



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR
ÁREA TERMINAL BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Papel de microARNs en la regulación de los mecanismos de tolerancia a estrés salino por NaCl en el hongo halófilo *Aspergillus sydowii*

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Michel Alexander Wilson Hernández**

**Director de tesis:
Dr. Ramón Alberto Batista García
Codirector de tesis:
Dr. Yordanis Pérez Llano**

CUERNAVACA, MORELOS.

Febrero 2022

MIEMBROS DEL JURADO

JURADO	NOMBRE	ADSCRIPCIÓN
Presidente	Dra. María del Rayo Sánchez-Carbente	CEIB-UAEM
Secretario	Dra. Sonia Dávila Ramos	CIDC-UAEM
Vocal	Dr. Ramón Alberto Batista García	CIDC-UAEM
Suplente	Dra. Nilda del Carmen Sánchez Castellanos	CCG-UNAM
Suplente	Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo	CIDC-UAEM

RESUMEN

Los microorganismos halófilos son organismos que pueden crecer en altas concentraciones de NaCl. Este grupo de microorganismos está conformado por procariontes en su mayoría, pero también se han identificado otros organismos eucariontes como los hongos. *Aspergillus sydowii* es un hongo ascomiceto halófilo que por sus características ha sido propuesto como un organismo modelo para el análisis molecular de las adaptaciones ante condiciones de alta salinidad. Algunos de los mecanismos que utiliza este hongo para contrarrestar el estrés causado por las altas concentraciones de NaCl son: aumento en la fluidez de la membrana plasmática, cambio en la composición y rigidez de la pared celular, acumulación de solutos compatibles y cambios en la expresión de transportadores de membrana.

En algunos hongos, se ha identificado que el RNA pequeño juega un papel importante en la regulación de la formación de heterocromatina, genes endógenos, elementos transponibles, defensa contra patógenos, patogénesis y adaptación a condiciones de estrés mediante mecanismos de RNA de interferencia (RNAi). Los micro ARN (miRNA) son un tipo de RNA pequeño que regulan la información genética a nivel postranscripcional mediante la degradación, relocalización o inhibición de la traducción de ARNm. A la fecha no existe información sobre la regulación por miRNAs de los mecanismos de halofilia en hongos halófilos.

En algunos hongos la maquinaria de síntesis de RNA pequeño desapareció, por lo que la búsqueda de proteínas Dicer, Argonauta y RdRp es comúnmente utilizada para identificar si estos mecanismos de regulación están conservados. En este trabajo hallamos secuencias de proteínas Dicer y Argonauta en los subgéneros más importantes del género *Aspergillus*, lo que confirma que en este género se han conservado los mecanismos de regulación mediados por RNA pequeño. Con las secuencias de estas proteínas se construyeron árboles filogenéticos que permitieron identificar eventos de duplicación que dieron lugar a la aparición de las familias Argonauta 1 y 2, y Dicer 1 y 2. *A. sydowii* tiene una enzima Dicer 1 y Dicer 2 y mantiene una Argonauta 1 y dos Argonautas 2.

En las proteínas Argonauta se buscó el sitio catalítico DEDX y residuos de aminoácidos que interactúan con Cap para identificar in silico cuales de estas proteínas mantienen actividad catalítica de RNasa y cuales inhiben los eventos de traducción inhibiendo el reconocimiento del Cap por eIF4E. Una de las Argonautas 2 no mantiene actividad catalítica y solo la Argonauta 1 tiene los aminoácidos necesarios para interactuar con el Cap.

Usando la base de datos STRING en *Aspergillus nidulans*, encontramos 17 proteínas homologas a proteínas que posiblemente participen en la síntesis de miRNAs en otros organismos eucariontes y mediante homología de secuencia identificamos 16 de estas proteínas en *A. sydowii*.

Finalmente se hicieron extracciones de RNA total por triplicado en *A. sydowii* cuando crece en medio de cultivo sin NaCl, en 0.5 M y 2.0 M de NaCl, con el objetivo de aislar y secuenciar RNAs pequeños que participen en la regulación de los mecanismos de halofilia en estas condiciones. De estas extracciones, solo se obtuvieron 5 muestras que cumplen con los criterios de calidad para la secuenciación de RNA.

ABSTRACT

Halophilic microorganisms are organisms that can grow in high concentrations of NaCl. This group of microorganisms is conformed mainly by prokaryotes, but eukaryote microorganisms like fungi have also been found. *Aspergillus sydowii* is an ascomycete fungus and for its characteristics it has been proposed as a model organism for the molecular study of adaptations to high salinity conditions. Some of the mechanisms used by this fungus to counteract the stress caused by high concentrations of NaCl are: increase in plasma membrane fluidity, change in composition and rigidity of the cell wall, accumulation of compatible solutes and change in expression pattern of membrane transporters.

In some fungi, it has been found that small RNA plays an important role in the regulation of heterochromatine formation, endogenous genes, transposable elements, defense against pathogens, pathogenesis, and adaptation to stress conditions by RNA interference (RNAi) mechanisms. Micro RNA (miRNA) is a type of small RNA that regulate genetic information at posttranscriptional level by degradation, relocation, or inhibition of mRNA translation. At the present time, there is no information about regulation of halophilic mechanisms by small RNA in halophilic fungi.

In some pathogenic fungi the synthesis machinery of small RNA has been lost. The search of Dicer, Argonaute and RdRp proteins is commonly used to identify if this regulation mechanisms are conserved. In this study we found sequences of Dicer and Argonaute proteins in the most important subgenus of *Aspergillus*, these findings confirm that mechanisms of gene regulation by small RNA are conserved in the *Aspergillus* genus. With the sequences of these proteins, we built phylogenetic trees that allowed us to identify duplication events that gave rise to the appearance of Argonaute 1 and 2, and Dicer 1 and 2 families. *A. sydowii* has a pair of Dicer 1 and 2 enzymes and has one Argonaute 1 and two Argonaute 2 proteins.

In Argonaute proteínas we searched the catalytic domain DEDX and amino acid residues that interact with Cap to identify in silico which Argonautes conserved RNase catalytic activity and which inhibit translation initiation events by inhibition of Cap recognition by eIF4E. One of the two Argonaute 2 proteins does not have catalytic activity and only the Argonaute 1 has the amino acid residues required for interaction with Cap.

Using the STRING database in *Aspergillus nidulans*, we found 17 homologue proteins to proteins involved in the synthesis of miRNAs in other eukaryotic organisms and by sequence homology we found 16 of these proteins in *A. sydowii*.

Finally, we made extractions of total RNA by triplicate in *A. sydowii* when it grows in culture media without NaCl, 0.5 M and 2.0 M of NaCl, with the objective of isolate and sequence small RNAs that function in the regulation of halophilic mechanisms in these conditions. From these extractions, we only obtained 5 samples that meet the quality criteria for RNA sequencing.

Agradecimientos

Ahora que he cumplido una meta más en mi vida, la más importante hasta este punto, miro hacia atrás y veo que no hubiera podido llegar hasta donde estoy sino hubiera sido por el apoyo incondicional de muchísimas personas a lo largo de mi camino. No soy muy bueno con las palabras y expresando mis sentimientos, pero a través de este corto texto quiero agradecerles por todo.

Quiero empezar con mi familia, el pilar más importante en mi vida, quienes me han formado como persona y quienes me han tolerado y amado durante estos 22 años de vida. Gracias, mamá por tu paciencia, por haberme apoyado con todo el corazón en todo y siempre alentarme y animarme a esforzarme por ser una mejor persona. Gracias abuelita por siempre preocuparte por mí y por prepararme ese atole de ciruela con bolitas tan delicioso que solo tú sabes hacer. Gracias, tía Paula por siempre quererme como a un hijo y apoyarme en todo. Gracias, tío Javier por siempre darme consejo. Y gracias, tío/padrino Cirilo por siempre apoyarme en todas las formas posibles y alentarme a estudiar, sin ti no hubiera sido posible cumplir el sueño de ir a la Universidad. ¡¡¡Gracias!!!

También quiero agradecer a mis amigos, con quienes he pasado algunos de los momentos más felices, difíciles y desafiantes a lo largo de mi etapa universitaria. Gracias Alexis, por todas las risas, viajes, buenos momentos y por todas esas batallas ganadas y perdidas que hemos tenido. Gracias, Fer por toda tu amistad, por todas esas horas en la biblioteca y laboratorio, y por todas esas salidas al cine que tuvimos. Y gracias, Enrique por todas las risas que pasamos, horas de estudio y buenos momentos.

En lo académico quiero agradecer a mi profesor de preparatoria Juan Carlos Chaves por mostrarme el camino de la ciencia, a mi tutor el Dr. Ramón Batista quien confió en mí desde mis primeros años de preparación universitaria y me dio la oportunidad de estar en su grupo de investigación y al Dr. Yordanis Pérez quien me ha ayudado a lo largo de este trabajo de investigación. Muchas gracias por su amistad y este solo es el principio de grandes cosas que están por venir.

Finalmente, quiero agradecer a CONACYT por el apoyo económico en este trabajo de investigación mediante los proyectos 285816, 1004, 1559 al Dr. Ramón Alberto Batista García.

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
1.- INTRODUCCIÓN	2
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Microorganismos halófilos	3
2.2.- Mecanismos de halofilia.....	3
2.3.- <i>Aspergillus sydowii</i>	5
2.4.- RNA de interferencia (RNAi).....	9
2.5.- RNA pequeño interferente (siRNA)	13
2.6.- Micro RNA (miRNA).....	14
2.7.- Mecanismo de RNAi en hongos	20
3.- HIPOTESIS	24
4.- OBJETIVOS	24
5.- MATERIALES Y METODOS.....	25
5.1.- Identificación de proteínas Dicer y Argonauta de <i>Aspergillus</i>	25
5.2.- Alineamiento y Construcción de Árboles Filogenéticos.....	25
5.3.- Identificación in silico de posibles vías de síntesis de miRNAs en el hongo <i>A. sydowii</i>	26
5.4.- Cepa, condiciones de cultivo y conservación	26
5.5.- Extracción de RNA total.....	27
6.- RESULTADOS	28
6.1.- Proteínas Dicer y Argonauta del género <i>Aspergillus</i>	28
6.2.- Proteínas involucradas en la síntesis de miRNAs en <i>Aspergillus sydowii</i>	35
6.2.1.- Proteína de Resistencia a Arsénico (Ars2).....	37
6.2.2.- Deaminasa de Adenosina Actuante sobre tRNA (ADAT).....	37
6.2.3.- Tudor-SN.....	39
6.2.4.- Hsp90 y Hsp70.....	40
6.2.5.- Trans/TRAX.....	41
6.2.6.- Pérdida de Cap 5' (Deccaping)	42
6.3.- Extracción de RNA	44
7.- CONCLUSIONES	46
8.- BIBLIOGRAFIA.....	49

LISTADO DE ABREVIATURAS

RNA	Ácido Ribonucleico, del inglés.
RNAi	ARN de Interferencia, del inglés.
dsRNA	ARN doble cadena, del inglés.
siRNA	ARN pequeño interferente, del inglés.
miRNA	Micro ARN, del inglés.
Pri-miRNA	Micro ARN primario, del inglés.
Pre-miRNA	Estructura previa al miRNA maduro.
mRNA	ARN mensajero, del inglés
HOG	Alta osmolaridad del glicerol, del inglés.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno, del inglés.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN, del inglés.
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA, del inglés.
DGCR8	Región critica gene-8 del síndrome de DiGeorge, del inglés.

1.- INTRODUCCIÓN

Análisis morfológicos y moleculares en los hongos halófilos y halotolerantes modelo *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii* y *Wallemia ichthyophaga*, y la levadura sensible a sal *Saccharomyces cerevisiae* han revelado una serie de mecanismos de halofilia para la adaptación de hongos a ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman et al., 2009). Algunas de estos mecanismos son: síntesis de solutos compatibles, activación de la vía HOG, cambios en la fluidez y composición de la membrana plasmática, cambio en la composición y engrosamiento de la pared celular, y cambios en la composición de transportadores de membrana (Plemenitaš et al., 2014a).

Aspergillus sydowii es un hongo ascomiceto halófilo que por sus características ha sido propuesto como un organismo modelo para el análisis molecular de las adaptaciones de hongos ascomicetos ante condiciones de alta salinidad. En estudios previos de nuestro laboratorio en el hongo *Aspergillus sydowii* BMH-0004, se identificaron algunos mecanismos de halofilia. Se analizó la acumulación de manitol, trehalosa, eritritol, arabitol y glicerol como solutos compatibles en distintas condiciones y la expresión de genes involucrados en su síntesis. Aumento en la fluidez de la membrana plasmática mediado por el aumento de las insaturaciones en los fosfolípidos y síntesis de ergosterol. Cambio en la composición, reordenamiento y engrosamiento de la pared celular mediado por el aumento en la síntesis y ramificaciones de β -glucanos y disminución de quitina y quitosano. Aumento en la expresión de transportadores de internalización de azúcares, aminoácidos y otros metabolitos que corresponden a la degradación de paja de trigo (Pérez-Llano et al., 2020; Rodríguez-Pupo et al., 2021).

El mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento de genes guiado por RNA pequeño que puede ser de origen endógeno o exógeno. Los micro RNAs (miRNAs) son RNAs de aproximadamente 22nt que están codificados en el genoma. Mediante complementariedad de secuencia, los miRNAs dirigen al complejo de silenciamiento RISC para regular la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la inhibición de la traducción, relocalización o degradación del transcrito (Chu & Rana, 2008).

Se han identificado miRNAs en hongos y se han descrito algunas vías de síntesis en *Neurospora crassa* (Lee et al., 2010). Hasta la fecha no se ha publicado un análisis de miRNAs en hongos halófilos para describir como estos regulan los mecanismos de halofilia en ambientes de alta salinidad, por lo que este será el primer estudio en el campo. El objetivo de este trabajo es identificar in silico proteínas que posiblemente participen en la síntesis de miRNAs en el hongo *Aspergillus sydowii*, extraer y analizar el transcriptoma de miRNAs y encontrar cuales podrían ser los posibles blancos biológicos. Esta aproximación de transcriptómica de RNA pequeños se sumará a la creciente información que está obteniendo nuestro grupo de investigación en cuanto a la regulación transcripcional de los mecanismos de respuesta a condiciones de salinidad.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Microorganismos halófilos

Existen microorganismos que colonizan hábitats con condiciones extremas como alta y baja temperatura, alta presión, alta salinidad, sistemas ácidos y básicos, desecación y radiación ultravioleta o ionizante. Los microorganismos que pueden prosperar en estas condiciones se clasifican como extremotolerantes si pueden tolerar estas condiciones, pero crecen óptimamente fuera de ellas y extremófilos si requieren obligatoriamente de estas condiciones para crecer (Singh et al., 2018).

Los microorganismos halófilos son aquellos que pueden crecer en altas concentraciones de NaCl y se clasifican en tres grupos con base en la concentración de sal donde tienen un crecimiento óptimo: ligeros entre 0.2-0.85M de NaCl (1-5%), moderado entre 0.85-3.4M de NaCl (5-20%) y extremos entre 3.4-5.1M de NaCl (20-30%) (DasSarma & DasSarma, 2017). Los halófilos están conformados principalmente por microorganismos procariontes, pero también se han identificado algunos eucariontes como protistas y hongos (Ventosa et al., 2015).

2.2.- Mecanismos de halofilia

La exposición a alta salinidad induce un estrés osmótico y estrés iónico. El estrés hiperosmótico en organismos no adaptados causa que las células se deshidraten e incrementen la concentración de solutos en el citoplasma. Cuando hay estrés iónico, los iones entran a la célula, lo que causa un incremento en la cantidad de iones intracelulares que pueden dañar las membranas y el sistema citosólico (Plemenitaš et al., 2014b).

Los microorganismos halófilos han desarrollado distintas estrategias para poder balancear el estrés osmótico e iónico de los ambientes hipersalinos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo sensible a sal, que ha sido utilizado para entender algunas respuestas a las altas concentraciones de NaCl, pero los hongos *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii* y *Wallemia ichthyophaga* han sido propuestos como organismos modelo para estudiar los mecanismos de halofilia y halotolerancia (Gunde-Cimerman et al., 2009).

Acumulación de solutos compatibles

Las bacterias y algunos organismos eucariontes como los hongos utilizan la estrategia de “salt out”. Esta estrategia consiste en excluir las sales del citosol y sintetizar o almacenar solutos compatibles, que no interfieran con la maquinaria de las células (DasSarma & DasSarma, 2015). Los solutos compatibles son moléculas orgánicas osmóticamente activas y se clasifican en zwitterionicos, no cargados y aniónicos. Estas moléculas pueden ser polialcoholes y derivados, azúcares y derivados, aminoácidos y derivados, betainas, ectoínas y ocasionalmente péptidos alterados para remover cargas (Roberts, 2005).

Los hongos halófilos y halotolerantes modelo *D. hansenii*, *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* sintetizan y/o acumulan glicerol como su principal soluto compatible. La síntesis, transporte y retención de glicerol en estos hongos, está estrechamente regulado. También se ha visto que las vías de síntesis, transporte y retención de este soluto son adaptaciones importantes contra estrés salino. Además de glicerol, otros hongos y levaduras producen y/o acumulan polialcoholes como eritritol, ribitol, arabinitol, xilitol, sorbitol, manitol y galacticol (Gunde-Cimerman et al., 2009).

Detección y señalización de cambios en osmolaridad

La habilidad de medir los cambios en la concentración de Na⁺ en el medio extracelular es de vital importancia para la supervivencia celular en ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman et al., 2009). En hongos la principal vía de señalización para medir estos cambios y montar una respuesta celular es la vía de alta osmolaridad del glicerol (HOG), que consiste en una cascada de fosforilación en proteínas MAPK cinasas. Esta vía ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae*, pero también se han identificado y caracterizado diversos componentes de la vía HOG en *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* (Plemenitaš et al., 2014b).

En *S. cerevisiae*, la primera parte de la vía de señalización de HOG contiene dos ramas que se caracterizan por los receptores SLN1 y SHO1. En respuesta a estrés hiperosmótico, ambas ramas convergen en la activación de la MAPKK Pbs2, que activa por fosforilación a la MAPK Hog1. Hog1 es importada a núcleo donde regula la transcripción, el ciclo celular, activa la vía de síntesis de glicerol y otras vías. Cuando la turgencia se reestablece, Hog1 es inactivada por fosfatasa y es exportada al citoplasma (Plemenitaš et al., 2014b; Saito & Posas, 2012).

Modificación de la pared celular

La pared celular de los hongos provee una barrera protectora contra diferentes condiciones ambientales como calor, frío, disecación y estrés osmótico. Esta estructura está conformada mayoritariamente por quitina, quitosano, β -(1,3)-glicanos que se pueden ramificar con β -(1,6)-glicanos, una mezcla de β -(1,3)-/ β -(1,4)-glicanos, α -(1,3)-glicanos, melanina y algunas glicoproteínas (Free, 2013).

Los hongos halófilos han desarrollado la capacidad de modificar esta estructura. *W. ichthyophaga* en respuesta al estrés salino, engrosa su pared 1.6 veces al pasar de 15% (2.57M) a 25% (4.28M) de NaCl (Plemenitaš et al., 2014b). El transcriptoma de *Aspergillus salisburgensis* cuando crece en 5 y 20% (0.85 M y 3.42 M) de NaCl, mostró que había sobreexpresión de transcritos cuyas proteínas se ubican en la periferia celular y región extracelular. La función de estos transcritos se asocia con proteínas de reparación de pared celular como la D-alanina-D-alanina ligasa y la manosa-6-fosfato isomerasa. Esto indica que hay daño en la pared celular cuando el hongo crece en estas condiciones (Tafer et al., 2019).

Modificación de la membrana plasmática

Los cambios en la membrana plasmática han sido descritos como importantes en la adaptación de microorganismos a distintas condiciones de estrés. Los ácidos grasos tienen efectos importantes en las propiedades de la membrana y la composición de estos tiene roles importantes en la retención de glicerol. *H. werneckii* y *D. hansenii* mostraron una menor proporción de esterol-fosfolípidos y mayor fluidez en la membrana plasmática que *S. cerevisiae*. Esto indica que existe una conexión entre la capacidad de prosperar en condiciones saladas y una baja proporción esterol-fosfolípidos. Además, *H. werneckii* puede aumentar los niveles de insaturación de los fosfolípidos de sus ácidos grasos (Gunde-Cimerman et al., 2009).

Transporte de cationes

Para evitar concentraciones tóxicas de iones en la región intracelular y mantener una proporción estable y alta de K^+/Na^+ , las levaduras utilizan transportadores de membrana que tienen mayor afinidad por K^+ que por Na^+ , efluyen las concentraciones tóxicas de Na^+ fuera o los transportan a organelos específicos. En *S. cerevisiae*, se han descrito seis tipos de transportadores a nivel de membrana y tres intracelulares que corresponden a las membranas de la vacuola, sistema endosomal y aparato de Golgi (Ariño et al., 2010). Mediante análisis genómico y transcriptómico, se ha identificado que en los hongos *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* tienen homólogos del sistema de captación K^+ Trk, antiportadores Nha que expulsa $Na^+(K^+)$ e introducen H^+ , Ena Na^+ -ATPasa tipo P o intercambiadores Na^+/H^+ y simportadores Pho89 Na^+/Pi (solo *W. ichthyophaga*) (Plemenitaš et al., 2014b; Zajc et al., 2013).

2.3.- *Aspergillus sydowii*

Aspergillus sydowii es un hongo ascomiceto que, debido a su ecología extremotolerante y su potencial biotecnológico, ha sido propuesto como un organismo modelo para el análisis molecular de las adaptaciones ante condiciones de alta salinidad (Pérez-Llano et al., 2020). Se han identificado distintas cepas de *A. sydowii* capaces de habitar ambientes hipersalinos. En nuestro laboratorio se ha estudiado la cepa BMH-0004, aislada de una muestra de bagazo de caña de azúcar (Batista-García et al., 2014). De acuerdo con la clasificación de Dassarma 2017, esta cepa es un halófilo moderado ya que su crecimiento óptimo se encuentra entre 0.5-1.0 M de NaCl, pero puede crecer en múltiples concentraciones de sal e incluso sin sal (Batista-García et al., 2014; DasSarma & DasSarma, 2017).

Mediante un análisis del transcriptoma y la acumulación de solutos compatibles en la cepa BMH-0004 realizado por nuestro laboratorio, se identificaron algunos de los mecanismos que utiliza el hongo para tolerar salinidad. Las modificaciones fisiológicas más evidentes en este hongo ocurren en alta salinidad (2.0 M) y no en la condición óptima (0.5 M). Esto sugiere que la mayoría de los mecanismos que se

describen en este hongo son consecuencia de la respuesta al estrés salino y no una adaptación a salinidad (Pérez-Llano et al., 2020; Rodríguez-Pupo et al., 2021).

