



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estructura y Función de la Ribonucleasa R3B2
implicada en el Mecanismo de Silenciamiento
Génico de *Mucor lusitanicus*

D. José Tomás Cánovas Márquez

2022

Estructura y Función de la Ribonucleasa R3B2 implicada en el Mecanismo 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 con Mención de Doctorado Internacional, por el Graduado José Tomás Cánovas Márquez.

A mis abuelos

Agradecimientos

Tras más de una década recorriendo los pasillos de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia primero como alumno de grado, después de Máster y finalmente de Doctorado esta etapa de mi vida llega a su final. Espero con estas palabras poder agradecer a todos los que me han apoyado durante este tiempo, porque sin ellos probablemente no hubiese llegado hasta aquí.

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a mis directores, Víctor y Sebi. Sois vosotros los que me acogisteis desde mis inicios como alumno interno del departamento y compartisteis vuestro conocimiento y experiencia conmigo, demostrándome un día tras otro la enorme cantidad de saber que lleváis a vuestras espaldas y el largo camino que queda para comprender la vida que nos rodea. Víctor, muchas gracias por todo el tiempo que me has dedicado y las oportunidades que me has dado porque has sido como un padre para mí. Aun en tus momentos de mayor ocupación con la docencia, la investigación y la gestión siempre te has parado a hablar conmigo sin mirar el reloj. No recuerdo ninguna de esas conversaciones en la que no me hayas enseñado algo nuevo y además me has transmitido tu celo a la hora de poner a prueba cada nuevo resultado para obtener pilares sólidos en este mundo en el que tanto cuesta encontrar certezas. Va a ser muy complicado descubrir un laboratorio con un director tan cercano como tu has sido y nunca lo voy a olvidar. Sebi, te he dado más guerra que un hijo en el laboratorio, entrando a tu despacho e interrumpiéndote constantemente. Gracias a ti he aprendido a desenvolverme sin que ninguna máquina pague las consecuencias de mi inexperiencia. Me has transmitido tus buenas prácticas y técnicas de laboratorio, pero además fueron tus observaciones durante el estudio de la carotenogénesis las que dieron pie a la investigación dentro del departamento que esta tesis continua. Espero algún día poder llegar a ser como vosotros e inspirar a una nueva generación de alumnos e investigadores a profundizar en el conocimiento tan limitado de la biología que tenemos.

Por supuesto, a mis compañeros y al grupo de investigación muchísimas gracias porque tanto los que seguiréis como los que ya os marchasteis habéis hecho de mi paso por el laboratorio un lugar acogedor y perlado de retos intelectuales sobre los que debatir abiertamente. No me tengáis en cuenta las veces que hemos acabado hablando sobre algún experimento en las comidas. Rosa, Santiago, Curro, Silvia, Juan Pedro, María, Ana, Trung, Maribel y Carlos me considero afortunado de haber podido continuar vuestro trabajo. Camino a hombros de gigantes como vosotros y sin toda la dedicación y el esfuerzo que hicisteis no hubiese podido escribir esta tesis. Rosa y Santi, hace tiempo que pudisteis volver a vuestra tierra para poder disfrutar de vuestra familia sin la pesada carga que supone este mundo a nivel personal. Nunca se me olvidará aquel día siendo interno del departamento en el que estabais planificando una de esas maravillosas comidas y Rosa exclamó “¡pero si Joseto se pasa el día aquí... ya forma parte del laboratorio!”. Muchas gracias a los dos, porque desde el principio supisteis hacerme sentir querido a pesar de mi ignorancia y falta de experiencia. Curro, si tuviese que decir todo lo que te tengo que

agradecer tendría que dividir la tesis en dos tomos. Permíteme la licencia de agradecerte todo lo que me has ayudado a lo largo de estos años con tus consejos personales y tus brillantes ideas. Espero que con la seguridad que te ofrece tu merecida titularidad sigas contribuyendo como has hecho hasta ahora a que la ciencia y el laboratorio siga creciendo. Aunque ya no esté alado de tu despacho, siempre que esté en mi mano os ayudaré si me necesitáis. Silvia, aunque hemos compartido breves periodos de tiempo en el laboratorio para mi eres omnipresente. Dicen que se puede conocer a un escritor a través de sus obras y las tuyas para mi han sido libros de cabecera. He leído tu tesis y tus artículos más veces de las que se podría considerar sano para una persona cabal y creo que por ello siento una conexión especial contigo a pesar de los breves periodos que hemos compartido. Lo mismo puedo decir para el resto, muchas gracias por cada una de vuestras contribuciones porque sin ellas esta tesis no existiría. Laura, espero que todo te vaya muy bien en los próximos años. Sin tener ninguna necesidad ni esperar nada a cambio me enseñaste a hacer las puñeteras PCRs cuantitativas. Siento decirte que desde entonces he empezado a apreciar profundamente las hibridaciones tipo *Northern* y más aún después de ver los oligos que usan otros grupos para amplificar genes de referencia. Fuera de bromas, has sido una parte fundamental en mi paso por el laboratorio y te estoy profundamente agradecido por compartir tus experiencias conmigo ya que me han preparado un poco más para afrontar la etapa que comienzo tras estas tesis. Jose, Ghizlane, Lax, Pacho y Sergio, habéis hecho del laboratorio un lugar increíble y divertido que compensaba con creces el tiempo que robaba a mi familia y amigos. De hecho, os considero mi segunda familia ya que he compartido con vosotros casi más tiempo que con la mía a lo largo de todos estos años. No me tengáis en cuenta no participar en vuestros partidos de futbol, pero nunca he sido de deportes en los que haya que correr detrás de un balón. Adolezco de una completa falta de coordinación de cintura para abajo que me ha impedido hacer fortuna en la primera división o en el mundo del espectáculo. Ay Ghizlane, como has crecido desde que comenzaste a trabajar en el laboratorio. Sigue haciéndolo y no te distraigas porque tienes el potencial para dedicarte a este mundo si es lo que quieres. Nunca olvidaré nuestro tándem cuasi matrimonial durante la ejecución de tu TFM y tus infinitas carcajadas con las que has llenado el laboratorio de vida. Como el primer amor, tu siempre serás mi primera alumna de TFM extraoficiosamente. No me puedo olvidar de los alumnos, que al igual que yo, empezaron a dar sus primeros pasos en el departamento de genética y a los que he intentado transmitirles los valores que mis directores me han enseñado. María y Pablo, aunque se supone que yo tenía que instruiros al final habéis acabado enseñándome vosotros a mi también. Gracias a vosotros he aprendido las dificultades de la didáctica y los peligros de la literalidad, así como un sinfín de detalles experimentales que he tenido que consultar en los antiguos legajos para comprender los motivos por los que realizamos cada paso de los protocolos más básicos de biología molecular. Gracias a mi enriquecedora experiencia con vosotros he podido actuar sobre esos protocolos y adaptarlos para llegar más allá. Nunca perdáis esa curiosidad. Pablo, recae sobre la tarea de transmitir a los nuevos alumnos todo lo que hemos aprendido en estos años. Dentro de un suspiro comenzarás tu doctorado y te deseo que lo disfrutes tanto

o más que yo lo he hecho. Muchas gracias por sacarme esa sonrisa en los peores momentos porque has sido la única persona que cuando he tenido un mal día me lo has dicho sin contemplaciones y como una colega pedagógica me has devuelto al buen camino de inmediato. Muchas gracias también a los internacionales que han pasado por el departamento, Ullie, Manu, Macario, Albert, Lupita, Viridiana, Yington, Judit y Shaoqui. Habéis hecho de este laboratorio un lugar de encuentro para conocer diferentes culturas y compartir experiencias mucho más allá de la investigación.

Muchas gracias a la gente del Ala A, me habéis ayudado siempre que lo he necesitado. No puedo olvidar que solicité entrar al departamento en segundo sin haber cursado genética porque en esas primeras clases Paco me transmitió una pasión y un amor por este campo del conocimiento que no pudo sino acrecentar más mi necesidad por conocerlo de cerca. Montse, Marta, Padhu, Carmen y Antonio muchas gracias por vuestras maravillosas clases y conversaciones, espero no haberos defraudado cuando me habéis dado la oportunidad de participar en la docencia de esas asignaturas que con tanto celo y dedicación impartís cada año. Carmen, no se que sería de la organización del departamento sin ti, muchísimas gracias por todo ese tiempo que le dedicas a la organización a pesar de los malabares que a veces te pedimos. Marisa, no he tenido el placer de ser tu alumno, pero tu oposición me brindó la oportunidad de asistir a una de las mejores clases magistrales de genética que he visto. No me cabe duda de que gracias a ti los futuros alumnos sentirán la necesidad de saber más y como yo solicitarán su ingreso en el departamento. Sigue disfrutando de cada clase como lo haces y se muy feliz. Diego, Antonio M., Eva, Ricardo, Elena y todos los demás, muchas gracias por enseñarme tantas cosas y los momentos que hemos compartido. No puedo olvidarme tampoco de nuestro técnico de laboratorio, sin cuyo trabajo ninguno de los dos laboratorios funcionaría tal y como lo hace. Muchas gracias José Antonio, por tu trabajo y por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de estos años.

Tampoco me olvido de ti, José Ángel, muchas gracias por todos los consejos y oportunidades que me has dado y me sigues dando. Desde aquél fatídico día en el que comenzamos a hablar en la puerta de la facultad no has hecho más que enriquecer mi vida y mi estancia en la universidad de Murcia. No solo a mí, nos has ayudado a todos siempre que has podido. Muchas gracias a todos mis amigos y compañeros de carrera, Celia y Gabi especialmente habéis convertido las comidas en ese momento del día especial donde reunirse y animarse mutuamente para seguir adelante.

Gracias a toda mi familia por haberme apoyado durante estos años porque gracias a ello he podido llegar hasta este momento y sobre todo muchas gracias por no cabrearos a pesar de los largos meses en los que he estado ausente. A mis abuelos y a mis primas, porque lo dieron todo para que yo pudiese estudiar y salir de Totana. Gracias a mis tíos y mis padres por transmitirme los valores por los que me he regido durante toda mi vida.

Finalmente, muchas gracias a ti, Alejandro. Han sido unos años muy duros y que nunca podré agradecerte del todo. Tu me has dado la oportunidad de apartar

temporalmente todo aquello que no estuviese relacionado con la redacción de esta tesis y has realizado un sacrificio que no te correspondía. Gracias por tener tanta paciencia conmigo y alegrarme cada día.

