AN7981	3.8	Ferric-chelate reductase	FAD-binding domain
AN10388	3.6	Conserved hypothetical protein	Berberine and berberine like, FAD binding domain
AN11191	3.6	Polyketide synthase	Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain, Beta-ketoacyl synthase, C-terminal dor Acyl transferase domain, short chain dehydrogenase, KR domain
AN6096	3.4	Conserved hypothetical protein	Aldo/keto reductase family
AN8349	3.3	Salicylate hydroxylase	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, FAD binding domain
AN0330	3.2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase family
AN10099	3.2	Pyridoxamine phosphate oxidase	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
AN2504	3.1	Conserved hypothetical protein	FAD dependent oxidoreductase
AN0618	3.1	Oxidoreductase	KR domain, short chain dehydrogenase
AN10005	3.0	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	Short chain dehydrogenase
AN8979	2.8	AlcA, Alcohol dehydrogenase I	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain, Zinc-binding dehydrogenase
AN4643	2.8	Conserved hypothetical protein	Cytochrome P450
AN2704	2.8	Conserved hypothetical protein	GMC oxidoreductase
AN10296	2.8	FAD dependent oxidoreductase	FAD binding domain, flavo_cyto_c: flavocytochrome c, FAD dependent oxidoreducte Flavin containing amine oxidoreductase
AN6414	2.8	Conserved hypothetical protein	Cytochrome P450
AN2682	2.8	12-oxophytodienoate reductase	NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase family
AN1548	2.7	Short-chain dehydrogenase	Not found
AN10667	2.7	Alcohol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain, Zinc-binding dehydrogenase
AN2723	2.7	Histidinol dehydrogenase	Histidinol dehydrogenase, hisD: histidinol dehydrogenase
AN7388	2.6	Catalase-peroxidase	Peroxidase, cat_per_HPI: catalase/oxidase HPI
AN5287	2.6	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	Acyl-CoA dehydrogenase, middle domain, Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal dor
AN5421	2.5	Steroid monooxygenase	Not found
AN3400	2.5	Short chain type dehydrogenase	KR domain, short chain dehydrogenase
AN3206	2.5	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	GMC oxidoreductase
AN7415	2.5	Conserved hypothetical protein	FAD binding domain
AN1034	2.5	Polyketide synthase	NAD dependent epimerase/dehydratase , short chain dehydrogenase, Methyltransfe domain, Male sterility protein, Acyl transferase domain, Phosphopantetheine attachn site, Beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain, Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain
AN0027	2.5	Cyclohexanone monooxygenase	Flavin-binding monooxygenase-like, Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
AN0554	2.4	Aldehyde dehydrogenase ALDH	Aldehyde dehydrogenase family
AN5854	2.4	Oxidoreductase	2-nitropropane dioxygenase, FMN-dependent dehydrogenase, Conserved region in glutamate synthase

(Contir

TABLE 2 | Continued

Gene	LogFC	Description	Domains
AN8547	2.3	GMC oxidoreductase	GMC oxidoreductase
AN2389	2.3	Ketopantoate reductase	Ketopantoate reductase PanE/ApbA C terminal, apbA_panE: 2-dehydropantoate 2-reductase, Ketopantoate reductase PanE/ApbA
AN1825	2.3	Sulfide:quinone oxidoreductase	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
AN11096	2.3	Conserved hypothetical protein	Short chain dehydrogenase
AN5360	2.3	Conserved hypothetical protein	Cytochrome P450
AN5373	2.3	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	Short chain dehydrogenase, 23BDH: acetoin reductases
AN8250	2.3	Conserved hypothetical protein	Cytochrome P450
AN4126	2.3	Aldehyde dehydrogenase	Aldehyde dehydrogenase family
AN2396	2.3	Conserved hypothetical protein	NAD dependent epimerase/dehydratase family
AN2666	2.2	Sorbitol/xylitol dehydrogenase	Zinc-binding dehydrogenase, bchC: Chlorophyll synthesis pathway, bchC, Alcohol dehydrogenase GroES-like domain
AN9315	2.2	Conserved hypothetical protein	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
AN2335	2.2	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	NAD binding domain of 6-phosphogluconate
AN4829	2.1	Alcohol dehydrogenase	Aldo/keto reductase family
AN3399	2.0	FAD binding oxidoreductase	FAD binding domain
AN5550	2.0	Conserved hypothetical protein	FAD binding domain
AN6659	2.0	Short chain dehydrogenase	KR domain, short chain dehydrogenase, NAD dependent epimerase/dehydratase
TRANSPORTER ACTIVITY			
AN9000	4.4	MFS transporter	Major Facilitator Superfamily
AN10891	3.8	High-affinity glucose transporter	SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family, Sugar (and other), Major Facilitator Superfamily
AN8981	3.6	AlcS, conserved hypothetical protein	GPR1/FUN34/yaaH family
AN6019	3.5	MFS transporter	Major Facilitator Superfamily
AN12129	3.0	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily, Sugar (and other) transporter
AN2368	3.0	Membrane transporter	Major Facilitator Superfamily
AN9010	2.8	MFS nicotinic acid transporter Tna1	Major Facilitator Superfamily
AN2699	2.8	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily, Ion channel regulatory protein UNC-93
AN7380	2.7	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
AN11211	2.6	Uracil permease	Permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin, ncs1: NCS1 nucleoside transporter family
AN5275	2.6	Choline transporter	Amino acid permease
AN2665	2.5	MFS sugar transporter	Major Facilitator Superfamily, Major Facilitator Superfamily, Sugar (and other)
AN2358	2.5	Conserved hypothetical protein	Sugar (and other), Major Facilitator Superfamily
AN8995	2.5	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
AN3207	2.5	Amino acid transporter	Transmembrane amino acid transporter protein
AN9165	2.4	Conserved hypothetical protein	Sugar (and other) transporter, Major Facilitator Superfamily
AN3352	2.4	Conserved hypothetical protein	ncs1: NCS1 nucleoside transporter family, Permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin
AN2201	2.4	Proline permease	Amino acid permease
AN8352	2.4	Carboxylic Transporter	Not found
AN8941	2.4	Na/K ATPase alpha 1 isoform	Cation transporting ATPase, C-terminus, haloacid dehalogenase-like hydrolase, ATPase_P-type: HAD ATPase, P-type, family IC, E1-E2 ATPase
AN2959	2.3	Allantoate transporter	Major Facilitator Superfamily
AN6063	2.2	MFS transporter	Major Facilitator Superfamily, 2_A_01_02: Multidrug resistance protein, Sugar (and other) transporter, pump (TRI12)
AN12222	2.2	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
AN8955	2.2	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
AN3503	2.2	Allantoate permease	Major Facilitator Superfamily
AN5187	2.1	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ antiporter	Sodium/hydrogen exchanger family
AN2814	2.1	MFS lactose permease	Major Facilitator Superfamily, SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family
AN6960	2.1	Conserved hypothetical protein	WD domain, G-beta repeat, Ankyrin repeat, CorA-like Mg ²⁺ transporter

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Gene	LogFC	Description	Domains
AN6451	2.1	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily, Sugar (and other) transporter, 2_A_01_02: Multidrug resistance protein, Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)
AN7067	2.0	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily, SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family, Sugar (and other)
AN10305	2.0	Vacuolar membrane ATPase C	V_ATP_synt_C: V-type ATPase, C subunit, ATP synthase subunit C
AN9336	2.0	Conserved hypothetical protein	Major Facilitator Superfamily
HYDROLASES			
AN2690	4.0	Conserved hypothetical protein	Glycosyl hydrolases family 16
AN10346	3.8	Cutinase	Cutinase, Phospholipase/Carboxylesterase
AN3402	3.8	Alpha-amylase	Starch binding domain, Domain of unknown function (DUF1966), Alpha amylase, catalyt domain
AN8899	3.8	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme, ACC_deam: 1-aminocyclopropane-1-
AN5422	3.8	Beta-lactamase	Beta-lactamase
AN6097	3.7	Conserved hypothetical protein	3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme
AN2834	3.5	Conserved hypothetical protein	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
AN1792	3.5	GDSL Lipase/Acylhydrolase	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
AN2539	3.3	Haloalkanoic acid dehalogenase	HAD_type_II: haloacid dehalogenase, type II, HAD-SF-IA-v2: HAD hydrolase, family IA, variant 2
AN3777	3.1	Endo-beta-1,6-glucanase	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5)
AN0022	3.1	Alpha-galactosidase/alpha-n-acetylgalactosaminidase	Melibiase
AN11051	3.0	Extracellular chitosanase CsnC	Fungal chitosanase
AN3613	2.8	Xylanase	Glycosyl hydrolases family 11
AN5060	2.7	Conserved hypothetical protein	Has domain(s) with predicted arylformamidase activity and role in tryptophan catabolic process to kynurenine
AN11219	2.7	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	Amidase
AN10333	2.7	Metallopeptidase, putative	Has domain(s) with predicted hydrolase activity and role in metabolic process
AN6656	2.6	Endo-polygalacturonase D	Glycosyl hydrolases family 28
AN9518	2.5	Haloalkanoic acid dehalogenase	HAD_type_II: haloacid dehalogenase, type II, HAD-SF-IA-v2: HAD hydrolase, family IA, variant 2
AN7275	2.5	Xylosidase/glycosyl hydrolase	Glycosyl hydrolases family 43
AN0181	2.4	Conserved hypothetical protein	Thioesterase superfamily
AN8977	2.4	AlcP, Conserved hypothetical protein	Strictosidine synthase, SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like region
AN5608	2.4	Conserved hypothetical protein	Carboxylesterase
AN1043	2.3	Conserved hypothetical protein	Glycosyl hydrolases family 43
AN2779	2.2	Dipeptidase	Amidohydrolase family
AN2388	2.2	Beta-1,4-endoglucanase	Not found
AN1826	2.1	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein	Metallo-beta-lactamase superfamily
AN2424	2.1	Beta-N-acetylhexosaminidase	Glycosyl hydrolase family 20, catalytic domain
AN7911	2.1	Conserved hypothetical protein	Amidohydrolase
AN2777	2.0	Fumarylacetoacetate hydrolase	Fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase family, alpha/beta hydrolase fold
UNCLASSIFIED			
AN2587	8.7	Conserved hypothetical protein	CFEM domain
AN11810	3.7	Putative GNAT-type acetyltransferase	Not found
AN8980	3.4	AlcM, conserved hypothetical protein	Not found
AN8092	3.3	Conserved hypothetical protein	pfs domain Potential Cdc28p substrate
AN0180	3.0	Putative Enoyl-CoA hydratase	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family
AN7539	3.0	Hydrophobin	Fungal hydrophobin
AN8913	3.0	Predicted glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein	Not found

(Continue

TABLE 2 | Continued

Gene	LogFC	Description	Domains
AN8614	2.7	Conserved hypothetical protein	Cupin domain
AN9354	2.7	Putative transcription factor	NmrA-like family Transcription factor
AN2954	2.6	Extracellular serine-rich protein	Not found
AN1982	2.5	Cell cycle regulatory protein, putative	WD domain
AN5273	2.5	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family, HMGL-like
AN8468	2.2	Wd-repeat protein	NACHT domain, WD domain
AN9297	2.2	FAD binding, oleate hydratase activity and role in fatty acid metabolic process	Not found
AN8622	2.2	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	PhoD-like phosphatase
AN1046	2.2	Chitin synthase D	Chitin synthase
AN2022	2.2	Putative heterokaryon incompatibility protein	Not found
AN11080	2.1	DMATS type aromatic prenyltransferase	Tryptophan dimethylallyltransferase, arom_pren_DMATS: aromatic prenyltransferase, DMATS type
AN3730	2.1	1,3-beta-glucanosyltransferase	X8 domain, Glycolipid anchored surface protein (GAS1)
AN0017	2.1	Conserved hypothetical protein	CutC family
AN2623	2.1	Acyl-coenzyme A:6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase	Not found
AN5833	2.1	Acyl-CoA synthetase	AMP-binding enzyme, Domain of unknown function (DUF3448)
AN7279	2.1	GPI anchored protein poly(beta-D-mannuronate) lyase activity	Not found
AN2346	2.1	Conserved hypothetical protein	Pfs domain
AN10302	2.1	Hypothetical protein	NACHT domain
AN3159	2.0	Conserved hypothetical protein	RasGEF domain
AN8368	2.0	Conserved hypothetical protein	Spherulation-specific family 4
AN2778	2.0	Conserved hypothetical protein	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain
HYPOTHETICAL PROTEINS WITH NO IDENTIFIED DOMAINS			
AN2676	4.9	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7203	3.5	Conserved hypothetical protein	Not found
AN8369	3.4	Predicted protein	Not found
AN11341	3.2	Predicted protein	Not found
AN10086	3.1	DUF1446 domain-containing protein	Protein of unknown function (DUF1446)
AN9331	3.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN6797	3.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN4122	3.1	Conserved hypothetical protein	Protein of unknown function
AN2322	3.0	Conserved hypothetical protein	Not found
AN10360	2.9	Conserved hypothetical protein	Not found
AN9323	2.9	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7261	2.8	Conserved hypothetical protein	Not found
AN5190	2.8	Conserved hypothetical protein	Not found
AN2700	2.8	Conserved hypothetical protein	Not found
AN0972	2.7	Conserved hypothetical protein	Not found
AN2750	2.7	Conserved hypothetical protein	Not found
AN1928	2.7	Conserved hypothetical protein	Not found
AN12341	2.7	Hypothetical protein	Not found
AN1042	2.7	Conserved hypothetical protein	Not found
AN10326	2.6	Predicted protein	Not found
AN7333	2.6	Conserved hypothetical protein	Not found
AN12061	2.6	Conserved hypothetical protein	Not found
AN8240	2.6	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7985	2.5	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11290	2.5	Conserved hypothetical protein	Not found

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Gene	LogFC	Description	Domains
AN7270	2.5	Conserved hypothetical protein	Not found
AN4554	2.5	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11809	2.5	Conserved hypothetical protein	Not found
AN2041	2.4	Conserved hypothetical protein	Not found
AN10048	2.4	Conserved hypothetical protein	Not found
AN1925	2.4	Conserved hypothetical protein	Not found
AN8994	2.4	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11281	2.4	Conserved hypothetical protein	Not found
AN12238	2.3	Conserved hypothetical protein	Not found
AN10320	2.3	Conserved hypothetical protein	Not found
AN9521	2.2	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7124	2.2	Conserved hypothetical protein	Not found
AN4319	2.2	Conserved hypothetical protein	Not found
AN0005	2.2	Hypothetical protein	Not found
AN4136	2.2	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11585	2.2	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7976	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11872	2.1	Predicted protein	Not found
AN8148	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN6648	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN11777	2.1	Predicted protein	Not found
AN11865	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN0481	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN8008	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN1649	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN7099	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN8740	2.1	Conserved hypothetical protein	Not found
AN4642	2.0	Conserved hypothetical protein	Not found
AN0539	2.0	Conserved hypothetical protein	Not found

important role in the utilization of carbon sources alternative to glucose.

NapA Is Localized in Nuclei during Growth in Ethanol or Glucose Starvation

Having found that NapA is necessary for proper growth in arabinose and fructose, we explored NapA localization during growth in poor carbon sources, as well as during glucose starvation. Results in **Figure 10** show that as it occurs during growth in glucose, NapA expression is very low during growth in arabinose and fructose as sole carbon sources. In contrast, NapA::GFP expression was induced during growth in ethanol, as well as during glucose starvation, and NapA::GFP nuclear localization was detected between 60 and 120 min after shifting to ethanol or glucose lacking media. In addition, we found that an osmotic stress treatment with 1 M NaCl is able to induce NapA nuclear localization under normal glucose growth conditions (**Figure S7**), despite the fact that $\Delta napA$ mutants are not sensitive to osmotic stress.

