



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**LAS CINASAS SENSORAS DE ESTRÉS SakA Y MpkC Y LAS
PROTEÍNAS DnmA Y FisA, EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS
OXIDATIVO, LA DINÁMICA MITOCONDRIAL Y LA DIFERENCIACIÓN
CELULAR EN *Aspergillus nidulans***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Verónica Garrido Bazán

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jesús Aguirre Linares
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR)
OFICIO CPCB/793/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Comité Académico en su sesión (Virtual) ordinaria del día 19 de octubre de 2020, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GARRIDO BAZÁN VERÓNICA** con número de cuenta **507007813** con la tesis titulada **“Las cinasas sensoras de estrés SakA y MpkC y las proteínas DnmA y FisA, en la respuesta al estrés oxidativo, la dinámica mitocondrial y la diferenciación celular en *Aspergillus nidulans*”**, realizada bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
Vocal: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Secretario: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
Suplente: DR. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES
Suplente: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 07 de diciembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos oficiales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Este trabajo fue financiado por el CONACYT (proyectos CB-2014-01-238492, Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-I-319, CONACYT-DFG 277869), y por PAPIIT-UNAM (proyectos IN208916, IN200719 y IV200519).

Agradezco al CONACYT por el apoyo de una beca doctoral con registro de becario 388278 y al PAPIIT (IN208916) por una beca de obtención de grado.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares en el laboratorio 107 oriente, Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró este proyecto estuvo formado por:

Dr. Jesús Aguirre Linares, Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Rosa Estela Navarro González, Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Luis Cárdenas Torres, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Agradecimientos a título personal

Agradezco el invaluable apoyo técnico de la Bióloga Alma Olivia Sánchez González, durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco ampliamente al Dr. Leonardo Peraza Reyes y al Dr. Juan Pablo Pardo por su apoyo y asesoría durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Fernando García y al Dr. Abraham Rosas por el apoyo y la asesoría en el área de microscopía.

Se agradece al jurado que fue conformado por:

Presidenta: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Secretario: Dra. Rosa Estela Navarro González

Suplente: Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes

Suplente: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Dedicatoria

A mis padres y hermanas por apoyarme en todo momento y brindarme mucho cariño, amor y confianza.

Al Dr. Jesús Aguirre por motivarme, por confiar en mí y apoyar siempre mis ideas y mi curiosidad científica.

A mis amigos Neri, Adrián y Carlos por apoyarme y estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos y amigas del laboratorio Daniela, Emilio, Fabián, Ulises, Nallely, Ariann y Silvana.

A Rafa y Tadeo por ayudarme desde mis inicios en este proyecto y por su amistad brindada.

A mi amiga Pao por sus palabras de apoyo.

Y muchas personas más, quienes seguramente de manera especial estuvieron conmigo durante esta etapa de mi vida, mil gracias.

Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción general	5
1.1 Las especies reactivas del oxígeno (ERO)	5
1.2 Fuentes de las especies reactivas del oxígeno	6
1.3 Sistemas antioxidantes celulares	6
1.4 Las ERO como señales celulares	7
1.5 Las cinco vías de cinasas MAPK en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.6 Transducción de señales en <i>Aspergillus nidulans</i>	9
1.7 <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio	11
1.8 Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	11
Capítulo 1. SrkA en la respuesta al estrés oxidativo y la fragmentación mitocondrial ...	14
Introducción	14
Resultados	15
Conclusiones	19
Bibliografía	19
Capítulo 2. Las cinasas sensoras de estrés SakA y MpkC muestran funciones comunes y opuestas durante el desarrollo y en la respuesta al estrés oxidativo en <i>Aspergillus nidulans</i>	20
Resumen	21
Introducción	22
Resultados	23
Discusión	35
Conclusiones	38
Materiales y métodos	39
Figuras suplementarias	45
Bibliografía	52
Capítulo 3. Las proteínas DnmA y FisA son mediadoras de la división mitocondrial y peroxisomal, y regulan la función mitocondrial, la producción de especies reactivas del oxígeno y el desarrollo en <i>Aspergillus nidulans</i>	54
Resumen	55
Introducción	56
Resultados	59
Discusión	74
Conclusiones	79
Materiales y métodos	80
Figuras suplementarias	85
Bibliografía	93
Capítulo 4. El H ₂ O ₂ induce la formación de constricciones mitocondriales transitorias en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$	98
Resumen	98
Introducción	99

Resultados	100
Discusión.....	103
Conclusiones.....	104
Materiales y métodos.....	104
Bibliografía	106
Discusión general	108
Conclusiones generales	112
Bibliografía general	113

Resumen

Este trabajo está basado en resultados previos de nuestro laboratorio, relacionadas con el efecto del H₂O₂ en la fisiología del hongo *Aspergillus nidulans*. En primer lugar, reportamos que el H₂O₂ induce la interacción de la SAPK (Stress Activated Protein Kinase) SakA y su posible sustrato, la MAPKAP (Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase) SrkA, con proteínas mitocondriales. Además, en ausencia de SakA, detectamos a SrkA en las mitocondrias. En segundo lugar, mostramos que el H₂O₂ induce la división mitocondrial de una manera rápida y pronunciada (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). *A. nidulans* posee una segunda SAPK, llamada MpkC, cuyo papel en la respuesta al estrés se desconocía. En la primera parte de este trabajo abordamos la contribución de SakA y MpkC a la localización nuclear y mitocondrial de SrkA en respuesta al H₂O₂ (Capítulo 1), así como el papel que juegan tanto la cinasa SakA como MpkC en la respuesta al estrés oxidativo y demostramos que una mutante $\Delta mpkC$ no solamente no es sensible al estrés oxidativo, sino que su inactivación restaura parcialmente la resistencia al estrés oxidativo de una mutante $\Delta sakA$. También mostramos que SakA, y MpkC en menor grado, regulan la integridad de la pared celular. Además, encontramos que MpkC se localiza de manera diferencial en los distintos estadios de crecimiento de *A. nidulans* y que tanto el estrés oxidativo como el osmótico, inducen la acumulación nuclear de MpkC tanto en germínulas como en hifas. Todos estos resultados indican que las cinasas SakA y MpkC poseen tanto funciones en común, como opuestas (Capítulo 2). En la segunda parte del trabajo, abordamos los mecanismos mediante los cuales el H₂O₂ induce la división mitocondrial. Específicamente, estudiamos la participación de las proteínas DnmA y FisA que son parte del complejo de división mitocondrial y peroxisomal, en la respuesta al estrés oxidativo. Primeramente, mostramos que la ausencia DnmA y FisA conlleva a severos defectos en el crecimiento radial, la producción de conidios asexuales y ascosporas sexuales. Algunos de estos defectos se incrementaron o disminuyeron en diferentes fuentes de carbono. Aunque las proteínas DnmA y FisA tienen funciones comunes en la división mitocondrial y peroxisomal, y ambas son necesarias para la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂, también parecen tener algunas funciones diferentes. Encontramos que las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$

muestran una disminución en su respiración y un notable incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) mitocondriales, las cuales podrían corresponder al superóxido (Capítulo 3). Posteriormente demostramos que aún en ausencia de DnmA o FisA el H₂O₂ es capaz de inducir múltiples eventos de constricción mitocondrial, los cuales ocurren de manera transitoria a todo lo largo de los filamentos mitocondriales, incapaces de dividirse en estas condiciones (Capítulo 4). Nuestros resultados contribuyen a entender el papel de las ERO en la señalización celular y en la regulación de la dinámica mitocondrial y el desarrollo, mostrando que todos estos procesos están íntimamente ligados entre sí.

Abstract

This work is based on previous results from our laboratory, related to H₂O₂ effects on the physiology of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. First, we reported that H₂O₂ induces the interaction between the SAPK (Stress Activated Protein Kinase) SakA and its possible substrate, the MAPKAP (Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase) SrkA, with mitochondrial proteins. Moreover, in absence of SakA, SrkA was detected in mitochondria. Second, we demonstrated that H₂O₂-induced an extensive mitochondrial division (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). *A. nidulans* contains a second SAPK, called MpkC, whose role in oxidative stress was unknown. In the first part of this work, we examined SakA and MpkC contribution to SrkA nuclear and mitochondrial localization, in response to H₂O₂ (Chapter 1), as well as the roles that SakA and MpkC play in response to oxidative stress. We show that $\Delta mpkC$ mutants are not sensitive to oxidative stress but that in fact MpkC inactivation partially restores the oxidative stress resistance of $\Delta sakA$ mutants. SakA and to a minor extent MpkC also regulate cell-wall integrity. MpkC shows a differential localization during *A. nidulans* growth and development. Interestingly, oxidative and osmotic stresses induce MpkC nuclear accumulation in both, germinating conidia and hyphae. Our results indicate that SakA and MpkC play major, distinct and sometimes opposing roles during stress and development (Chapter 2). In the second part of this work, we address the mechanism by which H₂O₂ induces mitochondrial division. Specifically, we studied the involvement of proteins DnmA and FisA, which are part of the mitochondrial division complex, in the response to oxidative stress. We show that the absence of DnmA and FisA has strong developmental defects, leading to a decrease in hyphal growth and asexual and sexual sporulation, with some of these defects being aggravated or partially remediated by different carbon sources. Although both DnmA and FisA, are essential for mitochondrial fission, participate in peroxisomal division and are fully required for H₂O₂-induced mitochondrial division, they also appear to play differential functions. $\Delta dnmA$ and $\Delta fisA$ mutants show decreased respiration and notably high levels of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), which likely correspond to superoxide (Chapter 3). We also show that in the absence of DnmA and FisA, H₂O₂ induce transient mitochondrial constrictions distributed along the mitochondrial filaments, unable to divide under these conditions (Chapter 4). Our results

contribute to understand the role of ROS in cell signaling, mitochondrial dynamics and development, indicating that these are critically interrelated processes.

Introducción general

1.1 Las especies reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno es un elemento común que existe como una molécula diatómica (O_2) en la atmósfera terrestre y representa el 21% de esta. En las células, el O_2 se disuelve y su concentración depende de su difusión y de qué tan rápido se consume (Halliwell, 1989). La respiración de los organismos aeróbicos es la principal vía de consumo del O_2 , pues utilizan al O_2 como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria para producir energía en forma de ATP. Aproximadamente el 80% del ATP que utilizamos proviene de las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y 90% del O_2 (Hansberg, 2002). Un incremento intracelular de O_2 puede generar un estado prooxidante, es decir, existe un aumento de radicales libres del oxígeno que son incapaces de ser neutralizados por la propia célula (Hansberg y Aguirre, 1990). De hecho, la toxicidad del O_2 es debida a la formación de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO son más reactivas que el O_2 en su estado basal, debido a que contienen uno o más electrones no apareados (Hansberg, 2002). Las ERO se pueden formar ya sea por la excitación del O_2 o por su reducción parcial. De la excitación del O_2 se forman el oxígeno atómico (O), el oxígeno en singulete (1O_2) y el ozono (O_3). De la reducción parcial se forman el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Hansberg, 2002; Halliwell, 1989).

El anión $O_2^{\cdot-}$ es dismutado al H_2O_2 por la superóxido dismutasa. Por otra parte, el radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}) es la forma protonada del $O_2^{\cdot-}$; este radical reacciona eficientemente con otros radicales, notablemente, con el óxido nítrico (NO) y forma peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual a su vez puede reaccionar con el residuo de tirosina de las proteínas (D'Autréaux y Toledano, 2007) (Sies y Jones, 2020).

El radical hidroxilo (OH^{\cdot}) es considerado el más reactivo, oxida a biomoléculas y se forma a partir de la reducción del H_2O_2 . El OH^{\cdot} reacciona directamente con moléculas cercanas a él y tiene poca capacidad de difusión. De hecho, el OH^{\cdot} es un iniciador de la oxidación de los lípidos (Sies y Jones, 2020).

Como ya se mencionó anteriormente, el $O_2^{\cdot-}$ es dismutado y forma H_2O_2 sin embargo también algunas oxidasas lo producen, como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. El H_2O_2 tiene poca reactividad, pero se puede difundir a través de los compartimentos celulares. Tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco, sin embargo, ambos son tóxicos porque generan 1O_2 y OH^{\cdot} (Hansberg, 2002).

1.2 Fuentes de las especies reactivas del oxígeno

Dentro de las células, las ERO se están produciendo de manera continua por diversos mecanismos. Las oxidasas del NADPH (NOX) producen $O_2^{\cdot-}$ a partir de O_2 y NADPH. Algunos estudios sugieren que las NOX están dentro de una estructura celular especializada llamada redoxoma (Sies y Jones, 2020) y recientemente se les ha ubicado en el sistema vacuolar de *Neurospora crassa* (Cano-Domínguez *et al.*, 2019). Otras proteínas como la oxidasa de xantina utiliza al O_2 como aceptor de electrones para formar $O_2^{\cdot-}$ (Hansberg, 2002). En las células eucarióticas, la mitocondria es la principal fuente de ERO, ya que cerca del 1-3% del O_2 consumido puede formar $O_2^{\cdot-}$. Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona citocromo c óxidorreductasa) de la cadena respiratoria pueden formar $O_2^{\cdot-}$ cuando hay fuga de electrones (Halliway, 1989). Además, otras oxidasas en el retículo endoplásmico y los peroxisomas producen ERO (Dickinson y Chang, 2011; Zeeshan *et al.*, 2016; Lismont *et al.*, 2015)

1.3 Sistemas antioxidantes celulares

Los sistemas antioxidantes que previenen el daño que causan las ERO incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y peroxirredoxinas (PXR) y a los mecanismos que generan poder reductor, como la vía de las pentosas fosfato, y reductores como las tiorredoxinas y el glutatión (Aguirre *et al.*, 2005).

Las células eucarióticas contienen diversos reservorios de glutatión reducido (GSH). Cerca del 90% se encuentra en el citosol, pero también se puede encontrar en la mitocondria, el núcleo y el retículo endoplásmico. El GSH es un antioxidante importante contra ERO endógenas y externas. El GSH es un tripéptido glu–cys–gly (GSH)

sintetizado en la célula, directamente relacionado con la respuesta antioxidante y es un mecanismo de detoxificación muy importante de las ERO (Aquilano, Baldelli y Ciriolo, 2014).

La SOD dismuta al $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 . Existen distintos tipos de dismutasas del superóxido: las enzimas pueden tener Cu^{2+} , Zn^{2+} (Cu/ZnSOD), Mn(III) (MnSOD) o Fe(III) (FeSOD) en su sitio activo (Hansberg, 2002).

Las catalasas que dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O , son homotetrámeros u homodímeros con un grupo *hemo* que forma parte de su sitio activo (Hansberg, 2002), se encuentran típicamente en los peroxisomas, donde se genera H_2O_2 durante los procesos de beta-oxidación (Imlay, 2003), pero también se encuentran en otros compartimentos celulares. Las peroxidases son enzimas que también descomponen el H_2O_2 y lo hacen de una manera rápida (Dickinson y Chang, 2011), también descomponen peróxidos orgánicos a través de la oxidación de algunos sustratos específicos. Por ejemplo, la glutatión peroxidasa reduce a los hidroperóxidos utilizando el poder reductor del glutatión (Davies, 2000; Hansberg, 2002). Las peroxirredoxinas son enzimas que contienen cisteínas en su sitio activo, algunas de sus isoformas son susceptibles a hiperoxidación, lo cual las vuelve catalíticamente inactivas (Dickinson y Chang, 2011). Las tioredoxinas, las glutarredoxinas o el glutatión pueden servir como donadores de electrones para reducir a las peroxirredoxinas (D'Autréaux y Toledano, 2007).

1.4 Las ERO como señales celulares

Distintas ERO tienen efectos biológicos diferentes, relacionados con su reactividad química, vida media y solubilidad lipídica. El OH^{\cdot} puede reaccionar con muchas moléculas biológicas, mientras que el H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ tienen blancos específicos (D'Autréaux y Toledano, 2007).

Dentro de las células existe un balance en los niveles de ERO. Sin embargo, un incremento en las ERO, ya sea por una mayor producción o una disminución en la capacidad para eliminarlas, provoca un estrés oxidativo (Sies, 1986). El estrés oxidativo puede causar daños al DNA, a las proteínas y a los lípidos (Hansberg, 2002; Halliwell,

1989). Por lo tanto, percibir los niveles de ERO es crucial para la fisiología celular. La señalización por las ERO puede causar diferentes cambios en las células. Por ejemplo, cambios en la función de proteínas, la fosforilación de proteínas, la actividad enzimática, la transcripción de genes y en la integridad del genoma (Sies y Jones, 2020). Algunos blancos de las ERO provocan la oxidación de algunas cisteínas en las proteínas, la oxidación de lípidos e incluso la modificación de DNA y RNA, funcionan como interruptores redox moleculares en la transducción de señales y tienen múltiples niveles de regulación celular que trabajan en conjunto para regular la respuesta antioxidante (Dickinson y Chang, 2011).

El mecanismo por el cual el H_2O_2 tiene efectos en la señalización es mediante la reacción con grupos tioles específicos de algunas proteínas, mientras que altas concentraciones de H_2O_2 en las células pueden causar un aumento en la oxidación de las proteínas y un daño irreversible a muchas biomoléculas, provocando la detención del crecimiento e incluso la muerte celular (Sies y Jones, 2020).

Como ya se mencionó, dentro de la célula debe de haber un delicado equilibrio entre la producción de ERO, su manejo y su eliminación. Esto depende en gran medida del monitoreo de estas a través de cascadas o vías de señalización que a su vez ejecutan diversas funciones celulares, utilizando a las propias ERO como segundos mensajeros.

A continuación, se describirán algunas de las vías de señalización celular mediadas por cinasas MAPK, descritas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente se describen las vías homólogas relacionadas con la percepción del estrés oxidativo, en *Aspergillus nidulans*.

1.5 Las cinco vías de cinasas MAPK en *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en otros eucariontes, en los hongos las vías de señalización de las MAPK o proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Proteins Kinases) convierten los estímulos externos en señales intracelulares capaces de inducir algún tipo de respuesta celular (Herskowitz, 1995). Este tipo de vías de señalización están compuestas por una MAPK que es fosforilada por una MAPK cinasa (MAPKK), y esta a

su vez es fosforilada por una MAPKK cinasa (MAPKKK). A su vez, las MAPK fosforilan distintos sustratos, los cuales incluyen enzimas y factores de transcripción. La fosforilación de factores de transcripción ocurre cuando la MAPK fosforilada se transloca del citoplasma al núcleo (Caffrey, O'Neill y Shields, 1999). La levadura *S. cerevisiae* tiene cinco vías de señalización MAPK y cada una responde a uno o más estímulos (Gustin *et al.*, 1998). En la vía de respuesta a hormonas, la MAPK Fus3p es responsable de la respuesta (Gustin *et al.*, 1998; Zhao, Mehrabi y Xu, 2007; Smith y Nilar, 2010). La MAPK Kss1p regula el crecimiento filamentoso, mientras que la MAPK Ste12 está involucrada en la vía de integridad de la pared celular (Gustin *et al.*, 1998). La cinasa Smk1 pertenece a la vía de desarrollo meiótico (Hamel *et al.*, 2012). Finalmente, la MAPK Hog1 (SakA en *A. nidulans*) participa principalmente en la respuesta a condiciones hiperosmóticas (Saito y Tatebayashi, 2004), aunque también se ha relacionado con la respuesta al estrés por calor (Winkler *et al.*, 2002) y por estrés oxidativo (Jamieson, 1998).

1.6 Transducción de señales en *Aspergillus nidulans*

Para percibir diversos tipos de estrés extracelular, *A. nidulans* cuenta con un sistema de fosforrelevo compuesto por 15 cinasas sensoras HK (histidine kinase), una proteína Hpt de fosfotransferencia y dos proteínas reguladoras de la respuesta o RR (response regulator). Dicho sistema está conectado con una vía de cinasas MAPK sensoras de estrés o SAPK. Sólo se conoce la función de algunas de las 15 HK (Vargas-Pérez *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2014). Por ejemplo, la cinasa de histidina TcsA está relacionado con la formación de los conidios (Appleyard, McPheat y Stark, 2000), mientras que TcsB podría tener una función como osmosensor (Furukawa *et al.*, 2002). FphA ha sido clasificada como un fitocromo, es decir un sensor específico de luz roja, involucrado en la des-represión del ciclo sexual de *A. nidulans* (Blumenstein *et al.*, 2005); recientemente se ha demostrado que FphA interactúa con YpdA en presencia de luz, lo que induce la fosforilación de SakA y su translocación al núcleo (Yu, Armant y Fischer, 2016). La HK HysA es abundante bajo condiciones de oxígeno restringido y Nika está involucrada en la percepción de fungicidas específicos (Hayashi *et al.*, 2014), del estrés oxidativo y del osmótico (Vargas-Pérez *et al.*, 2007). La HK YpdA, también está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo. Respecto a los RR, se ha descrito que el

RR SskA media la activación de la cinasa de estrés Saka en respuesta al estrés osmótico y oxidativo, mientras que el RR SrrA parece exclusivo del estrés oxidativo (Vargas-Pérez *et al.*, 2007). Únicamente el RR SskA transmite las señales de estrés a la vía de las SAPK, la cual fosforila factores de transcripción y algunos otros sustratos involucrados directamente en la respuesta al estrés (Brewster y Gustin, 2014). En *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, la vía de las SAPK tiene elementos similares (**Figura 1**). En los capítulos I y II se describen dichas cinasas sensoras de estrés con más detalle.

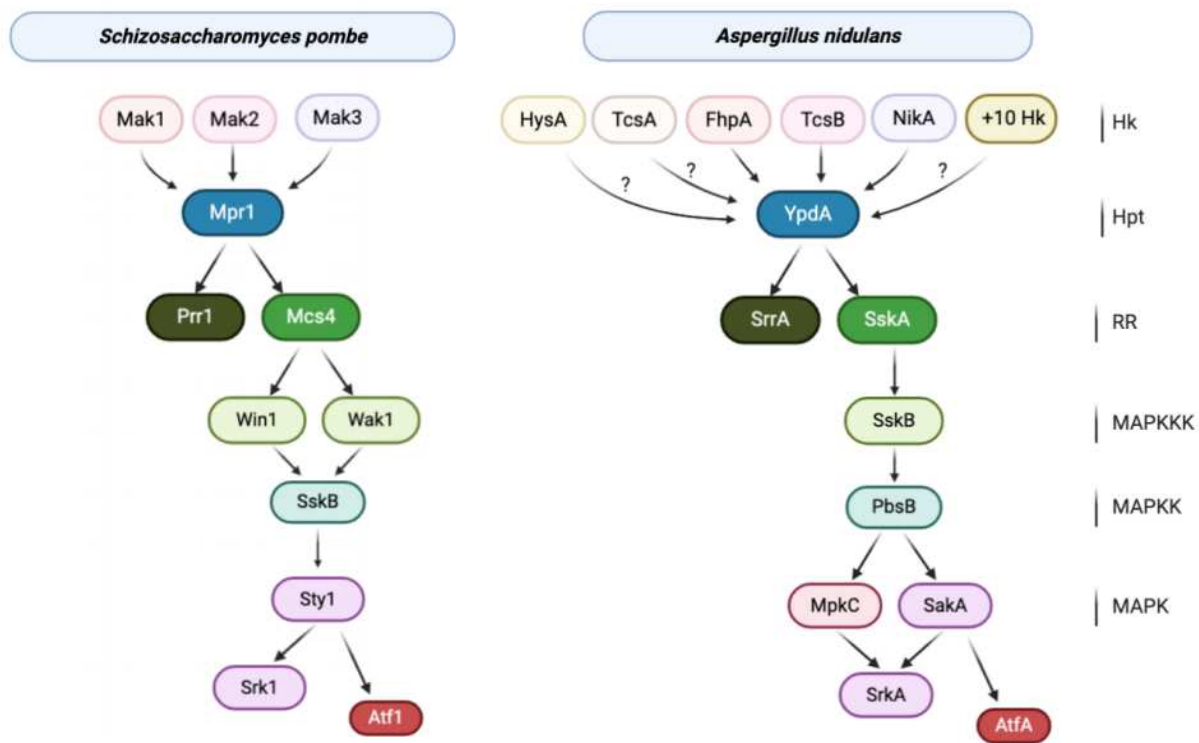


Figura 1. La transducción de señales de estrés mediada por cinasas MAPK en *S. pombe* y *A. nidulans*. La conservación de la arquitectura general de las vías de percepción de señales de estrés en *S. pombe* y *A. nidulans*, esta indicada utilizando los mismos colores para las proteínas que componen dichas vías. Estas consisten en un sistema de fosforrelevo compuesto por cinasas sensoras (Hk), una proteína de fosfotransferencia (Hpt) y dos reguladores de la respuesta (RR) uno de los cuales (Mcs4 o SskA) se encuentra acoplado a la vía de las cinasas MAP sensoras de estrés o SAPK. En *S. pombe* y la mayoría de los hongos existe una sola SAPK, mientras que en los hongos del género *Aspergillus* existen dos (SakA y MpkC). Srk1 y SrkA corresponden a cinasas MAPKAP que regulan el ciclo celular y son sustratos de las SAPK, mientras que Atf1 y AtfA, también sustratos de las SAPK, corresponden a factores transcripcionales que regulan la expresión de genes antioxidantes. Modificado de Smith, Morgan y Quinn, 2010 and Day y Quinn, 2019).

1.7 *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

Los hongos son microorganismos eucariotas que comparten muchas características estructurales y funcionales con otras células eucariotas, particularmente con las células animales. Los hongos filamentosos crecen como colonias multicelulares o micelio, el cual está compuesto por múltiples células tubulares llamadas hifas. Diversos hongos han cobrado interés, debido a sus efectos negativos y positivos para los humanos. Por ejemplo, algunas especies del género *Aspergillus* como *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. terreus* y *A. niger* son importantes por la producción de metabolitos secundarios (Houbraken, de Vries y Samson, 2014) que se utilizan como medicamentos o alimento. En el caso de *A. nidulans*, éste ha sido utilizado desde 1945 como modelo de estudio para entender la organización espacial de la célula (G. Pontecorvo, 1953), ya que presenta notables ventajas experimentales: es un organismo haploide capaz de crecer y reproducirse en medios de cultivo definidos con tiempos de duplicación muy cortos, posee ciclos complejos de diferenciación asexual y sexual y sobre todo, es de fácil manipulación genética (Clutterbuck, 1974; G. Pontecorvo, 1953). Por ello, *A. nidulans* ha contribuido al entendimiento de procesos biológicos fundamentales, tales como la meiosis, la dinámica del citoesqueleto y la diferenciación celular (Martin, Osmani y Oakley, 1997; Mims, Richardson y Timberlake, 2005; Clutterbuck, 1974), entre otros.

1.8 Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo ascomiceto homotático que pertenece a la familia Aspergillaceae (G. Pontecorvo, 1953). Su ciclo asexual se caracteriza por la formación de esporas asexuales o conidios uninucleados (Clutterbuck, 1974). Al germinar, los conidios forman hifas tubulares que crecen apicalmente, formando una red de células interconectadas que se le denomina micelio (Adams, Wieser y Yu, 1998). Las hifas son células septadas que contienen múltiples núcleos, algunas de las cuales pueden diferenciarse y formar un conidióforo (G. Pontecorvo, 1953). Algunos estímulos ambientales como la exposición de las hifas al aire o la privación de nutrientes, da como resultado la iniciación de la formación de los conidióforos (Skromne, Sanchez y Aguirre, 1995; Adams, Wieser y Yu, 1998). En una interfase aérea, algunas hifas se diferencian

en célula pie, la cual está delimitada por dos septos. Dicha célula crece de manera polar hacia la fase aérea, dando como resultado una célula tallo que crece hasta una longitud determinada, para posteriormente hincharse en su parte apical y formar una vesícula multinucleada. Dicha vesícula produce múltiples gemaciones, cada una de las cuales hereda un núcleo, formando un nuevo tipo celular denominado métula. Posteriormente, cada métula dará origen a dos nuevas estructuras celulares uninucleadas, llamadas fiálides. Finalmente, cada fiálide sufrirá repetidas divisiones para formar una cadena de esporas o conidios uninucleados (Adams, Wieser y Yu, 1998) (**Figura 2**).

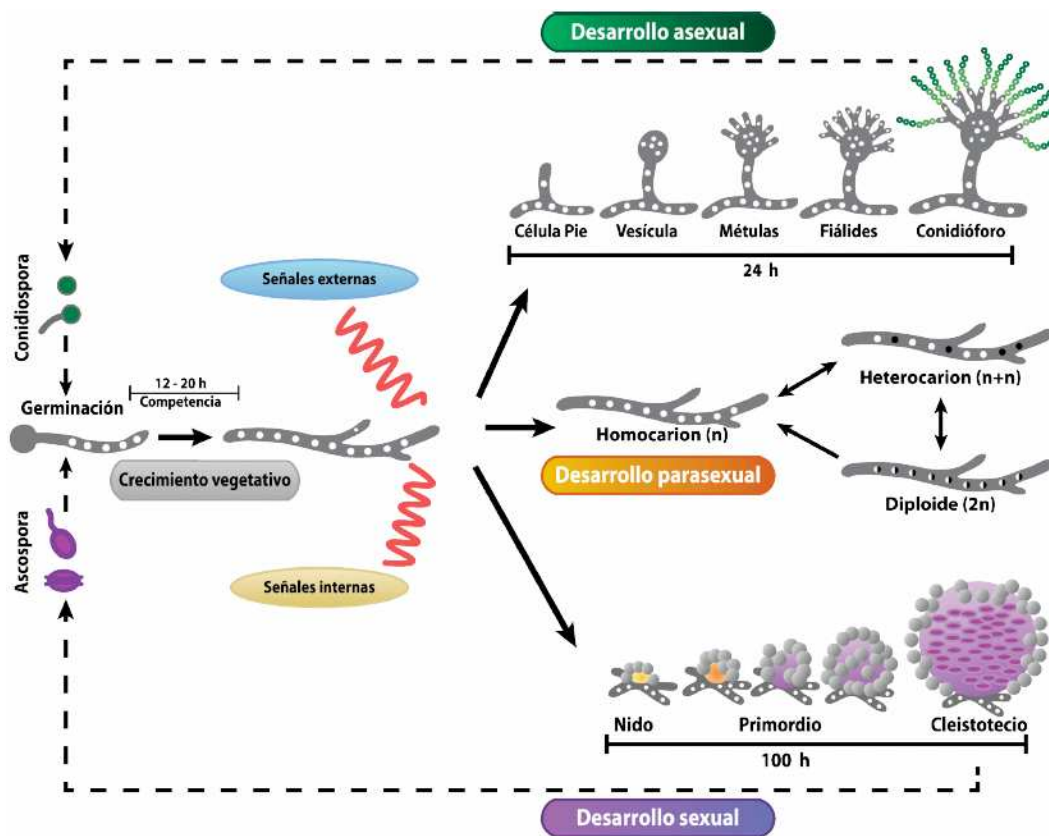


Figura 2. Desarrollo asexual y sexual de *A. nidulans*. El desarrollo del ciclo asexual comienza con la germinación de una espora asexual (conidio) o de una espora sexual (ascospora), las cuales producen células tubulares denominadas hifas (crecimiento vegetativo). En respuesta a señales internas y externas, las hifas pueden diferenciar conidióforos que a través de múltiples divisiones mitóticas producirán a los nuevos conidios. Posteriormente, también en respuesta a factores internos y externos (luz, disminución del O₂) se inicia el ciclo sexual, el cual se caracteriza por la presencia de células Hülle cuya función se asocia con la maduración de una estructura fructífera llamada cleistotecio. Esta es una estructura redonda pigmentada y en su interior se desarrollan unas bolsas llamadas ascas, que contienen las esporas sexuales o ascosporas (Modificado de Bayram, 2010).

Un signo visual del inicio del ciclo sexual es la aparición de grupos de células globosas llamadas células Hülle, cuya función se ha asociado con proveer de nutrientes al cleistotecio (Sohn y Yoon, 2002); recientemente se demostró que las células Hülle se forman a partir de las hifas de *A. nidulans* y que contienen múltiples núcleos, los cuales provienen de las cepas parentales (Troppens *et al.*, 2020). Los cleistotecios inmaduros son cuerpos fructíferos pequeños con una coloración rosada y una delgada pared externa (Hermann, Kurtz y Champe, 1983), que con el tiempo se melaniza y se vuelve rígida. Siendo *A. nidulans* un hongo homotálico, la formación de un cleistotecio comienza con la fusión de dos hifas que pueden provenir de la misma colonia o de dos colonias distintas (Krijgsheld *et al.*, 2013). En esta hifa dicarionte los dos núcleos se dividen y forman muchas células dicarióticas. Cada célula dicariótica se convertirá en una célula llamada asca, en la cual ocurre la fusión de dos núcleos haploides para formar un núcleo diploide, el cual sufre meiosis y después una mitosis postmeiótica. Finalmente este proceso produce ocho esporas binucleadas llamadas ascosporas (Gavrias, Timberlake y Adams, 2001; Casselton y Zolan, 2002). Bajo condiciones adecuadas, cada ascospora germina y forma una colonia.

Adicionalmente, *A. nidulans* posee un ciclo parasexual, mediante el cual se puede producir un micelio heterocariótico, en el cual dos núcleos haploides pueden fusionarse y generar micelio y conidios diploides que pueden tener núcleos estables (diploides) o haploidizarse (Pontecorvo, 1956).

Capítulo 1. SrkA en la respuesta al estrés oxidativo y la fragmentación mitocondrial

Introducción

La proteína Spc1/Sty1 es la SAPK ortóloga de SakA en *S. pombe*. Esta cinasa media el arresto del ciclo celular en respuesta al estrés oxidativo, a través de la fosforilación y translocación al núcleo de la MAPKAP Srk1 (López-Avileés *et al.*, 2008). En *A. nidulans* se ha demostrado que SakA interactúa con MpkC y con el ortólogo de Srk1, así como con otras proteínas que regulan el ciclo celular (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). La interacción SakA-SrkA es constitutiva e independiente de la exposición a agentes estresantes. SakA regula la localización nuclear de SrkA, ya que en ausencia de SakA, SrkA cambia su patrón de localización nuclear a mitocondrial, en respuesta al estrés oxidativo (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015).

La delección de *srkA* induce a una mayor conidiación y resistencia al estrés oxidativo. En respuesta al H₂O₂, tanto SakA como SrkA interactúan con proteínas mitocondriales. En estas condiciones, el H₂O₂ también induce la división mitocondrial, de manera muy notable. Sin embargo, se desconoce la función que SakA o SrkA podrían tener en la fisiología mitocondrial (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015).

Objetivo general

- Entender la relación entre las cinasas SakA, MpkC y SrkA en respuesta al H₂O₂ y durante el desarrollo de *A. nidulans*.

Objetivos específicos

- Comprobar la localización de la cinasa SrkA en respuesta al H₂O₂ y en ausencia de las cinasas de estrés SakA y MpkC.
- Determinar si el patrón de localización de SrkA en respuesta al H₂O₂, depende de las cinasas SakA y MpkC

Resultados

Inicialmente, en este trabajo se pretendía confirmar el dato de que SrkA se dirige a las mitocondrias en respuesta al peróxido de hidrógeno (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Para esto se obtuvo una mutante $\Delta sakA srkA::gfp$ con mitocondrias marcadas con una proteína fluorescente (Ver materiales y métodos) y se observó a distintos tiempos, utilizando microscopía confocal, en ausencia y en presencia de H_2O_2 . Como se muestra en la **Figura 1**, en ausencia de estrés SrkA::GFP se encuentra en el citoplasma de las hifas y se encuentra excluida de estructuras que por su posición y tamaño, y por observaciones anteriores utilizando un marcador nuclear, corresponderían a los núcleos. En estas condiciones, las mitocondrias muestran una morfología filamentosa. Después de 20 minutos de exposición al H_2O_2 , SrkA::GFP se encuentra acumulada en estructuras que corresponderían a los núcleos y una porción menor está en las mitocondrias, las cuales muestran cierta fragmentación. Después de 30 minutos de exposición al H_2O_2 , SrkA::GFP se detecta en las mitocondrias ya totalmente fragmentadas y una porción menor en los núcleos. Estas observaciones demostraron que el estrés oxidativo induce la fisión mitocondrial como se había reportado previamente (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). También demuestran que en ausencia de SakA, el H_2O_2 no induce la localización inmediata y total de la cinasa SrkA en las mitocondrias, sino que inicialmente ésta se acumula principalmente en el núcleo.

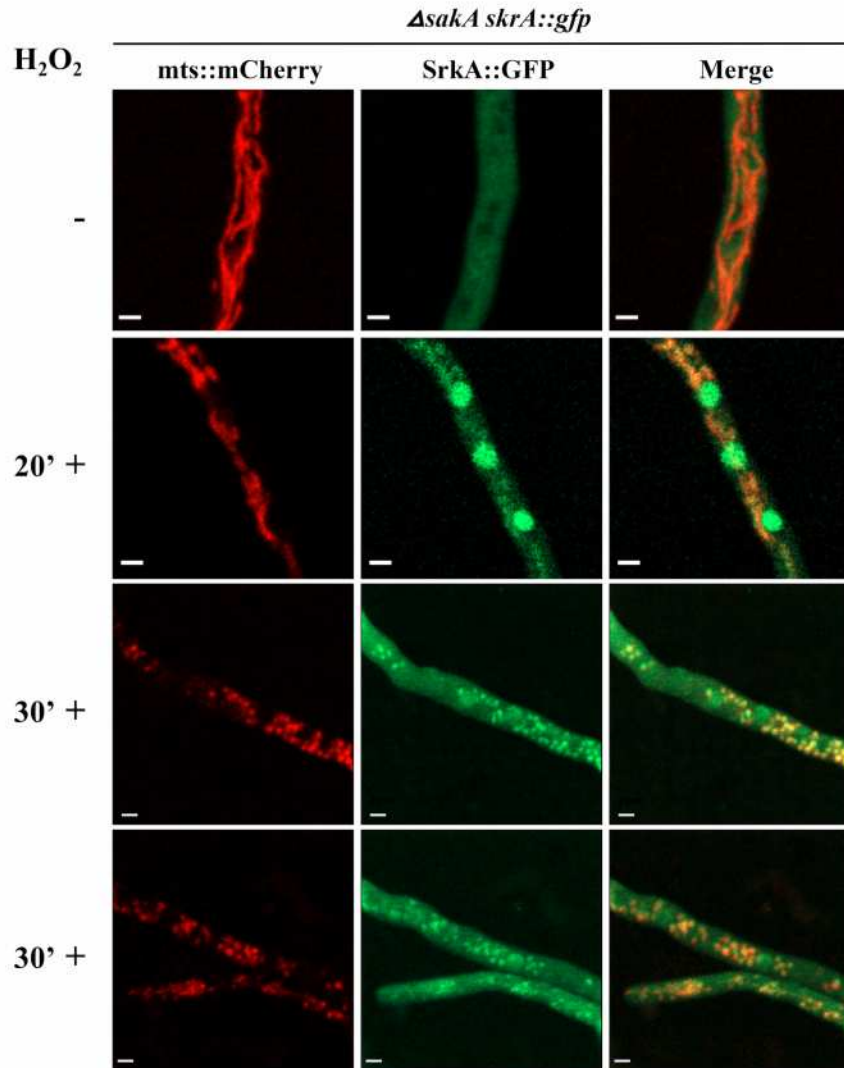


Figura 1. En ausencia de la MAPK SakA, SrkA se acumula primero en el núcleo y las mitocondrias y después sólo en las mitocondrias, en respuesta al H₂O₂. Se creció la cepa CVG12 (*ΔsakA skrA::gfp mts::mCherry*) durante 14 h. Posteriormente se le adicionó o no 10 mM de H₂O₂ y se incubó por 20 y 30 min. Posteriormente, se retiró el H₂O₂, se lavó con H₂O estéril y se observó en el microscopio confocal. La barra blanca corresponde a 2 μm.

