



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Identificación y estudio funcional de una proteína de choque térmico implicada en el mecanismo no canónico de silenciamiento génico de *Mucor lusitanicus*

**D. José Antonio Pérez Ruiz**

2021



Identificación y estudio funcional de una proteína de  
choque térmico implicada en el mecanismo no  
canónico de silenciamiento génico de *Mucor*  
*lusitanicus*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología (Área de Genética) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección de D. Victoriano Garre Mula y D. Eusebio Navarro Ros, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología por el Graduado José Antonio Pérez Ruiz.





D. Victoriano Garre Mula, Catedrático de Universidad del Área de Genética, y  
D. Eusebio Navarro Ros, Profesor Contratado Doctor del Área de Genética,  
ambos en el Departamento de Genética y Microbiología, AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Identificación y estudio funcional de una proteína de choque térmico implicada en el mecanismo no canónico de silenciamiento génico de *Mucor lusitanicus*", realizada por D. José Antonio Pérez Ruiz, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 1 de septiembre de 2021

Fdo. Eusebio Navarro Ros

Fdo. Victoriano Garre Mula



*A mi familia y a Laura*

*“Pass on what you have learned. Strength, mastery...  
but weakness, folly, failure also. Yes, failure, most of all.  
The greatest teacher failure is.”*

— Yoda





## Agradecimientos

Después de todo este tiempo, este camino llega a su fin. Ha sido largo, seguramente más de lo que esperaba, pero al final todo llega. Estas líneas son para todos los que han estado a mi lado, por su apoyo y su ayuda, porque sin ellos no habría sido posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Víctor y Sebi, porque son ellos los que me han ido marcado el camino. A Víctor, gracias por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo, por poner la primera piedra de un trabajo en el que tu dirección ha sido esencial. A Sebi, porque siempre podía contar con tu infinito consejo. Has sabido guiarme en mi camino día a día y siempre es un placer contar con alguien a tu lado a quien le guste tanto enseñar. Gracias también a Curro y a Laura, por su calidad humana con la que te conquistan desde el primer momento y porque cuando las dudas me asaltaban sabía que siempre podía confiar en ellos.

También quiero agradecer a todos los miembros de mi grupo, a los que siguen y a los que no, a los que estuvieron de paso y a los que me acompañaron durante toda esta aventura, gracias de corazón. A Pacho, Tahiri, Ulli, Albert, Joseto, Silvia, Dámaris y a una larga lista de personas porque, aunque con algunos haya compartido poco tiempo, a todos les pertenece un trocito de este trabajo. Por supuesto, gracias a mi maestro Sergio, que tanto tuvo que aguantarme en mis primeros pasos (y que aún lo hace), y cuya paciencia no tiene límites. Todo lo que he aprendido y disfrutado estos años a tu lado (literalmente) son impagables. No puede faltar mi compañero de batallas, el *"true fan"*. Me has acompañado todos estos años, has conseguido alegrarme hasta los días más negros. Muchas gracias, Lax. A Leandro, por la suerte de haber sido tutor de TFG y haber tenido a una gran persona a mi lado, a la que enseñar y de la que aprender. Y, como no puede ser de otra manera, muchas gracias a vosotros, Carlos y Maribel, formáis una parte fundamental de este trabajo, y también de mi vida, sin vosotros nada habría sido lo mismo y quien sabe si habría sido capaz de poder con todo. En gran parte, gracias a vosotros, lo he conseguido.

A toda la gente del ala A, porque todos en algún momento me habéis ayudado en este tiempo. Gracias a Ricardo, Elena, Diego y al resto de compañeros, con los que tantas horas he compartido, por las comidas en el seminario, los partidillos de fútbol y porque también a ellos les he dado el follón durante estos años, como no puede ser de otra manera.

A mi familia y amigos porque han aguantado mis penas y han compartido mis alegrías a partes iguales. A mis padres y mi hermano, porque gracias a vosotros soy quien soy y he conseguido todo gracias a vosotros, porque siempre os he tenido a mi lado. Aunque ha habido momentos duros, siempre he podido contar con vosotros, y sin eso no habría llegado hasta aquí.

Y a ti, Laura, por ser la persona más importante de mi vida, por acompañarme en este camino al que seguirán muchos más y porque sin ti habría sido imposible. Por estar conmigo en cada momento y alegrarme cada día. Te debo todo a ti. Vivir es fácil contigo al lado (y con los ojos cerrados).

# Índice de contenidos

I. INTRODUCCIÓN .....	1
I. 1. <i>Mucor lusitanicus</i> .....	3
I. 1. 1. Características generales .....	3
I. 1. 2. <i>M. lusitanicus</i> como organismo de estudio .....	7
I. 2. Silenciamiento génico .....	10
I. 2. 1. Generalidades .....	10
I. 2. 2. El silenciamiento génico en hongos .....	15
I. 2. 3. Silenciamiento génico en <i>M. lusitanicus</i> .....	17
I. 2. 3. 1. Componentes y mecanismos de silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	17
I. 2. 3. 2. R3B2, una nueva ribonucleasa en el silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	23
I. 3. Las proteínas de choque térmico .....	26
I. 3. 1. Características generales y su relación con el silenciamiento génico .....	26
I. 3. 2. La familia de las Hsp70: HspA12, la subfamilia más singular ..	30
I. 4. Objetivos de la tesis .....	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados.....	39
II. 1. 1. Estirpes de <i>M. lusitanicus</i> .....	39
II. 1. 2. Estirpes de <i>E. coli</i> .....	40
II. 1. 3. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> .....	41
II. 1. 4. Plásmidos.....	42
II. 2. Medios y condiciones de crecimiento.....	44

II. 2. 1. <i>E. coli</i> .....	44
II. 2. 2. <i>M. lusitanicus</i> .....	44
II. 2. 3. <i>S. cerevisiae</i> .....	46
II. 3. Tampones y reactivos .....	46
II. 3. 1. Manipulación del DNA .....	46
II. 3. 2. Extracción de DNA de <i>M. lusitanicus</i> .....	47
II. 3. 3. Tampones para la transformación de <i>M. lusitanicus</i> .....	48
II. 3. 4. Tampones para la manipulación de levaduras .....	48
II. 3. 5. Manipulación de proteínas .....	48
II. 3. 6. Ensayos de actividad RNasa .....	51
II. 4. Transformación de <i>E. coli</i> .....	52
II. 5. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	52
II. 6. Obtención de estirpes diploides de <i>S. cerevisiae</i> para los ensayos de doble híbrido .....	53
II. 7. Transformación de <i>M. lusitanicus</i> .....	53
II. 8. Ensayo de germinación de <i>M. lusitanicus</i> .....	54
II. 9. Manipulación de DNA .....	55
II. 9. 1. Aislamiento de DNA de <i>M. lusitanicus</i> .....	55
II. 9. 2. Aislamiento de DNA de <i>E. coli</i> .....	56
II. 9. 3. Aislamiento de DNA de <i>S. cerevisiae</i> .....	56
II. 9. 4. Técnicas electroforéticas .....	56
II. 9. 5. Tratamiento de DNA con enzimas .....	57
II. 9. 6. Amplificación de DNA por PCR .....	57
II. 9. 7. Secuenciación de DNA .....	59
II. 10. Análisis de las secuencias de DNA genómico .....	60

II. 11. Búsqueda y análisis de proteínas HspA12 .....	61
II. 12. Construcción de árboles filogenéticos .....	62
II. 13. Manipulación de RNA .....	62
II. 13. 1. Aislamiento de RNA de <i>M. lusitanicus</i> .....	62
II. 13. 2. Síntesis de cDNA a partir de RNA y PCR cuantitativa con transcriptasa inversa.....	63
II. 13. 3. Obtención y marcaje con radiactividad de ssRNA y dsRNA..	64
II. 14. Manipulación de proteínas .....	64
II. 14. 1. Obtención de extractos de proteína de <i>E. coli</i> .....	64
II. 14. 2. Purificación de proteínas a partir de extractos de <i>E. coli</i> .....	65
II. 14. 3. Purificación por afinidad en tándem .....	65
II. 14. 4. Electroforesis de proteínas.....	66
II. 14. 5. Ensayo de actividad RNasa <i>in vitro</i> .....	67
II. 15. Rastreo de dos híbridos de levadura de una genoteca de cDNA de <i>M. lusitanicus</i> .....	67
II. 15. 1. Titulación de la genoteca de cDNA y de fagos ayudantes.....	67
II. 15. 2. Amplificación de los fagos ayudantes.....	68
II. 15. 3. Escisión de la genoteca de fagémidos de <i>M. lusitanicus</i> .....	68
II. 15. 4. Amplificación de los fagémidos escindidos.....	69
II. 16. Ensayos de virulencia en ratón .....	69
III. RESULTADOS.....	71
III. 1. Identificación de nuevos componentes en el silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	73
III. 1. 1. Estrategias para la identificación de nuevos genes del silenciamiento génico en <i>M. lusitanicus</i> .....	73
III. 1. 1. 1. Purificación por afinidad en tándem.....	73

III. 1. 1. 2. Sistema de doble híbrido de levaduras .....	74
III. 2. Caracterización del gen 112212 ( <i>hspA12a</i> ).....	77
III. 2. 1. Caracterización del gen <i>hspA12a</i> de <i>M. lusitanicus</i> .....	77
III. 2. 2. Análisis filogenético de la proteína HspA12a de <i>M. lusitanicus</i> .....	79
III. 2. 3. Caracterización de las interacciones de la proteína HspA12a con R3B2 y con otras proteínas del silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	85
III. 3. Generación de mutantes para el gen <i>hspA12a</i> y su caracterización fenotípica .....	88
III. 3. 1. Deleción del gen <i>hspA12a</i> de <i>M. lusitanicus</i> .....	88
III. 3. 2. Termorresistencia del mutante en <i>hspA12a</i> .....	91
III. 3. 3. Caracterización de las colonias supervivientes a 30 °C de los mutantes en <i>hspA12a</i> .....	93
III. 3. 4. Caracterización de los mutantes en <i>hspA12a</i> con fenotipo silvestre e identificación de los genes implicados en su reversión fenotípica.....	101
III. 3. 5. Análisis de virulencia de las estirpes mutantes en <i>hspA12a</i> ..	106
III. 4. Implicación de la proteína HspA12a en el silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	108
III. 4. 1. Participación de HspA12a en el silenciamiento canónico ....	108
III. 4. 2. Participación de HspA12a en el silenciamiento no canónico	109
III. 5. Caracterización <i>in vitro</i> de la proteína HspA12a .....	112
III. 5. 1. Análisis de la actividad RNasa de R3B2 en presencia de HspA12a .....	112
IV. DISCUSIÓN .....	115
IV. 1. Proteínas que interaccionan con R3B2 .....	117

<b>IV. 2. La familia de chaperonas <i>hspA12</i>.....</b>	<b>118</b>
<b>IV. 3. El papel del gen <i>hspA12a</i> en el crecimiento a altas temperaturas .....</b>	<b>120</b>
<b>IV. 4. Identificación del gen causante de la reversión fenotípica.....</b>	<b>122</b>
<b>IV. 5. El papel de <i>hspA12a</i> en las rutas de silenciamiento de <i>M. lusitanicus</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>IV. 6. El papel de <i>hspA12a</i> en la virulencia de <i>M. lusitanicus</i> .....</b>	<b>124</b>
<b>IV. 7. Actividad RNasa de R3B2 en presencia de HspA12a.....</b>	<b>125</b>
<b>IV. 8. Modelo de actuación de HspA12a.....</b>	<b>126</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>





## Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético del reino de los hongos.....	3
Figura 2. Morfología de <i>M. lusitanicus</i> . .....	5
Figura 3. Prevalencia de los distintos géneros de Mucorales en las distintas manifestaciones de la mucormicosis .....	6
Figura 4. Ruta de la biosíntesis de carotenos en <i>M. lusitanicus</i> .....	9
Figura 5. Mecanismo de silenciamiento génico.. .....	11
Figura 6. Fuentes endógenas de RNA de doble cadena.....	14
Figura 7. Estructura de las proteínas participantes en las rutas de silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> . .....	18
Figura 8. Rutas de silenciamiento génico de <i>M. lusitanicus</i> .....	21
Figura 9. Diferencias y similitudes de la secuencia de la proteína R3B2 con otras ribonucleasas. ....	25
Figura 10. Ensamblaje del complejo RISC con la cooperación de las proteínas Hsp90 y Hsc70 .....	29
Figura 11. Árbol filogenético de las proteínas Hsp70 de las especies de Ascomycota y Basidiomycota estudiadas.....	33
Figura 12. Árbol filogenético de las 17 proteínas HSP70 humanas, clasificadas en siete grupos.....	33
Figura 13. Sistema de doble híbrido de levaduras .....	76
Figura 14. Secuencias codificante y de aminoácidos del gen hspA12a ...	79
Figura 15. Análisis filogenético de la Hsp70 identificada en <i>M. lusitanicus</i> .....	81
Figura 16. Análisis filogenético de las distintas Hsp70 de <i>M. lusitanicus</i>	83
Figura 17. Representación del número de genes hspA12 por especies ...	84
Figura 18. Contexto genómico de algunos genes hspA12 en diferentes especies .....	85

<b>Figura 19. Ensayo de interacción por doble híbrido de la HspA12a y las proteínas del silenciamiento .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 20. Procedimiento de obtención de mutantes en <i>M. lusitanicus</i> ...</b>	<b>89</b>
<b>Figura 21. Análisis por PCR de la interrupción del gen <i>hspA12a</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 22. Crecimiento de los mutantes en <i>hspA12a</i> a 30 °C.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 23. Caracterización de la germinación de las estirpes mutantes en el gen <i>hspA12a</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 24. Esquema del ensayo con los individuos supervivientes a 30 °C .....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 25. Comparativa de colonias formadas a 26 °C y 30 °C de los individuos supervivientes a 30 °C .....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 26. Caracterización de los individuos utilizados en el ensayo de supervivencia a 30 °C.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 27. Análisis del crecimiento micelial a 26 °C de las estirpes implicadas en el ensayo de supervivencia a 30 °C .....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 28. Caracterización del crecimiento a altas temperaturas de la estirpe con alta supervivencia a 30 °C procedente de MU909 .....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 29. Ensayo de virulencia de mutantes <i>hspA12a</i>Δ en ratón.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 30. Ensayo de RT-qPCR para determinar la implicación de <i>hspA12a</i> en el silenciamiento no canónico .....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 31. Ensayo de RT-qPCR para determinar la regulación de la expresión de <i>hspA12a</i> por la temperatura.....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 32. Purificación del fragmento SBD de HspA12a .....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 33. Análisis de la actividad RNasa de R3B2 en presencia de la región SBD de HspA12a .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 34. Modelo de la ruta NCRIP a 26 y 30 °C .....</b>	<b>127</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Estirpes utilizadas de <i>M. lusitanicus</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 2. Estirpes utilizadas de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR, RT-qPCR y secuenciaciones .....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 5. Listado de mutaciones localizadas en genes o en regiones próximas a genes en las estirpes MU913 y MU914 .....</b>	<b>103</b>
<b>Tabla 6. Listado de variantes estructurales localizadas en genes o en regiones próximas a genes de las estirpes MU913 y MU914 .....</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 7. Selección de variantes localizadas en genes o en regiones próximas a genes que afectan a ambas estirpes .....</b>	<b>106</b>



## Listado de abreviaturas

Abreviatura	Castellano	English
<b>AD</b>	Dominio de activación	Activation domain
<b>Ago</b>	Argonauta	Argonaute
<b>BD</b>	Dominio de unión	Binding domain
<b>bp</b>	Pares de bases	Base pairs
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<b>Dcl</b>	Proteína similar a Dicer	Dicer-like protein
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena	Double-stranded RNA
<b>Endo-siRNA</b>	siRNA endógenos	Endogenous siRNA
<b>esRNA</b>	sRNA endógenos	Short endogenous RNA
<b>ex-siRNA</b>	siRNA derivados de exones	<i>exonic-siRNA</i>
<b>kb</b>	Kilobases	Kilobases
<b>kDa</b>	KiloDalton	KiloDalton
<b>lncRNA</b>	RNAs largos no codificantes	<i>long non-coding RNA</i>
<b>miRNA</b>	RNA similares a miRNA	<i>miRNA-like RNA</i>
<b>miRNA</b>	Micro RNA	Micro RNA
<b>MMC</b>	Medio mínimo con casaminoácidos	<i>Minimal medium with casamino acids</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero	<i>Messenger RNA</i>
<b>MROC</b>	Mucormicosis rino-órbito-cerebral	<i>Rhino-orbito-cerebral mucormycosis</i>
<b>MSUD</b>	Silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado	<i>Meiotic silencing of unpaired DNA</i>
<b>NCRIP</b>	Ruta de RNAi no canónica	Non-canonical RNAi pathway
<b>Nt</b>	Nucleótidos	Nucleotides
<b>piRNA</b>	RNAs asociados a proteínas Piwi	Piwi-interacting RNA

<b>Qip</b>	Proteína inducida por quelling o proteína de interacción con QDE2	<i>Quelling induced protein or QDE2-interating protein</i>
<b>rdRNA</b>	RNA degradado dependiente de RdRP	<i>RdRP-dependent degraded RNA</i>
<b>RdRP</b>	Polimerasas de RNA dependientes de RNA	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
<b>RIP</b>	Mutaciones puntuales inducidas por repetición	<i>Repeat-induced point mutation</i>
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia	<i>RNA interference</i>
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa	<i>Ribonuclease</i>
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
<b>siRNA</b>	Pequeños RNA de interferencia	<i>Short interfering RNA</i>
<b>sRNA</b>	Pequeños RNA	<i>Small RNA</i>
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena sencilla	<i>Single-stranded RNA</i>
<b>TAP</b>	Purificación por afinidad en tándem	<i>Tandem affinity purification</i>
<b>TE</b>	Tampón de Tris-EDTA	<i>Tris-EDTA buffer</i>
<b>YNB</b>	Medio base de nitrógeno para levaduras	<i>Yeast nitrogen base medium</i>
<b>YPG</b>	Medio de extracto de levadura, peptona y glucosa	<i>Yeast extract-peptone-glucose medium</i>

# I. INTRODUCCIÓN

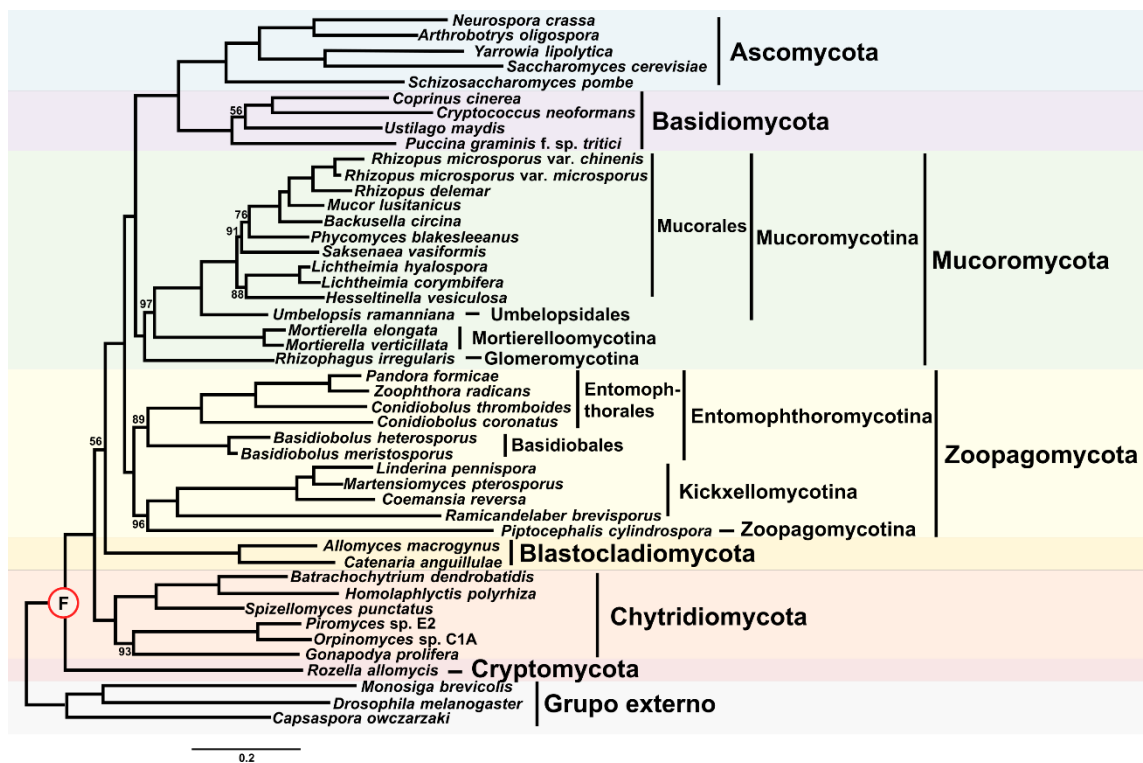
## I. Introducción



## I. 1. *Mucor lusitanicus*

### I. 1. 1. Características generales

*M. lusitanicus*, anteriormente llamado *Mucor circinelloides* f. *Lusitanicus* (Wagner *et al.*, 2019), es un hongo basal y filamentoso perteneciente al orden Mucorales (Figura 1). Este orden pertenece al filo Mucoromycota y, dentro de este, al subfilo Mucoromycotina (Spatafora *et al.*, 2016).



**Figura 1. Árbol filogenético del reino de los hongos.** Árbol filogenético basado en el análisis de 192 proteínas ortólogas conservadas, para el que se incluyeron 3 especies como grupo externo, mostradas en la parte inferior. Todas las ramas en las que no se indica otro valor poseen un soporte de tipo *bootstrap* del 100 %. Se indica con una F el ancestro común de los hongos (Navarro-Mendoza, 2020; modificado de Spatafora *et al.*, 2016).

Los hongos Mucorales se caracterizan por un rápido crecimiento y por ser colonizadores de sustratos ricos en carbono. Además, tienen un gran impacto en el ser humano. Por un lado, debido a algunas enfermedades que afectan tanto a especies productoras de frutas como al propio ser humano y, por otro lado, por

su utilidad en la producción de alimentos o suplementos alimenticios (Spatafora *et al.*, 2017).

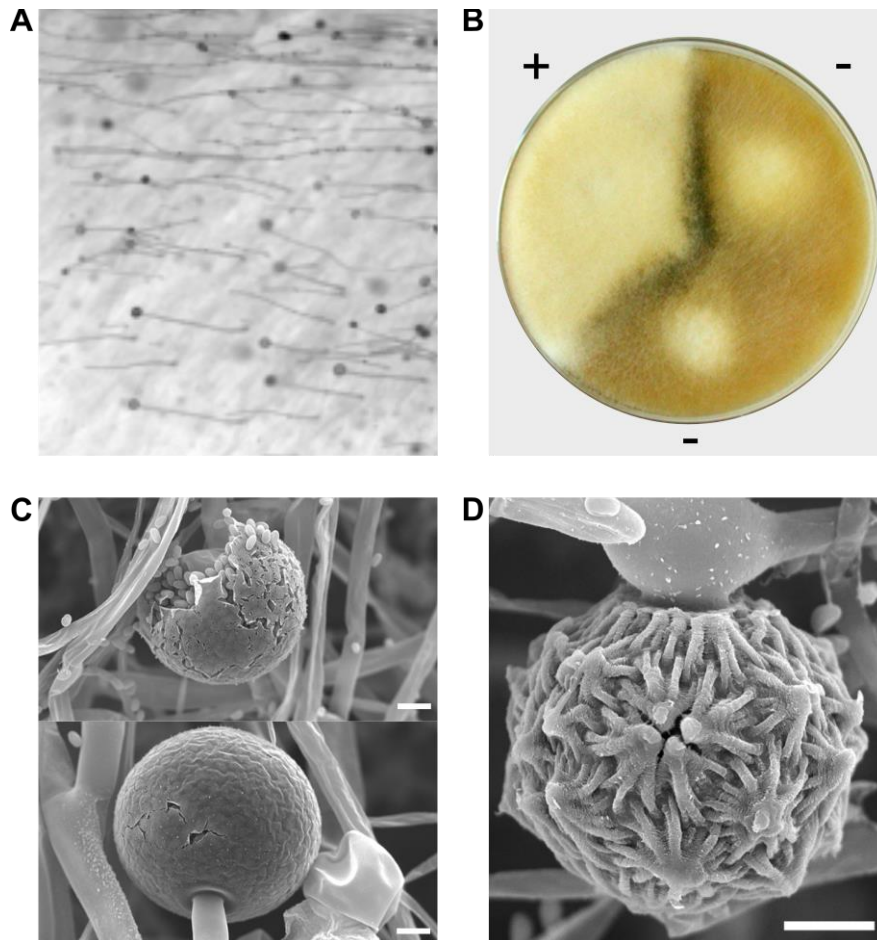
El orden Mucorales estaba enmarcado en el filo denominado Zygomycota, caracterizado por presentar de forma general un micelio cenocítico y por la capacidad de formar zigosporas en la reproducción sexual (Figura 2) (Guarro *et al.*, 1999). Sin embargo, esta clasificación, fundamentada en aspectos morfológicos, ha sido modificada, desapareciendo este grupo Zygomycota y sustituyéndose por los fillos Mucoromycota y Zoopagomycota (Hibbett *et al.*, 2007; Spatafora *et al.*, 2016).

Las zigosporas son un tipo especial de esporas sexuales de color oscuro, ornamentadas y de pared gruesa, características de algunos grupos como los Mucorales. Las esporangiosporas en cambio son un tipo de esporas asexuales que se producen en los esporangios, donde se albergan múltiples esporas, localizados en el extremo de hifas aéreas conocidas como esporangióforos (Figura 2) (Guarro *et al.*, 1999). Además, los Mucorales se caracterizan por la presencia de una porción del esporangióforo que se localiza dentro del esporangio y se denomina columela. Asimismo, muchas especies de este orden pueden presentar otras estructuras reproductivas como clamidosporas, artrosporas y células levaduriformes (Hoffmann *et al.*, 2013).

Los Mucorales presentan dos ciclos de vida: por un lado, un ciclo sexual caracterizado por la formación de zigosporas que se forman por la proximidad y posterior unión de dos micelios de diferente tipo sexual y, por otro lado, un ciclo asexual donde se induce la formación de esporangiosporas que pueden ser uninucleadas o multinucleadas, siendo las más comunes de este segundo tipo (Figura 2) (Gooday *et al.*, 1973). Se desconocen las ventajas que pueden proporcionar las zigosporas respecto a las esporangiosporas debido a que solo se ha conseguido su germinación en el laboratorio en muy pocas especies (Hoffmann *et al.*, 2013).

*M. lusitanicus* es un hongo heterotálico, con los tipos sexuales “-“ y “+” (Figura 2B). Los genes que determinan el sexo son *sexM*(-) y *sexP*(+) que están localizados en el locus *sex* y son excluyentes entre sí. Las esporas producidas por el sexo “+“ son de menor tamaño que las del sexo “-“, y esta diferencia en el

tamaño de las esporas ha sido relacionada con su capacidad de virulencia en el hombre (Li *et al.*, 2011).

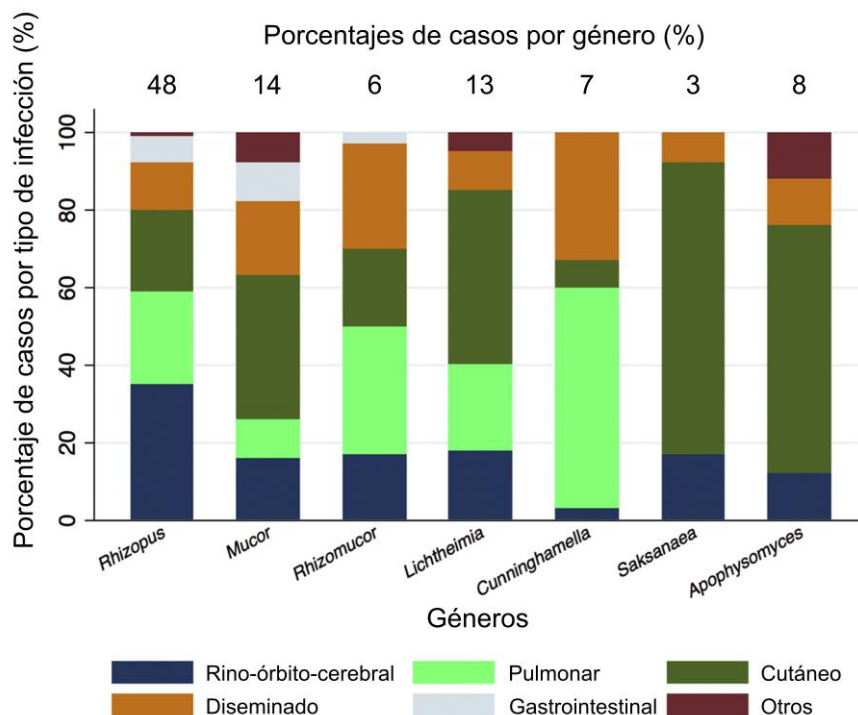


**Figura 2. Morfología de *M. lusitanicus*.** **A)** Fototropismo de *M. lusitanicus* bajo condiciones de luz blanca (Silva *et al.*, 2006) **B)** Estirpes de ambos sexos de *M. lusitanicus* en un ensayo de interacción sexual. Se muestra la formación de zigosporas en las regiones (regiones de color negro) donde ambos sexos entran en contacto. **C)** Esporangios de *M. lusitanicus* al microscopio electrónico de barrido. **D)** Zigospora de *M. lusitanicus* al microscopio electrónico de barrido. **B), C)** y **D)** son imágenes tomadas de Li *et al.*, 2011. Escala = 10  $\mu$ m.

Otra de las características a destacar de *M. lusitanicus* es que presenta dimorfismo, ya que es capaz de crecer con una morfología micelial o con una morfología levaduriforme. La transición entre las morfologías micelio-levadura está condicionada por factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno y de fuentes de carbono fermentables, de modo que el hongo pasa a un estado levaduriforme cuando se encuentra en condiciones de anaerobiosis y con

hexosas fermentables disponibles. Un cambio de estas fuentes a otras, como pentosas o disacáridos, provoca en el hongo una transición a la forma de micelio (Orlowski, 1992). Este dimorfismo también se ha relacionado en Mucorales con su grado de virulencia, siendo más virulenta la forma micelial (Lee *et al.*, 2013).

*M. lusitanicus*, es uno de los agentes causantes de la mucormicosis, una enfermedad rara con una alta letalidad y una incidencia creciente en la especie humana (Alvarez *et al.*, 2009). Esta enfermedad suele iniciarse a partir de las vías respiratorias y afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, pero también puede afectar a personas inmunocompetentes a través de traumatismos y heridas (Sugar, 1992; Neblet *et al.*, 2012). La mucormicosis está provocada por la infección de un conjunto de hongos de los órdenes de los Mucorales y Entomoptorales. El género *Mucor* es el segundo en cuanto al número de infecciones en la especie humana, solo superado por el género *Rhizopus* (Reid *et al.*, 2020). La enfermedad se manifiesta de distintas maneras, siendo las más habituales las mucormicosis rino-órbito-cerebral (MROC o *rhino-orbito-cerebral mucormycosis*), cutánea y pulmonar (Jeong *et al.*, 2018) (Figura 3).



**Figura 3. Prevalencia de los distintos géneros de Mucorales en las distintas manifestaciones de la mucormicosis.** Figura adaptada de Jeong *et al.*, 2018.

Debido a la actual pandemia de COVID-19, se ha producido un aumento de casos de MROC, siendo India uno de los países más afectados. La diabetes es un factor de riesgo para ambas enfermedades, lo que sumado al entorno favorable para el desarrollo de los Mucorales que genera la COVID-19 (condiciones de hipoxia, medio ácido, altos niveles de hierro y descenso en la actividad fagocítica), ha propiciado un aumento del desarrollo de estas dos enfermedades de manera conjunta, además de que el uso de corticoides para el tratamiento de la COVID-19 ha mostrado un aumento en los casos mucormicosis (Singh *et al.*, 2021).

### I. 1. 2. *M. lusitanicus* como organismo de estudio

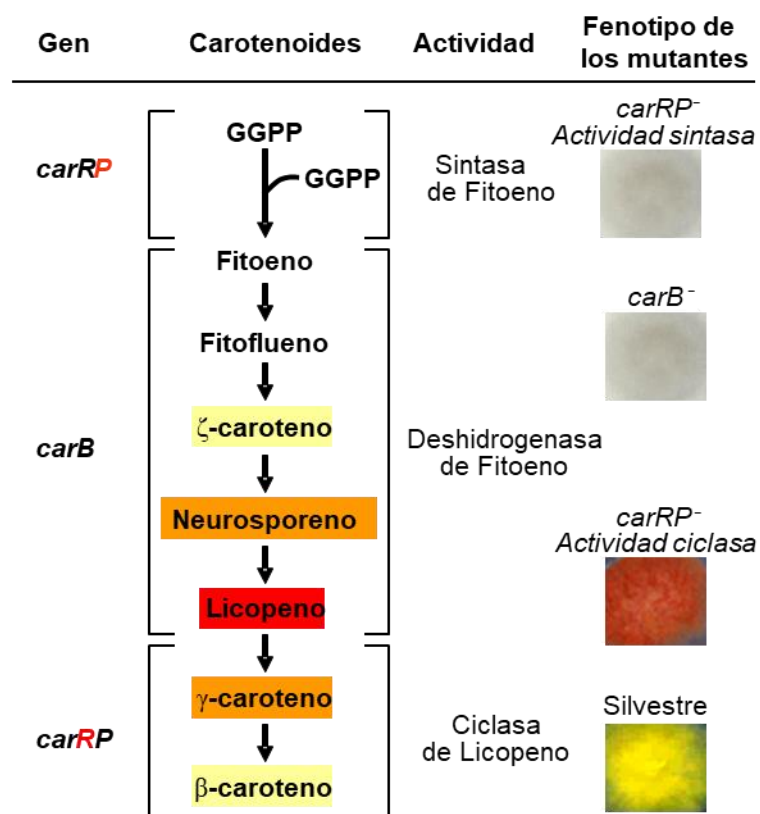
*M. lusitanicus* es un gran modelo de estudio, posee un genoma pequeño y secuenciado, de unas 36 megabases y alrededor de unos 12.000 genes (*M. lusitanicus* CBS277.49 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>; *M. lusitanicus* MU402 v1.0; [https://mycocosm.jgi.doe.gov/Muccir1\\_3/Muccir1\\_3.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Muccir1_3/Muccir1_3.home.html)), permite un fácil manejo en el laboratorio, presenta una alta velocidad de crecimiento y se dispone de una gran cantidad de herramientas moleculares para su manipulación. La secuenciación del genoma de *M. lusitanicus* se realizó gracias a un proyecto liderado por nuestro grupo en 2007 y aprobado por el *Joint Genome Institute* (JGI), dependiente del Departamento de Energía de Estados Unidos, bajo el marco de la posibilidad del uso de este hongo para la producción de biocarburantes.

Entre las herramientas moleculares disponibles, destaca un sistema de transformación genética (van Heeswijk, 1984; van Heeswijk y Roncero, 1984; Gutiérrez *et al.*, 2011; Nicolás *et al.*, 2018) basado en la complementación de auxotrofías que permite la introducción de DNA exógeno. Esta complementación se realiza con marcadores de auxotrofia formando parte tanto de vectores autorreplicativos (plásmidos), que permiten no modificar el genoma (Roncero *et al.*, 1989; Anaya y Roncero, 1991; Benito *et al.*, 1995; Nicolás *et al.*, 2018), como de un fragmento de DNA lineal para facilitar su integración en el genoma por recombinación homóloga (Navarro *et al.*, 2001). Con la integración del DNA

puede conseguirse la sobreexpresión de genes introducidos bajo el control de un promotor fuerte (Rodríguez-Frómata *et al.*, 2012), la interrupción de genes para la obtención de mutantes nulos (Navarro *et al.*, 2001) o la introducción de genes quimera para producir proteínas fusionadas a determinados dominios proteicos (Navarro-Mendoza *et al.*, 2019). El proceso de transformación de *M. lusitanicus* por electroporación de protoplastos ha supuesto una mejora en la técnica, permitiendo obtener mejores resultados que con el método tradicional basado en la utilización de polietilenglicol e iones calcio (Gutiérrez *et al.*, 2011). En los últimos años la técnica basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR o *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) se ha implementado en muchos organismos, incluyendo a *M. lusitanicus*, donde esta técnica comienza a ser utilizada con el objetivo de introducir fragmentos de DNA y de generar mutantes nulos (Nagy *et al.*, 2017).

Uno de los procesos mejor estudiados en *M. lusitanicus* es la carotenogénesis (Figura 4), debido a la gran importancia que poseen los carotenos para distintos sectores productivos (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2007). Nuestro grupo ha identificado y estudiado distintos genes participantes en su síntesis. La biosíntesis de carotenos en *M. lusitanicus* está inducida por la luz, así, su micelio de color ligeramente amarillento en la oscuridad, debido a la acumulación de pequeñas cantidades de  $\beta$ -caroteno, torna amarillo intenso debido al incremento de acumulación de este caroteno en respuesta a la luz azul (Navarro *et al.*, 1995). El estudio de esta ruta de carotenogénesis llevó al descubrimiento del mecanismo de silenciamiento génico en *M. lusitanicus*, ya que tras intentar sobreexpresar el gen *crgA*, que es un represor de la carotenogénesis, se produjo el mismo fenotipo que con la delección del gen, el micelio adquirió un color amarillo intenso incluso en oscuridad (Navarro *et al.*, 2001). Posteriormente se confirmó, tras la introducción de plásmidos autorreplicativos que contenían el gen *carB*, un gen estructural de esta ruta, que lo ocurrido estaba relacionado con la activación del silenciamiento génico, produciéndose pequeños RNA de interferencia (siRNA o *short interfering RNAs*) a partir del gen *carB*, que daban lugar a su silenciamiento y a un micelio albino (Nicolás *et al.*, 2003).

El descubrimiento del silenciamiento génico en *M. lusitanicus* permitió sumar una nueva herramienta molecular a las ya disponibles para estudiar la función génica, con la ventaja de que no requería la interrupción génica y la generación de mutantes nulos (Nicolás *et al.*, 2008), pues basta con utilizar un plásmido que lleve un fragmento del gen que se quiere silenciar. Nuestro grupo ha diseccionado genéticamente el mecanismo de silenciamiento de *M. lusitanicus*, identificando los genes implicados en este proceso y su función a través de la generación de mutantes nulos para cada uno de ellos, lo que ha permitido un mayor conocimiento de su mecanismo de acción y su uso como herramienta molecular.



**Figura 4. Ruta de la biosíntesis de carotenos en *M. lusitanicus*.** La biosíntesis de carotenos comienza con la enzima CarRP, que genera fitoeno a partir de dos moléculas de geranylgeranylpirofosfato (GGPP) por su actividad sintasa de fitoeno. A continuación, se producen cuatro deshidrogenaciones sucesivas por la enzima CarB, transformando el fitoeno en licopeno. Por último, la enzima CarRP participa de nuevo en esta ruta, esta vez promoviendo la síntesis de β-caroteno a partir de licopeno, gracias a su actividad ciclasa. A la derecha se muestran los fenotipos asociados a los mutantes en los distintos genes participantes en la ruta (Calo, 2010).

## I. 2. Silenciamiento génico

### I. 2. 1. Generalidades

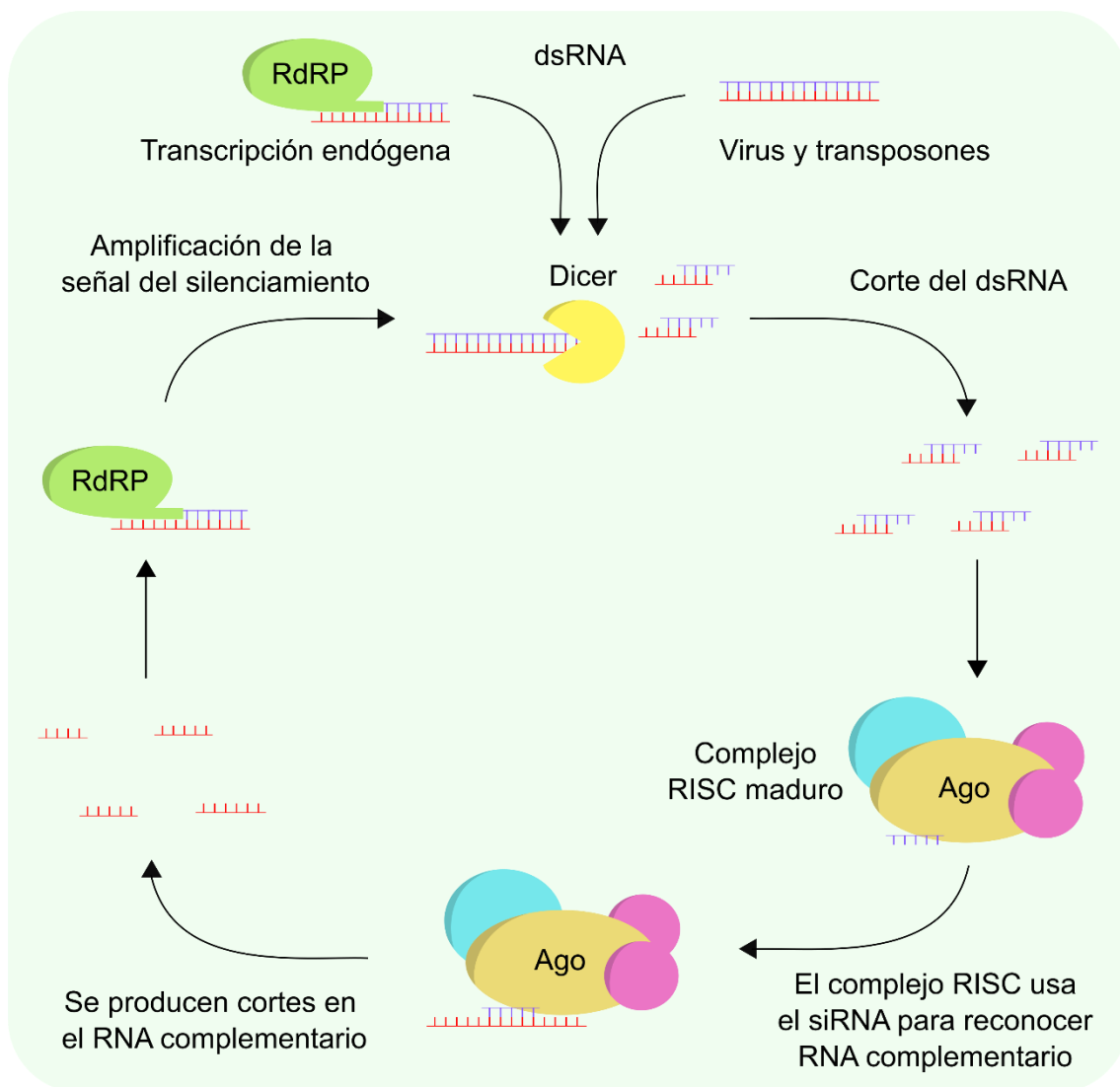
El silenciamiento génico provoca la inhibición de la expresión génica de manera específica, mediante la destrucción del RNA mensajero (mRNA o *messenger RNA*) del gen diana, la inhibición de su traducción o el bloqueo de su transcripción. De manera general es el RNA de doble cadena (dsRNA o *double-stranded RNA*) el responsable de desencadenar este proceso de supresión de la expresión génica, inicialmente descrito como un mecanismo de defensa contra material genético exógeno, pero que actualmente se ha visto que también está relacionado con la regulación de la expresión génica. Mediante este proceso de regulación de genes endógenos, el organismo puede regular procesos biológicos como el desarrollo, el metabolismo o la proliferación celular, entre otros.

El silenciamiento génico fue descubierto en plantas en 1990, donde se observó una supresión génica en *trans* cuando se pretendía la sobreexpresión de una chalcona sintasa en petunia (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente este fenómeno se ha descubierto también en animales, observándose en *Caenorhabditis elegans* por primera vez, inhibiendo la expresión de dos genes codificantes de proteínas del miofilamento mediante el uso de vectores que expresaban fragmentos de estos genes en sentido contrario, produciendo RNA antisentido (Fire *et al.*, 1991). Fue dos años después de su descubrimiento en plantas, cuando este fenómeno se observó en hongos, concretamente en *Neurospora crassa* (Romano y Macino, 1992). Años después, se descubrió que el silenciamiento génico estaba provocado por la unión de estos RNA antisentido y los RNA con sentido, formando moléculas de dsRNA (Fire *et al.*, 1998).