DISCUSSION

AtfA, SrrA, and NapA Play Non-redundant and Differential Roles in the Antioxidant Response

At least three pathways, mediated by TFs, AtfA, SrrA and NapA are involved in fungal responses to oxidative and other types of stress and we have studied them here in the same organism. We have reported that four catalases present in *A. nidulans* display differential regulation during growth, stress and development (Navarro et al., 1996; Navarro and Aguirre, 1998; Kawasaki and Aguirre, 2001). Notably, catalase CatA is found only in asexual and sexual spores, despite the fact that *catA* mRNA accumulates under many stress conditions (Navarro and Aguirre, 1998; Luján Rojas et al., 2011). Our results here show that TFs, AtfA, SrrA and NapA are essential components in such catalase gene regulation. NapA and SrrA are both required for CatB induction by H₂O₂, while only AtfA is required for CatA expression in conidia and no other TF is required for CatB induction during late stationary phase of growth, while CatD/CpeA activity levels are influenced

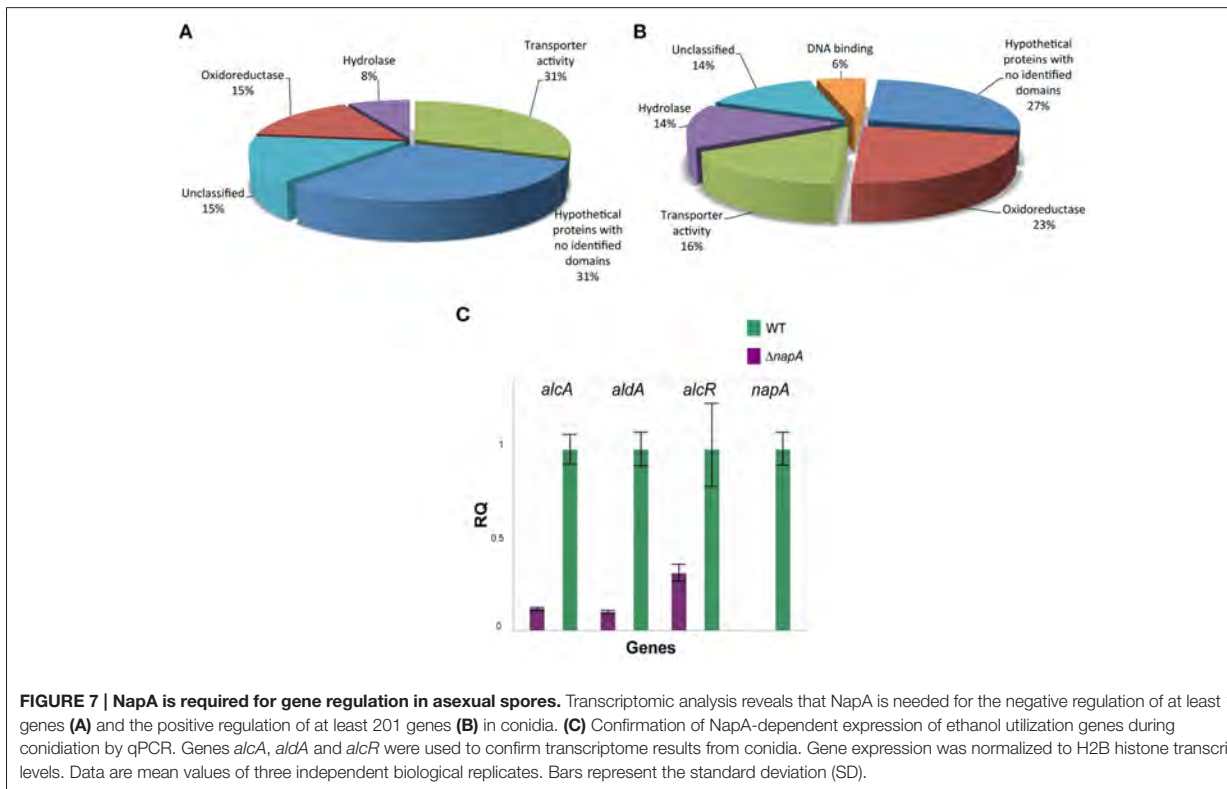


FIGURE 7 | NapA is required for gene regulation in asexual spores. Transcriptomic analysis reveals that NapA is needed for the negative regulation of at least 201 genes (A) and the positive regulation of at least 201 genes (B) in conidia. (C) Confirmation of NapA-dependent expression of ethanol utilization genes during conidiation by qPCR. Genes *alcA*, *aldA* and *alcR* were used to confirm transcriptome results from conidia. Gene expression was normalized to H2B histone transcript levels. Data are mean values of three independent biological replicates. Bars represent the standard deviation (SD).

SrrA. The phenotypic analysis of oxidative stress resistance using $\Delta napA$, $\Delta srrA$, and $\Delta atfA$ single, double and triple mutants also showed that TFs NapA, SrrA, and AtfA play differential roles in oxidative stress resistance.

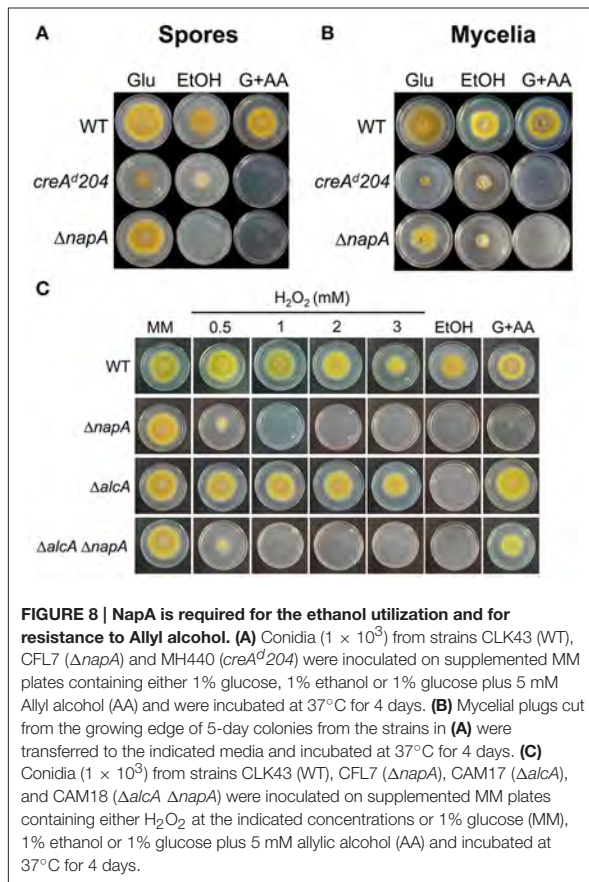
The functions of Ap1-like TFs in different fungi show both similarities and differences. For example and in contrast to our results, *yapA* deletion in symbiotic fungus *Epichloë festucae* causes sensitivity to H₂O₂ and *t*-BOOH in conidia but not in mycelia and YapA, instead of AtfA, is required for expression of the spore-specific catalase *CatA* (Cartwright and Scott, 2013). *Neurospora crassa* mutants lacking the NapA homolog *NcAp-1* were reported as showing no sensitivity to osmotic stress and only a slight sensitivity to H₂O₂ (Takahashi et al., 2010), although recent work showed that mutants were sensitive to osmotic stress, cadmium and H₂O₂ (Tian et al., 2011). In *Magnaporthe oryzae* inactivation of NapA homolog MoAP1 causes only a mild sensitivity to H₂O₂ (Guo et al., 2011), while *Ustilago maydis* *yap1* null mutants are sensitive to H₂O₂ and their virulence is significantly reduced (Molina and Kahmann, 2007). *A. fumigatus*, *yap1* null mutants are also sensitive to H₂O₂ and menadione but not affected in pathogenicity (Lessing et al., 2007).

Like in the case of Yap1 and Pap1, the activation of NapA homologs by H₂O₂ results in nuclear accumulation in all filamentous fungi where this has been studied, and in *U. maydis* two Yap1 conserved cysteines (Cys-399 and Cys-407) were shown to be crucial for both, nuclear accumulation and functionality (Molina and Kahmann, 2007). An additional level

of redox regulation has been proposed in *A. nidulans*, where the CCAAT-binding complex (CBC) represses *napA* expression under low ROS levels, while high ROS levels result in oxidation of two cysteines in HapC CBC subunit, and the transcript activation of *napA* (Thön et al., 2010). We found that in addition to H₂O₂ and menadione, osmotic stress (Figure S7), glucose starvation stress and growth on ethanol also induced nuclear localization, supporting the idea that different types of stress can all lead to oxidative stress (Hansberg and Aguiar 1990).

GpxA, TpxA, and TpxB Peroxiredoxin Function in the Antioxidant Response and Conidiation

We analyzed the role of Gpx3 peroxiredoxin homolog Gp and Tpx1 homologs TpxA and TpxB in NapA antioxidant and developmental functions. We found that none of the peroxiredoxins was required for H₂O₂ or menadione resistance and therefore are unnecessary for NapA activation. This is consistent with results in *E. festucae*, where peroxiredoxin Gpx3 (GpxA) and Tpx1 (TpxA) were not needed for yeast H₂O₂-induced nuclear accumulation (Cartwright and Scott 2013). On the contrary, *M. oryzae* mutants lacking Gp functional homolog MoHYR1 are sensitive to H₂O₂, fail to express several genes related to the antioxidant response and show reduced virulence. However, initial data showing that



MoYap1 mutants are not affected in pathogenicity indicates that MoHYR1 functions in virulence are not mediated by MoYap1 (Huang et al., 2011). In *A. fumigatus* AfYap1 also accumulates in the nuclei in response to H_2O_2 and notably, GpxA homolog AspF3 and TpxA require AfYap1 for its H_2O_2 -mediated induction (Lessing et al., 2007). These and our results suggest that NapA might be required for H_2O_2 -induced expression of *gpxA*, *tpxA* and *tpxB*. A minor direct or indirect role for these peroxiredoxins in H_2O_2 detoxification is indicated by the fact that in a $\Delta napA$ background, the simultaneous inactivation of Gpx3, TpxA, and TpxB resulted in increased sensitivity to H_2O_2 . Our results suggest that TpxA and NapA regulate conidiation through the same pathway. One possibility is that NapA mediates TpxA induction during conidiation, although we did not detect *tpxA* mRNA in our transcriptomic experiments, and TpxA could in turn regulate other activities needed for full sporulation.

NapA Regulates Development

We reported that the regulated production of ROS is essential for fungal sexual development (Lara-Ortiz et al., 2003; Cano-Domínguez et al., 2008), a finding demonstrated in several fungi (Malagnac et al., 2004; Siegmund et al., 2013; Dirschnabel et al.,

2014). In addition to their roles in the antioxidant response, AtfA and SrrA play different roles in gene regulation during development. AtfA mediates SakA roles in sexual development and conidial viability (Kawasaki et al., 2002; Lara-Rojas et al., 2011), while SrrA is required for normal conidiation and conidial viability (Vargas-Perez et al., 2007). The results reported here uncovered a novel developmental role for NapA, by showing that NapA represses sexual development and is needed for full conidiation, as well as for the accumulation of multiple mRNAs in conidia. The requirement for increased ROS levels during sexual development is consistent with the fact that $\Delta napA$ mutants show an increased production of fruiting bodies, as NapA is required to maintain low ROS levels and to express genes involved in the biosynthesis of cleistothecial melanin, a well-known antioxidant.

The lower conidiation observed in $\Delta napA$ mutants might be related to their lower expression of *gmcA* gene (AN8547), encoding a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for early stages of conidiophore development (Etxebeste et al., 2012). The fact that GmcA ortholog AFUA_3G01580 is also induced by H_2O_2 in an AfYap1-dependent manner in *A. fumigatus* (Lessing et al., 2007) suggests that *gmcA* regulation by NapA is conserved, at least in the Aspergilli. Moreover, NapA roles in development might be conserved in fungi. In *M. oryzae* MoAP1 deletion causes only mild sensitivity to H_2O_2 but mutants show a drastic reduction in formation of aerial mycelium and conidiation. Notably, the same phenotypes are observed in mutants affected in MoAP1 regulated genes MGG_01230 and MGG_15157, encoding succinic semialdehyde dehydrogenase MoSsadh and acetyltransferase MoAct, respectively (Guo et al., 2011), which however we did not detect as NapA-dependent. In the dimorphic fungus *Talaromyces marneffeii*, *yapA* mutants are sensitive to H_2O_2 and menadione, show decreased radial growth, produce conidiophores with fewer phialides and conidia, and conidia show decreased germination rates, while yeast cells fail to undergo binary fission (Dankai et al., 2016). Overall, the developmental roles of TFs long associated only with ROS detoxification support the role of ROS as developmental signals (Hansberg and Aguirre, 1990; Aguirre et al., 2005).

Genes Regulated by NapA during Asexual Development

A comparison between Ap1-like dependent regulons under H_2O_2 stress shows common themes in different fungi. DNA microarray analysis of *yap1*-dependent genes in *U. maydis* identified 221 down regulated genes with a fold change >1.5 , that included genes for ROS decomposing enzymes and enzymes involved in biosynthesis of low molecular weight antioxidants and NADPH generation (Molina and Kahmann, 2007). Similarly, in *Cochliobolus heterostrophus* CHAP1-dependent genes included genes for thioredoxin reductase, γ -glutamyl cysteine synthetase, glutathione reductase, glutathione synthetase and thioredoxin (Lev et al., 2005). In *B. cinerea*, genes for catalaseC, thioredoxin reductase, glutaredoxin, glutathione-S-transferase1, thioredoxin and a hypothetical glutathione-S-transferase were found to be Bap1-dependent (Temme and Tudzynski, 2009) and

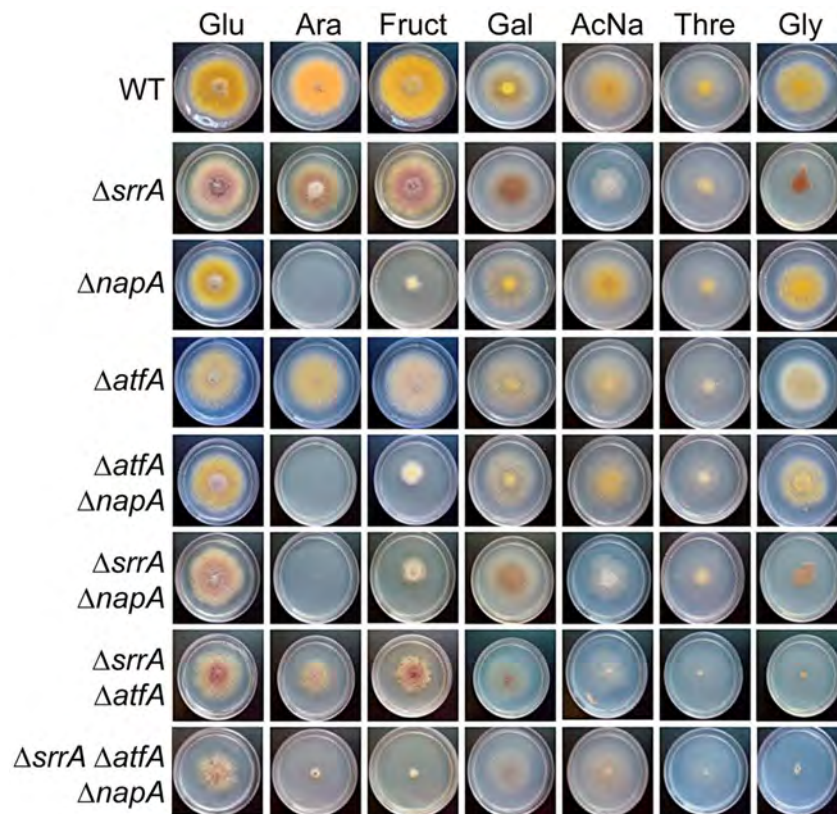


FIGURE 9 | NapA is also necessary for the utilization of arabinose and fructose as sole carbon sources. Conidia (1×10^3) from strains CLK43 (WT), COSsrrA3 ($\Delta srrA$), CFL7 ($\Delta napA$), TFL $\Delta atfA$ -04 ($\Delta atfA$), CAM7 ($\Delta atfA \Delta napA$), CAM6 ($\Delta srrA \Delta napA$), CAM8 ($\Delta srrA \Delta atfA$), and CAM9 ($\Delta srrA \Delta atfA \Delta napA$) were inoculated on supplemented MM plates containing either glucose (Glu), arabinose (Ara), fructose (Fruct), galactose (Gal), sodium acetate (AcNa), threonine (Thre) or 1% glycerol (Gly) as sole carbon sources and incubated at 37°C during 4 days.

a similar pattern was observed in *A. fumigatus* (Lessing et al., 2007).

Overall, such relatively conserved H₂O₂-induced Ap1-mediated gene expression patterns are different from the one we observe during conidiation. Indeed, we do not find genes involved in major NADPH or GSH generation pathways. Instead, we find a large number of genes involved in drug efflux and detoxification, including several genes for enzymes with putative cytochrome P450 activity, as well as other oxidases. Notably, Yap1 (Lee et al., 1999) and Pap1 (Chen et al., 2008) regulate genes coding for efflux pumps and dehydrogenases that seem necessary for defense against multiple drugs. In fact, *pap1* was first identified as a gene whose overexpression conferred resistance to drugs like brefeldin A, staurosporine or caffeine (Toda et al., 1991). Furthermore, Calvo et al. (2012) have shown that in response to H₂O₂ Pap1 requires the transcription factor Prr1 to activate the antioxidant but not the drug tolerance genes, providing a possible mechanism to explain the major role that NapA shows in the regulation of drug tolerance genes during conidiation. Indeed, the possibility that NapA plays overlapping

but different functions during oxidative stress, conidiation sexual development deserves further research.

Among the NapA-dependent genes, we also identified members of the cupin superfamily, which includes many dependent and independent enzymes, as well as catalytically inactive proteins associated with abiotic stress and quiescent structures. AN8614 encodes a single-domain 153 amino-acid cupin showing similarity to germins and oxalate oxidase (Dunwell et al., 2000), some of which surprisingly also show superoxide dismutase activity (Woo et al., 2000). AN8614 encodes a 305 amino-acid protein identified as a spherulin-like protein. We detected that AN8368 is an ortholog of AN2 in *A. fumigatus* and *A. clavatus* Sph3, which corresponds to a glycoside hydrolase essential for the biosynthesis of exopolysaccharide galactosaminogalactan (Bamford et al., 2007).