Cuando no hay NaCl en el medio de cultivo, el hongo está sometido a un estrés hipoosmótico. En esta condición el manitol fue el soluto que más se acumuló, seguido de trehalosa y eritritol (Figura 1). Se produjo un incremento en la expresión del gen de hidrofobina *sih4* y un aumento en la transcripción de genes de catabolismo de carbohidratos y degradación de otro tipo de substratos (Pérez-Llano et al., 2020; Rodríguez-Pupo et al., 2021).

La condición de salinidad donde el hongo tiene crecimiento óptimo es 0.5 M de NaCl. Los solutos que se acumularon en esta condición fueron manitol, eritritol y arabitol (Figura 1). Las vías anabólicas se ven favorecidas y aumenta la expresión de sistemas de transporte a través de la membrana para la adquisición eficiente de nutrientes en lugar de sintetizar enzimas extracelulares que son costosas energéticamente (Pérez-Llano et al., 2020; Rodríguez-Pupo et al., 2021).

Cuando el hongo crece en 2.0 M de NaCl se observan las mayores modificaciones en su fisiología, debido a que hay un estrés hiperosmótico. El glicerol solo se detectó en estas condiciones, pero también se acumuló trehalosa y eritritol (Figura 1). Se observó una sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis y transporte de glicerol del medio extracelular. Además, se propuso que hay un cambio en la composición y grosor de la pared celular debido a la sobre expresión de genes relacionados con la degradación de quitina y quitosano, y la síntesis y modificación β -glucanos. La composición de la membrana plasmática podría verse afectada por la expresión de genes de ácido graso desaturasa y metilesterol monooxigenasa para hacerla más fluida mediante el aumento de insaturaciones de los fosfolípidos y el aumento en la síntesis de ergosterol. Finalmente, también se observó sobreexpresión de las hidrofobinas *sih1* y *sih2* (Pérez-Llano et al., 2020; Rodríguez-Pupo et al., 2021)

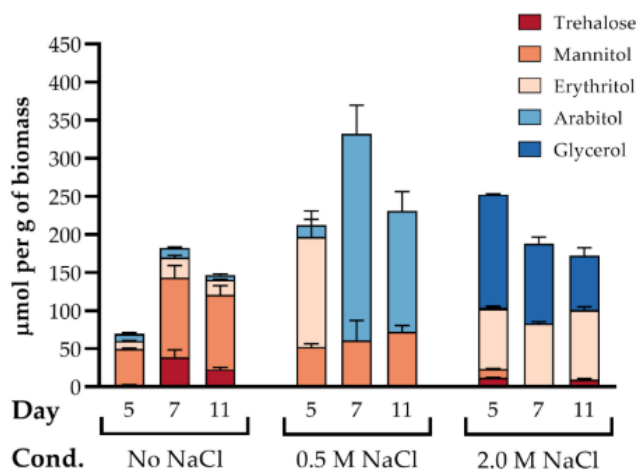


Figura 1) Acumulación de solutos compatibles en *Aspergillus sydowii* BMH-0004. La concentración de cada soluto fue medida en los días 5, 7 y 11 después de la inoculación. Figura tomada de Rodríguez-Pupo et al., 2021.

El genoma de *A. sydowii* codifica un alto número de transportadores APC que podrían estar involucrados en la absorción rápida de aminoácidos. Esto podría indicar que al igual que en algunos procariontes, la acumulación de aminoácidos sirve para regular la osmosis, aunque esto aún no se ha estudiado en hongos halófilos. Con respecto a la vía HOG, *A. sydowii* codifica dos variantes de la MAPK *hogA*, pero ninguna de ellas se sobre expresó (Pérez-Llano et al., 2020).

Cuando el hongo creció en 0.5 M de NaCl, se observó un aumento en la expresión de transcritos relacionados con proteínas de transporte. La mayoría de estos transcritos no están involucrados en regular el estrés iónico, sino que participan en la internalización de azúcares, aminoácidos y otros metabolitos que corresponden a la degradación de paja de trigo (Pérez-Llano et al., 2020).

El gen *ena2* que codifica a una ATPasa tipo P y los genes *atc3* y *atc9* que corresponden a ATPasas hipotéticas, disminuyeron su expresión en 0.5 M de NaCl comparado con 2.0 M y la condición sin sal. Esto podría indicar que estos genes son regulados por señales de estrés y no por concentración de sal. El gen *kha1* que corresponde a un antiportador K^+/H^+ para extruir K^+ de la célula o transportarlo a vesículas, aumentó su expresión cuando creció sin sal (Pérez-Llano et al., 2020).

Los genes *stps* y *ccg-9* que participan en la síntesis de trehalosa fueron sobre expresados en las condiciones de estrés y su expresión disminuyó en la condición óptima. Debido a la baja concentración de trehalosa y al alto nivel de expresión de estos genes en las condiciones de estrés, es posible que los genes *stps* y *ccg-9* estén involucrados predominantemente en otras respuestas a estrés y no en la síntesis de este soluto (Rodríguez-Pupo et al., 2021).

El patrón de expresión del gen *mtld*, que participa en la síntesis de manitol, fue similar al de los genes de la síntesis de trehalosa. La expresión de este gen no coincide con la acumulación de manitol en 0.5 M de NaCl y sin sal. Por otro lado, el gen *m2dh* que también participa en esta vía de síntesis es sobre expresado cuando no hay sal y su expresión baja en 0.5 M de NaCl. Esto indica que ambos genes no participan en la regulación de la síntesis de manitol en 0.5 M de NaCl (Rodríguez-Pupo et al., 2021).

Como ya se mencionó el glicerol es el soluto que más se acumula en 2.0 M de NaCl. La acumulación de este soluto coincide con la sobre expresión del gen *gpd* que participa en su síntesis. El nivel de expresión de este gen disminuyó cuando el hongo creció en las condiciones óptimas (Rodríguez-Pupo et al., 2021).

El eritrol y arabitol, al ser productos de la vía de las pentosas fosfato, son sintetizados preferentemente cuando la energía y el balance redox favorecen las reacciones anabólicas. Los niveles de expresión de *tktA* disminuyeron en 2.0 M de NaCl, pero los niveles de *tktB* aumentaron conforme aumentaba la salinidad. El patrón de expresión de ambos no se correlaciona con la acumulación de ninguno de los dos solutos (Rodríguez-Pupo et al., 2021).

Gene	Enzyme	<i>A. sydowii</i>		
		Gene ID*	Protein ID*	% Ident**
Trehalose pathway				
<i>tpsA</i>	Trehalose phosphate synthase subunit	e_gw1.4.743.1	149182	95
<i>or1A</i>	Trehalose phosphate phosphatase subunit	fgenes1_pm.3_#_972	56871	85
<i>tps3</i>	TPS regulatory subunit	fgenes1_pm.7_#_385	59235	89
<i>stps</i>	Heat shock trehalose phosphate synthase	fgenes1_pm.10_#_111	60104	50
<i>ccg-9</i>	Trehalose phosphate synthase	CE565934_14846	780972	83
<i>tpp</i>	Trehalose-6-P phosphatase	gm1.12758_g	96075	87
<i>treb</i>	Neutral trehalase	e_gw1.4.354.1	149568	90
<i>treu</i>	Acid trehalase	fgenes1_pm.18_#_129	62558	84
Mannitol Pathway				
<i>mtld</i>	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	e_gw1.5.2043.1	152275	86
<i>m2dh</i>	Mannitol 2-dehydrogenase	fgenes1_pg.3_#_1082	29920	84
<i>mpp</i>	Manitol/Hexitol phosphatase			
<i>hk</i>	Hexokinase			
Glycerol Pathway				
<i>gpd</i>	Glycerol-3-P dehydrogenase	fgenes1_kg.2_#_690_#_Locus2578v1rpkm69.02	40910	89
<i>gpd-m</i>	Glycerol-3-P dehydrogenase mitochondrial	fgenes1_pm.1_#_8	52965	79
<i>gpp</i>	Glycerol-3-P phosphatase	fgenes1_kg.1_#_238_#_Locus2655v1rpkm66.24	38002	91
<i>gut1</i>	Glycerol-kinase	e_gw1.4.2272.1	149605	92
<i>had1</i>	Haloacid dehalogenase	gm1.5577_g	88894	83
<i>dak1</i>				
<i>gld1</i>	Glycerol dehydrogenase	CE68380_3389	283418	90
		fgenes1_pg.5_#_204	31279	86
		fgenes1_pm.11_#_239	60569	56
Pentose phosphate pathway (Arabitol and Erythritol)				
<i>tktA</i>	Transketolase	e_gw1.2.510.1	142846	95
<i>tktB</i>	Transketolase - putative	gm1.10640_g	93957	90
<i>tad</i>	Transaldolase	fgenes1_pm.2_#_386	55064	94
<i>larA / xylA</i>	L-arabinose/D-xylose reductase	e_gw1.2.1363.1	144547	87
<i>ardh</i>	L-arabinitol dehydrogenase	CE897698_12019	1112736	80

Tabla 1) Genes que participan en la síntesis de solutos compatibles en *Aspergillus sydowii*.

Los genes fueron tomados de *Aspergillus nidulans* y se muestran los genes homólogos en *Aspergillus sydowii*. Esta tabla fue tomada de Rodríguez-Pupo et al., 2021.

2.4.- RNA de interferencia (RNAi)

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento de genes iniciado por RNA de doble cadena (dsRNA) de origen endógeno o exógeno. Este dsRNA es procesado por diversas endonucleasas para producir RNAs pequeños (20-30nt). Estos se asocian con proteínas de la familia Argonauta para formar un complejo de ribonucleoproteínas capaz de reconocer RNA mensajero (mRNA) y degradarlo o inhibir su traducción (Chu & Rana, 2008; Rana, 2007).

Aunque han surgido diversos tipos de RNAs pequeños que participan en mecanismos de RNAi, algunos aspectos de su evolución, estructura, proteínas efectoras asociadas y roles biológicos han llevado a la identificación de tres categorías principales: RNA pequeño interferente (siRNA) (aprox. 21nt), miRNA (aprox. 22nt) y RNA PIWI-interactuante (piRNA) (aprox. 24-26nt) (Carthew & Sontheimer, 2009).

Los siRNA y miRNA están distribuidos en una gran cantidad de organismos y a pesar de sus diferencias funcionales, su síntesis está relacionada. En cambio, los piRNA se encuentran principalmente en animales y ejecutan sus funciones solo en la línea germinal (Carthew & Sontheimer, 2009).

Se han descrito tres tipos de proteínas claves para la función de los mecanismos de RNAi: las RNasas de tipo III Argonauta/Piwi y Dicer, y una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp). Estos tres componentes están presentes en una gran cantidad de organismos eucariontes, lo que sugiere que esta forma primitiva del mecanismo estuvo presente en el ancestro común más lejano de eucariontes (LECA). Se propone que la formación de mecanismos más complejos surgió a partir de eventos de duplicación génica de estas tres proteínas, más la aparición de diversas proteínas accesorias (Shabalina & Koonin, 2008).

La función de las enzimas Dicer es cortar dsRNA precursor del cual provienen los RNA pequeños que dirigen el mecanismo de RNAi. Una clase de este tipo de RNasas se caracteriza por una serie de dominios acomodados en orden desde el grupo amino inicial al carboxilo terminal: dominio ATPasa DEXD/H, dominio DUF283, dominio PAZ, dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a dsRNA (Figura 2). Algunos miembros de esta familia difieren un poco de este orden: no tienen un dominio de ATPasa o PAZ funcional y en algunos casos pueden tener dos dominios de unión a dsRNA en el carboxilo terminal o ninguno.

Los dominios PAZ y RNasa III son fundamentales para la función de estas enzimas. El dominio PAZ reconoce y se ancla a dsRNA que en un extremo 3' tenga aproximadamente 2nt sobresalientes con respecto a la cadena complementaria. El resto del dsRNA se extiende aproximadamente dos giros helicoidales a lo largo de la superficie de la enzima hasta llegar al sitio activo. Este sitio está hundido en un dímero intramolecular formado por los dominios RNasa III. Cada uno de estos dominios corta una de las dos cadenas, generando un dsRNA más corto que el

original, con 2nt sobresalientes en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5'.

Algunos organismos incluyendo mamíferos y nematodos tienen una sola enzima Dicer que participa tanto en la síntesis de siRNA, como en la síntesis de miRNA. Otros organismos tienen múltiples enzimas Dicer y en general las Dicer de estos organismos se han especializado para procesar distintos tipos de RNA pequeño. *Drosophila melanogaster* expresa dos Dicer distintas y *Arabidopsis thaliana* produce cuatro (Carthew & Sontheimer, 2009).

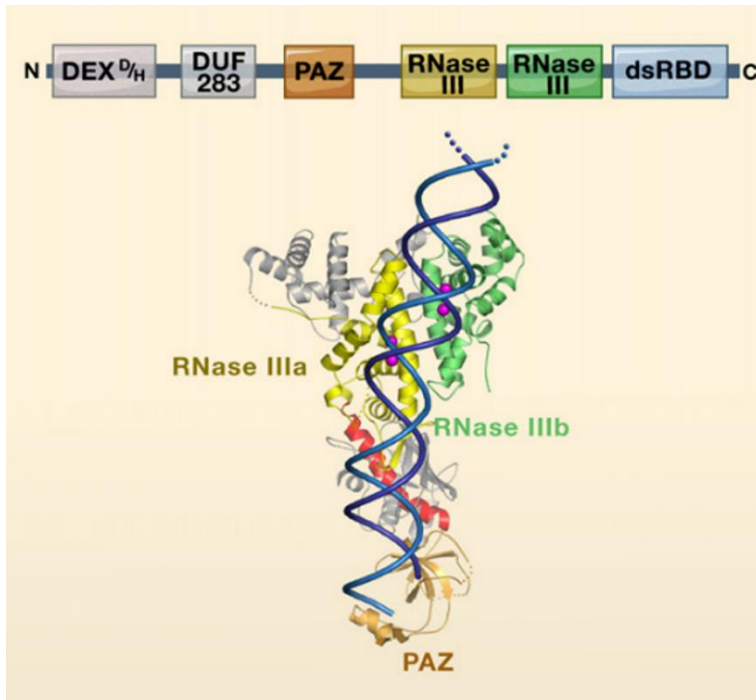


Figura 2) Estructura cristalográfica de una enzima Dicer. Arriba se muestra el acomodo de los dominios de la enzima Dicer. Debajo se muestra la estructura cristalográfica de la Dicer de *Giardia lamblia*. En morado se muestran los iones del sitio activo y en rojo una regla que ayuda a medir el tamaño del producto de la enzima. Esta figura fue tomada de Carthew & Sontheimer, 2009.

Se piensa que todos los fenómenos de regulación y silenciamiento de genes que involucran RNAs pequeños requieren la función de una proteína Argonauta. La superfamilia de las proteínas Argonauta se divide en tres subgrupos: el clado PIWI que se asocia a piRNA, el clado Ago que se asocia a siRNA y miRNA, y un tercer clado que solo se ha descrito en nematodos.

Las Argonautas son el componente central de varios tipos del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). Este complejo desenrolla al dúplex de RNA producido por Dicer y asocia una de sus cadenas a una proteína Argonauta, mientras que la otra en la mayoría de los organismos es descartada. La cadena que se queda es conocida como la cadena guía y dirige mediante complementariedad de secuencia, tipo Watson-Crick, al complejo RISC para degradar o inhibir a una molécula de RNA blanco.

Las proteínas Argonauta están conformadas por cuatro dominios: el dominio PAZ (compartido con las Dicer), el dominio PIWI que es exclusivo de las Argonauta y los dominios N y Mid. La estructura de la proteína está formada por dos lóbulos, uno de

ellos está formado por el dominio PAZ y el otro está formado por el dominio PIWI que está flanqueado por los dominios N y Mid (Figura 3).

El dominio PAZ reconoce en 3' la cadena guía de la misma forma que lo hace en las Dicer, el extremo 5' acopla su grupo fosfato en un sitio de unión formado por el dominio MID, el resto de la cadena se estabiliza por la carga positiva que hay en la superficie de la cadena formada por todos los dominios.

El dominio PIWI puede adoptar un plegamiento de RNasa H-like que cataliza un corte endonucleolítico en una molécula blanco dependiente de la complementariedad de secuencia de la cadena guía con dicha molécula. Este corte es un paso crítico en los eventos del mecanismo de RNAi.

Algunos organismos como *Schizosaccharomyces pombe* tienen una sola Argonauta, aunque la mayoría expresan múltiples, como es el caso de *Drosophila melanogaster* con 5, humanos con 8 y *Caenorhabditis elegans* con 27 parálogos. Al igual que con las Dicer, los organismos con múltiples Argonauta se han especializado para unirse selectivamente con siRNA o miRNA. En humanos 4 de las 8 Argonautas son del clado Ago y se asocian tanto a siRNA como miRNA (Carthew & Sontheimer, 2009).

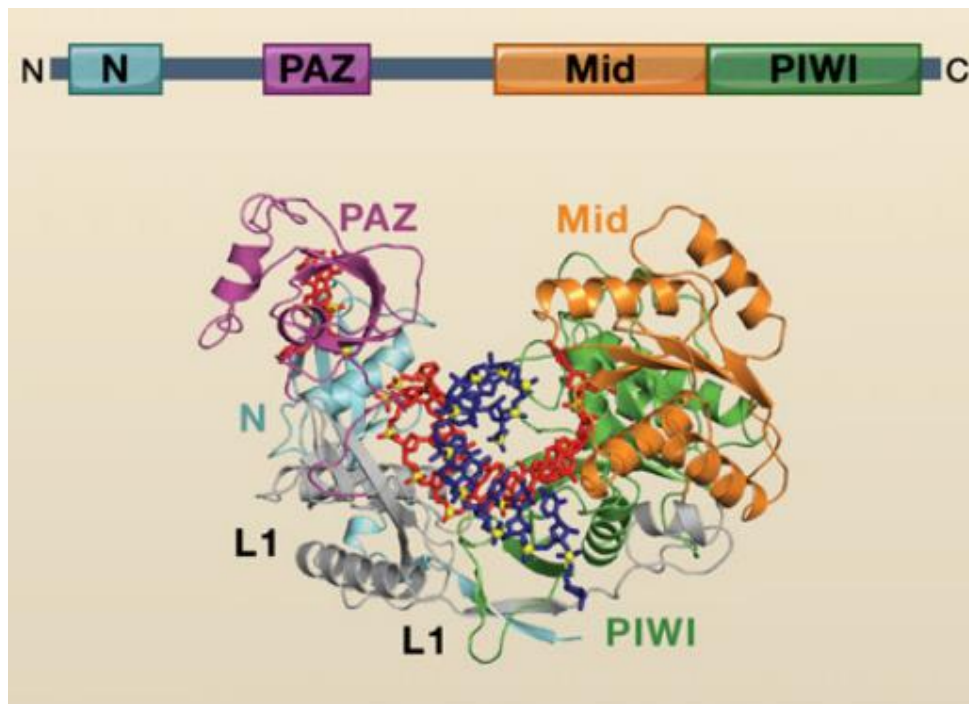


Figura 3) Estructura cristalográfica de una enzima Argonauta. Arriba se muestra el acomodo canónico de los dominios de la enzima Argonauta. Debajo se muestra la estructura cristalográfica de una Argonauta de *Thermus thermophilus* perteneciente al clado de las AGO. En rojo se muestra una cadena de ADN y que está unida mediante complementariedad de secuencia a una cade de RNA en azul. Esta figura fue tomada de Carthew & Sontheimer, 2009.

En plantas, hongos y gusanos, se ha identificado que el mecanismo de RNAi debe cumplir un proceso de amplificación mediado por una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). En este mecanismo, las RdRp convierten un RNA blanco del

complejo RISC en dsRNA que puede servir como sustrato para las Dicer y producir siRNA secundario (Figura 5) (Rana, 2007).

En plantas y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado dos mecanismos para la amplificación del mecanismo de RNAi mediado por siRNA secundario:

En plantas la producción eficiente de los siRNA secundarios depende de que la molécula blanco tenga dos sitios de reconocimiento para un siRNA primario. Una vez que Argonaute corta la molécula blanco, la RdRp es reclutada y reconocerá a la molécula cortada para sintetizar un dsRNA que será reconocido por Dicer y entrará en el mecanismo de RNAi mediado por siRNA y para repetir el proceso de amplificación (Figura 5) (Baulcombe, 2007; Rana, 2007).

En *Caenorhabditis elegans*, cuando Argonaute se une a la molécula blanco, la RdRp es reclutada. Los siRNA secundarios que sintetiza tienen la peculiaridad de tener en el extremo 5' un grupo trifosfato, además estos son sintetizados de manera adyacente a lo largo de la cadena cada 22nt. Se propone que el siRNA primario en este organismo funciona como cebador y que la transcripción termina de forma automática o que los transcritos son cortados por una endonucleasa que no ha sido identificada (Figura 4) (Baulcombe, 2007)

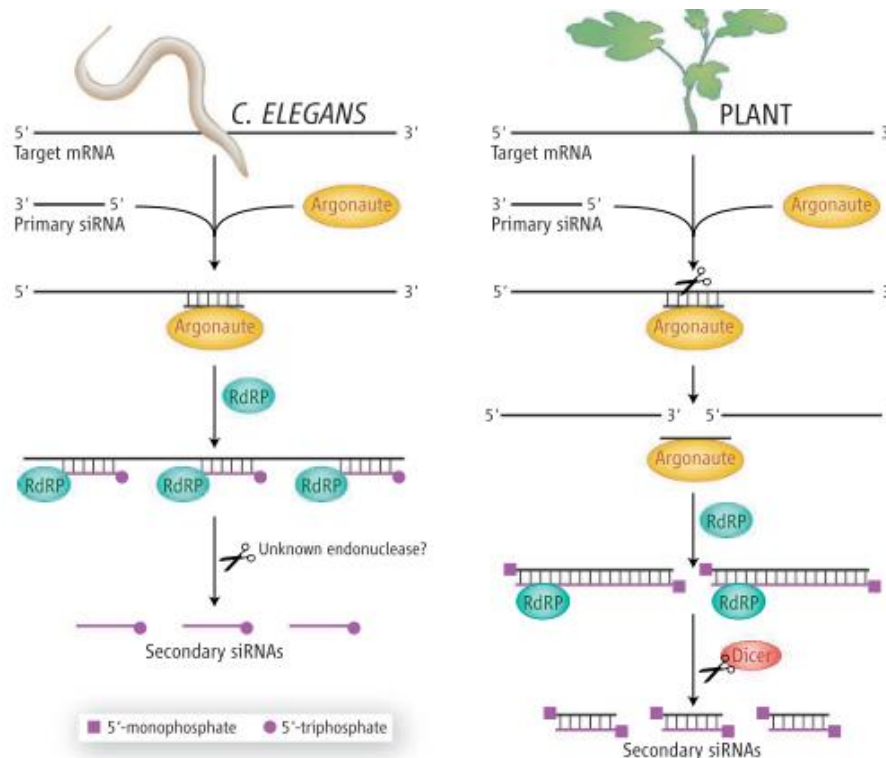


Figura 4) Mecanismo de amplificación del RNAi mediante la actividad de una Polimerasa dependiente de RNA para sintetizar siRNA secundario identificado en *Caenorhabditis elegans* y plantas. Figura tomada de Baulcombe, 2007.