Índice de contenidos

Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Listado de abreviaturas	IX
Resumen en inglés	XI
I. Introducción.....	1
I.1. Los hongos Mucorales	3
I.1.1. Características generales	3
I.1.2. Filogenia y mucormicosis	4
I.1.3. <i>M. lusitanicus</i> como organismo modelo	6
I.2. Silenciamiento génico.....	8
I.2.1. Generalidades	8
I.2.2. El silenciamiento génico en hongos	12
I.2.3. Mecanismos de silenciamiento génico descritos en <i>M. lusitanicus</i>	13
I.2.3.1. Mecanismo canónico de silenciamiento.....	16
I.2.3.2. Mecanismo de regulación endógena y de producción de epimutantes..	16
I.2.3.3. Mecanismo no canónico de silenciamiento y la regulación de las rutas de RNAi	18
I.3. R3B2, la ribonucleasa del mecanismo no canónico de silenciamiento	20
II. Justificación y objetivos de la tesis	23
III. Materiales y métodos	27
III.1. Estirpes utilizadas	29
III.1.1. Estirpes de <i>E. coli</i>	29
III.1.2. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	30
III.1.3. Estirpes de hongos filamentosos	31
III.2. Medios, condiciones de crecimiento y transformación.....	32
III.2.1. Medios de cultivo	32
III.2.2. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	34
III.2.3. Transformación de levaduras y ensayo de doble híbrido en levaduras	34
III.2.4. Transformación de <i>M. lusitanicus</i>	37
III.3. Manipulación de DNA	38

III.3.1. Amplificación de DNA mediante PCR	38
III.3.2. Construcción de plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	39
III.3.3. Extensión de oligonucleótidos.....	53
III.3.4. Aislamiento de DNA de <i>M. lusitanicus</i>	53
III.3.5. Aislamiento de DNA plasmídico.....	53
III.3.6. Tratamiento del DNA con enzimas	53
III.3.7. Técnicas electroforéticas para el DNA.....	54
III.4. Manipulación de RNA	54
III.4.1. Aislamiento de RNA total	54
III.4.2. Síntesis de ssRNA y dsRNA marcado radiactivamente	55
III.4.3. Síntesis de cDNA	57
III.4.4. PCR cuantitativa.....	58
III.5. Manipulación de proteínas.....	59
III.5.1. Electroforesis de proteínas	59
III.5.2. Expresión de proteínas recombinantes	60
III.5.3. Purificación de proteínas recombinantes mediante matrices de Ni-NTA ..	60
III.5.4. Proteólisis limitada e identificación de fragmentos de R3B2	62
III.6. Retraso en gel (EMSA)	63
III.7. Ensayos de actividad RNasa <i>in vitro</i>	63
III.8. Infección de <i>Galleria mellonella</i> y determinación de supervivencia.....	64
III.9. Análisis bioinformático.....	65
III.9.1. Predicción de la estructura de proteínas	65
III.9.2. Análisis de los resultados de la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq)	65
III.9.3. Disponibilidad de datos	66
IV. Resultados.....	67
IV.1. Caracterización <i>in vitro</i> de la proteína R3B2	69
IV.1.1. Clonación del cDNA, expresión y purificación de R3B2	69
IV.1.2. Caracterización de los dominios estructurados de la proteína R3B2	71
IV.1.3. Análisis de interacción de los dominios de la proteína R3B2.....	74
IV.1.4. Unión de RNA a la proteína R3B2.....	75
IV.1.5. Caracterización de la actividad RNasa de la proteína R3B2.....	80

IV.1.5.1. <i>Demostración de la especificidad por el ssRNA de R3B2</i>	80
IV.1.5.2. <i>Efecto de las mutaciones de los dsRBD en la actividad de R3B2</i>	82
IV.1.5.3. <i>La especificidad de corte de R3B2 depende de su dominio RIIID</i>	82
IV.1.6. <i>Caracterización de la estructura del dominio RIIID de R3B2</i>	84
IV.1.6.1. <i>Descripción y comparación de la estructura del RIIID de R3B2</i>	84
IV.1.6.2. <i>Mutación del centro catalítico de R3B2</i>	86
IV.1.6.3. <i>Mutación del canal de posicionamiento del RNA de R3B2</i>	88
IV.2. Caracterización <i>in vivo</i> de R3B2	90
IV.2.1. <i>Análisis de interacción de R3B2 con los componentes de RNAi</i>	90
IV.2.2. <i>Caracterización de las interacciones de R3B2 y las proteínas Dicer</i>	93
IV.2.3. <i>Papel de los dominios dsRBD de R3B2 en los mecanismos de RNAi</i>	95
IV.2.3.1. <i>Obtención de estirpes portadoras de alelos mutados de r3b2</i>	95
IV.2.3.2. <i>Papel de los dominios dsRBD en el silenciamiento génico</i>	97
IV.2.3.3. <i>Papel de los dominios dsRBD en la NCRIP</i>	98
IV.2.3.4. <i>Estudio de la virulencia de las estirpes portadoras de alelos mutados de r3b2</i>	100
IV.2.4. <i>Efecto de las mutaciones en los dsRBD en la interacción de R3B2 con las proteínas Dicer</i>	101
IV.2.5. <i>Bases estructurales de las interacciones de R3B2 y las proteínas Dicer</i> ..	103
IV.2.5.1. <i>Estructura predicha de las proteínas Dicer-1 y Dicer-2 de M. lusitanicus</i>	103
IV.2.5.2. <i>Estructura de la proteína R3B2 y descripción de la posible región de interacción (PIR) en CTF</i>	105
IV.2.5.3. <i>Interacción de la región PIR de R3B2 con las regiones de Dicer-1</i> .	107
IV.2.6. <i>Análisis del tamaño y polaridad de los siRNA en los mutantes de las proteínas implicadas en el RNAi de M. lusitanicus</i>	109
IV.2.6.1. <i>Comparación de sRNA en el mutante en r3b2 durante el crecimiento activo y la fase estacionaria</i>	110
IV.2.6.2. <i>Acumulación de sRNA con sentido y antisentido en los mutantes de las proteínas de RNAi</i>	112
IV.3. Determinación de la conservación funcional de la proteína R3B2 en Mucorales	117
IV.3.1. <i>Análisis filogenético de la proteína R3B2</i>	117

IV.3.2. Análisis de la actividad RNasa <i>in vitro</i> de proteínas homólogas de R3B2	119
IV.3.3. Complementación funcional con proteínas homólogas a R3B2 en <i>M. lusitanicus</i>	122
IV.3.3.1. Complementación del defecto en la NCRIP del mutante en <i>r3b2</i> de <i>M. lusitanicus</i>	122
IV.3.3.2. Complementación del defecto en la ruta canónica de RNAi del mutante en <i>r3b2</i> de <i>M. lusitanicus</i>	124
V. Discusión	125
V.1. La proteína R3B2 de <i>M. lusitanicus</i>	127
V.2. El papel de R3B2 en el complejo con las proteínas Dicer de <i>M. lusitanicus</i>	132
V.3. El papel de R3B2 en los mecanismos de RNAi de <i>M. lusitanicus</i>	138
V.4. Conservación funcional de la proteína R3B2 en Mucorales	147
VI. Conclusiones en inglés	149
VII. Bibliografía	153
VIII. Anexos	173
VIII.1. Proteínas utilizadas para el análisis filogenético	175

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de los Mucorales.	3
Figura 2. Clasificación de los Hongos.	5
Figura 3. Porcentaje de los géneros de Mucorales causantes de mucormicosis en las diferentes regiones geográficas del planeta.	6
Figura 4. Morfología macroscópica y microscópica de <i>M. lusitanicus</i>	8
Figura 5. Mecanismo general de silenciamiento génico.	9
Figura 6. Biogénesis de los diferentes esRNA.	11
Figura 7. Proteínas que participan en la maquinaria de RNAi de <i>M. lusitanicus</i>	15
Figura 8. Mecanismos de silenciamiento génico descritos en <i>M. lusitanicus</i>	19
Figura 9. La familia de R3B2 en Mucorales.	22
Figura 10. Representación del sistema de expresión de proteínas recombinantes en la estirpe BL21(DE3).	30
Figura 11. Representación de la PCR de fusión.	39
Figura 12. Obtención de alelos mutados de <i>r3b2</i> para su expresión en <i>E. coli</i>	40
Figura 13. Construcción de los plásmidos que contienen los fragmentos de reemplazamiento del locus <i>r3b2</i>	42
Figura 14. MCS insertado en pMAT2038 y fusión mediante PCR de fragmentos con extremos no solapantes.	44
Figura 15. Representación gráfica del protocolo de expresión de proteínas recombinantes.	60
Figura 16. Construcción del plásmido pMAT1603 para la expresión en <i>E. coli</i> de la proteína R3B2.	69
Figura 17. Clonación, expresión y purificación de R3B2.	70
Figura 18. Caracterización de dominios estructurados en la proteína R3B2.	72
Figura 19. Expresión y purificación de fragmentos resistentes a Subtilisina.	73
Figura 20. Perfil de interacción de los dominios de la proteína R3B2.	75
Figura 21. Caracterización de la unión de R3B2 a RNA.	78
Figura 22. Contribución de los dsRBD de R3B2 a la unión de RNA.	79
Figura 23. Caracterización de la actividad RNasa de R3B2 frente a ssRNA y dsRNA.	81
Figura 24. Caracterización de la actividad RNasa de las variantes de R3B2 y restauración de la capacidad para cortar dsRNA.	83
Figura 25. Análisis estructural del dímero formado por el RIIID de R3B2.	85
Figura 26. Dimerización del dominio RIIID de R3B2.	86
Figura 27. Caracterización de los residuos catalíticos de R3B2 y actividad <i>in vitro</i> de los mutantes N52.	87
Figura 28. Análisis de unión de RNA al RIIID de R3B2 y actividad <i>in vitro</i> de las variantes en K84.	89
Figura 29. Análisis de interacción de las proteínas conocidas de RNAi de <i>M. lusitanicus</i>	92
Figura 30. Interacción entre R3B2 y las proteínas Dicer.	94

