



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Cambios en los patrones de fosforilación  
de proteínas de unión a RNA inducidos  
por el  $H_2O_2$  como parte de la respuesta  
antioxidante en *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANGÉLICA MICHIRU MARTÍNEZ MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

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

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Programa UNAM-PAPIIT con clave IN215622 y folio 207122.

Se agradece por la revisión, comentarios y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de este trabajo a los miembros del jurado conformado por:

<b>Secretario tutor</b>	Dr. Jesús Aguirre Linares
<b>Presidente</b>	Dra. Rosa Estela Navarro González
<b>Vocal</b>	Dra. Nallely Cano Domínguez
<b>Suplente 1</b>	Dra. Claudia Segal Kischinevzky
<b>Suplente 2</b>	Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Se agradece profundamente a la Bióloga Alma Olivia Sánchez González por el apoyo técnico brindado, al Dr. Ulises Carrasco Navarro por sus asesorías en el manejo de distintos softwares y bases de datos, y a la Dra. Ruth Rincón Heredia por su ayuda con el manejo de programas de edición de imágenes.

## **Agradecimientos personales**

A mi hermana Paola, por ser mi mejor amiga, mi confidente y mi gran apoyo durante toda mi vida.

A mis padres Antonio y Alejandrina, por su apoyo incondicional, sus enseñanzas y por el cariño que compartimos.

Al Dr. Jesús Aguirre, por guiarme, motivarme y apoyarme en todos los proyectos del laboratorio. Gracias por compartir con nosotros su amor por la ciencia y por su gran calidez como asesor y ser humano.

A Oli, por ser mi primera maestra en el laboratorio, por su paciencia y apoyo durante todo mi tiempo en el laboratorio. Gracias por enseñarme tanto y por ser una gran fuente de admiración para mí.

A Vero, por compartirme muchos de sus conocimientos, consejos y ayuda, por brindarme su amistad, por contagiarme su entusiasmo por la ciencia e inspirarme tanto en el ámbito académico como en el personal.

A mis amigos del laboratorio Yair, Naomi, Betsy, Laurel, Emilio, Fabián y Juan Carlos, por hacer del laboratorio mi segundo hogar y hacer el ambiente tan ameno y divertido.

A mis amigos Ix, Beca, Memo y Rafa por ser la familia que formé con el corazón y por seguir caminando a mi lado después de tantos años.

A Froycito, mi veracruzano favorito, por siempre sacarme de mi cueva en los días oscuros y motivarme a dar lo mejor de mí.

A Sofi, porque además de ser mi gran amiga, fue la primera en contagiarme su pasión por la biología, es mi primer colega y fuente de admiración.

A Lupita (mi ángel de la titulación y hermana de trámites), Mari, Mario, Dorito, Liz y Arturo, por todas las risas y desvelos compartidos bajo la magnolia que hicieron de mi vida universitaria una experiencia aún más maravillosa.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
1. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) .....	3
1.1. La producción de ERO .....	3
1.2. La respuesta antioxidante.....	6
1.3. Las ERO como señales celulares.....	7
1.4. Las ERO como moduladores de fosforilación y desfosforilación de proteínas.....	8
2. SakA y otras MAP cinasas en la respuesta al estrés en <i>Aspergillus nidulans</i> .....	9
3. Proteínas de unión al RNA.....	12
3.1. Clasificación.....	12
3.2. Funciones.....	14
3.2.1. Las proteínas de unión al RNA en la respuesta al estrés.....	14
3.2.2. Las proteínas de unión al RNA en la separación de fases.....	15
3.3. Las proteínas de unión al RNA descritas en <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> cuyos patrones de fosforilación se analizan en este trabajo.....	16
3.3.1. FabM.....	16
3.3.2. PbpA.....	17
3.3.3. PufA.....	18
3.3.4. AN7700 .....	19
3.3.5. Clu.....	19
4. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio.....	21
4.1. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	22
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVOS .....	26

GENERAL.....	26
PARTICULARES.....	26
MÉTODOS .....	27
1. Identificación de proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mediante las herramientas Gene Ontology y g:Profiler, y elaboración de una base de datos en Excel.....	27
2. Obtención de fosfositos y posibles cinasas responsables de su fosforilación utilizando los programas SnapGene y NetPhos .....	28
3. Obtención y visualización de alineamientos en T-Coffee y JalView.....	30
4. Obtención de dominios por medio de las bases de datos PROSITE, UNIPROT y SMART.....	31
5. Análisis de la estructura de las proteínas estudiadas y de sus posibles regiones intrínsecamente desordenadas.....	31
6. Elaboración de esquemas de proteínas con fosfositos y vías de señalización conocidas.....	31
RESULTADOS .....	32
<b>Nuestro análisis muestra que 79 proteínas posiblemente involucradas en la unión al RNA sufren cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en <i>Aspergillus nidulans</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>La proteína FabM posee 3 fosfositos que cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>....</b>	<b>44</b>
<b>La proteína AN1325/PbpA posee 7 fosfositos, de los cuales 5 cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>50</b>
<b>La proteína AN7474/PufA posee 17 fosfositos, de los cuales 8 cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>56</b>
<b>La proteína AN7700 posee 3 fosfositos que cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>..</b>	<b>60</b>

**La proteína Clu posee 3 fosfositios que cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....64**

DISCUSIÓN .....68

CONCLUSIONES .....82

REFERENCIAS .....83

## RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) pueden funcionar como señales fisiológicas que regulan no sólo la respuesta antioxidante, sino también el crecimiento y la diferenciación celular en los hongos y otros eucariontes. Esta función puede estar mediada por la oxidación directa de cisteínas específicas en ciertas cinasas y fosfatasas, causando la activación o inactivación de dichas enzimas y cambios en los patrones de fosforilación de algunas proteínas. En este trabajo analizamos cambios globales en los patrones de fosforilación de proteínas de unión al RNA inducidos por un tratamiento con  $H_2O_2$ , en el hongo *Aspergillus nidulans*, dado que algunas proteínas de unión al RNA se han relacionado con la respuesta al estrés oxidante en diversos organismos. A partir de datos crudos de los fosfoproteomas de *A. nidulans* obtenidos en ausencia y presencia de  $H_2O_2$ , identificamos, mediante análisis de enriquecimiento funcional, las proteínas de unión al RNA que mostraron cambios en sus patrones de fosforilación inducidos por el  $H_2O_2$ . A partir de estos resultados, generamos una base de datos que contiene los residuos de cada proteína que mostraron fosforilación o desfosforilación en presencia del  $H_2O_2$  y las posibles cinasas responsables de esta fosforilación, según el programa NetPhos. Identificamos 79 proteínas, de las cuales 40 probablemente participan en la formación de condensados ribonucleoproteicos. Posteriormente, profundizamos en el análisis de las proteínas FabM, PbpA/AN1325, AN7700, PufA/AN7474 y Clu. Obtuvimos sus posibles estructuras mediante AlphaFold y localizamos los fosfositos en posibles regiones intrínsecamente desordenadas. Encontramos que FabM se fosforila en 2 sitios y se desfosforila en uno en presencia de  $H_2O_2$ , lo que podría regular su papel en la formación de gránulos de estrés y promover la señalización de la cinasa MAPK SakA, activada por  $H_2O_2$ . PbpA/AN1325 se fosforila en 4 sitios y se desfosforila en 1, que podría favorecer una separación de fases inducida por  $H_2O_2$  para detectar el estado redox e inducir la autofagia. PufA/AN7474, ortólogo de Jsn1/Puf1, se fosforila en 4 sitios y se desfosforila en 4 en respuesta al  $H_2O_2$ . Lo cual que podría relacionarse con el control en el ciclo celular, la reparación de la pared celular y la interacción indirecta con la vía SakA. La proteína AN7700, ortólogo de Whi3, se desfosforila en 2 sitios y se



fosforila en 1, posiblemente relacionado con la señalización de la vía PKA y la formación de gránulos de estrés. Finalmente, Clu se fosforila en 3 sitios en presencia del  $H_2O_2$  y podría estar asociada con la reparación de la pared celular, la formación de gránulos ribonucleoproteicos y la mitofagia, así como con la división mitocondrial inducida por el  $H_2O_2$ . Con base en las funciones reportadas para estas proteínas en *A. nidulans* u otros organismos, proponemos que algunas de ellas podrían formar parte de la respuesta antioxidante en *A. nidulans*.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Las especies reactivas del oxígeno (ERO)

#### 1.1. La producción de ERO

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas derivadas del oxígeno molecular que se forman mediante reacciones redox o por excitación electrónica. Se pueden dividir en dos grupos: 1) especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) o el ozono ( $\text{O}_3$ ); y 2) radicales libres como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) o el radical peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ). En las células, la acumulación de concentraciones elevadas de ERO puede generar daño celular, lo que se conoce como estrés oxidante. Para evitarlo es importante mantener controlados sus niveles basales mediante la regulación de su producción y eliminación (Sies & Jones, 2020).

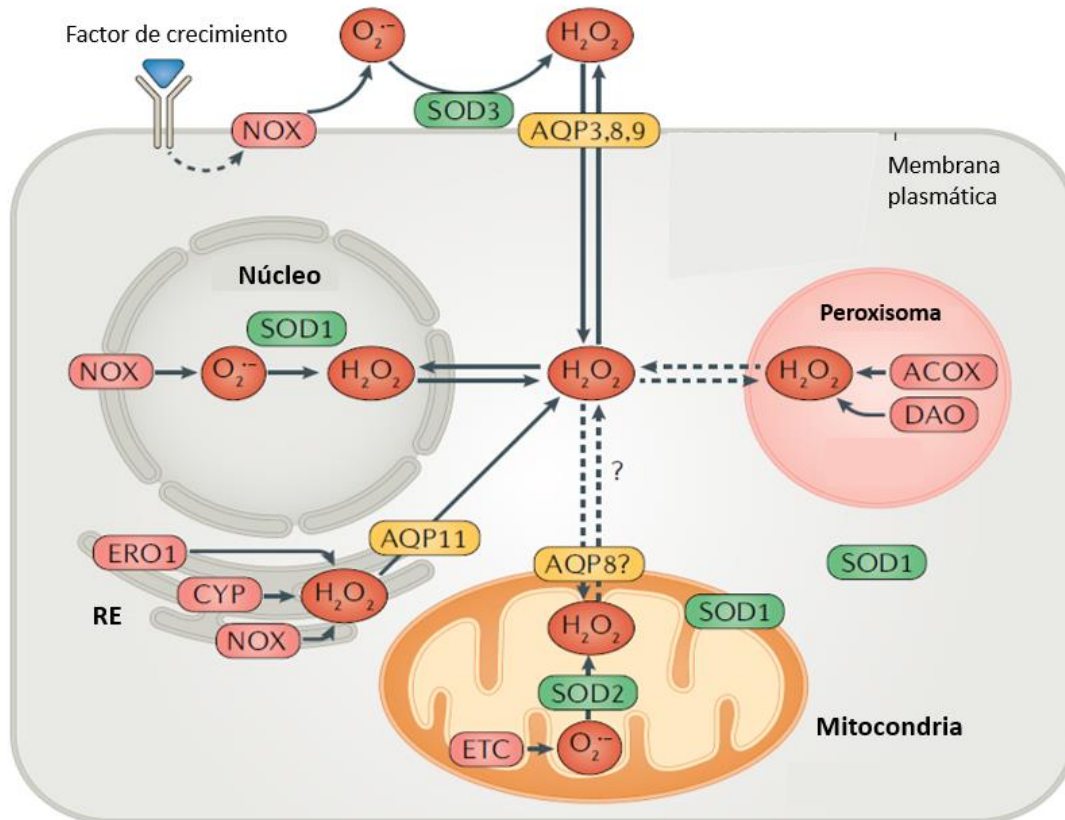
La principal producción de ERO se da mediante la respiración aeróbica, en donde del 1 al 2% del oxígeno consumido puede generar estas moléculas. En organismos eucariontes, la mitocondria produce aproximadamente el 90% de las ERO debido a la fosforilación oxidativa. En la cadena de transporte de electrones, los electrones se escapan e interactúan con el oxígeno molecular, generando al anión  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Posteriormente, el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede ser convertido espontánea o enzimáticamente en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\bullet\text{OH}$ . De igual forma, cantidades menores de ERO pueden ser producidas por las cadenas de transporte de electrones localizadas en el retículo endoplásmico, en las membranas plasmáticas y en membranas nucleares (Figura 1) (Checa & Aran, 2020; Lushchak, 2014).

Otras fuentes endógenas de ERO importantes son las NADPH oxidasas transmembranales (NOX), que catalizan la producción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y poseen diferentes localizaciones celulares como el núcleo, el retículo endoplásmico y la membrana plasmática. Asimismo, las NOX pueden encontrarse en endosomas especializados llamados redoxomas, que en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento y citocinas, compartimentan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para su regulación local o para la señalización celular (Sies & Jones, 2020). En particular, en el hongo *Neurospora crassa* las NOX también se encuentran en el sistema vacuolar (Cano-Domínguez, 2019). Además

de las NOX, existen otras oxidasas en diferentes organelos que generan ERO, tales como la acil-CoA oxidasa (ACOX) y la D-aminoácido oxidasa (DAO) en los peroxisomas (Sies & Jones, 2020).

Entre otras enzimas productoras de ERO, las superóxido dismutasas (SOD) son las encargadas de convertir al anión  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ . En el retículo endoplásmico, las enzimas del citocromo P450, como la mono-oxigenasa dependiente de citocromo P450 (CYP), llevan el sistema de hidroxilación (una reacción química en donde se añade un grupo hidroxilo (OH) a un sustrato), en el que sus productos pueden convertirse en generadores de ERO, ya que pueden entrar en ciclos de autooxidación. De igual forma, la autooxidación de pequeñas moléculas endógenas y exógenas (la epinefrina y los xenobióticos respectivamente) pueden generar ERO. En el retículo endoplásmico se encuentra la oxidorreductina del retículo endoplásmico 1, que puede producir ERO. Por último, otras proteínas importantes para la distribución de las ERO son las peroxiporinas o acuaporinas, que facilitan el movimiento del  $H_2O_2$  a través de membranas (Figura 1) (Lushchak, 2014; Sies & Jones, 2020).

Además de las fuentes endógenas, los oxidantes también se generan por factores ambientales tales como bajos nutrientes, drogas, contaminantes y otros estresores físicos (UV, rayos X y otras radiaciones ionizantes). Para contender con las diversas fuentes de producción de ERO, las células cuentan con diversas respuestas antioxidantes (Sies & Jones, 2020).



**Figura 1. Modelo de producción de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ .** En células animales las ERO pueden producirse por diferentes vías endógenas y exógenas. Entre las fuentes endógenas se encuentran las cadenas de transporte de electrones de la mitocondria y del retículo endoplásmico (ER). Otros productores de ERO son las enzimas NADPH oxidasa y las distintas superóxido dismutasas (SOD), así como la acil-CoA oxidasa (ACOX) y la D-aminoácido oxidasa (DAO), también la monooxigenasa dependiente de citocromo P450 (CYP) y la oxidoreductina del retículo endoplásmico 1 (ERO1) en el retículo endoplásmico. Las peroxiporinas (AQP) facilitan el transporte del  $H_2O_2$  entre distintos compartimentos celulares. Ciertas citocinas o factores de crecimiento también pueden generar ERO (Modificado de Sies & Jones, 2020).

## 1.2. La respuesta antioxidante

Los organismos poseen varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para descomponer las ERO que colectivamente se denominan como la respuesta antioxidante celular (Dvorak, 2021).

En la vía enzimática, las principales enzimas antioxidantes son las superóxido dismutasas (SODs), las catalasas (CATs), las peroxirredoxinas y peroxidasas (PXs). La familia de las superóxido dismutasas está dividida en tres categorías, dependiendo del metal que se encuentra en su sitio activo ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe(III)}$  o  $\text{Mn(III)}$ ): 1) las Cu/Zn-SOD; 2) las Fe-SOD y 3) las Mn-SOD. Estas enzimas dismutan el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que disminuye la probabilidad de que se forme OH. Por su parte, las catalasas son enzimas homotetraméricas que contienen un grupo hemo en su sitio activo y catalizan la reacción:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Entre las peroxidasas más relevantes se encuentran la glutatión peroxidasa (GSH-Px), que es una enzima tetramérica con un residuo de selenocisteína en su sitio activo y que utiliza glutatión para reducir al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peróxidos lipídicos (Das & Roychoudhury, 2014; Birben et al., 2012).

Otras enzimas antioxidantes son las peroxirredoxinas (PRXs), una familia de peroxidasas que reducen al peróxido de hidrógeno, utilizando un residuo de cisteína altamente conservado en su sitio activo (Rhee, 2016). De igual forma, se encuentran las reductasas, que son importantes en la respuesta antioxidante, tales como la dehidroascorbato reductasa (DHARs), la monodehidroascorbato reductasa (MDHARs) y la glutatión reductasa (GRs) (Dvorak, 2021).

La defensa antioxidante no enzimática es mediada principalmente por metabolitos de bajo peso molecular, el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, los polifenoles, además de los carotenoides y flavonoides. De igual forma, el glutatión (tripéptido gama-glutamil-cisteinil-glicina, GSH) es un antioxidante importante, ya que controla los niveles de ERO por la vía de interacción directa o como cofactor para las enzimas detoxificantes de ERO (Lushchak, 2014).

### 1.3. Las ERO como señales celulares

Se ha demostrado que las ERO pueden funcionar como agentes de señalización celular. Las características que permiten a algunas ERO, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ser agentes de señalización son: 1) la alta regulación de su concentración a nivel de síntesis y degradación; 2) la presencia de blancos y receptores específicos, 3) la capacidad de difundirse fácilmente a través de las membranas y 4) la reversibilidad del efecto de señalización, en este caso, la oxidación. De igual forma, ciertas ERO son importantes agentes señalizadores implicados en la regulación de procesos como el crecimiento, la diferenciación celular y la actividad de factores de transcripción, incluidos el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), la proteína activadora 1 (AP-1), Sp-1, c-Myb, p53, egr-1 y el factor inducible por hipoxia (Hif -1 $\alpha$ ) (Corcoran & Cotter, 2013; Sauer, Wartenberg & Hescheler, 2001).

Las proteínas son los blancos principales de las ERO dentro de la célula y representan aproximadamente el 69% de los eventos de oxidación, en comparación con los lípidos y los ácidos nucleicos. La oxidación de estas proteínas puede inducir cambios en la carga, el tamaño, la hidrofobicidad o la polaridad de los aminoácidos, que a su vez puede afectar la estructura secundaria o terciaria, modificando la actividad de la proteína. Los aminoácidos más susceptibles a la oxidación de manera reversible son los que contienen azufre, como la cisteína y la metionina. El reconocimiento de las ERO ocurre a nivel atómico, mediante reacciones químicas con átomos específicos de las proteínas blanco, lo que expande el número potencial de receptores específicos (Corcoran & Cotter, 2013; D'Autréaux & Toledano, 2007).

Entre las diferentes ERO, el peróxido de hidrógeno es reconocido como el principal agente de señalización celular. El  $H_2O_2$  es una molécula pequeña, ubicua, que es capaz de difundir y su producción y degradación están altamente reguladas. Además, posee una alta energía de activación que limita su reactividad a determinados blancos biológicos. De igual forma, el  $H_2O_2$  logra cierta especificidad en la señalización celular al reaccionar con algunos grupos tiol en sus proteínas

blanco. En general, el  $H_2O_2$  se encuentra fisiológicamente en niveles basales bajos en células eucariotas aeróbicas normales, en donde por su estado de mantenimiento y su señalización redox asociada, se le ha denominado como euestrés oxidante (Corcoran & Cotter, 2013; Sies & Jones, 2015).

#### 1.4. Las ERO como moduladores de la fosforilación y desfosforilación de proteínas

La fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes e importantes de las proteínas. Es un mecanismo reversible en donde proteínas cinasas añaden un grupo fosfato ( $PO_4$ ) al grupo polar R de principalmente 3 aminoácidos: serina, treonina y tirosina. En muchos casos, esta modificación causa cambios conformacionales que regulan la actividad de la proteína blanco. La fosforilación de proteínas es extremadamente importante en la regulación de diversos procesos celulares, tales como como la síntesis de proteínas, la división celular, la transducción de señales, la localización celular, las interacciones de las proteínas y su estabilidad, el crecimiento celular, el desarrollo y el envejecimiento (Ardito et al., 2017; Conibear, 2020).

Las ERO modulan la fosforilación de proteínas al regular directamente a las proteínas cinasas y a las fosfatasas. Esta regulación puede ser mediada por la oxidación de residuos de cisteínas o metioninas. Las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), pueden ser inactivadas mediante la oxidación de su cisteína catalítica, resultando en un mayor nivel de fosforilación de las vías implicadas (Sies & Jones, 2015; D'Autréaux & Toledano, 2007). Un ejemplo es la tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), que es inactivada por  $H_2O_2$  (Londhe et al., 2020). De igual forma, la inactivación inducida por ERO de la fosfatasa PTEN permite la activación de la cinasa de respuesta extracelular 1/2 (ERK 1/2) y la proteína cinasa B (Akt) (Guyton et al., 1996; Konishi et al., 1999). Por otro lado, las ERO pueden inducir directamente tanto la inactivación como la activación de algunas cinasas. En el caso de la cinasa Aurora A, la oxidación de la cisteína C290 previene la fosforilación de la T288 adyacente encontrada en su segmento de activación (Byrne et al., 2020). En cambio, el  $H_2O_2$  promueve la actividad de cinasa del

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) al oxidar la cisteína de su sitio activo (Truong, 2016).

Entre otras cinasas, se ha demostrado que las ERO también regulan la actividad de la cinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2) a través de la oxidación de residuos conservados de cisteína cerca del T-loop en células epiteliales (RPE-1). La oxidación de CDK2 promueve su fosforilación y al mismo tiempo previene la unión a la proteína fosfatasa asociada a la cinasa dependiente de ciclina (KAP). De hecho, interferencias químicas y metabólicas con la producción de ERO disminuyen la fosforilación del T-loop en la CDK2 y, por lo tanto, se impide su activación completa (Kirova et al., 2022). En *A. nidulans* y otros hongos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también induce la fosforilación y la localización nuclear de las MAPK ortólogas de Hog1/p38 activadas por estrés llamadas SakA y MpkC (Kawasaki et al., 2002; Lara-Rojas, 2011; Garrido-Bazán et al., 2018).

Además de las cinasas y las fosfatasas, las ERO pueden modular la fosforilación de otras proteínas, como la proteína de unión asociada a GRB2 1 (GAB1). Esta proteína adaptadora multifuncional con un rol clave en la vía de señalización de tirosina cinasa, ha sido identificada recientemente como un blanco redox de NOX4, con las cisteínas 374 y 405 como mayores sitios blancos (Löwe et al., 2019). De igual forma, las ERO inducen la fosforilación en el receptor de estrógeno alfa (ERalfa) en la serina 118 y 167 en células cancerígenas (Weistman, 2009). Asimismo, en plantas, la oxidación de residuos de metionina por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la proteína nitrato reductasa (NR) inhibe la fosforilación de residuos cercanos, generando cambios en los patrones de fosforilación de la proteína (Hardin et al., 2009).

## 2. SakA y otras MAP cinasas en la respuesta al estrés en *Aspergillus nidulans*

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) son aquellas que fosforilan sus propios residuos duales de serina y treonina (autofosforilación) o los que se encuentran en sus sustratos para activar o desactivar su proteína blanco. Las MAPK regulan procesos celulares importantes como la proliferación, las respuestas al estrés, la apoptosis y la defensa inmune.



La activación de la cascada de las MAPK ocurre en un módulo de fosforilaciones consecutivas, que se compone de tres proteínas cinasas activadas secuencialmente: la MAPKK cinasa (MAPKKK o MAP3K), la MAPK cinasa (MAPKK o MAP2K) y la MAP cinasa (MAPK). La MAPKKK fosforila y activa directamente a la MAPKK, que a su vez activa a la MAPK. Una vez activada, la MAPK fosforila diversos sustratos en el citoplasma y en el núcleo para llevar a cabo cambios en la función de las proteínas y en la expresión génica (Soarez-Silva, 2016; Morrison, 2012).

Las MAP cinasas se agrupan en tres familias principales. En mamíferos se han caracterizado las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs por sus siglas en inglés), las cinasas Jun amino terminal (JNKs) y las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs o p38). Las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs) son cinasas especializadas en la transducción de múltiples señales de estrés, que se encuentran en todos los eucariontes incluidos los hongos (Morrison, 2012). Entre los hongos filamentosos, *Aspergillus nidulans* contiene dos SAPKs llamadas MpkC y SakA/Hog1. Se ha observado que SakA y MpkC interactúan físicamente (Jaimes-Arroyo et al., 2015), y ambas son sustratos de la MAPKK PbsB (Furukawa et al., 2005), que es requerida para el funcionamiento de las dos SAPKs en *A. nidulans* (Garrido-Bazán et al., 2018). Se ha demostrado que SakA y MpkC tienen importantes funciones durante el ciclo de vida de *A. nidulans*. Ambas SAPKs poseen roles distintos y a veces opuestos en la conidiación y en la sensibilidad al estrés oxidante de las conidias. A su vez, SakA y MpkC también presentan roles en común relacionados con la estabilidad de la pared celular (Garrido-Bazán et al., 2018).

La conidiación en *A. nidulans* es regulada por SakA y MpkC de diferentes maneras (Garrido-Bazán et al., 2018). La ausencia de SakA no tiene efectos importantes en la conidiación, mientras que en mutantes  $\Delta MpkC$  se genera un aumento de la producción de conidias. SakA es necesaria para detener la mitosis en las conidias durante la latencia o dormancia (Lara-Rojas et al., 2011) y se ha propuesto que

son necesarios bajos niveles de MpkC para retrasar la mitosis durante el desarrollo de las conidias (Garrido-Bazán et al., 2018).

En cuanto a la sensibilidad al estrés oxidante en las conidias, SakA es necesaria para la resistencia al  $H_2O_2$ , ya que se ha observado que mutantes  $\Delta sakA$  son sensibles a este tipo de estrés (Kawasaki et al., 2002). En cambio, MpkC puede generar una mayor sensibilidad al  $H_2O_2$ , debido a que la inactivación de MpkC restaura parcialmente la resistencia al estrés oxidante en mutantes  $\Delta sakA$ . Por ello, SakA y MpkC regulan la resistencia al estrés oxidante en las conidias de forma opuesta (Garrido-Bazán et al., 2018).

La localización nuclear tanto de MpkC como de SakA es regulada durante el desarrollo asexual. Sin embargo, se ha demostrado que la localización nuclear de ambas SAPKs también es opuesta. En las conidias intactas, MpkC está localizada principalmente en el citoplasma (Garrido-Bazán et al., 2018), mientras que SakA está en el núcleo (Lara-Rojas et al., 2011). Esto concuerda con que la actividad de SakA es esencial para mantener la viabilidad de las conidias, mientras que la de MpkC es dispensable (Kawasaki et al., 2002; Garrido-Bazán et al., 2018). Con respecto a la etapa de germinación, MpkC está en el núcleo (Garrido-Bazán et al., 2018), en tanto que SakA se localiza en el citoplasma e incluso necesita ser desfosforilada para que se lleve a cabo la germinación (Kawasaki et al., 2002; Lara-Rojas et al., 2011; Jaimes-Arroyo et al., 2015).

De igual forma, se ha observado que el estrés oxidante y el osmótico inducen la localización nuclear de MpkC y SakA (Garrido-Bazán et al., 2018; Lara-Rojas et al., 2011; Hagiwara et al., 2009). SakA, en específico, interactúa con la MAPKAP SrkA, mediando su localización nuclear y ya en el núcleo interactúa con el factor de transcripción AtfA en respuesta al estrés oxidante (Jaimes-Arroyo et al., 2015; Lara-Rojas et al., 2011). Tanto SakA como AtfA son importantes para la inducción del gen de catalasa *catB* (Lara-Rojas et al., 2011; Kawasaki et al., 2002). Asimismo, MpkC y SakA contribuyen a la integridad de la pared celular en las conidias, aunque SakA posee un rol más importante que MpkC (Garrido-Bazán et al., 2018).

Independientemente de MpkC, se ha reportado que SakA se activa también en respuesta a la privación de nutrientes, al estrés por hipoxia y a los choques de calor, además del estrés oxidante y el osmótico (Lara-Rojas et al., 2011; Kawasaki et al., 2002). Adicionalmente, SakA está involucrada en la represión del desarrollo sexual al reprimir la expresión del gen de la NADPH oxidasa NoxA (Kawasaki et al., 2002; Lara-Ortiz et al., 2003), y es utilizada para la señalización en respuesta a la luz mediada por fitocromo en *A. nidulans* (Yu et al., 2016).