En estos casos, donde el silenciamiento génico se desencadena por dsRNA de origen exógeno, se generan pequeños fragmentos de RNA de interferencia (RNAi o *RNAs interference*), denominados siRNA (*short interfering RNA*). Estos siRNA se producen a partir de moléculas de dsRNA más grandes de diversos orígenes (Figura 5) por la acción de las proteínas Dicer. Estas enzimas Dicer poseen actividad endorribonucleasa específica para dsRNA (Bernstein *et al.*, 2001). Los siRNA se incorporan a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC o *RNA-induced silencing complex*), cuyo componente



principal es una proteína Argonauta (Ago), que usa una de las dos cadenas de siRNA como RNA guía para desencadenar el silenciamiento génico (Ghildiyal y Zamore, 2009). La participación de polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP o *RNA-dependent RNA polymerase*) permite desencadenar el silenciamiento génico a partir de RNA de cadena sencilla (ssRNA o *single-stranded RNA*), además de amplificar la señal de este, gracias a su capacidad de generar moléculas de dsRNA a partir de ssRNA (Figura 5) (Cogoni y Macino, 1999; Dalmay *et al.*, 2000).



**Figura 5. Mecanismo de silenciamiento génico.** Se muestra el mecanismo general de silenciamiento génico y sus distintos componentes, junto con las moléculas de RNA y las distintas modificaciones que sufren. Se representa con color rojo el RNA con sentido respecto a la transcripción y en azul el RNA antisentido.

En muchos organismos se han encontrado varios genes para cada una de las proteínas del silenciamiento génico, observándose frecuentemente una especialización de su función, de tal forma que cada miembro de la familia se encarga de la biogénesis de un tipo de pequeños RNA (sRNA o *small RNAs*), como ocurre en *Drosophila melanogaster* con las proteínas Dicer, donde una produce los micro RNA (miRNA o *micro RNAs*), que se explicarán a continuación, y la otra los siRNA (Y. S. Lee *et al.*, 2004).

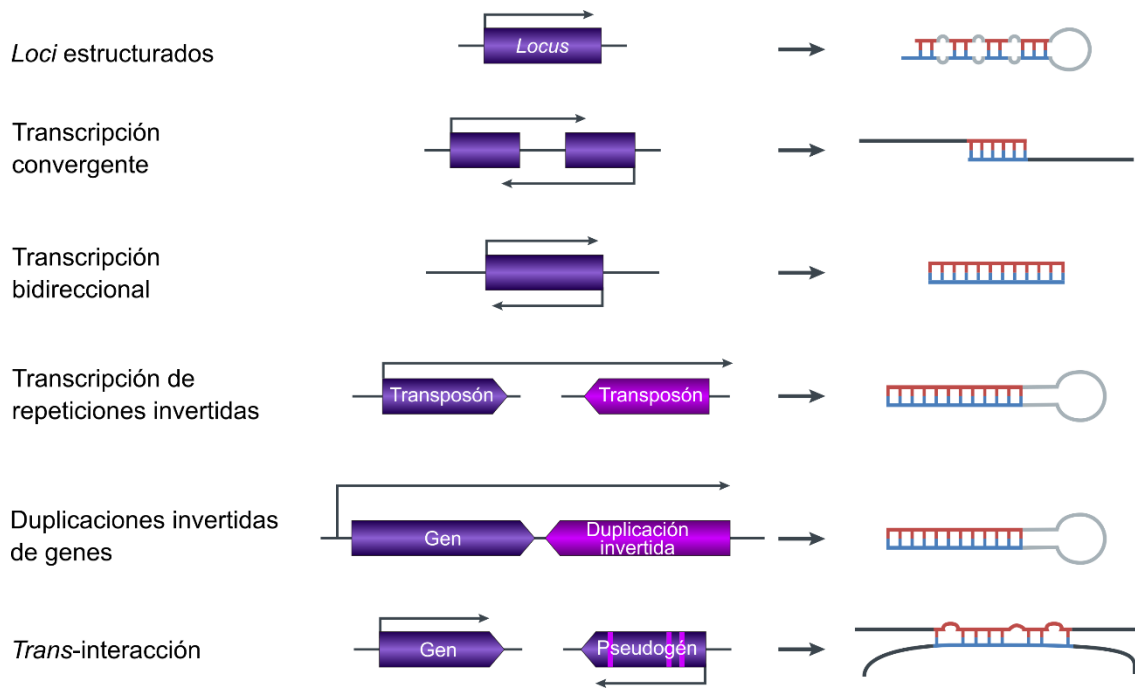
Aunque el silenciamiento génico tiene un papel fundamental en la defensa del genoma, no es esta la única función que se atribuye a este mecanismo. Existen tres clases mayoritarias de sRNA endógenos (esRNA o *short endogenous RNAs*) relacionados con la regulación génica. Por un lado, se encuentran los miRNA, cuya función principal consiste en la regulación de la expresión génica, y su biogénesis se realiza a partir de material genético endógeno. Otro de los grupos mayoritarios está constituido por los siRNA, tradicionalmente vinculados a la defensa del genoma. Por último, cabe mencionar los RNA asociados a proteínas Piwi (piRNA o *Piwi-interacting RNAs*), también relacionados con la defensa, pero con diferencias respecto a los siRNA, principalmente asociadas a su biogénesis.

Los miRNA son productos de RNA de alrededor de unos 22 nucleótidos, identificados en una gran diversidad de organismos, que actúan como moléculas guía para desencadenar el silenciamiento de aquellos mRNA a los que son complementarios. Estas pequeñas moléculas son procesadas por Dicer a partir de RNA en forma de horquilla (Y. Lee *et al.*, 2004; Ambros *et al.*, 2003a). Los miRNA son transcritos en forma de pri-miRNA por la polimerasa II de RNA, llegando a tener longitudes de miles de bases. Estos pri-miRNA son procesados, aprovechando las dobles cadenas producidas en su estructura secundaria, por enzimas Dicer en plantas y Drosha en animales. Tras el corte por estas ribonucleasas, se generan primero los pre-miRNA de doble cadena, para posteriormente generarse los miRNA, también debido a la acción de las proteínas Dicer. Estos pequeños fragmentos de RNA son unidos por una proteína Ago del complejo RISC, que utiliza este RNA como guía para desencadenar el mecanismo de silenciamiento (Y. S. Lee *et al.*, 2004; Bartel, 2004; Ghildiyal y Zamore, 2009). Se ha demostrado que estas proteínas Ago

participan en los procesos de expresión y maduración de los miRNA, además de portar la cadena de RNA guía en el complejo RISC (Diederichs y Haber, 2007).

Por otro lado, nos encontramos con los siRNA, que inicialmente se consideraba que solo actuaban como mecanismo de defensa contra material genético exógeno, pero posteriormente se ha observado que no solamente tienen esta función. Con el descubrimiento de los siRNA endógenos (endo-siRNA o *endogenous siRNAs*) se ha comprobado que los siRNA también están implicados en funciones reguladoras (Ghildiyal y Zamore, 2009). Aunque una de las principales funciones de estos endo-siRNA es el silenciamiento de transposones y regiones del genoma con repeticiones, también se han observado otros escenarios donde están implicados, como la regulación génica en respuesta a daño en el DNA o a diferentes tipos de estreses (Czech *et al.*, 2008; Vázquez *et al.*, 2010). Estos endo-siRNA, inicialmente descubiertos en plantas y en *C. Elegans*, se han observado en un gran número de eucariotas superiores (Hamilton *et al.*, 2002; Zilberman *et al.*, 2003; Ambros *et al.*, 2003b). Los endo-siRNA presentan un tamaño de 21 pares de nucleótidos y se procesan por las enzimas Dicer a partir de largas moléculas de dsRNA precursoras, que pueden generarse a partir de distintos mecanismos (Figura 6). Después, las pequeñas moléculas se unen al complejo RISC, guiándolo hasta los RNA diana. Además, en algunos organismos como plantas, hongos y gusanos, se produce una amplificación de esta señal de silenciamiento, mediada por las proteínas RdRP, produciendo siRNA secundarios (Ghildiyal y Zamore, 2009). En plantas se han observado tres tipos distintos de endo-siRNA: los siRNA de actuación en cis (*casiRNA* o *cis-acting siRNAs*), vinculados con transposones y regiones repetitivas (Xie *et al.*, 2004); los siRNA de actuación en trans (*tasiRNA* o *trans-acting siRNAs*), que requieren la participación de miRNA complementarios a los pre-tasiRNA para reclutar a las RdRP (Vázquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Ghildiyal y Zamore, 2009); y los siRNA derivados de transcritos antisentido naturales (*natsiRNA* o *natural antisense transcript-derived siRNAs*), que son generados por el solapamiento de dos transcritos convergentes, que se producen ante situaciones de estrés (Borsani *et al.*, 2005).

## I. Introducción



**Figura 6. Fuentes endógenas de RNA de doble cadena.** Representación de las secuencias de DNA genómico que pueden generar dsRNA. Se representa en rojo el RNA con sentido respecto a la transcripción y en azul el RNA antisentido. Se representa el sentido de la transcripción con flechas junto a los bloques morados de DNA genómico (en una tonalidad más clara se representan las secuencias repetidas). Cuando es relevante, se ha representado la dirección de las secuencias de DNA con un extremo en forma de flecha (Pérez-Arques, 2020; modificado de Ghildiyal y Zamore, 2009).

El tercer grupo mayoritario de esRNA son los piRNA, llamados así por su asociación con las proteínas PIWI, pertenecientes a la superfamilia de proteínas Ago. Estos esRNA se denominaron inicialmente pequeños RNA interferentes asociados a repeticiones, ya que derivaban de elementos repetitivos y están vinculados a la defensa contra transposones en animales (Aravin *et al.*, 2003; Aravin *et al.*, 2007). Los piRNA tienen un tamaño de entre 21 y 35 nucleótidos y están principalmente presentes en las células germinales, aunque también se ha observado la presencia de proteínas PIWI en neoblastos de *Schmidtea mediterranea*, células indiferenciadas que dan lugar a un nuevo organismo (Ozata *et al.*, 2019; Reddien *et al.*, 2005). Este tipo de RNA, a diferencia de los mencionados anteriormente, son independientes de las proteínas Dicer para su biogénesis (Vagin *et al.*, 2006; Houwing *et al.*, 2007). Los piRNA se generan a partir de determinados loci, llamados agrupaciones de piRNA, y no requieren de dsRNA para su biogénesis (Ozata *et al.*, 2019).

### I. 2. 2. El silenciamiento génico en hongos

Como se ha mencionado anteriormente, fue en 1992 cuando se descubrió el silenciamiento génico en hongos, concretamente en *N. crassa* (Romano y Macino, 1992). En este caso el fenómeno descubierto se denominó “*quelling*” y representa un silenciamiento génico post-transcripcional, que se describió como un proceso reversible.

Este no ha sido el único fenómeno de silenciamiento génico encontrado en *N. crassa*, que ha pasado a ser uno de los hongos mejor estudiados en cuanto a silenciamiento génico se refiere. Existen otros mecanismos de silenciamiento génico como el mediado por RNA similar a miRNA (miRNA o *miRNA-like*), que guardan una gran similitud con los miRNA (Lee *et al.*, 2010; Ambros, 2004); las mutaciones puntuales inducidas por repetición (RIP o *repeat-induced point mutation*) y el silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD o *meiotic silencing of unpaired DNA*), vinculados con la defensa (Galagan *et al.*, 2003, Shiu *et al.*, 2001); el mediado por qiRNA, inducidos por daño en el DNA y llamados así por su relación con la proteína argonauta QDE-2 (Lee *et al.*, 2009); o el mediado por siRNA independientes de Dicer (disiRNA o *Dicer independent siRNAs*), relacionados con la metilación de promotores de genes para regular su expresión y cuyo mecanismo no requiere la implicación de las proteínas clásicas del silenciamiento (Lee *et al.*, 2010).

Dentro del silenciamiento génico en el mundo de los hongos existe una gran diversidad de mecanismos y rutas que regulan una gran variedad de funciones. Como se ha mencionado anteriormente, una de las funciones que tradicionalmente se ha vinculado al silenciamiento génico es la defensa contra material genético exógeno. Sin ir más lejos, en *N. crassa* se ha comprobado que la presencia de dsRNA induce la expresión de genes de proteínas clave en el silenciamiento, en concreto de las proteínas Dicer y Argonauta, y también de genes que actúan en la respuesta antiviral, poniendo de manifiesto el papel fundamental del silenciamiento en la defensa del organismo (Choudhary *et al.*, 2007). En oposición a esta maquinaria de defensa, también se han observado mecanismos de respuesta en los virus, donde estos virus codifican proteínas

capaces de suprimir el silenciamiento génico del hospedador, como ocurre en la infección del hipovirus CHV1 en *Cryphonectria parasitica* (Segers *et al.*, 2006).

El silenciamiento también tiene un papel importante en la estabilidad genómica controlando la expresión de los transposones, siendo este un mecanismo de defensa de gran importancia. Al igual que en otros organismos, en algunos hongos como *M. lusitanicus* se ha observado como el silenciamiento génico actúa controlando estos elementos transponibles (Nicolás *et al.*, 2010). Además, en otros hongos como *Cryptococcus neoformans*, esta defensa frente a transposones se pone de manifiesto durante la reproducción sexual con el objetivo de proteger la integridad de la descendencia (Wang *et al.*, 2010).

Existe una fuerte relación entre la patogenicidad de algunos hongos y el silenciamiento génico. Sin ir más lejos, en *M. lusitanicus* se ha observado recientemente que la ruta de RNAi no canónica (NCRIP o non-canonical RNAi pathway), tiene un papel fundamental en la virulencia del hongo, ya que mutantes para dos genes fundamentales en esta ruta (*r3b2* y *rdrp1*) sufren una pérdida de su capacidad patogénica en ensayos de virulencia con ratón (Pérez-Arques *et al.*, 2020). En otros organismos se ha observado la existencia de otros tipos de RNA, diferentes a los RNA de interferencia, relacionados con la virulencia, como los RNA largos no codificantes (lncRNA o *long non-coding RNAs*), que son RNA de más de 200 nucleótidos transcritos principalmente por la polimerasa II de RNA. Estos RNA provienen de regiones intergénicas e intragénicas, y actúan generalmente regulando negativamente a sus genes diana (Till *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2010). Aunque están implicados en otros procesos celulares muy diversos tales como la meiosis, el metabolismo o la replicación de los telómeros (Till *et al.*, 2018), también se ha observado una relación de estos lncRNA con la capacidad virulenta de hongos como *Ustilago maydis* (Donaldson y Saville, 2013) o *C. neoformans* (Chacko *et al.*, 2015), entre otros.

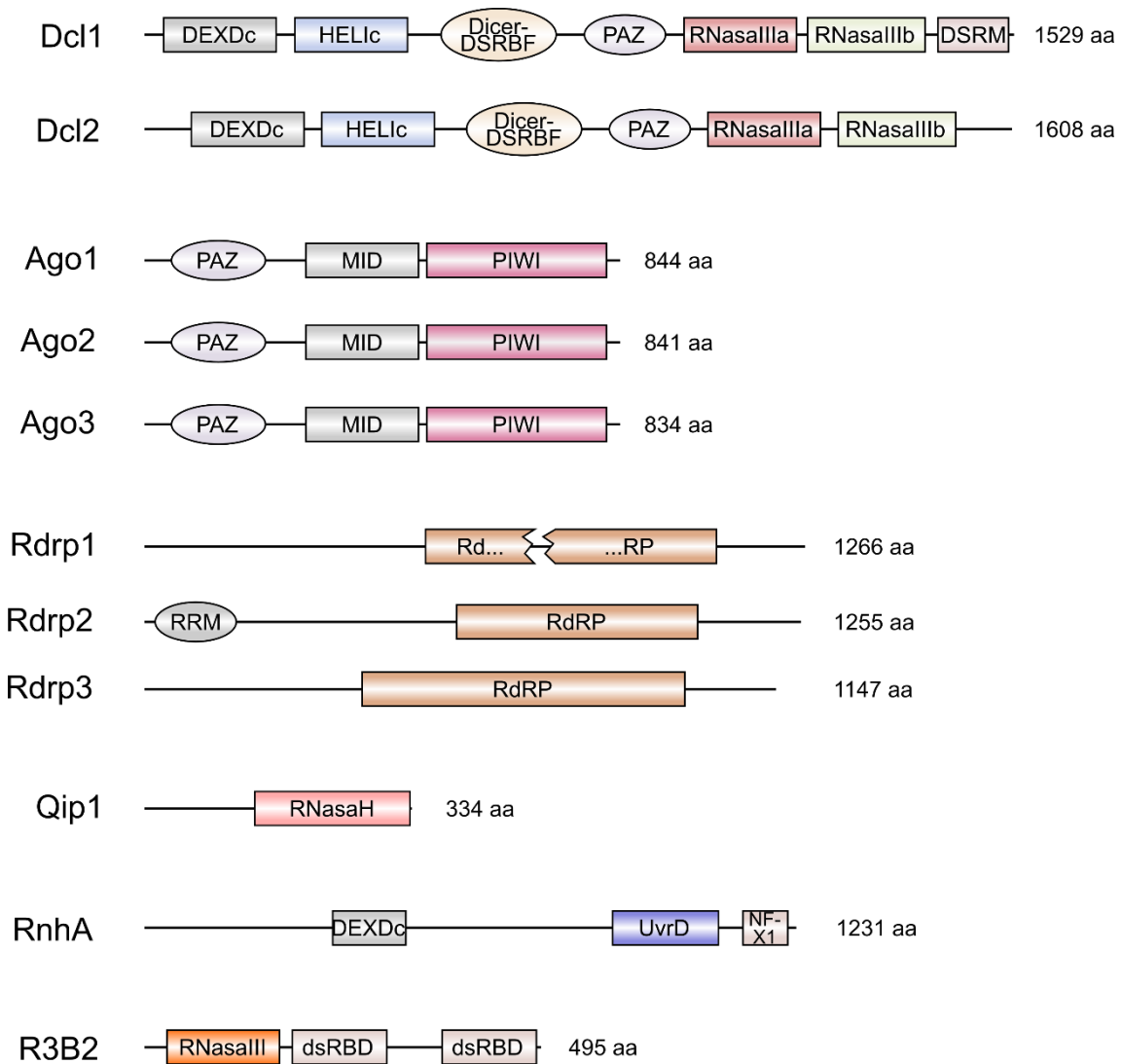
### I. 2. 3. Silenciamiento génico en *M. lusitanicus*

#### I. 2. 3. 1. Componentes y mecanismos de silenciamiento génico de *M. lusitanicus*

*M. lusitanicus* posee dos rutas básicas de silenciamiento génico, uno canónico y otro no canónico o NCRIP, con elementos específicos de cada una de ellas y elementos comunes (Figuras 7 y 8), que se han vinculado con funciones tan diversas como la defensa contra material genético exógeno, el desarrollo o la virulencia. Es importante mencionar que este es el primer hongo basal donde se ha caracterizado, molecular y funcionalmente, el silenciamiento génico, aunque la presencia de las proteínas clave del mecanismo en otros hongos basales sugiere que este mecanismo puede ser funcional también en ellos (Garre *et al.*, 2014). En *M. lusitanicus* se han encontrado varias copias de los genes elementales del silenciamiento génico por RNAi (Figura 7) y cada una de las rutas requiere de la participación de combinaciones específicas de las mismas, cómo se describe a continuación.

La caracterización de las proteínas que participan en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus* permitió descubrir que este hongo posee dos RNasas III similares a Dicer (Dcl o *Dicer-like*), llamadas Dcl1 y Dcl2. Los primeros estudios de estas proteínas indicaban que Dcl1 no era esencial para el silenciamiento, aunque parecía tener un papel importante en la regulación de distintos procesos celulares en *M. lusitanicus*. En cambio, Dcl2 sí parecía esencial para la biogénesis de RNAi, puesto de manifiesto por la reducción drástica de la frecuencia de silenciamiento en los mutantes de este gen, aunque esa reducción no fue completa, lo que sugería la implicación de Dcl1 (Nicolás *et al.*, 2007; de Haro *et al.*, 2009). Posteriormente se observó que Dcl1 sí es esencial para la biogénesis de determinados RNAi, como algunos grupos de siRNA derivados de exones (*ex-siRNA* o *exonic-siRNAs*), y que participa en la generación de epimutantes del mecanismo canónico de *M. lusitanicus* (Nicolás *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2017).

## I. Introducción



**Figura 7. Estructura de las proteínas participantes en las rutas de silenciamiento génico de *M. lusitanicus*.** Las figuras geométricas representan los distintos dominios de las proteínas implicadas en el silenciamiento (Pérez-Arques, 2020; adaptada de Ruiz-Vázquez *et al.*, 2015). DEXDc: dominio helicasa similar a DEAD. HELIc: dominio helicasa C. Dicer-DSRBF: dominio de plegamiento similar a dominios de unión a dsRNA típicos de proteínas Dicer. PAZ: dominio PIWI-Argonauta-Zwille. RNasaIII: dominios ribonucleasa III. DSRM: motivo de unión a dsRNA. MID: dominio central. PIWI: dominio PIWI carboxilo terminal con actividad ribonucleasa H. RdRP: dominio polimerasa de RNA dependiente de RNA. RRM: motivo de reconocimiento de RNA. RNasaH: dominio con actividad ribonucleasa tipo H. UvrD: dominio helicasa UvrD/REP. NF-X1: dominio de dedo de zinc tipo NF-X1. dsRBD: dominio de unión a dsRNA.

Se han identificado tres proteínas Ago distintas, siendo Ago1 la que está implicada en el silenciamiento génico (Cervantes *et al.*, 2013). Las proteínas Ago que se han encontrado en otros mucorales muestran mayor similitud con esta



misma proteína, Ago1, no encontrándose ortólogos para las proteínas Ago2 y Ago3, por lo que estas provendrían de un ancestro distinto (Garre *et al.*, 2014).

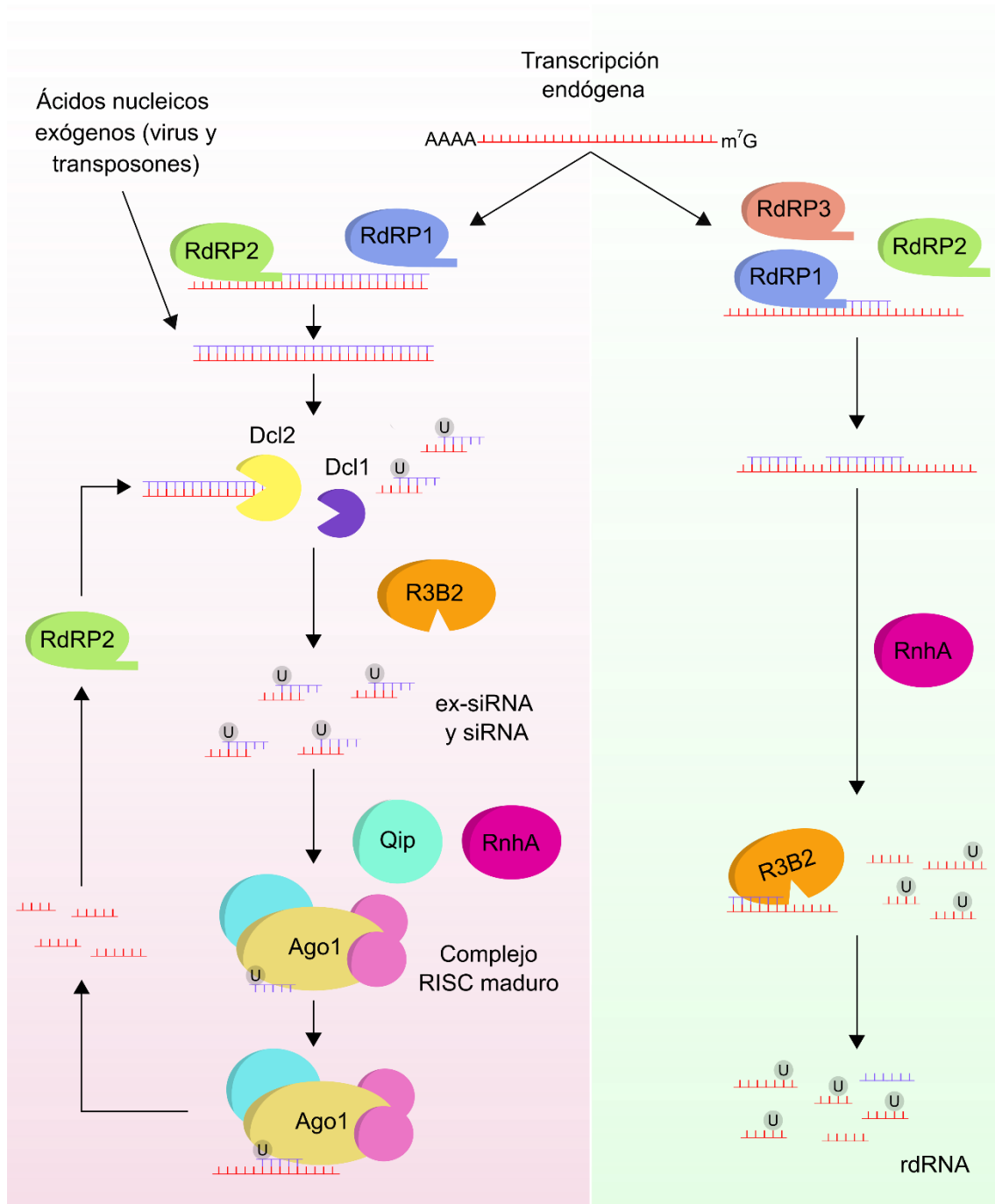
También son tres las proteínas RdRP que se han identificado en *M. lusitanicus*, teniendo todas papeles importantes en ambas rutas de silenciamiento (Calo *et al.*, 2012; Calo *et al.*, 2017; Nicolás *et al.*, 2010; Trieu *et al.*, 2015). Estas RdRP son las protagonistas junto con la ribonucleasa R3B2 de una ruta no canónica de RNAi independiente de Dicer, (Calo *et al.*, 2017). R3B2 es una RNasa III, cuya arquitectura de dominios solo se había observado en *Arabidopsis thaliana* dentro del reino eucariota (Trieu *et al.*, 2015).

Por último, cabe mencionar la participación de dos proteínas en el sistema de silenciamiento de las que se desconoce su función con exactitud: Qip1 y RnhA. Qip1 (*quelling induced protein* o *QDE2-interating protein*) es una exonucleasa ortóloga de la proteína QIP de *N. crassa* (Calo *et al.*, 2017), que participa en el mecanismo de silenciamiento génico convirtiendo los siRNA de doble cadena en moléculas de cadena sencilla (Maiti *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2010). Por su parte, RnhA es una helicasa similar a SAD-3 (Calo *et al.*, 2017), una helicasa que, al igual que QIP, también participa en el silenciamiento génico en otros hongos, como es el caso del mecanismo MSUD de *N. crassa* (Alexander *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado, estas proteínas se combinan para generar las distintas rutas de silenciamiento génico de *M. lusitanicus* (Figura 8), que se agrupan en dos tipos básicos, canónica y no canónica o NCRIP. La ruta canónica es la ruta clásica de silenciamiento y, por lo tanto, la mejor estudiada. Esta vía puede actuar contra ácidos nucleicos exógenos que procedan de transposones, plásmidos o virus, ejerciendo una función de defensa para el organismo (Nicolás *et al.*, 2003; Ruiz-Vázquez *et al.*, 2015). La ruta canónica comienza con la participación de RdRP1 generando dsRNA a partir de moléculas de ssRNA de origen exógeno (Calo *et al.*, 2012). Una vez se han generado estas largas moléculas de dsRNA, es la enzima Dcl2, con una participación secundaria de Dcl1, la que se encarga de procesarlas para producir pequeños fragmentos de siRNA de 21 o 25 pb (de Haro *et al.*, 2009). Estos siRNA son captados por la proteína Ago1 del complejo RISC (Cervantes *et al.*, 2013). La exonucleasa Qip podría estar involucrada en la maduración de los siRNA, además de en la

activación del complejo RISC junto a la proteína Ago1 (Calo *et al.*, 2017). Esta ruta se ve favorecida por un paso de amplificación protagonizado por RdRP2, esencial para el silenciamiento de material genético exógeno, generando siRNA secundarios (Calo *et al.*, 2012). La RNasa R3B2 participa también en esta ruta, aunque su papel aún se desconoce (Calo *et al.*, 2017). Su participación en este mecanismo se confirmó al comprobar que el mutante en *r3b2* tenía una menor capacidad para silenciar material genético exógeno (Trieu *et al.*, 2015).

Esta ruta canónica de silenciamiento también se ha relacionado con la regulación de genes endógenos a través de los ex-siRNA. Estos ex-siRNA deben su nombre a la localización de la secuencia de DNA de la que proceden, ya que derivan de exones, y regulan la expresión de los genes que llevan esos exones y también de otros genes con secuencias complementarias, produciéndose una regulación en *trans* (Nicolás *et al.*, 2010; Nicolás *et al.*, 2015). Los cerca de 700 genes regulados por este mecanismo, de manera directa e indirecta, están relacionados con funciones muy diversas, como el metabolismo, la defensa del organismo o mecanismos de transducción de señales (Nicolás *et al.*, 2015). Los 324 ex-siRNA identificados fueron clasificados en 4 clases, que difieren en las proteínas que actúan en su biogénesis. En la producción de los ex-siRNA procedentes de los 9 exones clasificados en la clase 1 intervienen Dcl2 y RdRP2. La clase 2 abarca el mayor número de exones implicados, con un total de 222, diferenciándose de la clase 1 en que en este caso actúa RdRP1 en lugar de RdRP2. En la biogénesis de los 88 ex-siRNA de la clase 3 participan Dcl1, Dcl2 y RdRP-1 o RdRP-2. Por último, la clase 4 está formada por 5 ex-siRNA y su producción depende de Dcl1 y RdRP1 o RdRP2 (Nicolás *et al.*, 2010). Posteriormente se determinó la participación de Ago1 en la biogénesis y/o estabilidad de las 4 clases de ex-siRNA y de R3B2 en la producción de algunos ex-siRNA de la clase 1 y en la mayoría de los ex-siRNA del resto de las clases. En el caso de Ago1, la unión a ex-siRNA solo se produce en las dos primeras clases, no con los ex-siRNA de las clases 3 y 4, pero siendo esencial esta proteína para la producción de estos (Cervantes *et al.*, 2013; Trieu *et al.*, 2015).



**Figura 8. Rutas de silenciamiento génico de *M. lusitanicus*.** Las moléculas de dsRNA de origen exógeno (ruta canónica) o de origen endógeno (ambas rutas) desencadenan el silenciamiento génico. La ruta canónica se muestra en el recuadro rosa y la no canónica en el verde. Se muestra en la imagen la posición conservada de uracilo con una “U” y las moléculas de RNA con sentido y antisentido se representan con colores diferentes (rojo y azul, respectivamente). Figura adaptada de Pérez-Arques, 2020.

Además, este mecanismo de silenciamiento es el responsable de la generación de epimutantes para adaptación ante situaciones de estrés. Se ha visto que *M. lusitanicus* es capaz de generar resistencia al antifúngico FK506, que se une a la peptidilpropil isomerasa FKBP12 formando un complejo que inhibe la calcineurina, de dos formas distintas, una de ellas provocada por mutaciones en los genes *fkbA* (que codifica FKBP12), *cnaA* o *cnbR* (que codifican las subunidades de la calcineurina) que presentan una resistencia estable, y una segunda que involucraba la ruta canónica de silenciamiento génico produciendo siRNA a partir del mRNA de *fkbA*. En este segundo caso se trata de un proceso reversible puesto en marcha por la presión selectiva del antifúngico y que evidencia la existencia de un mecanismo que le confiere una gran plasticidad fenotípica al hongo (Calo *et al.*, 2014). Las proteínas del mecanismo de silenciamiento implicadas en la generación de epimutantes son Dcl1, Dcl2, Ago1, Qip, RnhA y RdRP1, de la cual se desconoce su papel en la ruta. R3B2 participa en el mecanismo de generación de epimutantes inhibiéndolo, ya que los mutantes en este gen presentan una mayor tasa de generación de epimutantes (Calo *et al.*, 2017). Con el uso de otros antifúngicos, como el ácido 5-fluororótico, se ha comprobado que este mecanismo permite la generación de epimutantes ante otros estreses (Chang *et al.*, 2019). El estudio del impacto de estos epimutantes en ratones muestra que la resistencia a antifúngicos se mantiene durante la infección, indicando la importancia que puede tener este mecanismo para el desarrollo de la mucormicosis (Chang y Heitman, 2019).

El segundo mecanismo básico de silenciamiento génico de *M. lusitanicus* es el no canónico o NCRIP, que es dependiente de las tres proteínas RdRP e independiente de Dicer y Ago. Tras secuenciar los sRNA de la estirpe silvestre y las estirpes mutantes para *dicer* y *rdrp*, se identificó un grupo de esRNA que eran producidos por un mecanismo dependiente de *rdrp* e independiente de *dicer*. Además, estos sRNA no mostraban el patrón de tamaño clásico de los sRNA dependientes de *dicer*, sino que mostraban una distribución de tamaño aleatoria. En la búsqueda de proteínas candidatas a participar en esta ruta se identificó a R3B2, una ribonucleasa que muestra preferencia por la posición que se encuentra dos bases aguas abajo de un uracilo para realizar el corte del RNA

y que resultó ser esencial para la producción de los sRNA dependientes de *rdrp* e independientes de *dicer* (Trieu *et al.*, 2015). Con el estudio de los integrantes de esta ruta se observó que RdRP1 y RdRP2 participan en ella, y posteriormente se incluyó también a RdRP3 (Trieu *et al.*, 2015; Calo *et al.*, 2017). Con la identificación de RdRP3 en esta ruta, también se identificó la participación de RnhA, aunque se desconoce el papel que desempeña en el mecanismo. Las tres proteínas RdRP actuarían en la generación de las cadenas complementarias al mRNA, con el objetivo de generar una cadena diana para R3B2, cuya degradación producirá los RNA degradados dependientes de RdRP (rdRNA o RdRP-dependent degraded RNAs) (Calo *et al.*, 2017). Los rdRNA generados por esta ruta suelen presentar un uracilo en la penúltima posición, además de no mostrar una longitud específica, como se ha mencionado anteriormente (Trieu *et al.*, 2015). Esta ruta no canónica se ha relacionado con la estabilidad genómica y la virulencia (Pérez-Arques *et al.*, 2020).

Existe una interacción entre los dos mecanismos de silenciamiento, el canónico y el no canónico. Como ejemplo de esta interconexión entre rutas, se ha observado que NCRIP reprime las funciones de la ruta canónica relacionadas con la generación de epimutantes y el silenciamiento de los retrotransposones pericentroméricos (Calo *et al.*, 2017; Pérez-Arques *et al.*, 2020).

### **I. 2. 3. 2. R3B2, una nueva ribonucleasa en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus***

El descubrimiento de R3B2 dio respuesta a la incógnita existente sobre la RNasa que debía formar parte de la ruta NCRIP. El hecho de que esta proteína sea tan diferente al resto de RNasas tipo III conocidas generó interés por profundizar en su estudio. La importancia de R3B2 va más allá de la ruta NCRIP ya que también tiene un papel, desconocido hasta el momento, en la ruta canónica del silenciamiento (Trieu *et al.*, 2015; Calo *et al.*, 2017).

Al igual que en el resto de RNasas que poseen un solo dominio ribonucleasa de tipo III (RIIID o *RNase III nuclease domain*), R3B2 forma homodímeros para poder cortar el RNA (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021). Esta presencia de un solo dominio RIIID es común en las RNasas pertenecientes a la

clase I de procariotas y hongos. Además, este grupo de RNAsas solo presenta un dominio de unión a RNA, mientras que R3B2 se diferencia de ellas porque posee dos de estos dominios (Torres-Martínez y Ruiz-Vázquez, 2016).

A nivel de secuencia, la comparación de R3B2 con otras ribonucleasas de su misma familia, como la ribonucleasa AaRIII (RNasa III de *Aquifex aeolicus*), pone de manifiesto ciertas diferencias en los dominios de unión a dsRNA del dominio catalítico (RBM o *dsRNA-binding motifs*), conocidos como RBM3 y RBM4. Estos dominios, que contribuyen a la unión de la proteína al RNA, difieren en algunos aspectos de los del resto de ribonucleasas (Figura 9). Mientras que en el RBM3 de R3B2 se ha producido un cambio de un glutamato conservado por una asparagina, en el RBM4 los cambios se han producido en la zona de unión entre las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , donde en R3B2 hay 3 aminoácidos mientras que en el resto de ribonucleasas analizadas hay entre 11 y 21. Se ha comprobado que este enlace tan corto en RBM4 es común en los homólogos de R3B2 del resto de Mucorales, conservándose solo dos de los aminoácidos que se encontraban en R3B2: L102 y V106 (Figura 9B) (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021).

A pesar de que R3B2 es capaz de unirse tanto a ssRNA, como a dsRNA, se ha comprobado que solo es capaz de cortar ssRNA, en una posición específica que es el segundo nucleótido después de un uracilo, produciendo fragmentos de diversos tamaños detectados en los loci regulados por NCRIP de modo que esta ruta produce la degradación de los mRNA de los genes diana sobre los que actúa (Trieu *et al.*, 2015; Cánovas-Márquez *et al.*, 2021).

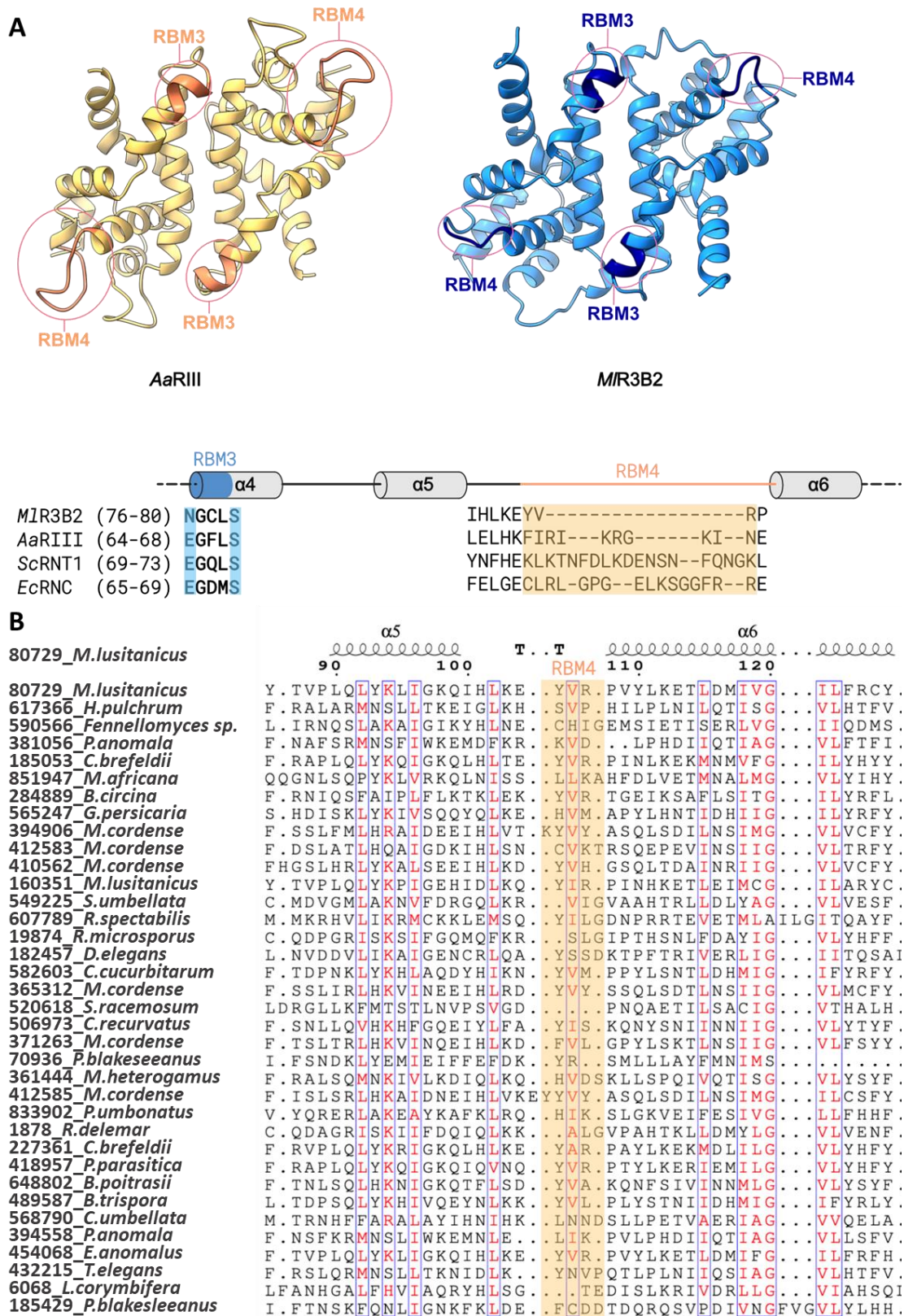


Figura 9. Diferencias y similitudes de la secuencia de la proteína R3B2 con otras ribonucleasas. A) Representación de los dominios RBM3 y RBM4 del dominio catalítico y comparación de la secuencia de aminoácidos de diferentes ribonucleasas con R3B2.

**B)** Alineamiento del dominio RBM4 de R3B2 de *M. lusitanicus* y otras ribonucleasas de Mucorales (Cánovas-Márquez et al., 2021). *Ml*, *M. lusitanicus*; *Aa*, *A. aeolicus*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Ec*, *Escherichia coli*. Especies mostradas en el alineamiento: *Helicostylum pulchrum*, *Fennellomyces sp.*, *Pilaria anomala*, *Chaetocladium brefeldii*, *Mycotypha africana*, *Backusella circina*, *Gilbertella persicaria*, *Mucor cordense*, *Sporodiniella umbellata*, *Radiomyces spectabilis*, *Rhizopus microsporus*, *Dichotomocladium elegans*, *Choanephora cucurbitarum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Cokeromyces recurvatus*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor heterogamus*, *Pilobolus umbonatus*, *Rhizopus delemar*, *Parasitella parasitica*, *Benjaminella poitrasii*, *Blakeslea trispora*, *Circinella umbellata*, *Ellisomyces anomalus*, *Thamnidium elegans* y *Lichthemia corymbifera*.

### **I. 3. Las proteínas de choque térmico**

#### **I. 3. 1. Características generales y su relación con el silenciamiento génico**

En 1962, en un estudio realizado con células de las glándulas salivares de *Drosophila busckii*, se encontraron los primeros indicios de la presencia de las proteínas de choque térmico (Hsp o *heat-shock proteins*). Cuando las células se incubaban a 25 °C, se les sometía a un choque térmico de 30 °C durante 30 minutos y se volvían a incubar a 25 °C, se producía un incremento de regiones ensanchadas (*puffs*) en su genoma (Ritossa, 1962). Estas regiones ensanchadas se corresponden con genes cuya expresión se ha inducido por el choque térmico y están produciendo ciertas cantidades de mRNA de genes necesarios para la supervivencia a esa mayor temperatura, las proteínas producidas en estas condiciones se denominaron Hsp (Tissières *et al.*, 1974).