Figura 31. Obtención de estirpes recombinantes de <i>M. lusitanicus</i> en el locus <i>r3b2</i>	96
Figura 32. Funcionamiento de la NCRIP en las estirpes de <i>M. lusitanicus</i> portadoras de alelos mutados de <i>r3b2</i>	99
Figura 33. Supervivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con las estirpes de <i>M. lusitanicus</i> portadoras de alelos mutados de <i>r3b2</i>	101
Figura 34. Efecto de las mutaciones en R3B2 sobre las interacciones en las que participa.	102
Figura 35. Estructura predicha de las proteínas Dicer de <i>M. lusitanicus</i>	104
Figura 36. Estructura predicha de R3B2.	106
Figura 37. Determinación de los dominios de Dicer-1 y R3B2 involucrados en su interacción.	108
Figura 38. Comparación de las características de los sRNA de <i>M. lusitanicus</i> acumulados en el mutante <i>r3b2Δ</i>	112
Figura 39. Funcionamiento de la ruta de RNAi canónica en los mutantes <i>rdrp-1Δ</i> y <i>rdrp-2Δ</i>	114
Figura 40. Funcionamiento de la ruta de RNAi canónica en el mutante <i>rdrp-3Δ</i>	115
Figura 41. Acumulación de sRNA en los mutantes en <i>dicer</i>	116
Figura 42. Acumulación de sRNA en el mutante <i>ago-1Δ</i>	116
Figura 43. Conservación filogenética de la proteína R3B2.....	118
Figura 44. Posición relativa del locus <i>r3b2</i> en <i>M. heterogamus</i> , <i>M. lusitanicus</i> , <i>P. parasitica</i> y <i>R. microsporus</i>	119
Figura 45. Comparación de los dominios RIIID de Mucorales con los de las RNasas III canónicas.	120
Figura 46. Caracterización de la actividad <i>in vitro</i> de las proteínas homólogas de R3B2 en Mucorales.....	121
Figura 47. Obtención de estirpes de <i>M. lusitanicus</i> portadoras de los posibles ortólogos de <i>r3b2</i> en el locus <i>carRP</i>	123
Figura 48. Funcionamiento de la NCRIP en las estirpes de <i>M. lusitanicus</i> portadoras de los homólogos de <i>r3b2</i>	124
Figura 49. Modelo de actuación de la proteína R3B2.	131
Figura 50. Modelo de actuación de la proteína R3B2 en el complejo con Dicer.....	136
Figura 51. Modelo de funcionamiento de RNAi sobre la regulación de transcritos endógenos.	140
Figura 52. Predicciones estructurales de la proteína SGS3 de <i>A. thaliana</i> y el posible homólogo de <i>M. lusitanicus</i>	142

Índice de tablas

Tabla 1. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	29
Tabla 2. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	30
Tabla 3. Estirpes de <i>M. lusitanicus</i> utilizadas en este trabajo.	31
Tabla 4. Suplementos de aminoácidos para la transformación de levaduras y estudios de interacción.	33
Tabla 5. Colección de levaduras haploides generadas en este trabajo.	35
Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.	45
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la manipulación de DNA.....	50
Tabla 8. Moléculas de RNA sintetizadas en este trabajo, obtención del molde y características más relevantes.	57
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.....	58
Tabla 10. Mezclas para la preparación manual de geles de SDS-PAGE.	59
Tabla 11. Frecuencia de silenciamiento inducida por pMAT1253 en las estirpes de <i>M. lusitanicus</i> portadoras de alelos mutados de <i>r3b2</i>	98
Tabla 12. Frecuencia de silenciamiento de la estirpe MU412 de <i>M. lusitanicus</i> transformada con plásmidos que expresan la horquilla de RNA del gen <i>carB</i> y los genes homólogos de <i>r3b2</i>	124

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Castellano	Inglés
<i>aRNA</i>	RNA aberrante	<i>Aberrant RNA</i>
<i>CTF</i>	Fragmento C-terminal	<i>C-terminal fragment</i>
<i>Dcl</i>	Similar a Dicer	<i>Dicer-like</i>
<i>disiRNA</i>	siRNA independiente de Dicer	<i>Dicer independent siRNA</i>
<i>dsRBD</i>	Dominio de unión a dsRNA	<i>Double-stranded RNA binding domain</i>
<i>DSRM</i>	Motivo de unión a dsRNA	<i>Double-stranded RNA binding motive</i>
<i>dsRNA</i>	RNA de doble cadena	<i>Double-stranded RNA</i>
<i>EMSA</i>	Retraso en gel	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>Endo-siRNA</i>	siRNA endógeno	<i>Endogenous siRNA</i>
<i>esRNA</i>	Pequeño RNA endógeno	<i>Endogenous short RNA</i>
<i>Ex-siRNA</i>	siRNA derivado de exones	<i>Exonic short interfering RNA</i>
<i>His</i>	Histidina	<i>Histidine</i>
<i>miRNA</i>	Semejante a miRNA	<i>miRNA-like</i>
<i>miRNA</i>	MicroRNA	<i>Micro-RNA</i>
<i>mRNA</i>	RNA mensajero	<i>Messenger RNA</i>
<i>MSUD</i>	Silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado	<i>Meiotic silencing of unpaired DNA</i>
<i>NCRIP</i>	Ruta no canónica de RNAi	<i>Non-canonical RNAi pathway</i>
<i>nt</i>	Nucleótidos	<i>Nucleotides</i>
<i>PAZ</i>	Dominio PIWI-Argonauta-Zwille	<i>PIWI-Argonaute-Zwille domain</i>
<i>pb</i>	Pares de bases	<i>Base pair</i>
<i>PBD</i>	Banco de datos de proteínas	<i>Protein Data Bank</i>
<i>PIR</i>	Posible región de interacción	<i>Possible interaction region</i>
<i>piRNA</i>	RNA asociado a PIWI	<i>PIWI-interacting RNA</i>
<i>PTGS</i>	Silenciamiento génico postranscripcional	<i>Post-transcriptional gene silencing</i>
<i>qPCR</i>	PCR cuantitativa	<i>Quantitative PCR</i>
<i>RBM</i>	Motivo de unión a RNA	<i>RNA-binding motif</i>
<i>RDRC</i>	Complejo de RdRP dirigido por RNA	<i>RNA-directed RdRP complex</i>
<i>rdRNA</i>	siRNA dependiente de <i>rdrp</i> e independiente de <i>dicer</i>	<i>rdrp-dependent dicer-independent siRNA</i>
<i>RdRP</i>	Polimerasa de RNA dependiente de RNA	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
<i>RIIID</i>	Dominio RNasa III	<i>RNase-III domain</i>

<i>RIP</i>	Mutación puntual inducida por repeticiones	<i>Repeat-induced point mutation</i>
<i>RISC</i>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<i>RITS</i>	Complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA	<i>RNA-induced transcriptional silencing complex</i>
<i>RLC</i>	Complejo de carga del RISC	<i>RISC loading complex</i>
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
<i>RMSD</i>	Desviación de la raíz media cuadrática	<i>Root-mean-square deviation</i>
<i>RNAi</i>	Interferencia de RNA	<i>RNA interference</i>
<i>RNasa</i>	Ribonucleasa	<i>Ribonuclease</i>
<i>rRNA</i>	RNA ribosomal	<i>Ribosomal RNA</i>
<i>RT-qPCR</i>	PCR cuantitativa a tiempo real	<i>real time quantitative PCR</i>
<i>SEC</i>	Cromatografía por exclusión molecular	<i>Size-exclusion chromatography</i>
<i>siRNA</i>	Pequeño RNA de interferencia	<i>Short interfering RNA</i>
<i>SIS</i>	Silenciamiento inducido por sexo	<i>Sex-induced silencing</i>
<i>SLS</i>	Dispersión estática de la luz	<i>Static light Scattering</i>
<i>sncRNA</i>	Pequeño RNA no codificante	<i>Small non-coding RNA</i>
<i>SRA</i>	Archivo de lecturas de secuenciación	<i>Sequence Read Archive</i>
<i>sRNA</i>	Pequeño RNA	<i>Small RNA</i>
<i>ssRNA</i>	RNA de cadena sencilla	<i>Single-stranded RNA</i>
<i>TE</i>	Elemento transponible	<i>Transposable element</i>
<i>UTR</i>	Región no traducida	<i>Untranslated region</i>
<i>Y2H</i>	Doble híbrido en levaduras	<i>Yeast-two hybrid</i>

Resumen en inglés

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) or RNA interference (RNAi) was one of the most outstanding discoveries of the 90s decade that impacted biology fields. Nowadays multiple researches are still being conducted to understand the diverse RNAi pathways widespread among every eukaryotic lineage. These mechanisms utilize small interfering RNAs (siRNAs) to target and either degrade the complementary transcripts or block their translation into proteins. The specificity conferred by the siRNAs allows the control of the exogenous and endogenous invasive nucleic acids, constituting a powerful defense of the organism and its genome, while in some organisms they orchestrate a refined control of endogenous transcripts. Since the initial discovery of the RNAi in fungi, a continuously expanding world of small RNAs (sRNAs) and RNAi mechanisms have demonstrated to participate in the control of fundamental processes of the lifestyle of these organisms such as growth, reproduction, stress adaptation, and pathogenesis. Here in this work, we carry out a detailed characterization of the atypical RNase R3B2 of *Mucor lusitanicus* in order to shed light over the complex interaction of the main RNAi pathways of this fungus, which are a canonical RNAi mechanism, where the Dicer RNases produce the siRNA, and a non-canonical RNAi pathway (NCRIP), driven by R3B2 that degrades specific endogenous transcripts without the production of typical siRNA.

We determined that R3B2 binds *in vitro* both single-stranded RNA (ssRNA) and double-stranded RNA (dsRNA), although it is only capable to cut ssRNA. While the RNA binding was dependent on both double-strand RNA binding domains (dsRBD), the substrate specificity was fully determined by the RNase III domain (RIIID), although the crystal structure of this domain shows an overall architecture similar to other well described RNase III proteins that cut dsRNA. The dimerization of the protein results in a narrowed RNA channel regarding other well described RNase III proteins that suggests a restricted access of dsRNA to the catalytic centers of the RNase. In fact, the relative position of a lysine (K84) to the catalytic centers and the charged nature of the lateral chain of the amino acid could explain the preference of U in the penultimate position of the sRNAs generated by the NCRIP, allowing us to propose a mechanistic model for ssRNA processing by R3B2.

The *in vivo* characterization of R3B2 revealed its interaction with Dicer proteins of *M. lusitanicus* establishing a direct link between the canonical RNAi and the NCRIP. We dissected the interactions based on the domain architecture of both proteins and their structural prediction taking advantage of the latest advances on artificial intelligence. The yeast-two hybrid assay showed that the contact between R3B2 and Dicer-1 was stronger than the detected with Dicer-2, involving two clearly different regions of the proteins. A strong interaction involved the linker region between both dsRBD of R3B2, where a novel putative interaction region (PIR) was described, and the PAZ-platform domains of Dicer-1. This interaction suggests an inhibitory role of R3B2 over Dicer activity by affecting

the PAZ-mediated binding of dsRNA. The second interaction was weaker and involved the corner of the helicase domain in the base of Dicer-1 protein and the first dsRBD of R3B2. This interaction resembled the characterized in animals between Dicer proteins and their multi-dsRBD domain-containing partners, representing the first description of this kind of Dicer partners in the fungal kingdom. Our *in vivo* mutational analysis of the interacting regions of R3B2 revealed that both regions are essential for R3B2 in the canonical RNAi. Surprisingly, while the absence of the strong interaction with the PAZ-platform region yielded a similar performance of the canonical RNAi than the *r3b2Δ* strain, the absence of the weak interaction with the helicase domain showed a more pernicious effect over the mechanism. These results suggest that in absence of the weak interaction, the strong one remains causing a complete blockage of the Dicer activity, which is compatible with the described positive and negative role of R3B2 on the processes mediated by the canonical RNAi. The substrate specificity and these *in vivo* results suggest that R3B2 is necessary to cleave the ssRNA stretches of the dsRNA in order to produce adequate dsRNA termini for Dicer processing. We explored this possibility by analyzing the effect of R3B2 absence over the sRNA length and strand polarity distribution during active growth and the stationary phase. The results obtained revealed two clearly different situations in regard of the growth state and the type of genes regulated by the RNAi mechanisms of *M. lusitanicus*. While R3B2 is necessary to produce exonic-siRNAs (ex-siRNA) during exponential growth, it was completely dispensable or even a negative regulator of the production of these siRNAs during the stationary phase. In addition, it was dispensable for the silencing of Genomic Retrotransposable Elements of Mucoromycotina LINE1-like (Grem-LINE1) during exponential growth, but negatively regulates them during the stationary phase, as previously described. These results agreed with the proposed differential dsRNA production by RdRP-1 and RdRP-2 and prompted us to re-analyze previously published sRNA datasets of RNAi mutants to propose a model for RNAi mechanisms in *M. lusitanicus* that include the results of these thesis results.