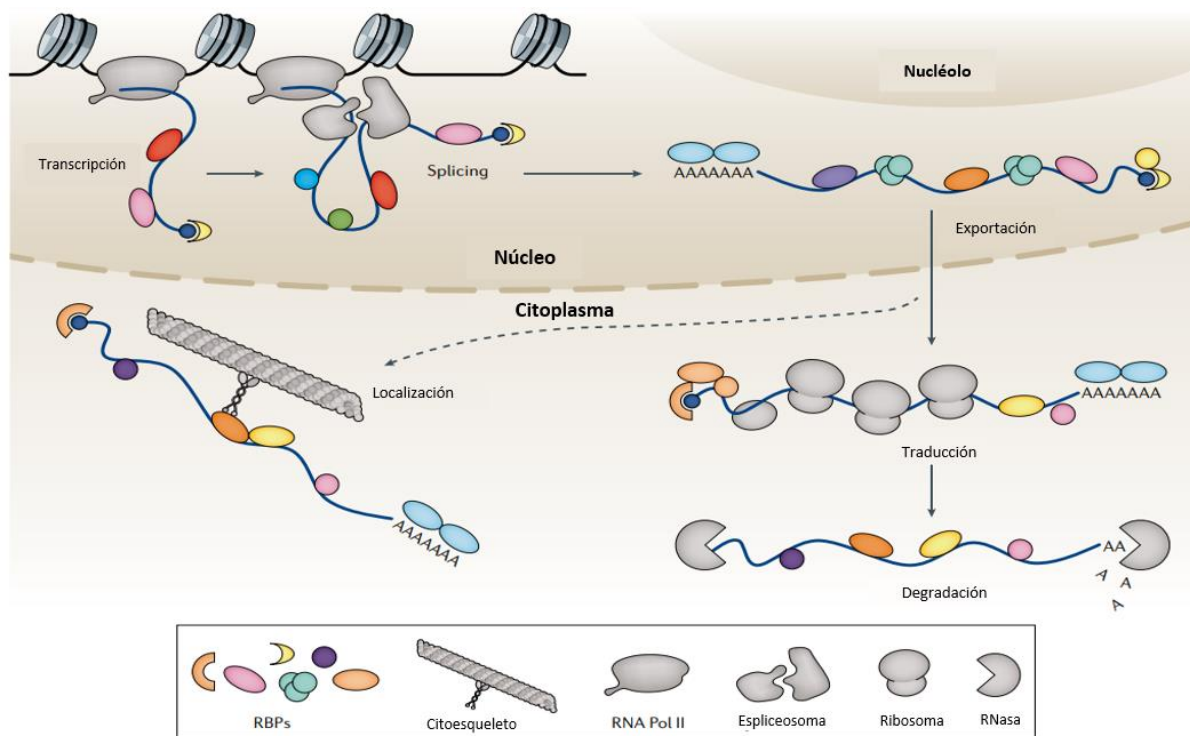
### 3. Las proteínas de unión al RNA

#### 3.1. Clasificación

Las proteínas de unión al RNA (RBP, por sus siglas en inglés) son aquellas que reconocen e interactúan con una secuencia de RNA por medio de dominios específicos (proteínas RBD, por sus siglas en inglés) (Hentze et al., 2018). Las RBP pueden ensamblarse y formar complejos de ribonucleoproteínas (RNP), que contienen RNA y proteínas que participan en diferentes aspectos de la modulación de la expresión genética (Lunde et al., 2007). La importancia de estas proteínas radica en que regulan el metabolismo y la biología del RNA, tanto los procesos que ocurren en el núcleo (transcripción, procesamiento y maduración), hasta los que se llevan a cabo en el citoplasma (transporte, localización, estabilidad, traducción y degradación) (Figura 2) (Gebauer et al., 2021).

La clasificación de las proteínas de unión al RNA más utilizada se basa en los diferentes dominios de unión que poseen, tales como el motivo de reconocimiento del RNA (RRM), el dominio K-homólogo (KH), la helicasa DEAD/DEAH, los dominios de dedo de zinc, entre otros 30 de menor abundancia (Hentze et al., 2018). Varios dominios de unión al RNA utilizan sólo algunos pocos residuos para unirse al RNA, por lo que es común encontrar múltiples dominios de unión coexistiendo en una sola RBP, ya que esto potencia la unión al RNA. Sin embargo, muchos de estos dominios son altamente heterogéneos y, por lo tanto, difíciles de clasificar, sin mencionar todos los dominios que aún no han sido caracterizados (Corley, Burns & Yeo, 2020).

De igual forma, las proteínas de unión al RNA también se han clasificado mediante máquinas de vectores de soporte multiclase dependiendo de su RNA blanco, ya sea RNA ribosomal (rRNA), RNA de transferencia (tRNA) o RNA mensajero (mRNA) (Shazman & Mandel-Gutfreund, 2008). En cambio, clasificaciones más recientes de las RBP las han categorizado en tres grupos: independientes, dependientes y oportunistas. Las RBP independientes son aquellas que se unen directamente y de manera específica al RNA sin necesitar de otros factores (como proteínas), mientras que las dependientes sólo pueden unirse mediante la presencia de ciertos factores. Por último, se le considera como una RBP oportunista cuando la unión al RNA no es específica y se da por circunstancias favorables, tales como localizarse en el mismo compartimento subcelular (Vaishali et al., 2021).



**Figura 2. Las proteínas de unión al RNA participan en el metabolismo y la biología del RNA.** Se ilustran algunos procesos en donde participan las proteínas de unión a RNA (RBP) como la transcripción, el splicing, las modificaciones post-transcripcionales, la localización, el transporte, la traducción y la degradación del RNA (Modificado de Gebauer et al., 2021).

## 3.2. Funciones

### 3.2.1. Las proteínas de unión al RNA en la respuesta al estrés

Diferentes tipos de estrés, tales como el calor excesivo, la falta de nutrientes, la hipoxia, la desecación deshidratación, la disfunción de vías celulares particulares o la acumulación de especies reactivas del oxígeno pueden constituir una amenaza para la integridad celular. Es por ello que existen diferentes mecanismos para enfrentarse al estrés que involucran cambios transcripcionales y alteraciones de las vías de degradación de las proteínas. Un mecanismo esencial para la respuesta al estrés implica generar alteraciones en la organización intracelular a través de la formación de compartimentos sin membrana especializados: los gránulos de estrés. Los gránulos de estrés son un tipo de gránulo de ribonucleoproteína mensajera (mRNP), en donde ciertas moléculas de mRNA son secuestradas y la traducción es detenida en respuesta al estrés (Marcelo et al., 2021; Coppin et al., 2018).

Los gránulos de estrés contienen una combinación de subunidades ribosomales, moléculas de mRNA, factores de iniciación de la traducción y diversas proteínas funcionales, especialmente las proteínas de unión al RNA. Las proteínas de unión al RNA controlan la localización, estabilidad y traducción de su RNA blanco dentro de los gránulos de estrés. Además, las regiones desordenadas de las RBP participan en las propiedades dinámicas de los gránulos al crear conexiones proteína-proteína, llamadas *hubs*. La composición de los gránulos de estrés varía dependiendo del factor estresor que provoca su formación, además de su duración (Marcelo et al., 2021; Coppin et al., 2018). En particular, el estrés oxidante puede causar modificaciones post-traduccionales en las RBP, como por ejemplo, la oxidación y acetilación de cisteínas en la proteína de unión a RNA y DNA llamada TDP-43, al igual que su fosforilación. Asimismo, el estrés oxidante fomenta el reclutamiento de varias RBP, como TDP-43, SFPQ, hnRNPA1, TIA1 y ATXN2 (en *A. nidulans* conocida como PbpA/AN1325), para la formación posterior de los gránulos de estrés (Harley et al., 2021).

Los gránulos de estrés representan varias ventajas en el contexto del estrés celular: 1) su formación constituye una respuesta más rápida que los cambios transcripcionales o traduccionales; 2) diversas moléculas celulares importantes pueden ser protegidas de la degradación mediante su ensamblaje en los gránulos durante el estrés; y 3) los gránulos de estrés se desensamblan rápidamente después del estrés, lo que permite a las células acceder a proteínas y mRNA listos para ser usados (Marcelo et al., 2021).

### 3.2.2. Las proteínas de unión al RNA en la separación de fases

La separación de fases juega un rol importante en gran variedad de procesos celulares, tales como la formación de complejos de señalización, organelos sin membrana, organización del citoesqueleto y de otros ensamblajes supramoleculares. La separación de fases refleja una transición de separación, en donde una solución homogénea y bien mezclada se reorganiza de tal manera que diferentes regiones del espacio quedan ocupadas por distintas concentraciones de moléculas. La separación de fases más común en los sistemas biológicos es la separación líquido-líquido, que consiste en dos líquidos coexistiendo en fases separadas, en lugar de en una solución homogénea (Boeynaems et al., 2018).

La separación de fases favorece la formación de condensados macromoleculares, como los gránulos de estrés, que de acuerdo a estudios proteómicos son ricos en proteínas de unión al RNA. Por ello, no es de extrañarse que entre las funciones de estos condensados están organizar la síntesis, procesamiento, metabolismo, expresión y silenciamiento del RNA en diferentes regiones celulares. Algunas características de las secuencias de las proteínas de unión al RNA, como las regiones intrínsecamente desordenadas, dominios de unión al RNA y modificaciones post-traduccionales, contribuyen a su capacidad de separación de fases (Wiedner & Giudice, 2021).

Las regiones intrínsecamente desordenadas en las RBP consisten en una secuencia de aminoácidos de baja complejidad, bajo contenido de residuos hidrofóbicos y sin una estructura 3D bien definida. Las RBP están enriquecidas en

estas regiones intrínsecamente desordenadas, que al facilitar interacciones multivalentes, potencian la capacidad de separación de fases. Se ha observado que proteínas que poseen tanto regiones intrínsecamente desordenadas como dominios de unión a RNA tienen un alto potencial para la separación de fases, lo que sugiere que estos tipos de secuencia interactúan entre sí (Wiedner & Giudice, 2021).

En el caso de las modificaciones post-traduccionales de las RBP, la metilación de la arginina y la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina pueden afectar la separación de fases. La metilación de arginina limita la separación de fases, mientras que la fosforilación puede potenciar o inhibirla de acuerdo al contexto específico. Por lo tanto, la modificación de la fosforilación de dos diferentes sitios en una sola proteína podría tener efectos contrarios (Wiedner & Giudice, 2021).

### 3.3. Las proteínas de unión al RNA descritas en *Aspergillus nidulans* cuyos patrones de fosforilación se analizan en este trabajo

#### 3.3.1. FabM

En los hongos, las proteínas de unión al RNA participan en procesos fundamentales, como la respuesta al estrés, el desarrollo y la patogénesis (Son et al., 2021; Göhre et al., 2013). Entre las diferentes RBP que posee *A. nidulans*, FabM (Forced expression Activation of *brlA*) la cual pertenece al grupo de proteínas de unión a la cola de poliA del RNA, se expresa constitutivamente y es esencial para la viabilidad de *Aspergillus nidulans*. FabM participa en la formación de gránulos de estrés bajo privación de glucosa, interactúa con las cinasas SrkA y SakA (Jaimes-Arroyo et al., 2015) y participa en el desarrollo asexual de *A. nidulans*, ya que su sobreexpresión induce la conidiación (Soukup et al., 2017; Marhoul & Adams, 1996). FabM posee cuatro dominios RRM, los tres primeros se encuentran conservados. Además, tiene un dominio carboxilo terminal que es divergente en diferentes hongos (Marhoul & Adams, 1996).

Pab1, el homólogo de FabM en *S. cerevisiae*, también tiene un rol en la formación de gránulos de estrés, además de proteger los transcritos de la degradación al

unirse con ellos. De igual forma, está implicada en la regulación de la iniciación y terminación de la transcripción y en la exportación de los transcritos del núcleo al citoplasma (Brambilla et al., 2017). Asimismo, se ha demostrado que tras la exposición a condiciones de estrés térmico o de pH, Pab1 induce una separación de fases formando hidrogeles *in vitro*. Por lo tanto, Pab1 puede actuar como un sensor de estrés fisiológico al marcar el inicio del mismo mediante la separación de fases (Riback et al., 2017).

### 3.3.2. PbpA

La proteína AN1325, también llamada PbpA, se requiere para el desarrollo sexual y el metabolismo secundario en *A. nidulans*. A diferencia de su homólogo de *S. cerevisiae* (Pbp1), AN1325 no participa en la formación de gránulos de estrés ni de P-bodies (Soukup et al., 2017). Algunas otras funciones que posee su homólogo y que no han sido estudiadas en *A. nidulans* son la interacción que tiene Pbp1 con Pab1 (homólogo de FabM). Se ha visto que esta interacción regula la poliadenilación del mRNA y la formación de condensados en respuesta al estado respiratorio los cuales se requieren para mediar la señalización de TORC1 (Mangus et al., 1998; Mangus et al., 2007; Yang et al., 2019).

Pbp1 posee 24 metioninas en un dominio de baja complejidad que promueven reversiblemente la separación de fases para la regulación de la vía TORC en condiciones de estrés oxidante. De esta manera, los residuos de metionina en este homólogo podrían representar sensores redox que facilitan una conexión molecular entre la mitocondria y TORC1 (Kato et al., 2019).

En otros organismos, incluidos *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* y *H. sapiens*, los homólogos de PbpA/AN1325, también conocidos como Ataxina-2, poseen funciones claves en la regulación de la estabilidad y traducción del RNA y en la respuesta al estrés celular. De igual forma, se han involucrado en el desarrollo embrionario, la apoptosis, la organización de la actina, la proliferación celular, la señalización de la insulina en la obesidad y otros procesos metabólicos. Asimismo, en humanos, la ataxina 2 está implicada en el trastorno neurodegenerativo llamado ataxia espinocerebelosa tipo 2 (Ostrowski et al., 2017).



### 3.3.3. PufA

En el caso de PufA (AN7474), se trata de una proteína poco estudiada perteneciente a la familia PUF (Factor de unión a Pumilio/Fem-3 por sus siglas en inglés) que fue recientemente caracterizada en *A. nidulans*. Se observó que la delección de *pufA* provoca una disminución de la formación de esporas asexuales y una reducción de la expresión de dos genes que regulan el desarrollo asexual: *brlA* y *abaA* (Son et al., 2021). La familia PUF se encuentra altamente conservada en diferentes eucariontes y es conocida por asociarse con motivos específicos cortos en el 3'-UTR del mRNA (elementos de respuesta nanos o NRE) por medio de sus dominios de homología a Pumilio (PUM-HD por sus siglas en inglés) (Galez et al., 2021; Spassov et al., 2003). En los hongos Ascomycota, las proteínas PUF reconocen entre 8 a 10 elementos de unión a nucleótidos, lo que generalmente provoca la reducción de la eficiencia de la traducción o el aumento de la degradación de sus mRNA blancos (Wilinski et al., 2015; Wilinski et al., 2017).

Jsn1, el ortólogo de PufA en *S. cerevisiae*, es una proteína de membrana mitocondrial periférica que contribuye al reclutamiento del complejo Arp2/3 a la mitocondria, siendo que podría tener un rol en el movimiento y herencia mitocondrial (Fehrenbacher et al., 2005). De igual forma, Jsn1 y su parólogo Puf2 regulan a la proteína Zeo1 y por lo tanto modulan la respuesta al estrés de la pared celular (Haramati et al., 2017). Además, se observó que la sobreexpresión de Jsn1 puede suprimir la sensibilidad a la temperatura causada por la mutación en una tubulina estabilizadora de microtúbulos, lo que podría darle un rol en la dinámica de regulación de microtúbulos (Machin & Barnes, 1995). Por último, también se comprobó que la cinasa Ypk1 fosforila a Jsn1 como mecanismo de control de la composición y función de la membrana plasmática por medio de la vía TORC-Ypk1 (Galez et al., 2021).

#### 3.3.4. La proteína AN7700

AN7700 es una proteína aún no caracterizada. No obstante, su homólogo en *S. cerevisiae* Whi3 posee diversas funciones que podrían llevar al planteamiento de nuevas investigaciones en *A. nidulans*. Whi3 está asociada al retículo endoplasmático con un único dominio RRM altamente conservado cerca de su extremo carboxilo terminal. Experimentos de microarreglos han identificado cerca de 30 RNA blancos de Whi3, incluyendo transcritos involucrados en la regulación del ciclo celular, la biogénesis de la pared celular y el tráfico exocítico de proteínas (Colomina et al., 2008; Vergés et al., 2007). Se ha demostrado que Whi3 también regula el ciclo celular controlando el tamaño celular en la transición de la fase G1/S. Asimismo, controla la producción de las ciclinas Cln1 y Cln2 de la fase G1 (Schladebeck & Mösch, 2013).

También se ha observado un papel de Whi3 en el procesamiento del RNA dependiente de algunos tipos de estrés, tales como su localización en los gránulos de estrés por privación de glucosa o por golpe de calor (Holmes et al., 2013). Además, Whi3 controla la adhesión y la formación de biofilms de *S. cerevisiae*, gracias a que dirige la producción de la proteína cinasa Yak1 a nivel post-transcripcional y mediante sus otras proteínas blanco Tpk1 y el factor de transcripción Tec1. Se ha sugerido, igualmente, que Whi3 tiene un rol en el control de la ploidía, así como que su acumulación causa el fenotipo de esterilidad en levaduras envejecidas (Schladebeck & Mösch, 2013; Schlissel et al., 2017).

#### 3.3.5. Clueless (Clu)

Clueless o también abreviada como Clu, es una proteína de unión a RNA altamente conservada en diferentes organismos y es necesaria para la función, localización y probablemente control de calidad mitocondrial (Sen & Cox, 2016; Wakim et al., 2017). En *A. nidulans*, no ha sido caracterizada aún, aunque sí está identificada en su proteoma como Clu (Malavazi et al., 2006; Freitas et al., 2011). Clu posee un dominio Clu N-terminal y un dominio de repetición tetratricopeptídica (TPR) C-

terminal que es el responsable de la unión con los RNA. La pérdida de Clu en *Drosophila* genera una localización mitocondrial defectuosa, una disminución severa de la producción de ATP y daño oxidante mitocondrial (Cox & Spradling, 2009). El fenotipo de la localización defectuosa, en donde se genera una agrupación mitocondrial característica junto al núcleo, está altamente conservado tras la eliminación de los ortólogos Clu en especies evolutivamente distantes (Fields et al., 1998, 2002; Logan et al., 2003; Cox & Spradling, 2009; Gao et al., 2014; Schatton et al., 2017). En *Drosophila* se ha observado que Clu es necesaria en moscas adultas para generar cantidades normales de ATP y para suprimir el daño oxidante. De igual forma, moscas sin Clu son estériles y hay mortalidad prematura (Sen et al., 2013). En *S. cerevisiae*, la mutante  $\Delta clu$  provoca una disminución del crecimiento en una fuente de carbono no fermentable y una mayor formación de colonias pequeñas (Sheard et al., 2020).

Además, se ha observado que Clu se une preferentemente a los RNA codificados en el núcleo con destino mitocondrial y que puede que los posicione para su importación co-traducciona en *Drosophila* y en células animales. Entre las proteínas mitocondriales con las que se asocia Clu, se encuentran la porina y la translocasa de membrana externa 20 (TOM), además de PINK y Parkin, con las que interactúa genética y bioquímicamente. Las vías en las que participan las proteínas cuya expresión depende de Clu son la fosforilación oxidativa (OXPHOS), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la degradación de aminoácidos, la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis (Schatton et al., 2017; Sen & Cox, 2016). Asimismo, se ha mostrado que en *Drosophila* y células humanas, Clu funge como regulador clave de Drp1 para controlar la fisión mitocondrial, ya que promueve su reclutamiento a las mitocondrias (Yang et al., 2022).

En hepatocitos de células humanas, CLUH, el ortólogo de Clu en *Homo sapiens*, se distribuye en el citosol en condiciones no estresantes. No obstante, se ha observado que en condiciones de inanición, CLUH y sus RNAm unidos forman partículas rinucleoproteicas que funcionan como compartimentos. Se sugiere que dentro de estos compartimentos CLUH regula la traducción y la estabilidad de

los RNAm, controla la señalización de mTORC1 y modula el recableado metabólico en células animales (Pla-Martin et al., 2020). Por el contrario, se ha reportado en *Drosophila* y en *S. cerevisiae* que Clu forma y se localiza en partículas citoplasmáticas denominadas “bliss” en condiciones no estresantes, mientras que en condiciones de estrés oxidante y privación de glucosa, estos condensados se dispersan. Igualmente, los bliss de Clu son dependientes del citoesqueleto de microtúbulos para su movimiento. La formación de estas partículas en *Drosophila* es regulada en parte por la insulina y su vía de señalización (Sheard et al., 2020).

#### 4. *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

*Aspergillus nidulans* es un hongo ascomiceto filamentoso que es utilizado como modelo de estudio gracias a algunas de sus características biológicas y a su cercanía filogenética con hongos de importancia industrial, médica y biotecnológica. Por lo tanto, los estudios en este hongo contribuyen significativamente al entendimiento de procesos biológicos fundamentales y son relevantes para generar aplicaciones en diferentes sectores. Además, en la investigación, el uso de *A. nidulans* en el laboratorio es altamente útil, ya que es fácilmente manipulado mediante genética clásica y molecular (Todd, Davis & Hynes, 2007; Pontecorvo et al., 1953).

Entre las características biológicas que permiten a *A. nidulans* ser manipulado con genética clásica están sus dos programas de desarrollo (sexual y asexual) bien definidos, ya que muchos otros hongos filamentosos carecen de un ciclo sexual conocido. Además, este organismo tiene un crecimiento rápido y una gran capacidad de generar mutantes auxotróficas, facilitando los análisis genéticos. De igual forma, produce conidias uninucleadas, permitiendo la propagación clonal y la purificación rápida de mutantes, transformantes y progenie a partir de cruces. Otra ventaja es que *A. nidulans* es haploide, favoreciendo la selección fácil de mutantes y el análisis mendeliano en una sola generación (Todd, Davis & Hynes, 2007; Gavrias, Timberlake & Adams, 2001).

Gracias a las relaciones filogenéticas de *A. nidulans*, su desarrollo y metabolismo son representativos de otros hongos filamentosos del género *Aspergillus*. Entre estos hongos se encuentran *A. flavus* y *A. parasiticus* (mayores productores de micotoxinas), *A. fumigatus* (causante de aspergilosis en humanos y otros animales), *A. niger* y *A. oryzae* (productores de enzimas industriales), así como *A. terreus* (productor de colesterol y lovastatina). Asimismo, los estudios de *A. nidulans*, junto con los de *N. crassa*, pueden ser aplicables a un mayor rango de ascomicetos no tan estrechamente relacionados, tales como *Magnaporthe*, *Fusarium* y *Penicillium* (David et al., 2008; Todd, Davis & Hynes, 2007).

La investigación en *A. nidulans* ha generado contribuciones importantes al entendimiento del desarrollo (Clutterbuck, 1969; Adams, Boylan & Timberlake, 1988; Mirabito, Adams & Timberlake, 1989; Timberlake, 1990, Lara-Ortíz et al., 2003), el ciclo celular (Oakley & Morris, 1981; Osmani, Engle, Doonan & Morris; Osmani & Mirabito, 2004), la polaridad celular (Momany, 2002), la reparación del DNA (Goldman & Käfer, 2004), el metabolismo secundario (Yu & Keller, 2005), la señalización (Hicks et al., 1997), control del pH (Arst & Peñalva, 2003; Peñalva, & Arst, 2004), vías de señalización en respuesta al estrés oxidante (Kawasaki et al., 2002; Lara-Rojas et al., 2011; Garrido-Bazán et al., 2018; Carrasco & Aguirre, 2021), así como a la dinámica mitocondrial (Garrido-Bazán et al., 2020; Garrido-Bazán & Aguirre, 2022).

#### 4.1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* comprende las siguientes fases: fase de crecimiento, ciclo sexual, ciclo asexual y ciclo parasexual. La fase de crecimiento comienza con la germinación de una espora asexual (conidia) o sexual (ascospora) que lleva a la formación de células septadas multinucleadas con forma filamentosa llamadas hifas. Las hifas se elongan apicalmente y se ramifican subapicalmente formando una red de células interconectadas llamadas en su conjunto micelio. Durante esta fase, diferentes hifas pueden tener roles que involucren la adquisición de nutrientes del medio o el desarrollo de estructuras reproductivas especializadas (Gavrias, Timberlake & Adams, 2001; Casselton & Zolan, 2002).

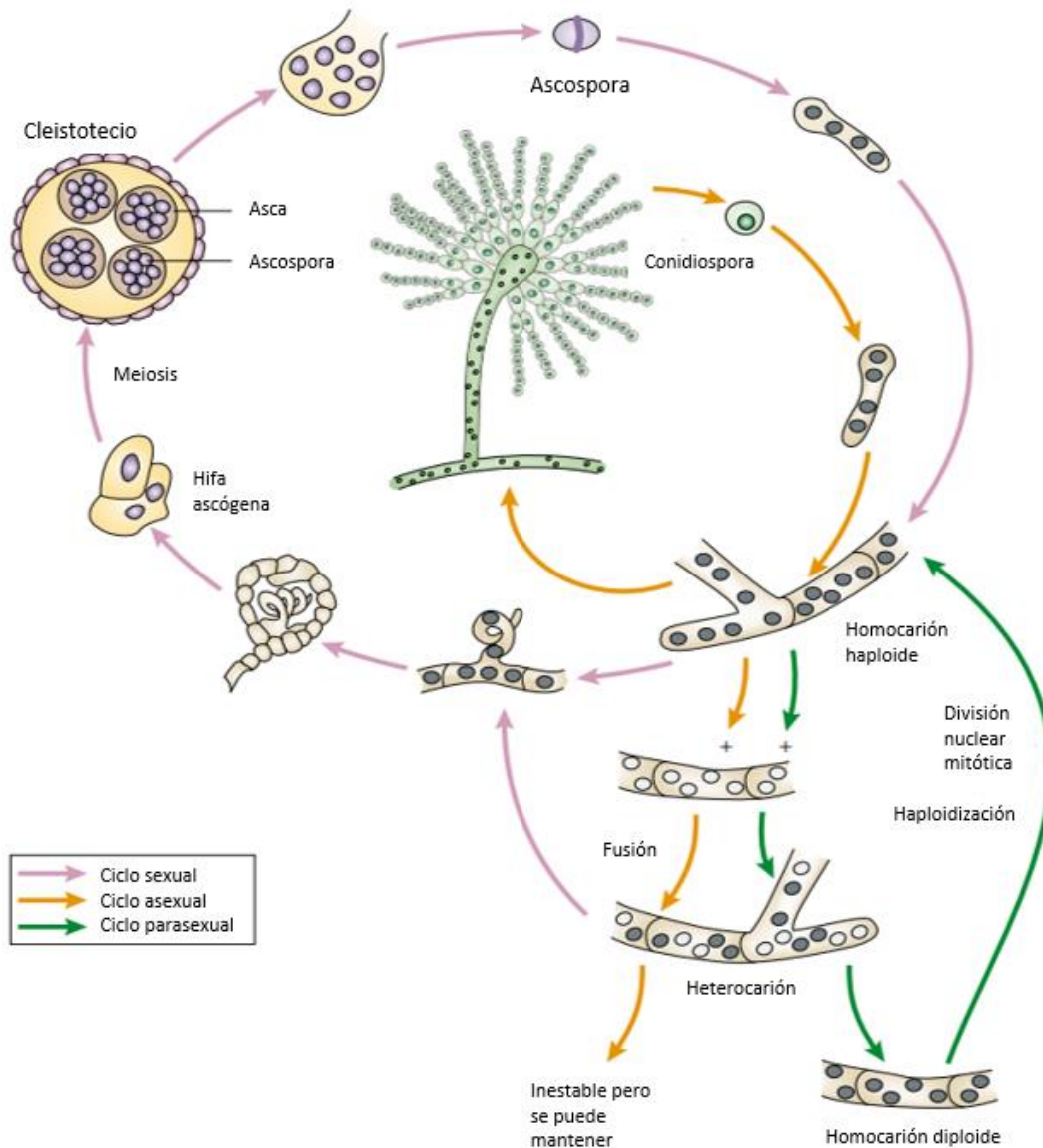
En el ciclo asexual, las hifas vegetativas se diferencian para producir esporas asexuales (conidias) en estructuras reproductivas especializadas llamadas conidióforos. El ciclo asexual puede ser inducido por la exposición a la luz, a niveles normales de oxígeno (Axelrod, Gealt & Pastushok, 1973; Adams, Wieser & Yu, 1998) o por estresores ambientales como la privación de nutrientes (Skromne, Sánchez & Aguirre, 1995). Este proceso inicia con la diferenciación de una célula pie especializada de donde emerge una célula tallo que se elonga hacia una fase aérea. Posteriormente se forma una vesícula multinucleada en la punta de la célula tallo, que dará lugar a un tipo celular nuevo llamado métula por medio de divisiones mitóticas. Cada una de las métulas genera dos fiálides mediante gemaciones polares, que a su vez originan cadenas de esporas uninucleadas idénticas llamadas conidias por medio de divisiones sucesivas (Todd, Davis & Hynes, 2007; Adams, Wieser & Yu, 1998).

La oscuridad, bajos niveles de oxígeno y algunas señales intrínsecas pueden inducir el ciclo sexual, en donde se producen cuerpos fructíferos (cleistotecios) que contienen a las esporas sexuales (ascosporas) (Zonneveld, 1988; Champe, Nagle, Yager, 1994; Krijgsheld et al., 2013). El ciclo sexual de *A. nidulans* involucra la diferenciación coordinada de tres tipos de tejidos: las células Hülle, las hifas ascógenas y la pared de los cleistotecios (Pirzak, Miller & Miller, 2008) (Figura 3). Las células Hülle son estructuras asociadas únicamente con los hongos del género *Aspergillus* y han sido relacionadas con funciones de soporte, protección y nutrición de los cuerpos fructíferos (Troppens et al., 2020; Sohn & Yoon, 2002). Investigaciones recientes sugieren que son células de tejido sexual derivado de las hifas con una función de almacenamiento de núcleos (Troppens et al., 2020).