2.5.- RNA pequeño interferente (siRNA)

Los siRNA silencian la expresión de genes mediante la degradación del mRNA y funcionan como defensores de la integridad del genoma en respuesta a ácidos nucleicos invasivos o extraños como los virus, transposones y transgenes. Cuando un organismo se enfrenta a un nuevo invasor, las secuencias de los ácidos nucleicos foráneos pueden introducirse al mecanismo de RNAi mediante siRNA, para adaptarse a la amenaza e inhibir la expresión de sus genes (Carthew & Sontheimer, 2009).

Cuando un dsRNA entra en el citoplasma de los organismos eucariontes es reconocido y procesado por la endonucleasa Dicer para producir un dúplex de RNA que mide aproximadamente 21nt. Las cadenas de este dúplex se conocen como cadena guía y pasajera, y cada una tiene un grupo fosfato en 5' y 2nt que sobresalen en 3' (Chu & Rana, 2008).

Este dúplex entra en el complejo RISC y se selecciona la cadena guía mientras la otra cadena es descartada. Cuando un complejo RISC introduce como cadena guía a un siRNA, este pasa a llamarse complejo siRISC, para diferenciarlo cuando se une a miRNA. Posteriormente el complejo siRISC identificará moléculas blanco mediante complementariedad de secuencia de un siRNA a las cuales silenciará y utilizará para amplificar su función mediante la actividad de una RdRp y la síntesis de siRNA secundario (Figura 5) (Chu & Rana, 2008).

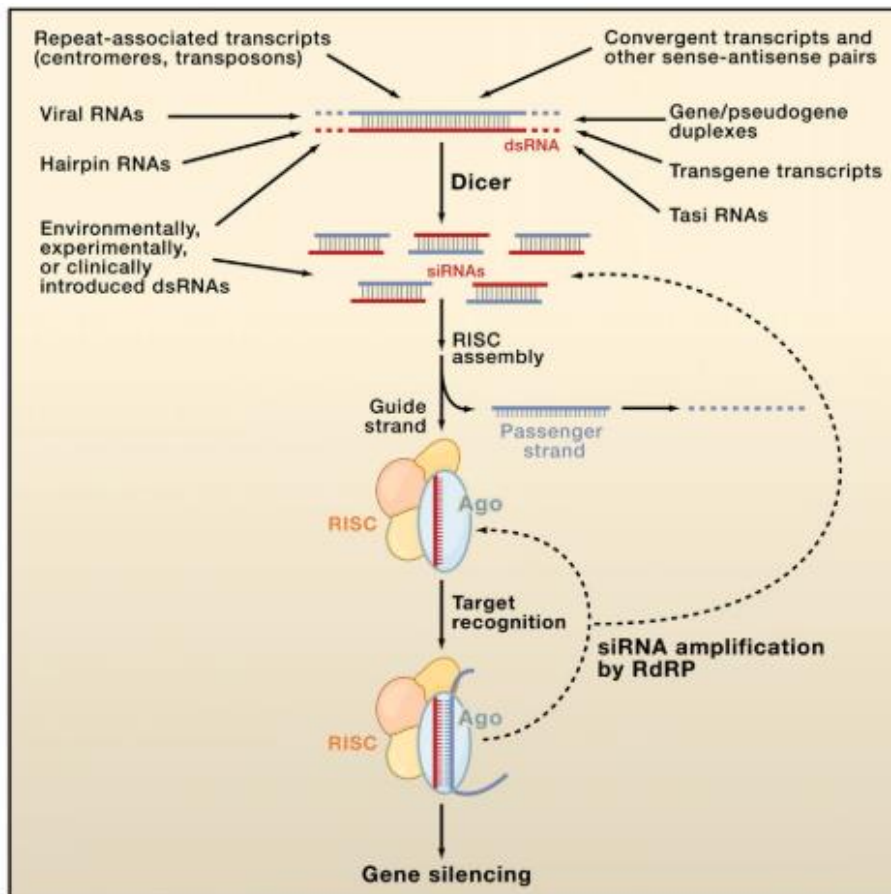


Figura 5) Vía de RNAi mediada por siRNA. Esta figura fue tomada de Carthew & Sontheimer, 2009.

2.6.- Micro RNA (miRNA)

Los miRNA son endógenos y están codificados en el genoma de los organismos donde van a cumplir su función. Su función es regular la expresión de genes endógenos. Evidencia sugiere la función de los miRNA puede ser mediada por varios mecanismos: degradación de mRNA, represión de la traducción o secuestro de mRNA en compartimentos celulares (Figura 8) (Chu & Rana, 2008; Rana, 2007).

Se han identificado miRNA en plantas, animales, hongos y también en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que sugiere que los miRNA pueden tener un origen en la evolución más antiguo de lo que se pensó en un principio (Filipowicz et al., 2008; Rana, 2007).

En plantas y animales los genes de miRNA están localizados mayoritariamente en regiones intergénicas que no son cercanas al transcrito que van a regular (Millar & Waterhouse, 2005). Cada uno de estos genes de miRNA tiene su propio promotor individual y su patrón de expresión es independiente al del mRNA que regulan. Una minoría de miRNA, conocidos como mirtrons, esta codificada dentro de intrones de mRNA, su orientación es la misma que la del transcrito y su patrón de expresión se correlaciona con la expresión de su molécula blanco. Algunos miRNA están organizados en clústeres donde la transcripción de estos genes produce un transcrito poli-cistronico. La mitad de los miRNA conocidos en *Drosophila* se acomodan de esta forma y estos no siempre regulan transcritos con actividad relacionada (Figura 6) (Bartel, 2004).

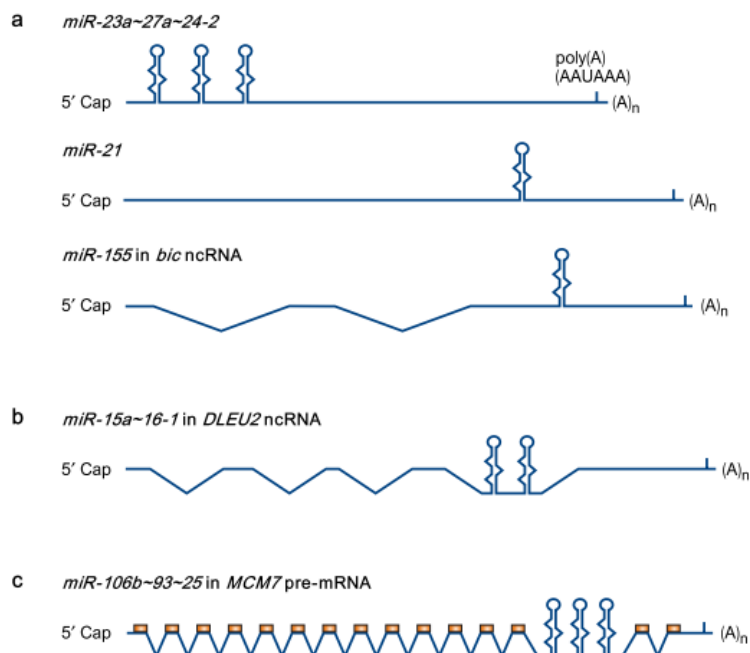


Figura 6) Estructura de cinco pri-miRNA. A) Estructura de pri-miRNA del miR-21, miR-155 y en el clúster miR-23a~27a~24-2. **B)** Estructura de pri-miRNA del clúster miR-15a~16-1 que está localizado en el cuarto intrón de un RNA largo no codificante. **C)** Estructura de un pri-miRNA del clúster miR-106b~93~25 que está codificado en el intrón número 13 del transcrito del factor de licencia de replicación de ADN MCM7. Esta figura fue tomada de Kim, 2005.

En animales el sitio de unión entre mRNA y miRNA ocurre en distintos sitios dentro de la región 3'UTR del mRNA y al parecer mientras más sitios de unión existan, la actividad del miRNA va a ser más efectiva. El silenciamiento de la expresión de genes en este organismo ocurre mediante la inhibición de la traducción y la posterior degradación del mRNA (Millar & Waterhouse, 2005).

La vía de síntesis de miRNA más estudiada es la vía canónica (Figura 8). Esta vía inicia en el núcleo, donde los genes de miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II (Bartel, 2004). El producto de esta transcripción es una cadena sencilla de RNA conocida como miRNA primario (pri-miRNA), que al igual que el mRNA producido por esta misma polimerasa, tiene en su extremo 5' un Cap y en el 3' una cola de Poli-A (Kim, 2005). La estructura representativa de un pri-miRNA es una estructura de tallo horquilla flanqueada por los extremos 5' y 3' de la cadena (Figura 6).

La estructura de tallo del pri-miRNA es cortada a 11nt de la base por el complejo formado por Drosha-DGCR8. Drosha pertenece a la familia de RNasas de tipo III y tiene dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a dsRNA, DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene-8) tiene un dominio de unión a dsRNA. Este corte produce un pre-miRNA de aproximadamente 70nt con 2nt que sobresalen en el extremo 3' y una estructura de tallo horquilla (Figura 7) (J. S. Yang & Lai, 2011).

Después de este procesamiento, el pre-miRNA debe ser exportado al citoplasma para que continúe su procesamiento. La Exportina-5 reconoce los 2nt que sobresalen en el extremo 3' del pre-miRNA y lo exporta a través del complejo del poro nuclear. Después de ser exportado al citoplasma, el pre-miRNA es reconocido por la RNasa Dicer y corta aproximadamente 2 vueltas de hélice del bucle para producir un dúplex de RNA de aproximadamente 22nt. Las cadenas de este dúplex se conocen como cadena guía y pasajera, y cada una cuenta con un grupo fosfato en 5' y 2nt que sobresalen en 3' (J. S. Yang & Lai, 2011)

Después del procesamiento por Dicer, el dúplex de RNA es pasado de Dicer a la Argonauta, donde la cadena pasajera es degradada y la cadena guía es utilizada para guiar al complejo RISC (J. S. Yang & Lai, 2011). Argonauta, Dicer, TRBP ((HIV-1 transactivation responsive element (TAR) RNA-binding protein) y la proteína de unión a RNA PACT forman al complejo RISC, que cuando tiene un miRNA, se llama miRISC, para diferenciarlo del siRISC (Rana, 2007)

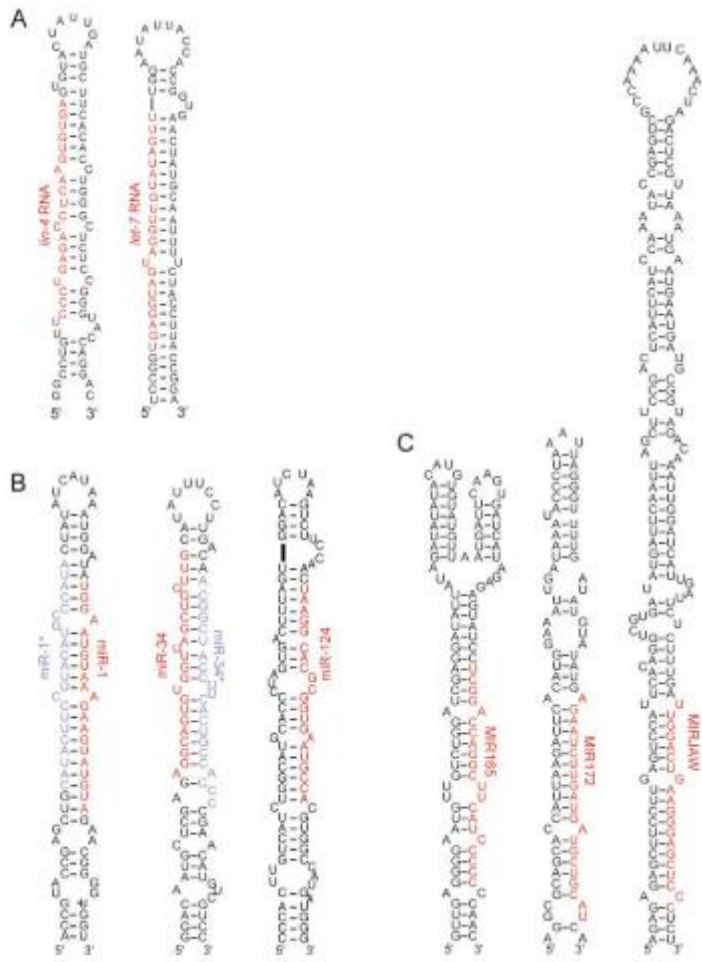


Figura 7) Estructura de distintos pre-miRNA. En rojo se encuentra la secuencia del miRNA guía y en azul la secuencia de la cadena pasajera.

A) pre-miRNA de *lin-4* y *let-7* en *C. elegans*, se han identificado homólogos en moscas y mamíferos.

B) pre-miRNA de *mir-1*, *mir-34* y *mir-124* en metazoario, se han identificado homólogos en moscas y mamíferos.

C) pre-miRNA de *MIR165a*, *MIR172a2* y *JAW* en *Arabidopsis*, se han identificado homólogos en arroz y otras plantas.

Figura tomada de Bartel, 2004.

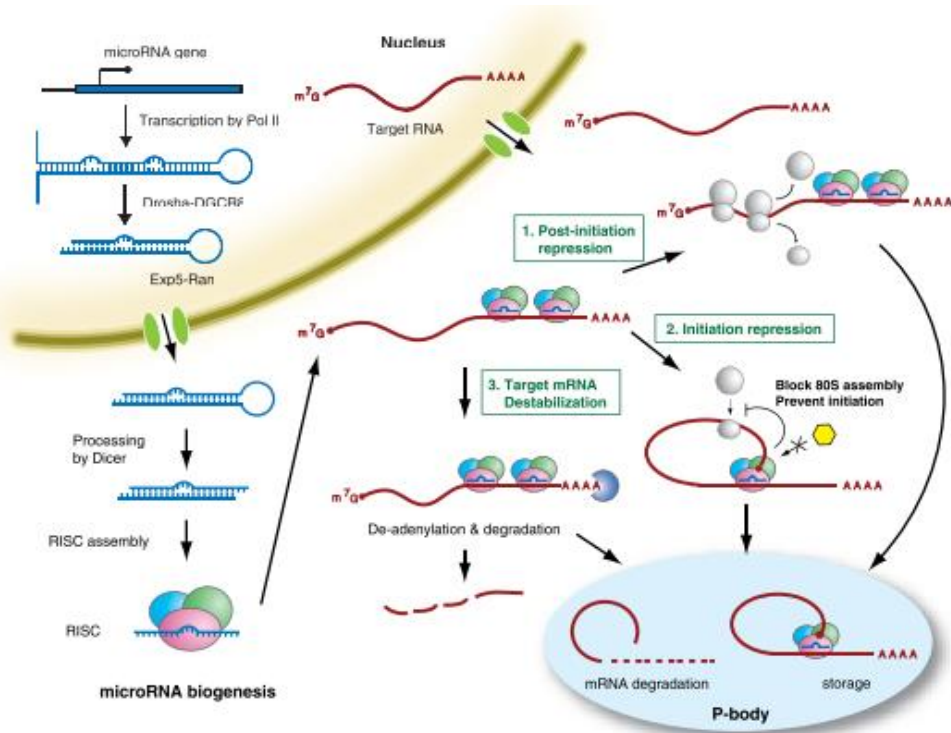


Figura 8) Vía de síntesis canónica de miRNA en animales. Figura tomada de Chu & Rana, 2008.

Existen mecanismos de síntesis de miRNA en animales que son independientes del procesamiento nuclear por Drosha-DGCR8. En *Drosophila melanogaster* se han mapeado miRNA llamados mirtrons, que están dentro de regiones de intrones y sus extremos coinciden con los sitios donadores y aceptores de corte y empalme (J. S. Yang & Lai, 2011).

Cuando un intrón es escindido, este tiene una estructura en forma de lariat que se forma por un enlace fosfodiéster 2'-5' entre dos nucleótidos (Figura 9). Cuando un miRNA es generado a partir de un intrón, la estructura de lariat debe ser resuelta para que pueda adoptar la estructura de un pre-miRNA. La enzima que se encarga de este proceso es una enzima desramificadora de lariat (Dbr, por sus siglas en inglés lariat debranching) y se encarga de hidrolizar el enlace fosfodiéster 2'-5' (Ooi et al., 2001; J. S. Yang & Lai, 2011).

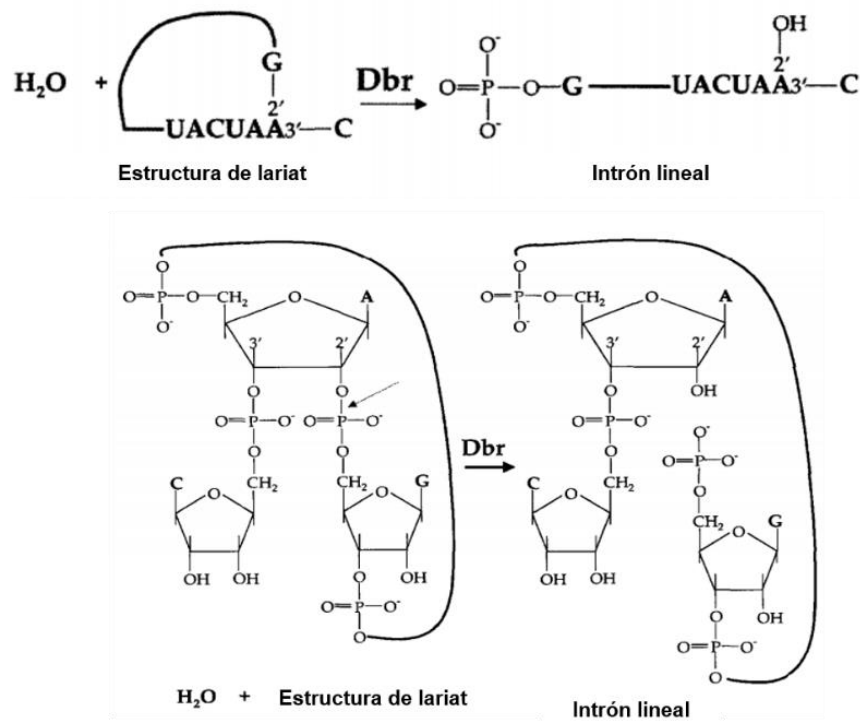


Figura 9) Actividad de la enzima desramificadora de lariat (Dbr). Figura tomada de Ooi et al., 2001.

Existen intrones cuyos extremos no corresponden con los sitios de corte y empalme. En *Drosophila* se han identificado mirtrones que tienen una horquilla en el extremo 5' que corresponde a un sitio de corte y empalme, y antes del otro sitio hay una región que no está estructurada. En vertebrados se han identificado mirtrones que son la contraparte de los que hay en *Drosophila*, mirtrones con horquilla en el extremo 3' que corresponde a un sitio de corte y empalme, y antes del otro sitio hay una región que no está estructurada (J. S. Yang & Lai, 2011).

Estos mirtrones con cola no estructurada resuelven su estructura mediante distintos mecanismos. En *Drosophila* los que tienen la cola en 3' utilizan el complejo nuclear de RNA exosoma. Este complejo degrada la cola en 3' para producir un pre-miRNA mediante su actividad de exoribonucleasa en la dirección 3' a 5'. En mamíferos se propone que los que tienen cola en 5' son procesados por una exoribonucleasa de la familia XRN con actividad 5' a 3' (J. S. Yang & Lai, 2011).

La síntesis de miRNA en plantas ha sido estudiada en *Arabidopsis thaliana* (Figura 10). Los pri-miRNA son producidos por la RNA polimerasa II, que pueden medir desde 70nt hasta cientos de ellos y tienen Cap en 5' y cola de Poli-A en 3'. En el Cap se asocia la proteína CBP (Heterodimeric cap-binding complex) y en otras regiones de, transcrito se asocia la proteína DDL (DAWDLE), que es una proteína de unión a RNA, estas dos proteínas promueven la síntesis de miRNA, pero no son esenciales (Axtell et al., 2011; X. Chen, 2009).

Este pri-miRNA es procesado por la Dicer-like 1 (Dcl1), una de las cuatro proteínas Dicer-like que están codificadas en el genoma de *Arabidopsis*. Esta enzima esta acoplada a Hyl1 (Hyponastic leaves1), una proteína de unión a dsRNA y a SE (Serrate), una proteína de dedos de zinc. Las tres proteínas se localizan en cuerpos nucleares conocidos como cuerpos Dicing (Dicing bodies) (X. Chen, 2009).

Dcl1 corta desde la base del tallo al pri-miRNA para producir un pre-miRNA (Figura 7) y después lo vuelve a cortar, pero está vez en la región cercana a la horquilla para producir un dúplex de RNA. Aunque comúnmente Dcl1 primero corta en la base del tallo y después cerca de la horquilla, esto también puede ocurrir en el orden inverso. Aunque normalmente un pri-miRNA puede derivar en un solo dúplex de RNA, en plantas hay pri-miRNA que pueden derivar en múltiples duplexes (Millar & Waterhouse, 2005).

La síntesis de miRNA en plantas es completada en los cuerpos D. Ahí, los nucleótidos del extremo 3' del dúplex son metilados en el oxígeno del C2', por la proteína Hen1 (Hua Enhancer). Hen1 es una RNA metiltransferasa que reconoce 2nt que sobresalen en el extremo 3' de las cadenas de RNA. Cuando un mRNA es cortado por una Argonauta, el mRNA es uridilado para ser degradado, así que la metilación del mRNA previene la uridilación de esta cadena. Finalmente, Hasty, el homólogo en plantas de Exportina 5, exporta al dúplex de RNA para cargarlo en las proteínas Argonauta (X. Chen, 2009).