La mayoría de estas Hsp son chaperonas que se expresan de manera constitutiva, no solo ante temperaturas elevadas y otros estreses, aunque estos estímulos sí pueden producir un aumento en sus niveles de expresión (Whitesell y Lindquist, 2005). Las Hsp se clasifican en distintos grupos en función de su peso molecular, entre las que destacan: las Hsp90, vinculadas con el plegamiento y maduración de proteínas (el uso de inhibidores de estas proteínas está dando buenos resultados en estudios contra el cáncer); las Hsp70, junto con las cochaperonas Hsp40, implicadas en una gran cantidad de funciones



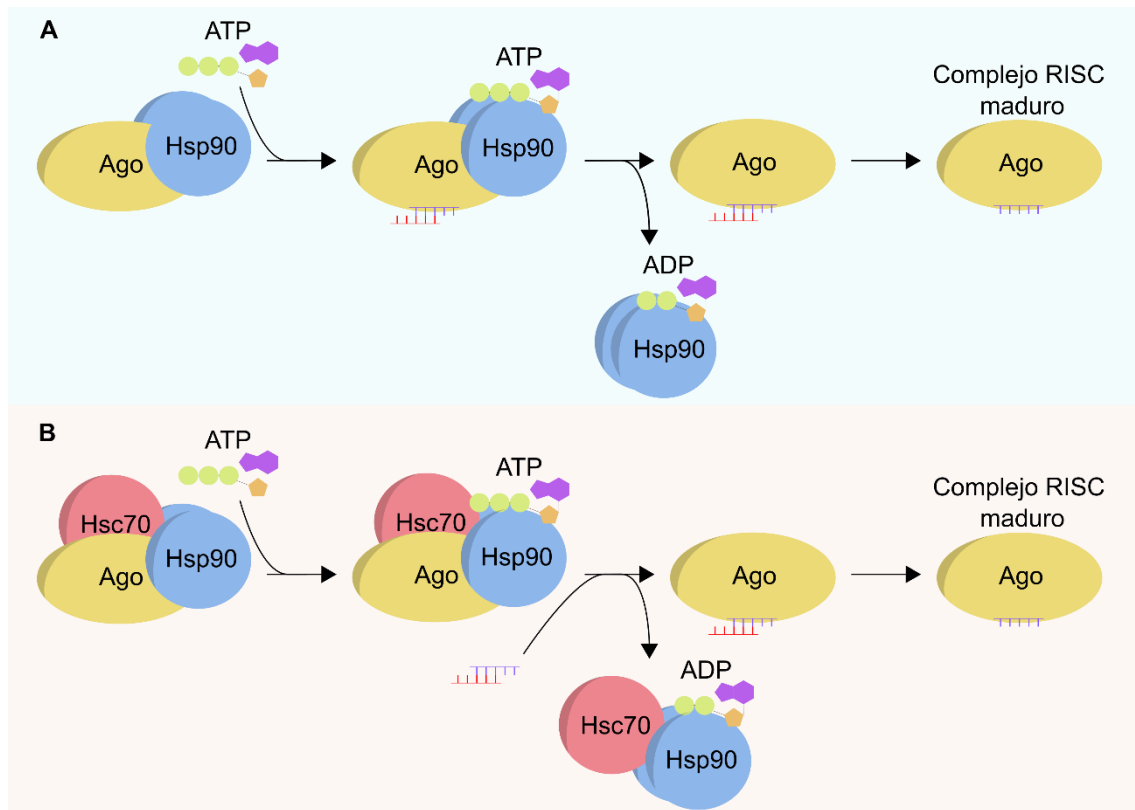
relacionadas con el mantenimiento y correcto funcionamiento de la proteínas, como son el plegamiento, su desagregación o la eliminación de proteínas aberrantes; y las Hsp60, chaperonas que forman complejos estructurados donde se produce el plegamiento de proteínas y se evita su agregación (Whitesell y Lindquist, 2005; Rosenzweig *et al.*, 2019). Las chaperonas pueden interactuar con otras chaperonas para llevar a cabo sus funciones de asistencia a otras proteínas, y las alteraciones en su funcionamiento pueden desembocar en enfermedades, como cáncer, miopatías o enfermedades neurodegenerativas (Macario y Conway de Macario, 2007; Fernández-Fernández *et al.*, 2017).

Las proteínas Hsp70, como se ha mencionado anteriormente, realizan el mantenimiento de las proteínas de una célula, tanto en situaciones normales como en condiciones de estrés. Además, estas proteínas se han relacionado con procesos como la protección frente a la apoptosis o la división celular, donde la expresión de estas proteínas aumenta (Milarski y Morimoto, 1986; Mosser *et al.*, 1997). La hidrólisis de ATP llevada a cabo por las Hsp70 es esencial para el correcto mantenimiento de la proteostasis en la célula, al igual que las interacciones con otras chaperonas y cochaperonas (Gething y Sambrook, 1992; Fernández-Fernández *et al.*, 2017). Además, las Hsp70 son proteínas que interactúan con una gran variedad de proteínas en la célula, lo que dificulta los estudios de interacción y, además, estas interacciones se pueden ver alteradas ante determinados estreses, como el producido por un choque térmico (Calloni *et al.*, 2012; Shalgi *et al.*, 2013). Por otro lado, las cochaperonas, mencionadas anteriormente, interactúan con proteínas que presentan determinados dominios para posteriormente atraer a las chaperonas (Taipale *et al.*, 2014; Zabinsky *et al.*, 2018). Una de las principales funciones de las Hsp70 es su participación en el plegamiento de nuevas proteínas, actuando junto a otras Hsp, para lo que interactúan con la cadena nascente de aminoácidos de estas nuevas proteínas a través de regiones con residuos hidrofóbicos (Hartl *et al.*, 2011). En hongos se han observado distintos procesos donde las proteínas Hsp70 están implicadas, entre los que se encuentran la formación y propagación de priones en levaduras, la respuesta a diversos estreses como altas temperaturas o a antifúngicos y la patogenicidad de hongos patógenos en plantas y humanos (Tiwari y Shankar, 2018).

Los miembros de la familia de las Hsp70 poseen al menos dos de las cuatro regiones características que presentan las DnaK (chaperona) de bacterias y que son: un dominio de unión a nucleótido (NBD o *nucleotide binding domain*) de 45 kDa en el extremo amino-terminal; un dominio de unión a sustrato (SBD o *substrate binding domain*) de 15 kDa, llamado SBD $\beta$ ; un segundo dominio SBD $\alpha$  helicoidal de 10 kDa; y por último, un extremo carboxilo-terminal desestructurado de longitud variable (Rosenzweig *et al.*, 2019).

Las Hsp se ha vinculado en numerosas ocasiones con el silenciamiento génico, en concreto con el complejo RISC y la proteína Ago1, tanto en animales como en plantas (Figura 10) (Smith *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2010; Iki *et al.*, 2010). En el caso de plantas se ha propuesto un modelo donde Hsp90 se uniría a Ago1 y a ATP, permitiéndole unir dsRNA y, tras la hidrólisis de ATP, se liberan la Hsp90 y la cadena accesoria del RNA, dejando a Ago1 unida a la cadena guía, dando lugar al complejo RISC maduro (Iki *et al.*, 2010). El modelo de animales sería ligeramente distinto, siendo necesarias las Hsp90 y Hsc70 (también conocida como HspA8, miembro de la familia de las Hsp70) para la unión del RNA al complejo RISC, requiriendo para ello la hidrólisis de ATP. En este caso, la actividad de las Hsp se necesita para el ensamblaje del complejo RISC, pero no para la separación de las cadenas y el posterior corte que se produce en los mRNA (Iwasaki *et al.*, 2010). En estudios realizados con la proteína Ago de *D. melanogaster*, se ha comprobado que la cavidad de esta proteína donde se une el RNA es demasiado pequeña, y requeriría un cambio conformacional para la unión de este, que se produciría por la unión y la posterior hidrólisis de ATP por las Hsp (Miyoshi *et al.*, 2010). El sistema mediado por las Hsp70 es suficiente para provocar la apertura parcial de la proteína Ago, mientras que el sistema de las Hsp90 no puede llevar esta acción por sí solo, aunque sí es necesario para prolongar el estado activo de la proteína Ago (Tsuboyama *et al.*, 2018). Asimismo, también se ha podido vincular a cochaperonas con el silenciamiento génico. Por un lado, la generación de mutantes en genes que codifican proteínas homólogas a la cochaperona Hsp40 en *A. thaliana*, afecta a la función de Ago1. De la misma manera, cochaperonas de las Hsp90, como p23, FKBP4 (ambas interaccionando y formando complejos

con Ago2) o Cdc37 (de manera indirecta), también son esenciales en la ruta de RNAi en humanos (Sjögren *et al.*, 2018; Pare *et al.*, 2013).



**Figura 10. Ensamblaje del complejo RISC con la cooperación de las proteínas Hsp90 y Hsc70. A)** Modelo de ensamblaje en plantas, donde se requiere a la proteína Hsp90 para el ensamblaje del complejo. **B)** Modelo de ensamblaje en animales, donde se requiere a las proteínas Hsp90 y Hsc70 para el ensamblaje del complejo. Figura adaptada de Makhnevych y Houry, 2011, y de Iwasaki *et al.*, 2010.

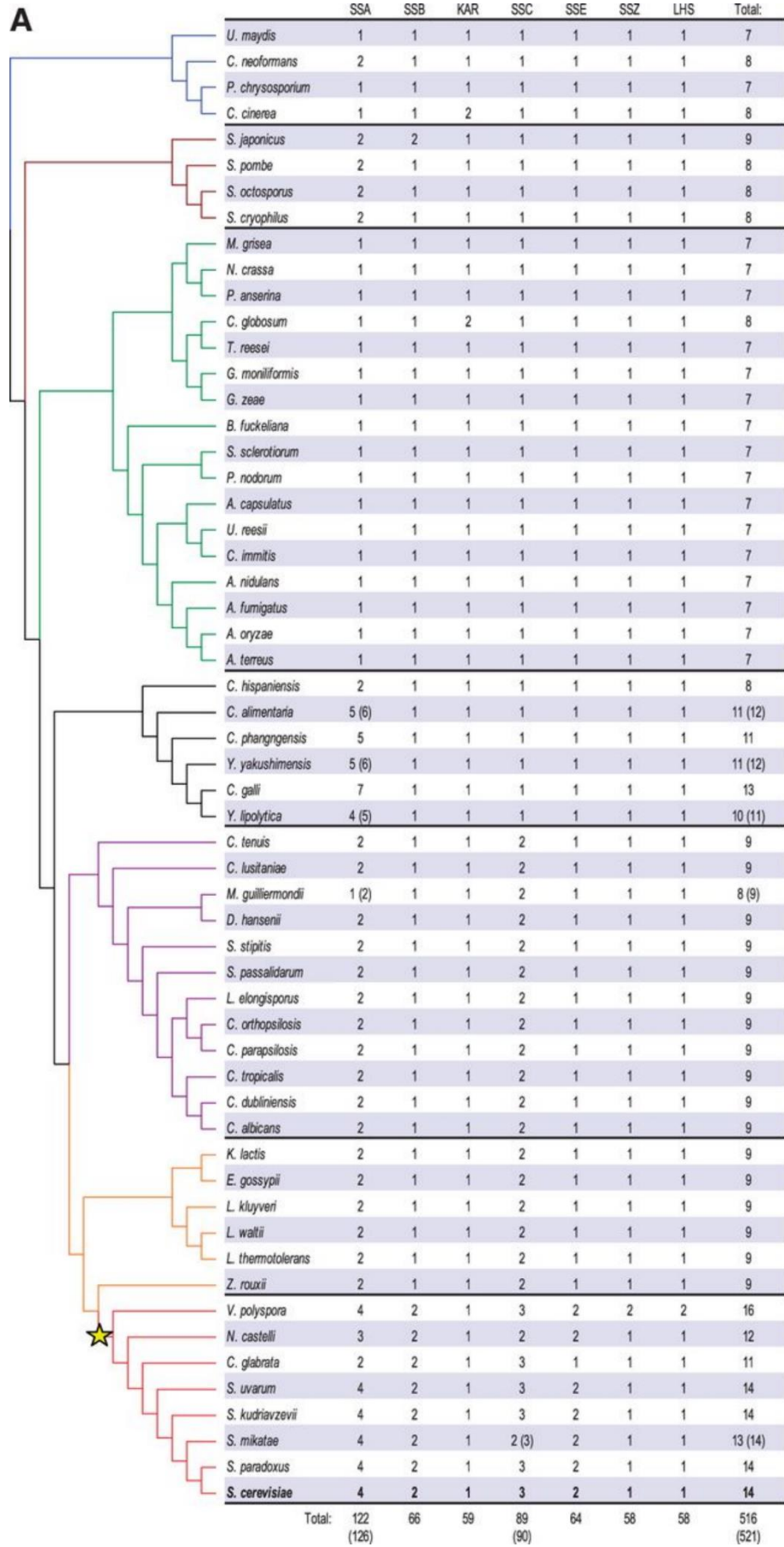
No solamente se han identificado la implicación de estas familias de proteínas con sRNA dependientes de Dicer, sino también con los piRNA, tratándose en este caso de cochaperonas de Hsp70 y Hsp90. La proteína Hop, una cochaperona de *D. melanogaster*, parece tener un papel fundamental en la ruta de los piRNA, ya que los mutantes en Hop presentan la activación de transposones de su genoma debido a la reducción en los niveles de los piRNA (Karam *et al.*, 2017).

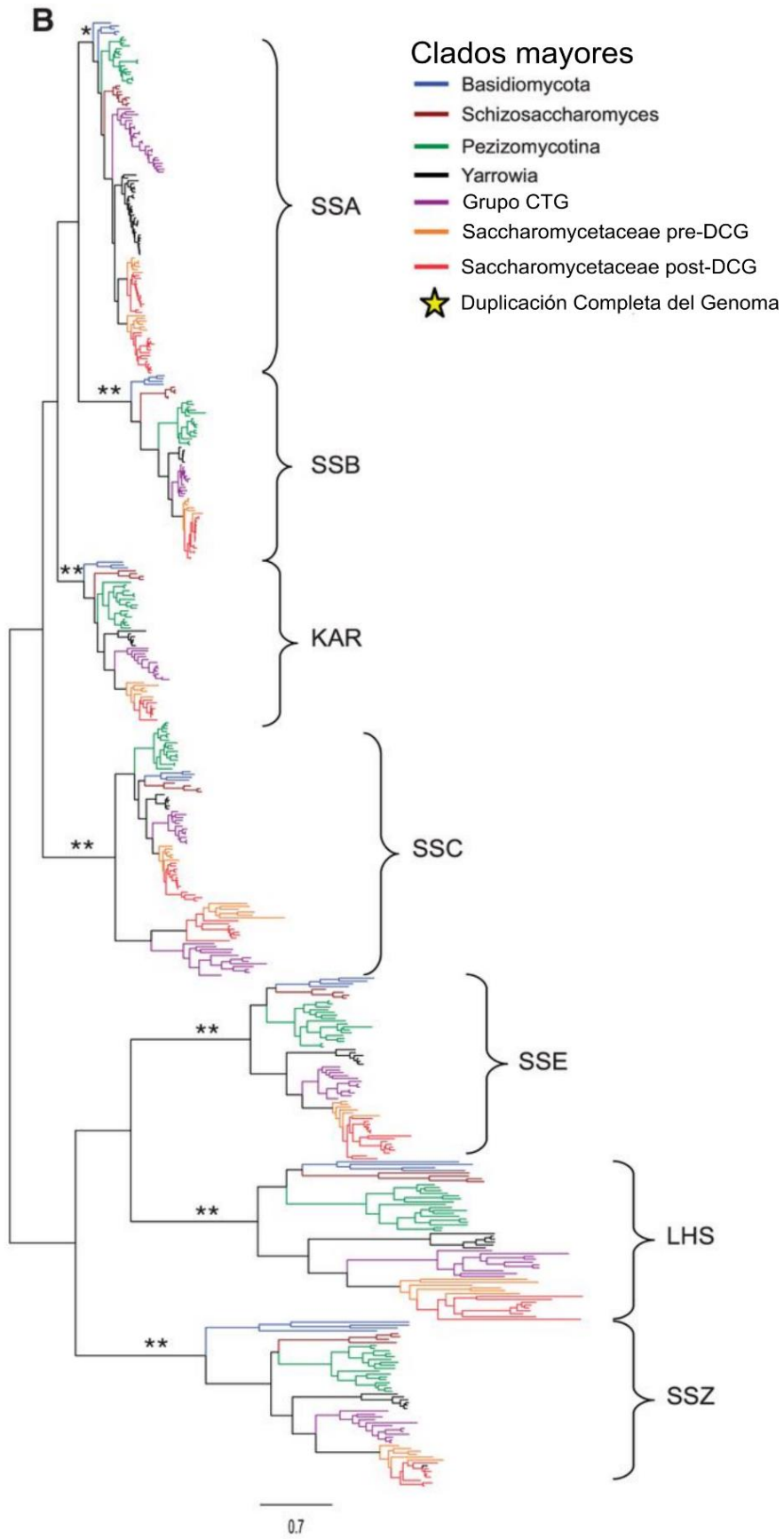
### **I. 3. 2. La familia de las Hsp70: HspA12, la subfamilia más singular**

Dentro del reino de los hongos, *S. cerevisiae* se ha utilizado como modelo para los estudios genómicos de los genes *hsp70*, presentando un total de 14 genes, agrupados en 7 subfamilias (Morano *et al.*, 2012; Kominek *et al.*, 2013).

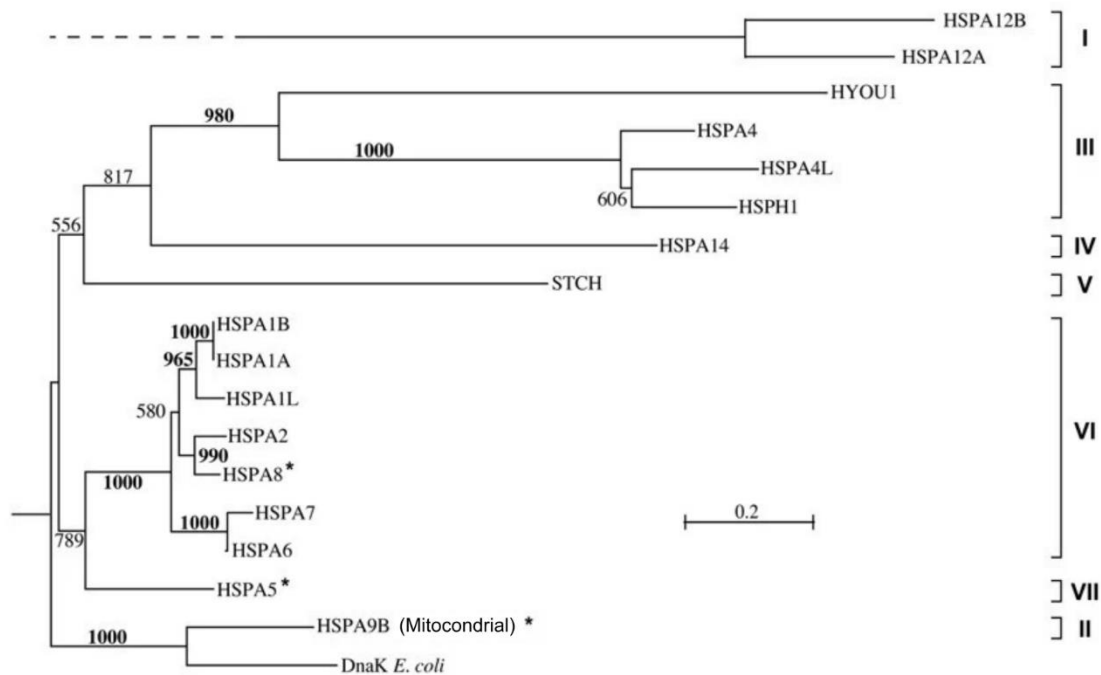
La búsqueda de los genes *hsp70*, utilizando las secuencias de estos 14 genes de *S. cerevisiae*, en 53 genomas de especies del subreino Ascomycota y 4 pertenecientes al Basidiomycota, usados como grupo externo en el análisis, ha permitido la identificación de 491 homólogos en Ascomycota y 30 en los genomas de Basidiomycota (Figura 11). Todos los genomas presentan homólogos para las siete subfamilias de *hsp70* (incluidos los cuatro genomas de Basidiomycota), entre las cuales se distinguen cuatro subfamilias canónicas (KAR, SSA, SSB y SSC) y tres subfamilias atípicas (SSE, SSZ y LHS), las cuales tienen una gran similitud con las canónicas, pero no son capaces de llevar a cabo el proceso de “interacción con” y “liberación de” otras proteínas por sí mismas (Kominek *et al.*, 2013). Estas Hsp70 atípicas adquieren una gran relevancia, ya que interaccionando con Hsp70 canónicas, facilitan este ciclo de unión-liberación de proteínas (Shaner y Morano, 2007). Se cree que los miembros de cada una de estas siete familias, en cada caso, provienen de un único gen ancestral, a partir del cual se han generado los distintos genes de cada una de estas familias (Kominek *et al.*, 2013).

En el caso de los genes *hsp70* de humanos, se encontraron 17 genes distribuidos también en siete grupos (Figura 12). Las proteínas codificadas por estos genes presentan distintas combinaciones de dominios. Por un lado, nueve de ellas (HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8 y HSPA9B) son HSP70 clásicas con dominios NBD y SBD; un segundo grupo formado por seis proteínas (HSPH1, HSPA4, HSPA4L, HSPA14, HYOU1 y STCH) son HSP70s de mayor tamaño, teniendo un peso molecular por encima de 80 kDa, y con extremos carboxi-terminal divergentes; y las otras dos proteínas presentan un peso molecular más bajo y una ausencia total o parcial del dominio SBD. Estas dos proteínas, de estructura peculiar por esta ausencia total o parcial del dominio SBD y con un dominio NBD muy divergente al resto, se denominan HSPA12 (Brocchieri *et al.*, 2008).





**Figura 11. Árbol filogenético de las proteínas Hsp70 de las especies de Ascomycota y Basidiomycota estudiadas.** A) Árbol filogenético de los hongos estudiados y distribución de las proteínas Hsp70 encontradas, tras la búsqueda realizada utilizando las 7 subfamilias de *S. cerevisiae*. Se incluyen las cifras de ortólogos de estas familias y entre paréntesis supuestos ortólogos, donde se incluyen pseudogenes y otros genes afectados por datos de genomas de baja calidad. B) Árbol filogenético de las proteínas Hsp70 identificadas. El color de las ramas muestra la distribución entre los distintos grupos de hongos. \*\**Bootstrap*  $\geq 95$ , \**Bootstrap*  $\geq 70$  (Kominek *et al.*, 2013).



**Figura 12. Árbol filogenético de las 17 proteínas HSP70 humanas, clasificadas en siete grupos.** Se muestran en este árbol las distancias filogenéticas representadas por la longitud de las ramas y su clasificación basadas en un soporte de tipo *bootstrap* (1000 *bootstraps*). Se marcan con un asterisco los genes que han dado lugar a otros pseudogenes (Brocchieri *et al.*, 2008).

El porcentaje de identidad entre las proteínas HspA12a y HspA12b es de un 60% tanto en ratón como en humano, mientras que este porcentaje alcanza más del 90% cuando se comparan las proteínas HspA12a y Hsp12b de ratón con las humanas, mostrando que estos genes están muy conservados desde el punto de vista evolutivo (Han *et al.*, 2003). En un estudio genómico realizado con el objetivo de buscar homólogos para estas proteínas en diferentes especies, de

los genomas utilizados solo se identificaron en *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus tropicalis* y *Gallus gallus*, no encontrándose homólogos en ninguno de los hongos analizados (*Candida glabrata*, *N. crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*) (Brocchieri *et al.*, 2008).

En mamíferos, la subfamilia HspA12 parecen tener una gran importancia en las células endoteliales. La expresión de ambas chaperonas, HspA12a y HspA12b, aumenta en lesiones de aterosclerosis en ratón (Han *et al.*, 2003). En concreto, la subfamilia de chaperonas HspA12b muestra una mayor expresión en células endoteliales que en el resto de tejidos, además de estar implicada en procesos como la angiogénesis y la protección o recuperación frente a respuestas inflamatorias e isquemias en el endotelio (Steagall *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). Esta subfamilia de chaperonas también se ha relacionado con células tumorales del endotelio, ya que su expresión y secreción por parte de estas células parece generar una respuesta de polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 (Zhou *et al.*, 2020).

Por otro lado, la proteína HSPA12A interacciona con SorLA, una proteína implicada en la endocitosis y la localización intracelular de los ligandos a los que se ha unido. Se trata de la primera interacción identificada de la proteína HSPA12A humana, cuya unión afecta a la endocitosis y a la localización subcelular de SorLA (Madsen *et al.*, 2019). El interés en los procesos mediados por SorLA se debe a su posible relación con el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (Rogaeva *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014). También se ha observado un aumento en la presencia de HspA12a en pacientes de esteatosis hepática no alcohólica, además de una reducción de esta afección, de la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1 y de la respuesta inflamatoria en hígado en ratones mutantes para *hspA12a*. Esto convierte a HSPA12A en una posible diana terapéutica para los casos de esteatosis hepática no alcohólica (Kong *et al.*, 2019).

La falta de estudios sobre las funciones y las interacciones de estas chaperonas en otros organismos, como los hongos, hace que guarden un gran interés para la investigación.



#### **I. 4. Objetivos de la tesis**

El objetivo central de esta tesis ha sido la identificación y caracterización de la/s proteína/s que interaccionan con la proteína R3B2 y que, por lo tanto, pueden participar junto a ella en la ruta NCRIP. Este objetivo general se ha estructurado en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de la/s proteína/s que interaccionan con la ribonucleasa R3B2.
2. Comprobación de la participación de esta/s proteína/s en la ruta NCRIP.
3. Caracterización funcional de la/s proteína/s identificadas y su implicación en aspectos como la virulencia o la resistencia a estreses de *M. lusitanicus*.



## II. MATERIALES Y MÉTODOS



## II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados

### II. 1. 1. Estirpes de *M. lusitanicus*

Las estirpes de *M. lusitanicus* que han sido empleadas en este trabajo quedan recogidas en la Tabla 1. El prefijo MU utilizado indica que estas estirpes han sido obtenidas en la Universidad de Murcia y todas ellas provienen de la estirpe, auxótrofa para la leucina y uracilo, MU402, que a su vez deriva de la estirpe R7B, auxótrofa para leucina obtenida por mutagénesis química de la estirpe silvestre CBS 277.49 (Schipper, 1976).

**Tabla 1. Estirpes utilizadas de *M. lusitanicus*.**

Estirpe	Genotipo	Origen o referencia
R7B	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , sexo (-)	Roncero, 1984
NRRL3631	silvestre, sexo (+)	Díaz-Mínguez <i>et al.</i> , 1999
MU402	<i>leuA</i> <sup>-</sup> <i>pyrG</i> <sup>-</sup>	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
MU412	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>r3b2Δ::pyrG</i>	Trieu <i>et al.</i> , 2015
MU413	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>ago1Δ::pyrG</i>	Navarro-Mendoza <i>et al.</i> , 2019
MU419	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>rdrp1Δ::pyrG</i>	Calo <i>et al.</i> , 2012
MU636	<i>leuA</i> <sup>-</sup>	Navarro-Mendoza <i>et al.</i> , 2019
MU901	<i>r3b2Δ::pyrG</i> , <i>carRPΔ::Pzrt1+r3b2</i> <sup>-</sup> +TAP+ <i>leuA</i>	Este trabajo
MU902	<i>r3b2Δ::pyrG</i> , <i>carRPΔ::Pzrt1</i> +TAP+ <i>leuA</i>	Este trabajo
MU903	<i>carRPΔ::Pzrt1+r3b2</i> <sup>-</sup> +TAP+ <i>leuA</i>	Este trabajo
MU904	<i>carRPΔ::Pzrt1</i> +TAP+ <i>leuA</i>	Este trabajo
MU909	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>hspA12aΔ::pyrG</i>	Este trabajo
MU910	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>hspA12aΔ::pyrG</i>	Este trabajo
MU913	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>hspA12aΔ::pyrG</i>	Este trabajo
MU914	<i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>hspA12aΔ::pyrG</i>	Este trabajo

La estirpe 636 se obtuvo por recombinación homóloga del alelo silvestre del gen *pyrG* en su propio locus mutado. Las estirpes MU412 y MU419 se obtuvieron por recombinación homóloga sustituyendo los genes *r3b2* y *rdrp1*,

## II. Materiales y métodos

respectivamente, por el gen *pyrG* en MU402. Además, en las estirpes MU909 y MU910 se sustituyó el gen *hspA12a* también por el gen *pyrG*. Las estirpes MU913 y MU914 se obtuvieron a partir de la estirpe MU909 en ensayos de crecimiento a altas temperaturas (30 °C) por mostrar una reversión al fenotipo silvestre. En referencia a las estirpes relacionadas con la etiqueta TAP, la estirpe MU901 se obtuvo a partir de la estirpe MU412, por sustitución del gen *carRP* por una construcción donde se encontraban el gen *leuA* junto a la versión mutada del gen *r3b2*, fusionado a la etiqueta TAP en su extremo 3' y el promotor de sobreexpresión *Pzrt1*. La estirpe MU902 se obtuvo a partir de la estirpe MU412, por sustitución del gen *carRP* por una construcción donde se encontraban el gen *leuA* junto a la etiqueta TAP y el promotor de sobreexpresión *Pzrt1*. La estirpe MU903 se obtuvo a partir de la estirpe MU636, por sustitución del gen *carRP* por una construcción donde se encontraban el gen *leuA* junto a la versión mutada del gen *r3b2*, fusionado a la etiqueta TAP en su extremo 3' y el promotor de sobreexpresión *Pzrt1*. La estirpe MU904 se obtuvo a partir de la estirpe MU636, por sustitución del gen *carRP* por una construcción donde se encontraban el gen *leuA* junto a la etiqueta TAP y el promotor de sobreexpresión *Pzrt1*.

### II. 1. 2. Estirpes de *E. coli*

Las estirpes de *E. coli* que han sido empleadas durante este trabajo quedan recogidas en la Tabla 2.

La estirpe DH5 $\alpha$  ha sido utilizada en la clonación de plásmidos bacterianos debido a las siguientes características:

- La mutación *recA*<sup>-</sup> propicia que no se produzcan recombinaciones, mejorando así la estabilidad de los plásmidos.

- La mutación en *lacZ* permite utilizar plásmidos que complementen dicha mutación, siendo de utilidad en la diferenciación entre plásmidos con o sin insertos.

- Puede permanecer congelada en estado competente durante extensos periodos de tiempo.

La estirpe BL21 se utilizó para la síntesis de proteínas y las posteriores purificaciones. Esta síntesis de proteínas puede ser controlada por la adición de IPTG al medio. El promotor *lacUV5* es el que controla al gen de la polimerasa T7, encargada de la expresión del gen de interés tras la adición de IPTG al medio.

Las estirpes XL1-Blue MRF' y XLOLR se utilizaron para los procedimientos relacionados con la genoteca de cDNA de *M. lusitanicus* y el doble híbrido de levaduras.

**Tabla 2. Estirpes utilizadas de *E. coli*.**

Estirpe	Genotipo	Origen o referencia
DH5 $\alpha$	<i>F</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>-</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , <i>l</i> .	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	<i>HsdS</i> , <i>gal</i> ( $\lambda$ <i>clts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>LacUV5-T7 gene1</i> )	Díaz-Mínguez <i>et al.</i> , 1999
XL1-Blue MRF'	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lacIq Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet R)</i> ]	Stratagene
XLOLR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lac<sup>P</sup> Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> ], <i>Su<sup>r</sup></i> (no supresora), $\lambda^R$ (resistente a lambda)	Stratagene

### II. 1. 3. Estirpes de *S. cerevisiae*

La estirpe PJ69-4 (*MATa/MAT $\alpha$* , *leu2-3*, *112 ura3-52*, *trp1-901*, *his3-200*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *GAL-ADE2*, *lys2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-LacZ*; James *et al.*, 1996) se utilizó en experimentos de doble híbrido para la búsqueda de proteínas que interaccionaran con R3B2 usando una genoteca de cDNA de *M. lusitanicus* y para los ensayos de interacción entre proteínas concretas. El uso de los dos tipos sexuales (*MATa* y *MAT $\alpha$* ) de esta estirpe permitió realizar experimentos de cruzamiento entre levaduras para el estudio de interacción de proteínas de manera dirigida.

## II. 1. 4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados durante este trabajo se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

Plásmido	Características	Origen o referencia
pACTII	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leu2</i> (doble híbrido de levaduras)	Clontech
pBD-GAL4	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>trp1</i> (doble híbrido de levaduras)	Stratagene
pBluescript II SK +/-	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Stratagene
pGEX-KG	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Amersham
pMAT679	<i>Amp<sup>R</sup></i> , fragmento de 530 pb del gen <i>carB</i> (obtenido de pGCMM20 (Velayos <i>et al.</i> , 2000) y clonado en pBluescript II SK +/- bajo el promotor T7).	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
pMAT688	<i>Amp<sup>R</sup></i> , fragmento de 530 pb del gen <i>carB</i> (igual que en pMAT679, pero en sentido contrario)	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
pMAT1063	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leu2</i> , <i>mcwc1b</i> (pACTII + <i>mcwc1</i> )	Este laboratorio
pMAT1064	<i>Cam<sup>R</sup></i> , <i>trp1</i> , <i>mcwc1b</i> (pBD-GAL4 + <i>mcwc1</i> )	Este laboratorio
pMAT1253	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leuA</i> , <i>carB</i> (repeticiones invertidas del gen <i>carB</i> )	Calo <i>et al.</i> , 2012
pMAT1360	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leuA</i> (vector diseñado para integración de genes en el locus <i>carRP</i> bajo el control del promotor ZRT1)	Este laboratorio
pMAT1511	<i>Cam<sup>R</sup></i> , <i>trp1</i> , <i>qip</i> (pBD-GAL4 + <i>qip</i> )	Vila, 2014
pMAT1604	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leuA</i> , <i>r3b2</i> /C-TAP (vector diseñado para integración del gen <i>r3b2</i> mutado (Trieu <i>et al.</i> , 2015) con la etiqueta C-TAP en el locus <i>carRP</i> bajo el control del promotor del gen <i>zrt1</i> )	Este trabajo
pMAT1605	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leuA</i> , C-TAP (vector diseñado para la integración de la etiqueta C-TAP en el locus <i>carRP</i> bajo el control del promotor del gen <i>zrtr1</i> )	Este trabajo
pMAT1966	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leu2</i> , <i>r3b2</i> (pACTII + <i>r3b2</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
pMAT1973	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>leu2</i> , <i>f18</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pACTII + <i>f18</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
pMAT1974	<i>Cam<sup>R</sup></i> , <i>trp1</i> , <i>f18</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pBD-GAL4 + <i>f18</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021



<b>pMAT1975</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, f14</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pACTII + <i>f14</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
<b>pMAT1976</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, f14</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pBD-GAL4 + <i>f14</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
<b>pMAT1977</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, fct</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pACTII + <i>fct</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
<b>pMAT1978</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, fct</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pBD-GAL4 + <i>fct</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
<b>pMAT1979</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, r3b2</i> (pBD-GAL4 + <i>r3b2</i> )	Cánovas <i>et al.</i> , 2021
<b>pMAT1982</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, qip</i> (pACTII + <i>qip</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1983</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, dcl1</i> (pACTII + <i>dcl1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1984</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, ago2</i> (pACTII + <i>ago2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1985</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, ago1</i> (pACTII + <i>ago1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1986</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, rdrp3</i> (pACTII + <i>rdrp3</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1987</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, rnhA</i> (pACTII + <i>rnhA</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1988</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, rdrp1</i> (pACTII + <i>rdrp1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1989</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, ago3</i> (pACTII + <i>ago3</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1990</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, dcl2</i> (pACTII + <i>dcl2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1991</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, translin</i> (pACTII + <i>translin</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1993</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, rdrp2</i> (pACTII + <i>rdrp2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1994</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, ago1</i> (pBD-GAL4 + <i>ago1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1995</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, ago2</i> (pBD-GAL4 + <i>ago2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1996</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, dcl1</i> (pBD-GAL4 + <i>dcl1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1997</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, rdrp2</i> (pBD-GAL4 + <i>rdrp2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1998</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, ago3</i> (pBD-GAL4 + <i>ago3</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT1999</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, dcl2</i> (pBD-GAL4 + <i>dcl2</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT2000</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, rdrp1</i> (pBD-GAL4 + <i>rdrp1</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT2032</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, rdrp3</i> (pBD-GAL4 + <i>rdrp3</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT2033</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, translin</i> (pBD-GAL4 + <i>translin</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT2036</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, rnhA</i> (pBD-GAL4 + <i>rnhA</i> )	Este laboratorio
<b>pMAT2202</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, fnt</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pBD-GAL4 + <i>fnt</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2203</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, fnt</i> (fragmento del gen <i>r3b2</i> ) (pACTII + <i>fnt</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2204</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, hspA12a</i> (pBD-GAL4 + <i>hspA12a</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2206</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, hspA12a</i> (pACTII + <i>hspA12a</i> )	Este trabajo

## II. Materiales y métodos

<b>pMAT2212</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, hspA12a-gst</i> (pGEX-KG + <i>hspA12a</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2213</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, sbd</i> (dominio SBD de <i>hspA12a</i> )- <i>gst</i> (pGEX-KG + <i>sbd</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2220</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, nbd</i> (dominio NBD de <i>hspA12a</i> ) (pBD-GAL4 + <i>nbd</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2221</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, nbd</i> (dominio NBD de <i>hspA12a</i> ) (pACTII + <i>nbd</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2222</b>	<i>Cam<sup>R</sup>, trp1, sbd</i> (dominio SBD de <i>hspA12a</i> ) (pBD-GAL4 + <i>sbd</i> )	Este trabajo
<b>pMAT2223</b>	<i>Amp<sup>R</sup>, leu2, sbd</i> (dominio SBD de <i>hspA12a</i> ) (pACTII + <i>sbd</i> )	Este trabajo

---

## II. 2. Medios y condiciones de crecimiento

### II. 2. 1. *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio Luria (LB) (Miller, 1972). Este medio se autoclavó antes de utilizarse y su pH se ajustó a 7,2-7,4. Para medios solidos se utilizó el medio LB con agar comercial (Sigma). En caso de que fuera necesario, se añadió al medio autoclavado los antibióticos ampicilina o cloranfenicol, a una concentración final de 100 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Para la síntesis de proteínas en la estirpe BL21 se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Tanto los cultivos líquidos en agitación, como los cultivos en medio sólido, se incubaron a una temperatura de 37 °C, a excepción de las inducciones de síntesis de proteínas con IPTG, realizadas a 26-30 °C.

Las colonias se conservaron en placas Petri a 4 °C para un uso continuado, y a -70 °C en una concentración final de glicerol del 30 % para periodos de tiempo largos.

### II. 2. 2. *M. lusitanicus*

*M. lusitanicus* se cultivó a 26 °C en el medio rico YPG (*yeast extract-peptone-glucose medium*) o en los medios mínimos MMC (*minimal medium with casamino acids*) e YNB (*yeast nitrogen base medium*). El pH de los medios se

ajustó con NaOH o HCl, siendo el pH 4,5 el utilizado para un crecimiento micelial normal, y un pH más ácido (3-3,2) para un crecimiento micelial en forma de colonia. En los medios sólidos, el agar se autoclavó por separado debido a que el pH ácido de los medios afecta su polimerización. Los medios mínimos MMC e YNB se suplementaron con uridina, cuando fue necesario, a una concentración final 200 µg/ml, mientras que el medio YNB se suplementó con leucina, cuando esta se requirió, a una concentración final de 20 µg/ml. Los medios de transformación requirieron sorbitol a una concentración de 0,5 M, para evitar la lisis de los protoplastos por la diferencia de presión osmótica.

La obtención de esporas de *M. lusitanicus* se realizó a partir de cajas Petri donde se crecía micelio a partir de esporas o de trozos de micelio trasplantados. Las cajas se incubaron bajo luz continua a 26 °C y, tras la esporulación, se recogieron las esporas en unos 5 ml de agua destilada. Estas esporas se conservaron a 4 °C para periodos cortos y a -20 °C para periodos de tiempo más prolongados.

Los micelios para la obtención de muestras de proteínas y RNA se obtuvieron a partir de la siembra de  $5 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^5$  esporas por caja (9 cm de diámetro), respectivamente, de medio sólido cubierto con papel celofán. Los micelios se recogieron tras 24 horas de crecimiento en presencia de luz continua.

Para los ensayos de crecimiento a distintas temperaturas  $5 \times 10^3$  esporas por caja se incubaron en oscuridad a 26 °C y 30 °C. Tras 48 horas se seleccionaron colonias de ambas condiciones y se pasaron a una nueva caja, en las mismas condiciones de temperatura, hasta que se produjo la esporulación. Una vez recogidas las esporas de estos individuos, se volvieron a incubar en oscuridad 500 esporas por caja a 26 °C y 30 °C, manteniéndose esta concentración en el resto de pases realizados, salvo en aquellos casos donde el conteo podría requerir la inoculación de  $5 \times 10^3$  esporas por caja, debido al bajo porcentaje de supervivientes. Los datos de estos ensayos fueron representados con RStudio (versión 1.4.1103, Rstudio, Boston, Massachusetts USA, <http://www.rstudio.com/>), utilizando el paquete ggplot2 (Wickham y Chang, 2016). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor  $p$  era  $\leq 0,05$  en una prueba  $t$  de Student de dos colas de muestras desapareadas.

### **II. 2. 3. *S. cerevisiae***

*S. cerevisiae* se cultivó en medio rico YPAD o en medio mínimo SD (*Synthetic Defined*). De este medio SD se eliminaron determinados componentes para la selección de individuos: triptófano (W), leucina (L), histidina (H) y adenina (A). Cuando la histidina se eliminó del medio, se añadió a este 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), a concentraciones entre 1 mM, para los ensayos realizados con la genoteca, y 2,5 mM para el resto de los ensayos. El 3-AT es un antimetabolito de la histidina, necesario para evitar que la expresión basal del gen *his3* permita el crecimiento de la levadura, evitando así falsos positivos. Los medios se autoclavaron antes de su uso. El triptófano esterilizado por filtración se añadió al medio después de ser autoclavado. Para los medios sólidos se añadieron 20 g/L de agar, que se autoclavó por separado.

Las levaduras transformadas con los distintos plásmidos se conservaron en cajas Petri a 4 °C para un uso continuado, y a -70 °C, en una concentración final de glicerol del 25 %, para periodos de tiempo largos.

## **II. 3. Tampones y reactivos**

### **II. 3. 1. Manipulación del DNA**

#### TAE 50x:

-Tris (2 M)

-Ácido acético (5,71 %)

-EDTA (0,05 M)

#### Tampón de carga para electroforesis 10x:

-Azul de bromofenol (0,25 %)

-Sacarosa (40 %)

### **II. 3. 2. Extracción de DNA de *M. lusitanicus***

#### TE:

-Tris-HCl (pH 8,0; 10 mM)

-EDTA (pH 8,0; 1 mM)

#### Tampón de lisis:

-Tiocianato de guanidina (4M)

-Tris-HCl (pH 7,0; 50 mM)

-EDTA (20 mM)

-Triton X-100 (0,1 %)

-RNAsa A (50 µg/ml)

#### Tampón de unión de DNA:

- Tiocianato de guanidina (4M)

-Tris-HCl (pH 7,0; 50 mM)

-EDTA (20 mM)

-Partículas de sílice (20 mg/ml)

#### Tampón de lavado:

-NaCl (200 mM)

-EDTA (10 mM)

-Tris-HCl (pH 7.4; 50 mM)

-Etanol (50 %)

### **II. 3. 3. Tampones para la transformación de *M. lusitanicus***

#### Tampón fosfato-sorbitol:

- Fosfato sódico (pH 6,5; 10 mM)
- Sorbitol (0,5 M)

### **II. 3. 4. Tampones para la manipulación de levaduras**

#### Tampón de transformación de levaduras (TE-LiAc-PEG):

- Tris-HCl (pH 7,5; 10 mM)
- EDTA (1 mM)
- C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>LiO<sub>2</sub> (pH 7,5; 100 mM)
- Polietilenglicol (PEG) 3350 (40 %)

#### Tampón de lisis de levaduras:

- Tris-HCl (pH 8,0; 50 mM)
- LiCl (2,5 M)
- EDTA (62,5 mM)
- Tritón X-100 (4 %)

### **II. 3. 5. Manipulación de proteínas**

#### Tampón de unión de la etiqueta Glutación-S-transferasa (GST):

- NaCl (140 mM)
- KCl (2,7 mM)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,8 mM)

-pH 7,3

Tampón de elución de GST:

-Tris-HCl (pH 8,0; 50 mM)

-Glutación reducido (10 mM)

Tampón de diálisis:

-Tris-HCl (pH 8,0; 20 mM)

-EDTA (1 mM)

-DTT (1 mM)

-Glicerol (10 %)

Tampón de unión de TAP:

-Tris-HCl (pH 8,0; 10 mM)

-NaCl (150 mM)

-NP40 (0,1 %)

-EDTA (0,5 mM)

Tampón de elución de TAP:

-Tris-HCl (pH 8,0; 10 mM)

-NaCl (150 mM)

-NP40 (0,1 %)

-EDTA (0,5 mM)

-DTT (1 mM)

## II. Materiales y métodos

-Proteasa AcTEV™ (Invitrogen) (10 unidades/ml)

### Tampón de unión a calmodulina:

-Tris-HCl (pH 8.0; 10 mM)

-NaCl (150 mM)

-NP40 (0,1 %)

-β-mercaptoetanol (10 mM)

-CaCl<sub>2</sub> (2 mM)

-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>MgO<sub>4</sub> (1 mM)

-Imidazol (1 mM)

### Tampón de elución de calmodulina:

-Tris-HCl (pH 6,8; 50 mM)

-Glicerol (10 %)

-SDS (3 %)

-β-mercaptoetanol (3 %)

-Azul de bromofenol (0,3 %)

-EGTA (2 mM)

### Tampón de electroforesis (10x):

-Tris (0,5 M)

-Glicina (1,92 M)

-SDS (1 %)

-pH 8,3



Gel condensador (6 %):

- Tris-HCl (pH 6,8; 0,125 M)
- SDS (0,1 %)
- Acrilamida/bisacrilamida - 37, 5:1 (6 %)
- APS (0,2 %)
- TEMED (0,2 %)

Gel separador (10 %):

- Tris-HCl (pH 6,8; 0,75 M)
- SDS (0,1 %)
- Acrilamida/bisacrilamida - 37, 5:1 (10 %)
- APS (0,2 %)
- TEMED (0,1 %)

Tampón de carga (5x):

- Tris-HCl (pH 6,8; 0,3 M)
- SDS (7 %)
- Glicerol (50 %)
- Azul de bromofenol (0,5 %)
- $\beta$ -mercaptoetanol (17,5 %)

**II. 3. 6. Ensayos de actividad RNasa**

Tampón de reacción Weinberg 5x:

- Tris-HCl (pH 7,4; 1 M)

## II. Materiales y métodos

-NaCl (2 M)

-MgCl<sub>2</sub> (0,5 M)

-DTT (1 M)

-EDTA (50 mM)

### II. 4. Transformación de *E. coli*

Para llevar a cabo la transformación de *E. coli* las células deben estar en un estado competente, que permita la introducción de DNA. Para ello, se realizó el protocolo de obtención de células competentes con cloruro cálcico con las estirpes DH5 $\alpha$  y BL21. Posteriormente, se realizó la transformación de estas células mediante choque térmico (Sambrook y Russell, 2001).