Para la diferenciación de las hifas ascógenas se forma primero un dicarionte mediante la fusión de dos hifas. Las hifas fusionadas pueden ser de la misma colonia o de colonias diferentes, debido a que *A. nidulans* es homotálico (Krijgsheld et al., 2013). En los cleistotecios, un par de núcleos del dicarionte se divide para formar una masa de células llamadas hifas ascógenas. Estas hifas están altamente ramificadas y cada célula de la punta se convierte en una asca (célula

especializada), en la que los dos núcleos haploides se fusionan. El núcleo diploide sufre una meiosis inmediata seguida de una mitosis post-meiótica, que resulta en la formación de ocho ascosporas (Casselton & Zolan, 2002). Los núcleos en cada ascospora sufren una sola división mitótica, resultando en ascosporas maduras binucleadas haploides (Todd, Davis & Hynes, 2007) (Figura 3). Cada cleistotecio contiene más de 10,000 ascosporas que son la progenie meiótica de una sola hifa ascógena (Pontecorvo et al., 1953).

El ciclo parasexual inicia cuando los núcleos haploides en un heterocarión o en un homocarión se fusionan para formar un diploide. El núcleo diploide puede dividirse mitóticamente de manera consecutiva dando lugar a un micelio diploide. Los núcleos diploides pueden ser estables o haploidizarse por alteraciones durante las divisiones mitóticas (Todd, Davis & Hynes, 2007; Schoustra et al., 2007) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.** El ciclo asexual inicia con la formación de una estructura especializada llamada conidióforo. El conidióforo genera mediante divisiones mitóticas hilas de esporas asexuales llamadas conidias. En el ciclo sexual se forman los cuerpos fructíferos llamados cleistotecios que contienen ascas con 8 ascosporas binucleadas dentro de cada una. Los cleistotecios se encuentran acompañados de las células de Hülle, asociadas con funciones de soporte, protección y nutrición. El ciclo parasexual consiste en la formación de heterocariontes y la fusión de núcleos haploides que forman diploides. Las conidias diploides pueden generar micelio diploide o sufrir un proceso de haploidización (Modificado de Casselton & Zolan, 2002).



## HIPÓTESIS

Los cambios en los patrones de fosforilación de diversas proteínas de unión al RNA inducidos por el  $H_2O_2$  pueden ser parte importante de la respuesta antioxidante en *Aspergillus nidulans*.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Identificar las proteínas de unión al RNA que sufren cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al  $H_2O_2$  y realizar un análisis bioinformático de algunas proteínas que podrían estar relacionadas con la respuesta antioxidante en *Aspergillus nidulans*.

### PARTICULARES

1. Utilizar los datos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem del fosfoproteoma global del hongo *Aspergillus nidulans* para identificar las proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al  $H_2O_2$ .
2. Generar una base de datos con las proteínas identificadas, obtener los fosfositios y las posibles cinasas involucradas en dichas fosforilaciones.
3. Elegir, de la base de datos, las proteínas que presenten el mayor número de cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al  $H_2O_2$ .
4. Realizar alineamientos de las proteínas seleccionadas y con sus homólogos en otros hongos, para determinar la conservación de regiones de interés y de los residuos fosforilados.
5. Realizar análisis de las posibles regiones desordenadas en las proteínas de interés y su posible función en la respuesta antioxidante.
6. Integrar las proteínas analizadas en vías de señalización conocidas.

## MÉTODOS

1. Identificación de proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante las herramientas Gene Ontology y g:Profiler y elaboración de una base de datos en Excel.

Se identificaron las proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de datos crudos no analizados del fosfoproteoma del hongo *Aspergillus nidulans* (Carrasco & Aguirre, 2021). La identificación se realizó mediante la comparación e integración de dos análisis de enriquecimiento funcional en Gene Ontology (Ashburner et al., 2000; Mi et al., 2019; Gene Ontology Consortium, 2021) y en g:Profiler (versión e105\_eg52\_p16\_e84549f) con el método de corrección de prueba múltiple g\_SCS y aplicando una significancia de 0.05 (Raudvere et al., 2019).

Para realizar el análisis de enriquecimiento funcional en ambos programas, primero se obtuvieron los números de identificación de las 1964 proteínas que se encuentran en la base de datos del fosfoproteoma (Carrasco & Aguirre, 2021). En el caso de Gene Ontology, se ingresaron los números de identificación de acuerdo a UNIPROT (UniProt Consortium, 2021), se escogió el término de función molecular, al organismo *Emericella nidulans* (nombre por el que se identifica a *A. nidulans* en la base de datos) y se realizó el análisis. Después se descargó en Excel la lista correspondiente al término RNA binding en la segunda columna denominada “#” en el análisis.

En g:Profiler se ingresaron los números de identificación de acuerdo a la base de datos de *Aspergillus* (AspGD) (Arnaud et al., 2012) en la sección g:GOST, se seleccionó al organismo *Aspergillus nidulans* y se corrió el análisis. En la pestaña de “Detailed Results” se descargó la lista correspondiente al término RNA binding en la columna “TUQ”. TUQ se refiere a la intersección de las proteínas del término RNA binding registrados en *Aspergillus nidulans* con el de las proteínas que ingresamos al análisis.

Una vez obtenidas las listas de los análisis de ambos programas, se combinaron en una hoja de Excel y se eliminaron duplicados para obtener la lista final. Posteriormente, se colocó la lista en una base de datos en Excel, en donde se añadió el nombre y los números de identificación de cada proteína con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al  $H_2O_2$ .

Para identificar a las proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación que pueden formar parte de complejos ribonucleoproteicos, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en G:Profiler y Gene Ontology, en donde se descargó en Excel la lista correspondiente al término complejo ribonucleoproteico (GO:1990904) en la segunda columna denominada “#” en el análisis. Posteriormente, se descargó de la misma forma del análisis, la lista correspondiente a gránulos de estrés.

2. Identificación de los fosfositos y las posibles cinasas responsables de su fosforilación utilizando los programas SnapGene y NetPhos.

La base de datos del fosfoproteoma de *A. nidulans* consiste en los resultados de cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas en tándem ya validados por el software Scaffold, que dan lugar a más de 40 000 datos para las 1964 proteínas detectadas con fosforilaciones en ausencia y/o presencia de  $H_2O_2$ . La cepa silvestre de *A. nidulans* utilizada para la realización del fosfoproteoma fue CLK43 (*pabaA1 yA2 veA1*), que después de crecerla en medio mínimo líquido 1% de glucosa por 12 horas, fue tratada con o sin 10mM de  $H_2O_2$  durante 10 minutos (Carrasco & Aguirre, 2021). La información de la base de datos está dividida principalmente en 2 secciones: la primera sección es para todos aquellos datos que corresponden a las muestras sin  $H_2O_2$  (WT sample), mientras que la segunda sección corresponde a los datos correspondientes a las muestras con  $H_2O_2$  (WT hydrogen peroxide sample). Además, se encuentran datos como el nombre de la proteína, sus números de identificación, así como las secuencias de entre 7 a 11 péptidos en donde se ubican las modificaciones post-traduccionales, indicadas en letras minúsculas, entre otros datos de los espectros de masas.

Para encontrar los fosfositos de cada proteína ya previamente identificada como de unión al RNA, se buscó cada una de ellas en la base del fosfoproteoma (Carrasco & Aguirre, 2021), que está en un formato de Excel, ingresando su número respectivo de identificación en el buscador del archivo. Una vez identificadas las filas que contengan los datos de la proteína de interés, se reconocen las secuencias de los péptidos en donde se encuentran las fosforilaciones, ya sean en treonina (T), serina (S) o tirosina (Y) en la columna llamada Peptide sequence. Posteriormente, para ubicar los sitios específicos de las fosforilaciones, se identificaron las secuencias de péptidos en la secuencia general de cada una de las proteínas de interés. Para ello, se descargó el proteoma general de *A. nidulans* desde UNIPROT (UniProt Consortium, 2021) y se visualizó en el software SnapGeneViewer® (de Insightful Science; disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)). Después se buscó la secuencia de la proteína de interés dentro del proteoma general y con el comando Edit>Find>Find Protein Sequence se identificó la ubicación de la secuencia de péptidos que nos indicó el fosfoproteoma en el software de SnapGeneViewer®. Así, se identificó específicamente el número de aminoácido de cada una de las fosforilaciones que aparecían en las secuencias de péptidos para cada proteína de interés, descartando también datos repetidos.

La identificación de los fosfositos se hizo para las categorías de muestras biológicas WT sample (muestra silvestre no expuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y WT hydrogen peroxide sample (muestra silvestre expuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Carrasco & Aguirre, 2021). Luego se registraron los fosfositos en la base de datos creada de acuerdo a su categoría de muestra biológica con el siguiente código de colores: rojo para los sitios fosforilados únicamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; azul para los sitios fosforilados únicamente en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; negro para los sitios fosforilados tanto en ausencia como en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De igual forma, para predecir las posibles cinasas de los fosfositos se ingresaron una por una las secuencias de cada proteína de la base de datos en el programa NetPhos (Blom et al., 2004). Del resultado del análisis, se escogieron las cinasas de probabilidad mayor al 50% para cada fosfosito sin tomar en cuenta las cinasas

no especificadas (“UNSP” por sus siglas en inglés). Finalmente, fueron añadidas a la base de datos las probables cinasas de los fosfositos.

### 3. Obtención y visualización de alineamientos en T-Coffee y JalView.

Se seleccionaron cinco proteínas de la base de datos elaborada: AN1325, AN7700, AN7474, FabM y Clu, de acuerdo a la cantidad de fosfositos que poseían y a sus posibles funciones en la respuesta al estrés oxidante. Para su análisis posterior, se obtuvieron las secuencias de estas proteínas en *A. nidulans* y de sus ortólogos en otros eucariontes a partir de las bases de datos del NCBI (Sayers et al., 2021), UNIPROT (UniProt Consortium, 2021) y AspGD (Arnaud et al., 2012).

Los números de identificación de las secuencias recopiladas para cada proteína fueron de los siguientes organismos: *A. nidulans* (AN1325), *A. fumigatus* (Afu1g09630), *A. niger* (An08g01230), *A. oryzae* (AO090012000905), *Saccharomyces cerevisiae* (Pbp1), *Candida albicans* (C3\_00130C\_A) y *Neurospora crassa* (XP\_963488.1); *A. nidulans* (AN7700), *A. fumigatus* (Afu5g08330), *A. niger* (An03g04650), *A. oryzae* (AO090701000760), *S. cerevisiae* (Whi3), *Schizosaccharomyces pombe* (SPCC16C4.07.1), *C. albicans* (C7\_02200W\_A|Whi3) y *N. crassa* (XP\_964717.2); *A. nidulans* (AN7474), *A. fumigatus* (Afu2g05610), *A. niger* (An02g13940), *A. oryzae* (AO090001000672), *S. cerevisiae* (Jsn1), *S. pombe* (SPBP32G2.14.1), *C. albicans* (C5\_02500C\_A) y *crassa* (XP\_962915.2); *A. nidulans* (AN4000), *A. fumigatus* (Afu1g04190), *A. niger* (An01g03050), *A. oryzae* (AO090003000927), *S. cerevisiae* (PAB1), *S. pombe* (SPAC57A7.04c.1), *C. albicans* (C1\_03370W\_A), *N. crassa* (sp|Q7S6N6|PABP\_NEUCR); *A. nidulans* (AN4908), *A. fumigatus* (Afu3g10800), *A. niger* (An02g06530), *A. oryzae* (AO090003000629), *S. cerevisiae* (YMR012W), *C. albicans* (C1\_04970W\_A) y *N. crassa* (NCU00021).

Para determinar la conservación de regiones de interés y de los residuos fosforilados, con las secuencias anteriormente adquiridas se obtuvieron alineamientos mediante el software T-Coffee (Notredame, Higgins & Heringa, 2000) y se visualizaron en JalView (Waterhouse et al., 2009). En los alineamientos

de PbpA/AN1325 se marcaron en verde las metioninas mediante el programa JalView (Waterhouse et al., 2009).

4. Obtención de dominios por medio de las bases de datos PROSITE, UNIPROT y SMART.

Se obtuvieron los dominios de AN1325, AN7700, AN7474, FabM y Clu por medio de las bases de datos PROSITE (Sigrist et al., 2013), UNIPROT (UniProt Consortium, 2021) y SMART (Letunic & Bork, 2020).

5. Análisis de la estructura de las proteínas estudiadas y de sus regiones intrínsecamente desordenadas posibles.

Para determinar la posible función de las regiones intrínsecamente desordenadas de las proteínas de interés en la respuesta antioxidante, se realizaron análisis por medio del software AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) y los softwares IUPred3 y ANCHOR2 (Erdős et al., 2021). Para el análisis mediante estos programas se utilizaron las secuencias de las proteínas de interés y se identificaron los fosfositios dentro de las secuencias. En el caso de la proteína AN1325/PbpA, se utilizó ColabFold (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2021) para la predicción de la estructura 3D y se visualizó mediante el software ChimeraX (Pettersen et al., 2021), debido a que la secuencia completa no se encontraba en la base de datos de AlphaFold.

6. Elaboración de esquemas de proteínas con fosfositios y vías de señalización conocidas.

Finalmente, se elaboraron esquemas de las proteínas con sus fosfositios y sus dominios en SnapGeneViewer®. Igualmente, se integraron en estos esquemas las proteínas analizadas que participan en distintas vías de señalización conocidas utilizando el programa BioRender (BioRender.com).

## RESULTADOS

### **En *Aspergillus nidulans* 79 proteínas involucradas posiblemente en la unión al RNA, sufren cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Para identificar las proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *Aspergillus nidulans*, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional en Gene Ontology y en g:Profiler con datos crudos de las 1964 proteínas identificadas en el fosfoproteoma global de *A. nidulans* (Carrasco & Aguirre, 2020). De esta forma, se generó una base de datos en donde se identificaron 79 proteínas posiblemente involucradas en la unión al RNA, con cambios en la fosforilación y desfosforilación de residuos en ausencia o en presencia de estrés oxidante. Asimismo, se identificaron las posibles cinasas responsables de la fosforilación de cada proteína, entre las que se encuentran la MAP cinasa p38 (p38MAPK), las proteínas cinasas A, B, C y G (PKA, PKB, PKC, PKG), las proteínas caseína cinasa I y II (CKI y CKII), la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), la calcio/calmodulina cinasa II (CaMK-II), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la cinasa ribosomal S6 (RSK), la proteína cinasa dependiente de DNA (DNAPK) y la proteína serina/treonina ATM (ATM) (Tabla 1).

**Tabla 1. Proteínas de unión al RNA que mostraron cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posibles cinasas responsables, de acuerdo a NetPhos.** En azul se marcan los fosfositos en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en rojo los fosfositos en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en negro los que se encuentran en ambas condiciones. Los fosfositos se obtuvieron mediante el análisis del fosfoproteoma de *A. nidulans* (Carrasco & Aguirre, 2021), utilizando SnapGeneViewer® (de Insightful Science; disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)) Se detectaron 79 proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nombre de la proteína	Números de acceso de la proteína (UNIPROT)	Números de acceso alternativos	Fosfositos sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fosfositos con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Posibles cinasas de acuerdo a NetPhos
Pseudouridine synthase	Q5BHA8_EMENI	AN0072	S244	S244, S250	S244(PKA), S250(CKI)

Ribonuclease P protein subunit	Q5BGZ1_EMENI	AN0189	S17, T20, T21	S17	S17(PKA), T20(CKI), T21(CKII)
ATP-dependent RNA helicase dbp7	DBP7_EMENI	AN0204		S479, S481	S479(CKII), S481(CKII)
60S ribosomal protein L12	C8VUJ2_EMENI	AN0262	S38, S103	S38	S38(Cdk5), S103(CaMK-II)
Uncharacterized protein	Q5BGR4_EMENI	AN0266	S274, S276, T281, S353, T370, S371	S353, T370, S371	S274(PKG), S276(PKB), T281(PKA), S353(PKA), T370(PKG), S371(PKA)
Pre-mRNA-splicing factor cwc22	CWC22_EMENI	AN0289	T15, S21, Y22, S23, S46, S693, T695, S697, S698, S715, S717	T15, S21, S23, S715, S861, T864	T15(Cdk5), S21(GSK3), S23(Cdk5), S46(PKA), S693(PKC), T695(Cdc2), S697(Cdc2), S698(PKC), S715(PKA), S717(PKB), S861(PKB), T864(Cdk5)
Protein vts1	VTS1_EMENI	AN0406	T66, S160, S198, S293, S294, S295, S528	S295	T66(p38MAPK ), S160(Cdk5), S198(Cdk5), S293(RSK), S294(PKC), S295(PKC), S528(PKC)
Multiple RNA-binding domain-containing protein 1	MRD1_EMENI	AN0421		S819	S819(CaMK-II)
Nonsense-mediated mRNA decay protein Upf3, putative	Q5BG25_EMENI	AN0505		S272, S280, S377	S272(PKC), S280(Cdc2), S377(PKG)
Uncharacterized protein	C8VS08_EMENI	AN0646	S1034, S1036, S1041, S1042, S1044, S1070	S1034, S1036, S1041, S1042, S1044	S1034(GSK3), S1036(Cdc2), S1041(Cdc2), S1042(GSK3), S1044(Cdc2), S1070(DNAPK)



5'-3' exoribonuclease 2	XRN2_EMENI	AN0707	S443, S444, S446, Y447, S452, T454, S531, T532	S443, S444, S446, Y447, S452, T454	S443(PKA), S444(PKA), S446(PKC), S452(Cdk5), T454(PKC), S531(CKII), T532(CKII)
Ribosomal_S7 domain-containing protein	C8VQ27_EMENI	AN0843	S56	S56, S141	S56(Cdk5), S141(PKA)
DNA replication initiation factor Cdc45	Q5BF08_EMENI	AN0872	T259		T259(GSK3)
Endoribonuclease ysh1	YSH1_EMENI	AN0990	T771, T775	T771, T775, T781	T771(GSK3), T775(Cdk5), T781(CKII)
Ribosomal_L18_c domain-containing protein	Q5BEL7_EMENI	AN1013	S180, S182		S180(GSK3), S182(Cdc2)
Cell wall biogenesis RNA binding protein Ssd1, putative	Q5BE72_EMENI	AN1158	S183, S538, S1213, S1288, T1302, S1304	S183, S524, S526, S536, S538, S1213, S1288, T1302, S1304	S183(PKA), S524(Cdc2), S526(CKI), S536(CKII), S538(GSK3), S1213(PKG), S1288(Cdk5), T1302(GSK3), S1304(RSK)
Eukaryotic translation elongation factor 1 subunit Eef1-beta, putative	Q5BE68_EMENI	AN1162	T28, S29, S109	T28, S29, S42, S43, S109	T28(Cdc2), S29(Cdc2), S42(CKII), S43(CKII), S109(CKII)
Nuclear mRNA splicing factor- associated protein, putative	C8VT05_EMENI	AN1188	S15		S15(Cdk5)
Pre-mRNA splicing factor (Prp31), putative	Q5BDX0_EMENI	AN1260	T393, S400, S401, T412, S414	T292, T412, S414	T292(PKG), T393(Cdk5), S400(PKC), S401(PKC), T412(GSK3), S414(PKC)
PAB1 binding protein (Pbp1), putative	Q5BDQ5_EMENI	AN1325	T367, S369, S429, S633, S634, T640	S267, S429, S634	S267(CKII), T367(GSK3), S369(PKC), S429(GSK3),

					S633(CaMK-II), S634(Cdk5), T640(p38MAPK)
Protein cft1	CFT1_EMENI	AN1413	S506		S506 (Cdc2)
Transcription elongation factor spt5	SPT5_EMENI	AN1698	S12, S27, T818, T829, S839, T860, T869, S877, S879, T904, S908	T829, T904	S12(CKII), S27(CKII), T818(p38MAPK), T829(p38MAPK), S839(GSK3), T860(GSK3), T869(Cdk5), S877(Cdc2), S879(CKII), T904(Cdk5), S908(Cdc2)
Translation release factor eRF3, putative	Q5BBK0_EMENI	AN2080	S146, S153	S146, S153, S220, S228, S232, S233	S146(CKI), S153(Cdc2), S220(Cdk5), S228(Cdk5), S232(Cdc2), S233(Cdk5)
THO complex component (Rlr1), putative	Q5BB54_EMENI	AN2226	S76, S1730, S2106, T2109, S2361, S2362, S2363	S76, S1730, S2106, T2109, S2167	S76(RSK), S1730(p38MAPK), S2106(Cdk5), T2109(GSK3), S2167(Cdk5), S2361(PKA), S2362(PKA), S2363(PKC)
Uncharacterized protein	Q5BAJ3_EMENI	AN2437	S211		S211(CKII)
RNA-dependent RNA polymerase	Q5B9R3_EMENI	AN2717		T162, T168	T162(PKB), T168(p38MAPK)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A_EMENI	AN2743	S931, S976, T1000, T1002, S1006, S1007	S931, T1002, S1006, S1007	S931(PKA), S976(PKA), T1000(DNAPK), T1002(Cdk5), S1006(Cdc2), S1007(Cdk5)
Eukaryotic translation initiation factor 2A	Q5B9K5_EMENI	AN2775	S479, T480, T611	S479, T480, S578, T611	S479(PKA), T480(CaMK-II), S578(GSK3), T611(p38MAPK)
tRNA (guanine(9)-N1)-methyltransferase	TRM10_EMENI	AN3010	S15		S15(PKC)

RRM domain-containing protein	A0A1U8QKK0_EMENI	AN3072	S112	S112, S674	S112(RSK), S674(Cdk5)
Nucleolar protein 58	NOP58_EMENI	AN3167	S314, S426, T453	T453, S501	S314(Cdk5), S426(Cdc2), T453(p38MAPK), S501(PKC)
rRNA adenine N(6)-methyltransferase	Q5B817_EMENI	AN3313		S13, S15	S13(PKG), S15(p38MAPK)
U3 small nucleolar RNA-associated protein 22	Q5B7M5_EMENI	AN3455	S12, S14	S12	S12(PKA), S14(GSK3)
Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector	CCR4_EMENI	AN3602	S112	S111, S112	S111(PKA), S112(GSK3)
RNP domain protein	C8V7B0_EMENI	AN3739	S56, S58, S61, S81, S88	S34, S56, S58, S61, S81, Y82, S88	S34(PKC), S56(PKA), S58(RSK), S61(GSK3), S81(PKA), S88(GSK3)
Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic and nuclear	PABP_EMENI	AN4000	S207	T368, S376	S207(PKC), T368(P38mapk), S376(CKII)
Signal recognition particle subunit SRP68	Q5B5Y7_EMENI	AN4043	S187		S187(Cdc2)
Uncharacterized protein	Q5B5U3_EMENI	AN4087	T204, T210		T204(GSK3), T210(CKI)
RL16_NEUCR 60S ribosomal protein L16Ribosomal protein L16a	G5EB54_EMENI	AN4202		S79, S195	S79(PKA), S195(ATM)
Ribosome biogenesis (Nop4), putative	Q5B550_EMENI	AN4330		S454	S454(p38MAPK)
mRNA splicing protein PRP8	Q5B4K7_EMENI	AN4523	S1377, T1382, Y1920, S1924		S1377(CKII), T1382(CKI), S1924(CKII)
KH domain RNA-binding protein	Q5B414_EMENI	AN4546		S263, S442	S263(PKC), S442(PKA)
Nuclear protein (Sgd1), putative	Q5B4E9_EMENI	AN4581	S562		S562(Cdc2)

Woronin body major protein	HEX1_EMENI	AN4695	S106, T115	S105, T115	S105(PKA), S106(p38MAPK), T115(PKA)
Uncharacterized protein	Q5B409_EMENI	AN4721	S186, Y191, S405, S471	S471	S186(PKG), S405(PKB), S471(Cdk5)
Pre-mRNA-splicing factor slu7	SLU7_EMENI	AN4788		S282	S282(CKII)
40S ribosomal protein S4	C8VAM4_EMENI	AN4794	S13, S246	S32	S13(PKC), S32(p38MAPK), S246(PKA)
G-patch domain protein, putative	C8VA69_EMENI	AN4850	S39, S41, T48	S39, S41, S504, S506, T508	S39(PKG), S41(Cdk5), T48(Cdk5), S504(PKC), S506(PKC), T508(PKC)
Transcription elongation factor S-II	C8V9V9_EMENI	AN4861	S109		S109(p38MAPK)
Nucleolin protein Nsr1, putative	Q5B3L5_EMENI	AN4865	S434		S434(CKII)
mRNA 3'-end-processing protein rna14	RNA14_EMENI	AN4892	S219, T221, T223, S228, T231, S643, T645, S865, S878, T880, S882, S905	S219, T221, S228, S643, T645, S865, T880, S882, S905	S219(PKA), T221(Cdc2), T223(Cdk5), S228(Cdk5), T231(PKC), S643(CKII), T645(PKC), S865(Cdc2), S878(CKI), T880(Cdc2), S882(Cdk5), S905(PKA)
Clustered mitochondria protein homolog (Clu)	CLU_EMENI	AN4908		T512, Y517, Y522	T512(PKC)
Exosome complex exonuclease Rrp6, putative	Q5B379_EMENI	AN5001	T624, S625, T627		T624(PKG), S625(Cdk5), T627(GSK3)
Zinc knuckle domain protein (Byr3), putative	C8VEX3_EMENI	AN5111	S39, S93, S97		S39(GSK3), S93(DNAPK), S97(GSK3)
Heat shock 70 kDa protein	HSP70_EMENI	AN5129	S349, S546	S349, T417	S349(RSK), T417(CaMK-II), S546(PKC)

mRNA splicing factor (Prp17), putative	C8VF70_EMENI	AN5196	Y9, S11, S12	Y9, S11, S12, T16	S11(CKII), S12(CKII), T16(Cdk5)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	EIF3J_EMENI	AN5745	S93	S15	S15(Cdc2), S93(CKII)
Putative RNA binding protein Swok	Q5B0X8_EMENI	AN5802	T84, S121	T84, T101, S121	T84(Cdk5), S121(p38MAPK)
40S ribosomal protein S15	Q5B0D3_EMENI	AN5997		S170, S171	S170(PKC), S171(GSK3)
Actin cytoskeleton protein (VIP1), putative	Q5B0C6_EMENI	AN6004	S238, S240	S238, S240, S245	S238(Cdc2), S240(Cdk5), S245(Cdc2)
Elongation factor 2	Q5AZF0_EMENI	AN6330	S487	S23, S38, S487	S23(PKC), S38(Cdc2), S487(p38MAPK)
Elongation factor 1-gamma, putative	Q5AYR7_EMENI	AN6563	T91		T91(CaMK-II)
Transformer-SR ribonucleoprotein, putative	Q5AYF4_EMENI	AN6676	T150, T152, S233	T150, T152	T150(PKB), T152(PKB), S233(Cdc2)
Nonsense-mediated mRNA decay factor (Upf2), putative	Q5AYD5_EMENI	AN6695	S993, S995		S993(CKII), S995(CKII)
Elongation factor 3	C8V1N7_EMENI	AN6700	S283, S294, S321, S629	S294, S321	S283(PKA), S294(CKII), S321(CaMK-II), S629(CaMK-II)
60S ribosomal protein L7	C8VDC6_EMENI	AN7107		S58	S58(PKA)
Pre-rRNA-processing protein esf2	ESF2_EMENI	AN7305	T14, S15, S26, S90	T14, S15, Y24	T14(CKII), S15(CKII), S26(CKII), S90(CKII)
TFIIIC transcription initiation factor complex subunits Tfc3, putative	Q5AWI8_EMENI	AN7342	T503, S508, S518, S519, T527, S627, S629, T731, S733	T503, S519, T527, S627, S629	T503(p38MAPK), S508(CKII), S518(Cdc2), S519(PKB), T527(Cdk5), S627(DNAPK), S629(p38MAPK), T731(PKA), S733(PKB)
PufA RNA binding protein Jsn1, putative	Q5AW56_EMENI	AN7474	S67, T140, S143, S207, T239, S251,	S67, S69, S207, S251, S253, S331,	S67(Cdk5), S69(Cdc2), T140(PKC),

			S253, T401, S556, S557, S570, T572, S971	S333, T401, S557, T561, S570, T572, S971	S143(Cdc2), S207(PKA), T239(PKB), S251(P38mapk), S253(DNAPK), S331(PKA), S333(PKC), T401(PKB), T561(Cdk5), S556(PKC), S557(PKA), S570(Cdck5 ), T572(p38MAPK), S971(CKI)
Pre-rRNA processing protein Esf1, putative	Q5AW27_EMENI	AN7503	S452		S452(GSK3)
ATP-dependent RNA helicase dbp5	DBP5_EMENI	AN7659	S41		S41(CKII)
RRM domain- containing protein	A0A1U8QGP5_EMENI	AN7700	S280, S615	T216	S280(p38MAPK), S615(CaMK-II), T216(PKA)
RRM domain- containing protein	A0A1U8QPC0_EMENI	AN7706	Y74, S77	S75, S81	S75(Cdk5), S77(P38mapk), S81(PKG)
Uncharacterized protein	A0A1U8QPH3_EMENI	AN8276	S430, S440	S402, S423, S440, S460	S402(Cdk5), S423(Cdk5), S430(PKA), S440(Cdk5), S460(Cdk5)
SnoRNA binding protein, putative	C8V3R6_EMENI	AN8293	S865		S865(PKC)
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit CBF5	CBF5_EMENI	AN8851	T380, S398, S399	S399	T380(GSK3), S398(GSK3), S399(DNAPK)
Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase-like 4	PPIL4_EMENI	AN9095	S188		S188(p38MAPK)
RNA polymerase I specific transcription initiation factor Rrn7, putative	C8V5Q0_EMENI	AN10501	S442		S442(CKII)
YT521-B-like splicing factor, putative	C8V3R8_EMENI	AN10537	S507, T539, S540	S497, S501, S502, S507	S497(GSK3), S501(CKII), S502(CKII), S507(p38MAPK),

Igualmente, se realizó otro análisis de enriquecimiento funcional en G: Profiler y Gene Ontology para identificar las proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que probablemente se localicen en complejos ribonucleoproteicos y específicamente en gránulos de estrés. Se obtuvieron 40 proteínas de unión a RNA con estos cambios, que se localizan probablemente en complejos ribonucleoproteicos. Además, se identificaron en esta lista al menos 5 proteínas (FabM/AN4000, AN7700, Ssd1/AN1158, AN4850 Y Dbp5/AN7659) que pueden formar parte específicamente de los gránulos de estrés (Tabla 2).