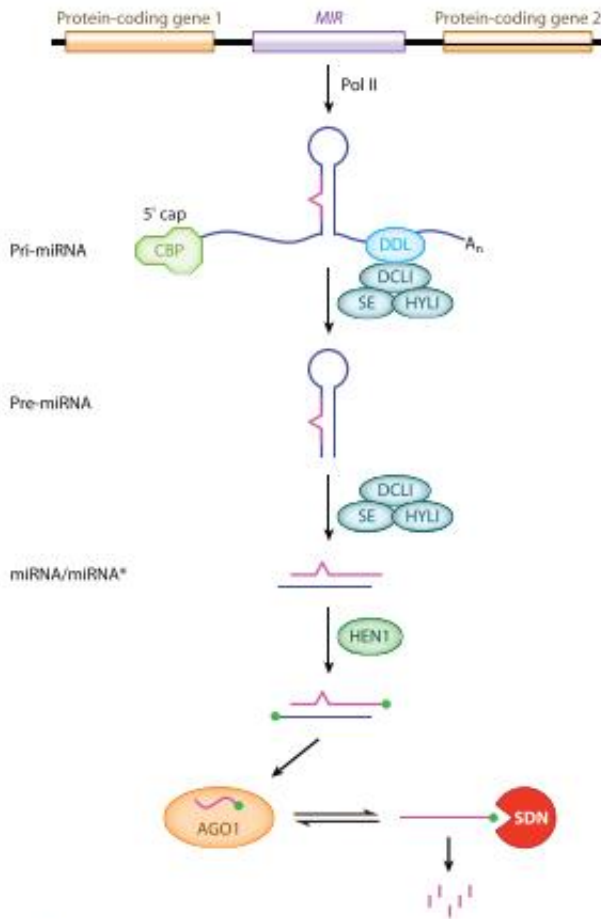


Figura 10) Mecanismo de síntesis de miRNA en plantas. Figura tomada de Chen, 2009.

El mecanismo que utiliza el complejo RISC para silenciar una molécula blanco depende del grado de complementariedad de secuencia que exista entre ambas moléculas. El RNA pequeño que tenga un grado de complementariedad alto, regulará la expresión de genes mediante la degradación y mientras más baja sea la complementariedad, la expresión de genes será regulada mediante la inhibición de la traducción. Los siRNA y los miRNA de plantas tienen una complementariedad perfecta o casi perfecta, así que el mecanismo que utilizan es el de degradación. Los miRNA de animales tienen una complementariedad menor que su contraparte en plantas, así que el mecanismo que utilizan mayoritariamente es el de inhibición de la traducción (Chu & Rana, 2008; Filipowicz et al., 2008; Millar & Waterhouse, 2005).

Para describir cómo es la interacción entre miRNA con una molécula blanco, se han identificado ciertos patrones en miRNA de metazoarios mediante experimentos y análisis bioinformáticos donde estos miRNA interactúan de manera imperfecta con su molécula blanco (Figura 11):

- En la región semilla (2-8nt del miRNA) la interacción entre los nucleótidos debe ser perfecta, porque esta es la zona de nucleación de la interacción.

Nucleótidos mal emparejados o protuberancias dentro de esta región afectan la represión. Para una mejor eficiencia, se toleran una A o una A/U en la posición 1 y 9 respectivamente, aunque éstas no tengan apareamiento de base.

- Los nucleótidos mal emparejados o protuberancias deben estar en la región central de la interacción, porque ahí es donde el dominio PIWI de la Argonauta va a cortar.
- Debe existir una complementariedad razonable en la zona 3' del miRNA. Los nucleótidos mal emparejados y protuberancias se toleran en esta región. Cuando la interacción en la región semilla es subóptima, las interacciones en la zona de nucleótidos que comprende del 13-16 en el miRNA son importantes. (Filipowicz et al., 2008)

Para que exista actividad de un complejo miRISC, el miRNA debe tener una complementariedad mínima de 7nt en la región semilla. Probablemente basado en esta sola región, un solo miRNA puede reconocer múltiples mRNA (Chu & Rana, 2008)

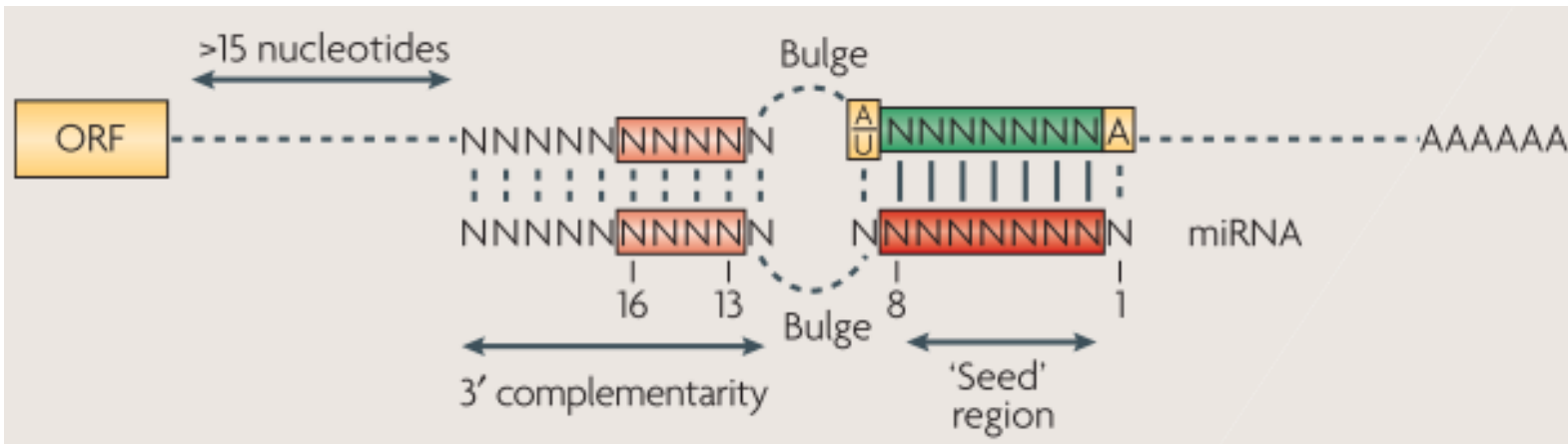


Figura 11) Patrón de interacción entre miRNA y mRNA identificado a partir de experimentos y análisis bioinformáticos en miRNA de matazoarios. Esta figura fue tomada de Filipowicz et al., 2008.

2.7.- Mecanismo de RNAi en hongos

Basado en la presencia las proteínas Dicer, Argonauta y la RdRp, se ha determinado que el mecanismo de RNAi está presente en los principales grupos de hongos, incluyendo a los filos Ascomicota, Basidiomicota y Zygomycota (Billmyre et al., 2013), aunque también se ha identificado un pequeño grupo de hongos que han perdido éstas proteínas y por lo tanto también este mecanismo (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017).

El RNAi en hongos funciona como: mecanismo de defensa contra virus, control de elementos transponibles, regulación de genes endógenos, formación de heterocromatina, adaptación a condiciones de estrés y patogénesis (Lax et al., 2020). En hongos patógenos como *Cryptococcus deuterogattii*, la ausencia del mecanismo de RNAi, provocó un aumento en la expresión de transposones que

benefició la plasticidad del genoma y le confirió al hongo una diversidad genética para llevar a cabo los procesos de infección de manera más efectiva. Esto indica que en algunos organismos la pérdida de este mecanismo les confiere una ventaja evolutiva que contrarresta los efectos negativos (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017).

Por mucho tiempo se creyó que los miRNA estaban ausentes en los hongos debido a que no se habían identificado fenotipos donde se pudiera analizar la actividad de estas moléculas y a que había hongos que perdieron su maquinaria para sintetizar miRNA. Fue hasta que se hicieron estudios en el hongo *Neurospora crassa* que se identificó la existencia de Micro RNA-like RNA (miRNA) (Figura 12) (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017).

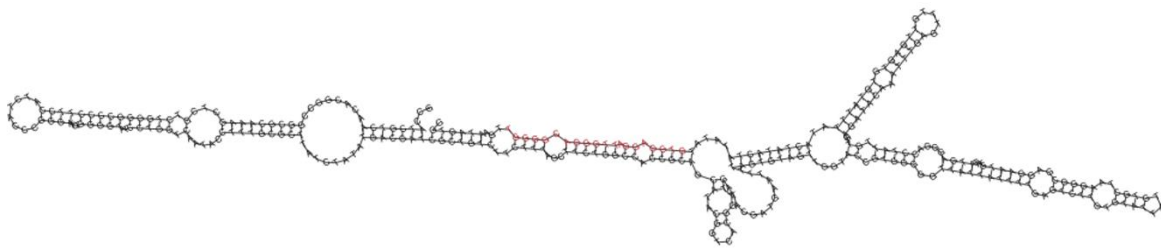


Figura 12) Estructura del pre-miRNA Afl-miR-4 de *Aspergillus flavus*. Figura tomada de Youhuang Bai, 2014.

Los miRNA reciben ese nombre debido a que comparten características y actividad similar con los miRNA de plantas y animales, pero son producidos por vías de síntesis similares, pero no idénticas, a las de estos organismos. Son transcritos a partir de genes en regiones intergénicas, miden aproximadamente 25nt y tienen una alta prevalencia de U en su extremo 5'. Al igual que los miRNA de animales, los miRNA probablemente llevan a cabo su función mediante la represión de la traducción (Lee et al., 2010).

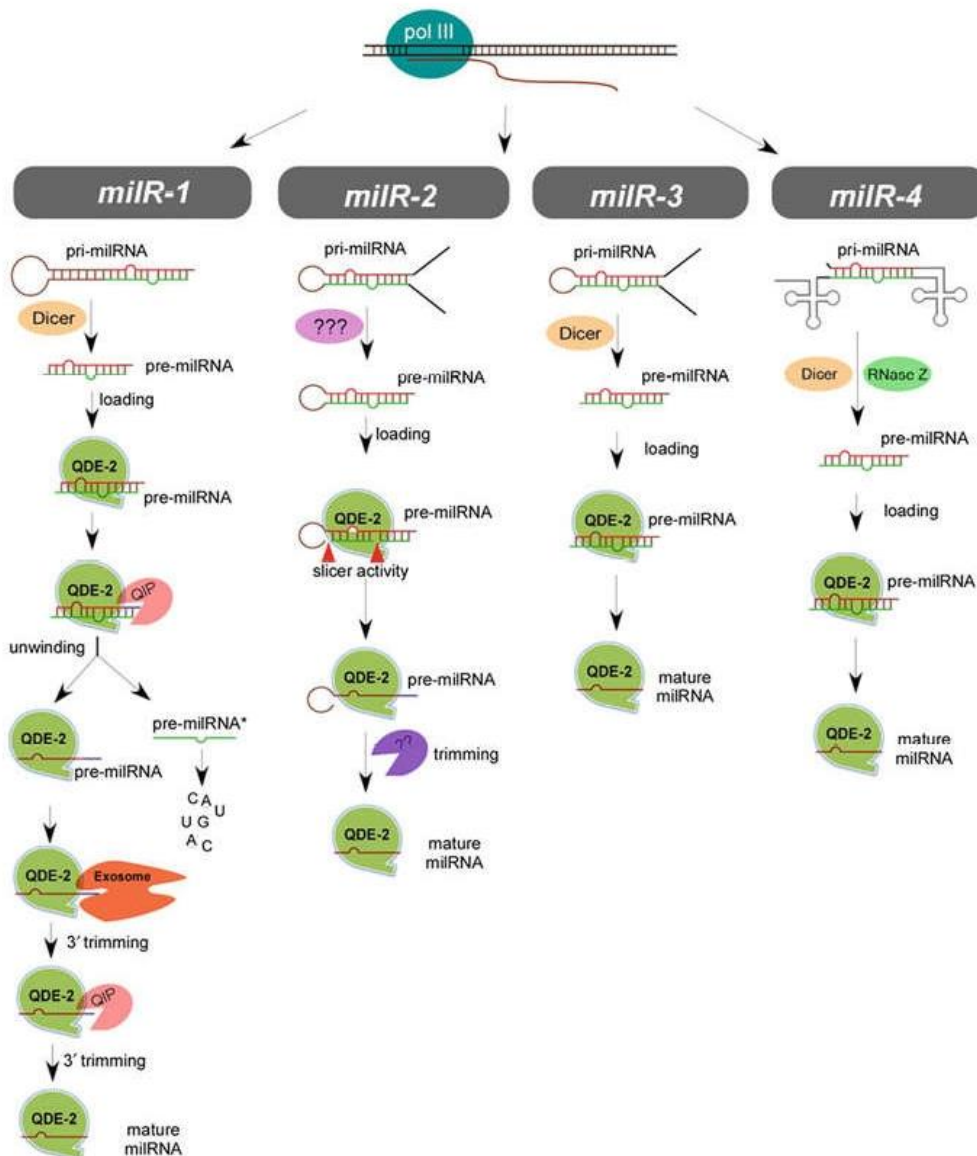
En *Neurospora Crassa*, se ha reportado que los miRNAs son transcritos principalmente por la RNA polimerasa III, pero también existen algunos tipos que son transcritos por la RNA polimerasa II y en algunos casos se sugiere que esto ocurre mediante una combinación de la actividad de ambas (Nicolás & Ruiz-Vázquez, 2013). También se reportó el mecanismo de síntesis de 4 loci de miRNA: miR-1, miR-2, miR-3, y miR-4 (Figura 13):

- El pri-miRNA de los miR-1 miRNA es procesado por Dicer para generar un pre-miRNA sin la horquilla, con participación de la RNasa MRPL3. La proteína QDE-2 es necesaria para el procesamiento del pre-miRNA y recluta a la exonucleasa QIP para separar las cadenas del dúplex de miRNA. Para producir un miRNA maduro se necesita la función del Exosoma y de QIP.
- El pri-miRNA de los miR-2 tiene un procesamiento independiente de Dicer, se desconoce cuál es la endonucleasa que lleva a cabo este procesamiento. La actividad catalítica de QDE-2 es importante para la producción del pre-

miRNA y del miRNA. La actividad de la exonucleasa QIP no es necesaria para la maduración, pero se desconoce cuál es la última endonucleasa que participa en la maduración.

- El pri-miRNA de los miR-3 y 4 miRNA es parcialmente procesado por Dicer. En el caso de los miR-4 cuando Dicer y MRPL3 fueron silenciados, solo hubo una disminución del miRNA maduro, así que probablemente otra nucleasa está involucrada en el proceso. Para ambos miRNA la Qde2 no está involucrada en el proceso de síntesis y a actividad de la exonucleasa QIP no es necesaria para la maduración. El miR-4 es producido a partir de un tRNA, por lo que para su maduración se necesita la tRNasa Z.

La diversidad de mecanismos que existe para la síntesis de miRNA, sugiere que en hongos filamentosos existen diversos mecanismos para la síntesis de RNA pequeño



Los miRNA han sido detectados en una gran cantidad de hongos: *Trichoderma reesei* (Kang et al., 2013), *Sclerotinia sclerotiorum* (J. Zhou et al., 2012), *Metarhizium anisopliae* (Q. Zhou et al., 2012), *Zymoseptoria tritici* (F. Yang, 2015), *Fusarium oxysporum* (R. Chen et al., 2014), *Fusarium graminearum* (Y. Chen et al., 2015), *Aspergillus flavus* (Bai et al., 2015), *Penicillium chrysogenum* (Dahlmann & Kück, 2015), *Antrodia cinnamomea* (Lin et al., 2015), *Penicillium marneffe* (S. K. P. Lau et al., 2013), *Cryptococcus neoformans* (Jiang et al., 2012), *Curvularia lunata* (Liu et al., 2016), *Ganoderma lingzhi* (B. Li et al., 2016), *Coprinopsis cinerea* (A. Y. T. Lau et al., 2018) y *Ophiocordyceps sinensis* (Zhang et al., 2019). En estos hongos se ha identificado el papel de los miRNAs durante el desarrollo del hongo, cuerpos fructíferos, regulación de enzimas con importancia biotecnológica y en eventos de infección.

3.- HIPOTESIS

Los miRNA participan en la regulación de los mecanismos de tolerancia a salinidad en el hongo *Aspergillus sydowii*.

4.- OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar posibles vías de síntesis de miRNA y analizar la expresión diferencial de miRNA en el hongo *Aspergillus sydowii* cuando crece sin NaCl y en 0.5 M y 2.0 M de NaCl.

Objetivos Particulares

- 1 - Identificar proteínas Dicer y Argonauta en *A. sydowii* y en otros miembros del género *Aspergillus* para analizar su evolución.
- 2 – Identificar *in-silico* posibles vías de síntesis de miRNAs en el hongo *A. sydowii* a través de la búsqueda de homólogos de vías descritas en otros organismos modelo.
- 3 - Realizar la extracción y secuenciación de RNAs pequeños de *A. sydowii* en tres condiciones diferentes de salinidad (Sin NaCl, 0.5M y 2M de NaCl) mediante RNA-seq.
- 4 - Analizar la expresión diferencial de RNA pequeños en las condiciones estudiadas.
- 5 – Predecir la posible función de los RNA pequeños como miRNA mediante la predicción de su estructura secundaria, la identificación de posibles mRNA diana y la correlación de expresión mRNA-miRNA.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Identificación de proteínas Dicer y Argonauta de *Aspergillus*

Se realizó la búsqueda de estas enzimas en el genoma de un grupo de *Aspergillus*, mostrados en la Tabla 2. Estos hongos son representativos de los subgéneros más importantes del género *Aspergillus* con base en análisis filogenéticos previos (Kocsubé et al., 2016). Los genomas de estos hongos se encuentran depositados en la base de datos MycoCosm (Nordberg et al., 2014). Las secuencias se obtuvieron mediante una búsqueda por términos PFAM en MycoCosm, con el dominio de Dimerización Dicer (Dicer_dim) (PF03368) para Dicer y PIWI (PF02171) para Argonauta.

Tabla 2. Especies de *Aspergillus* utilizadas para la reconstrucción de la historia evolutiva de las enzimas del mecanismo de producción de miRNAs

Subgénero	Especie	Cepa
Nidulantes	<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS593.65
	<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS795.97
	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4
Circumdati	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC1015
	<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL3557
	<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40
Fumigati	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af293
	<i>Aspergillus fischeri</i>	NRRL 181
	<i>Aspergillus clavatus</i>	NRRL1

5.2.- Alineamiento y Construcción de Árboles Filogenéticos

Las secuencias de las proteínas obtenidas se alinearon utilizando MAFFT (Kato & Toh, 2010) con parámetros por defecto en el programa Jalview versión 2.11.1.5 (Waterhouse et al., 2009). De la misma forma que en otros análisis filogenéticos de Dicer y Argonauta reportados en la literatura, para construir estos árboles, solo se utilizaron los dominios RNasa III para Dicer y PIWI para Argonauta (Nakayashiki et al., 2006) (Hu et al., 2013). Los árboles se construyeron en MEGA X (Kumar et al., 2018) mediante el método de máxima verosimilitud, modelo de sustitución LG+G+I y 500 réplicas de Bootstrap. Como *outgroups* para el enraizamiento de los árboles se seleccionaron las cuatro Argonautas del clado Ago de *Homo sapiens* (Q9UL18, Q9UKV8, Q9H9G7 y Q9HCK5), la Argonauta de *Schizosaccharomyces pombe* (O74957), la Dicer de *Homo sapiens* (Q9UPY3) y la Dicer de *Schizosaccharomyces pombe* (Q09884).

5.3.- Identificación in silico de posibles vías de síntesis de miRNAs en el hongo *A. sydowii*

Para identificar posibles vías de síntesis de miRNAs en *Aspergillus sydowii*, se hizo una búsqueda en STRING (Szklarczyk et al., 2021) de proteínas con probable interacción física y funcional con Dicer y Argonauta. Esta búsqueda de interacciones se realizó en *Aspergillus nidulans* por tres razones: i) es uno de los *Aspergillus* mejor anotados, ii) al igual que *Aspergillus sydowii*, está en el subgénero de *Nidulantes* (de Vries et al., 2017) y iii) posee solo una copia de los genes Argonauta y Dicer. Los genes de Dicer y Argonauta de este hongo se usaron como nodos centrales en la búsqueda.

Se consideró además que las proteínas obtenidas a partir del análisis de STRING debían cumplir con los siguientes criterios: tener un puntaje de confiabilidad mayor a 0.4 en STRING, estar involucradas en mecanismos de síntesis de miRNAs en otros organismos y coincidir su arreglo de dominios con homólogos que estén anotados manualmente anotados en la base de datos Uniprot. Para la identificación de los dominios se usó PFAM (Mistry et al., 2021) y se confirmó la anotación con SMART (Letunic et al., 2021). Las proteínas que cumplieron con el criterio anterior fueron buscadas en el genoma de *A. sydowii* (Taxid:75750) con la herramienta BLAST de NCBI, mediante blastp con parámetros predeterminados.

5.4.- Cepa, condiciones de cultivo y conservación

La cepa *A. sydowii* BMH-0004 fue aislada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), México. Esta cepa fue depositada en la Colección de Cultivos Fúngicos del CEIB (UAEM, México) con número de referencia BMH-0004, en la colección TUCIM (Colección de Microorganismos Industrialmente Relevantes, Universidad Tecnológica de Viena, Austria) con número de referencia 6524 y en la Colección de Cultivos Extremófilos del Centro De Infraestructura Mycocosmo (MRIC UL) (Liubliana, Eslovenia), con número EXF-12860.

La cepa se mantuvo en placas Petri con agar extracto de papa (PDA) almacenadas a 4 °C, o como suspensión de esporas en 20% de glicerol complementado con 0.5 % NaCl a – 80 °C en la Colección de Cultivos Fúngicos del CEIB (UAEM, México).

Para la extracción de RNA el hongo se obtuvo de un preinóculo en medio YMB (Caldo de Malta y Levadura) con 1.0 M de NaCl incubado durante 4 días a 28°C. Este inóculo se transfirió a un medio sin sal, y con 0.5 M y 2.0 M de NaCl y se incubó durante 5 días a 28°C. El medio YMB se preparó con 10g/L de Malta, 4g/L de Dextrosa, 4g/L de extracto de levadura y 5g/L de peptona, adicionado con 29.22g/L para tener una concentración de 0.5 M de NaCl y 116.88g/L para tener una concentración de 2.0 M de NaCl.

5.5.- Extracción de RNA total

El micelio se colectó mediante centrifugación y se maceró con nitrógeno líquido para romper la pared celular. El RNA total se aisló mediante el método de fenol ácido calentado a 62°C. El fenol interactúa con las moléculas hidrofóbicas para precipitarlas y separa en la fase acuosa a los ácidos nucleicos. La separación del DNA y RNA depende del pH: a un pH ácido, el DNA pierde carga negativa por lo que se favorece su solubilidad en la fase orgánica, mientras que el RNA se mantiene en la fase acuosa. La concentración de RNA se determinó mediante medición de la absorbancia a 260nm en nanodrop y la integridad y calidad se evaluaron mediante electroforesis de agarosa al 1% y Bioanalyzer 2100 (Agilent) por la compañía Novogene (Sacramento, CA).

6.- RESULTADOS

6.1.- Proteínas Dicer y Argonauta del género *Aspergillus*

En distintos hongos de los filos Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota, la presencia de las enzimas Dicer, Argonauta y RdRp indica que estos hongos mantienen los mecanismos de RNAi (Billmyre et al., 2013). Se usan estas tres proteínas como marcadores porque múltiples evidencias sugieren que estos componentes se han conservado a lo largo de la evolución, indicando que los mecanismos de RNAi que utilizan estas proteínas surgieron desde el LECA. En distintos organismos eucariontes se han identificado múltiples parálogos de estas enzimas, que surgieron a partir de eventos de duplicación genica, por lo que es común encontrar más de un gen que codifica para estas proteínas (Paturi & Deshmukh, 2021).