Finally, we extended the previous R3B2 phylogenetic analyses and showed that the unusual preference for ssRNA cleavage is conserved in Mucorales. In addition, we proved that the ortholog protein of *Lichtheimia corymbifera*, a Mucorales species causing mucormycosis, was able to complement the defects in the RNAi canonical pathway and the NCRIP by the absence of R3B2 in *M. lusitanicus*, reinforcing that the R3B2 function is conserved in this fungal order.

I. Introducción

I.1. Los hongos Mucorales

I.1.1. Características generales

Los Mucorales son un grupo de hongos basales heterotálicos caracterizados por la producción, durante la reproducción sexual, de zigosporas, unas esporas sexuales de pared gruesa, generalmente ornamentada y pigmentada. Las zigosporas se forman tras la fusión de hifas de dos individuos haploides de diferente tipo sexual, (+) y (-), dando lugar a la mezcla de citoplasmas y núcleos que conduce posteriormente a la cariogamia, formando un cigoto diploide (Figura 1). Tras un período de latencia se produce la germinación de la zigospora dando lugar a un germoesporangiofóro en cuyo ápice se desarrolla el germoesporangio en el que se producen, mediante meiosis, las germoesporangiosporas haploides que darán lugar a un nuevo micelio. La mayor parte del ciclo celular de este orden de hongos filamentosos es haploide y las hifas de su micelio normalmente son cenocíticas, salvo en algunos casos en los que pueden producirse septos de manera irregular o delimitando las estructuras sexuales, por lo que se trata de hongos multinucleados (Talbot, 1971). Estas hifas vegetativas que forman el micelio haploide se reproducen de forma asexual mediante la producción de esporangiosporas, unas esporas unicelulares e inmóviles (Figura 1). Las esporangiosporas se generan dentro de unas estructuras especializadas conocidas como esporangios que están sostenidos sobre los esporangióforos, unas prolongaciones verticales sobre el micelio, vulgarmente denominadas hifas aéreas. La prolongación del esporangióforo para formar una cúpula bien diferenciada dentro del esporangio, denominada columela, diferencia a los Mucorales del resto de hongos filamentosos (Guarro et al., 1999; Hoffmann et al., 2013).

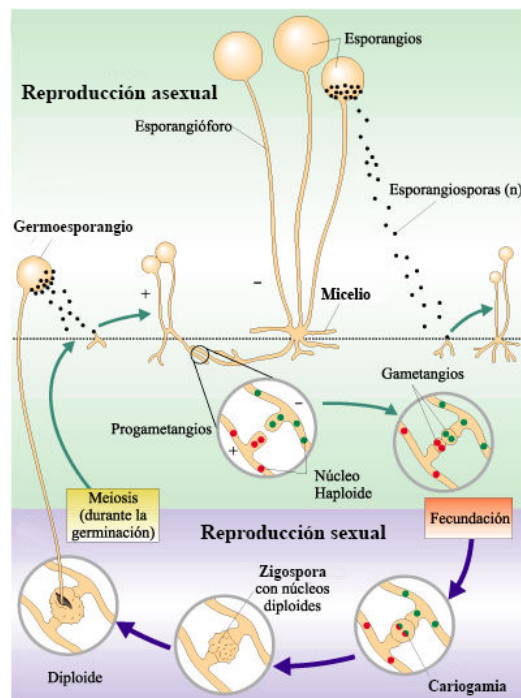


Figura 1. Ciclo de vida de los Mucorales.

Representación del ciclo de vida de los Mucorales donde se muestran la fase reproductiva sexual (abajo), tras el encuentro de dos micelios haploides de sexo (+) y (-), y la fase de reproducción asexual (arriba). Figura tomada de Curtis & Barnes (2003) y adaptada por coherencia interna en la terminología.

El grupo de los Mucorales presenta una distribución geográfica cosmopolita (Tedersoo et al., 2014), siendo generalmente saprófitos que pueden crecer sobre el suelo, la materia vegetal en descomposición, los alimentos y los excrementos de animales (Richardson, 2009). Se trata de hongos de rápido crecimiento que colonizan sustratos ricos en carbono y que presentan diversos usos para el ser humano, tanto para la fabricación de compuestos de interés industrial como para la producción de alimentos (Spatafora et al., 2017). Así, además de sus usos tradicionales para la fermentación de soja y arroz (Londoño-Hernández et al., 2017), su creciente interés industrial ha permitido su aplicación para la producción de biocombustibles (Satari & Karimi, 2018; Vicente et al., 2010) y lípidos (Conti et al., 2001; Papanikolaou et al., 2007), así como para la obtención de compuestos tales como carotenos (Kuzina & Cerdá-Olmedo, 2007) y quitosano (Kaur & Dhillon, 2014). Por otro lado algunos Mucorales presentan un modo de vida endofítico (RuYong & Hong, 1995) o actúan como parásitos vegetales, animales e incluso de otros Mucorales (Benny et al., 2001). Algunas especies de este grupo producen una enfermedad en humanos conocida como mucormicosis (Prakash & Chakrabarti, 2019) que presenta una alta letalidad y cuya incidencia ha sufrido un marcado incremento en los últimos años afectando sobre todo a individuos inmunodeprimidos, aunque también puede afectar a individuos con un sistema inmunológico totalmente funcional que hayan sufrido heridas o quemaduras. Actualmente se han dado numerosos casos de mucormicosis en pacientes infectados por SARS-CoV-2 debido a la alteración del sistema inmune que produce el virus y al uso de corticoides para el tratamiento del COVID-19 (Singh et al., 2021). Este aumento en la incidencia y su alta letalidad han puesto de manifiesto la necesidad de profundizar en la biología de este tipo de hongos para el desarrollo de terapias efectivas para su tratamiento (Bruch et al., 2021).

1.1.2. Filogenia y mucormicosis

Los análisis de filogenia molecular desarrollados en los últimos años han dado lugar a una actualización de la clasificación clásica de los hongos basales (Figura 2). Tradicionalmente, se consideraba la existencia del filo Zygomycota que englobaba, en base a criterios morfológicos, los actuales filios Mucoromycota y Zoopagomycota (Benny et al., 2001). Pero los nuevos análisis han supuesto una modificación de esta clasificación, de modo que los hongos basales se dividen taxonómicamente en los filios Cryptomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota y Mucoromycota (Spatafora et al., 2017). Este último filo, Mucoromycota, a su vez se divide en las clases Glomeromycotina, Mortierellomycotina y Mucoromycotina, siendo esta última la que integra al orden Mucorales, junto con los órdenes Endogonales y Umbelopsidales (Spatafora et al., 2016).

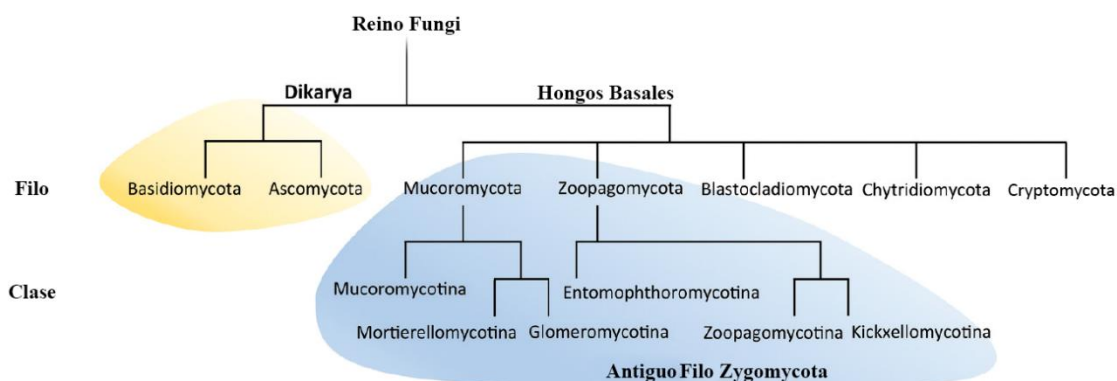


Figura 2. Clasificación de los Hongos.

Representación del árbol del reino de los hongos donde se muestra sombreado en azul el antiguo grupo polifilético de los zigomicetos (*Zygomycota*). Figura modificada de Lee & Idnurm (2017).

Los Mucorales como el grupo monofilético descrito en la actualidad (Spatafora et al., 2016) engloban a 55 géneros en los que se agrupan 260 especies, (Wijayawardene et al., 2018) de las cuales 38 se han asociado con la enfermedad infecciosa mucormicosis (Walther et al., 2019). Estas especies patógenas oportunistas pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Rhizomucor* y *Saksenaea*, siendo los tres primeros los causantes de más de la mitad de los casos de mucormicosis registrados a nivel mundial (Figura 3) (Cornely et al., 2019; Jeong et al., 2019).

La mucormicosis es una enfermedad emergente rara en términos relativos, pero con una alta letalidad en casos de infección diseminada, para la que no se dispone de tratamientos eficaces (U. Binder et al., 2014; Lax et al., 2020). En su forma más habitual se presenta con un cuadro de infección rino-órbita-cerebral, cutánea o pulmonar, siendo más habitual su inicio a partir de las vías respiratorias en pacientes inmunocomprometidos (Richardson, 2009). Las esporas de estos hongos, que presentan una distribución ubicua, dan lugar a un micelio filamentosos en el hospedador que invade los vasos sanguíneos generando trombos y necrosis de los tejidos afectados (Frater et al., 2001). Se han descrito diversos factores de riesgo, como la diabetes no controlada o la hiperferremia, que predisponen a individuos inmunocompetentes a la mucormicosis (U. Binder et al., 2014; Hassan & Voigt, 2019), pero han sido precisamente los tratamientos iniciales a base de corticoides para los infectados graves por SARS-CoV-2, los que han generado un espectacular aumento de los casos de mucormicosis, especialmente en el continente asiático (Singh et al., 2021).