**Tabla 2. Proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podrían localizarse en complejos ribonucleoproteicos.** Las primeras 5 proteínas podrían localizarse en gránulos de estrés, de acuerdo a un análisis de enriquecimiento funcional en G: Profiler y Gene Ontology. En azul se marcan los fosfositos en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en rojo los fosfositos en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en negro los que se encuentran en ambas condiciones. Los fosfositos se obtuvieron mediante el análisis del fosfoproteoma de *A. nidulans* (Carrasco & Aguirre, 2021), utilizando SnapGeneViewer® (de Insightful Science; disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)).

Nombre de la proteína	Números de acceso de la proteína (UNIPROT)	Números de acceso alternativos	Fosfositos sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fosfositos con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Posibles cinasas de acuerdo a NetPhos
Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic and nuclear	PABP_EMENI	AN4000	S207	T368, S376	S207(PKC), T368(P38mapk), S376(CKII)
ATP-dependent RNA helicase dbp5	DBP5_EMENI	AN7659	S41		S41(CKII)
RRM domain-containing protein	A0A1U8QGP5_EMENI	AN7700	S280, S615	T216	S280(p38MAPK), S615(CaMK-II), T216(PKA)
Cell wall biogenesis RNA binding protein Ssd1, putative	Q5BE72_EMENI	AN1158	S183, S538, S1213, S1288, T1302, S1304	S183, S524, S526, S536, S538, S1213,	S183(PKA), S524(Cdc2), S526(CKI), S536(CKII),

				S1288, T1302, S1304	S538(GSK3), S1213(PKG), S1288(Cdk5), T1302(GSK3), S1304(RSK)
G-patch domain protein, putative	C8VA69_EMENI	AN4850	S39, S41, T48	S39, S41, S504, S506, T508	S39(PKG), S41(Cdk5), T48(Cdk5), S504(PKC), S506(PKC), T508(PKC)
PAB1 binding protein (Pbp1), putative	Q5BDQ5_EMENI	AN1325	T367, S369, S429, S633, S634, T640	S267, S429, S634	S267(CKII), T367(GSK3), S369(PKC), S429(GSK3), S633(CaMK-II), S634(Cdk5), T640(p38MAPK)
Clustered mitochondria protein homolog (Clu)	CLU_EMENI	AN4908		T512, Y517, Y522	T512(PKC)
Ribonuclease P protein subunit	Q5BGZ1_EMENI	AN0189	S17, T20, T21	S17	S17(PKA), T20(CKI), T21(CKII)
60S ribosomal protein L12	C8VUJ2_EMENI	AN0262	S38, S103	S38	S38(Cdk5), S103(CaMK-II)
Pre-mRNA-splicing factor cwc22	CWC22_EMENI	AN0289	T15, S21, Y22, S23, S46, S693, T695, S697, S698, S715, S717	T15, S21, S23, S715, S861, T864	T15(Cdk5), S21(GSK3), S23(Cdk5), S46(PKA), S693(PKC), T695(Cdc2), S697(Cdc2), S698(PKC), S715(PKA), S717(PKB), S861(PKB), T864(Cdk5)
Multiple RNA-binding domain-containing protein 1	MRD1_EMENI	AN0421		S819	S819(CaMK-II)
Ribosomal_S7 domain-containing protein	C8VQ27_EMENI	AN0843	S56	S56, S141	S56(Cdk5), S141(PKA)



Ribosomal_L18_c domain-containing protein NRRL	Q5BEL7_EMENI	AN1013	S180, S182		S180(GSK3), S182(Cdc2)
Pre-mRNA splicing factor (Prp31), putative	Q5BDX0_EMENI	AN1260	T393, S400, S401, T412, S414	T292, T412, S414	T292(PKG), T393(Cdk5), S400(PKC), S401(PKC), T412(GSK3), S414(PKC)
Uncharacterized protein	Q5BAJ3_EMENI	AN2437	S211		S211(CKII)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A_EMENI	AN2743	S931, S976, T1000, T1002, S1006, S1007	S931, T1002, S1006, S1007	S931(PKA), S976(PKA), T1000(DNAPK), T1002(Cdk5), S1006(Cdc2), S1007(Cdk5)
Eukaryotic translation initiation factor 2A	Q5B9K5_EMENI	AN2775	S479, T480, T611	S479, T480, S578, T611	S479(PKA), T480(CaMK-II), S578(GSK3), T611(p38MAPK)
Nucleolar protein 58	NOP58_EMENI	AN3167	S314, S426, T453	T453, S501	S314(Cdk5), S426(Cdc2), T453(p38MAPK), S501(PKC)
rRNA adenine N(6)-methyltransferase	Q5B817_EMENI	AN3313		S13, S15	S13(PKG), S15(p38MAPK)
U3 small nucleolar RNA-associated protein 22	Q5B7M5_EMENI	AN3455	S12, S14	S12	S12(PKA), S14(GSK3)
RNP domain protein	C8V7B0_EMENI	AN3739	S56, S58, S61, S81, S88	S34, S56, S58, S61, S81, Y82, S88	S34(PKC), S56(PKA), S58(RSK), S61(GSK3), S81(PKA), S88(GSK3)
Signal recognition particle subunit SRP68	Q5B5Y7_EMENI	AN4043	S187		S187(Cdc2)
Uncharacterized protein	Q5B5U3_EMENI	AN4087	T204, T210		T204(GSK3), T210(CKI)
RL16_NEUCR 60S ribosomal protein L16Ribosomal protein L16a	G5EB54_EMENI	AN4202		S79, S195	S79(PKA), S195(ATM)

Ribosome biogenesis (Nop4), putative	Q5B550_EMENI	AN4330		S454	S454(p38MAPK)
mRNA splicing protein PRP8	Q5B4K7_EMENI	AN4523	S1377, T1382, Y1920, S1924		S1377(CKII), T1382(CKI), S1924(CKII)
Uncharacterized protein	Q5B409_EMENI	AN4721	S186, Y191, S405, S471	S471	S186(PKG), S405(PKB), S471(Cdk5)
Pre-mRNA-splicing factor slu7	SLU7_EMENI	AN4788		S282	S282(CKII)
40S ribosomal protein S4	C8VAM4_EMENI	AN4794	S13, S246	S32	S13(PKC), S32(p38MAPK), S246(PKA)
mRNA splicing factor (Prp17), putative	C8VF70_EMENI	AN5196	Y9, S11, S12	Y9, S11, S12, T16	S11(CKII), S12(CKII), T16(Cdk5)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	EIF3J_EMENI	AN5745	S93	S15	S15(Cdc2), S93(CKII)
40S ribosomal protein S15 (Broad)	Q5B0D3_EMENI	AN5997		S170, S171	S170(PKC), S171(GSK3)
Elongation factor 2 (Eurofung)	Q5AZF0_EMENI	AN6330	S487	S23, S38, S487	S23(PKC), S38(Cdc2), S487(p38MAPK)
Transformer-SR ribonucleoprotein, putative	Q5AYF4_EMENI	AN6676	T150, T152, S233	T150, T152	T150(PKB), T152(PKB), S233(Cdc2)
Nonsense-mediated mRNA decay factor (Upf2), putative	Q5AYD5_EMENI	AN6695	S993, S995		S993(CKII), S995(CKII)
60S ribosomal protein L7	C8VDC6_EMENI	AN7107		S58	S58(PKA)
Uncharacterized protein	A0A1U8QPH3_EMENI	AN8276	S430, S440	S402, S423, S440, S460	S402(Cdk5), S423(Cdk5), S430(PKA), S440(Cdk5), S460(Cdk5)
SnoRNA binding protein, putative	C8V3R6_EMENI	AN8293	S865		S865(PKC)
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit CBF5	CBF5_EMENI	AN8851	T380, S398, S399	S399	T380(GSK3), S398(GSK3), S399(DNAPK)

### **La proteína FabM posee 3 fosfositos que cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

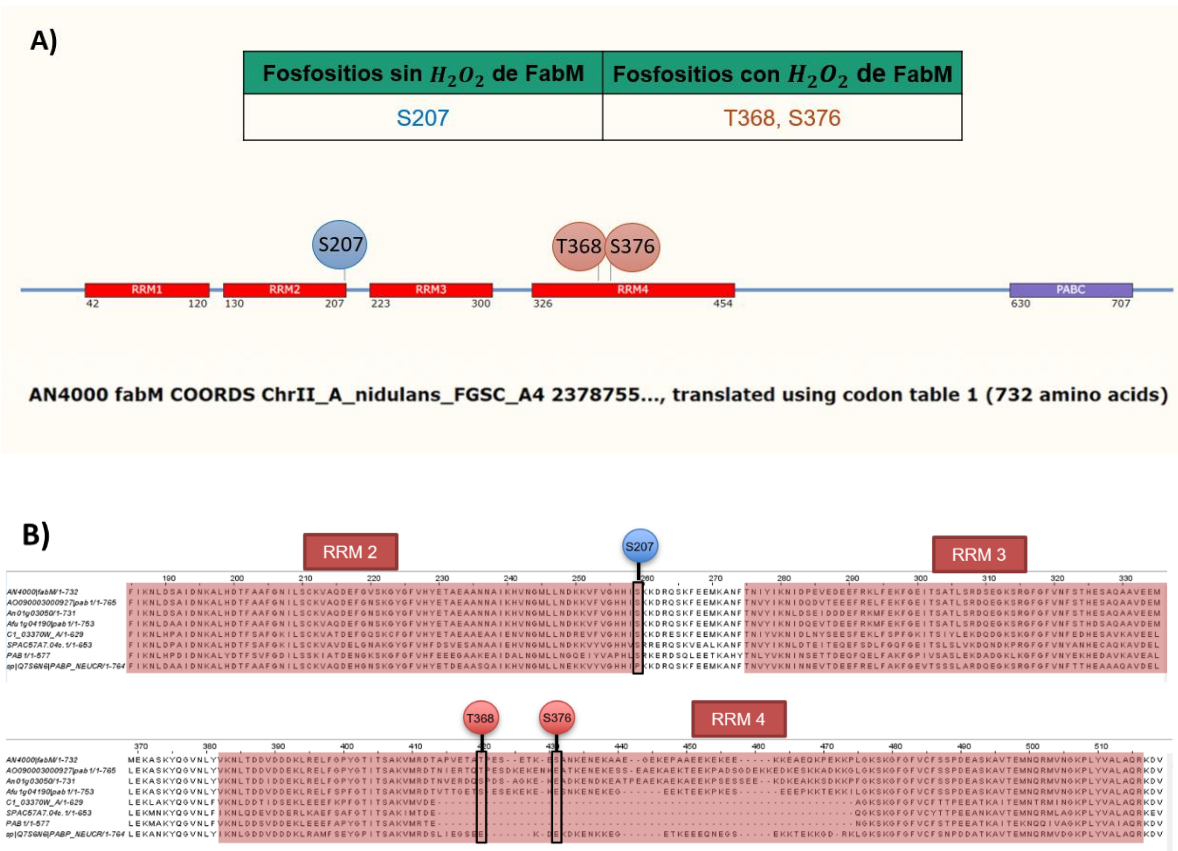
De la base de datos creada se eligieron las proteínas AN4000/FabM, AN7700, AN7474/PufA, AN1325/PbpA y AN4908/Clu, que mostraron un mayor número de cambios en sus patrones de fosforilación en respuesta al peróxido de hidrógeno y porque algunas de ellas podrían ser fosforiladas por p38MAPK, cuyos ortólogos en *A. nidulans* SakA y MpkC se activan por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kawasaki et al., 2002; Garrido-Bazán, 2018; Lara-Rojas, 2011). Para hacer un análisis con mayor profundidad de cada proteína, se realizaron esquemas de los dominios y fosfositos, alineamientos para determinar la conservación de regiones de interés y de los residuos fosforilados. Además, se realizaron análisis de la estructura de la proteína en AlphaFold para localizar los fosfositos en posibles regiones desordenadas.

Las regiones intrínsecamente desordenadas son secuencias de aminoácidos de baja complejidad y sin una estructura 3D bien definida (Wiedner & Giudice, 2021), que se han asociado con la potencialización de la respuesta antioxidante (Gehi et al., 2022; Eleutherio et al., 2021). Las regiones intrínsecamente desordenadas de unión son segmentos desordenados cortos que experimentan una transición a una estructura ordenada por la unión específica a un ligando afín, como las proteínas (Fuxreiter et al., 2007). AlphaFold predice las coordenadas 3D de los átomos de una proteína dada utilizando datos de la secuencia primaria de aminoácidos, así como de alineamientos múltiples de las secuencias homólogas. AlphaFold puede identificar regiones desordenadas mediante la métrica de confianza pLDDT, ya que regiones con una pLDDT menor a 50 son interpretadas como posibles regiones desordenadas (Jumper et al., 2021). Sin embargo, como AlphaFold no es un software que prediga específicamente de regiones desordenadas y sólo se les puede interpretar como desordenadas en aislamiento, se utilizaron los softwares IUPred3 y ANCHOR2 para predecir regiones intrínsecamente desordenadas de acuerdo al contexto celular, en específico, con la presencia de posibles interacciones con proteínas (Mészáros et al., 2009; Jumper et al., 2021).

IUPred3 es un software de predicción de regiones desordenadas que se basa en un método de estimación de energía que genera un potencial estadístico entre pares a

partir de una biblioteca de estructuras conocidas. De esta forma, se puede asignar una cantidad de energía a cada residuo en función de las interacciones que hace con otros residuos en la misma estructura. Estas energías se estiman a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando una matriz de estimación de energía. El supuesto básico de este enfoque es que los residuos con energías favorables están ordenados mientras que los residuos con energías desfavorables están desordenados. Finalmente, las energías se convierten en una puntuación entre 0 y 1, indicando la probabilidad de la región de ser intrínsecamente desordenada (Erdős et al., 2021). En el caso de ANCHOR2, que identifica regiones intrínsecamente desordenadas de unión, también se basa en el modelo de estimación de energía entre pares como IUPred3. Sin embargo, a diferencia de IUPred3, identifica segmentos dentro de regiones desordenadas que no pueden formar interacciones intracatenarias lo suficientemente favorables para formar una estructura ordenada por sí mismos, pero que pueden ganar energía estabilizadora al interactuar con una proteína globular, posiblemente permitiendo un cambio de estructura (Mészáros, 2009).

En el caso de FabM, una proteína de unión a la cola de poliA del RNA que forma parte del desarrollo asexual de *A. nidulans* (Soukup et al., 2017; Marhoul & Adams, 1996), se detectaron 4 dominios de reconocimiento de RNA (RRM) y un dominio de unión a péptidos denominado PABC (Kozlov et al., 2002) (Figura 4). De igual forma, se encontraron 3 fosfositios, de los cuales S207 se encuentra fosforilado en ausencia de estrés y desfosforilado en su presencia. Este fosfositio se ubica en el dominio altamente conservado RRM2 y podría ser fosforilado por la proteína cinasa C (PKC), cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkcA (Ronen et al., 2007). En cambio, los fosfositios T368 y S376, que sólo se detectaron en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se encuentran en el dominio RRM4, que está poco conservado en diferentes hongos (Figura 4). NetPhos predice que la treonina 368 y la serina 376 podrían ser sustrato de la MAP cinasa p38 y la caseína cinasa II (CKII), respectivamente, cuyos ortólogos en *A. nidulans* son Saka/MpkC y Cka1 (De Souza et al., 2013; Rethinaswamy et al., 1998) (Tabla 3).

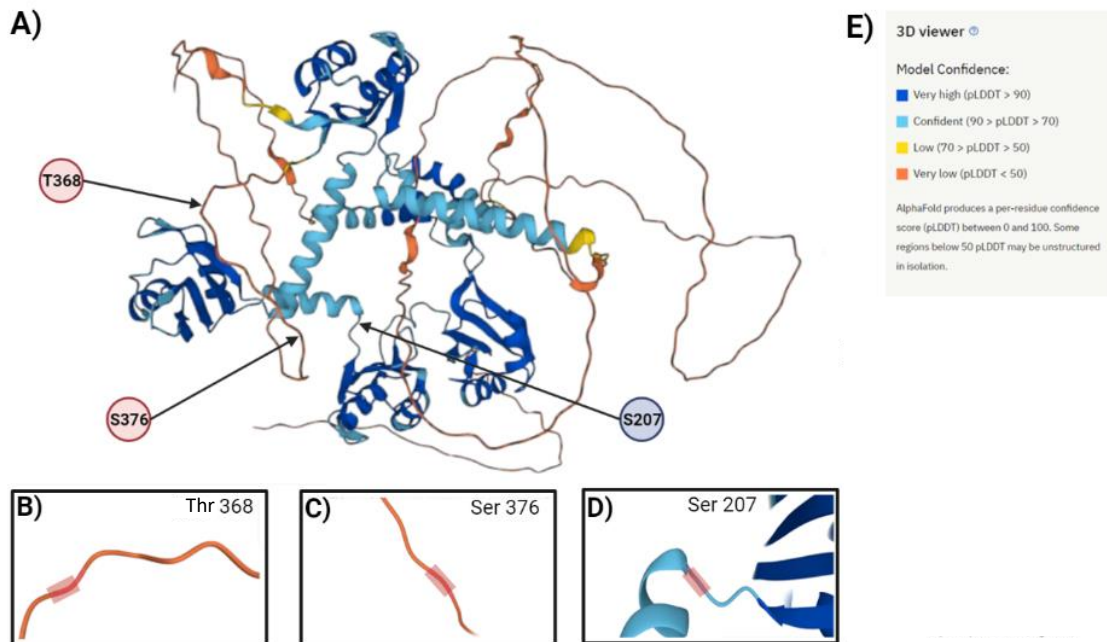


**Figura 4. Fosfositos detectados en la proteína FabM y su conservación en diferentes hongos. A)** Fosfositos de FabM detectados en ausencia (azul) o en presencia (rojo) de  $H_2O_2$  y su localización en los dominios identificados (RRM1, RRM2, RRM2, RRM4 y PABC) mediante SnapGene. **B)** Comparación de la secuencia de FabM con proteínas homólogas *A. nidulans* (AN4000), *A. oryzae* (AO090003000927), *A. niger* (An01g03050), *A. fumigatus* (Afu1g04190), *C. albicans* (C1\_03370W\_A), *S. pombe* (SPAC57A7.04c.1), *S. cerevisiae* (PAB1), *N. crassa* (sp|Q7S6N6|PABP\_NEUCR). El alineamiento se realizó utilizando T-Coffee (<https://tcoffee.org.eu>) y JalView.

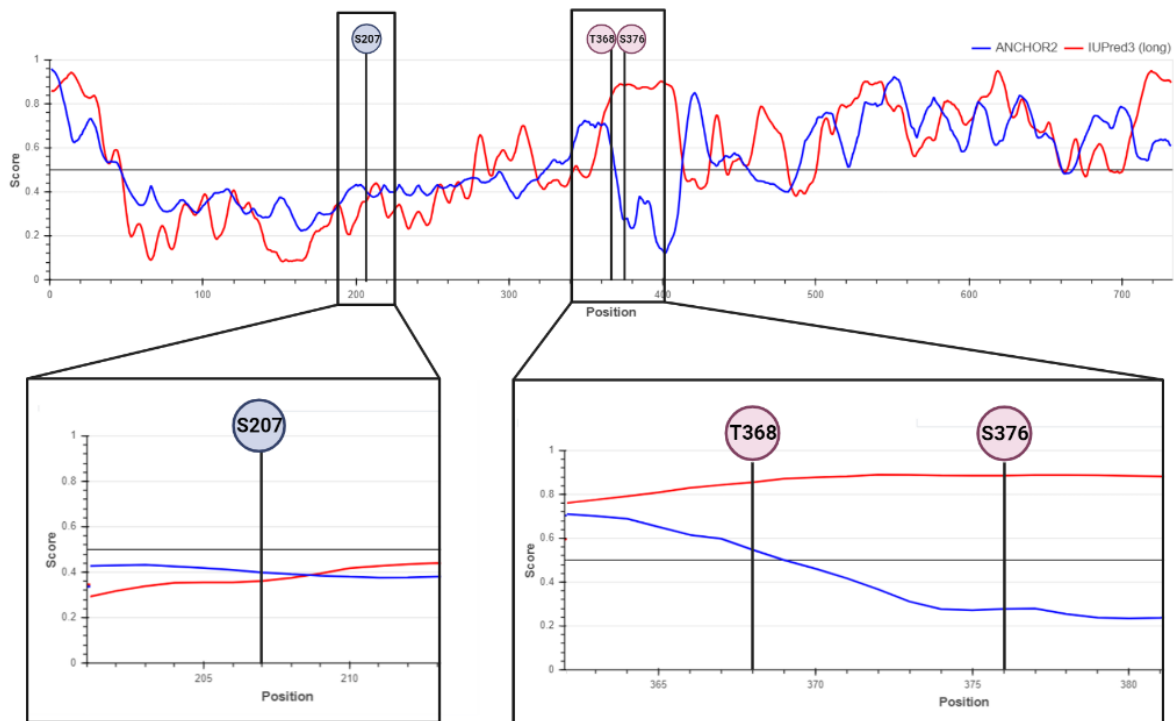
**Tabla 3. Posibles cinasas responsables de la fosforilación de FabM de acuerdo al programa NetPhos.** En rojo se encuentran los sitios que se fosforilan en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en azul, el que se desfosforila en su presencia. NetPhos predice que T368 podría ser fosforilada por la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK). SakA y MpkC son las cinasas ortólogas de p38MAPK en *A. nidulans* que se activan en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kawasaki et al., 2002; Garrido-Bazán, 2018; Lara-Rojas, 2011).

Posible cinasa responsable de la fosforilación de FabM (NetPhos)	Fosfositos de FabM
Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK)	T368
Caseína cinasa II (CKII)	S376
Proteína cinasa C (PKC)	S207

En el análisis de la localización de los fosfositos en la estructura 3D de FabM predicha por AlphaFold, encontramos que el sitio S207 específico del tratamiento sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ubica contiguo a una región alfa hélice indicada en color azul claro en la figura 5, que según la métrica pLDDT es una región modelada correctamente. El análisis por IUPred3 (líneas rojas) indica que este sitio se encuentra en una posible región estructurada (Figura 6). Los dos fosfositos específicos del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probablemente se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de acuerdo a AlphaFold, que en la figura 5 son las regiones naranjas y de acuerdo a la métrica pLDDT, se pueden interpretar como regiones desordenadas en aislamiento. En el caso de IUPred3, estas regiones tienen una probabilidad mayor al 80% de ser regiones desordenadas y sólo uno de ellos (T368) tiene una probabilidad mayor al 50% de también ser una región de unión de acuerdo a ANCHOR2 (Figura 6). Este fosfosito (T368) podría ser sustrato de SakA, como se observa en la tabla 3.



**Figura 5. Localización de los fosfositos de FabM que cambian en posibles regiones no estructuradas según la estructura 3D predicha por AlphaFold. A)** Localización de los fosfositos de FabM detectados en ausencia (azul) o en presencia de  $H_2O_2$  (rojo), en la posible estructura 3D de FabM. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en **B), C) y D).** **E)** Métrica de confianza por residuo pLDDT que indica en colores la confianza del modelo. Las regiones con una pLDDT menor a 50 pueden ser interpretadas como regiones desordenadas en aislamiento.

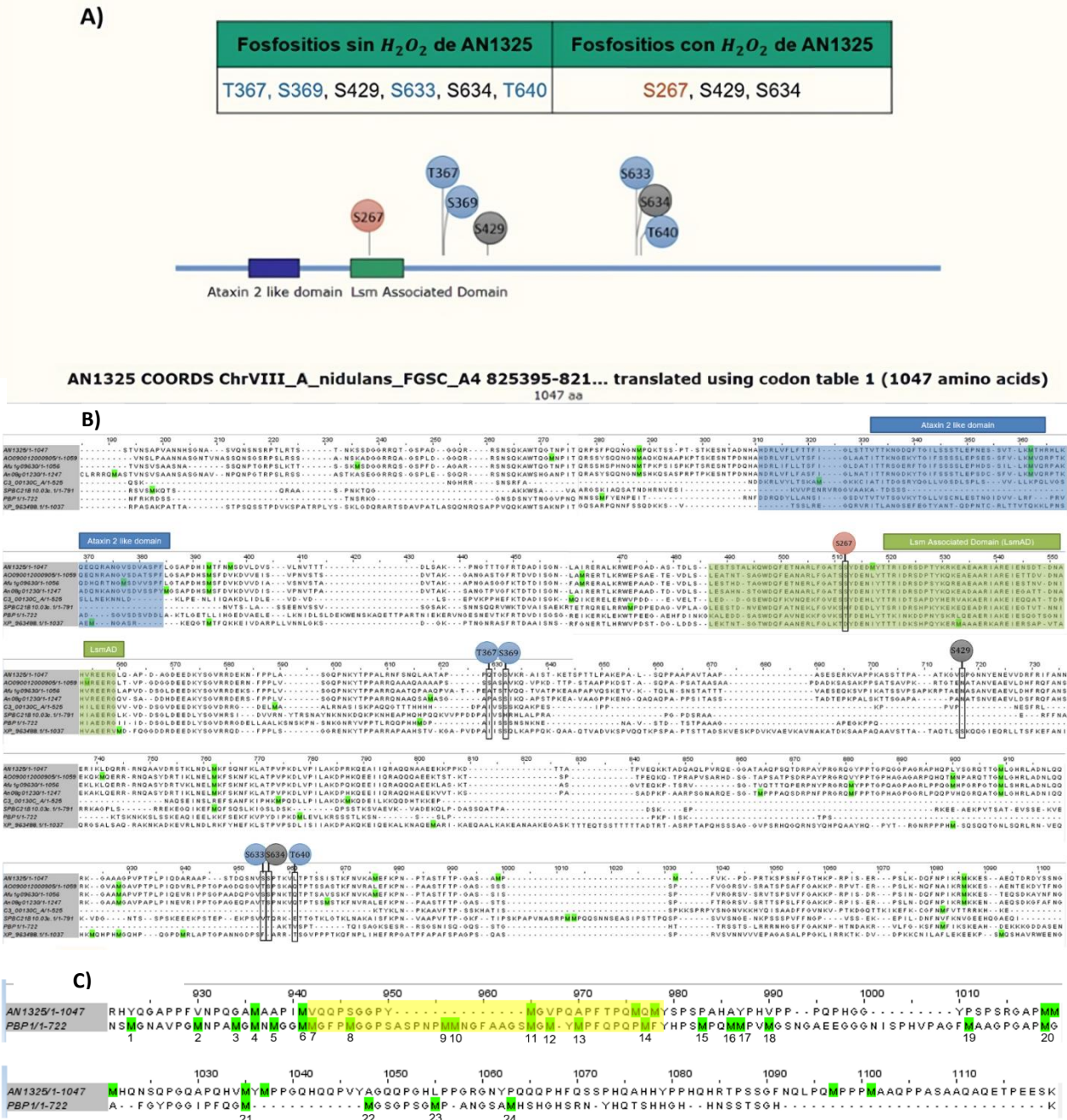


**Figura 6. Localización de los fosfositos de FabM en posibles regiones intrínsecamente desordenadas y en posibles regiones intrínsecamente desordenadas de unión. A)** Posibles regiones intrínsecamente desordenadas y de unión, en donde se localizan los fosfositos de FabM en ausencia (azul) o en presencia de  $H_2O_2$  (rojo). Las líneas rojas por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones intrínsecamente desordenadas obtenidas por medio del software IUPred3. Las líneas azules por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones desordenadas de unión, de acuerdo al software ANCHOR2. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en el análisis en **B) y C).**



## **La proteína AN1325/PbpA posee 7 fosfositos, de los que 5 cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

En la proteína AN1325/PbpA, que se requiere para el desarrollo sexual y el metabolismo secundario en *A. nidulans* (Soukup et al., 2017), se detectaron 7 fosfositos totales de los que T367, S369, S633 y T640 se encuentran fosforilados en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y desfosforilados en su presencia (Figura 7). En la tabla 4 se observa que las cinasas que posiblemente fosforilan estos residuos que se desfosforilan en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la proteína cinasa C (PKC), la calcio calmodulina cinasa II (CaMK-II) y la MAP cinasa p38, cuyos ortólogos en *A. nidulans* son GSKA, PkcA, CMKA, MCKB y CMKC, y las MAP cinasas SakA y MpkC respectivamente (De Souza et al., 2013; Ronen et al., 2007; Joseph & Means, 2000; Kornstein et al., 1992). En cambio, el sitio S267 se fosforila únicamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sería posiblemente fosforilado por la cisteína cinasa II (CKII), que en *A. nidulans* corresponde a Cka1 (De Souza et al., 2013; Rethinaswamy et al., 1998). Finalmente, los fosfositos S429 y S634 no presentan cambios en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno y son posiblemente fosforilados por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) y por la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), respectivamente (Figura 7, tabla 4). Solamente el fosfositio S267, específico de la presencia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se encontró en una región altamente conservada en diferentes hongos, mientras que S634, que se desfosforila por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se encuentra en una región conservada en diferentes especies de *Aspergillus*, pero no en otros hongos. En el esquema se marcan dos dominios de AN1325: el Ataxin 2-like domain y el LsmAD, un dominio de unión al RNA (Corley et al., 2020) (Figura 7).