Para confirmar la presencia del mecanismo de RNAi en el hongo *Aspergillus sydowii* y en otros hongos del género *Aspergillus*, se hizo una búsqueda de enzimas Dicer y Argonauta en sus genomas y se realizaron análisis filogenéticos para entender como ha sido la evolución de estas proteínas en estos hongos. No se realizó este análisis para la enzima RdRp debido a que en la literatura no se ha descrito que esta enzima participe en la amplificación de miRNAs.

Dicer es una endonucleasa que pertenece a la familia de las RNAsas III. Esta familia se divide en cuatro clases, las enzimas Dicer pertenecen a la clase IV y en humanos estas enzimas contienen un dominio Helicasa, dos RNAsa III, dos de unión a dsRNA y un dominio Piwi/Ago/Zwille (PAZ) (Paturi & Deshmukh, 2021).

El arreglo de los dominios de Dicer está muy conservado entre distintos eucariontes y algunas especies utilizan más de una enzima, lo que en algunos casos les ha conferido ventajas funcionales. El hongo filamentoso *Neurospora crassa* codifica dos enzimas Dicer funcionalmente redundantes que participan en el mecanismo de Quelling y en la producción de siRNA (Paturi & Deshmukh, 2021).

En esta búsqueda de enzimas Dicer en *Aspergillus*, logramos identificar que *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* tienen genes parálogos (Tabla 3), lo que sugiere que en estos hongos tal vez cada Dicer tiene una función particular o patrones de expresión distintos. *Aspergillus clavatus* fue el único hongo de este estudio que no codifica ninguna enzima Dicer.

Una vez identificadas las proteínas Dicer en el género *Aspergillus*, se identificaron los arreglos de dominios y se compararon con los arreglos de las proteínas Dicer de *Homo sapiens* (Uniprot: Q9UPY3) y *Schizosaccharomyces pombe* (Uniprot: Q09884) (Figura 14A, Tabla 3). En el arreglo 1 se encuentra la Dicer de *Homo sapiens*, que es la única que tiene los dominios PAZ y de unión a dsRNA. En el arreglo 2 se presenta la pérdida de los dominios PAZ y de unión a dsRNA y aquí se encuentran la Dicer de *S. pombe* y la mayor parte de las Dicer de *Aspergillus*.

Finalmente, el arreglo 3 no tiene los dominios PAZ, de unión a dsRNA y el dominio Helicasa DEXD. Solo tres Dicer del genero *Aspergillus* presentan este arreglo.

La pérdida del dominio PAZ en hongos ya ha sido documentada en la literatura y se observa en los arreglos 2 y 3. En estudios proteómicos se identificó que este dominio aparecía solamente en 9 de 232 proteomas de hongos, mientras que en metazoarios en 51 de 92 proteomas y en plantas en 99 de 111, siendo en hongos donde este dominio aparece menos (Choi et al., 2014). Debido a su ausencia, no se sabe si el dominio PAZ es esencial en la función de las Dicer de estos organismos.

Tabla 3. Enzimas Dicer de *Aspergillus* utilizadas para la reconstrucción de la historia evolutiva

Subgénero	Especie	Dicer	ID de Proteína	Arreglo de Dominios
<i>Nidulantes</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	2	158697	2
			195183	2
	<i>Aspergillus versicolor</i>	2	87955	2
			181452	2
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	8926	1	
<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1	1115623	2
	<i>Aspergillus flavus</i>	3	2215063	2
			2280744	2
			2285283	2
	<i>Aspergillus oryzae</i>	2	10336	1
2210			2	
<i>Fumigati</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	4846	1
	<i>Aspergillus fischeri</i>	1	5303	2
	<i>Aspergillus clavatus</i>	0	-	-

En el árbol obtenido a partir de las secuencias de RNAsa III (Figura 14B), se observa que la Dicer humana, a diferencia de la de *S. pombe*, se ubica como outgroup de las Dicer de hongos. Esto concuerda con información en la literatura sobre la diversificación independiente de Dicer en hongos.

En el árbol de genes Dicer se identificaron al menos dos clados, el primero formado por tres Dicer que pertenecen a especies de los subgéneros *Nidulantes* y *Circumdati*, y está relacionado con la Dicer 1 de *S. pombe* (clado de las Dicer 1). El segundo clado esta formado por proteínas de los subgeneros *Nidulantes*, *Fumigati* y *Circumdati* (Clado de las Dicer 2).

A partir de este árbol, se pueden formular dos hipótesis sobre eventos de duplicación de Dicer en el género *Aspergillus*. La primera es un evento de duplicación que dio lugar a la aparición de las Dicer 1 y 2 y que posiblemente tenga

un origen evolutivo anterior a la diversificación de *Aspergillus*, y la segunda es un evento de duplicación que ocurrió en el clado de las Dicer 2, en el subgénero *Circumdati*, que dio lugar a la obtención de una segunda Dicer en *Aspergillus oryzae* y una tercera en *Aspergillus flavus*.

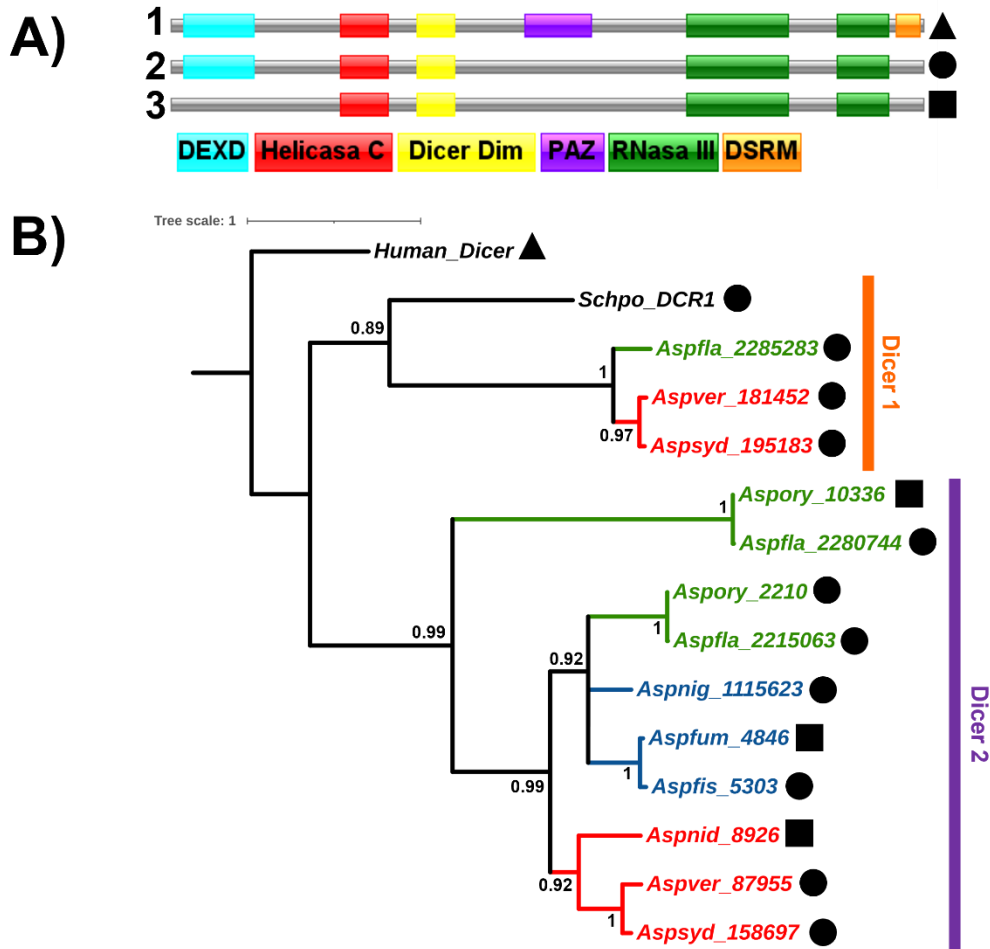


Figura 14: A) Arreglo de dominios correspondientes a Dicer del género *Aspergillus*, *Homo sapiens* y *Schizosaccharomyces pombe*. Dominios: DEXD helicasa (PF04851, SM000487), Helicasa C (PF00271, SM000490), Dicer Dim (PF03368), PAZ (PF02170, SM000949), RNAsa III (PF00636, SM000535) y DSRM (PF14709, SM000358). B) Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud obtenido con base en la alineación del dominio RNAsa III de las Dicer del género *Aspergillus* y 500 réplicas de Bootstrap. Las Dicer de *Homo sapiens* (Human_Dicer) y *Schizosaccharomyces pombe* (Schpo_DCR1) fueron usadas como outgroups. En Rojo se encuentran las Dicer del subgénero *Nidulantes*, en Azul las del género *Fumigati* y en Verde las de *Circumdati*. Los arreglos de dominios se muestran con las figuras negras. La línea Naranja indica el clado Dicer 1 y la línea Morada indica el clado Dicer 2.

Las proteínas Argonautas se han conservado a lo largo de la evolución y diversos organismos han adquirido múltiples parálogos. El número de estos parálogos puede variar desde 1 hasta 27, como es en el caso de *S. pombe* y *C. elegans* respectivamente. Hasta la fecha todas las proteínas Argonautas descubiertas mantienen dos dominios fundamentales: el PAZ y el PIWI (Höck & Meister, 2008).

Se identificó más de una proteína Argonauta en cada uno de los *Aspergillus* usados en este estudio (Tabla 4). La mínima cantidad de parálogos encontrados fueron dos

en un hongo y la máxima fue de 4, que están codificados en *A. versicolor*. En *A. sydowii* se encontraron 3 Argonautas.

Algo interesante es que *A. clavatus* codifica dos proteínas Argonautas, pero ninguna Dicer (Tabla 3 y 4). Esto podría significar que este hongo mantiene las actividades del mecanismo de RNAi mediante el complejo Argonauta y la formación de un complejo RISC, pero tal vez la generación de RNAs pequeños no codificantes depende de vías independientes a Dicer.

Una vez identificadas las Argonautas en este género, se identificaron los arreglos de dominios (Tabla 2) y se compararon con de las cuatro Argonautas de *Homo sapiens* (Uniprot: Q9UL18, Q9UKV8, Q9H9G7 y Q9HCK5) y la Argonauta de *S. pombe* (Uniprot: O74957) (Figura 15A). Se identificaron 5 arreglos de dominios. El arreglo 1 mantiene todos los dominios identificados en las proteínas Argonautas, las cuatro Argonautas humanas y la de *S. pombe* mantienen este arreglo. En el arreglo 2 se perdió el dominio MID y en el arreglo 3 se perdió el dominio N.

El arreglo 4 solo mantiene los dominios N y PIWI (Figura 15A), y debido a que no mantienen el dominio fundamental PAZ su función como homólogos de proteínas Argonautas no es segura. A la fecha no se han estudiado proteínas Argonautas sin dominio PAZ, pero es posible que las Argonautas de este arreglo colaboren como proteínas accesorias en el mecanismo de generación de RNAs pequeños.

Finalmente el arreglo 5 está conformado por dos proteínas de *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus fischeri* que únicamente mantienen el dominio catalítico PIWI (Figura 15A). La función de las proteínas con este arreglo no ha sido discutida o investigada hasta el momento, por lo que no sabe cuál sea su importancia en la evolución del mecanismo de RNAs pequeños en hongos.

Tabla 4. Enzimas Argonauta de *Aspergillus* utilizadas para la reconstrucción de la historia evolutiva

Subgénero	Especie	Argonauta	ID de Proteína	Arreglo de Dominios
Nidulantes	<i>Aspergillus sydowii</i>	3	148201	1
			688147	2
			88080	4
	<i>Aspergillus versicolor</i>	4	126397	1
			60063	2
			79543	2
			82417	4
	<i>Aspergillus nidulans</i>	2	7172	2
229			5	
Circumdati	<i>Aspergillus niger</i>	3	1088545	1
			1124628	2
			1186438	2

	<i>Aspergillus flavus</i>	3	2279043	2
			2540	3
			2283528	4
	<i>Aspergillus oryzae</i>	3	3271	1
			1486	2
			6435	4
Fumigati	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	4241	1
			9573	4
	<i>Aspergillus fischeri</i>	3	4224	1
			5791	4
			3743	5
	<i>Aspergillus clavatus</i>	2	5882	1
147			4	

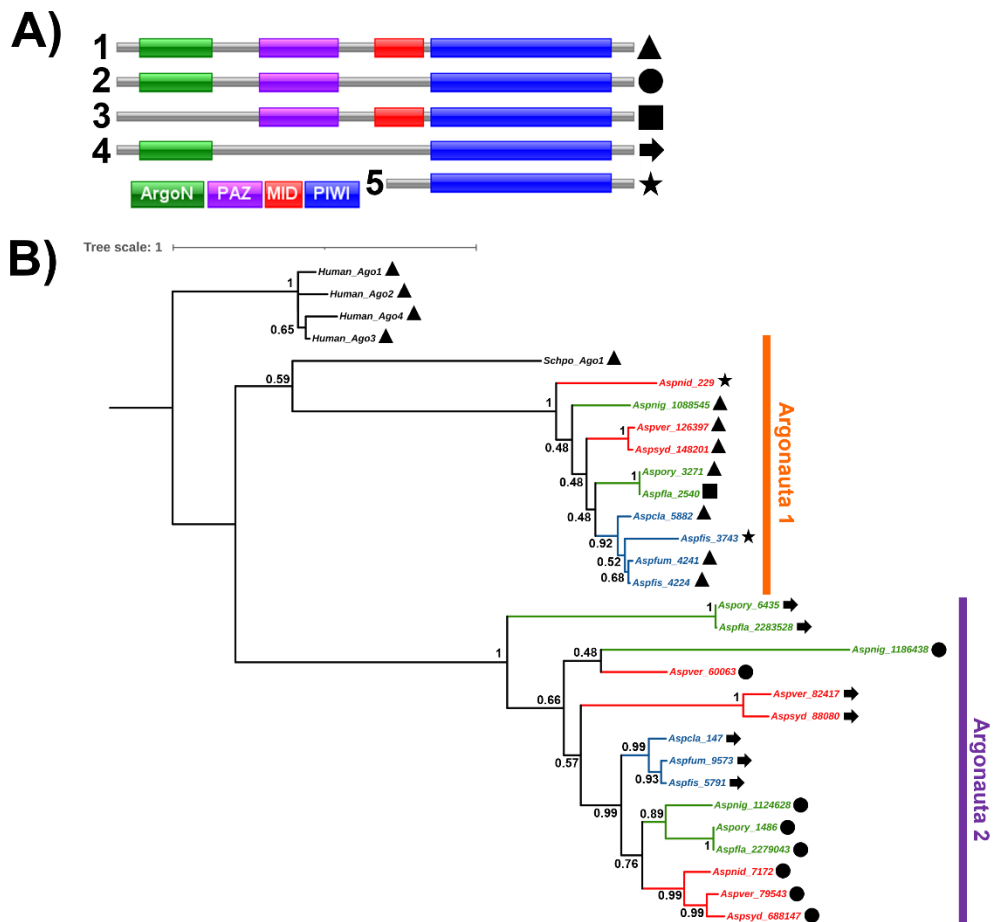


Figura 15: **A)** Arreglo de dominios correspondientes a ArgonAUTA del género *Aspergillus*, *Homo sapiens* y *Schizosaccharomyces pombe*. Dominios: ArgoN (PF16486), PAZ (PF02170, SM000949), MID (PF16487) y PIWI (PF02171, SM000950). **B)** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud obtenido con base en la alineación del dominio PIWI de las ArgonAUTA del género *Aspergillus* y 500 réplicas de Bootstrap. Las 4 ArgonAUTAs de *Homo sapiens* (Human_Ago1-4) y *Schizosaccharomyces pombe* (Schpo_Ago1) fueron usadas como outgroups. En Rojo se encuentran las ArgonAUTAs del subgénero *Nidulantes*, en Azul las del género *Fumigati* y en Verde las de *Circumdati*. Los arreglos de dominios se muestran con las figuras en negro. La línea Naranja indica el clado ArgonAUTA 1 y la línea Morada indica el clado ArgonAUTA 2.

En el árbol filogenético de Argonutas de *Aspergillus* se observa que hay tres clados (Figura 15B): uno formado por las Argonautas humanas que están funcionando como outgroups, un segundo clado que está relacionado con la Argonauta 1 de *S. pombe* (Argonautas 1), y un tercer clado (Argonautas 2). Al igual que en el árbol de las Dicer, los nodos finales tienden a agruparse en subgeneros. Debido a que algunos nodos internos del árbol tienen niveles muy bajos de Bootstrap, no se pueden determinar relaciones evolutivas estadísticamente confiables.

Las Argonautas que tienen función de endonucleasa para cortar mRNA blanco y degradar a la cadena pasajera, solo lo hacen cuando tienen presente el sitio catalítico del dominio PIWI (Hauptmann et al., 2013). Inicialmente se creía que el sitio catalítico era una triada formada por dos residuos Aspárticos y un tercero denominado X, que puede ser Aspartato o Histidina, de ahí el nombre DDX para este sitio. Sin embargo, a partir de análisis estructurales en estas proteínas se identificó que el sitio catalítico no es una triada, sino una tétrada conformada por los aminoácidos Asp, Glu, Asp y X, por lo que ahora a este sitio catalítico se le conoce como DEDX (Nakanishi et al., 2012).

En humanos solo la Argonauta 2 posee actividad catalítica y su sitio DEDX está formado por los aminoácidos Asp597, Glu637, Asp669 e His807. A pesar de que otras Argonautas humanas tengan el sitio DEDX, no todas tienen actividad catalítica (Nakanishi et al., 2012). La actividad endonucleasa no es imprescindible para las Argonautas, pues algunas de ellas llevan a cabo el silenciamiento de genes a través de la represión de la traducción y no por la degradación del mRNA blanco (ver sección 2.6). La Argonauta 1 humana es un ejemplo de Argonauta que ha sido predicha como inactiva debido a que no tiene el sitio catalítico DEDX completo, en este caso X=Arg (Fig 16) (Jin et al., 2021).

Para identificar la presencia del sitio DEDX de las Argonautas de *Aspergillus* y comprobar *in silico* la actividad endonucleasa, se hizo un alineamiento del dominio PIWI y se identificaron los aminoácidos de este sitio utilizando como referencia la Argonauta humana 2.

Del alineamiento de la figura 16, se puede observar que de las tres Argonautas de *A. sydowii*, solo la 88080 no mantiene el dominio DEDX, ya que, en lugar de un Glutamato, tiene una Lisina con propiedades fisicoquímicas opuestas y en el segundo Aspartato hay una Glicina. Esto podría indicar que esta Argonauta no mantiene la actividad de corte y tal vez necesite de proteínas accesorias para cumplir su función. Probablemente esta Argonauta participe en las actividades mediadas por miRNAs, ya que con estos no se necesita actividad endonucleasa para la regulación de expresión génica. Ninguna de las proteínas del arreglo 5 mantiene el sitio DEDX, por lo que es probable que estas enzimas no tengan actividad catalítica endonucleasa, por lo que su función es un enigma.

Se ha asociado la función de las Argonautas y el complejo RISC con la inhibición del inicio de la traducción, la interacción entre eIF4E y el Cap en 5' es la estrategia más común para inhibir este inicio (Fabian et al., 2010). Se han identificado dos posibles mecanismos por los cuales las Argonautas pueden evitar esta interacción:

- Las Argonautas tienen un dominio de unión a Cap, que tiene homología limitada a eIF4E, este dominio en Argonautas se llama MC y se encuentra dentro del dominio MID. En la eIF4E humana, la capacidad de unirse al Cap recae en los aminoácidos Trp56 y Trp102. En el dominio MC de la Argonauta 2 humana, estos dos aminoácidos han sido reemplazados por Phe470 y Phe505. Esto sugiere que hay una competencia entre Argonauta y eIF4E por unirse al Cap (Kiriakidou et al., 2007), aunque este mecanismo ha sido cuestionado debido a la poca similitud en la estructura de ambas proteínas (Kinch & Grishin, 2009).
- El otro mecanismo consiste en la interacción de Argonauta y el complejo miRISC con componentes de eIF4F (eIF4E, eIF4G y eIF4A). En *Drosophila* se reporta la Argonauta 2 compete con eIF4G por unirse a eIF4E, impidiendo la circularización y el inicio. Se cree que este mecanismo no está conservado en la evolución debido a que eIF4E y la Argonauta 2 de mamíferos no interactúan (Fabian et al., 2010).

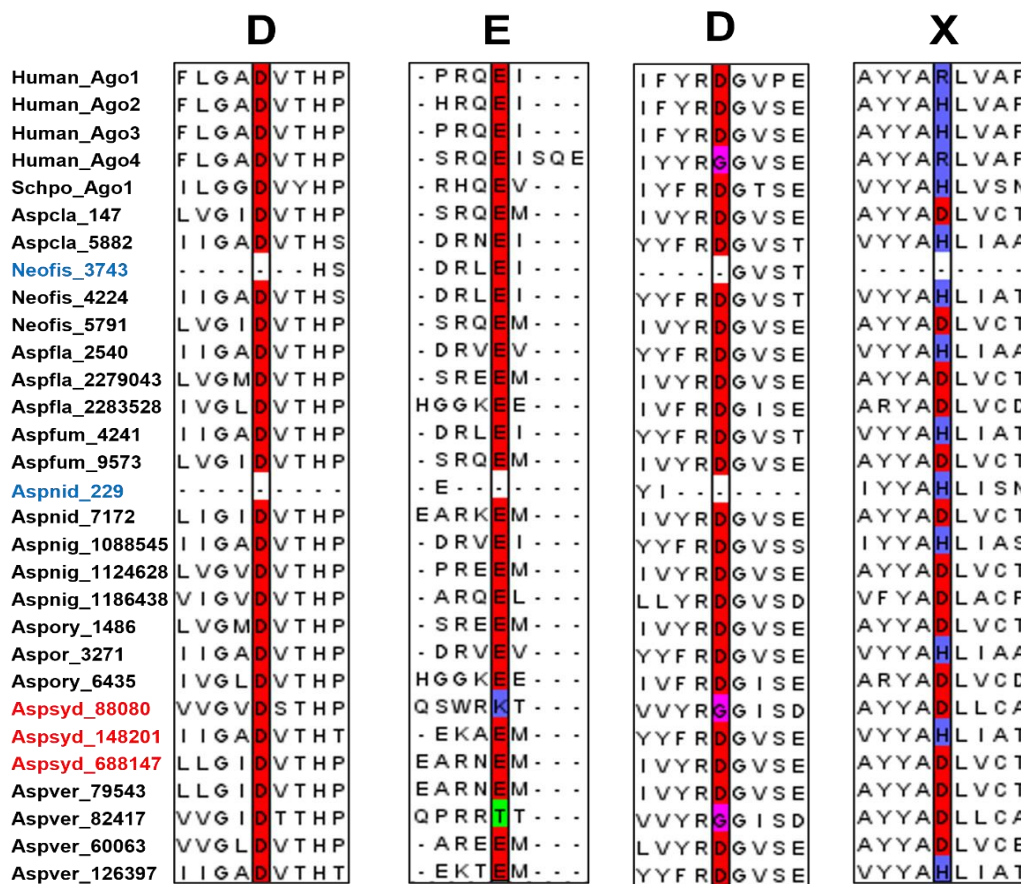


Figura 16: Sitio catalítico DEDX de las proteínas Argonauta del género *Aspergillus*. A la izquierda se muestran los nombres de cada proteína, en Rojo están las Argonautas de *Aspergillus sydowii* y en Azul las proteínas de arreglo 5. En colores se encuentran marcadas las posiciones de los aminoácidos que corresponden al sitio DEDX de la Argonauta humana 2. Aminoácidos coloreados con base en las propiedades fisicoquímicas Zappo: negativos (Rojo), positivos (Azul), hidrofílicos (Verde) y G (Rosa). El alineamiento se hizo con Jalview y Mafft por defecto.