La MAPK MpkC es homóloga de SakA y aunque se expresa poco (Furukawa *et al.*, 2005), en ausencia de SakA y presencia de H₂O₂, MpkC podría secuestrar la mayor parte de SrkA y llevarla al núcleo. En estas condiciones, inicialmente sólo una parte menor de SrkA se translocaría a las mitocondrias (**Figura 1**). Posteriormente la degradación de MpkC o su salida del núcleo podría resultar en una mayor acumulación de SrkA en las mitocondrias ya fragmentadas. Es importante mencionar que en experimentos de proteómica (interactoma de SrkA), SrkA aparece asociada con proteínas mitocondriales

después de 10 min de tratamiento con 10 mM de H₂O₂, aún en una cepa silvestre (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Para explorar esta hipótesis, decidimos estudiar la localización de SrkA::GFP en ausencia de Saka y MpkC. Inesperadamente, nuestros experimentos preliminares mostraron una ausencia total de SrkA::GFP en mutantes carentes de Saka y MpkC, aún después de un tratamiento de 30 min con H₂O₂. Por ello, decidimos repetir estos experimentos, prolongando el tratamiento con el H₂O₂. Como se observa en la **Figura 2**, sin estrés oxidativo SrkA::GFP se encuentra totalmente ausente en la mutante carente de Saka y MpkC. Sin embargo, después de 90 minutos con H₂O₂, se observan altos niveles de SrkA::GFP en las mitocondrias, las cuales se encuentran totalmente fragmentadas en estas condiciones. Estos resultados indican que la expresión de SrkA depende de Saka y MpkC, y sugieren que MpkC tiene funciones semejantes y potencialmente redundantes a las de Saka. Nuestros resultados también sugieren que SrkA podría tener funciones importantes en la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂.

En los siguientes capítulos decidimos enfocarnos en dos de los aspectos más importantes generados por estos antecedentes. Por un lado, quisimos explorar las funciones de MpkC y responder hasta qué punto son redundantes con las de Saka (Capítulo 2). Por otro lado, quisimos entender el papel que las proteínas reguladoras de la fisión mitocondrial tienen en la división mitocondrial inducida por el H₂O₂ (Capítulos 3-4).

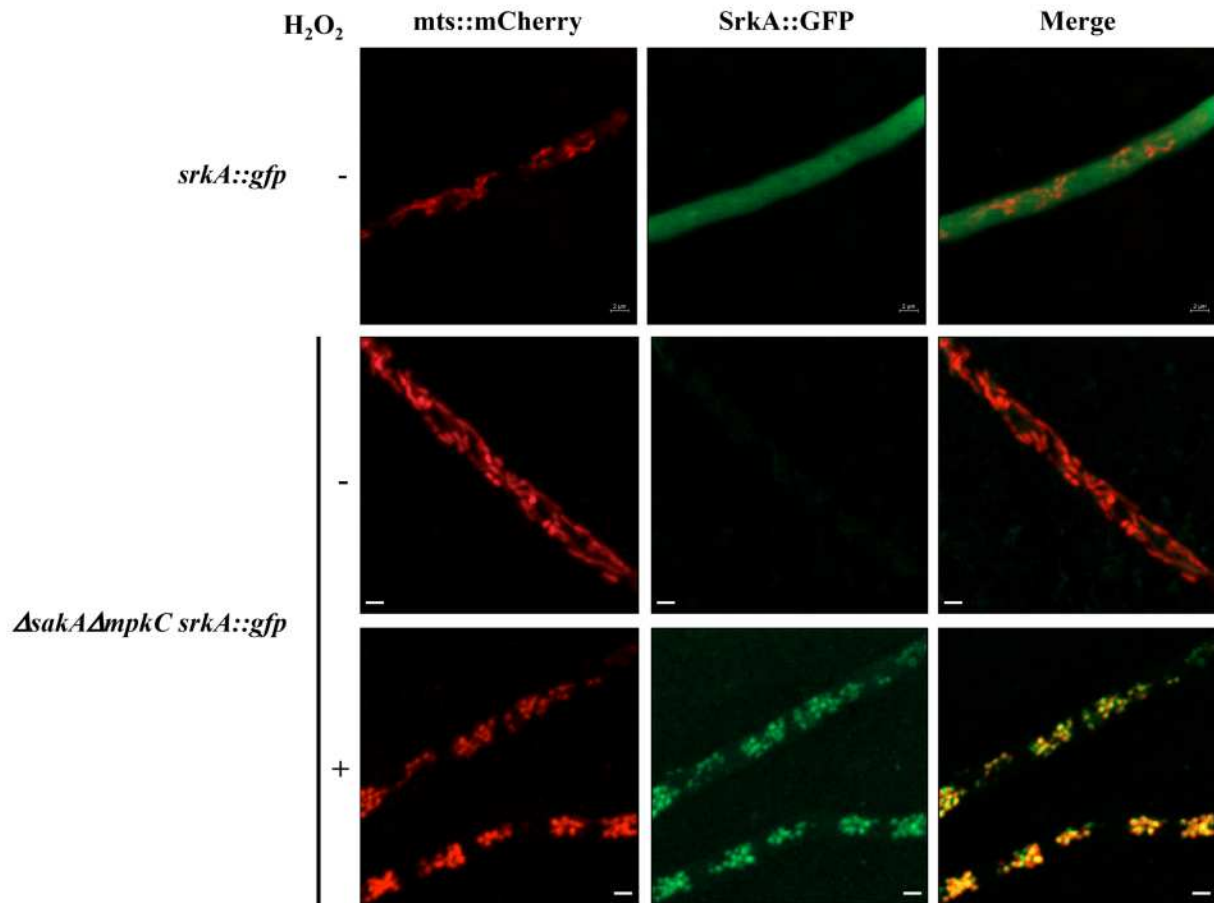


Figura 2. SrkA no se expresa en ausencia de las MAPK Saka y MpkC, pero en condiciones de estrés oxidativo prolongado, sí se expresa y se localiza en las mitocondrias. Se crecieron las cepas CVG9 (*srkA::gfp mts::mCherry*) y CVG11 (*ΔsakA ΔmpkC srkA::gfp mts::mCherry*) durante 14 h. Posteriormente se les adicionó o no 10 mM de H₂O₂ durante 90 min, el cual se retiró, se lavó con H₂O estéril y se observó en el microscopio confocal. La barra blanca corresponde a 2 μm.

Conclusiones

- En mutantes de *A. nidulans* carentes de la MAPK SakA, el H₂O₂ induce la acumulación nuclear de la cinasa SrkA en los primeros minutos de tratamiento, en un proceso que podría ser dependiente de la MAPK MpkC. Posteriormente (30 min), SrkA se localiza en las mitocondrias. Proponemos que esta dinámica de localización de SrkA, primero nuclear y posteriormente mitocondrial, así como la división mitocondrial, son parte esencial de la respuesta normal de *A. nidulans* al H₂O₂. En este contexto, SrkA podría jugar un papel importante durante la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂.
- La expresión de *srkA* es dependiente de SakA y MpkC. Sin embargo, en ausencia de ambas MAPK existe un mecanismo capaz de inducir *srkA* en respuesta al estrés oxidativo. En estas condiciones la localización de SrkA es esencialmente mitocondrial.

Bibliografía

Jaimes-Arroyo, R., Lara -Rojas F., Bayram O., Valerius O., Braus H. G., 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*", *Eukaryotic Cell*, 14(5), pp. 495–510

López-Avileés S., Lambea E., Moldón A., Grande M., Fajardo A., Rodríguez-Gabriel M.A., and Hidalgo E. (2008) "Activation of Srk1 by the Mitogen-activated Protein Kinase Sty1/Spc1 Precedes Its Dissociation from the Kinase and Signals Its Degradation", *Molecular biology of the cell*, 19(1), pp. 1670–1679.

Capítulo 2. Las cinasas sensoras de estrés SakA y MpkC muestran funciones comunes y opuestas durante el desarrollo y en la respuesta al estrés oxidativo en *Aspergillus nidulans*



SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*

Verónica Garrido-Bazán^{1,2}, Rafael Jaimes-Arroyo¹, Olivia Sánchez¹,
Fernando Lara-Rojas¹ and Jesús Aguirre^{1*}

¹ Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Mexico City, Mexico

Stress activated MAP kinases (SAPKs) of the Hog1/Sty1/p38 family are specialized in transducing stress signals. In contrast to what is seen in animal cells, very few fungal species contain more than one SAPK. *Aspergillus nidulans* and other Aspergilli contain two SAPKs called SakA/HogA and MpkC. We have shown that SakA is essential for conidia to maintain their viability and to survive high H₂O₂ concentrations. H₂O₂ induces SakA nuclear accumulation and its interaction with transcription factor AtfA. Although SakA and MpkC show physical interaction, little is known about MpkC functions. Here we show that $\Delta mpkC$ mutants are not sensitive to oxidative stress but in fact MpkC inactivation partially restores the oxidative stress resistance of $\Delta sakA$ mutants. $\Delta mpkC$ mutants display about twofold increase in the production of fully viable conidia. The inactivation of the SakA upstream MAPKK PbsB or the simultaneous elimination of *sakA* and *mpkC* result in virtually identical phenotypes, including decreased radial growth, a drastic reduction of conidiation and a sharp, progressive loss of conidial viability. SakA and to a minor extent MpkC also regulate cell-wall integrity. Given the roles of MpkC in conidiation and oxidative stress sensitivity, we used a functional MpkC::GFP fusion to determine MpkC nuclear localization as an *in vivo* indicator of MpkC activation during asexual development and stress. MpkC is mostly localized in the cytoplasm of intact conidia, accumulates in nuclei during the first 2 h of germination and then becomes progressively excluded from nuclei in growing hyphae. In the conidiophore, MpkC nuclear accumulation increases in vesicles, metulae and phialides and decreases in older conidia. Oxidative and osmotic stresses induce MpkC nuclear accumulation in both germinating conidia and hyphae. In all these cases, MpkC nuclear accumulation is largely dependent on the MAPKK PbsB. Our results indicate that SakA and MpkC play major, distinct and sometimes opposing roles in conidiation and conidiospore physiology, as well as common roles in response to stress. We propose that two SAPKs are necessary to delay (MpkC) or fully stop (SakA) mitosis during conidiogenesis and the terminal differentiation of conidia, in the highly prolific phialoconidiation process characteristic of the Aspergilli.

Keywords: oxidative stress, cell-wall stress, spore germination, spore development, spore viability, MAPK nuclear localization, MAPKK

OPEN ACCESS

Edited by:

Luis F. Larrondo,
Pontificia Universidad Católica
de Chile, Chile

Reviewed by:

Iran Malavazi,
Universidade Federal de São Carlos,
Brazil
Richard B. Todd,
Kansas State University, United States

*Correspondence:

Jesús Aguirre
jaguirre@correo.ifc.unam.mx

Specialty section:

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

Received: 12 July 2018

Accepted: 03 October 2018

Published: 23 October 2018

Citation:

Garrido-Bazán V,
Jaimes-Arroyo R, Sánchez O,
Lara-Rojas F and 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.
doi: 10.3389/fmicb.2018.02518

Resumen

Las cinasas MAPK activadas por estrés (SAPKs) de la familia Hog1/Sty1/p38 están especializadas en la transducción de señales de estrés. En contraste a lo observado en células animales, pocas especies de hongos tienen más de una SAPK. *Aspergillus nidulans* y otros Aspergilli tienen dos SAPKs llamadas SakA/HogA y MpkC. Anteriormente se ha demostrado que SakA es esencial para mantener la viabilidad de las esporas asexuales (conidios) y para sobrevivir a altas concentraciones de H₂O₂. También se sabe que SakA interactúa con el factor transcripcional AtfA en el núcleo. Aunque SakA y MpkC interactúan físicamente, se sabe poco de la función de MpkC. En el presente capítulo se muestra que una mutante $\Delta mpkC$ no solamente no es sensible al estrés oxidativo, sino que su inactivación restaura parcialmente la resistencia al estrés oxidativo de una mutante $\Delta sakA$. Además, una mutante $\Delta mpkC$ muestra un incremento notable en la producción de conidios viables. Una mutante carente de la cinasa río arriba de SakA, es decir la MAPKK PbsB, y una doble mutante $\Delta sakA \Delta mpkC$ muestran el mismo fenotipo, incluyendo una disminución en el crecimiento radial, una drástica disminución en la conidiación y una pérdida progresiva de la viabilidad de los conidios. También mostramos que SakA y MpkC, en menor grado, regulan la integridad de la pared celular. Estos resultados indican que MpkC tiene un papel importante en la conidiación y la sensibilidad al estrés. Para comprobar esto, estudiamos la localización nuclear de una fusión MpkC::GFP funcional, como un ensayo *in vivo* de la activación de MpkC. En los conidios intactos, MpkC::GFP se encuentra localizada en el citoplasma, pero después de 2 horas de germinación se observó una localización nuclear, la cual se perdió durante el crecimiento de las hifas. En los conidióforos, se detectó un incremento nuclear de MpkC::GFP en la vesículas, métulas y fiálides y una disminución en los conidios recién formados. Tanto el estrés oxidativo como el osmótico inducen la acumulación de MpkC::GFP en el núcleo, tanto en germínulas como en hifas en crecimiento. En todos estos casos, la acumulación de MpkC::GFP en los núcleos es dependiente de la MAPKK PbsB. Nuestros resultados indican que SakA y MpkC juegan papeles importantes en la respuesta al estrés oxidativo y que algunas de sus funciones son comunes, mientras que otras son opuestas. Proponemos que las dos SAPKs regulan el ciclo celular a través del

retraso (MpkC) o la detención (SakA), durante el estrés y la diferenciación de las esporas asexuales.

Introducción

Las cinasas MAPK que transmiten señales de estrés son conocidas como proteínas cinasas activadas por estrés o SAPK. Los miembros de la familia de las SAPK Hog1/Sty1/p38 están especializados en transducir señales de estrés (Brewster *et al.*, 1993; Sandra López-Avileés *et al.*, 2008). Hog1 fue la primera SAPK identificada y estudiada en *Saccharomyces cerevisiae* (Brewster *et al.*, 1993). En *Aspergillus nidulans*, SakA es la proteína homóloga de Hog1 (Kawasaki *et al.*, 2002). SakA se encuentra fosforilada en las esporas asexuales de este hongo filamentoso y su desfosforilación es necesaria para que las esporas germinen. SakA también se fosforila en respuesta al estrés oxidativo y junto con la cinasa SrkA (homólogo Rck2 en *S. cerevisiae*) se translocan al núcleo (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Una vez en el núcleo, SakA interactúa con el factor de transcripción AtfA, el cual regula la expresión de varios genes de estrés (Lara-Rojas *et al.*, 2011). En *Schizosaccharomyces pombe* la cinasa Srk1 (SrkA en *A. nidulans*) es fosforilada por Spc1/Sty1 en condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Smith *et al.*, 2002). Cuando SrkA se transloca al núcleo, interactúa con proteínas del ciclo celular y con proteínas de respuesta de daño al DNA (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015).

En muy pocos hongos se ha reportado la presencia de más de una SAPK (Reyes *et al.*, 2006). En el basidiomiceto *Wallemia ichthyophaga* y el ascomiceto *Hortaea werneckii*, se han identificado dos SAPK, ambas con alta similitud, funciones redundantes y una fosforilación dependiente de alta osmolaridad (Konte y Plemenitas, 2013; Kejžar *et al.*, 2015). El presente trabajo se centró en la caracterización de la función del gen *mpkC* (AN4668) de *A. nidulans*. *mpkC* codifica para la MAPK MpkC, la cual muestra un alto porcentaje de identidad (62%) con SakA. Sin embargo, mientras MpkC posee 415 aminoácidos, SakA sólo tiene 379. Anteriormente se ha reportado que ambas proteínas son sustrato de la cinasa MAPKK PbsB (Furukawa *et al.*, 2005).

Para disectar la función de SakA y MpkC durante el desarrollo y el estrés oxidativo, se generaron y caracterizaron mutantes $\Delta sakA$, $\Delta mpkC$ y $\Delta sakA \Delta mpkC$ (ver materiales y métodos y **Figura suplementaria S1**) y los resultados se compararon con los de una mutante carente de la cinasa MAPK PbsB. Además, se evaluó la localización de una construcción funcional MpkC::GFP, con un ensayo *in vivo* de la activación de esta MAPK.

Resultados

Las MAPK SakA y MpkC regulan el desarrollo y el crecimiento radial

En *Aspergillus fumigatus* se reportó que MpkC es necesaria para la utilización de diversos polialcoholes como única fuente de carbono (Reyes *et al.*, 2006). Sin embargo, nosotros encontramos que en *A. nidulans* tanto las mutantes $\Delta sakA$ como $\Delta mpkC$ crecieron igual que la cepa WT en diferentes fuentes de carbono, incluyendo el manitol y el sorbitol (**Figura Suplementaria S2A**). Al igual que lo reportado anteriormente en *A. nidulans* (Jun *et al.*, 2011), encontramos que la mutante $\Delta mpkC$ no muestran ningún fenotipo evidente (**Figura suplementaria S2B y Figura 2**). Sin embargo, cuando determinamos el número de conidios producidos por la mutante $\Delta mpkC$, se encontró que ésta produce un mayor número de conidios que las cepas $\Delta sakA$ y WT, mientras que una mutante doble $\Delta sakA \Delta mpkC$ muestra un menor número de conidios y un menor crecimiento radial (**Figura 1**).

También se evaluó la sensibilidad de la mutante $\Delta mpkC$ al estrés osmótico y se observó que al eliminar una o ambas cinasas ($\Delta sakA \Delta mpkC$) no se incrementó la sensibilidad. Estos datos indican que eliminar MpkC tiene como mayor consecuencia el aumento en la conidiación y no en la sensibilidad al estrés osmótico. También indican que la función de MpkC en la utilización de polialcoholes como fuente de carbono es diferentes entre *A. fumigatus* (Reyes *et al.*, 2006) y *A. nidulans*.

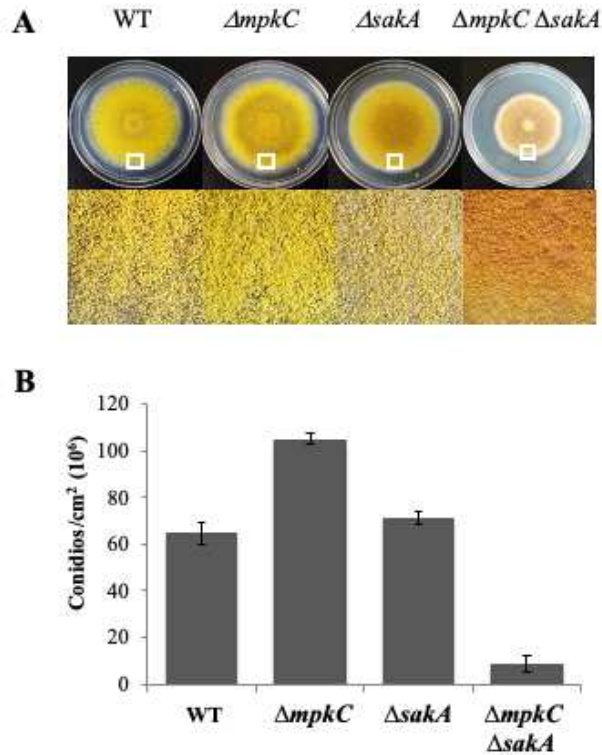


Figura 1. Las deleciones de *sakA* y *mpkC* muestran efectos opuestos en la conidiación, pero ambos genes son necesarios para una conidiación normal. A) Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CLK43 (WT), CFL10 ($\Delta mpkC$), TOL1 ($\Delta sakA$) y CFL12 ($\Delta mpkC \Delta sakA$) en cajas con medio mínimo (MM) y se incubaron a 37 °C durante 5 días. B) Todos los conidios por colonia fueron cosechados y contados y el número resultante dividido entre el área de la colonia, para obtener el número de conidios por centímetro cuadrado. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las ampliificaciones de una región de la colonia (pánel A) están indicados con recuadros blancos.

Para entender mejor la relación entre MpkC y SakA se generó una mutante en la cinasa MAPKK PbsB. Esta cinasa se encarga de fosforilar tanto a SakA como a MpkC (Furukawa *et al.*, 2005). Se encontró que la MAPKK PbsB es necesaria para la función de ambas cinasas, pues en las **Figuras 2 y 3** se muestra que tanto la doble mutante $\Delta sakA \Delta mpkC$ como la mutante $\Delta pbsB$ muestran fenotipos muy similares, incluyendo la disminución en la conidiación y el crecimiento radial, así como en la sensibilidad al estrés.

SakA y PbsB regulan la viabilidad de los conidios, mientras que SakA y MpkC regulan la integridad de la pared celular

Debido a que los conidios de la cepa mutante $\Delta sakA$ sufren una pérdida progresiva de su viabilidad (Kawasaki *et al.*, 2002), se evaluó la viabilidad de los conidios producidos por las cepas $\Delta mpkC$, $\Delta sakA \Delta mpkC$ y $\Delta pbsB$. Se encontró que las cepas WT y $\Delta mpkC$ no la pierden aún después de 40 días. Por el contrario, los conidios de las cepas $\Delta sakA \Delta mpkC$ pierden más rápido su viabilidad, con respecto a los conidios $\Delta sakA$. Por otro lado, los conidios de las mutantes $\Delta pbsB$ y $\Delta sakA \Delta mpkC$ muestran un mismo comportamiento y la mayor pérdida, pues después de 10 días ya han perdido cerca del 75% de su viabilidad (**Figura S4**).

Después de ver que las mutantes $\Delta sakA$, $\Delta sakA \Delta mpkC$ y $\Delta pbsB$ muestran una disminución en el crecimiento, se decidió determinar el papel de estas cinasas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Para esto, los conidios de las cepas $\Delta sakA$, $\Delta mpkC$, $\Delta sakA \Delta mpkC$ y $\Delta pbsB$ se inocularon en medios que contenían compuestos desestabilizadores de la pared celular (calcoflúor y rojo congo). Como se muestra en la **Figura 2**, estos compuestos no afectaron la germinación ni el crecimiento de la mutante $\Delta mpkC$. Sin embargo, la mutante $\Delta sakA$ disminuyó su crecimiento en presencia de rojo congo y la mutante $\Delta sakA \Delta mpkC$ resultó aún más sensible a estos compuestos, indicando que el papel de SakA en este proceso es más importante que el de MpkC, aunque ambas cinasas podrían contribuir a una adecuada biosíntesis de la pared celular. Cuando se hizo el mismo experimento, pero utilizando el micelio de estas cepas, se observó que las mutantes $\Delta sakA$, $\Delta sakA \Delta mpkC$ y $\Delta pbsB$ mostraron la misma sensibilidad al calcoflúor y al rojo congo, sugiriendo que la contribución de MpkC a la integridad de la pared celular es menos importante en el micelio que en los conidios (**Figura 2**).

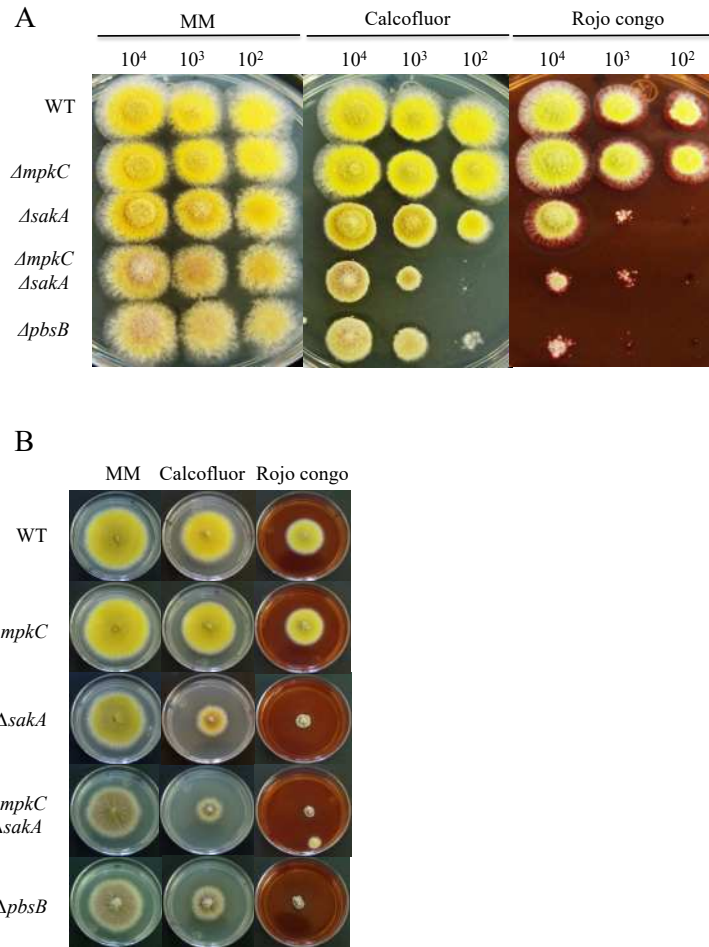


Figura 2. La inactivación de *sakA* y *mpkC* afectan la pared celular. A) Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CLK43 (WT), COS0020 Δ *mpkC* (Δ *mpkC*), CRJ1 (Δ *sakA*), CRJ11 (Δ *mpkC* Δ *sakA*) y COS Δ *pbsB*05 (Δ *pbsB*) en cajas con MM y con compuestos que dañan la pared celular; calcoflúor (20 μ g/mL) o rojo congo (20 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 2 días. **B)** Cilindros de agar con micelio de colonias de 5 días de las cepas CLK43 (WT), COS0020 Δ *mpkC* (Δ *mpkC*), CRJ1 (Δ *sakA*), CRJ11 (Δ *mpkC* Δ *sakA*) y COS Δ *pbsB*05 (Δ *pbsB*) se transfirieron a cajas con MM y calcoflúor (20 μ g/mL) o rojo congo (20 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 4 días.

En los conidios, las cinasas *MpkC* y *SakA* cumplen funciones opuestas en respuesta al estrés oxidativo

La cinasa *SakA* es importante para la resistencia de los conidios al estrés oxidativo (Kawasaki *et al.*, 2002). Sin embargo, se desconoce la contribución de *MpkC*, por lo cual decidimos comparar la sensibilidad de las mutantes Δ *mpkC*, Δ *sakA*, Δ *mpkC* Δ *sakA* y Δ *pbsB* al estrés oxidativo. En la **Figura 3** se muestra que los conidios de la mutante

$\Delta sakA$ son incapaces de crecer a 4.5 y 6 mM de H_2O_2 , mientras que los conidios de la mutante $\Delta mpkC$ y la cepa WT son resistentes al H_2O_2 . Inesperadamente, la inactivación de MpkC restauró la capacidad de las mutantes $\Delta sakA$ para crecer en 4.5 y 6 mM de H_2O_2 . Resultados similares se observan en presencia del hidroperóxido de tert-butilo. En cambio, en el micelio la falta de *sakA*, *mpkC* o *pbsB* no afecta la sensibilidad al H_2O_2 (**Figura 3**). Estos datos indican que MpkC y SakA regulan la respuesta al estrés oxidativo de manera opuesta en los conidios.

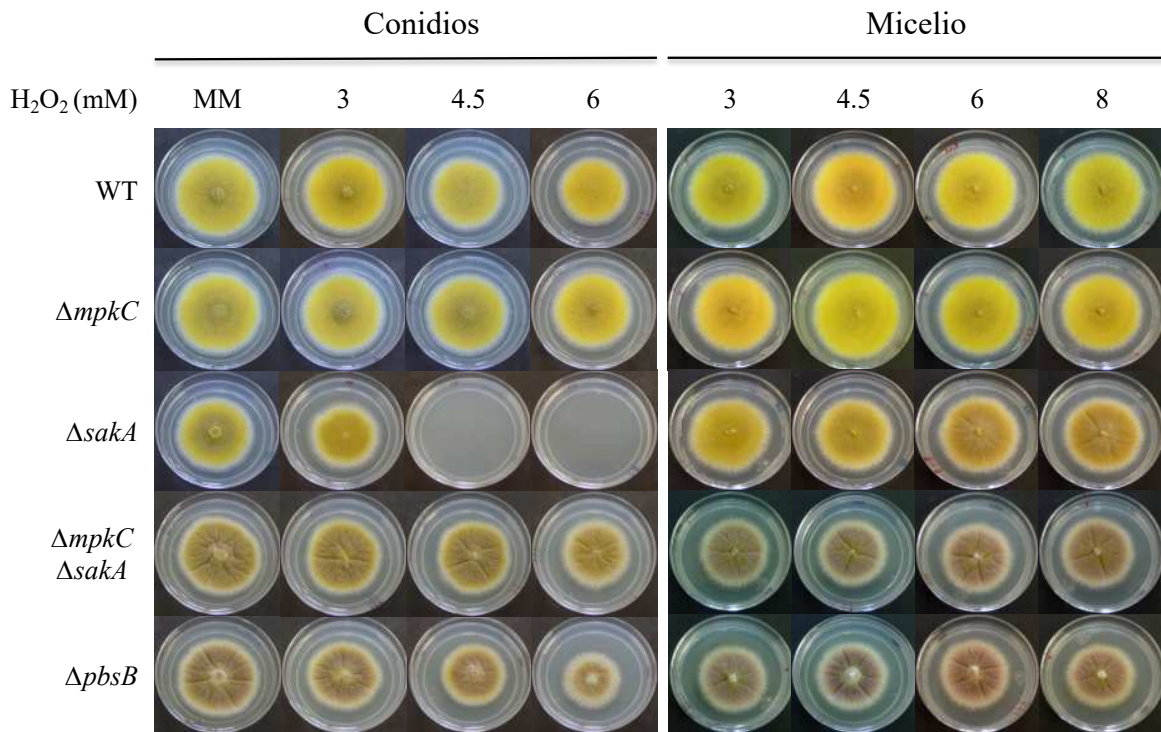


Figura 3. SakA y MpkC regulan la resistencia al estrés oxidativo de manera opuesta en los conidios. Conidios (1×10^4) o micelio de las cepas CLK43 (WT), COS0020 $\Delta mpkC$ ($\Delta mpkC$), CRJ1 ($\Delta sakA$), CRJ11 ($\Delta mpkC \Delta sakA$) y COS $\Delta pbsB$ 05 ($\Delta pbsB$) se inocularon en cajas con MM y H_2O_2 a las concentraciones indicadas y se incubaron a 37 °C durante 4 días.

De acuerdo con estos resultados, la mutante $\Delta pbsB$, incapaz de activar a las cinasas SakA y MpkC, fue capaz de crecer a 4.5 y 6 mM de H_2O_2 (**Figura 3**). Estos datos indican que PbsB es un regulador río arriba tanto de SakA como de MpkC y confirma la interacción observada en la mutante $\Delta sakA \Delta mpkC$. Así, en ausencia de SakA, MpkC parece mediar la alta sensibilidad de los conidios al H_2O_2 .

En resumen, nuestros resultados muestran que MpkC y SakA interactúan de manera compleja y contribuyen a dos cosas de manera opuesta (conidiación y sensibilidad al estrés oxidativo) como de manera concurrente (biosíntesis de pared celular), finalmente, todo esto es para regular la respuesta al estrés, el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans*.

En ausencia de estrés, la localización nuclear de MpkC está regulada durante el desarrollo, mientras que el estrés oxidativo y osmótico incrementan su localización nuclear

En *A. nidulans* el gen *mpkC* muestra bajos niveles de expresión y aunque en *Aspergillus oryzae* se demostró que PbsB se requiere para la fosforilación de MpkC, esto sólo se pudo observar después de expresar *mpkC* desde un promotor constitutivo (Furukawa *et al.*, 2005). En *A. fumigatus* se mostró recientemente que la expresión de una fusión *mpkC::gfp*, desde su propio promotor, es suficiente para observar la localización nuclear de MpkC::GFP en conidios germinados sujetos al estrés osmótico (Bruder Nascimento *et al.*, 2016). Sin embargo, no se observó ninguna señal de fluorescencia en ausencia de estrés. Por estos motivos, para nuestros estudios decidimos expresar una fusión *mpkC::gfp* desde el promotor constitutivo *gpdA* y examinar el efecto de dicha expresión, así como el papel de la cinasa PbsB en la localización nuclear de MpkC en ausencia y en presencia de estrés oxidativo. Para probar la funcionalidad de la fusión MpkC::GFP, se introdujo la construcción en los siguientes fondos: WT, $\Delta mpkC$, $\Delta sakA$ y $\Delta mpkC \Delta sakA$. Como se muestra en la **Figura suplementaria 6**, la expresión de MpkC::GFP en el fondo WT no afectó su crecimiento, conidiación o sensibilidad al estrés oxidativo. Por lo contrario, la expresión de MpkC::GFP en los fondos $\Delta mpkC$ y $\Delta sakA$ fue capaz de restaurar la conidiación, llevándola a un nivel parecido al de la cepa WT. También restauró la resistencia al calcoflúor y al rojo congo (**Figura suplementaria S6**). Estos resultados demuestran que la fusión MpkC::GFP es funcional en este proceso.

Al estudiar la localización de MpkC::GFP durante el desarrollo asexual y en condiciones de estrés, encontramos que en conidios intactos MpkC::GFP se localizó mayoritariamente en el citoplasma (**Figura 4A**). Los conidios poseen un solo núcleo, el

cual se encuentra detenido en la fase G1 del ciclo celular. Notablemente, durante la germinación la cantidad de MpkC::GFP se incrementó y se detectó en los núcleos, los cuales están etiquetados con la fusión histona *h2A::mrfp*. La detección nuclear de MpkC::GFP se observó desde el inicio de la germinación (**Figura 4B**), hasta el establecimiento del crecimiento polar y la mitosis (**Figuras 4B y 5**).

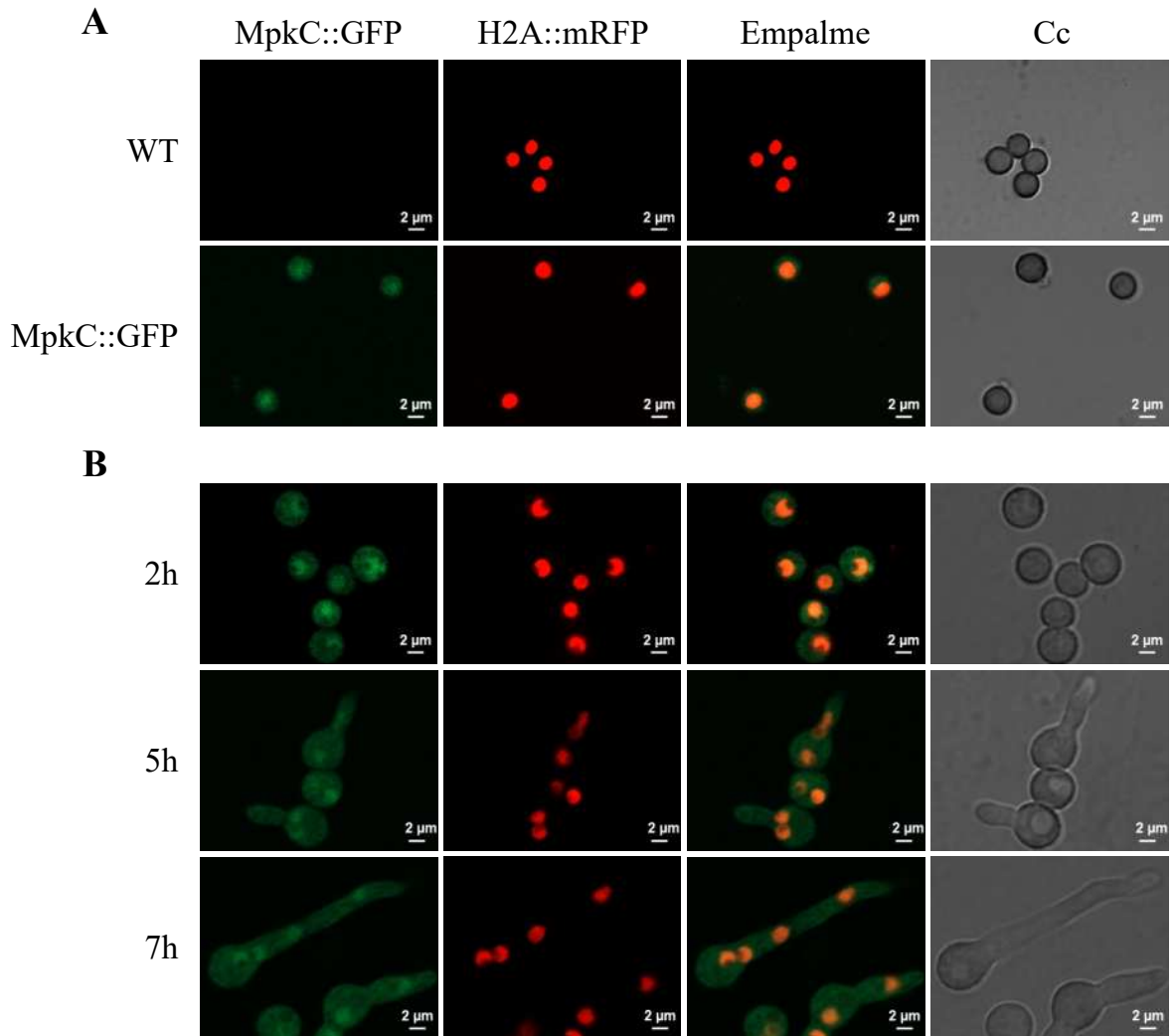


Figura 4. En ausencia de estrés, MpkC::GFP expresada desde un promotor constitutivo, muestra una localización nuclear durante la germinación de los conidios asexuales. A) Conidios intactos de las cepas TRJ7 (WT *h2A::mrfp*) y TRJ13 (*mpkC::gfp h2A::mrfp*) se observaron con microscopía confocal. **B)** Conidios de las cepas TRJ13 se germinaron en los tiempos indicados y se observaron utilizando microscopía confocal. Campo claro (Cc).

Cuando los conidios germinados se trataron con H_2O_2 (estrés oxidativo) o con sorbitol (estrés osmótico), se observó un incremento en la señal nuclear de MpkC::GFP (**Figura 5**), respecto a los conidios no tratados (**Figura suplementaria 7**). Estos datos indican

que la localización nuclear de MpkC se regula durante el desarrollo asexual y que además el estrés oxidativo y osmótico inducen una mayor acumulación nuclear de MpkC.

