



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

El Silenciamiento Génico de *Mucor circinelloides*

Regula la Cromatina Centromérica
y la Virulencia

D. Carlos Pérez Arques

2020

El silenciamiento génico de *Mucor circinelloides* regula la cromatina centromérica y la virulencia

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología (Área de Genética) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección y supervisión de D. Victoriano Garre Mula y D. Francisco Esteban Nicolás Molina, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología con Mención de Doctorado Internacional, por el graduado Carlos Pérez Arques.

Esta memoria ha sido concebida como un compendio de las tres publicaciones siguientes:

Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F.E., Garre, V. (2019). *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *mBio* 10, 1–15. doi:10.1128/mBio.02765-18

Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, Panchal, S., Nicolás, F.E., Mondo, S.J., Ganguly, P., Pangilinan, J., Grigoriev, I. V., Heitman, J., Sanyal, K., Garre, V. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology* 29, 1–12. doi:10.1016/j.cub.2019.09.024

Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Murcia, L., Navarro, E., Garre, V., Nicolás, F.E. (2020). A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genetics* 16, e1008611. doi:10.1371/journal.pgen.1008611

Otras publicaciones producidas durante la tesis doctoral

Trieu, T.A., Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, Sanchis, M., Capilla, J., Navarro-Rodríguez, P., Lopez-Fernandez, L., Torres-Martínez, S., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R.M., Nicolás, F.E. (2017). RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathogens* 13, e1006150. doi:10.1371/journal.ppat.1006150

Patiño-Medina, J.A., Maldonado-Herrera, G., **Pérez-Arques, C.**, Alejandro-Castañeda, V., Reyes-Mares, N.Y., Valle-Maldonado, M.I., Campos-García, J., Ortiz-Alvarado, R., Jácome-Galarza, I.E., Ramírez-Díaz, M.I., Garre, V., Meza-Carmen, V. (2018). Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current Genetics* 64, 853–869. doi:10.1007/s00294-017-0798-0

López-Fernández, L., Sanchis, M., Navarro-Rodríguez, P., Nicolás, F.E., Silva-Franco, F., Guarro, J., Garre, V., Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, Capilla, J. (2018). Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence* 9, 707–730. doi:10.1080/21505594.2018.1435249

- Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M.I., Garcia, A., Murcia, L., **Pérez-Arques, C.**, Garre, V., Nicolas, F.E., Lee, S.C. (2018). *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current Protocols in Microbiology* 49, e53. doi:10.1002/cpmc.53
- Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F.E., Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific Reports* 8, 7660. doi:10.1038/s41598-018-26051-x
- Nicolás, F.E., Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, López-García, S., Navarro, E., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2018). Molecular tools for carotenogenesis analysis in the mucoral *Mucor circinelloides*. In *Microbial Carotenoids. Methods in Molecular Biology*, C. Barreiro and J. L. Barredo, eds. (Humana Press, New York, NY). doi:10.1007/978-1-4939-8742-9_13
- Patiño-Medina, J.A., Valle-Maldonado, M.I., Maldonado-Herrera, G., **Pérez-Arques, C.**, Jácome-Galarza, I.E., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A.L., Araiza-Cervantes, C.A., Villagomez-Castro, J.C., Campos-García, J., Ramírez Díaz, M.I., Garre, V., Meza-Carmen, V. (2019). Role of Arf-like proteins (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal Genetics and Biology* 129, 40–51. doi:10.1016/j.fgb.2019.04.011
- Patiño-Medina, J.A., Reyes-Mares, N.Y., Valle-Maldonado, M.I., Jácome-Galarza, I.E., **Pérez-Arques, C.**, Nuñez-Anita, R.E., Campos-García, J., Anaya-Martínez, V., Ortiz-Alvarado, R., Ramírez-Díaz, M.I., Lee, S.C., Garre, V., Meza-Carmen, V. (2019). Heterotrimeric G-alpha subunits Gpa11 and Gpa12 define a transduction pathway that control spore size and virulence in *Mucor circinelloides*. *PLoS ONE* 14, e0226682. doi:10.1371/journal.pone.0226682
- Lebreton, A., Corre, E., Jany, J.L., Brillet-Guéguen, L., **Pérez-Arques, C.**, Garre, V., Monsoor, M., Debuchy, R., Meur, C., Coton, E., Barbier, G., Meslet-Cladière, L. (2020). Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC Genomics* 21, 135. doi:10.1186/s12864-019-6256-2
- Lax, C., Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Cánovas-Márquez, J.T., Tahiri, G., Pérez-Ruiz, J.A., Osorio-Concepción, M., Murcia-Flores, L., Navarro, E., Garre,

V., Nicolás, F.E. (2020). Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes* 11, 317. doi:10.3390/genes11030317

Valle-Maldonado, M.I., Patiño-Medina, J.A., **Pérez-Arques, C.**, Reyes-Mares, N.Y., Jácome-Galarza, I.E., Ortiz-Alvarado, R., Vellanki, S., Ramirez-Diaz, M.I., Lee, S.C., Garre, V., Meza-Carmen, V. (2020). The heterotrimeric G-protein beta subunit Gpb1 controls hyphal growth under low oxygen conditions through the protein kinase A pathway and is essential for virulence in the fungus *Mucor circinelloides*. *Cellular Microbiology*, e13236. Advance online publication. doi:10.1111/cmi.13236

Nicolás, F E., Murcia, L., Navarro, E., Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., Garre, V. (2020). Mucorales species and macrophages. *Journal of Fungi* 6, 94. doi:10.3390/jof6020094

Esta tesis se ha desarrollado dentro de los proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (BFU2015-65501-P cofinanciado por FEDER), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (PGC2018-097452-B-I00 cofinanciado por FEDER) y la Fundación Séneca Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (19339/PI/14).

Carlos Pérez Arques ha realizado la tesis doctoral financiada por una ayuda para la Formación de Profesorado Universitario por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (FPU14/01983), y opta a la mención de doctorado internacional gracias a la estancia realizada en la Universidad de Duke en Estados Unidos financiada por una ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales de beneficiarios FPU (EST16/00497).

Para Maribel

AGRADECIMIENTOS

Toda aventura toca su fin y, aunque el viaje ha sido largo, todavía mantengo la misma ilusión que cuando se inició. Al echar la vista atrás, no puedo evitar sentir un profundo agradecimiento hacia todas las personas que me han ayudado en este camino, a las que quiero dedicar estas palabras. Víctor y Curro, mis directores. No podría haber estado bajo mejores manos y quiero que sepáis que sin vosotros nada de esto habría sido posible. Obvio, pensaréis. Pero no me refiero solo a vuestras firmas. Si algo he aprendido, que espero que sí, os lo debo a vosotros. A vuestra infinita paciencia y a todo el tiempo que me habéis dedicado, a vuestro rigor científico, a vuestra genialidad y, sobre todo, a vuestra insaciable voluntad por enseñar. Gracias. Gracias también a Joe Heitman, una persona que respira ciencia, incansable y vivaz, por acogerme durante mi estancia. Y cómo no, gracias a Rosa y Santi, por catapultarme al doctorado. Aunque ya no ocupéis vuestros despachos, vuestra obra continúa. Y nosotros, aupados a hombros de gigantes, intentamos que sigáis orgullosos del grupo que creasteis. No es fácil.

A mi Maestro Jedi, Sergio, por guiarme por el sendero luminoso durante mi iniciación en la ciencia. Gracias por tu bondad, tus buenos consejos y por todo el tiempo que te hice perder. Ojalá la vida te trate con justicia y te devuelva todo lo que nos has dado a tus jóvenes Padawanes. Laura, ejemplo de dedicación y tesón, gracias por contagiarme tu alegría. Te deseo lo mejor. Sebi, siempre has estado ahí. La mano invisible que hace que todo vaya bien. Gracias por tu cercanía, por tu calma y tu ayuda.

A mis compañeros, de todos los lugares. Gracias por los momentos compartidos, por hacer volar el tiempo. A los viejos, gracias por hacerme sentir en casa; y a los nuevos, espero haberos ayudado. El doctorado no es un camino fácil, pero vosotros habéis hecho que merezca la pena. No os preocupéis si se os hace bola, nos pasa a todos. Recordad que “El mejor maestro, el fracaso es”. De todos he aprendido, y muchos me habéis apoyado. A los últimos, gracias de corazón.

A los profesores que me han hecho mella. Demasiados para nombrar aquí. Durante la carrera habéis moldeado mi camino, y dirigido mis pasos hacia donde hoy estoy. Gracias a todos, en especial a un señor de vara y bigote. Sin sus lecciones, no estaría aquí.

Por último, gracias a mi familia y amigos. A mis padres, que lo han sacrificado todo por mí y los míos. Me habéis dado lo más valioso, la vida y la herencia. Genética, claro. Pero también me habéis enseñado a ser persona. Qué pena haber aprendido tan

poco. No lo podríais haber hecho mejor, dada mi materia prima. Os quiero y estoy orgulloso de vosotros. A mi hermano, cuya sombra siempre me ha cobijado. A mis amigos, gracias por aguantarme. Y lo que os queda. Nuestros lazos no los rompe la distancia y, aunque pase el tiempo, sé que siempre podré contar con vosotros.

Al amor de mi vida, gracias porque a ti te lo debo todo. Nos hemos arrastrado juntos por este camino, y juntos saldremos de él. Largas jornadas unidos, lamentando que los días sean tan cortos. Recuerdos que permanecerán para siempre cautivos en mi memoria. Por eso sé que, pase lo que pase, tú siempre serás mi constante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN (SUMMARY)	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Biología de hongos mucorales	5
I.1.1. Filogenia, descripción morfológica, ecología y beneficios biotecnológicos	5
I.1.2. <i>Mucor circinelloides</i> como organismo modelo	7
I.2. Mucormicosis	11
I.2.1. Epidemiología y factores de riesgo	11
I.2.2. Interacción con el sistema inmune innato y factores de virulencia	12
I.3. Silenciamiento génico mediado por RNA en Mucorales	16
I.3.1. Generalidades del mecanismo de silenciamiento génico	16
I.3.2. Diversidad de pequeños RNAs endógenos y su papel en la regulación génica	19
I.3.3. Rutas de silenciamiento génico en <i>M. circinelloides</i>	24
I.4. Identidad de la cromatina centromérica	30
I.4.1. Función y estructura del complejo cinetocoro-centrómero	30
I.4.2. Cromatina centromérica en hongos	34
II. JUSTIFICACIÓN	41
III.PUBLICACIONES	47
III.1. Early diverging fungus <i>Mucor circinelloides</i> lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres	49
III.2. <i>Mucor circinelloides</i> thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway	51
III.3. A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales	53
IV.CONCLUSIONES	55
V. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. El árbol de la vida de los hongos	5
Figura I.2. Estructuras reproductivas de hongos Mucorales	6
Figura I.3. Ciclo de vida de <i>Mucor</i> spp.....	10
Figura I.4. Interacción macrófago-espora.....	13
Figura I.5. La transición levadura-micelio está implicada en la interacción con el sistema inmune innato y la virulencia	15
Figura I.6. Mecanismo general de silenciamiento génico.....	18
Figura I.7. Biogénesis y mecanismo de acción de los piRNAs en animales.....	21
Figura I.8. Fuentes genómicas de RNA de doble cadena	23
Figura I.9. Proteínas involucradas en la maquinaria de RNAi de <i>Mucor circinelloides</i>	25
Figura I.10. Rutas de RNAi identificadas en <i>Mucor circinelloides</i>	27
Figura I.11. Función del cinetocoro en la biorientación de los cromosomas	30
Figura I.12. Estructura general del cinetocoro en eucariotas	31
Figura I.13. Tipos de centrómeros	34
Figura I.14. Cromatina centromérica en el subreino Dikarya	36

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura <i>Abbreviation</i>	Castellano	<i>English</i>
5mC	Metilación de citosinas, o 5-metilcitosina	Cytosine methylation, 5-methylcytosine
Ago	Proteína Argonauta	Argonaute protein
aRNA	RNA aberrante	Aberrant RNA
AT	Par de bases de adenina y timina	Adenine and thymine basepair
ATF	Factor de transcripción activador	Activating transcription factor
bp	Pares de bases	Base pairs
BPM	Bins por millón de lecturas alineadas	Bins per million mapped reads
CC	Núcleo del centrómero	Core centromere
CCAN	Red constitutiva asociada al centrómero	Constitutive centromere-associated network
CDE	Elemento determinante del centrómero	Centromere-determining element
CENP	Proteína centromérica	Centromere protein
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación	Chromatin immunoprecipitation and sequencing
CLR	Receptor de lectinas de tipo C	C-type lectin receptor
CPM	Cuentas por millón de lecturas alineadas	Counts per million mapped reads
CT	Umbral de ciclos	Cycle threshold
Dcl	Proteína similar a Dicer	Dicer-like protein
DEG	Gen diferencialmente expresado	Differentially expressed gene
dsRNA	RNA de doble cadena, RNA bicatenario	Double-stranded RNA
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada	Enhanced green fluorescent protein
endo-siRNA	siRNA endógeno	Endogenous siRNA
esRNA	RNA pequeño endógeno	Short endogenous RNA
ex-siRNA	siRNA derivado de exones	Exonic siRNA

Abreviatura <i>Abbreviation</i>	Castellano	<i>English</i>
FBS	Suero bovino fetal	Fetal bovine serum
FDR	Tasa de falsos positivos	False discovery rate
FPKM	Fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas	Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads
GO	Nomenclatura de ontología génica	Gene ontology
Grem-LINE1	Retroelemento genómico de los Mucoromycotina similar a LINE1	Genomic retroelement of Mucoromycotina LINE1-like
H3K9me2/ H3K9me3	Di/trimetilación de histonas H3 en la lisina 9	Di/trimethylation at the 9th lysine of the histone H3 protein
HFD	Dominio de plegamiento de las histonas	Histone fold domain
kb	Kilobases	Kilobases
KMN	Kln1-Mis12-Ndc80	Kln1-Mis12-Ndc80
KOG	Grupos de ortólogos eucarióticos	Eukaryotic orthologous groups
LTR	Repetición terminal larga	Long terminal repeat
miRNA	Similar a miRNA	miRNA-like
miRNA	Micro RNA	Micro RNA
MMC	Medio mínimo con casaminoácidos	Minimal medium with Casamino Acids
mRNA	RNA mensajero	Messenger RNA
MSUD	Silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado	Meiotic silencing by unpaired DNA
NCRIP	Ruta de RNAi no canónica	Non-canonical RNAi pathway
NLR	Receptor de tipo NOD	NOD-like receptor
nt	Nucleótidos	Nucleotides
ORF	Marco abierto de lectura	Open reading frame
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate-buffered saline

Abreviatura <i>Abbreviation</i>	Castellano	<i>English</i>
piRNA	RNA asociado a proteínas PIWI	PIWI-interacting RNA
poly(A)	Poliadenilación	Polyadenylation
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones	Pattern recognition receptor
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional	Post-transcriptional gene silencing
QIP	Proteína inducida por <i>quelling</i> , proteína asociada a QDE-2	Quelling-induced protein, QDE-2-interacting protein
rdRNA	RNA degradado dependiente de RdRP	RdRP-dependent degraded RNA
RdRP	Polimerasa de RNA dependiente de RNA	RNA-dependent RNA polymerase
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA	RNA-induced silencing complex
RNAi	Interferencia de RNA	RNA interference
RNasa	Ribonucleasa	Ribonuclease
RNA-seq	Secuenciación de RNA	RNA-sequencing
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa	Reverse transcription quantitative PCR
SAC	Punto de control de la formación del huso acromático	Spindle-attachment checkpoint
siRNA	RNA pequeño de interferencia	Short interfering RNA
SIS	Silenciamiento inducido por sexo	Sex-induced silencing
sncRNA	RNA pequeño no codificante	Small non-coding RNA
sRNA	RNA pequeño	Short RNA
ssRNA	RNA de cadena sencilla, RNA monocatenario	Single-stranded RNA
TE	Elemento genético móvil	Transposable element
YNB	Medio con bases nitrogenadas para levaduras	Yeast nitrogen base medium
YPG	Medio de extracto de levadura, peptona y glucosa	Yeast extract-peptone-glucose medium

RESUMEN (SUMMARY)

Since its discovery in the early 1990s, post-transcriptional gene silencing or RNA interference (RNAi) has revolutionized the fields of genetics and molecular biology and continues to inspire groundbreaking research across the scientific community. The presence of double-stranded RNA molecules triggers the RNAi mechanism to recognize and direct degradation of complementary messenger RNAs or prevent their translation into protein. Originally a defense mechanism against invasive nucleic acids –exogenous or endogenous– it has evolved into a complex regulatory phenomenon that not only protects the genome but also controls gene expression. RNAi functionality relies on short RNA molecules (sRNAs) to guide catalytic complexes to their targets by RNA base pairing. This mechanism is conserved in every major eukaryotic lineage, though there are diverse biogenetic pathways that result in different types of sRNAs. The fungal kingdom is an excellent example of this diversity because it encompasses many RNAi pathways involved in controlling the vegetative and sexual stages of their lifecycles. Here in this work, we propose the early-diverging fungus *Mucor circinelloides* as a model to study the role of RNAi in controlling essential biological processes involved in chromosome function and pathogenesis. *M. circinelloides* harbors canonical and non-canonical RNAi pathways that are intertwined to regulate genome expression, stability, and transmission, having an impact on its singular ecology. A ubiquitous inhabitant of the soil, *M. circinelloides* displays a saprophytic lifestyle, but can become an opportunistic animal pathogen and cause an often-lethal infectious disease known as mucormycosis.

We identified *M. circinelloides* conserved homologs of the kinetochore complex, a protein bridge that binds the centromeres to the microtubules during cell division. Surprisingly, *M. circinelloides* and all of the Mucorales lack the essential centromeric histone H3 variant CENP-A that binds directly to the centromeric chromatin but retain most of the remaining kinetochore proteins. A functional analysis and ChIP-seq assay of conserved kinetochore proteins discovered nine centromeres that anchor kinetochores throughout the cell cycle in a monocentric arrangement. *M. circinelloides* mosaic centromeres bear features of the genetically-defined point centromeres, like their short length and a highly conserved DNA motif; while also exhibiting regional centromere determining characteristics, mainly their large pericentric regions colonized by a retrotransposable element. This retrotransposon is similar to the human LINE1 and conserved in all species belonging to the subphylum Mucoromycotina that lack CENP-

A. Thus, we named it genomic retroelement of *Mucoromycotina* LINE1-like, or Grem-LINE1, and proposed its involvement in centromere identity in the absence of CENP-A. Grem-LINE1 sequences are being actively silenced by canonical sRNAs, indicating that RNAi is involved in maintaining genome stability and determining centromere identity in *M. circinelloides*. Intriguingly, there is an increased number of canonical antisense sRNAs targeting Grem-LINE1 sequences in mutants lacking the non-canonical RNAi pathway (NCRIP). Hence, our data support previous observations of an antagonistic interaction of the non-canonical over the canonical RNAi pathway in *M. circinelloides* .

This coordinated RNAi regulation plays a critical role in the interaction with the host innate immune defenses. A comparison between two pathotypes with opposite virulence potentials revealed the genetic response involved in survival and germination during macrophage phagocytosis. The hostile phagosomal environment triggers this response by inducing two basic leucine-zipper activating transcription factors (Atf), Atf1 and Atf2, and remodeling a vast gene network that includes genes encoding an aquaporin *aqp1*, and two putative membrane-bound or secreted effectors *chil* and *pps1*. Most of the principal components of this Atf-mediated germination pathway are also induced during *in vivo* interaction with peritoneal mouse macrophages and are needed for a full virulence in a murine infection model. NCRIP exerts a fine control of this response by repressing it during non-stressful or saprophytic conditions and releasing it upon stressful challenges like those encountered during phagocyte interaction. Our data suggest that NCRIP activity is restrained during macrophage phagocytosis, correlating with an increased expression of the canonical RNAi genes. This increased expression is also observed in mutants lacking NCRIP activity. As a result, NCRIP mutants are unable to repress the response to phagocytosis and develop a constitutive pre-exposure adaptation to stressful conditions that protects them from oxidative damage. This is manifested and explained at a transcriptional level because the transcriptomic profile of these NCRIP mutants cultured under non-stressful conditions mimics most of the wild-type response to macrophage phagocytosis. Surprisingly, the NCRIP mutants are significantly less virulent than a wild-type strain, suggesting that the genetic deregulation provoked by the lack of NCRIP activity affects other fungal processes required for virulence. Overall, our results offer a detailed analysis of how two interacting RNAi pathways in *M. circinelloides* contribute to essential biological functions and provide insights into its virulence traits, which could lead to therapeutic breakthroughs against the difficult-to-treat mucormycosis.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Biología de hongos mucorales

I.1.1. Filogenia, descripción morfológica, ecología y beneficios biotecnológicos

Los Mucorales son un grupo monofilético que pertenece a los hongos basales, unos hongos ancestrales que divergieron de manera temprana en la historia evolutiva del reino Fungi. Los hongos basales se clasifican taxonómicamente en los filos Cryptomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota y Mucoromycota (Figura I.1)^{1,2}. El filo Mucoromycota se divide en los subfilos Glomeromycotina, Mortierellomycotina y Mucoromycotina, englobando este último a los órdenes Endogonales, Umbelopsidales y Mucorales³. Tradicionalmente y, por tanto, en gran parte de la bibliografía, los hongos pertenecientes a los filos Mucoromycota y Zoopagomycota se englobaban en el filo Zygomycota atendiendo a criterios morfológicos como la producción de cigosporas durante la reproducción sexual⁴. Los recientes análisis de filogenia molecular no se ajustan a esa clasificación obsoleta y concluyen que el antiguo clado de los cigomicetos no es monofilético^{3,5}, desaconsejando su uso.