Aunque la mucormicosis se considera una infección rara por su incidencia, como se ha mencionado anteriormente, se trata de la tercera más frecuente causada por hongos después de la aspergilosis y la candidiasis (Skiada et al., 2013), presentando una tasa de mortalidad muy elevada comprendida entre 40 – 80 % (Cornely et al., 2019). Esta alta mortalidad se explica, en parte, por la ausencia de un tratamiento eficaz debido a la resistencia natural de estos hongos a la mayoría de antifúngicos disponibles (Schwarz et

al., 2019). Por ello, es urgente caracterizar nuevas dianas terapéuticas sobre las que poder desarrollar tratamientos eficaces contra esta enfermedad (Garre, 2022).

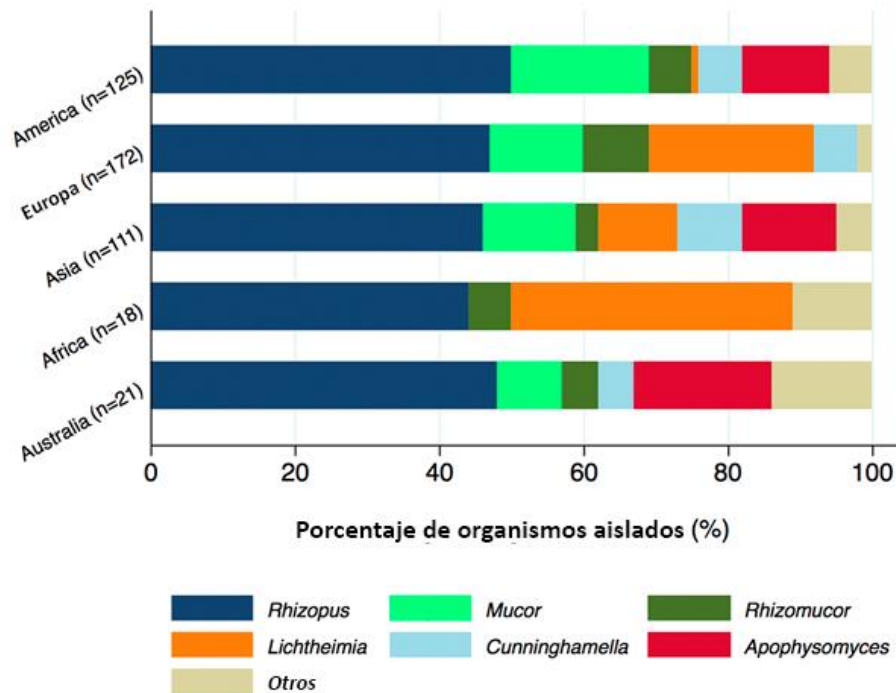


Figura 3. Porcentaje de los géneros de Mucorales causantes de mucormicosis en las diferentes regiones geográficas del planeta.

Figura modificada de Jeong et al. (2019).

1.1.3. *M. lusitanicus* como organismo modelo

El hongo filamentoso *M. lusitanicus*, anteriormente llamado *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* (Wagner et al., 2020), se ha erigido como el modelo de referencia en la investigación genética de los Mucorales debido a la posibilidad de realizar modificaciones genéticas, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de especies de este grupo de hongos basales. Recientemente, se ha conseguido también desarrollar la tecnología para modificar el genoma de una segunda especie de Mucorales, *Rhizopus microsporus* (Lax et al., 2021), gracias a la aplicación de la galardonada técnica de CRISPR-Cas9. Si bien el modelo de Mucorales por excelencia fue *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, 2001), el desarrollo temprano de una técnica de transformación eficaz para introducir DNA exógeno en *M. lusitanicus* supuso una revolución (van Heeswijk & Roncero, 1984). Desde las transformaciones iniciales basadas en la introducción de plásmidos autoreplicativos que contenían genotecas para complementar fenotipos mutantes identificados en el laboratorio (Navarro et al., 2000) hasta la modificación directa y precisa del genoma mediante recombinación homóloga utilizando fragmentos lineales de DNA (Gutiérrez et al., 2011; Navarro et al., 2001), el repertorio de técnicas moleculares se ha incrementado notablemente año tras año incrementando el interés por *M. lusitanicus* como modelo de investigación.

Estas técnicas basadas en la transformación génica permiten tanto la manipulación del genoma para modificar genes (mutación o delección completa, sobreexpresión, etiquetado, ...), como la explotación de las propias rutas biológicas del hongo para silenciar genes específicos mediante plásmidos que transcriben RNA de doble cadena (*double-stranded RNA* o dsRNA). Así, se han podido caracterizar a nivel molecular las respuestas a la luz, incluyendo la fotocarotenogénesis (Corrochano & Garre, 2010), el mecanismo de silenciamiento génico (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016) y enzimas clave involucradas en la síntesis de ácidos grasos (Rodrigues et al., 2019). El gran rendimiento de estas técnicas no hubiese sido posible sin la puesta a disposición pública del genoma de *M. lusitanicus* que tiene un tamaño de ≈ 36 megabases y alrededor de 12.000 genes anotados (*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).

En cuanto a su manejo en el laboratorio, *M. lusitanicus* es un hongo fácilmente cultivable con un ciclo de vida corto (Figura 1) que permite la realización de múltiples ensayos en poco tiempo. La germinación de las esporas asexuales o esporangiosporas se produce en unas pocas horas, tras la cual se inicia el desarrollo de un micelio haploide (Figura 4A), cenocítico y multinucleado que al ser expuesto a luz azul adquiere un tono anaranjado por la acumulación de β -caroteno (Silva et al., 2006; Velayos et al., 2000). Tras 48-72 horas, del micelio surgen los esporangióforos en cuyo ápice se desarrollan los esporangios repletos de esporangiosporas (Figura 1), generalmente multinucleadas, que pueden ser fácilmente recolectadas y almacenadas durante largos periodos de tiempo a 4°C o congeladas a -20°C o -70°C. A pesar de que *M. lusitanicus* es un hongo heterotálico con dos tipos sexuales morfológicamente similares, (+) y (-), que pueden conjugarse para dar lugar a una zigospora (Figura 1), no se ha conseguido la germinación de estas esporas sexuales en condiciones de laboratorio (Li et al., 2011) y, por tanto, en estas condiciones se cultiva y propaga mediante reproducción asexual o vegetativa.

El crecimiento vegetativo de *M. lusitanicus* puede ser modulado de manera sencilla ajustando el pH del medio de cultivo para trabajar con colonias (Figura 4B) en medios ácidos (pH 2,8-3,2) o con micelios extendidos (Figura 4A) en medios más alcalinos (pH 4-5). El control de la forma de crecimiento facilita el estudio de caracteres de forma cuantitativa como, por ejemplo, el cálculo de la frecuencia de silenciamiento cuando se utiliza un plásmido que produce una horquilla de doble cadena en un RNA derivado de un gen estructural de la carotenogénesis, *carB*, que provoca la aparición de parches albinos en las colonias (Figura 4B) (Calo et al., 2012; De Haro et al., 2009), o el estudio de características morfológicas, como la tasa de crecimiento o la de esporulación de los diferentes micelios (Trieu et al., 2015). Además, *M. lusitanicus* es un hongo dimórfico capaz de alternar entre un crecimiento micelial (Figura 4C) y levaduriforme (Figura 4D). La transición micelio-levadura está condicionada por factores ambientales como la baja disponibilidad de oxígeno y la presencia de fuentes de carbono fermentables (Orlowski, 1991). Dicha transición es reversible y ha sido ampliamente estudiada debido

a su implicación en la virulencia del hongo, ya que la forma micelial muestra una mayor virulencia (Lee et al., 2013).

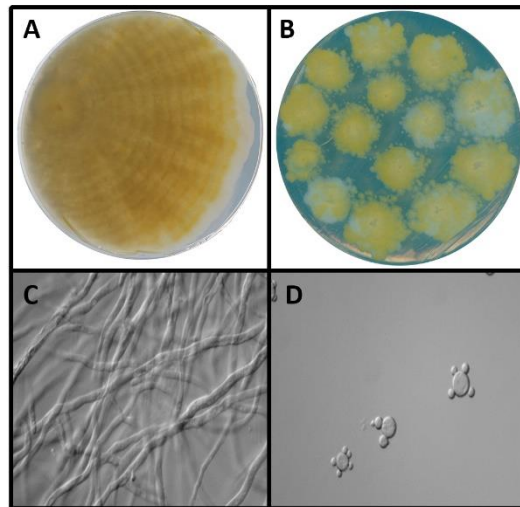


Figura 4. Morfología macroscópica y microscópica de *M. lusitanicus*.

A) Crecimiento micelial de *M. lusitanicus* donde se aprecia la influencia del fotoperíodo en la producción de esporas. B) Crecimiento colonial de *M. lusitanicus* donde puede observarse la aparición de parches albinos debido al silenciamiento del gen *carB*. C) Hifas de *M. lusitanicus* vistas al microscopio. D) *M. lusitanicus* en forma levaduriforme visto al microscopio (Lee et al., 2013).

1.2. Silenciamiento génico

1.2.1. Generalidades

El silenciamiento génico mediado por RNA, silenciamiento génico postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing* o PTGS) o interferencia de RNA (*RNA interference* o RNAi) es un mecanismo que permite la inhibición de la expresión de un determinado gen de forma dirigida, a través de la degradación de su RNA mensajero (*messenger RNA* o mRNA), la inhibición de su traducción o el bloqueo de su transcripción (Ghildiyal & Zamore, 2009). Las primeras observaciones de este fenómeno de forma simultánea en plantas (Napoli et al., 1990) y hongos (Romano & Macino, 1992), donde se denominó cosupresión y “*quelling*”, respectivamente, han supuesto una revolución en el campo de la regulación de la expresión génica gracias al ingenio de estos primeros investigadores a la hora de interpretar sus observaciones. El propósito de las investigaciones iniciales consistía en la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de pigmentos tanto en petunia, como en *Neurospora crassa*. Pero la introducción de transgenes planteada para lograr esa sobreexpresión dio lugar a la aparición de una alta proporción de individuos transgénicos en los que se observaba el fenotipo opuesto al esperado, es decir, una reducción en la producción del pigmento de interés. Al estudiar la acumulación del mRNA de los genes empleados en la transformación se determinó que la menor acumulación del pigmento correlacionaba con una menor expresión de estos genes. Este hecho suponía que el intento de sobreexpresar un gen a veces provocaba el efecto contrario, su silenciamiento, un fenómeno que era reversible (Romano & Macino, 1992). Paralelamente, otros investigadores que utilizaban como modelo de estudio

Caenorhabditis elegans estaban desarrollando una técnica denominada inhibición antisentido, basada en la observación de que la introducción en células de RNA de cadena sencilla (*single-stranded RNA* o ssRNA), preferentemente con sentido opuesto a la transcripción (antisentido), impedía la traducción de genes específicos (Fire et al., 1991). Pero el mecanismo subyacente no comenzó a esclarecerse hasta que se descubrió posteriormente que este fenómeno observado en *C. elegans* era inducido por una molécula de dsRNA formada al hibridar el mRNA y el RNA antisentido (Fire et al., 1998). Los trabajos posteriores a estas primeras observaciones pusieron de manifiesto que la cosupresión, el *quelling*, el PTGS y el RNAi eran en realidad la observación del mismo fenómeno conservado en los eucariotas, quedando así establecidas las bases del modelo de silenciamiento génico mediado por RNA (Hutvágner & Zamore, 2002).