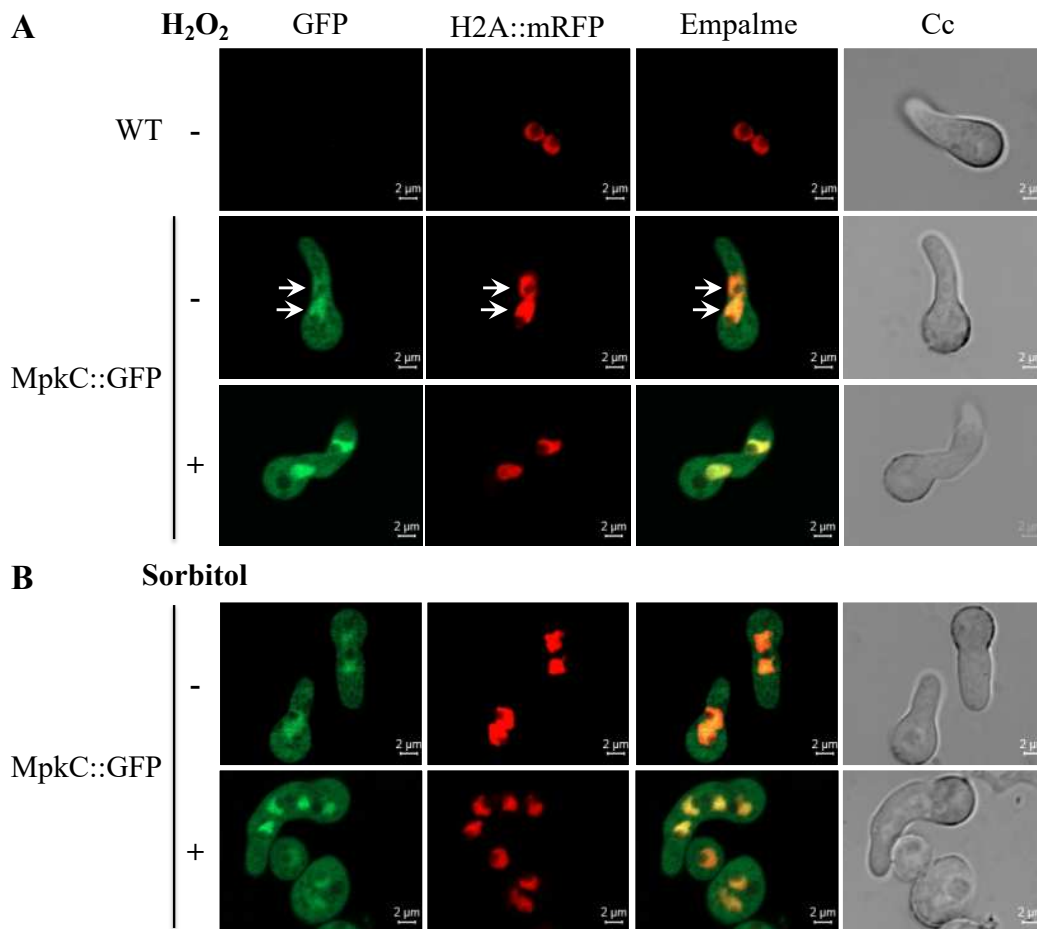


Figura 5. Durante la germinación de los conidios, el estrés oxidativo y osmótico incrementan la localización nuclear de MpkC::GFP. A) Conidios de las cepas TRJ7 (WT *h2A::mrfp*) y TRJ13 (*mpkC::gfp h2A::mrfp*) se germinaron en medio mínimo por 6 h, y se trataron o no con 10 mM de H₂O₂ por 10 min y después se observaron en el microscopio confocal. **B)** Conidios de las cepas TRJ13 (*mpkC::gfp h2A::mrfp*) se germinaron en MM que contenía 1.2 M de sorbitol durante 6 h y después se observaron en el microscopio confocal. Las flechas en el pánel A, indican un ejemplo de señal nuclear. Campo claro (Cc).

Para profundizar más estas observaciones, decidimos detectar MpkC::GFP en conidióforos intactos. A pesar de las dificultades en la detección debido a las múltiples capas celulares que contiene un conidióforo, se pudo observar que los núcleos de la célula pie y las hifas contienen niveles muy bajos de MpkC::GFP (**Figura 6**), mientras que en los diferentes tipos celulares que tiene un conidióforo se observaron diferentes intensidades de fluorescencia roja y verde. En los núcleos de las vesículas se observó un

color naranja, indicando un claro incremento en la localización nuclear de MpkC::GFP. Aunque la señal nuclear de H2A::mRFP disminuyó en las métulas y fiálides, la señal de MpkC::GFP es claramente más intensa en el centro de la célula, que corresponde con la posición de los núcleos, sugiriendo una mayor cantidad de MAPK nuclear, respecto al citoplasma en estos tipos celulares. En conidios jóvenes (proximales) se observa una señal más naranja e incluso amarilla, lo que indicaría una localización nuclear parcial de MpkC::GFP, mientras que la señal verde disminuyó en los conidios maduros (distales), que corresponde con lo que se observa en conidios intactos aislados (**Figura 4A**). Este patrón de la señal de fluorescencia de MpkC::GFP sugiere que en hifas en crecimiento, MpkC está mayormente localizado en el citoplasma y que durante el desarrollo del conidióforo MpkC::GFP se transloca gradualmente del citoplasma a los núcleos de las vesículas, métulas y fiálides, para posteriormente relocarse en el citoplasma de los conidios maduros, que contienen núcleos detenidos en la fase G1 del ciclo celular.

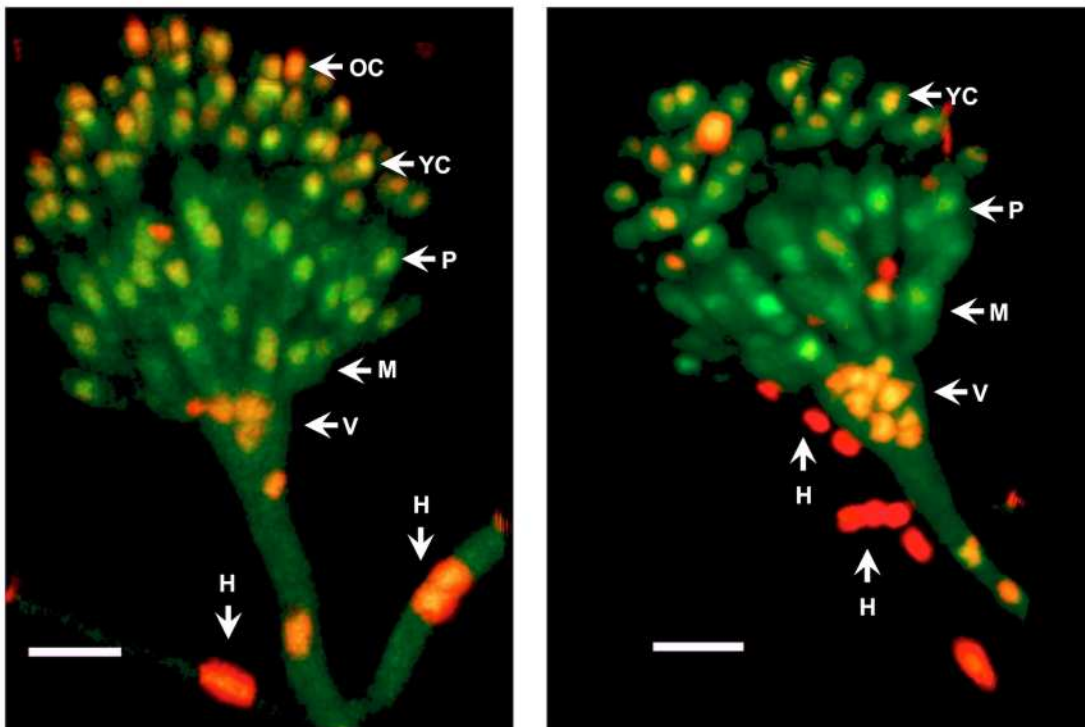


Figura 6. La localización nuclear de MpkC muestra un patrón diferencial en los distintos tipos celulares del conidióforo. Se observaron conidióforos intactos de la sección de una colonia de la cepa TRJ13 (*mpkC::gfp h2A::mrfp*) crecida durante 3 días a 37 °C, utilizando un microscopio confocal. Se muestran dos distintos conidióforos. Los distintos tipos celulares se indican como: H, hifas; V, vesícula; M, métula; P, fiálide; YC, conidios jóvenes; y OC conidios

maduros. Las imágenes corresponden a la máxima proyección de cortes en Z. La barra corresponde a 5 μm .

Estos datos son consistentes con el hecho de que en ausencia de estrés las hifas muestran a MpkC::GFP localizada en el citoplasma y excluida del núcleo, mientras que en condiciones de estrés oxidativo u osmótico, MpkC::GFP se relocaliza hacia los núcleos (**Figura 7A**). Notablemente, en ausencia de la MAPKK PbsB la localización nuclear de MpkC::GFP en respuesta al estrés se ve drásticamente disminuida (**Figura 7B**). Asimismo, la falta de PbsB causa una disminución de la localización nuclear de MpkC::GFP en conidios germinados en condiciones de estrés oxidativo u osmótico (**Figura 8**).

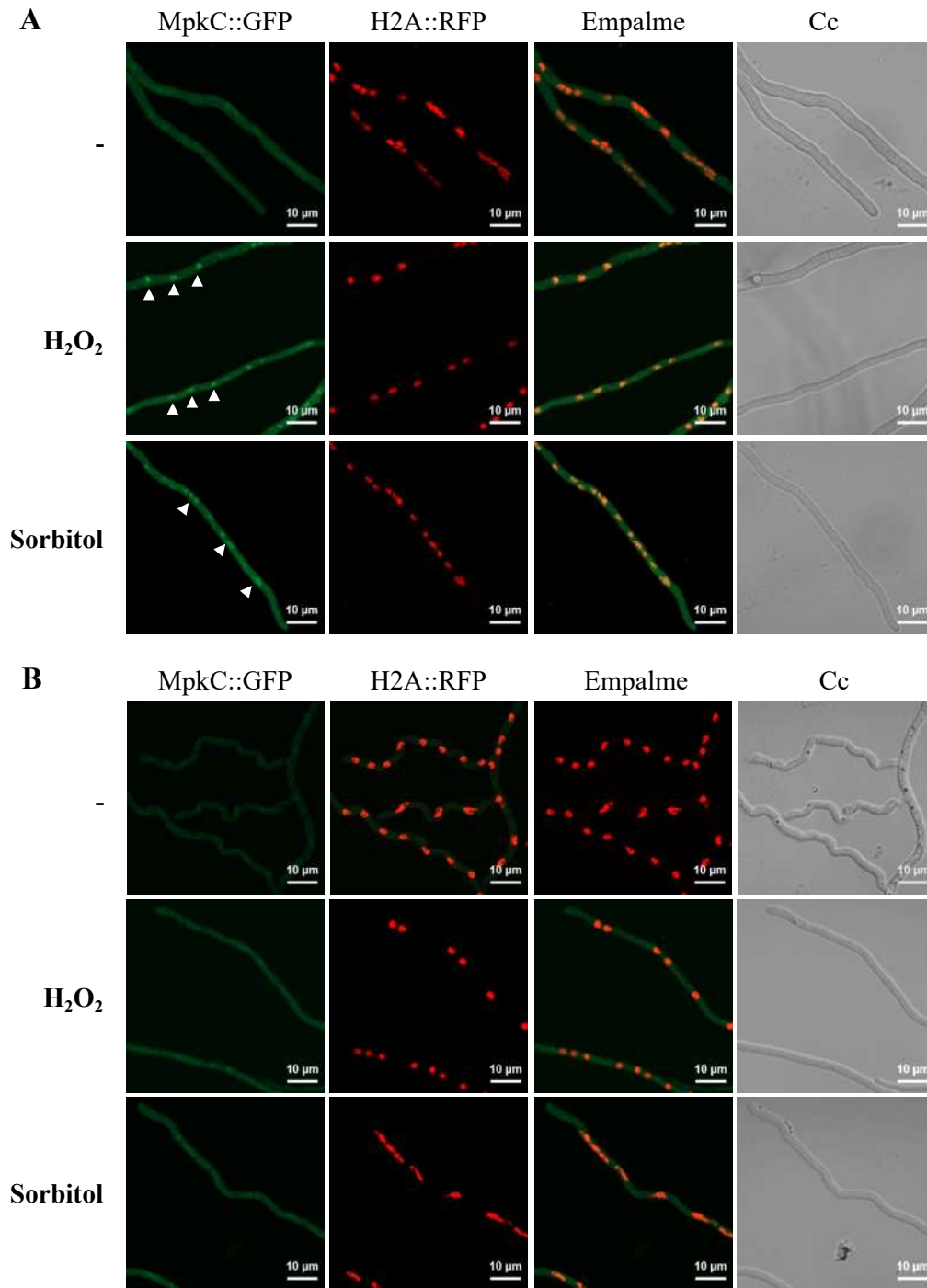


Figura 7. En micelio, la MAPKK PbsB es necesaria para la acumulación nuclear de MpkC::GFP en respuesta al estrés oxidativo u osmótico. A) El micelio de la cepa TRJ13 (*mpkC::gfp h2A::mrfp*) se creció por 14 h en MM y se trató o no con 10 mM de H₂O₂ (pánel superior) por 20 min, o se creció por 14 h en MM con 1.2 M de sorbitol (pánel inferior). Cuadros de agar que contenían dicho micelio se observaron utilizando un microscopio confocal. **B)** El micelio de la cepa CVG10 (Δ *pbsB mpkC::gfp h2A::mrfp*) se creció por 14 h en MM con 1.2 M de sorbitol y se observó en el microscopio confocal. Las flechas blancas en el pánel A indican la señal nuclear de MpkC::GFP. Campo claro (Cc).

En resumen, MpkC se localiza en el citoplasma durante el crecimiento de las hifas, se acumula en el núcleo durante el desarrollo de los conidióforos y se relocaliza en el citoplasma en los conidios maduros. Durante la germinación, MpkC está mayoritariamente en el núcleo hasta que se establece el crecimiento de las hifas, en donde la localización vuelve a ser citoplasmática. Nuestros resultados indican la participación de MpkC en el desarrollo asexual y en la respuesta al estrés oxidativo y osmótico.

La acumulación nuclear de SakA también se regula durante el desarrollo y en respuesta a estrés oxidativo y osmótico. Sin embargo y de manera notable, la acumulación nuclear de SakA durante el desarrollo (Kawasaki *et al.*, 2002; Lara-Rojas *et al.*, 2011; Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015) ocurre de manera opuesta a la de MpkC.

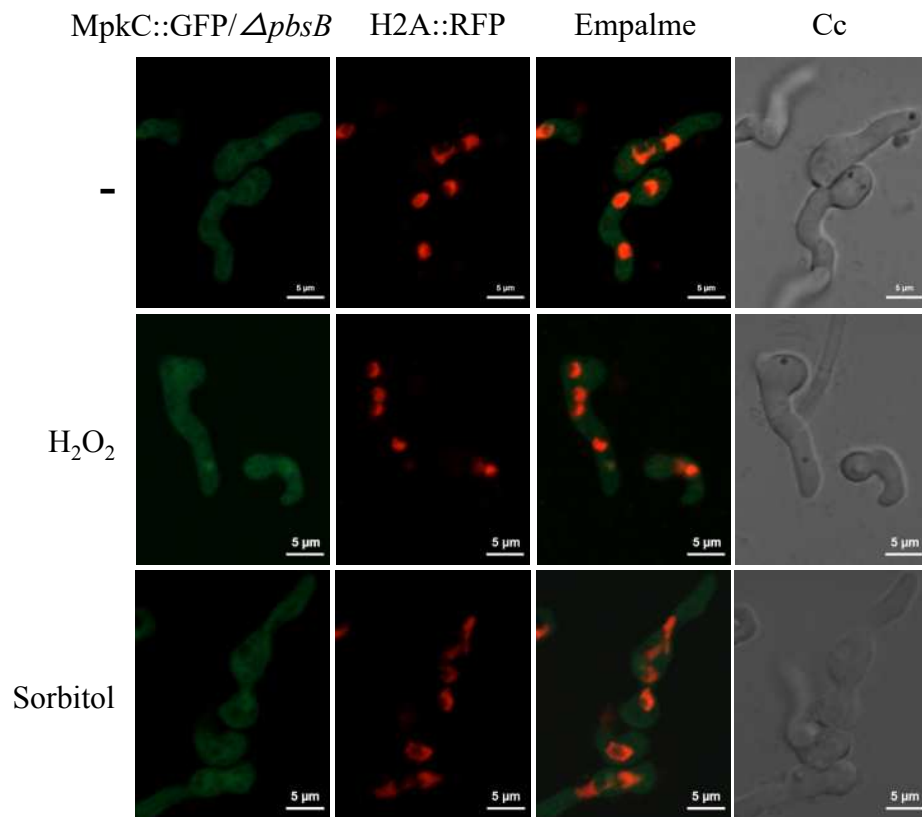


Figura 8. La MAPKK PbsB es necesaria para la acumulación nuclear de MpkC::GFP durante la germinación y en respuesta al estrés oxidativo u osmótico. A) Se germinaron esporas de la cepa CVG10 (Δ *pbsB mpkC::gfp h2A::mrfp*) por 6 h en MM y posteriormente se trataron con 10 mM de H₂O₂ (pánel superior) por 10 min y se observaron en el microscopio confocal. En el panel inferior se muestran conidios germinados por 6 h en MM con 1.2 M de sorbitol. Campo claro (Cc).

Todos los datos anteriores sugieren que el estrés oxidativo tiene algún papel importante en la fisiología de la célula y que organelos como las mitocondrias responden rápidamente, además las cinasas sensoras de estrés (SakA, MpkC y SrkA) podrían tener un papel fundamental en esta respuesta.

Debido a que *A. nidulans* tuvo una respuesta al H₂O₂ la cual incluye a las cinasas y las mitocondrias, los análisis posteriores se centrarán en entender el papel del H₂O₂ en la mitocondria y su división.

Discusión

Nuestros resultados ayudan a entender la relación entre estas dos SAPKs y demuestran que SakA y MpkC cumplen funciones comunes y también opuestas durante el ciclo de vida de *A. nidulans*. De hecho, SakA y MpkC regulan la resistencia al estrés oxidativo de maneras opuestas (**Figura 3**) y esto es consistente con su localización opuesta en los conidios intactos, mientras MpkC está localizada en el citoplasma (Figura 4A), SakA se localiza en el núcleo (Lara-Rojas *et al.*, 2011). Ignoramos el mecanismo por el cual, en ausencia de SakA, MpkC contribuye a una mayor resistencia al H₂O₂ en los conidios. Bajo estas condiciones, parece que el H₂O₂ induce una hiperactivación de la vía de MpkC, lo cual conlleva a la muerte celular. Durante la germinación de los conidios, MpkC está enriquecida en el núcleo, mientras que SakA se localiza en el citoplasma y necesita ser desfosforilada para inducir la germinación (Lara-Rojas *et al.*, 2011). Además, la actividad de SakA es esencial para mantener la viabilidad de las esporas (Lara-Rojas *et al.*, 2011), mientras que la de MpkC no es indispensable. (**Figura S4B**). Adicionalmente, MpkC aumenta su acumulación en el núcleo en respuesta al estrés oxidativo y osmótico. En este sentido, el papel de MpkC en la respuesta a ambos estreses está relacionada con una regulación transitoria del arresto del ciclo celular en estas condiciones.

SakA y MpkC regulan la conidiación de diferentes maneras. La falta de SakA no tiene mucho efecto, mientras que la falta de MpkC aumenta la conidiación, en contraste la ausencia de ambas MAPKs y de PbsB, tiene como resultado una drástica reducción en la conidiación (**Figura 1-3 y FS4A**). Los conidióforos de las mutantes $\Delta mpkC$ y $\Delta mpkC$

Δsaka crecidas en medio sólido o en medio líquido con falta de glucosa o nitrógeno, condición en la cual se induce la conidiación (Skromne, Sanchez y Aguirre, 1995), presentaron morfología normal (datos no mostrados). Su respectivo incremento y disminución de la conidiación, parece ser resultado de la diferencia en la cantidad de conidios producidos por cada fiálide y por la densidad de conidióforos, aunque estos parámetros fueron difíciles de evaluar. Está claro que la cinasa Saka detiene la mitosis y esto mantiene a las esporas en latencia (Lara-Rojas *et al.*, 2011), nosotros proponemos que los bajos niveles de la cinasa MpkC en el núcleo se debe a su baja actividad y/o a su baja expresión, lo cual es necesario para el retraso de la mitosis durante el desarrollo de las esporas. En *S. pombe*, las cinasas Spc1/Sty1 (ortólogo de Saka) median el arresto del ciclo celular en respuesta al estrés, a través de la fosforilación de la MAPKAP Srk1 y posterior translocación al núcleo (López-Avileés *et al.*, 2008). En *A. nidulans*, Saka interactúa con MpkC, con el ortólogo de Srk1 (SrkA) y con otras proteínas que están involucradas en la regulación del ciclo celular, además Saka también regula la localización nuclear de SrkA (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Esto sugiere que MpkC podría asimismo regular el ciclo celular a través de SrkA.

En *S. pombe*, en condiciones de baja cantidad de nutrientes, la fosforilación de una sola SAPK (Spc1/Sty1) es suficiente para regular el avance o el retraso del ciclo celular (Hartmuth y Petersen, 2009; Shiozaki, 2009). En hongos filamentosos el control del tamaño celular es crítico durante la mitosis, sobre todo durante la diferenciación de una célula (conidio). En el género *Aspergillus* las dos SAPKS podrían estar regulando la mitosis durante el desarrollo de la estructura multicelular llamada conidióforo. De hecho, en estos hongos la conidiación comienza con la división mitótica del núcleo que hay en las vesículas, después de que la siguiente estructura celular se ha formado, la métula, un núcleo migra. Posteriormente se forma una fiálide, en donde ocurre la mitosis para tener dos núcleos, uno de ellos migrará al nuevo conidio que se forma y se mantendrá en la fase G1 del ciclo celular. El núcleo que quedó en la fiálide vuelve a sufrir división mitótica para producir el núcleo del siguiente conidio, este evento se repite aproximadamente 120 veces (Oliver, 1972; Mims *et al.*, 2005; Sewall *et al.*, 1990).

En las hifas, la localización nuclear de MpkC se induce por el estrés oxidativo u osmótico, en donde podría tener menor relevancia que SakA, lo cual explica por qué la inactivación de MpkC no produce un fenotipo.

La MAPKK PbsB regula la localización de SakA y MpkC durante el desarrollo y en respuesta a estrés, por lo tanto, también regula los niveles de fosforilación de ambas cinasas. Sin embargo, se detectaron bajos niveles de la señal nuclear de MpkC en ausencia de PbsB, particularmente en condiciones de estrés osmótico (**Figura 8**). Cabe señalar que esto podría ser efecto del uso de un promotor constitutivo para su expresión o podría indicar la existencia de un mecanismo que activa a MpkC que no depende de PbsB. La autofosforilación podría ser un mecanismo que hasta ahora no ha sido explorado. Aunque en general las MAPKs no muestran autofosforilación, la capacidad de ser autofosforilada ya se ha reportado para p38 β y otras MAPKs bajo ciertas condiciones (Beenstock *et al.*, 2014; Tesker *et al.*, 2016).

Las diferencias moleculares entre SakA y MpkC pueden explicar sus diferencias funcionales. De hecho, en humanos CSBP2 y CSBP1 son las dos proteínas homólogas a SakA/MpkC/Hog1 y son producto de un *splicing* de su RNA, el cual da como resultado a dos proteínas que difieren en 25 aminoácidos. Sin embargo, ambos alelos no tienen la capacidad de complementar a una mutante de levadura $\Delta hog1$ y se activan diferencialmente en condiciones salinas. *CSPB1* pero no *CSPB2*, complementan al fenotipo de una mutante $\Delta hog1$ y la activación *CSPB1* fue dependiente de la MAPKK PbsB2. Notablemente, aunque la proteína *CSPB1* tiene tres veces menos actividad de cinasa, el alelo de esta proteína fue capaz de complementar a una mutante $\Delta hog1$ (Kumar *et al.*, 1995). Aunque PbsB regula a ambas cinasas, SakA y MpkC podrían mostrar diferencias en su actividad basal de cinasa, sensibilidad a las fosfatasas y en su interacción con sustratos.

Además de los diferentes papeles que tienen SakA y MpkC durante el desarrollo de *A. nidulans*, también tienen algunos comunes como es la de mantener la integridad de la pared celular. En *A. fumigatus* se mostró que ambas MAPKs se requieren para la resistencia al estrés osmótico, oxidativo y estrés de pared celular, y que la eliminación simultánea de las dos MAPKs tiene efectos notorios en la respuesta a estos tipos de estrés (Bruder Nascimento *et al.*, 2016). Aunque no observamos efectos aditivos en la

sensibilidad al estrés osmótico u oxidativo cuando se inactivaron SakA y MpkC simultáneamente, se observó que ambas MAPKs contribuyen a la integridad de la pared celular de los conidios. Previamente se reportó que en el micelio de 24 h de crecimiento a 30 °C, no se detectó la fosforilación de MpkC. Cabe señalar que el gen *mpkC* se expresó bajo un promotor constitutivo. Mientras que con el tratamiento de 0.5 M de NaCl por 10 minutos se observó la fosforilación de MpkC (Furukawa *et al.*, 2005). Estos resultados son similares a los que observamos nosotros, pues en ausencia de estrés se observó que MpkC estuvo excluida del núcleo y en ambos estreses, oxidativo u osmótico, se indujo su acumulación nuclear.

Conclusiones

- En ausencia de SakA y en respuesta al H₂O₂, SrkA se dirige al núcleo en los primeros minutos, proceso que podría ser dependiente de MpkC.
- En tiempos más tardíos (30 min), SrkA se relocaliza en las mitocondrias. Esto en ausencia de SakA y en respuesta al H₂O₂.
- SrkA podría tener algunas funciones durante la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂.
- La expresión inicial de SrkA es dependiente de SakA y MpkC; sin embargo, en respuesta a estrés, parece haber otra manera independiente de las cinasas de estrés SakA y MpkC que regula su expresión y su posterior localización mitocondrial.
- SakA y MpkC regulan el desarrollo de los conidios y la respuesta al estrés oxidativo de manera opuesta.
- Además de regular el desarrollo, SakA y MpkC regulan la respuesta al estrés oxidativo en las germínulas de *A. nidulans*
- MpkC tiene un papel diferencial durante el desarrollo de los conidióforos.
- La acumulación nuclear de MpkC en respuesta al estrés oxidativo y osmótico en hifas sugiere que ambas cinasas cumplen con un papel importante ante estos estreses.

- La localización nuclear en respuesta al estrés oxidativo de las cinasas MpkC y SakA, dependen de la MAPKK PbsB.

Materiales y métodos

Las cepas utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Todas las cepas se crecieron a 37 °C en medio mínimo (Hill y Kafer, 2001) más el suplemento requerido para cada cepa. El medio mínimo sólido contenía 1.25 % de agar. Para los experimentos de crecimiento radial y estrés, se inocularon 1×10^4 conidios. En los experimentos de estrés se adicionaron los agentes estresantes cuando el medio estaba a 50 °C. Las placas que contenían H₂O₂ se usaban el mismo día de su preparación.

Delección de genes *mpkC* y *pbsB*

La construcción de las cepas mutantes $\Delta sakA$ y $\Delta mpkC$ se describió en un trabajo previo del laboratorio (Lara-Rojas, 2012); estas cepas se utilizaron para diferentes cruces y así obtener la progenie deseada.

Para la delección del gen *pbsB* (AN0931), se utilizó como templado DNA genómico de una cepa WT (A1155) para amplificar por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) el ORF de *pbsB* con los oligonucleótidos pbsB5'Fw/pyrGpbsB5'Rv y pbsB3'pyrGFw/pbsB3'Rv. El marcador *pyrG* de *A. fumigatus* se amplificó con los oligonucleótidos pyrGforward/ptrGreverse. Los tres fragmentos se purificaron y se fusionaron en otra PCR con los oligonucleótidos RealNestedpbsB5'/RealNestedpbsBRev, se obtuvo un producto final pbsB-AfpyrG-pbsB de 4307 pb, el cual se purificó y se utilizó para transformar por electroporación a esporas electrocompetentes de la cepa 11035 de *A. nidulans* (Sánchez y Aguirre, 1996; Sánchez, *et al.*, 1998). Se obtuvieron cinco transformantes que se analizaron por PCR para confirmar la delección del gen. Se seleccionó una cepa y se llamó TOS Δ pbsB03, ésta se usó para cruzarla con CLK43 y eliminar la delección *kuA*. Se analizó la progenie por PCR y se seleccionó a COS Δ pbsB05 para los siguientes experimentos. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados.

Expresión de *mpkC::gfp* bajo un promotor constitutivo

Para la expresión de *mpkC::gfp* bajo el promotor constitutivo *gpdA*, se obtuvo una construcción *biA-pyroA-gpdA-mpkC-GFP-biA*, la cual se usó para transformar a la cepa TFL22 (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Las transformantes *PyroA⁺ BiA⁻* se analizaron observando la proteína GFP. Se seleccionó una cepa y se le llamó TRJ12. Esta cepa se usó en posteriores experimentos. Se secuenció el ORF de la cepa TRJ12, para descartar alguna mutación (Bayram *et al.*, 2012).

Se hizo una cruce entre las cepas TRJ7 y CRJ1 para introducir el alelo *gpdA(p)::h2A::mrfp* en el fondo genético $\Delta sakA$. Por microscopía de epifluorescencia se detectó la marca de los núcleos y por PCR la delección de *sakA*. Con las cruces entre las cepas CRJ11 X TRJ13 y CRJ11 X TRJ7 se introdujo el alelo *bioA::pyroA::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA::bioA* ó *gpdA(p)::h2A::mrfp* en los fondos mutantes $\Delta mpkC$, $\Delta sakA$ o $\Delta mpkC \Delta sakA$. La progenie obtenida de las cruces se analizó en el microscopio de epifluorescencia y se comprobó que contuvieran la señal GFP y/o mRFP. Las delecciones de *mpkC* y/o *sakA* se comprobaron por PCR. Se obtuvieron las cepas CVG17($\Delta mpkC::AfpyrG \Delta sakA::Afribo \ bio::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA$) y CVG18($\Delta sakA::AfriboB \ bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::mrfp::bio$) y se usaron para posteriores experimentos. Bajo la misma estrategia se introdujeron los alelos *bioA::pyroA::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA::bioA* ó *gpdA(p)::h2A::mrfp* en el fondo genético $\Delta pbsB$. Se cruzaron las TRJ7 o TRJ13 con la cepa COS $\Delta pbsB05$, así se obtuvieron las cepas CVG10 ($\Delta pbsB::AfpyrG \ bio::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA \ gpdA(p)::h2A::mrfp::phleo$) y CVG20 ($\Delta pbsB::AfpyrG \ bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::mrfp::bio$). La detección de la delección *pbsB* se comprobó por PCR.

Obtención de las cepas *srkA::gfp*, $\Delta sakA \ srkA::gfp$ y $\Delta sakA \ \Delta mpkC \ srkA::gfp$ con mitocondrias marcadas

La cepa CVG1($\Delta dnmA \ srkA::gfp \ mts::mCherry$) contiene una integración ectópica de la proteína mCherry fusionada a la secuencia premitocondrial de la ATP7-9 y bajo el promotor constitutivo del gen *gapdh* del hongo *Podospora anserina* (Ver materiales y

métodos, Capítulo 3,). La cepa CVG1 se usó para cruzarla con la cepa TRJ1. La progenie obtenida se analizó con ayuda del microscopio de epifluorescencia y se eligió una cepa que tuviera a SrkA::GFP y las mitocondrias marcadas. La cepa se llamó CVG3 (*srkA::gfp mts::mCherry*). Con las cruces de las cepas TFL Δ sakA-03 o TFL11 X CVG3 se obtuvo progenie que se analizó por PCR para detectar las deleciones *sakA* y/o *mpkC* y por microscopía de epifluorescencia se detectó a la proteína SrkA::GFP y las mitocondrias marcadas *mts::mCherry*. Se seleccionaron cepas que se llamaron CVG12 (Δ sakA *srkA::gfp mts::mCherry*) y CVG11 (Δ sakA Δ mpkC *srkA::gfp mts::mCherry*). Estas cepas se usaron para posteriores experimentos.

Microscopía

Las imágenes de microscopía se capturaron en experimentos *in vivo*. Para la detección de MpkC durante la germinación, se germinaron conidios por 2, 4 y 7 h a 37 °C en MM sólido y se observaron usando el microscopio confocal. Para los tratamientos de estrés, se germinaron conidios por 6 h y se trataron con 10 mM de H₂O₂ por 10 minutos y posteriormente pasados otros 10 minutos se observaron. Para el experimento de estrés osmótico, se germinaron conidios por 6 h en MM que contenía 1.2 M de sorbitol y se observaron en el microscopio confocal. Para observar a los conidióforos, se creció la cepa TRJ13 durante 3 días a 37 °C, posteriormente se cortó una sección de la orilla de la colonia, se adicionó una gota de agua y se colocó cuidadosamente el cubreobjetos, enseguida se observó en el microscopio confocal. Para observar los tratamientos en hifas, se inocularon las cepas en MM, se incubaron a 37 °C por 14 h. Posteriormente se cortaron cuadros de agar que contenían micelio y se trataron o no con 10 mM de H₂O₂ por 20 minutos. Enseguida se observaron en el microscopio confocal.

Para el tratamiento de estrés osmótico se crecieron las cepas en MM que contenía 1.2 M de sorbitol, se incubaron a 37 °C por 14 h. Posteriormente se cortaron cuadros de medio con agar que contenían micelio y se observaron en el microscopio confocal.

Todas las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Zeiss LSM800 con laser invertido y se usó el objetivo 63 X/1.4 con aceite de inmersión y los láseres 488 y 561 nm. Para observar a los conidióforos hicimos cortes en Z, en secciones cada 15 μ m del

volumen de la célula. Posteriormente se obtuvo la máxima proyección de imágenes. Las imágenes se procesaron usando el Software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena Germany).

Tabla S1. Cepas de *Aspergillus nidulans* que se usaron en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
CLK43	<i>pabaA1 yA2 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , (2002)
11035	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB veA1</i>	M. Hynes; Nayak <i>et al.</i> , (2006)
1155	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::bar veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
SRF200	<i>pyrG89 ΔargB::trpCΔB pyroA4 trpC801 veA1</i>	Karos, M., and R. Fischer (1999)
TOL1	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB ΔsakA::argB trpC801 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , (2002)
TFL8	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔmpkC::AfpYrG ΔnKuA::argB veA1</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
TFL11	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔsakA::AfriboB ΔmpkC::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
TFL22	<i>pyrG89 pyroA4 sakA::s-tag::AfpYrG ΔnkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo <i>et al.</i> , (2015)
TFLΔsakA-03	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔsakA::AfriboB ΔnkuA::argB veA1</i>	Lara-Rojas <i>et al.</i> , 2011
TRJ7	<i>pyrG89 pyroA4 bio::pyroA::(p)gpdA::h2A::mrfp::bio nkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo (2015) Tesis doctoral
TRJ12	<i>pyrG89 pyroA4 sakA::s-tag::AfpYrG bio::(p)gpdA::mpkC::GFP::pyroA::bio ΔnkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo (2015) Tesis doctoral
TRJ13	<i>pyrG89 pyroA4 sakA::s-tag::AfpYrG bio::(p)gpdA::mpkC::GFP::pyroA gpdA(p)::h2A::mrfp::phleo ΔnkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo (2015) Tesis doctoral
TRJ1	<i>pyrG89 pyroA4 srkA::GFP ΔnkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo <i>et al.</i> , (2015)
TOSΔpbsB03	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔpbsB::AfpYrG ΔnkuA::argB veA1</i>	En este trabajo; cepa 11035 transformada con la construcción de PCR pbsB-AfpYrG-pbsB

CFL3	<i>pabaA1 yA2 pyrG89 veA1</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
CFL8	<i>pabaA1 yA2 ΔmpkC::AfpYrG veA1^a</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
CFL10	<i>pabaA1, yA2; ΔmpkC::AfpYrG; veA1^a</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
CFL12	<i>pabaA1 yA2 ΔsakA::AfrB ΔmpkC::AfpYrG veA1</i>	Lara-Rojas (2012) Tesis doctoral
CRJ1	<i>pabaA1 yA2 ΔsakA::AfrB veA1</i>	Jaimes-Arroyo (2015) Tesis doctoral
CRJ11	<i>pabaA1 yA2 ΔmpkC::AfpYrG ΔsakA::AfrB veA1^{a,c}</i>	Jaimes-Arroyo (2015) Tesis doctoral
COSΔpbsB05	<i>pabaA1 yA2 ΔpbsB::AfpYrG veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de TOSΔpbsB03 X CLK43
COS0020	<i>pabaA1 yA2 ΔmpkC::AfpYrG veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de CFL3 X TFL8
CVG1	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::AfpYrG gadp (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de TRV1 X TVG1
CVG3	<i>pabaA1 yA2 srkA::gfp gadp (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de CVG1 X TRJ4
CVG13	<i>bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::mrfp::bio veA1^b</i>	En este trabajo; progenie de TRJ7 X CLK43
CVG10	<i>ΔpbsB::AfpYrG bio::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA gpdA(p)::h2A::mrfp::phleo veA1^{ab}</i>	En este trabajo; progenie de COSΔpbsB05 X TRJ13
CVG11	<i>pabaA1 yA2 ΔsakA::AfrB ΔmpkC::AfpYrG srkA::gfp (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de TFL11 X CVG3
CVG12	<i>pabaA1 yA 2ΔsakA::AfrB srkA::gfp (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de TFLΔsakA-03 X CVG3
CVG15	<i>ΔmpkC::AfpYrG; bio::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de COS0020 ΔmpkC X TRJ13
CVG17	<i>ΔmpkC::AfpYrG ΔsakA::AfrB bio::gpdA(p)::mpkC::GFP::pyroA veA1^{a,b,c}</i>	This work; progeny from CRJ11 X TRJ13

CVG18	<i>ΔsakA::AfriboB</i> <i>bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::mrfp::bio veA1^{b,c}</i>	En este trabajo; progenie de TRJ7 X CRJ1
CVG19	<i>ΔmpkC::AfpvrG ΔsakA::AfriboB</i> <i>bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::</i> <i>mrfp::bio veA1^{a,b,c}</i>	En este trabajo; progenie de CRJ11 X TRJ7
CVG20	<i>ΔpbsB::AfpvrG</i> <i>bio::pyroA::gpdA(p)::h2A::mrfp::bio veA1^{a,b}</i>	En este trabajo; progenie de COSΔpbsB05 X TRJ7

^aPodría contener *pyrG89*, ^bpodría contener *pyroA4*, ^cpodría contener *riboB2*

Tabla S2. Oligonucleótidos que se usaron en este trabajo

Primer	Sequence (5' to 3')
5'For-mpkC	TACCCAGAGCGCGATAC
5'Rev-mpkC	GGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCAGCGAAAGGAGGTGGAGT
3'For-mpkC	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACCCAGCTCACCACAAACGC
3'Rev-mpkC	GCCTTGACCTTGGCCTTG
pyrGforward	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
pyrGreverse	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
5'Nest-mpkC	TTCCGGCCAGGACACGAT
3'Nest-mpkC	GGCCTTGCCCCGACACTAG
pbsB5'Fw	TTTGGACCCTTGTATAGACGACAGC
pyrGpbsB5'Rv	CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACCCATTTACACGCCTCCGTTCA
pbsB3'pyrGFw	CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACCCATTTACACGCCTCCGTTCA
pbsB3'Rv	GAGCCATCGTTCATTATCAGCTT
RealNestedpbsB5'For	TCGGGATCCGGGAGAATGAT
RealNestedpbsBRev	CAATCAGCAATGCGCTGGTTC

Figuras suplementarias

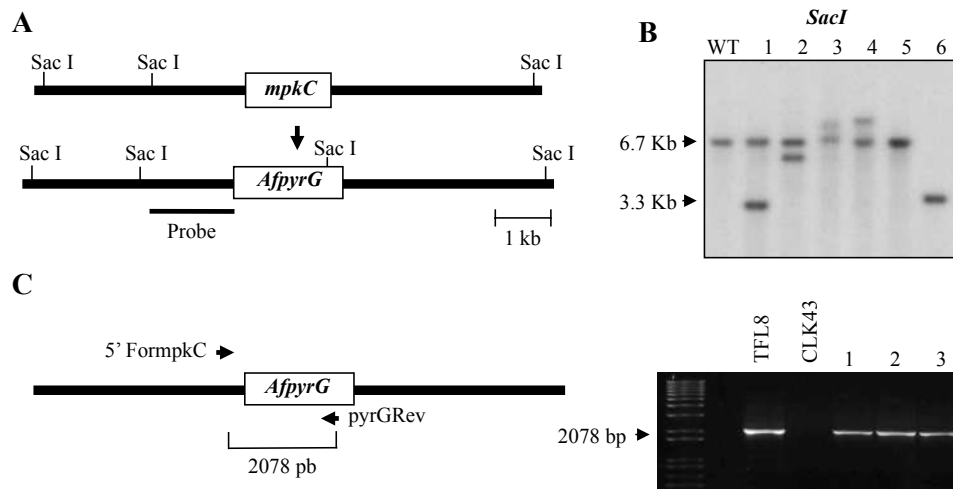


Figura S1. Eliminación del gen *mpkC*. (A) Se obtuvo una construcción mediante la técnica de double-joint PCR para eliminar el gen *mpkC*, la cual contiene el gen *AfpyrG* como marcador selectivo. (B) Patrón de digestión con la enzima *Sac*I para la detección de la delección del gen *mpkC*. Para una cepa WT, esperaba una banda de 6.7 Kb y de 3.3 Kb para una mutante *mpkC*, se seleccionó la transformante 6 y se llamó TFL8. Esta cepa se usó para posteriores experimentos. (C) Análisis por PCR de la progenie proveniente de la cruce TFL8 X CLK43 para eliminar la delección *kuA* (datos no mostrados). Se utilizaron los oligonucleótidos 5'FormpkC y pyrGRev. Se esperaba una banda de 2078 pb para una cepa *mpkC* y ninguno para la cepa WT (CLK43). Se seleccionaron las tres cepas se les llamó CFL8 y se usaron para posteriores experimentos (Lara-Rojas, 2012).