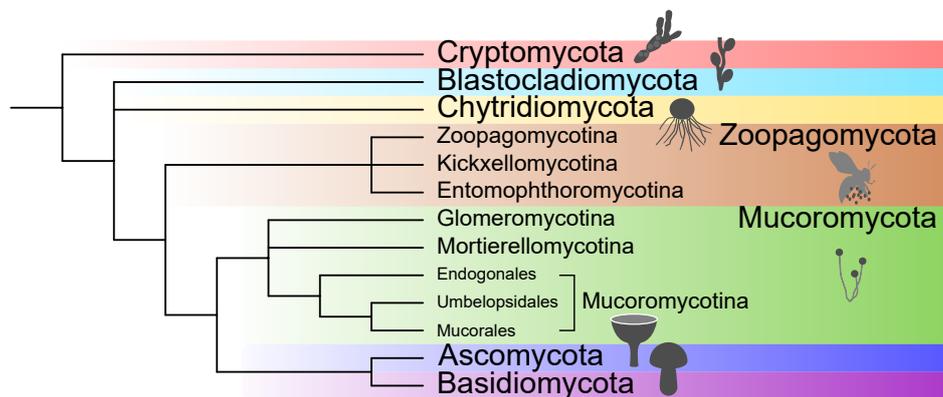


Figura I.1. El árbol de la vida de los hongos. Cladograma que muestra la historia evolutiva de los siete filos del reino Fungi (-mycota), sombreados con colores distintos. Las ramas cuya filogenia no está del todo resuelta se representan como una politomía en su correspondiente nodo. Los filos Zoopagomycota y Mucoromycota, antiguamente englobados en el grupo polifilético de los cigomicetos, se detallan al nivel de subfilo (-mycotina) con especial énfasis en el subfilo Mucoromycotina, que se analiza a nivel de orden (-ales) para mostrar los Mucorales. Adaptado de Spatafora et al., 2017¹, Ahrendt et al., 2018² y Naranjo-Ortiz et al., 2019⁶.

Aunque los cigomicetos no constituyan un grupo monofilético, la producción de cigosporas sigue siendo una de las principales características morfológicas del filo Mucoromycota. Las cigosporas son esporas sexuales o cigotos con una gruesa pared, normalmente ornamentada y pigmentada, que se forman por fusión de gametangios

(Figura I.2). Tras producirse la fusión de citoplasma y núcleos, la cigospora queda pendida entre dos hifas suspensorias que pueden exponer apéndices protectores. Las hifas de los mucoromicetos son multinucleadas y normalmente cenocíticas, salvo por la presencia de septos adventicios dispuestos de manera irregular o delimitando estructuras sexuales⁷. El subfilo Mucoromycotina se caracteriza por la producción endógena de esporas asexuales unicelulares e inmóviles, denominadas esporangiosporas (Figura I.2). Las esporangiosporas se producen dentro de estructuras especializadas de distinta forma y tamaño conocidas como esporangios, que están sostenidos por esporangióforos (Figura I.2). Con menor frecuencia, pueden producir otras estructuras de reproducción asexual conocidas como clamidosporas y artrosporas a partir de hifas vegetativas. Los Mucorales exhiben una pronunciada prolongación del esporangióforo en forma de cúpula, denominada columela (Figura I.2), que se introduce en el esporangio⁸. La presencia de una columela bien diferenciada es una sinapomorfia que diferencia a los Mucorales del resto del subfilo Mucoromycotina⁹ y, en algunas especies, posee un engrosamiento terminal antes de introducirse en el esporangio conocido como apófisis (Figura I.2). La producción de grandes cantidades de esporangios llenos de esporangiosporas es el principal modo de reproducción y dispersión de los Mucorales que, junto a su rápido crecimiento como micelio filamentoso, proporciona una gran ventaja ecológica frente a otros hongos y habitantes del suelo¹⁰.



Figura I.2. Estructuras reproductivas de hongos Mucorales. (A) Cigospora (zi) de *Mucor endophyticus* (CBS385.95), sostenida por dos hifas suspensorias (hs) iguales. (B, C) Esporangióforo (sf) de *Rhizopus arrhizus* (JMRC:NRZ:1217) que muestra un esporangio (sp) completo (B); tras la dehiscencia del esporangio (C) se liberan las esporangiosporas (ep), dejando a la vista la columela (co). (D) Esporangióforo de *Lichtheimia ramosa* (NRZ-2019-435) en el que, tras liberar las esporas, se aprecia la apófisis (ap) justo debajo de la columela. (A, B, C, D) Se muestra una escala de 50 µm (barra negra). Fotografías tomadas de Walther et al., 2019¹¹.

Los Mucorales se distribuyen geográficamente de manera cosmopolita¹² y suelen ser saprófitos, por lo que sus hábitats más frecuentes son el suelo, materia vegetal en

descomposición, alimentos y excrementos de animales¹⁰. No obstante, las funciones ecológicas de estos hongos son altamente diversas y, además de saprófitos, existen especies de Mucorales que se comportan como endófitos¹³, parásitos de plantas, animales, hongos e incluso de otros mucorales⁴. Algunas especies actúan como patógenos oportunistas de humanos, causando una infección fúngica emergente conocida como mucormicosis¹⁴. Las características fisiológicas y bioquímicas que les permiten adaptarse a tan diversos nichos ecológicos han sido explotadas tradicionalmente por la humanidad para producir distintos fermentados de soja y arroz¹⁵. Recientemente, los hongos mucorales han despertado el interés de la industria biotecnológica para utilizarlos en biotransformaciones¹⁶, producción de biocombustibles^{17,18}, carotenos¹⁹, lípidos^{20,21} y quitosano²². Además, poseen un considerable potencial como agentes biorremediadores²³. A pesar de sus numerosas aplicaciones y el peligro que suponen como patógenos emergentes²⁴, se conoce relativamente poco sobre la biología de los hongos mucorales, en especial de los mecanismos moleculares que regulan su fisiología, desarrollo y virulencia.

I.1.2. *Mucor circinelloides* como organismo modelo

Pese a su enorme interés económico y clínico, la investigación en Mucorales se ha visto frenada porque son difíciles de manipular genéticamente, en especial por la ausencia de un método de transformación genética eficaz²⁵. Aunque casi todas las especies son refractarias a la transformación genética, se ha conseguido transformar con éxito tres especies mucorales: *Rhizopus oryzae*²⁶, *Rhizopus delemar*²⁷ y *M. circinelloides*²⁸. Desafortunadamente, la interrupción génica mediante transformación genética y posterior recombinación homóloga en *Rhizopus* spp. no es estable ya que, tras sucesivos cultivos en condiciones no selectivas, se recupera el alelo silvestre²⁹. Por el contrario, en *M. circinelloides* se ha optimizado el método de transformación genética por electroporación de manera que la interrupción y reemplazo génicos son considerablemente eficientes y, además, los mutantes resultantes son completamente estables³⁰.

Estas ventajas hicieron que la investigación genética en Mucorales se decantara principalmente por *M. circinelloides*, convirtiéndolo en el hongo mucoral con el mayor repertorio de técnicas de biología molecular disponibles. Estas técnicas incluyen el uso de la transformación genética para el reemplazo génico, que permite realizar la delección, sobreexpresión y adición de epítopos en cualquier gen; y para silenciar genes diana

introduciendo vectores plasmídicos que producen RNA de doble cadena (*double-stranded RNA* o dsRNA). Todas estas técnicas han ayudado a desentrañar los mecanismos moleculares de las respuestas a la luz y fotocarotenogénesis en Mucorales³¹ y a identificar los componentes principales que participan en el mecanismo de silenciamiento génico en Mucorales³². Además, el genoma de *M. circinelloides* está completamente secuenciado por la plataforma de Illumina para lecturas cortas³³. Este genoma no contiene huecos y consta de 19 supercántigos o *scaffolds*, aproximadamente el doble que cromosomas completos identificados en distintas estirpes de *M. circinelloides*³⁴. La anotación génica disponible a partir de este genoma permite obtener el máximo rendimiento de las herramientas de manipulación genética, así como realizar estudios de genómica comparada y funcional, incluyendo análisis transcriptómicos utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación³⁵⁻³⁷, y rastreos funcionales mediante genotecas que inducen silenciamiento génico³⁸. Por último, la irrupción de las revolucionarias técnicas CRISPR-Cas9 en el campo de la genética de hongos filamentosos³⁹ no tardó en conquistar también a los hongos mucorales, empezando por *M. circinelloides*⁴⁰. La aplicación de CRISPR-Cas9 ha mejorado la eficiencia de interrupción génica en especies mucorales para las que no existía un método de transformación eficaz^{41,42}, prometiendo un futuro esperanzador para el estudio genético de este grupo de hongos.

Además de estos avances técnicos, *M. circinelloides* es fácilmente cultivable y tiene un ciclo de vida corto (Figura I.3), lo que permite realizar múltiples ensayos fenotípicos en poco tiempo. En unos pocos días, *M. circinelloides* desarrolla un micelio haploide, normalmente cenocítico y multinucleado que adquiere un color anaranjado si recibe luz del espectro azul^{43,44}. Puede iniciar un proceso de reproducción sexual ya que es heterotálico con dos tipos sexuales morfológicamente idénticos, (+) y (-), determinados por los genes *sexP* y *sexM*, respectivamente, en el *locus sex*. Cuando dos hifas compatibles se encuentran desarrollan una morfología helicoidal y se conjugan para formar la cigospora mediante un proceso de plasmogamia. Las cigosporas de *M. circinelloides* poseen una pared gruesa, de color oscuro, y con ornamentaciones en forma de asterisco⁴⁵. Desafortunadamente, no se ha conseguido que las cigosporas de *M. circinelloides* germinen y completen la reproducción sexual en condiciones de laboratorio⁴⁵, aunque se ha observado la germinación de la cigospora en otras especies del género *Mucor*⁴⁶. Poco se conoce sobre lo que ocurre en el interior de la cigospora en

estas especies. Todo indica que ocurre un proceso de cariogamia entre dos núcleos haploides de sexo opuesto para formar un núcleo diploide que sufre una meiosis y, de los cuatro productos meióticos, solamente uno sobrevive y los otros tres se desintegran junto al resto de núcleos haploides. Tras aproximadamente un mes de latencia, la germinación de la cigospora culmina con la producción de un único esporangióforo terminal, conocido como germosporangióforo, que sostiene el germosporangio. En su interior se encuentran las germosporangiosporas, cuyo material genético proviene del único producto meiótico superviviente, que germinarán produciendo un micelio nuevo⁴⁷.

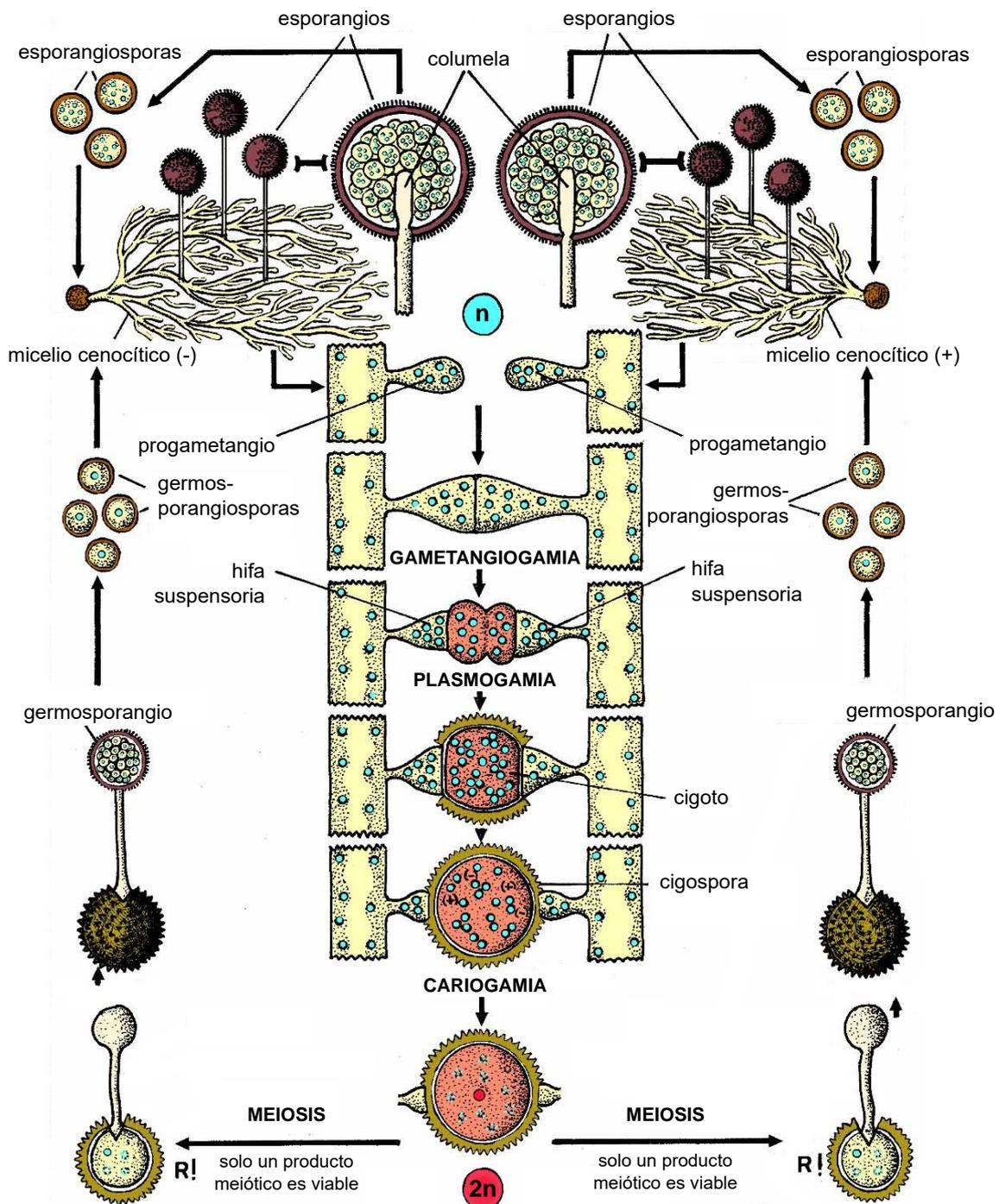


Figura I.3. Ciclo de vida de *Mucor* spp. Esquema de las fases reproductivas asexual (arriba) y sexual (abajo) del ciclo de vida de *Mucor* spp. heterotálicas de sexo (+) o (-). Los círculos de color azul representan núcleos haploides (n), mientras que los círculos de color rojo representan núcleos diploides (2n). Los eventos de meiosis se indican con los caracteres “R!”. Se indican las estructuras que se forman en cada ciclo. Figura tomada de Díaz González et al., 2004⁴⁸ y adaptada por coherencia interna en la terminología.

Debido a las incógnitas sobre su reproducción sexual y la imposibilidad de germinar sus cigosporas y, por tanto, realizar cruzamientos, se prefiere cultivar y propagar a *M. circinelloides* mediante reproducción asexual o vegetativa. De su micelio surgen largos y erectos esporangióforos que se ramifican de manera simpodial, sosteniendo esporangios globosos o esféricos que contienen un elevado número de esporangiosporas. Sus esporangióforos no presentan apófisis, pero sí una columela muy patente al introducirse en el esporangio, normalmente obovada o globosa⁴⁹. Las esporangiosporas suelen ser multinucleadas, aunque el número de núcleos puede variar dependiendo de la *forma*⁴⁵. La mayoría de especies del género *Mucor* son dimórficas⁵⁰, por lo que las esporangiosporas pueden desarrollar tanto una morfología levaduriforme como un micelio cenocítico siempre que se den las condiciones adecuadas. En condiciones aerobias, las esporangiosporas germinan y desarrollan un micelio fértil capaz de volver a propagarse en pocos días. Sin embargo, en ambientes anaerobios en los que hay una fuente de carbono fermentable disponible⁵¹, las esporangiosporas desarrollan una morfología levaduriforme. La diferenciación en levadura o micelio es reversible, y la transición de una a otra morfología está sujeta a las condiciones ambientales.

Los avances técnicos en biología molecular y su fácil manipulación y cultivo convierten a *M. circinelloides* en el mejor modelo de hongo mucoral disponible actualmente para el estudio a nivel molecular de procesos biológicos. Además, su posición en el árbol de la vida lo convierte en un organismo más cercano filogenéticamente a animales que otros hongos del subreino Dikarya utilizados habitualmente como modelos de estudio. La investigación en Mucorales proporciona información sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos con aplicación a la industria biotecnológica; las rutas de transducción de señales conservadas evolutivamente que tienen aplicaciones biomédicas; y los detalles moleculares del proceso de infección y de los factores de virulencia que podrían ayudar a combatir la mucormicosis.

I.2. Mucormicosis

I.2.1. Epidemiología y factores de riesgo

Los hongos mucorales se desarrollan rápidamente como saprófitos y producen una enorme cantidad de esporas asexuales que se dispersan fácilmente al medio aéreo¹⁰. Algunas especies patógenas oportunistas aprovechan estas ventajas ecológicas para causar una infección potencialmente letal en individuos predispuestos, que pueden inhalar las esporas, entrar en contacto con ellas a través de heridas traumáticas y quemaduras o consumir alimentos contaminados. Entre estos patógenos, las especies mucorales que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Lichtheimia* son los agentes causales de mucormicosis más frecuentes⁵². La manifestación rino-cerebro-orbital es la más habitual, seguida de la mucormicosis pulmonar, lo que concuerda con el tracto respiratorio como la principal vía de entrada de estos patógenos¹⁰. Una vez que penetran en el hospedador, las esporas de estos Mucorales pueden proliferar y desarrollar un micelio filamentosos que provoca procesos de angioinvasión, trombosis y necrosis tisular en individuos susceptibles⁵³.

Entre los factores de riesgo que predisponen a padecer mucormicosis destacan las deficiencias del sistema inmune, habituales en pacientes con neoplasias hematológicas y trasplantados que suelen encontrarse bajo tratamiento inmunosupresor, y pacientes con diabetes mellitus mal controlada⁵⁴. Los avances en medicina han mejorado el diagnóstico y tratamiento de estas patologías, lo que ha ocasionado un aumento en la población de riesgo susceptible a la mucormicosis. Aunque se consideraba una infección rara, actualmente es la tercera infección más frecuente en pacientes hematológicos después de la aspergilosis y candidiasis⁵⁵. El aumento en la incidencia de la mucormicosis es muy preocupante debido a su alta tasa de mortalidad, que oscila entre 40 – 80 %⁵², y a la ausencia de un tratamiento antifúngico eficaz. La resistencia intrínseca de los hongos mucorales a la mayoría de antifúngicos empleados en clínica⁵⁶ supone un problema doble. Por un lado, los tratamientos profilácticos ante infecciones fúngicas son contraproducentes contra la mucormicosis⁵⁷. Y, por otro lado, dificulta el tratamiento de esta enfermedad⁵⁸. La aproximación más eficaz contra esta infección es el diagnóstico precoz, que permite administrar a tiempo el único tratamiento antifúngico efectivo: formas lipídicas de anfotericina B en monoterapia o en terapia combinada con azoles de amplio espectro y desbridamiento de los tejidos infectados⁵². Todos estos factores

convierten a la mucormicosis en una infección emergente, muy difícil de tratar y con altas tasas de mortalidad y morbilidad para la que urge encontrar nuevas dianas terapéuticas y tratamientos eficaces.