The Role of NapA in Carbon Catabolism

Conidia and mycelia from $\Delta napA$ mutants are unable to grow on ethanol and arabinose and show reduced growth on fructose as sole carbon sources. A derepression of *alcA* during conidia

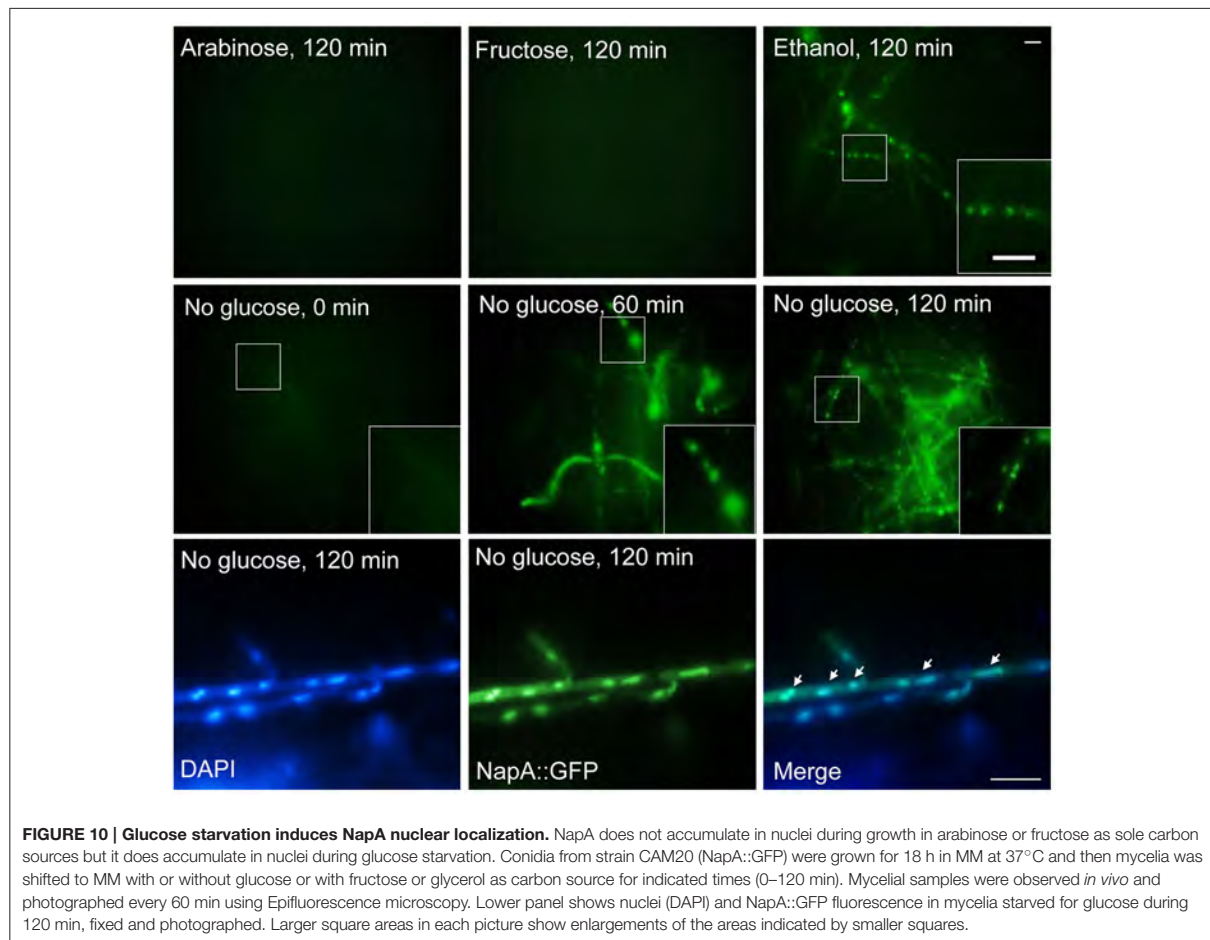


FIGURE 10 | Glucose starvation induces NapA nuclear localization. NapA does not accumulate in nuclei during growth in arabinose or fructose as sole carbon sources but it does accumulate in nuclei during glucose starvation. Conidia from strain CAM20 (NapA::GFP) were grown for 18 h in MM at 37°C and then mycelia was shifted to MM with or without glucose or with fructose or glycerol as carbon source for indicated times (0–120 min). Mycelial samples were observed *in vivo* and photographed every 60 min using Epifluorescence microscopy. Lower panel shows nuclei (DAPI) and NapA::GFP fluorescence in mycelia starved for glucose during 120 min, fixed and photographed. Larger square areas in each picture show enlargements of the areas indicated by smaller squares.

was observed before in conidiation defective mutants carrying alleles of the affected gene fused to the *alcA* promoter (Arratia-Quijada et al., 2012). The lack of growth on ethanol can be at least partially explained by the fact that NapA is required for full expression of *alcR*, *alcA*, and *aldA* genes during conidiation and presumably also during mycelial growth. Since NapA is needed for normal expression of AlcR and this TF is required for its own transcription, it seems likely that AlcR mediates the regulation of *alcP*, *alcA*, *alcM*, *alcS*, and *aldA* exerted by NapA. In this scenario *alcR* full expression might require CreA derepression, activation by NapA, as well as AlcR autoinduction. The fact that *alcR* promoter contains putative Ap1 binding sites is consistent with this interpretation. It seems unlikely that CreA represses *napA* expression because NapA antioxidant function must be required during normal glucose metabolism. In addition, *creA^{d204}* mutants do not show increased resistance to H₂O₂ and qPCR analysis did not show increased *napA* mRNA levels in conidia from the *creA^{d204}* mutant, as compared to wild type conidia (not shown). Three lines of evidence indicate that ethanol utilization represents a condition in which NapA antioxidant

role becomes more important. First, NapA is required for full expression of most *alc* genes during conidiation. Second, ethanol growth induces *napA* expression and NapA nuclear localization. Third, NapA is needed for growth in ethanol. Evidence indicates that ethanol toxicity is mediated by AlcA product acetaldehyde which itself can cause oxidative stress. Interestingly, it has been considered unlikely that ethanol catabolism alone requires such a high expression levels and subtle regulation of the *alc* genes (Flippin et al., 2006). We have added another regulation layer that might help to understand the physiological significance of this complex regulation.

NapA requirement to utilize arabinose and fructose might be explained at different levels. First, NapA is necessary for transcript accumulation of the xylitol/sorbitol dehydrogenase (AN2666) in conidia and possibly in mycelia. AN2666 is 52% identical to *A. niger* enzyme XdhA, which participates in conversion of xylitol to D-xylulose during arabinose metabolism (de Groot et al., 2007). Xylitol/sorbitol dehydrogenase also shows 77% identity to SdhA, an enzyme involved in reversible transformation between fructose and

sorbitol (Koivistoinen et al., 2012). This suggests that AN2666 participates in fructose assimilation and is essential for arabinose assimilation. In addition, arabinose and/or fructose transport might be compromised in $\Delta napA$ mutants, considering that NapA regulates several genes encoding proteins with transport activity. Among these, AN10891 and AN2665 encode proteins that are 28 and 26% identical to *B. cinerea* fructose specific transporter FRT1 (Doehlemann et al., 2005). Second, arabinose and fructose metabolism share some regulatory steps. Within the Aspergilli transcriptional activators AraR, GalR and XlnR regulate the metabolic conversion of L-arabinose, D-galactose and D-xylose, respectively. A recent report shows that both AraR and XlnR regulate the pentose catabolism genes, as well as the oxido-reductive D-galactose catabolic pathway (Kowalczyk et al., 2015). However, it is interesting that mutants lacking both AraR and XlnR still show a detectable growth on arabinose, indicating the participation of additional regulatory mechanisms. Also interesting is that *A. niger* XlnR is somehow related to ROS metabolism, as *xlnR* null mutants are sensitive to oxidative stress and show a qualitative increase in ROS levels (Raulo et al., 2016). Third, NapA homologs are necessary for expression of enzymes involved in the generation of cellular reducing power (NADPH, GSH and thioredoxins). Although this was not detected during conidiation, during growth *A. nidulans* $\Delta napA$ mutants show a decreased GSH/GSSG ratio and a 1.6 fold decrease in total glutathione content when compared to a WT strain (Thön et al., 2010). This is consistent with the fact that $\Delta napA$ mutants are very sensitive to AA/acrolein, known to cause GSH depletion (Kwolek-Mirek et al., 2009). Such a decrease in reducing power might provide additional difficulties in catabolizing carbon sources that are more demanding on these resources. Indeed, ethanol and arabinose catabolism results in an imbalance of redox cofactors (Seiboth and Metz, 2011).

A role for NapA homologs in carbon metabolism appears conserved in fungi. In *S. cerevisiae* the involvement of Yap1 in responding to carbon stress was proposed after it was recovered in two-hybrid assays as interactor of the Sip2 subunit of the Snf1 kinase, needed for adaptation to glucose limitation, and showing that media shifting from glucose to glycerol or to glucose lacking media induced Yap1 nuclear accumulation (Wiatrowski and Carlson, 2003). Likewise, in *S. pombe* glucose but not nitrogen starvation induces Pap1 nuclear localization in a process that depends on the stress MAPK Spc1/Sty1 (Madrid et al., 2004).

However, a direct involvement of Yap1 or NapA in carbon utilization was not demonstrated in these cases.

In nature, fungal spores germinate on environments containing diverse, often-poor carbon sources as well as drugs produced by competing organisms or that are detritus-derived. In addition, conidia contain chemicals and toxins derived from secondary metabolism as well as auto-inhibitors of germination. Our results support the proposal that oxidative stress is produced during conidiation and that NapA plays a crucial role in the regulation of multiple genes during this process. Although the rates of conidia germination are not decreased in $\Delta napA$ mutants under laboratory conditions, the set of genes regulated by NapA during conidiation suggest that they might be important for spores to germinate in natural heterogeneous environments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JA: Designed experiments, wrote the MS, and obtained funding. AM, FL and OS: Performed and designed experiments, contributed to MS writing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACYT grants CB-2014-01-238492, Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-I-319 and PAPIIT-UNAM IN208916. AM received a Doctoral fellowship from CONACYT and this work is part of her Ph.D. Thesis, as student in the program Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas from Universidad Nacional Autónoma de México. We thank IFC-UNAM Molecular Biology, Imagenology and Computer Units. We also thank Ricardo Grande, Veronica Jimenez-Jacinto and Alejandro Sanchez-Flores for sequencing and bioinformatics support as part of the “Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática” of the “Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas,” CONACyT #260481, at Instituto de Biotecnología/UNAM.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00516/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111–118. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.007
- Andersen, M. R., Nielsen, J. B., Klitgaard, A., Petersen, L. M., Zachariassen, M., Hansen, T. J., et al. (2013). Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E99–E107. doi: 10.1073/pnas.1205532110
- Araújo-Bazan, L., Fernández-Martínez, J., de los Ríos, V. M., Etxebeste, O., Albar, J. P., Penalva, M. A., et al. (2008). NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin alpha. *Fungal Genet. Biol.* 45, 278–291. doi: 10.1016/j.fgb.2007.08.003
- Arratia-Quijada, J., Sánchez, O., Scazzocchio, C., and Aguirre, J. (2012). FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation. *Eukaryot. Cell* 11, 1132–1142. doi: 10.1128/EC.00101-12
- Asano, Y., Hagiwara, D., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007). Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1800–1803. doi: 10.1271/bbb.70133
- Bamford, N. C., Snarr, B. D., Gravelat, F. N., Little, D. J., Lee, M. J., Zacharias, C. A., et al. (2015). Sph3 Is a Glycoside hydrolase required for the

- biosynthesis of galactosaminogalactan in *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 290, 27438–27450. doi: 10.1074/jbc.M115.679050
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506. doi: 10.1126/science.1155888
- Bok, J. W., Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., et al. (2009). Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* 5, 462–464. doi: 10.1038/nchembio.177
- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., et al. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Biol. Cell* 12, 407–419. doi: 10.1091/mbc.12.2.407
- Calvo, I. A., Garcia, P., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2012). The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂. *Nucleic Acids Res.* 40, 4816–4824. doi: 10.1093/nar/gks141
- Cano-Domínguez, N., Alvarez-Delfín, K., Hansberg, W., and Aguirre, J. (2008). The NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 7, 1352–1361. doi: 10.1128/EC.00137-08
- Cartwright, G. M., and Scott, B. (2013). Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*. *Eukaryot. Cell* 12, 1335–1348. doi: 10.1128/EC.00129-13
- Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., et al. (2014). The aspergillus genome database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res.* 42, D705–D710. doi: 10.1093/nar/gkt1029
- Chen, D. R., Wilkinson, C. R. M., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., et al. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 308–317. doi: 10.1091/mbc.E07-08-0735
- Dankai, W., Pongpom, M., Younchim, S., Cooper, C. R. Jr., and Vanittanakom, N. (2016). The yapA encodes bZIP transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffei*. *PLoS ONE* 11:e0163778. doi: 10.1371/journal.pone.0163778
- DeGols, G., and Russell, P. (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3356–3363. doi: 10.1128/MCB.17.6.3356
- DeGols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2870–2877. doi: 10.1128/MCB.16.6.2870
- de Groot, M. J. L., van den Dool, C., Wösten, H. A. B., Levisson, M., vanKuyk, P. A., Ruijter, G. J. G., et al. (2007). Regulation of pentose catabolic pathway genes of *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* 45, 134–138.
- Delanay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01048-6
- de Nadal, E., Ammerer, G., and Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.* 12, 833–845. doi: 10.1038/nrg3055
- Dirschabel, D. E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kück, U. (2014). New insights into the roles of NADPH oxidases in sexual development and ascospore germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* 196, 729–744. doi: 10.1534/genetics.113.159368
- Doehlemann, G., Molitor, F., and Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 601–610. doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.001
- Dunwell, J. M., Khuri, S., and Gane, P. J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 153–179. doi: 10.1128/MMBR.64.1.153-179.2000
- Etchebeste, O., Herrero-García, E., Cortese, M. S., Garzia, A., Oiartzabal-Arango, E., de los Ríos, V., et al. (2012). GmcA is a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 7:292. doi: 10.1371/journal.pone.0040292
- Fillinger, S., and Felenbok, B. (1996). A newly identified gene cluster in *Aspergillus nidulans* comprises five novel genes localized in the alc region that are controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon-catabolite repressor CreA. *Mol. Microbiol.* 20, 475–480. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.5301061.x
- Flippi, M., Kocalkowska, J., and Felenbok, B. (2002). Characteristic physiological inducers of the ethanol utilization (alc) pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 364, 25–31. doi: 10.1042/bj3640025
- Flippi, M., Robellet, X., Dequier, E., Leschelle, X., Felenbok, B., and Vélo (2006). Functional analysis of alcS, a gene of the alc cluster in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 43, 247–260. doi: 10.1016/j.fgb.2005.12.008
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., and Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signal pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* 56, 1246–1255. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x
- Golla, U., Bandi, G., and Tomar, R. S. (2015). Molecular cytotoxicity mechanism of allyl alcohol (acrolein) in budding yeast. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1246–1255. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00071
- Guo, M., Chen, Y., Du, Y., Dong, Y., Guo, W., Zhai, S., et al. (2011). The transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Pathog.* 7:e1001302. doi: 10.1371/journal.ppat.1001302
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Yoshimi, A., Mizuno, T., and Abe, K. (2009). Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* 46, 868–878. doi: 10.1016/j.fgb.2009.07.003
- Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, K., Kanamaru, K., et al. (2007). Characterization of the Nika histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans* with special reference to fungicide responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 41, 844–847. doi: 10.1271/bbb.70051
- Han, K. H., Park, J. S., Chae, K. S., and Han, D. M. (2010). Site-specific identification of veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 148, 885–887. doi: 10.1007/s12275-010-0506-y
- Han, K. H., and Prade, R. A. (2002). Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 43, 1065–1074. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02774.x
- Hansberg, W., and Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142, 201–210. doi: 10.1016/S0022-5193(05)80222-X
- Hill, T. W., and Käfer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet. Biol.* 48, 20–21. doi: 10.4148/1941-4765.1173
- Huang, K., Czymmek, K. J., Caplan, J. L., Sweigard, J. A., and Donnelly, N. M. (2011). HYR1-mediated detoxification of reactive oxygen species required for full virulence in the rice blast fungus. *PLoS Pathog.* 7:e1001335. doi: 10.1371/journal.ppat.1001335
- Käfer, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetic* 55, 217–232.
- Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2001). Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 183, 1434–1440. doi: 10.1128/JB.183.4.1434-1440.2001
- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002). Saka1 kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 45, 1153–1162. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., and Aguirre, J. (1997). Divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179, 3284–3292. doi: 10.1128/jb.179.10.3284-3292.1997
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., and Chae, K. (2002). The veA activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 40, 72–80. doi: 10.1016/S1087-1845(02)00029-4
- Koivistoinen, O. M., Richard, P., Penttilä, M., Ruohonen, L., and Mojit (2012). Sorbitol dehydrogenase of *Aspergillus niger*, SdhA, is part of the oxidative D-galactose pathway and essential for D-sorbitol catabolism. *J. Lett.* 586, 378–383. doi: 10.1016/j.lets.2012.01.004
- Kowalczyk, J. E., Gruben, B. S., Battaglia, E., Wiebenga, A., Majoor, E., and Vries, R. P. (2015). Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans* galR, xlnR and araR in regulating D-Galactose and L-Arabinose release and catabolism expression. *PLoS ONE* 10:43200. doi: 10.1371/journal.pone.0143200