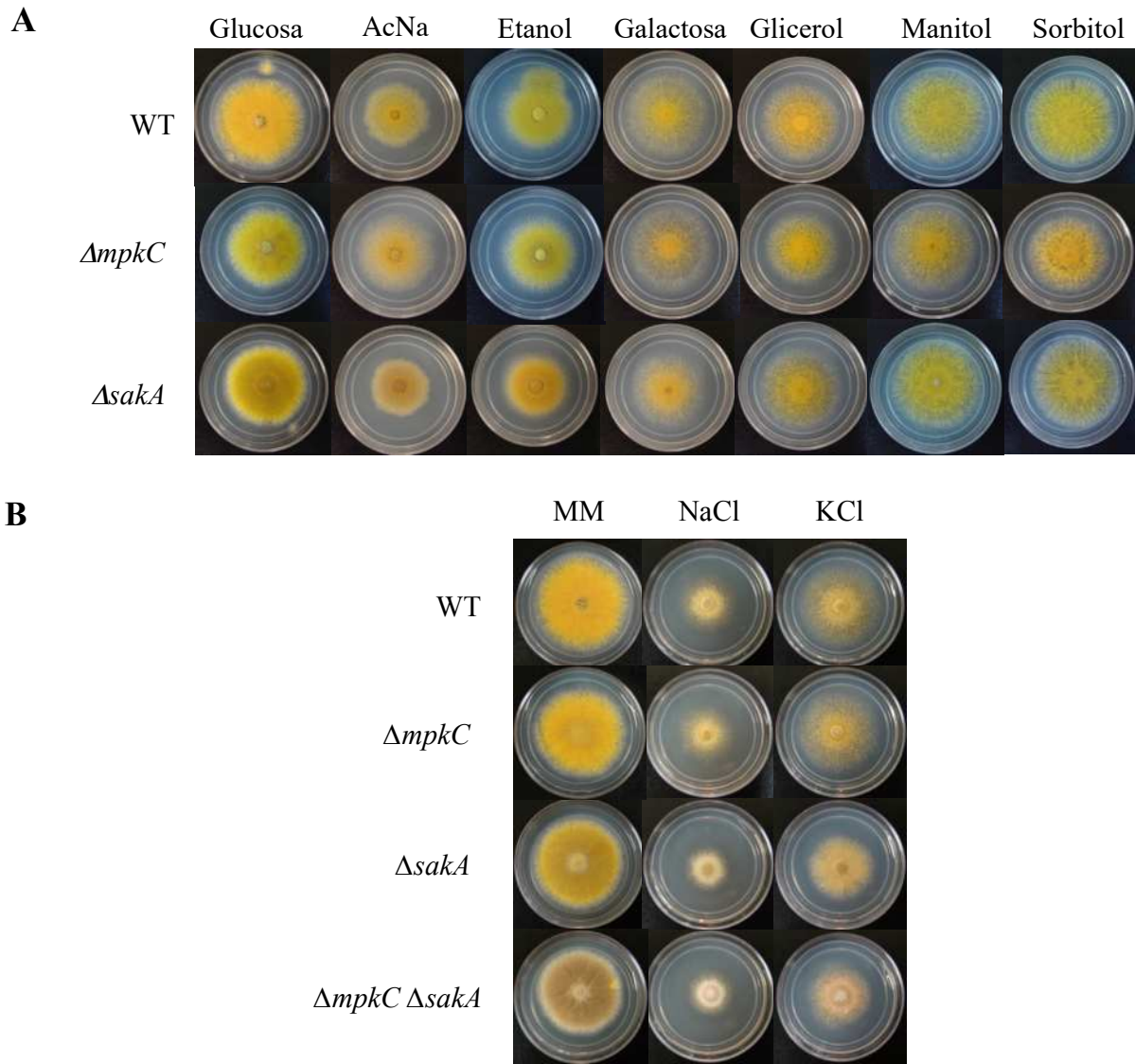


Figura S2. (A) Las proteínas Saka y MpkC no son necesarias para la utilización de fuentes alternas de carbono. (A) Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CLK43 (WT), CFL10 ($\Delta mpkC$) y TOL1 ($\Delta saka$) en MM que contenía ya sea 1% glucosa, 100 mM acetato de sodio (AcNa), 1% etanol (ETOH), 1% galactosa, 1% glicerol, 1% manitol ó 1% sorbitol, como única fuente de carbono y se incubaron a 37°C durante 4 días. **(B) La inactivación simultánea de Saka y MpkC no incrementa la osmosensibilidad.** Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CLK43 (WT), CFL8 ($\Delta mpkC$) y CFL12 ($\Delta mpkC \Delta saka$) en MM que contenía ya sea 1M de NaCl ó 0.6 M de KCl y se incubaron a 37 °C por 4 días (Lara-Rojas, 2012).

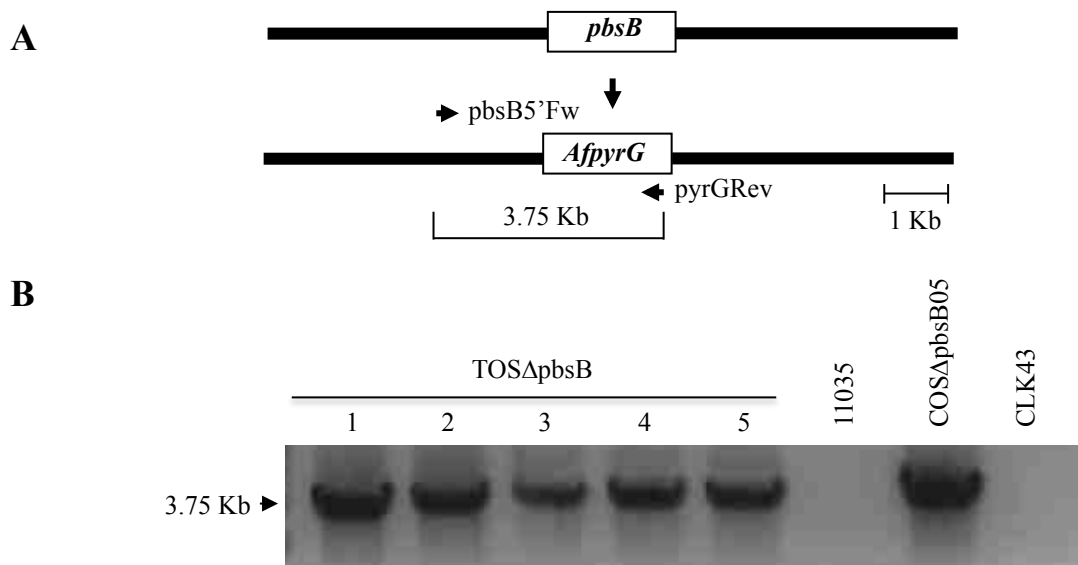


Figura S3. Delección del gen *pbsB*. (A) Para la delección del gen *pbsB* se utilizó la construcción 5'*pbsB*-*AfpyrG*-3'*pbsB*. La construcción de purificó y se usó para transformar a la cepa 11035. (B) Para el análisis de 5 transformantes por PCR, se usaron los oligonucleótidos *pbsB*5'Fw y *pyrG*Rev. Se esperaba una banda de 3.75 Kb para las mutantes Δ *pbsB* y ninguna para la cepa WT (11035 y CLK43). Se seleccionó una cepa y se le llamó TOS Δ *pbsB*03, esta misma se cruzó con CLK43 para eliminar la delección *kuA* (datos no mostrados) y se obtuvo la cepa COS Δ *pbsB*, la cual se usó en posteriores experimentos.

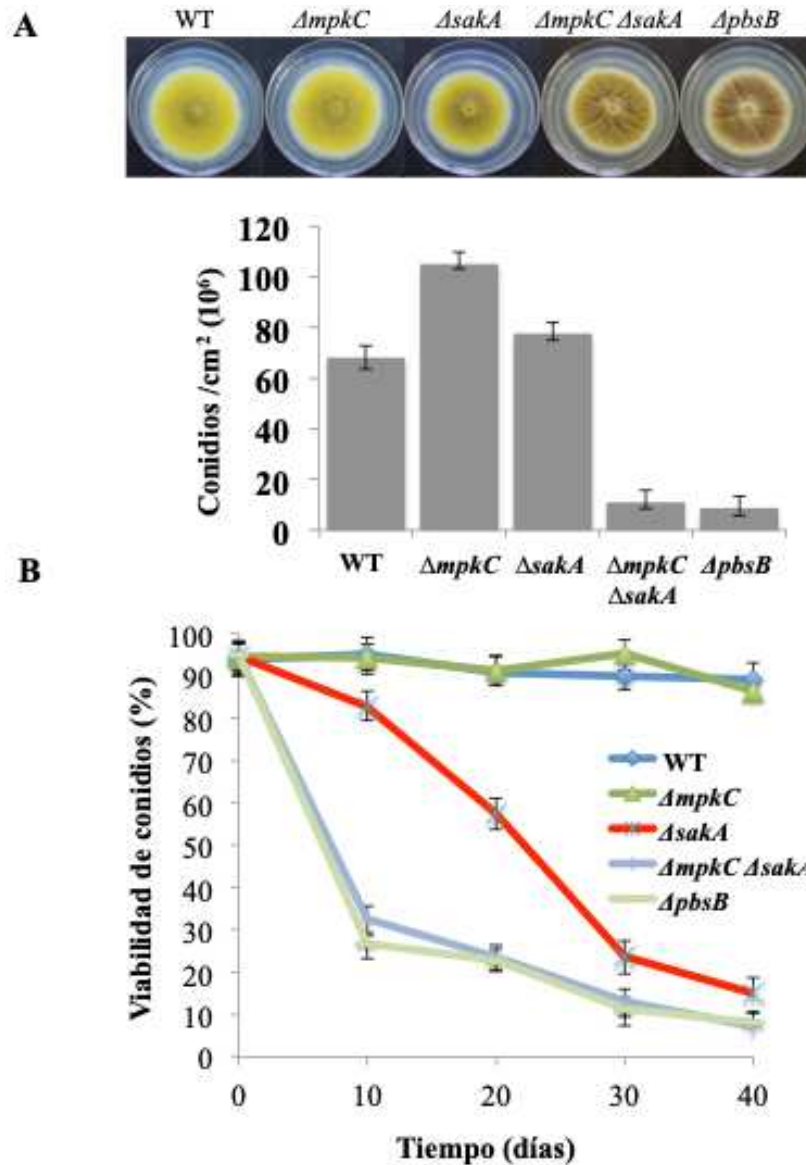


Figura S4. Las mutantes $\Delta mpkC \Delta saka$ y $\Delta pbsB$ muestran fenotipos similares. (A) Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CLK43 (WT), COS0020 $\Delta mpkC$ ($\Delta mpkC$), CRJ1 ($\Delta saka$), CRJ11 ($\Delta mpkC \Delta saka$) y COS $\Delta pbsB05$ ($\Delta pbsB$) en cajas con MM y se incubaron a 37°C por 4 días. Se colectó el total de conidios por colonia, se contaron y el total se dividió entre el área de la colonia. (B) Se crecieron conidios de las mismas cepas por 5 días, se colectaron y se contaron y una cantidad conocida se sembró en cajas con MM, el resto de los conidios se mantuvieron en H₂O a 4 °C durante 40 días. A los tiempos indicados en la gráfica, alícuotas de conidios que se habían mantenido en H₂O a 4 °C se sembraron en cajas con MM y se incubaron a 37 °C. Después de dos días, se contaron los conidios que habían germinado. Los datos muestran la media de tres réplicas experimentales independientes; la barra indica la desviación estándar.

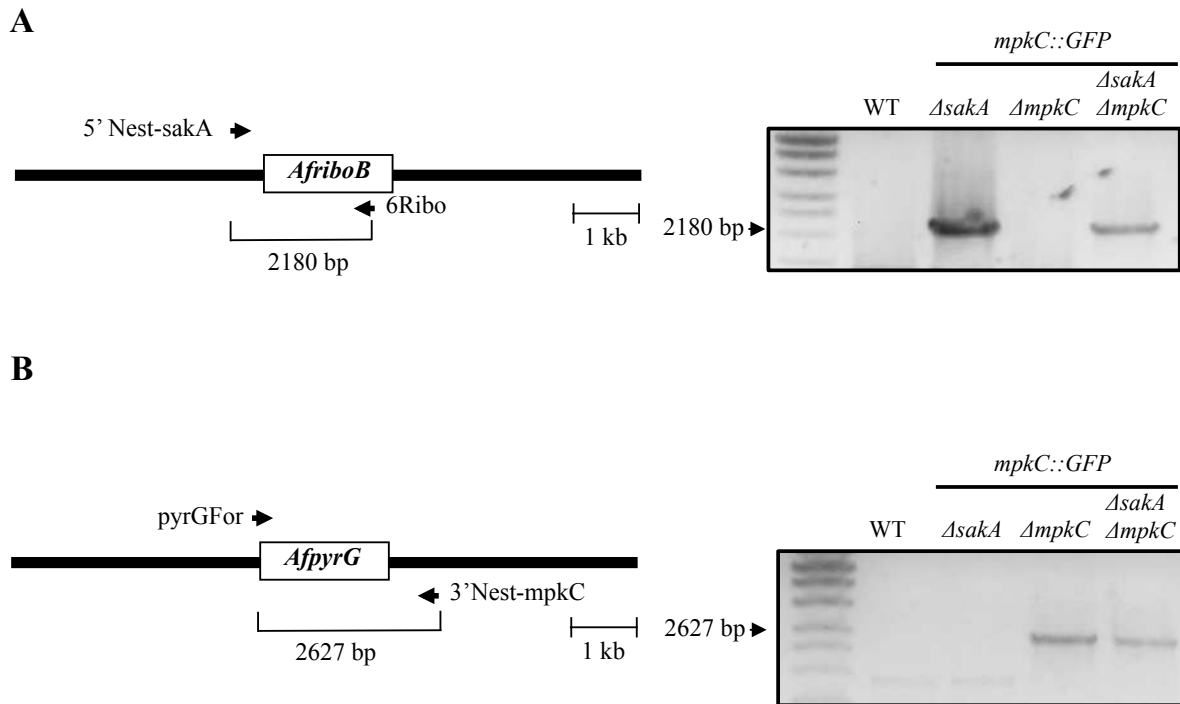


Figura S5. Confirmación por PCR de las cepas que contienen el alelo *mpkC::gfp*. Se usó DNA genómico de las cepas CVG16 ($\Delta sakA mpkC::GFP$), CVG15 ($\Delta mpkC mpkC::GFP$) y CVG17 ($\Delta sakA \Delta mpkC mpkC::GFP$) que contienen el alelo *mpkC::GFP* para amplificar productos de PCR como se indica. **(A)** La PCR para confirmar la delección del gen *sakA*. Se usaron los oligonucleótidos 5'Nest-sakA y 6Ribo, el producto que se esperaba fue de 2180 pb, solo las mutantes $\Delta sakA$ lo presentaron. **(B)** La delección del gen *mpkC* se confirmó usando los oligonucleótidos pyrGFor y 3' Nest-mpkC, el producto esperado para la mutante $\Delta mpkC$ fue de 2627 pb.

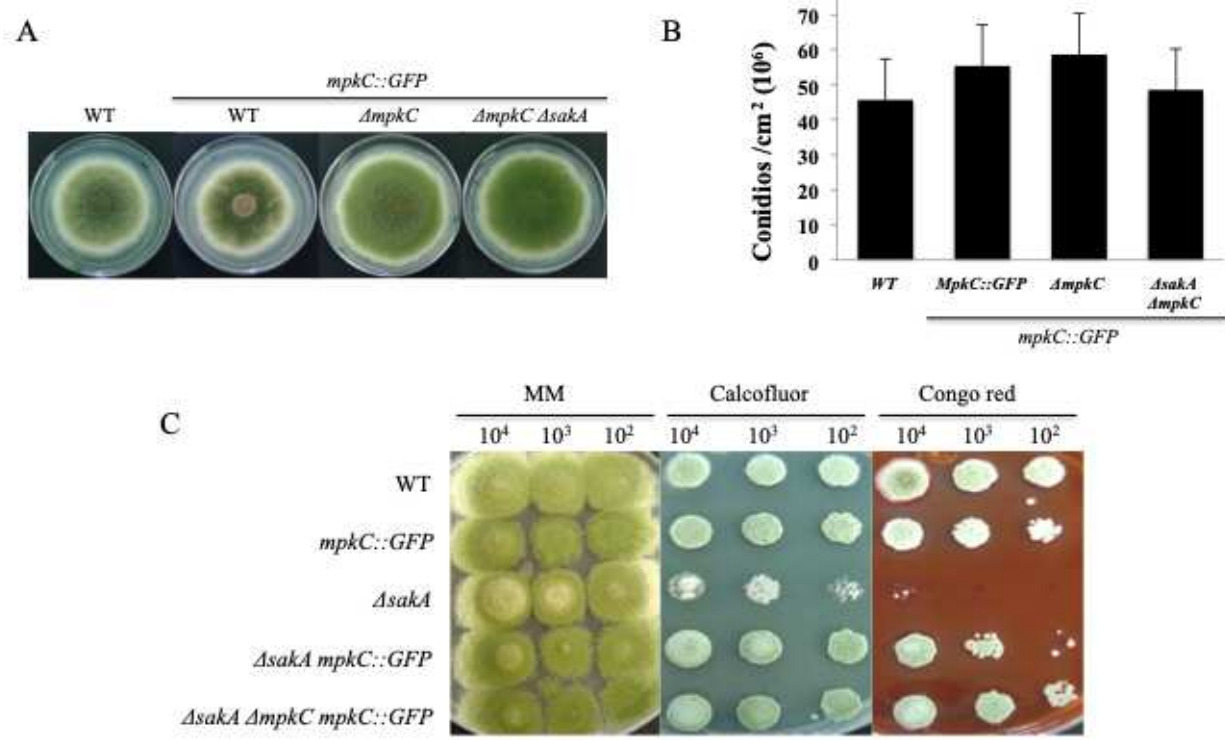


Figura S6. La fusión *mpkC::gfp* expresada constitutivamente es funcional. (A) Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas CVG13 (WT), TRJ13 (*mpkC::GFP*), CVG18 ($\Delta sakaA$), CVG15 ($\Delta mpkC mpkC::GFP$), CVG16 ($\Delta sakaA mpkC::GFP$) y CVG17 ($\Delta sakaA \Delta mpkC mpkC::GFP \Delta pbsB$) en cajas con MM y se incubaron a 37 °C por 5 días. (B) Se colectó el total de conidios por colonia, se contaron y el total se dividió entre el área de la colonia. La barra indica la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (C) Se inoculó el número de conidios indicado en la figura en medio que contenía calcoflúor (20 mg/mL) o rojo congo (30 mg/mL) y se incubaron a 37 °C por 3 días.

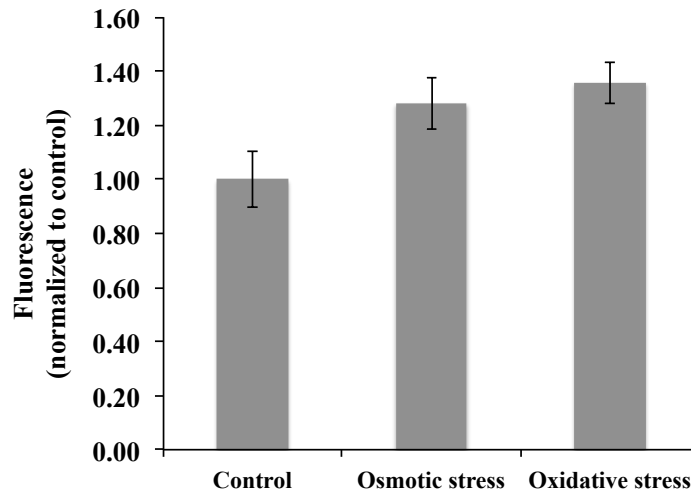
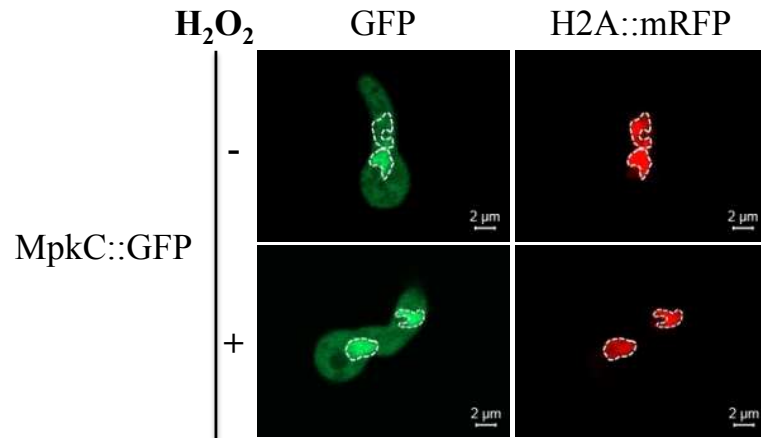


Figura S7. El estrés incrementa la fluorescencia nuclear de MpkC::GFP en las germinulas de *A. nidulans*. Para medir la fluorescencia de las imágenes de la Figura 5, se delimitó el área nuclear y se cuantificó la intensidad de fluorescencia. El promedio de la intensidad bajo condiciones de estrés se normalizó respecto a la condición control. El gráfico muestra el promedio de la intensidad de fluorescencia al analizar núcleos como sigue: en la condición control n=21, estrés osmótico n=23 y estrés oxidativo n=21. Las imágenes se procesaron con ayuda del programa Image J y ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena Germany).

Bibliografía

Bayram, Ö. *et al.* (2012) “The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism”, *PLoS Genetics*, 8(7).

Beenstock, J. *et al.* (2014) “The p38 β mitogen-Activated protein kinase possesses an intrinsic autophosphorylation activity, Generated by a short region composed of the α -G Helix and MAPK insert”, *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), pp. 23546–23556.

Brewster, J. L. *et al.* (1993) “An osmosensing signal transduction pathway in yeast”, *Science*, 259(5102), pp. 1760–1763.

Bruder Nascimento, A. C. M. de O. *et al.* (2016) “Mitogen activated protein kinases SakAHOG1 and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence”, *Molecular Microbiology*, 100(5), pp. 841–859.

Furukawa, K. *et al.* (2005) “*Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress”, *Molecular Microbiology*, 56(5), pp. 1246–1261.

Hartmuth, S. y Petersen, J. (2009) “Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress”, *Journal of Cell Science*, 122(11), pp. 1737–1746.

Hill, T. W. y Kafer, E. (2001) “Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions”, *Fungal Genetics Reports*, 48(1), pp. 20–21.

Jaimes-Arroyo, R. *et al.* (2015) “The SrkA kinase is part of the SakA Mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*”, *Eukaryotic Cell*, 14(5), pp. 495–510.

Jun, S. C. *et al.* (2011) “The MpkB MAP kinase plays a role in post-karyogamy processes as well as in hyphal anastomosis during sexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Journal of Microbiology*, 49(3), pp. 418–430.

Kawasaki, L. *et al.* (2002) “SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*”, *Molecular Microbiology*, 45(4), pp. 1153–1163.

Kejžar, A. *et al.* (2015) “HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments”, *Fungal Genetics and Biology*, 74, pp. 45–58.

Konte, T. y Plemenitas, A. (2013) “The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B”, *Extremophiles*, 17(4), pp. 623–636.

- Kumar, S. *et al.* (1995) "Deletion in Yeast **", *Biochemistry*, pp. 29043–29046.
- Lara-Rojas, F. *et al.* (2011) "Aspergillus nidulans transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions", *Molecular Microbiology*, 80(2), pp. 436–454.
- Lara-Rojas, F. (2012) El papel de las cinasas MAP SakA y MpkC y los factores transcripcionales AtfA y NapA en la diferenciación celular y en respuesta al estrés en el hongo *Aspergillus nidulans*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mims, C. W., Richardson, E. A. y Timberlake, W. E. (2005) "Mims 1988 Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus nidulans*", pp. 1–10.
- Oliver, P. T. (1972) "Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*.", *Journal of general microbiology*, 73(1), pp. 45–54.
- Reyes, G. *et al.* (2006) "Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars", *Eukaryotic Cell*, 5(11), pp. 1934–1940.
- Sánchez, O. y Aguirre, J. (1996) "Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia", *Fungal Genetics Reports*, 43(1), pp. 48–51.
- Sánchez, O., Navarro, R. E. y Aguirre, J. (1998) "Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)", *Molecular and General Genetics*, 258(1–2), pp. 89–94.
- Sandra López-Avileés, Eva Lambea, Alberto Moldón, Maribel Grande, Alba Fajardo, Miguel A. Rodríguez-Gabriel,? Elena Hidalgo, and R. A. (2008) "Activation of Srk1 by the Mitogen-activated Protein Kinase Sty1/Spc1 Precedes Its Dissociation from the Kinase and Signals Its Degradation", *Molecular biology of the cell*, 19(1), pp. 1670–1679.
- Sewall, T. C., Mims, C. W. y Timberlake, W. E. (1990) "abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*", *Plant Cell*, 2(8), pp. 731–739.
- Shiozaki, K. (2009) "Nutrition-Minded Cell Cycle", 2(96), pp. 1–4.
- Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre, J. (1995) "Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene", *Microbiology*, 141(1), pp. 21–28.
- Smith, D. A. *et al.* (2002) "The Srk1 protein kinase is a target for the Sty1 stress-activated MAPK in fission yeast", *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 33411–33421.
- Tesker, M.*et al.* (2016) "Tighter α -helix- α L16-helix interactions seem to make p38 α less prone to activation by autophosphorylation than Hog1", *Bioscience Reports*, 36(2), pp.1-18.

Capítulo 3. Las proteínas DnmA y FisA son mediadoras de la división mitocondrial y peroxisomal, y regulan la función mitocondrial, la producción de especies reactivas del oxígeno y el desarrollo en *Aspergillus nidulans*



DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission, and Regulate Mitochondrial Function, ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*

Verónica Garrido-Bazán^{1,2}, Juan Pablo Pardo³ and Jesús Aguirre^{1*}

¹ Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Jae-Hyuk Yu,
University of Wisconsin-Madison,
United States

Reviewed by:

Kap-Hoon Han,
Woosuk University, South Korea
Hee-Soo Park,
Kyungpook National University,
South Korea

*Correspondence:

Jesús Aguirre
jaguirre@ifc.unam.mx

Specialty section:

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

Received: 24 February 2020

Accepted: 07 April 2020

Published: 04 May 2020

Citation:

Garrido-Bazán V, Pardo JP and Aguirre J (2020) DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission, and Regulate Mitochondrial Function, ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 11:837. doi: 10.3389/fmicb.2020.00837

The dynamin-like protein Drp1 and its receptor Fis-1 are required for mitochondria and peroxisome fission in animal and yeast cells. Here, we show that in the fungus *Aspergillus nidulans* the lack of Drp1 and Fis-1 homologs DnmA and FisA has strong developmental defects, leading to a notable decrease in hyphal growth and asexual and sexual sporulation, with some of these defects being aggravated or partially remediated by different carbon sources. Although both DnmA and FisA, are essential for mitochondrial fission, participate in peroxisomal division and are fully required for H₂O₂-induced mitochondrial division, they also appear to play differential functions. Despite their lack of mitochondrial division, $\Delta dnmA$ and $\Delta fisA$ mutants segregate mitochondria to conidiogenic cells and produce viable conidia that inherit a single mitochondrion. During sexual differentiation, $\Delta dnmA$ and $\Delta fisA$ mutants develop fruiting bodies (cleistothecia) that differentiate excessive ascogenous tissue and a reduced number of viable ascospores. $\Delta dnmA$ and $\Delta fisA$ mutants show decreased respiration and notably high levels of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), which likely correspond to superoxide. Regardless of this, $\Delta dnmA$ mutants can respond to an external H₂O₂ challenge by re-localizing the MAP kinase-activated protein kinase (MAPKAP) SrkA from the cytoplasm to the nuclei. Our results show that ROS levels regulate mitochondrial dynamics while a lack of mitochondrial fission results in lower respiration, increased mitochondrial ROS and developmental defects, indicating that ROS, mitochondrial division and development are critically interrelated processes.

Keywords: mitochondrial dynamics, mitochondrial inheritance, mitoflash, cell differentiation, mitochondrial fission

INTRODUCTION

Our work has been oriented to demonstrate that ROS play critical signaling roles in cell differentiation (Hansberg and Aguirre, 1990; Aguirre et al., 2005; Mendoza-Martinez et al., 2017; Mendoza-Martinez et al., 2019). In one approach, we have used the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* to study the mechanisms by which cells perceive and respond to external ROS. In this and

Resumen

Drp1 y su receptor Fis-1 son proteínas que se requieren para la división mitocondrial y peroxisomal en los animales, las plantas, las levaduras y los hongos. En el presente capítulo demostramos que en *A. nidulans* la ausencia de los homólogos de Drp1 (DnmA) y Fis-1 (FisA) conlleva severos defectos durante el desarrollo. Mostramos que las mutantes sencillas $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ y la mutante doble $\Delta dnmA \Delta fisA$ disminuyen tanto su crecimiento radial como la producción de conidios asexuales y ascosporas sexuales. Algunos de estos defectos se incrementaron o disminuyeron en diferentes fuentes de carbono. Aunque las proteínas DnmA y FisA tienen funciones comunes en la división mitocondrial y peroxisomal y ambas son necesarias para la fisión mitocondrial inducida por H_2O_2 , también parecen tener algunas funciones diferenciales. A pesar de que las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ no pueden hacer fisión mitocondrial, son capaces de segregar mitocondrias a las células conidiogénicas y producir conidios viables que heredan una sola mitocondria. Durante la diferenciación sexual, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ producen cuerpos fructíferos (cleistotecios), los cuales contienen un exceso de tejido ascógeno estéril y se forman pocas ascosporas, las cuales son viables. Además, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ muestran una disminución en su respiración y un notable incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) mitocondriales, las cuales podrían corresponder al superóxido. Independientemente de esto, una mutante $\Delta dnmA$ es capaz de responder al H_2O_2 externo, relocalizando a la MAPKAP (cinasa activada por MAP cinasa) SrkA del citoplasma al núcleo. Nuestros resultados muestran que las ERO regulan la dinámica mitocondrial, mientras que la falta de fisión mitocondrial conlleva a una disminución de la respiración, un incremento en las ERO mitocondriales y a varios defectos en el desarrollo. Esto demuestra que la producción de las ERO, la división mitocondrial y el desarrollo son procesos que están íntimamente ligados entre sí.

Introducción

El trabajo de nuestro grupo de investigación se ha orientado a demostrar que las ERO juegan un papel crucial en la diferenciación celular como señales celulares (Hansberg y Aguirre, 1990; Aguirre *et al.*, 2005; Mendoza-Martínez *et al.*, 2017; Mendoza-Martínez *et al.*, 2019). En uno de nuestros enfoques, hemos utilizado al hongo *Aspergillus nidulans* para estudiar los mecanismos por los cuales las células perciben y responden a las ERO externas. En este y otros hongos, la vía de MAPK cinasas de estrés SakA-MpkC es crucial para responder a diferentes tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo (Kawasaki *et al.*, 2002; Lara-Rojas *et al.*, 2011; Garrido-Bazán *et al.*, 2018). Durante el curso de este trabajo, encontramos que la MAPKAP cinasa SrkA es parte de dicha vía y que, en respuesta a las ERO externas, se transloca del citoplasma al núcleo o la mitocondria, dependiendo de la presencia de la MAPK SakA. Adicionalmente, en estas condiciones la mitocondria se fragmenta, de manera consistente con una división mitocondrial inducida por el H₂O₂ (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015).

Debido a que las mitocondrias se replican a partir de mitocondrias preexistentes, la división mitocondrial es un proceso altamente regulado, que es clave para muchos procesos celulares, tales como la división celular, la autofagia y la mitofagia (Horbay y Bilyy 2016; Burman *et al.*, 2017). Este último es fundamental para mantener la calidad mitocondrial, pues a través de este proceso se eliminan componentes mitocondriales dañados, incluyendo el mDNA. La importancia de la fisión mitocondrial se refleja en que su falta conlleva a la letalidad embrionaria en ratón (Wakabayashi *et al.*, 2009) y a que varias patologías en humanos están relacionadas con defectos en la dinámica mitocondrial (Poole *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2018).

Una de las proteínas esenciales para la división mitocondrial es la proteína relacionada con las dinaminas Dnm1, conocida como Drp1 en las células de los animales. Esta proteína es una GTPasa que se ensambla alrededor de la mitocondria y es importante para llevar a cabo la fisión (Bleazard *et al.*, 1999). En las levaduras y otros hongos, Dnm1 es reclutada a la mitocondria por su proteína adaptadora Fis1 y las proteínas adaptadoras Mdv1 y Caf4 (Tieu y Nunnari 2000; Tieu *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005) y las mismas proteínas se requieren para la fisión peroxisomal, incluyendo a Dnm1 (Motley

et al., 2008). Además, las mitocondrias y los peroxisomas también comparten funciones como la beta-oxidación de los ácidos grasos y ambos organelos son fuentes de ERO (Wanders *et al.*, 2016).

El hongo *A. nidulans* es un excelente modelo para estudiar procesos de biología celular durante el crecimiento y la diferenciación celular, ya que cuenta con dos ciclos, el asexual y el sexual. El desarrollo asexual (la conidiación) se conoce mejor e implica la formación de estructuras complejas denominadas conidióforos. Un conidióforo se desarrolla a partir de una hifa que se diferencia en una célula pie delimitada por dos septos, de la cual surge una célula tallo. Después de un crecimiento determinado hacia la fase aérea, la parte apical de la célula tallo comienza a hincharse y forma una vesícula multinucleada a partir de la cual se generan múltiples gemaciones uninucleadas, llamadas métulas. Posteriormente, cada métula dará origen a dos nuevas células conidiogénicas unicelulares llamadas fiálides. Finalmente, cada fiálide sufre repetidas divisiones para formar conidios uninucleados, los cuales constituyen la forma más importante de dispersión de este hongo (Adams *et al.*, 1998). El desarrollo sexual involucra la diferenciación de un tejido ascógeno que da origen a las ascas y ascosporas, las cuales están rodeadas por un tejido de hifas estériles llamado peridio, el cual termina formando la pared melanizada del cleistotecio. A su vez, el cleistotecio estará rodeado por células de aspecto globoso, llamadas células Hülle (Sohn y Yoon, 2002).

En este capítulo decidimos estudiar la función de las proteínas homólogas de Drp1 (DnmA) y Fis1 (FisA) en *A. nidulans*, como un enfoque para entender la división mitocondrial inducida por el H₂O₂ y el papel de la dinámica mitocondrial en la respuesta al estrés y el desarrollo en este hongo.

Objetivo general

- Determinar el papel de las proteínas homólogas de Drp1 (DnmA) y Fis1 (FisA) durante el desarrollo de *A. nidulans* y el papel de las ERO en la fisión mitocondrial.

Objetivos específicos

- Determinar el papel de las proteínas homólogas de Drp1 (DnmA) y Fis1 (FisA) durante el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans*.
- Determinar el papel de las ERO (H_2O_2) en la dinámica mitocondrial durante el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans*.
- Conocer el papel de las proteínas DnmA y FisA en la fisión peroxisomal de *A. nidulans*.
- Determinar si la falta de fisión mitocondrial afecta la función mitocondrial y/o el estado redox mitocondrial.

Resultados

Las proteínas DnmA y FisA regulan el crecimiento y el desarrollo en *A. nidulans*

Para determinar la función de las proteínas Drp1 y Fis1, usamos a las proteínas Dnm1 (Drp1) y Fis-1 (Fis1) para realizar un BLAST contra la base de datos AspGD (Cerqueira *et al.*, 2014). Identificamos a la proteína AN8874 (con 749 aminoácidos) como el homólogo (56 % de identidad) de Dnm1 y la denominamos DnmA. La proteína AN6225 (153 aminoácidos) como el homólogo (40% de identidad) de Fis1 y la denominamos FisA. Después, se generaron construcciones para la delección de ambos genes. Para esto se utilizó la técnica de *double joint* PCR. Se hicieron dos construcciones que contenían al gen *AfpyrG* como marcador de selección. Se transformó la cepa A1155 con ambas construcciones y se obtuvieron 8 y 4 transformantes para *dnmA* y *fisA*, respectivamente. Cada cepa se comprobó por PCR (**Figura S1 y Figura S2**) y se les denominaron TVG1 ($\Delta dnmA$) y TVG2 ($\Delta fisA$). La cepa TVG1 se cruzó con la cepa CVG2 (*pabaA1 yA2 $\Delta fisA::AfpyrG$ gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a*) y se obtuvo una cepa doble mutante, CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) la cual también se comprobó por PCR (**Figura S3**). En ésta y en otras cruza sexuales, los fenotipos de $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ co-segregaron siempre con el marcador *AfpyrG*. Adicionalmente, realizamos la complementación de los genes con los plásmidos que contenían los genes WT respectivamente. Se hicieron los experimentos que demostraron que los fenotipos de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ fueron restaurados con la complementación (**Figura S4**).

Como se muestra en la **Figura 1**, las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ presentaron fenotipos similares cuando se crecieron en medio con glucosa como fuente de carbono, incluyendo una drástica reducción en el crecimiento radial y la conidiación. La disminución en la conidiación se debió a la baja producción de conidióforos (**Figura 1A** pánel inferior). Se observó que los conidióforos de las cepas mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ fueron capaces de diferenciar todas las estructuras que contiene un conidióforo: vesículas, métulas, fiálides. Sin embargo, las fiálides forman menos conidios, en comparación con las de una cepa WT (**Figura 1**).