I.2.2. Interacción con el sistema inmune innato y factores de virulencia

Los Mucorales son ubicuos y dispersan sus esporas asexuales por el aire fácilmente, por lo que inhalarlas es un evento rutinario¹⁰. Los individuos sanos con las barreras primarias – piel y mucosas – intactas no suelen desarrollar la infección. Sin embargo, las esporas mucorales pueden adherirse y dañar los epitelios y mucosas de individuos susceptibles, iniciando la colonización del hospedador⁵⁹⁻⁶⁴. Una vez que han penetrado estas barreras, las esporas se enfrentan a las células del sistema inmune innato que incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. En individuos inmunocompetentes, estas células son capaces de detener la germinación de las esporas, limitando la progresión de la infección. No es el caso de individuos inmunocomprometidos, bien sea por un tratamiento inmunosupresor o defectos del sistema inmune innato, que son más propensos a infecciones fúngicas invasivas⁶⁵. Por tanto, evitar el desarrollo de la mucormicosis depende del éxito en la respuesta temprana del sistema inmune. Las células fagocíticas – macrófagos y neutrófilos – llevan a cabo un proceso rápido de fagocitosis y destrucción intracelular, esencial para combatir la invasión. Al inicio de la infección con las esporas mucorales, estos fagocitos son reclutados al sitio de la infección para proteger al hospedador. Este reclutamiento ocurre en la gran mayoría de infecciones fúngicas y es un proceso mediado por el reconocimiento de ligandos de membrana específicos de la espora, que funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o PAMPs), por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors* o PRRs) de los fagocitos⁶⁶. Las células fagocíticas disponen de un amplio repertorio de PRRs, que incluyen los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors* o TLRs), receptores de lectinas de tipo C (*C-type lectin receptors* o CLRs) y receptores de tipo NOD (*NOD-like receptors* o NLRs), cada uno especializado en reconocer un PAMP específico⁶⁷. Tras reconocer los PAMPs, los fagocitos se activan y producen una serie de citoquinas proinflamatorias que participan en la respuesta proinflamatoria que media el reclutamiento de otras células inmunitarias⁶⁶. Al activarse, los fagocitos internalizan las esporas en el fagosoma, iniciando un proceso de maduración que culmina en la formación del fagolisosoma y la degradación de las esporas⁶⁸ (Figura I.4). En la mucormicosis, se ha descrito la participación de los receptores TLR2 y Dectin-

1 en el reconocimiento de las hifas mucorales⁶⁹, posiblemente de los glucanos de su pared celular⁶⁷. Tras el reconocimiento, los fagocitos que internalizan las esporas mucorales forman agrupaciones conocidas como granulomas para detener el proceso de germinación y el desarrollo del micelio⁷⁰⁻⁷³.

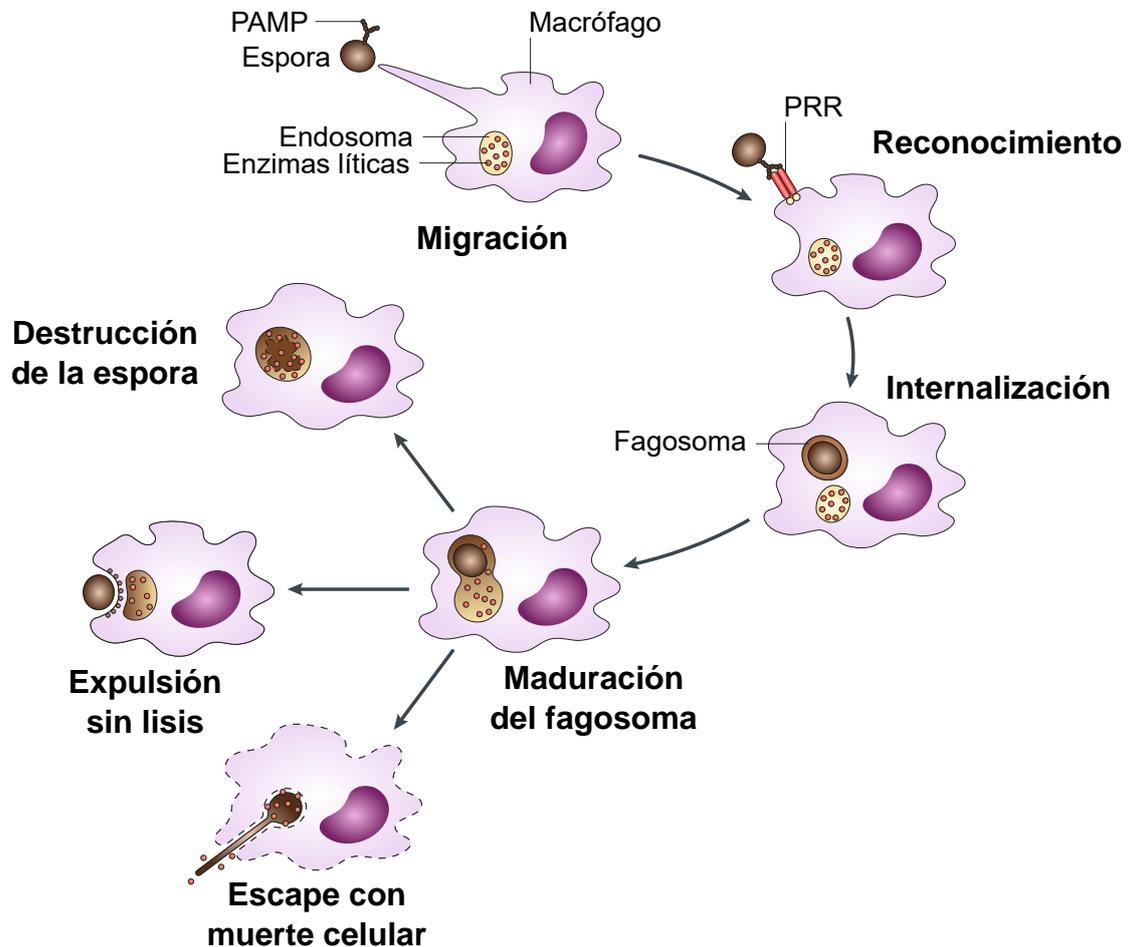


Figura I.4. Interacción macrófago-espora. Etapas de la interacción entre un macrófago y una espora fúngica, que culmina con la destrucción del patógeno en el interior del fagolisosoma maduro o la supervivencia de la espora mediante distintas estrategias. Figura modificada de Erwig & Gow, 2016⁶⁸.

Los hongos han desarrollado distintas estrategias para evadir o interferir con la respuesta de las células fagocíticas. Las principales se basan en modificar su morfología y la composición de su pared celular, interferir con el reclutamiento de los fagocitos y el proceso de fagocitosis, sobrevivir al ambiente hostil del fagolisosoma, y escapar de las células fagocíticas tras la fagocitosis. Empleando esta última estrategia, el hongo puede ser expulsado del fagosoma sin causar su lisis o, por el contrario, provocar la muerte

celular del fagocito⁶⁸ (Figura I.4). Las esporas de las distintas especies mucorales se han especializado en varias de estas estrategias para sobrevivir a la fagocitosis. Las esporas de *R. delemar* permanecen latentes en el interior de los macrófagos, inhibiendo la maduración del fagosoma gracias a la melanina de su pared celular⁷⁴. La lucha por el hierro es un mecanismo de inmunidad nutricional esencial en este proceso, ya que la falta de este micronutriente mantiene a las esporas de *R. delemar* en estado latente durante la fagocitosis, inhibiendo su crecimiento. El secuestro del hierro en el fagosoma regula la respuesta transcripcional de *R. delemar*, que induce la expresión de genes que cifran proteínas clave del mecanismo de captación de hierro de alta afinidad, *fet3* y *ftr1*⁷⁴. El gen *ftr1* cifra una permeasa de hierro esencial para la virulencia en *R. delemar*²⁹, mientras que el papel de la familia génica de ferroxidasas *fet3* se ha descrito en *M. circinelloides*⁷⁵. Este Mucoral dispone de tres genes que cifran ferroxidasas –*fet3a*, *fet3b* y *fet3c*– que se inducen *in vivo* durante la infección de un modelo de ratón⁷⁵. El gen *fet3c* es imprescindible para la virulencia en *M. circinelloides*, mientras que *fet3a* y *fet3b* podrían ofrecer un efecto aditivo en el proceso infeccioso. Sorprendentemente, los componentes de la familia génica *fet3* se expresan diferencialmente en cada estado dimórfico: *fet3a* se transcribe en la morfología de levadura, mientras que *fet3b* y *fet3c* lo hacen en la morfología de micelio⁷⁵ (Figura I.5). Esta subespecialización dimórfica en el mecanismo de captación de hierro de alta afinidad y su papel en la virulencia podría explicar por qué las esporas de *M. circinelloides* son capaces de germinar en el interior de macrófagos de ratón *in vitro*, al contrario que las esporas de *Rhizopus* spp.

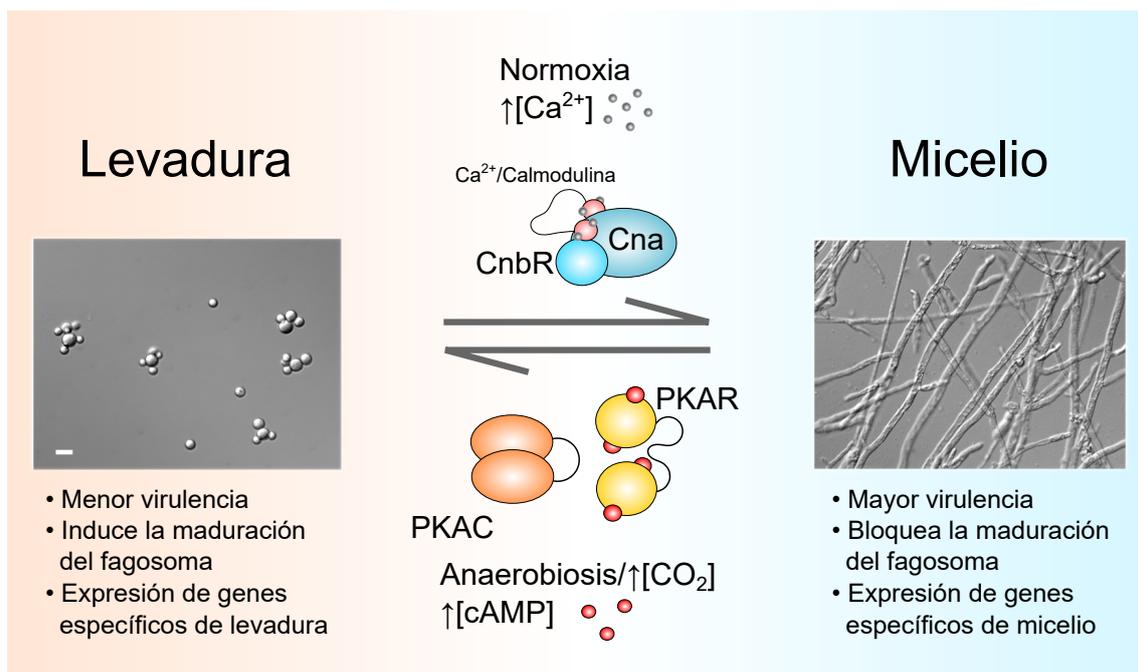


Figura I.5. La transición levadura-micelio está implicada en la interacción con el sistema inmune innato y la virulencia. *M. circinelloides* es un mucoral dimórfico que crece en morfología de levadura en condiciones de anaerobiosis con altos niveles de dióxido de carbono, mediada por un aumento de AMPc que activa a la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKAC) al unirse y liberar su subunidad reguladora (PKAR). Las condiciones de aerobiosis y un aumento intracelular de catión calcio provocan un crecimiento en morfología de micelio mediado por las proteínas calmodulina y calcineurina, formada esta última por las subunidades catalítica y reguladora (Cna y CnbR, respectivamente). Estas morfologías son reversibles y las células del hongo realizan una transición bidireccional levadura-micelio según las condiciones ambientales. Fotografías tomadas de Lee et al., 2013⁷⁶, a las que además se añaden los resultados de Lee et al., 2015⁷⁷ y Navarro-Mendoza et al., 2018⁷⁵.

El dimorfismo, entendido como la capacidad de alternar entre las morfologías de levadura y micelio, es una estrategia frecuentemente utilizada por distintos hongos patógenos para evadir la respuesta inmune del hospedador⁷⁸. Esta transición levadura-micelio también está implicada en la capacidad de *M. circinelloides* para sobrevivir a la fagocitosis y la virulencia^{38,76}. La transición dimórfica está controlada principalmente por la calcineurina, una fosfatasa que induce la morfogénesis del micelio. La calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad reguladora B y por una subunidad catalítica A, cifradas por el gen *cnbR* y los genes *cnaA*, *cnaB* y *cnaC*, respectivamente, en *M. circinelloides*⁷⁶. La delección del gen *cnbR* (*cnbRΔ*) produce mutantes bloqueados en la morfología de levadura⁷⁶, que son incapaces de desarrollar micelio en tejidos del hospedador y causar la muerte de un modelo animal invertebrado. Por otro lado, los mutantes *cnaAΔ* presentan unas esporas más grandes, que germinan de manera acelerada dentro del macrófago, y más virulentas⁷⁶. Un estudio posterior sobre estos mutantes para la calcineurina confirmó que las esporas de *M. circinelloides* capaces de realizar la transición levadura-micelio germinan en el interior de los macrófagos e inhiben la maduración del fagosoma, al contrario que las esporas bloqueadas en la morfología de levadura⁷⁷ (Figura I.5). Esta relación entre anomalías morfológicas en la espora y la capacidad de germinar en el interior de los macrófagos y la virulencia se exploró en detalle mediante una plataforma de genómica funcional basada en el mecanismo de interferencia de RNA (RNA *interference* o RNAi). Gracias a esta herramienta se identificó, entre otros, el gen *myo5*, que cifra una miosina motora de clase V implicada en morfogénesis de hongos dimórficos⁷⁹. La delección en heterocariosis de este gen genera individuos bloqueados en morfología de levadura, que sufren un retraso en la germinación en el interior de

macrófagos y una pérdida de virulencia³⁸. La transición entre las morfologías de levadura a micelio es un factor determinante en la virulencia de *M. circinelloides*, pero no es el único ya que el tamaño de las esporas también está relacionado con su virulencia⁴⁵. Dos estirpes de *M. circinelloides* muestran un potencial virulento completamente contrario y, por tanto, se han clasificado como patotipos distintos. Las esporas de la estirpe CBS277.49 –el patotipo virulento– son más grandes y sufren un proceso de germinación rápido tras la fagocitosis, desarrollando hifas que las ayudan a escapar de las células fagocitarias. Por otro lado, las esporas de la estirpe NRRL3631 –el patotipo avirulento– son más pequeñas y deben superar una etapa de crecimiento isotrópico lenta antes de iniciar la germinación, lo que se traduce en una incapacidad para germinar en el interior del fagosoma y evadir la fagocitosis⁴⁵. Las diferencias genómicas entre ambas estirpes están implicadas en el potencial virulento de ambos patotipos³⁵, por lo que ahondar en ellas y caracterizar la regulación transcripcional detrás del proceso de germinación en el fagosoma podría aportar las claves para entender cómo los Mucorales evaden el sistema inmune.

Todas estas observaciones consideradas en conjunto subrayan la importancia del proceso morfogenético que sufren las esporas de Mucorales al ser fagocitadas, y apuntan a una relación causal entre el éxito de la germinación y el desarrollo de la mucormicosis. Por tanto, es necesario caracterizar en detalle el programa genético que permite a la espora sobrevivir al ambiente hostil del fagosoma. Identificar los reguladores maestros y efectores principales en este proceso podría ser la clave para avanzar en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y tratamientos más eficaces contra la mucormicosis.

I.3. Silenciamiento génico mediado por RNA en Mucorales

I.3.1. Generalidades del mecanismo de silenciamiento génico

El descubrimiento del silenciamiento génico mediado por RNA, silenciamiento génico postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing* o PTGS) o mecanismo de interferencia de RNA (*RNA interference* o RNAi) supuso una revolución científica en el campo de la regulación de la expresión génica. Las primeras observaciones del fenómeno sucedieron simultáneamente en plantas⁸⁰ y hongos⁸¹, donde inicialmente recibió el nombre de cosupresión y *quelling*, respectivamente. El propósito inicial de estos investigadores fue sobreexpresar genes involucrados en la síntesis de pigmentos mediante la introducción de transgenes en sus organismos de estudio, petunia y *Neurospora crassa*.

Sin embargo, observaron un fenotipo contrario al esperado en una alta proporción de los individuos transgénicos; en lugar de producir más pigmentos, sintetizaban menor cantidad. Además, este déficit en la síntesis de pigmentos correlacionaba con una disminución de la transcripción del gen involucrado en su síntesis. Dicho de otra manera, al intentar sobreexpresar un gen, este a veces se silenciaba de manera reversible⁸¹. Un trabajo posterior en *N. crassa* reveló que este silenciamiento o *quelling* era postranscripcional y que ocurría mediante un efector citoplasmático que actuaba en trans, muy probablemente una molécula de RNA derivada del transgén introducido⁸².

El mecanismo de silenciamiento empezó a esclarecerse cuando se descubrió que el silenciamiento en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se inducía por una molécula de dsRNA complementaria al transcrito diana^{83,84}. Los investigadores acuñaron el término RNA interferente para diferenciarlo de la técnica de inhibición antisentido, en la que se impide la traducción de transcritos al introducir en la célula moléculas de RNA de cadena sencilla (*single-stranded RNA* o ssRNA) preferentemente con sentido opuesto a la transcripción (antisentido) de genes específicos⁸⁵⁻⁸⁸. Posteriormente, confirmaron que esta interferencia ocurría de manera postranscripcional en el citoplasma y sugirieron un modelo en el que las moléculas de dsRNA mediaban la actividad catalítica contra los transcritos complementarios⁸⁹.

Pronto se hizo evidente que tanto la cosupresión, el *quelling*, el PTGS y el RNAi eran distintas descripciones del mismo fenómeno conservado evolutivamente en la mayoría de los eucariotas. Numerosos trabajos en distintos organismos sentaron las bases del modelo de silenciamiento génico mediado por RNA (Figura I.6)⁹⁰, en el que las moléculas de dsRNA que activan la maquinaria de silenciamiento son reconocidas específicamente por endoribonucleasas (RNasas) III tipo Dicer⁹¹, y cortadas en RNAs pequeños de interferencia (*short interfering RNAs* o siRNAs) de 21-25 nucleótidos (nt)⁹². Los siRNAs son reclutados por un complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex* o RISC) que, tras separar y descartar una de las hebras del siRNA, utiliza la otra como guía para reconocer los transcritos complementarios⁹³. Una vez que RISC reconoce al transcrito diana por complementariedad de bases, una RNasa tipo Argonata presente en RISC produce un corte endonucleolítico en el transcrito, que posteriormente es degradado⁹⁴. En algunos organismos se produce un proceso secundario de amplificación, en el que ciertas polimerasas de RNA dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerases* o

RdRPs) utilizan las hebras antisentido de los siRNAs como cebadores y los transcritos o sus productos de degradación como molde para generar más moléculas de dsRNA que retroalimentan el proceso⁹⁵⁻⁹⁷. No obstante, el proceso de amplificación que llevan a cabo las RdRPs no es esencial en todos los organismos con rutas de RNAi activas para que ocurra un silenciamiento eficaz⁹⁸. Las enzimas Dicer y Argonauta sí son claves en el fenómeno de RNAi y están altamente conservadas en la mayoría de los organismos eucarióticos, por lo que este mecanismo debe cumplir un papel importante para la célula. La función primordial del mecanismo de RNAi es la defensa del organismo frente a la invasión de virus^{99,100}, elementos genéticos móviles, secuencias repetidas y transgenes que vulneran la integridad genómica¹⁰¹.

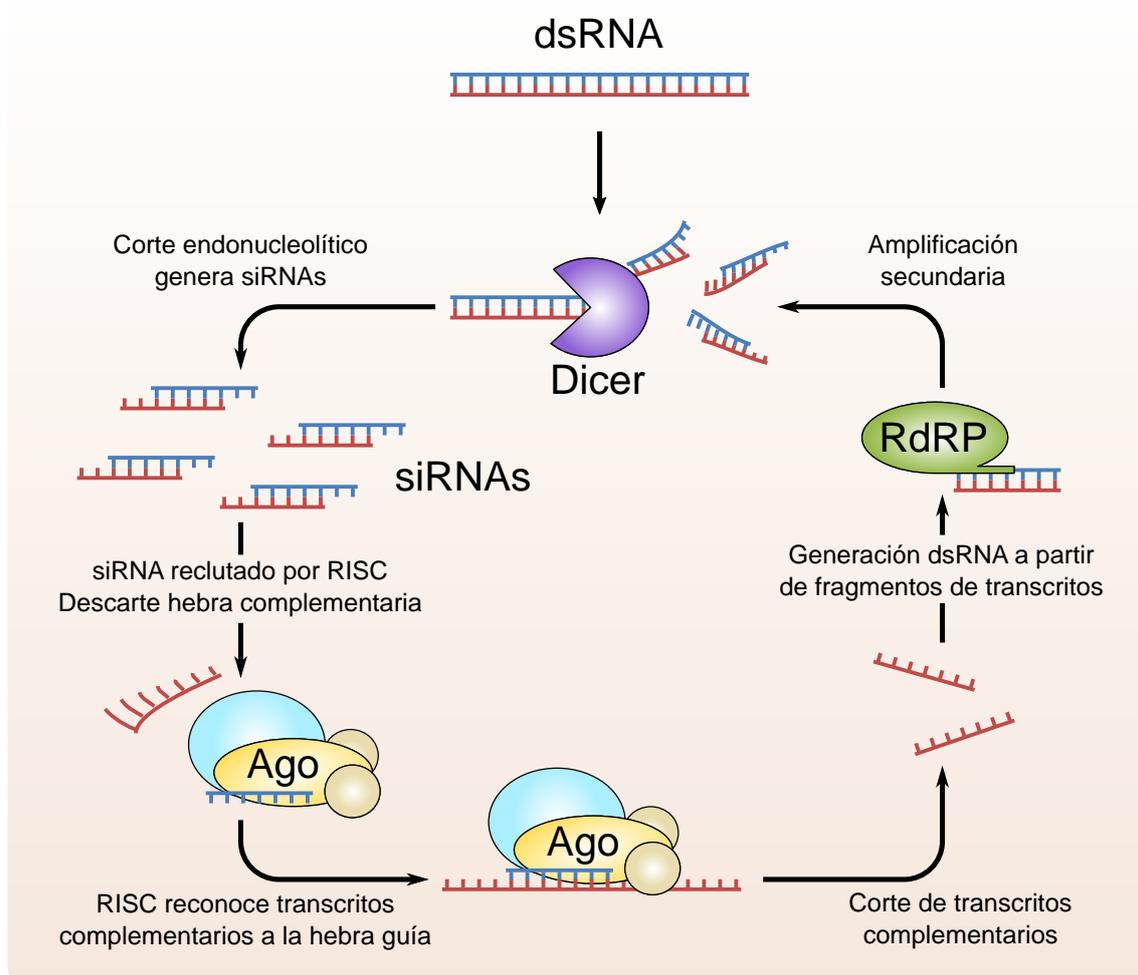


Figura I.6. Mecanismo general de silenciamiento génico. Las proteínas y complejos proteicos clave que intervienen en el mecanismo se muestran con distintas formas y aparecen nombrados en la figura. Las líneas de color rojo representan RNA con sentido respecto a la transcripción, y de color azul RNA antisentido.