En el caso particular de las transformaciones de *E. coli* con DNA plasmídico extraído de *S. cerevisiae*, el método utilizado fue la electroporación con las muestras de DNA dializadas con agua bidestilada (Sambrook y Russell, 2001). Las transformaciones se realizaron en cubetas de electroporación de 1 mm (Fisher Scientific) en un electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros eléctricos: 1,7 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ .

### II. 5. Transformación de *S. cerevisiae*

El protocolo utilizado para la transformación de levaduras fue el protocolo del acetato de litio y PEG 3350 descrito por Gietz *et al.* (1995) y modificado por Vila (2014), realizándose la incubación de las levaduras a 200 r.p.m. En las transformaciones con la genoteca de cDNA de la estirpe CBS277.49 de *M. lusitanicus* (Silva *et al.*, 2006), se utilizó una cantidad de DNA de 500-1000 ng/ $\mu$ l por transformación, realizándose un total de 26 transformaciones de una estirpe de levaduras que ya poseían el plásmido pMAT1979 que expresa la proteína R3B2 fusionada al dominio de unión al DNA (BD) de GAL4.

## II. 6. Obtención de estirpes diploides de *S. cerevisiae* para los ensayos de doble híbrido

Las estirpes diploides para analizar la interacción entre dos proteínas concretas se obtuvieron inoculando en el mismo punto de cajas de medio YPAD dos gotas (2 µl), una de un cultivo de una estirpe que expresaba una de las proteínas fusionada al dominio BD de GAL4 y la otra de un cultivo de una estirpe de sexo opuesto que expresaba la segunda proteína fusionada al dominio de activación (AD) de GAL4. En este proceso, las placas se dividieron utilizando cuadrículas, de modo que en cada cuadrado se colocaron las levaduras de ambos sexos, cada una expresando una de las proteínas de interés. Una vez que las gotas con las levaduras quedaron secas a temperatura ambiente, se incubaron a 30 °C durante 24 horas. A continuación, se recogió la colonia formada (cruzamiento) de cada cuadrícula con un palillo estéril y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. De esta suspensión de células se inocularon gotas de 2 µl en medio selectivo SD-WL, donde solo pueden crecer las células que poseen los dos plásmidos seleccionados y, por lo tanto, son el resultado de un cruzamiento. Tras incubarlas durante 48 horas a 30 °C, se recogió la masa celular de cada uno de los cruzamientos con un palillo estéril y se resuspendió en 50 µl agua destilada para, posteriormente, depositar gotas de 2 µl en los distintos medios selectivos (SD-WL, SD-WLH con 2,5mM de 3-AT y SD-WLA). Estas cajas se incubaron a 30 °C y se observó su crecimiento durante los cinco días siguientes.

## II. 7. Transformación de *M. lusitanicus*

La transformación de *M. lusitanicus* fue llevada a cabo por electroporación (Gutiérrez *et al.*, 2011) de protoplastos obtenidos a partir de la incubación de esporas con la enzima quitosanasa (van Heeswijck, 1984). La eliminación de la pared celular de las esporas permite la incorporación de DNA exógeno, el cual es integrado por los mecanismos propios del hongo mediante recombinación homóloga.

## II. Materiales y métodos

Para llevar a cabo la transformación, se inocularon  $25 \times 10^7$  esporas de la estirpe que se quiere transformar en 50 ml de medio YPG pH 4,5. Estas esporas se dejaron en oscuridad durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente las esporas se incubaron durante 3 o 4 horas a 26 °C y 250 r.p.m. para promover la germinación. Cuando la mayoría han germinado, se centrifugaron 5 minutos a 91 xg. Una vez eliminado el sobrenadante, se lavaron las esporas en 10 ml de tampón fosfato-sorbitol, para dejarlas de nuevo en 10 ml de este tampón con 10 mg de enzimas de lisis de *Trichoderma harzianum* (Sigma) y 0,6 µl de quitosanasa de *Streptomyces sp.* (Sigma). Se incubaron las esporas 90 minutos a 60 r.p.m. y 30 °C para digerir su pared. Se realizaron dos lavados con sorbitol 0,5 M frío y se resuspendieron los protoplastos en un volumen final de 1,6 ml de sorbitol 0,5 M frío. Para la mezcla de transformación se utilizaron 200 µl de protoplastos y un mínimo de 3 µg de DNA. Se incorporaron a una cubeta de electroporación de 2 mm (Fisher Scientific) y se les dio un pulso eléctrico en un electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros: 0,8 KV, 25 µF de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω. Tras el pulso, se añadió 1 ml de YPG con sorbitol al 0,5 M frío, para incubarlas en tubos eppendorf durante 1 hora a 150 r.p.m. y 26 °C. Los protoplastos se centrifugaron a 110 xg durante 5 minutos, para resuspenderlos entonces en 400 µl de YNB con sorbitol al 0,5 M. Para terminar, se sembraron 200 µl por placa en medio YNB pH 3 con sorbitol al 0,5 M. Se mantuvieron en oscuridad a 26 °C durante 3 o 4 días, cuando ya comenzaron a aparecer transformantes.

### II. 8. Ensayo de germinación de *M. lusitanicus*

Para llevar a cabo el ensayo de germinación de esporas de *M. lusitanicus*, se inocularon  $25 \times 10^7$  esporas en 50 ml de medio YPG pH 4,5. Este cultivo se mantuvo en oscuridad a 4 °C toda la noche, y a la mañana siguiente se incubó 4 horas en agitación (250 r.p.m.), a temperaturas de 26 °C, 28 °C y 30 °C. La germinación de las esporas se analizó a las 2, 3 y 4 horas.

## II. 9. Manipulación de DNA

### II. 9. 1. Aislamiento de DNA de *M. lusitanicus*

En la purificación de DNA genómico de *M. lusitanicus* se siguieron distintos procedimientos según el propósito del experimento.

Para las comprobaciones por PCR de la integración de DNA en el genoma de transformantes, se realizó un aislamiento de DNA mediante microondas, descrito por Dörnte y Kües (2013). Este procedimiento se llevó a cabo incorporando un fragmento de micelio de 1 mm<sup>2</sup> en eppendorf con 200 µl de TE, y realizando dos pulsos de 1 minuto a 700 W en microondas (Samsung M171N), separados por 30" durante los que se voltearon las muestras suavemente. Finalmente, se centrifugaron los tubos eppendorf a 2.300 xg durante 5 minutos con el objetivo de eliminar restos de micelio del sobrenadante.

Las muestras para secuenciación masiva del genoma se prepararon siguiendo un protocolo de extracción y purificación de DNA con fenol/cloroformo. Para ello, 500 mg de micelio de cada estirpe de *M. lusitanicus* se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido. Al polvo resultante se añadió 1 ml de TE, 1 ml de fenol y 100 µl de RNAsa A (Sigma, 10 mg/ml). Después de agitarlo suavemente durante 1 minuto, se realizó una centrifugación de 2 minutos a 1.780 xg. Se recogió la fase acuosa, se añadió un volumen de la mezcla (1:1) de fenol y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y posteriormente se centrifugó durante dos minutos a 9.160 xg. Este último paso se repitió 2 veces. Se realizó un lavado con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó dos minutos a 9.160 xg. Se recogió la fase acuosa y se añadió 0,1 volúmenes de AcNH<sub>4</sub> 5M y 1 ml de etanol frío. Se agitó lentamente y se centrifugó a 9.160 xg. El pellet de DNA formado se lavó con 1 ml de etanol al 80 % y se repitió la centrifugación. Se secó el precipitado durante 10 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente, resuspenderlo en 100 µl de agua bidestilada estéril.

Por último, el resto de los ensayos de aislamiento de DNA se llevó a cabo por un método de unión del DNA a sílice (Nicolás *et al.*, 2018). Las centrifugaciones que se llevaron a cabo con la sílice unida al DNA, el tampón de

## II. Materiales y métodos

lavado y la acetona, fueron sustituidas por el uso de columnas construidas con puntas de 1000 µl y la ayuda del émbolo de una jeringa para permitir el paso del sobrenadante por el filtro.

### II. 9. 2. Aislamiento de DNA de *E. coli*

El aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, cuando no se requería una gran pureza, se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Holmes y Quigley (1981). Estas muestras de DNA se utilizaron para analizar los transformantes obtenidos en experimentos de ligación. En el resto de los ensayos, como la obtención de DNA plasmídico para la transformación de *M. lusitanicus*, *S. cerevisiae* u otras estirpes de *E. coli*, o su secuenciación, las preparaciones de DNA se obtuvieron utilizando el sistema comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific).

### II. 9. 3. Aislamiento de DNA de *S. cerevisiae*

El DNA plasmídico de *S. cerevisiae* se purificó con un procedimiento con fenol/cloroformo (Ward *et al.*, 1990). 1,5 ml de un cultivo de *S. cerevisiae* crecido en medio selectivo durante 16 horas se centrifugó en un tubo eppendorf a 15.000 xg durante 20 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis de levadura, se añadió un volumen de fenol/cloroformo y 0,2 g de bolas de cristal de 425-600 micrones (Sigma). La solución se agitó en un agitador vórtex durante 2 minutos y después se centrifugó durante 1 minuto a 15.000 xg. Se recogió la fase acuosa, se precipitó el DNA con etanol, se secó a 37 °C y se resuspendió en 30 µl de TE.

### II. 9. 4. Técnicas electroforéticas

Con el objetivo de caracterizar las distintas preparaciones de DNA, como plásmidos, fragmentos obtenidos por digestión o productos de PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa). Estos geles variaban en su concentración de agarosa desde 0,7 %, la concentración usada de manera estándar, hasta 2 %, en el caso de la caracterización de los fragmentos más

pequeños (menos de 500 pb). El compuesto elegido para observar el DNA bajo luz ultravioleta fue bromuro de etidio, usado a una concentración final de 0,5 µg/ml. Para caracterizar el tamaño de fragmentos lineales y la concentración de las muestras de DNA, se utilizaron los marcadores *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific) y λ DNA/HindIII (Thermo Scientific), respectivamente.

La purificación de muestras de DNA a partir de geles de agarosa se realizó con el sistema comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific). Para ello, los fragmentos de interés se recortaron del gel para, posteriormente, continuar con el protocolo recomendado por el fabricante.

### **II. 9. 5. Tratamiento de DNA con enzimas**

Durante este trabajo se realizaron tres tipos de tratamientos de DNA con enzimas, siguiendo las instrucciones del fabricante:

-Digestión: se realizaron digestiones con enzimas de restricción (Thermo Fisher) para tareas como la generación de plásmidos recombinantes y la caracterización de moléculas de DNA, entre otras.

-Defosforilación: para evitar la autoligación de vectores de clonación, se realizó la defosforilación del extremo 5' de las cadenas de DNA con la fosfatasa alcalina FastAP (Thermo Fisher).

-Ligación: las ligaciones de fragmentos de DNA se realizaron en volúmenes de 20 µl durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando la ligasa de DNA de T4 (Thermo Fisher).

En aquellas ocasiones que se requería, las enzimas eran inactivadas por calor, siguiendo las condiciones del suministrador.

### **II. 9. 6. Amplificación de DNA por PCR**

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con la enzima Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent). Las muestras de DNA se incubaron con la enzima en las condiciones recomendadas por el fabricante durante 3 minutos a

## II. Materiales y métodos

98 °C, seguido por un número de ciclos variable de desnaturalización (30 segundos a 98 °C), alineamiento con los cebadores (30 segundos a una temperatura dependiente de la T<sub>m</sub> de los cebadores) y elongación (30 segundos por kilobase que se quiera amplificar a 72 °C). Una vez acabados los ciclos, se mantuvo la temperatura de elongación durante 2 minutos adicionales.

Cabe destacar el uso de la técnica de PCR de fusión, utilizada para la unión de distintos fragmentos de DNA y su amplificación como un único fragmento. Para realizarla, se añadió a la reacción de PCR los fragmentos de DNA que se quieren fusionar, que deben solapar en sus extremos, y los cebadores que hibridan con los dos extremos más externos del fragmento fusionado. A la reacción de PCR, se añadieron pasos adicionales para hacer más lentos los cambios de temperatura y para incrementar el tiempo de elongación 10 segundos en cada ciclo en los 25 últimos ciclos.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR, RT-qPCR y secuenciaciones.** Las secuencias marcadas en rojo y verde representan puntos de corte de enzimas de restricción.

Oligonucleótido	Secuencia
CTAP R3B2 Fow1	CCA ACTGGAACAATCTGATCATGGAGAAGCGCCGCTGGAAG
CTAP Rev2-BsiWI	CACGTG <b>CGTACG</b> TCAGGTGGACTTCCCCGCGG
CTAP For2XmaJI	CTCGAG <b>CCTAGG</b> CATGACAGACACGGACACTG
R3B2 RevX	GATCAGATTGTTCCAGTTGG
CTAP Fow XmaJI	CTCGAG <b>CCTAGG</b> CATGGAGAAGCGCCGCTGGAAG
CarRP4	AAGAGCTTGTGCGACTATTTAGATTTCTCATTTTTCC
ZRT1-F5	CAAGAGAAGGCTTTACTGTTCC
pACTII Rev	CACGATGCACAGTTGAAGTG
GA44-AD	TACCACTACAATGGATG
R3B2-FowY-NcoI	CGGC <b>CCATGG</b> CCATGACAGACACGGACACTG
R3B2-Rev5-XhoI	TGATG <b>CTCGAG</b> AATTCTAACTATCCCCACTCCAATC
R3B2-FowY-XhoI	CGGC <b>CTCGAG</b> CCATGACAGACACGGACACTG
R3B2-Rev5-NsiI	TGATG <b>ATGCAT</b> AATTCTAACTATCCCCACTCCAATC
NBD-Chap-Fow	GCTATG <b>CCCGGGGGAATTC</b> ATGATAGGCATCAAGGACAA
NBD-Chap-Rev	GCTATG <b>GAGCTCGTCGAC</b> CTAGCCCAAATAGACAGCAC
FF-Chap-Fow	GCTATG <b>CCCGGGGGAATTC</b> AATCCACGGGTCATTACATC



<b>FF-Chap-Rev</b>	GCTATG <b>GAGCTCGTCGAC</b> CTCAAGTTGATGTGGCTTCCT
<b>BDG4-Fow</b>	ATAAGTGCGACATCATCATCG
<b>T7 promoter</b>	TAATACGACTCACTATAGG
<b>Chap UFow (EcoRI)</b>	GTACAA <b>GAATTC</b> TGTGATGTTTGGGTATTTTCG
<b>Chap URev (<i>pyrG</i>)</b>	CAAGTACCAATGCTGAGGCAGTTCTTTCACTTGCTGTGTA
<b>Chap DFow (<i>pyrG</i>)</b>	CGATAGCATGGCCAGTGTACCTCCTAACCTGCAATCCTTA
<b>Chap DRev (HindIII)</b>	TACAGC <b>AAGCTT</b> CCAAGAGACGCCAAGAAGAT
<b>pyrGFow2kb</b>	TGCCTCAGCATTGGTACTTG
<b>pyrGRev2Kb</b>	TGCCTCAGCATTGGTACTTG
<b>Ext Fow Chap 2</b>	GCAGCATCTCTCATGATTTGC
<b>DRev Chap Interno</b>	GGTTGCGTAGTACCTCATGC
<b><i>pyrG</i>-R2</b>	ATCCCACCAGAAGGAGTACATGG
<b>Fow FF Chap EcoRI</b>	GTGGTG <b>GAATTC</b> TAATGAATCCACGGGTCATTACATC
<b>Chap Rev HindIII</b>	GCTTAT <b>AAGCTT</b> TCAAGTTGATGTGGCTTCCTCG
<b>Chap Fow EcoRI</b>	ATAGTG <b>GAATTC</b> TAATGATAGGCATCAAGGACAAC
<b>STU</b>	GTTGTAAAACGACGGCCAGT
<b>pMAT679-Rev1</b>	AACTAGTGGATCTCTGGAG
<b>pMAT688-Rev1</b>	ATGTCCAAGAAACACATTG
<b>qPCR-EF1-Fow</b>	GTCCGTGATATGCGTCAAACC
<b>qPCR-EF1-Rev</b>	AGCGGCCTTGGTGACCTTAC
<b>RVTFw</b>	GCTCTAATCAACTGGCTATGGC
<b>RVTRv</b>	ATGAGCAGGTGAGGAGCATC
<b>qPCR Dehyd Fow</b>	AACTGCCACAACAACATGCG
<b>qPCR Dehyd Rev</b>	CAGAGTCATTGGCGAGGTCA
<b>qPCR ChapF</b>	CGGCCATGAACAACCTGATG
<b>qPCR ChapR</b>	CAAGCTGATGGAGACTGGCA

### II. 9. 7. Secuenciación de DNA

Las muestras de DNA, tanto productos de PCR como plásmidos, se secuenciaron en el Servicio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la

Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los plásmidos fueron aislados con el *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher), los fragmentos obtenidos a partir de gel con el *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher) y aquellos purificados directamente de la reacción de PCR con el *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La secuenciación del DNA genómico de *M. lusitanicus* se realizó por el mismo servicio de la Universidad de Murcia, usando un equipo de secuenciación masiva (MiSeq System de Illumina) con una profundidad de secuenciación 100x y una longitud de lectura de 500 pares de bases (lecturas pareadas, 2x250).

## II. 10. Análisis de las secuencias de DNA genómico

Las lecturas de DNA genómico obtenidas del sistema de Illumina se mapearon contra el genoma de referencia de *M. lusitanicus* (*Mucor lusitanicus* CBS277.49 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>), utilizando la plataforma web de Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Posteriormente, estas lecturas que mapearon se analizaron con el paquete CLC Genomics Workbench 20.0 (<https://digitalinsights.qiagen.com>). En este programa se realizó la búsqueda de variantes sencillas (SNVs), InDels y variantes estructurales en las estirpes analizadas, descartándose las variantes que estaban presentes en la estirpe parental. De estas, se seleccionaron como candidatas a causar el fenotipo las variantes que estaban en genes o a menos de 500 pb, en el caso de las estructurales, o 200 pb para el resto (SNVs e InDels). Además, en ambos casos, se consideraron solo aquellos cambios que estaban presentes al menos en el 50 % de lecturas realizadas de esa región.

Para identificar los genes adyacentes a los genes de la familia *hspA12*, se utilizaron las plataformas web del JGI, en el caso de *M. lusitanicus* (*Mucor lusitanicus* CBS277.49 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) y *Phycomyces blakesleeanus* (*Phycomyces blakesleeanus* NRRL1555 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phybl2/Phybl2.home.html>) (Corrochano *et al.*, 2016), y del NCBI, en el caso de *Xiphophorus maculatus* (*Xiphophorus maculatus*

5.0; [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_002775205.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002775205.1/)). Se indican a continuación las IDs de los genes representados en el contexto genómico de los genes *hspA12* en las diferentes especies. *M. lusitanicus*: [18040](#), [112211](#) y [112212](#). *P. blakesleeanus*: [145255](#), [145256](#), [145257](#), [145259](#), [145260](#), [145262](#) y [145263](#). *X. maculatus*: [102217811](#), [102218061](#), [102218324](#), [111609290](#), [111609291](#), [111609292](#), [111609293](#) y [111609294](#).

Para la búsqueda de secuencias en *M. lusitanicus* con similitud a una dada, se utilizó la herramienta Blast de la plataforma web del JGI (Nordberg *et al.*, 2014).

## II. 11. Búsqueda y análisis de proteínas HspA12

Para la selección de los organismos con un mayor número de proteínas HspA12 se realizó una búsqueda de proteínas homólogas a la HspA12a de *M. lusitanicus* en la base de datos de ENSEMBL, utilizando el servidor web de HMMER (Potter *et al.*, 2018). La búsqueda de proteínas HspA12, para la posterior identificación de los genes de los que provenían, se realizó utilizando las herramientas Blastp de la plataforma web del NCBI (Altschul *et al.*, 1997) y de la plataforma web del JGI (Nordberg *et al.*, 2014). Se descartaron aquellas secuencias inferiores a 300 aminoácidos porque el dominio NBD de HspA12a de *M. lusitanicus* posee una secuencia cercana a 400 aminoácidos. De las seleccionadas, se escogieron aquellas que mostraban un porcentaje de cobertura con la HspA12a de *M. lusitanicus* superior al 70 % a lo largo de toda la secuencia de la proteína y un 90 % con el dominio NBD, menos variable que el resto de la proteína, además de un mínimo de 23 % de similitud de secuencia. Con las secuencias de aquellas proteínas que no lograban alcanzar dichos porcentajes, se realizó una búsqueda por Blastp. Esta búsqueda sirvió para comprobar si estas proteínas tenían una alta homología con otras proteínas HspA12 y, si realmente las proteínas con las que guardaban una mayor homología eran HspA12, eran incluidas como proteínas de esta subfamilia.

El árbol filogenético con las especies seleccionadas se realizó en la plataforma web de Phylotastic (Stoltzfus *et al.*, 2013) y editado y visualizado con

la plataforma web de iTOL (Letunic y Bork, 2019). Este árbol se modificó teniendo en cuenta las clasificaciones de hongos más recientes (Spatafora *et al.*, 2016).

## II. 12. Construcción de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos de las Hsp70 se realizaron a partir de secuencias de las proteínas de *M. lusitanicus*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. En el caso de *M. lusitanicus*, las secuencias fueron obtenidas de la plataforma web del JGI: [80053](#), [80055](#), [80057](#), [83220](#), [106618](#), [108439](#), [112211](#), [112212](#), [112382](#), [113249](#), [116055](#), [116289](#), [116296](#), [183759](#), [31506](#), [76134](#), [88941](#), [90308](#), [143123](#), [146440](#), [177367](#), [185951](#), [187297](#), [189067](#) y [189295](#) (Corrochano *et al.*, 2016). Las secuencias de proteínas de *H. sapiens* fueron obtenidas de la plataforma web del NCBI: [NP\\_005336.3](#), [NP\\_005337.2](#), [NP\\_005518.3](#), [NP\\_006635.2](#), [NP\\_001374860.1](#), [NP\\_002145.3](#), [NP\\_055093.2](#), [NP\\_005338.1](#), [P48741.2](#), [NP\\_006588.1](#), [AAH30634.1](#), [NP\\_079291.2](#), [NP\\_443202.3](#), [NP\\_008879.3](#), [NP\\_057383.2](#), [NP\\_001124463.1](#). Para *S. cerevisiae*, las secuencias fueron obtenidas también de la web del NCBI: [NP\\_009396.2](#), [NP\\_013076.1](#), [NP\\_012579.1](#), [NP\\_010052.1](#), [NP\\_012500.3](#), [NP\\_014190.1](#), [NP\\_009478.1](#), [NP\\_011029.3](#), [NP\\_013473.1](#), [NP\\_012850.1](#), [NP\\_010884.1](#), [NP\\_015219.1](#), [NP\\_009728.1](#) y [NP\\_011931.2](#) (Goffeau *et al.*, 1996). El alineamiento se llevó a cabo con MUSCLE (Edgar, 2004) y la construcción del árbol se realizó a partir de 1000 repeticiones (*bootstraps*) (Felsenstein, 1985) por el método de unión de vecinos (*Neighbor joining*) (Saitou y Nei, 1987). Para el cálculo de las distancias evolutivas se usó el método basado en matrices de Jones-Taylor-Thornton (JTT) (Jones *et al.*, 1992). Todo el proceso realizó en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

## II. 13. Manipulación de RNA

### II. 13. 1. Aislamiento de RNA de *M. lusitanicus*

El aislamiento de RNA a partir de micelio de *M. lusitanicus* se realizó mediante el método rápido del TRIzol (Thermo Fisher), descrito por Vila (2014). El RNA se resuspendió en 50 µl de agua de biología molecular.

## II. 13. 2. Síntesis de cDNA a partir de RNA y PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

Previamente a la síntesis de cDNA, se realizó un tratamiento con DNasa, utilizando la enzima *TURBO™ DNase* (Invitrogen) para eliminar cualquier traza de DNA. Para ello, las muestras (5 µg de RNA) se incubaron con 4 U de la Turbo DNasa, en presencia del inhibidor de RNasas *SUPERase-In™ RNase Inhibitor* (Invitrogen), durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo bajando la temperatura a 4 °C y añadiendo 7,5 µl de EDTA 50 mM para, a continuación, inactivar la enzima mediante calor (10 minutos a 75 °C).

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando 1 µg de RNA total por cada reacción. Para confirmar la ausencia de DNA en las muestras de RNA y que la retrotranscripción había funcionado correctamente, se realizaron PCR de comprobación de las muestras de RNA y de cDNA utilizando los cebadores para la secuencia de interés con el preparado de PCR Megamix 2MM-5 (Microzone).

La PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR o *quantitative reverse transcription PCR*) se llevó a cabo con el sistema de PCR a tiempo real de QuantStudio™, utilizando 2x *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 300 nmoles de cada cebador (Tabla 2.4.). Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen de 10 µl siguiendo estas condiciones: 10 minutos de activación de la polimerasa a 95 °C, 40 ciclos consistentes en 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minuto a 60 °C (alineamiento y elongación). Se realizaron tres réplicas de cada muestra y de un control sin DNA. Las eficiencias de todos los cebadores utilizados fueron similares, por lo que la expresión génica se obtuvo por el método de delta CT ( $\Delta\Delta CT$ ), normalizando respecto a la expresión del factor de elongación 1 (*ef-1*).

Los datos de los ensayos de RT-qPCR fueron representados con RStudio (versión 1.4.1103, Rstudio, Boston, Massachusetts USA, <http://www.rstudio.com/>), utilizando el paquete ggplot2 (Wickham y Chang, 2016). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor *p* era  $\leq 0,01$  en una prueba *t* de Student de dos colas de muestras desapareadas.

### **II. 13. 3. Obtención y marcaje con radiactividad de ssRNA y dsRNA**

Para la obtención de ssRNA y dsRNA marcado radiactivamente se siguió el protocolo detallado por Cánovas-Márquez *et al.* (2021). Las secuencias del ssRNA y dsRNA pertenecen a la secuencia del gen *carB*, con sentido y antisentido. El DNA molde para el ssRNA se obtuvo a partir del producto de PCR del plásmido pMAT679 con los oligos STU y pMAT679-Rev1, mientras que para el dsRNA se utilizó este mismo fragmento junto con el fragmento de PCR del plásmido pMAT688 amplificado con los oligos STU y pMAT688-Rev1. Para la transcripción se utilizó la polimerasa de RNA T7 (Thermo Scientific) y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP para su marcaje tal como se describe en Cánovas-Márquez *et al.* (2021). Se realizó un tratamiento con la DNasa Turbo™ (Invitrogen) durante 15 minutos a 37 °C, para eliminar el DNA, y se pasó la muestra por una columna de Sephadex G-50 para descartar los nucleótidos libres.

## **II. 14. Manipulación de proteínas**

### **II. 14. 1. Obtención de extractos de proteína de *E. coli***

Cultivos de estirpes de BL21 que portaban vectores de expresión dependiente de IPTG se crecieron durante una noche a 37 °C se diluyeron 1:100 y se cultivaron a 37 °C hasta que la densidad óptica (D. O.) a 600nm estuvo comprendida entre 0,6 y 1. En este momento, se añadió IPTG para lograr una concentración final en el medio de 1 mM y se prolongó el cultivo durante 3 horas a 30 °C. 50 ml de estos cultivos se centrifugaron a 3000 xg durante 15 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón de unión de GST con benzamidina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Las células se lisaron mediante sonicación, realizando 6 pulsos de 15 segundos, con pausas de 30 segundos en hielo entre pulsos, con un sonicador automático Labsonic U (B. Braun). Por último, se realizó una centrifugación durante 30 minutos a 10.000 xg y 4 °C para eliminar los restos celulares.

## II. 14. 2. Purificación de proteínas a partir de extractos de *E. coli*

Las proteínas de *M. lusitanicus* se expresaron en *E. coli* fusionadas a una etiqueta de GST para facilitar su purificación. Los extractos de proteína de 5 ml obtenidos se incubaron con 250 µl de matriz de sefarosa con glutatión unido (*Glutathione Sepharose™ 4B*, GE Healthcare) durante 90 minutos a 4 °C en agitación suave para promover la unión de la etiqueta de GST a la matriz. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados en las mismas condiciones, para después añadir 1 ml de tampón de elución de GST, con el que se libera la proteína de la matriz de sefarosa. Se realizó una última centrifugación de 500 xg durante 1 minuto para precipitar la matriz de sefarosa, quedando en el sobrenadante la proteína de *M. lusitanicus* unida a GST.

Para la liberación de la proteína de la etiqueta GST, se añadieron 20 unidades de trombina, que corta en una secuencia entre la proteína de *M. lusitanicus* y la etiqueta GST, y se dejó en agitación suave durante una noche a temperatura ambiente. Esta solución con la proteína ya eluida se dializó en tampón de unión de GST durante 5 horas con el objetivo de eliminar el tampón de elución. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con 100 µl de matriz de sefarosa con glutatión y 50 µl de matriz de unión a trombina (*Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow* (high sub), GE Healthcare). Tras una nueva centrifugación a 500 xg durante 1 minuto para precipitar las matrices con la trombina y la etiqueta GST unidas, se recuperó el sobrenadante, que se dializó en tampón de diálisis durante 5 horas.

## II. 14. 3. Purificación por afinidad en tándem

Los experimentos de purificación por afinidad en tándem (TAP o *Tandem Affinity Purification*) se realizaron a partir de 400 mg de micelio congelado, obtenido tras 24 horas en YNB pH 4,5 con celofán, sembrando  $5 \times 10^4$  esporas por caja. Tras machacar el micelio en mortero con nitrógeno líquido, se dejó las muestras 30 minutos en hielo en 10 ml de tampón de unión de TAP, al que se añadieron bezamidina y PMSF a una concentración final de 1mM cada uno y 100 µl de *Protease Inhibitor Cocktail for use with fungal and yeast extracts* (Sigma). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000 xg y 4 °C durante 20

## II. Materiales y métodos

minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se incubó durante 2 horas a 4 °C en agitación suave con 200 µl de esferas de *IgG Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare), lavadas previamente con tampón de unión de TAP. Las proteínas no unidas a la matriz se eliminaron mediante centrifugación a 440 xg durante 2 minutos. El pellet de la matriz se lavó tres veces con 10 ml de tampón de unión durante 10 minutos, eliminando los sobrenadantes mediante centrifugaciones iguales a las anteriores. Para liberar el complejo unido a IgG, se añadieron 2 ml de tampón de elución de TAP y se incubaron las muestras durante toda la noche a 4 °C y rotación suave. Se realizó una centrifugación de 2 minutos a 440 xg, recuperando el sobrenadante. Se añadió 6 ml de tampón de unión a calmodulina, 6 µl de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 200 µl de *Calmoduline-Sepharose® 4B* (GE Healthcare), y se incubó durante 1 hora a 4 °C con rotación suave. Se centrifugó las muestras 2 minutos a 440 xg y se desechó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con 10 ml de tampón de unión a calmodulina. Las esferas de calmodulina con el complejo unido se pasaron a un tubo eppendorf, se añadieron 100 µl de tampón de elución de calmodulina y se incubaron en rotación suave a 4 °C durante 10 minutos. Las muestras en el tampón de elución se incubaron durante 10 minutos a 100 °C y se cargaron en un gel NuPAGE™ 7%, *Tris-Acetate* (Invitrogen) para separar y visualizar las proteínas purificadas.

### II. 14. 4. Electroforesis de proteínas

Las electroforesis de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida al 10 % en el sistema Mini-Protean® 3 Cell (BIO-RAD) o en el sistema XCell SureLock™ Novex Mini-Cell (Invitrogen), dependiendo si se utilizaron geles preparados manualmente o comerciales, respectivamente. A las muestras se les añadió tampón de carga de proteínas (5x) y se incubaron a 100 °C durante 10 minutos para su desnaturalización. Posteriormente, se cargaron en el gel correspondiente y se realizó la electroforesis durante 45 minutos a 200 V, usando el tampón de electroforesis para proteínas. Como referencia de tamaños se utilizó el marcador de tamaño *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).



### **II. 14. 5. Ensayo de actividad RNasa *in vitro***

Para los ensayos de actividad RNasa *in vitro* se siguió el protocolo descrito en Cánovas-Márquez *et al.*, 2021. Los ssRNA y dsRNA, obtenidos a partir de los plásmidos pMAT679 y pMAT688 y marcados radiactivamente, se incubaron con las proteínas de interés durante la noche a 30 °C. La degradación se analizó en geles de poliacrilamida al 16 %.

### **II. 15. Rastreo de dos híbridos de levadura de una genoteca de cDNA de *M. lusitanicus***

En nuestro laboratorio se construyó una genoteca de cDNA de *M. lusitanicus*, utilizando el mRNA de la estirpe *M. lusitanicus* CBS 277.49 (Silva *et al.*, 2006). Se utilizó el vector HybriZAP-2.1 (Stratagene), para clonar los cDNAs fusionados al dominio de activación (AD) del factor transcripcional GAL4 y, posteriormente, se escindió la genoteca en el vector fagémido pAD-GAL 4-2.1. Esta genoteca se utilizó para identificar proteínas que interaccionaran con la ribonucleasa R3B2 unida al dominio de unión al DNA (BD) de GAL4.

#### **II. 15. 1. Titulación de la genoteca de cDNA y de fagos ayudantes**

Para realizar la titulación de la genoteca y fagos ayudantes se siguieron las instrucciones del suministrador (HybriZAP-2.1 XR *cDNA Synthesis Kit Instruction Manual*, Stratagene). Con el objetivo de obtener un cultivo de *E. coli* de la estirpe XL1-Blue MRF' con una D.O. a 600 nm comprendida entre 0,7 y 1, se inoculó esta estirpe en medio NZY con 0,2 % de maltosa y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, incubándose a 37 °C y 250 r.p.m. durante 4-6 horas. Estos cultivos se centrifugaron a 500 xg durante 10 minutos, y después se resuspendieron en una solución de 10 mM MgSO<sub>4</sub> hasta diluir las células a una D.O. a 600 nm de 0,5. 200 µl de estas células se inocularon con diferentes diluciones de fagos en TE, incubándose durante 15 minutos a 37 °C para promover la adsorción del fago a la célula. A continuación, se añadieron 3 ml de agar de cobertera (medio NZY) a cada una de las mezclas y se sembraron en cajas de NZY, que se incubaron a

37 °C hasta el día siguiente, cuando se realizó el conteo de las unidades formadoras de placa por  $\mu\text{l}$  (u.f.p/ $\mu\text{l}$ ).

### **II. 15. 2. Amplificación de los fagos ayudantes**

La amplificación de los fagos ayudantes, necesarios para la escisión del vector, se realizó inoculando una colonia de la estirpe de *E. coli* XL1-Blue MRF' en 10 ml de medio 2xYT. El cultivo se mantuvo en agitación a 250 r.p.m. y 37 °C hasta que alcanzó una D.O. a 600 nm de 0,3. Teniendo en cuenta que esta densidad óptica corresponde a  $2,5 \times 10^8$  células/ml, se añadieron fagos ayudantes en una relación 20:1 (fago:célula). Se mantuvo el cultivo a 37 °C durante 8 horas, y después se calentó a 65 °C durante 15 minutos para lisar las células. Tras una centrifugación a 500 xg para eliminar los restos celulares, se recuperó el sobrenadante y se procedió a la titulación de los fagos. Se añadió dimetilsulfóxido para su conservación a -80 °C a una concentración final del 7 %.

### **II. 15. 3. Escisión de la genoteca de fagémidos de *M. lusitanicus***

Siguiendo las instrucciones del suministrador, para la escisión de los fagémidos se prepararon dos cultivos de *E. coli* de las estirpes XL1-Blue MRF' y XLOLR. Estos cultivos crecidos a 30 °C y 250 r.p.m. durante la noche se centrifugaron a 500 xg y las células se resuspendieron en  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) hasta quedar en una D.O. a 600 nm de 1. A continuación, se realizó una dilución 1:200 de las células en medio NYZ suplementado con maltosa (0,2 %) y 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ , y se incubaron a 250 r.p.m. y 37 °C hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,3-0,4. En el siguiente paso, las células XL1-Blue MRF' y XLOLR se resuspendieron en  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) para obtener una D.O. a 600 nm de 5 y 1, respectivamente. Para la escisión se utilizó:

- $10^7$  u.f.p. de la genoteca de cDNA.
- $10^8$  células de la estirpe XL1-Blue MRF'.
- $10^9$  u.f.p. de los fagos ayudantes.

Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C para permitir la adsorción de los fagos y después se añadió 20 ml de medio LB. Este cultivo se mantuvo en agitación a 120 r.p.m. y 37 °C durante 3 horas. Se calentó a 70 °C durante 20 minutos para lisar las células y se centrifugó 10 minutos a 500 xg para eliminar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante donde se encontraban los fagémidos escindidos.

Para la titulación de estos fagémidos se utilizaron las células del cultivo de XLOLR mencionado anteriormente. Mezclas de 200 µl de este cultivo y distintas diluciones en TE de los fagémidos escindidos se incubaron a 37 °C durante 15 minutos y se sembraron en placas con medio LB con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron toda la noche a 37 °C y al día siguiente contaron las unidades formadoras de colonia por microlitro (u.f.c./ µl).

#### **II. 15. 4. Amplificación de los fagémidos escindidos**

Por último, antes de la transformación en levaduras, era necesario la amplificación de los fagémidos escindidos, para lo que se genera un cultivo de XLOLR en las mismas condiciones que el apartado anterior, a los que se le añadió una décima parte de fagémidos escindidos. Se realizó una incubación de 15 minutos a 37 °C, para después inocular estas células en un cultivo de LB suplementado con ampicilina a 100 µg/ml. Se incubó este cultivo durante 9 horas a 37 °C y 250 r.p.m., hasta que alcanzó una D.O. a 600 nm de 0,3. Tras centrifugar las células 10 minutos a 500 xg, se realizó una purificación de DNA por el método mencionado anteriormente de Holmes y Quigley (1981).

#### **II. 16. Ensayos de virulencia en ratón**

Los ensayos de virulencia se realizaron con grupos de 10 ratones macho de 4 semanas de la estirpe OF-1 (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, España) por estirpe de *M. lusitanicus*. El peso de cada ratón rondaba los 30 gramos. Los ratones se inmunosuprimieron, mediante inyección intraperitoneal con ciclofosfamida (200 mg/kg), dos días antes de la infección y cada cinco días desde la primera inmunosupresión. La infección se llevó a cabo con  $1 \times 10^6$

## II. Materiales y métodos

esporas por inyección intravenosa, siguiendo la evolución de los ratones durante 20 días. Los ratones se encontraban bajo condiciones controladas y tenían libre acceso a agua y comida. A los animales supervivientes al final del ensayo se les realizó la eutanasia por inhalación de CO<sub>2</sub>. El ensayo de supervivencia se representó usando el estimador de Kaplan-Meier (GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor  $p$  era  $\leq 0,05$  en una prueba de Mantel-Cox.

## III. RESULTADOS



### **III. 1. Identificación de nuevos componentes en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus***

Durante los últimos años, nuestro grupo ha identificado los diferentes componentes que forman parte del silenciamiento génico de *M. lusitanicus* (Nicolás *et al.*, 2007; de Haro *et al.*, 2009; Nicolás *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2012; Cervantes *et al.*, 2013; Trieu *et al.*, 2015; Calo *et al.*, 2017). Además de estos elementos, se han identificado las diferentes rutas que forman parte de este mecanismo de silenciamiento, las cuales realizan distintas funciones (Nicolás *et al.*, 2003; Nicolás *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2014; Trieu *et al.*, 2015). Entre todas las proteínas que participan en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus*, R3B2 ha despertado un gran interés, no solamente por ser la pieza principal de la ruta NCRIP, sino también por su peculiar estructura que, como se ha mencionado anteriormente, solo se había observado en *A. thaliana* dentro del reino eucariota (Trieu *et al.*, 2015).

El descubrimiento de una ruta de silenciamiento distinta a las previamente descritas, que era independiente de la ribonucleasa Dicer, unido al protagonismo en ella de R3B2, una nueva ribonucleasa que resulta singular en la naturaleza ya que está conservada en Mucorales y degrada ssRNA pero no dsRNA *in vitro*, despertó el interés por profundizar más en el estudio de esta nueva ruta no canónica y, por lo tanto, de R3B2. Un primer paso consistió en la búsqueda e identificación de nuevas proteínas que interaccionasen con R3B2, con la intención de caracterizar posteriormente los componentes de esta nueva ruta de silenciamiento génico.

#### **III. 1. 1. Estrategias para la identificación de nuevos genes del silenciamiento génico en *M. lusitanicus***

##### **III. 1. 1. 1. Purificación por afinidad en tándem**

La primera estrategia que se utilizó para identificar el interactoma de R3B2 fue una purificación por afinidad en tándem utilizando la proteína R3B2 fusionada a la etiqueta TAP, que está formada por un péptido de unión a calmodulina (CBP), un punto de escisión para la proteasa del virus de grabado del tabaco

(TEV) y dos dominios de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, que se unen a IgG. Para ello, fue necesario generar un plásmido con una construcción que contuviera el gen *r3b2* unido a la secuencia que codifica esta etiqueta y, posteriormente, una estirpe de *M. lusitanicus* que tuviera integrada esta construcción en su genoma. El objetivo era purificar la proteína de fusión a través de las propiedades de la etiqueta para así aislar las proteínas que interaccionan con R3B2. Para la sobreexpresión se utilizó un promotor potente, el del gen *zrt1* (que se suele utilizar en nuestro grupo con este fin). Las estirpes generadas, MU901 y MU903, a pesar de llevar el gen *r3b2* fusionado al gen que codifica la proteína TAP, bajo el control de dicho promotor, mostraron una expresión de la proteína de fusión muy baja, impidiendo la purificación de R3B2 a partir de extractos de proteínas de estas estirpes.

#### **III. 1. 1. 2. Sistema de doble híbrido de levaduras**

Tras las dificultades para la expresión de R3B2 fusionada al TAP, se siguió una segunda estrategia utilizando el ensayo del doble híbrido de levadura, en el que se utilizó la proteína R3B2 como cebo para rastrear una genoteca de cDNA de *M. lusitanicus* (Silva *et al.*, 2006). Para realizar el rastreo se utilizó el vector pMAT1979 (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021) que expresa la proteína R3B2 fusionada al dominio BD del factor de transcripción GAL4. La genoteca de cDNA se construyó previamente en nuestro laboratorio a partir de mRNAs aislados de la estirpe silvestre CBS277.49 de *M. lusitanicus* tras un pulso de luz de 20 minutos, clonando los cDNA correspondientes en el vector pAD-GAL4-2.1 (Stratagene) que los expresa fusionados al dominio AD del factor de transcripción GAL4 (Silva *et al.*, 2006).