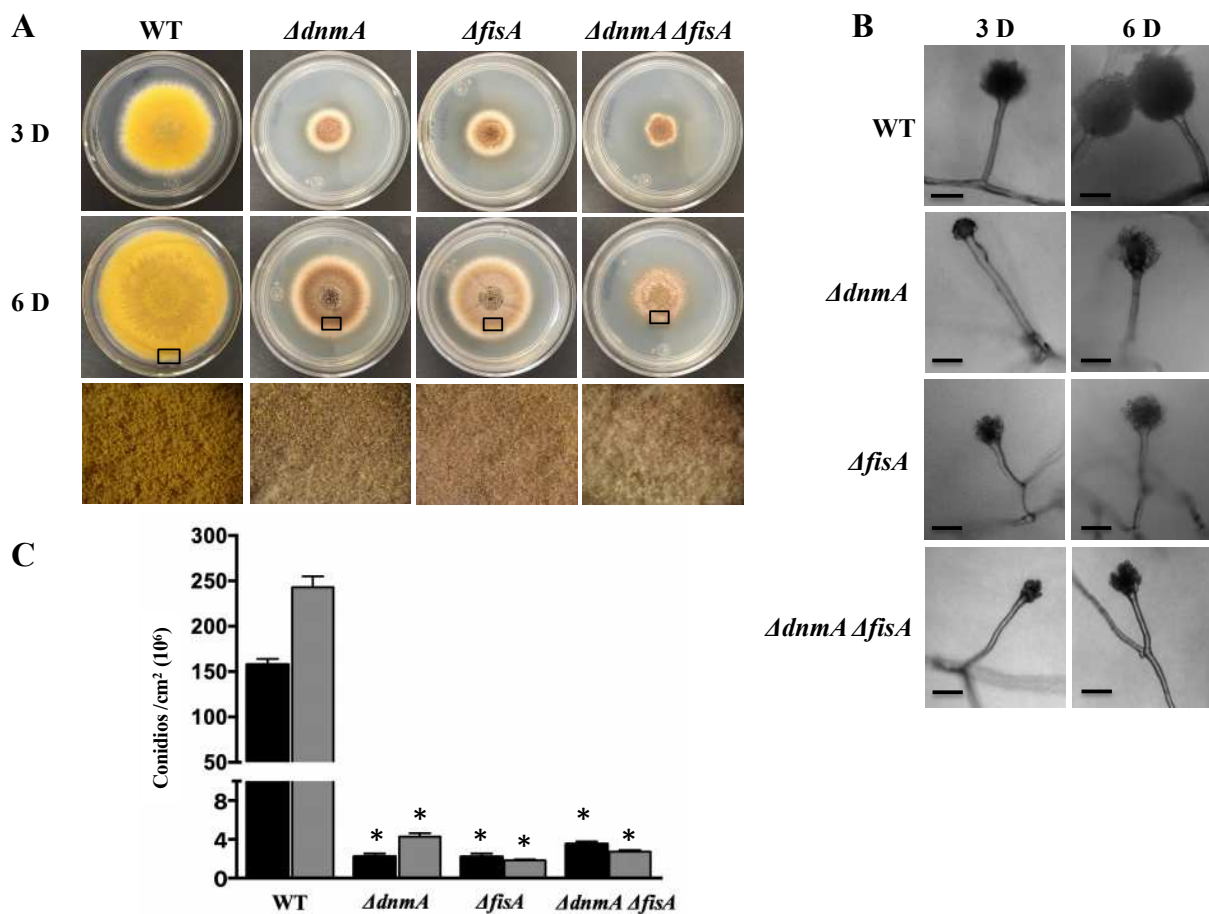


Figura 1. Los genes *dnmA* y *fisA* se requieren para el crecimiento y el desarrollo asexual en *A. nidulans*. **A)** Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$) y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) en cajas con medio mínimo (MM) más el suplemento requerido, se incubaron a 37 °C durante 3 (3D) o 6 (6D) días (pánel superior e inferior, respectivamente). El pánel inferior muestra los bordes de una colonia de 6 días. **B)** Se colectaron y se contaron los conidios por cada colonia, el total se dividió entre el área de la colonia y se obtuvo el número de conidios por centímetro cuadrado. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA de un factor y se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($*p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la cepa WT. **C)** Conidióforos de colonias de 3 y 6 días, observados en el microscopio estereoscópico. La barra corresponde a 20 μm .

Dado que la carencia de las proteínas DnmA y FisA afectó el crecimiento, decidimos evaluar si las mutantes mostraban defectos en la pared celular. Para esto se crecieron las cepas mutantes en medio con calcoflúor o rojo congo, como agentes desestabilizadores de la pared celular. En la **Figura S5** se muestra que las cepas WT, $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ fueron igualmente sensibles al calcoflúor, a la concentración probada (30 mg/mL). Por el contrario, en rojo congo (50 $\mu\text{g/mL}$) se observó

que las mutantes fueron más sensibles que la cepa silvestre, sugiriendo que estas mutantes tienen defectos en la pared celular.

Al analizar el ciclo sexual de las cepas $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ se observó que las tres presentaron un gran número de células Hülle, sugiriendo un inicio prematuro del ciclo sexual (Troppens *et al.*, 2020) (**Figura 1A, panel inferior de la Figura S6**). Cuando se aislaron las estructuras sexuales denominadas cleistotecios, se observó que las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ producen cleistotecios con aspecto normal. Sin embargo, cuando éstos se reventaron para liberar las ascosporas, se observó un número reducido de ellas respecto a la cepa WT. Se colocó todo lo que contenía un cleistotecio cajas con MM, esto para cada una de las cepas. Después de haberlas incubado a 37 °C por cuatro días, observamos que crecieron pocas colonias de tamaño reducido. Notablemente, también se observó que los cleistotecios de las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ presentaron una gran cantidad de tejido ascógeno estéril (**Figura 2 y Figura S6**).

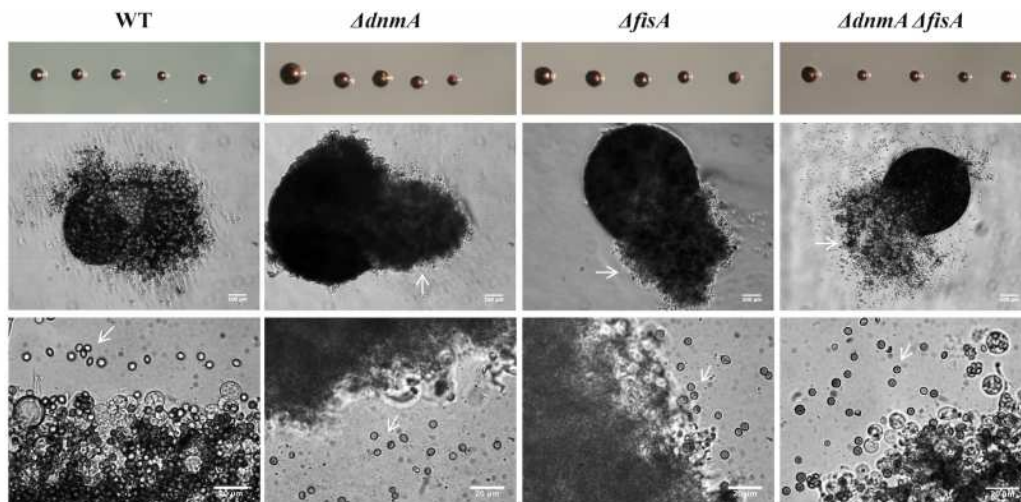


Figura 2. La falta de los genes *dnmA* o *fisA* causa severos defectos en el desarrollo sexual. Se indujo el ciclo sexual de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$) y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) de acuerdo con las condiciones previamente reportadas (Kawasaki *et al.*, 2002). Se aislaron cleistotecios de cultivos de 8 días de desarrollo y se observaron en el microscopio estereoscópico. En la figura se muestran cleistotecios intactos (pánel superior) o reventados (páneles medio e inferior). Las flechas indican tejido ascógeno (pánel medio) o ascosporas (pánel inferior).

El hecho de que las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ muestren fenotipos tan similares sugiere que en *A. nidulans* la dinamina DnmA-like y su posible receptor FisA funcionan en la misma vía y que ambas proteínas se requieren para el crecimiento y el desarrollo tanto asexual como sexual.

Las proteínas DnmA y FisA son esenciales para la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂

Para determinar el papel de las proteínas DnmA y FisA durante la fisión mitocondrial, se generó la cepa TRV1 la cual contiene la proteína fluorescente mCherry fusionada a una etiqueta que la dirige a las mitocondrias. En esta cepa se introdujo el plásmido pFS03, el cual contiene los primeros 79 aa de la subunidad ATP9-7 de la ATPasa mitocondrial del hongo *Podospora anserina* fusionados a la proteína mCherry y bajo el promotor del gen *gapdh* de *P. anserina* (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). La cepa TRV1 se cruzó con las cepas mutantes TVG1 ($\Delta dnmA$) y TVG2 ($\Delta fisA$). Así se obtuvieron las cepas CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) con las mitocondrias marcadas. La doble mutante CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) se generó cruzando las cepas TVG1 con CVG2. Toda la progenie se analizó por PCR para comprobar la presencia de las deleciones *dnmA* y/o *fisA* (**Figura S3**).

Trabajo previo del laboratorio (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015) y los antecedentes experimentales mencionados anteriormente, mostraron que el H₂O₂ induce la fragmentación mitocondrial en *A. nidulans*. Quisimos saber si las proteínas DnmA y FisA, que son parte de la maquinaria de la fisión mitocondrial, son necesarias para este proceso en respuesta al estrés oxidativo. Para esto, primero probamos distintas concentraciones de H₂O₂ y seleccionamos aquella que no fuera letal pero sí capaz de inducir fisión mitocondrial en un periodo de 5-20 min (datos no mostrados). Para comprobar dicha concentración seleccionada, se creció la cepa TRV1 en medio mínimo a 37 °C durante 14 h y posteriormente se le adicionó 5 mM de H₂O₂ o H₂O (control), se incubó durante 5, 10, 15 o 20 minutos, se retiró el H₂O₂ y se lavó dos veces con H₂O estéril y se incubó nuevamente a 37 °C por 24 h. Después de este tiempo se observó que ni la concentración probada ni los tiempos de incubación, resultaron letales para *A.*

nidulans, pues todas las colonias continuaron con su crecimiento normal (**Figura S7**), al igual que las colonias tratadas con agua. Con ayuda del microscopio confocal se observaron las mitocondrias en estas condiciones y se notó una fragmentación mitocondrial a los 5 minutos de incubación con 5 mM de H₂O₂, la cual fue más evidente después de 20 minutos de incubación (**Figura S8**).

Posteriormente, utilizamos estas condiciones experimentales para estudiar la morfología mitocondrial de las cepas WT y mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$. En la **figura 3** se muestra que en ausencia de H₂O₂ las hifas en crecimiento de una cepa silvestre contienen mitocondrias filamentosas y algunas fragmentadas. En cambio, en ausencia de las proteínas DnmA o FisA las mitocondrias forman largos filamentos y no se observaron mitocondrias fragmentadas. Cuando la cepa WT se trató con 5 mM de H₂O₂ durante 20 minutos, se produjo una extensa fragmentación mitocondrial. En contraste, el mismo tratamiento en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ no produjo ningún cambio en la morfología filamentosas de las mitocondrias (**Figura 3**). Estos resultados muestran claramente que las proteínas DnmA y FisA son componentes esenciales de la fisión mitocondrial y que se requieren para la división inducida por el H₂O₂.

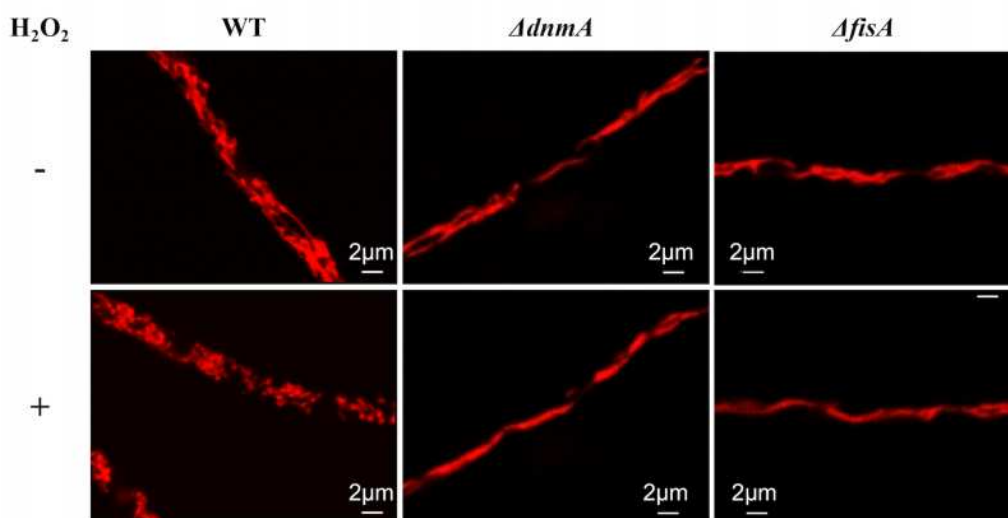


Figura 3. Los genes *dnmA* y *fisA* son esenciales para la fisión mitocondrial inducida por el H₂O₂. Se creció micelio de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) por 14 horas en MM más el suplemento requerido (pánel superior) y se trató con 5 mM de H₂O₂ por 20 minutos (pánel inferior). Posteriormente se lavó dos veces con agua estéril y se observó en el microscopio confocal.

Los conidios de las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ heredan mitocondrias

La fisión mitocondrial es muy importante durante la división celular, pues este mecanismo asegura una buena distribución de las mitocondrias a las nuevas células. En *A. nidulans* se llevan a cabo numerosas divisiones mitóticas durante la formación de los conidios, proceso en el cual la división y repartición mitocondrial deben ser importantes para la formación de los nuevos conidios. Por ello, decidimos determinar si los conidios generados por las mutantes incapaces de llevar a cabo la división mitocondrial podían heredar mitocondrias. Primero observamos que los conidios de una cepa WT contenían múltiples mitocondrias pequeñas (fisionadas). Por el contrario, observamos que todos los conidios de las cepas mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ contenían mitocondrias alargada (**Figura 4A**). Para entender cómo se llega a este estado terminal, observamos la morfología mitocondrial en los conidióforos, las estructuras que producen los conidios. En una cepa WT, las mitocondrias sufren una extensa división mitocondrial a nivel de la vesícula y posteriormente son segregadas a las métulas, fiálides y finalmente a los conidios. En contraste, las vesículas de los conidióforos de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ muestran una red de mitocondrias que se ramifica, formando filamentos que se extienden hacia las nacientes fiálides y métulas, antes de que éstas se separen mediante un septo. Finalmente, las fiálides segregan un filamento mitocondrial hacia los conidios en desarrollo y éstos, después de ser separadas por un septo, terminarán heredando un solo fragmento mitocondrial (**Figura 4B, flechas blancas**).

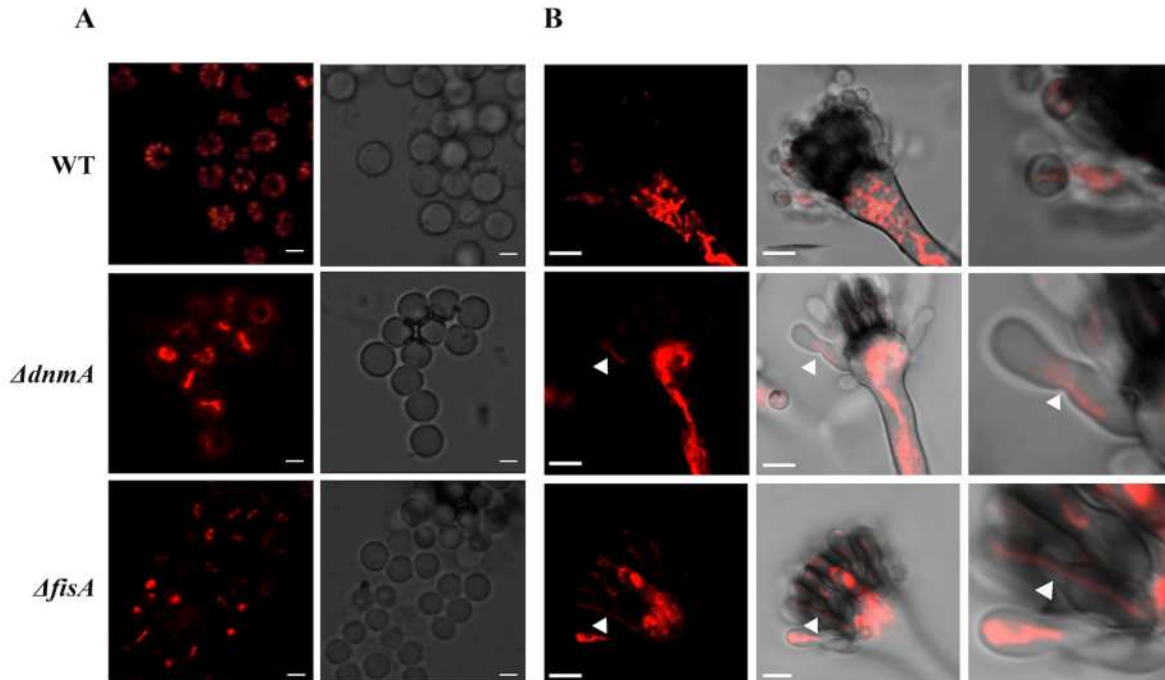


Figura 4. Todos los conidios de las mutantes que no hacen fisión mitocondrial heredaron mitocondrias. A) Conidios intactos de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) se colocaron en cuadros de agar y se observaron en el microscopio confocal. **B)** Se crecieron las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) durante 3 días en medio mínimo suplementado y se incubaron a 37 °C. Posteriormente se cortaron cuadros de agar que tenían parte de la colonia, se les adicionó una gota de H₂O estéril y se colocó en un cubreobjetos para inmediatamente después ser observados en el microscopio confocal.

Estos resultados mostraron que la fisión mitocondrial es importante para el desarrollo de los conidióforos y que en ausencia de las proteínas DnmA o FisA, las mitocondrias pueden ramificarse y distribuirse a las diferentes estructuras del conidióforo. Además, sugieren que sólo los conidios nacientes que heredan un fragmento mitocondrial pueden completar el proceso de desarrollo y que durante la conidiación, las mitocondrias sufren un proceso de división independiente de DnmA y FisA. Esta división parece ocurrir mediante un proceso mecánico, mediado por la división celular y la septación.

Las proteínas DnmA y FisA también participan en la fisión peroxisomal

La fisión de las mitocondrias y los peroxisomas en levaduras (Motley *et al.*, 2008) y en células animales (Koch *et al.*, 2003) requiere de las proteínas Dnm1 y Fis1. Para averiguar si esto también ocurre en *A. nidulans*, decidimos evaluar la morfología de los peroxisomas en la cepa WT y en los fondos mutantes. Para esto, se generaron cepas

ΔdnmA y *ΔfisA* que contenían peroxisomas marcados con una proteína mCherry fusionada a una secuencia PTS1 de localización peroxisomal (Tan *et al.*, 2014).

Para examinar el papel de las proteínas DnmA y FisA en la fisión peroxisomal, se crecieron las cepas WT y mutantes en medio con glucosa u oleato como única fuente de carbono. Previamente se había reportado que el oleato induce la proliferación peroxisomal (Valenciano *et al.*, 1998). Inesperadamente, observamos que en el oleato las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA* mostraron una mejor conidiación respecto a la glucosa. En efecto, en glucosa la conidiación de las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA* representó solo el 2% de la WT, mientras que en oleato este valor se incrementó a 33 y 34% para las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA*, respectivamente (**Figura 5**).

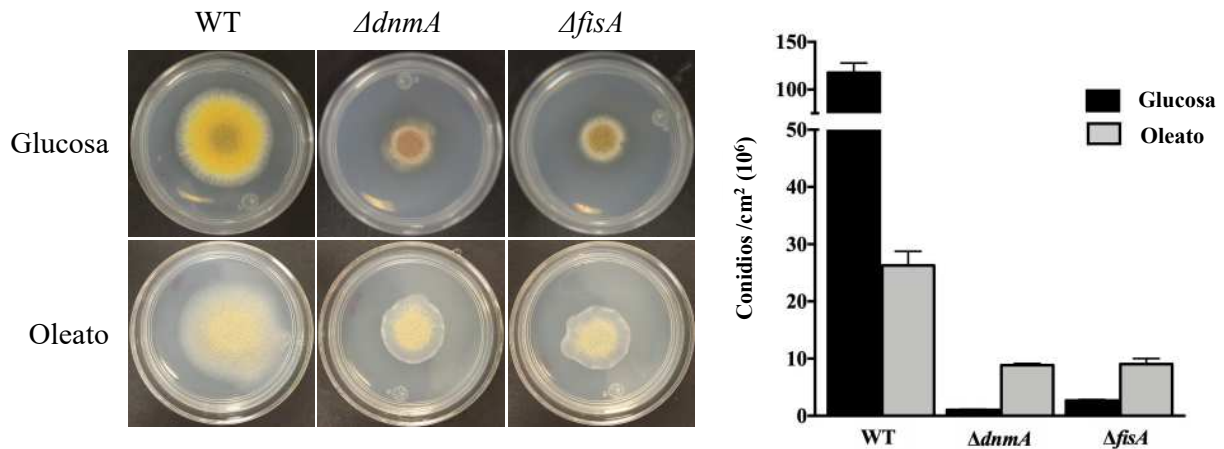


Figura 5. El crecimiento y esporulación asexual de las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA* es mejor en medio con oleato como fuente de carbono. Se inocularon conidios de las cepas RPA (WT), CVG30 (*ΔdnmA*) y CVG31 (*ΔfisA*) en MM suplementado que contenía glucosa u oleato como única fuente de carbono y se incubaron a 37 °C por 3 días (fotografías, lado izquierdo). Se colectaron los conidios y se contaron, el total se dividió entre el área de la colonia y se determinó el número de conidios por centímetro cuadrado (gráfica, lado derecho). Las barras representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA de un factor y se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey (**p* < 0.05). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la cepa WT.

En oleato, el número y tamaño de los peroxisomas se incrementó tanto en la cepa WT como en las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA* con respecto a glucosa. Por el contrario, en oleato se observó un cambio notable en la morfología peroxisomal de las mutantes. Es decir, en estas condiciones, muchos de los peroxisomas de las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA*

mostraron una morfología filamentososa (**Figura 6A-B**), por lo que decidimos clasificar la morfología peroxisomal en glucosa y oleato. En glucosa la cepa WT presentó un alto número de peroxisomas esféricos con un diámetro aproximado de 0.3-1 μm . En oleato, además de los peroxisomas esféricos (0.3-1 μm) se observaron peroxisomas medianamente alargados (1-3 μm). En glucosa, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ mostraron peroxisomas esféricos, mientras que en oleato se detectó una mayor cantidad de peroxisomas medianamente alargados y otros notablemente más alargados ($>3 \mu\text{m}$) (**Figura 6**). Es importante hacer notar que en el oleato no se afectan ni la morfología ni la abundancia mitocondrial que ya se había observado en glucosa en ninguna de las dos mutantes (Datos no mostrados). Estos resultados indican que las proteínas DnmA y FisA también participan en la fisión peroxisomal en *A. nidulans*.

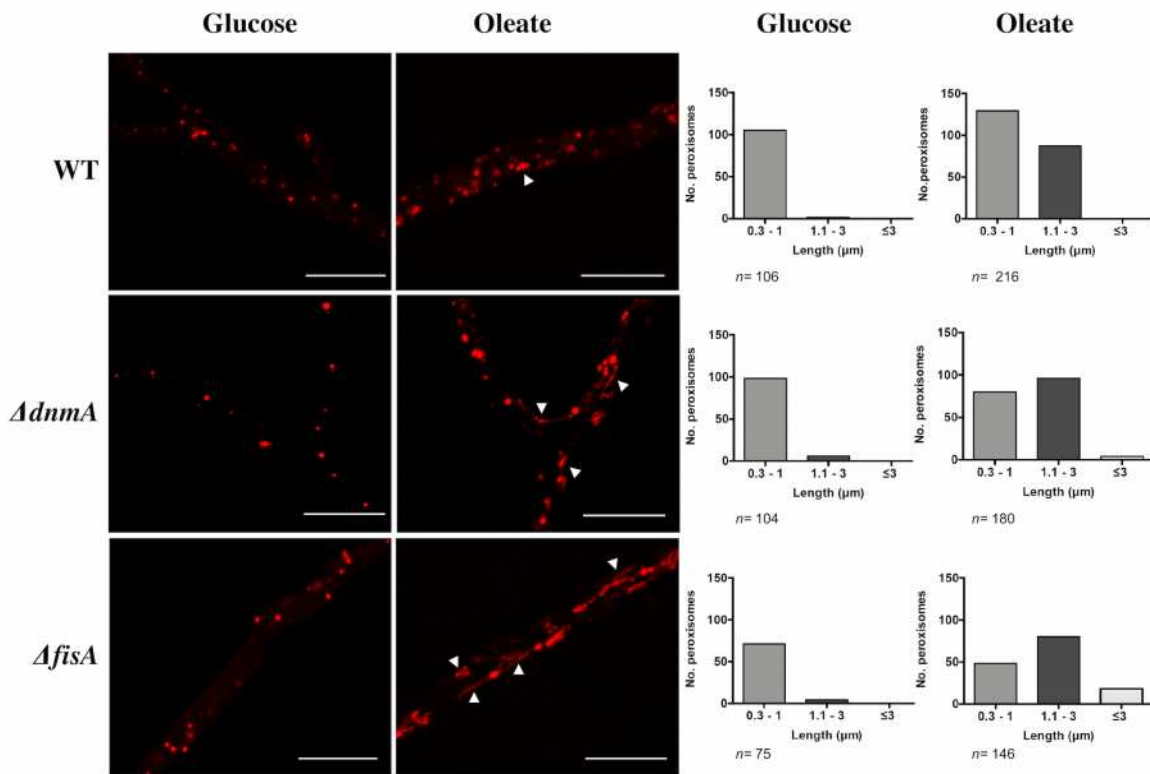


Figura 6. Las proteínas DnmA y FisA regulan la fisión peroxisomal. Se crecieron las cepas RPA (WT), CVG30 ($\Delta dnmA$) y CVG31 ($\Delta fisA$) en MM suplementado con glucosa u oleato como únicas fuentes de carbono durante 48 h a 37 °C. Posteriormente, un cuadro de agar que contenía micelio se observó en el microscopio confocal (fotografías, lado izquierdo). Se cuantificó y clasificó el número de peroxisomas en tres categorías de acuerdo con su tamaño como sigue:

cortos (0.3-1.0 μm), medianos (1.1-3.0 μm) y largos ($> 3 \mu\text{m}$). La barra de las fotografías = 10 μm .

El crecimiento y la conidiación de las mutantes ΔdnmA y ΔfisA están menos afectados en etanol, arabinosa y glicerol

Después de observar que las mutantes ΔdnmA y ΔfisA mejoraron su conidiación en oleato con respecto a la glucosa, decidimos explorar el efecto de otras fuentes de carbono. Las mutantes no presentaron cambios fenotípicos en medio con fructosa o galactosa como únicas fuentes de carbono (**Figura S9**). Sin embargo, sí se observaron cambios en etanol, arabinosa, glicerol y acetato. En acetato, la mutante ΔdnmA disminuyó aún más su conidiación. En contraste, la conidiación aumentó en etanol, arabinosa y notablemente en glicerol, en donde la conidiación alcanzó el 52% de la observada en la cepa silvestre. Estos mismos cambios no se observaron en la mutante ΔfisA en arabinosa y glicerol (**Figura 7**), indicando que aunque DnmA y FisA tienen funciones comunes en la fisión mitocondrial y peroxisomal, podrían también tener funciones separadas en la fisiología del hongo. Nuevamente, la fisión mitocondrial no se restauró en estas fuentes de carbono (datos no mostrados).

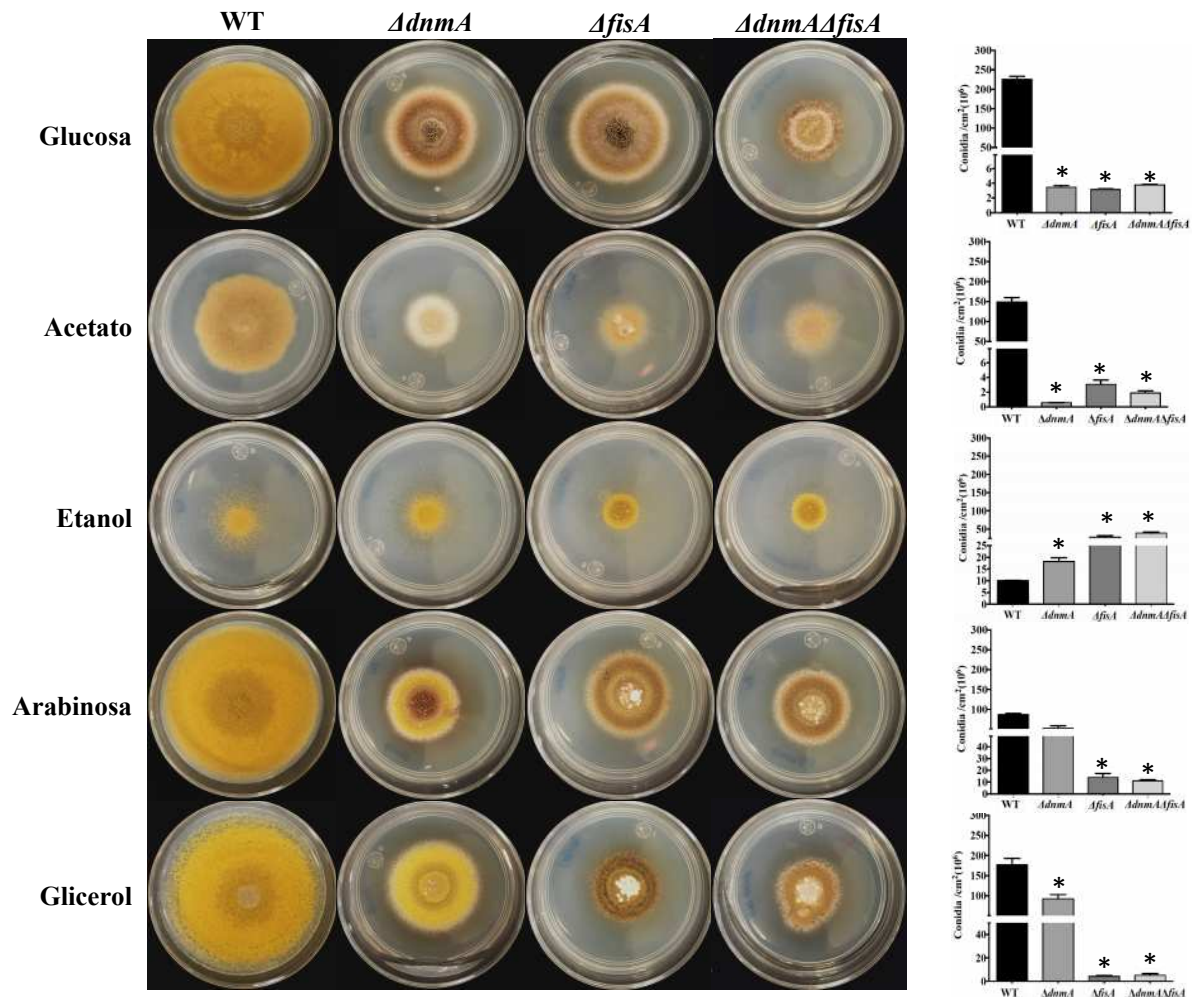


Figura 7. La esporulación de las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ mejora en etanol, arabinosa y glicerol como fuentes de carbono. Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$) y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) en MM con 1% de glucosa, acetato, etanol, arabinosa o glicerol. Se incubaron a 37 °C durante 6 días y posteriormente se colectaron las esporas, se contaron y se dividieron entre el área de la colonia para obtener el número de conidios por centímetro cuadrado. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA de un factor y se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($*p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la cepa WT.

La falta de las proteínas DnmA y FisA tiene efectos en la respiración y en la producción de ERO mitocondriales

Para explorar si la falta de las proteínas DnmA y FisA tienen repercusión en la función mitocondrial, se exploraron la respiración celular y el contenido de ERO en las mitocondrias. Se comparó la respiración *in vivo* de las cepas WT y las mutantes $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$. Sin embargo, debido a que el micelio de *A. nidulans* es altamente

heterogéneo en cuanto a estado de crecimiento (puntas en crecimiento vs regiones vacuoladas) y composición de las hifas (por ejemplo, durante la formación de micelio hay regiones con distinto número de vacuolas, núcleos o mitocondrias), decidimos utilizar conidios, siendo éstos unicelulares y uninucleados. Para medir la respiración, los conidios de las distintas cepas se germinaron en medio líquido durante 4 h a 37 °C con agitación (300 rpm). Posteriormente se hicieron las mediciones utilizando un instrumento Oroboros. Como se muestra en la **Figura 8**, las mutantes mostraron una ligera reducción en la respiración rutinaria (de aproximadamente el 20%, respecto a la WT), lo cual fue consistente con la reducción observada para la respiración máxima. Estos datos indican que la falta de fisión mitocondrial provoca una disminución de la respiración, moderada, pero reproducible.

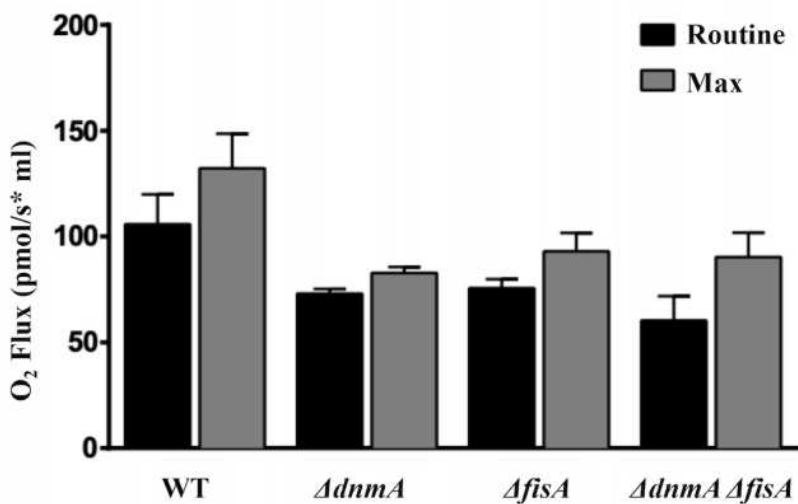


Figura 8. La falta de fisión mitocondrial provoca una disminución moderada de la respiración. Se midió el consumo de oxígeno utilizando conidios de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$) y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$). Los conidios se germinaron previamente por 4 h a 37°C. Las mediciones del consumo de oxígeno se hicieron con el instrumento Oroboros, el cual se calibró a 30 °C. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para explorar si la ausencia de fisión mitocondrial podría resultar en el incremento de la producción de ERO mitocondriales, se usó el compuesto MitoSOX como un detector de superóxido y otras ERO mitocondriales (Robinson *et al.*, 2006). Aunque el MitoSOX ha sido ampliamente utilizado para medir el superóxido mitocondrial, recientemente se ha cuestionado su especificidad. Sin embargo, se sigue considerando como una prueba ideal para detectar oxidantes mitocondriales (Zielonka y Kalyanaraman, 2010). Como se

observa en la **Figura 9** las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ mostraron una rápida y notable tinción con MitoSOX. En las mismas condiciones, las mitocondrias de la cepa WT no mostraron ninguna tinción. Sin embargo, las mitocondrias de una cepa WT sí se tiñeron con MitoSOX cuando ésta se creció en medio con etanol como fuente de carbono, condición en la que se induce un estrés oxidativo en *A. nidulans* (Mendoza *et al.*, 2017).

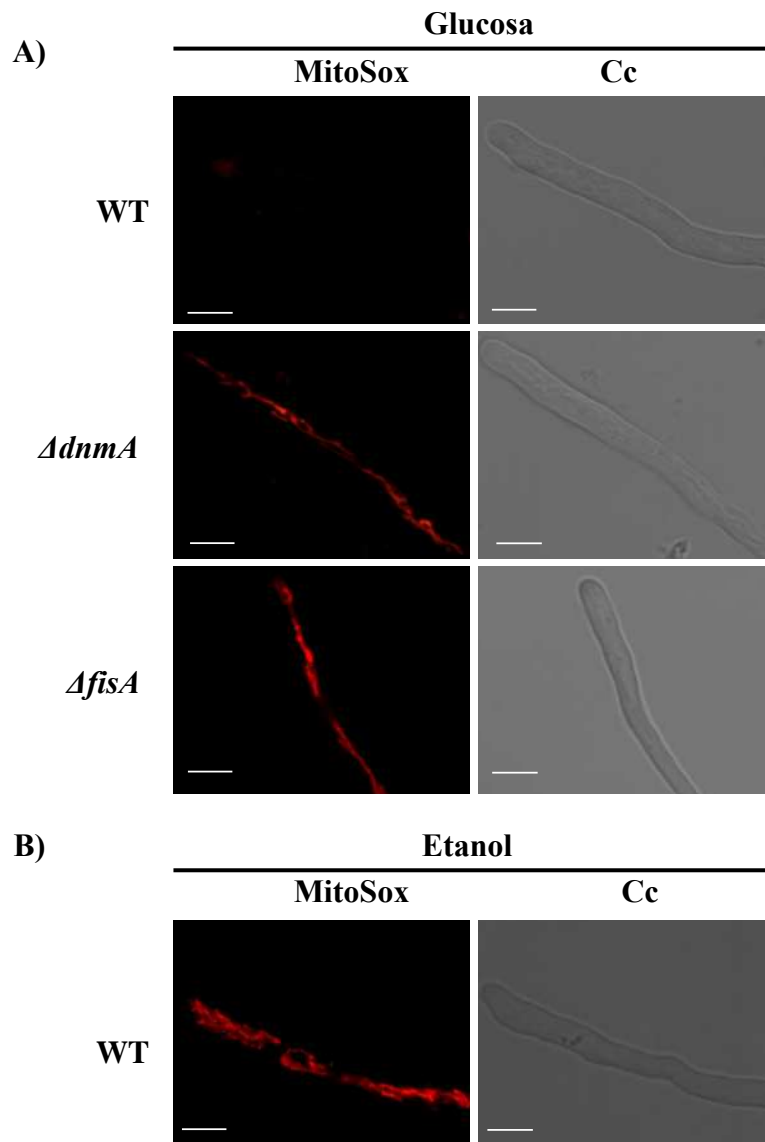


Figura 9. En ausencia de fisión mitocondrial aumentan los ERO mitocondriales. A) Se creció micelio de las cepas A1155 (WT), TVG1 ($\Delta dnmA$) y TVG2 ($\Delta fisA$) en MM suplementado durante 14 horas a 37°C. Posteriormente se detectaron las ERO con ayuda del compuesto MitoSOX (Ver materiales y métodos) y se observaron en el microscopio confocal. **B)** Se creció micelio de la cepa A1155 (WT) por 14 h en MM con etanol al 1% como fuente de carbono y

posteriormente se trató con MitoSOX, y se observó en el microscopio confocal. Campo claro (Cc), barra blanca = 5 μ m.

Para determinar el tipo de ERO detectadas en las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, decidimos hacer un pretratamiento con Mito TEMPO, un compuesto que reduce el superóxido mitocondrial (Dikalova *et al.*, 2010), antes de teñirlas con MitoSOX. Como se muestra en la **Figura 10**, el pretratamiento con Mito TEMPO provocó que las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ no se tiñeran con MitoSOX, pero sí con Mitotracker, cuya fluorescencia no depende del superóxido mitocondrial.

Posteriormente quisimos explorar si el incremento en las ERO mitocondriales observado en las mutantes provocaría una mayor sensibilidad al estrés oxidativo. Como se muestra en la **Figura S10**, las cepas WT, $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ presentaron una sensibilidad muy similar al H₂O₂. Por el contrario, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ resultaron más sensibles que la cepa WT a la menadiona, un compuesto que induce la producción de superóxido a nivel mitocondrial. Estos resultados apoyan un modelo en el cual la falta de fisión mitocondrial conlleva a un incremento de la producción del superóxido mitocondrial.