I.3.2. Diversidad de pequeños RNAs endógenos y su papel en la regulación génica

La defensa de la integridad genómica frente a material genético exógeno, aunque crucial, no es la única función del mecanismo de RNAi. El silenciamiento génico también participa en regular la expresión de genes nativos del propio organismo usando como efectores pequeños RNAs endógenos (*endogenous short RNAs* o esRNAs), también conocidos como pequeños RNAs no codificantes (*small non-coding RNAs* o sncRNAs) o, simplemente, pequeños RNAs (*short RNAs* o sRNAs). Se han identificado distintas clases de esRNAs que derivan de moléculas de dsRNA transcritas a partir de secuencias genómicas del propio organismo: 1) los *micro-RNAs* (miRNAs), 2) los RNAs asociados a proteínas PIWI (*PIWI-interacting RNAs* o piRNAs) y 3) los siRNAs endógenos (*endogenous siRNAs* o endo-siRNAs).

1) Los miRNAs y moléculas similares son los esRNAs más conocidos y están presentes en animales¹⁰², plantas¹⁰³, hongos^{104,105} y protistas¹⁰⁶. Aunque su biogénesis presenta características específicas en cada uno de estos reinos eucarióticos, los miRNAs poseen una serie de características comunes que los diferencia del resto de esRNAs. Los miRNAs están cifrados en *loci* genómicos distintos a los genes que regulan. Al tratarse de *loci* genómicos, suelen estar conservados en organismos relacionados. Estos *loci* se transcriben en moléculas de ssRNA no codificantes que pueden formar estructuras en horquilla de manera local, denominadas pri-miRNA. Por tanto, el dúplex de RNA que se forma a partir de un pri-miRNA concreto siempre es el mismo. El pri-miRNA es procesado secuencialmente por una o varias RNAsas tipo Dicer, primero en un pre-miRNA y después en el miRNA propiamente dicho. Tras este procesamiento, que ocurre total o parcialmente en el núcleo, el pre-miRNA o miRNA se transporta al citoplasma¹⁰⁷. A pesar de estas diferencias iniciales, el miRNA es una molécula de dsRNA de 21-25 nt prácticamente idéntica a un siRNA y, por tanto, comparten un mismo destino en la ruta de RNAi. Los miRNA son reclutados por RISC para, tras desechar una de las hebras del dúplex de RNA, reconocer los transcritos complementarios a la hebra guía. RISC ejerce una regulación postranscripcional negativa sobre estos transcritos mediante dos mecanismos: degradación por corte endonucleolítico, que ya se ha explicado anteriormente, o represión de la traducción, dependiendo del grado de complementariedad de bases entre la hebra guía y el transcrito reconocido y la región a la que se une. Si la identidad es suficiente, se cortará el transcrito. De esta manera, los miRNA regulan postranscripcionalmente la expresión de genes involucrados en procesos

biológicos esenciales como el desarrollo¹⁰⁸, la respuesta inmune¹⁰⁹, muerte celular y cáncer¹¹⁰, entre otros.

2) Los piRNAs son específicos de las células de la línea germinal en animales¹¹¹. Al contrario que el resto de esRNAs, no se originan a partir de dsRNA ni son procesados por enzimas Dicer, sino que derivan de precursores de ssRNA transcritos de *loci* genómicos específicos conocidos como agrupaciones de piRNAs^{112,113}. Estos transcritos precursores de piRNA sufren un proceso de maduración conocido como el ciclo ping-pong^{113,114}, en el que una enzima Argonauta del clado PIWI guiada por un piRNA iniciador corta un transcrito complementario para producir un pre-pre-piRNA (Figura I.7). El pre-pre-piRNA se une a una enzima PIWI que produce un corte endonucleolítico para generar el pre-piRNA, que más tarde se procesa por una endonucleasa y se metila en el extremo 3' para formar un piRNA de respuesta. Este piRNA de respuesta puede actuar como un nuevo piRNA iniciador que participará en el corte de otro transcrito diana complementario, retroalimentando el proceso en un ciclo de amplificación¹¹¹. Por otro lado, los restos del pre-pre-piRNA que no participan en el ciclo ping-pong siguen siendo procesados por enzimas PIWI y endonucleasas que actúan secuencialmente para generar nuevos piRNA rezagados (*trailing* piRNA) en la ruta de biogénesis desfasada. Esta peculiar maduración hace que los piRNAs presenten características bioquímicas particulares, en especial la 2'-*O*-metilación de la última base de su extremo 3'^{115,116} y un tamaño de 21-35 nt¹¹¹. La mayoría de los animales depende de los piRNA para proteger el genoma de su línea germinal contra elementos genéticos móviles, y su función ancestral es silenciarlos. Pero, además, cumplen funciones más específicas en unas pocas especies como la defensa contra virus de RNA en algunos insectos; la distinción de los transcritos propios en *C. elegans*, silenciando los exógenos; y la regulación de genes endógenos en algunos mamíferos¹¹¹.

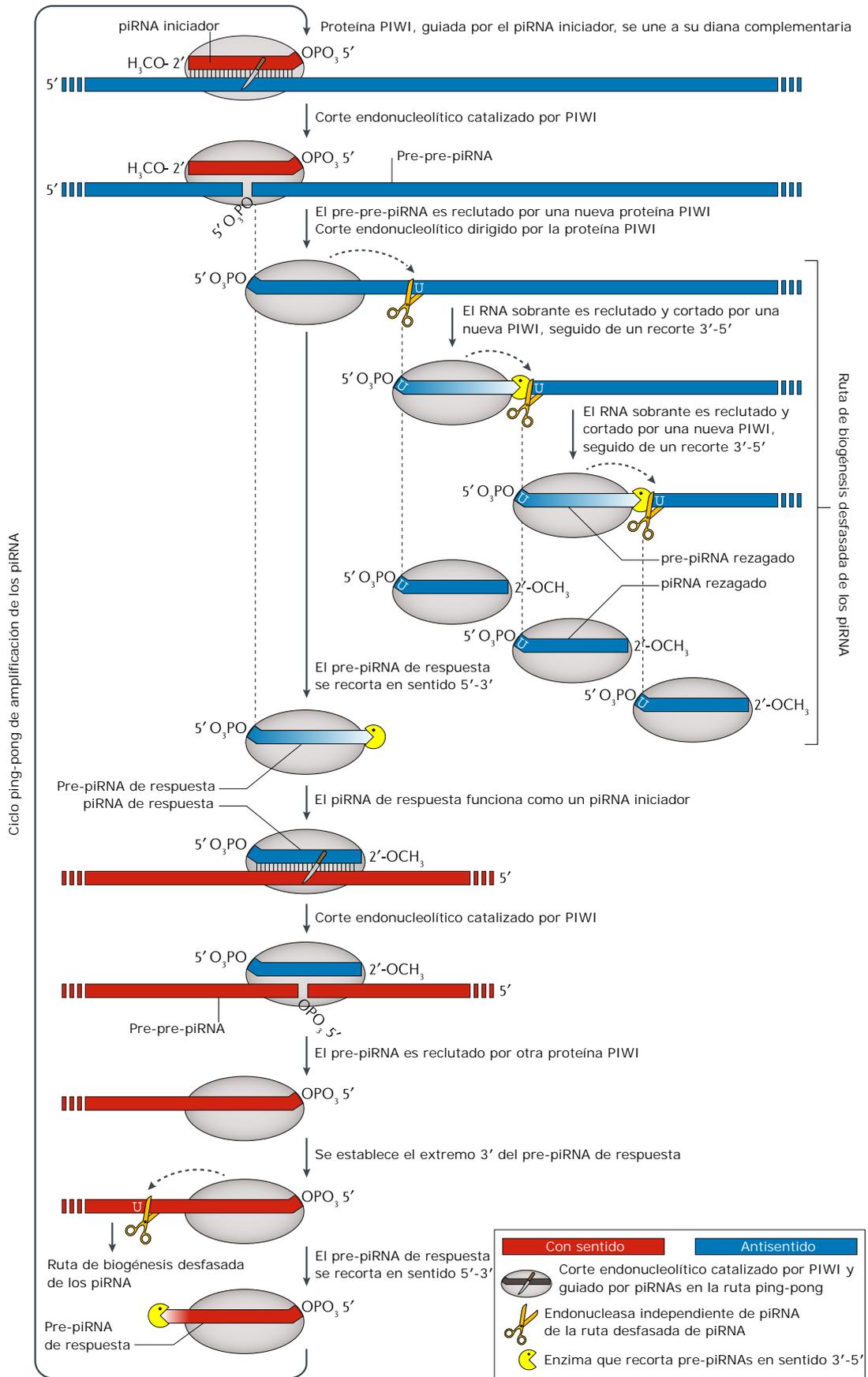


Figura I.7. Biogénesis y mecanismo de acción de los piRNAs en animales. Esquema del procesamiento de los piRNA guiado por PIWI (elipses grises) para generar un piRNA de respuesta (ciclo ping-pong) que inicia la producción de piRNAs desfasados y rezagados (ruta de

biogénesis desfasada). Los rectángulos rojos y azules representan moléculas de RNA antisentido y con sentido, respectivamente. Las enzimas encargadas del procesamiento de los piRNAs se representan mediante distintos objetos cortantes indicados en la leyenda. Figura traducida de Ozata et al., 2019¹¹¹.

3) La última clase de esRNAs –los endo-siRNAs– están presentes en la mayoría de los organismos eucarióticos^{117–122}. El mecanismo de acción de los endo-siRNAs comparte la mayoría de las etapas con el RNAi, salvo una diferencia primordial: el origen de las moléculas de dsRNA. En el fenómeno de RNAi clásico, las moléculas de dsRNA son de origen exógeno, como por ejemplo el material genético de virus de RNA o transgenes con la capacidad de formar estructuras de RNA bicatenarias⁹⁰. Sin embargo, los endo-siRNAs provienen de secuencias genómicas que se transcriben en RNAs con la capacidad de formar estructuras bicatenarias de manera total o parcial. Las fuentes de secuencias genómicas que generan dsRNA son muy diversas (Figura I.8): *loci* genómicos estructurados que se transcriben en moléculas de RNA con capacidad de formar estructuras bicatenarias por complementariedad interna de bases; transcripción convergente de dos secuencias de DNA, generalmente genes, que transcriben una misma región del genoma; transcripción bidireccional, en la que dos promotores con orientaciones opuestas transcriben la misma secuencia de DNA; transcripción de repeticiones o duplicaciones invertidas, en la que se transcribe un RNA con secuencias complementarias capaces de formar horquillas bicatenarias; e interacción en *trans*, en la que las moléculas de RNA transcritas a partir de duplicaciones invertidas en *loci* genómicos alejados interactúan para formar estructuras bicatenarias por complementariedad de bases¹²³. Además, principalmente en plantas y hongos, algunas RdRPs pueden generar dsRNA en ausencia de moléculas que funcionen como cebador en respuesta a elevados niveles de un determinado transcrito o RNAs aberrantes (*aberrant RNAs* o aRNAs)^{124–126}, o incluso participar directamente en la síntesis de aRNAs^{127,128}. De forma análoga al procesamiento de los siRNAs, estas moléculas de dsRNA de origen endógeno disparan la maquinaria de silenciamiento al ser reconocidas por enzimas Dicer, que las procesa en los endo-siRNAs. Una vez procesados, el RISC recluta estos endo-siRNAs para dirigir la degradación de los transcritos complementarios que, debido al origen endógeno de estos siRNA, provienen de secuencias genómicas. El papel principal de los endo-siRNAs es regular la expresión de transposones, aunque también regulan la expresión génica involucrada en las respuestas al daño en el DNA en animales¹¹⁷, y a estreses bióticos y abióticos en plantas^{118,129}.

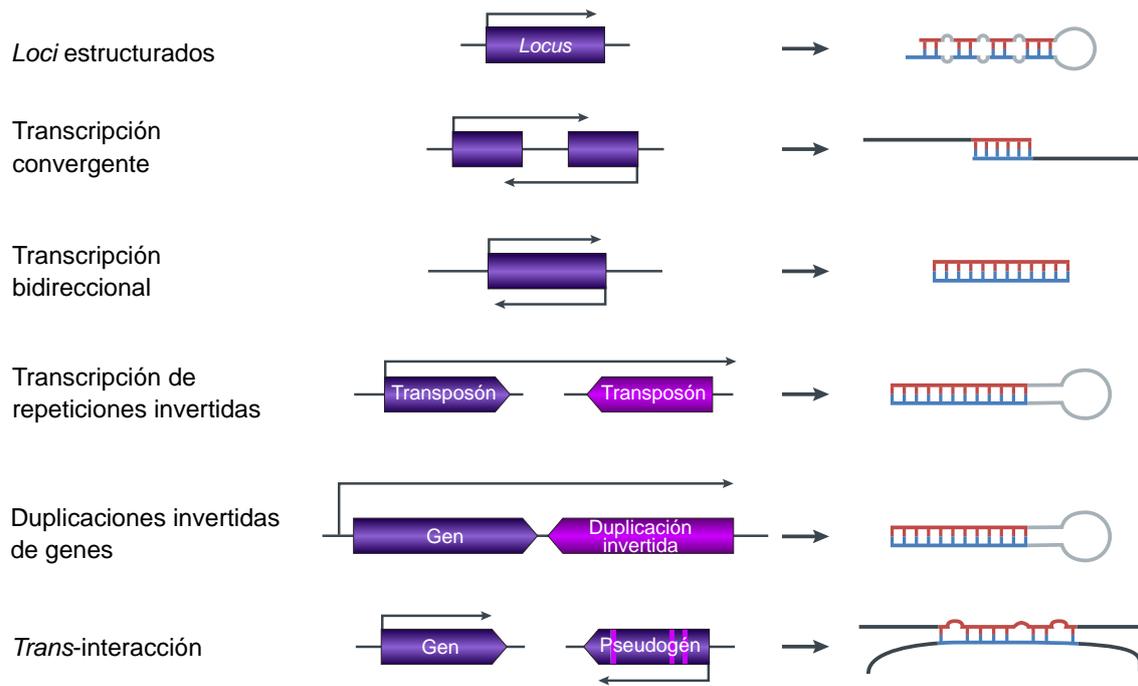


Figura I.8. Fuentes genómicas de RNA de doble cadena. Esquema de las secuencias de DNA genómico (bloques púrpura) que pueden originar moléculas de dsRNA (derecha) capaces de disparar la maquinaria de RNAi en eucariotas. La complementariedad de bases se indica con un tramo en escalera en la molécula de dsRNA, de color rojo para las secuencias con sentido y azul antisentido al sentido de la transcripción. Las duplicaciones o repeticiones se muestran con un color púrpura más claro que la copia original. Las flechas negras en ángulo recto indican el sentido de la transcripción. Los bloques muestran una punta de flecha que marca la orientación de la secuencia de DNA cuando es relevante. Figura adaptada de Ghildiyal & Zamore, 2009¹²³.

Las funciones de los endo-siRNAs se han descrito con mayor profundidad en hongos, quizá porque la identificación de moléculas similares a miRNAs (*miRNA-like* o *miRNAs*) capaces de regular la expresión génica fue relativamente tardía en estos organismos¹⁰⁴. Los endo-siRNAs de hongos participan en defender la integridad genómica de elementos genéticos móviles durante el crecimiento vegetativo o mitótico¹³⁰⁻¹³⁴; y también durante los procesos de meiosis, mediante un fenómeno denominado silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (*meiotic silencing by unpaired DNA* o *MSUD*) en *N. crassa*¹³⁵, y silenciamiento inducido por sexo (*sex-induced silencing* o *SIS*) en *Cryptococcus neoformans*¹³⁶. Pero, además, en algunas especies también regulan procesos fisiológicos y del desarrollo fundamentales como el crecimiento vegetativo y la esporulación^{137,138}; la reproducción sexual^{36,139}; las respuestas al daño en el DNA^{127,128} y a estrés oxidativo y nutricional¹⁴⁰; la expresión de factores de virulencia¹⁴¹; y la resistencia a antifúngicos¹⁴²⁻¹⁴⁴. El papel de los endo-siRNAs no se

limita a regular los genes propios del organismo que los produce, sino que en algunas especies de hongos fitopatógenas funcionan para silenciar genes específicos del hospedador y así evadir la respuesta inmune de la planta¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Esta enorme cantidad de funciones destaca la importancia del mecanismo de silenciamiento génico en hongos, y convierte a estos organismos en excelentes modelos de estudio para profundizar en el papel regulador de los esRNAs.

I.3.3. Rutas de silenciamiento génico en *M. circinelloides*

El estudio del silenciamiento génico en hongos ha conseguido la mayor parte de sus hitos gracias a la investigación en hongos filamentosos, empezando por su descubrimiento en el ascomiceto *N. crassa*⁸¹. La ausencia de un mecanismo de RNAi canónico en *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras filogenéticamente próximas¹⁴⁸ ha fomentado la búsqueda de modelos alternativos para estudiar este fenómeno en grupos filogenéticos de hongos distintos a los ascomicetos. *M. circinelloides* dispone de, al menos, tres rutas de silenciamiento génico implicadas en la regulación de procesos biológicos esenciales como son el crecimiento vegetativo, la reproducción sexual, y la respuesta a distintos estreses abióticos³². Esto, junto a sus ventajas como modelo de estudio (ver I.1.2), lo convierte en un excelente candidato para estudiar la regulación de procesos biológicos mediante RNAi en hongos.

La maquinaria canónica de RNAi, es decir, dependiente de Dicer y Argonauta, está completamente conservada en *M. circinelloides*, habiéndose identificado al menos un ortólogo para cada componente de esta maquinaria (Figura I.9). Entre ellos, destacan dos ribonucleasas III tipo Dicer denominadas Dcl1 y Dcl2 (*Dicer-like* 1 y 2), siendo esta última la que ejerce un papel principal en el procesamiento de las moléculas de dsRNA^{134,138,149}; tres proteínas Argonauta, Ago1 (*Argonaute* 1) que participa en la degradación de los transcritos diana, y Ago2 y Ago3 cuya función se desconoce¹⁴⁰; tres RdRPs denominadas Rdrp1, Rdrp2 y Rdrp3, que actúan de manera especializada en las distintas rutas y etapas de silenciamiento génico^{38,134,143,150}; Qip1, una exonucleasa homóloga a la proteína inducida por *quelling* (*quelling-induced protein*, *QDE-2-interacting protein* o QIP)¹⁵¹ y RnhA, un homólogo a la helicasa SAD-3¹⁵², ambas implicadas en el silenciamiento génico aunque se desconoce su función exacta¹⁴³. Además, se ha identificado una nueva proteína con actividad ribonucleasa denominada R3B2 que participa en una ruta de RNAi no canónica (*non-canonical RNAi pathway* o NCRIP), así llamada ya que es independiente de Dicer y Argonauta³⁷.