- Kwolek-Mirek, M., Bednarska, S., Bartosz, G., and Bilinski, T. (2009). Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 363–378. doi: 10.1007/s10565-008-9090-x
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 50, 1241–1255. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x
- Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* 80, 436–454. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., et al. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040–16046. doi: 10.1074/jbc.274.23.16040
- Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., et al. (2007). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* 6, 2290–2302. doi: 10.1128/EC.00267-07
- Lev, S., Hadar, R., Amedeo, P., Baker, S. E., Yoder, O. C., and Horwitz, B. A. (2005). Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryot. Cell* 4, 443–454. doi: 10.1128/EC.4.2.443-454.2005
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., et al. (2004). A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 279, 41594–41602. doi: 10.1074/jbc.M405509200
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., and Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 982–997. doi: 10.1016/j.fgb.2004.07.008
- Millar, J. B., Buck, V., and Wilkinson, M. G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9, 2117–2130. doi: 10.1101/gad.9.17.2117
- Molina, L., and Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19, 2293–2309. doi: 10.1105/tpc.107.052332
- Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D., and Parker, C. S. (1989). Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* 3, 283–292. doi: 10.1101/gad.3.3.283
- Nasser, L., Weissman, Z., Pinsky, M., Amartely, H., Dvir, H., and Kornitzer, D. (2016). Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nat. Microbiol.* 1:16156. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.156
- Navarro, R. E., and Aguirre, J. (1998). Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase during *Aspergillus nidulans* development. *J. Bacteriol.* 180, 5733–5738.
- Navarro, R. E., Stringer, M. A., Hansberg, W., Timberlake, W. E., and Aguirre, J. (1996). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* 29, 352–359. doi: 10.1007/s002940050056
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., et al. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566. doi: 10.1534/genetics.105.052563
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. (2000). Multistep phosphorylation proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* 11, 1169–1181. doi: 10.1091/mbc.11.4.1169
- Nguyen, A. N., and Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* 13, 1653–1663. doi: 10.1101/gad.13.13.1653
- Oh, Y. T., Ahn, C. S., Kim, J. G., Ro, H. S., Lee, C. W., and Kim, J. W. (2010). Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 246–253. doi: 10.1016/j.fgb.2009.11.002
- Qiao, J., Kontoyiannis, D. P., Calderone, R., Li, D., Ma, Y., Wan, Z., et al. (2008). Afyap1, encoding a bZip transcriptional factor of *Aspergillus fumigatus*, contributes to oxidative stress response but is not essential to the virulence of this pathogen in mice immunosuppressed by cyclophosphamide and triamcinolone. *Med. Mycol.* 46, 773–782. doi: 10.1080/13693780802054215
- Quinn, J., Malakasi, P., Smith, D. A., Cheetham, J., Buck, V., Millar, J. B., et al. (2011). Two-component mediated peroxide sensing and signal transduction in fission yeast. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 153–165. doi: 10.1089/ars.2010.3345
- Raulo, R., Kokolski, M., and Archer, D. B. (2016). The roles of the zinc finger transcription factors XlnR, ClrA and ClrB in the breakdown of lignocellulose by *Aspergillus niger*. *Amb Express* 6:5. doi: 10.1186/s13568-016-0177-0
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., et al. (2008). Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot. Cell* 7, 988–1000. doi: 10.1128/EC.00228-07
- Rhee, S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Mol. Cells* 39, 1–5. doi: 10.14348/molcells.2016.2368
- Sanchez, J. F., Entwistle, R., Hung, J. H., Yaegashi, J., Jain, S., Chiang, Y. M., et al. (2011). Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 4010–4017. doi: 10.1021/ja1096682
- Sanchez, O., and Aguirre, J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet. Newslett.* 43, 48–51. doi: 10.4148/1941-4765.1317
- Sánchez, O., Navarro, R. E., and Aguirre, J. (1998). Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* 258, 89–94. doi: 10.1007/s004380050710
- Scherer, M., Wei, H. J., Liese, R., and Fischer, R. (2002). *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot. Cell* 1, 725–735. doi: 10.1128/EC.1.5.725-735.2002
- Seiboth, B., and Metz, B. (2011). Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1665–1673. doi: 10.1007/s00253-010-3071-8
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739–743. doi: 10.1038/378739a0
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 10, 2276–2288. doi: 10.1101/gad.10.18.2276
- Shroff, R. A., Lockington, R. A., and Kelly, J. M. (1996). Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Microbiol.* 42, 950–959. doi: 10.1139/m96-122
- Siegmund, U., Heller, J., van Kan, J. A., and Tudzynski, P. (2013). The NADPH oxidase complexes in *Botrytis cinerea*: evidence for a close association with the ER and the tetraspanin Pls1. *PLoS ONE* 8:e55875. doi: 10.1371/annotation/84c258cf-4f98-43d8-a4f0-7032cba36f22
- Tachibana, T., Okazaki, S., Murayama, A., Naganuma, A., Nomoto, A., and Kuge, S. (2009). A major peroxiredoxin-induced activation of yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals low level of transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 284, 4464–4472. doi: 10.1074/jbc.M807583200
- Takahashi, M., Yamashita, K., Shiozawa, A., Ichiishi, A., Fukumori, F., and Fujimura, M. (2010). An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulate expression of the glutathione S-transferase and NADH:flavin oxidoreductase genes in *Neurospora crassa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 746–752. doi: 10.1271/bbb.90790
- Temme, N., and Tudzynski, P. (2009). Does botrytis cinerea ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 987–998. doi: 10.1094/MPMI-22-8-0987
- Thön, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H., et al. (2010). The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 38, 1098–1111. doi: 10.1093/nar/gkp1091
- Tian, C., Li, J., and Glass, N. L. (2011). Exploring the bZIP transcription factor regulatory network in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 157, 747–755. doi: 10.1099/mic.0.045468-0
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein-kinase related to the mammalian Erk1/Map2 and budding yeast fus3 and Kss1 Kinases. *Genes Dev.* 5, 60–73. doi: 10.1101/gad.5.1.60

- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., and Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 6, 1570–1583. doi: 10.1128/EC.00085-07
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M. B., et al. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8875–8880. doi: 10.1073/pnas.0503251102
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol. Microbiol.* 52, 1427–1435. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04065.x
- Wiatrowski, H. A., and Carlson, M. (2003). Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 2, 19–26. doi: 10.1128/EC.2.1.19-26.2003
- Woo, E. J., Dunwell, J. M., Goodenough, P. W., Marvier, A. C., and Pickersgill, R. W. (2000). Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1036–1040. doi: 10.1038/80954
- Yin, W. B., Reinke, A. W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y. M., Keating, A. E. et al. (2013). bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159, 77–88. doi: 10.1099/mic.0.063370-0
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., and Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41, 973–981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Mendoza-Martínez, Lara-Rojas, Sánchez and Aguirre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table S1. Stress signal transduction proteins in model fungi

Fungal phosphorelay components involved in stress sensing				
Phosphorelay Component	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
Sensor Kinase (HK)	Mak1 Mak2 Mak3	Sln1*	15 HKs*	13 HKs*
Phosphotransfer Protein (HPt)	Mpr1	Ypd1	YpdA (AN2005)	Ypd1 (Afu4g10280)
Response Regulator (MAPK-linked)	Mcs4	Ssk1	SskA (AN7697)	Ssk1 (Afu5g08390)
Response Regulator (TF)	Prr1	Skn7	SrrA (AN3688)	Skn7 (Afu6g12520)

Fungal MAPK components involved in stress sensing				
MAPK Component	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
MAPKKK	Wis4, Win1	Ssk2, Ssk22	SskB (AN10153)	SskB (Afu1g10940)
MAPKK	Wis1/Sty2	Pbs2	PbsA (AN0931) (Alias PbsB)	Pbs2 (Afu1g15950)
MAPK	Spe1/Sty1	Hog1	SakA/HogA (AN1017) MpkC (AN4668)	SakA (Afu1g12940) MpkC (Afu5g09100)
bZIP TF	Atf1	Sko1	AtfA (AN2911)	AtfA (Afu3g11330)

Fungal Ap1 transcription factors involved in oxidative stress sensing				
API-like Component	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
bZip TF	Yap1	Pap1	NapA (AN7513)	AfYap1 (Afu6g09930)

* *S. pombe* HKs are involved in H₂O₂ sensing and *S. cerevisiae* Sln1 in osmotic stress sensing. HKs involved in oxidative stress sensing in *A. nidulans* and *A. fumigatus* have not been identified.

Table S2. *Aspergillus nidulans* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
FGSC4	<i>biA1</i>	FGSC
CLK43	<i>pabaA1 yA2 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 2002
A11035	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB veA1</i>	M. Hynes, Nayak <i>et al.</i> , 2006
A1155	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::bar veA1</i>	FGSC
CFL3	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 veA1</i>	Lara-Rojas <i>et al.</i> , 2011
CFL7	<i>pabaA1 yA2 ΔnapA::AfpYrG veA1</i>	This work, progeny from CFL3 X TFL9
CreA ^d 204	<i>pabaA1 yA2 creA^d204 veA1</i>	P. González, progeny from CLK43 X MH440
MH440	<i>yA2 suA1adE20 adE20 riboB2 areA217 creA^d204</i>	M. Hynes
TRN1	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB: ΔcatA::argB trpC801 veA1</i>	Navarro <i>et al.</i> , 1996
TLK12	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB: ΔcatB::argB trpC801 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 1997
TFL9	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnapA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct napA-AfpYrG-napA
TFL14	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnapA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 1155 transformed with PCR construct napA-gfp-AfpYrG
TFL15	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnapA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct napA-AfpYrG-napA
TFLΔatfA-04	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔatfA::AfrB ΔnkuA::argB veA1</i>	Lara-Rojas <i>et al.</i> , 2012
TΔsrrA-pyrG9	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔsrrA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	Vargas-Pérez <i>et al.</i> , 2007
TAM16	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔgpxA::AfrB ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct gpxA-AfrB-gpxA
TAM17	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔtpxA::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct tpxA-AfpYrG-tpxA
TAM19	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔtpxB::AfrB ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct tpxB-AfrB-tpxB
TAM20	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔalcA::AfrB ΔnkuA::argB veA1</i>	This work, 11035 transformed with PCR construct alcA-AfrB-alcA
COS SrrA3.1	<i>pabaA1 yA2 ΔsrrA::AfpYrG veA1</i>	This work, progeny from TSrrAΔsskA X CLK56
CAM6	<i>pabaA1 yA2 ΔnapA::AfpYrG ΔsrrA::AfpYrG veA1</i>	This work, progeny from CFL7 X TΔsrrA-pyrG9
CAM7	<i>pabaA1 yA2 ΔnapA::AfpYrG ΔatfA::AfrB veA1</i>	This work, progeny from ΔatfA-04 X CAM6
CAM8	<i>pabaA1 yA2 ΔsrrA::AfpYrG ΔatfA::AfrB veA1</i>	This work, progeny from ΔatfA-04 X CAM6
CAM9	<i>pabaA1 yA2 ΔsrrA::AfpYrG ΔnapA::AfpYrG ΔatfA::AfrB veA1</i>	This work, progeny from ΔatfA-04 X CAM6
CAM11	<i>pabaA1 yA2 ΔgpxA::AfrB veA1</i>	This work, progeny from TAM16 X CLK43

Table S3. DNA primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')
5'For-napA	CGATGTGAGAAAGGCACG
5'Rev-napA	GGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCCGGTCCTGGAAGAGAGG
3'For-napA	GCATCAGTGCCTCCTCAGACCACGCTACGGATACCCAC
3'Rev-napA	GCGGTAGCAACACATCAC
5'nest-napA	CTGCACGCGTGCTGGTCG
3'nest-napA	TCGTCCGCTCCATCAACG
5Dig-nkuA	GATGCTGTCCTTTTGCC
3Dig-nkuA	TACCCAGAGCGCGATAC
pyrG forward	GCCTCAAACAATGCTCTTACC
pyrG reverse	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
5Ribo	CTGGCTCGTTTGATCACATGG
6Ribo	GCGCTGCAGAACCGTTACATG
GFP1napA	AGGGATGTGGATGACATCATTGGCCGCGTGGGAGCTGGTGACAGCGCTGGAGCCGGTGCC
GFP2napA	CAGACTCTCCTCCGTGACTACGTTGGTCAAGCGAATCGAATTGAACAATCGA
GSP1napA	CTGGCACTGCAATTTGGTCTGGCCGTCC
GSP2napA	CACGCGGCAATGACGTCATCCACATCCCT
GSP3napA	TCGATTGTTCAATTCGATTGCTTGACCAA
GSP4napA	TACGTCTCCTGCTCCCGTCATCCCTAAG
5'AtfFor	ATACCGCTACGAATCCAGACCC
5'For-gpxA	CCATAAAAACCGTGGTAG CTCAGGA
5'Rev-gpxA	CGAGCCAGACTCCTGAACGGCCTCTTAGGTCTGAGATGAGGTTGTTGACGTT
3'For-gpxA	AACGGTCTGCAGCGCAAACGTTCTTTTTTACATTGTTATTTCAAGGATTA
3'Rev-gpxA	CGGAACCGGTAACAACAATAAGTTG
5'For-nested gpxA	CGGAAGCCGATCTCCCT
3'For-nested gpxA	GCAGTGTATGTTATCTCTGACCCAAGG
5'For-tpxA	CGATTCCGCAAGATATCAAA
5'Rev-tpxA	GAAGAGCATTGTTTGAGGCTGTGAGAGTGTTGATGTATCAGAA
3'For-tpxA	AGTGCTCCTCCTCAGACATTGGAAAATGATACCTCATAACC
3'Rev-tpxA	CGACTGGCTTCTCGACATC
5'For-nested tpxA	TAGCACACCGGTTTCAGAG
3'For-nested tpxA	TCGTGAGGTGTAGATACGGTGT
5'For-tpxB	GATACCATGCATTATTAGTA
5'Rev-tpxB	TGATCAAACGAGCCAGTTTGATATTTTCACAGCA
3'For-tpxB	TAACGGTTCTGCAGCGCTGTAATCTGAATAGAATGTACTAT
3'Rev-tpxB	GGTTGATCTTCATTCTCTC
5'For-nested tpxB	TTTCAAAGCACTATGATGAT
3'For-nested tpxB	TTTTTCTTTCAATCGCT
5'For-alcA	AATCACAACACCACGGTCTGCTAC
5'Rev-alcA	CCATGTGATCAAACGAGCCAGTTTGAGGCGAGGTGATAGGATTG
3'For-alcA	CATGTAACGGTCTGCAGCGCGGTTTCAACGGCCACGG

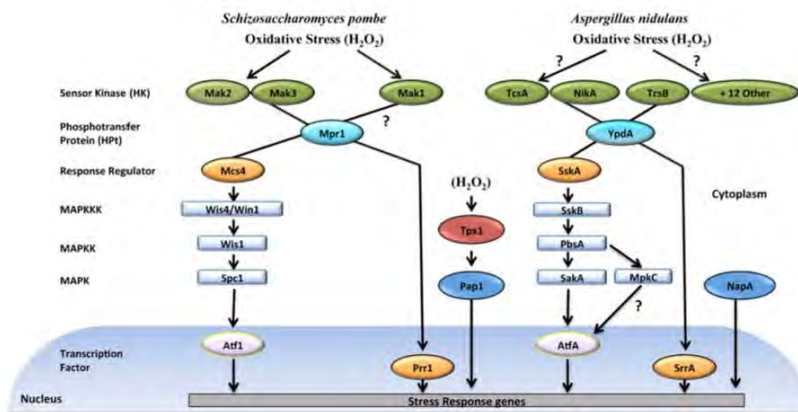


FIGURE S1. Oxidative stress sensing pathways in *S. pombe* and *A. nidulans*. The phosphorelay system composed by histidine kinases (green), phosphotransfer proteins (blue) and response regulators Mcs4 and SskA (orange) are connected to the stress MAPK module (light blue). When phosphorylated, Spc1 and SakA MAPKs translocate to the nucleus, where they activate bZIP transcription factors Atf1 and AtfA, respectively. Response regulators Prr1 and SrrA are located in the nucleus where they are activated by phosphotransfer proteins. In *S. pombe* bZIP transcription factor Pap1 oxidation by peroxiredoxin Tpx1 results in its nuclear localization and activation. HKs and peroxiredoxins responsible for H₂O₂ sensing have not been identified in *A. nidulans*. A direct interaction between MpkC and AtfA has not been demonstrated. See the text for detailed description and relevant references.

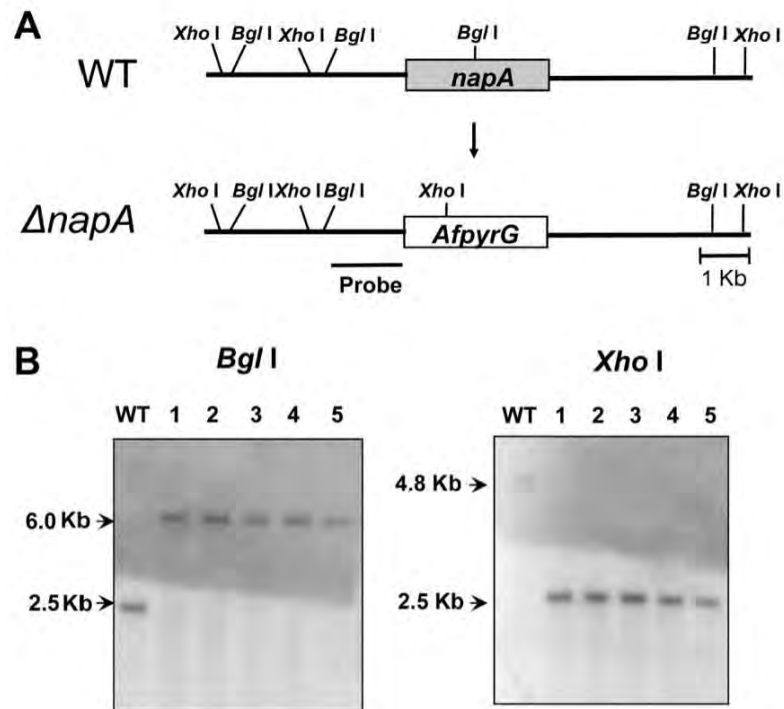


FIGURE S2. Deletion of the *napA* gene. (A) A *napA* deletion construct containing the *AfpyrG* gene, as a selective marker, was generated by double-joint PCR and used to transform strain 11035. The expected integration event results in replacement of the wild-type *napA* gene by the deletion construct. (B) DNA from strains 11035 (wild type; WT) and 5 PyrG⁺ transformants were digested with *BglI* or *XhoI* and used for Southern blot analysis using the probe in indicated (A). The wild type pattern corresponds a 2.5 Kb band for *BglI* and 4.8 Kb band for *XhoI* while $\Delta napA$ pattern corresponds to bands of 6 and 2.5 Kb. Transformant 4 was named TFL9 and used in further experiments.