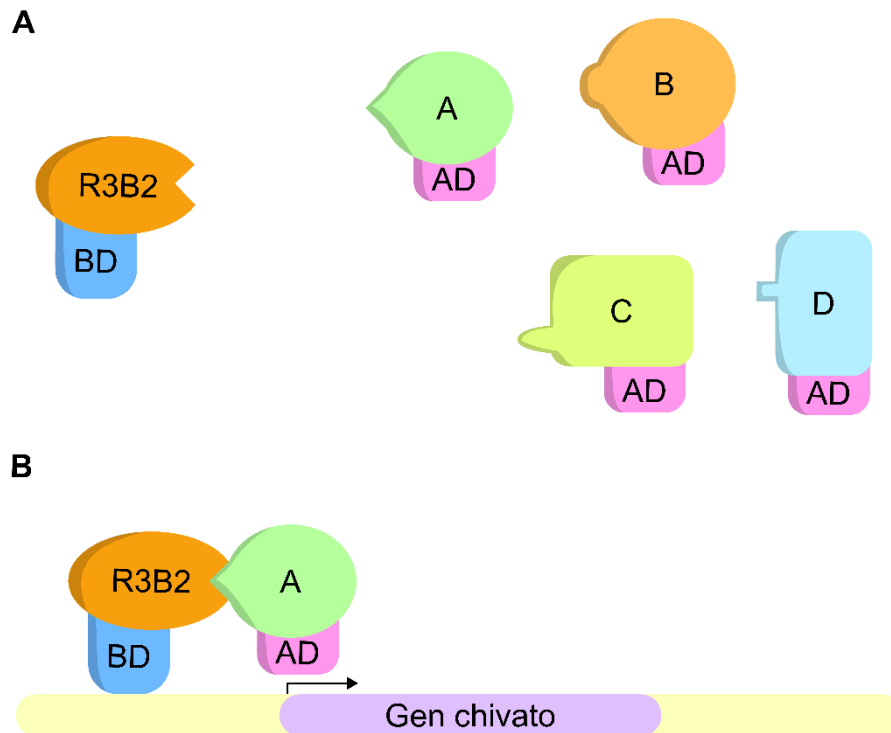
El ensayo de doble híbrido de levaduras pretende la identificación de proteínas que interaccionan con una proteína de interés. El principio en el que se basa este experimento es la activación de la expresión de genes chivatos, que solo se produce cuando las proteínas unidas a BD y a AD interaccionan entre sí, lo que hace que los dos dominios estén próximos y se pueda producir la acción activadora del factor de transcripción GAL4. En este caso, la proteína R3B2 unida a BD se utiliza como proteína “cebo”, mientras que al dominio AD se



fusionan las proteínas “presa” producidas por la genoteca de cDNA de *M. lusitanicus* (Figura 13). La estirpe de *S. cerevisiae* PJ69-4a, a la que se introdujo previamente el vector pMAT1979 que porta el gen que codifica la proteína cebo, se transformó con la genoteca. La incubación en medio selectivo, SD-WLH con 1mM de 3AT, permite el crecimiento solo de aquellas células que hayan incorporado un plásmido de la genoteca que produzca una proteína presa que interaccione con R3B2, porque solo en ese caso se producirá la expresión del gen *his3* (deshidratasa de imidazoleglicerol-fosfato) que está bajo el promotor del gen *gal1* en la estirpe de levadura PJ69-4a.

Para la realización de este ensayo de doble híbrido fue necesaria la titulación de los fagos de la genoteca y los fagos ayudantes, necesarios para la escisión del vector. En la titulación de los primeros se obtuvo un conteo de  $2,1 \times 10^6$  u.f.p/μl, y en la de los fagos ayudantes, para los que fue necesaria su amplificación,  $6,1 \times 10^7$  u.f.p/μl. Posteriormente, se realizó la escisión del fagémido pAD-GAL4-2.1 (véase apartado II. 15. 3. de Materiales y Métodos), necesaria para la transformación de levaduras. La titulación de las partículas de fagémido escindidas fue de  $2,1 \times 10^6$  u.f.c./ μl, una concentración suficientemente alta para realizar la transformación de levaduras.

Con el objetivo de tener una estimación del número total de células transformadas, se sembró un pequeño volumen de la mezcla de transformación (2 μl) en medio selectivo SD-WL. En este medio crecerán todas aquellas células que portan tanto el plásmido que expresa la proteína “cebo” como el que expresa la proteína “presa”, independientemente de que se produzca interacción entre las proteínas, lo que nos permite estimar el número de células de levadura que han incorporado ambos vectores. Este control de transformación determinó que el número total de células que habían sido transformadas con ambos plásmidos fue de  $7,6 \times 10^5$ . Teniendo en cuenta la última secuenciación y caracterización total del genoma realizada en *M. lusitanicus* (*Mucor lusitanicus* CBS277.49 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>), el número total de genes que presenta es de 11.719. Estos datos sugieren que el transcriptoma al completo del hongo debe haber quedado representado en este experimento de transformación.



**Figura 13. Sistema de doble híbrido de levaduras. A)** Para la detección de interacciones se generó la proteína R3B2 fusionada al dominio BD de GAL4 y las proteínas representadas en la genoteca fusionadas a su dominio AD. **B)** La interacción de R3B2 con una de las proteínas “presa” debía inducir la transcripción de los genes chivato.

Tras 3 días de incubación a 30 °C de las células transformadas en medio selectivo para la interacción, se obtuvo un total de 15 colonias. Se utilizaron cultivos de estas colonias para aislar los plásmidos que derivaban de la genoteca, con los que se transformó mediante electroporación *E. coli*, seleccionándose las colonias que incorporaron los plásmidos correspondientes en medio LB con ampicilina. Se aislaron un total de 11 plásmidos.

Como cada transformante de *S. cerevisiae* pudo haber incorporado más de un plásmido de la genoteca, se volvió a transformar la estirpe de *S. cerevisiae* que poseía el vector pMAT1979 con cada uno de los diferentes plásmidos aislados. Se trataban de 5 plásmidos diferentes, algunos de ellos encontrándose en más de un transformante. Estos transformantes se sembraron de nuevo en medio selectivo, SD-WLH con 1 mM de 3AT, para comprobar qué plásmidos aislados eran los responsables de la activación de la transcripción del gen chivato *his3* que permite el crecimiento de la levadura en el medio selectivo.

Una vez confirmada la interacción de las proteínas “presa” expresadas por 7 de los plásmidos, estos se secuenciaron para identificar los genes clonados en cada uno de ellos y se comprobó que estaban en fase con el AD de GAL4. Finalmente fueron dos los genes identificados:

-El gen con ID 80729, que corresponde al propio *r3b2*, aislado a partir de 4 colonias diferentes. Este era un resultado esperado, ya que se conocía que R3B2 dimerizaba (Cánovas-Márquez et al., 2021), y que valía la utilidad del rastreo de la genoteca de cDNA en el sistema de dos híbridos de levadura para identificar proteínas que interaccionan con R3B2.

-El gen con ID 112212 aislado a partir de 3 colonias diferentes. En este caso se trata de un gen que codifica una proteína con similitud de secuencia con proteínas de choque térmico de la familia Hsp70, cuya caracterización funcional se convirtió en el objetivo principal de esta tesis.

## III. 2. Caracterización del gen 112212 (*hspA12a*)

### III. 2. 1. Caracterización del gen *hspA12a* de *M. lusitanicus*

La secuencia del gen con ID 112212, nombrado como *hspA12a* por su similitud a patrones humanos (véase apartado III. 2. 2), del genoma de *M. lusitanicus* (CBS277.49 v2.0; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) consta de 1.994 pb, agrupadas en 5 exones y 4 intrones. La región codificante está formada por 1.713 pb, dando lugar a una proteína de 570 aminoácidos (Figura 14). La proteína que codifica este gen, al igual que todos los miembros de la subfamilia de Hsp70 al que pertenece (véase apartado III.2.2), presenta un dominio NBD con baja identidad respecto al que presentan el resto de las subfamilias Hsp70, y carece de un dominio SBD típico. En el mecanismo alostérico de las Hsp70, el dominio NBD de estas proteínas es el encargado de la unión e hidrólisis de ATP, permitiendo la unión al sustrato del dominio SBD, que en estas HspA12 no se encuentra presente (Brocchieri et al., 2008; Rosenzweig et al., 2019). Este dominio NBD de HspA12a posee 397 aminoácidos, localizándose entre el aminoácido 10 y el 406, ambos incluidos.

### III. Resultados

ATGATAGGCATCAAGGACAAC TACAAGGTGGTGATTTTCGTACGATTTTGG AACACATT  
M I G I K D N Y K V V I S Y D F G T T F  
CTCAGGTGCTTCTTACGCCTT TACTCACAATACCAGCCTGAAGTATTCGATGTACAAA  
S G A S Y A F T H N T T P E V F D V Q  
AATGGTAACATGGCACACATTTTGT TTTATTATTTAGCATACTCAATTGACGACTACAGG  
K W  
CCTCACAAAGGTGGCAGCTTCTACCCGAAGACGCCCTCTATATCAGCATACAAACGCTC  
P H K G G S F Y P K T P S I S A Y K R S  
AGACCCTGCTACTATGGTTCGAGTGGGGCCATGCTGCCAAGAAGTTGATGCTTAAACCAC  
D P A T M V E W G H A A K K L M L K P Q  
AAGCTGCCAAGGAAAACATAATTTTGTCAA ACTTCAA ACTCAATCTCGATGAGTCTCTG  
A A K E N I I L S N F K L N L D E S L  
CATAGAGGCGTTGCTGAAAACCACAGGTACACTATGCCACACTCACTATGCATGATCCG  
H R G V A E N H R  
GCTTGCTGATACCAGATGTAGATCGT CGGTCAGCAACATTGCAGACTATTTGAAGGCGC  
S S V S N I A D Y L K A L  
TCCACAAACATGTTGTGGAAGACGTGACCAAGGGTTTCGCCAAGA ACTACGATCCTGAT  
H K H V V E D V T K G F A K N Y D P D  
ACCTTTCGCTACTGCCTGACTGTGCCAGCCATGTGGTCTGATCTCGCAAAGCATTCCAT  
T F R Y C L T V P A M W S D L A K H S M  
GAGAAAAGCAGCTGTGATGGCAGGACTGATCAAGCAAACGACCCGCAGGACAGACTGA  
R K A A V M A G L I K Q N D P Q D R L I  
TACTGATATCAGAGCCCGAAGCTGCTGCACTGTACTGTGAACGTATGTGCGAGCAAGTC  
L I S E P E A A A L Y C E R M C E Q V  
AATCTCAAGAAGGGGGATCGCATGCTGATCTGTGATGCGGGCGGTGGCACCGTGGATCT  
N L K K G D R M L I C D A G G G T V D L  
GATTGTGTTTGAAGTCATTGATGATAGAATACAGAGCAACAACCGGCTAAAGGAGGTAA  
I V F E V I D D R I Q S N N R L K E V T  
CAAAGGCATCGGCGAGAGCTGTGGCAGTGTGTTTCTGGATGAAA AATTCAAGGCATTG  
K G I G E S C G S V F L D E K F K A L  
ATGCAAGAGAAGCTGGGTGATCAGGCCAAGACCTTGCCGGCTGCGGCCATGAACAACCT  
M Q E K L G D Q A K T L P A A A M N N L  
GATGGATCAGTTTGTGGATAACATCAAGCCAGAATTTGATGGTTT TAGACGACCAATATC  
M D Q F V D N I K P E F D G L D D Q Y L  
TCAGTTTGGCAGTCTCCATCAGCTTGGACGAGTTGAATACAGAAGACGATTGCTTGGAC  
S L P V S I S L D E L N T E D D C L D  
GAGGGCACCATGGCACTGAGAGCAGATGAATTAAAGGAGAAGGTGTTTGAACCGTGTGT  
E G T M A L R A D E L K E K V F E P V V  
GGAGCGCGTGGTAAGTCAACTGTTGATAGAATGGCTGTGTGAGAGAGAAATGGCTCACA  
E R V  
ATGCTCTCCTTGATAGATTGCACTATTGGAAAAGCAATACAACGCTGTGCCTGACAAGC  
I A L L E K Q Y N A V P D K R  
GAGTGTGCATGCATTTTTTTTGGTGGGTGGATTTGGGTTCGTCCAATTACCTGTTTCAACGC  
V S C I F L V G G F G S S N Y L F Q R  
GTGCAAGAAGTGTGTAATCAAGAGTGGGCCAAGTGTGTGTCCCCAAGAGCTGCCAT  
V Q E V F E S R V G Q V L C P P R A A M  
GGCAGTGGTGCCTGGTGTCTATTTTGGGCTAAATCCACGGGTCAATTACATCCAGAG  
A V V R G A V Y F G L N P R V I T S R V  
TGTCTCGTCGCACCTATGGCATCAATGCTGGCTTACCCTTTGACGACAAGCTGGATCCC  
S R R T Y G I N A G L P F D D K L D P  
ATTTCTCTCGCGTGGTTCGACCAGACGGTAGTATTCGTTGTACATCGCGATTCTCTGGT

I S S R V V R P D G S I R C T S R F L V  
 GTTTGTCAAGAAAGGAGACGAGCTGCCCCGTAGATCATTGCATACGCGAAAGAATGTTTG  
 F V K K G D E L P V D H C I R E R M F V  
 TCTATTACGGCACCATGAAGGCAACGGATATCATGCTGTATGCCACGGACGAGGATAAA  
 Y Y G T M K A T D I M L Y A T D E D K  
 GAGCCCCGCTATTTTCGATGAGCCCAATGTCAAGCAAGTCGCCGCTATTTTCAGTGCCTAT  
 E P R Y F D E P N V K Q V A A I S V P I  
 ACCACAACCTGCCCGATGTGATCCATGGAGAGCGTATTGCATATACTGTCTAGTAATAAG  
 P Q L P D V I H G E R I A Y T V R  
 TACTGTGTATATCTCAACTGTCTTGCTCATGCCTCCTTGTCCTGTATAGAAATGTATTT  
 M Y F  
 TGGACTGACTGAAATTCGCATGGAAGCTGATTTTGGCACTGGCATCATTCCACAAGGTGC  
 G L T E I R M E A D F G T G I I H K V  
 AATGCAATTTTGATGCTTTTCGACAAGTACGATACCGAGGAAGCCACATCAACTTGA  
 Q C N F D A F D K Y D T E E A T S T \*

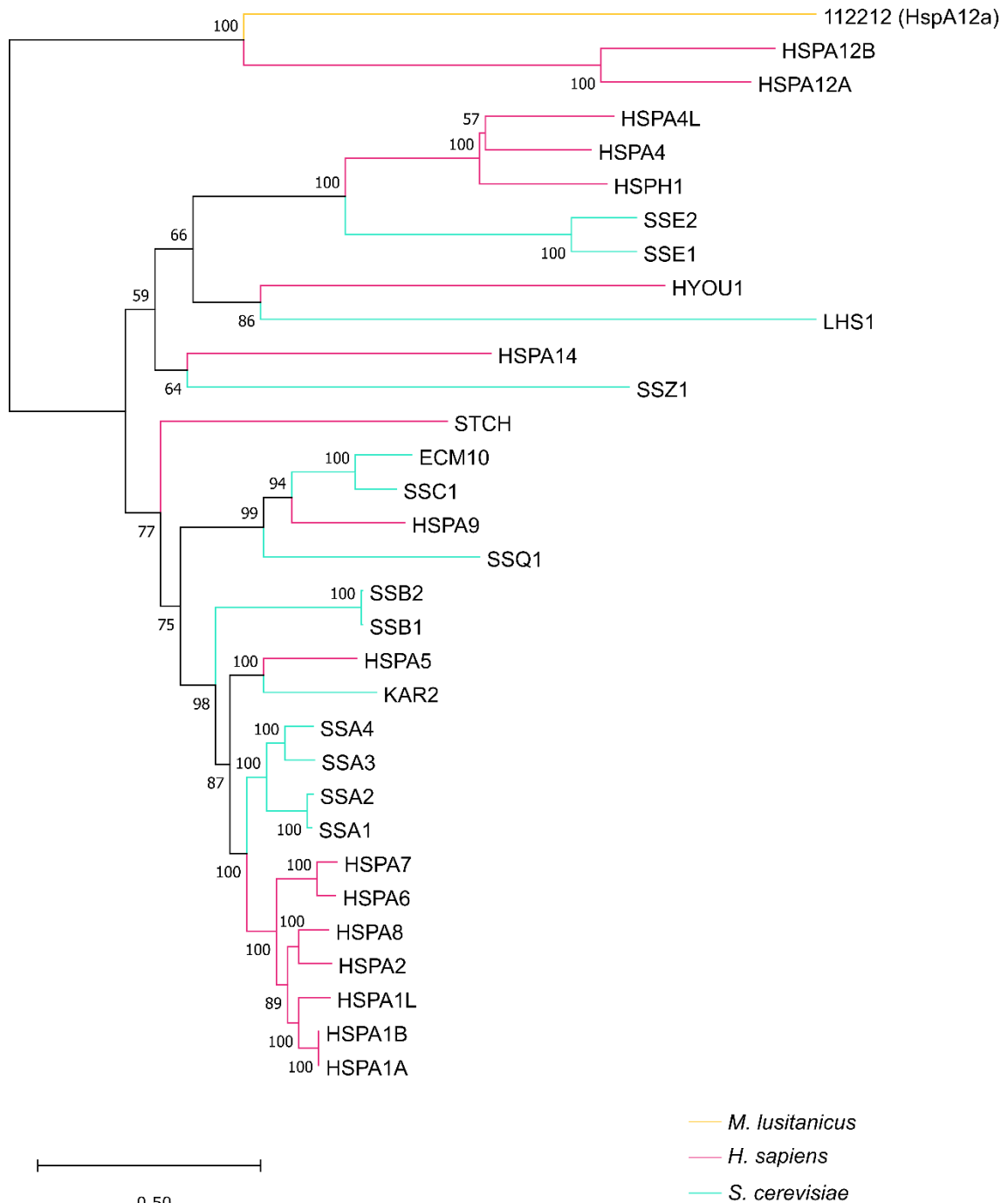
**Figura 14. Secuencias codificante y de aminoácidos del gen *hspA12a*.** Se muestran las secuencias de los exones (rojo), intrones (azul) y de aminoácidos (negro). Se resalta la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio NBD (amarillo). Se muestran en negrita los posibles sitios de unión a nucleótido conservados en las HSPA12 humanas.

### III. 2. 2. Análisis filogenético de la proteína HspA12a de *M. lusitanicus*

El gen *hspA12a* estaba anotado en el genoma de *M. lusitanicus* dentro de la superfamilia de las chaperonas moleculares Hsp70. En el reino de los hongos, *S. cerevisiae* ha servido como modelo para el estudio de las Hsp70. Como se ha mencionado anteriormente (apartado I. 3. 2), esta levadura posee 14 genes que codificaban proteínas de la familia Hsp70 que se han agrupado en 7 subfamilias (Morano *et al.*, 2012; Kominek *et al.*, 2013). Una búsqueda de genes homólogos al gen *hspA12a* de *M. lusitanicus* en el genoma de *S. cerevisiae*, con ayuda de la herramienta Blastp del NCBI (Altschul *et al.*, 1997), no produjo ningún resultado. En cambio, la misma búsqueda contra toda la base de datos del NCBI reveló que la proteína de *M. lusitanicus* pertenece a la subfamilia de chaperonas HspA12, que está ausente en *S. cerevisiae*. Esta subfamilia de Hsp70 se había descrito en otros organismos, como *H. sapiens*, donde es una de las 7 subfamilias en las que se clasificaron los 17 genes de humanos (Brocchieri *et al.*, 2008).

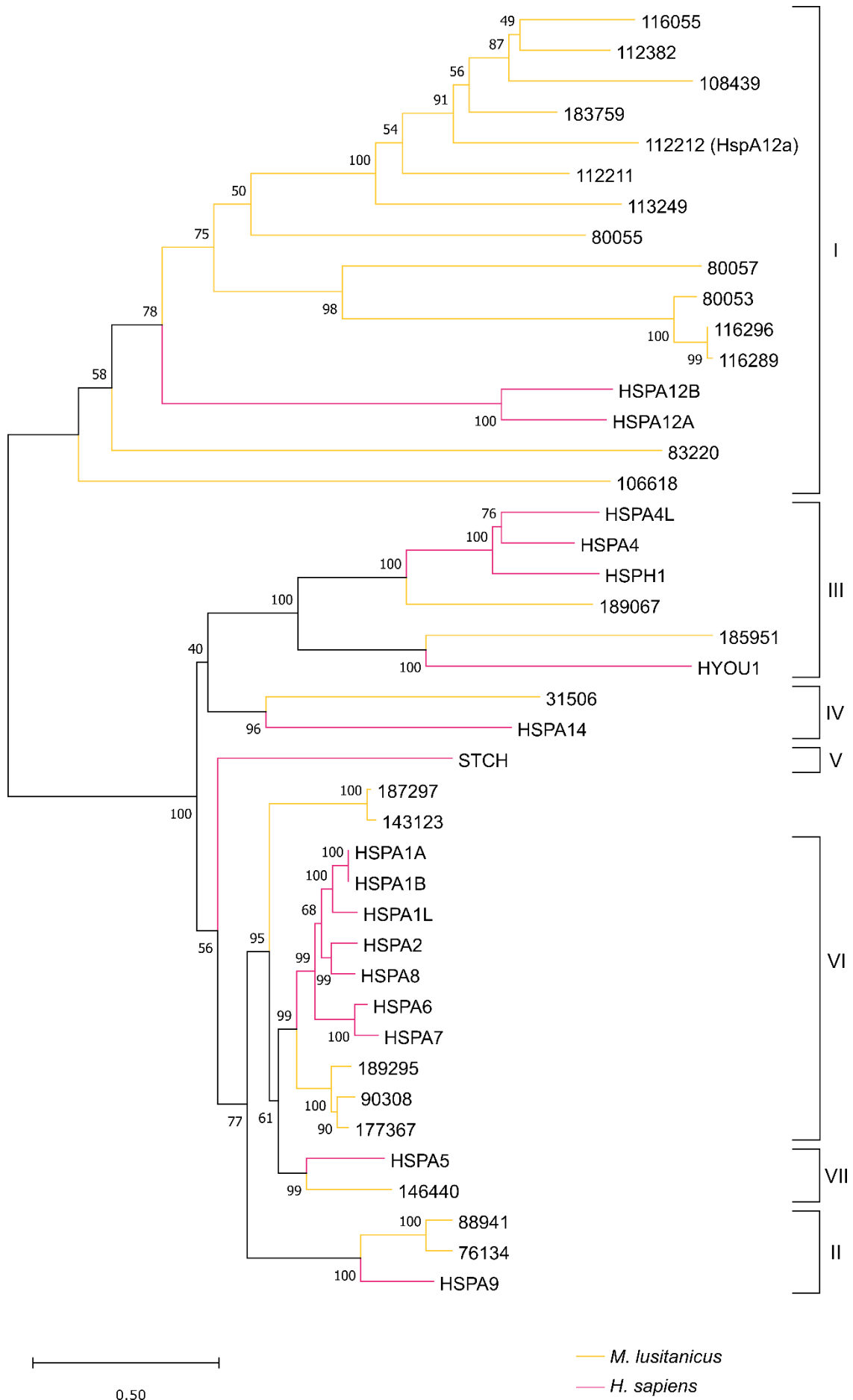
Un análisis filogenético con las proteínas HSP70 de *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y la proteína identificada en *M. lusitanicus* (Figura 15) mostró que las distintas familias de las dos primeras especies son similares entre ellas, salvo algunas excepciones, como la familia HSPA12. La proteína identificada en *M. lusitanicus* tiene una gran similitud con las proteínas HSPA12 de humanos, formando un grupo muy distanciado del resto, lo que indica una gran conservación de esta familia de Hsp70 en aquellos organismos donde está presente. Esta Hsp70 identificada en *M. lusitanicus* fue nombrada como HspA12a, por su similitud con la subfamilia de humanos. *S. cerevisiae* no es el único hongo donde no se encuentra esta subfamilia, ya que tampoco aparece en otras especies como *C. glabrata*, *N. crassa* y *S. pombe* (Brocchieri *et al.*, 2008).

Para identificar todos los genes que cifran posibles proteínas Hsp70 en *M. lusitanicus* se realizó una búsqueda en el genoma de *M. lusitanicus* utilizando las secuencias de las proteínas Hsp70 de *H. sapiens*, apareciendo un total de 25 genes distintos. El análisis filogenético elaborado con estas posibles proteínas Hsp70 de *M. lusitanicus* y las conocidas de *H. sapiens* (Figura 16) mostró una clara expansión en el número de miembros de la familia HspA12, clasificados en el grupo I, en el hongo. Mientras que en *H. sapiens* solamente dos de sus 17 Hsp70 quedaron clasificadas en este grupo I, en *M. lusitanicus* son 14 de un total de 25 proteínas Hsp70. El resto de los grupos presentaron una variabilidad mucho menor, mostrando números de miembros similares entre ambas especies. No obstante, cabe destacar que *M. lusitanicus* no presenta genes del grupo V y que las proteínas de los genes 143123 y 187297, que comparten una alta similitud con las proteínas del grupo VI y del grupo VII (cuyos miembros también muestran una gran similitud entre ellas), han evolucionado por una vía diferente a estos grupos, no pudiendo clasificarse en ninguno de ellos.



**Figura 15. Análisis filogenético de la Hsp70 identificada en *M. lusitanicus*.** Este árbol muestra las distintas Hsp70 identificadas en *H. sapiens* y *S. cerevisiae*, además de la Hsp70 identificada en el ensayo de interacción con R3B2 de *M. lusitanicus* (diferenciadas por los colores de las ramas). Se indican las distancias filogenéticas, representadas por la longitud de las ramas, y el soporte de las mismas, mostrado numéricamente (1000 *bootstraps*). Este árbol filogenético se elaboró por el método de unión de vecinos (*Neighbor joining*) y las distancias evolutivas se estimaron por el método basado en matrices de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

III. Resultados

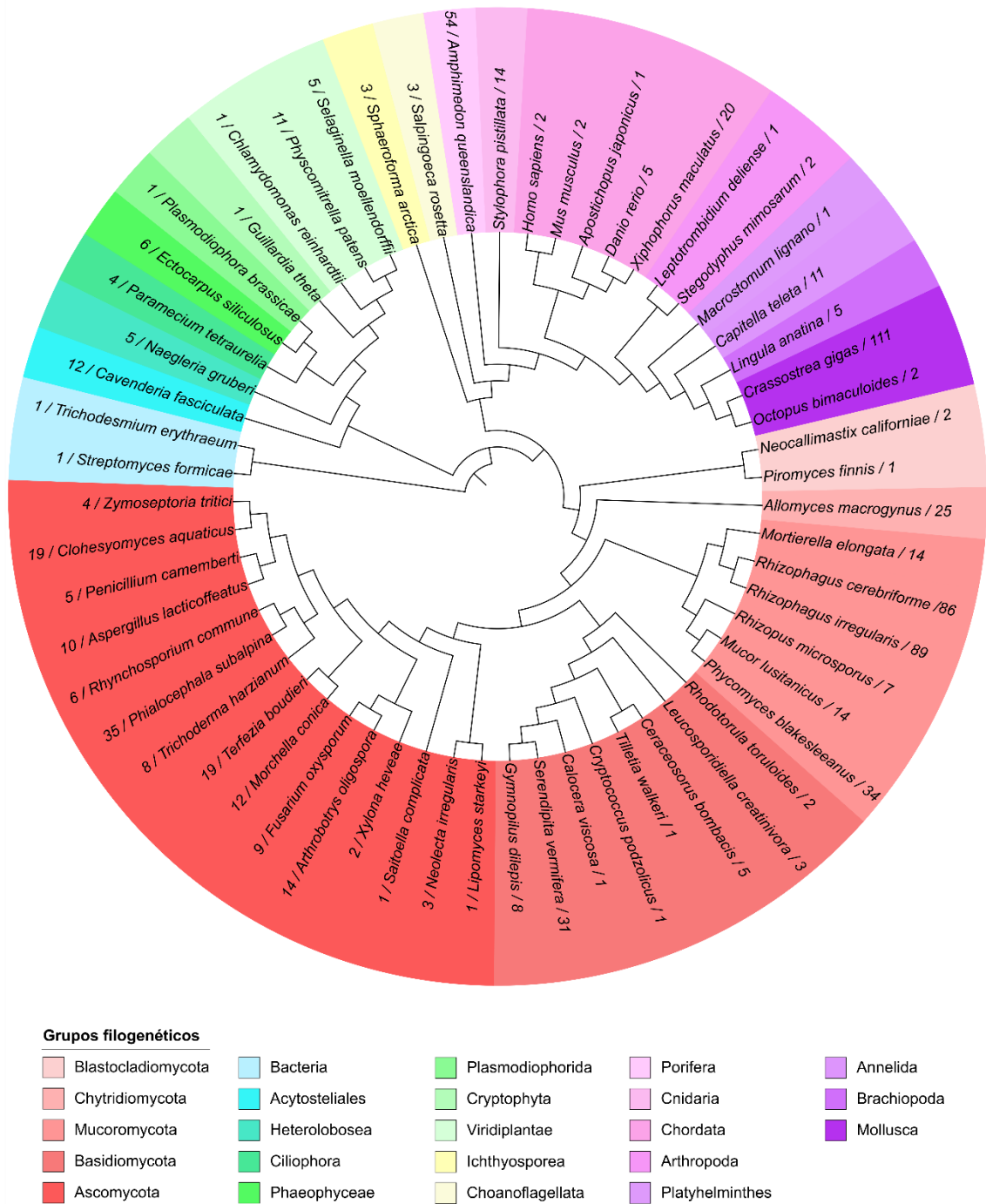




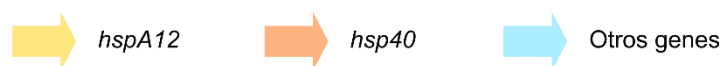
**Figura 16. Análisis filogenético de las distintas Hsp70 de *M. lusitanicus*.** Este árbol muestra las Hsp70 que posee *M. lusitanicus*, junto a las de *H. sapiens* (diferenciadas por los colores de las ramas). En la clasificación elaborada de las Hsp70 humanas por Brocchieri *et al.* (2008) se han incluido las identificadas en *M. lusitanicus*. Se indican las distancias filogenéticas, representadas por la longitud de las ramas, y el soporte de las mismas, mostrado numéricamente (1000 *bootstraps*). Este árbol filogenético se elaboró por el método de unión de vecinos (*Neighbor joining*) y las distancias evolutivas se estimaron por el método basado en matrices de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

La expansión observada de los genes *hspA12* en *M. lusitanicus* sugirió la posibilidad de que confiriese alguna ventaja evolutiva a este hongo. Con el objetivo de analizar si este tipo de expansiones eran exclusivas de *M. lusitanicus* o habían ocurrido en otros organismos, se realizó una búsqueda exhaustiva de proteínas con similitud en la base de datos de ENSEMBL, utilizando el servidor web de HMMER (Potter *et al.*, 2018). Existe un gran número de organismos donde el número de estos genes se ha incrementado, aunque la distribución de estos genes en los distintos grupos es muy variable (Figura 17). Aunque en el reino fungi existe un aumento de los genes *hspA12*, es en el orden Mucoromycota donde se observa una mayor expansión de estos genes, destacando algunas especies como *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus cerebriforme* o *P. blakesleeanus*. Además, otros organismos también presentan un gran número de estos genes, en muchas ocasiones diferenciándose del resto de especies de sus grupos filogenéticos. Es el caso de especies como *Crassostrea gigas* o *X. maculatus*.

En algunos casos la expansión en número de miembros de genes podría explicarse por duplicaciones genómicas, pero en otros casos es muy probable que sean resultado de duplicaciones de segmentos del genoma debido al elevado número de genes y a la presencia de agrupaciones de estos genes en una región del genoma (Figura 18). Este fenómeno de agrupación génica se encuentra en especies que poseen un gran número de genes *hspA12* como *M. lusitanicus*, *X. maculatus* o *P. blakesleeanus* (14, 20 y 34 genes, respectivamente).



**Figura 17. Representación del número de genes *hspA12* por especies.** En este árbol filogenético se presentan los números de genes *hspA12* identificados en especies representativas de los principales grupos filogenéticos del planeta. Se muestran las especies con un mayor número de genes de los grupos filogenéticos representados, incluyendo algunas que muestran la media de genes de esos grupos y otras especies representativas o modelos de estudio. En hongos se muestran especies de cada una de las clases que componen los grupos representados. Los grupos no representados en el árbol carecen de especies con genes para las HspA12.

*M. lusitanicus**P. blakesleeanus**X. maculatus*

**Figura 18. Contexto genómico de algunos genes *hspA12* en diferentes especies.** Representación gráfica del contexto genómico de algunos genes *hspA12* en *M. lusitanicus*, *P. blakesleeanus* y *X. maculatus*, que sugieren una duplicación segmental. En azul oscuro se representan regiones intergénicas.

### III. 2. 3. Caracterización de las interacciones de la proteína HspA12a con R3B2 y con otras proteínas del silenciamiento génico de *M. lusitanicus*

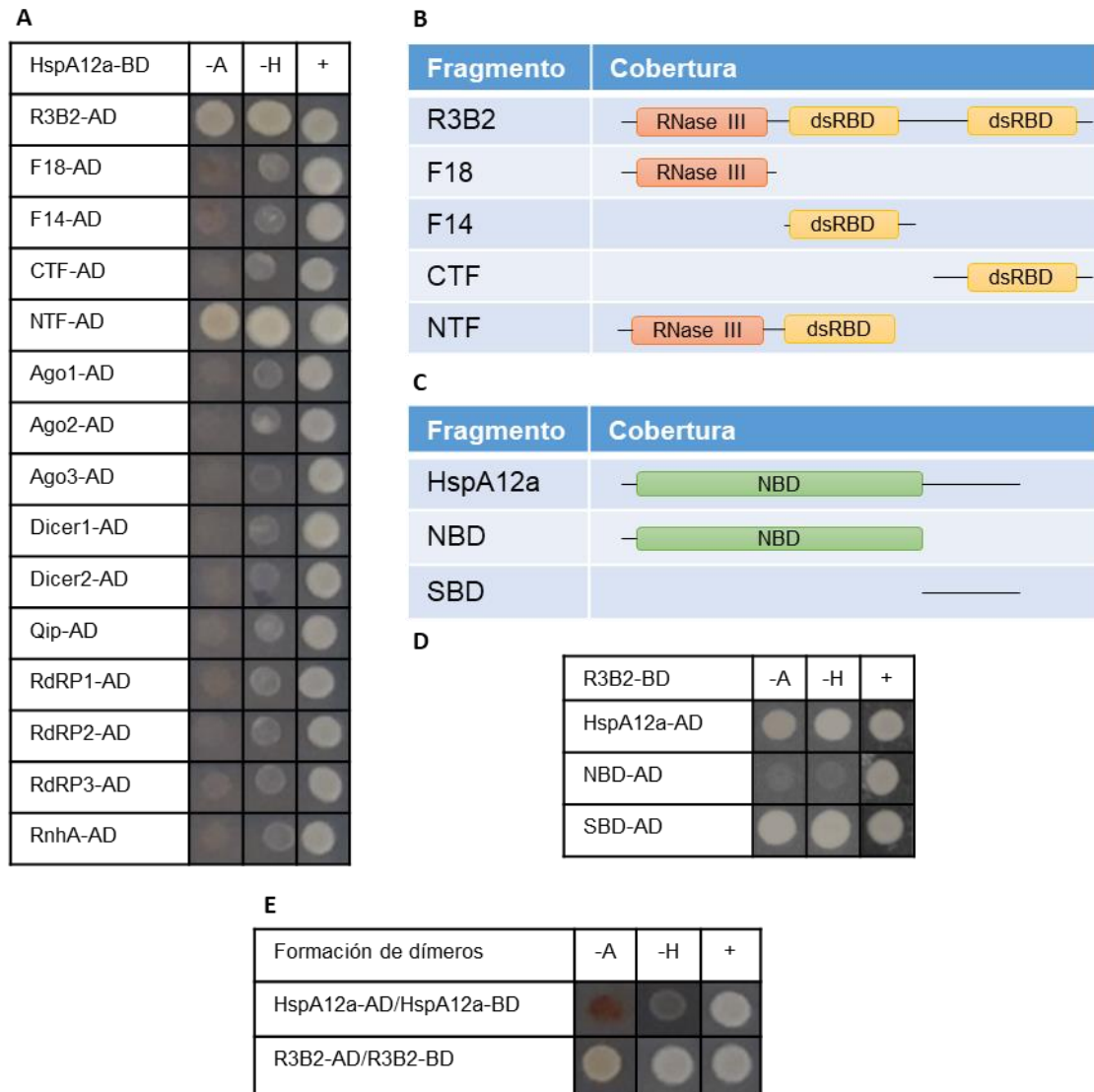
Una vez se identificó la interacción entre las proteínas HspA12a y R3B2, los siguientes pasos consistieron en caracterizar qué dominios de ambas estaban implicados directamente en esa interacción y determinar si la chaperona interacciona con alguna de las proteínas, previamente identificadas, implicadas en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus*, mediante el uso del sistema de doble híbrido de levaduras.

En nuestro laboratorio se dispone de una colección de levaduras con distintos plásmidos, que expresan algunos de los genes del silenciamiento génico de *M. lusitanicus* fusionados a los dominios AD y BD de GAL4. Durante este trabajo fue necesario generar algunos plásmidos adicionales (Tabla 3) y algunas de las estirpes de levaduras para completar la colección necesaria para analizar todas las interacciones previstas. Las interacciones se analizaron

mediante cruzamientos entre estirpes  $\alpha$  y  $\alpha$  de la estirpe PJ69-4 de *S. cerevisiae* (Figura 19), que expresaban las proteínas a analizar fusionadas a los dominios AD y BD de GAL4, respectivamente. La existencia de interacción se determinó mediante siembras de los diploides resultantes en medios selectivos para la interacción (SD-WLH y SD-WLA) (véase Apartado II. 6. de Materiales y Métodos para una descripción detallada de este procedimiento). El estudio de la interacción con proteínas del silenciamiento confirmó la interacción observada entre las proteínas R3B2 y HspA12a completas, pero no se detectó ninguna otra interacción entre esta Hsp70 y el resto de las proteínas identificadas en *M. lusitanicus* que están vinculadas con el silenciamiento génico (Figura 19A).

El análisis de la interacción de HspA12a con diferentes regiones de la proteína R3B2 (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021) (Figura 19B) permitió determinar que la región de R3B2 implicada en la interacción con HspA12a es la región N-terminal (llamada NTF), la cual contiene el dominio RNasa III (fragmento F18) y el primer dominio de unión a RNA de doble cadena (fragmento F14) (Figura 19A). El hecho de que HspA12a no interaccione con ninguno de estos dos dominios por separado (Figura 19A) puede deberse a que ambos son necesarios para que se produzca la interacción, o a que existe una pequeña secuencia de la proteína que se encuentra entre ambos que se rompe al dividir el fragmento NTF. Para estudiar la interacción de R3B2 con los dominios de HspA12a se tuvo en cuenta la estructura general de este tipo de proteínas Hsp70, previamente descrita (Apartado I. 3. 1.) (Figura 19C), y se generaron plásmidos y estirpes de levadura que expresaban el dominio de unión a nucleótido y otros que expresan la región correspondiente al dominio de unión a sustrato, aunque este último no se mantiene conservado en la familia de las chaperonas HspA12. El análisis con estas estirpes reveló que la región de HspA12a implicada en la interacción con R3B2 es la SBD (Figura 19D), que corresponde al extremo carboxilo terminal (Figura 19C).

Por último, se realizó un ensayo para comprobar si HspA12a interacciona consigo misma. La ausencia de crecimiento de los diploides que expresaban simultáneamente la proteína fusionada al dominio AD y BD de GAL4 en los medios selectivos para la interacción (Figura 19E) sugiere la proteína HspA12a no forma dímeros (Figura 19E).



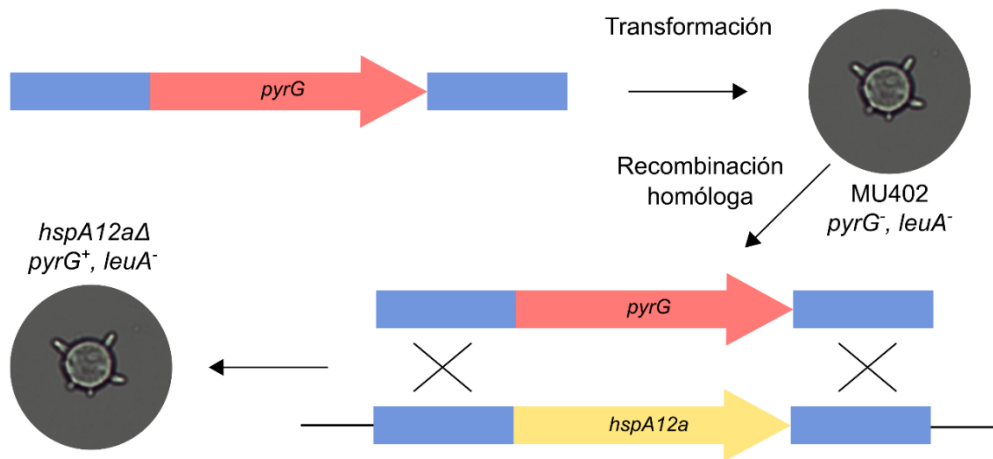
**Figura 19. Ensayo de interacción por doble híbrido de la HspA12a y las proteínas del silenciamiento.** **A)** Ensayo de interacción de la proteína HspA12a con las proteínas del silenciamiento génico en *M. lusitanicus* y distintos fragmentos de la proteína R3B2, para determinar la región específica de esta proteína implicada en la interacción. Los medios utilizados para el crecimiento de las levaduras fueron SD-WLA (-A) para selección de interacción fuerte, SD-WLH con 2,5 mM de 3AT (-H) para selección de interacción más débiles y SD-WL (+) como control de la presencia de los dos plásmidos en los diploides. **B)** Estructura de dominios de R3B2 y las diferentes regiones de esta proteína utilizadas en el ensayo de interacción. **C)** Estructura de dominios de HspA12a y los diferentes fragmentos de esta proteína utilizadas en el ensayo de interacción. **D)** Ensayo de interacción de R3B2 con HspA12a y dos fragmentos de esta, para determinar la región implicada en la interacción. **E)** Ensayo de interacción de HspA12a consigo misma. Como control positivo de interacción se incluyeron diploides de levadura expresando R3B2 fusionada tanto al dominio AD como BD del GAL4.

### III. 3. Generación de mutantes para el gen *hspA12a* y su caracterización fenotípica

#### III. 3. 1. Delección del gen *hspA12a* de *M. lusitanicus*

Para la delección del gen *hspA12a* fue necesaria la construcción de un fragmento de DNA que contenía el gen *pyrG*, el cual complementa la auxotrofia para el uracilo de la estirpe MU402 (*pyrG*<sup>-</sup>, *leuA*<sup>-</sup>), flanqueado a ambos lados por aproximadamente 1 kb de las regiones adyacentes al gen *hspA12a* en el genoma del hongo. Esta construcción se generó a partir de una PCR de fusión, en la que se utilizaron fragmentos de DNA de las dos regiones adyacentes al gen *hspA12a* y del gen *pyrG*, anteriormente amplificadas por PCR. Para la amplificación de los fragmentos adyacentes a *hspA12a* se utilizaron los cebadores Chap UFow (EcoRI) y Chap URev (*pyrG*), para la región aguas arriba, y Chap DFow (*pyrG*) y Chap DRev (HindIII), para la región aguas abajo (Tabla 4). Para amplificar el gen *pyrG* se utilizaron los cebadores *pyrGFow2kb* y *pyrGRev2Kb* (Tabla 4). Esta PCR de fusión dio como resultado un fragmento de DNA de aproximadamente 4 kb, que fue utilizado en la transformación de *M. lusitanicus*. La transformación de protoplastos de *M. lusitanicus* con este fragmento de DNA buscaba que, mediante recombinación homóloga por las regiones adyacentes del gen *hspA12a*, se reemplace este gen por el gen *pyrG* (Figura 20).