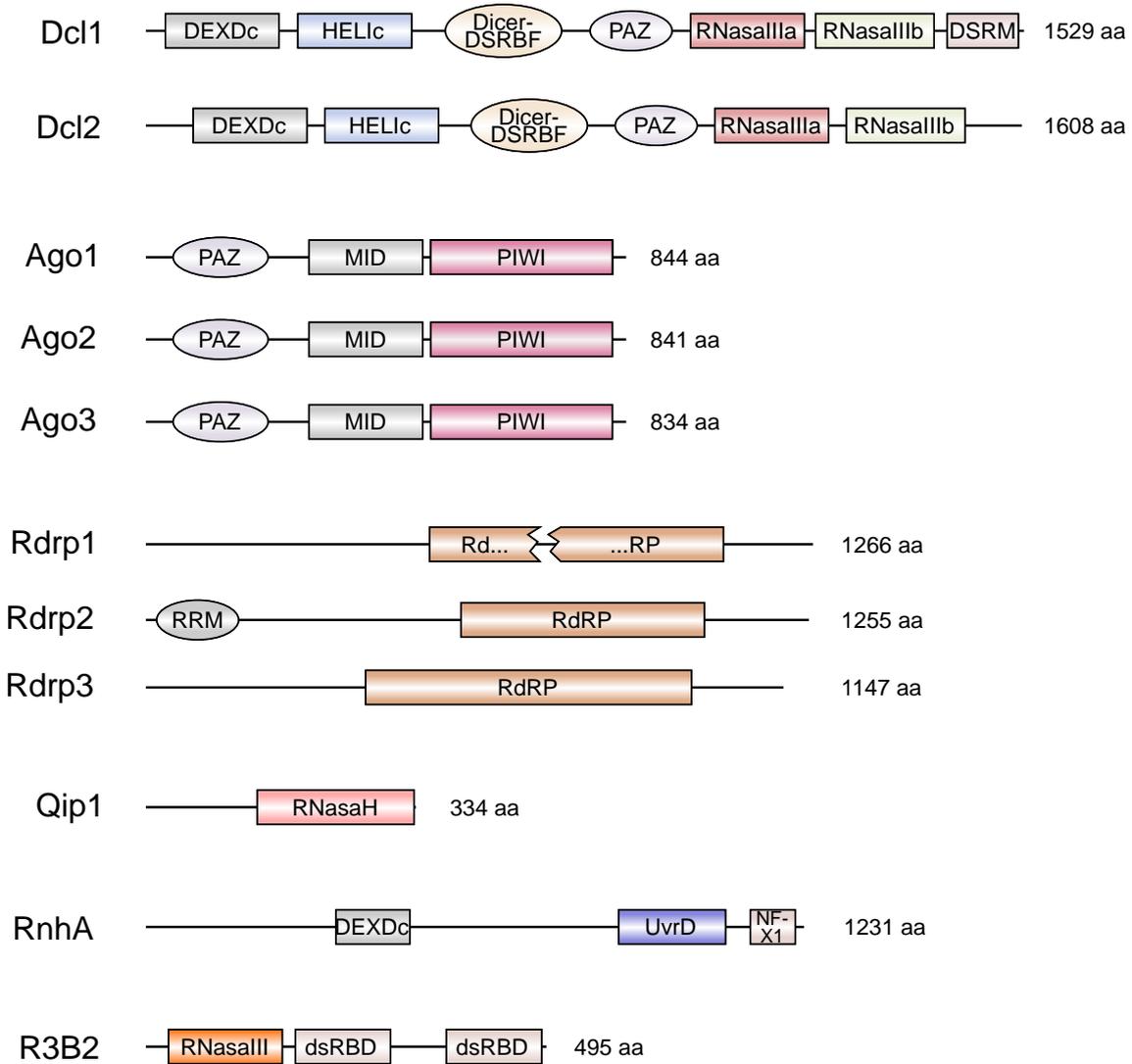


Figura I.9. Proteínas involucradas en la maquinaria de RNAi de *Mucor circinelloides*.

Arquitectura de dominios proteicos en las proteínas Dicer (Dcl), Argonauta (Ago), polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP), Qip1, RnhA y R3B2. Las distintas formas geométricas representan dominios proteicos predichos bioinformáticamente por similitud de secuencia. Las proteínas Dcl disponen de un dominio helicasa similar a DEAD (DEXDc) y helicasa C (HELIc), un dominio de plegamiento similar a dominios de unión a dsRNA típicos de proteínas Dicer (Dicer-DSRBF), un dominio PIWI-Argonauta-Zwille (PAZ), dos dominios Ribonucleasa III dispuestos en tándem (RNasaIII a y b) y un motivo de unión a dsRNA (DSRM). Las proteínas Ago poseen un dominio PAZ, un dominio central (MID) y un dominio PIWI carboxilo terminal con actividad ribonucleasa H (PIWI). Las proteínas RdRP tienen un dominio Polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP) y un motivo de reconocimiento de RNA (RRM) en RdRP2; el dominio RdRP de RdRP1 está interrumpido por una serie de residuos ácidos (representado como una discontinuidad en el dominio). Qip1 presenta un dominio con actividad ribonucleasa tipo H (RNasaH). La proteína RnhA dispone de un dominio DEXDc, un dominio Helicasa UvrD/REP (UvrD) y un dominio de dedo de zinc tipo NF-X1 (NF-X1). La proteína R3B2 posee dos dominios

de unión a dsRNA (dsRBD) y un dominio Ribonucleasa III (RNasaIII). Figura adaptada de Ruiz-Vázquez et al., 2015¹⁵³, añadiendo las proteínas identificadas por Calo et al., 2017¹⁴³.

Estas proteínas participan de manera no exclusiva en las distintas rutas de RNAi de *M. circinelloides* (Figura I.10): una ruta canónica involucrada en 1) la defensa contra material genético invasivo mediante siRNAs, y en 2) la regulación endógena, controlando la expresión génica mediante esRNAs derivados de exones (*exonic siRNAs* o *ex-siRNAs*) que pueden generar epimutantes durante situaciones de estrés; y 3) la ruta degradativa NCRIP.

1) La ruta mejor estudiada, por ser la primera que se caracterizó, es la canónica de siRNA. Se activa ante la presencia de moléculas de dsRNA invasivas o exógenas que derivan de transgenes, repeticiones, transposones y probablemente virus; o endógenas derivadas de secuencias génicas, principalmente de exones. Rdrp1 genera las moléculas de dsRNA a partir de transcritos de ssRNA, que serán procesadas en siRNAs de 21 o 25 nt¹⁵⁴. Dcl2 es la RNasa III tipo Dicer encargada de este procesamiento, aunque Dcl1 podría participar de manera residual en su ausencia¹⁴⁹ o en situaciones sin caracterizar. La proteína Argonauta Ago1 es el componente principal de RISC en *M. circinelloides*¹⁴⁰, que utiliza los siRNAs como guía para dirigir la degradación de los transcritos complementarios. Además de activar a RISC, Ago1 y Qip1 participan en la biogénesis de los siRNA, o en estabilizarlos, ya que no se generan siRNAs en ausencia de cualquiera de estas proteínas^{140,143}. Esta ruta se beneficia de una etapa de amplificación en la que participa Rdrp2, una RdRP que genera nuevas moléculas de dsRNA utilizando los productos de degradación de los transcritos diana como molde. Estas moléculas de dsRNA secundarias son procesadas de nuevo por Dcl2 para generar siRNAs de 25 nt, tanto en el mismo sentido (con sentido) como antisentido a los transcritos diana, y de 21 nt antisentido^{150,153}. Esta ruta es la encargada de silenciar la expresión de transgenes que generan aRNA^{149,150} y un considerable número de secuencias repetidas y transposones contenidos en el genoma de *M. circinelloides*^{134,153}.

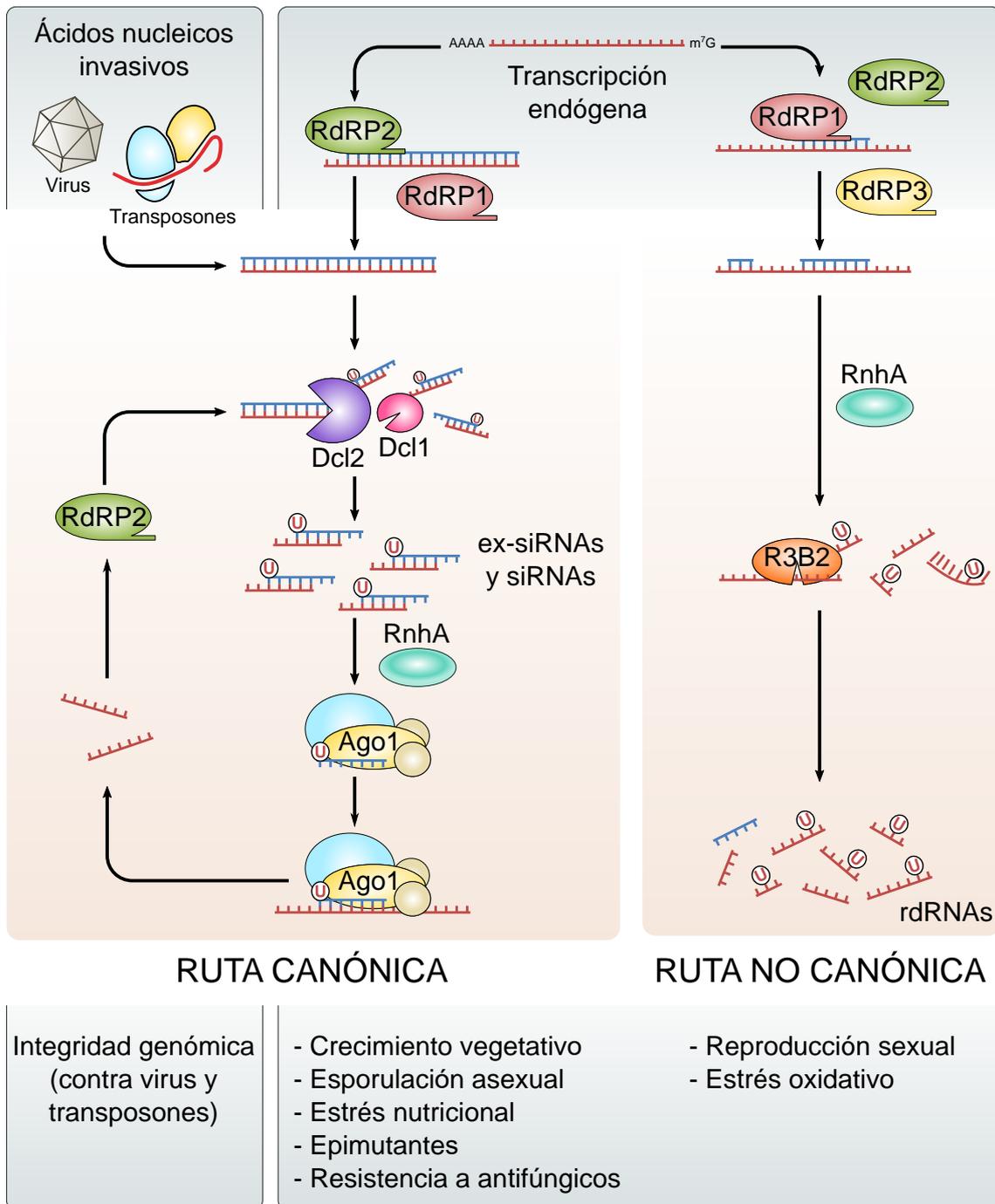


Figura I.10. Rutas de RNAi identificadas en *Mucor circinelloides*. Las moléculas de dsRNA de origen exógeno, o bien de la propia transcripción endógena (arriba) activan la ruta de RNAi canónica que genera (ex-)siRNAs (izquierda), mientras que la ruta de RNAi no canónica (derecha) solo participa en la degradación de transcritos endógenos generando RNAs degradados dependientes de RdRP (RdRP-dependent degraded RNAs o rdRNAs). Las proteínas que participan en las distintas etapas de ambas rutas están representadas como formas geométricas etiquetadas. Las moléculas de RNA con sentido y antisentido se diferencian por colores, rojo y azul respectivamente; la posición conservada de nucleótidos de uracilo se marca con una (U).

Dependiendo del origen de las moléculas de dsRNA, la ruta de RNAi activada participa en distintas funciones biológicas (abajo). Figura adaptada de Calo et al., 2017.

2) Además, esta maquinaria de RNAi dependiente de Dicer y Argonauta participa en la regulación endógena generando esRNAs principalmente a partir exones, denominados ex-siRNA. El primer modelo que clasificaba los ex-siRNA de *M. circinelloides* atendía a las proteínas que participan en su biogénesis y a las características estructurales de los ex-siRNAs¹³⁴. Los ex-siRNA de las clases I y II, que se diferencian únicamente en la RdRP que los genera, son siRNAs con un tamaño predominante de 23-24 nt, tanto con sentido como antisentido, y presentan un nucleótido de uracilo en su extremo 5'. Estos ex-siRNA se unen a Ago1 para dirigir la degradación de los transcritos que los originan, controlando así procesos biológicos tan diversos como el crecimiento vegetativo, la esporulación, la respuesta a ayuno y la reproducción sexual^{36,140,149}. Esta ruta participa en la generación de epimutantes ante distintas situaciones estresantes, utilizando gran parte de la maquinaria de RNAi canónica y otras proteínas que funcionan de manera específica en la ruta epimutacional. Este mecanismo se descubrió por primera vez en *M. circinelloides*, al observar la aparición de individuos resistentes a un agente antifúngico, pero que no mostraban cambios a nivel de secuencia de DNA en su genoma que explicaran la resistencia. En lugar de cambios en el DNA, los individuos resistentes generaban ex-siRNAs complementarios a los transcritos diana del antifúngico, silenciándolos y adquiriendo así una resistencia transitoria por mediada por cambios epigenéticos que desaparecía al eliminar la presión selectiva del antifúngico. A estos individuos resistentes se los denominó epimutantes, y a la ruta de RNAi involucrada en este fenómeno ruta epimutacional¹⁴². Posteriormente, se demostró que esta ruta opera para generar epimutantes ante distintos estreses¹⁴⁴, y que los epimutantes mantienen esta resistencia en órganos del hospedador que son blanco de la mucormicosis¹⁵⁵. En cuanto al mecanismo molecular de la ruta, la diferencia principal con la ruta canónica de siRNAs radica en el papel predominante de Rdrp2 en lugar de Rdrp1¹⁴³. Por el momento se desconoce en qué etapas de la ruta participa Rdrp2, ya que podría actuar tanto en la producción de aRNA ante un estrés específico, disparando la maquinaria de RNAi, como en la etapa de amplificación. En cualquier caso, Rdrp2 junto a Dcl1, Dcl2, Ago1, RnhA y Qip1, son esenciales para generar los siRNAs y degradar los transcritos complementarios a estos¹⁴³. De esta manera, la ruta epimutacional confiere una enorme

plasticidad fenotípica que permite una adaptación rápida y reversible ante condiciones ambientales adversas y estresantes.

3) Por último, la identificación de los ex-siRNAs clasificados como clase III y IV, que no se unen a Ago-1 ni requieren específicamente a Dcl2, sugirió la existencia de una ruta de RNAi dependiente de RdRPs o no canónica^{37,134}. El funcionamiento de esta ruta, conocida como NCRIP, comenzó a perfilarse tras el descubrimiento de R3B2, una nueva ribonucleasa involucrada en la degradación de RNAs mensajeros (*messenger RNAs* o mRNAs)³⁷. Rdrp1, Rdrp2 y Rdrp3 participan en esta ruta junto a RnhA^{37,143}, posiblemente generando moléculas de dsRNA a partir de transcritos altamente expresados. La producción de dsRNA marcaría la degradación de estos transcritos mediada por la actividad ribonucleasa de R3B2, que genera los denominados RNAs degradados dependientes de RdRP (*RdRP-dependent degraded RNAs* o rdRNAs)³⁷. Estos rdRNAs que genera la NCRIP presentan un tamaño variable, comprendido en un rango de 18-24 nt, son mayoritariamente con sentido, y en su secuencia predomina un nucleótido de uracilo en la penúltima posición del rdRNA en lugar de en su extremo 5' como ocurre en los siRNAs. La producción de rdRNAs correlaciona con un descenso en los niveles de mRNA complementario, por lo que NCRIP regula la expresión génica a nivel postranscripcional. Los primeros resultados acerca de qué transcritos son las dianas preferentes de NCRIP indican un enriquecimiento en aquellos involucrados en el metabolismo y transporte de coenzimas e iones inorgánicos, principalmente genes que participan en la síntesis de grupos hemo y en la respuesta a estrés oxidativo³⁷. El fenotipo de los mutantes en proteínas clave de esta ruta confirma estos resultados, ya que muestran una sensibilidad alterada al estrés oxidativo. Además, estos mutantes no producen cigosporas cuando se cruzan con estirpes del sexo contrario, lo que sugiere que la NCRIP participa en regular los procesos de reproducción sexual.

Estas rutas de RNAi interactúan entre sí para regular la expresión génica en *M. circinelloides*, añadiendo más complejidad al sistema. Por una parte, y a pesar de su papel principal en la NCRIP, la ribonucleasa R3B2 también participa en la ruta canónica generando siRNAs y ex-siRNAs³⁷. Este doble papel de R3B2 explicaría la similitud estructural entre los ex-siRNA de las clases III y IV y los rdRNAs. Por otra parte, la ruta epimutacional se induce considerablemente en ausencia de las proteínas clave que participan en la NCRIP^{142,143}, lo que indica una interacción entre ambas rutas. Esta interacción podría explicarse como una relación de competencia por el mismo sustrato,

los aRNAs; ante un estrés o estímulo ambiental específico, la balanza se inclina del lado de la ruta epimutacional ya que conferiría una ventaja adaptativa. El descubrimiento de estas dos rutas es relativamente reciente, por lo que aún no se conoce todo su potencial regulador. Un análisis exhaustivo de los genes regulados por NCRIP podría ayudar a entender su papel en la respuesta a estrés y la reproducción sexual, así como su interrelación con la ruta epimutacional.

I.4. Identidad de la cromatina centromérica

I.4.1. Función y estructura del complejo cinetocoro-centrómero

La separación de los cromosomas durante la división celular en eucariotas es un proceso que requiere una regulación extremadamente compleja. En este proceso interviene el cinetocoro, un complejo proteico macromolecular que actúa como puente de unión entre los centrómeros de los cromosomas y los microtúbulos. La función del cinetocoro es asegurar la biorientación de los cromosomas o las cromátidas hermanas, garantizando que cada célula hija recibe la dotación genética adecuada. Durante la mitosis y meiosis II, el cinetocoro favorece la biorientación anfitélica de las cromátidas hermanas controlando la estabilidad del anclaje a los microtúbulos, de manera que si la orientación es correcta se produce una tensión que mantiene el anclaje, o se rompe en caso de orientaciones incorrectas como aquellas monotélicas, sintéticas o merotélicas (Figura I.11). Por otro lado, durante la meiosis I, las cromátidas hermanas se fusionan de manera yuxtapuesta por lo que el cinetocoro se ancla a los microtúbulos propiciando una biorientación sintética¹⁵⁶ (Figura I.11).

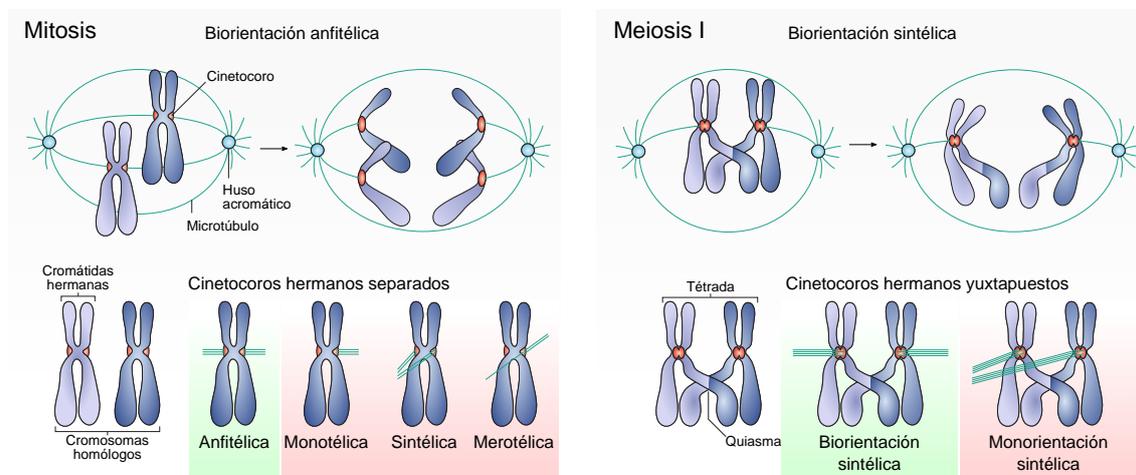


Figura I.11. Función del cinetocoro en la biorientación de los cromosomas. Se muestra la disposición adecuada de los cromosomas y las cromátidas hermanas durante la división celular,

específicamente durante la mitosis y la meiosis I; la disposición durante la meiosis II se considera análoga a la mostrada en la mitosis. Durante la mitosis (izquierda), los husos cromáticos emiten microtúbulos que se anclan a los cinetocoros de las cromátidas hermanas, produciendo una tensión que arrastra cada cinetocoro hermano hacia un polo opuesto de la célula en un fenómeno de biorientación anfitélica (sombreado verde). También se muestran las disposiciones incorrectas que no generan la tensión necesaria para separar las cromátidas hermanas (sombreado rojo). Durante la meiosis I (derecha), los cromosomas de una tétrada deben separarse y ser arrastrados hacia los polos opuestos de la célula. Para ello, los microtúbulos de un huso acromático se unen a los cinetocoros hermanos, que en meiosis I se disponen yuxtapuestos o fusionados, produciendo la tensión que causa la biorientación sintélica (sombreado verde). Las orientaciones incorrectas (sombreado rojo) no producen la adecuada separación de los cromosomas. Figura traducida de Watanabe et al., 2012¹⁵⁶.

El cinetocoro está altamente conservado en eucariotas¹⁵⁷ y se divide estructuralmente en dos capas: 1) el cinetocoro externo e 2) interno (Figura I.12).