Para saber si las Argonautas de *Aspergillus* pueden interactuar con el Cap, se hizo un alineamiento para identificar los aminoácidos que puedan participar en esta interacción usando la Argonauta 2 humana como referencia (Figura 17). Los resultados de este alineamiento mostraron que la gran mayoría de estas Argonautas no mantienen los aminoácidos hidrofóbicos en estas posiciones. En *Aspergillus sydowii* solo la Argonauta 148201 mantiene una Fen y Tyr que corresponden a los aminoácidos aromáticos de la interacción de Argonauta 2 humana, por lo que podría interactuar con el Cap. Estos resultados sugieren que tal vez las Argonautas de este género, en su mayoría, inhiben el inicio de la traducción mediante la degradación de mRNA o mediante mecanismos independientes a la interacción con el Cap.

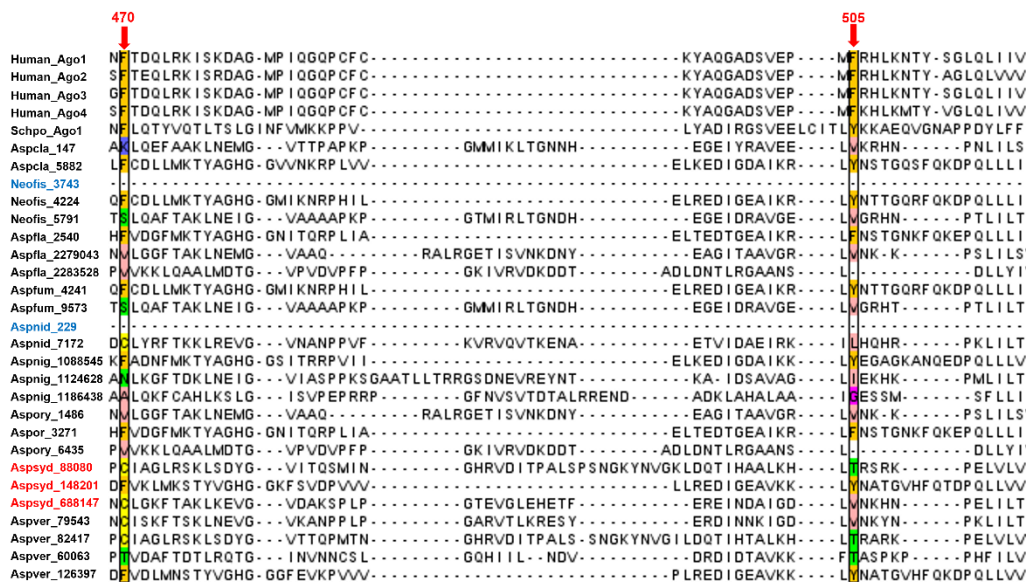


Figura 17: Aminoácidos involucrados en la interacción con Cap 5' en las Argonauta del género *Aspergillus*. A la izquierda se muestran los nombres de cada proteína, en Rojo están las Argonautas de *Aspergillus sydowii* y en Azul las proteínas de arreglo 5. Las flechas rojas indican las posiciones de las Fen de la Argonauta humana 2 y en colores se encuentran marcadas estas posiciones. Aminoácidos coloreados con base en las propiedades fisicoquímicas Zappo: negativos (Rojo), positivos (Azul), hidrofílicos (Verde), hidrofóbicos (Naranja), Gly (Violeta) y Cis (Amarillo). El alineamiento se hizo con Jalview y Mafft por defecto a lo largo de todas las proteínas Argonauta.

6.2.- Proteínas involucradas en la síntesis de miRNAs en *Aspergillus sydowii*

STRING es una herramienta que permite identificar interacciones entre proteínas con relación funcional o física. En STRING las interacciones se obtienen con base en evidencia por conservación de vecindad y fusión de genes, co-ocurrencia, co-expresión, experimental, bases de datos y minería de textos en distintos organismos. Cada tipo de evidencia tiene asociado un puntaje que indica que tan confiable o no puede ser una interacción y la suma de todos estos puntajes se ve reflejado en un puntaje de confiabilidad que va de 0 a 10 (Szklarczyk et al., 2021). Mientras más grande sea el puntaje, mayor es la confiabilidad de una interacción, pero menor la probabilidad de obtener un gran número de interacciones.

La búsqueda de proteínas que interactúan con Dicer y Argonauta en *A. nidulans* arrojó un total de 29 proteínas que superaron un puntaje de confiabilidad mayor

a 0.4. Una desventaja de este análisis es que gran parte de la evidencia de estas interacciones recayó en bases de datos, minería de textos y en muy poca cantidad en evidencia experimental. Esto se debe a que en comparación con otros organismos eucariontes, existe poca información relacionada a miRNAs en hongos y sus vías de síntesis.

De las 29 proteínas que arrojó STRING, 17 pasaron los criterios de selección establecidos (ver Sección 5). Las proteínas seleccionadas se muestran en la Tabla 5 y la red de interacciones se muestra en la Figura 18.

Tabla 5. Proteínas seleccionadas del análisis de STRING			
Anotación STRING	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	Valor de confiabilidad
Ars2	AN7544.2	153624	0.909
Translin	AN2847	780145	0.998
TRAX	AN3367.2	43499	0.7
Hsp90	AN8269.2	61916	0.616
Hsp70	AN5129	33431	0.999
ADAT	AN4093.2	31002	0.578
Tudor-SN	AN0242.2	85834	6.611
Dcp1/Dcp2	AN10010	40472	0.999
Pat1	AN2751.2	59484	0.999
Dhh1	ANIA_10417	77727	0.711
Lsm1	AN6199.2	151821	0.999
Lsm2	ANIA_10963	-	0.999
Lsm3	ANIA_10007	40490	0.999
Lsm4	ANIA_10781	45335	0.999
Lsm5	AN5679.2	43764	0.999
Lsm6	ANIA_10719	43604	0.999
Lsm7	AN0767.2	41589	0.999

Red de Interacciones en STRING

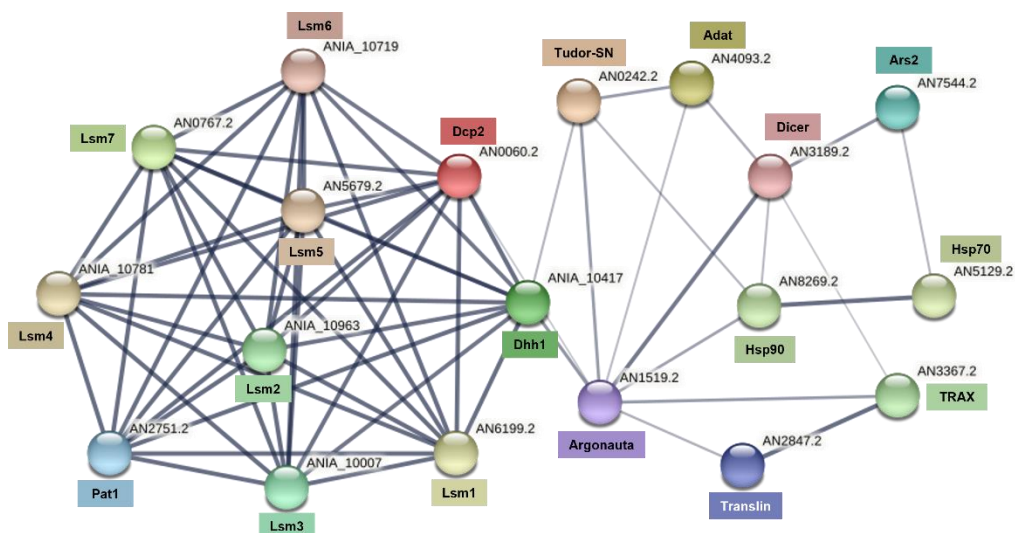


Figura 18: Red de interacciones de proteínas seleccionadas en STRING. Argonauta y Dicer fueron usadas como nodos centrales para la búsqueda. Los conectores indican interacciones, a mayor intensidad del conector, más confiables son las interacciones.

6.2.1.- Proteína de Resistencia a Arsénico (Ars2)

La proteína de resistencia a arsénico (Ars2) se localiza principalmente en núcleo y participa en el procesamiento de mRNA y RNA pequeño, así como en su exportación y degradación. Ars2 está altamente conservada en mamíferos y metazoarios, pero además existen homólogos en plantas y en la levadura *S. pombe* (Egan et al., 2014; Gruber et al., 2009; Lobbes et al., 2006; Y. Zhou et al., 2015) (Sabin 2009).

En *A. nidulans* y *A. sydowii* se encontró una proteína Ars2 (Tabla 5) y sus dominios coinciden con los de proteínas manualmente anotadas en Uniprot (Figura 19). La única diferencia entre estas y las Ars2 de estos *Aspergillus*, es que las últimas tienen un dominio de función desconocida (DUF4187).

En el hongo Ascomiceto *Fusarium graminearum*, un patógeno de plantas, se describió que Ars2 tiene funciones en respuesta a daño de DNA y patogénesis, pero no en la producción de RNA pequeño (Bui et al., 2019). Esta es la única evidencia experimental que existe sobre el papel de Ars2 en mecanismos de RNAi en hongos. A falta de mayor evidencia experimental, Ars2 en *A. nidulans* y *A. sydowii* no debería participar en la producción de miRNAs.

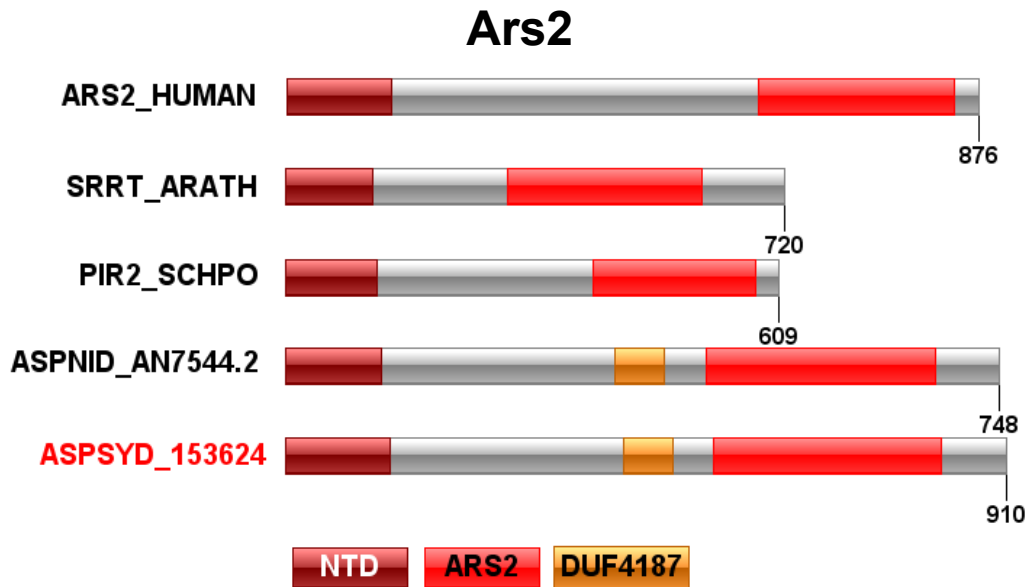


Figura 19: Proteína de Resistencia a Arsénico (Ars2) en *Homo sapiens* (AR2_HUMAN; Uniprot: Q9BXP5), *Arabidopsis thaliana* (SRRT_ARATH; Uniprot: Q9ZVD0) y *Schizosaccharomyces pombe* (PIR2_SCHPO; Uniprot: O94326), Dominios: Dominio Terminal N (NTD) (PF12066), ARS2 (PF04959) y DUF4187 (PF13821). Todas las proteínas están alineadas en el inicio del dominio NTD.

6.2.2.- Deaminasa de Adenosina Actuante sobre tRNA (ADAT)

La familia de enzimas Deaminasa de Adenosina Actuante sobre RNA (ADAR), se encargan de catalizar la conversión de Adenina (A) a Inosina (I) en dsRNA. Se sabe que estas enzimas llevan a cabo ediciones A-I en miRNAs, lo que resulta en una regulación negativa debido a que este tipo de modificaciones evitan que sean

reconocidos por enzimas clave durante su procesamiento y sean marcadas para degradación (Nishikura, 2016).

Se han propuesto algunos mecanismos de regulación de miRNAs mediados por ADAR y se ha descrito que estos pueden ser dependientes o independientes de edición A-I. Los dependientes pueden ocurrir en núcleo o citoplasma y evitan que enzimas claves en el procesamiento de miRNAs, como Drosha o Dicer, reconozcan a estas moléculas debido a la gran cantidad de Inosinas que contienen. También se ha visto que pueden evitar que estos miRNAs editados sean cargados al complejo RISC. Los mecanismos independientes son mediados por la capacidad de las enzimas ADAR de reconocer y unirse a dsRNA para secuestrar pri-miRNAs en núcleo y evitar su procesamiento (Nishikura, 2016).

En la literatura se ha reportado que no existen ortólogos de enzimas ADAR en hongos. Sin embargo, se ha identificado que las modificaciones A-I no solo ocurren en dsRNA, sino también en tRNAs y son mediadas por enzimas Deaminasa de Adenosina Actuante sobre tRNA (ADAT). Aunque las enzimas ADAT son capaces de reconocer la estructura completa de tRNAs, en bacterias se ha comprobado que homólogos de ADAT llevan a cabo su función sobre un pequeño sustrato con estructura de tallo-asa perteneciente al brazo del anticodón. También se ha visto que la edición A-I en mRNA es mediada por un homólogo ADAT. Debido a que la mayoría de las modificaciones A-I en hongos Ascomicetos están situadas en estructuras tallo-asa, se ha levantado debate sobre si estas enzimas ADAT en hongos pueden llevar a cabo una función similar a la de bacterias. *S. cerevisiae*, *F. graminearum* y *N. crassa* tienen 3 genes homólogos de enzimas ADAT (Teichert, 2020).

En *A. nidulans*, STRING reconoció una enzima ADAT. Al hacer la búsqueda con Blast en *A. sydowii*, también identificamos una enzima ADAT (Tabla 5). Comparamos los dominios de ambas proteínas con una proteína ADAR de humano y una ADAT de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que confirmó su identidad (Figura 20). Nosotros proponemos que debido a la falta de enzimas ADAR en hongos, tal vez las enzimas ADAT sean las que participen en la regulación de la síntesis de miRNAs.

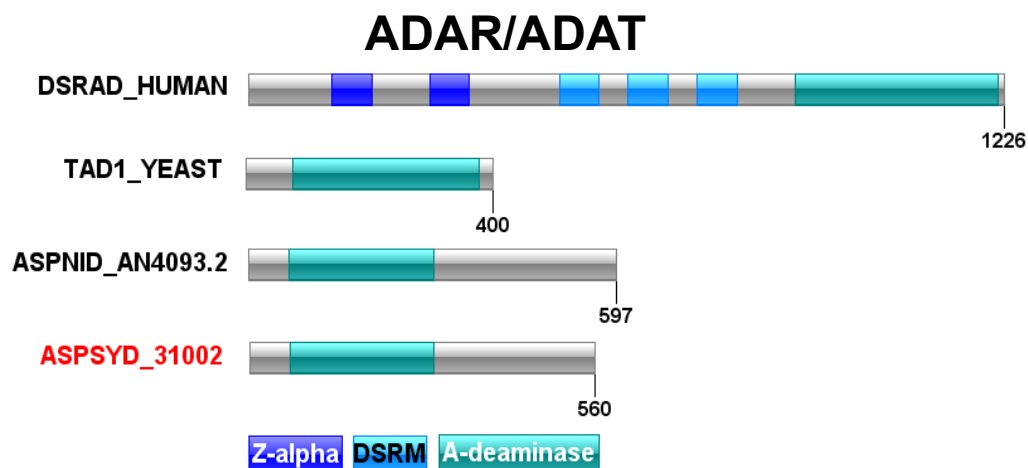


Figura 20: Proteínas ADAR de *Homo sapiens* (*DSRAD_HUMAN*; P55265) y ADAT de *Saccharomyces cerevisiae* (*TAD1_YEAST*; P53065). Dominios: Dominio de unión a DNA Z (PF02295, SM000550), DSRM (PF00035, SM000358) y Dominio Deaminasa (PF02137, SM000552).

6.2.3.- Tudor-SN

Tudor-SN también llamada SND1 o p100, es una ribonucleasa presente en núcleo y citoplasma, que tiene alta especificidad por dsRNA que haya sufrido edición A-I. Se ha vinculado la actividad de Tudor-SN con la regulación de la síntesis de miRNAs. En humanos el pri-miRNA-142 es editado por enzimas ADAR, lo que inhibe su procesamiento, lo marca para ser reconocido por Tudor-SN y posteriormente ser degradado (C. L. Li et al., 2008).

Tudor-SN también participa en el mecanismo de decaimiento de miRNAs mediado por Tudor-SN (TumiD). Este mecanismo funciona en el recambio de miRNAs unidos al complejo RISC y en la liberación de sus mRNAs blanco. Los miRNAs maduros que son blanco de este mecanismo contienen al menos un dinucleótido CA o UA en los primeros cinco nucleótidos de los extremos 5' o 3'. Tudor-SN corta en estos dinucleótidos y posteriormente degrada en su totalidad estos blancos (Elbarbary et al., 2017; Elbarbary et al., 2017).

En el mecanismo de TumiD también participa una ATP Helicasa llamada UPF1. Si bien su presencia no es esencial para que exista degradación de los blancos de TumiD, su función en este mecanismo es disociar a los miRNAs de su mRNA blanco haciendo que estos se vuelvan más susceptibles a su decaimiento por Tudor-SN (Andjus et al., 2021; Elbarbary et al., 2017).

A. nidulans contiene una proteína Tudor-SN y esta tiene interacciones con Argonauta y ADAR (Figura 18). *A. sydowii* también contiene esta proteína (Tabla 5). La distribución de dominios en esta familia de proteínas consiste en cuatro repeticiones en tándem de dominios SN, seguido de dominio Tudor y un dominio parcial SN en el C terminal (Figura 21). Se ha reportado que para que haya función de Tudor-SN, mínimo debe haber dos repeticiones del dominio SN (C. L. Li et al., 2008). La Tudor-SN de *A. sydowii* tiene tres repeticiones en tándem de dominios SN, seguido de dominio Tudor y un dominio SN completo en el C terminal (Figura 21). No se identificó una Helicasa UPF1 en *A. sydowii*, por lo que debe haber otra helicasa mediando el mecanismo de TumiD.

Tudor-SN

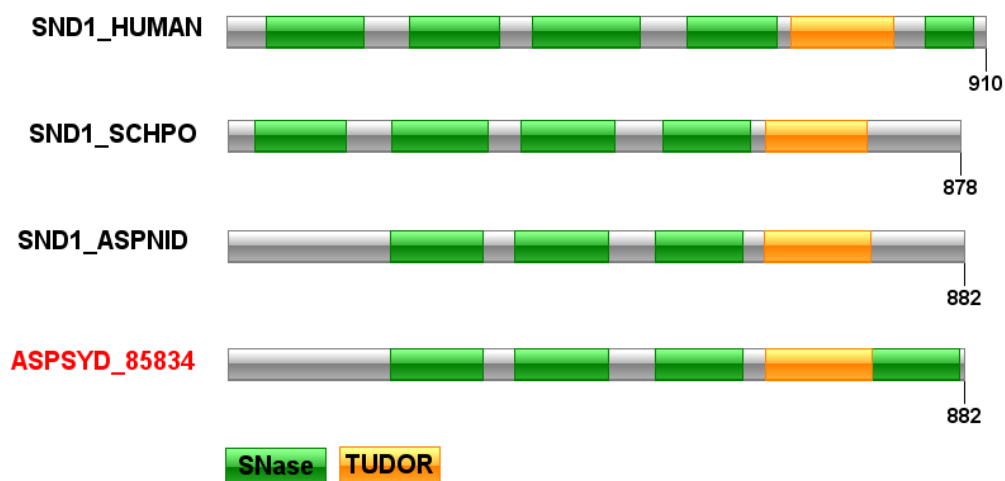


Figura 21: Proteínas Tudor-SN de *Homo sapiens* (SND1_HUMAN; Uniprot: Q7KZF4) y *Schizosaccharomyces pombe* (SND1_SCHPO; Uniprot: Q9Y7U7). Dominios: SNase (PF00565, SM000318) y TUDOR (PF00567, SM000333).

6.2.4.- Hsp90 y Hsp70

El complejo formado por las chaperonas Hsp70/90 juega un papel esencial en la activación de cientos de proteínas como: receptores de hormonas esteroideas, Cinasas, E3 ubiquitin ligasas y factores de transcripción, solo por mencionar algunos (Tsuboyama et al., 2018). Cuando la endonucleasa Dicer produce un dúplex de RNA, este dúplex debe pasar desde el sitio catalítico de esta enzima, al sitio catalítico de la enzima Argonauta. La función de Hsp70/90 en RNAi es promover la translocación de ese dúplex de RNA desde Dicer hasta Argonauta, una vez que Dicer ya fue reclutado al complejo RISC. La función de Hsp70/90 es esencial para que RISC cumpla su función adecuadamente (Iwasaki et al., 2010). Mediante un mecanismo dependiente de ATP, Hsp70 induce una conformación abierta de la Argonauta, mientras que la Hsp90 mantiene por más tiempo esta estructura abierta (Tsuboyama et al., 2018). Este mecanismo ha sido demostrado en plantas, donde Hsp70/90 mediante la hidrolisis de ATP induce un cambio conformacional en Argonauta, induciendo una estructura abierta que permite la carga de duplexes de RNA pequeño (Iki et al., 2010).