**Figura 7. Fosfositos de AN1325/PbpA que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), su conservación en diferentes hongos y conservación de la región de baja complejidad de Pbp1 en *A. nidulans*. A) Fosfositos de AN1325/PbpA en ausencia (en azul), en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) y en ambas condiciones (negro), además de su localización en la secuencia con los dominios marcados (Ataxin 2 like domain y LsmA Associated Domain) esquematizada mediante SnapGene. B) Comparación de secuencias homólogas de PbpA/AN1325 entre *A. nidulans* (AN1325), *A. oryzae* (AO090012000905), *A.***

*fumigatus* (Afu1g09630), *A. niger* (An08g01230), *C. albicans* (C3\_00130C\_A), *S. pombe* (SPBC21B10.03c.1), *S. cerevisiae* (Pbp1), y *N. crassa* (XP\_963488.1). En verde se indican todas las metioninas presentes en las distintas proteínas. **C)** Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región de baja complejidad C-terminal rica en metioninas de Pbp1 de *S. cerevisiae* (Pbp1/1-722) con la secuencia de PbpA/AN1325 de *A. nidulans* (AN1325/1-1047). En *S. cerevisiae*, la oxidación reversible de las metioninas en esta región genera una separación de fases, lo que permite sensar el estado redox celular (Yang et al., 2019; Kato et al., 2019). Las metioninas se encuentran resaltadas en verde, mientras que las metioninas de la secuencia de *S. cerevisiae* también se encuentran numeradas. En amarillo se resalta la región en donde se ubican las metioninas críticas para la separación de fases en *S. cerevisiae* (Yang et al., 2019). Los alineamientos fueron realizados utilizando T-Coffee (<https://tcoffee.org.eu>) y visualizados en JalView.

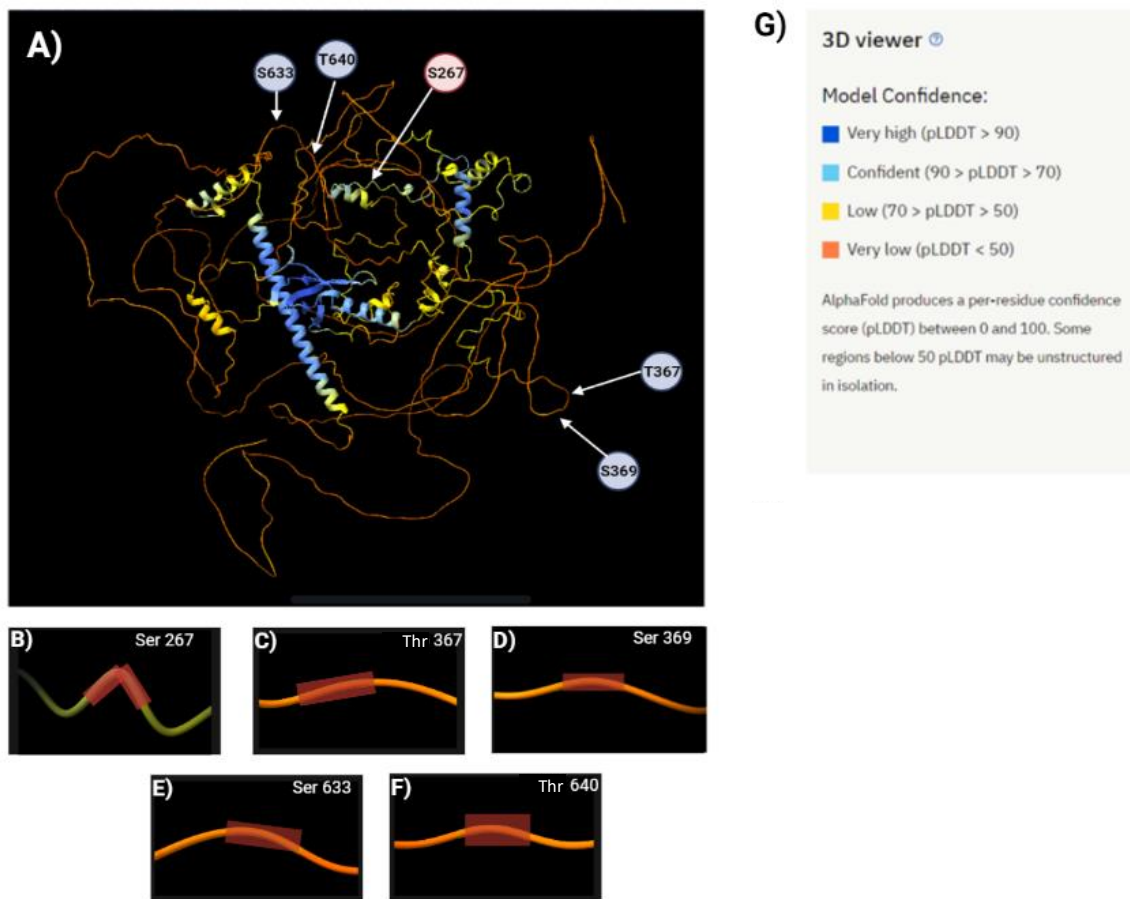
En la figura 7C se muestra el alineamiento de la secuencia de la región de baja complejidad rica en metioninas de Pbp1 de *S. cerevisiae*, con la secuencia de PbpA/AN1325 de *A. nidulans*. Pbp1 posee una región de baja complejidad ubicada en el carboxilo terminal, cuyos 24 residuos de metionina podrían representar sensores redox que facilitan la conexión molecular entre la mitocondria y TORC1, al promover una separación de fases reversible (Kato et al., 2019). En *A. nidulans*, la región equivalente a la de *S. cerevisiae* posee 12 metioninas, de las que 5 se encuentran conservadas en ambos organismos: M4, M6, M11, M20, M21, de acuerdo a la numeración de metioninas en *S. cerevisiae*. Entre ellas, la M11 es una de las metioninas críticas para la separación de fases, ya que se ha observado que la mutación de los residuos M7-M14 afecta de manera severa la autofagia en *S. cerevisiae* (Yang et al., 2019). Además de la M11, que se encuentra conservada en ambos organismos, *A. nidulans* posee otras 2 metioninas que se ubican dentro de esta región de metioninas críticas, a pesar de que no se encuentran conservadas. De igual forma, todas las metioninas de *A. nidulans* en esta región equivalente se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión, de acuerdo a IUPred3 y ANCHOR2 (Figura 9).

**Tabla 4. Posibles cinasas responsables de la fosforilación de AN1325 de acuerdo al programa NetPhos.** En azul se encuentran los sitios que se desfosforilan en presencia de  $H_2O_2$ , en rojo el que se fosforila y en negro los que se encuentran de manera independiente de la presencia o ausencia de  $H_2O_2$ .

Posible cinasa responsable de la fosforilación de PbpA/AN1325 (NetPhos)	Fosfositos de PbpA/AN1325
Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK)	T640
Cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5)	S634
Caseína cinasa II (CKII)	S267
Glucógeno sintasa 3 (GSK3)	T367, S429
Calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII)	S633
Proteína cinasa C (PKC)	S369

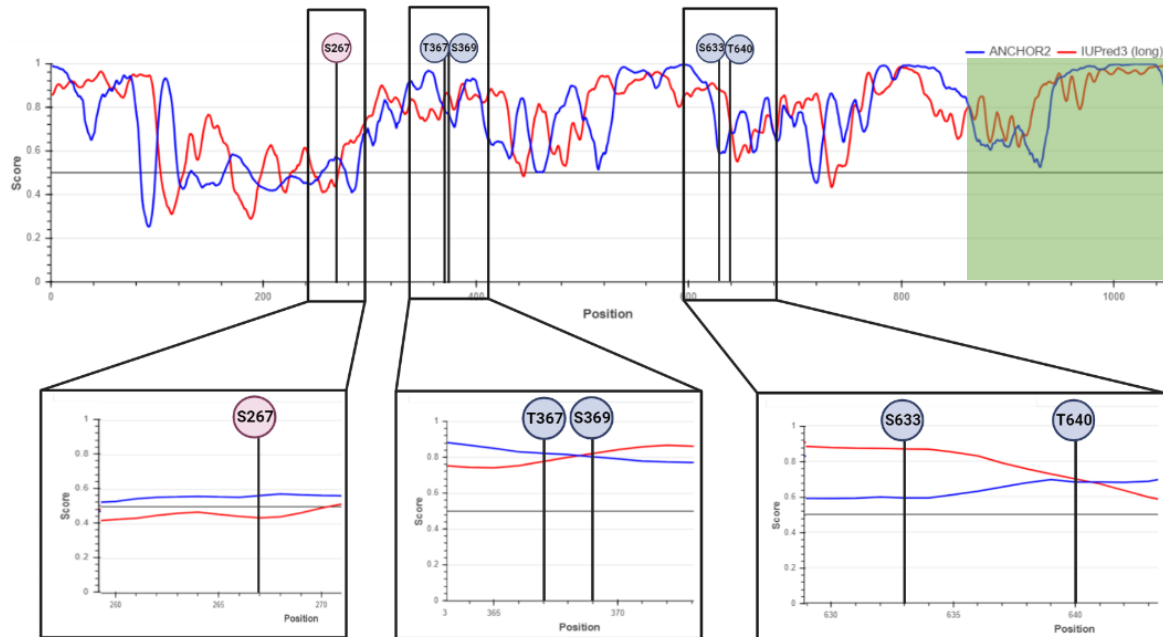
En el análisis de la localización de los fosfositos en la estructura 3D de PbpA/AN1325 predicha por AlphaFold y de acuerdo al software IUPred3, todos los fosfositos detectados en ausencia de  $H_2O_2$  se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión (Figuras 8 y 9). En la estructura de AlphaFold, se observa que estos fosfositos se encuentran en regiones de color naranja, que se interpretan según la métrica de confianza pLDDT como posibles regiones desordenadas (Figura 8). En el caso de IUPred3 (líneas rojas), estos fosfositos se localizan en regiones con una probabilidad mayor al 60% de ser intrínsecamente desordenadas y con una probabilidad mayor al 50% de también ser

regiones de unión según ANCHOR2 (líneas azules) (Figura 9). Por otro lado, no es clara la estructura de la región en donde se encuentra el sitio S267, que se fosforila por presencia de  $H_2O_2$ . El programa IUPred3 la reconoce como una región posiblemente estructurada, mientras que AlphaFold la modela como una región no estructurada, pero con una baja métrica de confianza pLDDT y el software ANCHOR2 la reconoce como una posible región intrínsecamente desordenada de unión (Figuras 8 y 9).



**Figura 8. Los fosfositios de AN1325/PbpA que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se encuentran en posibles regiones desordenadas, de acuerdo a la estructura predicha por ColabFold y visualizada con ChimeraX. A)** Localización de los fosfositios de AN1325/PbpA en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) en la estructura 3D predicha de AN1325/PbpA. Imagen agrandada de la localización de los fosfositios en **B), C), D), E)** y **F)**. **G)** Métrica de confianza por residuo pLDDT que indica en

colores la confianza del modelo. Las regiones con una pLDDT menor a 50 pueden ser interpretadas como regiones desordenadas en aislamiento.



**Figura 9. Localización de los fosfositios de PbpA/AN1325 en posibles regiones intrínsecamente desordenadas y regiones intrínsecamente desordenadas de unión.**

**A)** Regiones intrínsecamente desordenadas y de unión predichas, además de la localización de los fosfositios de PbpA/AN1325 en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo). Las líneas rojas por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones intrínsecamente desordenadas obtenidas por medio del software IUPred3. Las líneas azules por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones desordenadas de unión, de acuerdo al software ANCHOR2. Imagen agrandada de la localización de los fosfositios en el análisis en **B), C) y D)**. En verde se señala la región en donde se encuentran las 12 metioninas de PbpA/AN1325 que se ubican en la zona equivalente al dominio de baja complejidad de Pbp1, cuya función sugiere ser un sensor redox celular por la oxidación reversible de metioninas en *S. cerevisiae* (Kato et al., 2019).

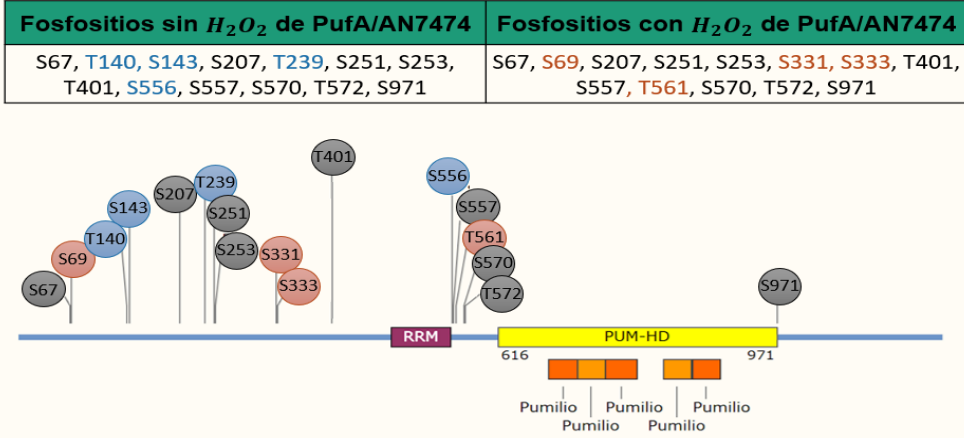
## **La proteína AN7474/PufA posee 17 fosfositos, de los que 8 cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

En la proteína AN7474/PufA, que recientemente fue caracterizada en *A. nidulans* involucrada en el desarrollo asexual (Son et al., 2021), se detectaron 17 fosfositos, de los que T140, T143, T239 y S556 se encuentran fosforilados únicamente en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 10). Estos fosfositos podrían ser fosforilados por la proteína cinasa C (PKC), la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2) y la proteína cinasa B (PKB) (Tabla 5), cuyos ortólogos en *A. nidulans* son PkcA, NimX y PKB, respectivamente (Ronen et al., 2007; Osmani et al., 1994; De souza et al., 2013). En cambio, los fosfositos S69, S331, S333 y T561 se fosforilan únicamente en presencia de estrés oxidante y las posibles cinasas que los fosforilan son la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2), la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa B (PKB) y la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (Tabla 5), cuyos ortólogos en *A. nidulans* son NimX, PkaA, PKB y Cdk5, respectivamente (Osmani et al., 1994; De souza et al., 2013). Finalmente, los otros 9 fosfositos se mantienen en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y son posiblemente fosforilados por la MAP cinasa p38, la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), la caseína cinasa I (CK1), la proteína cinasa dependiente de DNA (DNAPK), y las proteínas cinasas A y B (PKA y PKB) (Figura 10, tabla 5), cuyos ortólogos en *A. nidulans* son SakA y MpkC, Cdk5, Ku70 y Ku86, PKaA y PKB, respectivamente (De souza et al., 2013; Goldman & Kafer, 2004). En AN7474/PufA se detectaron los dominios de reconocimiento del RNA PUM-HD y 5 dominios Pumilio (Figura 10).

Se encontró que de los 17 fosfositos, S67, S69, T140, T143, S207, S251, S253, T401, T561, S570 y T572 se ubican en regiones altamente conservadas en diferentes especies de *Aspergillus*. En cambio, los fosfositos T239, S331, S333, T561 y S971 se encuentran en regiones medianamente conservadas en diferentes hongos, a excepción de *Candida albicans* (C5\_02500C\_A) (Figura 10).

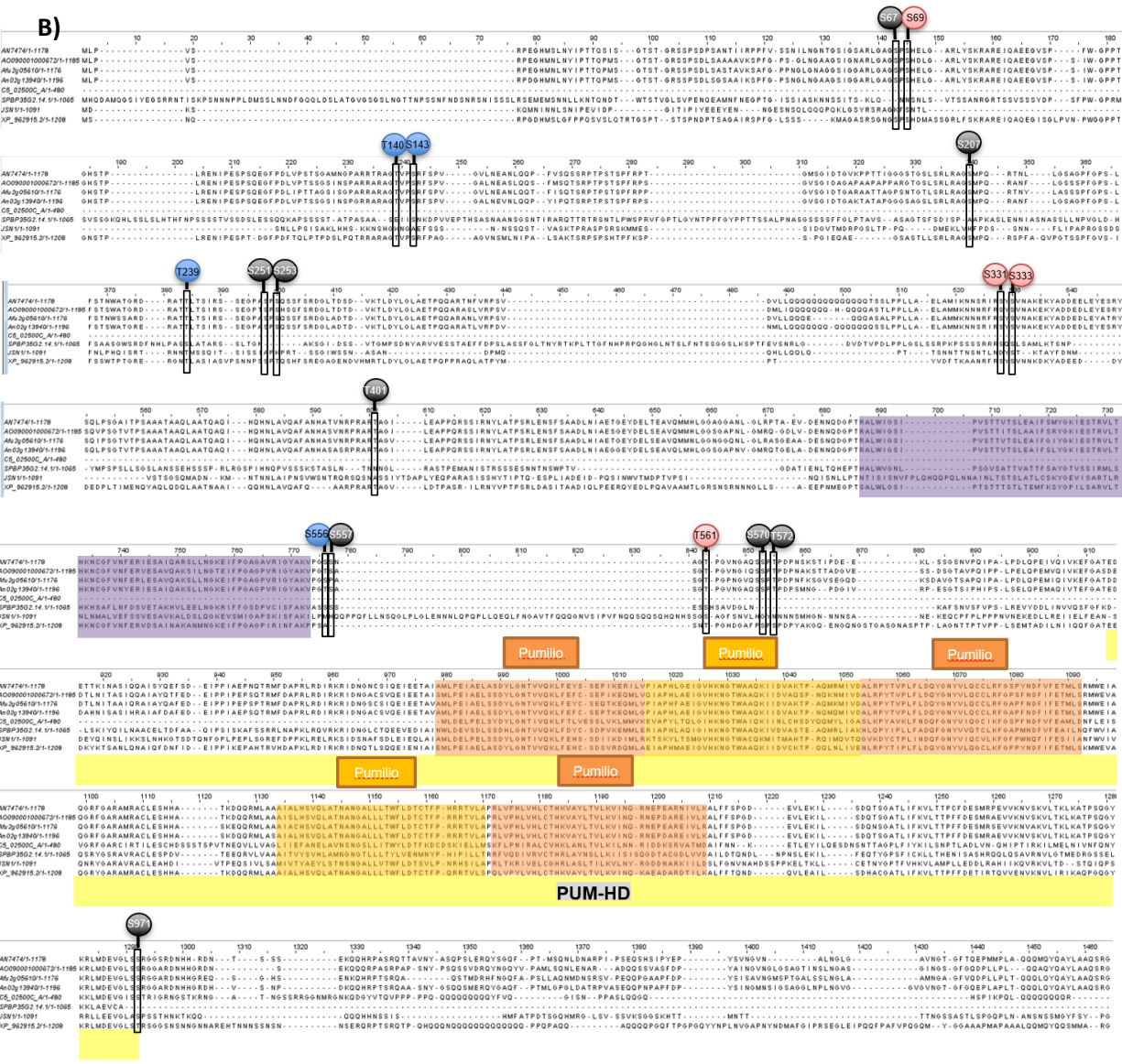


A)



AN7474 COORDS ChrIV\_A\_nidulans\_FGSC\_A4 1652147-164... translated using codon table 1 (1178 amino acids) 1178 aa

B)





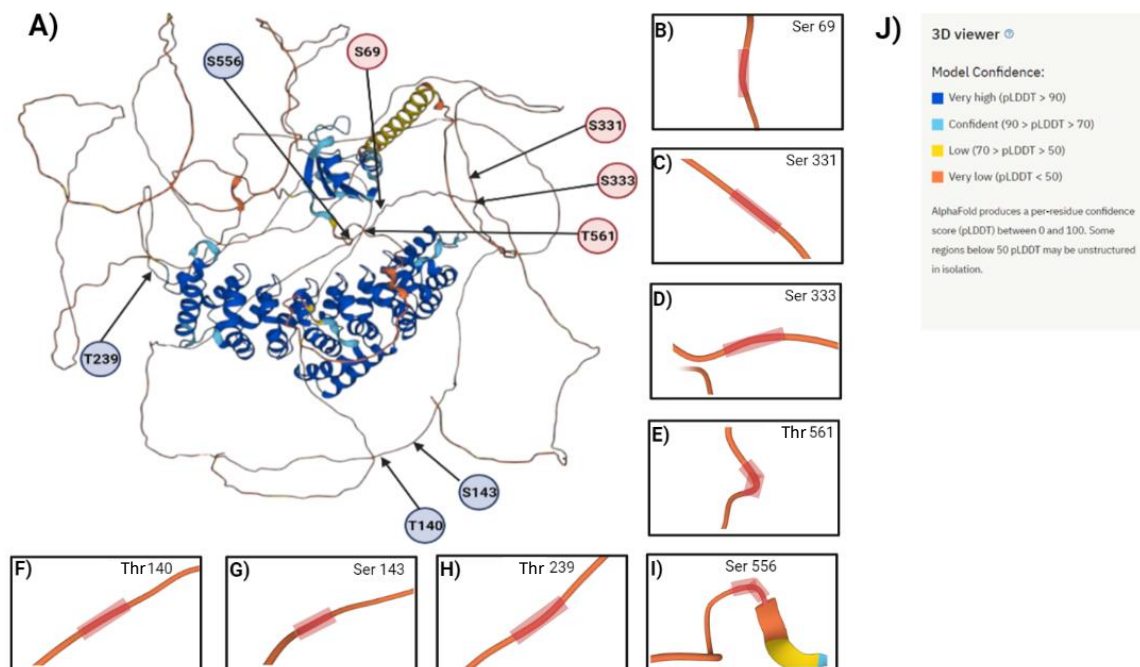
**Figura 10. Fosfositios de PufA/AN7474 y su conservación en diferentes hongos. A)**

Fosfositios de AN7474/PufA presentes en ausencia (azul), o en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo), y en ambas condiciones (negro), además de su localización en la secuencia con los dominios marcados (RRM, PUMHD y dominios Pumilio) esquematizada mediante SnapGene. **B)** Comparación de secuencias homólogas de AN7474/PufA entre *A. nidulans* (AN7474), *A. oryzae* (AO090001000672), *A. fumigatus* (Afu2g05610), *A. niger* (An02g13940), *C. albicans* (C5\_02500C\_A), *S. pombe* (SPBP32G2.14.1), *S. cerevisiae* (Jsn1), y *N. crassa* (XP\_962915.2)

**Tabla 5. Posibles cinasas responsables de la fosforilación de AN7474/PufA de acuerdo al programa NetPhos.** En rojo se encuentran los sitios que se fosforilan en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en azul los que se desfosforilan y en negro los que se encuentran independientemente de la presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

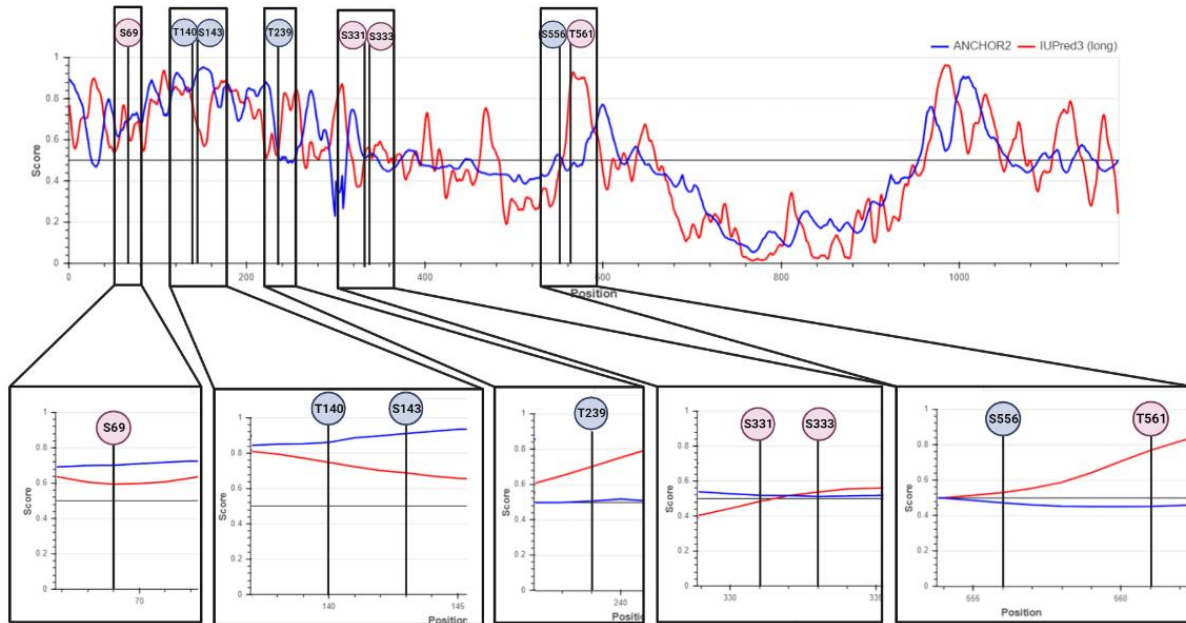
Posible cinasa responsable de la fosforilación de AN7474/PufA (NetPhos)	Fosfositios de AN7474/PufA
Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK)	S251, T572
Cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5)	S67, T561, S570
Caseína cinasa I (CKI)	S971
Proteína cinasa dependiente de DNA (DNAPK)	S253
Cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2)	S69, S143
Proteína cinasa A (PKA)	S207, S331, S557
Proteína cinasa B (PKB)	T239, T401
Proteína cinasa C (PKC)	T140, S333, S556

En el análisis de la localización de los fosfositios de acuerdo a AlphaFold y al análisis de IUPred3 de AN7474/PufA, encontramos que todos los fosfositios que cambian en respuesta al  $H_2O_2$  se encuentran en posibles regiones intrínsecamente desordenadas (Figuras 11 y 12). En la estructura predicha por AlphaFold se observa que todos los fosfositios con cambios en respuesta al  $H_2O_2$  se encuentran en regiones de color naranja, que de acuerdo a la métrica de confianza pLDDT, se pueden interpretar como regiones desordenadas en aislamiento (Figura 11). En el caso de IUPred3, todas las regiones en donde se encuentran los fosfositios tienen una probabilidad mayor del 50% de ser regiones intrínsecamente desordenadas. Finalmente, el fosfotio específico de  $H_2O_2$  S69 y los fosfositios específicos en su ausencia T140 y S143, se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión con una probabilidad mayor al 50% (Figura 12).



**Figura 11. Los fosfositios de AN7474/PufA que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se encuentran en posibles regiones no estructuradas, según la predicción de AlphaFold. A) Localización de los fosfositios de AN7474/PufA en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) en la estructura 3D de AN7474/PufA predicha. Imagen agrandada de la localización de los fosfositios en B), C), D), E), F), G), H) e I). J) Métrica de confianza por residuo pLDDT que indica en colores la confianza del modelo. Las**

regiones con una pLDDT menor a 50 pueden ser interpretadas como regiones desordenadas en aislamiento.