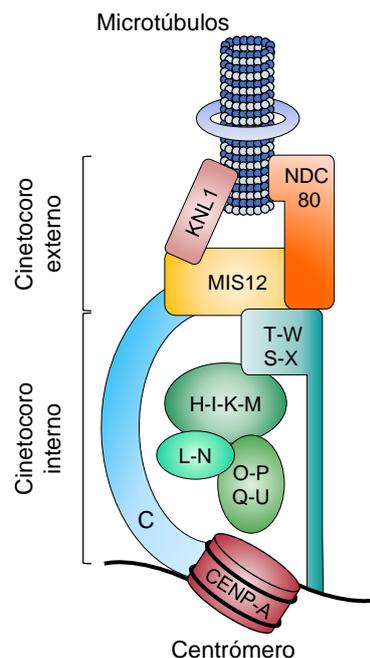


Figura I.12. Estructura general del cinetocoro en eucariotas. El cinetocoro es un macrocomplejo proteico que une los centrómeros con los microtúbulos. Está dividido en el cinetocoro interno, más cercano a los centrómeros, que se compone por los complejos TWSX, HIKM, LN, OPQU, CENP-C y CENP-A, que se une directamente al DNA centromérico; y el cinetocoro externo, próximo a los microtúbulos, y formado por los complejos MIS12, NDC80 y KNL1. Los distintos complejos están representados por formas geométricas, y el DNA centromérico como una hebra de color negro.

1) El cinetocoro externo está compuesto por los complejos proteicos Knl1, Mis12 y Ndc80, por lo que también se lo conoce como la red KMN. Los microtúbulos forman uniones estables con el cinetocoro externo a través del complejo Ndc80, un requisito esencial para superar el punto de control de la formación del huso acromático (*spindle-attachment checkpoint* o SAC)¹⁵⁸. Para inhibir los componentes del SAC y progresar en la separación de las cromátidas hermanas, es necesario que Knl1 reclute una serie de proteínas reguladoras¹⁵⁹. Por último, el complejo Mis12 ocupa el lugar central en las interacciones proteicas del cinetocoro externo, uniendo el resto de los componentes y, por tanto, los microtúbulos al cinetocoro interno^{160,161}.

2) El cinetocoro interno se ancla a unas regiones de la cromatina bien definidas denominadas centrómeros, específicamente a los nucleosomas que contienen la variante de histona H3 conocida como proteína centromérica (*centromeric protein* o CENP) CENP-A. CENP-A recluta a CENP-C^{162,163}, que también se une a la cromatina centromérica y al complejo CENP-LN¹⁶³, sobre los que se ensambla el complejo CENP-HIKM¹⁶³. Este último sirve de unión al resto de los complejos CENP, CENP-TWSX^{164,165} y CENP-OPQU¹⁶⁶, formando la red constitutiva asociada al centrómero (*constitutive centromere-associated network* o CCAN). Las proteínas CENP del complejo CENP-TWSX presentan dominios de plegamiento de las histonas (*histone-fold domain* o HFD) que le permiten unirse al DNA de la cromatina centromérica, formando estructuras similares a nucleosomas que flanquean los nucleosomas con CENP-A¹⁶⁷. La unión del cinetocoro interno con el externo se completa con las interacciones entre CENP-C y CENP-T con el complejo Mis12^{161,168}.

CENP-A es, por tanto, el cimiento sobre el que se construye el cinetocoro. La unión de CENP-A a los centrómeros suele ser independiente de la secuencia de DNA, muy estable y autopropagable a través de muchas generaciones¹⁶⁹. Debido a estas características se considera a CENP-A como una marca epigenética que determina la identidad del centrómero. La estructura de CENP-A es ligeramente distinta en cada organismo, lo que contrasta con el alto grado de conservación que se observa en el resto de las histonas eucarióticas y demás proteínas del cinetocoro¹⁷⁰. Estas diferencias se deben a episodios de evolución adaptativa para ajustar la estructura de CENP-A a las distintas regiones centroméricas de cada organismo¹⁷¹.

Aunque la función del centrómero está conservada en todos los eucariotas, su secuencia evoluciona extremadamente rápido y difiere hasta en organismos

filogenéticamente próximos. La variabilidad en su secuencia se extiende también a la organización de la cromatina centrómerica, por lo que existen varios tipos de centrómeros con características que los hacen únicos (Figura I.13). La mayoría de los organismos eucarióticos poseen cromosomas monocéntricos en los que el centrómero ocupa una posición concreta. Entre estos, *S. cerevisiae* y otras levaduras relacionadas presentan centrómeros puntuales, considerados únicos porque solo necesitan una secuencia específica de DNA para reclutar a CENP-A y al resto del cinetocoro¹⁷². El resto de los organismos con cromosomas monocéntricos disponen de centrómeros regionales, que están determinados de manera epigenética¹⁷³. Los centrómeros regionales son de mayor tamaño que los puntuales con una longitud es muy variable, desde los pequeños centrómeros de *Candida albicans* hasta las enormes regiones centroméricas de mamíferos, ya que suelen estar compuestos por repeticiones de DNA. Estas repeticiones están constituidas por retrotransposones o por una serie de repeticiones en tándem, que suelen contribuir a la función del centrómero. Excepcionalmente, algunos eucariotas reclutan cinetocoros a lo largo de toda la longitud de sus cromosomas y no presentan una región centromérica definida; un fenómeno conocido como holocentrismo que ha surgido de manera independiente hasta en dieciséis linajes evolutivos distintos¹⁷⁴. Esta variabilidad define la paradoja del centrómero: a pesar de llevar a cabo una función tan vital y conservada como es la correcta separación de los cromosomas durante la división celular, los centrómeros son sorprendentemente variables en secuencia, estructura y organización entre los distintos organismos eucarióticos¹⁷⁵. Cómo se forma el complejo centrómero-cinetocoro en eucariotas sigue siendo un interrogante biológico fundamental. Aunque el descubrimiento de los primeros centrómeros puntuales indicaba que una secuencia concreta de DNA determina la identidad del centrómero, esta idea ha sido reemplazada por la de un mecanismo epigenético en el que un complejo proteico marca la localización y función de la cromatina centromérica. El estudio comparativo del complejo centrómero-cinetocoro en grupos filogenéticos muy diversos podría ofrecer una visión más completa de este mecanismo en eucariotas.

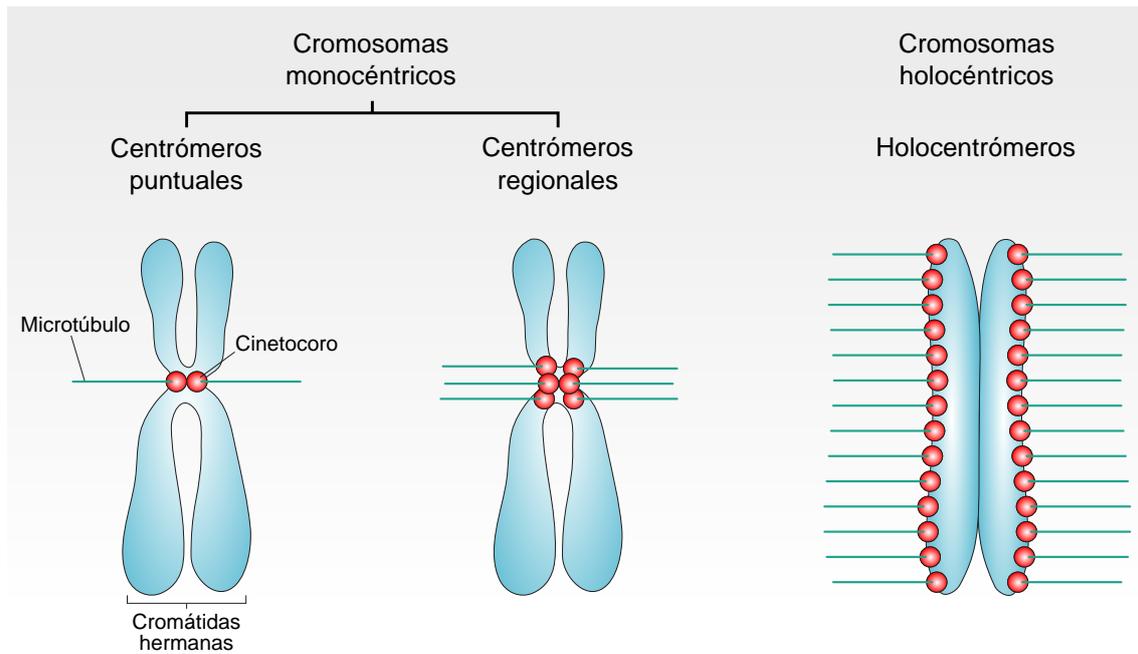


Figura I.13. Tipos de centrómeros. Se muestran tres tipos de organización centromérica: centrómeros puntuales y centrómeros regionales, cuyos cinetocoros se depositan en regiones específicas de los cromosomas, generando cromosomas monocéntricos y holocentrómeros, estos últimos denominados así porque los cinetocoros se disponen de manera difusa a lo largo de todo el cromosoma, lo que genera cromosomas holocéntricos.

I.4.2. Cromatina centromérica en hongos

La característica que mejor define a los centrómeros es su variabilidad, y queda patente al examinar la organización de la cromatina centromérica en hongos. En este reino, los centrómeros oscilan desde los pequeños centrómeros puntuales de *S. cerevisiae*¹⁷², de unas 100 pares de bases (*base pairs* o bp), hasta los enormes centrómeros regionales de algunos hongos filamentosos como *N. crassa*, que contienen hasta 300 kilobases (kb)¹⁷⁶. La mayor parte de los centrómeros de hongos muestran algunas características comunes a todos los centrómeros de eucariotas, como la presencia de regiones muy ricas en pares de adenina y timina (AT) y agrupaciones de secuencias repetidas típicas de centrómeros regionales; pero también poseen características únicas que convierten a este diverso grupo filogenético en un modelo excelente para estudiar la dinámica del complejo centrómero-cinetocoro.

Los organismos del filo Ascomycota poseen los centrómeros más diversos de todos los hongos, algo que podría estar relacionado con la pérdida de ciertos mecanismos de regulación epigenética en algunos linajes (Figura I.14). El ancestro común de las levaduras del subfilo Saccharomycotina perdió la maquinaria implicada en la formación

de heterocromatina mediante di- o trimetilación de histonas H3 en la lisina 9 (H3K9me2/me3, respectivamente)¹⁷⁷. Los centrómeros de los descendientes de este linaje son muy distintos a los del resto de eucariotas; son más pequeños, muy diversos y carecen de regiones de heterocromatina en sus extremos¹⁷³. Además de esta pérdida, la mayor parte de linajes de la familia Saccharomycetaceae carecen de la maquinaria de RNAi^{148,178} y todas las especies estudiadas hasta la fecha poseen centrómeros puntuales, descritos por primera vez en *S. cerevisiae*^{172,179}. Los centrómeros puntuales de esta levadura están determinados genéticamente por una secuencia consenso compuesta por dos elementos de DNA bien conservados (*centromere-determining element* o CDE): CDEI, un palíndromo de 8 bp, y CDEIII, un motivo de DNA de 26 bp. Las proteínas del cinetocoro se unen a CDEI y CDEIII, que están separados por una región rica en AT de ~ 80 bp denominada CDEII^{172,180}. Esta secuencia consenso de ~ 125 bp formada por las tres regiones CDE es necesaria y suficiente para la función del centrómero¹⁷², y se localiza en un único nucleosoma formado por CENP-A¹⁸¹. Los CDE están conservados en la mayoría de centrómeros puntuales de sacaromicetáceas¹⁸², con la excepción de *Naumovozyma* spp. que muestran centrómeros puntuales atípicos con un origen evolutivo independiente¹⁸³. Curiosamente, las levaduras del género *Naumovozyma* sí poseen un mecanismo de RNAi funcional¹⁷⁸, aunque no parece estar implicado en la función centromérica¹⁸³. Estas observaciones sugieren que la aparición de los centrómeros puntuales, determinados genéticamente, representa un cambio evolutivo reciente que substituyó a los centrómeros ancestrales que se regularían mediante mecanismos epigenéticos. Este reemplazamiento debió posibilitar la relajación de la presión selectiva para mantener la maquinaria de formación de heterocromatina y RNAi, explicando la pérdida de estos mecanismos en la mayoría de los linajes de levaduras sacaromicetáceas con centrómeros puntuales¹⁷³. Es sorprendente que esta organización en centrómeros puntuales haya surgido en dos eventos evolutivos independientes, un hecho que subraya la diversidad de secuencias centroméricas que cumplen la misma función.

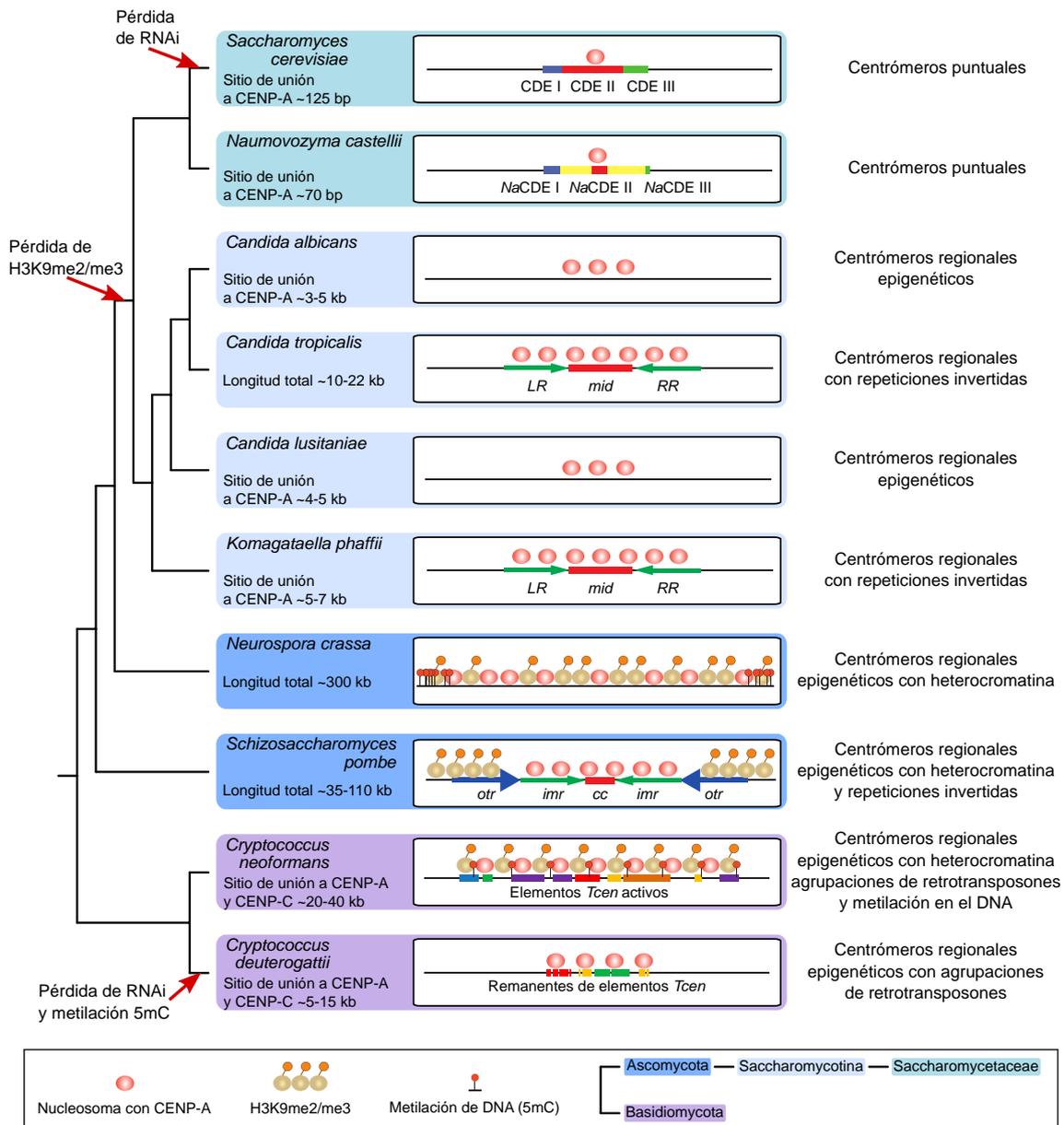


Figura I.14. Cromatina centromérica en el subreino Dikarya. Características principales de los centrómeros identificados en distintas especies del subreino Dikarya, representadas conforme a la leyenda (abajo) y resumidas a la derecha. El cladograma muestra la relación filogenética entre las especies estudiadas, donde las flechas rojas indican eventos de pérdida evolutiva de la maquinaria necesaria para procesos biológicos importantes en la regulación génica. Las especies se muestran con un sombreado de color que indica su pertenencia a los grupos filogenéticos indicados en la leyenda. Figura adaptada de Coughlan et al. 2016¹⁸⁴, añadiendo los centrómeros de basidiomicetos descritos por Yadav et al. 2018¹⁸⁵.

Las levaduras del subfilo Saccharomycotina que carecen de centrómeros puntuales tienen centrómeros regionales pequeños, identificados por primera vez en *C. albicans* y *Candida dubliniensis*^{186,187}. Los centrómeros de estas *Candida* spp. tienen sitios de unión a CENP-A de 3-5 kb, que se localizan en regiones no codificantes de hasta

18 kb carentes de secuencias consenso o características estructurales en común¹⁸⁸. La secuencia de DNA de estos centrómeros no es suficiente ni necesaria para la función centromérica^{189,190}, lo que apunta a que están determinados epigenéticamente por la presencia de CENP-A en generaciones anteriores. Los centrómeros de *Candida lusitanae* son muy parecidos, dispuestos en regiones únicas, sin genes, y con un alto contenido en AT donde CENP-A ocupa una región de 4-5 kb¹⁹¹. No obstante, los centrómeros regionales pequeños no siempre presentan secuencias de DNA únicas, y en algunas especies se observa una repetición invertida (*left/right repeat*, LR/RR) que flanquea los extremos de una pequeña región central (*mid*) a la que se une CENP-A. Este es el caso de los centrómeros de *Candida tropicalis*¹⁹² y *Komagataella phaffii*¹⁸⁴, la antigua *Pichia pastoris*. Estas repeticiones recuerdan a la estructura de los centrómeros regionales grandes del resto de los eucariotas, aunque no se forman las grandes agrupaciones de secuencias repetidas compactadas en heterocromatina características de estos. Una vez más, estas observaciones apuntan a que el ancestro común de hongos, animales y plantas poseía centrómeros regionales grandes; y refuerzan la correlación entre la pérdida de la maquinaria de formación de heterocromatina H3K9me2/me3 y de RNAi y la presencia de centrómeros con una estructura más sencilla.

El resto de los organismos de los filos Ascomycota y Basidiomycota estudiados reclutan cinetocoros en centrómeros regionales grandes, los más habituales entre los eucariotas. En general, sus secuencias centroméricas están formados por un gran número de repeticiones y transposones activos o truncados. Los centrómeros regionales más extensos pertenecen al ascomiceto *N. crassa*, que presenta enormes regiones heterocromáticas de hasta 300 kb, ricas en AT y compuestas por repeticiones heterogéneas y transposones inactivos^{176,193,194}, sobre las que se deposita CENP-A de manera no uniforme. Esta estructura es similar a la de otros hongos alejados filogenéticamente, como el basidiomiceto *C. neoformans*. En este hongo, CENP-A se une de manera no uniforme a lo largo de regiones de 20-40 kb, que están compuestas por distintos retrotransposones centroméricos denominados Tcn^{185,195,196}. Una especie filogenéticamente cercana, *Cryptococcus deuterogattii*, muestra una estructura y composición muy similar, pero con regiones centroméricas significativamente más pequeñas. Esta y otras especies de basidiomicetos perdieron la maquinaria de RNAi y de metilación de citosinas (5mC), por lo que no podrían silenciar la transcripción, ni prevenir la transposición de los retroelementos centroméricos. Como consecuencia evolutiva,

estos elementos han perdido los dominios esenciales para su transposición y están truncados, lo que explica la pérdida de tamaño y la correlación entre la ausencia de la maquinaria para RNAi y 5mC y la presencia de centrómeros más pequeños¹⁸⁵. Como último ejemplo de diversidad, la levadura ascomiceta *S. pombe* muestra unos centrómeros muy característicos definidos como un caso especial de centrómeros regionales grandes. Su cromatina centromérica está organizada en largas secuencias pericéntricas de 35-110 kb que encierran una región central de ~ 15 kb a la que se une CENP-A (*central core*, *cc* o *cnt*). Esta región central está flanqueada a ambos extremos por una repetición invertida específica de cada centrómero (*innermost repeat* o *imr*), encerradas a su vez por varias copias en tándem de secuencias repetidas (*outer repeats* u *otr*) dispuestas también con orientación invertida (Figura I.14)^{197,198}. Las *otr*, compuestas por elementos *dh* y *dg*, se transcriben en aRNAs que disparan la maquinaria de RNAi. De esta manera se generan siRNAs complementarios a los *loci* centroméricos, dirigiendo la metilación de H3K9 y la formación de heterocromatina necesaria para reclutar a CENP-A¹⁹⁹. Al contrario que en el resto de organismos con centrómeros regionales grandes, parte de la secuencia de los centrómeros de *S. pombe* –un fragmento que incluye las regiones *cc*, *imr* y una *otr*– es suficiente para determinar la identidad del centrómero²⁰⁰; pero no necesaria, ya que la formación de heterocromatina dirigida de manera artificial en ausencia de secuencias *otr* consigue reclutar al cinetocoro²⁰¹.