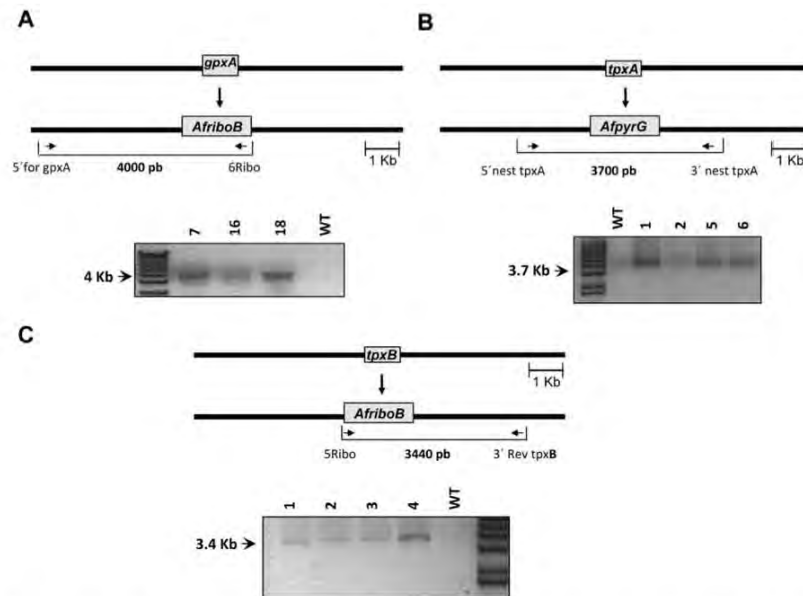


FIGURE S3. PCR analysis of $\Delta gpxA$, $\Delta tpxA$ and $\Delta tpxB$ deletion strains. (A) DNA from WT (CLK43) and indicated PyrG^+ transformants was used for PCR analysis. For *gpxA* gene deletion, primers 5' for *gpxA* and 6Ribo were utilized to amplify a 4 Kb band present only in *gpxA* deletion transformants. Transformant 18 was used for further experiments. (B) For *tpxA* gene deletion, 5' nest *tpxA* and 3' nest *tpxA* primers were used to amplify a 3.7 Kb band present only in *tpxA* deletion transformants. Transformant 6 was used for further experiments. (C) For *tpxB* gene deletion, a 3.4 Kb band was obtained with primers 5Ribo and 3' Rev *tpxB* only in transformants carrying a *tpxB* gene deletion. Transformant 4 was used for further experiments.

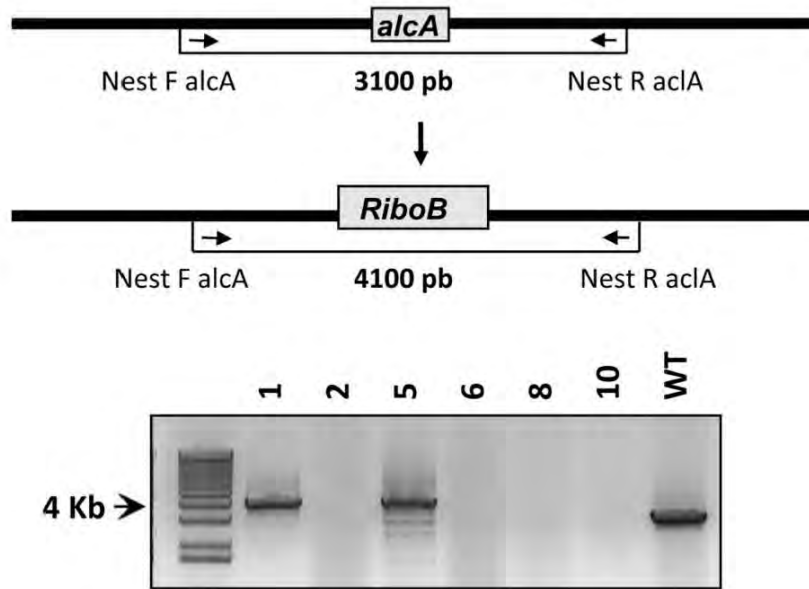


FIGURE S4. PCR analysis of $\Delta alcA$ deletion strains. *alcA* deletion construct containing *AfriboB* gene as a selective marker was generated by double-joint PCR and used to transform strain 11035. Primers NestFalca and NestRacla generated 4.1 and 3.1 Kb bands in *alcA* deletion and wild type strains, respectively. Transformant 1 was used for further experiments.

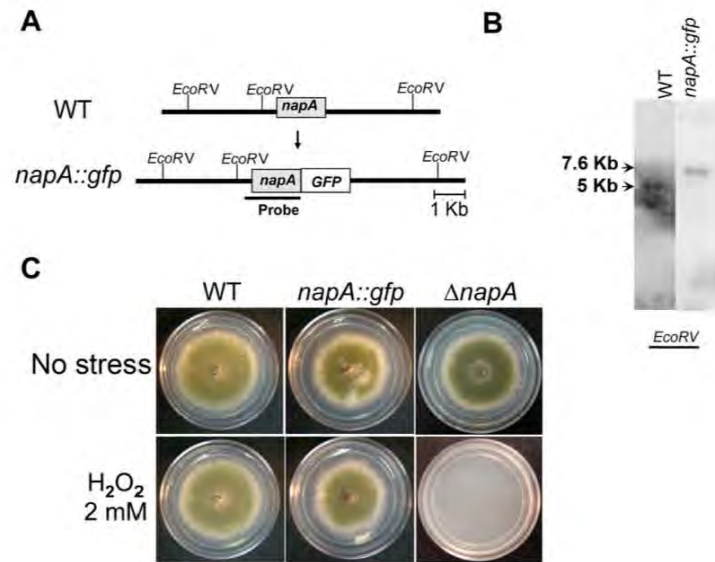


FIGURE S5. GFP tagging does not affect NapA function. (A) Three PCR products were used to generate an AtfA C-terminal GFP construct by double joint PCR, which was used to transform strain A1155. (B) Total DNA from strains A1155 (WT) and PyrG⁺ transformant TFL14 were digested with EcoRV restriction enzyme and used for Southern blot analysis using *napA* ORF as probe. The WT pattern corresponds to a 5 Kb band, while *napA::GFP* pattern corresponds to a 7.6 Kb fragment. H₂O₂ resistance of WT and *napA::GFP* strains is similar. (C) Conidiospores (1×10^4) from strains A1155 (WT), TFL9 ($\Delta napA$) and TFL14 (*napA::GFP*) were inoculated on supplemented MM plates with or without 2 mM H₂O₂ and incubated at 37°C for 4 days.

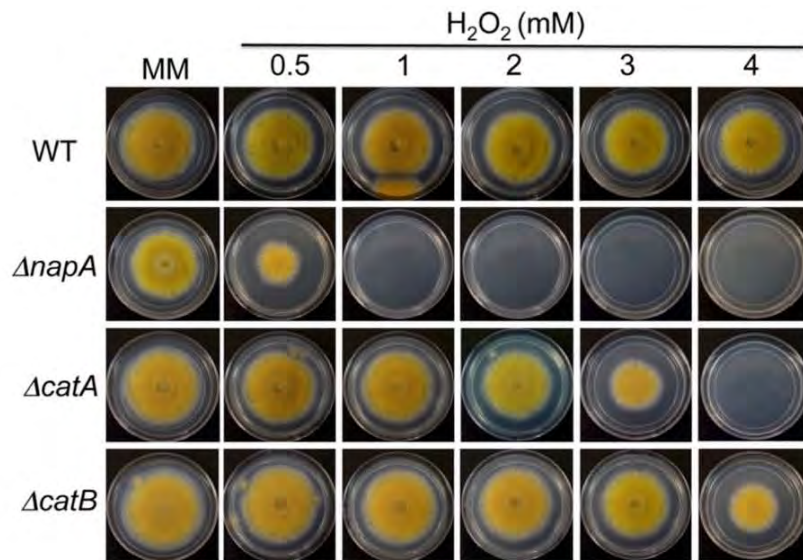


FIGURE S6. *ΔnapA* mutants are more sensitive to H₂O₂ than catalase mutants *ΔcatA* and *ΔcatB*. Conidia (1X10⁴) from strains CLK43 (WT), CFL7 (*ΔnapA*), CRN1 (*ΔcatA*) and TLK12 (*ΔcatB*) were inoculated on supplemented MM plates containing H₂O₂ at the indicated concentrations and incubated at 37°C for 4 days.

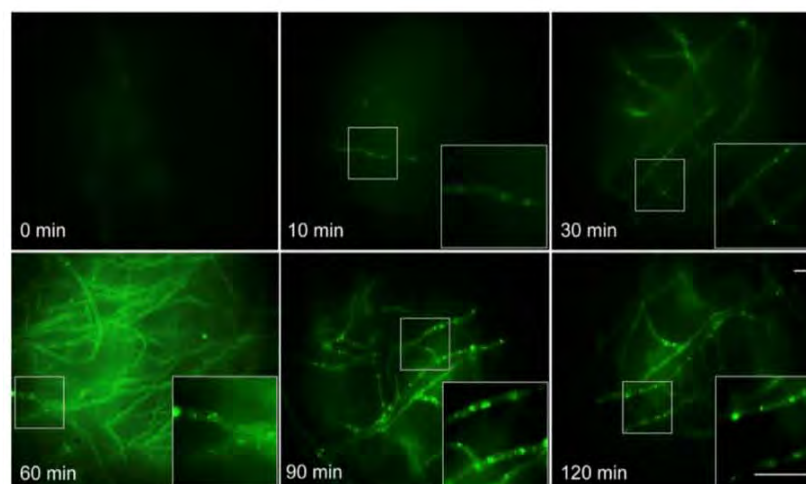


FIGURE S7. Osmotic stress induces NapA nuclear localization. Conidia from strain CAM20 (NapA::GFP) were grown for 18 h in liquid MM medium, which was then replaced by the same medium containing 1M NaCl for the indicated times (0-120 min). Mycelial samples were observed *in vivo* and photographed every 30 minutes using Epifluorescence microscopy. Bar = 10 μ m.



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio

Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi

Ariann E. Mendoza-Martínez, Nallely Cano-Domínguez, Jesús Aguirre*

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2019
Received in revised form
2 April 2019
Accepted 3 April 2019
Available online xxx

Corresponding Editor: Drauzio E.N Rangel

Keywords:

ROS sensing
Fungal development
Reactive oxygen species
Secondary metabolism
Virulence

ABSTRACT

The regulation of gene expression in response to increased levels of reactive oxygen species (ROS) is a ubiquitous response in aerobic organisms. However, different organisms use different strategies to perceive and respond to high ROS levels. Yeast Yap1 is a paradigmatic example of a specific mechanism used by eukaryotic cells to link ROS sensing and gene regulation. The activation of this transcription factor by H₂O₂ is mediated by peroxiredoxins, which are widespread enzymes that use cysteine thiols to sense ROS, as well as to catalyze the reduction of peroxides to water. In filamentous fungi, Yap1 homologs and peroxiredoxins also are major regulators of the antioxidant response. However, Yap1 homologs are involved in a wider array of processes by regulating genes involved in nutrient assimilation, secondary metabolism, virulence and development. Such novel functions illustrate the divergent roles of ROS and other oxidizing compounds as important regulatory signaling molecules.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Aerobic respiration is one of the most important traits acquired during the evolution of life. In eukaryotes, respiration occurs in the mitochondria and it involves the use of oxygen as the final acceptor of the electrons that feed the electron transport chain, and the production of ATP. The incomplete reduction of O₂ to water generates the anion superoxide (O₂^{•-}), which in turn generates hydrogen peroxide (H₂O₂), either spontaneously or by the activity of superoxide dismutase enzymes. Through different reactions, H₂O₂ can produce other reactive oxygen species (ROS) such as the hydroxyl radical (•OH). ROS can react with many different biomolecules, causing enzyme inactivation and degradation, lipid peroxidation and DNA damage. To avoid this, organisms evolved mechanisms to perceive and decompose ROS through coordinated cellular responses, collectively called the antioxidant response. Typical responses involve the up-regulation of ROS-decomposing enzymes such as superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT), glutathione peroxidases (Gpx), glutathione S-transferases (GST) and peroxiredoxins (Prx), as well as enzymes involved in the

production of reducing compounds such as NADPH and glutathione (Halliwell and Gurreridge, 2007).

For a long time, only the cell damaging aspects of ROS were considered as biologically relevant. Currently, increasing evidence from studies in many different biological systems supports our early view, in which ROS were proposed as signaling molecules important for cell differentiation (Aguirre et al., 2005; Hansberg and Aguirre, 1990), and several mechanisms for ROS perception, ROS signal transduction and ROS-induced gene regulation have been identified. Many of the regulatory roles of ROS are based on their ability to modify the activity of proteins sensitive to redox modifications. In turn, many of these modifications are mediated by the oxidation of cysteine residues, since its sulfhydryl group can be reversibly oxidized to form intra- or intermolecular disulfide bonds, affecting protein structure and function (D'Autreaux and Toledano, 2007; Holmstrom and Finkel, 2014).

2. Yap1, a paradigm in ROS signal transduction

Saccharomyces cerevisiae Yap1 is a transcription factor first identified as a member of the jun family, which includes AP-1 in mammalian cells (Harshman et al., 1988), which represents a paradigmatic example of the mechanisms that a cell utilizes to perceive and transduce ROS signals. YAP1 was also found as a gene

* Corresponding author.

E-mail address: jaguirre@ic.unam.mx (J. Aguirre).

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

1878-6146/© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Mendoza-Martínez, A.E et al., Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

critical to survive the oxidative stress caused by H₂O₂, diamide (Kuge and Jones, 1994), cadmium and other heavy metals (Schneff and Entian, 1991). In addition, it was reported that Yap1 over-expression conferred pleiotropic drug resistance (Hertle et al., 1991).

There are excellent and recent reviews on Yap1 and its homologs in yeasts (Dantas da Silva et al., 2015; García-Santamarina et al., 2014). Here we describe a comparative analysis between Yap1 and its homologs in filamentous fungi. Yeast Yap1 contains five characteristic domains: a “b-ZIP” DNA binding domain, a N-terminal nuclear localization sequence (NLS), a C-terminal nuclear exportation sequence (NES), and two cysteine-rich (CRD) regions (Fernandes et al., 1997; Harshman et al., 1988). The first CRD (nCRD domain) contains Cys-303, Cys310 and Cys-315, while C-terminal CRD (cCRD domain) contains Cys-598, Cys-620 and Cys-629 (Fig. 1), and the oxidation of these cysteines is critical to regulate Yap1 nuclear localization (Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 1997; Yan et al., 1998). When yeast cells are treated with H₂O₂, a Yap1 step-wise oxidation is initiated by the oxidation of the catalytic cysteine of the peroxiredoxin Gpx3, which then reacts with Yap1 Cys-598, forming a mixed Gpx3-Yap1 intermediate that immediately resolves in the formation of an intra-molecular bridge between Yap1 Cys-598 and Cys-303 (Delaunay et al., 2002). This generates a conformational change that hides the NES region and prevents its interaction with the Crm1 nuclear export factor, resulting in the accumulation of Yap1 in the nucleus (Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 1997). The protein Ybp1 is necessary for this disulfide relay, very likely acting as a molecular scaffold protein and as a sulfenic acid chaperone (Bersweiler et al., 2017). Additionally, intermolecular disulfides Cys310–Cys629 and Cys315–Cys620 have been identified, all of which appear necessary for full Yap1 activation (Gulshan et al., 2005; Okazaki et al., 2007; Wood et al., 2003). Oxidized nuclear Yap1 is subject to phosphorylation, but the responsible kinase and the physiological consequences of this are yet unknown (Delaunay et al., 2000). However, the fact that *Candida albicans* Yap1 homolog Cap1 is also phosphorylated, suggests that this modification is physiologically important (Kos et al., 2016).

Yap1 cCRD cysteines can also be oxidized directly by synthetic as well as natural electrophilic compounds such as diamide, diethylmaleimide, menadione (Azevedo et al., 2003; Kuge et al., 1997; Wemmie et al., 1997), methylglyoxal (Maeta et al., 2004) and the garlic compound allicin (Grublike et al., 2017). This process is independent of Gpx3 and Ybp1 and also results in hiding of the NES motif and Yap1 nuclear accumulation. However, these two Yap1-activation mechanisms lead to the expression of different sets of genes and different adaptive responses. Indeed, Yap1 oxidation by H₂O₂ regulates the expression of around ~100 genes, including genes required for glutathione biosynthesis and redox balance proteins such as γ -glutamylcysteine synthetase GSH1, glutathione reductase GLR1 (Gasch et al., 2000) and thioredoxin gene TRX2 (Kuge and Jones, 1994). In contrast, Yap1 oxidation by electrophilic compounds results in the induction of genes related to xenobiotic detoxification, such as genes encoding major facilitator and ATP-binding cassette transporters (Alarco et al., 1997; Wemmie et al., 1994). Consistent with this, H₂O₂ and N-ethylmaleimide do not induce cross-protection against each other (Ouyang et al., 2011). The mechanism by which different oxidized forms of Yap1 regulate different sets of genes is not well understood. Part of the explanation involves Yap1 interaction with other transcriptional regulators such as Skn7, a response regulator also involved in the antioxidant response, and the mediator complex. About half of the genes regulated by Yap1 require its interaction with Skn7, while the other half is Skn7-independent (Lee et al., 1999; Mulford and Fassler, 2011). Mediator is a highly conserved multi-subunit

protein complex involved in the transcriptional activation of many genes, including genes involved in multidrug resistance (Shahi et al., 2010; Utth et al., 2017). The Yap1-mediated induction of the TRX2 gene depends on the mediator component Rox3 and a proper disulfide bonding between Yap1 n-CRD and c-CRD domains (Gulshan et al., 2005). Yap1 oxidized by either H₂O₂ or electrophilic compounds is subject to degradation (Gulshan et al., 2012) and can be reduced back by thioredoxin Trx2 and then translocated to the cytosol (Delaunay et al., 2000). In fact, deletion of *trx1* and *trx2* thioredoxin genes results in constitutive activation of Yap1 (Izawa et al., 1999).