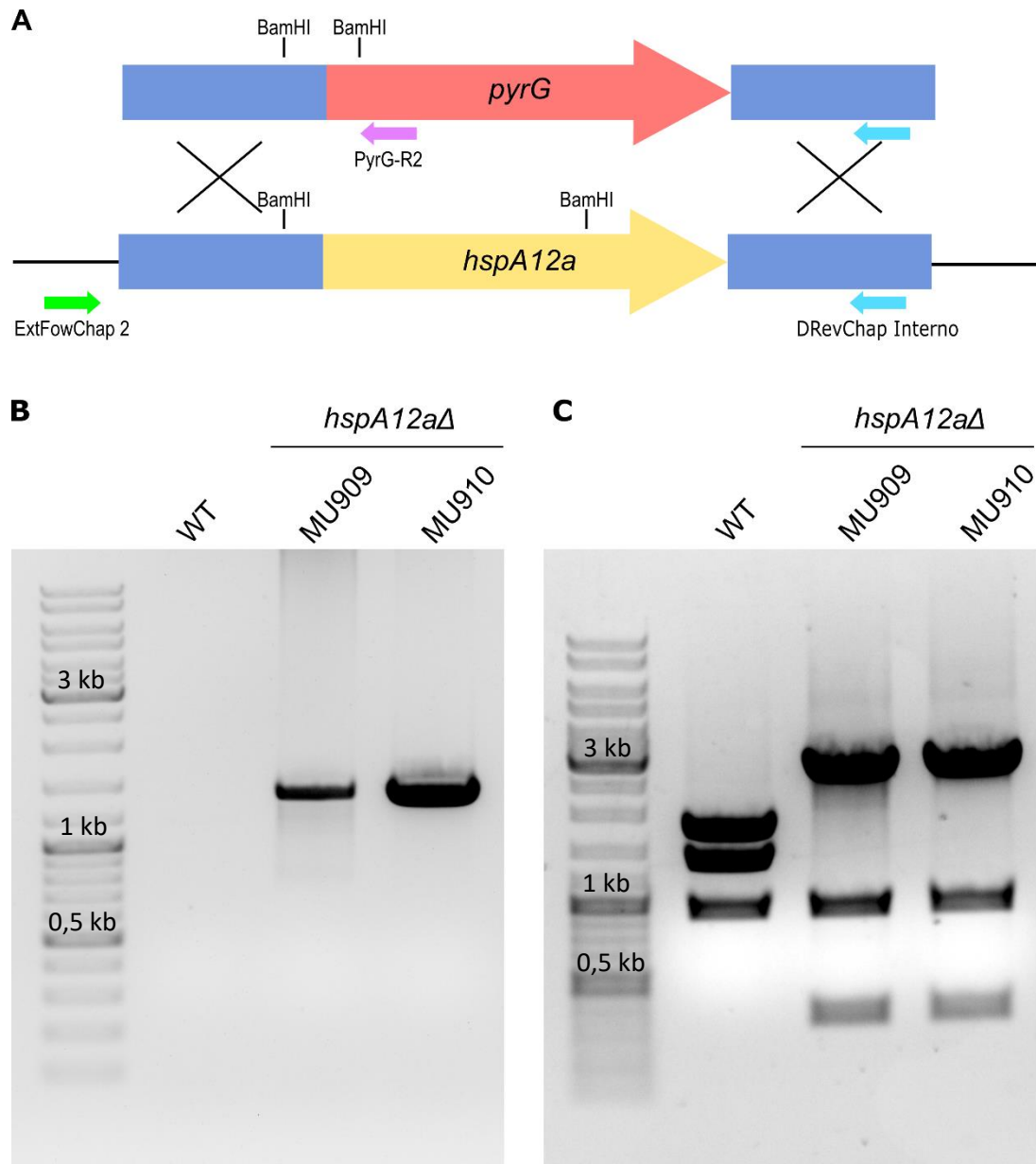
Protoplastos multinucleados de la estirpe MU402 (*leuA*, *pyrG*<sup>-</sup>) se transformaron con el fragmento de DNA construido para la delección. Tras la siembra en medio selectivo (MMC 3,2 sin uridina y con 0,5 M de sorbitol), se obtuvieron 7 transformantes, a los que se les realizó una serie de ciclos asexuales de crecimiento (pases) en medio selectivo (MMC 3,2 sin uridina) para favorecer un enriquecimiento en núcleos que han incorporado el fragmento de DNA, con el objetivo de obtener estirpes homocariontes con todos sus núcleos transformados. De los 7 transformantes obtenidos se analizó su DNA para determinar si se había producido la delección del gen *hspA12a* y eran homocariontes para la misma, siendo 2 los transformantes en los que se identificó esta delección. El número de pases que se realizaron para favorecer la homocariosis de núcleos transformados fueron 6 y 10 para las dos estirpes seleccionadas.



**Figura 20. Procedimiento de obtención de mutantes en *M. lusitanicus*.** Los bloques azules representan las regiones de 1 kb que flanquean al gen *hspA12a*. La doble recombinación (aspas) por estas regiones produce la sustitución de ese gen por el marcador *pyrG*.

Para comprobar la delección del gen se realizó una PCR utilizando un cebador del gen *pyrG* (PyrG-R2) y otro del locus *hspA12a*, que hibridaba fuera de las regiones de este gen presentes en el fragmento de delección (ExtFowChap) (Figura 21A). Esta PCR permite comprobar la delección del gen, ya que solo es posible que se produzca amplificación, con un producto de PCR de tamaño conocido (1,4 kb en este caso), si esta ha ocurrido. La presencia de un producto de amplificación de 1,4 kb en los dos transformantes seleccionados (Figura 21B) confirmó que en ambos casos se había producido la sustitución del gen *hspA12a* por el marcador *pyrG*. En una segunda PCR se analizó la homocariosis de los transformantes. Para ello, se utilizaron los cebadores ExtFowChap y DRevChap Int (Figura 21A) que permitieron amplificar el locus completo, tanto si el núcleo es silvestre y está el gen *hspA12a*, como si es mutante y se encuentra el marcador *pyrG*. Los fragmentos obtenidos en la PCR a partir de ambos tipos de núcleos tenían un tamaño parecido, de 4 kb, por lo que para diferenciar uno del otro fue necesario hacer una digestión con la enzima de restricción BamHI, que generaba patrones de bandas específicos para cada caso (Figura 21A). El patrón de bandas esperado a partir del núcleo mutante era de 2,81 kb, 0,93 kb y 0,35 kb, mientras que para los núcleos silvestres era 1,75 kb, 1,37 kb y 0,93 kb. Los dos transformantes mostraron exclusivamente el patrón de bandas mutante (Figura 21C) confirmando que portaban la delección del gen *hspA12a* en homocariosis, recibiendo el nombre de MU909 y MU910.

### III. Resultados



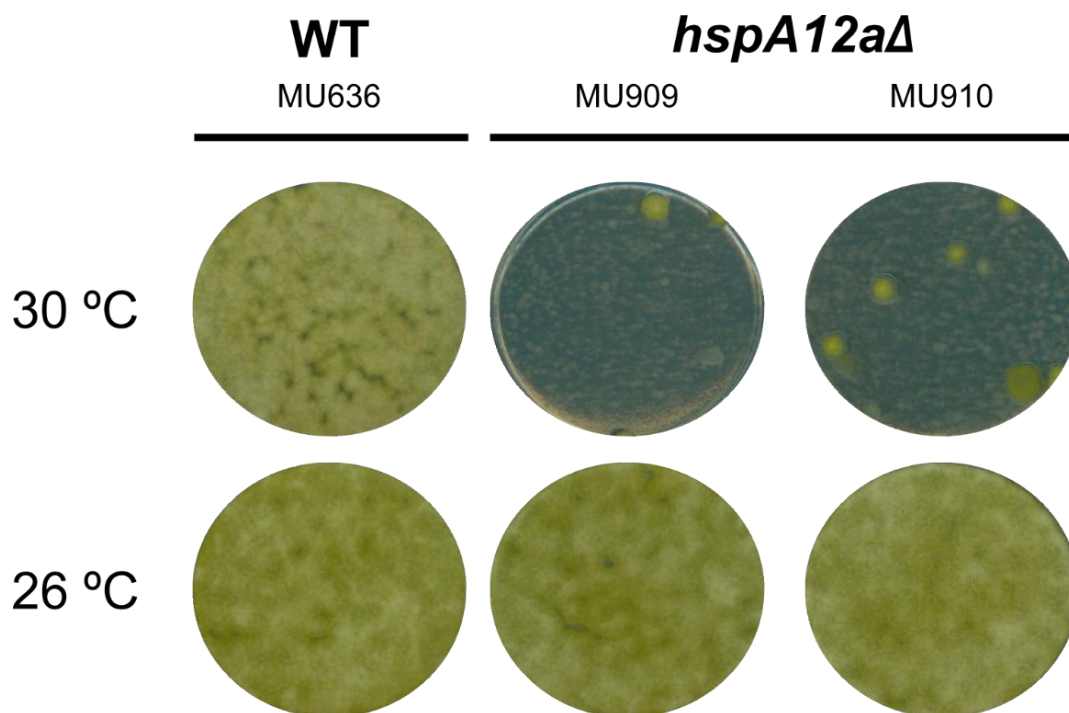
**Figura 21. Análisis por PCR de la interrupción del gen *hspA12a*.** **A)** Esquema de la recombinación homóloga realizada para la sustitución del gen *hspA12a* por el marcador *pyrG*. Se muestran en él los cebadores utilizados en las PCRs de comprobación. **B)** Productos de la PCR realizada con DNA de los transformantes (MU909 y MU910) y de la estirpe control MU636 (WT) con los cebadores ExtFowChap y PyrG-R2. Los transformantes muestran un producto de PCR de tamaño cercano a 1,4 kb, el cual solo se podía obtener en aquellas estirpes donde se hubiese producido la sustitución del gen. **C)** Digestión con la enzima BamHI de los productos de PCR amplificados con los cebadores ExtFowChap y DRevChap Int en los transformantes y la estirpe control (WT). Los núcleos silvestres debían producir tres fragmentos de 1,75 kb, 1,37 kb y 0,93 kb, mientras que en aquellas estirpes homocarióticas para la delección solo debían presentar fragmentos de 2,81 kb, 0,93 kb y 0,35 kb.



### III. 3. 2. Termorresistencia del mutante en *hspA12a*

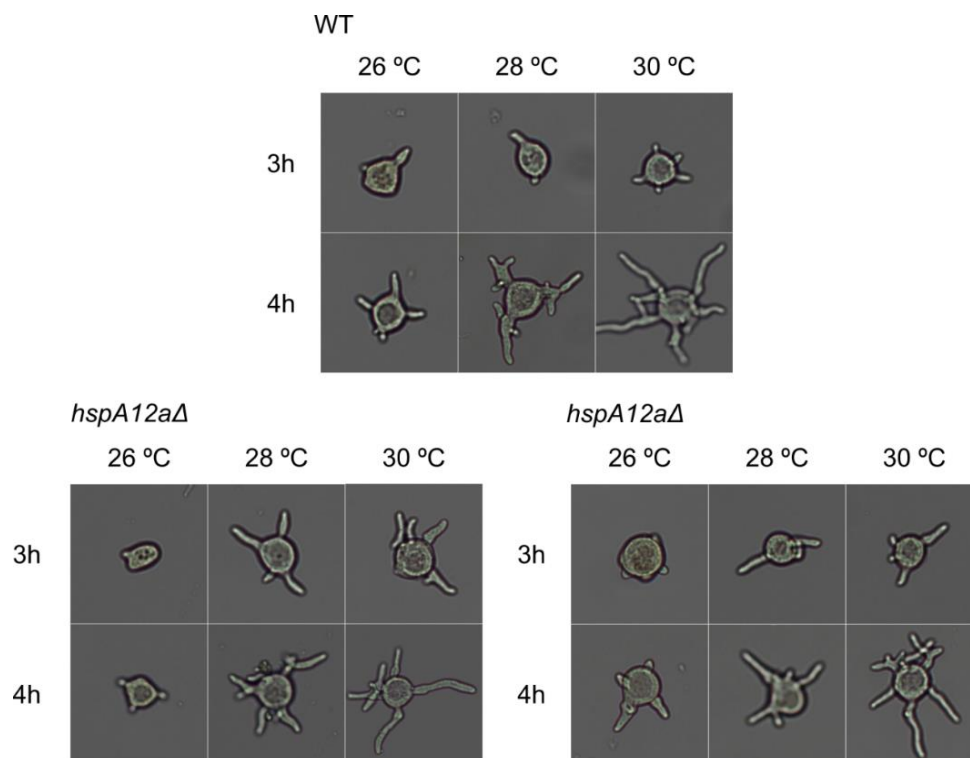
Debido a la relación que existe entre las proteínas Hsp70 y la respuesta ante diferentes estreses (Rosenzweig *et al.*, 2019), por su implicación en la protección de la célula ante los mismos, se realizó una caracterización fenotípica de la resistencia de los mutantes en *hspA12a* a temperaturas superiores a 26 °C, que es la temperatura óptima para el crecimiento de *M. lusitanicus*. De entre todos los estreses relacionados con las Hsp70, la temperatura siempre ha adquirido un papel principal con este tipo de proteínas, lo que hizo pensar que la ausencia de HspA12a podría provocar un defecto en el crecimiento del hongo a temperaturas superiores a 26 °C, lo que podría conllevar, además, un defecto en la capacidad virulenta de este hongo patógeno para humanos.

Con el objetivo de analizar el crecimiento de estos mutantes a 30 °C, se realizaron siembras de esporas (500 por caja) en medio MMC 3,2 de las estirpes mutantes, usando como control la estirpe MU636, que porta el gen silvestre para *hspA12a* y presenta la misma auxotrofia para leucina que los transformantes. Tras 48 horas de incubación a 30 °C en oscuridad, para eliminar la influencia de otros factores ambientales como la luz, se observó que ambas estirpes mutantes mostraban un claro defecto en el crecimiento a 30 °C (Figura 22). Este defecto parecía afectar solo al crecimiento y no a la germinación a 30 °C porque todas las esporas sembradas fueron capaces de germinar, pero solo unas pocas formaron un pequeño micelio, mientras que la mayoría parecía que detuvo su crecimiento tras la formación de unas pocas hifas (Figura 22). Por el contrario, en estas condiciones, todas las esporas de la estirpe control formaron colonias bien definidas que crecieron perfectamente. Este fenotipo de pobre crecimiento a 30 °C que mostraron los mutantes en el gen *hspA12a* también se observó en otros medios, como en medio rico YPG con el mismo pH.



**Figura 22. Crecimiento de los mutantes en *hspA12a* a 30 °C.** Las imágenes mostradas corresponden a la estirpe control MU636 (WT) y a las estirpes mutantes para el gen *hspA12a*. Se sembraron 500 esporas por placa de cada una de las estirpes en medio MMC pH 3,2 y se crecieron a 26 °C y 30 °C durante 48 horas.

Tras observar este fenotipo de los mutantes, se quiso comprobar si este defecto en el crecimiento podría deberse a un retraso en la germinación de las esporas. Para ello, se realizó un ensayo de germinación siguiendo las condiciones que se utilizan para germinar las esporas en los experimentos de transformación. Así, cultivos líquidos en medio YPG a un pH de 4,5 inoculados con  $5 \times 10^6$  esporas/ml se mantuvieron toda la noche en oscuridad a 4 °C para favorecer la germinación (Figura 23). Al día siguiente, los cultivos se mantuvieron en agitación a diferentes temperaturas (26 °C, 28 °C y 30 °C) y en condiciones de oscuridad. La observación de las esporas a las 3 y 4 horas permitió determinar que la germinación de las estirpes mutantes no mostraba diferencias significativas con relación a la velocidad de germinación en comparación con la estirpe control (MU636). Además, se pudo observar que la germinación se producía antes a las temperaturas más altas (28 °C y 30 °C), tanto en la estirpe control como en las estirpes mutantes para el gen *hspA12a*, lo que sugiere que las estirpes mutantes no presentan un defecto en la germinación.



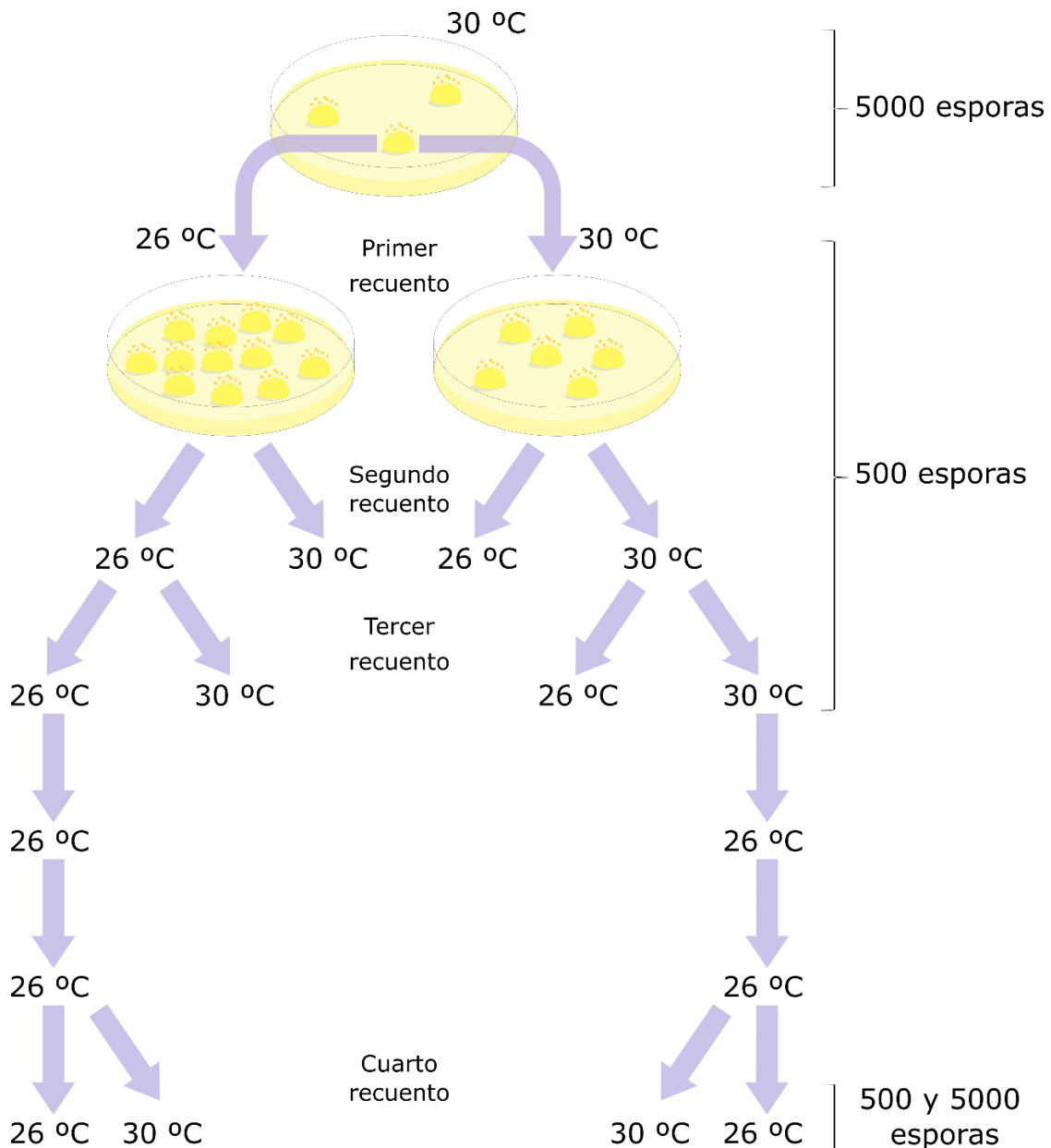
**Figura 23. Caracterización de la germinación de las estirpes mutantes en el gen *hspA12a*.** Imágenes representativas de la germinación de las estirpes mutantes MU909 (izquierda) y MU910 (derecha) y la estirpe control MU636 (WT) a las 3 y 4 horas de comenzar la incubación a las temperaturas indicadas. Se inocularon  $25 \times 10^7$  esporas de cada una de las estirpes en 50 ml de medio YPG 4,5, a 26 °C, 28 °C y 30 °C.

### III. 3. 3. Caracterización de las colonias supervivientes a 30 °C de los mutantes en *hspA12a*

Como se ha mostrado anteriormente, la mayoría de las esporas de las estirpes mutantes MU909 y MU910 detenían su crecimiento tras la germinación y no producían colonias densas a 30 °C, en clara contraposición a lo que ocurría con la estirpe control, donde el micelio crecido a partir de las esporas cubría por completo la caja (Figura 22). No obstante, un porcentaje pequeño de las esporas sembradas ( $\ll 1\%$ ) de los mutantes sí formaban colonias de tamaño y densidad similares a las formadas por las esporas de la estirpe control, sugiriendo una reversión al fenotipo silvestre. Con el objetivo de indagar en las causas del crecimiento diferencial de ese pequeño porcentaje de esporas, se realizó un estudio del fenotípico de estos individuos durante varios ciclos asexuales de crecimiento (pases) recogiendo y sembrando esporas a diferentes temperaturas.

### III. Resultados

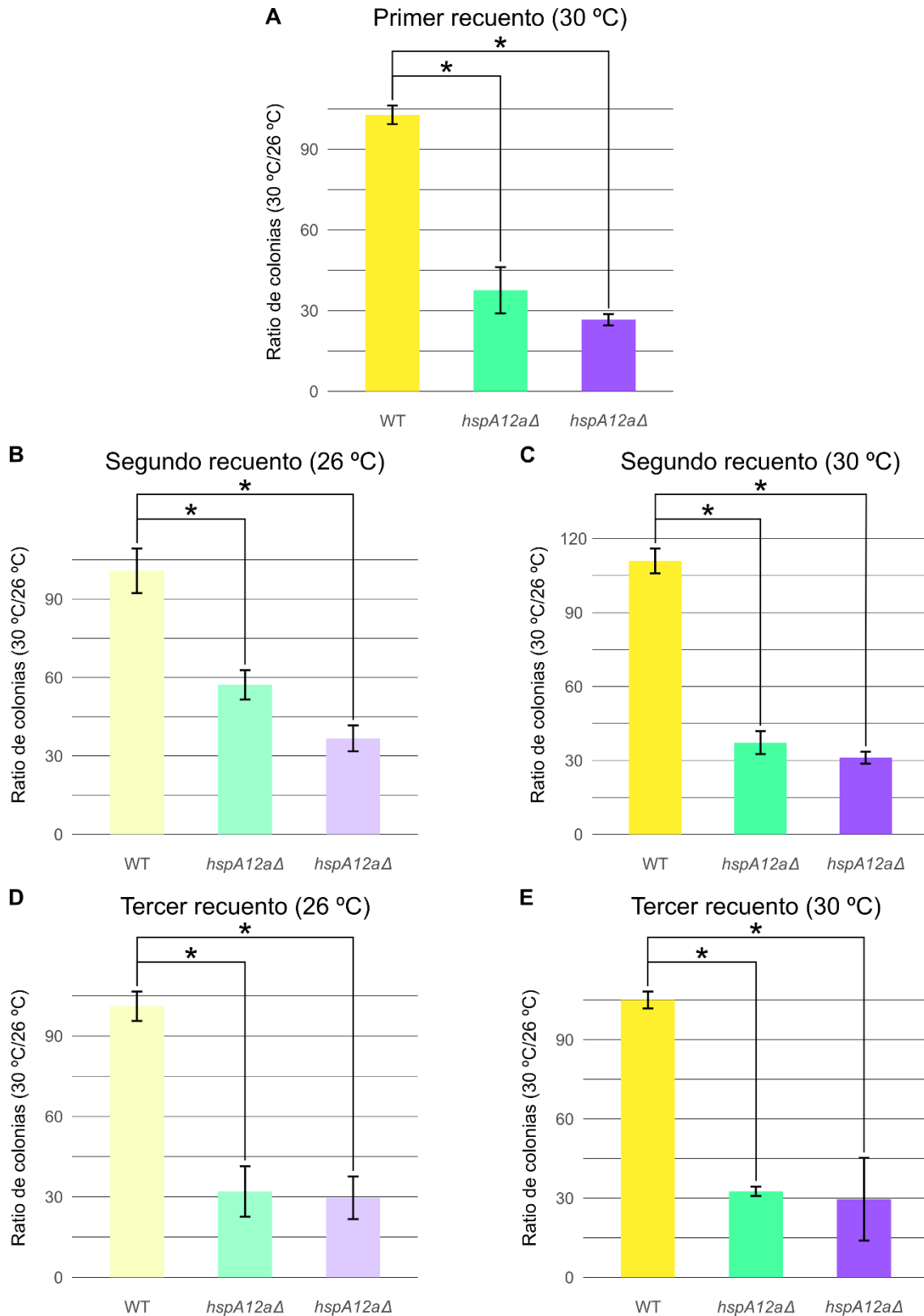
Con esto se quería comprobar si el mejor crecimiento de esas colonias era un carácter heredable y estable. Para llevar a cabo este ensayo, se incubaron en un primer paso  $5 \times 10^3$  esporas por caja para garantizar que hubiese suficientes colonias de fenotipo silvestre debido a su baja frecuencia. A partir de este primer paso se redujo la cantidad de esporas sembradas por caja a 500, con la intención de poder hacer un recuento de los individuos crecidos a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  en relación con los crecidos a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 24).



**Figura 24. Esquema del ensayo con los individuos supervivientes a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .** Se muestra en el esquema los diferentes pasos realizados durante el ensayo, las condiciones de temperatura y el número de esporas sembradas por caja de las distintas estirpes.

Tras la primera siembra en medio MMC pH 3,2 se seleccionaron tres colonias capaces de crecer a 30 °C de cada una de las estirpes mutantes y tres de la estirpe control MU636, con las que se realizó el proceso descrito en la Figura 24. De cada uno de los individuos seleccionados se trasplantó una porción de micelio a medio sólido YPG pH 3,2, para promover la esporulación, y se incubó a 30 °C. Las esporas recogidas de cada individuo se volvieron a sembrar en medio MMC pH 3,2 a 26 °C y 30 °C, pero esta vez usando 500 esporas por caja para poder hacer el primer recuento. Después de haber realizado este recuento, se volvió a realizar el mismo proceso, por el cual los individuos se crecieron en YPG manteniendo la temperatura a la que se encontraban (26 °C o 30 °C), se recogieron esporas y, posteriormente, se sembraron 500 esporas de cada una de las líneas en medio MMC pH 3,2 a 26 °C y 30 °C para realizar el segundo recuento. De esta manera se tuvieron cuatro condiciones distintas para cada uno de los individuos seleccionados originalmente: la línea que provenía de 30 °C se sembró en 26 °C y 30 °C, y del mismo modo la línea que provenía de 26 °C. Este paso volvió a realizarse de nuevo, repitiendo las siembras realizadas anteriormente, con el objetivo de comprobar la evolución de los individuos que se han encontrado durante los últimos pasos a una sola temperatura. Para el tercer recuento solo se utilizaron los individuos que habían crecido en todo momento a 30 °C o 26°C con el objetivo de observar solo la evolución de estos individuos cuando se mantienen varios ciclos a estas temperaturas. Por lo tanto, se volvieron a tener cuatro condiciones en este paso. Tras los recuentos realizados durante estos tres pasos, se analizó la proporción de esporas capaces de formar colonias a 30 °C en relación con 26 °C (Figura 25).

### III. Resultados



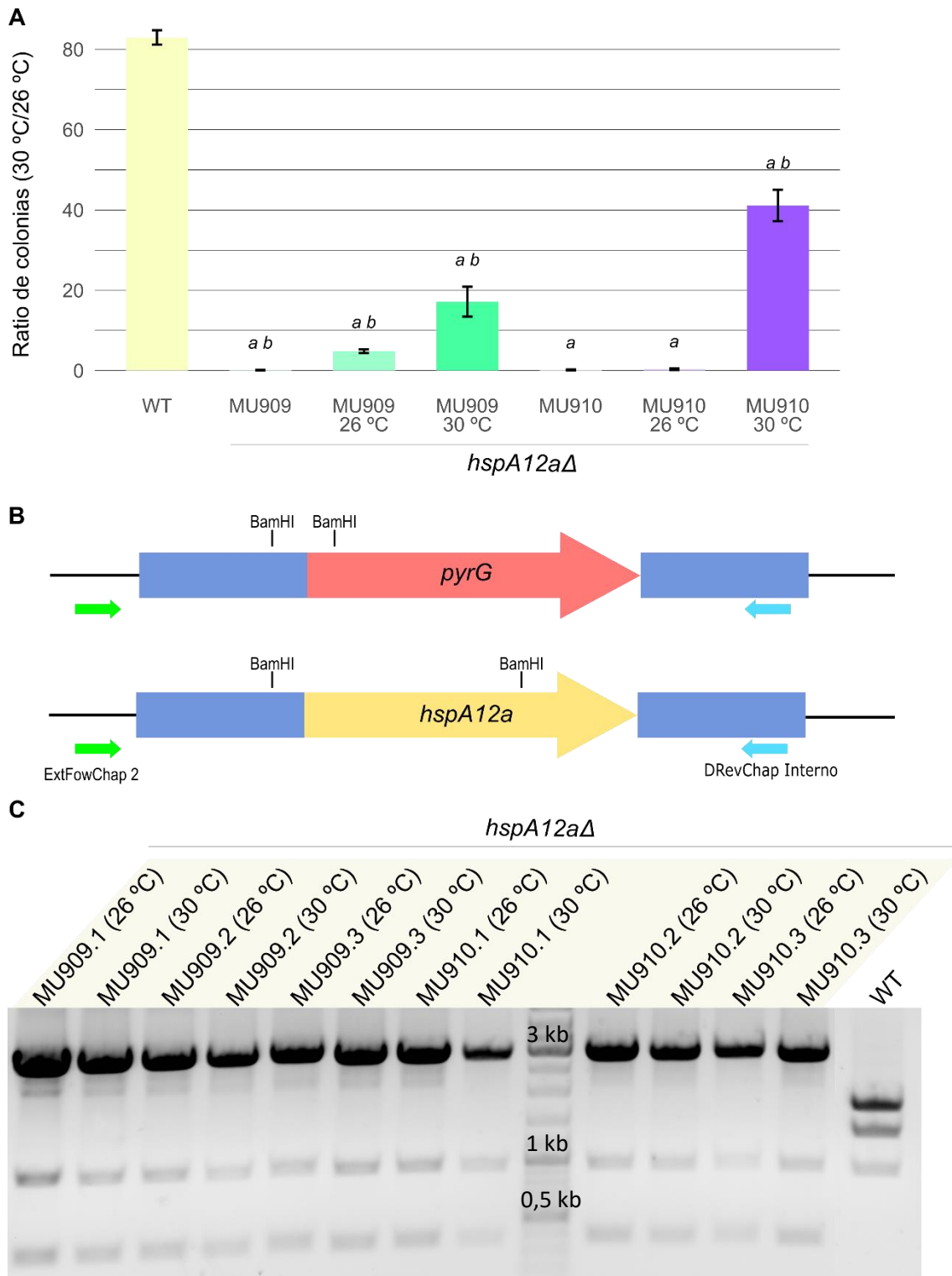
**Figura 25. Comparativa de colonias formadas a 26 °C y 30 °C de los individuos supervivientes a 30 °C.** Se representan, de manera porcentual, la ratio de colonias formadas a 30 °C respecto a las formadas a 26 °C en los distintos recuentos realizados ( $N^{\circ}$  colonias a 30 °C /  $N^{\circ}$  colonias a 26 °C x 100). En amarillo se representa a la estirpe

WT (MU636) y en verde y violeta las estirpes mutantes para *hspA12a* (MU909 y MU910, respectivamente). **A)** Relación de las colonias formadas a 30 °C y 26 °C en el primer recuento, proviniendo las esporas de individuos crecidos a una temperatura de 30 °C. **B)** Relación de las colonias formadas a 30 °C y 26 °C en el segundo recuento, proviniendo las esporas de individuos crecidos a una temperatura de 26 °C. **C)** Relación de las colonias formadas a 30 °C y 26 °C en el segundo recuento, proviniendo las esporas de individuos crecidos a una temperatura de 30 °C. **D)** Relación de las colonias formadas a 30 °C y 26 °C en el tercer recuento, proviniendo las esporas de individuos crecidos a una temperatura de 26 °C. **E)** Relación de las colonias formadas a 30 °C y 26 °C en el tercer recuento, proviniendo las esporas de individuos crecidos a una temperatura de 30 °C. El asterisco (\*) indica una diferencia significativa en una prueba t de Student de dos colas de muestras desapareadas ( $P \leq 0,05$ ).

Como se puede observar con estos datos, las esporas que habían pasado por 30 °C produjeron aproximadamente un 30 % de colonias que consiguieron crecer a 30 °C del total de colonias formadas a 26 °C, un porcentaje mucho mayor al que se obtuvo en una primera siembra, que se encontraba entre el 0,1 % y el 0,2 % (Figura 26A). El porcentaje de 30 % se obtuvo en todos los recuentos, incluso cuando las esporas habían pasado por tres ciclos asexuales de crecimiento a 26 °C, sugiriendo que este fenotipo era heredable y estable al menos durante tres ciclos.

Después de estos tres recuentos se mantuvieron, las dos líneas que habían permanecido estos últimos pases a 26 °C o 30 °C, durante tres pases más a 26 °C, sin realizar recuento de individuos hasta el último pase. El objetivo era determinar si este fenotipo de supervivencia del 30 % se mantenía estable en condiciones no selectivas, es decir, a 26 °C (Figura 26). Para este paso se seleccionó una colonia de cada línea de las estirpes MU909 y MU910, de la que se obtendrían esporas para un cuarto recuento, y esporas de estos mutantes que no habían sido expuestas a 30 °C. Debido a que podrían no aparecer colonias supervivientes utilizando 500 esporas, se realizaron siembras de 500 y  $5 \times 10^3$  esporas de todos los individuos.

### III. Resultados



**Figura 26. Caracterización de los individuos utilizados en el ensayo de supervivencia a 30 °C.** **A)** Recuento de individuos realizado al final del ensayo de supervivencia a altas temperaturas. En este ensayo se han utilizado las dos líneas de los individuos inicialmente seleccionados (26 °C y 30 °C), además de esporas de estas mismas estirpes que no han sido sembradas con anterioridad a 30 °C. Se utilizó la estirpe MU636 como estirpe silvestre tolerante a temperaturas de 30 °C. **B)** Esquema



del locus para el gen *hspA12a*, en las estirpes mutantes y silvestre, donde se indican los cebadores utilizados para la comprobación de homocariosis por PCR. **C)** Digestión con la enzima BamHI del producto de PCR amplificado con los cebadores ExtFowChap y DRevChap Int en los individuos derivados de MU909 y MU910, utilizados en el ensayo, y la estirpe control MU636. En el genotipo silvestre se producen tres fragmentos de 1,75, 1,37 y 0,93 kb, mientras que en aquellas estirpes donde se haya producido la sustitución del locus en todos sus núcleos solo se verán tres bandas de 2,81, 0,93 y 0,35 kb (ver apartado III.3.1.). Las letras mostradas (<sup>a</sup> <sup>b</sup>) indican una diferencia significativa en una prueba t de Student de dos colas de muestras desapareadas ( $P \leq 0,05$ ).

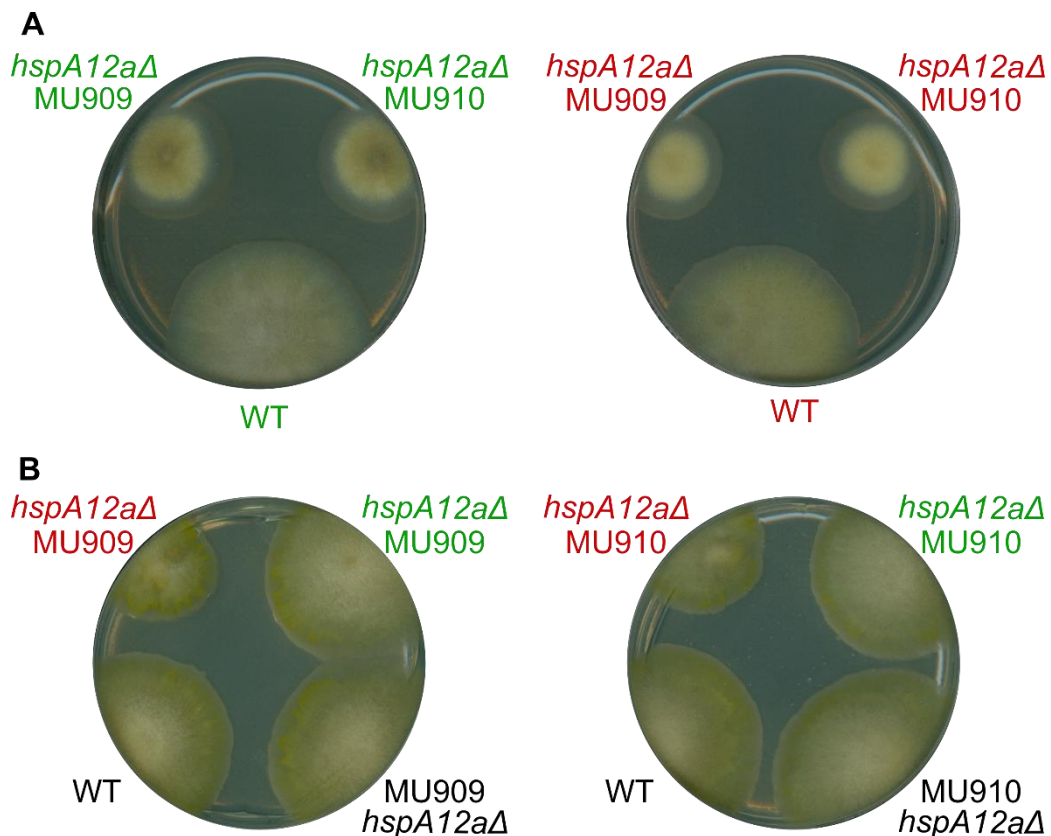
<sup>a</sup>Diferencias significativas con respecto a la estirpe control MU636.

<sup>b</sup>Diferencias significativas con respecto al resto de condiciones de la misma estirpe.

El porcentaje de esporas capaces de formar colonias a 30 °C de las estirpes MU909 y MU910 que nunca habían estado a temperaturas superiores a 26 °C rondó el 0,1-0,2 % del total de las esporas sembradas (Figura 26A), tal como ya se había observado previamente. En cambio, las líneas derivadas de estos mutantes que se habían mantenido todo el tiempo a 30 °C siguieron mostrando porcentajes altos (17-30 %) de supervivencia a esa temperatura. Por último, las esporas provenientes de aquellos supervivientes a 30 °C que se mantuvieron a 26 °C desde su selección, mostraron un porcentaje de supervivencia mucho más bajo, llegando alguno incluso a cifras similares a aquellos individuos que no se habían incubado a temperaturas elevadas. Por lo tanto, parecía que se estaba observando una reversión del fenotipo de estas estirpes, que era heredable, pero que se perdía en medio selectivo tras seis pases a 26 °C. Para confirmar que esa reversión fenotípica no se debía a la presencia de núcleos silvestres que pudieran devolver a los individuos a su fenotipo original, se realizó una comprobación del tipo de núcleos, silvestres y/o mutantes, presentes en los diferentes individuos analizados. El resultado de este análisis puso de manifiesto que en todos los casos había sólo núcleos mutados, es decir, todos los micelios carecían del gen *hspA12a* (Figura 26C), por lo que las diferencias fenotípicas observadas debían ser resultado de otro tipo de alteración y, como el paso por una temperatura normal de crecimiento para *M. lusitanicus* como es la de 26 °C restablecía el fenotipo del parental, posiblemente epigenética.

### III. Resultados

Para comprobar si las colonias de los mutantes que crecían a 30 °C presentaban un desarrollo micelial normal a 26 °C se realizó un análisis del crecimiento vegetativo en dos puntos del ensayo (Figura 27). El primero de ellos se realizó en el tercer recuento, mientras que el segundo se realizó en el paso previo a la última siembra, donde se observó como algunas líneas estaban recuperando el fenotipo original mutante.

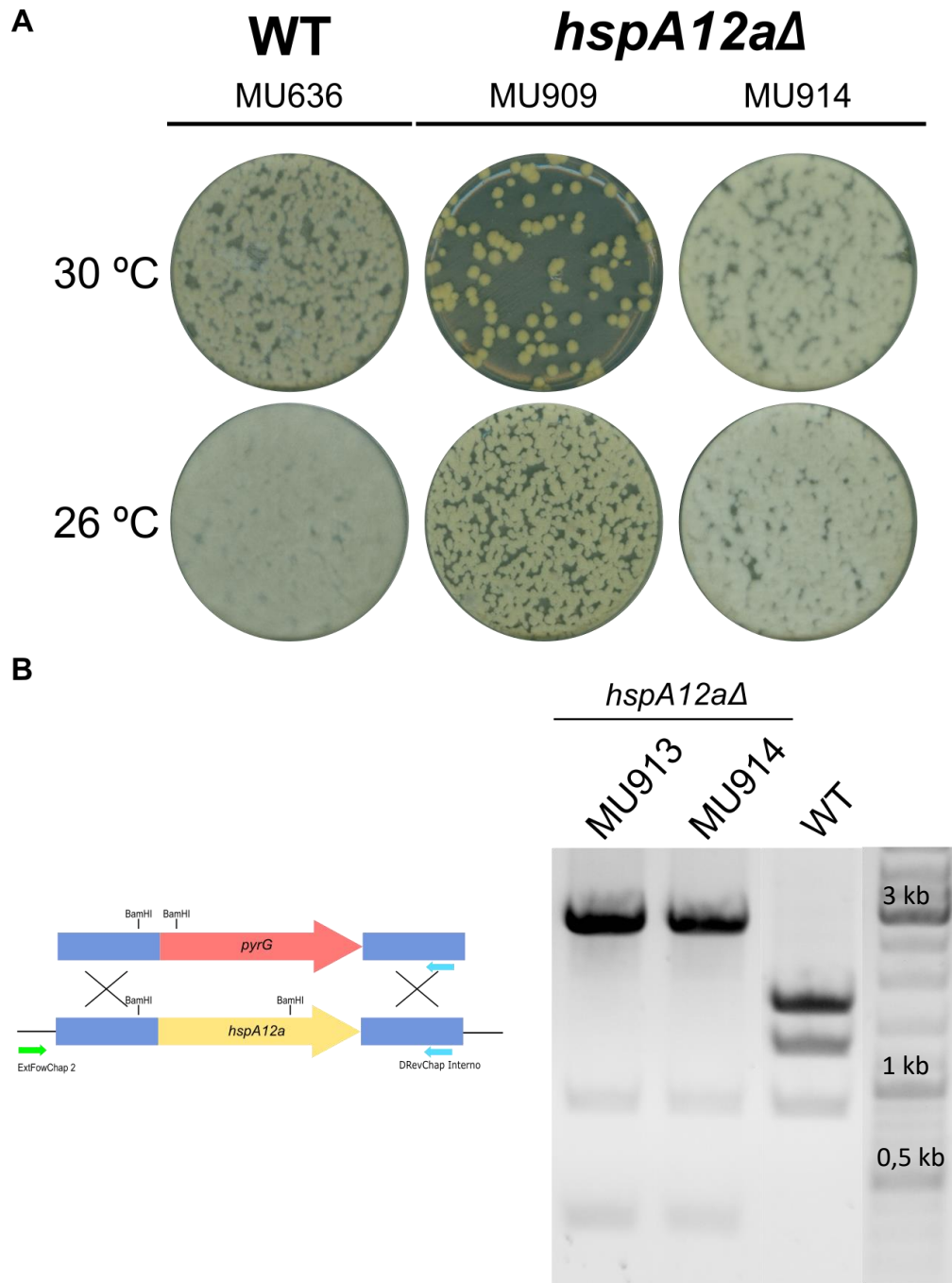


**Figura 27. Análisis del crecimiento micelial a 26 °C de las estirpes implicadas en el ensayo de supervivencia a 30 °C. A)** Imágenes tomadas de las líneas utilizadas en el ensayo, provenientes de las colonias supervivientes, tanto las que crecieron durante el ensayo a 26 °C (verde) como a 30 °C (rojo). Ensayo realizado con colonias del tercer recuento. **B)** Imágenes tomadas de las líneas utilizadas en el ensayo, provenientes de las colonias supervivientes, tanto las que crecieron durante el ensayo a 26 °C (verde) como a 30 °C (rojo), además de utilizar las estirpes originales, las cuales no han pasado por temperaturas de 30 °C (negro). Ensayo realizado en el paso previo a la última siembra. Estos análisis se llevaron a cabo incubando una gota de esporas de cada una de las estirpes en medio YPG pH 3,2 durante 5 días.

Los individuos seleccionados a 30 °C que se habían mantenido a 26 °C durante tres ciclos mostraron un crecimiento reducido, similar al que mostraban los individuos equivalentes que habían permanecido a 30 °C (Figura 27A). Por tanto, estos resultados sugirieron que la capacidad de formar colonias a 30 °C estaba asociada a una menor capacidad de crecimiento micelial. El incremento del número de pases a 26 °C resultó en un crecimiento que se asemejó más a los de la estirpe original y la estirpe control MU636 (Figura 27B). Por el contrario, los individuos que habían permanecido todo el tiempo a 30 °C siguieron mostrando un crecimiento micelial reducido hasta el final del experimento (Figura 27B), al igual que se ocurrió con la capacidad de formar colonias a 30 °C (Figura 26A). Por tanto, el fenotipo de crecimiento micelial se iba revertiendo con el paso de las generaciones en condiciones no selectivas, lo que apoyaría que el efecto se deba a una causa epigenética.

#### **III. 3. 4. Caracterización de los mutantes en *hspA12a* con fenotipo silvestre e identificación de los genes implicados en su reversión fenotípica.**

En los experimentos para determinar si la reversión al fenotipo silvestre a 30 °C de los mutantes para *hspA12a* era heredable y estable, se aislaron dos estirpes derivadas de MU909 que mostraban un fenotipo similar al de la estirpe control MU636, es decir, 100 % de supervivencia a 30 °C (Figura 28A). Para descartar una posible contaminación con esporas de alguna estirpe silvestre, se comprobó mediante PCR que ambas estirpes carecían del gen *hspA12a* (Figura 28B). El fenotipo de crecimiento a 30 °C se mantuvo en sucesivas generaciones, indicando que debía ser resultado de alguna mutación en el genoma de estas estirpes, que se denominaron MU913 y MU914.