La enorme diversidad en cuanto a la secuencia, estructura y regulación de la cromatina centromérica en hongos es un reflejo de la paradoja del centrómero. La variabilidad en estos *loci* entre las distintas especies está relacionada con la pérdida evolutiva de mecanismos de regulación epigenética considerados imprescindibles para la mayoría de los eucariotas. Como consecuencia, la identidad del centrómero se determina mediante distintos mecanismos en hongos: dependientes de secuencias de DNA específicas y conservadas, que definen genéticamente los centrómeros puntuales; dependientes de repeticiones y transposones, que determinan los centrómeros regionales grandes mediante secuencia y marcas epigenéticas; y que sólo dependen de la presencia de CENP-A en regiones específicas durante generaciones anteriores, como algunos centrómeros regionales pequeños que están regulados exclusivamente por epigenética. Sin embargo, toda esta diversidad se ha caracterizado en los Dikarya, mientras que el complejo cinetocoro-centrómero de los linajes de hongos basales permanece inexplorado. Un estudio reciente sugiere la pérdida evolutiva de CENP-A en algunas especies de

hongos basales del filo Mucoromycota, entre ellas *M. circinelloides*¹⁵⁷. CENP-A es una proteína clave en definir la identidad de los centrómeros, cuya pérdida se ha descrito únicamente en algunos linajes de protistas y animales. Entre los protistas, los kinetoplástidos poseen un cinetocoro alternativo compuesto por proteínas completamente distintas al resto de eucariotas²⁰². Y entre los animales, CENP-A se ha perdido de manera independiente en distintos órdenes de insectos cuyos cromosomas, como consecuencia, han sufrido una transición desde monocéntricos a holocéntricos²⁰³. Por tanto, la ausencia de CENP-A parece ser tolerada en algunos organismos, aunque ocasiona una drástica reorganización del complejo cinetocoro-centrómero. Esto significa que la diversidad observada en la centrocromatina de ascomicetos y basidiomicetos podría ser solo la punta del iceberg, y que el estudio del complejo cinetocoro-centrómero en los linajes de hongos basales puede descubrir organizaciones y mecanismos de regulación de la cromatina centromérica completamente nuevos.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La aparición de los organismos eucariotas vino acompañada y, posiblemente, facilitada por un aumento drástico en la complejidad espaciotemporal de mecanismos reguladores de la expresión génica. Entre todos estos mecanismos destacan las distintas rutas de RNAi que utilizan RNAs pequeños para reconocer transcritos diana, e inhibir su expresión a nivel postranscripcional mediante complejos efectores. Durante las últimas décadas, la lista de sRNAs con funciones reguladoras no cesa de crecer, aunque se podrían resumir en tres grandes grupos: microRNAs, piRNAs y siRNAs. Estas rutas de silenciamiento génico postranscripcional juegan un papel crucial en coordinar la expresión, estabilidad, protección y herencia de los genomas eucarióticos. Probablemente aparecieron como un mecanismo de defensa ante ácidos nucleicos parásitos o invasores, pero los procesos de coevolución junto a sus antagonistas han conseguido que trasciendan su función original¹⁰¹. Estos procesos han acelerado la evolución de la maquinaria proteica que interviene en el fenómeno de RNAi, algo especialmente patente en invertebrados²⁰⁴ y hongos²⁰⁵, pero también han modelado el paisaje genómico controlando la actividad y presencia de elementos genéticos móviles¹⁰¹ y la estructura de las secuencias centroméricas¹⁸⁵. Esta rápida evolución se manifiesta de manera ejemplar en hongos, cuya cromatina centromérica muestra organizaciones únicas y extremadamente diversas. Hasta el momento, todas las investigaciones al respecto se han centrado en el subreino Dikarya, ignorando los linajes de hongos basales por ser modelos de estudio difíciles de manipular²⁵. Sin embargo, la cromatina centromérica de hongos basales promete encerrar una enorme diversidad que ayudaría a entender la evolución de los centrómeros en eucariotas. *M. circinelloides* es un hongo basal del orden Mucorales que carece de la proteína centromérica CENP-A¹⁵⁷, la piedra angular del cinetocoro que media la unión entre los centrómeros y el cinetocoro durante la división celular. *M. circinelloides* es un ejemplo de diversidad en la maquinaria de RNAi, ya que dispone de una ruta de RNAi canónica, o dependiente de Dicer, y otra no canónica que controlan la expresión génica y la integridad genómica. Además, su genoma ha sufrido un evento extenso de duplicación con consecuencias drásticas para la percepción de señales ambientales³³. Esto, junto a la amplia gama de herramientas moleculares disponibles para manipularlo genéticamente, lo convierte en un candidato excelente para estudiar la dinámica entre distintas rutas de RNAi, cromatina centromérica, elementos genéticos móviles y estabilidad genómica.

Esta dinámica, y en particular la interacción entre dos rutas de RNAi que compiten por la regulación génica, debe tener consecuencias sobre la fisiología, desarrollo y ecología de los hongos mucorales. Frecuentemente saprófitos, algunas especies se comportan como patógenos oportunistas causantes de una infección poco común pero letal conocida como mucormicosis. La infección es rara en individuos inmunocompetentes pero en personas susceptibles, normalmente inmunocomprometidos, las esporas inhaladas germinan y evaden a las células fagocíticas del sistema inmune, provocando angioinvasión y diseminación sistémica. Debido a la ausencia de terapias clínicas eficaces contra estos patógenos, resistentes a gran parte de los antifúngicos empleados como tratamiento de primera línea, la consecuencia de una infección sistémica es la muerte del enfermo en el 90 % de los casos. Por tanto, la interacción entre el patógeno y el sistema inmune del hospedador es determinante para el pronóstico de la infección. Entender los mecanismos reguladores que gobiernan este proceso supondría un enorme avance para combatir la mucormicosis y atajar el proceso de colonización del hospedador. Los estudios a nivel transcriptómico de esta interacción se han centrado principalmente en la respuesta del hospedador⁶³, revelando la importancia de la inmunidad nutricional y, en especial, de la captación de hierro para iniciar la germinación⁷⁴. A pesar de estos esfuerzos, no se conocen los mecanismos de regulación que dirigen el proceso de germinación dentro de los fagocitos, ni si está regulado a nivel postranscripcional mediante RNAi. Recientemente, se ha implicado el mecanismo de RNAi canónico de *M. circinelloides* en la aparición de epimutaciones que confieren resistencia transitoria a distintos antifúngicos^{142,144}. Esta ruta de RNAi epimutacional podría estar regulada por la ruta de RNAi no canónica, o alguno de sus componentes principales¹⁴³. El interés en explorar el papel del mecanismo de RNAi en la patogénesis de los hongos Mucorales es doble. Por un lado, desentrañar cómo contribuye a los mecanismos morfogenéticos que ocurren en la espora durante la infección. Y, por otro lado, sentar las bases para futuras aplicaciones en el tratamiento y prevención de la mucormicosis, y de otras infecciones de patógenos eucariotas que poseen rutas de RNAi activas.

En base a estos antecedentes, el objetivo principal de esta tesis doctoral es estudiar la función del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en la función de la cromatina centromérica y la virulencia en hongos mucorales. Este objetivo principal engloba los siguientes objetivos específicos:

- 1. Caracterizar la cromatina centromérica e identificar las proteínas del cinetocoro interno y externo de *M. circinelloides*.** Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación:
Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., et al. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology* 29, 1–12. doi:10.1016/j.cub.2019.09.024
- 2. Analizar la función de las distintas rutas de RNAi en la regulación de la cromatina centromérica de *M. circinelloides*.** La consecución de este objetivo queda reflejada en los resultados de estas publicaciones:
Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., et al. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology* 29, 1–12. doi:10.1016/j.cub.2019.09.024
Pérez-Arques, C., et al (2020). A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genetics*
- 3. Identificar posibles reguladores maestros y efectores principales de la respuesta de *M. circinelloides* a la fagocitosis mediada por macrófagos, y su implicación en la virulencia empleando modelos de infección patógeno-hospedador.** La siguiente publicación detalla los resultados obtenidos al cumplir este objetivo:
Pérez-Arques, C., et al. (2019). *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *mBio* 10, 1–15. doi:10.1128/mBio.02765-18
- 4. Determinar la implicación de las distintas rutas de RNAi en la regulación de la respuesta a la interacción patógeno-hospedador y en la virulencia.** Los resultados derivados tras finalizar este objetivo forman parte de esta publicación:
Pérez-Arques, C., et al (2020). A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genetics*

III. PUBLICACIONES

III.1. Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres

Navarro-Mendoza, M.I., **Pérez-Arques, C.**, Panchal, S., Nicolás, F.E., Mondo, S.J., Ganguly, P., Pangilinan, J., Grigoriev, I. V., Heitman, J., Sanyal, K., Garre, V.

Publication date: November 28, 2019

Journal: Current Biology 29, 1-12. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.024

Summary: Centromeres are rapidly evolving across eukaryotes, despite performing a conserved function to ensure high-fidelity chromosome segregation. CENP-A chromatin is a hallmark of a functional centromere in most organisms. Due to its critical role in kinetochore architecture, the loss of CENP-A is tolerated in only a few organisms, many of which possess holocentric chromosomes. Here, we characterize the consequence of the loss of CENP-A in the fungal kingdom. *Mucor circinelloides*, an opportunistic human pathogen, lacks CENP-A along with the evolutionarily conserved CENP-C but assembles a monocentric chromosome with a localized kinetochore complex throughout the cell cycle. Mis12 and Dsn1, two conserved kinetochore proteins, were found to co-localize to a short region, one in each of nine large scaffolds, composed of an ~200-bp AT-rich sequence followed by a centromere-specific conserved motif that echoes the structure of budding yeast point centromeres. Resembling fungal regional centromeres, these core centromere regions are embedded in large genomic expanses devoid of genes yet marked by Grem-LINE1s, a novel retrotransposable element silenced by the Dicer-dependent RNAi pathway. Our results suggest that these hybrid features of point and regional centromeres arose from the absence of CENP-A, thus defining novel mosaic centromeres in this early-diverging fungus.

Available at [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(19\)31186-8](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(19)31186-8)

III.2. *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway

Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F.E., Garre, V.

Publication date: February 5, 2019

Journal: mBio 10, e02765-18. doi: 10.1128/mBio.02765-18

Summary: Mucormycosis is an emerging fungal infection that is often lethal due to the ineffectiveness of current therapies. Here, we have studied the first stage of this infection—the germination of *Mucor circinelloides* spores inside phagocytic cells—from an integrated transcriptomic and functional perspective. A relevant fungal gene network is remodeled in response to phagocytosis, being enriched in crucial functions to survive and germinate inside the phagosome, such as nutritional adaptation and response to oxidative stress. Correspondingly, the phagocytic cells induced a specific proinflammatory and apoptotic response to the pathogenic strain. Deletion of fungal genes encoding putative transcription factors (*atf1*, *atf2*, and *gcn4*), extracellular proteins (*chi1* and *pps1*), and an aquaporin (*aqp1*) revealed that these genes perform important roles in survival following phagocytosis, germination inside the phagosome, and virulence in mice. *atf1* and *atf2* play a major role in these pathogenic processes, since their mutants showed the strongest phenotypes and both genes control a complex gene network of secondarily regulated genes, including *chi1* and *aqp1*. These new insights into the initial phase of mucormycosis define genetic regulators and molecular processes that could serve as pharmacological targets.

Available at <https://mbio.asm.org/content/10/1/e02765-18>

III.3. A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in *Mucorales*

Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Murcia, L., Navarro, E., Garre, V., Nicolás, F.E.

Publication date: July 13, 2020

Journal: PLoS Genetics 16, e1008611. doi: 10.1371/journal.pgen.1008611

Summary: Epimutations in fungal pathogens are emerging as novel phenomena that could explain the fast-developing resistance to antifungal drugs and other stresses. These epimutations are generated by RNA interference (RNAi) mechanisms that transiently silence specific genes to overcome stressful stimuli. The early-diverging fungus *Mucor circinelloides* exercises a fine control over two interacting RNAi pathways to produce epimutants: the canonical RNAi pathway and a new RNAi degradative pathway. The latter is considered a non-canonical RNAi pathway (NCRIP) because it relies on RNA-dependent RNA polymerases (RdRPs) and a novel ribonuclease III-like named R3B2 to degrade target transcripts. Here in this work, we uncovered the role of NCRIP in regulating virulence processes and transposon movements through key components of the pathway, RdRP1, and R3B2. Mutants in these genes are unable to launch a proper virulence response to macrophage phagocytosis, resulting in a decreased virulence potential. The transcriptomic profile of *rdp1* Δ and *r3b2* Δ mutants revealed a pre-exposure adaptation to the stressful phagosomal environment even when the strains are not confronted by macrophages. These results suggest that NCRIP represses key targets during regular growth and releases its control when a stressful environment challenges the fungus. NCRIP interacts with the RNAi canonical core to protect genome stability by controlling the expression of centromeric retrotransposable elements. In the absence of NCRIP, these retrotransposons are robustly repressed by the canonical RNAi machinery; thus, supporting the antagonistic role of NCRIP in containing the epimutational pathway. Both interacting RNAi pathways might be essential to govern host-pathogen interactions through transient adaptations, contributing to the unique traits of the emerging infection mucormycosis.

Available at

<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1008611>

IV. CONCLUSIONES

The research articles that comprise this thesis and the results contained therein led to the following conclusions:

1. The centromeric histone H3 variant CENP-A was evolutionary lost in the last common ancestor of Mucorales and Umbelopsidales, followed by CENP-C in the last mucoralean common ancestor. Most of the remaining kinetochore proteins are conserved across the subphylum Mucoromycota.
2. Four histone H3- and three histone H4-coding genes were identified in the *M. circinelloides* genome, including one histone H3 and H4 variants. All canonical and variant histone proteins analyzed bind the whole chromatin instead of organizing in discrete kinetochore-like clusters, indicating that *M. circinelloides* lacks either histone H3 or H4 centromeric variants on monocentric chromosomes.
3. Fluorescent fusion proteins of Mis12 and Dsn1 –outer kinetochore–, as well as CENP-T –inner kinetochore– homologs were colocalized within the nucleus, forming one discrete kinetochore-like cluster for each nucleus. These kinetochore-like clusters maintain their arrangement throughout the whole nuclear division, which is asynchronous. These observations indicate that *M. circinelloides* possess monocentric chromosomes despite the absence of centromeric histone H3 or H4 variants.
4. Chromatin immunoprecipitation of Mis12 and Dsn1 and subsequent DNA sequencing revealed nine kinetochore-bound regions defined as core centromeres (CC), ranging from 400 to 1000 bp. The kinetochore binds asymmetrically to each CC, shown as two kinetochore-bound sequences –one minor and one major– separated by a highly AT-rich stretch. All nine CCs exhibit a highly conserved 41-bp motif that is exclusively located at their major kinetochore-bound sequences, resembling the centromere-determining elements (CDE) that define genetically-determined point centromeres.
5. CC-surrounding sequences show large regions varying in length from 15 to 75 kb, devoid of genes and almost transcriptionally silent. Numerous copies of a LINE1-like retrotransposon specific of Mucoromycotina species lacking CENP-A (Grem-LINE1) have colonized these pericentric regions of *M. circinelloides*, evoking features of regional centromeres.

6. *M. circinelloides* generates Dicer- and Ago-dependent sRNAs targeting Grem-LINE1 sequences. The accumulation of these sRNAs correlates inversely with their target mRNA levels, indicating that Grem-LINE1 transposition is controlled by the canonical RNAi pathway in *M. circinelloides*.
7. There is an increased number of canonical antisense sRNAs targeting Grem-LINE1 sequences in the absence of a functional non-canonical RNAi pathway suggesting that NCRIP represses the canonical RNAi pathway controlling Grem-LINE1 expression.
8. Transcriptomic profiling of two *M. circinelloides* opposite pathotypes undergoing mouse macrophage phagocytosis revealed a general response to phagocytosis present in both pathotypes, involved in functions related to macronutrient and ion assimilation and metabolism, as well as the production of secondary metabolites and extracellular structures; and a virulence-specific response observed only in the virulent pathotype that controls processes of cell wall and membrane biogenesis, cytoskeleton, cell motility, extracellular structures, and defense mechanisms.
9. The mouse macrophages launched a proinflammatory and proapoptotic response after phagocytosing spores from the virulent pathotype, but not from the avirulent pathotype.
10. Fungal genes encoding a putative aquaporin Aqp1, putative membrane-bound or secretion proteins Chi1 and Pps1, and basic leucine-zipper transcription Atf1, Atf2 are essential to survive macrophage phagocytosis and to develop a fully virulent phenotype in a murine infection model.
11. Atf1 and Atf2 regulate a vast gene network involved in the response to phagocytosis, including the *aqp1* and *chi1* genes. These four genes are important for the germination process at acidic pH, suggesting that the harsh environmental conditions within the phagosome result in the activation of an Atf-mediated germination pathway.
12. *M. circinelloides* NCRIP regulates a vast gene network by degrading its primary targets, especially during saprophytic conditions. When the fungus is challenged by stressful conditions, specifically those found in the phagosome, the control exerted by this regulatory mechanism is restrained.
13. The stressful phagosomal environment, as well as the lack of NCRIP activity, prompts the induction of genes encoding canonical RNAi essential enzymes, specifically Dcl1 and Dcl2, Qip1, and Ago1. These data support that both canonical

and non-canonical pathways play an antagonizing role in regulating gene expression, and that this interaction among pathways is important for pathogenesis.

14. A major portion of the virulence-specific response to macrophage phagocytosis is driven by the NCRIP, including genes essential to survive macrophage phagocytosis and host colonization *atf1*, *atf2*, *aqp1* and *pps1*.
15. Mutants lacking NCRIP activity mimicked most of the NCRIP-dependent virulence response during saprophytic growth in the absence of stressful conditions. This pre-exposure adaptive response is involved in macronutrient metabolic changes, production of secondary metabolites and extracellular structures, and could explain the higher tolerance to oxidative stress exhibited by the NCRIP-deficient mutants.
16. *M. circinelloides* mutants lacking NCRIP activity are significantly less virulent than a wild-type strain in a murine infection model, highlighting that NCRIP regulation is important for virulence.

V. REFERENCIAS

1. Spatafora, J. W. *et al.* The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol. Spectr.* **5**, 1–32 (2017).
2. Ahrendt, S. R. *et al.* Leveraging single-cell genomics to expand the fungal tree of life. *Nat. Microbiol.* **3**, 1417–1428 (2018).
3. Spatafora, J. W. *et al.* A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**, 1028–1046 (2016).
4. Benny, G. L., Humber, R. A. & Morton, J. B. Zygomycota: Zygomycetes. in *Systematics and Evolution* 113–146 (Springer Berlin Heidelberg, 2001). doi:10.1007/978-3-662-10376-0_6
5. Hibbett, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509–547 (2007).
6. Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol. Rev.* **94**, 2101–2137 (2019).
7. Talbot, P. H. B. *Principles of fungal taxonomy.* (Macmillan Education UK, 1971). doi:10.1007/978-1-349-15432-6
8. Guarro, J., Gené, J. & Stchigel, A. M. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 454–500 (1999).
9. Hoffmann, K. *et al.* The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **30**, 57–76 (2013).
10. Richardson, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 2–9 (2009).
11. Walther, Wagner & Kurzai. Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *J. Fungi* **5**, 106 (2019).
12. Tedersoo, L. *et al.* Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**, 1256688 (2014).
13. Zheng, R. & Jiang, H. *Rhizomucor endophyticus* sp. nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. *Micotaxon* **56**, 455–466 (1995).
14. Bouza, E., Muñoz, P. & Guinea, J. Mucormycosis: an emerging disease? *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 7–23 (2006).

15. Londoño-Hernández, L. *et al.* *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *Int. J. Food Microbiol.* **257**, 110–127 (2017).
16. Gładkowski, W., Mazur, M., Białońska, A. & Wawrzęczyk, C. Lactones 35 [1]. Metabolism of iodolactones with cyclohexane ring in *Absidia cylindrospora* culture. *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 326–333 (2011).
17. Satari, B. & Karimi, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 1097–1117 (2018).
18. Vicente, G. *et al.* Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy & Fuels* **24**, 3173–3178 (2010).
19. Kuzina, V. & Cerdá-Olmedo, E. Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 991–999 (2007).
20. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. & Aggelis, G. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 1060–1070 (2007).
21. Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S. & Zanetti, F. γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of Mucorales strains on cereals. *Bioresour. Technol.* **76**, 283–286 (2001).
22. Kaur, S. & Dhillon, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **40**, 155–175 (2014).
23. Harms, H., Schlosser, D. & Wick, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 177–192 (2011).
24. Friedman & Schwartz. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. *J. Fungi* **5**, 67 (2019).
25. Cerdá-Olmedo, E. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 503–512 (2001).
26. Skory, C. Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics* **268**, 397–406 (2002).