En el modelo básico de RNAi (Figura 5), las moléculas de dsRNA activan la maquinaria de silenciamiento y son reconocidas por ribonucleasas (RNAsas) III de tipo Dicer (Bernstein et al., 2001), que las cortan en dsRNAs pequeños de interferencia (*short interfering RNAs* o siRNA) de 21-25 pares de bases (pb) (Hammond et al., 2000). A continuación, los siRNAs se introducen en el complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex* o RISC) que, tras degradar una de las hebras, utiliza la otra como guía para reconocer transcritos complementarios (Zamore et al., 2000). El reconocimiento de la secuencia complementaria por parte del RISC, provoca que una RNasa de tipo Argonauta, presente en el complejo, genere un corte endonucleolítico en el transcrito y provoque su posterior degradación (S. M. Hammond et al., 2001). Además de este sistema de RNAi básico, algunos organismos presentan un proceso secundario de amplificación producido por polimerasas de RNA dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* o RdRP) que, utilizando como molde los productos del RISC, generan nuevas moléculas de dsRNA capaces de retroalimentar el proceso (Forrest et al., 2004; Makeyev & Bamford, 2002; Sijen et al., 2001).

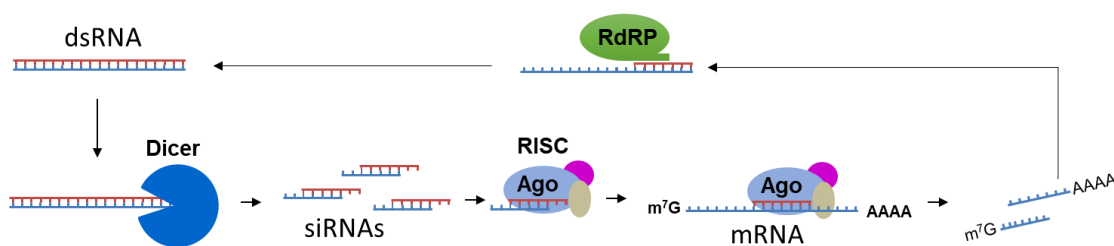


Figura 5. Mecanismo general de silenciamiento génico.

Representación del mecanismo básico de silenciamiento génico y sus componentes junto con las moléculas de RNA que intervienen. El color azul y rojo indican los RNA con el mismo sentido y antisentido, respectivamente con respecto a la transcripción.

Aunque el RNAi se describió como un mecanismo de defensa frente a ácidos nucleicos exógenos, tales como virus, elementos genéticos móviles y transgenes que pueden afectar a la integridad del genoma, pronto se descubrió su capacidad para regular la expresión génica endógena. En los eucariotas se han descrito tres clases mayoritarias de pequeños RNA endógenos (*endogenous short RNAs* o esRNA) (Figura 6A), también

conocidos como pequeños RNA no codificantes (*small non-coding RNAs* o sncRNA) o, simplemente, pequeños RNA (*small RNAs* o sRNA). En base a su estructura y biogénesis se diferencian en:

- 1) Micro-RNA (miRNA). Los miRNA están especializados en la regulación de la expresión génica. Son los esRNA más conocidos y se han identificado en animales (Ambros, 2004), plantas (Reinhart et al., 2002), hongos (Lee et al., 2010) y protistas (Molnár et al., 2007). Aunque se han descrito particularidades específicas de su biogénesis en cada uno de los reinos mencionados, todos presentan como característica distintiva que están codificados a partir de *loci* genómicos diferentes a los de los genes que regulan. Así, cuando estos *loci* se transcriben producen una molécula de ssRNA no codificante que forma una estructura en horquilla intramolecular, denominada pri-miRNA. Los pri-miRNA son procesados total o parcialmente en el núcleo por las RNasas de tipo Dicer o Drosha para dar lugar en primer lugar a un pre-miRNA y finalmente al miRNA. Una vez maduros, los pre-miRNA o los miRNA son transportados al citoplasma donde finaliza su procesamiento (Bartel, 2004). Los miRNA resultantes son moléculas de 21-25 pb con características similares a los siRNA, por lo que una vez en el citoplasma entran en la ruta de silenciamiento al ser captados por el complejo RISC y actúan como guía para desencadenar su función biológica sobre los transcritos complementarios (Figura 6A). Se trata por tanto de siRNA codificados por los genomas de los organismos que regulan postranscripcionalmente la expresión de genes endógenos relacionados con procesos tales como el desarrollo (Flynt & Lai, 2008), la inmunidad (Pedersen & David, 2008), la senescencia celular y el cáncer (Schickel et al., 2008), entre otros.
- 2) RNA asociados a proteínas PIWI (*PIWI-interacting RNAs* o piRNA). Los piRNA son esRNA especializados en la defensa del genoma frente a elementos móviles. Se trata de esRNA que se producen específicamente en células animales de la línea germinal o que presentan un estado totipotencial, y están codificados por loci genómicos específicos que presentan un gran número de repeticiones (Ozata et al., 2018). La biogénesis de los piRNA difiere del resto de esRNA debido a que no depende de dsRNA o del procesamiento por parte de RNasas del tipo Dicer. Los transcritos precursores de los piRNA maduran a través de un complejo mecanismo conocido como ciclo ping-pong (Gunawardane et al., 2007) dando lugar a los piRNA de respuesta y piRNA rezagados con un tamaño de 21-35 nt (Figura 6A) (Ozata et al., 2018).

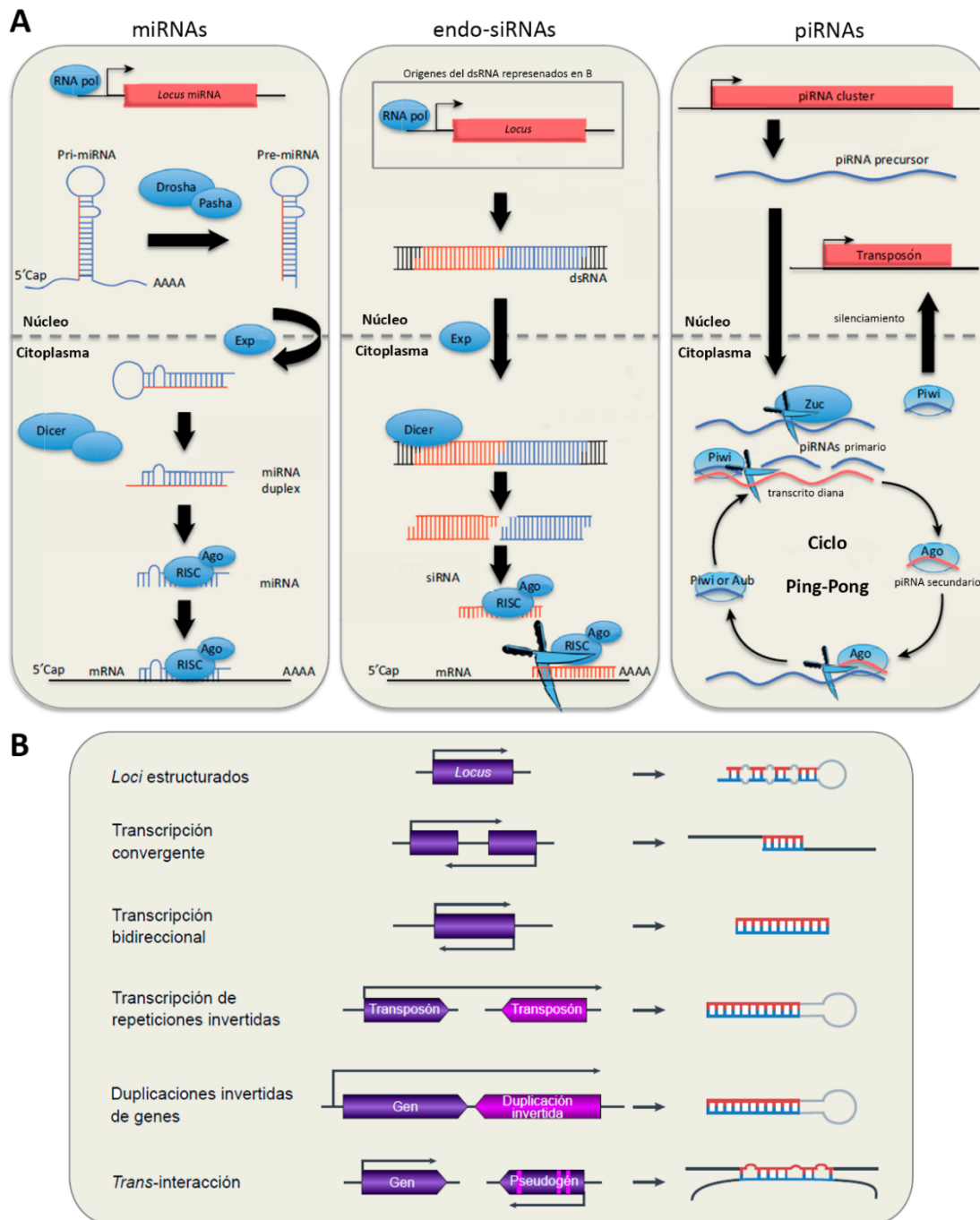


Figura 6. Biogénesis de los diferentes esRNA.

A) Esquema de la producción y maduración de las diferentes clases de esRNA y las enzimas clave del proceso en animales. Figura modificada de Lucas et al. (2013). B) Posibles fuentes genómicas de dsRNA para la producción de endo-siRNA (izquierda) y representación del producto de la transcripción (derecha). Figura de Pérez-Arques (2020), modificada de Ghildiyal & Zamore (2009). RNA pol, Polimerasa de RNA dependiente de DNA; 5'cap, caperuza del mRNA; Exp, exportina.