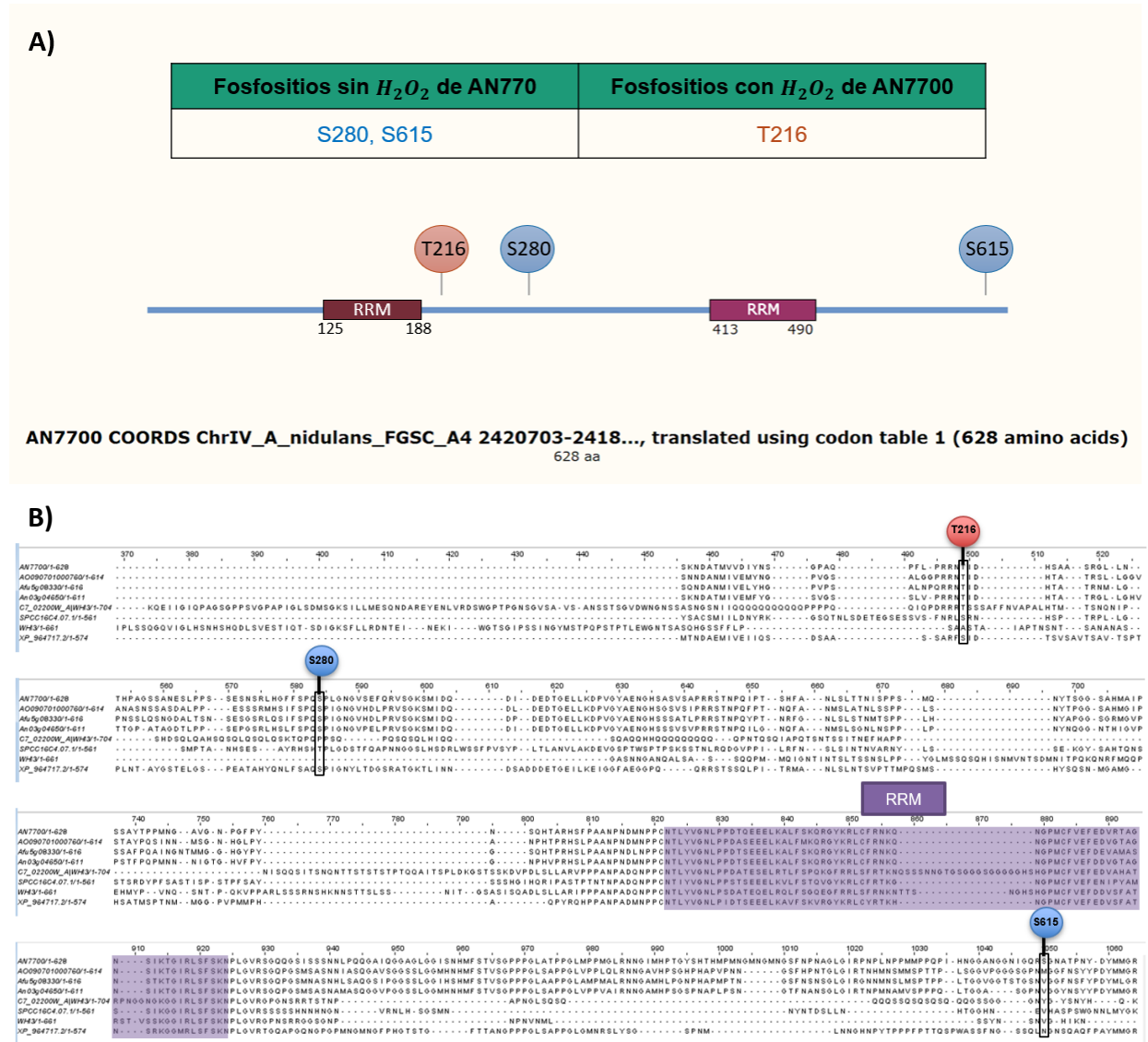


**Figura 12. Localización de los fosfositos de AN7474/PufA que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en posibles regiones intrínsecamente desordenadas y en posibles regiones intrínsecamente desordenadas de unión. A) Posibles regiones intrínsecamente desordenadas y de unión, además de la localización de los fosfositos de AN7474/PufA en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo). Las líneas rojas por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones intrínsecamente desordenadas obtenidas por medio del software IUPred3. Las líneas azules por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones desordenadas de unión, de acuerdo al software ANCHOR2. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en el análisis en B), C), D), E) y F).**

**La proteína AN7700 posee 3 fosfositos que cambian en respuesta al  $H_2O_2$**

En la proteína AN7700, aún no caracterizada en *A. nidulans* pero homóloga de Whi3 en *S. cerevisiae*, se detectaron tres fosfositos, de los que S280 y S615 sólo se detectaron en ausencia de  $H_2O_2$  y las posibles cinasas que los fosforilan son la calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII) y la MAP cinasa p38, cuyos ortólogos en *A. nidulans* son CmkA, CmkB y CmkC, además de las cinasas SakA y MpkC (Joseph

& Means, 2000; Kornstein et al., 1992; De souza et al., 2013). En cambio, el fosfotio T216 se fosforila únicamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posiblemente por la proteína cinasa A (PKA) cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkaA (De souza et al., 2013). Se aprecia que el fosfotio T216 se encuentra en una región conservada en distintas especies de *Aspergillus*, al igual que el fosfotio S280. Se identificaron dos dominios RRM, de unión al RNA (Figura 13, tabla 6).



**Figura 13. Fosfotios de AN7700 que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y su conservación en diferentes hongos. A) Fosfotios de AN7700 en ausencia (azul) o en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo), además de su localización en la secuencia con los dominios marcados (RRM) esquematizada mediante SnapGene. B) Comparación de**

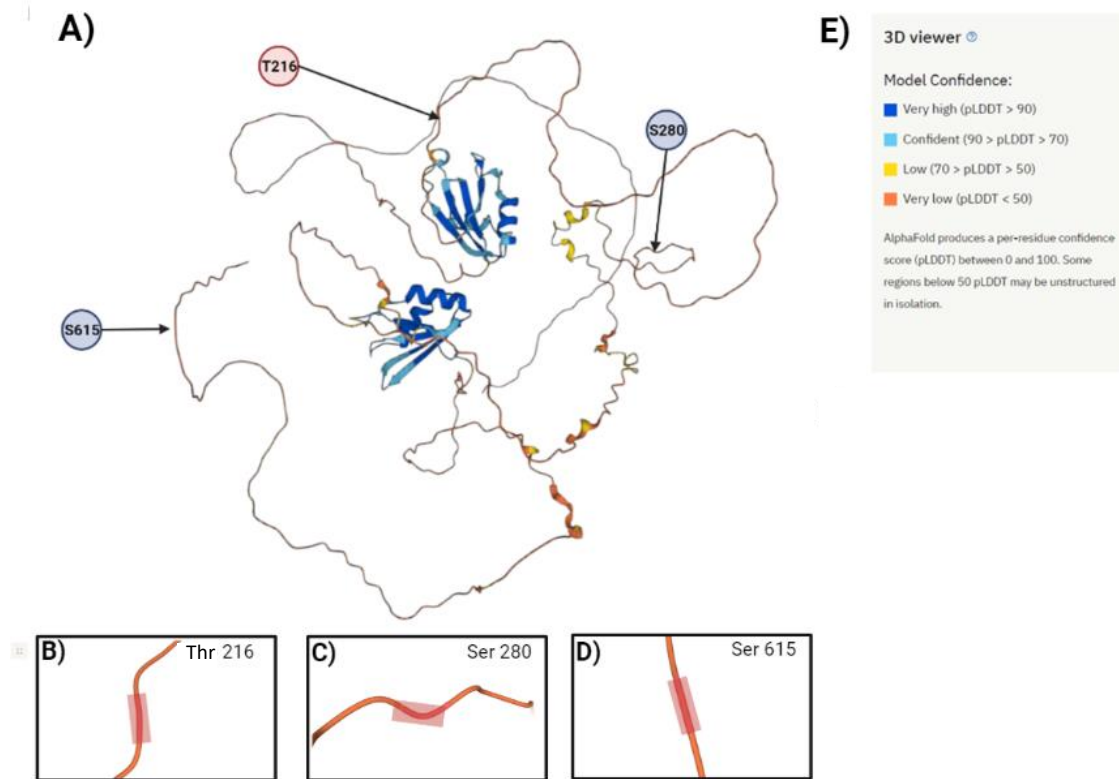
secuencias homólogas de AN7700 entre *A. nidulans* (AN7700), *A. oryzae* (AO090701000760), *A. fumigatus* (Afu5g08330), *A. niger* (An03g04650), *C. albicans* (C7\_02200W\_A|Whi3), *S. pombe* (SPCC16C4.07.1), *S. cerevisiae* (Whi3) y *N. crassa* (XP\_964717.2). El alineamiento fue realizado utilizando T-Coffee (<https://tcoffee.crg.eu>) y JalView.

**Tabla 6. Posibles cinasas responsables de la fosforilación de AN7700 de acuerdo al programa NetPhos.** En azul se encuentran los sitios que se desfosforilan en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en rojo el que se fosforila.

Posible cinasa responsable de la fosforilación de AN7700 (NetPhos)	Fosfositos de AN7700
Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK)	S280
Calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII)	S615
Proteína cinasa A (PKA)	T216

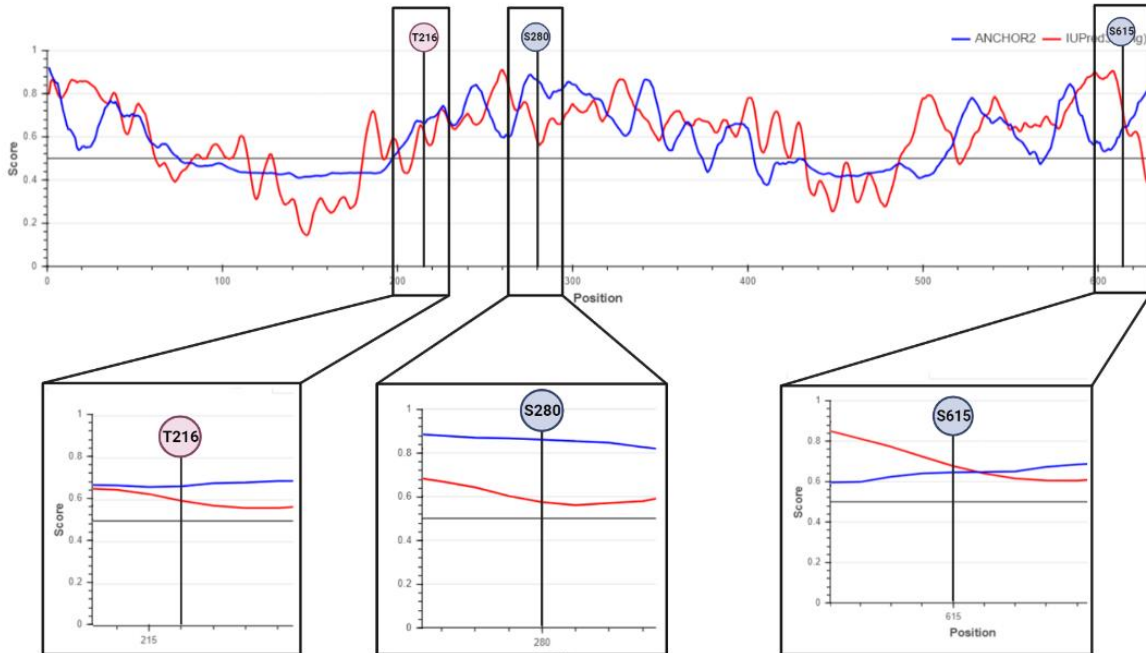
En el análisis de la localización de los fosfositos de acuerdo a AlphaFold y IUPred3 de AN7700, encontramos que todos los fosfositos que cambian en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentran en posibles regiones intrínsecamente desordenadas (Figuras 14 y 15). En la estructura predicha por AlphaFold se observa que todos los fosfositos con cambios en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentran en regiones de color naranja, que de acuerdo a la métrica de confianza pLDDT, se pueden interpretar como regiones desordenadas en aislamiento (Figura 14). En el caso de IUPred3, todas las regiones en donde se encuentran los fosfositos tienen una probabilidad mayor del 50% de ser regiones intrínsecamente desordenadas. De igual forma,

todos los fosfositos se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión con una probabilidad mayor al 50%, de acuerdo a ANCHOR2 (Figura 15).



**Figura 14. Localización de los fosfositos de AN7700 que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en posibles regiones no estructuradas según AlphaFold. A)** Localización de los fosfositos de AN7700 en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) en la posible estructura 3D de AN7700. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en **B)**, **C)** y **D)**. **E)** Métrica de confianza por residuo pLDDT que indica en colores la confianza del modelo. Las regiones con una pLDDT menor a 50 pueden ser interpretadas como regiones desordenadas en aislamiento.





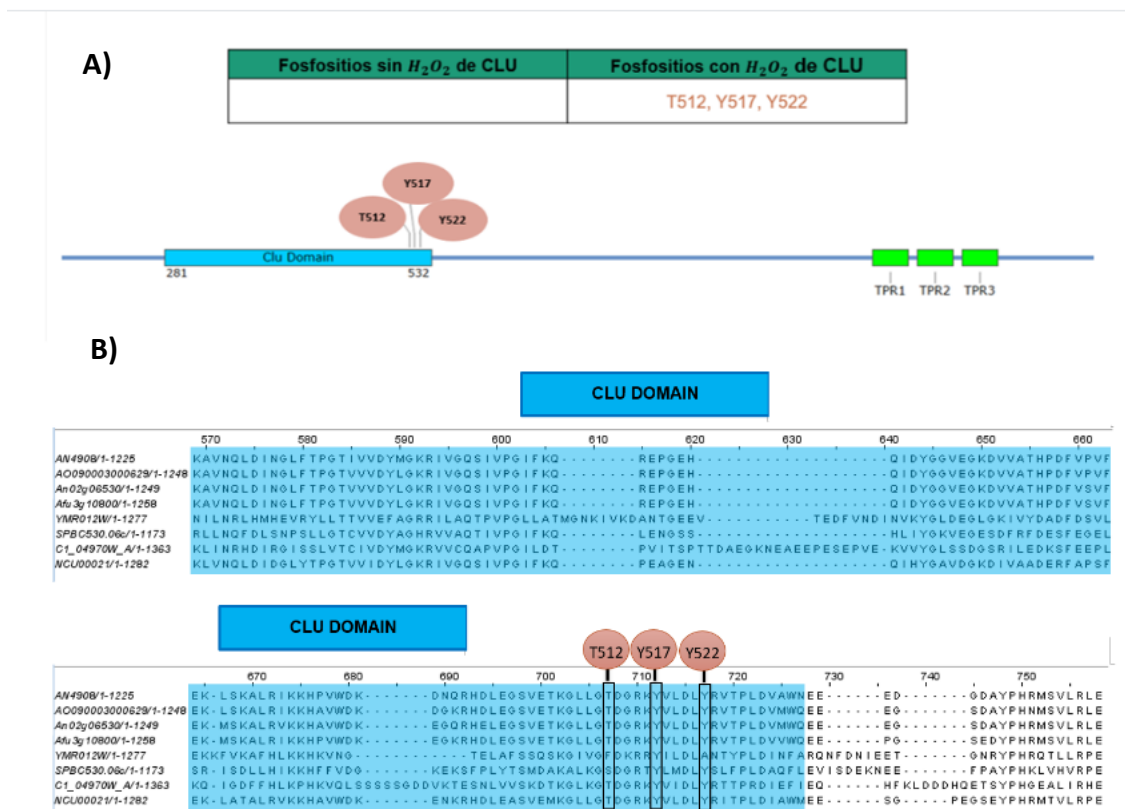
**Figura 15. Localización de los fosfositos de AN7700 que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en posibles regiones intrínsecamente desordenadas y en posibles regiones intrínsecamente desordenadas de unión. A) Posibles regiones intrínsecamente desordenadas y de unión, además de la localización de los fosfositos de AN7700 en ausencia (azul) y en presencia de  $H_2O_2$  (rojo). Las líneas rojas por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones intrínsecamente desordenadas obtenidas por medio del software IUPred3. Las líneas azules por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones desordenadas de unión, de acuerdo al software ANCHOR2. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en el análisis en B), C) y D).**

### **La proteína Clu posee 3 fosfositos que cambian en respuesta al $H_2O_2$**

Clu es una proteína de unión a RNA necesaria para la función, localización y probablemente control de calidad mitocondrial que no todavía no ha sido caracterizada en *A. nidulans* (Sen & Cox, 2016; Wakim et al., 2017; Malavazi et al., 2006; Freitas et al., 2011). La proteína Clu/AN4908 posee los fosfositos T512, Y517 y Y522 que son específicos del tratamiento con  $H_2O_2$  (Figura 16). T512 podría ser fosforilada por la cinasa PKC, cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkcA (Ronen et al., 2007). Las posibles cinasas que fosforilarían a los sitios restantes en presencia de

$H_2O_2$  son desconocidas, ya que las cinasas que arrojaba el programa NetPhos tenían una probabilidad de menos del 50%, por lo que no se tomaron en cuenta (Tabla 7).

Se aprecia que los 3 fosfositios de Clu se encuentran en el dominio CLU altamente conservado en diferentes especies de hongos filamentosos y *S. cerevisiae*, a pesar de que su función no está clara. La proteína Clu también posee 3 dominios de repeticiones tetratricopéptidas (TPR, por sus siglas en inglés) cuya función es de reconocimiento y unión al mRNA (Sen et al., 2016) (Figura 16).



**Figura 16. Fosfositios de Clu en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y su conservación en diferentes hongos. A) Fosfositios de Clu en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) B) Comparación de secuencias homólogas de Clu entre *A. nidulans* (AN4908), *A. fumigatus* (Afu3g10800), *A. niger* (An02g06530), *A. oryzae* (AO090003000629), *S. cerevisiae* (YMR012W), *C. albicans* (C1\_04970W\_A) y *N. crassa* (NCU00021). El alineamiento fue realizado utilizando T-Coffee (<https://tcoffee.crg.eu>) y JalView.**

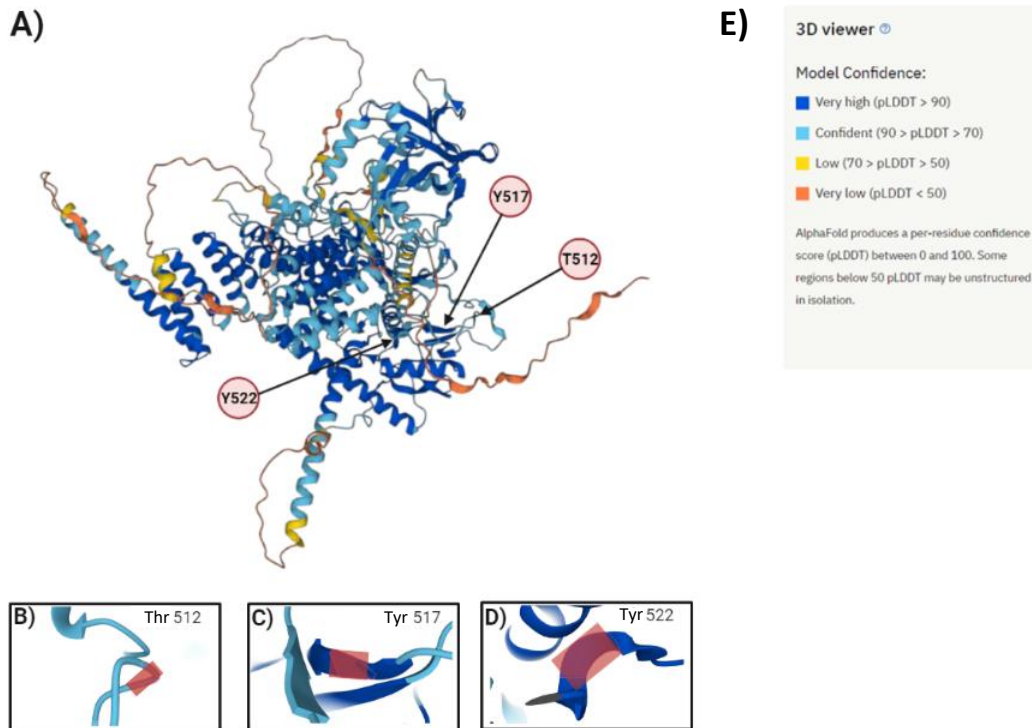


**Tabla 7. Posible cinasa responsable de la fosforilación de Clu de acuerdo al programa NetPhos.** En rojo se encuentran los sitios que se fosforilan en presencia de  $H_2O_2$ . Se desconocen las posibles cinasas de Y517 y Y522, debido a que los resultados de NetPhos indican cinasas con una probabilidad menor al 40%, por lo que fueron descartadas.

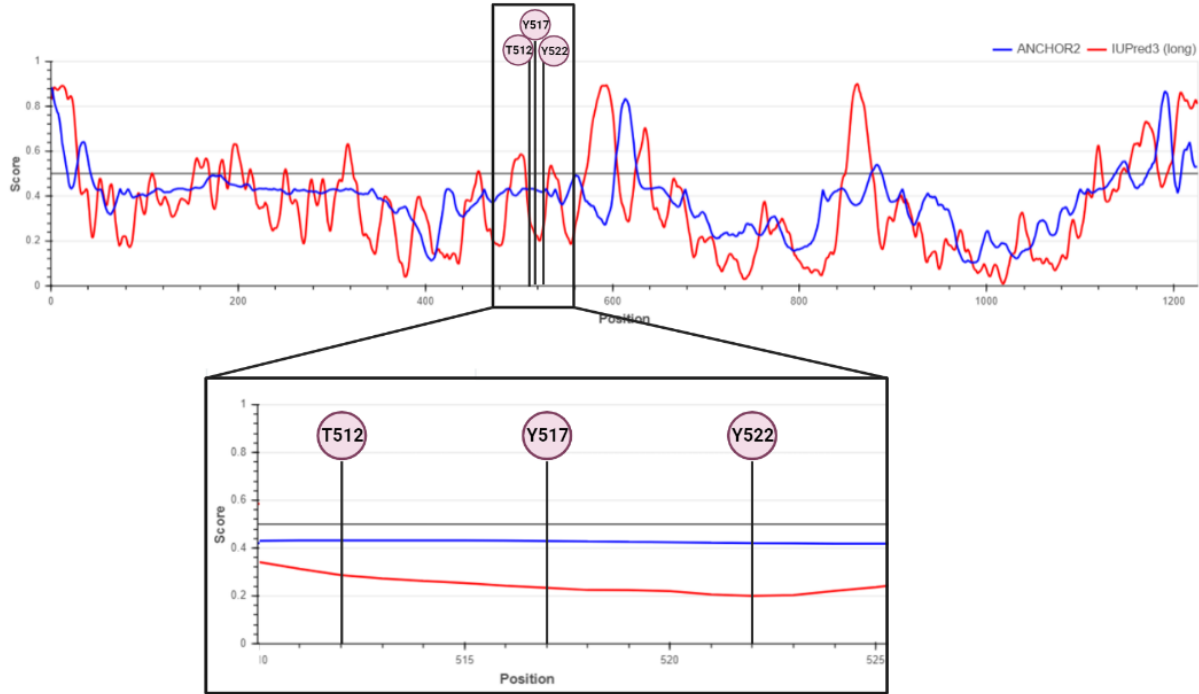
Posible cinasa responsable de la fosforilación de Clu (NetPhos)	Fosfositos de Clu
Proteína cinasa C (PKC)	T512
	Y517
	Y522

En el análisis de la localización de los fosfositos de acuerdo a AlphaFold y al análisis de IUPred3 de Clu, encontramos que la mayoría de los fosfositos que cambian en respuesta al  $H_2O_2$  se encuentran en posibles regiones estructuradas (Figuras 17 y 18). En la estructura predicha por AlphaFold se observa que los fosfositos Y517 y Y522 en respuesta al  $H_2O_2$  se encuentran en regiones indicadas en color azul oscuro, que de acuerdo a la métrica de confianza pLDDT, sugieren una confianza alta en el modelado, además de ser parte de un posible dominio estructurado (Figura 17). El fosfosito T512 se ubica en una región modelada como desordenada de color azul claro que está contigua a un posible dominio beta plegado de color azul oscuro. Sin embargo, en la figura 18 se aprecia que IUPred3 ubica al fosfosito T512 en una posible región estructurada, por lo que su estructura no es concluyente. Además, IUPred3 también indica que las regiones en donde se encuentran los otros fosfositos tienen una probabilidad menor al 40% de ser regiones intrínsecamente desordenadas, por lo que se interpretan como regiones estructuradas. De igual

forma, con el software ANCHOR2, no se identifican estas regiones como intrínsecamente desordenadas de unión (Figura 18).



**Figura 17. Localización de los fosfositos de Clu que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en posibles regiones desordenadas y estructuradas según AlphaFold. A)** Localización de los fosfositos de Clu en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) en la posible estructura 3D de Clu. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en **B), C)** y **D).** **E)** Métrica de confianza por residuo pLDDT que marca en colores la confianza del modelo. Las regiones con una pLDDT menor a 50 también pueden ser interpretadas como regiones desordenadas en aislamiento.



**Figura 18. Localización de los fosfositos de Clu que cambian en respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en posibles regiones estructuradas. A) Localización de los fosfositos de Clu en presencia de  $H_2O_2$  (rojo) en posibles regiones estructuradas. Las líneas rojas por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones intrínsecamente desordenadas obtenidas por medio del software IUPred3. Las líneas azules por encima de la línea negra media muestran las posibles regiones desordenadas de unión, de acuerdo al software ANCHOR2. Imagen agrandada de la localización de los fosfositos en el análisis en B).**

## DISCUSIÓN

Las proteínas de unión al RNA son de vital importancia para las células, ya que regulan distintos aspectos del metabolismo y biología del RNA, así como participan notablemente en diferentes mecanismos de respuesta al estrés (Gebauer et al., 2021). De acuerdo a la base de datos de G:Profiler y Gene Ontology, en el proteoma de *A. nidulans* están registradas aproximadamente 464 proteínas con el término “unión al RNA” (GO:0003723). En este trabajo identificamos que 79 de ellas muestran cambios en su patrón de fosforilación en ausencia o presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Tabla 1). Esto sugiere que el estrés oxidante

provocaría cambios en el patrón de fosforilación en casi un quinto del total de las proteínas de unión a RNA que probablemente posee *A. nidulans*.

Algunas proteínas de unión al RNA pueden formar gránulos ribonucleoproteicos al inducir la formación de fases líquido-líquido (Gebauer et al., 2021; Marcelo et al., 2021). De acuerdo a un análisis de enriquecimiento funcional en G:Profiler, 40 de las 79 proteínas de unión a RNA podrían estar involucradas en la formación de complejos ribonucleoproteicos, que pueden incluir a los gránulos de estrés, los P-bodies, los paraspeckles y cualquier otro condensado ribonucleoproteico (Tabla 2). En general, los gránulos de estrés protegen al RNA en condiciones de estrés y se componen de factores de iniciación de la traducción, mRNA y proteínas de unión al RNA (Jeon et al., 2022). Los P-bodies están compuestos de mRNA y proteínas asociadas a la represión de la traducción, así como a la degradación del RNA, por lo que regulan al RNA de forma post-transcripcional (Luo et al., 2018). En cambio, los paraspeckles son condensados nucleares formados por RNA no codificante largos junto con proteínas de la familia DBHS (*Drosophila Behavior Human Splicing*), que controlan la expresión génica durante procesos celulares como la respuesta al estrés al retener mRNA que han sido editados de adenosina a inosina en el núcleo (Fox & Lamond, 2010).

De igual forma, se ha observado que modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación de proteínas de unión al RNA, pueden afectar la dinámica de los complejos ribonucleoproteicos, en especial mediante la regulación de la separación de fases. De acuerdo a la proteína y al contexto celular en el que se encuentre, la fosforilación de aminoácidos puede promover o inhibir la separación de fases (Owen & Shewmaker, 2019). Asimismo, la separación de fases puede estar involucrada en percibir el desbalance redox, como se ha reportado para la proteína de unión al RNA Pbp1, que actúa como un sensor redox que sincroniza la fisiología celular al estado metabólico de la mitocondria en *S. cerevisiae* (Kato et al., 2019; Yang et al., 2019). Además, se ha propuesto que la separación de fases puede dar especificidad a cascadas de señalización que potencialmente activan múltiples procesos biológicos al incorporar sustratos de una vía específica

y excluyendo a otros. En el caso de la resistencia al estrés oxidante, la separación de fases es indispensable para la formación de los gránulos de estrés (Saito & Kimura, 2021). El hecho de que la ausencia o presencia del peróxido de hidrógeno afecte los patrones de fosforilación de 40 proteínas de unión al RNA, potencialmente involucradas en la formación de complejos ribonucleoproteicos, sugiere que algunas de estas proteínas podrían regular la dinámica y la separación de fases de distintos complejos ribonucleoproteicos en *A. nidulans*, en respuesta a distintos niveles celulares de ERO.

Entre los complejos ribonucleoproteicos que forman parte las proteínas de unión al RNA, los más importantes para mediar la resistencia al estrés oxidante son los gránulos de estrés. Los gránulos de estrés retienen a los mRNA e inhiben la traducción para proteger a los RNA no traducidos del daño oxidante, así como para ahorrar energía para las otras respuestas celulares al estrés (Marcelo et al., 2021). De las 40 proteínas de unión al RNA con cambios en sus patrones de fosforilación en *A. nidulans* que podrían ser parte de complejos ribonucleoproteicos, se encontraron al menos 5 proteínas que podrían formar o estar localizadas en gránulos de estrés. Por ejemplo, en la proteína FabM (AN4000), que se ha demostrado que se localiza en gránulos de estrés inducidos por privación de glucosa en *A. nidulans* (Soukup et al., 2017), se detectaron 2 sitios que se fosforilan en presencia de  $H_2O_2$  y uno que se desfosforila. De igual forma, la proteína AN7659, homóloga de la helicasa de RNA dependiente de ATP llamada Dbp5, se detectó con un fosfotio que se desfosforila en presencia de  $H_2O_2$ . Dbp5 se ha localizado en gránulos de estrés inducidos por azida sódica de acuerdo a análisis proteómicos en *S. cerevisiae* y mamíferos (Jain et al., 2016; Eiermann et al., 2020).