Yap1 homologs Pap1 and Cap1 show very similar regulation in response to H₂O₂ in *Schizosaccharomyces pombe* (Toda et al., 1991; Toone et al., 1998) and *C. albicans* (Kos et al., 2016), respectively. However, in *S. pombe*, it is peroxiredoxin Tpx1 the enzyme which oxidizes Pap1, hiding the NES region and leading to Pap1 nuclear accumulation (Calvo et al., 2013), and the expression of ~50 genes (Chen et al., 2008) involved in the antioxidant response (catalases, peroxiredoxins, sulfiredoxins), cellular detoxification and multiple drug resistance (Calvo et al., 2009). In *C. albicans*, peroxiredoxin Gpx3 and interacting protein Ybp1 are needed to relay H₂O₂ signaling to Cap1 (Patterson et al., 2013). Like Yap1, Pap1 regulates the expression of two subsets of genes. Notably, one subset requires Pap1 nuclear accumulation but not its oxidation, and includes genes related to multidrug resistance like *caf5*, which encodes an efflux pump to exclude drugs from the intracellular compartment. The second subset includes antioxidant genes such as catalase and thioredoxin reductase and depends on Pap1 nuclear localization as well as its oxidation and heterodimerization with Prr1, the Skn7 ortholog. Consistent with this, Pap1 binding to drug tolerance promoters is Prr1-independent, while Pap1 association with Prr1 enhances its affinity for antioxidant gene promoters (Calvo et al., 2012).

As indicated before, H₂O₂ signal is relayed to Yap1, Pap1 and Cap1 by specific peroxiredoxins (Prxs). Prxs constitute a large family of thiol-dependent peroxidases originally discovered as enzymes catalyzing the reduction of H₂O₂, alkyl hydroperoxides and peroxinitrite (Chae et al., 1994b; Jacobson et al., 1989; Peshenko and Shichi, 2001). All Prxs contain a conserved cysteine residue, designated as the peroxidatic cysteine (Cys_P), which is oxidized by peroxides (Choi et al., 1998; Ellis and Poole, 1997). Most, but not all Prxs contain an additional cysteine, designated as the resolving cysteine (Cys_R). Depending on their catalytic mechanism, Prxs are classified into three types: typical 2-Cys, atypical 2-Cys and 1-Cys Prxs. Each catalysis cycle can be divided into three steps. The first step, peroxidation, is where the sulfur atom of the Cys_P residue exerts a nucleophilic attack on the O–O bond of the peroxide substrate, releasing the corresponding molecule of alcohol or water, at the cost of Cys_P being oxidized to the cysteine sulfenic acid form. The second step, resolution, occurs when the Cys_R attacks the sulfenic acid, resulting in the formation of an inter- or intramolecular disulfide bond for typical and atypical 2-Cys Prxs, respectively, and the release of a water molecule. This step is omitted in 1-Cys Prxs, as they do not have a Cys_R residue and move directly to the third step, recycling, which occurs when the oxidized Prx is reduced by thiol-containing electron donors such as thioredoxin (Chae et al., 1994a). The regenerated Prx can then go through another catalytic cycle.

Clearly, the basic mechanisms by which Yap1 regulates gene expression in response to oxidative stress are well conserved in yeast fungi. However, as we will see below, is not clear yet to what extent these mechanisms are conserved in filamentous fungi, which are more complex organisms, containing about twice as many genes and showing more complex patterns of growth and cell differentiation.

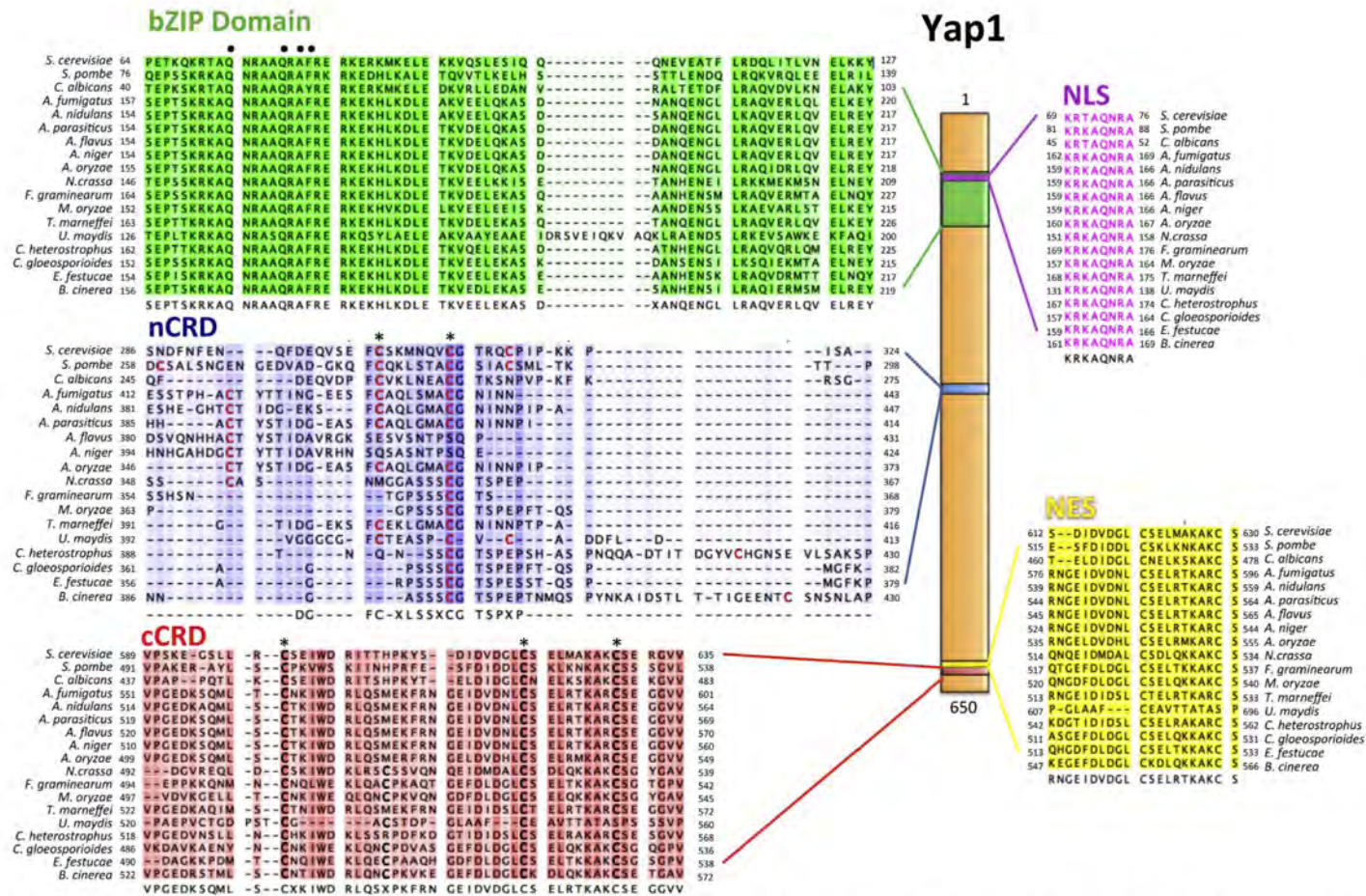


Fig. 1. Yap1 homologs from filamentous fungi contain the same domains described in yeast Yap1. The amino acid sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Yap1 is aligned to homologous proteins from *Schizosaccharomyces pombe* (SPAC1783.07c), *Candida albicans* (C3_02220W), *Aspergillus fumigatus* (AFUG09930), *Aspergillus nidulans* (AN7513), *Aspergillus parasiticus* (P875_00065012), *Aspergillus flavus* (AFLA_129340), *Aspergillus niger* (An11g07980), *Aspergillus oryzae* (AO090001000627), *Neurospora crassa* (NCU03905), *Fusarium graminearum* (FGSG_08800T0), *Magnaporthe oryzae* (MGG_12814), *Talaromyces marneffii* (PMAA_063050), *Ustilago maydis* (um02191), *Cochliobolus heterostrophus* (estExt_Genewise1Plus.C_130082), *Colletotrichum gloeosporioides* (CGL0_14059), *Epichloe festucae* (KC121577) and *Botrytis cinerea* (FM957543). The b-ZIP binding domain is indicated in green and characteristic residues are indicated by black dots. The nuclear localization sequence (NLS) and nuclear exportation sequences (NESs) are indicated in pink and yellow, respectively. N-terminal cysteine rich domain (nCRD) is labeled in blue and conserved cysteines are indicated with asterisks. C-terminal cysteine rich domain (cCRD) is indicated in red and conserved cysteines are labeled with asterisks. The alignment was generated using software T-coffee (Notredame et al., 2000) and edited using CLC Sequence Viewer (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench-direct-download/>). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Please cite this article as: Mendoza-Martinez, AE et al. Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi. Fungal Biology. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

3. Yap1 homologs in filamentous fungi are also involved in the antioxidant response

Filamentous fungi contain Yap1 homologs, which contain the same domains described in Yap1 (Fig. 1). The b-ZIP domain covers a highly conserved region of about 64 amino acids with characteristic residues Q73, Q78, A80, F81 (Fernandes et al., 1997). NLS and NES regions with lengths of about 8 and 21 residues, respectively, are also conserved. However, there are clear differences in the total number of cysteines, as well as in their distribution within putative nCRD and cCRD domains (Fig. 1 and Table 2). The total number of cysteines in the Yap1 homologs studied up to now in filamentous fungi ranges from 4 in *Aspergillus niger* to 8 in *Ustilago maydis*. Within the nCRD, the number of cysteines varies from 1 in *Epichloe festucae* to 3 in several fungi, and from 3 to 4 in the cCRD domains (Fig. 1).

As indicated, the number and localization of cysteines is important because in Yap1 different cysteines are oxidized in response to different oxidizing agents (Kuge et al., 1997). However, it is not clear how these differences in cysteine number and distribution affect the function of Yap1 homologs in filamentous fungi. In fact, cysteine function has only been studied in *U. maydis* Yap1, where the simultaneous replacement of Cys399 and Cys407 by alanine resulted in sensitivity to H₂O₂, as in the null mutant, and a lack of nuclear localization (Molina and Kahmann, 2007).

Despite this limited information, most Yap1 null mutants reported in filamentous fungi are sensitive to some type of oxidant, such as H₂O₂, *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) or menadione, indicating that the involvement of this transcription factor in the antioxidant response is highly conserved in fungi. However, there are interesting differences, likely related to differences in Yap1 structure and fungal life styles (Tables 1 and 2). *ΔyapA* mutants of endophytic fungus *E. festucae* show mycelial sensitivity to menadione (Md) and diamide, while only conidia are sensitive to H₂O₂ (Cartwright and Scott, 2013). In the animal pathogen *Aspergillus fumigatus*, *ΔAfyap1* mutants are susceptible to H₂O₂ and Md, but not to diamide (Lessing et al., 2007). In contrast, *Aspergillus parasiticus* *ΔApyapA* mutants show only slight growth defects in the presence of H₂O₂, Md and cumenehydroperoxide (CH), despite the fact that they showed reduced activity of antioxidant enzymes like SOD, GPX (glutathione peroxidase) and HPR (Hydrogen peroxide reducing enzymes) (Reverberí et al., 2008). Likewise, *Magnaporthe oryzae* mutants lacking MoAPI show only mild sensitivity to H₂O₂ (Guo et al., 2011). In contrast, *Aspergillus nidulans* NapA is essential for resistance to H₂O₂ and Md in conidia, as well as in mycelia (Asano et al., 2007; Mendoza-Martínez et al., 2017). Although *ΔnapA* spores do not show a reduction in catalase CatA activity, mycelial CatB induction by H₂O₂ depends on both NapA and the Skn7 homolog SrrA (Mendoza-Martínez et al., 2017; Vargas-Perez et al., 2007). The differential sensitivity to H₂O₂ vs. electrophilic compounds could reflect the extent to which cysteines in these Yap1 homologs are available for either peroxiredoxin-mediated or direct oxidation. However, whether or not a peroxiredoxin is directly involved in Yap1 oxidation in filamentous fungi has not been answered yet. In *E. festucae*, double mutants lacking *S. cerevisiae* Gpx3 and *S. pombe* Tpx1 homologs were still able to accumulate Yap1 in the nucleus in the presence of H₂O₂, ruling out these proteins as possible mediators of Yap1 oxidation (Cartwright and Scott, 2013). Likewise, in *A. nidulans* peroxiredoxins GpxA, TpxA and TpxB were not required for resistance to H₂O₂ or menadione, indicating that these proteins are not needed for NapA activation (Mendoza-Martínez et al., 2017). Similarly, the phenotypes of *A. fumigatus* mutants lacking PrxA, PrxB or PrxC are different from mutants lacking Yap1, arguing against the participation of these

peroxiredoxins in Yap1 activation (Rocha et al., 2018). For a long time it was considered that fungi did not contain 2-Cys peroxiredoxins. However, PrxA has been characterized in *A. fumigatus* as AspB (Hillmann et al., 2016) and in *A. nidulans* as PrxA (Xia et al., 2018), showing that it belongs to a family of atypical 2-Cys peroxiredoxins homologous to yeast peroxiredoxin Ahp1 (Lian et al., 2012). More recently, we (Mendoza-Martínez and Aguirre; unpublished) and others (Xia et al., 2018) have found that *A. nidulans* mutants lacking peroxiredoxin PrxA are highly sensitive to H₂O₂, opening the possibility that PrxA might regulate NapA in this fungus.

The Yap1 pathway is connected to other oxidative stress signaling pathways in yeast cells. For example, in *S. pombe*, Pap1 activation by Tpx1 occurs only at low H₂O₂ concentrations, while at high H₂O₂ concentrations Tpx1 is inactivated by over-oxidation of its catalytic cysteine. These conditions lead to the activation of the Sty1/Spc1 MAPK pathway, triggering a complementary antioxidant response (Vivancos et al., 2005). Therefore, differences in oxidative stress sensitivities observed in Yap1 mutants in filamentous fungi could also indicate different interactions among stress signaling pathways. Indeed, in addition to NapA (Mendoza-Martínez et al., 2017), Skn7 homolog SrrA (Vargas-Perez et al., 2007) and the Hog1/Sty1/Spc1 homologs SakA (Jaimes-Arroyo et al., 2015; Kawasaki et al., 2002; Lara-Rojas et al., 2011) and MpkC (Garrido-Bazan et al., 2018) are part of the antioxidant response in *A. nidulans*.

4. Nuclear localization of Yap1 homologs in filamentous fungi

The nuclear localization of Nap1 homologs has been studied fusing Yap1 to a reporter fluorescence protein and expressing it from its own promoter or from strong constitutive promoters, using H₂O₂ (or *t*-BOOH) as stressor agent. Although H₂O₂ concentrations and treatment times varied (Table 1), in all cases Yap1 nuclear accumulation was induced by the oxidant treatment. However, in contrast to the high basal expression of YAP1 observed in yeast cells, in most cases in which *yap1* was expressed from its native promoter, the initial fluorescence signal was low and increased only after the oxidant treatment. This is particularly notable in *A. nidulans*, where *napA* mycelial basal expression was low, as determined by qPCR and NapA::GFP fluorescence expression. In this fungus, the CCAAT-binding complex represses *napA* expression in the absence of oxidative stress. Interestingly, H₂O₂ can induce the formation of an intermolecular disulfide in CCAAT-binding complex subunit HapC, which results in the transcriptional activation of *napA* (Thon et al., 2010), creating a double redox switch in the antioxidant response in this fungus. Whether a similar regulation occurs in other filamentous fungi is not known. In addition to H₂O₂, other conditions have been reported to induce Yap1 nuclear accumulation in filamentous fungi. In the plant pathogen *Cochliobolus heterostrophus*, where *Chap1* initial expression is high in conidia and germ tubes, plant phenolic compounds like cinnamic acid trigger ChAP1 nuclear accumulation but this results in only a slight up regulation of specific antioxidant genes (Shalaby et al., 2012; Shanmugam et al., 2010). In *A. nidulans*, menadione, osmotic stress, glucose starvation stress and growth on ethanol as sole carbon source also induced NapA nuclear localization (Mendoza-Martínez et al., 2017). In *A. fumigatus* AfYap1 is accumulated in the nucleus under hypoxia, which correlates with an increased production of ROS and protein cysteine oxidation, under these conditions (Shekhova et al., 2019). One possible interpretation of these results is that all these different types of stress lead to oxidative stress (Hansberg and Aguirre, 1990).

Please cite this article as: Mendoza-Martínez, A.E et al., Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi. Fungal Biology. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

Table 1
The function of Yap1 homologs in filamentous fungi.