**Figura 28. Caracterización del crecimiento a altas temperaturas de la estirpe con alta supervivencia a 30 °C procedente de MU909. A)** Crecimiento de las estirpes MU636 (WT), utilizada como control de crecimiento, MU909, tras haber sido sembrada previamente a 30 °C, y MU914, revertiente fenotípico de MU909. Se sembraron 500 esporas de cada una de las estirpes en medio MMC 3,2, que se incubaron a 26 °C y 30 °C durante 5 días. **B)** Digestión con la enzima BamHI del producto de PCR amplificado con los cebadores ExtFowChap y DRevChap Int en los mutantes con reversión del fenotipo y la estirpe control MU636 (WT). En el genotipo silvestre se debían producir tres fragmentos de 1,75 kb, 1,37 kb y 0,93 kb, mientras que las estirpes homocariontes para la delección se debían observar solo tres fragmentos de 2,81 kb, 0,93 kb y 0,35 kb.

Se muestra a la izquierda del gel el esquema de ambos loci para indicar la posición de los cebadores usados en las PCR y los puntos de corte de la enzima de digestión.

Con el objetivo de conocer la causa de esta reversión fenotípica, se procedió a secuenciar el genoma de ambas estirpes, MU913 y MU914, junto con la estirpe parental MU909, para identificar las posibles mutaciones causantes de este aumento en el porcentaje de supervivencia a 30 °C. La secuenciación del genoma completo se realizó con un equipo de secuenciación masiva (MiSeq System de Illumina). Las secuencias de las tres estirpes que mapean en el genoma de *M. lusitanicus* se analizaron con el programa CLC Genomics Workbench 20.0 (<https://digitalinsights.qiagen.com>) y la plataforma web de Galaxy (Afgan *et al.*, 2018) para identificar cambios que aparecían en las estirpes revertientes y estaban ausentes en la estirpe parental. La búsqueda de variantes se centró en mutaciones puntuales por cambio de base, inserciones, deleciones y variantes estructurales. De estas se seleccionaron aquellas que se encontraban en un gen o en regiones próximas a uno y que pudieran afectar a su expresión.

**Tabla 5. Listado de mutaciones localizadas en genes o en regiones próximas a genes en las estirpes MU913 y MU914.**

Estirpe	ID	Función	Tipo de mutación	% Homocariosis	Localización	Scaffold
MU913	182750	$\beta$ -1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa	Variación de nucleótido	100	Exón	S2: 15687
MU913	87421 <sup>a</sup>	Repetición rica en leucina (interacción proteína-proteína)	Inserción	81,25	Aguas abajo	S2: 4961162-4961163
MU914	135024	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP	Variación de nucleótido	100	Exón	S1: 324730
MU914	72570 <sup>a</sup>	Quinasa de serina/treonina	Variación de nucleótido	100	Intrón	S2: 1074836
MU914	160432	Helicasa de DNA/RNA	Inserción	100	Intrón	S2: 3481664-3481665
MU914	152274	Peptidasa C19	Inserción	52	Intrón	S2: 4981022-4981023
MU914	109568-109569	Función desconocida-Proteína con dedo de zinc	Inserción	63,2	Aguas abajo-Aguas arriba	S4: 88661-88662
MU914	162982	GTPasa Ran	Inserción	75	Aguas arriba	S4: 2214904-2214905
MU914	153122	Sintetasa de leucil-tRNA	Delección	50,7	Aguas arriba	S4: 4165807-4165808
MU914	156514	Proteína con dedos FYVE	Inserción	84	3'UTR	S5: 2335420-2335421

### III. Resultados

<b>MU914</b>	157081-114011 <sup>b</sup>	Función desconocida-Proteína de unión a ssDNA	Delección	100	Aguas abajo-Aguas abajo	S7: 2643841
<b>MU914</b>	148106	Cotransportador de sodio-nucleósido CNT1/CNT2	Inserción	85,7	Aguas abajo	S7: 3076422-3076423
<b>MU914</b>	115761-75694 <sup>b</sup>	Posible lipasa-Función desconocida	Inserción	91,8	Aguas abajo-Aguas abajo	S11: 659586-659587

<sup>a</sup>ID de genes anotados en la versión 1 de la secuenciación de la estirpe silvestre CBS277.49.

<sup>b</sup>Varios genes afectados.

**Tabla 6. Listado de variantes estructurales localizadas en genes o en regiones próximas a genes de las estirpes MU913 y MU914.**

Estirpe	ID	Función	Tipo de mutación	% Homocariosis	Localización	Scaffold
<b>MU913</b>	106722	Función desconocida	Inserción	92,86	Aguas arriba	S2: 1499286-1499301
<b>MU913</b> <b>MU914</b>	160895	Factor de transcripción con cremallera de leucina	Inserción	95,24/ 85,71	Aguas abajo	S3: 36925-36940
<b>MU913</b>	155924	Transportador de GDP-fucosa	Compleja	102,71 <sup>c</sup>	Aguas abajo	S3: 4556384-4556483
<b>MU913</b>	156039	Proteína con dominios GRAM	Inserción	66,67	Intrón	S4: 1059458-1059477
<b>MU913</b>	110062	Subunidad H del complejo de condensina	Compleja	73,17	Aguas abajo	S4: 1545795-1545894
<b>MU913</b> <b>MU914</b>	110439	Proteína asociada a la resistencia a diferentes medicamentos (superfamilia ABC)	Inserción	83,87/ 93,10	Aguas abajo	S4: 2698105-2698119
<b>MU913</b>	117918	Proteína con repeticiones WD40	Compleja	84,21	Intrón y exón	S5: 991653-991752
<b>MU913</b>	156499-121280 <sup>b</sup>	Hipotética oxidoreductasa-Quinasa de serina/treonina de traducción de señal con un dominio sensor PAS/PAC	Compleja	84,21	Aguas abajo-Aguas abajo	S5: 2090603-2090702
<b>MU913</b>	112234	Receptores de lipoproteína de baja densidad con dominios de unión a calcio similares a EGF	Inserción	54,55	Aguas abajo	S6: 503532-503533
<b>MU913</b>	165063	Proteína con dedo de zinc	Delección	75	Intrón y exón	S6: 1586261-1586360
<b>MU913</b>	157362	Subunidad de 30 kDa de NADH deshidrogenasa	Compleja	150 <sup>c</sup>	Aguas abajo	S9: 987209-987308
<b>MU913</b>	115397 <sup>d</sup>	Función desconocida	Compleja	80,08 <sup>c</sup>	Exón e intrón	S10: 473896-473995
<b>MU913</b>	86334 <sup>a</sup> -167661 <sup>b</sup>	Ferredoxina-Fosfodiesterasa de glicerofosforil diéster	Compleja	80,08 <sup>c</sup>	Aguas abajo-Aguas abajo	S10: 824893-824992
<b>MU913</b> <b>MU914</b>	157510	Proteína con dedo de zinc	Inserción	98,51/ 98,36	Intrón	S12: 152752-152755

<b>MU913</b>	186012	Proteína conservada de función desconocida	Inserción	85,71	Aguas abajo	S13: 94075-94174
<b>MU914</b>	136814	Función desconocida	Inserción	81,25	Intrón	S1: 3373137-3373158
<b>MU914</b>	106649	Función desconocida	Inserción	75	Aguas abajo	S2: 1272108-1272207
<b>MU914</b>	78352	Diadenosina y difosfoinositol polifosfato hidrolasa	Inserción	75	Exón	S2: 2834015-2834114
<b>MU914</b>	107939	Componente del complejo del poro nuclear (sc Nup85)	Inversión	84	Exón	S3: 48370-48469
<b>MU914</b>	155924	Transportador de GDP-fucosa	Compleja	116,95 <sup>c</sup>	Aguas abajo	S3: 4556347-4556446
<b>MU914</b>	155959	Función desconocida	Inserción	94,74	Aguas abajo	S4: 41166-41265
<b>MU914</b>	155959	Función desconocida	Compleja	90	Aguas abajo	S4: 41198-41297
<b>MU914</b>	156407	Proteína con repeticiones de anquirina	Delección	73,33	Aguas arriba	S5: 1131112-1131211
<b>MU914</b>	112741	Transferasa GPI11/PIG-F de etanolamina-Fosfato	Inserción	95,65	Aguas arriba	S6: 2035814-2035913
<b>MU914</b>	153684	Hidrolasa de glicósido de la familia 3 (beta-glucosidasas)	Delección	94,74	Exón	S6: 2659163-2659262
<b>MU914</b>	113739	Hipotética proteína de membrana	Inserción	83,33	Aguas abajo	S7: 1957829-1957847
<b>MU914</b>	113949	Función desconocida	Inserción	90,48	Exón	S7: 2462430-2462444
<b>MU914</b>	167295	Función desconocida	Inserción	96,67	Intrón	S9: 654320-654336
<b>MU914</b>	Múltiples genes <sup>b</sup>	-	Inserción	77,42	-	S9: 654322-739302
<b>MU914</b>	157457	Función desconocida	Inserción	80,85	Aguas abajo	S11: 154300-154317
<b>MU914</b>	154458-115618-115620-115621 <sup>b</sup>	Glicoproteína de la matriz mitocondrial- Función desconocida- Función desconocida- Función desconocida	Delección	85,71	-	S11: 181865-204499
<b>MU914</b>	Múltiples genes <sup>b</sup>	-	Inversión	70	-	S14: 75268-154085
<b>MU914</b>	157599	Sintetasa de espermidina	Inserción	90,63	Aguas abajo	S14: 78313-78332
<b>MU914</b>	Múltiples genes <sup>b</sup>	-	Delección	59,09	-	S16: 4412-34165

<sup>a</sup>ID de genes anotados en la versión 1 de la secuenciación de la estirpe silvestre CBS277.49.

<sup>b</sup>Varios genes afectados.

<sup>c</sup>Porcentajes alterados por un fallo en el código del programa, a la espera de actualización.

<sup>d</sup>Gen afectado en la otra estirpe, también en exón e intrón y con una variante estructural distinta, pero con un porcentaje de lecturas con la alteración inferior al 50 %.

El análisis de los genomas de los revertientes fenotípicos reveló la presencia de un gran número de mutaciones en las dos estirpes, que no se detectaron en la estirpe parental (Tablas 5 y 6), lo que dificulta la selección de un gen o un grupo de genes como causantes de la reversión del fenotipo. El número de mutaciones que se encontraban en genes o en regiones próximas a

genes detectadas fue de 17 para MU913 y 33 para MU914. A pesar de ello, se identificaron cuatro genes que presentaban mutaciones en ambas estirpes y podrían ser responsables de la supresión del fenotipo mutante. Tres de los genes mostraban las mismas alteraciones en ambas estirpes, como ocurría en el caso de los genes 160895, 110439 y 157510, que codifican para un factor de transcripción con cremallera de leucina, una proteína asociada a la resistencia a diferentes medicamentos de la superfamilia ABC y una proteína con dedo de zinc, respectivamente. Por otro lado, también se encontró un gen con mutaciones en cada una de las estirpes revertientes, el gen con ID 155924 (transportador de GDP-fucosa), que posee variaciones estructurales diferentes en ambas estirpes en las regiones adyacentes (Tabla 7). Se espera que alguna de las mutaciones identificadas en estos genes comunes a las dos estirpes revertientes sea la responsable de la supresión del fenotipo de defecto de crecimiento a 30 °C de los mutantes para *hspA12a*.

**Tabla 7. Selección de variantes localizadas en genes o en regiones próximas a genes que afectan a ambas estirpes.**

Estirpe	ID	Función	Tipo de mutación	% Homocariosis	Localización	Scaffold
MU913 MU914	160895	Factor de transcripción con cremallera de leucina	Inserción	95,24/ 85,71	Aguas abajo	S3: 36925-36940
MU913	155924	Transportador de GDP-fucosa	Compleja	102,71 <sup>a</sup>	Aguas abajo	S3: 4556384-4556483
MU914	155924	Transportador de GDP-fucosa	Compleja	116,95 <sup>a</sup>	Aguas abajo	S3: 4556347-4556446
MU913 MU914	110439	Proteína asociada a la resistencia a diferentes medicamentos (superfamilia ABC)	Inserción	83,87/ 93,10	Aguas abajo	S4: 2698105-2698119
MU913 MU914	157510	Proteína con dedo de zinc	Inserción	98,51/ 98,36	Intrón	S12: 152752-152755

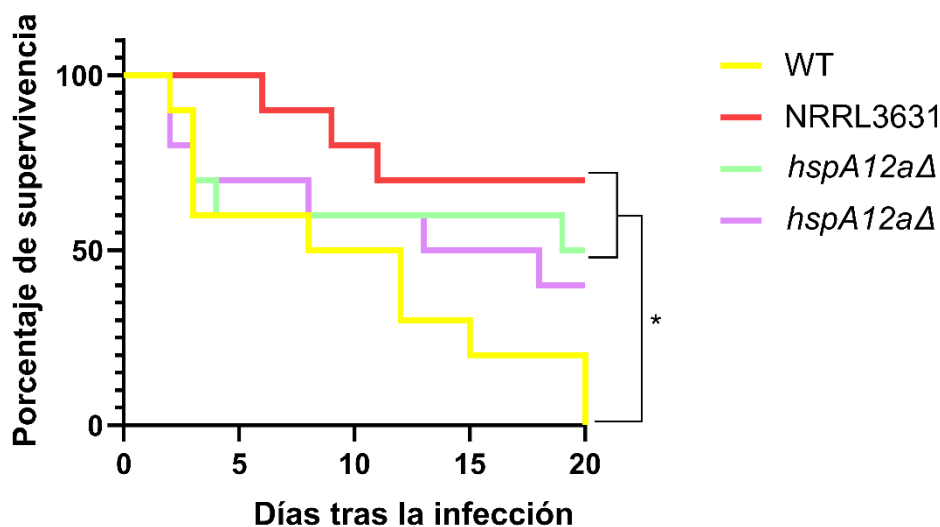
<sup>a</sup>Porcentajes alterados por un fallo en el código del programa, a la espera de actualización.

### III. 3. 5. Análisis de virulencia de las estirpes mutantes en *hspA12a*

Como se ha mencionado anteriormente, la ruta del silenciamiento no canónica NCRIP se ha relacionado con la virulencia del hongo, debido a que mutantes para distintos genes de la ruta han mostrado una reducción de su virulencia en ratón (Pérez-Arques *et al.*, 2020). Debido a la relación que existe entre el gen *hspA12a* y esta ruta, vía R3B2, y las dificultades que muestran los



mutantes en esta chaperona para crecer a 30 °C, pensamos que estas estirpes podrían mostrar una reducción de su virulencia en ratones. Para ello, se realizó un ensayo de virulencia incluyendo las dos estirpes mutantes para *hspA12a*, MU909 y MU910, y las estirpes MU636 y NRRL3631, usadas como control virulento y avirulento, respectivamente (Figura 29). A ratones macho de la estirpe OF-1, inmunosuprimidos cada cinco días con ciclofosfamida, se les inyectaron  $1 \times 10^6$  esporas de las estirpes indicadas dos días después de la primera inmunosupresión. Ambas estirpes mutantes mostraron una reducción de la virulencia respecto a la estirpe control virulenta MU636, aunque solo en una de ellas las diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 29). Además, las diferencias de estas estirpes respecto a la estirpe avirulenta NRRL3631 no son estadísticamente significativas, indicando que su virulencia es más parecida a la estirpe avirulenta, que a la estirpe virulenta. Según estos datos, las estirpes carentes de *hspA12a* muestran una reducción en su capacidad infectiva, por lo que la actividad de la proteína HspA12a parece necesaria en la virulencia del hongo.



**Figura 29. Ensayo de virulencia de mutantes *hspA12a*Δ en ratón.** Se muestra el porcentaje de supervivencia de ratones OF-1 inmunosuprimidos tras la inoculación de las esporas de las estirpes correspondientes a lo largo de los 20 días que duró el experimento. En amarillo se representa la estirpe WT virulenta (MU636), en rojo la estirpe control avirulenta (NRRL3631) y en verde y violeta las estirpes mutantes para *hspA12a* (MU909 y MU910, respectivamente). El asterisco (\*) indica una diferencia significativa en una prueba de Mantel-Cox ( $P \leq 0,05$ ).

### **III. 4. Implicación de la proteína HspA12a en el silenciamiento génico de *M. lusitanicus***

#### **III. 4. 1. Participación de HspA12a en el silenciamiento canónico**

La ribonucleasa R3B2 no solo participa en la ruta NCRIP, sino que también está implicada en el silenciamiento canónico, puesto que mutantes que carecen de esta proteína muestran una baja eficacia de silenciamiento en respuesta a transgenes (Trieu *et al.*, 2015; Calo *et al.*, 2017). La participación de R3B2 en la ruta canónica, sugirió que la proteína HspA12a podría estar implicada del mismo modo en esta vía de silenciamiento. Para comprobar si efectivamente esta Hsp70 participa en el silenciamiento canónico, se realizó un ensayo basado en el silenciamiento del gen *carB* de *M. lusitanicus* en respuesta a la introducción del plásmido pMAT1253 (Calo *et al.*, 2012), que contiene una repetición invertida de un fragmento del gen *carB* bajo el control de un promotor inducido por glucosa (*gpd1P*) (Wolff y Arnau, 2002). La transcripción de este fragmento produce una molécula de RNA con estructura de horquilla que induce el silenciamiento del gen *carB* endógeno y con ello la supresión de la síntesis de carotenos. Por lo tanto, en aquellos individuos donde el silenciamiento funcione de manera correcta, se producirá el silenciamiento del gen *carB*, lo que producirá micelios o parches de estos micelios albinos. Por otro lado, en aquellos individuos donde el sistema del silenciamiento canónico se vea alterado, no se producirá el silenciamiento del gen y el micelio será completamente amarillo.

El plásmido pMAT1253 se introdujo mediante transformación en las estirpes mutantes para *hspA12a* (MU909 y MU910), en la estirpe MU636 como control positivo y en la estirpe MU413 control negativo, ya que presenta una delección del gen *ago1*, que es esencial para la vía canónica del silenciamiento (Cervantes *et al.*, 2013). Los transformantes de todas las estirpes fueron picados en cajas de medio YNB 3,2 y se incubaron 4 días en condiciones de luz continua, al cabo de los cuales se analizó la coloración de sus micelios (Tabla 8). La cuantificación del porcentaje de colonias albinas reveló que ambos mutantes para el gen *hspA12a* mostraban frecuencias de silenciamiento similares a la estirpe control MU636 con fenotipo silvestre y muy alejadas de la frecuencia de silenciamiento del 0 % de la estirpe MU413. De este modo, HspA12a no parece

estar implicada en esta ruta de silenciamiento canónico inducida por transgenes de *M. lusitanicus*.

**Tabla 8. Análisis de la participación de *hspA12a* en el silenciamiento canónico inducido por transgenes.**

Estirpe	Genotipo	Transformantes albinos	Transformantes amarillos	% Silenciamiento
MU413	<i>ago1</i> <sup>-</sup>	0	12	0
MU636	WT	104	0	100
MU909	<i>hspA12a</i> <sup>-</sup>	115	2	98,3
MU910	<i>hspA12a</i> <sup>-</sup>	90	1	98,9

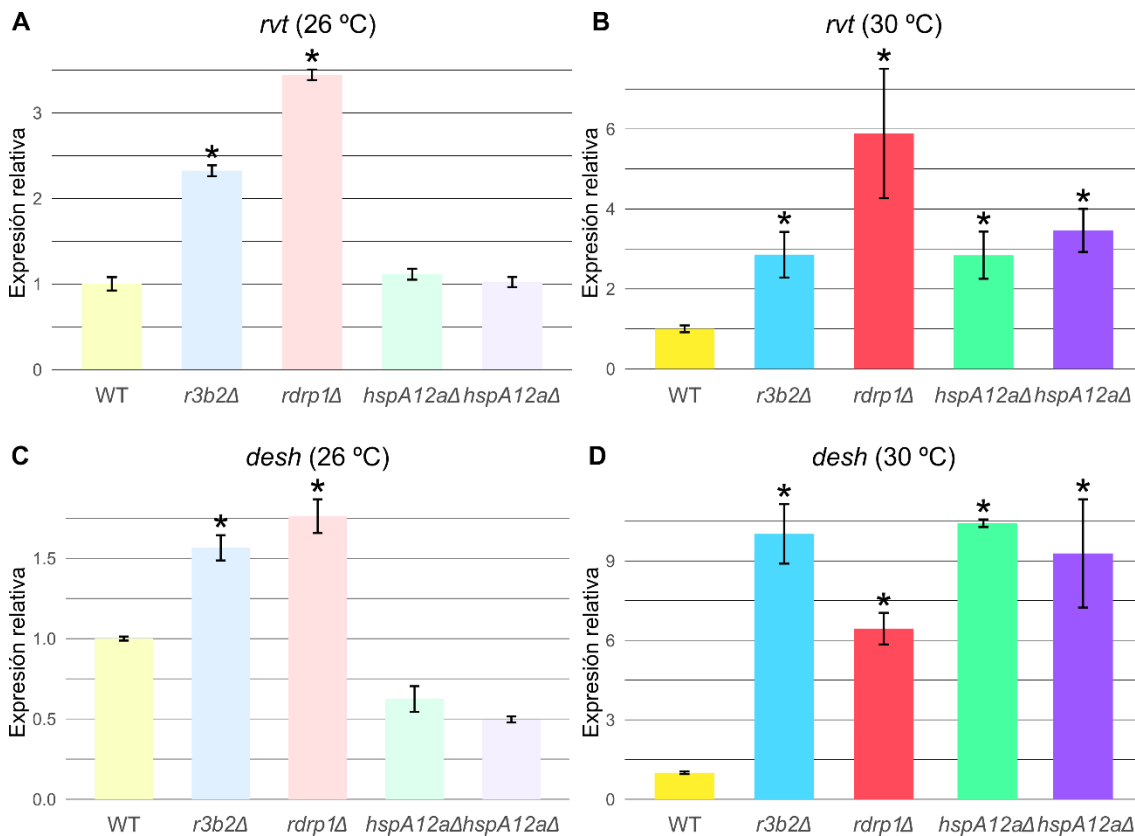
### III. 4. 2. Participación de HspA12a en el silenciamiento no canónico

R3B2 es la proteína clave del silenciamiento no canónico en *M. lusitanicus*, por ello cabría esperar que la proteína HspA12a formara también parte de este sistema debido a su interacción con esta ribonucleasa. Para comprobar esta hipótesis se realizaron diferentes ensayos de RT-qPCR utilizando dos genes chivatos, con ID 156292 y 142378 (llamados *rvt*, y *desh*, respectivamente), regulados por el silenciamiento no canónico en este hongo. Estos genes chivatos, fueron seleccionados a partir de un análisis transcriptómico realizado en nuestro laboratorio, donde se comparó el transcriptoma de la estirpe MU412, mutante para *r3b2*, y la estirpe MU636 utilizada como estirpe silvestre, creciéndose el hongo en medio YPG con pH 4,5 y bajo condiciones de luz continua. El gen *rvt*, que codifica un dominio de unión a zinc típico de retrotranscriptasas, es una diana directa del silenciamiento no canónico, por lo que no existen genes intermediarios entre el sistema y el silenciamiento de *rvt*, mientras que el gen *desh*, que codifica una deshidrogenasa de aldehído, está regulado de manera indirecta (Ghizlane Tahiri, comunicación personal). Tras seleccionar estos genes regulados por NCRIP, se comprobó que no estuvieran regulados por el silenciamiento canónico, recurriendo a análisis transcriptómicos realizados con mRNA (Nicolás *et al.*, 2015) y sRNA (Trung *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo los ensayos de RT-qPCR, las estirpes de *M. lusitanicus* fueron incubadas en las mismas condiciones en las que se realizaron los ensayos de supervivencia a diferentes temperaturas, realizando cultivos en medio sólido bajo condiciones de oscuridad a 26 °C y 30 °C, aunque en esta ocasión se utilizó el medio YPG a pH 4,5 y con una cantidad de  $2,5 \times 10^5$  esporas

### III. Resultados

por caja para favorecer el crecimiento del hongo. El micelio para obtener las muestras de RNA, con las que se obtendría el cDNA empleado en el experimento de qPCR, se recogió a las 24 horas. Para realizar este experimento se utilizaron las estirpes MU412 y MU419, ambas mutantes para el silenciamiento no canónico (*r3b2Δ* y *rdrp-1Δ*, respectivamente), la estirpe MU636 como estirpe silvestre y las dos estirpes mutantes para *hspA12a* (Figura 30).



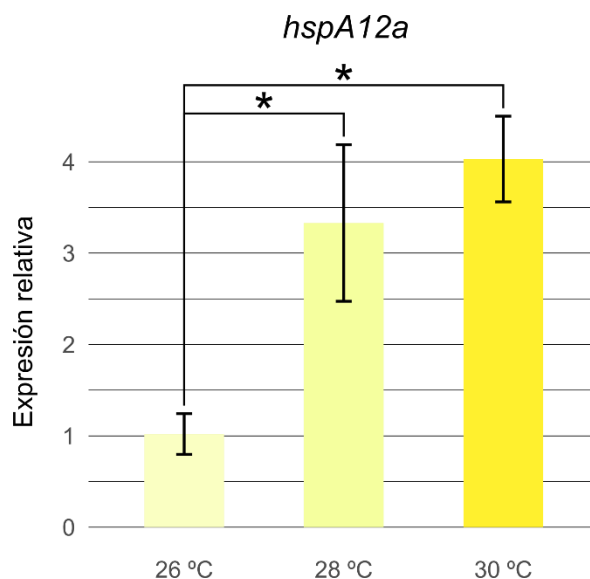
**Figura 30. Ensayo de RT-qPCR para determinar la implicación de *hspA12a* en el silenciamiento no canónico.** **A)** Expresión relativa del gen *rvt*, determinada mediante RT-qPCR, en las estirpes indicadas crecidas a 26 °C. **B)** Expresión relativa del gen *rvt*, determinada mediante RT-qPCR, en las estirpes indicadas crecidas a 30 °C. **C)** Expresión relativa del gen *desh*, determinada mediante RT-qPCR, en las estirpes indicadas crecidas a 26 °C. **D)** Expresión relativa del gen *desh*, determinada mediante RT-qPCR, en las estirpes indicadas crecidas a 30 °C. En amarillo se representa la estirpe WT (MU636), en azul la estirpe mutante para *r3b2* (MU412), en rojo la estirpe mutante para *rdrp1* (MU419) y en verde y violeta las estirpes mutantes para *hspA12a* (MU909 y MU910, respectivamente). Los valores fueron normalizados usando el factor de elongación 1 (*ef-1*) como control interno. El asterisco (\*) indica una diferencia significativa en una prueba t de Student de dos colas de muestras desapareadas con respecto a la estirpe MU636 (WT) ( $P \leq 0,01$ ).

Como se observa en la Figura 30, la expresión de los dos genes chivatos no varió en los mutantes para el gen *hspA12a* con respecto a la estirpe silvestre cuando el hongo se incubó a temperatura óptima, es decir, a 26 °C. En cambio, en estas condiciones, la expresión de los genes chivatos en los mutantes en genes de NCRIP (*r3b2Δ* y *rdrp-1Δ*) sí presentaron diferencias ya que, como cabía esperar, la expresión de estos genes debería aumentar al estar inhibida esta ruta.

Por otro lado, cuando el hongo se creció a temperaturas más elevadas, en este caso 30 °C, la ausencia del gen *hspA12a* sí afectó a la expresión de los genes chivatos respecto a la estirpe silvestre produciendo un aumento de dicha expresión, lo que indicaría una reducción en la actividad de la ruta de silenciamiento no canónico en estas condiciones. Este hecho se confirma porque los niveles de expresión en los dos mutantes de NCRIP fueron similares a los mutantes de la chaperona a 30 °C.

Por otro lado, se quiso comprobar la importancia de la temperatura en la expresión del gen *hspA12a*, ya que como se ha observado en los resultados anteriores, la temperatura parece tener un papel fundamental en la función de HspA12a en la ruta NCRIP. Para ello se realizó un ensayo de RT-qPCR en las mismas condiciones anteriores, utilizando solo la estirpe silvestre MU636 crecida a tres temperaturas diferentes: 26°C, 28 °C y 30 °C (Figura 31). Los resultados muestran que la expresión de *hspA12a* aumenta conforme aumenta la temperatura de cultivo del hongo.

Estas diferencias en la expresión mostraron una relación con los resultados expuestos anteriormente, donde el papel de la HspA12a en la ruta NCRIP se ciñe a condiciones donde la temperatura es más elevada. Esto está en consonancia con los resultados de los genes chivatos, a 30 °C la disponibilidad de HspA12a es mayor en el micelio silvestre, de modo que su mutación es más apreciable en esas condiciones de temperatura que a 26 °C donde se expresa mucho menos.



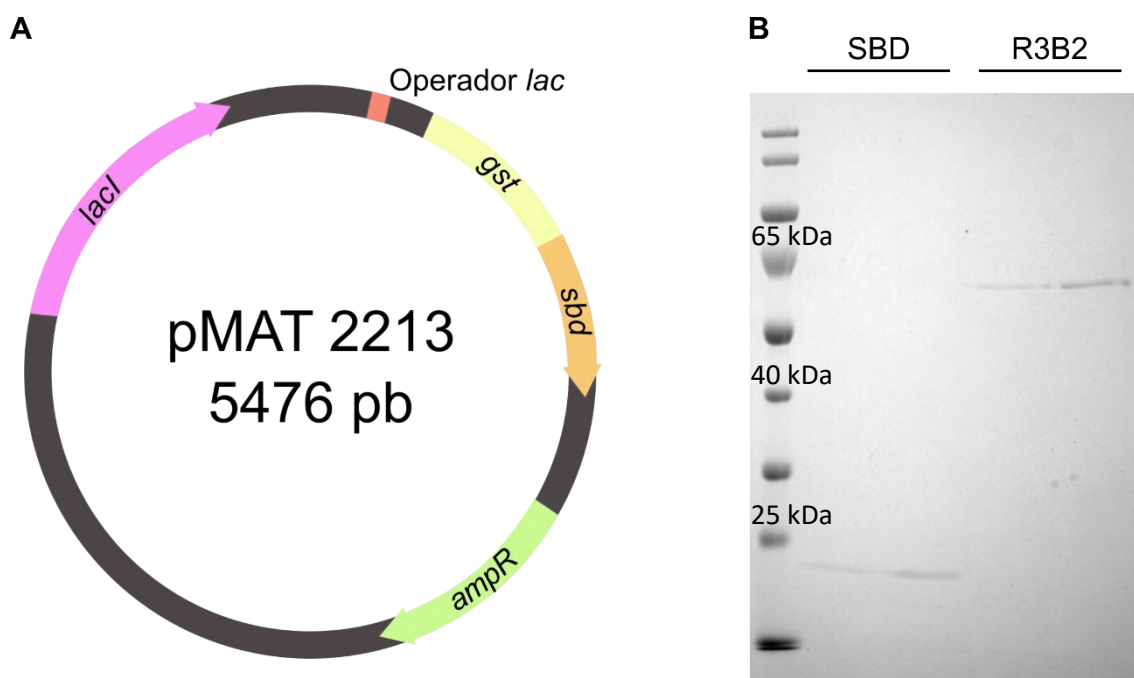
**Figura 31. Ensayo de RT-qPCR para determinar la regulación de la expresión de *hspA12a* por la temperatura.** Gráfica representativa de los datos obtenidos en el ensayo de RT-qPCR con muestras de la estirpe MU636 (WT) de *M. lusitanicus* a 26 °C, 28 °C y 30 °C para el gen *hspA12a*. Los valores fueron normalizados usando el factor de elongación 1 (*ef-1*) como control interno. El asterisco (\*) indica una diferencia significativa en una prueba t de Student de dos colas de muestras desapareadas ( $P \leq 0,01$ ).

### III. 5. Caracterización *in vitro* de la proteína HspA12a

#### III. 5. 1. Análisis de la actividad RNasa de R3B2 en presencia de HspA12a

Como se ha mencionado, se observó recientemente que R3B2 es capaz de unirse tanto a dsRNA como a ssRNA, aunque solo digiere este último (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021). Con el objetivo de comprobar el posible efecto de la proteína HspA12a en la actividad RNasa de R3B2, se realizaron ensayos de actividad RNasa *in vitro* en presencia de ambas proteínas, R3B2 y HspA12a, simultáneamente. La idea original fue utilizar la proteína HspA12a completa, pero tras varios intentos se comprobó que, independientemente de la etiqueta utilizada (GST o 6xHistidinas), resultaba imposible su purificación, debido a que precipitaba. Ante las dificultades para purificar la proteína HspA12a al completo, se realizó el ensayo con la región SBD de HspA12a que interacciona con R3B2, que sí se pudo expresar en *E. coli*.

Para la purificación de la región SBD de HspA12a, esta se expresó fusionada a la etiqueta GST en *E. coli*. Para ello, se generó el plásmido pMAT2213 (Figura 32A), obtenido tras la clonación del cDNA correspondiente a la región SBD de HspA12a en el plásmido pGEX-KG. Tras la transformación de la estirpe BL21 con este plásmido y la inducción por IPTG, se procedió a la purificación de la proteína de fusión mediante matrices de sefarosa con glutatión. Una vez purificada la proteína se dirigió con trombina que corta entre el fragmento SBD y la etiqueta de GST, permitiendo eliminar la etiqueta y obtener el fragmento SBD puro (Figura 32B).

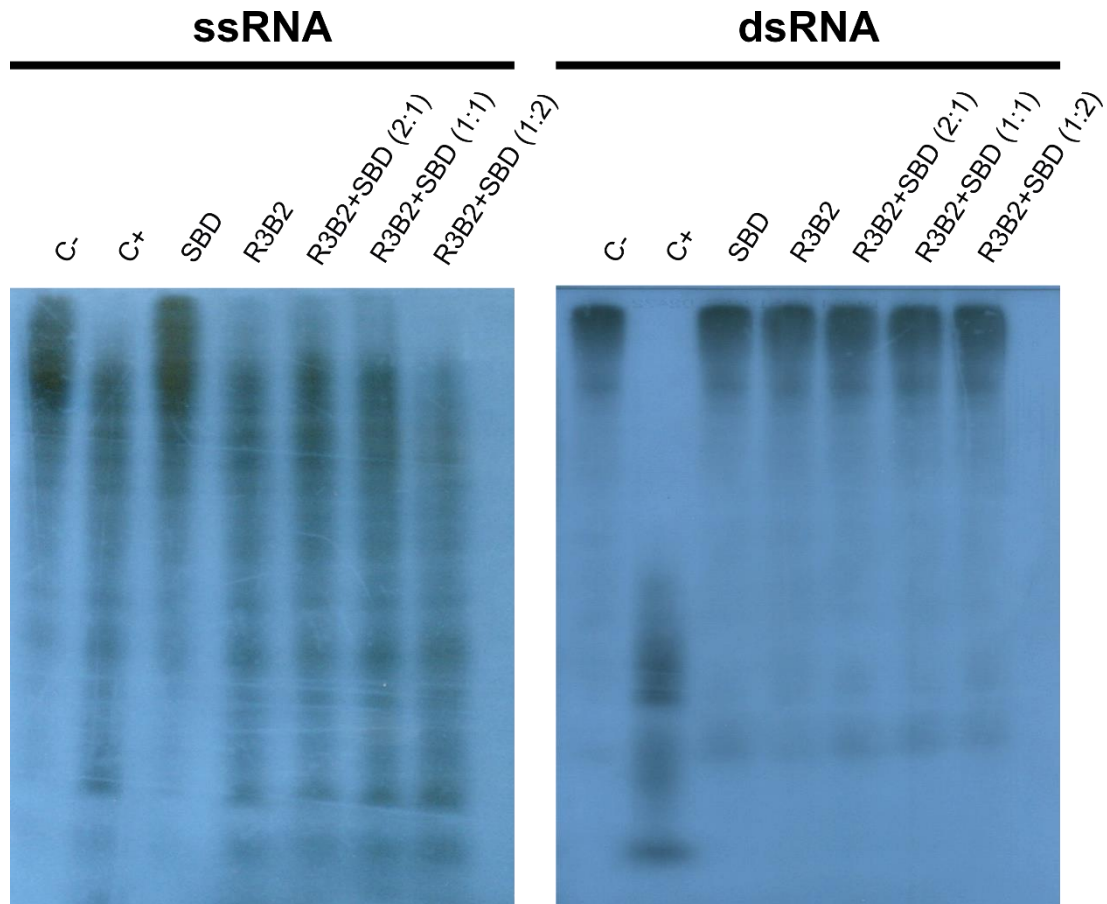


**Figura 32. Purificación del fragmento SBD de HspA12a.** **A)** Plásmido pMAT2213 construido a partir de la clonación de la región SBD en el vector pGEX-KG, que permite la producción del fragmento SBD unido a la etiqueta de GST. **B)** Proteínas purificadas para el ensayo de actividad RNasa. A la izquierda se muestran dos alícuotas de la proteína SBD purificada (90 y 180 ng), y a la derecha dos de la proteína R3B2 (50 y 100 ng), esta última cedida por Cánovas-Márquez.

En el ensayo de actividad RNasa *in vitro* se incubó por separado ssRNA y dsRNA marcados radiactivamente con diferentes relaciones estequiométricas (2:1, 1:1 y 1:2) de R3B2 (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021) y SBD, además de controles en los que se añadió solo una de las dos proteínas (Figura 33). La actividad RNasa *in vitro* de R3B2 frente a ssRNA no se vio alterada por la presencia del fragmento SBD de HspA12a, al igual que su incapacidad para

### III. Resultados

cortar dsRNA. Este resultado podría deberse a que es necesaria la proteína HspA12a completa para que la actividad de la ribonucleasa pueda verse modificada o porque esta proteína no actúa directamente sobre la actividad de R3B2, pudiendo actuar como una proteína que genere cierta estabilidad en R3B2 o en el complejo formado.



**Figura 33. Análisis de la actividad RNasa de R3B2 en presencia de la región SBD de HspA12a.** Separación electroforética en geles de poliacrilamida del resultado de los ensayos de actividad RNasa utilizando ssRNA y dsRNA marcados radiactivamente. Las secuencias de RNA corresponden a una parte de la secuencia del gen *carB* de *M. lusitanicus* (véase apartado II. 14. 5. de Materiales y Métodos). Como control negativo (C-) se incubaron los RNA en ausencia de proteínas, mientras que en el control positivo (C+) las muestras se incubaron en presencia de la RNase III de *E. coli*, RNC. La concentración de R3B2 utilizada en todos los ensayos fue de 3,5 ng/ $\mu$ l, mientras que la de SBD fue de 0,9-1,8-3,6 ng/ $\mu$ l, generando una relación entre estas proteínas de 2:1, 1:1 y 1:2. En el control de SBD sin R3B2 se utilizó la concentración más alta de las indicadas anteriormente.



## IV. DISCUSIÓN



## IV. 1. Proteínas que interactúan con R3B2

En *M. lusitanicus* se han identificado dos rutas principales de silenciamiento génico (Torres-Martínez y Ruiz-Vázquez, 2016). Los mecanismos vinculados con la ruta canónica dependen de la ribonucleasa Dicer, mientras que la otra ruta denominada no canónica o NCRIP depende de la RNasa III atípica R3B2, que está restringida al orden de los Mucorales (Trieu *et al.*, 2015; Cánovas-Márquez *et al.*, 2021). Esta ruta no canónica ha sido recientemente relacionada con el control de la estabilidad genómica y la virulencia de *M. lusitanicus*, un patógeno oportunista de humanos que junto a otros Mucorales produce la mucormicosis (Pérez-Arques *et al.*, 2020). Esta enfermedad posee una alta tasa de letalidad y una incidencia creciente, la cual se ha visto aumentada con la crisis sanitaria actual con los casos del denominado hongo negro en numerosos pacientes de COVID de la India (Alvarez *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2021). El hecho de que esta ruta esté restringida a este orden de hongos y que controle los genes de virulencia, abre nuevas posibilidades de tratamiento. Durante esta tesis se han tratado de identificar nuevos elementos de la ruta NCRIP en un intento de profundizar en su funcionamiento y de poder encontrar nuevas dianas moleculares que puedan servir para el desarrollo de antifúngicos.

Para encontrar nuevos genes que interviniesen en la ruta se utilizó la estrategia de purificación por afinidad en tándem (TAP) debido a que está diseñada para aislar complejos de proteínas del organismo en estudio, en este caso *M. lusitanicus*. Aunque se construyó con éxito la estirpe que portaba en su genoma el gen *r3b2* fusionado a la etiqueta TAP, la baja presencia de la proteína de fusión impidió su purificación. Debido a estos resultados negativos, se procedió a realizar el rastreo de una genoteca de cDNA de *M. lusitanicus*, usando el sistema de doble híbrido de levadura, para intentar identificar proteínas que interaccionaran con la proteína R3B2. En esta búsqueda solo se detectaron dos proteínas que interaccionaran con esta ribonucleasa:

-La propia R3B2, que ya se conocía que dimeriza (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021).

-Una nueva proteína perteneciente a la familia de las Hsp70, que se denomina HspA12a por su similitud miembros de la subfamilia HspA12.

La región de R3B2 involucrada en la interacción con HspA12a es la llamada NTF, la cual incluye al dominio RNasa III y uno de los dominios de unión a dsRNA, de manera similar a lo que ocurre en la interacción de R3B2 consigo misma, ya que esta se produce a través del dominio RNasa III (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021). Sin embargo, la interacción HspA12a-R3B2 no ocurre solo a través del dominio RNasa III, ni tampoco solo a través del dominio de unión a dsRNA, sino que es necesaria la presencia de ambos.

La proteína HspA12a, como otras proteínas Hsp70, presenta dos regiones claras. En el extremo amino, y representando la mayor parte de la secuencia de la proteína (69 %), posee el dominio NBD, muy diferente del presente en el resto de las proteínas Hsp70. Este dominio tiene los residuos conservados para unir ATP (Figura 14), lo que le permitiría catalizar su hidrólisis produciendo una alteración en la configuración de la proteína (Gething y Sambrook, 1992). El extremo carboxilo de HspA12a carece del típico dominio SBD que se encuentra en el resto de las proteínas Hsp70 (Brocchieri *et al.*, 2008) y que es utilizado para interaccionar con el sustrato. Es de destacar que la interacción de HspA12a con R3B2 ocurre a través de la región de la proteína correspondiente al dominio SBD, sugiriendo que está funcionando con un dominio de unión a sustrato.

#### **IV. 2. La familia de chaperonas *hspA12***

La familia de genes que codifican hipotéticas proteínas Hsp70 se encuentra representada en *M. lusitanicus* por un total de 25 genes, superando en número a modelos de estudio como *S. cerevisiae*, con 14 genes (Kominek *et al.*, 2013), o humanos, con 17 genes (Brocchieri *et al.*, 2008). Las proteínas HSP70 de estas dos especies se han clasificado en distintas subfamilias atendiendo a sus relaciones evolutivas. Algunas subfamilias, como el grupo I de humanos y que corresponde a las proteínas HspA12, está ausente en levaduras (Figura 15). El análisis filogenético de las proteínas de *M. lusitanicus* y humanas reveló que el hongo tiene representantes para todas las subfamilias de humanos, excepto para la familia V. No obstante, el resultado más interesante fue el elevado número de miembros de la subfamilia HspA12 que posee *M. lusitanicus*, que supera el 50 % de los genes *hsp70* de esta especie (14 de 25 genes *hsp70*),

y a su vez explica el mayor número de genes hsp70 del hongo con respecto a humanos y otras especies (Figura 17).

La expansión de genes que cifran proteínas de la subfamilia HspA12 no es exclusiva de *M. lusitanicus* y se ha producido en otras especies, principalmente hongos y dentro de este grupo, la división Mucoromycota muestra las cifras más altas, aunque existen especies muy relacionadas filogenéticamente donde esta subfamilia no está presente, como *Candida albicans* o *S. cerevisiae*. Fuera del reino de los hongos, la expansión se ha producido también en la evolución de algunas especies concretas de grupos filogenéticos de animales, como Mollusca, Annelida, Chordata, Cnidaria y Porifera; y de plantas, como Viridiplantae y Acytosteliales. A pesar de la evidencia de la expansión de la subfamilia, no existen datos que nos permitan relacionar la misma con una ventaja evolutiva y se necesitan más estudios.