- 3) siRNA endógenos (*endogenous siRNAs* o endo-siRNA). Los endo-siRNA son esRNA que se han descrito en la mayoría de los organismos eucarióticos (Claycomb, 2014). Su función es la de regular la expresión génica endógena y su mecanismo de acción es el propio del RNAi con la particularidad de la procedencia de las moléculas de dsRNA. Mientras que el mecanismo de RNAi clásico se desencadena por la detección de moléculas de dsRNA exógenas, los

endo-siRNA proceden de secuencias genómicas cuya transcripción produce RNA con el potencial de formar dsRNA (Ghildiyal & Zamore, 2009; Hutvágner & Zamore, 2002). Existen diversas situaciones que pueden generar dsRNA a partir de la transcripción endógena (Figura 6B): loci cuyos transcritos presentan complementariedad intramolecular; transcripción convergente de genes en una misma región del genoma; transcripción bidireccional mediada por dos promotores enfrentados; transcripción de repeticiones o duplicaciones invertidas; e incluso interacciones intermoleculares en *trans*, donde la transcripción de una duplicación invertida situada en un locus alejado permite la formación del dsRNA por complementariedad. Este dsRNA también se genera de forma postranscripcional, principalmente en plantas y hongos, a través de la intervención de las RdRP (Liu et al., 2010; Sijen et al., 2007). En cualquier caso, los dsRNA de origen endógeno disparan el mecanismo de RNAi al ser reconocidos por las enzimas del tipo Dicer, que los procesarán para dar lugar a los endo-siRNA de 21 pb (Figura 6A).

1.2.2. El silenciamiento génico en hongos

Gran parte de los conocimientos que hoy se tienen sobre el funcionamiento del silenciamiento génico proviene de las descripciones que se realizaron del proceso en hongos. Anteriormente se ha comentado la serie de sucesos que llevaron a la descripción del “*quelling*” en *N. crassa* (Romano & Macino, 1992), pero los hongos han desarrollado una enorme diversidad de mecanismos y moléculas de silenciamiento que les permiten un control refinado de sus funciones biológicas.

La descripción de moléculas semejantes a los miRNA (*miRNA-like* o miRNA) de animales en *N. crassa* y su relación con la regulación de la expresión génica en hongos se produjo de forma tardía (Lee et al., 2010). Posteriores análisis bioinformáticos de datos de secuenciación masiva, confirmados mediante hibridación tipo *Northern* o por PCR cuantitativa (*quantitative PCR* o qPCR), han demostrado su presencia en especies tales como *Cryptococcus neoformans* (Jiang et al., 2012), *Aspergillus flavus* (Bai et al., 2015), *Fusarium oxysporum* (Chen et al., 2014), *Penicillium chrysogenum* (Dahlmann & Kück, 2015) y *Trichoderma reesei* (Kang et al., 2013). El ascomiceto *N. crassa* es un buen representante de la enorme diversidad de especializaciones del silenciamiento génico en hongos. Ejemplos de estas especializaciones son el mecanismo de mutaciones puntuales inducidas por repetición (*repeat-induced point mutation* o RIP) y el silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (*meiotic silencing of unpaired DNA* o MSUD), ambos descritos como mecanismos de defensa (Gladyshhev, 2017; Shiu et al., 2001). El mecanismo de RIP provoca la introducción de mutaciones (C→T) sobre secuencias repetidas y transposones para inactivarlos, mientras que el MSUD es un fenómeno de silenciamiento que actúa sobre aquellos genes cuya secuencia queda desapareada durante el entrecruzamiento meiótico, por no estar presentes en el cromosoma homólogo.

Además, en *N. crassa* también se han descrito los qiRNA, unos sRNA relacionados con la proteína QDE-2 que se inducen por daños en el DNA con el objetivo de disminuir la producción de proteínas en la célula mientras se realizan las reparaciones de esos daños (Lee et al., 2009), y los siRNA independientes de Dicer (*dicer independent siRNAs* o disiRNA), cuya biogénesis no requiere de las RNasas III del tipo Dicer (Lee et al., 2010). Por último, no se puede olvidar el papel del silenciamiento como mecanismo de defensa frente a ácidos nucleicos exógenos. Es la detección del dsRNA en *N. crassa* la que induce la expresión de las proteínas Dicer y Argonauta entre otras, desencadenando la respuesta antiviral que permite al RNAi defender al organismo (Choudhary et al., 2007).

Los endo-siRNA son el grupo de sRNA mejor descrito, no solo en *N. crassa*, sino en hongos en general. Entre la gran variedad de procesos con los que se han relacionado, se encuentra el silenciamiento de los elementos genéticos móviles durante el crecimiento vegetativo protegiendo la integridad del genoma (Murata et al., 2007; Navarro-Mendoza et al., 2019; Nicolás et al., 2010; Nolan et al., 2005; Pérez-Arques et al., 2020), un mecanismo homólogo al silenciamiento inducido por sexo (*sex-induced silencing* o SIS) en *C. neoformans* (Wang et al., 2010) y la regulación en procesos biológicos como crecimiento y esporulación (Carreras-Villaseñor et al., 2013; Nicolás et al., 2007), reproducción sexual (Nicolás et al., 2015; Son et al., 2017) y respuesta a estrés oxidativo y nutricional (Cervantes et al., 2013; Trieu et al., 2015). Destaca por su interés para la comunidad científica, médica y agroforestal, el papel de los endo-siRNA en la expresión de factores de virulencia (Qutob et al., 2013), la resistencia a antifúngicos (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019), la capacidad de algunas especies patógenas para silenciar genes del hospedador con el fin de evadir la respuesta inmunitaria (Wang et al., 2016, 2017), o ,más sorprendentemente, la inducción del crecimiento de *Candida albicans* durante la infección a través del uso de miRNA del hospedador (Halder et al., 2022). Queda así patente la enorme relevancia de los mecanismos de silenciamiento en hongos y la cantidad de funciones que regulan, lo que los convierte en un excelente modelo para estudiar el papel de los endo-siRNA.

1.2.3. Mecanismos de silenciamiento génico descritos en *M. lusitanicus*

La ausencia del mecanismo de RNAi canónico en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Drinnenberg et al., 2009) ha provocado que los mayores hitos de investigación se realizasen sobre el ascomiceto modelo *N. crassa*. Pero la necesidad de estudiar el fenómeno en hongos distintos a los ascomicetos ha fomentado la búsqueda de modelos alternativos, entre los que destaca *M. lusitanicus*. Este hongo basal se ha erigido, debido a sus ventajas como modelo de estudio (Véase I.1.3), en el primero donde se ha caracterizado detalladamente cada uno de los elementos proteicos que participan en el RNAi, convirtiéndolo en un excelente candidato para desentrañar la regulación génica mediada por RNAi en hongos. Tanto es así que, hasta la fecha, se han descrito tres rutas de silenciamiento génico en *M. lusitanicus* que son el resultado de combinaciones específicas de las proteínas de silenciamiento identificadas: la ruta canónica de RNAi, la

ruta de regulación endógena y de generación de epimutantes y la ruta no canónica (*non-canonical RNAi pathway* o NCRIP).

En *M. lusitanicus* se han descrito dos RNasas III similares a Dicer (*Dicer-like* o Dcl), denominadas Dcl1 y Dcl2. Ambas presentan una arquitectura de dominios similar (Figura 7) y conservada respecto a esta familia de proteínas con una región helicasa N-terminal, una región intermedia de unión a RNA y una región C-terminal con dos dominios RNasa III (*RNase-III domain* o RIIID) y un motivo de unión a dsRNA (*double-stranded RNA binding motive* o DSRM), este último más definido en el caso de Dcl1. Aunque fue descrita posteriormente, Dcl2 es la RNasa esencial para la biogénesis de la mayor parte de los siRNA descritos en *M. lusitanicus*, lo que le otorga un papel protagonista en el mecanismo canónico de RNAi y en el de regulación endógena que solo es complementado parcialmente por Dcl1 (De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2007). Por su parte, Dcl1 es esencial para la producción de los endo-siRNA derivados de exones de clase IV (Véase I.2.3.2) (Nicolás et al., 2010) y para la producción de epimutantes junto a Dcl2 (Calo et al., 2017). Otra RNasa III, no de tipo Dicer, denominada R3B2, sustituye a las anteriores en la ruta no canónica de silenciamiento (*Non-canonical RNAi pathway* o NCRIP). La proteína R3B2 presenta una arquitectura de dominios (Figura 7) similar a las RNasas III bacterianas y de algunas plantas, con un dominio RIIID y dos dominios de unión a dsRNA (*double-stranded RNA binding domain* o dsRBD) (Trieu et al., 2015). Esta última RNasa degrada los mRNA controlados por la NCRIP y está involucrada en un mecanismo de regulación no caracterizado sobre la generación de epimutantes (Calo et al., 2017).

En cuanto a las proteínas del tipo Argonauta, el genoma de *M. lusitanicus* presenta tres genes que cifran las proteínas denominadas Ago1, Ago2 y Ago3. Las tres proteínas presentan una arquitectura similar (Figura 7) con un dominio PIWI-Argonauta-Zwille (*PIWI-Argonaute-Zwille domain* o PAZ) en la región N-terminal, un dominio medio (*middle domain* o MID) central y un dominio RNasa H del tipo PIWI (PIWI) en la región C-terminal. De estas, Ago1 es la que presenta una mayor similitud con las detectadas en otros Mucorales y es la ejecutora de los cortes guiados por siRNA de los mecanismos de RNAi caracterizados (Cervantes et al., 2013). Por el contrario, se desconoce la función de las proteínas Ago2 y Ago3, presentando la primera un codón de parada prematuro que podría impedir su traducción.

En *M. lusitanicus*, al igual que en otros hongos, los mecanismos de RNAi están mediados por la participación de RdRP que producen el dsRNA. Se han identificado tres RdRP denominadas RdRP1, RdRP2 y RdRP3, que suponen uno de los hechos diferenciales de las tres rutas de silenciamiento de este hongo. Se trata de grandes proteínas de más de 1000 aminoácidos (Figura 7) que presentan el dominio característico de polimerasa de RNA dependiente de RNA, y que se encuentra interrumpido en el caso de RdRP1 (Calo et al., 2012). La RdRP1 es la encargada de generar el dsRNA inicial que desencadena el mecanismo de silenciamiento canónico, mientras que la RdRP2 participa

en un ciclo de amplificación posterior de dicho mecanismo y en la producción de epimutantes (Calo et al., 2012). Por el contrario, la RdRP3 solo participa en el mecanismo no canónico de silenciamiento junto a las otras dos (Calo et al., 2017; Trieu et al., 2015). Precisamente, el requerimiento de RdRP1, RdRP2, Dcl1 y/o Dcl2 para la biogénesis de los endo-siRNA de *M. lusitanicus* permitió elaborar una clasificación que sugiere aspectos bioquímicos diferentes en la actividad de estas enzimas que otorgan caracteres distintivos a los siRNA que producen (Nicolás et al., 2010).