La tercera proteína que podría formar o estar localizada en gránulos de estrés es AN7700, en donde se detectaron 3 fosfotios en respuesta al  $H_2O_2$ . El ortólogo en *S. cerevisiae* de AN7700 es Whi3, que también está relacionado con la formación de gránulos de estrés. La proteína de unión al RNA Ssd1, cuyos RNA blancos codifican para proteínas de pared celular, se transloca del núcleo al citoplasma y viceversa, así como se localiza tanto en gránulos de estrés como en P-bodies en

*S. cerevisiae* en privación de glucosa (Kurischko et al., 2011; Kurischko & Broach, 2017). En *A. nidulans* encontramos que AN1158, el homólogo de Ssd1, posee 3 fosfositios específicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo cual resultaría interesante estudiar su participación en la formación de P-bodies en distintas condiciones de estrés, principalmente el estrés oxidante. Por último, la proteína AN4850 posee 3 fosfositios específicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otro que se desfosforila en su presencia. El ortólogo de AN4850 es TIAR-2 en mamíferos, que es parte de los gránulos de estrés inducidos por el choque de calor (Kedersha et al., 1999). En particular, se ha observado que la fosforilación de residuos de serina de TIAR-2 podría promover la separación de fases y la formación de gránulos de estrés en *C. elegans* (Andrusiak et al., 2019). Por lo tanto, nuestro análisis sugiere que los cambios en los patrones de fosforilación de al menos 5 proteínas de unión al RNA en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podrían afectar la dinámica y formación de gránulos de estrés y P-bodies como parte del mecanismo antioxidante en *A. nidulans*.

Una de las características que favorece que las proteínas de unión a RNA formen condensados ribonucleoproteicos, como los gránulos de estrés, es la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas. Las regiones intrínsecamente desordenadas consisten en una secuencia de aminoácidos de baja complejidad y sin una estructura 3D bien definida (Wiedner & Giudice, 2021). Además, también se les ha asociado con la señalización de la respuesta antioxidante. Recientemente, un análisis bioinformático determinó que todas las proteínas de la cascada de señalización de cinasas Jun N-terminal (JNK) inducidas por estrés oxidante son ricas en regiones desordenadas (Gehi et al., 2022). De igual forma, la superóxido dismutasa 1 (SOD1), una proteína clave en la respuesta antioxidante de la célula, se considera una proteína intrínsecamente desordenada (Eleutherio et al., 2021). En las proteínas de la cascada de cinasas JNK y en la SOD1, se encontraron modificaciones post-traduccionales importantes, tales como fosforilaciones, ubicadas en las regiones intrínsecamente desordenadas, lo que las asocia con posibles funciones en la potenciación y propagación de la señalización antioxidante (Gehi et al., 2022; Eleutherio et al., 2021). No obstante, en el caso de

las proteínas de unión al RNA, aún no han sido asociadas las funciones de las regiones intrínsecamente desordenadas con los sistemas antioxidantes.

En este trabajo se observó que 4 de las 5 proteínas analizadas con mayor profundidad poseen la mayor parte de los fosfositios en respuesta al estrés oxidante ubicados en posibles regiones intrínsecamente desordenadas y en posibles regiones intrínsecamente desordenadas de unión. Las regiones intrínsecamente desordenadas de unión o también conocidas como caracteres de reconocimiento molecular (MoRFs, por sus siglas en inglés), son segmentos cortos que experimentan una transición de desorden a orden al unirse a sus ligandos afines, usualmente proteínas (Fuxreiter et al., 2007). Por lo tanto, no sólo es importante la ubicación de los fosfositios específicos de estrés oxidante, sino que también los fosfositios que se desfosforilan en presencia de  $H_2O_2$  y se ubican en regiones desordenadas de unión podrían indicar un posible cambio en la estructura y en la función de la proteína.

En el caso de los otros fosfositios que se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas, pero no de unión, podrían estar involucrados en la separación de fases, ya que modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones promueven la formación de condensados intracelulares (Owen & Shewmaker, 2019). Asimismo, también podrían ser regiones de unión a otras moléculas, como RNA o péptidos, ya que ANCHOR2 sólo predice regiones intrínsecamente desordenadas que se unen a proteínas globulares. En general, los resultados de este estudio podrían mostrar que las fosforilaciones en respuesta al estrés oxidativo en regiones intrínsecamente desordenadas de algunas proteínas de unión al RNA sugieren su posible importancia en la señalización durante la respuesta antioxidante.

Las proteínas con cambios en sus patrones de fosforilación que se analizaron con mayor profundidad fueron FabM, PbpA/AN1325, AN7474/PufA, AN7700 y Clu, ya que muestran mayores cambios en función de la ausencia o presencia del  $H_2O_2$ . Además, algunas de estas proteínas podrían ser sustrato de las MAPK SakA y/o

MpkC que se activan en respuesta al  $H_2O_2$  (Kawasaki et al., 2002; Garrido-Bazán, 2018; Lara-Rojas, 2011) (Figura 19).

FabM es una proteína de unión a la cola poliA del RNA que se ha encontrado localizada en gránulos de estrés inducidos por privación de glucosa y tiene un rol en el desarrollo asexual de *A. nidulans* (Soukup et al., 2017; Marhoul & Adams, 1996). En presencia de  $H_2O_2$ , FabM posee los sitios S368 y S376 fosforilados y el sitio S207 desfosforilado. De acuerdo a NetPhos, la posible cinasa responsable de la fosforilación del sitio S368 es la p38, cuyos ortólogos en *A. nidulans* son SakA y MpkC, MAPK involucradas en la respuesta al estrés. Asimismo, este fosfositio se encuentra en una región desordenada de unión (Figuras 5 y 6), lo que podría indicar que esta fosforilación de FabM podría inducir una transición de estructura desordenada a ordenada promoviendo la unión con SakA u otras proteínas de la misma vía.

Se ha demostrado anteriormente que SakA interactúa físicamente con FabM (Jaimes-Arroyo et al., 2015), lo que apoyaría la idea de que FabM es un posible sustrato de SakA y que podría estar involucrada en la señalización de esta vía en respuesta al estrés oxidativo. Asimismo, en otros hongos se puede observar la interacción de los homólogos de SakA y FabM en algunos procesos celulares. En *Candida boidinii* y en *S. pombe*, el homólogo de SakA, Hog1, se co-localiza con Pab1 (el homólogo de FabM) en los gránulos de estrés en respuesta al estrés por alta temperatura (Shiraishi et al., 2018). En *S. cerevisiae* se ha determinado que Hog1 podría regular la traducción mediada por elementos 3'-UTR al modular el reclutamiento de Pab1 (homólogo de FabM), quien puede interactuar con la maquinaria de traducción (Vasudevan et al., 2005).

FabM podría ser fosforilada también en el sitio S376 por la caseína cinasa II (CKII), que en *A. nidulans* se ha identificado como Cka1 (AN1485) y tiene, al igual que en *S. cerevisiae*, un rol en la regulación del crecimiento polarizado, (De Souza et al., 2013; Rethinaswamy et al., 1998). Asimismo, se observado que la caseína cinasa II promueve la formación de gránulos de estrés al fosforilar a la proteína de unión a SH3 (G3BP1) en respuesta al estrés de arsenito en células U2OS (Reineke et



al., 2017). Lo anterior podría sugerir que esta cinasa tendría un rol similar en la formación de gránulos de estrés al posiblemente fosforilar a FabM. Además, el fosfotio S376 se encuentra en una región intrínsecamente desordenada, que al ser fosforilada podría favorecer la formación de los gránulos de estrés.

Finalmente, la proteína cinasa C (PKC), cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkcA (Ronen et al., 2007), podría fosforilar al sitio S207, detectado en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se encuentra en el dominio RRM2 altamente conservado en diferentes hongos. PkcA integra señales de diferentes procesos celulares y una de sus principales funciones es mantener la integridad de la pared celular (Ronen et al., 2007). De igual forma, se ha observado en *S. cerevisiae* que se requiere la actividad de PKC para sobrellevar los efectos del estrés oxidante en la pared celular (Colabardi et al., 2010; Vilella et al., 2005). No obstante, la fosforilación de S207 únicamente se presenta en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que sugiere un probable rol de FabM en la integridad de la pared celular relacionada con la vía de PKC en ausencia de estrés. En resumen, las posibles cinasas de FabM sugieren que podría estar relacionada con la vía SakA, la vía MAPK de integridad de la pared celular, así como en la formación de gránulos de estrés.

Otra de las proteínas analizadas fue PbpA/AN1325, que es necesaria para el desarrollo sexual y el metabolismo secundario de *A. nidulans*. A pesar de que en *A. nidulans* se ha comprobado que PbpA no se localiza en gránulos de estrés ni en P-bodies (Soukup et al., 2017), todavía no se descarta su potencial para formar otros complejos ribonucleoproteicos por separación de fases, como lo hace su ortólogo Pbp1 (Kato et al., 2019). Se ha comprobado que en *S. cerevisiae*, Pbp1 posee una región de baja complejidad con 24 residuos de metionina, que en presencia de estrés oxidante se oxidan, promoviendo la separación de fases de Pbp1. Esto a su vez es necesario para inhibir al complejo TORC1 y así inducir la autofagia, siendo que Pbp1 puede sensar el estado celular redox. Se ha mostrado que 8 de las 24 metioninas de esta región son críticas para la separación de fases, ya que mutantes sin estas metioninas muestran una reducción severa en la autofagia (Yang et al., 2019). En *A. nidulans*, PbpA/AN1325 posee 32 metioninas

a lo largo de su secuencia, de las que 12 se encuentran en una región equivalente a la de baja complejidad de *S. cerevisiae* y sólo 5 de ellas se encuentran conservadas en ambos organismos. De estas 5 metioninas, únicamente 1 coincide con uno de los residuos críticos para la separación de fases en *S. cerevisiae* (Figura 7). Igualmente, estas metioninas se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión (Figura 9), por lo que sería interesante analizar si PbpA tiene un rol similar al promover la separación de fases y ser un sensor redox en *A. nidulans*. Asimismo, la presencia de estas regiones intrínsecamente desordenadas en la mayor parte de la secuencia de PbpA (Figura 9) podría favorecer la formación de los condensados y la unión a diferentes blancos, potenciando la señalización de distintas vías.

En PbpA/AN1325, el sitio específico de estrés oxidante (S267) es probablemente fosforilado por la caseína cinasa II (CKII), cuyo ortólogo en *A. nidulans* es Cka1, involucrado en el crecimiento polarizado (De Souza et al., 2013; Rethinaswamy et al., 1998). Este sitio S267 se encuentra en el dominio altamente conservado Lsm Associated Domain en *Aspergillus* y otros hongos como *S. cerevisiae* (Figura 7), lo que sugiere que podría ser importante para la modulación de la proteína en respuesta al estrés.

Entre las cinasas que podrían fosforilar a los sitios que se desfosforilan en presencia de  $H_2O_2$ , se encuentra la calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII), cuyos ortólogos en *A. nidulans* son CmkA, CmkB y CmkC (Joseph & Means, 2000; Kornstein et al., 1992). En particular, CmkA y CmkB también presentan fosfositos específicos en presencia de estrés oxidante y, además, podrían ser algunas de las cinasas responsables de la fosforilación de SakA y MpkC (Carrasco & Aguirre, 2021), sugiriendo que podrían estar relacionadas con esta vía de respuesta al estrés. Finalmente, la proteína cinasa C (PKC), cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkcA también podría estar fosforilando a PbpA en ausencia de estrés oxidante. Al igual que para FabM, podría sugerir un probable rol de PbpA en la integridad de la pared celular relacionada con la vía de PKC en condiciones no estresantes, posibilidad que sería interesante explorar experimentalmente.

Por su parte, la proteína PufA/AN7474 ha sido poco estudiada en *A. nidulans*, en donde se ha visto que tiene un rol importante en la formación de las esporas asexuales y en la regulación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo asexual (Son et al., 2021). El ortólogo de PufA/AN7474 en *S. cerevisiae* llamado Jsn1 o Puf1, se encuentra localizado en la membrana mitocondrial periférica y también asociado a la membrana plasmática. Puede estar involucrada en el movimiento y herencia mitocondrial, la dinámica de los microtúbulos y el control de la composición de la membrana plasmática (Fehrenbacher et al., 2005; Machin & Barnes, 1995). Todos los fosfositos de PufA/AN7474 con cambios en respuesta al peróxido de hidrógeno se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas. Entre ellos, el fosfosito específico de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S69 y los fosfositos en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T140 y S143 se ubican también en posibles regiones desordenadas de unión. La posible cinasa que podría fosforilar a los sitios S69 y S143 es la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2), cuyo ortólogo en *A. nidulans* es NimX que también posee un fosfosito específico en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Osmani et al., 1994; Aguirre & Carrasco, 2021). En cigotos de ratón se ha observado que el estrés oxidante induce la fosforilación de la Cdc2. Cdc2 fosforilada podría desencadenar el punto de control del ciclo celular que resulta en su detención en respuesta al daño oxidante al DNA (Zhang et al., 2016). Por lo tanto, podría haber una relación de la posible fosforilación de PufA/AN7474 por Cdc2 con la respuesta al estrés oxidante relacionado con el control del ciclo celular. Aunque no se ha asociado directamente a algún ortólogo de PufA/AN7474 con el ciclo celular ni con Cdc2, algunas otras proteínas de la misma familia Puf, como la Puf5 y la Puf9, tienen roles reguladores en el ciclo celular de *S. cerevisiae* y de *Trypanosoma brucei* (Sato et al., 2022; Kolev et al., 2014). Por lo que sería interesante abordar experimentalmente estas cuestiones.

Se ha observado que en *S. cerevisiae*, la proteína Jsn1, la cual es un ortólogo de PufA/AN7474, regula probablemente la vía de la integridad de pared celular en respuesta al estrés por altas concentraciones de calcio (Haramati et al., 2017). De igual manera, PufA/AN7474 es un posible sustrato de la PKC, cuyo ortólogo en *A. nidulans* es PkcA, cinasa involucrada en la vía de MAPK de integridad de la pared

celular (Ronen et al., 2007). Además, PkcA podría estar fosforilando a algunos sitios en ausencia de  $H_2O_2$  y otros sólo en su presencia, lo que sugiere en *A. nidulans* un rol de PufA/AN7474 en el mantenimiento de la pared celular en condiciones normales y una posible función en la reparación de la pared como respuesta al estrés oxidante. De acuerdo a NetPhos, p38 también podría estar involucrada en la fosforilación de PufA/AN7474, sin embargo, los sitios que posiblemente fosforila no presentan cambios respecto a la presencia o ausencia de  $H_2O_2$ . No obstante, en *S. cerevisiae* se ha observado que la cinasa regulada por glucocorticoides, llamada Ypk1, puede fosforilar a Jsn1 (ortólogo de PufA/AN7474) como mecanismo de control de la composición y función de la membrana plasmática por medio de la vía TORC-Ypk1 (Galez et al., 2021). Asimismo, en *A. fumigatus* se ha comprobado que el ortólogo de Ypk1 se activa a través de la interacción física con SakA en condiciones de estrés por golpe de calor cuando se es perturbada la biosíntesis de esfingolípidos (Fabri et al., 2019). A pesar de que Ypk1 no fue identificada como posible cinasa de PufA/AN7474, se ha observado que la activación de la PKC requiere de la síntesis de esfingolípidos y que defectos en su metabolismo pueden llevar a la inhibición de PKC (Hannun & Bell, 1989; Cerbon et al., 2009). Asimismo, tanto PKC como Ypk1 también pueden ser fosforiladas por las cinasas Pkh1/2, y el complejo TORC2 (De Souza et al., 2013; Kobayashi & Cohen, 1999). De esta forma, ambas vías podrían estar relacionadas. Por lo tanto, no se puede descartar el posible rol de PufA/AN7474 en el control de la composición de la membrana y su posible interacción indirecta con SakA.

La cuarta proteína analizada fue AN7700, que todavía no ha sido caracterizada en *A. nidulans*. El ortólogo de AN7700 en *S. cerevisiae* es Whi3, que se encuentra asociada al retículo endoplásmico y puede estar involucrada en la regulación del ciclo sexual en la biogénesis de la pared celular y en el tráfico exocítico de proteínas (Colomina et al., 2008; Vergés et al., 2007). Además, se ha comprobado que forma parte de los gránulos de estrés por privación de glucosa y golpe de calor (Holmes et al., 2013). De acuerdo a NetPhos, el fosfositio específico en  $H_2O_2$  de AN7700 es posiblemente fosforilado por la proteína cinasa A (PKA), cuya

subunidad regulatoria en *A. nidulans* llamada PkaR también se fosforila en presencia de  $H_2O_2$  y se le ha relacionado con la resistencia al estrés oxidante en *A. fumigatus* y *A. nidulans* (Carrasco & Aguirre, 2021; Zhao et al., 2006; Ni et al., 2005). Las otras posibles cinasas involucradas en la fosforilación de AN7700 en ausencia de estrés oxidante son la MAPK p38 y CAMKII, cuyos ortólogos en *A. nidulans* son SakA y/o MpkC y CmkA junto con CmkC respectivamente. Todos los fosfositos en respuesta al  $H_2O_2$  de AN7700 se encuentran en regiones intrínsecamente desordenadas de unión, lo que sustenta su posible rol en las vías de señalización ya mencionadas. De igual forma, el  $H_2O_2$  podría generar cambios en los patrones de fosforilación de AN7700 que afecten la dinámica de la formación de gránulos estrés.

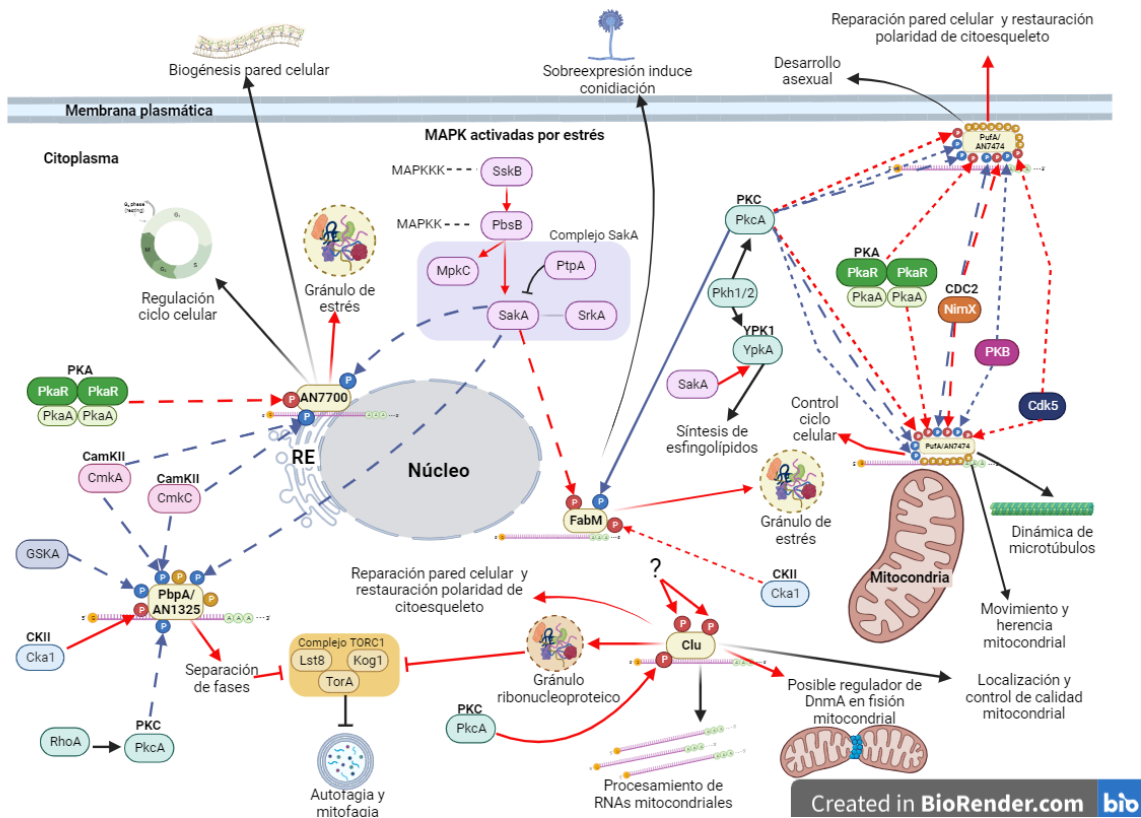
Finalmente, Clu, una proteína de unión al RNA necesaria para la función, localización y probablemente control de la calidad mitocondrial (Sen & Cox, 2016; Wakim et al., 2017), posee 3 fosfositos específicos de la presencia de  $H_2O_2$ . Se ha observado que el ortólogo de Clu en mosca es necesario para suprimir el daño oxidante, lo que sugiere un posible rol en la respuesta antioxidante (Sen et al., 2013). En este estudio, los fosfositos Y517 y Y522 de Clu en presencia de estrés oxidante se encuentran en regiones posiblemente estructuradas. No obstante, el fosfosito T512 es detectado por AlphaFold como una probable región desordenada que conecta láminas beta, mientras que IUPred3 indica que tiene una probabilidad menor al 50% de ser desordenada, por lo que es necesario realizar experimentos o utilizar software de predicción de regiones desordenadas adicionales para concluir su estructura. Asimismo, Clu posee regiones intrínsecamente desordenadas localizadas en los extremos amino carboxilo terminal, cuyas funciones aún no han sido caracterizadas. Además, no se ha estudiado si en estas regiones intrínsecamente desordenadas hay otras modificaciones post-traduccionales como la oxidación de cisteínas, que podría estar involucrada en la respuesta antioxidante (Elias et al., 2005). Esto es relevante porque se ha observado que en inanición, Clu forma gránulos ribonucleoproteicos para inhibir a TORC1 y promover la mitofagia, permitiendo un control de calidad mitocondrial (Pla-Martin et al., 2020). Aún no se ha comprobado si hace lo mismo en estrés

oxidante. Por lo tanto, no se puede descartar del todo la relevancia de regiones intrínsecamente desordenadas de Clu en la respuesta antioxidante, así que se sugiere un análisis más detallado al respecto.

PkcA es una de las posibles cinasas de Clu que podría fosforilar al sitio T512 únicamente en presencia de  $H_2O_2$ , lo que sugeriría que Clu podría ayudar a sobrellevar el daño causado por el estrés oxidante al promover la reparación de la pared celular alterada. En *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, PKC participa en la vía antioxidante al promover la actividad de la maquinaria necesaria para reparar la pared celular y restaurar la polaridad del citoesqueleto de actina por la formación de cables de actina (Colabardi et al., 2010; Vilella et al., 2005). La asociación de Clu con funciones de la pared celular es una cuestión que sería interesante determinar experimentalmente, ya que hasta ahora no ha sido objeto de estudio.

Asimismo, se ha mostrado que en *Drosophila* y células humanas, Clu funge como regulador clave de Drp1, cuyo ortólogo en *A. nidulans* es dnmA, para controlar la fisión mitocondrial (Yang et al., 2022). Nuestro grupo ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno celulares regulan la fisión mitocondrial y su producción endógena en las mitocondrias (Garrido-Bazán, Pardo & Aguirre, 2020). Por lo tanto, sería importante explorar la posible función de Clu en la fisión mitocondrial inducida por especies reactivas del oxígeno.

Considerando lo anterior, proponemos el modelo esquematizado en la Figura 19.



**Figura 19.** Las proteínas de unión al RNA FabM, PbpA/AN1325, PufA/AN7474, AN7700 y Clu presentan cambios en los patrones de fosforilación en ausencia y presencia del  $H_2O_2$  y podrían ser parte de la respuesta antioxidante de *Aspergillus nidulans*. Las líneas rojas indican procesos que ocurrirían en respuesta al  $H_2O_2$ , mientras que las azules indican procesos que ocurrirían en ausencia de  $H_2O_2$ . Las líneas negras indican procesos independientes de la presencia o ausencia del  $H_2O_2$ . Las líneas cortas punteadas señalan que los sitios fosforilados se encuentran en probables regiones intrínsecamente desordenadas; las líneas largas punteadas señalan que los sitios fosforilados se encuentran en probables regiones intrínsecamente desordenadas de unión; y las líneas continuas indican que los sitios fosforilados se encuentran en regiones estructuradas probables. En rojo y azul se indican los fosfositos presentes y ausentes en presencia del  $H_2O_2$ , respectivamente, y en amarillo los fosfositos que no cambian en estas dos condiciones. Con base en las funciones reportadas para estas proteínas en *A. nidulans* y las funciones reportadas para sus homólogos en otros organismos, así como en las cinasas que posiblemente las fosforilan, proponemos las siguientes funciones y localización como parte de la respuesta antioxidante. FabM, una proteína de unión a la cola poliA del RNA, está involucrada en la formación de gránulos de estrés y en el

desarrollo asexual (Soukup et al., 2017; Marhoul & Adams, 1996). FabM se fosforila en 2 sitios y se desfosforila en 1 en respuesta al  $H_2O_2$ , en donde uno de ellos podría ser fosforilado por las MAPK SakA o MpkC. Asimismo, otro de los sitios que se fosforila en FabM podría ser fosforilado por la caseína cinasa II (CKII), lo que podría regular la formación de gránulos de estrés, parecido a lo que sucede en células U2OS en respuesta al estrés por arsenito (Reineke et al., 2017). La proteína PbpA/AN1325 se fosforila en 1 sitio y se desfosforila en 4 en respuesta al  $H_2O_2$ . En *A. nidulans*, se localiza en el citoplasma y está involucrada en el desarrollo sexual y el metabolismo secundario (Soukup et al., 2017). También podría inducir una separación de fases para sensar el estado redox, inhibir a TORC1 e inducir la autofagia, como lo hace su ortólogo Pbp1 en *S. cerevisiae* (Yang et al., 2019). La proteína PufA/AN7474 se fosforila en 4 sitios y se desfosforila en otros 4 en respuesta al  $H_2O_2$ . PufA/AN7474 está involucrada en el desarrollo asexual (Son et al., 2021), mientras que su proteína homóloga Jsn1/Puf1 en *S. cerevisiae* está asociada a la mitocondria y a la membrana plasmática. Además, JSN1 tiene funciones en la herencia mitocondrial, en la dinámica de microtúbulos y en la respuesta al estrés de la pared celular (Fehrenbacher et al., 2005; Machin & Barnes, 1995). Como parte de la respuesta antioxidante en *A. nidulans*, PufA/AN7474 podría regular el ciclo celular, ya que uno de los fosfositos que tiene en respuesta al  $H_2O_2$  podría ser fosforilado por la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdc2), cuyo homólogo en *Mus musculus* parece desencadenar el punto de control del ciclo celular en respuesta al estrés oxidante (Zhang et al., 2016). De igual forma, la proteína PufA/AN7474 podría participar en la reparación de la pared celular en respuesta al  $H_2O_2$  y posiblemente interactuar indirectamente con SakA, debido a que PufA/AN7474 es un posible sustrato de la PKC. La PKC está involucrada en la reparación de la pared celular y su activación requiere de la síntesis de esfingolípidos (Hannun & Bell, 1989; Cerbon et al., 2009), cuya regulación en respuesta al estrés por golpe de calor se ha visto que es controlada por Ypk1 y SakA en *A. fumigatus* (Fabri et al., 2019). La proteína AN7700 se fosforila en 1 sitio y se desfosforila en 2 en respuesta al  $H_2O_2$ . Su homóloga en *S. cerevisiae*, Whi3, está asociada al retículo endoplásmico e involucrada en la regulación del ciclo celular, la biogénesis de la pared celular y la formación de gránulos de estrés (Colomina et al., 2008; Vergés et al., 2007). Proponemos que en *A. nidulans* AN7700 podría ser sustrato de PKA y regular la formación de gránulos de estrés. La proteína Clu se fosforila en 3 sitios en respuesta al  $H_2O_2$ , uno de ellos posiblemente fosforilado por la PKC. En *D. melanogaster* y en *H. sapiens*, Clu regula la localización, función y calidad de las mitocondrias (Sen & Cox, 2016; Wakim et al., 2017).



Como parte de la respuesta antioxidante, Clu podría formar parte de la reparación de la pared celular, debido a que PKC (PkcA) es parte de dicha respuesta, así como formar gránulos ribonucleoproteicos que induzcan la mitofagia, y regular la división mitocondrial inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pla-Martin et al., 2020, Yang et al., 2022).

Para probar las hipótesis mostradas en la Figura 19 sería necesario generar las mutantes respectivas de las 5 proteínas analizadas a mayor profundidad o de alguna otra que se encuentre en la base de datos creada en este trabajo. En los casos pertinentes, se podría analizar la formación de gránulos de estrés en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por ejemplo, en el caso de FabM, se puede utilizar la fusión FabM::mCherry, ya disponible en el laboratorio, para observar su localización en respuesta al estrés oxidante. Dependiendo de los resultados, se podrían mutagenizar los residuos cuya fosforilación cambia en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, se podrían ir confirmando o descartando las hipótesis realizadas para cada proteína. En general, la información *in silico* que se obtuvo en este trabajo puede ayudar a la determinación de futuros experimentos y anticipar posibles resultados de interés para el laboratorio.

## CONCLUSIONES

Nuestro análisis permitió identificar varias proteínas de unión al RNA que muestran cambios en sus patrones de fosforilación en ausencia y presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- Con base en las funciones reportadas para estas proteínas en *A. nidulans* y las de sus homólogos en otros organismos, proponemos que algunas podrían formar parte de la respuesta antioxidante, ya sea mediante la regulación de la formación de gránulos ribonucleoproteicos, como los gránulos de estrés y la separación de fases o como parte de la vía de las MAP cinasas.
- Los fosfositos que se detectaron en regiones intrínsecamente desordenadas podrían ser importantes para la formación de condensados ribonucleoproteicos o para la adquisición de estructura y la interacción con otras proteínas.