En los genomas de *A. nidulans* y *A. sydowii* se encuentra una copia de cada una de estas proteínas (Tabla 5). Por lo que se sugiere que éstas induzcan una conformación abierta de la enzima Argonauta para permitir la carga de dúplex de miRNAs. El arreglo de dominios de ambas proteínas esta conservado y los dominios de las proteínas de estos hongos coincide, por lo que pertenecen a estas familias de proteínas (Fig 21 y 22).

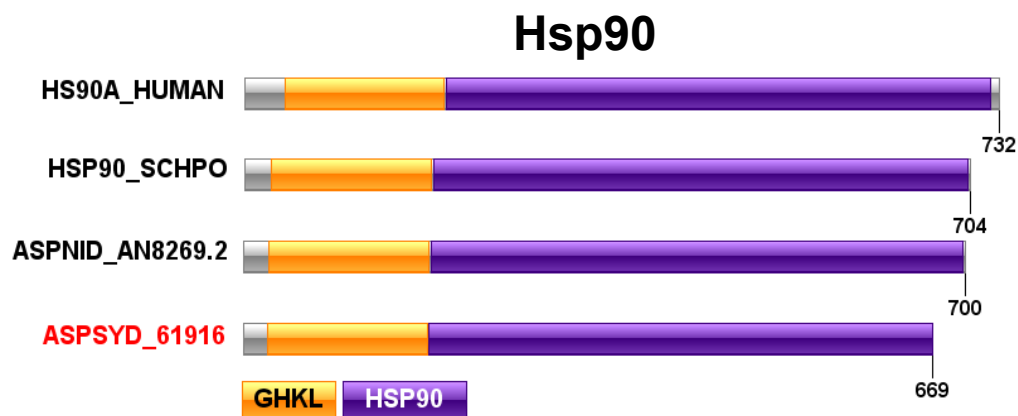


Figura 21: Proteínas Hsp90 de *Homo sapiens* (HS90A_HUMAN; Uniprot: P07900) y *Schizosaccharomyces pombe* (HSP90_SCHPO; Uniprot: P41887). Dominios: GHKL (PF02518, SM000387) y HSP90 (PF00183).

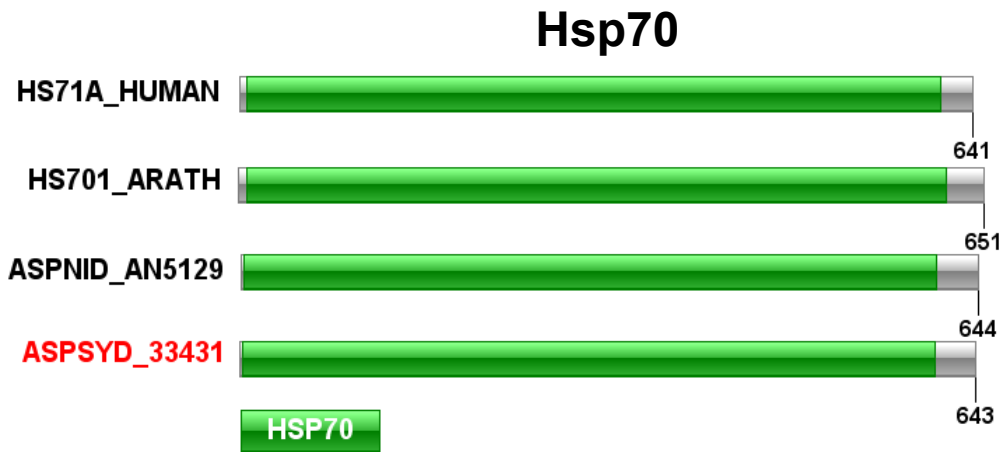


Figura 22: Proteínas Hsp70 de *Homo sapiens* (HS71A_HUMAN; Uniprot: P0DMV8) y *Arabidopsis thaliana* (HS701_ARATH; Uniprot: P22953). Dominio: HSP70 (PF00012).

6.2.5.- Trans/TRAX

Translin es una proteína de unión a RNA y DNA de cadena simple y TRAX (TRanslin Associated protein X) es un parálogo de esta proteína. Ambos forman un octámero formado de 6 proteínas Translin y dos TRAX conocido como Componente 3 promotor de RISC (component 3 promoter of RISC; C3PO), que induce la activación del complejo RISC mediante el corte y subsecuente degradación de la cadena pasajera en este complejo (Ye et al., 2011). Translin y Trax están altamente conservadas en diversos eucariontes, incluyendo a la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Eliahoo et al., 2014). En *N. crassa* la degradación de la cadena pasajera en el complejo pre-RISC no es mediada por C3PO, sino por otra endonucleasa llamada QIP (QDE-2-interacting protein) (Maiti et al., 2007).

En *A. nidulans* se identificó mediante STRING una proteína Translin y una Trax, que también se conservan en *A. sydowii* (Tabla 1). La comparación de dominios con Translin y Trax de *H. sapiens* y *S. pombe* confirmó que estas proteínas son homólogos de Translin y Trax (Figura 23). También se hizo una búsqueda con Blastp en estos *Aspergillus* para identificar proteínas con homología a QIP de *N. crassa*, pero no se identificaron proteínas con homología significativa. La presencia de Translin y Trax y la ausencia de QIP en estos *Aspergillus*, podría indicar que la degradación de cadena pasajera en el complejo pre-RISC ocurre vía Translin y Trax.

Translin/Trax

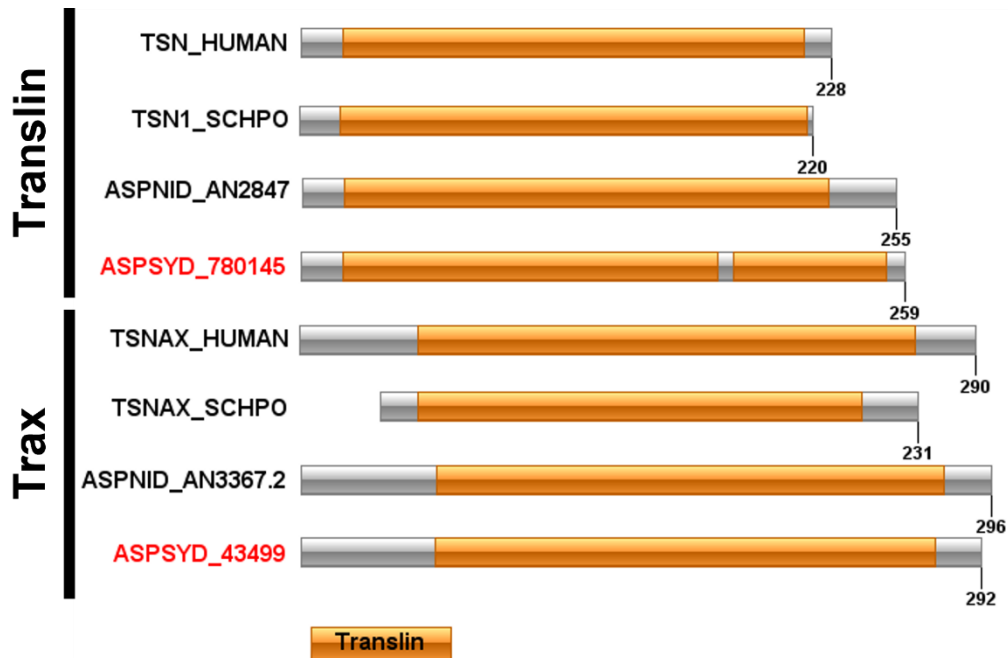


Figura 23: Proteínas Translin y TRAX de Homo sapiens (TSN_HUMAN; Uniprot: Q15631) (TSNAX_HUMAN: Uniprot: Q99598) y Schizosaccharomyces pombe (TSN1_SCHPO; Uniprot: Q9P7V3) (TSNAX_SCHPO; Uniprot: O74955). Dominio: Translin (PF01997).

6.2.6.- Pérdida de Cap 5' (Decapping)

Después de que un miRNA reconoce un mRNA blanco, este debe sufrir la pérdida del Cap en 5' (Decapping), lo que promueve su desestabilización para finalmente ser degradado (Rouya et al., 2014). En la levadura *S. cerevisiae* Dcp1/Dcp2 cataliza la escisión del Cap. Esta enzima tiene dos subunidades, una catalítica (Dcp2p) y una regulatoria (Dcp1p). Hay tres grupos de proteínas que acompañan a Dcp1/Dcp2 en los eventos de Decapping: las que activan directamente a la enzima que remueve el Cap (Edc3 y Lsm1-7), las que promueven el mecanismo inhibiendo la traducción (Dhh1 y Scd6) y las que cumplen los dos tipos de funciones (Pat1) (Nissan et al., 2010).

El mecanismo de Decapping funciona de la siguiente manera: primero se debe inhibir el inicio de la traducción, donde Dhh1, Scd6 y Pat1 inhiben la formación del complejo 48S. Después se deben reclutar Dcp1/Dcp2, Edc3, que activa a Dcp1/Dcp2 y al complejo Lsm 1-7, que es necesario para la activación completa del complejo de Decapping. Finalmente la exonucleasa Xrn1 es reclutada a este complejo para degradar al mRNA en dirección 3'-5' (Nissan et al., 2010).

De las 13 proteínas que participan en el mecanismo de Decapping en *S. cerevisiae* (Tabla 6), STRING solo reconoció a 11 de ellas y a la endonucleasa Xrn1 en *A. nidulans*, no reconoció y tampoco encontramos proteínas homologas a Edc3 y Scd6. Al hacer los Blast en *A. sydowii*, no identificamos a Lsm2 ni a la exonucleasa Xrn1 (Tabla 6). La falta de Edc3, Scd6 y Xrn1 podría indicar que tal vez otras proteínas lleven a cabo esas funciones.

De acuerdo con el arreglo de dominios, todas las proteínas tienen una anotación correcta (Figuras 24 y 25), excepto por la Lsm1 de *A. nidulans*. El dominio Lsm de

esta proteína estaba colocado en una posición diferente con respecto a las demás, lo que nos lleva a pensar que tal vez no se trate de esta misma proteína.

La presencia de estas proteínas podría indicar que el mecanismo de Decapping tal vez funcione de la misma manera en *Aspergillus sydowii*, tal y como lo hace en *Saccharomyces cerevisiae* y junto a las interacciones obtenidas por STRING, podríamos decir que el mecanismo de Decapping participa en la degradación del mRNA en los mecanismos de RNAi mediados por miRNAs.

Tabla 6. Proteínas del complejo Decapping			
Proteína/Organismo	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. sydowii</i>
Dhh1	P39517	ANIA_10417	77727
Dcp1/Dcp2	P53550	AN0060.2	40472
Pat1	P25644	AN2751.2	59484
Dhh1	P39517	ANIA_10417	77727
Lsm1	P47017	-	151821
Lsm2	P38203	ANIA_10963	-
Lsm3	P57743	ANIA_10007	40490
Lsm4	P40070	ANIA_10781	45335
Lsm5	P40089	AN5679.2	43764
Lsm6	Q06406	ANIA_10719	43604
Lsm7	P53905	AN0767.2	41589
Edc3	P39998	-	-
Scd6	P45978	-	-
Xrn1	P22147	AN11052	-

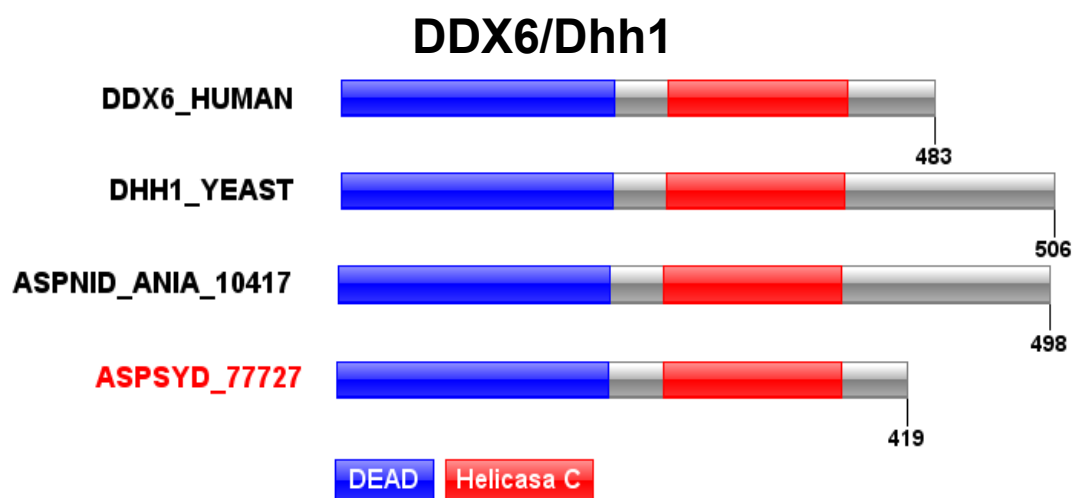


Figura 24: Proteínas DDX6 de *Homo sapiens* (DDX6_HUMAN; Uniprot: P26196) y Dhh1 de *Saccharomyces cerevisiae* (DHH1_YEAST; Uniprot: P39517). Dominios: DEAD (PF00270, SM000487) y Helicasa C (PF00271, SM000490).

Proteínas Dcp2, Pat1 y Lsm 1-7

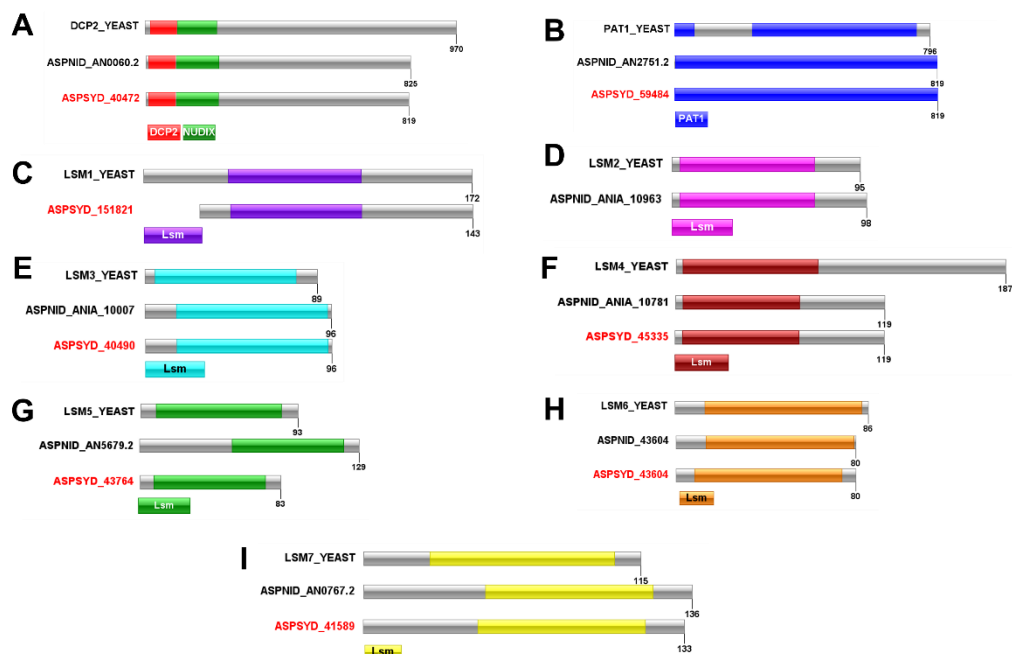


Figura 25: Proteínas **A)** Dcp2 (DCP2_YEAST; Uniprot: P53550), **B)** Pat1 (PAT1_YEAST; Uniprot: P25644), **C)** Lsm 1 (Uniprot: P47017), **D)** Lsm 2 (Uniprot: P38203), **E)** Lsm 3 (Uniprot: P57743), **F)** Lsm 4 (Uniprot: P40070), **G)** Lsm 5 (Uniprot: P40089), **H)** Lsm 6 (Uniprot: Q06406) e **I)** Lsm 7 (Uniprot: P53905) de *Saccharomyces cerevisiae*. Dominios: DCP2 (PF05026) y NUDIX (PF00293) en Dcp2; PAT1 (PF09770) en Pat1 y Lsm (PF01423) para Lsm 1-7.

6.3.- Extracción de RNA

El RNA es una molécula que se degrada rápidamente en presencia de RNasas. Para identificar si el RNA de partida es de buena calidad y no está degradado, se han desarrollado diversos métodos que permiten evaluar su integridad. Históricamente la integridad del RNA siempre se ha evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite analizar visualmente si el RNA se ha degradado o si está contaminado con DNA.

Cuando se hace una electroforesis de agarosa, esta produce un patrón de bandas que permite identificar ciertos tipos de RNA de interés. Dos tipos de RNA que son importantes para conocer la calidad de este, son el rRNA 28S y 18S en eucariontes. La relación 28S/18S permite evaluar la calidad del RNA con base en su razón, un RNA con una razón 28S/18S cercana o mayor a 2 es un RNA poco degradado.

Finalmente, el último parámetro que se utiliza comúnmente para evaluar la calidad el RNA es el Número de Integridad de RNA (RIN). Este parámetro se basa en distintas características del RNA que contribuyen a la información sobre su integridad. Generalmente se ha asociado un RIN mayor o igual a 8 como un parámetro de calidad para el RNA (Schroeder et al., 2006).

Al inicio de este trabajo se determinó que el RNA obtenido se secuenciará con la plataforma HiSeq2500 de Illumina usando las librerías TruSeq Small RNA. Para que

una muestra de RNA sea considerada para este tipo de secuenciación, debe cumplir con los siguientes criterios: tener una cantidad mínima de 3µg de RNA total, un RIN mayor a 7 y una razón de rRNA 28S/18S mayor a 1.

Para este trabajo se hicieron múltiples extracciones de RNA y como resultado de estas extracciones, se obtuvieron 5 muestras de calidad que cumplieron con los criterios para secuenciación. A la fecha de entrega de esta tesis, aún no se obtienen las 4 muestras restantes con calidad óptima para secuenciación, debido a que tienen contaminación con DNA genómico y bajo nivel de rendimiento. Debido a la falta de estas 4 muestras, aún no se han secuenciado los RNAs y por lo tanto los objetivos 3, 4 y 5 (Sección 4) no pudieron cumplirse en este trabajo.

En la tabla 7 se muestra el reporte de Control Calidad (QC) correspondiente a las muestras enviadas para secuenciación y en la figura 26 se muestra el último gel que se hizo, con muestras de RNA que corresponden a las condiciones sin Sal (Ctrl), 0.5M y 2.0M de NaCl.

Se observa que la muestra Ctrl 1 fue rechazada debido a la baja cantidad de RNA total, además, aunque no se muestra, esta tenía contaminación con DNA genómico. Las muestras de 0.5M de NaCl 1-3, fueron rechazadas debido a que no tenían la cantidad suficiente de RNA.

Tabla 7. Reporte Control Calidad (QC)						
Muestra	Concentración (ng/ µL)	Volumen Final (µL)	RNA Total (µg)	RIN	Radio rRNA	Estado
Control 1	94.517	28	2.646	10	1.4	Rechazado
Control 2	115.607	30	3.468	10	1.4	Aprobado
Control 3	122.682	32	3.926	9.7	2.4	Aprobado
0.5 M 1	20.345	27	0.549	8.8	1.1	Rechazado
0.5 M 2	57.889	23	1.331	9.4	1.1	Rechazado
0.5 M 3	32.639	23	0.751	9.3	1.3	Rechazado
2.0 M 1	273.753	22	6.023	9.5	1.7	Aprobado
2.0 M 2	444.996	26	11.57	9.6	1.6	Aprobado
2.0 M 3	540.729	23	12.437	9.9	1.6	Aprobado

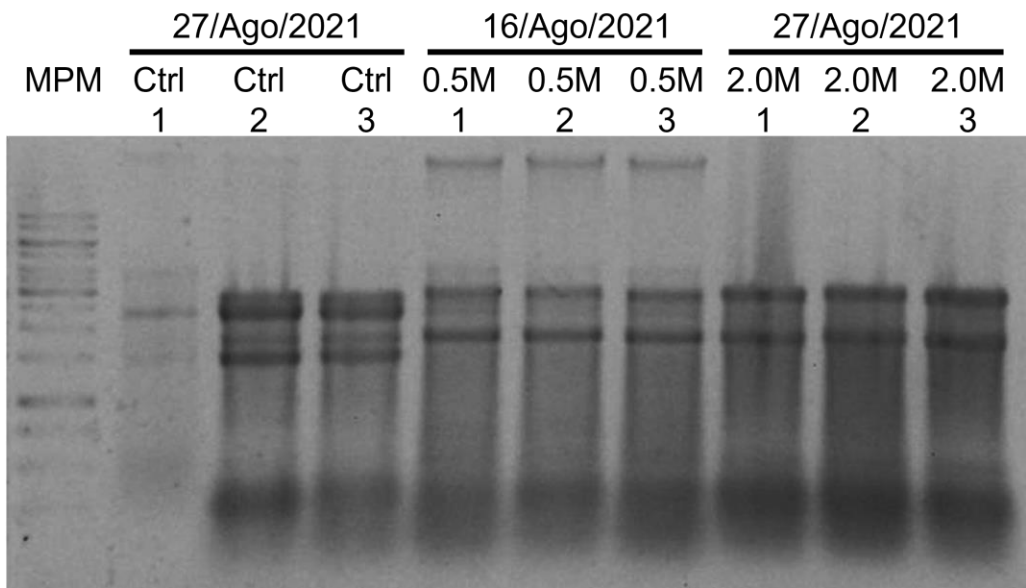


Figura 26: Gel de Agarosa al 1% con muestras de RNA en las condiciones sin sal (Ctrl), 0.5M de NaCl y 2.0M de NaCl. En la parte superior se muestra la fecha de extracción de estas muestras.

En el gel de Agarosa (Fig 26) en las muestras Ctrl 2 y 3, la relación de las bandas de rRNA 28S/18S parecería ser aproximadamente 2. Las tres muestras de 0.5M de NaCl no son RNA de calidad, debido a que la relación de las bandas de rRNA 28S/18S es aproximadamente 1 y además tiene contaminación con DNA genómico. Finalmente, en las tres muestras de 2.0M, no hay una relación de 2 en el rRNA 28S/18S y además se observa degradación del RNA.

7.- CONCLUSIONES

Para identificar la presencia de mecanismos de RNAi en *Aspergillus sydowii*, se buscaron las enzimas Dicer y Argonauta en los genomas de algunos hongos representativos del género *Aspergillus*. El número de parálogos de Dicer que codifican los hongos del género *Aspergillus* varían de 1 a 3, mientras que los parálogos de las Argonautas varían de 1 a 4.

A. sydowii codifica 2 enzimas Dicer y 3 Argonautas. *A. clavatus* es un caso particular dentro de este género, debido a que no tiene proteínas Dicer codificadas en su genoma, pero sí proteínas Argonautas, lo que indica que podría tener mecanismos de RNAi, pero la síntesis de sncRNA ocurre por mecanismos independientes de Dicer.