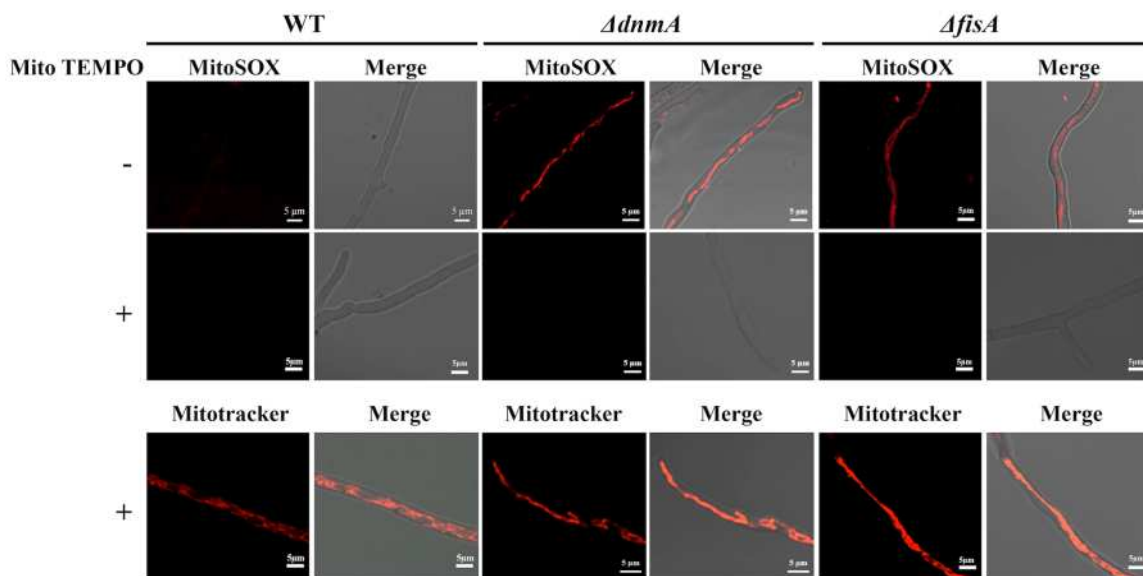


Figura 10. El pretratamiento de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ con Mito TEMPO previene la tinción de las mitocondrias con MitoSOX pero no con Mitotracker. Se creció micelio de las cepas A1155 (WT), TVG1 ($\Delta dnmA$) y TVG2 ($\Delta fisA$) en MM con glucosa como fuente de carbono y se incubó a 37 °C por 14 h. Posteriormente se incubó con Mito TEMPO por 2 horas a 37 °C y finalmente se tiñó con MitoSOX o Mitotracker como se indica en materiales y métodos, y se observaron en el microscopio confocal.

La cinética de la señal del MitoSOX mitocondrial en la mutante $\Delta dnmA$ muestra cambios notables en el patrón de intensidad y dinámica de la señal de fluorescencia mitocondrial, los cuales ocurren de manera transitoria y aleatoria en el tiempo (**Figura 11**). Este fenómeno también se observó en las mutantes $\Delta fisA$ (datos no mostrados). Cambios semejantes en la producción de superóxido mitocondrial se han reportado en células animales y se les ha denominado Mitoflashes (Feng *et al.*, 2019).

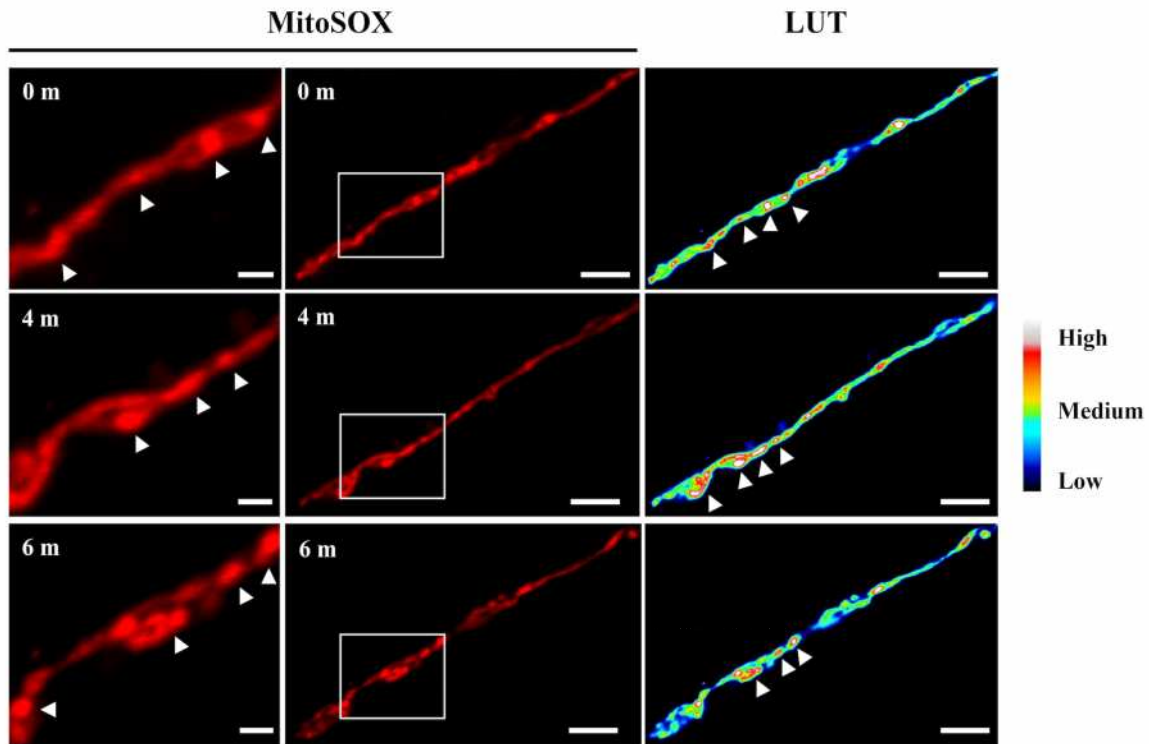


Figura 11. Detección diferencial de ERO a lo largo de una mitocondria de una mutante $\Delta dnmA$. Se creció la cepa TVG1 ($\Delta dnmA$) en MM suplementado y se incubó a 37 °C durante 14 h. Posteriormente se cortó un cuadro de agar y se incubó con MitoSOX (5 μ M) por 20 minutos a 37 °C, y se observó en el microscopio confocal. Se cambiaron los colores a LUT (Look Up Table) para visualizar mejor los cambios de intensidad.

El incremento en las ERO mitocondriales no afecta la localización citosólica de la cinasa SrkA en la mutante $\Delta dnmA$

Previamente, en nuestro laboratorio se reportó que en ausencia de H₂O₂ la MAPKAP SrkA se localiza en el citoplasma, excluida del núcleo. En contraste, el H₂O₂ induce su relocalización nuclear, en un proceso que depende de la MAPK SakA (Jaimes *et al.*, 2015). Decidimos utilizar este cambio en la distribución de la proteína SrkA, como un ensayo *in vivo* para detectar si los altos niveles de ERO mitocondriales detectados en las

mutantes $\Delta dnmA$ afectaban los niveles de ERO citoplásmicos. Como se muestra en la **Figura 12**, en una mutante $\Delta dnmA$ la proteína SrkA::GFP se encontró distribuida en el citosol y completamente excluida del núcleo (indicado con flechas en la **Figura 12**), mientras que el tratamiento con H_2O_2 indujo la localización nuclear de SrkA::GFP, tal como ocurre en una cepa WT. Estos resultados indican que mientras que las mitocondrias no fisionadas producen altos niveles de ERO de manera constitutiva, lo que no parece resultar en un aumento constitutivo de los niveles de ERO citosólicos, tal vez como resultado de una adaptación a dicha condición crónica. Por lo tanto, las mutantes $\Delta dnmA$ son capaces de responder a altos niveles de H_2O_2 externo, lo cual explicaría su falta de sensibilidad al H_2O_2 .

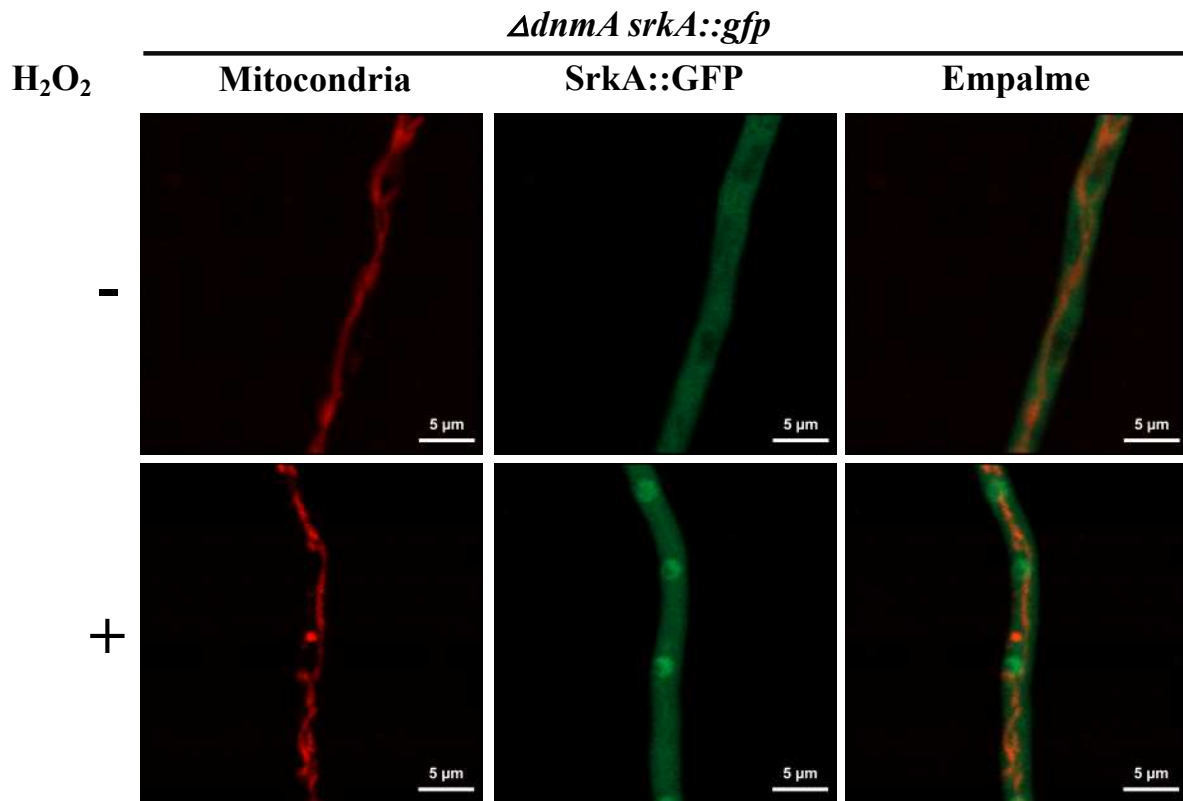


Figura 12. EL H_2O_2 induce la localización nuclear de SrkA en una mutante $\Delta dnmA$. Se creció micelio de la cepa CVG4 ($\Delta dnmA$ srkA::gfp) por 14h en MM suplementado y posteriormente se trató con 5 mM de H_2O_2 por 20 minutos, se lavó con H_2O estéril y se observó en el microscopio confocal. Las flechas señalan la posición de los núcleos.

Discusión

En *A. nidulans* la fisión mitocondrial está conectada con el desarrollo y se induce por el H₂O₂

Nuestros resultados muestran que durante el crecimiento, las puntas de las hifas de *A. nidulans* contienen mitocondrias mayoritariamente organizadas en forma de una red filamentosa. En contraste, durante el desarrollo del conidióforo, las mitocondrias sufren una extensa división en el estadio de vesícula, lo cual permite que cada conidio herede múltiples mitocondrias. Hemos demostrado que las proteínas DnmA y FisA son esenciales para la división mitocondrial y se requieren parcialmente para la fisión peroxisomal y que las mutantes carentes de estas proteínas muestran severos defectos en el crecimiento y el desarrollo asexual y sexual, lo cual es consistente con lo reportado en mutantes $\Delta dnmA$ de *A. nidulans* (Leiter *et al.*, 2016) y *A. fumigatus* (Neubauer *et al.*, 2015). A pesar de esta dramática reducción en la conidiación, todos los conidios de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ heredan una sola mitocondria, indicando que pueden ser fisionadas independientemente de la proteína DnmA. Esto podría ser mediado por un proceso mecánico de septación, que también podría ocurrir durante el crecimiento de las hifas. En células de animales se ha reportado que la fuerza mecánica induce la fisión mitocondrial, aunque sigue dependiendo de Drp1 (Helle *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se reportó que células animales infectadas por la bacteria *Lysteria monocytogenes* pueden fisionar la red mitocondrial de manera independiente de Drp1 (Carvalho *et al.*, 2020). La conidiación de *A. nidulans* podría representar un modelo interesante para estudiar la fisión mitocondrial dependiente e independiente de DnmA. Debido a que en glucosa la falta de las proteínas DnmA y FisA no afecta drásticamente ni el número ni la morfología de los peroxisomas, consideramos que los defectos observados en el desarrollo de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ son causados principalmente por la falta de fisión mitocondrial.

También hemos mostrado que la división mitocondrial inducida por el H₂O₂ depende de las proteínas DnmA y FisA, y que no se trata de un proceso inespecífico como el reportado en *Podospora anserina*, en donde se observó que la fragmentación mitocondrial inducida por H₂O₂ y la observada en cultivos senescentes no depende de Dnm1. En contraste con nuestro datos, en este hongo la delección de *dnm1* no causó

ningún efecto en la morfología del micelio, tasa de crecimiento o fertilidad, pero sí se observó un notable incremento en la esperanza de vida (Scheckhuber *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que *dnm1* y *fis1* se requieren para el desarrollo normal de las ascosporas en *P. anserina* (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020).

En otros hongos, la morfología mitocondrial se ha relacionado con los niveles de ERO y la patogenicidad (Verma, Shakya, y Idnurm, 2018). En un ejemplo notable, las cepas más virulentas del patógeno humano *Cryptococcus deuterogatti* contienen mitocondrias tubulares, y esto correlaciona con el aumento en su parasitismo intracelular en los macrófagos y en esta especie el H₂O₂ no induce la fisión sino la tubularización mitocondrial (Voelz *et al.*, 2014). Esto demuestra que independientemente del resultado final (fisión o fusión), el H₂O₂ juega un papel crítico en la regulación de la dinámica mitocondrial.

En el caso del patógeno de plantas *Ustilago maydis*, las plantas infectadas con una cepa mutante *dnm1Δ* produjo menos síntomas de enfermedad, en comparación con las infectadas con una cepa WT (Mahlert *et al.*, 2009). En el patógeno del arroz, *Magnaporthe oryzae*, ocurre una fragmentación mitocondrial durante la infección de la planta y se observó que MoDnm1 es necesaria para la patogenicidad. Durante la infección este hongo está expuesto a altos niveles de ERO, por lo que el H₂O₂ producido por las plantas podría inducir la fisión mitocondrial observada. Aunque los autores de este trabajo propusieron a la privación de carbono como la causa de la fragmentación mitocondrial (Kou *et al.*, 2019), ambos factores podrían contribuir a este proceso.

No obstante, la falta de las proteínas DnmA y FisA produce fenotipos similares, sin embargo parecen tener diferentes funciones bajo condiciones específicas (por ejemplo, en la utilización de diferentes fuentes de carbono). En *U. maydis* se ha reportado diferencias en las funciones de estas proteínas, en donde la sobreexpresión del gen *Iga2* induce una fragmentación mitocondrial y mitofagia que es dependiente de Dnm1 pero no de Fis1, aunque durante el crecimiento las mutantes *dnm1Δ* y *fis1Δ* mostraron defectos similares en la fisión mitocondrial (Nieto-jacobo *et al.*, 2012). Además, el gen *Iga2* del

“mating-type locus” codifica para una proteína mitocondrial que es importante para la herencia de DNA mitocondrial uniparental durante el desarrollo sexual, lo cual conecta este proceso con la fisión mitocondrial. Esto sugiere que los defectos sexuales observados en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ podrían relacionarse con defectos en la herencia mitocondrial uniparental.

Hay fuertes evidencias que demuestran que las ERO regulan el desarrollo de los hongos (Hansberg y Aguirre 1990; Lara-Ortíz, *et al.*, 2003; Cano-Domínguez *et al.* 2008; Cano-Domínguez *et al.*, 2019; Lara-Rojas *et al.*, 2011; Mendoza-Martínez *et al.*, 2017; Garrido-Bazán *et al.*, 2018). Nosotros hemos demostrado que la división mitocondrial está críticamente asociada al desarrollo y la producción de las ERO en los hongos y que a su vez la división mitocondrial está regulada por las ERO. Sin embargo, se requiere de más investigaciones para determinar el mecanismo por el cual se regulan estos procesos interrelacionados.

La función mitocondrial en mutantes afectadas en la fisión

Encontramos que la falta de fisión mitocondrial tiene como consecuencia una disminución moderada de la respiración *in vivo*. Esto es consistente con la disminución de la actividad de la citocromo C oxidasa reportada en mitocondrias aisladas de mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ de *A. fumigatus* (Neubauer *et al.*, 2015). La respiración podría estar afectada por el tipo de fuente de carbono disponible. La mutante $\Delta dnmA$ presentó una mejoría notable en la conidiación cuando la cepa se creció en glicerol como fuente de carbono. En los hongos, la utilización del glicerol depende de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD que se localiza en la superficie de la membrana interna mitocondrial, la cual transfiere electrones directamente del FADH₂ a la cadena respiratoria (Klein *et al.*, 2017). Sin embargo, cómo se relacionan la división mitocondrial y la respiración es algo que requiere de mayor investigación.

La morfología mitocondrial está relacionada con la producción de ERO mitocondriales

Nuestros resultados indican que la morfología de la mitocondria afecta la producción de ERO. En efecto, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ se tiñeron con el detector de ERO mitocondrial MitoSOX en condiciones en donde una cepa WT no se tiñó. Dos resultados apoyan la idea de que con el MitoSOX estamos detectando al anión superóxido en nuestros experimentos. En primer lugar, el pretratamiento con Mito TEMPO, un “scavenger” del superóxido mitocondrial, disminuyó drásticamente la tinción con MitoSOX. En segundo lugar, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ resultaron sensibles a la menadiona, compuesto que induce la formación de superóxido mitocondrial, pero resistentes al H_2O_2 externo. De manera notable, las mitocondrias de una cepa WT también se tiñeron con MitoSOX cuando la cepa se creció en etanol como fuente de carbono. En un trabajo previo del laboratorio se mostró que el etanol induce estrés oxidativo, de acuerdo con la localización nuclear de NapA, un factor de transcripción regulado por el estado redox celular (Mendoza-Martínez *et al.*, 2017). Recientemente se mostró que el etanol causa disfunción mitocondrial en el músculo esquelético, lo cual es revertido por el antioxidante mitocondrial Mito TEMPO (Kumar *et al.*, 2019), también sugiriendo que el etanol induce la formación de superóxido mitocondrial en células de animales.

Notablemente, las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ no se tiñen homogéneamente con el MitoSOX, sino que algunas regiones definidas presentan una mayor intensidad de fluorescencia, las cuales cambian de posición de manera aleatoria durante las observaciones. Esto sugiere que hay cambios dinámicos en la concentración de las ERO a lo largo de las mitocondrias, en ausencia de división mitocondrial. Esto es semejante a las ráfagas intermitentes y estocásticas de ERO que se han documentado ampliamente en mitocondrias de células de animales (Hou *et al.*, 2014), las cuales se han denominado Mitoflashes y se ven exacerbadas por la disminución de la fisión mitocondrial (Wang *et al.*, 2017)(Zhang *et al.*, 2017). A pesar de los altos niveles de ERO mitocondriales en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, éstas están adaptadas al estrés oxidativo,

puesto que en respuesta al H_2O_2 tuvieron la capacidad de relocalizar a la cinasa SrkA al núcleo.

Mientras que la fisión mitocondrial se ha asociado con la división celular o el daño mitocondrial y la mitofagia, nuestros resultados sugieren que las ERO producidas por diferentes actividades celulares, incluyendo la respiración, podrían regular la división mitocondrial y esto a su vez regular la producción de las ERO mitocondriales.

Conclusiones

- Las proteínas DnmA y FisA participan en una vía común que se requiere para la división mitocondrial y que participa en la división peroxisomal en *A. nidulans*. Sin embargo, durante la esporulación asexual se producen eventos de división mitocondrial que no dependen de DnmA ni de FisA. Ambas proteínas son esenciales para la división mitocondrial inducida por el H_2O_2 .
- La falta de DnmA o FisA produce una severa reducción en el crecimiento y la diferenciación asexual y sexual, una moderada disminución en la respiración y un incremento notable en la producción de ERO mitocondriales, posiblemente de superóxido. A pesar de esto, las mutantes sin fisión mitocondrial son capaces de percibir y responder al estrés oxidativo causado por H_2O_2 externo.
- Existe una estrecha relación entre las ERO, la división mitocondrial y el desarrollo en *A. nidulans*.

Materiales y métodos

Las cepas del presente trabajo se muestran en la Tabla 1. Todas las cepas se crecieron a 37 °C en medio mínimo (Hill y Kafer, 2001) con glucosa, excepto cuando se indique otra cosa, y los suplementos requeridos por cada cepa. El medio mínimo sólido contenía 1.25 % de agar. Para los experimentos de crecimiento radial y estrés se inocularon 1×10^4 conidios. Para los experimentos de estrés se adicionaron los agentes estresantes cuando el medio estaba a 50 °C. Las placas que contenían H₂O₂ y menadiona se usaron el día de su preparación.

Delección de los genes *dnmA* y *fisA*

Las construcciones de las deleciones de los genes *dnmA* y *fisA* se hicieron utilizando la técnica de *double-joint PCR* (Yu *et al.*, 2004). Para la obtención de los diferentes productos de PCR, se usó como templado DNA de la cepa A1155 (WT) y distintas combinaciones de oligonucleótidos como se explica enseguida. Para eliminar el gen *dnmA* (AN8874), se generaron dos fragmentos por PCR usando los oligonucleótidos 5'ForDnm2/5'RevDnm2 y 3'ForDnm2/3'RevDnm2. Se utilizó como marcador de selección el gen *pyrG* (*AfpyrG*) de *Aspergillus fumigatus*, el cual se amplificó del plásmido PFNO3 (Nayak *et al.*, 2006), con los oligonucleótidos pyrGFor y pyrGRev. Los tres fragmentos obtenidos se purificaron y se mezclaron para una PCR final de fusión, en la cual se usaron los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y 3'NestDnm2. El producto final de la construcción *dnmA-AfpyrG-dnmA* que se obtuvo fue de 3609 pb, el cual se purificó y se utilizó para transformar por electroporación conidios electrocompetentes de la cepa A1155 de *A. nidulans* (Sánchez y Aguirre, 1996; Sánchez *et al.*, 1998). Se obtuvieron ocho transformantes y se analizaron por PCR (**Figura S1**), se eligió una transformante y se le denominó TVG1 para usarla en posteriores experimentos. La cepa TVG1 se cruzó con la cepa TRV1 para incorporar la marca de las mitocondrias y eliminar la delección ΔkuA . Se analizó la cruce por PCR, se comprobó la delección de *dnmA* y se seleccionó una cepa que se denominó CVG1, la cual se utilizó en los experimentos posteriores.

La delección de *fisA* (AN6226) se hizo con la misma estrategia. Se usaron los oligonucleótidos 5'ForFis2 y 5'RevFis2 para generar el fragmento *fisA* 5' y los oligonucleótidos 3'ForFis2 y 3'RevFis2 para el 3' *fisA*. También se utilizó *pyrG* de *A. fumigatus* como marcador de selección. Los tres fragmentos se fusionaron en una PCR

en donde se usaron los oligonucleótidos 5'NestFis2 y 3'NestFis2 y se obtuvo una construcción final *fisA-pyrG-fisA* de 2478 pb. Se purificó la construcción y se transformó la cepa A1155 por electroporación. Se obtuvieron cuatro transformantes y se comprobó la eliminación del ORF de *fisA* por PCR (**Figura S2**). Se seleccionó una cepa y se le denominó TVG2. La cepa TVG2 se cruzó con la cepa TRV1 para marcar a las mitocondrias y eliminar la delección ΔkuA . Se analizó la progenie y se obtuvo la cepa CVG2, la cual se utilizó en los posteriores experimentos.

Para marcar a las mitocondrias, se transformó la cepa silvestre CLK43 con el plásmido pFS03, el cual confiere resistencia a fleomicina y contiene una secuencia premitocondrial de 79 aa de ATP9-7 de *Podospora anserina*, fusionada a la proteína mCherry, expresada bajo el promotor *gpdA* de *P. anserina* (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). La presencia de las mitocondrias marcadas se confirmó por microscopía de epifluorescencia y la cepa TRV1 se seleccionó para experimentos posteriores.

Consumo de oxígeno

Para determinar el consumo de oxígeno por respirometría de alta resolución, se usó el instrumento Oroboros 2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Australia), el cual se calibró a 30 °C. Posteriormente conidios (1×10^8) de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$) y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) se inocularon en 200 mL de medio mínimo líquido y se incubaron a 37 °C con agitación (300 rpm) por 4 horas. Después, se colectaron los conidios por centrifugación (3000 rpm por 5 minutos) y se lavaron 3 veces con MM frío sin glucosa. Después se diluyeron a una concentración final de 0.1 mg/ μ L con MM sin glucosa y se mantuvieron en hielo hasta hacer las mediciones. En cada cámara del respirómetro se adicionaron 2 mL de medio mínimo sin glucosa y posteriormente 2.5 mg de conidios. La respiración de rutina se midió adicionando 1 % de glucosa a cada cámara y posteriormente la máxima respiración se midió adicionando CCCP (10 μ M). Se hicieron 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron con el software DatLab6 (Oroboros Instruments).

Microscopía

Las imágenes de microscopía se obtuvieron *in vivo*. Para observar a la morfología mitocondrial se crecieron las cepas por 14 h y el micelio se trató o no con 5 mM de H₂O₂

por 20 minutos y posteriormente se observaron en el microscopio Zeiss LSM800 con láser invertido. Se utilizó el objetivo de inmersión en aceite Plan Apochromat 63_/1.4 y con el láser 561 nm. Las imágenes se procesaron con el software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena Germany).

Detección de ERO mitocondriales

Se usó el compuesto MitoSOX Red (Invitrogen Waltham, Massachusetts, USA) para medir los ERO mitocondriales. Para esto, se disolvió en DMSO a una concentración madre de 5 mM, la cual se mantuvo congelada. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo con agua estéril a una concentración de 5 μ M. Con esta solución se cubrieron cuadros de medio sólido, que contenían el micelio de las cepas a estudiar y se incubaron por 20 minutos a 37 °C. Después de esto se lavó dos veces el MitoSOX con agua estéril y se observó inmediatamente en el microscopio confocal.

Para los ensayos Mito TEMPO/MitoSOX, cuadros de MM sólido con el micelio de las cepas se cubrieron con una solución de 100 μ M Mito TEMPO (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) preparado en H₂O, se incubó durante dos horas a 37 °C. Después se retiró la solución Mito TEMPO con dos lavados de H₂O estéril y se adicionó MitoSOX 5 μ M por 20 minutos a 37 °C, se lavó el MitoSOX con H₂O estéril e inmediatamente después se observó en el microscopio confocal. Las imágenes obtenidas se procesaron usando el software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Jena Germany).

Complementación de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$

Para la complementación de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, se clonaron los genes correspondientes en el plásmido pEM-03 (E. Martínez y J. Aguirre, sin publicar). Para esto, se amplificaron los fragmentos de *dnmA* y *fisA* por PCR con los oligonucleótidos CV3/CV4 y CV5/CV6, respectivamente. Cada construcción contenía 1000 pb río arriba del ORF del gen y 500 pb río abajo. La amplificación del plásmido pEM-03 se hizo con los oligonucleótidos CV1 y CV2. El plásmido incluye el gen *argB* como marcador selectivo. Los plásmidos obtenidos pVDnmA y pVFisA se usaron para transformar las cepas CVG36 y CVG37. Las transformantes ArgB⁺ CVG38 y CVG39 se seleccionaron para experimentos adicionales.

Tabla S1. Cepas de *Aspergillus nidulans* usadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente
CLK43	<i>pabaA1 yA2 veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , (2002)
11035	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB veA1</i>	M. Hynes; Nayak <i>et al.</i> , (2006)
A1155	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::bar veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
TRV1	<i>pabaA1 yA2 veA1 gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1</i>	En este trabajo: transformación de la cepa CLK43 con el plásmido pPABLE
TVG1	<i>pyrG89 pyroA4 ΔdnmA::AfpyrG ΔnkuA::bar veA1</i>	En este trabajo; Cepa A1155 transformada con la construcción obtenida por PCR dnmA-AfpyrG-dnmA
TVG2	<i>pyrG89 pyroA4 ΔfisA::AfpyrG ΔnkuA::bar veA1</i>	En este trabajo; Cepa A1155 transformada con la construcción obtenida por PCR fisA-AfpyrG-fisA
CVG1	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::AfpyrG gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruce TRV1 X TVG1
CVG2	<i>pabaA1 yA2 ΔfisA::AfpyrG gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruce TRV1 X TVG2
CVG3	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::AfpyrG ΔfisA::AfpyrG gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruce TVG1 X CVG2
CVG4	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::AfpyrG srkA::GFP::AfpyrG gadph (p)::atp9-7(mts)::mcherry veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruce TRJ1 X CVG1
RPA	<i>yA::[gpdA(p)-mcherry-FLAG-PTS1::Afpyro], [TagGFP2::rabA::AfpyrG], riboB2, pyroA4, pyrG89, pabaA, nkuA:: argB⁺</i>	Tan <i>et al.</i> ,(2014)
CVG30	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::AfpyrG yA::[gpdA(p)-mcherry-FLAG-PTS1::Afpyro]</i>	En este trabajo; progenie de la cruce RPA X TVG1
CVG31	<i>pabaA1 yA2 ΔfisA::AfpyrG yA::[gpdA(p)-mcherry-FLAG-PTS1::Afpyro]</i>	En este trabajo; progenie de la cruce RPA X TVG2
TRJ1	<i>pyrG89 pyroA4 srkA::GFP ΔnkuA::bar veA1</i>	Jaimes-Arroyo <i>et al.</i> , (2015)
RMSO	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB trpC801 veA1</i>	M. Stringer
CVG36	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB ΔdnmA::pyrG trpC801 veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruce RMSO11 X TVG1

CVG37	<i>pabaA1 yA2 ΔargB::trpCΔB ΔfisA::pyrG trpC801 veA1^a</i>	En este trabajo; progenie de la cruza RMSO11 X TVG2
CVG38	<i>pabaA1 yA2 ΔdnmA::pyrG argB::dnmA veA1^{a,b}</i>	En este trabajo; cepa CVG36 transformada con el plásmido pVDnmA
CVG39	<i>pabaA1 yA2 ΔfisA::pyrG argB::fisA veA1^{a,b}</i>	En este trabajo; cepa CVG37 transformada con el plásmido pVFisA

^aPodría contener *pyrG89*

^bPodría contener *ΔargB::trpCΔB trpC801*

Tabla S2. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
5'ForDnm2	CAGGCATCTCAGGCAGACTTCAA
5'NestDnm2	TGACGAGCTCTGCGGAACGAT
5'RevDnm2	GAGGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCACAGGTTTTCCCCAAGGC G
3'ForDnm2	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACACATAACGCCTGTCTGTCCGTG
3'RevDnm2	CATCCGCGCGAGACTCTTTCCG
3'NestDnm2	GCGGAGTGCATCTTCTCTCCG
pyrGFor	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
pyrGRev	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
5'ForFis 2	GCGTTGAAGTCGAAGATTGGGC
5'NestFis 2	CATCTCCCTTGCGGCTGTTACG
5'RevFis 2	GAGGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCATTGCTGGAATACAGTACC ACTGTCT
3'ForFis2	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAAATGCAGGGTAATAGGGTGCT GAG
3'RevFis2	GGTTGTGGTCTGCAAAGGGAT TC
3'NestFis2	GGAACCAGTGTGTGCAAGGAAGC
CV1	GGTACCCAGCTTTTGTTC
CV2	TCCACTAGTTCTAGAGCGGCC
CV3	TCTAGAACTAGTGAAGGCGGTCGGCTGGGGTAG
CV4	CAAAAGCTGGGTACCTGCATCTTCTCTCCGCGAAATCG
CV5	TCTAGAACTAGTGAATAGATAAAAGCAAAGATCCA
CV6	CAAAAGCTGGGTACCTCATCTTGTGTACACGATAAGACT

Figuras suplementarias

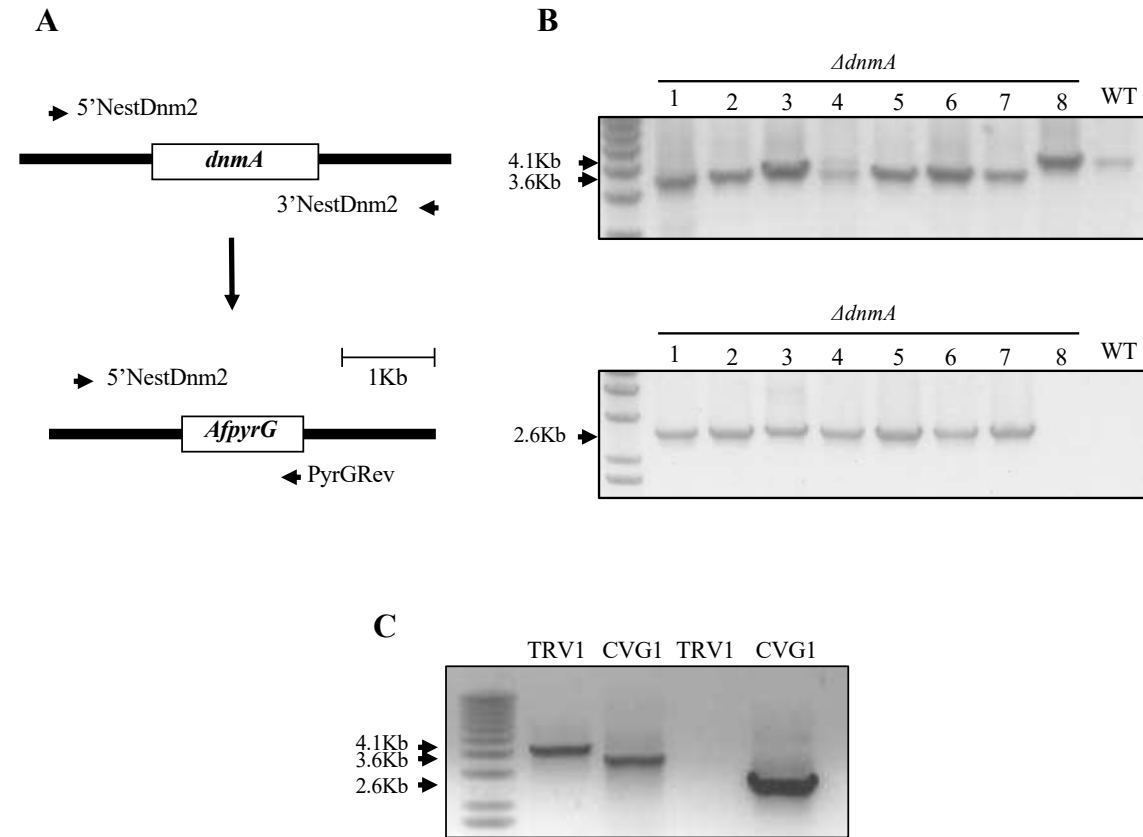


Figura S1. Delección del gen *dnmA*. **A)** Se utilizó una construcción que contiene *AfpyrG* como marcador selectivo para la delección de *dnmA*. Con la construcción se transformó a la cepa A1155. Se extrajo DNA de 8 transformantes y se comprobaron por PCR, usando los oligonucleótidos 5'NesDnm2 y 3'NestDnm2. Se obtuvieron productos de PCR de 3.6 y 4.1 Kb para las cepas WT y $\Delta dnmA$, respectivamente. **B)** Se hizo otra PCR de comprobación para las transformantes (1-8) con los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y PyrGRev, para los cuales sólo se obtuvo un producto de 2.6 Kb para las cepas $\Delta dnmA$. Se seleccionó la transformante 2 y se le denominó TVG1. TVG1 se cruzó con la cepa TRV1, la cual contiene mitocondrias marcadas con la construcción *mts::mCherry*, y se analizó la progenie por PCR para ver que llevaran la delección. **C)** Se extrajo DNA de la cepa TRV1 y la cepa seleccionada de la cruce (CVG1) y se hizo una PCR con los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y 3'NestDnm1 para generar un producto de 3.6 Kb para $\Delta dnmA$ y 4.1 Kb para TRV1 (productos lado derecho). Los siguientes dos carriles corresponden a la PCR con los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y PyrGRev, en donde sólo la cepa $\Delta dnmA$ generó un producto de 2.6 Kb. La cepa CVG1 ($\Delta dnmA$) se seleccionó para los siguientes experimentos.

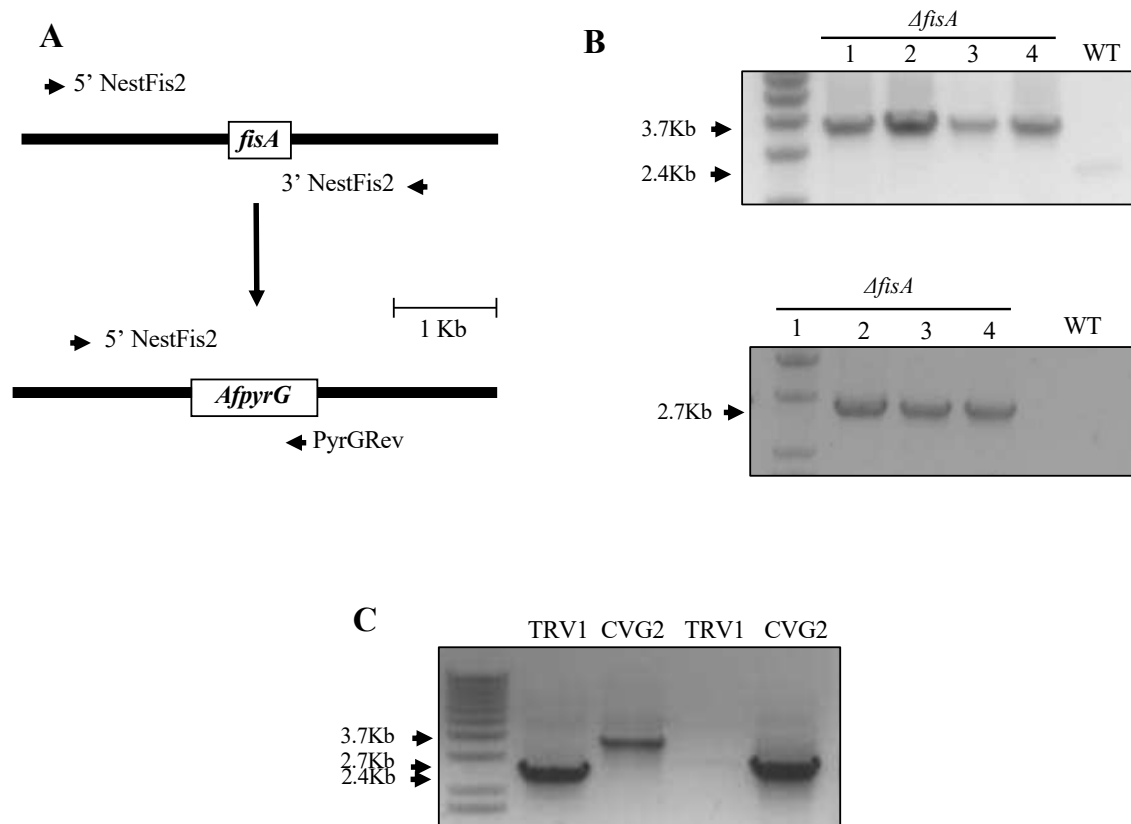


Figura S2. Delección del gen *fisA*. **A)** Se utilizó una construcción que contiene *AfpyrG* como marcador selectivo para la delección de *fisA*. Con la construcción se transformó a la cepa A1155. Se extrajo DNA de 4 transformantes y se comprobaron por PCR, usando los oligonucleótidos 5'NesFis2 y 3'NestFis2. Se obtuvieron productos de PCR de 2.4 y 3.7 Kb para las cepas WT y $\Delta fisA$, respectivamente. **B)** Se hizo otra PCR de comprobación para las transformantes (1-4) con los oligonucleótidos 5'NestFis2 y PyrGRev, para los cuales sólo se obtuvo un producto de 2.7 Kb para la cepa $\Delta fisA$. Se seleccionó la transformante 3 y se le denominó TVG2. TVG2 se cruzó con la cepa TRV1, la cual contiene a las mitocondrias marcadas con la construcción *mts::mCherry*, se analizó la progenie por PCR para ver que llevaran la delección. **C)** Se extrajo DNA de la cepa TRV1 y la cepa seleccionada de la cruce (CVG2) y se hizo una PCR con los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y 3'NestDnm1 para generar un producto de 3.7 Kb para $\Delta fisA$ y 2.4 Kb para TRV1 (productos lado derecho). Los siguientes dos carriles corresponden a la PCR con los oligonucleótidos 5'NestFis2 y PyrGRev, en donde sólo se generó un producto de 2.7 Kb para la cepa $\Delta fisA$. La cepa CVG2 ($\Delta fisA$) se seleccionó para los siguientes experimentos.