Organism (reference)	Oxidant sensitivity	Nuclear localization	Genes regulated	Fungi–host interaction	Developmental phenotype	Other
<i>Ustilago maydis</i> (Molina and Rahmann, 2007)	$\Delta yap1$ and $yap1^{C399A/R07A}::3XeGFP$ mutants sensitive to H_2O_2 .	Native <i>yap1</i> locus replaced by <i>yap1::3XeGFP</i> fusion. Low accumulation in vacuoles without H_2O_2 . Nuclear accumulation after 1 mM H_2O_2 (1 h) or during early biotrophic growth.	221 Yap1-dependent genes induced by 5 mM H_2O_2 , including genes encoding ROS detoxifying enzymes and enzymes involved in NADPH and glutathione biosynthesis.	$\Delta yap1$ mutants formed appressorium but were virtually non-virulent.	Brown pigment accumulation.	
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (Lay et al., 2005; Shalaby et al., 2012)	$\Delta chap1$ mutants sensitive to H_2O_2 and menadione.	GFP-CHAP1 fusion under its own promoter. Strong cytoplasmic expression without stress in germ tubes and conidia. Nuclear localization induced by 50 mM H_2O_2 , 1 mM menadione and plant phenolic signals.	Genes encoding to Thioredoxin reductase (ChTRR1), γ -glutamylcysteine synthetase (ChGSH1), glutathione reductase (ChGLR1), glutathione synthetase (ChGSH2) and thioredoxin (ChTRX1).	Virulence not affected in $\Delta chap1$ mutants.	Similar to WT.	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Li et al., 2017; Sun et al., 2016)	$\Delta CgAPI$ mutants sensitive to H_2O_2 , menadione and t-BOOH.	<i>CgAPI::eGFP</i> fusion expressed from its own promoter. Low diffuse cytoplasmic fluorescence without stress. High expression and nuclear localization after 60 min with t-BOOH.	Genes encoding glutathione disulfide reductase, cytochrome P450 monooxygenase and glutathione peroxidase. 1505 <i>CgAPI</i> -dependent genes.	$\Delta CgAPI$ mutants show attenuated virulence on poplar leaves and are non-pathogenic on mango.	Similar to WT.	
<i>Epiclothe festucae</i> (Cartwright and Scott, 2013)	$\Delta yapA$ spores sensitive to H_2O_2 . Mycelia sensitive to menadione and diamide, but not to H_2O_2 , t-BOOH or KO_2 .	YapA-EGFP expressed from native promoter. Diffuse cytoplasmic fluorescence without stress. Nuclear localization after 30 min with 16 mM H_2O_2 and 30 min post-inoculation in plant. Not determined.	Catalase gene <i>catA</i> .	Symbiotic interaction not affected in $\Delta yapA$ mutants.		
<i>Fusarium graminearum</i> (Montibus et al., 2013)	$\Delta Fgap1$ mutants sensitive to H_2O_2 , $CdCl_2$, sorbitol and NaCl.	Not determined.	Down-regulation of <i>cat1</i> , <i>cat2</i> and <i>cat3</i> catalase genes and two Cu/ZnSOD genes. Expression of genes <i>Tri4</i> and <i>Tri101</i> slightly up-regulated.	Virulence not affected in $\Delta Fgap1$ mutants.	Similar to WT.	Mycotoxin genes and toxin production increased in $\Delta Fgap1$ mutants.
<i>Aspergillus fumigatus</i> (Liesing et al., 2007; Qiao et al., 2008)	$\Delta Afyap1$ mutants sensitive to H_2O_2 and menadione but not to diamide and DETANO.	<i>fyap1-eGFP</i> gene expressed from heterologous promoter. Low and diffuse cytoplasmic fluorescence without stress. Nuclear localization after 60 min with 2 mM H_2O_2 . Not determined.	57 protein spots, decreased or increased in intensity in $\Delta Afyap1$ mutants treated with 2 mM H_2O_2 , including catalases, peroxidases and peroxiredoxins. SOD, HRP and GPX activities reduced and early expression of <i>afIR</i> and <i>norA</i> genes, involved in aflatoxin biosynthesis, in a $\Delta Apyap1$ mutant. Increased expression of transcription factor Skn7.	Virulence not affected in $\Delta Afyap1$ mutants.	Slight growth reduction on malt agar.	Cat1 and Cat2 activity reduced in $\Delta Afyap1$ mutants.
<i>Aspergillus parasiticus</i> (Reverber et al., 2007, 2008)	$\Delta Apyap1$ mutants sensitive to H_2O_2 , Cumene Hydroperoxide and menadione.	Not determined.	Not determined.		Increased and premature conidiogenesis.	Increased aflatoxin production.
<i>Talaromyces marneffei</i> (Dankai et al., 2016)	Mutant sensitive to H_2O_2 , menadione and $NaNO_2$.	Not determined.	Not determined.	YapA necessary for virulence.	Slow growth and smaller colonies with more red pigment. Fewer aerial hyphae and conidia.	Swollen cells and no internal fission.
<i>Magnaporthe oryzae</i> (Luo et al., 2011)	<i>Moap1</i> mutant mycelia sensitive to H_2O_2 .	<i>MoAP1::eGFP</i> expressed from <i>trpC</i> promoter. Low fluorescence signal throughout the cell without stress. Nuclear localization after 2 mM H_2O_2 (2 h).	1179 <i>Moap1</i> -dependent genes, including genes putatively involved in ROS detoxification.	<i>MoAP1</i> is required for growth of invasive hyphae and for pathogenicity.	Decreased growth of aerial hypha and conidiation. Abnormal morphology of conidia.	High expression in conidia.

(continued on next page)

Please cite this article as: Mendoza-Martínez, A.E. et al., Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi, Fungal Biology, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

Table 1 (continued)

Organism (reference)	Oxidant sensitivity	Nuclear localization	Genes regulated	Fungi–host interaction	Developmental phenotype	Other
<i>Botrytis cinerea</i> (Temme and Tudzynski, 2009)	Δ bap1 mutants sensitive to H ₂ O ₂ and menadione.	Not determined	99 H ₂ O ₂ -induced and Bap1-dependent genes.	Virulence not affected in Δ Apyap1 mutants.	Similar to WT.	
<i>Aspergillus nidulans</i> (Mendoza-Martinez et al., 2017)	Mutant mycelia and conidia sensitive to H ₂ O ₂ and menadione.	napA::gfp fusion from its own promoter. Very low expression without stress. Increased expression and nuclear localization after 1–2 h with 2 mM H ₂ O ₂ , glucose starvation, ethanol as carbon source or osmotic stress.	214 NapA-dependent genes in isolated conidia.		Decreased asexual sporulation and highly derepressed sexual development.	Δ napA mutants unable to grow on ethanol, sorbose and fructose as sole carbon sources.
<i>Neurospora crassa</i> (Takahashi et al., 2010; Tian et al., 2011)	Mutant Δ NcAp-1 sensitive to H ₂ O ₂ CdCl ₂ and Menadione.	Nap-1-sGFP expressed from heterologous cgl1 promoter. Strong cytoplasmic fluorescence without stress. Nuclear localization after 5 min with 50 μ M menadione or 30 min with 30 mM H ₂ O ₂ or 10 mM CdCl for 30 min.	16 nap-1-dependent genes induced by menadione (microarray). 45 genes NcAp-1 dependent genes induced by 6 mM H ₂ O ₂ (transcriptional profiling).		Growth and asexual reproduction similar to WT.	

Table 2

Protein size and total cysteine content in Yap1 homologs from filamentous fungi.

Organism	Protein name	Protein size (aa)	Total cysteines	Identity to Yap1 (%)
<i>Ustilago maydis</i>	Yap1	758	C396, C399, C405, C407, C526, C532, C536 and C546	40
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	CHAP1	589	C394, C418, C529, C553 and C562	51
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CgAP1	566	C367, C497, C507, C521, C530 and C557	44
<i>Epichloe festucae</i>	YapA	580	C363, C410, C499, C509, C523 and C532	45
<i>Fusarium graminearum</i>	Fgap1	588	C365, C491, C503, C513, C527, C536 and C564	44
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AfYap1	615	C419, C431, C438, C562, C586 and C595	52
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ApyapA	583	C346, C388, C400, C407, C530, C554 and C563	44
<i>Aspergillus nidulans</i>	NapA	577	C388, C397, C404, C525, C549 and C558	41
<i>Aspergillus flavus</i>		584	C346, C388, C400, C407, C531, C555 and C564	41
<i>Aspergillus oryzae</i>		563	C346, C358, C365, C510, C534 and C543	41
<i>Aspergillus niger</i>		574	C402, C521, C545 and C554	34
<i>Neurospora crassa</i>	NcAp1	577	C350, C361, C500, C510, C524, C533, C561 and C565	39
<i>Talaromyces marneffei</i>	YapA	592	C400, C407, C533, C557 and C566.	42
<i>Magnaporthe oryzae</i>	MoAP1	576	C369, C506, C516, C530, C539 and C566	46
<i>Botrytis cinerea</i>	Bap1	601	C393 and C423, C533, C543, C557 and C566	44

5. Yap1 homologs in filamentous fungi and gene expression

Most studies showing that Yap1 regulates gene expression in response to oxidative stress in filamentous fungi have monitored the expression of specific antioxidant genes such as genes encoding catalases, peroxidases or genes involved in glutathione biosynthesis (Table 1). In more comprehensive studies, a proteomic study identified 29 proteins with decreased abundance in mutants lacking AfYap1 and treated with H₂O₂, including catalases, peroxidases, peroxiredoxins and chaperons (Lessing et al., 2007). Transcriptomic analysis in *Neurospora crassa* identified 16 NcAP-1-dependent genes induced by menadione (Takahashi et al., 2010) and 45 genes induced by H₂O₂ (Tian et al., 2011). Similar studies identified 99, 221, 214, 1179 and 1505 yap1-regulated genes induced by H₂O₂ in *Botrytis cinerea* (Temme and Tudzynski, 2009), *U. maydis* (Molina and Kahmann, 2007), *A. nidulans* (Mendoza-Martinez et al., 2017), *M. oryzae* (Guo et al., 2011) and *Colletotrichum gloeosporioides* (Li et al., 2017), respectively. By comparison, about 100 and 50 Yap1 and Pap1 regulated genes have been reported in *S. cerevisiae* (Gasch et al., 2000) and *S. pombe* (Chen et al., 2008), respectively. While most of these studies identified Yap1-dependent genes in response to oxidants, the transcriptomic study in *A. nidulans* analyzed NapA-dependent gene expression in isolated asexual spores, showing for the first time, a role for this transcription factor in developmental

gene regulation. Notably, the set of genes that NapA regulates during conidiation is different from the set of genes normally induced by oxidants. Indeed, during conidiation NapA is required for full induction of 201 genes, which include genes encoding 12 putative transcription factors; 46 oxidoreductase enzymes; 32 membrane transporter proteins, putatively involved in sugar and amino acid transport, drug and metal detoxification; 29 predicted or confirmed hydrolases involved in ethanol and complex carbohydrate utilization, as well as 29 proteins with recognizable protein domains not included in the previous categories. Some of these enzymes would be involved in iron acquisition and the production of antibiotics and other secondary metabolites (Mendoza-Martinez et al., 2017). These results indicate that like in yeast cells, Yap1 homologs in filamentous fungi can regulate the expression of both antioxidant and drug detoxification genes. This might have clinical implications as in the opportunistic human pathogen *Aspergillus flavus* a Yap1 point mutation that would result in constitutive nuclear localization causes resistance to the antifungal voriconazole, mediated by the upregulation of the *atrR* gene, encoding an ATP-binding cassette transporter (Ukai et al., 2018). In *Cryptococcus neoformans* CnYap1 is dispensable for virulence but required for resistance to the fungicide fluconazole (Paul et al., 2015) and for the fluconazole-mediated induction of the *AFR1* gene, encoding a major ABC-type pump critical for azole efflux (Chang et al., 2018).

Please cite this article as: Mendoza-Martinez, A.E et al., Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi, Fungal Biology, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

6. Yap1 homologs regulate inter-kingdom communication in filamentous fungi

Major mechanisms of defense in plants and animals involve the production of ROS to prevent pathogen attack. Therefore, fungal pathogens need effective strategies for ROS detoxification, which could involve Yap1 homologs. In biotroph *U. maydis*, Yap1 is necessary for successful infection but not for the development of the infection structure called appressorium. H₂O₂ accumulation was detected at the plant infection point in $\Delta yap1$ but not in WT strains, and the flavoenzyme inhibitor DPI prevented such H₂O₂ accumulation and restored $\Delta yap1$ virulence, suggesting that Yap1 is essential to neutralize the ROS generated by the host NADPH oxidases (Molina and Kahmann, 2007). Similarly, in the hemibiotrophic pathogen *M. oryzae*, *Moap1* mutants are unable to infect the host plant but do form appressoria. In these mutants also the growth of invasive hyphae during infection was reduced and ROS accumulation was observed at the infection site (Guo et al., 2011), indicating that MoAp1 is necessary for ROS scavenging. Similar results were reported in hemibiotrophic *C. gloeosporioides*, where $\Delta CgAP-1$ mutants were unable to cause lesions on mango (Li et al., 2017) and showed decreased virulence on poplar leaves, despite not being affected in appressorium formation. Moreover, wild type CgAP1 was necessary to prevent ROS accumulation during early stages of biotrophic growth (Sun et al., 2016). Likewise, $\Delta Yap1$ mutants of hemibiotrophic *Alternaria alternata* failed to incite necrotic lesions on wounded or unwounded *Minneola* leaves and the use of plant NADPH oxidase inhibitors partially restored virulence (Lin et al., 2009). However, Yap1 homologs are not essential for virulence or plant interactions in all pathogenic or symbiotic fungi studied. The biotrophic interaction of *E. festucae* with its host plant is not affected by the lack of Yap1, although Yap1 accumulates in nuclei during plant penetration (Carrwright and Scott, 2013). In *C. heterostrophus*, CHAP1 deletion does not affect virulence, despite that nuclear accumulation is induced from 2.5 to 30 h after infection (Lev et al., 2005). In necrotrophic *B. cinerea*, the deletion of *bap1* did not impact virulence (Temme and Tudzynski, 2009) and a *Fusarium graminearum Fgap1* deletion mutant was also not affected in pathogenicity (Montibus et al., 2013). These differences in Yap1 impact on fungal virulence may be related to the different type of associations established between plant and fungi, as Yap1 requirement for virulence appears to be more common in biotrophic and hemibiotrophic fungi. Biotrophic fungi establish a close association with the host through the development of specialized infection hyphae within living plant cells, from which nutrients are taken up (Mendgen and Hahn, 2002). Necrotrophic fungi secrete toxins and enzymes that kill host cells and then nutrients released from the dead tissue are taken up, while hemibiotrophic fungi combine both strategies (Horbach et al., 2011). An initial biotrophic phase, during which the host's immune system and cell death is actively suppressed, allows invasive hyphae to spread throughout the infected plant tissue. This is followed by a necrotrophic phase during which toxins are secreted by the pathogen to induce host cell death. For necrotrophs and hemibiotrophic fungi, ROS accumulation act as a virulence factor that induces cell death for successful infection (Mengiste, 2012). For most biotrophic fungi, the Yap1 pathway is probably sufficient and necessary to contend with ROS during the first stages of colonization, while necrotrophic fungi might use additional antioxidant pathways to counteract the oxidative stress produced by the host.

ROS also play critical roles in animal's immunity. Fungal human pathogens are usually opportunistic like *A. fumigatus*, which causes invasive pulmonary disease in immunocompromised patients. However, $\Delta Jyap1$ mutants did not show attenuated virulence in a murine model (Lessing et al., 2007). In the dimorphic fungus

Talaromyces marneffeii, $\Delta yapA$ mutants showed decreased survival in human macrophages, suggesting that in this fungus YapA is important for virulence (Dankai et al., 2016).

7. Yap1 functions in secondary metabolism

Secondary metabolites are small non-essential molecules that work as chemical communication signals in complex ecosystems, defending the habitat from predators or inhibiting the growth of competitors. Fungal secondary metabolites like mycotoxins cause food contamination, affecting human health. In contrast, penicillin and others are used as medical treatment of infectious diseases, cancer, or as immunosuppressants (See (Keller, 2018) for a recent review).

In fungi, secondary metabolite production is generally related to developmental processes and in some cases development is regulated by secondary metabolites (Marquez-Fernandez et al., 2007; Soid-Raggi et al., 2016). In *A. nidulans*, *napA* overexpression results in increased tolerance to oxidative stress and decreased production of secondary metabolites, including sterigmatocystin, emericellin, asperthecin, shamixanthone, and epishamixanthone and a shift from sexual to asexual development (Yin et al., 2013). Consistent with this, *A. parasiticus* $\Delta yapA$ mutants produce more hydroperoxides and aflatoxin during growth on maize seeds, compared to the wild type strain (Reverberi et al., 2007). These results suggest that NapA regulates secondary metabolism genes in a negative way. However, during development, NapA is necessary for the induction of several secondary metabolism genes in *A. nidulans*. During sexual development, NapA is needed for expression of a specific polyketide synthetase involved in the production of the cleistothecial melanin (Mendoza-Martinez et al., 2017), and during asexual development it is required for the conidial accumulation of mRNAs corresponding to two polyketide synthases genes and other genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites such as sterigmatocystin, penicillin, monodictyphenone and prenyl xanthenes, all with antimicrobial activity (Mendoza-Martinez et al., 2017). These results indicate that in filamentous fungi Yap1 homologs can repress as well as activate secondary metabolism genes, perhaps depending on the developmental stage. Further research is needed to determine the specific mechanisms.

8. ROS and Yap1 regulate development in filamentous fungi

Hansberg and Aguirre (1990) proposed that increased (localized) ROS levels, beyond certain threshold, induce cell differentiation. Such increase is a transient process as much as ROS induce the expression of ROS scavenging systems (Aguirre et al., 2005; Hansberg and Aguirre, 1990). In filamentous fungi, the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (NOX) connect ROS and cell differentiation processes. These enzymes transfer electrons from NADPH to produce superoxide, which can readily produce H₂O₂. NOX homologs are widely distributed in animals, plants and many multicellular microorganisms (Aguirre and Lambeth, 2010). The link between NOX activity and cell differentiation in fungi was first established in *A. nidulans*, where NoxA was shown to be necessary for fruiting body development (Lara-Ortiz et al., 2003). Similar results were obtained in *Podospira anserina* (Malagnac et al., 2004), *N. crassa* (Cano-Dominguez et al., 2008) and other fungi. In *B. cinerea*, NoxA and NoxB are necessary for the differentiation of sclerotia (Segmuller et al., 2008). Additional evidence indicating that ROS regulate fungal sexual development comes from experiments in *A. nidulans* showing a drastic increase in the production of fruiting bodies in mutants that either overexpress NoxA (Lara-Ortiz et al., 2003), lack catalases CatA, CatB

and CatC (Lara-Ortiz, 2004), or lack NapA (Mendoza-Martinez et al., 2017).

In different fashions, ROS and NapA have also been related to asexual development in filamentous fungi. In *A. alternata*, mutants lacking NoxB or its regulatory subunit NoxR show a drastic decrease in conidiation and YAP1 expression appears reduced in these mutants (Yang and Chung, 2012, 2013). In *T. marneffeii*, *yapA* mutants produce conidiophores with fewer phialides and conidia, and conidia show decreased germination rates, while yeast cells fail to undergo binary fission (Dankai et al., 2016). In *M. oryzae* MoAP1 deletion led to a reduction of aerial hyphal growth, abnormal conidium morphology and reduced conidiation (Guo et al., 2011). In *A. nidulans*, NapA is also needed for full conidiation (Mendoza-Martinez et al., 2017), and the normal accumulation of 201 mRNAs in conidia. Lower conidiation in Δ *napA* mutants might be related to their lower expression of *gmcA* gene, encoding a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for early stages of conidiophore development (Etxebeste et al., 2012). In *A. fumigatus*, *gmcA* ortholog AFUA_3G01580 is induced by H₂O₂ in an A_YYap1-dependent manner (Lessing et al., 2007), suggesting that *gmcA* regulation by NapA is conserved, at least in the *Aspergilli*.