- Específicamente, el  $H_2O_2$  podría regular la dinámica de gránulos de estrés formados por la proteína de unión a la cola poliA llamada FabM, la helicasa de RNA dependiente de ATP llamada Dbp5, la proteína de unión a RNA Ssd1/AN1158, cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* participa en la biogénesis de la pared celular, la proteína de respuesta al estrés AN4850/TIAR-2 y la proteína AN7700, cuyo ortólogo Whi3 está involucrado en la regulación del ciclo sexual, como parte de la respuesta antioxidante en *A. nidulans*.
- FabM, PbpA, AN7700, ortólogo de Whi3, y PufA/AN7474, ortólogo de Jsn1/Puf1, podrían estar relacionadas con la vía de las MAP cinasas en respuesta al estrés, ya sea como sustratos de SakA y/o MpkC o interactuando con ellas de manera indirecta.
- Los cambios en el patrón de fosforilación de PbpA por  $H_2O_2$  podrían estar relacionados con la regulación de la separación de fases durante el estrés oxidante en *A. nidulans*.
- PbpA y Clu podrían formar condensados que inhiban al complejo TORC1 para promover la autofagia y la mitofagia, respectivamente, en respuesta al  $H_2O_2$ .
- PufA/AN7474, ortólogo de Jsn1/Puf1, y Clu podrían tener un papel en la reparación de la pared celular y la restauración de la polaridad del citoesqueleto en respuesta al estrés oxidante.

### Referencias:

- Adams, T. H., Boylan, M. T., & Timberlake, W. E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 54(3), 353–362. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90198-5)
- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(1), 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
- Andrusiak, M. G., Sharifnia, P., Lyu, X., Wang, Z., Dickey, A. M., Wu, Z., Chisholm, A. D., & Jin, Y. (2019). Inhibition of Axon Regeneration by Liquid-like TIAR-2 Granules. *Neuron*, 104(2), 290–304.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.004>

- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International journal of molecular medicine*, 40(2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, J., Chibucos, M. C., Crabtree, J., Howarth, C., Orvis, J., Shah, P., Wymore, F., Binkley, G., Miyasato, S. R., Simison, M., Sherlock, G., & Wortman, J. R. (2012). The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D653–D659. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr875> (<https://fungidb.org/fungidb/app/>)
- Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in genetics: TIG*, 19(4), 224–231. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(03)00052-0)
- Axelrod, D. E., Gealt, M., & Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental biology*, 34(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90335-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90335-7)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
- Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., Tompa, P., & Fuxreiter, M. (2018). Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends in cell biology*, 28(6), 420–435. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004>
- Brambilla, M., Martani, F., & Branduardi, P. (2017). The recruitment of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein into stress granules: new insights into the contribution of the different protein domains. *FEMS yeast research*, 17(6), 10.1093/femsyr/fox059. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox059>
- Byrne, D. P., Shrestha, S., Galler, M., Cao, M., Daly, L. A., Campbell, A. E., Evers,

- C. E., Veal, E. A., Kannan, N., & Evers, P. A. (2020). Aurora A regulation by reversible cysteine oxidation reveals evolutionarily conserved redox control of Ser/Thr protein kinase activity. *Science signaling*, *13*(639), eaax2713. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aax2713>
- Buchan, J. R., Muhlrad, D., & Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, *183*(3), 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807043>
  - Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., & Aguirre, J. (2019). *Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01825>
  - Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature reviews. Genetics*, *3*(9), 683–697. <https://doi.org/10.1038/nrg889>
  - Carrasco-Navarro, U., & Aguirre, J. (2021). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induces Major Phosphorylation Changes in Critical Regulators of Signal Transduction, Gene Expression, Metabolism and Developmental Networks in *Aspergillus nidulans*. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), *7*(8), 624. <https://doi.org/10.3390/jof7080624>
  - Cerbon, J., Olguin, T., Alvarez-Grave, P. R., & López-Sánchez, R. C. (2009). *Entamoeba invadens*: sphingolipids metabolic regulation is the main component of a PKC signaling pathway in controlling cell growth and proliferation. *Experimental parasitology*, *122*(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.011>
  - Champe, S. P., Nagle, D. L., & Yager, L. N. (1994). Sexual sporulation. *Progress in industrial microbiology*, *29*, 429–454.
  - Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *Journal of inflammation research*, *13*, 1057–1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>
  - Clutterbuck A. J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *63*(2), 317–327. <https://doi.org/10.1093/genetics/63.2.317>
  - Colabardini, A. C., De Castro, P. A., De Gouvêa, P. F., Savoldi, M., Malavazi, I., Goldman, M. H. S., & Goldman, G. H. (2010). Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. *Molecular Microbiology*, *78*(5), 1259–1279.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07403.x>

- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Wang, H., Aldea, M., & Garí, E. (2008). Whi3, a developmental regulator of budding yeast, binds a large set of mRNAs functionally related to the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 283(42), 28670–28679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804604200>
- Conibear, A.C. (2020). Deciphering protein post-translational modifications using chemical biology tools. *Nat Rev Chem* 4, 674–695. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00223-8>
- Coppin, L., Leclerc, J., Vincent, A., Porchet, N., & Pigny, P. (2018). Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *International journal of molecular sciences*, 19(3), 650. <https://doi.org/10.3390/ijms19030650>
- Corcoran, A., & Cotter, T. G. (2013). Redox regulation of protein kinases. *The FEBS journal*, 280(9), 1944–1965. <https://doi.org/10.1111/febs.12224>
- Corley, M., Burns, M. C., & Yeo, G. W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular cell*, 78(1), 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
- Cox, R. T., & Spradling, A. C. (2009). *Clueless*, a conserved *Drosophila* gene required for mitochondrial subcellular localization, interacts genetically with parkin. *Disease models & mechanisms*, 2(9-10), 490–499. <https://doi.org/10.1242/dmm.002378>
- Das, K. and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- David, H., Özçelik, I. S., Hofmann, G., & Nielsen, J. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC genomics*, 9, 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-163>
- De Souza, C. P., Hashmi, S. B., Osmani, A. H., Andrews, P., Ringelberg, C. S., Dunlap, J. C., & Osmani, S. A. (2013). Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS one*, 8(3), e58008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058008>

- Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in plant science*, 11, 618835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618835>
- Eiermann, N., Haneke, K., Sun, Z., Stoecklin, G., & Ruggieri, A. (2020). Dance with the Devil: Stress Granules and Signaling in Antiviral Responses. *Viruses*, 12(9), 984. <https://doi.org/10.3390/v12090984>
- Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of biochemistry and biophysics*, 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
- Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 10248–10253. <https://doi.org/10.1021/jf0521698>
- Erdős, G., Pajkos, M., & Dosztányi, Z. (2021). IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W297–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab408> (<https://iupred3.elte.hu/>)
- Fabri, J. H. T. M., Godoy, N. L., Rocha, M. C., Munshi, M., Cocio, T. A., von Zeska Kress, M. R., Fill, T. P., da Cunha, A. F., Del Poeta, M., & Malavazi, I. (2019). The AGC Kinase YpkA Regulates Sphingolipids Biosynthesis and Physically Interacts With SakA MAP Kinase in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 3347. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03347>
- Fehrenbacher, K. L., Boldogh, I. R., & Pon, L. A. (2005). A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 16(11), 5094–5102. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0590>
- Fields, S. D., Conrad, M. N., & Clarke, M. (1998). The *S. cerevisiae* *CLU1* and *D. discoideum* *cluA* genes are functional homologues that influence mitochondrial morphology and distribution. *Journal of cell science*, 111 (Pt 12), 1717–1727. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.12.1717>
- Fields, S. D., Arana, Q., Heuser, J., & Clarke, M. (2002). Mitochondrial membrane dynamics are altered in *cluA*- mutants of *Dictyostelium*. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(7-8), 829–838. <https://doi.org/10.1023/a:1024492031696>
- Fox, A. H., & Lamond, A. I. (2010). Paraspeckles. *Cold Spring Harbor perspectives*

- in biology*, 2(7), a000687. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000687>
- Freitas, J. S., Silva, E. M., Leal, J., Gras, D. E., Martinez-Rossi, N. M., Dos Santos, L. D., Palma, M. S., & Rossi, A. (2011). Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Cell stress & chaperones*, 16(5), 565–572. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0267-5>
  - Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., and Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* 56, 1246–1261. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x
  - Galez, H. A., Roelants, F. M., Palm, S. M., Reynaud, K. K., Ingolia, N. T., & Thorner, J. (2021). Phosphorylation of mRNA-Binding Proteins Puf1 and Puf2 by TORC2-Activated Protein Kinase Ypk1 Alleviates Their Repressive Effects. *Membranes*, 11(7), 500. <https://doi.org/10.3390/membranes11070500>
  - Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., & Rugarli, E. I. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *The Journal of cell biology*, 207(2), 213–223. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403129>
  - Garrido-Bazán, V., & Aguirre, J. (2022). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induces Calcium and ERMES Complex-Dependent Mitochondrial Constriction and Division as Well as Mitochondrial Outer Membrane Remodeling in *Aspergillus nidulans*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(8), 829. <https://doi.org/10.3390/jof8080829>
  - Garrido-Bazán, V., Jaimes-Arroyo, R., Sánchez, O., Lara-Rojas, F., & Aguirre, J. (2018). SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2518. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02518>
  - Garrido-Bazán, V., Pardo, J. P., & Aguirre, J. (2020). DnmA and FisA Mediate Mitochondria and Peroxisome Fission, and Regulate Mitochondrial Function, ROS Production and Development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in microbiology*, 11, 837. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00837>
  - Gavrias, V., Timberlake, W.E., Adams, T.H. (2001). *Aspergillus nidulans*. En S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp.106-111). Academic Press.



- Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J., & Hentze, M. W. (2021). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nature reviews. Genetics*, 22(3), 185–198. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00302-y>
- Gehi, B. R., Gadhawe, K., Uversky, V. N., & Giri, R. (2022). Intrinsic disorder in proteins associated with oxidative stress-induced JNK signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(4), 202. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04230-4>
- Goldman, G. H., & Kafer, E. (2004). *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41(4), 428–442. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.12.001>
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., & Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of biological chemistry*, 271(8), 4138–4142. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4138>
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Yoshimi, A., Mizuno, T., and Abe, K. (2009). Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* 46, 868–878. doi: 10.1016/j.fgb.2009.07.003
- Hannun, Y. A., & Bell, R. M. (1989). Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 185(3), 333–345. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90224-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90224-6)
- Haramati, O., Brodov, A., Yelin, I., Atir-Lande, A., Samra, N., & Arava, Y. (2017). Identification and characterization of roles for Puf1 and Puf2 proteins in the yeast response to high calcium. *Scientific reports*, 7(1), 3037. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02873-z>
- Hardin, S. C., Larue, C. T., Oh, M. H., Jain, V., & Huber, S. C. (2009). Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in *Arabidopsis*. *The Biochemical journal*, 422(2), 305–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20090764>
- Harley, J., Clarke, B. E., & Patani, R. (2021). The Interplay of RNA Binding Proteins, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in ALS. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(4), 552. <https://doi.org/10.3390/antiox10040552>
- Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., & Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(5), 327–341. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>



- Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P., & Adams, T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *The EMBO journal*, 16(16), 4916–4923. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4916>
- Holmes, K. J., Klass, D. M., Guiney, E. L., & Cyert, M. S. (2013). Whi3, an *S. cerevisiae* RNA-binding protein, is a component of stress granules that regulates levels of its target mRNAs. *PloS one*, 8(12), e84060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084060>
- Jaimes-Arroyo, R., Lara-Rojas, F., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., & Aguirre, J. (2015). The SrkA Kinase Is Part of the SakA Mitogen-Activated Protein Kinase Interactome and Regulates Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, 14(5), 495–510. <https://doi.org/10.1128/EC.00277-14>
- Joseph, J. D., & Means, A. R. (2000). Identification and characterization of two Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of biological chemistry*, 275(49), 38230–38238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006422200>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2> (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.*, 42, D199–D205.
- Kato, M., Yang, Y. S., Sutter, B. M., Wang, Y., McKnight, S. L., & Tu, B. P. (2019). Redox State Controls Phase Separation of the Yeast Ataxin-2 Protein via Reversible Oxidation of Its Methionine-Rich Low-Complexity Domain. *Cell*, 177(3), 711–721.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.044>
- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., & Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 45(4), 1153–1163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x>

- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology*, 147(7), 1431–1442. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1431>
- Kirova, D. G., Judasova, K., Vorhauser, J., Zerjatke, T., Leung, J. K., Glauche, I., & Mansfeld, J. (2022). A ROS-dependent mechanism promotes CDK2 phosphorylation to drive progression through S phase. *Developmental cell*, 57(14), 1712–1727.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.06.008>
- Kolev, N. G., Ullu, E., & Tschudi, C. (2014). The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Cellular microbiology*, 16(4), 482–489. <https://doi.org/10.1111/cmi.12268>
- Konishi, H., Fujiyoshi, T., Fukui, Y., Matsuzaki, H., Yamamoto, T., Ono, Y., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A., & Kikkawa, U. (1999). Activation of protein kinase B induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and heat shock through distinct mechanisms dependent and independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of biochemistry*, 126(6), 1136–1143. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022559>
- Korak, T., Asir, F., Isik, E., Cengiz, N. (2021). Multiple sequence alignment quality comparison in T-Coffee, MUSCLE and M-Coffee based on different benchmarks. *Cumhuriyet Science Journal* 42(3):526-535. DOI: 10.17776/csj.842265
- Kornstein, L. B., Gaiso, M. L., Hammell, R. L., & Bartelt, D. C. (1992). Cloning and sequence determination of a cDNA encoding *Aspergillus nidulans* calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *Gene*, 113(1), 75–82. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90671-b](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90671-b)
- Kobayashi, T., & Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *The Biochemical journal*, 339 ( Pt 2)(Pt 2), 319–328.
- Kozlov, G., Siddiqui, N., Coillet-Matillon, S., Trempe, J. F., Ekiel, I., Sprules, T., & Gehring, K. (2002). Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 277(25), 22822–22828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201230200>
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 74(1), 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>

- Kurischko, C., & Broach, J. R. (2017). Phosphorylation and nuclear transit modulate the balance between normal function and terminal aggregation of the yeast RNA-binding protein Ssd1. *Molecular biology of the cell*, 28(22), 3057–3069. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0100>
- Kurischko, C., Kim, H. K., Kuravi, V. K., Pratzka, J., & Luca, F. C. (2011). The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *The Journal of cell biology*, 192(4), 583–598. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011061>
- Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 50(4), 1241–1255. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x>
- Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., & Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular microbiology*, 80(2), 436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic acids research*, 49(D1), D458–D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937> (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)
- Logan, D. C., Scott, I., & Tobin, A. K. (2003). The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 36(4), 500–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01894.x>
- Londhe, A. D., Bergeron, A., Curley, S. M., Zhang, F., Rivera, K. D., Kannan, A., Coulis, G., Rizvi, S., Kim, S. J., Pappin, D. J., Tonks, N. K., Linhardt, R. J., & Boivin, B. (2020). Regulation of PTP1B activation through disruption of redox-complex formation. *Nature chemical biology*, 16(2), 122–125. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0433-0>
- Löwe, O., Rezende, F., Heidler, J., Wittig, I., Helfinger, V., Brandes, R. P., & Schröder, K. (2019). BIAM switch assay coupled to mass spectrometry identifies novel redox targets of NADPH oxidase 4. *Redox biology*, 21, 101125. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101125>
- Lunde, B. M., Moore, C., & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(6), 479–490. <https://doi.org/10.1038/nrm2178>
- Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and

- Functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424–2431.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>
- Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
  - Machin, N. A., Lee, J. M., & Barnes, G. (1995). Microtubule stability in budding yeast: characterization and dosage suppression of a benomyl-dependent tubulin mutant. *Molecular biology of the cell*, 6(9), 1241–1259.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.6.9.1241>
  - Malavazi, I., Savoldi, M., Di Mauro, S. M., Menck, C. F., Harris, S. D., Goldman, M. H., & Goldman, G. H. (2006). Transcriptome analysis of *Aspergillus nidulans* exposed to camptothecin-induced DNA damage. *Eukaryotic cell*, 5(10), 1688–1704. <https://doi.org/10.1128/EC.00167-06>
  - Mangus, D. A., Amrani, N., & Jacobson, A. (1998). Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Molecular and cellular biology*, 18(12), 7383–7396.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7383>
  - Mangus, D. A., Smith, M. M., McSweeney, J. M., & Jacobson, A. (2004). Identification of factors regulating poly(A) tail synthesis and maturation. *Molecular and cellular biology*, 24(10), 4196–4206. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4196-4206.2004>
  - Marcelo, A., Koppenol, R., de Almeida, L. P., Matos, C. A., & Nóbrega, C. (2021). Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell death & disease*, 12(6), 592. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03873-8>
  - Marhouf, J. F., & Adams, T. H. (1996). *Aspergillus FabM* encodes an essential product that is related to poly(A)-binding proteins and activates development when overexpressed. *Genetics*, 144(4), 1463–1470.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/144.4.1463>
  - Mészáros, B., Simon, I., & Dosztányi, Z. (2009). Prediction of protein binding regions in disordered proteins. *PLoS computational biology*, 5(5), e1000376.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000376>
  - Mirabito, P. M., Adams, T. H., & Timberlake, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus*

- development. *Cell*, 57(5), 859–868. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90800-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90800-3)
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
  - Momany M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 580–585. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00368-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00368-5)
  - Morrison D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
  - Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M. L., Lehrach, H., & Krobitsch, S. (2007). Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1385–1396. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1120>
  - Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042> (<https://tcoffee.org.eu/>)
  - Oakley, B. R., & Morris, N. R. (1981). A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell*, 24(3), 837–845. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90109-4)
  - Osmani, S. A., Engle, D. B., Doonan, J. H., & Morris, N. R. (1988). Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, 52(2), 241–251. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90513-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90513-2)
  - Osmani, S. A., & Mirabito, P. M. (2004). The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41(4), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.11.009>
  - Osmani, A. H., van Peij, N., Mischke, M., O'Connell, M. J., & Osmani, S. A. (1994). A single p34cdc2 protein kinase (encoded by nimXcdc2) is required at G1 and G2 in *Aspergillus nidulans*. *Journal of cell science*, 107 ( Pt 6), 1519–1528. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.6.1519>
  - Ostrowski, L. A., Hall, A. C., & Mekhail, K. (2017). Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease. *Genes*, 8(6), 157.

<https://doi.org/10.3390/genes8060157>

- Owen, I., & Shewmaker, F. (2019). The Role of Post-Translational Modifications in the Phase Transitions of Intrinsically Disordered Proteins. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5501. <https://doi.org/10.3390/ijms20215501>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>  
(<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>)
- Peñalva, M. A., & Arst, H. N., Jr (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual review of microbiology*, 58, 425–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123715>
- Pla-Martín, D., Schatton, D., Wiederstein, J. L., Marx, M. C., Khiati, S., Krüger, M., & Rugarli, E. I. (2020). CLUH granules coordinate translation of mitochondrial proteins with mTORC1 signaling and mitophagy. *The EMBO journal*, 39(9), e102731. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019102731>
- Pyrzak, W., Miller, K. Y., & Miller, B. L. (2008). Mating type protein Mat1-2 from asexual *Aspergillus fumigatus* drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, 7(6), 1029–1040. <https://doi.org/10.1128/EC.00380-07>
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D., & Bufton, A. W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, 5, 141–238. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(08\)60408-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(08)60408-3)
- Reineke, L. C., Tsai, W. C., Jain, A., Kaelber, J. T., Jung, S. Y., & Lloyd, R. E. (2017). Casein Kinase 2 Is Linked to Stress Granule Dynamics through Phosphorylation of the Stress Granule Nucleating Protein G3BP1. *Molecular and cellular biology*, 37(4), e00596-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00596-16>
- Rhee S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and cells*, 39(1), 1–5. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>
- Riback, J. A., Katanski, C. D., Kear-Scott, J. L., Pilipenko, E. V., Rojek, A. E., Sosnick, T. R., & Drummond, D. A. (2017). Stress-Triggered Phase Separation Is an Adaptive, Evolutionarily Tuned Response. *Cell*, 168(6), 1028–1040.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.027>
- Ronen, R., Sharon, H., Levdansky, E., Romano, J., Shadkchan, Y., & Osherov, N.



- (2007). The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. *Current genetics*, 51(5), 321–329. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0129-y>
- Saito, Y., & Kimura, W. (2021). Roles of Phase Separation for Cellular Redox Maintenance. *Frontiers in genetics*, 12, 691946. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.691946>
  - Sato, M., Irie, K., Suda, Y., Mizuno, T., & Irie, K. (2022). The RNA-binding protein Puf5 and the HMGB protein Ixr1 contribute to cell cycle progression through the regulation of cell cycle-specific expression of CLB1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 18(7), e1010340. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010340>
  - Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 11(4), 173–186. <https://doi.org/10.1159/000047804>
  - Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Bourexis, D., Brister, J. R., Canese, K., Comeau, D. C., Funk, K., Kim, S., Klimke, W., Marchler-Bauer, A., Landrum, M., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., O'Leary, N., Phan, L., Rangwala, S. H., Schneider, V. A., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2021). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 49(D1), D10–D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa892> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
  - Schatton, D., Pla-Martin, D., Marx, M. C., Hansen, H., Mourier, A., Nemazanyy, I., Pessia, A., Zentis, P., Corona, T., Kondylis, V., Barth, E., Schauss, A. C., Velagapudi, V., & Rugarli, E. I. (2017). CLUH regulates mitochondrial metabolism by controlling translation and decay of target mRNAs. *The Journal of cell biology*, 216(3), 675–693. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607019>
  - Schlissel, G., Krzyzanowski, M. K., Caudron, F., Barral, Y., & Rine, J. (2017). Aggregation of the Whi3 protein, not loss of heterochromatin, causes sterility in old yeast cells. *Science*, 355(6330), 1184–1187. doi:10.1126/science.aaj2103
  - Schoustra, S. E., Debets, A. J., Slakhorst, M., & Hoekstra, R. F. (2007). Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS genetics*, 3(4), e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030068>

- Sheard, K. M., Thibault-Sennett, S. A., Sen, A., Shewmaker, F., & Cox, R. T. (2020). Clueless forms dynamic, insulin-responsive stress granules sensitive to stress. *Developmental biology*, 459(2), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.12.004>
- Shiraishi, K., Hioki, T., Habata, A., Yurimoto, H., & Sakai, Y. (2018). Yeast Hog1 proteins are sequestered in stress granules during high-temperature stress. *Journal of cell science*, 131(1), jcs209114. <https://doi.org/10.1242/jcs.209114>
- Sigrist, C. J., de Castro, E., Cerutti, L., Cuče, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067> (<https://prosite.expasy.org/>)
- Sen, A., & Cox, R. T. (2016). Clueless is a conserved ribonucleoprotein that binds the ribosome at the mitochondrial outer membrane. *Biology open*, 5(2), 195–203. <https://doi.org/10.1242/bio.015313>
- Sen, A., Damm, V. T., & Cox, R. T. (2013). *Drosophila clueless* is highly expressed in larval neuroblasts, affects mitochondrial localization and suppresses mitochondrial oxidative damage. *PLoS one*, 8(1), e54283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054283>
- Shazman, S., & Mandel-Gutfreund, Y. (2008). Classifying RNA-binding proteins based on electrostatic properties. *PLoS computational biology*, 4(8), e1000146. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000146>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Skromne, I., Sánchez, O., & Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology (Reading, England)*, 141 ( Pt 1), 21–28. <https://doi.org/10.1099/00221287-141-1-21>
- Schladebeck, S., & Mösch, H. U. (2013). The RNA-binding protein Whi3 is a key regulator of developmental signaling and ploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(1), 73–86. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153775>
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in microbiology*, 7, 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>



- Sohn, K. T., & Yoon, K. S. (2002). Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology*, 30(3), 117–127. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2002.30.3.117>
- Son, S. H., Jang, S. Y., & Park, H. S. (2021). Functions of PUF Family RNA-Binding Proteins in *Aspergillus nidulans*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(5), 676–685. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01011>
- Soukup, A. A.; Fischer, G. J.; Luo, J.; Keller, N. P. The *Aspergillus nidulans* Pbp1 homolog is required for normal sexual development and secondary metabolism. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 2017, 100, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.004>
- Spassov, D. S., & Jurecic, R. (2003). The PUF family of RNA-binding proteins: does evolutionarily conserved structure equal conserved function? *IUBMB life*, 55(7), 359–366. <https://doi.org/10.1080/15216540310001603093>
- Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P. (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.*, 47, D607–D613.
- Timberlake W. E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annual review of genetics*, 24, 5–36. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.24.120190.000253>
- Todd, R. B., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature protocols*, 2(4), 811–821. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
- Troppens, D. M., Köhler, A. M., Schlüter, R., Hoppert, M., Gerke, J., & Braus, G. H. (2020). Hülle Cells of *Aspergillus nidulans* with Nuclear Storage and Developmental Backup Functions Are Reminiscent of Multipotent Stem Cells. *mBio*, 11(4), e01673-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01673-20>
- Truong, T. H., Ung, P. M., Palde, P. B., Paulsen, C. E., Schlessinger, A., & Carroll, K. S. (2016). Molecular Basis for Redox Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase. *Cell chemical biology*, 23(7), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.05.017>
- UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>

[\(https://www.uniprot.org/\)](https://www.uniprot.org/)

- Yang, Y. S., Kato, M., Wu, X., Litsios, A., Sutter, B. M., Wang, Y., Hsu, C. H., Wood, N. E., Lemoff, A., Mirzaei, H., Heinemann, M., & Tu, B. P. (2019). Yeast Ataxin-2 Forms an Intracellular Condensate Required for the Inhibition of TORC1 Signaling during Respiratory Growth. *Cell*, 177(3), 697–710.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.043>
- Yang, H., Sibilla, C., Liu, R., Yun, J., Hay, B. A., Blackstone, C., Chan, D. C., Harvey, R. J., & Guo, M. (2022). Clueless/CLUH regulates mitochondrial fission by promoting recruitment of Drp1 to mitochondria. *Nature communications*, 13(1), 1582. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29071-4>
- Yu, Z., Armant, O., and Fischer, R. (2016). Fungi use the Saka (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signaling. *Nat. Microbiol.* 1:16019. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.19
- Yu, J. H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual review of phytopathology*, 43, 437–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
- Vaishali, Dimitrova-Paternoga, L., Haubrich, K., Sun, M., Ephrussi, A., & Hennig, J. (2021). Validation and classification of RNA binding proteins identified by mRNA interactome capture. *RNA (New York, N.Y.)*, 27(10), 1173–1185. <https://doi.org/10.1261/rna.078700.121>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061> (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)
- Vasudevan, S., Garneau, N., Tu Khounh, D., & Peltz, S. W. (2005). p38 mitogen-activated protein kinase/Hog1p regulates translation of the AU-rich-element-bearing MFA2 transcript. *Molecular and cellular biology*, 25(22), 9753–9763. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.9753-9763.2005>
- Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., & Aldea, M. (2007). Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Molecular cell*, 26(5), 649–662.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.023>

- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., & de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 280(10), 9149–9159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>
- Wakim, J., Goudenege, D., Perrot, R., Gueguen, N., Desquiret-Dumas, V., Chao de la Barca, J. M., Dalla Rosa, I., Manero, F., Le Mao, M., Chupin, S., Chevrollier, A., Procaccio, V., Bonneau, D., Logan, D. C., Reynier, P., Lenaers, G., & Khiati, S. (2017). CLUH couples mitochondrial distribution to the energetic and metabolic status. *Journal of cell science*, 130(11), 1940–1951. <https://doi.org/10.1242/jcs.201616>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033> (<https://www.jalview.org/>)
- Weitsman, G. E., Weebadda, W., Ung, K., & Murphy, L. C. (2009). Reactive oxygen species induce phosphorylation of serine 118 and 167 on estrogen receptor alpha. *Breast cancer research and treatment*, 118(2), 269–279. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0221-0>
- Wiedner, H. J., & Giudice, J. (2021). It's not just a phase: function and characteristics of RNA-binding proteins in phase separation. *Nature structural & molecular biology*, 28(6), 465–473. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00601-w>
- Wilinski, D., Buter, N., Klocko, A. D., Lapointe, C. P., Selker, E. U., Gasch, A. P., & Wickens, M. (2017). Recurrent rewiring and emergence of RNA regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(14), E2816–E2825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617777114>
- Wilinski, D., Qiu, C., Lapointe, C. P., Nevil, M., Campbell, Z. T., Tanaka Hall, T. M., & Wickens, M. (2015). RNA regulatory networks diversified through curvature of the PUF protein scaffold. *Nature communications*, 6, 8213. <https://doi.org/10.1038/ncomms9213>
- Zhang, Y., Qian, D., Li, Z., Huang, Y., Wu, Q., Ru, G., Chen, M., & Wang, B. (2016). Oxidative stress-induced DNA damage of mouse zygotes triggers G2/M checkpoint and phosphorylates Cdc25 and Cdc2. *Cell stress & chaperones*, 21(4), 687–696.

<https://doi.org/10.1007/s12192-016-0693-5>

- Zhao, W., Panepinto, J. C., Fortwendel, J. R., Fox, L., Oliver, B. G., Askew, D. S., & Rhodes, J. C. (2006). Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage, and virulence. *Infection and immunity*, 74(8), 4865–4874.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00565-06>
- Zonneveld, B. (1988) Morphology of initials and number of nuclei initiating cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Trans Br Mycol Soc* 90:369 –373.  
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80145-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80145-1).