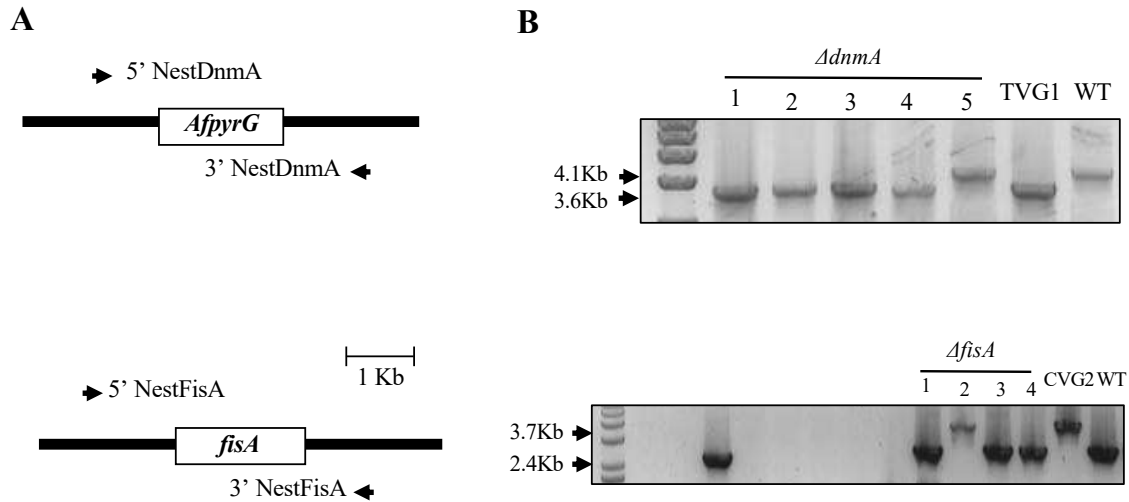
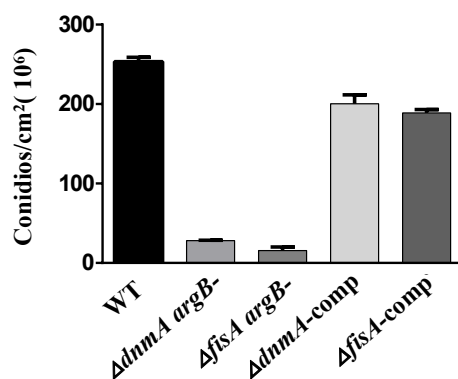
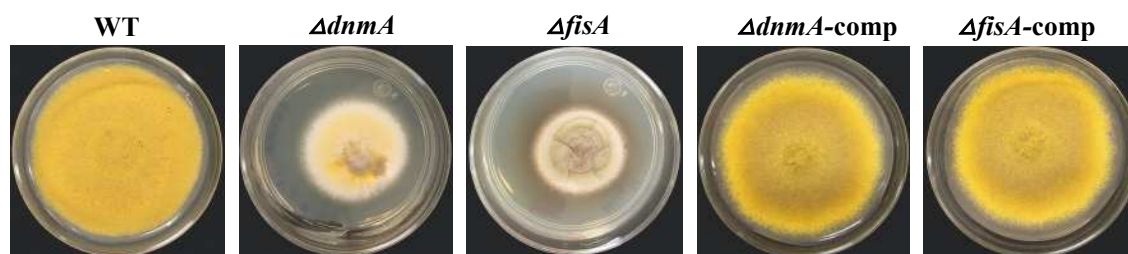


Figura S3. Confirmación por PCR de la mutante doble $\Delta dnmA \Delta fisA$. **A)** Se cruzaron las cepas TVG1 X CVG2, se seleccionó la progenie y se extrajo DNA para usarlo como templado para una PCR de comprobación, en donde se usaron los oligonucleótidos 5'NestDnm2 y 3'Nest Dnm2, para generar los productos de 3.6 y 4.1 Kb para la cepa $\Delta dnmA$ y WT, respectivamente. **B)** La delección de *fisA* se confirmó usando los oligonucleótidos 5'NestFis2 y 3'NestFis2, los cuales generaron los productos de 3.7 y 2.4 Kb para las cepas $\Delta fisA$ y WT, respectivamente. La cepa 2 se seleccionó como mutante doble $\Delta dnmA \Delta fisA$ y se denominó CVG3.

A)



B)

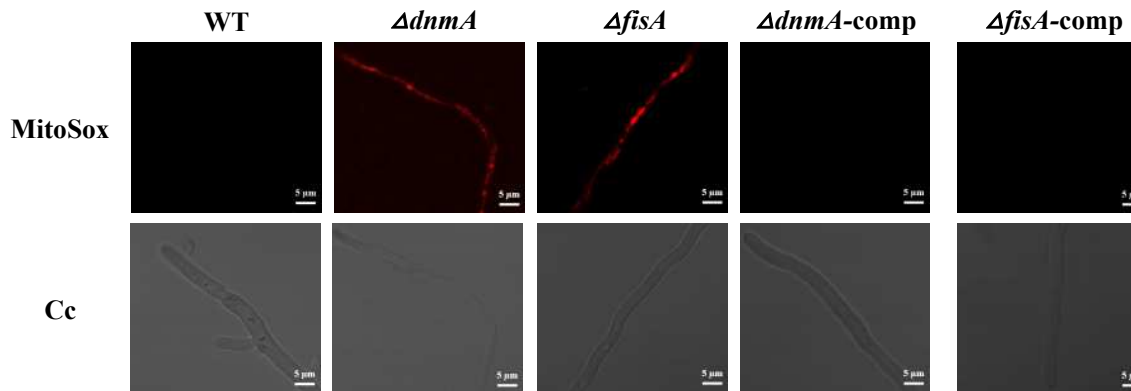


Figura S4. Complementación genética de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$. A) Las cepas CVG36 ($\Delta dnmA \Delta argB$) y CVG37 ($\Delta fisA \Delta argB$) se transformaron con los plásmidos pVDnmA y pVFisA, respectivamente. Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas RMSO (WT), CVG36, CVG37, CVG38 ($\Delta dnmA$ -comp) y CVG39 ($\Delta fisA$ -comp) en cajas con MM con glucosa y se incubaron a 37 °C por 6 días, posteriormente se determinó el número de conidios por centímetro cuadrado (pánel inferior). La gráfica representa tres experimentos independientes, con sus respectivas desviaciones estándar. B) Las mismas cepas se tiñeron con MitoSOX y se observaron en el microscopio confocal. Campo claro (Cc).

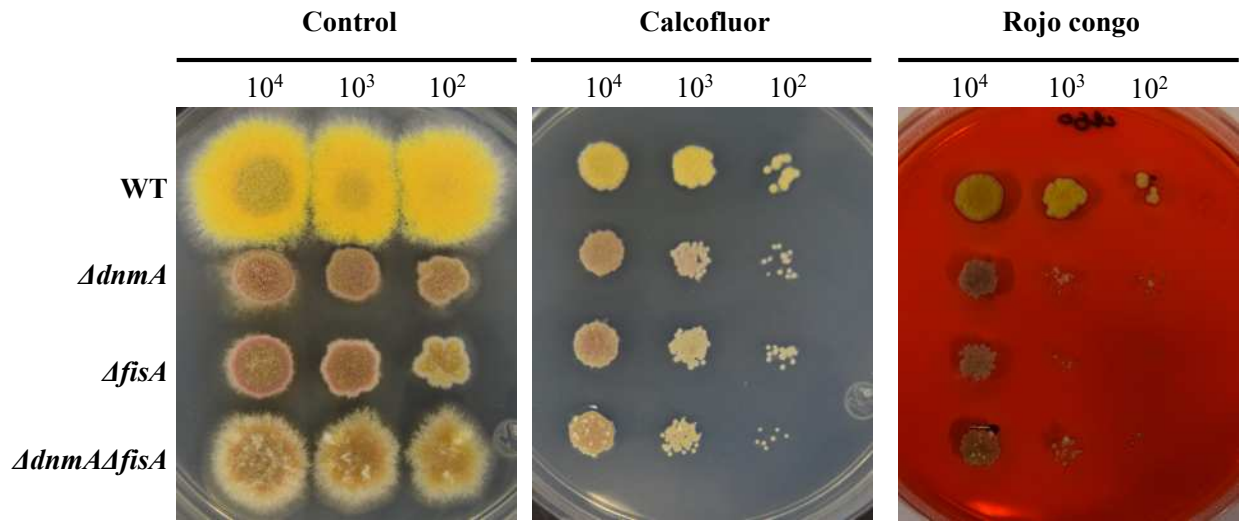


Figura S5. Las mutantes *ΔdnmA* y *ΔfisA* no son sensibles al calcoflúor, pero sí al rojo congo. Conidios de las cepas TRV1 (WT), CVG1 (*ΔdnmA*), CVG2 (*ΔfisA*) y CVG3 (*ΔdnmA ΔfisA*) se inocularon, a las concentraciones indicadas, en MM con glucosa y los compuestos desestabilizadores de la pared celular calcoflúor (30 mg/mL) y rojo congo (50 mg/mL), y se incubaron a 37 °C por 2 días.

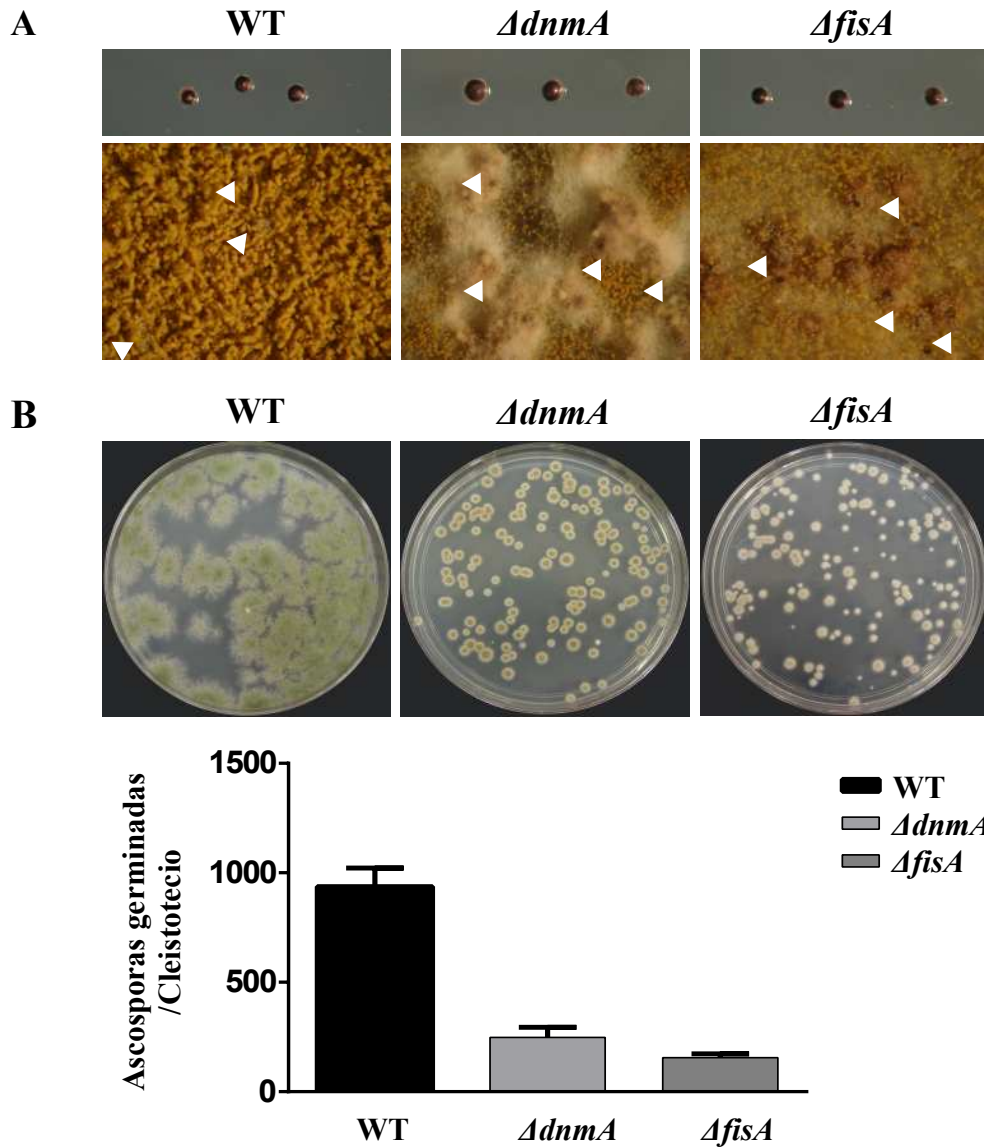


Figura S6. Las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ muestran un incremento en la formación de células Hülle y cleistotecios y una disminución en la producción de ascosporas. A) Se indujo el ciclo sexual (Kawasaki *et al.*, 2002) de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$). Las fotos muestran los cultivos a confluencia, después de 8 días de inducción del ciclo sexual. Las flechas blancas indican agregados de células Hülle. En el pánel inferior se muestran cleistotecios aislados y limpios de cada una de las cepas. **B)** Cleistotecios aislados de cada una de las cepas A1155 (WT), TVG1 ($\Delta dnmA$) y TVG2 ($\Delta fisA$) se reventaron en 500, 50 y 50 μL de H_2O , respectivamente y 50 μL de cada suspensión de ascosporas se colocó en cajas con MM suplementado, se incubaron durante 4 días y posteriormente se cuantificó el número de colonias formadas. El pánel superior muestra un experimento representativo. El pánel inferior muestra los datos de tres experimentos independientes en donde se obtuvo el promedio del total de ascosporas germinadas por cleistotecio. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con una ANOVA de un factor y se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($*p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la cepa WT.

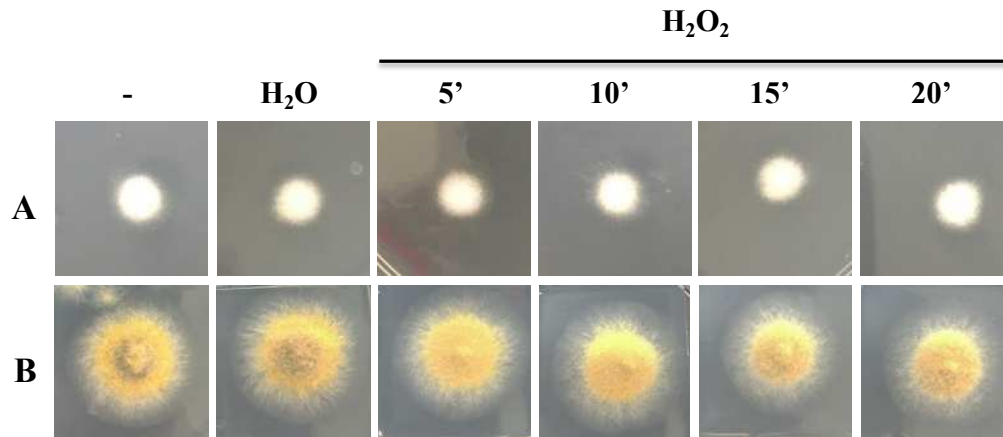


Figura S7. El crecimiento de *A. nidulans* no se ve afectado por un tratamiento de 5 mM de peróxido de hidrógeno. **A)** Se inocularon conidios (1×10^4) de la cepa TRV1 (WT) en MM-glucosa suplementado y se incubó a 37 °C por 14 h. Posteriormente se cubrió con una solución de 5 mM de H_2O_2 por los tiempos indicados y después se lavó con H_2O estéril. **B)** A continuación las cepas tratadas con y sin H_2O_2 se incubaron nuevamente a 37 °C durante 24 h y se tomaron fotos de las colonias.

H_2O_2

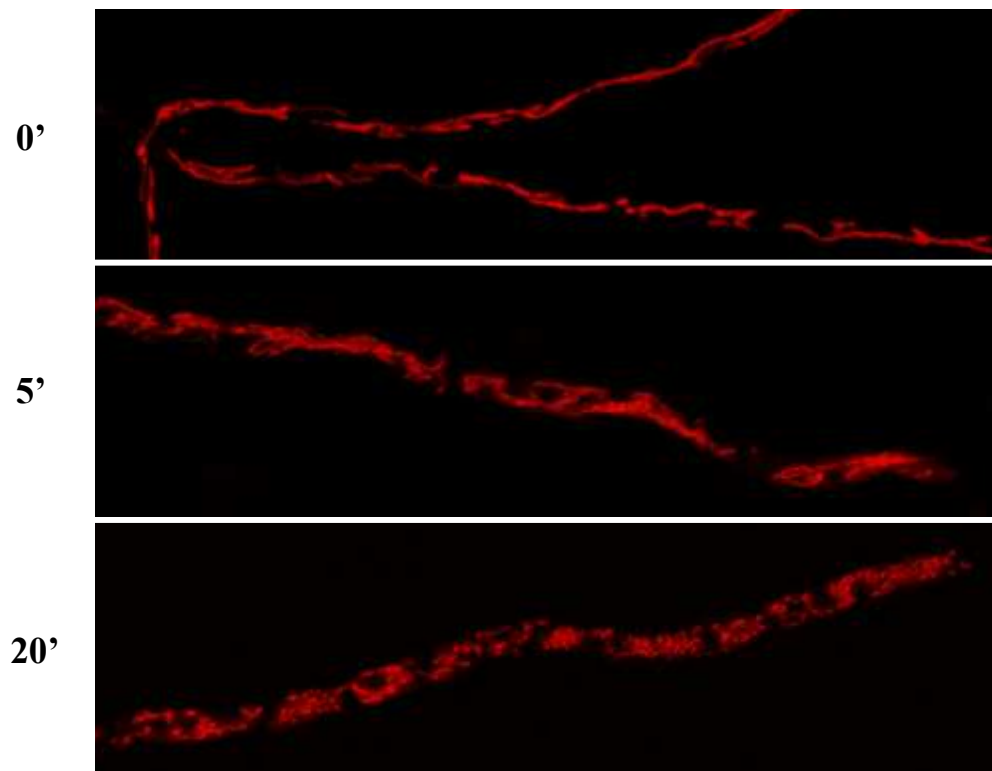


Figura S8. El peróxido de hidrógeno induce la fisión mitocondrial en *A. nidulans*. Se creció la cepa TRV1 con las mitocondrias marcadas con la proteína mCherry por 14 h a 37 °C. Posteriormente se trató con 5 mM de H_2O_2 como se indica en la **Figura S6** por 0, 5 y 20 minutos e inmediatamente después se observaron en el microscopio confocal.

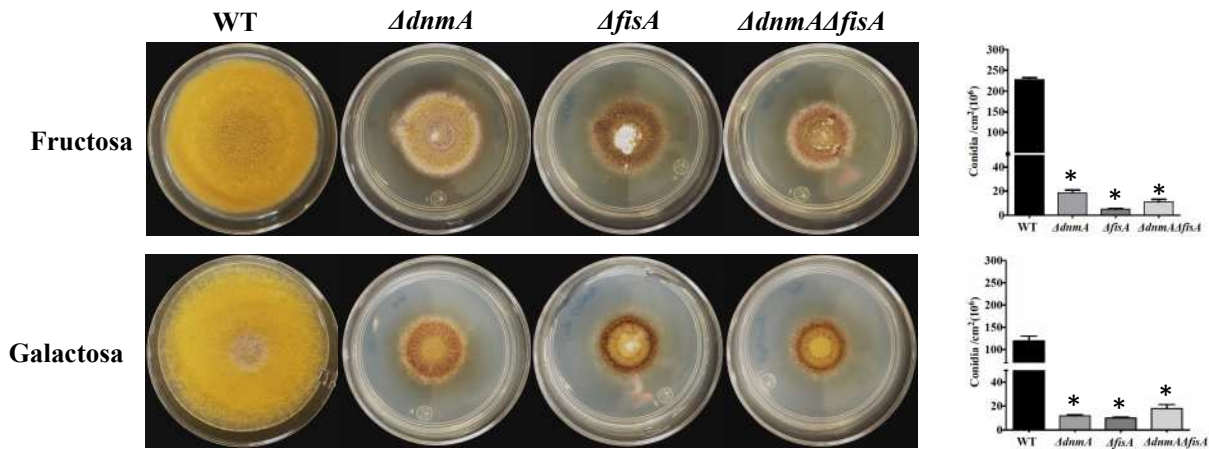


Figura S9. Crecimiento y conidiación de las cepas $\Delta dnmA$, $\Delta fisA$ y $\Delta dnmA \Delta fisA$ en medio con fructosa o galactosa como fuentes de carbono. Se inocularon conidios (1×10^4) de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$), CVG2 ($\Delta fisA$), y CVG3 ($\Delta dnmA \Delta fisA$) en cajas con MM suplementado y con la fuente de carbono indicada en la figura y se incubaron a 37 °C por 3 días. Posteriormente, se colectaron los conidios de cada colonia, se contaron y la cantidad total se dividió entre el área de la colonia y se determinó el número de conidios por centímetro cuadrado. Los datos se analizaron con una ANOVA de un factor y se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey (* $p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la cepa WT

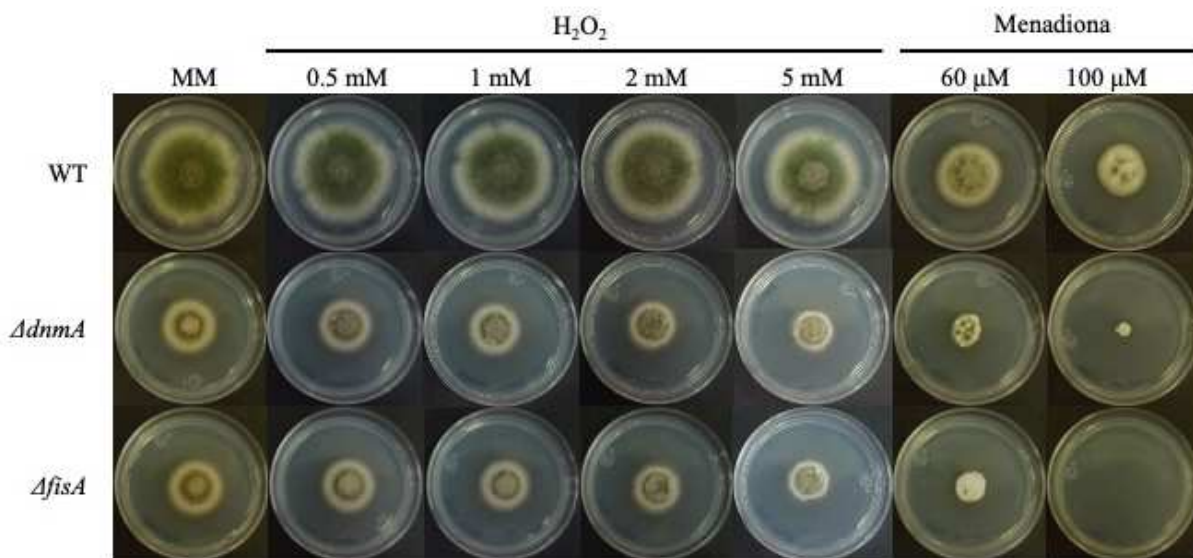


Figura S10. Las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ no son sensibles al H_2O_2 pero sí a la menadiona. Se inocularon conidios de las cepas A1155 (WT), TVG1 ($\Delta dnmA$), TVG2 ($\Delta fisA$) en MM-glucosa suplementado y que contenía H_2O_2 o menadiona, a las concentraciones indicadas y se incubaron a 37 °C durante 3 días.

Bibliografía

Adams, Thomas H., Jenny K. Wieser, y Jae-Hyuk Yu. 1998. "Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2): 545–545.

Aguirre, Jesús, Mauricio Ríos-Momberg, David Hewitt, y Wilhelm Hansberg. 2005. "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes". *Trends in Microbiology* 13 (3): 111–18.

Bleazard, William, J. Michael McCaffery, Edward J. King, Susan Bale, Amy Mozdy, Quinton Tieu, Jodi Nunnari, y Janet M. Shaw. 1999. "The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast". *Nature Cell Biology* 1 (5): 298–304.

Burman, Jonathon L., Sarah Pickles, Chunxin Wang, Shiori Sekine, Jose Norberto S. Vargas, Zhe Zhang, Alice M. Youle, et al. 2017. "Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates". *Journal of Cell Biology* 216 (10): 3231–47.

Cano-Domínguez, Nallely, Karen Álvarez-Delfín, Wilhelm Hansberg, y Jesús Aguirre. 2008. "NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*". *Eukaryotic Cell* 7 (8): 1352–61.

Cano-Domínguez, Nallely, Barry Bowman, Leonardo Peraza-Reyes, y Jesús Aguirre. 2019. "*Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane". *Frontiers in Microbiology* 10 (August): 1–14.

Carvalho, Filipe, Anna Spier, Thibault Chaze, Mariette Matondo, y Pascale Cossart. 2020. "*Listeria monocytogenes* Exploits Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System Complex Subunit Mic10 To Promote Mitochondrial Fragmentation and Cellular Infection". *mBio* 11 (1): 1–17.

Cerqueira, Gustavo C., Martha B. Arnaud, Diane O. Inglis, Marek S. Skrzypek, Gail Binkley, Matt Simison, Stuart R. Miyasato, et al. 2014. "The *Aspergillus* Genome Database: Multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations". *Nucleic Acids Research* 42 (D1): 705–10.

Dikalova, Anna E., Alfiya T. Bikineyeva, Klaudia Budzyn, Rafal R. Nazarewicz, Louise McCann, William Lewis, David G. Harrison, y Sergey I. Dikalov. 2010. "Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension". *Circulation Research* 107 (1): 106–16.

Feng, Gaomin, Beibei Liu, Jinghang Li, Tianlei Cheng, Zhanglong Huang, Xianhua Wang, y Heping Peace Cheng. 2019. "Mitoflash biogenesis and its role in the autoregulation of mitochondrial proton electrochemical potential". *The Journal of general physiology* 151 (6): 727–37.

Garrido-Bazán, Verónica, Rafael Jaimes-Arroyo, Olivia Sánchez, Fernando Lara-Rojas, y Jesús Aguirre. 2018. "SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*". *Frontiers in Microbiology* .

Garrido, Bazán Verónica, Juan Pablo Pardo, y Jesús Aguirre. 2020. "DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission , and Regulate Mitochondrial Function , ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*" 11 (May): 1–14.

Griffin, Erik E., Johannes Graumann, y David C. Chan. 2005. "The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria". *Journal of Cell Biology* 170 (2): 237–48.

Hansberg, Wilhelm, y Jesus Aguirre. 1990. "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen". *Journal of Theoretical Biology* 142 (2): 201–21.

Helle, Sebastian Carsten Johannes Helle, Qian Feng, Mathias J Aebbersold, Luca Hirt, Raphael R Gruter, Afshin Vahid, Andrea Sirianni, et al. 2017. "Mechanical force induces mitochondrial fission". *Elife* 6: e30292.

Hill, Terry W, y Etta Kafer. 2001. "Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions". *Fungal Genetics Reports* 48 (1): 20–21.

Horbay, Rostyslav, y Rostyslav Bilyy. 2016. "Mitochondrial dynamics during cell cycling". *Apoptosis* 21 (12): 1327–35.

Hou, Tingting, Xianhua Wang, Qi Ma, y Heping Cheng. 2014. "Mitochondrial flashes: New insights into mitochondrial ROS signalling and beyond". *Journal of Physiology* 592 (17): 3703–13.

Jaimes-Arroyo, Rafael, Fernando Lara-Rojas, Özgür Bayram, Oliver Valerius, Gerhard H. Braus, y Jesús Aguirre. 2015. "The SrkA kinase is part of the SakA Mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*". *Eukaryotic Cell* 14 (5): 495–510.

Kawasaki, Laura, Olivia Sánchez, Kazuhiro Shiozaki, y Jesús Aguirre. 2002. "SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*". *Molecular Microbiology* 45 (4): 1153–63. x.

Klein, Mathias, Steve Swinnen, Johan M. Thevelein, y Elke Nevoigt. 2017. "Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities". *Environmental Microbiology* 19 (3): 878–93.

Koch, Annett, Meinolf Thiemann, Markus Grabenbauer, Yisang Yoon, Mark A. McNiven, y Michael Schrader. 2003. "Dynamain-like protein 1 is involved in peroxisomal fission". *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8597–8605.

Kou, Yanjun, Yunlong He, Jiehua Qiu, Yazhou Shu, Fan Yang, Yi Zhen Deng, y Naweed I. Naqvi. 2019. "Mitochondrial dynamics and mitophagy are necessary for proper invasive growth in rice blast". *Molecular Plant Pathology* 20 (8): 1147–62.

Kumar, Avinash, Gangarao Davuluri, Nicole Welch, Adam Kim, Mahesha Gangadhariah, Allawy Allawy, Anupama Priyadarshini, et al. 2019. "Oxidative stress mediates ethanol-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction and dysregulated protein synthesis and autophagy". *Free Radical Biology and Medicine* 145: 284–99.

Lara-Ortíz, Teresa, Héctor Riveros-Rosas, y Jesús Aguirre. 2003. "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*". *Molecular Microbiology* 50 (4): 1241–55.

Lara-Rojas, Fernando, Olivia Sánchez, Laura Kawasaki, y Jesús Aguirre. 2011. "*Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions". *Molecular Microbiology* 80 (2): 436–54.

Leiter, Eva, Hee Soo Park, Nak Jung Kwon, Kap Hoon Han, Tamas Emri, Viktor Olah, Ilona Meszaros, et al. 2016. "Characterization of the aodA, dnmA, mnSOD and pimA genes in *Aspergillus nidulans*". *Scientific Reports* 6: 1–15.

Mahlert, Michael, Christine Vogler, Kathrin Stelter, Gerd Hause, y Christoph W. Basse. 2009. "The a2 mating-type-locus gene lga2 of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component". *Journal of Cell Science* 122 (14): 2402–12.

Mendoza-Martínez, Ariann E., Nallely Cano-Domínguez, y Jesús Aguirre. 2019. "Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi". *Fungal Biology*.

Mendoza-Martínez, Ariann E., Fernando Lara-Rojas, Olivia Sánchez, y Jesús Aguirre. 2017. "NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*". *Frontiers in Microbiology* 8 (MAR): 1–23.

Motley, Alison M., Gemma P. Ward, y Ewald H. Hetteema. 2008. "Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p". *Journal of Cell Science* 121 (10): 1633–40.

Navarro-Espíndola, Raful, Harumi Takano-Rojas, Fernando Suaste-Olmos, y Leonardo Peraza-Reyes. 2020. "Distinct Contributions of the Peroxisome-Mitochondria Fission

Machinery During Sexual Development of the Fungus *Podospora anserina*". *Frontiers in Microbiology* 11 (April): 1–23.

Nayak, Tania, Edyta Szewczyk, C. Elizabeth Oakley, Aysha Osmani, Leena Ukil, Sandra L. Murray, Michael J. Hynes, Stephen A. Osmani, y Berl R. Oakley. 2006. "A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*". *Genetics* 172 (3): 1557–66.

Neubauer, Michael, Zhaojun Zhu, Mirjam Penka, Christoph Helmschrott, Nikola Wagener, y Johannes Wagener. 2015. "Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: Therapeutic and evolutionary implications". *Molecular Microbiology* 98 (5): 930–45.

Nieto-jacobo, Fernanda, Denise Pasch, y Christoph W Basse. 2012. "The Mitochondrial Dnm1-Like Fission Component Is Required for Iga2 -Induced Mitophagy but Dispensable for Starvation-Induced" 11 (9): 1154–66.

Poole, Angela C., Ruth E. Thomas, Laurie A. Andrews, Heidi M. McBride, Alexander J. Whitworth, y Leo J. Pallanck. 2008. "The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1638–43.

Robinson, Kristine M., Michael S. Janes, Mariana Pehar, Jeffrey S. Monette, Meredith F. Ross, Tory M. Hagen, Michael P. Murphy, y Joseph S. Beckman. 2006. "Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (41): 15038–43.

Sánchez, O., R. E. Navarro, y J. Aguirre. 1998. "Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)". *Molecular and General Genetics* 258 (1–2): 89–94.

Sánchez, Olivia, y Jesús Aguirre. 1996. "Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia". *Fungal Genetics Reports* 43 (1): 48–51.

Scheckhuber, C. Q., N. Erjavec, A. Tinazli, A. Hamann, T. Nyström, y H. D. Osiewacz. 2007. "Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models". *Nature Cell Biology* 9 (1): 99–105.

Sohn, K. T., y K. S. Yoon. 2002. " Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans* ". *Mycobiology* 30 (3): 117.

Tieu, Q., y J. Nunnari. 2000. "Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division". *Journal of Cell Biology* 151 (2): 353–65.

Tieu, Quinton, Voytek Okreglak, Kari Naylor, y Jodi Nunnari. 2002. "The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p

during mitochondrial fission". *Journal of Cell Biology* 158 (3): 445–52.

Trevisan, Tatiana, Diana Pendin, Aldo Montagna, Sergio Bova, Anna Maria Ghelli, y Andrea Daga. 2018. "Manipulation of Mitochondria Dynamics Reveals Separate Roles for Form and Function in Mitochondria Distribution". *Cell Reports* 23 (6): 1742–53.

Valenciano, Susana, J. Ramón De Lucas, Ida Van Der Klei, Marten Veenhuis, y Fernando Laborda. 1998. "Characterization of *Aspergillus nidulans* peroxisomes by immunoelectron microscopy". *Archives of Microbiology* 170 (5): 370–76.

Verma, Surbhi, Viplendra P.S. Shakya, y Alexander Idnurm. 2018. "Exploring and exploiting the connection between mitochondria and the virulence of human pathogenic fungi". *Virulence* 9 (1): 426–46.

Voelz, Kerstin, Simon A. Johnston, Leanne M. Smith, Rebecca A. Hall, Alexander Idnurm, y Robin C. May. 2014. "'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak". *Nature Communications* 5: 1–12.

Wakabayashi, Junko, Zhongyan Zhang, Nobunao Wakabayashi, Yasushi Tamura, Masahiro Fukaya, Thomas W. Kensler, Miho Iijima, y Hiromi Sesaki. 2009. "The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice". *Journal of Cell Biology* 186 (6): 805–16.

Wanders, Ronald J.A., Hans R. Waterham, y Sacha Ferdinandusse. 2016. "Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (JAN): 1–15.

Wang, Xianhua, Xing Zhang, Di Wu, Zhanglong Huang, Tingting Hou, Chongshu Jian, Peng Yu, et al. 2017. "Mitochondrial flashes regulate ATP homeostasis in the heart". *eLife* 6: 1–20.

Yu, Jae Hyuk, Zsuzsanna Hamari, Kap Hoon Han, Jeong Ah Seo, Yazmid Reyes-Domínguez, y Claudio Scazzocchio. 2004. "Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi". *Fungal Genetics and Biology* 41 (11): 973–81.

Zhang, Wen, Xin Wang, Ping Li, Haibin Xiao, Wei Zhang, Hui Wang, y Bo Tang. 2017. "Illuminating Superoxide Anion and pH Enhancements in Apoptosis of Breast Cancer Cells Induced by Mitochondrial Hyperfusion Using a New Two-Photon Fluorescence Probe". *Analytical Chemistry* 89 (12): 6840–45.

Zielonka, Jacek, y B. Kalyanaraman. 2010. "Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth". *Free Radical Biology and Medicine* 48 (8): 983–1001.

Capítulo 4. El H₂O₂ induce la formación de constricciones mitocondriales transitorias en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$

Resumen

La división mitocondrial es un proceso que requiere de la proteína tipo dinamina DnmA y de su receptor FisA. Anteriormente (Capítulo 3), mostramos que el H₂O₂ induce la fisión mitocondrial en *Aspergillus nidulans* y que las proteínas DnmA y FisA son indispensables para este proceso. En este capítulo demostramos que en ausencia de DnmA o FisA, el H₂O₂ es capaz de inducir múltiples eventos de constricción mitocondrial, los cuales ocurren de manera transitoria a todo lo largo de los filamentos mitocondriales, incapaces de dividirse en estas condiciones. En ausencia de DnmA o FisA, el desacoplante mitocondrial CCCP, que induce fisión mitocondrial en varios organismos, también induce la formación masiva de constricciones mitocondriales. Sin embargo, dichas constricciones no son transitorias y producen una alteración drástica e irreversible de los filamentos mitocondriales, los cuales se observan como grandes esferas conectadas por filamentos delgados. Estos datos muestran que el H₂O₂ induce una respuesta mitocondrial rápida y generalizada, anterior a la división mitocondrial *per se* y sugieren que, aunque el mecanismo podría implicar una despolarización semejante a la causada por un desacoplante mitocondrial, dicho mecanismo posee características diferentes y transitorias.

Objetivo general

- Determinar la respuesta de los filamentos mitocondriales de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ al estrés oxidativo.

Objetivos específicos

1. Evaluar y comparar el efecto del H₂O₂ y el desacoplante CCCP en la morfología de los filamentos mitocondriales de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$

Introducción

La mitocondria es un organelo que cumple múltiples funciones dentro de la célula, tales como la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs, la beta oxidación de los ácidos grasos, la regulación de Ca^{++} y la síntesis de grupos hemo (McBride *et al.*, 2006). Las mitocondrias no funcionan de manera independiente ya que interactúan con otros organelos e influyen en distintas vías metabólicas y fisiológicas (Chan, 2012). Continuamente llevan a cabo eventos de fusión y fisión, lo cual se conoce como dinámica mitocondrial. Los eventos de fusión y fisión mitocondrial controlan el número, longitud, tamaño y forma de las mitocondrias y la frecuencia con que estas ocurren está balanceado en la célula de acuerdo al estado fisiológico (Detmer y Chan, 2007).