9. Yap1 in nutrient assimilation

In *S. pombe* glucose limitation induces both, the activation of the stress activated MAPK Spc1/Sty1 pathway, and the nuclear accumulation of Pap1 (Madrid et al., 2004). *S. cerevisiae* Yap1 was also identified in a two-hybrid screen for proteins interacting with Sip2, a β subunit of the Snf1 protein kinase, which is important for adaptation to glucose. Yap1 also shows nuclear accumulation on glycerol as carbon source (Wiatrowski and Carlson, 2003) and *A. nidulans* Δ *napA* mutants are unable to grow on ethanol or arabinose and show very reduced growth on fructose, as sole carbon sources. Consistent with their lack of growth on ethanol, Δ *napA* mutant conidia show notably decreased levels of *alcR*, *alcA* and *aldA* mRNAs, and the corresponding proteins are essential for ethanol utilization (Mendoza-Martinez et al., 2017). Such connections between Yap1, oxidative stress and nutrient assimilation deserve a more detailed exploration in both, yeasts and filamentous fungi.

10. Concluding remarks

It is clear that Yap1 homologs in filamentous fungi regulate the antioxidant response, as well as virulence, secondary metabolism, development and nutrient assimilation. However, it is not clear if the same regulatory mechanisms operate under all these conditions. It is critical to determine which Yap1 nCRD and cCRD cysteines are critical for H₂O₂ vs. electrophilic compound oxidation and to determine if peroxiredoxins are involved in H₂O₂-mediated oxidation. As mentioned before, natural plant phenolic compounds like cinnamic acid can trigger ChAP1 nuclear accumulation but only a slight up regulation of specific antioxidant genes in *C. heterostrophus* (Shalaby et al., 2012; Shanmugam et al., 2010). This raises the possibility that phenolic compounds produced during fungal development (i.e. conidiation, sexual development) could physiologically induce Yap1 direct oxidation, as opposed to H₂O₂-induced peroxiredoxin-dependent oxidation. Such possibility is supported by the fact that L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, which catalyzes the deamination of phenylalanine to form *trans*-cinnamic acid and ammonia, and PAL-encoding genes have been detected not only in plants, but also in fungi, including *A. nidulans* (Hyun et al., 2011). Moreover, AfeA enzymes related to plant 4-coumarate ligases (4CL), have also been reported to regulate development in *A. nidulans* and be present in other fungi (Soid-Raggi et al., 2016). 4CL is the third enzyme in the phenylpropanoid

biosynthesis pathway in plants and forms coenzyme esters from hydroxycinnamic acids such as coumaric, caffeic, or ferulic acids (Hahlbrock and Grisebach, 1970). Moreover, other Yap1 oxidizing physiological compounds like methylglyoxal could accumulate during development and induce the expression of drug detoxification genes. Finally, it is critical to determine if some Yap1 functions depend on its association with Skn7 homologs or other proteins, as it occurs in yeast cells, and to delimitate such functions.

Acknowledgments

Our work is supported by CONACYT grants Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-I-319, CONACYT-DFG 277869 and PAPIIT-UNAM IN200719 and IV200519. This article is part of the project granted for the International Symposium on Fungal Stress—ISFUS and the Brazilian agencies CAPES and FAPESP are acknowledged for their grants 88887.289326/2019-00 and 2018/20571-6, respectively.

References

- Aguirre, J., Lambeth, J.D., 2010. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1342–1353.
- Aguirre, J., Rios-Mombreg, M., Hewitt, D., Hansberg, W., 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111–118.
- Alarco, A.M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., Raymond, M., 1997. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.* 272, 19304–19313.
- Asano, Y., Hagiwara, D., Yamashino, T., Mizuno, T., 2007. Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1800–1803.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., Toledano, M.B., 2003. Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 889–900.
- Bersweiler, A., D'Autreaux, B., Mazon, H., Kriznik, A., Belli, G., Delaunay-Moisan, A., Toledano, M.B., Rahuel-Clermont, S., 2017. A scaffold protein that chaperones a cysteine-sulfenic acid in H₂O₂ signaling. *Nat. Chem. Biol.* 13, 909–915.
- Calvo, I.A., Boronot, S., Domenech, A., Garcia-Santamarina, S., Ayte, J., Hidalgo, E., 2013. Dissection of a redox relay: H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-thioredoxin cycle. *Cell Rep.* 5, 1413–1424.
- Calvo, I.A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Sanso, M., Zuin, A., Perez, P., Ayte, J., Hidalgo, E., 2009. Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PLoS One* 4, e6619.
- Calvo, I.A., Garcia, P., Ayte, J., Hidalgo, E., 2012. The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂. *Nucleic Acids Res.* 40, 4816–4824.
- Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W., Aguirre, J., 2008. NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 7, 1352–1361.
- Cartwright, G.M., Scott, B., 2013. Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*. *Eukaryot. Cell* 12, 1335–1348.
- Chae, H.Z., Chung, S.J., Rhee, S.G., 1994a. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670–27678.
- Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., Rhee, S.G., 1994b. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7017–7021.
- Chang, M., Sionov, E., Khanal Lamichhane, A., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y.C., 2018. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Chen, D., Wilkinson, C.R., Watt, S., Penkett, C.J., Toone, W.M., Jones, N., Bahler, J., 2008. Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 308–317.
- Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G., Ryu, S.E., 1998. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 400–406.
- D'Autreaux, B., Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- Dankai, W., Pongpoom, M., Youngschim, S., Cooper Jr., C.R., Vanittanakom, N., 2016. The *yapA* encodes bZIP transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffeii*. *PLoS One* 11, e0163778.

Please cite this article as: Mendoza-Martinez, A.E et al., Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi, *Fungal Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.001>

- Dantas Ada, S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., Quinn, J., 2015. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* 5, 142–165.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B., 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19, 5157–5166.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B., 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481.
- Ellis, H.R., Poole, L.B., 1997. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36, 13349–13356.
- Etchebeste, O., Herrero-García, E., Cortese, M.S., Garzia, A., Oñatividad-Arango, E., de los Ríos, V., Ugaldé, U., Espeso, E.A., 2012. GmcA is a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 7, e40292.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K., 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.* 17, 6982–6993.
- García-Santamarina, S., Boronat, S., Hidalgo, E., 2014. Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Biochemistry* 53, 2560–2580.
- Garrido-Bazan, V., Jaimes-Arroyo, R., Sanchez, O., Lara-Rojas, F., Aguirre, J., 2018. Saka and MpkC stress MAPKs show opposite and common functions during stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 9, 2518.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257.
- Gruhlke, M.C.H., Schlembach, I., Leontiev, R., Uebachs, A., Gollwitzer, P.U.G., Weiss, A., Delaunay, A., Toledano, M., Slusarenko, A.J., 2017. Yap1p, the central regulator of the *S. cerevisiae* oxidative stress response, is activated by allicin, a natural oxidant and defence substance of garlic. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 793–802.
- Gulshan, K., Rovinsky, S.A., Coleman, S.T., Moye-Rowley, W.S., 2005. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 280, 40524–40533.
- Gulshan, K., Thommandru, B., Moye-Rowley, W.S., 2012. Proteolytic degradation of the Yap1 transcription factor is regulated by subcellular localization and the E3 ubiquitin ligase Not4. *J. Biol. Chem.* 287, 26796–26805.
- Guo, M., Chen, Y., Du, Y., Dong, Y., Guo, W., Zhai, S., Zhang, H., Dong, S., Zhang, Z., Wang, Y., Wang, P., Zheng, X., 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 7, e1001302.
- Hahlbrock, K., Grisebach, H., 1970. Formation of coenzyme A esters of cinnamic acids with an enzyme preparation from cell suspension cultures of parsley. *FEBS Lett.* 11, 62–64.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Hansberg, W., Aguirre, J., 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142, 201–221.
- Harshman, K.D., Moye-Rowley, W.S., Parker, C.S., 1988. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* 53, 321–330.
- Hertle, K., Haase, E., Brendel, M., 1991. The SNQ3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr. Genet.* 19, 429–433.
- Hillmann, F., Bagramyan, K., Strassburger, M., Heinekamp, T., Hong, T.B., Bzymek, K.P., Williams, J.C., Brakhage, A.A., Kalkum, M., 2016. The crystal structure of peroxidoreductase Asp B3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* 6, 33396.
- Holmstrom, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 411–421.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W., Deising, H.B., 2011. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J. Plant Physiol.* 168, 51–62.
- Hyun, M.W., Yun, Y.H., Kim, J.Y., Kim, S.H., 2011. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* 39, 257–265.
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., Kimura, A., 1999. Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 28459–28465.
- Jacobson, E.S., Morgan, R.W., Christman, M.F., Ames, B.N., 1989. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 264, 1488–1496.
- Jaimes-Arroyo, R., Lara-Rojas, F., Bayram, O., Valerius, O., Braus, G.H., Aguirre, J., 2015. The SrkA kinase is part of the Saka Mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 14, 495–510.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., Aguirre, J., 2002. Saka MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 45, 1153–1163.
- Keller, N.P., 2019 Mar. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (3), 167–180.
- Kos, I., Patterson, M.J., Znaidi, S., Kaloriti, D., da Silva Dantas, A., Herrero-de-Dios, C.M., d'Enfert, C., Brown, A.J., Quinn, J., 2016. Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency. *mBio* 7, e00331.
- Kuge, S., Jones, N., 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13, 655–664.
- Kuge, S., Jones, N., Nomoto, A., 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16, 1710–1720.
- Lara-Ortiz, T., 2004. NoxA, una NADPH oxidasa homóloga a gp91phox, regula el desarrollo sexual en el hongo *Aspergillus nidulans*. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 69.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre, J., 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 50, 1241–1255.
- Lara-Rojas, F., Sanchez, O., Kawasaki, L., Aguirre, J., 2011. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK Saka to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* 80, 436–454.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B., 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040–16046.
- Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, L., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., Brakhage, A.A., 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* 6, 2290–2302.
- Lev, S., Hadar, R., Amedeo, P., Baker, S.E., Yoder, O.C., Horwitz, B.A., 2005. Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryot. Cell* 4, 443–454.
- Li, X., Wu, Y., Liu, Z., Zhang, C., 2017. The function and transcriptome analysis of a bZIP transcription factor CgAP1 in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol. Res.* 197, 39–48.
- Lian, F.M., Yu, J., Ma, X.X., Yu, X.J., Chen, Y., Zhou, C.Z., 2012. Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxidoreductase reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 287, 17077–17087.
- Lin, C.H., Yang, S.L., Chung, K.R., 2009. The YAP1 homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 942–952.
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., Cansado, J., 2004. A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 279, 41594–41602.
- Maeta, K., Izawa, S., Okazaki, S., Kuge, S., Inoue, Y., 2004. Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol. Cell Biol.* 24, 8753–8764.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., Silar, P., 2004. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 982–997.
- Marquez-Fernandez, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J.L., Viniestra-Gonzalez, G., Deising, H.B., Aguirre, J., 2007. Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot. Cell* 6, 710–720.
- Mendgen, K., Hahn, M., 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7, 352–356.
- Mendoza-Martínez, A.E., Lara-Rojas, F., Sanchez, O., Aguirre, J., 2017. NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 8, 516.
- Mengiste, T., 2012. Plant immunity to necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 267–294.
- Molina, L., Kahmann, R., 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19, 2293–2309.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2013. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 8, e83377.
- Mulford, K.E., Fassler, J.S., 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot. Cell* 10, 761–769.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217.
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N., Kuge, S., 2007. Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Mol. Cell* 27, 675–688.
- Ouyang, X., Tran, Q.T., Goodwin, S., Wible, R.S., Sutter, C.H., Sutter, T.R., 2011. Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1–13.
- Patterson, M.J., McKenzie, C.G., Smith, D.A., da Silva Dantas, A., Sherston, S., Veal, E.A., Morgan, B.A., MacCallum, D.M., Erwig, L.P., Quinn, J., 2013. Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antioxid. Redox. Signal.* 19, 2244–2260.
- Paul, S., Doering, T.L., Moye-Rowley, W.S., 2015. Cryptococcus neoformans Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. *Fungal Genet. Biol.* 74, 1–9.

- Peshenko, I.V., Shichi, H., 2001. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxytrite. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 292–303.
- Qiao, J., Kontoyiannis, D.P., Calderone, R., Li, D., Ma, Y., Wan, Z., Li, R., Liu, W., 2008. Afp1, encoding a bZIP transcriptional factor of *Aspergillus fumigatus*, contributes to oxidative stress response but is not essential to the virulence of this pathogen in mice immunosuppressed by cyclophosphamide and triamcinolone. *Med Mycol* 46, 773–782.
- Reverber, M., Zjalic, S., Punelli, F., Ricelli, A., Fabbri, A.A., Fanelli, C., 2007. Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. *Food Addit. Contam.* 24, 1070–1075.
- Reverber, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C., Fabbri, A.A., 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot. Cell* 7, 988–1000.
- Rocha, M.C., de Godoy, K.F., Bannitz-Fernandes, R., Fabri, J., Barbosa, M.M.F., de Castro, P.A., Almeida, F., Goldman, G.H., da Cunha, A.F., Netto, L.E.S., de Oliveira, M.A., Malavazi, L., 2018. Analyses of the three 1-Cys peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Sci. Rep.* 8, 12314.
- Schnell, N., Entian, K.D., 1991. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PARI) conferring resistance to iron chelators. *Eur. J. Biochem.* 200, 487–493.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J., Tudzynski, P., 2008. NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 808–819.
- Shahi, P., Gulshan, K., Naar, A.M., Moye-Rowley, W.S., 2010. Differential roles of transcriptional mediator subunits in regulation of multidrug resistance gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2469–2482.
- Shalaby, S., Horwitz, B.A., Larkov, O., 2012. Structure–activity relationships delineate how the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* uses aromatic compounds as signals and metabolites. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 931–940.
- Shanmugam, V., Ronen, M., Shalaby, S., Larkov, O., Rachamim, Y., Hadar, R., Rose, M.S., Carmeli, S., Horwitz, B.A., Lev, S., 2010. The fungal pathogen *Cochliobolus heterostrophus* responds to maize phenolics: novel small molecule signals in a plant–fungal interaction. *Cell Microbiol.* 12, 1421–1434.
- Shekhova, E., Ivanova, L., Kruger, T., Stroe, M.C., Macheleidt, J., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A., 2019. Redox proteomic analysis reveals oxidative modifications of proteins by increased levels of intracellular reactive oxygen species during hypoxia adaptation of *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics* e1800339.
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O., Ramos-Balderas, J.L., Aguirre, J., 2016. The adenylate-forming enzymes AfeA and TmpB are involved in *Aspergillus nidulans* self-communication during asexual development. *Front. Microbiol.* 7, 353.
- Sun, Y., Wang, Y., Tian, C., 2016. bZIP transcription factor CgAP1 is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genet. Biol.* 95, 58–66.
- Takahashi, M., Yamashita, K., Shiozawa, A., Ichiishi, A., Fukumori, F., Fujimura, M., 2010. An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulates expression of the glutathione S-transferase and NADH:flavin oxidoreductase genes in *Neurospora crassa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 746–752.
- Temme, N., Tudzynski, P., 2009. Does *Botrytis cinerea* ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 987–998.
- Thon, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D.H., Eisendle, M., Haas, H., Brakhage, A.A., 2010. The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 38, 1098–1113.
- Tian, C., Li, J., Glass, N.L., 2011. Exploring the bZIP transcription factor regulatory network in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 157, 747–759.
- Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M., 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev.* 5, 60–73.
- Toone, W.M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B.A., Toda, T., Jones, N., 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* 12, 1453–1463.
- Ukai, Y., Kuroiwa, M., Kurihara, N., Naruse, H., Homma, T., Maki, H., Naito, A., 2018. Contributions of yap1 mutation and subsequent atrF upregulation to voriconazole resistance in *Aspergillus flavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Uthe, H., Vanselow, J.T., Schlosser, A., 2017. Proteomic analysis of the mediator complex interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 7, 43584.
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., Aguirre, J., 2007. Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 6, 1570–1583.
- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Biteau, B., Nicot, C., Aye, J., Toledano, M.B., Hidalgo, E., 2005. A cysteine-sulfenic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8875–8880.
- Wemmie, J.A., Steggerda, S.M., Moye-Rowley, W.S., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J. Biol. Chem.* 272, 7908–7914.
- Wemmie, J.A., Szczycka, M.S., Thiele, D.J., Moye-Rowley, W.S., 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J. Biol. Chem.* 269, 32592–32597.
- Wiatrowski, H.A., Carlson, M., 2003. Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 2, 19–26.
- Wood, M.J., Andrade, E.C., Storz, G., 2003. The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry* 42, 11982–11991.
- Xia, Y., Yu, H., Zhou, Z., Takaya, N., Zhou, S., Wang, P., 2018. Peroxiredoxin system of *Aspergillus nidulans* resists inactivation by high concentration of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 145–156.
- Yan, C., Lee, L.H., Davis, L.L., 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 17, 7416–7429.
- Yang, S.L., Chung, K.R., 2012. The NADPH oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. *Mol. Plant Pathol.* 13, 900–914.
- Yang, S.L., Chung, K.R., 2013. Similar and distinct roles of NADPH oxidase components in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Pathol.* 14, 543–556.
- Yin, W.B., Reinke, A.W., Szilagy, M., Emri, T., Chiang, Y.M., Keating, A.E., Pocs, I., Wang, C.C., Keller, N.P., 2013. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159, 77–88.