Algunas especies del reino fungi, como *C. albicans* o *S. cerevisiae*, anteriormente mencionadas, carecen de proteínas homólogas a R3B2 (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021), de componentes clave del mecanismo de silenciamiento génico, como proteínas similares a Dicer o RdRP (Nakayashiki, 2009), y de genes pertenecientes a la subfamilia *hspA12*. A esta observación hay que añadir que especies de Mucorales, como *P. parasitica*, *R. microsporus* y *L. corymbifera*, que presentan proteínas homólogas a R3B2 con actividad ribonucleasa específica de ssRNA como la propia R3B2 de *M. lusitanicus* (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021) poseen también genes *hspA12*. Esta correlación podría apoyar la idea de que las proteínas HspA12 están relacionadas con el mecanismo de silenciamiento génico, aunque existen un gran número de especies en Mucorales donde se observa la presencia de R3B2 y no se observa la de proteínas de la subfamilia HspA12.

Un hecho muy llamativo es que en aquellas especies donde se han identificado un gran número de estos genes, se observan agrupaciones de genes *hspA12* en determinadas regiones del genoma (Figura 18). Estas agrupaciones pueden deberse a duplicaciones génicas que se han conservado, probablemente debido a la ventaja evolutiva que la presencia de las copias extras de estos genes puede suponer para estas especies.

### **IV. 3. El papel del gen *hspA12a* en el crecimiento a altas temperaturas**

Los genes que codifican proteínas de choque térmico actúan generalmente en condiciones de estrés, frecuentemente estrés térmico, y su expresión está regulada por estas. Se ha realizado el análisis de expresión del gen *hspA12a* a diferentes temperaturas comprobándose que, como cabía esperar, dicha expresión es dependiente de la temperatura y aumenta cuando sube.

Debido a las dificultades para detectar la interacción entre HspA12a y R3B2 *in vivo* en el propio *M. lusitanicus*, se procedió a comprobar si realmente existe una relación funcional entre ambas comprobando si mutantes carentes de *hspA12a* estaban afectados en los procesos regulados por la ruta NCRIP. Como la expresión del gen de esta chaperona, al igual que ocurre con la mayoría de este tipo de genes, responde a cambios de temperatura, se estudió el efecto de la temperatura en los mutantes para este gen. Existe el inconveniente del alto número de genes *hspA12* presentes en *M. lusitanicus*, que podrían presentar cierta redundancia funcional y, por tanto, dificultar que se observé un fenotipo en los mutantes para *hspA12a* en condiciones de temperaturas elevadas.

Se pudieron obtener dos estirpes mutantes carentes del gen *hspA12a*, MU909 y MU910, y el estudio de su comportamiento puso de manifiesto que cuando se crecen a 30 °C presentan un defecto en el crecimiento. A esta temperatura, que representa sólo 4 °C más que la temperatura óptima de crecimiento de *M. lusitanicus*, solo un porcentaje menor al 1 % de esporas de los mutantes forman colonias densas, mientras que todas las esporas de la estirpe silvestre son capaces de formarlas (Figura 22). Este efecto en el crecimiento de las esporas de las estirpes mutantes no se debe a un defecto en su germinación, ya que la ausencia de este gen no desemboca en un retraso en la germinación de las esporas en estas estirpes mutantes, las esporas germinan igual que las esporas de la estirpe silvestre en todas las temperaturas testadas (Figura 23). La ausencia de defectos en la germinación sugiere que la deficiencia de HspA12a provoca un defecto en el crecimiento a 30 °C después de que las esporas hayan germinado de forma normal.

Como se ha indicado, el porcentaje de esporas de las estirpes mutantes para *hspA12a* que crecen a 30 °C fue muy bajo, inferior al 1 %. Este fenotipo se produce siempre que se recogen esporas de individuos de estas estirpes mutantes crecidos a 26 °C y se siembran a 30 °C. Sin embargo, cuando se cogen esos pocos individuos que han crecido a 30 °C, se cultivan a 30 °C, se siembran esas esporas y se incuban a 30 °C, se comprueba que la proporción de individuos que forman colonias densas ahora, respecto al número de esporas sembradas, aumenta al 30 %. Es decir, ahora la tasa de supervivencia representa la tercera parte de la que presenta la estirpe silvestre y es mucho mayor que la supervivencia de las esporas de las estirpes mutantes recogidas a 26 °C y crecidas en las mismas condiciones. Este porcentaje de supervivencia se mantiene si se realizan varios pases vegetativos a 30 °C, por lo que esa resistencia se hereda. Pero si los ciclos de crecimiento de estos mismos individuos resistentes a 30 °C se realizan a 26 °C, tras varios pases a esta temperatura, el porcentaje de supervivencia desciende hasta los datos iniciales inferiores al 1 %. En todos los controles que se han realizado en los diferentes pasos de este experimento se pudo comprobar que todos los individuos analizados todos carecían de *hspA12a*. Los resultados sugieren que la causa de esta reversión parcial de la supervivencia a 30 °C no se debe a nuevas mutaciones en el DNA de estos individuos resistentes ya que la resistencia se pierde cuando se crecen a 26 °C, lo que lleva a pensar que se podría corresponder con un patrón de herencia epigenético que se produce y se mantiene a 30 °C, pero que se pierde cuando los individuos resistentes se crecen a 26 °C durante varios pases vegetativos. Este fenómeno, en cierta medida, recuerda a la aparición de epimutantes resistentes a FK506 (Calo *et al.*, 2014) y ácido 5-fluoroorotico (Chang *et al.*, 2019), que depende directamente de la ruta epimutacional de silenciamiento génico.

Además, los mutantes en *hspA12a* resistentes a 30 °C mostraban un crecimiento micelial deficiente cuando se compararon con el crecimiento de la estirpe silvestre a esa misma temperatura. El fenotipo de crecimiento original se recuperaba tras varios pases de estos individuos a 26 °C, a la vez que también se recuperaban los porcentajes bajos de supervivencia de la primera siembra realizada. Se mostraba así que ambos fenotipos se producen de manera

simultánea, sugiriendo que están determinados por los mismos posibles cambios epigenéticos.

Durante estos experimentos de crecimiento de los mutantes en el gen *hspA12a* a diferentes temperaturas se pudieron aislar dos individuos distintos, MU913 y MU914, que mostraban una reversión fenotípica permanente ya que el 100 % de las esporas sembradas crecía a 30 °C. Esta estabilidad del fenotipo sugiere que, en este caso, se ha producido en estos individuos alguna mutación, en el mismo gen o en genes distintos, que suprime el defecto en el crecimiento a 30 °C de la delección en el gen *hspA12a*.

#### **IV. 4. Identificación del gen causante de la reversión fenotípica**

Como se ha comentado anteriormente, las estirpes MU913 y MU914 presentaban una reversión espontánea del defecto en el crecimiento a 30 °C del mutante *hspA12a*Δ del que derivan (MU909). Para identificar las mutaciones y genes implicadas en la supresión del fenotipo mutante se procedió a la secuenciación masiva del genoma de ambas estirpes y de la estirpe parental (MU909). De los cambios exclusivos de MU913 y MU914, es decir, ausentes en la estirpe parental MU909, se seleccionaron los que estuvieran en genes o cerca de regiones codificantes y, además, superaran el 50 % de presencia en las lecturas realizadas. Estos criterios lo cumplieron 17 cambios para el caso de MU913 y 33 para MU914 (Tablas 5 y 6). Estos elevados números de cambios dificulta la identificación de la mutación responsable de la supresión del fenotipo mutante y, por tanto, se decidió concentrar la atención en genes que presentaran mutaciones en ambas estirpes.

De los cuatro genes que presentaban mutaciones en las dos estirpes revertientes, tres de ellos mostraban la misma alteración en ambas estirpes, aunque los porcentajes de homocariosis eran distintos en las dos estirpes (Tabla 7). Este era el caso de los genes 160895, 110439 y 157510, que codifican para un factor de transcripción con cremallera de leucina, una proteína de la superfamilia ABC asociada a la resistencia a diferentes medicamentos y una proteína con dedo de zinc, respectivamente. Estas variantes podrían encontrarse en la estirpe parental en un porcentaje indetectable, sobrerrepresentándose en



las estirpes MU913 y MU914, o bien podrían haber surgido idénticas alteraciones en estas dos estirpes de forma independiente. En estudios previos en *M. lusitanicus*, se identificaron mutantes independientes para el gen *cnbR* que habían sufrido la misma mutación puntual de un cambio de una tiamina por una adenina (Lee *et al.*, 2013), lo que apoya que las mutaciones en estos genes se consideren como candidatas a ser responsables de este fenotipo.

En el cuarto el gen, 155924, que cifra un transportador de GDP-fucosa, la alteración sufrida es diferente en ambas estirpes, convirtiéndolo en un serio candidato a ser responsable de este fenómeno de reversión fenotípica.

Algunos de estos genes se han relacionado en otros estudios con las proteínas Hsp o la resistencia a altas temperaturas. Por un lado, los factores de choque térmico (HSF o *heat shock factor*) son factores de transcripción que tienen un papel esencial en la respuesta al choque térmico y a otros estreses, promoviendo la expresión de proteínas Hsp. Estos factores de transcripción poseen cremalleras de leucina que son esenciales para su estructura (Prändl *et al.*, 1998; Barna *et al.*, 2018). Por otro lado, algunas cochaperonas Hsp40 poseen regiones similares a dedos de zinc, esenciales para la interacción de estas proteínas con proteínas Hsp70 y para el correcto mantenimiento de las proteínas de la célula ante distintos estreses, como el aumento de temperatura (Lu *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2005).

#### **IV. 5. El papel de *hspA12a* en las rutas de silenciamiento de *M. lusitanicus***

Los mutantes carentes de HspA12a, MU909 y MU910, se analizaron para determinar si estaban afectados en alguna de las rutas de silenciamiento génico de *M. lusitanicus*. Cuando a la estirpe silvestre de este hongo se le introduce un plásmido que expresa un fragmento del gen *carB*, capaz de adoptar una estructura de horquilla, se produce el silenciamiento de este gen, que se refleja en que el micelio del hongo pasa de color amarillo, debido a la acumulación de  $\beta$ -caroteno, a albino, por el silenciamiento del gen *carB* endógeno, uno de los genes estructurales de la síntesis de carotenos (Calo *et al.*, 2012). Cuando ese

#### IV. Discusión

mismo plásmido se introdujo en las estirpes MU909 y MU910 se observa que el silenciamiento génico se produce casi en el 100 % de transformantes obtenidos, lo que indica que esta ruta no se ve afectada por la eliminación del gen *hspA12a*, descartando la implicación de la proteína HspA12a en el silenciamiento canónico.

Para comprobar el efecto sobre NCRIP se analizó la expresión de genes regulados por esta ruta, concretamente los genes *rvt* y *desh*, a distintas temperaturas, teniendo en cuenta la regulación de la expresión del gen *hspA12a* por la temperatura (Figura 30). La expresión de ambos genes a 26 °C es similar en los mutantes en *hspA12a* y en la estirpe silvestre, sin embargo, su expresión a 30 °C es mayor en los mutantes con respecto a la estirpe silvestre. Este incremento de expresión es semejante al observado en mutantes en dos genes clave de esta ruta de silenciamiento no canónico, como son *rdp-1* y *r3b2*, lo que sugiere que HspA12a puede ser importante para el correcto funcionamiento de la ruta NCRIP a temperaturas superiores a las que normalmente crece el hongo. Así, podría estar sucediendo que HspA12a se una a R3B2 en condiciones de altas temperaturas, estabilizando a esta proteína, de modo que la ausencia de HspA12a a 30 °C en el mutante haga que R3B2 no sea funcional y los mRNA que son diana de la ruta dejan de ser degradados y se acumulen.

El hecho de que HspA12a sea esencial para la ruta NCRIP cuando se produce un aumento de temperatura, abre la posibilidad de que esta proteína sea esencial para el silenciamiento bajo otras circunstancias. Las Hsp70 están presentes de manera constitutiva en la célula, aunque se pueden sobreexpresar ante determinados estreses, no solamente con aumentos de temperatura, sino también ante otros estreses, como el estrés oxidativo (Whitesell y Lindquist, 2005; Morano *et al.*, 2012). Por lo tanto, es posible especular que esta proteína no actúe en el silenciamiento solamente ante aumentos de temperatura, sino también ante otras circunstancias que supongan un estrés para el hongo.

#### **IV. 6. El papel de *hspA12a* en la virulencia de *M. lusitanicus***

La reciente vinculación que se ha descubierto entre la virulencia y la ruta NCRIP (Pérez-Arques *et al.*, 2020), sumado al impacto que produce la delección

de *hspA12a* en *M. lusitanicus* cuando crece a temperaturas de 30 °C sobre la expresión de las dianas de esta ruta, permite plantear la hipótesis de que este gen se encuentra involucrado en la virulencia de este hongo.

En ensayos de virulencia con ratones inmunosuprimidos se observa que se produce una reducción en la virulencia de las estirpes mutantes para *hspA12a* en comparación con la estirpe virulenta de *M. lusitanicus*. La reducción es clara para ambos mutantes, pero la diferencia es estadísticamente significativa solo para uno de los mutantes, aunque hay que indicar que en el segundo caso no es estadísticamente significativa por un solo ratón. Además, ambas estirpes mutantes presentan un fenotipo de virulencia más próximo a la estirpe avirulenta (NRRL3631), que a la estirpe virulenta (MU636) (Figura 29). Este resultado apoya que *hspA12a* es importante para el funcionamiento de la ruta NCRIP, ya que los mutantes en genes claves de la ruta, como *r3b2* y *rdrp-1*, muestran también una reducción de la virulencia en el mismo tipo de ensayos (Pérez-Arques *et al.*, 2020).

#### **IV. 7. Actividad RNasa de R3B2 en presencia de HspA12a**

Los ensayos llevados a cabo con R3B2 para mostrar su actividad, demostraron que R3B2 era capaz de unirse tanto a dsRNA como a ssRNA, pero era capaz de digerir solo ssRNA (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021). Estos ensayos se realizaron a 30 °C, temperatura a la que, como se ha observado en este trabajo, la ruta NCRIP se ve afectada por la ausencia de HspA12a. Como HspA12a y R3B2 interactúan entre sí, se podría esperar un aumento en la actividad RNasa *in vitro* de R3B2 si se añade simultáneamente a la reacción HspA12a. Debido a las dificultades para la purificación de la proteína HspA12a completa, los ensayos para analizar la actividad RNasa se realizaron con la región SBD, cuya purificación es posible y es, además, la región por la que esta proteína interactúa con R3B2. Los resultados mostraron que la actividad RNasa de R3B2 no se vio afectada con la presencia de la región SBD. Esta falta de efecto en la actividad de R3B2 no descarta que HspA12a influya en la actividad RNasa de R3B2 *in vivo*, puesto que se está utilizando solo una parte de la proteína y falta una parte importante de esta, como es el dominio NBD. De

hecho, la interacción de las proteínas Hsp70 con otras proteínas se realiza tras la hidrólisis de ATP por el dominio NBD de estas chaperonas, lo que genera un cambio conformacional en la chaperona y facilita su posterior unión con las proteínas diana (Gething y Sambrook, 1992; Kominek *et al.*, 2013).

#### **IV. 8. Modelo de actuación de HspA12a**

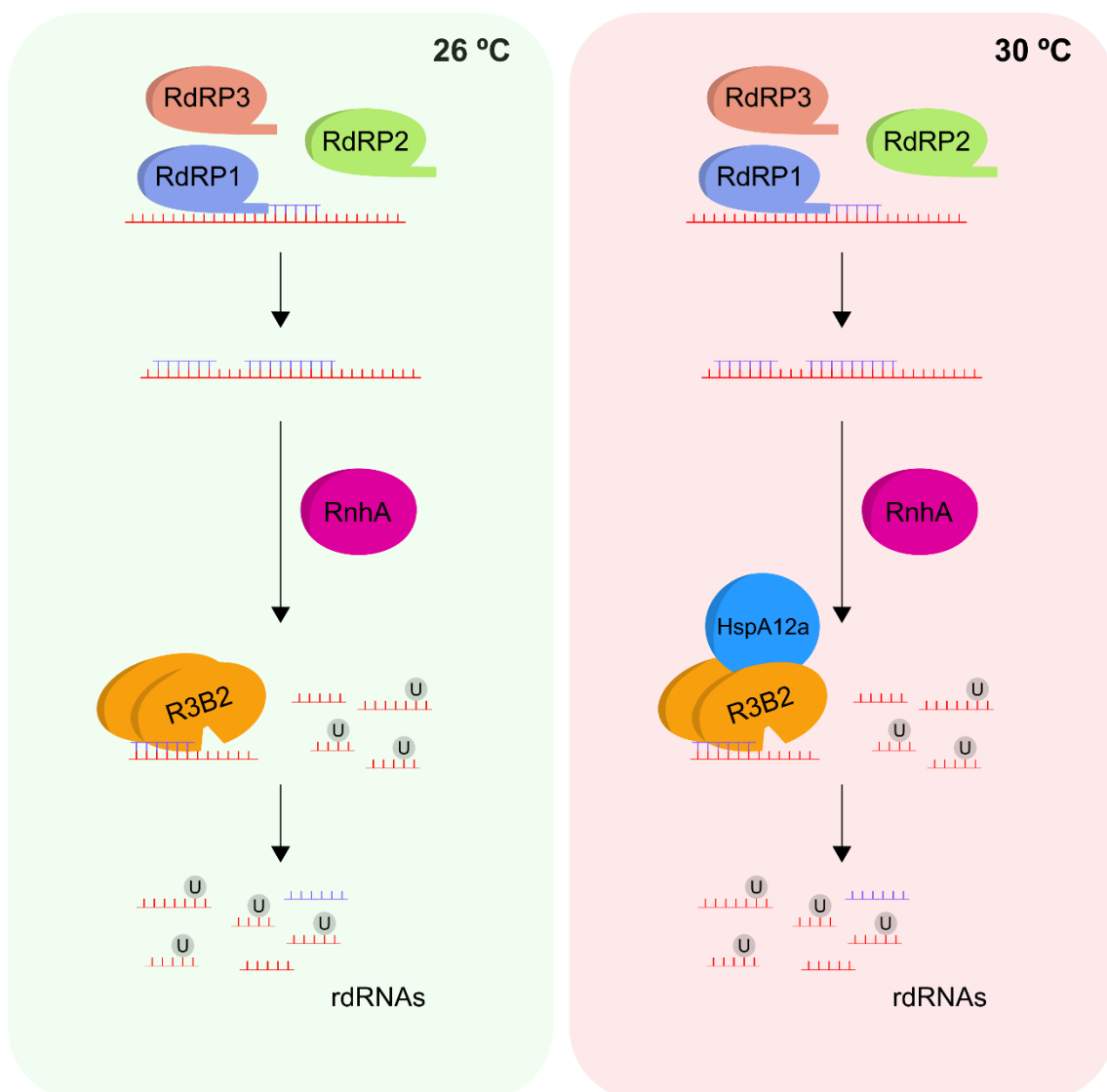
Los resultados de esta tesis nos llevan a plantear un modelo de actuación de HspA12a en la ruta NCRIP (Figura 34). Esta proteína tendría un papel importante a temperaturas superiores a 26 °C, como es 30 °C, donde se produce un incremento de la expresión del gen *hspA12a*. En estas condiciones, la proteína HspA12a se uniría con R3B2 a través de su región NTF estabilizándola para permitir que continúe degradando sus mRNA dianas a esa temperatura. La ausencia de HspA12a o R3B2 tendría el mismo resultado en los niveles de transcrito de los genes diana de la ruta a 30 °C pero, en cambio, a 26 °C la falta de HspA12a no tendría ninguna consecuencia en esos niveles, tal como se ha observado en los mutantes en *hspA12a*. Por tanto, HspA12a podría actuar como una proteína accesoria a R3B2, permitiendo que la ruta siga funcionando en condiciones de temperaturas elevadas.

Aunque los mutantes para *hspA12a* no mostraban tener afectada la ruta canónica del silenciamiento génico, no se puede descartar la participación de este gen en la ruta, puesto que estos ensayos fueron llevados a cabo a 26 °C. Por otro lado, puesto que el papel de R3B2 en la ruta canónica es desconocido, aunque se cree que puede participar junto a las proteínas Dicer (Calo *et al.*, 2017), el papel de HspA12a en esta ruta podría ser menor al observado en la ruta NCRIP.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas Hsp han sido relacionadas en múltiples ocasiones con el silenciamiento génico (Apartado I. 3. 1.). Se ha demostrado en numerosas ocasiones la relación que existe entre las proteínas Hsp70 y Hsp90 con el complejo RISC (Johnston *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2009; Iki *et al.*, 2010) y también de cochaperonas con proteínas vinculadas al mecanismo de silenciamiento (Pare *et al.*, 2013; Sjögren *et al.*, 2018), pero nunca se había observado una implicación directa de proteínas

HspA12 en el silenciamiento génico, menos aún con la proteína R3B2, tan particular en la naturaleza.

Esta interacción se ha observado en *M. lusitanicus*, pero hay que tener en cuenta la presencia de proteínas similares a R3B2 en otros Mucorales, con la misma actividad RNAsa específica de ssRNA, (Cánovas-Márquez *et al.*, 2021), y en algunos de estos Mucorales también se encuentra esta subfamilia de proteínas HspA12, por lo que puede pensarse que esta interacción puede encontrarse en otras especies de los Mucorales y puede ser importante para la estabilidad de la ruta cuando la temperatura aumenta.



**Figura 34. Modelo de la ruta NCRIP a 26 y 30 °C.** A la izquierda se muestra el modelo de la ruta NCRIP a 26 °C. A la derecha se muestra el modelo para esta ruta a 30 °C, donde actuaría la proteína HspA12a.



## V. CONCLUSIONES





Los resultados de este trabajo permiten generar las siguientes conclusiones:

1. Se ha identificado en un ensayo de doble híbrido de levadura una proteína Hsp70, perteneciente a la subfamilia de proteínas HspA12, llamada HspA12a, que interacciona con R3B2, proteína clave del mecanismo de silenciamiento no canónico NCRIP en *M. lusitanicus*.
2. La interacción identificada entre R3B2 y HspA12a se produce a través de sus regiones NTF, que posee un dominio RNasa III y un dominio de unión a dsRNA, y SBD, el cual no posee ningún dominio conservado, respectivamente.
3. *M. lusitanicus* presenta una expansión de la subfamilia HspA12, que se ha identificado también en otras especies, incluyendo algunas del orden de Mucorales, y que podría suponer una ventaja adaptativa desconocida.
4. La proteína HspA12a es necesaria para el correcto crecimiento a temperaturas de 30 °C, ya que dos estirpes mutantes independientes para el gen *hspA12a* muestran un crecimiento deficiente cuando sus esporas son sembradas a 30 °C, solo 4 °C superior a su temperatura óptima de crecimiento, no estando relacionado este crecimiento anómalo con un defecto en la germinación.
5. Un porcentaje bajo de esporas de las estirpes mutantes para *hspA12a* produjeron colonias con un crecimiento silvestre a 30 °C. Este fenotipo se mantenía en los sucesivos ciclos vegetativos de forma parcial y reversible, sugiriendo la existencia de un mecanismo epigenético implicado en la supresión del fenotipo mutante.
6. Se han identificado los principales genes candidatos implicados en la supresión del fenotipo de crecimiento defectuoso a 30 °C de los mutantes para *hspA12a*. Los genes candidatos identificados codifican

un transportador de GDP-fucosa, un factor de transcripción con cremallera de leucina, una proteína de la superfamilia ABC asociada a la resistencia a diferentes medicamentos y una proteína con dedo de zinc.

7. La proteína HspA12a parece ser importante para la virulencia de *M. lusitanicus*, ya que los mutantes para *hspA12a* muestran una virulencia reducida en ratón respecto a la estirpe virulenta control y más parecida a la estirpe avirulenta control.
8. La proteína HspA12a no parece participar en la ruta canónica del silenciamiento génico en *M. lusitanicus* bajo las condiciones empleadas en esta tesis.
9. La proteína HspA12a es esencial para el correcto funcionamiento de la ruta NCRIP bajo condiciones de temperaturas superiores a 26 °C, siendo prescindible para el correcto funcionamiento de esta cuando *M. lusitanicus* crece en su temperatura óptima.
10. Se sugiere un modelo de actuación de la proteína HspA12a en la ruta NCRIP del silenciamiento génico de *M. lusitanicus* en el cual HspA12a interaccionaría con el homodímero de R3B2 cuando el hongo se encuentra a temperaturas superiores a 26 °C, con el objetivo de estabilizar a esta ribonucleasa y permitir el correcto funcionamiento de la ruta NCRIP.

## VI. BIBLIOGRAFÍA



- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544.
- Alexander, W. G., Raju, N. B., Xiao, H., Hammond, T. M., Perdue, T. D., Metzberg, R. L., Pukkila, P. J., & Shiu, P. K. T. (2008). DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(5), 719–727.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., & Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *121*(2), 207–221.
- Altschul, S., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402.
- Alvarez, E., Sutton, D. A., Cano, J., Fothergill, A. W., Stchigel, A., Rinaldi, M. G., & Guarro, J. (2009). Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(6), 1650–1656.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, *431*(7006), 350–355.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-jones, S. a M., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003a). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, *9*, 277–279

## VI. Bibliografía

- Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., & Jewell, D. (2003b). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*, *13*, 807–818.
- Anaya, N., & Roncero, M. I. G. (1991). Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *MGG Molecular & General Genetics*, *230*(3), 449–455.
- Aravin, A. A., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, *318*(5851), 761–764.
- Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., & Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental Cell*, *5*(2), 337–350.
- Barna, J., Csermely, P., & Vellai, T. (2018). Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(16), 2897–2916.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*, 281–297.
- Benito, E. P., Campuzano, V., López-Matas, M. A., De Vicente, J. I., & Eslava, A. P. (1995). Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *MGG Molecular & General Genetics*, *248*(2), 126–135.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, *123*(7), 1279–1291.

- Brocchieri, L., Conway De Macario, E., & Macario, A. J. L. (2008). *hsp70* genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–20.
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, S. M., Chang, H. C., Genevoux, P., Agostini, F., Tartaglia, G. G., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2012). DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell Reports*, 1(3), 251–264.
- Calo, S. (2010). *Polimerasas de RNA y su papel en el silenciamiento génico mediado por RNA en Mucor circinelloides* [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Calo, S., Nicolás, F. E., Lee, S. C., Vila, A., Cervantes, M., Torres-Martinez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2017). A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genetics*, 13(3), 1–26.
- Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2012). Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 83(2), 379–394.
- Calo, S., Shertz-Wall, C., Lee, S. C., Bastidas, R. J., Nicolás, F. E., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2014). Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature*, 513(7519), 555–558.
- Cánovas-Márquez, J. T., Falk, S., Nicolás, F. E., Padmanabhan, S., Zapata-Pérez, R., Sánchez-Ferrer, Á., Navarro, E., & Garre, V. (2021). A ribonuclease III involved in virulence of Mucorales fungi has evolved to cut exclusively single-stranded RNA. *Nucleic Acids Research*, 49(9), 5294–5307.

## VI. Bibliografía

- Cervantes, M., Vila, A., Nicolás, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Dalmay, T., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). A single *argonaute* gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS ONE*, *8*(7), e69283.
- Chacko, N., Zhao, Y., Yang, E., Wang, L., Cai, J. J., & Lin, X. (2015). The lncRNA *RZE1* controls cryptococcal morphological transition. *PLoS Genetics*, *11*(11), 1–27.
- Chang, Z., Billmyre, R. B., Lee, S. C., & Heitman, J. (2019). Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genetics*, *15*(2), 1–17.
- Chang, Z., & Heitman, J. (2019). Drug-resistant epimutants exhibit organ-specific stability and induction during murine infections caused by the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *MBio*, *10*(6), e02579-19.
- Choudhary, S., Lee, H.-C., Maiti, M., He, Q., Cheng, P., Liu, Q., & Liu, Y. (2007). A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(11), 3995–4005.
- Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, *399*(6732), 166–169.
- Corrochano, L. M., Kuo, A., Marcet-Houben, M., Polaino, S., Salamov, A., Villalobos-Escobedo, J. M., Grimwood, J., Álvarez, M. I., Avalos, J., Bauer, D., Benito, E. P., Benoit, I., Burger, G., Camino, L. P., Cánovas, D., Cerdá-Olmedo, E., Cheng, J. F., Domínguez, A., Eliáš, M., ... Grigoriev, I. V. (2016). Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Current Biology*, *26*(12), 1577–1584.
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, *453*(7196), 798–802.



- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, *101*(5), 543–553.
- De Haro, J. P., Calo, S., Cervantes, M., Nicolás, F. E., Torres-Martinez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2009). A single *dicer* gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell*, *8*(10), 1486–1497.
- Díaz-Mínguez, J. M., López-Matas, M. A., & Eslava, A. P. (1999). Complementary mating types of *Mucor circinelloides* show electrophoretic karyotype heterogeneity. *Current Genetics*, *36*(6), 383–389.
- Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, *131*(6), 1097–1108.
- Donaldson, M. E., & Saville, B. J. (2013). *Ustilago maydis* natural antisense transcript expression alters mRNA stability and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, *89*(1), 29–51.
- Dörnte, B., & Kües, U. (2013). Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of *Agaricomycetes* for PCR amplification. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *7*(4), 825–836.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797.
- Fan, C. Y., Ren, H. Y., Lee, P., Caplan, A. J., & Cyr, D. M. (2005). The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 695–702.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791.

## VI. Bibliografía

- Fernández-Fernández, M. R., Gragera, M., Ochoa-Ibarrola, L., Quintana-Gallardo, L., & Valpuesta, J. M. (2017). Hsp70: a master regulator in protein degradation. *FEBS Letters*, *591*(17), 2648–2660.
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W., & Moerman, D. G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, *113*(2), 503–514.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806–811.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., Fitzhugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., ... Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, *422*(6934), 859–868.
- Garre, V., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2014). The RNAi machinery in Mucorales: the emerging role of endogenous small RNAs. In A. Sesma & T. von der Haar (Eds.), *Fungal RNA Biology* (pp. 291–313). Springer, Cam.
- Gething, M.-J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, *355*, 33–45.
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, *10*(2), 94–108.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, *11*(4), 355–360.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W.,

- Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546–567.
- Gooday, G. W., Fawcett, P., Green, D., & Shaw, G. (1973). The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of *Mucor mucedo*: a role for the sexual carotenogenesis in the Mucorales. *Journal of General Microbiology*, *74*(2), 233–239.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(3), 454–500.
- Gutiérrez, A., López-García, S., & Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(3), 442–446.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*, *21*(17), 4671–4679.
- Han, Z., Truong, Q. A., Park, S., & Breslow, J. L. (2003). Two Hsp70 family members expressed in atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(3), 1256–1261.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, *475*(7356), 324–332.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, *111*(5), 509–547.
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G. S., Benny, G. L., Kirk, P. M., & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales:

## VI. Bibliografía

- a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30, 57–76.
- Holmes, D. S., & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193–197.
- Houwing, S., Kamminga, L. M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C. B., Plasterk, R. H. A., Hannon, G. J., Draper, B. W., & Ketting, R. F. (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell*, 129(1), 69–82.
- Huang, Y. C., Chen, H. T., & Teng, S. C. (2010). Intragenic transcription of a noncoding RNA modulates expression of ASP3 in budding yeast. *RNA*, 16(11), 2085–2093.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, 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.
- 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.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425–1436.
- Jeong, W., Keighley, C., Wolfe, R., Lee, W. L., Slavin, M. A., Kong, D. C. M., & Chen, S. C. A. (2018). The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 26–34.

- Johnston, M., Geoffroy, M.-C., Sobala, A., Hay, R., & Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded Argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Molecular Biology of the Cell*, 21(9), 1462–1469.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequence. *Bioinformatics*, 8(3), 275–282.
- Karam, J. A., Parikh, R. Y., Nayak, D., Rosenkranz, D., Gangaraju, V. K., & Wek, R. C. (2017). Co-chaperone Hsp70/Hsp90-organizing protein (Hop) is required for transposon silencing and Piwi-interacting RNA (piRNA) biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 292(15), 6039–6046.
- Kominek, J., Marszałek, J., Neuvéglise, C., Craig, E. A., & Williams, B. L. (2013). The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: A genomic and functional perspective. *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2460–2477.
- Kong, Q., Dai, L., Wang, Y., Zhang, X., Li, C., Jiang, S., Li, Y., Ding, Z., & Liu, L. (2016). HSPA12B attenuated acute myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining endothelial integrity in a PI3K/Akt/mTOR-dependent mechanism. *Scientific Reports*, 6(1), 1–11.
- Kong, Q., Li, N., Cheng, H., Zhang, X., Cao, X., Qi, T., Dai, L., Zhang, Z., Chen, X., Li, C., Li, Y., Xue, B., Fang, L., Liu, L., & Ding, Z. (2019). HSPA12A is a novel player in nonalcoholic steatohepatitis via promoting nuclear PKM2-mediated M1 macrophage polarization. *Diabetes*, 68(2), 361–376.
- 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.
- Kuzina, V., & Cerdá-Olmedo, E. (2007). Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 991–999.

## VI. Bibliografía

- Lee, H. C., Chang, S. S., Choudhary, S., Aalto, A. P., Maiti, M., Bamford, D. H., & Liu, Y. (2009). qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, *459*(7244), 274–277.
- Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemliadis, 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.
- Lee, S. C., Li, A., Calo, S., & Heitman, J. (2013). Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003625.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, *117*(1), 69–81.
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, *47*, W256-259.
- Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., Heitman, J., & Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, *7*(6), e1002086.
- Lu, Z., & Cyr, D. M. (1998). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co- chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(10), 5970–5978.
- Macario, A. J. L., & Macario, E. C. De. (2007). Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications. *Frontiers in Bioscience*, *12*(1), 2588–2600.

- Madsen, P., Isaksen, T. J., Siupka, P., Tóth, A. E., Nyegaard, M., Gustafsen, C., & Nielsen, M. S. (2019). HSPA12A targets the cytoplasmic domain and affects the trafficking of the Amyloid Precursor Protein receptor SorLA. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Maiti, M., Lee, H. C., & Liu, Y. (2007). QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes and Development*, 21(5), 590–600.
- Makhnevych, T., & Houry, W. A. (2011). The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(3), 674–682.
- Milarski, K. L., & Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9517–9521.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics* (pp. 325–355). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miyashita, A., Koike, A., Jun, G., Wang, L. S., Takahashi, S., Matsubara, E., Kawarabayashi, T., Shoji, M., Tomita, N., Arai, H., Asada, T., Harigaya, Y., Ikeda, M., Amari, M., Hanyu, H., Higuchi, S., Ikeuchi, T., Nishizawa, M., Suga, M., ... Kuwano, R. (2013). SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in japanese, koreans and caucasians. *PLoS ONE*, 8(4), e58618.
- Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2010). A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(8), 1024–1026.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195.

## VI. Bibliografía

- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C., & Massie, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5317–5327.
- Nagy, G., Szebenyi, C., Csernetics, Á., Vaz, A. G., Tóth, E. J., Vágvölgyi, C., & Papp, T. (2017). Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10.
- Nakayashiki, H. (2005). RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Letters*, 579(26), 5950–5957.
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4), 279–289.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J., Quiles-Rosillo, M., Nicolás, F., Garre, V., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(3), 463–470.
- Navarro, E., Sandmann, G., & Torres-Martínez, S. (1995). Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Experimental Mycology*, 19(3), 186–190.
- Navarro-Mendoza, M. I. (2020). *Identificación de factores de virulencia en la mucormicosis* [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
- Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-arques, C., Panchal, S., Francisco, E., Mondo, S. J., Ganguly, P., Pangilinan, J., Grigoriev, I. V, Heitman, J., Sanyal, K., & Garre, V. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks



- centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology*, 29(22), 3791–3802.
- Neblett Fanfair, R., Benedict, K., Bos, J., Bennett, S. D., Lo, Y.-C., Adebajo, T., Etienne, K., Deak, E., Derado, G., Shieh, W.-J., Drew, C., Zaki, S., Sugerman, D., Gade, L., Thompson, E. H., Sutton, D. A., Engelthaler, D. M., Schupp, J. M., Brandt, M. E., ... Park, B. J. (2012). Necrotizing cutaneous Mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *New England Journal of Medicine*, 367(23), 2214–2225.
- Nicolás, F. E., Calo, S., Murcia-Flores, L., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M., & Torres-Martínez, S. (2008). A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters*, 280(1), 81–88.
- Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Mutants defective in a *Mucor circinelloides* *dicer*-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology*, 44(6), 504–516.
- Nicolás, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martínez, S., Moulton, V., Ruiz-Vázquez, R. M., & Dalmay, T. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Research*, 38(16), 5535–5541.
- Nicolás, F. E., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., López-García, S., Navarro, E., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2018). Molecular tools for carotenogenesis analysis in the mucoral *Mucor circinelloides*. In C. Barreiro & J. L. Barredo (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1852, pp. 221–237). Humana Press.
- Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO Journal*, 22(15), 3983–3991.

## VI. Bibliografía

- Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Cascales, M. D., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., & Garre, V. (2015). The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics*, *16*(1), 1–14.
- 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.
- Orlowski, M. (1991). *Mucor* Dimorphism. *Microbiological Reviews*, *55*(2), 234–258.
- Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O’Carroll, D., & Zamore, P. D. (2019). PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics*, *20*(2), 89–108.
- Pare, J. M., LaPointe, P., & Hobman, T. C. (2013). Hsp90 cochaperones p23 and FKBP4 physically interact with hAgo2 and activate RNA interference-mediated silencing in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(15), 2303–2310.
- Pérez-Arques, C. (2020). *El silenciamiento génico de Mucor circinelloides regula la cromatina centromérica y la virulencia* [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M. I., Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F. E., & Garrea, V. (2019). *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *MBio*, *10*(1), e02765-18.
- Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M. I., Murcia, L., Navarro, E., Garre, V., & Nicolás, F. E. (2020). A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genetics*, *16*(7), e1008611.

- Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R., & Finn, R. D. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*, W200–W204.
- Prändl, R., Hinderhofer, K., Eggerts-Schumacher, G., & Schöffl, F. (1998). HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Molecular and General Genetics*, *258*(3), 269–278.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C., & Sánchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, *310*(5752), 1327–1330.
- Reid, G., Lynch III, J. P., Fishbein, M. C., & Clark, N. M. (2020). Mucormycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *41*(1), 99–114.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, *18*(12), 571–573.
- Rodríguez-Frómata, R. A., Gutiérrez, A., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2012). Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(7), 3063–3072.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., ... St. George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics*, *39*(2), 168–177.
- Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, *6*(22), 3343–3353.

## VI. Bibliografía

- Roncero, M. I. G. (1984). Enrichment method for the isolation of auxotrophic mutants of *Mucor* using the polyene antibiotic N-glycosyl-polifungin. *Carlsberg Research Communications*, 49(7), 685–690.
- Roncero, M. I. G., Jepsen, L. P., Strøman, P., & van Heeswijck, R. (1989). Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84(2), 335–343.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665–680.
- Ruiz-Vázquez, R. M., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2015). Distinct RNAi pathways in the regulation of physiology and development in the fungus *Mucor circinelloides*. In T. Friedmann, J. C. Dunlap, & S. F. Goodwin (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 91, pp. 55–102). Academic Press.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Schipper, M. A. A. (1976). On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies in Mycology*, 12, 1–40.
- Segers, G. C., Van Wezel, R., Zhang, X., Hong, Y., & Nuss, D. L. (2006). Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic Cell*, 5(6), 896–904.
- Shalgi, R., Hurt, J. a, Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., & Burge, C. B. (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Molecular Cell*, 49(3), 439–452.

- Shaner, L., & Morano, K. A. (2007). All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress and Chaperones*, *12*(1), 1–8.
- Shiu, P. K. T., Raju, N. B., Zickler, D., & Metzenberg, R. L. (2001). Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, *107*, 905–916.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2006). Distinct *white collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, *61*(4), 1023–1037.
- Singh, A. K., Singh, R., Joshi, S. R., & Misra, A. (2021). Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *15*(4), 102146.
- Sjögren, L., Floris, M., Barghetti, A., Völlmy, F., Linding, R., & Brodersen, P. (2018). Farnesylated heat shock protein 40 is a component of membrane-bound RISC in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(43), 16608–16622.
- Smith, M. R., Willmann, M. R., Wu, G., Berardini, T. Z., Möller, B., Weijers, D., & Poethig, R. S. (2009). Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(13), 5424–5429.
- Spatafora, J. W., Aime, M. C., Grigoriev, I. V., Martin, F., Stajich, J. E., & Blackwell, M. (2017). The Fungal Tree of Life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*, *5*(5), 1–34.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, *108*(5), 1028–1046.

## VI. Bibliografía

- Steagall, R. J., Rusiñol, A. E., Truong, Q. A., & Han, Z. (2006). HSPA12B is predominantly expressed in endothelial cells and required for angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(9), 2012–2018.
- Stoltzfus, A., Lapp, H., Matasci, N., Deus, H., Sidlauskas, B., Zmasek, C. M., Vaidya, G., Pontelli, E., Cranston, K., Vos, R., Webb, C. O., Harmon, L. J., Pirrung, M., O'Meara, B., Pennell, M. W., Mirarab, S., Rosenberg, M. S., Balhoff, J. P., Bik, H. M., ... Jordan, G. (2013). Phylotastic! Making tree-of-life knowledge accessible, reusable and convenient. *BMC Bioinformatics*, *14*(158), 1–17.
- Sugar, A. M. (1992). Mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, *14*(1), S126-9.
- Taipale, M., Tucker, G., Peng, J., Krykbaeva, I., Lin, Z. Y., Larsen, B., Choi, H., Berger, B., Gingras, A. C., & Lindquist, S. (2014). A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell*, *158*(2), 434–448.
- Till, P., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2018). A current view on long noncoding RNAs in yeast and filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(17), 7319–7331.
- Tissières, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, *84*(3), 389–398.
- Tiwari, S., & Shankar, J. (2018). Hsp70 in fungi: evolution, function and vaccine candidate. In A. A. A. Asea & P. Kaur (Eds.), *HSP70 in Human Diseases and Disorders* (pp. 381–400). Springer, Cham.
- Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2016). RNAi pathways in *Mucor*: a tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genetics and Biology*, *90*, 44–52.
- Trieu, T. A., Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Dalmay, T., Torres-Martínez, S., Garre, V., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2015). A Non-canonical RNA

- silencing pathway promotes mRNA degradation in basal fungi. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005168.
- 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.
- Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., & Zamore, P. D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313(5785), 320–324.
- van Heeswijck, R. (1984). The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49(7), 597–609.
- van Heeswijck, R., & Roncero, M. I. G. (1984). High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications*, 49(7), 691–702.
- Vázquez, F., Legrand, S., & Windels, D. (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends in Plant Science*, 15(6), 337–345.
- Vázquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P., & Crété, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell*, 16(1), 69–79.
- Vila, A. (2014). *Regulación de la expresión de genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en Mucor circinelloides* [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Wagner, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartze, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2019). A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 44, 67–97.

## VI. Bibliografía

- Wang, X., Hsueh, Y. P., Li, W., Floyd, A., Skalsky, R., & Heitman, J. (2010). Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes and Development*, *24*(22), 2566–2582.
- Ward, A. C. (1990). Single-step purification of shuttle vectors from yeast for high frequency back-transformation into *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, *18*(17), 5319.
- Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *5*(10), 761–772.
- Wickham, H., & Chang, W. (2016). Package ‘ggplot2.’ In *Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (Vol. 2, Issue 1, pp. 1–189).
- Wolff, A. M., & Arnau, J. (2002). Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology*, *35*(1), 21–29.
- Wu, J., Li, X., Huang, L., Jiang, S., Tu, F., Zhang, X., Ma, H., Li, R., Li, C., Li, Y., Ding, Z., & Liu, L. (2015). HSPA12B inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(3), 544–554.
- Xiao, H., Alexander, W. G., Hammond, T. M., Boone, E. C., Perdue, T. D., Pukkila, P. J., & Shiu, P. K. T. (2010). QIP, a protein that converts duplex siRNA into single strands, is required for meiotic silencing by unpaired DNA. *Genetics*, *186*(1), 119–126.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, *2*(5), 642–652.
- Yin, R. H., Yu, J. T., & Tan, L. (2014). The role of SORL1 in Alzheimer’s disease. *Molecular Neurobiology*, *51*(3), 909–918.



- Zabinsky, R. A., Mason, G. A., Queitsch, C., & Jarosz, D. F. (2018). It's not magic – Hsp90 and its effects on genetic and epigenetic variation. In Academic Press (Ed.), *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 88, pp. 21–35). Elsevier Ltd.
- Zhao, Y., Liu, C., Liu, J., Kong, Q., Mao, Y., Cheng, H., Li, N., Zhang, X., Li, C., Li, Y., Liu, L., & Ding, Z. (2018). HSPA12B promotes functional recovery after ischaemic stroke through an eNOS-dependent mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(4), 2252–2262.
- Zhou, J., Zhang, A., & Fan, L. (2020). HSPA12B secreted by tumor-associated endothelial cells might induce M2 polarization of macrophages via activating pi3k/akt/mtor signaling. *OncoTargets and Therapy*, 13, 9103–9111.
- Zilberman, D., Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 299(5607), 716–719.