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, en el hongo *A. nidulans* se requieren las proteínas DnmA y FisA para que ocurra la fisión mitocondrial en condiciones normales, así como en respuesta al H_2O_2 (Garrido-Bazán, *et al.*, 2020). Aunque se ha reportado que otros agentes estresantes también son capaces de causar fisión mitocondrial, cada uno de estos agentes podría actuar por diferentes mecanismos. Un ejemplo de esto es la fragmentación inducida por el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) o el carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) que actúan como desacoplantes de la cadena respiratoria. Ambos producen mitocondrias fisionadas con un aspecto de esferas grandes, mientras que el estrés oxidativo produce mitocondrias fisionadas con formas esféricas de menor tamaño (Fan, Hussien y Brooks, 2010; Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Estas morfologías mitocondriales parecen estar relacionadas con diferentes respuestas celulares. La primera, se ha observado en estados celulares senescentes, mientras que las mitocondrias esféricas de menor tamaño se han asociado con la respuesta al estrés oxidativo (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2006; Willems *et al.*, 2015).

Un aspecto importante y sin explorar en los hongos filamentosos, es lo que ocurre con la morfología mitocondrial antes de, o en ausencia de, la división mitocondrial. En este sentido, las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ de *A. nidulans* representan un excelente modelo para dicho estudio. Mientras llevábamos a cabo este trabajo, Cho *et al.*, (2017) reportaron que previo a la división mitocondrial, se producen constricciones espontáneas

de la membrana interna mitocondrial (CoMIC), pero se desconoce el mecanismo por el cual dichas constricciones ocurren (Cho *et al.*, 2017).

Resultados

Las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ forman constricciones en respuesta al H_2O_2

Después de observar que el H_2O_2 no induce fragmentación mitocondrial en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, decidimos hacer observaciones más detalladas a tiempos más cortos, utilizando microscopía confocal. Primero observamos que sin estrés los filamentos mitocondriales de ambas mutantes no presentaron cambios morfológicos evidentes (**Figura 1**). Por el contrario, cuando las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ se expusieron a 5 mM de H_2O_2 por 5 minutos, notamos que el H_2O_2 indujo la formación de múltiples constricciones mitocondriales, produciendo una morfología semejante a la de un collar de perlas unidas entre sí por filamentos finos. Las constricciones perduraron sólo por un tiempo breve y posteriormente las mitocondrias retornaron a su morfología filamentosa inicial (**Figura 1**, las flechas indican las constricciones), lo cual explica que no las hayamos observado antes, en tiempos más largos de incubación con el H_2O_2 . Estos resultados indican claramente que el H_2O_2 dispara la formación de dichas constricciones y que este es un evento temprano, posiblemente anterior a la función de las proteínas DnmA y FisA en la fisión mitocondrial.

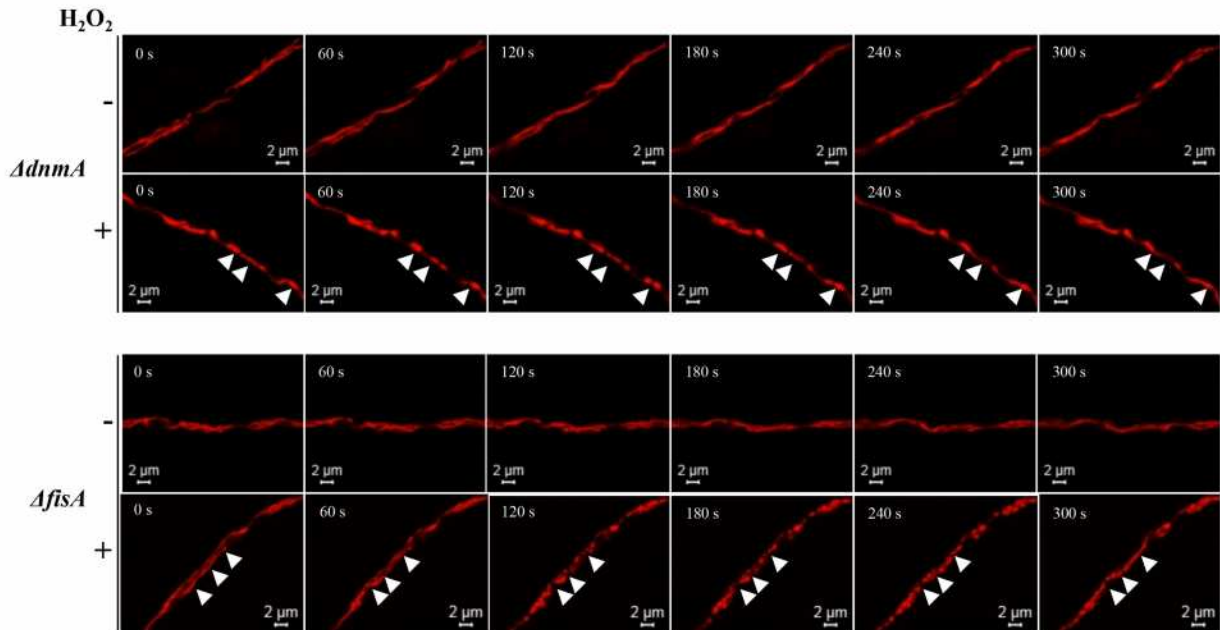


Figura 1. El H₂O₂ induce la formación de constricciones en las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$. Se crecieron las cepas CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) por 14 h a 37 °C. Posteriormente se cortaron cuadros de agar con micelio, se le adicionó o no 5 mM de H₂O₂. Después de 5 minutos se removió el H₂O₂ y 10 minutos después se observaron en el microscopio confocal. Se tomaron fotos cada 20 segundos durante 5 minutos. El tiempo 0s corresponde al inicio del registro fotográfico, después de haber retirado el H₂O₂. En la figura sólo se muestran tiempos representativos. Las flechas indican algunos eventos de constricción mitocondrial.

El agente desacoplante CCCP induce la fisión mitocondrial y la formación prolongada de constricciones mitocondriales.

Además del H₂O₂, decidimos explorar si el CCCP, un agente desacoplante de la cadena respiratoria, causaba fragmentación mitocondrial en *A. nidulans*, pues tanto en células HeLa como en células de osteosarcoma se ha reportado que provoca fisión mitocondrial (Legros *et al.*, 2002). Un tratamiento de 10 μ M de CCCP por 10 minutos indujo una completa fragmentación mitocondrial en una cepa WT (**Figura 2**). En las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, el CCCP también indujo la formación de constricciones mitocondriales. Sin embargo, al contrario de lo observado con el H₂O₂, éstas no fueron transitorias, permaneciendo como tales durante un tiempo prolongado (**Figura 2**), y tampoco se produjeron de manera regular y espaciada. En general, el CCCP alteró profundamente la morfología de las mitocondrias de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, las cuales se

observaron como aglomerados de compartimentos mitocondriales gigantes y esféricos, conectadas por filamentos muy delgados. Notablemente, esta morfología es mucho más acentuada en la mutante $\Delta fisA$ que en la mutante $\Delta dnmA$ (**Figura 2**). Estos resultados indican que, aunque tanto el H_2O_2 como el desacoplante CCCP son capaces de inducir la división mitocondrial y la formación de constricciones mitocondriales en ausencia de DnmA o FisA, los mecanismos y el resultado final parecen distintos. También sugieren que como propusimos antes (Garrido *et al.*, 2020), la carencia de DnmA y FisA no tiene exactamente las mismas consecuencias.

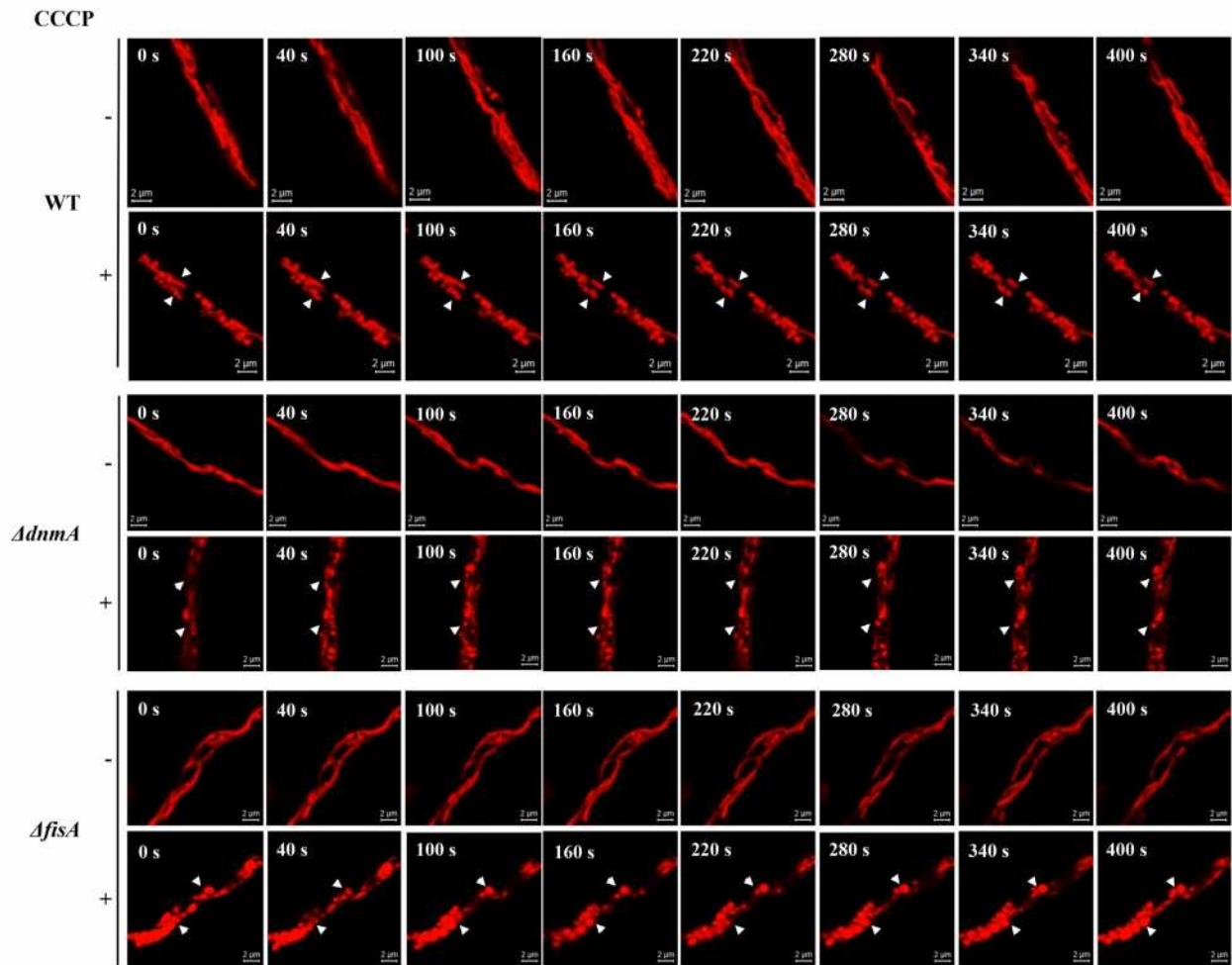


Figura 2. El CCCP induce fragmentación mitocondrial en una cepa WT, mientras que en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ induce la formación de grandes esferas mitocondriales interconectadas entre sí. Se creció micelio de las cepas TRV1 (WT), CVG1 ($\Delta dnmA$) y CVG2 ($\Delta fisA$) por 14 h a 37 °C. Posteriormente secciones de agar con micelio se trataron o no con 10 μ M de CCCP durante 10 minutos, se retiró la solución y se observaron en el microscopio confocal. El tiempo 0s corresponde al inicio del registro fotográfico, después de haber retirado el CCCP. Se tomaron fotos cada 20 segundos durante 7 minutos. En la figura se muestran tiempos

representativos. Las flechas indican eventos de fisión mitocondrial en la cepa WT y constricciones o cambios en la morfología mitocondriales.

Discusión

Las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ hacen constricciones mitocondriales en respuesta al H_2O_2 y al CCCP

Previamente reportamos que el H_2O_2 induce la fisión mitocondrial en *A. nidulans* (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015; Garrido, Pardo y Aguirre, 2020) y que las proteínas de la maquinaria de fisión, DnmA y FisA, son indispensables para esta respuesta. Sin embargo, aquí mostramos que aunque el H_2O_2 no es capaz de causar la división mitocondrial en mutantes $\Delta dnmA$ o $\Delta fisA$ (Garrido, Pardo y Aguirre, 2020), sus filamentos mitocondriales son capaces de formar constricciones transitorias en respuesta al H_2O_2 (**Figura 1**). Este tipo de constricciones mitocondriales se han observado en células de fibroblastos de embriones de ratón Dlp1-KO (homólogo de Dnm1 y Drp1)(Lee y Yoon, 2014a), y en neuronas que sobreexpresan a la proteína Drp1 sin actividad de GTPasa (Cho *et al.*, 2017b). Se ha propuesto que dichas constricciones mitocondriales son un evento previo a la fisión (Cho *et al.*, 2017b; Chakrabarti *et al.*, 2018) y, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual ocurren, se ha reportado que las constricciones ocurren en la membrana interna mitocondrial (Chakrabarti *et al.*, 2018). Nuestros datos sugieren que el H_2O_2 juega un papel importante en la inducción de estas constricciones mitocondriales. El H_2O_2 podría inducir la despolarización de la membrana interna mitocondrial (IMM), tal como se ha propuesto en miocitos de ratón expuestos a H_2O_2 (Legros *et al.*, 2002). En este sentido, una despolarización inducida por el H_2O_2 y el re-arreglo de la IMM (Fung *et al.*, 2019), podrían contribuir a la formación de constricciones. Un candidato que parece jugar un papel importante en estos cambios de la IMM, es la dinamina OPA1 (Lee y Yoon, 2014b; Cho y Sun, 2017; Fung *et al.*, 2019), pues dicha proteína se encarga de mantener la integridad de las crestas mitocondriales (Del Dotto *et al.*, 2017). Recientemente se han asociado a las proteínas Mic10 y Mic60, pertenecientes a un complejo denominado MICOS (Carvalho *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2017c), con la regulación de la estructura de la IMM, las constricciones mitocondriales y la fisión mitocondrial en células de mamíferos.

Posteriormente comparamos la respuesta de las mitocondrias al H_2O_2 y al desacoplante CCCP. Nuestros datos demostraron que al igual que en células de mamíferos, el CCCP fue capaz de inducir fisión mitocondrial. Sin embargo, el CCCP produjo constricciones permanentes y más espaciadas a lo largo del filamento mitocondrial, dejando aglomerados de mitocondrias fusionadas por delgados hilos mitocondriales (**Figura 2**), mientras que el H_2O_2 forma constricciones transitorias y continuas (**Figura 1**). En ambos casos el mismo filamento mitocondrial mostró continuidad y nunca se dividió. Esto sugiere que tanto el H_2O_2 como el CCCP producen una pérdida de potencial de membrana inicial (Legros et al. 2002; Kasianowicz, Benz y McLaughlin, 1984), lo cual llevaría a la formación de constricciones y cambios en la IMM. Sin embargo, dado que ambos compuestos producen distintos patrones de constricción y con diferente temporalidad, esto sugieren que cada compuesto induce otros cambios específicos en las mitocondrias. Por ejemplo, el H_2O_2 y el CCCP podrían inducir distintas respuestas celulares relacionadas con el transporte de calcio y el intercambio de K^+ (Chakrabarti *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2017c) en la mitocondria y algunos otros eventos específicos aún desconocidos.

Conclusiones

- Los filamentos mitocondriales de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ son capaces de formar constricciones transitorias en respuesta al H_2O_2 .
- El desacoplante CCCP es capaz de inducir fisión mitocondrial.
- En respuesta al CCCP los filamentos mitocondriales de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ forman constricciones permanentes y más espaciadas, dejando aglomerados de mitocondrias fusionadas por delgados hilos mitocondriales.

Materiales y métodos

Medios y cepas

Las cepas del presente trabajo se muestran en la tabla 1 (Capítulo 3). Todas las cepas se crecieron a 37 °C en medio mínimo (Hill y Kafer, 2001) con glucosa y los suplementos requeridos por cada cepa. El medio mínimo sólido contenía 1.25 % de agar.

Observaciones de microscopia

Los experimentos *in vivo* se hicieron en medio sólido y se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM800 con láser invertido. Se utilizó el objetivo de inmersión en aceite Plan Aplanachromat 63_/1.4. Para generar las muestras que se observaron en el microscopio confocal, se inocularon conidios por estriación en el medio mínimo más el suplemento requerido para cada cepa y se incubaron a 37 °C por 14 h. Posteriormente se cortaron cuadros de agar con micelio joven para su observación y para los tratamientos con H₂O₂ y CCCP.

Preparación de CCCP

Se utilizó una solución madre de CCCP a 1 mM diluida con etanol, posteriormente se hizo una dilución de trabajo a una concentración de 10 mM en H₂O. Se adicionaron 300 µL de la solución a las muestras y se incubaron por 10 minutos a 37 °C y después se hicieron dos lavados con H₂O y finalmente se observaron en el microscopio confocal.

Bibliografía

Carvalho, F. *et al.* (2020) “*Listeria monocytogenes* Exploits Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System Complex Subunit Mic10 To Promote Mitochondrial Fragmentation and Cellular Infection”, *mBio*, 11(1), pp. 1–17.

Chakrabarti, R. *et al.* (2018) “INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division”, *Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 251–268.

Chan, D. C. (2012) “Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health”, *Annual Review of Genetics*, 46(1), pp. 265–287.

Cho, B. *et al.* (2017a) “Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division”, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–17.

Cho, B. *et al.* (2017b) “Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division”, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 15754.

Cho, B. *et al.* (2017c) “Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division”, *Nature Communications*.

Cho, B. y Sun, W. (2017) “CoMIC, the hidden dynamics of mitochondrial inner compartments”, *BMB Reports*, 50(12), pp. 597–598.

Detmer, S. A. y Chan, D. C. (2007) “Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), pp. 870–879.

Del Dotto, V. *et al.* (2017) “OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions”, *Cell Reports*. Elsevier Company., 19(12), pp. 2557–2571. 3.

Fan, X., Hussien, R. y Brooks, G. A. (2010) “H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes”, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 49(11), pp. 1646–1654.

Fung, T. S. *et al.* (2019) “Two distinct actin filament populations have effects on mitochondria, with differences in stimuli and assembly factors”, *Journal of cell science*, 132(18).

Garrido, B. V., Pardo, J. P. y Aguirre, J. (2020) “DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission, and Regulate Mitochondrial Function, ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*”, 11(May), pp. 1–14.

Hill, T. W. y Kafer, E. (2001) “Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace

element and minimal medium salt stock solutions”, *Fungal Genetics Reports*, 48(1), pp. 20–21.

Jaimes-Arroyo, R. *et al.* (2015) “The SrkA kinase is part of the SakA Mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*”, *Eukaryotic Cell*, 14(5), pp. 495–510.

Kasianowicz, J., Benz, R. y McLaughlin, S. (1984) “The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-Chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes”, *The Journal of Membrane Biology*, 82(2), pp. 179–190.

Lee, H. y Yoon, Y. (2014a) “Transient contraction of mitochondria induces depolarization through the inner membrane dynamin opa1 protein”, *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), pp. 11862–11872.

Lee, H. y Yoon, Y. (2014b) “Transient contraction of mitochondria induces depolarization through the inner membrane dynamin opa1 protein”, *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), pp. 11862–11872.

Legros, F. *et al.* (2002) “Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins”, *Molecular Biology of the Cell*. Editado por T. D. Fox, 13(12), pp. 4343–4354.

McBride, H. M., Neuspiel, M. y Wasiak, S. (2006) “Mitochondria: More Than Just a Powerhouse”, *Current Biology*, 16(14), pp. 551–560.

Willems, P. H. G. M. *et al.* (2015) “Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics”, *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 22(2), pp. 207–218.

Yoon, Y.-S. *et al.* (2006) “Formation of Elongated Giant Mitochondria in DFO-Induced Cellular Senescence: Involvement of Enhanced Fusion Process Through Modulation of Fis1”, *Journal of cellular physiology*, 209(1), pp. 468–480.

Discusión general

Las cinasas SAPK SakA y MpkC en la percepción del estrés oxidativo

Nuestros resultados demuestran que el H₂O₂ es capaz de inducir diversos cambios fisiológicos en *A. nidulans*. Solo en algunos hongos como *Wallemia ichthyophaga* y *Hortaea weneckii* se han identificado dos SAPK, ambas con alta similitud y funciones redundantes (Konte y Plemenitas, 2013; Kejžar *et al.*, 2015). Además de SakA, *A. nidulans* y otros Aspergilli poseen una segunda SAPK, llamada MpkC. Anteriormente, nuestro laboratorio reportó que el H₂O₂ induce la interacción física entre las cinasas MAP SakA y MpkC y la MAPKAP SrkA, así como la interacción de SrkA con diversas proteínas mitocondriales (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). En este trabajo encontramos que en respuesta al H₂O₂, SrkA se localiza inicialmente en los núcleos y posteriormente en las mitocondrias (**Capítulo 1, figura 1**). Notablemente, en ausencia de SakA y MpkC, SrkA se acumula exclusivamente en las mitocondrias. Estos resultados apoyan la idea de que SrkA posee funciones tanto nucleares como mitocondriales, aunque estas últimas quedan por definirse.

En este trabajo logramos entender parte de la relación entre SakA y MpkC, al demostrar que tienen funciones comunes y también opuestas durante el ciclo de vida de *A. nidulans*. Por un lado, demostramos que la MAPKK PbsB regula la localización nuclear de SakA y MpkC durante el desarrollo y en respuesta al estrés y por lo tanto regula la fosforilación de ambas cinasas. Por otro lado, demostramos que, aunque en hifas ambas cinasas se acumulan en el núcleo en respuesta al estrés oxidativo y osmótico (**Capítulo 2, figuras 5 y 7**), éstas regulan la resistencia al estrés oxidativo de manera opuesta en los conidios (**Capítulo 2, figura 3**). Aún desconocemos el mecanismo por el cual, en ausencia de SakA, MpkC contribuye a una mayor resistencia al H₂O₂ en los conidios. Es claro que la activación de la cinasa SakA en los conidios detiene la mitosis y esto mantiene su latencia terminal (Lara-Rojas *et al.*, 2011). En cambio, la generación cíclica de conidios implica la partición funcional de dos núcleos, el que ingresa al conidio recién formado detenido en la fase G1 del ciclo celular, y el que permanece en la célula conidiogénica o fiálide. La fiálide genera los conidios en condiciones de estrés (deseccación, osmótico, oxidativo),

por lo que debe retrasar, mas no detener, el ciclo celular antes de la siguiente mitosis. Nosotros proponemos que dicho retraso se logra mediante una segunda MAPK (MpkC), con menor actividad que SakA, en el núcleo de la célula conidiogénica. La posible menor actividad de MpkC podría deberse a una baja actividad intrínseca de cinasa (por comprobar) y/o la comprobada baja expresión del gen *mpkC* (Garrido-Bazán *et al.*, 2018; Reyes *et al.*, 2006).

SakA interactúa con MpkC y SrkA (ortólogo de *Srk1*), así como con otras proteínas posiblemente involucradas en la regulación del ciclo celular y SakA también regula la localización nuclear de SrkA (Jaimes-Arroyo *et al.*, 2015). Esto sugiere que MpkC podría asimismo regular el ciclo celular a través de SrkA.

El H₂O₂ y la fisión mitocondrial

Además de activar la vía de SakA y MpkC, el H₂O₂ también induce la fisión mitocondrial, de manera dependiente de las proteínas DnmA y FisA (**Capítulo 3, figura 3**). En *Podospora anserina* se reportó que la fragmentación mitocondrial inducida por H₂O₂ y la observada en cultivos senescentes no depende de Dnm1 e incluso que la delección de *dnm1* y *fis1* no causa defectos en la morfología del micelio, tasa de crecimiento o la fertilidad, aunque sí se observó un notable incremento en la esperanza de vida (Scheckhuber *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se reportó que *dnm1* y *fis1* se requieren para un desarrollo sexual normal (Navarro-Espíndola *et al.*, 2020). En el hongo *Cryptococcus deuterogatti* la formación de mitocondrias tubulares correlaciona con el aumento en su parasitismo intracelular en los macrófagos y notablemente, en esta especie el H₂O₂ no induce la fisión sino la tubularización mitocondrial (Voelz *et al.*, 2014). Esto demuestra que independientemente del resultado final (fisión o fusión), el H₂O₂ juega un papel crítico en la regulación de la dinámica mitocondrial.

Debido a que en glucosa la falta de las proteínas DnmA y FisA no afecta drásticamente ni el número ni la morfología de los peroxisomas (**Capítulo 3, figura 6**), consideramos

que los defectos observados en el desarrollo de las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ son causados principalmente por la falta de fisión mitocondrial.

Múltiples evidencias muestran que las ERO regulan el desarrollo de los hongos (Hansberg y Aguirre 1990; Lara-Ortíz, *et al.*, 2003; Cano-Domínguez *et al.* 2008; Cano-Domínguez *et al.*, 2019; Lara-Rojas *et al.*, 2011; Mendoza-Martínez *et al.*, 2017; Garrido-Bazán *et al.*, 2018). Nosotros hemos demostrado que la división mitocondrial está críticamente asociada al desarrollo y a la producción de las ERO en los hongos y que a su vez, la división mitocondrial está regulada por las ERO. Sin embargo, se requiere de mayor investigación para determinar los mecanismos por los que se regulan estos procesos y cómo se relacionan entre sí.

También encontramos que la falta de fisión mitocondrial tiene como consecuencia una disminución moderada de la respiración *in vivo* (**Capítulo 3, figura 8**) y un notable incremento en los niveles de las ERO mitocondriales (**Capítulo 3, figura 9**). La idea de que dichas ERO corresponden al anión superóxido está apoyada porque el pretratamiento con Mito TEMPO, un (scavenger) del superóxido mitocondrial, disminuyó drásticamente la detección de ERO mitocondriales (**Capítulo 3, figura 10**) y porque las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$ resultaron sensibles a la menadiona, compuesto que induce la formación de superóxido mitocondrial, pero resistentes al H_2O_2 externo. Notablemente, las mitocondrias de una cepa WT también se tiñeron con MitoSOX cuando la cepa se creció en etanol como fuente de carbono (**Capítulo 3, figura 9**). En un trabajo previo del laboratorio se mostró que el etanol induce estrés oxidativo, de acuerdo con la localización nuclear de NapA, un factor de transcripción regulado por el estado redox celular (Mendoza-Martínez *et al.*, 2017). A pesar de los altos niveles de ERO mitocondriales en las mutantes $\Delta dnmA$ y $\Delta fisA$, éstas están adaptadas al estrés oxidativo, puesto que en respuesta al H_2O_2 tuvieron la capacidad de relocalizar a la cinasa SrkA al núcleo (**Capítulo 3, figura 12**).

El H₂O₂ y el CCCP inducen la formación de constricciones mitocondriales

Aunque el H₂O₂ no es capaz de causar la división mitocondrial en mutantes $\Delta dnmA$ o $\Delta fisA$ (Garrido, Pardo y Aguirre, 2020), sus filamentos mitocondriales pueden formar constricciones transitorias en respuesta al H₂O₂ (**Capítulo 4, figura 1**). Este tipo de constricciones mitocondriales se han observado en células de fibroblastos de embriones de ratón con baja expresión de Dlp1 (homólogo de Dnm1 y Drp1) (Lee y Yoon, 2014a), y en neuronas que sobreexpresan a la proteína Drp1 sin actividad de GTPasa (Cho *et al.*, 2017b). Se ha propuesto que dichas constricciones mitocondriales son un evento previo a la fisión (Cho *et al.*, 2017b; Chakrabarti *et al.*, 2018) y, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual suceden, se ha reportado que las constricciones ocurren en la membrana interna mitocondrial (Chakrabarti *et al.*, 2018). Nuestros datos sugieren que el H₂O₂ juega un papel importante en la inducción de estas constricciones mitocondriales. El H₂O₂ podría inducir la despolarización de la membrana interna mitocondrial (IMM), tal como se ha propuesto en miocitos de ratón expuestos a H₂O₂ (Legros *et al.*, 2002). En este sentido, una despolarización inducida por el H₂O₂ y el re-arreglo de la IMM (Fung *et al.*, 2019), podrían contribuir a la formación de las constricciones.

La presencia del desacoplante CCCP también produjo constricciones. Sin embargo, éstas no fueron transitorias y ocurrieron de manera más espaciada a lo largo del filamento mitocondrial, produciendo aglomerados de regiones mitocondriales, que se mantuvieron fusionadas por delgados hilos mitocondriales (**Capítulo 4, figura 2**). Esto sugiere que tanto el H₂O₂ como el CCCP producen una pérdida de potencial de membrana inicial (Legros *et al.* 2002; Kasianowicz, Benz y McLaughlin, 1984), lo cual llevaría a la formación de constricciones y cambios en la IMM. Sin embargo, dado que ambos compuestos producen distintos patrones de constricción y con diferente temporalidad, esto sugieren que cada compuesto induce otros cambios específicos en las mitocondrias.

Conclusiones generales

- En ausencia de SakA y en los primeros minutos de exposición al H₂O₂, la cinasa SrkA, posible sustrato de la MAPK SakA, se dirige al núcleo en un proceso dependiente de la MAPK MpkC. En ausencia de SakA, la localización de SrkA mitocondrial se incrementa y en ausencia de SakA y MpkC, SrkA muestra una localización exclusivamente mitocondrial. Estos datos indican que SrkA posee funciones nucleares y mitocondriales, como parte de la respuesta al H₂O₂.
- Además de SakA, la cinasa MpkC es importante para la regulación de la conidiación y la respuesta al estrés oxidativo y osmótico.
- La localización y función de las cinasas MpkC y SakA, dependen de la MAPKK PbsB.
- El H₂O₂ induce la división mitocondrial en *A. nidulans* de manera dependiente de las proteínas DnmA y FisA, las cuales también participa en la división peroxisomal.
- La falta de DnmA o FisA produce una severa reducción en el crecimiento y la diferenciación asexual y sexual, una moderada disminución en la respiración y un incremento notable en la producción de ERO mitocondriales. A pesar de esto, las mutantes sin fisión mitocondrial son capaces de percibir y responder al estrés oxidativo causado por el H₂O₂ externo.
- En *A. nidulans* existe una estrecha relación entre las ERO, la división mitocondrial y el desarrollo.
- En ausencia de división mitocondrial, tanto el H₂O₂ como el CCCP inducen la formación de distintos patrones de constricción mitocondrial, sugiriendo que parte de esta respuesta al H₂O₂ podría deberse a la inducción de una despolarización mitocondrial.
- Nuestros resultados muestran la importancia de las especies reactivas del oxígeno en la regulación de procesos celulares fundamentales, como lo son la división mitocondrial y la diferenciación celular.

Bibliografía general

Adams, T. H., Wieser, J. K. y Yu, J.-H. (1998) "Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), pp. 545–545.

Aguirre, J. *et al.* (2005) "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes", *Trends in Microbiology*, 13(3), pp. 111–118.

Appleyard, M. V. C. L., McPheat, W. L. y Stark, M. J. R. (2000) "A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*", *Current Genetics*, 37(6), pp. 364–372.

Aquilano, K., Baldelli, S. y Ciriolo, M. R. (2014) "Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant", *Frontiers in Pharmacology*, 5 AUG(August), pp. 1–12.

Blumenstein, A. *et al.* (2005) "The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light", *Current Biology*, 15(20), pp. 1833–1838.

Brewster, J. L. y Gustin, M. C. (2014) "Hog1: 20 years of discovery and impact", *Science Signaling*, 7(343), pp. 1–11.

Caffrey, D. R., O'Neill, L. A. J. y Shields, D. C. (1999) "The evolution of the map kinase pathways: Coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades", *Journal of Molecular Evolution*, 49(5), pp. 567–582.

Cano-Domínguez, N. *et al.* (2008) "NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*", *Eukaryotic Cell*, 7(8), pp. 1352–1361.

Cano-Domínguez, N. *et al.* (2019) "*Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane", *Frontiers in Microbiology*, 10(August), pp. 1–14.

Casselton, L. y Zolan, M. (2002) "The art and design of genetic screens: Filamentous fungi", *Nature Reviews Genetics*, 3(9), pp. 683–697.

Chakrabarti, R. *et al.* (2018) "INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division", *Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 251–268.

Cho, B. *et al.* (2017) "Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 15754.

Clutterbuck, A. . (1974) *Aspergillus nidulans*, *Bacteria, Bacteriophages and Fungi*.

D'Autréaux, B. y Toledano, M. B. (2007) "ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), pp. 813–824.

Davies, K. J. A. (2000) "An overview of oxidative stress", *IUBMB Life*, 50(4–5), pp. 241–244.

Day, A. M. y Quinn, J. (2019) "Stress-activated protein kinases in human fungal pathogens", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JUL), pp. 1–15.

Dickinson, B. C. y Chang, C. J. (2011) "Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses", *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 7(8), pp. 504–511.

Fung, T. S. *et al.* (2019) "Two distinct actin filament populations have effects on mitochondria, with differences in stimuli and assembly factors", *Journal of cell science*, 132(18).

Furukawa, K. *et al.* (2002) "Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*", *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp. 5304–5310.

Furukawa, K. *et al.* (2005) "Aspergillus nidulans HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress", *Molecular Microbiology*, 56(5), pp. 1246–1261.

G.Pontecorvo (1953) "The Genetics of *Aspergillus nidulans*", *Advances in Genetics*, 5(1), pp. 141–238.

Garrido-Bazán, V. *et al.* (2018) "SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*", *Frontiers in Microbiology* , p. 2518.

Garrido, B. V., Pardo, J. P. y Aguirre, J. (2020) "DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission , and Regulate Mitochondrial Function , ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*", 11(May), pp. 1–14.

Gavrias, V., Timberlake, W. E. y Adams, T. H. (2001) "Aspergillus Nidulans", *Encyclopedia of Genetics*, pp. 106–111.

Gustin, M. C. *et al.* (1998) "MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), pp. 1264–1300.

Hamel, L. P. *et al.* (2012) "Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: Distinct messages from conserved messengers", *Plant Cell*, 24(4), pp. 1327–1351.

Hansberg, W. (2002) "BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS", *Mensaje Bioquímico*, XXVI(9), pp. 19–54.

Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen", *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), pp. 201–221.

Hayashi, S. *et al.* (2014) "Control of reactive oxygen species (ROS) production through histidine kinases in *Aspergillus nidulans* under different growth conditions", *FEBS Open Bio*. Elsevier Ltd., 4, pp. 90–95.

Hermann, T. E., Kurtz, M. B. y Champe, S. P. (1983) "Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*", *Journal of Bacteriology*, 154(2), pp. 955–964.

Herskowitz, I. (1995) "MAP kinase pathways in yeast: For mating and more", *Cell*, 80(2), pp. 187–197.

Houbraken, J., de Vries, R. P. y Samson, R. A. (2014) *Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species*. 1a ed, *Advances in Applied Microbiology*. 1a ed. Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Jaimes-Arroyo, R., Lara -Rojas F., Bayram O., Valerius O., Braus H. G., 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*", *Eukaryotic Cell*, 14(5), pp. 495–510.

Jamieson, D. J. (1998) "Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, 14(16), pp. 1511–1527.

Kasianowicz, J., Benz, R. y McLaughlin, S. (1984) "The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-Chlorophenylhydrazine) transports protons across membranes", *The Journal of Membrane Biology*, 82(2), pp. 179–190.

Kejžar, A. *et al.* (2015) "HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments", *Fungal Genetics and Biology*, 74, pp. 45–58.

Konte, T. y Plemenitas, A. (2013) "The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B", *Extremophiles*, 17(4), pp. 623–636.

Krijgsheld, P. *et al.* (2013) "Development in aspergillus", *Studies in Mycology*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 74, pp. 1–29.

Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H. y Aguirre, J. (2003) "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*", *Molecular Microbiology*, 50(4), pp. 1241–1255.

Lara-Rojas, F. *et al.* (2011) “Aspergillus nidulans transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions”, *Molecular Microbiology*, 80(2), pp. 436–454.

Lee, H. y Yoon, Y. (2014) “Transient contraction of mitochondria induces depolarization through the inner membrane dynamin opa1 protein”, *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), pp. 11862–11872.

Legros, F. *et al.* (2002) “Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins”, *Molecular Biology of the Cell*. Editado por T. D. Fox, 13(12), pp. 4343–4354.

Lismont, C. *et al.* (2015) “Redox interplay between mitochondria and peroxisomes”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(MAY).

Martin, M. A., Osmani, S. A. y Oakley, B. R. (1997) “The role of γ -tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*”, *Journal of Cell Science*, 110(5), pp. 623–633.

Mendoza-Martínez, A. E. *et al.* (2017) “NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*”, *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), pp. 1–23.

Mims, C. W., Richardson, E. A. y Timberlake, W. E. (2005) “Mims 1988 Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus nidulans*”, pp. 1–10.

Navarro-Espíndola, R. *et al.* (2020) “Distinct Contributions of the Peroxisome-Mitochondria Fission Machinery During Sexual Development of the Fungus *Podospora anserina*”, *Frontiers in Microbiology*, 11(April), pp. 1–23.

Pontecorvo, G. (1956) “The Parasexual Cycle in Fungi”, *Annual Review of Microbiology*, 10(1), pp. 393–400.

Reyes, G. *et al.* (2006) “Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars”, *Eukaryotic Cell*, 5(11), pp. 1934–1940.

del Río, L. A. *et al.* (1992) “Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications”, *Free Radical Biology and Medicine*, 13(5), pp. 557–580.

Saito, H. y Tatebayashi, K. (2004) “Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast”, *Journal of Biochemistry*, 136(3), pp. 267–272.

Scheckhuber, C. Q. *et al.* (2007) “Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models”, *Nature Cell Biology*, 9(1), pp. 99–105.

Sies, H. (1986) "Biochemistry of Oxidative Stress", *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), pp. 1058–1071.

Sies, H. y Jones, D. P. (2020) "Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 21(7), pp. 363–383.

Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre, J. (1995) "Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene", *Microbiology*, 141(1), pp. 21–28.

Smith, D. A., Morgan, B. A. y Quinn, J. (2010) "Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways", *FEMS Microbiology Letters*, 306(1), pp. 1–8.

Smith, D. L. y Nilar, S. H. (2010) "Homology Modeling Studies of Yeast Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKS): Structural Motifs as a Basis for Specificity", *Protein & Peptide Letters*, 17(6), pp. 732–738.

Sohn, K. T. y Yoon, K. S. (2002) " Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans* ", *Mycobiology*, 30(3), p. 117.

Troppens, D. M. *et al.* (2020) "Hülle cells of *aspergillus nidulans* with nuclear storage and developmental backup functions are reminiscent of multipotent stem cells", *mBio*, 11(4), pp. 1–15.

Vargas-Pérez, I. *et al.* (2007) "Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*", *Eukaryotic Cell*, 6(9), pp. 1570–1583.

Voelz, K. *et al.* (2014) "'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–12.

Winkler, A. *et al.* (2002) "Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway , and Protein Tyrosine Phosphatases", *Society*, 1(2), pp. 163–173.

Yu, Z., Armant, O. y Fischer, R. (2016) "Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling", *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 1(5).

Zeeshan, H. M. A. *et al.* (2016) "Endoplasmic reticulum stress and associated ROS", *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), pp. 1–20.

Zhao, X., Mehrabi, R. y Xu, J. R. (2007) "Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis", *Eukaryotic Cell*, 6(10), pp. 1701–1714.