Para saber si las Argonautas conservan la actividad catalítica de endonucleasa, se hizo un alineamiento y se buscó el sitio DEDX. De las Argonautas presentadas, solo cuatro no conservan este sitio, Argonauta 88080 de *Aspergillus sydowii* es una de esas. Tal vez esta Argonauta regule la expresión de genes inhibiendo el inicio de la traducción

Uno de los mecanismos de inhibición del inicio de la traducción es impedir la interacción entre eIF4E y el Cap en 5'. Para comprobar cuáles Argonautas pueden inhibir el inicio de la traducción mediante este mecanismo, se identificaron los aminoácidos encargados de interactuar con el Cap. De todas las Argonautas de *Aspergillus*, solo 8 de ellas conservan los aminoácidos aromáticos que participan en

esta interacción. La Argonauta 148201 de *Aspergillus sydowii* tiene conservados ambos aminoácidos, por lo que podría secuestrar el Cap.

La identificación *in silico* de proteínas homologas relacionadas con mecanismos de síntesis de miRNAs utilizando la base de datos STRING, nos permitió identificar 17 proteínas (Tabla 5) que potencialmente podrían estar participando en la síntesis y regulación de miRNAs en el hongo *A. sydowii*. La presencia de estas proteínas y la evidencia experimental que existe para conocer la función de cada una de ellas nos permite proponer un mecanismo de síntesis y regulación de miRNAs en *A. sydowii*:

Un gen que codifica para un miRNA es transcrito por la RNA polimerasa II o III, produciendo un pri-miRNA que será reconocido por la endonucleasa Dicer para producir un dúplex de miRNA. Una vez producido este dúplex, Dicer es reclutada a al complejo RISC y mediante la actividad de HSP70/90, el dúplex será translocado de Dicer a Argonauta. Por la actividad de Trans/TRAX, la cadena pasajera del dúplex será degradada, dejando solamente al miRNA maduro y al complejo RISC activo. En este punto el complejo RISC puede inhibir la traducción de mRNA y posteriormente inducir la degradación de este, mediante el reclutamiento y la actividad de la maquinaria de Decapping.

En este mecanismo existen dos puntos de control, el primero a nivel del pri-miRNA cuando es editado por una enzima ADAT y posteriormente reconocido por Tudor-SN para ser degradado. El segundo es mediante el mecanismo Tumid, cuando el miRNA maduro esta unido al complejo RISC y una helicasa con actividad similar a UPF1 promueve la separación del mRNA y el miRNA, donde al final este último es degradado por Tudor-SN para promover el recambio de miRNAs (Figura 27).

Como perspectiva de este proyecto, se realizará el transcriptoma de RNAs pequeños en *A. sydowii* en las tres condiciones de salinidad mencionadas (sin sal, 0.5 M y 2.0 M de NaCl) para identificar los mecanismos de regulación de respuestas de halofilia mediante miRNAs y de esta forma complementar los objetivos no solventados en este trabajo de tesis.

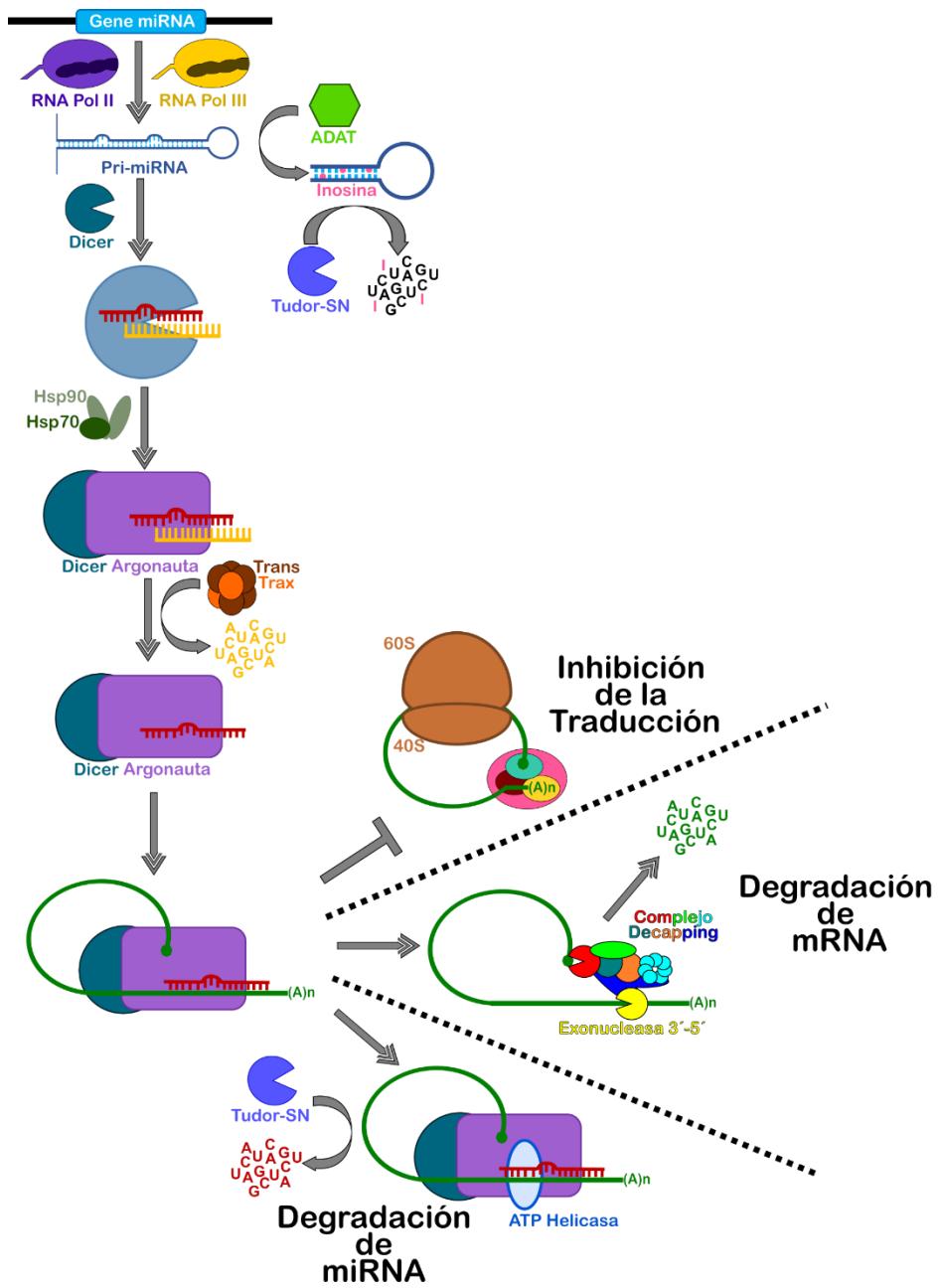


Figura 27: Propuesta de mecanismo de síntesis de miRNAs en *Aspergillus sydowii*.

8.- BIBLIOGRAFIA

- Andjus, S., Morillon, A., & Wery, M. (2021). From yeast to mammals, the nonsense-mediated mRNA decay as a master regulator of long non-coding RNAs functional trajectory. *Non-Coding RNA*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/ncrna7030044>
- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/mubr.00042-09>
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4), 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-221>
- Bai, Y., Lan, F., Yang, W., Zhang, F., Yang, K., Li, Z., Gao, P., & Wang, S. (2015). SRNA profiling in *Aspergillus flavus* reveals differentially expressed miRNA-like RNAs response to water activity and temperature. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.004>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function Review. *Cell*, 116, 281–297. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.001>
- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., & Folch-Mallol, J. (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105893>
- Baulcombe, D. C. (2007). Amplified silencing. *Science*, 315(5809), 199–200. <https://doi.org/10.1126/science.1138030>
- Billmyre, R. B., Calo, S., Feretzaki, M., Wang, X., & Heitman, J. (2013). RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. *Chromosome Research*, 21(6–7), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9388-2>
- Bui, D. C., Kim, J. E., Shin, J., Lim, J. Y., Choi, G. J., Lee, Y. W., Seo, J. A., & Son, H. (2019). Ars2 plays diverse roles in DNA damage response, fungal development, and pathogenesis in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02326>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Chen, R., Jiang, N., Jiang, Q., Sun, X., Wang, Y., Zhang, H., & Hu, Z. (2014). Exploring microRNA-like small RNAs in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104956>
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review*

of Cell and Developmental Biology, 25, 21–44.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113417>

- Chen, Y., Gao, Q., Huang, M., Liu, Y., Liu, Z., Liu, X., & Ma, Z. (2015). Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*, 5(September 2014), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep12500>
- Choi, J., Kim, K. T., Jeon, J., Wu, J., Song, H., Asiegbu, F. O., & Lee, Y. H. (2014). FunRNA: A fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*, 15(Suppl 9), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S9-S14>
- Chu, C.-Y., & Rana, T. M. (2008). Structure and Gene-Silencing Mechanisms of Small Noncoding RNAs. *Non-Protein Coding RNAs*, 335–356. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70840-7_17
- Dahlmann, T. A., & Kück, U. (2015). Dicer-dependent biogenesis of small RNAs and evidence for microRNA-like RNAs in the penicillin producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE*, 10(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125989>
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25(Table 1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2017). Halophiles. *ELS*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., ... Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. In *Genome Biology* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Egan, E. D., Braun, C. R., Gygi, S. P., & Moazed, D. (2014). Post-transcriptional regulation of meiotic genes by a nuclear RNA silencing complex. *Rna*, 20(6), 867–881. <https://doi.org/10.1261/rna.044479.114>
- Elbarbary, R. A., Miyoshi, K., Hedaya, O., Myers, J. R., & Maquat, L. E. (2017). UPF1 helicase promotes TSN-mediated miRNA decay. *Genes and Development*, 31(14), 1483–1493. <https://doi.org/10.1101/gad.303537.117>
- Elbarbary RA, Miyoshi K, Myers JR, Du P, Ashton JM, Tian B, Maquat LE. Tudor-SN-mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G1/S phase transition. *Science*. 2017 May 26;356(6340):859-862. doi: 10.1126/science.aai9372.

- Eliahoo, E., Litovco, P., Ben Yosef, R., Bendalak, K., Ziv, T., & Manor, H. (2014). Identification of proteins that form specific complexes with the highly conserved protein Translin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1844*(4), 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.016>
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, *79*, 351–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, *9*(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Free, S. J. (2013). Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Gruber, J. J., Zatechka, D. S., Sabin, L. R., Yong, J., Lum, J. J., Kong, M., Zong, W. X., Zhang, Z., Lau, C. K., Rawlings, J., Cherry, S., Ihle, J. N., Dreyfuss, G., & Thompson, C. B. (2009). Ars2 Links the Nuclear Cap-Binding Complex to RNA Interference and Cell Proliferation. *Cell*, *138*(2), 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.046>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, *113*(11), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., Merkl, R., & Meister, G. (2013). Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(7), 814–817. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2577>
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, *9*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>
- Hu, Y., Stenlid, J., Elfstrand, M., & Olson, A. (2013). Evolution of RNA interference proteins dicer and argonaute in Basidiomycota. *Mycologia*, *105*(6), 1489–1498. <https://doi.org/10.3852/13-171>
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhashi, I., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular Cell*, *39*(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.014>
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, *39*(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J., & Zhu, X. (2012). Identification and

- Functional Demonstration of miRNAs in the Fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 7(12), 20–25.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052734>
- Jin, S., Zhan, J., & Zhou, Y. (2021). Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4837–4849.
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06476-w>
- Kang, K., Zhong, J., Jiang, L., Liu, G., Gou, C. Y., Wu, Q., Wang, Y., Luo, J., & Gou, D. (2013). Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. *PLoS ONE*, 8(10), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076288>
- Katoh, K., & Toh, H. (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 26(15), 1899–1900.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385.
<https://doi.org/10.1038/nrm1644>
- Kinch, L. N., & Grishin, N. V. (2009). The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biology Direct*, 4, 1–10.
<https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-2>
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., & Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. *Cell*, 129(6), 1141–1151.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.016>
- Kocsubé, S., Perrone, G., Magistà, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, G., Hubka, V., Hong, S. B., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, 85, 199–213.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lau, A. Y. T., Cheng, X., Cheng, C. K., Nong, W., Cheung, M. K., Chan, R. H. F., Hui, J. H. L., & Kwan, H. S. (2018). Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*. *PLoS ONE*, 13(9), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198234>
- Lau, S. K. P., Chow, W. N., Wong, A. Y. P., Yeung, J. M. Y., Bao, J., Zhang, N., Lok, S., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2013). Identification of MicroRNA-Like RNAs in Mycelial and Yeast Phases of the Thermal Dimorphic Fungus *Penicillium marneffeii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002398>

- Lax, C., Tahiri, G., Patiño-Medina, J. A., Cánovas-Márquez, J. T., Pérez-Ruiz, J. A., Osorio-Concepción, M., Navarro, E., & Calo, S. (2020). The evolutionary significance of rai1 in the fungal kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21249348>
- Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z. A., Freitag, M., Selker, E. U., Mello, C. C., & Liu, Y. (2010). Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. *Molecular Cell*, 38(6), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.005>
- 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>
- Li, B., Cheng, X., Zhang, T., Liu, L., Nie, Z., & Sheng, Q. (2016). The identification of microRNAs in Ganoderma lingzhi sporocarp. *Mycoscience*, 57(4), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.03.004>
- Li, C. L., Yang, W. Z., Chen, Y. P., & Yuan, H. S. (2008). Structural and functional insights into human Tudor-SN, a key component linking RNA interference and editing. *Nucleic Acids Research*, 36(11), 3579–3589. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn236>
- Lin, Y. L., Ma, L. T., Lee, Y. R., Lin, S. S., Wang, S. Y., Chang, T. T., Shaw, J. F., Li, W. H., & Chu, F. H. (2015). MicroRNA-like small RNAs prediction in the development of antrodia cinnamomea. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123245>
- Liu, T., Hu, J., Zuo, Y., Jin, Y., & Hou, J. (2016). Identification of microRNA-like RNAs from Curvularia lunata associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(2), 587–596. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1128-1>
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C., & Clarke, J. (2006). *scientific report*. 7(10). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400806>
- Maiti, M., Lee, H., & Liu, Y. (2007). QIP, a putative exonuclease, interacts with the. 590–600. <https://doi.org/10.1101/gad.1497607.catalytic>
- Millar, A. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Plant and animal microRNAs: Similarities and differences. *Functional and Integrative Genomics*, 5(3), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s10142-005-0145-2>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., & Patel, D. J. (2012). Structure of

- yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486(7403), 368–374.
<https://doi.org/10.1038/nature11211>
- Nakayashiki, H., Kadotani, N., & Mayama, S. (2006). Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 63(1), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0257-2>
- Nicolás, F. E., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). Functional diversity of RNAi-associated sRNAs in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15348–15360. <https://doi.org/10.3390/ijms140815348>
- Nishikura, K. (2016). A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), 83–96.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.4>
- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., & Parker, R. (2010). Decapping Activators in *Saccharomyces cerevisiae* Act by Multiple Mechanisms. *Molecular Cell*, 39(5), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.025>
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., & Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 26–31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1069>
- Ooi, S. L., Dann, C., Nam, K., Leahy, D. J., Damha, M. J., & Boeke, J. D. (2001). RNA lariat debranching enzyme. In *Methods in Enzymology* (Vol. 342, Issue 1984). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)42548-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)42548-1)
- Paturi, S., & Deshmukh, M. V. (2021). A Glimpse of “Dicer Biology” Through the Structural and Functional Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.643657>
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E. C., Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Gostinčar, C., Kostanjšek, R., Folch-Mallol, J. L., Batista-García, R. A., & Sánchez-Carbente, M. del R. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells*, 9(3), 525. <https://doi.org/10.3390/cells9030525>
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014a). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014b). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 23–36.
<https://doi.org/10.1038/nrm2085>

- Roberts, M. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Rodríguez-Pupo, E. C., Pérez-Llano, Y., Tinoco-Valencia, J. R., Sánchez, N. S., Padilla-Garfias, F., Calahorra, M., Sánchez, N. D. C., Sánchez-Reyes, A., Rodríguez-Hernández, M. D. R., Peña, A., Sánchez, O., Aguirre, J., Batista-García, R. A., Folch-Mallol, J. L., & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2021). Osmolyte signatures for the protection of *Aspergillus sydowii* cells under halophilic conditions and osmotic shock. *Journal of Fungi*, 7(6), 1–29. <https://doi.org/10.3390/jof7060414>
- Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T. F., Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *Rna*, 20(9), 1398–1409. <https://doi.org/10.1261/rna.045302.114>
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289–318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Sesma, A., & Von Der Haar, T. (2014). Fungal RNA biology. *Fungal RNA Biology*, 1–395. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05687-6>
- Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(10), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, D. (2018). Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. In *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00018-6>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Tafer, H., Poyntner, C., Lopandic, K., Sterflinger, K., & Piñar, G. (2019). Back to the salt mines: Genome and transcriptome comparisons of the halophilic Fungus *Aspergillus salisburgensis* and its halotolerant relative *Aspergillus sclerotialis*. *Genes*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/genes10050381>
- Teichert, I. (2020). Fungal RNA editing: who, when, and why? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13), 5689–5695. <https://doi.org/10.1007/s00253-020->

- Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2017). The RNAi Universe in Fungi: A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. *Annual Review of Microbiology*, 71(June), 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093352>
- Tsuboyama, K., Tadakuma, H., & Tomari, Y. (2018). Conformational Activation of Argonaute by Distinct yet Coordinated Actions of the Hsp70 and Hsp90 Chaperone Systems. *Molecular Cell*, 70(4), 722-729.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.010>
- Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R. T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Yang, F. (2015). Genome-wide analysis of small RNAs in the wheat pathogenic fungus *Zygomycetes tritici*. *Fungal Biology*, 119(7), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.03.008>
- Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular Cell*, 43(6), 892–903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.024>
- Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., & Zhang, H. (2011). Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(6), 650–657. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2032>
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-617>
- Zhang, W., Li, X., Ma, L., Urrehman, U., Bao, X., Zhang, Y., Zhang, C. Y., Hou, D., & Zhou, Z. (2019). Identification of microRNA-like RNAs in *Ophiocordyceps sinensis*. *Science China Life Sciences*, 62(3), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9277-9>
- Zhou, J., Fu, Y., Xie, J., Li, B., Jiang, D., Li, G., & Cheng, J. (2012). Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(4), 275–282. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0678-8>
- Zhou, Q., Wang, Z., Zhang, J., Meng, H., & Huang, B. (2012). Genome-wide

identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biology*, 116(11), 1156–1162.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.09.001>

Zhou, Y., Zhu, J., Schermann, G., Ohle, C., Bendrin, K., Sugioka-Sugiyama, R., Sugiyama, T., & Fischer, T. (2015). The fission yeast MTREC complex targets CUTs and unspliced pre-mRNAs to the nuclear exosome. *Nature Communications*, 6(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms8050>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **WILSON HERNÁNDEZ MICHEL ALEXANDER** con número de matrícula **10002839** cuyo título es:

“Papel de microARNs en la regulación de los mecanismos de tolerancia a estrés salino por NaCl en el hongo halófilo *Aspergillus sydowii*”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 26 de agosto del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE	(PRESIDENTE).
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS	(SECRETARIO).
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA	(VOCAL).
DRA. NILDA DEL CARMEN SANCHEZ CASTELLANOS	(SUPLENTE). NO PARTICIPA
DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO	(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2022-09-08 18:21:13 | Firmante

JA/GuZOx3jixWyeNKV+sAlabt448VP1hrsWvjfiSOErjRsNuTHnACN6D7m4SnUhwcirN0PjPDIjVvjhUrKy29DBC+1zH+erLUpcXh/lj228fDJ6uPrTTksdWx89M/kT2rQMvmXhLHeRjyZ8huaL0+/qqgX2/PmfUrOip9vBGreTu99Z5GijTEB4NnCeHY+H1bq4c5LHKp8zxO/XpBuwBefHZswRkNZFmepXxHRYsxVAvtirYuLZECTAcIKK0YgvloaHYAkenl6rXHRk8yUctX4E5kUsUityj1zONJJVIQxgM1+7m3xHkrZH+LTzGNy90D4I+62O4bEe2VRB7Ow==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-09-09 04:50:17 | Firmante

ZS9LdLLNm8ZA3U9liMKfXYQhpo99Ure2rjxfNkDulASA3MARhYkg+zi+oS86W22j7911V3reJzAw6J4iQenJyJMNbHl+ufk52JP2RGbPHOfnPaSo0+nIAmsEMLeqMdeFnIsyhog5KQVZK4RutXrmmx+w8zo76+00NEGc3M48TYMzKdKTm0WFYqa7BRo95joWCA+JOWssLNFb6XX6yENMewT0qSAZTUZOC/t6XrBEQQPbxJ399cYilBn8BeHErgO46TYrWCjRx2GXxuG1vn4KQBGBxkBJtzQh0jPvf+EKUXCR/wA6LmlDNG3ZO2qTiIDrkvXia6h8UkU2EPQ3YloQQ==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-09-13 19:57:52 | Firmante

D0oRYA0n2LAvElkg9AetHzqi/E/FEs18wLyyLmdlBdQFNekkbVf1P9VqpQ0f/bzCGtkcv7Xiwecr2XYEwTjgZcD5jKgKKoAU9UepZ8KN+Mbisan417g4F5+QWMipCkialbfpBoXdJw4t4DAEZc1nmg2P/wu+0tgpQCjtrKMO2wYDSQWtJHkBGJM9bvLs1ORDGvM0ix/1qXr5l6Va/YrPFAOWAtVBNqD07HIRJg2DuuF0SL7Lwn8PjOKK3ypMjitiHbuSAdBar3lc4okU+dmQvuY7wR4mQ5ACs98TaZgD5CmV7I7QPvbErE7aS0yrEANwBnvXg8rMVvoVSUssIN+T3Bg==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-09-14 03:48:41 | Firmante

WFuqjDFjHw5PprT+04yYDp1B7eNWTB+8Q1YiWlVMPBi+w33bqn5y4Fd6+EFS7elsAOj8Yiz9+vwK58NihDhJJCQm5c9P354jZN++Csulkg99ULA2r2gGq1UkUb+bQV+3DUpagJbpwL8qefz8pASaD11gbjs/gFyYh5JC7i14DJmgxLRBCWI9M/vq9ZNF+SR4YpmV1hOb0O875cjQd1DR1WdGqP2gl1uKSdBQTvsF9SpMUSTiPA7InArTBeYr8cpHAbkiXO7XHTHiAxSGhRyyi34mGYNPYApBspNyA93anMVNcKpiaUUorodZ9xu1kk3Xxf5ZBeKlukoBFoqGJZ4g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



vzeadBFsr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jl3WJ0EYMRiPh1jhXIAsTe9ATcNnuzH1>