27. Skory, C. D. & Ibrahim, A. S. Native and modified lactate dehydrogenase expression in a fumaric acid producing isolate *Rhizopus oryzae* 99-880. *Curr. Genet.* **52**, 23–33 (2007).
28. van Heeswijk, R. & Roncero, M. I. G. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 691–702 (1984).
29. Ibrahim, A. S. *et al.* The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **77**, 587–604 (2010).
30. Gutiérrez, A., López-García, S. & Garre, V. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Methods* **84**, 442–446 (2011).
31. Corrochano, L. M. & Garre, V. Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 893–899 (2010).
32. Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet. Biol.* **90**, 44–52 (2016).
33. Corrochano, L. M. *et al.* Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Curr. Biol.* **26**, 1577–1584 (2016).
34. Díaz-Mínguez, J. M., López-Matas, M. A. & Eslava, A. P. Complementary mating types of *Mucor circinelloides* show electrophoretic karyotype heterogeneity. *Curr. Genet.* **36**, 383–389 (1999).
35. López-Fernández, L. *et al.* Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence* **1**, 707–720 (2018).
36. Nicolás, F. E. *et al.* The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics* **16**, 237 (2015).
37. Trieu, T. A. *et al.* A non-canonical RNA silencing pathway promotes mRNA degradation in basal fungi. *PLoS Genet.* **11**, e1005168 (2015).
38. Trieu, T. A. *et al.* RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathog.* **13**, e1006150 (2017).

39. Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E. & Mortensen, U. H. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* **10**, e0133085 (2015).
40. Nagy, G. *et al.* Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
41. Bruni, G. O., Zhong, K., Lee, S. C. & Wang, P. CRISPR-Cas9 induces point mutation in the mucormycosis fungus *Rhizopus delemar*. *Fungal Genet. Biol.* **124**, 1–7 (2019).
42. Ibragimova, S. *et al.* CRISPR-Cas9-based mutagenesis of the mucormycosis-causing fungus *Lichtheimia corymbifera*. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
43. Velayos, A., Blasco, J. L., Alvarez, M. I., Iturriaga, E. A. & Eslava, A. P. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* **210**, 938–946 (2000).
44. Silva, F., Torres-Martinez, S. & Garre, V. Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1023–1037 (2006).
45. Li, C. H. *et al.* Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002086 (2011).
46. Blakeslee, A. F. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **40**, 205 (1904).
47. Gauger, W. The germination of zygosporangia of *Mucor hiemalis*. *Mycologia* **57**, 634 (1965).
48. Díaz González, T. E., Fernández-Carvajal Álvarez, M. C. & Fernández Prieto, J. A. *Curso de botánica*. (Ediciones Trea S.L., 2004).
49. Schipper, M. A. A. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud. Mycol.* **12**, 1–40 (1976).
50. Ruiz-Herrera, J. Dimorphism in *Mucor* species. in *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine* 257–265 (Springer US, 1993). doi:10.1007/978-1-4615-2834-0_21
51. Orłowski, M. *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* **55**, 234–58 (1991).
52. Cornely, O. A. *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of

- mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect. Dis.* (2019). doi:10.1016/S1473-3099(19)30312-3
53. Frater, J. L., Hall, G. S. & Procop, G. W. Histologic features of zygomycosis: emphasis on perineural invasion and fungal morphology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 375–8 (2001).
 54. Hassan, M. I. A. & Voigt, K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: Epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Med. Mycol.* **57**, S245–S256 (2019).
 55. Skiada, A. *et al.* Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* **98**, 492–504 (2013).
 56. Schwarz, P., Cornely, O. A. & Dannaoui, E. Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective. *Mycoses* 0–3 (2019). doi:10.1111/myc.12909
 57. Pongas, G. N., Lewis, R. E., Samonis, G. & Kontoyiannis, D. P. Voriconazole-associated zygomycosis: A significant consequence of evolving antifungal prophylaxis and immunosuppression practices? *Clinical Microbiology and Infection* **15**, 93–97 (2009).
 58. Katragkou, A., Walsh, T. J. & Roilides, E. Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses? *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 74–81 (2014).
 59. Bouchara, J. P. *et al.* Attachment of spores of the human pathogenic fungus *Rhizopus oryzae* to extracellular matrix components. *Eur. J. Cell Biol.* **70**, 76–83 (1996).
 60. Liu, M. *et al.* The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 1914–24 (2010).
 61. Gebremariam, T. *et al.* CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *J. Clin. Invest.* **124**, 237–250 (2014).
 62. Gebremariam, T. *et al.* Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Sci. Adv.* **5**, eaaw1327 (2019).

63. Chibucos, M. C. *et al.* An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
64. Watkins, T. N. *et al.* Inhibition of EGFR signaling protects from mucormycosis. *mBio* **9**, (2018).
65. Slavin, M. *et al.* Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: epidemiology and determinants of mortality. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 490.e1-490.e10 (2015).
66. Hernández-Chávez, M., Pérez-García, L., Niño-Vega, G. & Mora-Montes, H. Fungal strategies to evade the host immune recognition. *J. Fungi* **3**, 51 (2017).
67. Salazar, F. & Brown, G. D. Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. *J. Innate Immun.* **10**, 373–397 (2018).
68. Erwig, L. P. & Gow, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 163–176 (2016).
69. Chamilos, G., Lewis, R. E., Lamaris, G., Walsh, T. J. & Kontoyiannis, D. P. Zygomycetes hyphae trigger an early, robust proinflammatory response in human polymorphonuclear neutrophils through toll-like receptor 2 induction but display relative resistance to oxidative damage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 722–724 (2008).
70. Inglesfield, S. *et al.* Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen *Mucor circinelloides* in innate granulomas in vivo. *mBio* **9**, e02010-17 (2018).
71. Sheldon, W. H. & Bauer, H. The development of the acute inflammatory response to experimental cutaneous mucormycosis in normal and diabetic rabbits. *J. Exp. Med.* **110**, 845–52 (1959).
72. Voelz, K., Gratacap, R. L. & Wheeler, R. T. A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*. *Dis. Model. Mech.* **8**, 1375–1388 (2015).
73. Waldorf, A. R., Ruderman, N. & Diamond, R. D. Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus*. *J. Clin. Invest.* **74**, 150–160 (1984).

74. Andrianaki, A. M. *et al.* Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat. Commun.* **9**, 3333 (2018).
75. Navarro-Mendoza, M. I. *et al.* Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Sci. Rep.* **8**, 7660 (2018).
76. Lee, S. C., Li, A., Calo, S. & Heitman, J. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* **9**, e1003625 (2013).
77. Lee, S. C. *et al.* Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **97**, 844–865 (2015).
78. Gauthier, G. M. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLOS Pathog.* **11**, e1004608 (2015).
79. Weber, I., Gruber, C. & Steinberg, G. A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826–2842 (2003).
80. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 279–289 (1990). doi:10.1105/tpc.2.4.279
81. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**, 3343–3353 (1992).
82. Cogoni, C. *et al.* Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* **15**, 3153–3163 (1996).
83. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
84. Rocheleau, C. E. *et al.* Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707–716 (1997).
85. Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W. & Moerman, D. G. Production of antisense

- RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* **113**, 503–14 (1991).
86. Izant, J. G. & Weintraub, H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**, 1007–1015 (1984).
87. Harland, R. & Weintraub, H. Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *J. Cell Biol.* **101**, 1094–1099 (1985).
88. Rosenberg, U. B., Preiss, A., Seifert, E., Jäckle, H. & Knipple, D. C. Production of phenocopies by Krüppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos. *Nature* **313**, 703–706 (1985).
89. Montgomery, M. K., Xu, S. & Fire, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15502–15507 (1998).
90. Hutvágner, G. & Zamore, P. D. RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 225–232 (2002).
91. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
92. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296 (2000).
93. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33 (2000).
94. Hammond, S. M. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146–1150 (2001).
95. Sijen, T. *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465–476 (2001).
96. Makeyev, E. V. & Bamford, D. H. Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol.*

- Cell* **10**, 1417–1427 (2002).
97. Forrest, E. C., Cogoni, C. & Macino, G. The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2123–8 (2004).
 98. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**, 537–548 (2002).
 99. Baulcombe, D. Viral suppression of systemic silencing. *Trends Microbiol.* **10**, 306–308 (2002).
 100. Waterhouse, P. M., Wang, M.-B. & Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834–842 (2001).
 101. Malone, C. D. & Hannon, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**, 656–668 (2009).
 102. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355 (2004).
 103. Reinhart, B. J. MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**, 1616–1626 (2002).
 104. Lee, H. C. *et al.* Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol. Cell* **38**, 803–814 (2010).
 105. Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J. & Zhu, X. Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **7**, e52734 (2012).
 106. Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C. & Baulcombe, D. C. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **447**, 1126–1129 (2007).
 107. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
 108. Flynt, A. S. & Lai, E. C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 831–842 (2008).
 109. Pedersen, I. & David, M. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine* **43**, 391–394 (2008).
 110. Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S.-M. & Peter, M. E. MicroRNAs: key players

- in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* **27**, 5959–5974 (2008).
111. Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O’Carroll, D. & Zamore, P. D. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 89–108 (2019).
 112. Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. & Carmell, M. A. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**, 199–202 (2006).
 113. Brennecke, J. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089–1103 (2007).
 114. Gunawardane, L. S. *et al.* A Slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5’ end formation in *Drosophila*. *Science* **315**, 1587–1590 (2007).
 115. Saito, K. *et al.* Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2’-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3’ ends. *Genes Dev.* **21**, 1603–1608 (2007).
 116. Ohara, T. *et al.* The 3’ termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2’-O-methylated. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 349–350 (2007).
 117. Golden, D. E., Gerbasi, V. R. & Sontheimer, E. J. An inside job for siRNAs. *Mol. Cell* **31**, 309–312 (2008).
 118. Vazquez, F., Legrand, S. & Windels, D. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci.* **15**, 337–345 (2010).
 119. Torres-Narbona, M., Guinea, J., Martinez-Alarcon, J., Munoz, P. & Gadea, I. Impact of Zygomycosis on Microbiology Workload: a Survey Study in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2051–2053 (2007).
 120. Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. The RNAi universe in fungi: A varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 371–391 (2017).
 121. Cerutti, H., Ma, X., Msanne, J. & Repas, T. RNA-mediated silencing in Algae: Biological roles and tools for analysis of gene function. *Eukaryot. Cell* **10**, 1164–1172 (2011).

122. Kolev, N. G., Tschudi, C. & Ullu, E. RNA interference in protozoan parasites: Achievements and challenges. *Eukaryot. Cell* **10**, 1156–1163 (2011).
123. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nature Reviews Genetics* **10**, 94–108 (2009).
124. Sijen, T., Steiner, F. A., Thijssen, K. L. & Plasterk, R. H. A. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**, 244–247 (2007).
125. Gazzani, S. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**, 1046–1048 (2004).
126. Voinnet, O. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **13**, 317–328 (2008).
127. Lee, H.-C. *et al.* The DNA/RNA-dependent RNA polymerase QDE-1 generates aberrant RNA and dsRNA for RNAi in a process requiring Replication Protein A and a DNA helicase. *PLoS Biol.* **8**, e1000496 (2010).
128. Lee, H.-C. *et al.* qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature* **459**, 274–277 (2009).
129. Zhang, X. *et al.* Mechanisms of small RNA generation from cis-NATs in response to environmental and developmental cues. *Mol. Plant* **6**, 704–715 (2013).
130. Chicas, A. RNAi-dependent and RNAi-independent mechanisms contribute to the silencing of RIPed sequences in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4237–4243 (2004).
131. Nolan, T. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1564–1573 (2005).
132. Murata, T. *et al.* siRNA-dependent and -independent post-transcriptional cosuppression of the LTR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5987–5994 (2007).
133. Janbon, G. *et al.* Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 1070–1080 (2010).
134. Nicolas, F. E. *et al.* Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-

- dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5535–5541 (2010).
135. Shiu, P. K. T., Raju, N. B., Zickler, D. & Metzzenberg, R. L. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905–916 (2001).
136. Wang, X. *et al.* Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes Dev.* **24**, 2566–2582 (2010).
137. Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C. & Herrera-Estrella, A. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Mol. Microbiol.* **89**, 96–112 (2013).
138. Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 504–516 (2007).
139. Son, H., Park, A. R., Lim, J. Y., Shin, C. & Lee, Y.-W. Genome-wide exonic small interference RNA-mediated gene silencing regulates sexual reproduction in the homothallic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Genet.* **13**, e1006595 (2017).
140. Cervantes, M. *et al.* A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS One* **8**, e69283 (2013).
141. Qutob, D., Patrick Chapman, B. & Gijzen, M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nat. Commun.* **4**, 1349 (2013).
142. Calo, S. *et al.* Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* **513**, 555–558 (2014).
143. Calo, S. *et al.* A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet.* **13**, e1006686 (2017).
144. Chang, Z., Billmyre, R. B., Lee, S. C. & Heitman, J. Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet.* **15**, e1007957 (2019).

145. Weiberg, A. *et al.* Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**, 118–123 (2013).
146. Wang, M. *et al.* Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat. Plants* **2**, 16151 (2016).
147. Wang, M., Weiberg, A., Dellota, E., Yamane, D. & Jin, H. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biol.* **14**, 421–428 (2017).
148. Drinnenberg, I. A. *et al.* RNAi in budding yeast. *Science* **326**, 544–550 (2009).
149. De Haro, J. P. *et al.* A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1486–1497 (2009).
150. Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **83**, 379–394 (2012).
151. Xiao, H. *et al.* QIP, a protein that converts duplex siRNA into single strands, is required for meiotic silencing by unpaired DNA. *Genetics* **186**, 119–126 (2010).
152. Hammond, T. M. *et al.* SAD-3, a putative helicase required for meiotic silencing by unpaired DNA, interacts with other components of the silencing machinery. *G3 & Genes|Genomes|Genetics* **1**, 369–376 (2011).
153. Ruiz-Vázquez, R. M., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S. & Garre, V. Distinct RNAi Pathways in the Regulation of Physiology and Development in the Fungus *Mucor circinelloides*. in *Advances in Genetics* **91**, 55–102 (2015).
154. Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J.* **22**, 3983–3991 (2003).
155. Chang, Z. & Heitman, J. Drug-resistant epimutants exhibit organ-specific stability and induction during murine infections caused by the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *mBio* **10**, 1–11 (2019).
156. Watanabe, Y. Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from

- meiosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 370–382 (2012).
157. van Hooff, J. J., Tromer, E., van Wijk, L. M., Snel, B. & Kops, G. J. Evolutionary dynamics of the kinetochore network in eukaryotes as revealed by comparative genomics. *EMBO Rep.* **18**, e201744102 (2017).
158. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
159. Yamagishi, Y., Sakuno, T., Goto, Y. & Watanabe, Y. Kinetochore composition and its function: Lessons from yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 185–200 (2014).
160. Petrovic, A. *et al.* The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* **190**, 835–852 (2010).
161. Screpanti, E. *et al.* Direct binding of CENP-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr. Biol.* **21**, 391–398 (2011).
162. Xiao, H. *et al.* Molecular basis of CENP-C association with the CENP-A nucleosome at yeast centromeres. *Genes Dev.* **31**, 1958–1972 (2017).
163. Weir, J. R. *et al.* Insights from biochemical reconstitution into the architecture of human kinetochores. *Nature* **537**, 249–253 (2016).
164. Basilico, F. *et al.* The pseudo GTPase CENP-M drives human kinetochore assembly. *eLife* **3**, e02978 (2014).
165. Pekgöz Altunkaya, G. *et al.* CCAN assembly configures composite binding interfaces to promote cross-linking of Ndc80 complexes at the kinetochore. *Curr. Biol.* **26**, 2370–2378 (2016).
166. Foltz, D. R. *et al.* The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.* **8**, 458–469 (2006).
167. Nishino, T. *et al.* CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a Histone-like fold. *Cell* **148**, 487–501 (2012).
168. Huis in 't Veld, P. J. *et al.* Molecular basis of outer kinetochore assembly on CENP-T. *eLife* **5**, (2016).
169. Jansen, L. E. T., Black, B. E., Foltz, D. R. & Cleveland, D. W. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* **176**, 795–805 (2007).

170. Malik, H. S. & Henikoff, S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882–891 (2003).
171. Malik, H. S. & Henikoff, S. Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* **157**, 1293–8 (2001).
172. Clarke, L. & Carbon, J. The structure and function of yeast centromeres. *Annu. Rev. Genet.* **19**, 29–55 (1985).
173. Malik, H. S. & Henikoff, S. Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* **138**, 1067–1082 (2009).
174. Talbert, P. B. & Henikoff, S. What makes a centromere? *Exp. Cell Res.* 111895 (2020). doi:10.1016/j.yexcr.2020.111895
175. Henikoff, S., Ahmad, K. & Malik, H. S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**, 1098–102 (2001).
176. Centola, M. & Carbon, J. Cloning and characterization of centromeric DNA from *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1510–1519 (1994).
177. Riley, R. *et al.* Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 9882–9887 (2016).
178. Wolfe, K. H. *et al.* Clade- and species-specific features of genome evolution in the Saccharomycetaceae. *FEMS Yeast Res.* **15**, fov035 (2015).
179. Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L. & Carbon, J. Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* **29**, 235–44 (1982).
180. Clarke, L. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 212–218 (1998).
181. Henikoff, S. & Henikoff, J. G. “Point” centromeres of *Saccharomyces* harbor single centromere-specific nucleosomes. *Genetics* **190**, 1575–1577 (2012).
182. Gordon, J. L., Byrne, K. P. & Wolfe, K. H. Mechanisms of chromosome number evolution in yeast. *PLoS Genet.* **7**, 0–3 (2011).
183. Kobayashi, N. *et al.* Discovery of an unconventional centromere in budding yeast redefines evolution of point centromeres. *Curr. Biol.* **25**, 2026–2033 (2015).
184. Coughlan, A. Y., Hanson, S. J., Byrne, K. P. & Wolfe, K. H. Centromeres of the yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) have a simple inverted-repeat

- structure. *Genome Biol. Evol.* **8**, 2482–2492 (2016).
185. Yadav, V. *et al.* RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 3108–3113 (2018).
186. Sanyal, K., Baum, M. & Carbon, J. Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 11374–11379 (2004).
187. Padmanabhan, S., Thakur, J., Siddharthan, R. & Sanyal, K. Rapid evolution of Cse4p-rich centromeric DNA sequences in closely related pathogenic yeasts, *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 19797–19802 (2008).
188. Roy, B. & Sanyal, K. Diversity in requirement of genetic and epigenetic factors for centromere function in fungi. *Eukaryot. Cell* **10**, 1384–1395 (2011).
189. Ketel, C. *et al.* Neocentromeres form efficiently at multiple possible loci in *Candida albicans*. *PLoS Genet.* **5**, e1000400 (2009).
190. Baum, M., Sanyal, K., Mishra, P. K., Thaler, N. & Carbon, J. Formation of functional centromeric chromatin is specified epigenetically in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14877–14882 (2006).
191. Kapoor, S., Zhu, L., Froyd, C., Liu, T. & Rusche, L. N. Regional centromeres in the yeast *Candida lusitanae* lack pericentromeric heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12139–12144 (2015).
192. Chatterjee, G. *et al.* Repeat-associated fission yeast-like regional centromeres in the ascomycetous budding yeast *Candida tropicalis*. *PLoS Genet.* **12**, e1005839 (2016).
193. Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R. & Freitag, M. Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2528–2542 (2011).
194. Cambareri, E. B., Aisner, R. & Carbon, J. Structure of the chromosome VII centromere region in *Neurospora crassa*: degenerate transposons and simple repeats. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5465–5477 (1998).
195. Janbon, G. *et al.* Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus*

- neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet.* **10**, e1004261 (2014).
196. Loftus, B. J. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **307**, 1321–4 (2005).
 197. Takahashi, K. *et al.* A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol. Biol. Cell* **3**, 819–835 (1992).
 198. Wood, V. *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871–880 (2002).
 199. Folco, H. D., Pidoux, A. L., Urano, T. & Allshire, R. C. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* **319**, 94–97 (2008).
 200. Baum, M., Ngan, V. K. & Clarke, L. The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere. *Mol. Biol. Cell* **5**, 747–61 (1994).
 201. Kagansky, A. *et al.* Synthetic heterochromatin bypasses RNAi and centromeric repeats to establish functional centromeres. *Science* **324**, 1716–1719 (2009).
 202. Akiyoshi, B. & Gull, K. Discovery of unconventional kinetochores in kinetoplastids. *Cell* **156**, 1247–1258 (2014).
 203. Drinnenberg, I. A., DeYoung, D., Henikoff, S. & Malik, H. S. Recurrent loss of CenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *eLife* **3**, 717–750 (2014).
 204. Palmer, W. H., Hadfield, J. D. & Obbard, D. J. RNA-Interference Pathways Display High Rates of. **208**, 1585–1599 (2018).
 205. Billmyre, R. B., Calo, S., Feretzaki, M., Wang, X. & Heitman, J. RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. *Chromosom. Res.* **21**, 561–572 (2013).