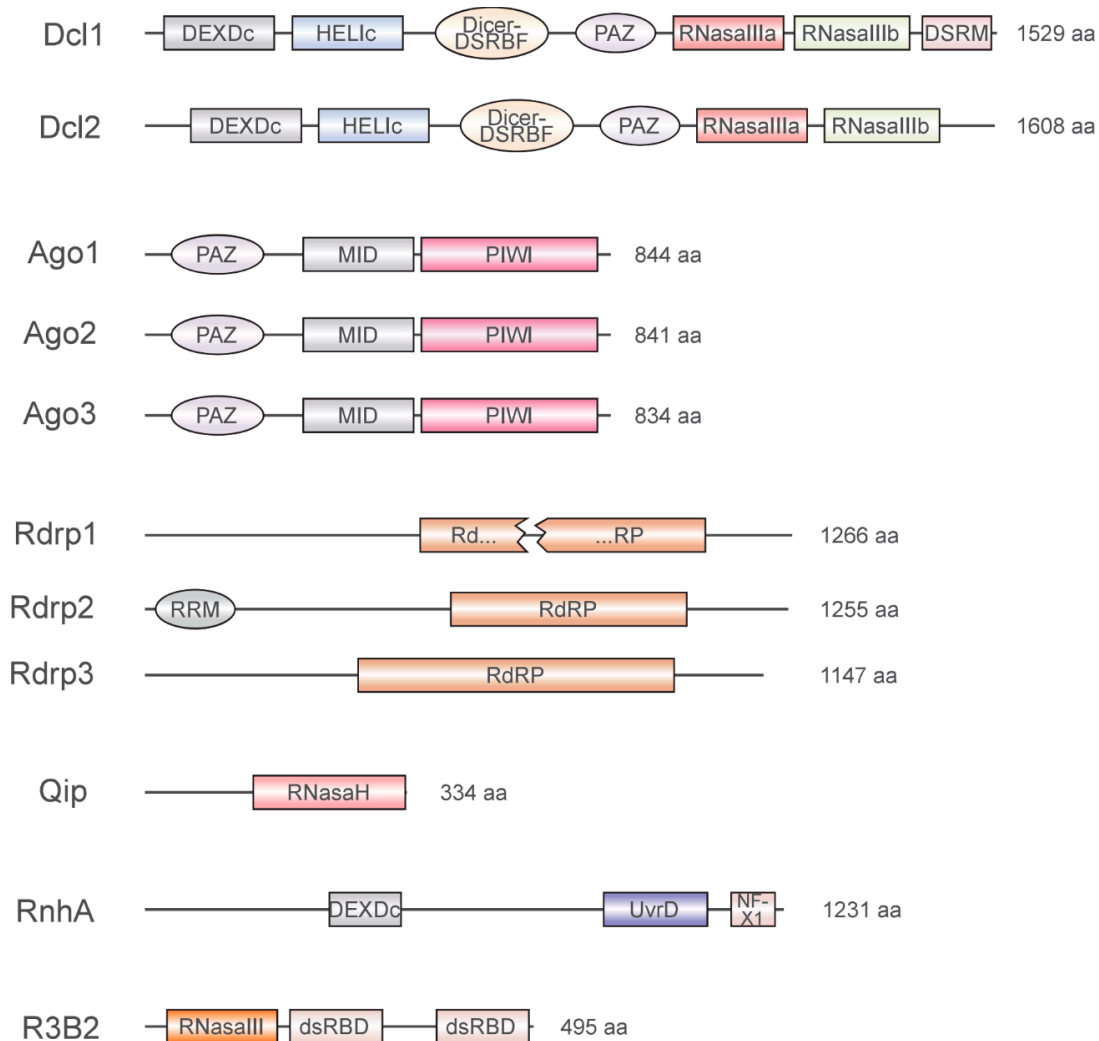


Figura 7. Proteínas que participan en la maquinaria de RNAi de *M. lusitanicus*.

Arquitectura de dominios descrita en el texto de los elementos proteicos, representada mediante formas geométricas cuya localización se predice bioinformáticamente mediante similitud de secuencias. Figura de Pérez-Arques (2020), modificada de Ruiz-Vázquez et al. (2015).

Finalmente, dos elementos cuya función no se conoce con exactitud son las proteínas Qip y RnhA (Calo et al., 2017). La proteína Qip (*QDE2-interacting protein*) es probable ortóloga de la exonucleasa homónima caracterizada en *N. crassa* (Lee et al., 2010). Esta exonucleasa presenta un dominio RNasa tipo H (Figura 7) que degrada ssRNA. De la misma forma, RnhA es una helicasa similar a SAD-3 ortóloga de la homónima cuya participación se ha descrito en el MSUD de *N. crassa* (Hammond et al., 2011). Esta helicasa presenta un dominio DEXDc, un dominio helicasa UvrD/REP (UvrD) y un dominio NF-XI de dedo de zinc (Figura 7).

1.2.3.1. Mecanismo canónico de silenciamiento

El mecanismo o ruta canónica de silenciamiento fue el primero en ser descubierto y descrito detalladamente en *M. lusitanicus* (Figura 8) y es capaz de silenciar la expresión de transgenes que generan RNA aberrante (*aberrant RNA* o aRNA) (Calo et al., 2012; De Haro et al., 2009), secuencias repetidas y transposones presentes en el genoma, así como genes endógenos (Nicolás et al., 2010; Pérez-Arques et al., 2020). Estas moléculas son convertidas en dsRNA por acción de la RdRP1 (Calo et al., 2012). Las moléculas de dsRNA son procesadas por Dcl2, y en menor medida por Dcl1, dando lugar a siRNA de 21 o 25 pb (De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2003). Estos siRNA son cargados en el RISC, cuyo componente principal en *M. lusitanicus* es Ago1 (Cervantes et al., 2013), donde se utiliza una de las hebras como guía para identificar y degradar los transcritos complementarios. Se considera que Ago1 y Qip, además de formar parte del RISC, deben de participar en la biogénesis o estabilización de los siRNA, ya que en ausencia de estas proteínas no se detecta su acumulación (Calo et al., 2017; Cervantes et al., 2013). Tras el corte endonucleolítico de los transcritos complementarios a la guía, los fragmentos de RNA fruto de la degradación entran en un ciclo de retroalimentación o amplificación donde RdRP2 sintetiza dsRNA adicional que vuelve a ser procesado por la enzima Dcl2 (Calo et al., 2012). El resultado del procesamiento de este dsRNA secundario genera siRNA de 25 nt, de ambos sentidos respecto al transcrito diana, y de 21 nt, exclusivamente antisentido (Calo et al., 2012; Ruiz-Vázquez et al., 2015). Debido al descenso de la frecuencia de silenciamiento detectada en los mutantes *r3b2⁻*, se sabe que esta RNasa juega un papel positivo en este mecanismo (Trieu et al., 2015), pero el modo de actuación aún se desconoce.

1.2.3.2. Mecanismo de regulación endógena y de producción de epimutantes

La adaptación del mecanismo canónico de silenciamiento, descrito anteriormente, permite a *M. lusitanicus* una regulación de los genes endógenos basada en la producción de endo-siRNA principalmente derivados de exones (*exonic short interfering RNAs* o ex-siRNA). Los ex-siRNA son complementarios a los genes de cuyos exones derivan, ejerciendo una regulación sobre estos y otros con secuencias similares en *trans* (Nicolás et al., 2010; Nicolás et al., 2015). Esta ruta de silenciamiento regula de forma directa o indirecta cerca de 700 genes relacionados con funciones tales como el metabolismo, la defensa del organismo, la transducción de señales o la virulencia del hongo (Cervantes et al., 2013; De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2015; Pérez-Arques et al., 2020). De estos, se identificaron y clasificaron 324 loci productores de ex-siRNA en 4 clases basadas en las proteínas implicadas en su biogénesis (Nicolás et al., 2010):

Clase I: Agrupa a 9 exones productores de ex-siRNA cuya biogénesis depende de Dcl2 y RdRP2. Su polaridad incluye secuencias con sentido y antisentido de 23-24 nt con un característico uracilo en su extremo 5'. Se unen a Ago1 para dirigir la degradación de sus transcritos diana.

Clase II: Se trata del grupo mayoritario, incluyendo 222 exones productores de ex-siRNA. Comparten las características bioquímicas y funcionales de los ex-siRNA de clase I, pero su biogénesis depende en este caso de Dcl2 y RdRP1. Junto con la anterior clase controlan procesos tales como el crecimiento vegetativo, la esporulación, la respuesta a estrés nutricional y la reproducción sexual (Nicolás et al., 2015).

Clase III: Agrupa a 88 exones productores de ex-siRNA cuya biogénesis puede ser realizada por cualquiera de las proteínas Dicer y depende de RdRP1 y RdRP2. Se trata de ex-siRNA mayoritariamente de polaridad con sentido y la presencia de un residuo de uracilo en la penúltima posición del extremo 3'. En contraposición a las clases anteriores, estos ex-siRNA no presentan un tamaño definido y ninguno tiene capacidad de unión a Ago1.

Clase IV: Se trata de la clase minoritaria donde se agrupan 5 exones productores de ex-siRNA cuyas características bioquímicas y funcionales son similares a la clase anterior. En este caso, su biogénesis depende de Dcl1, RdRP1 y RdRP2.

Las investigaciones posteriores a esta clasificación determinaron que Ago1 y R3B2 son necesarias para la biogénesis de la mayoría de las cuatro clases de ex-siRNA, a pesar de que las clases III y IV no se unen a la primera (Cervantes et al., 2013; Trieu et al., 2015).

Este mecanismo de control endógeno de la expresión génica basado en RNAi es el mismo que participa en la generación de epimutantes. Los epimutantes son aislados de *M. lusitanicus* que muestran el silenciamiento transitorio de un gen que les permite adaptarse a una situación de estrés (Calo et al., 2014). Este fenómeno se describió por primera vez al observar la aparición de individuos resistentes al antifúngico FK506 que no presentaban mutaciones en el gen diana de este compuesto. Un análisis detallado de los siRNA del hongo determinó que la presencia de FK506 disparaba en algunos individuos la acumulación de siRNA derivados del gen diana que provocaban su silenciamiento, posibilitando el crecimiento en presencia del agente antifúngico. Posteriormente, se demostró que este mecanismo podía operar frente a otros compuestos antifúngicos y otros estreses (Chang et al., 2019), e incluso que este silenciamiento transitorio se mantenía durante el proceso de infección (Chang & Heitman, 2019), de modo que puede tener importantes implicaciones en el tratamiento de la mucormicosis.

Como se ha mencionado, el mecanismo molecular de la ruta de generación de epimutantes es el propio del sistema canónico de silenciamiento (Figura 8), con la salvedad de que RdRP2 presenta un papel predominante en contraposición a RdRP1 y RdRP3 (Calo et al., 2017). Se desconoce el modo en el que RdRP2 participa en la ruta, si es mediante el procesamiento del aRNA inducido por el estrés o si es en la amplificación posterior. De cualquier modo, las proteínas RdRP2, Dcl1, Dcl2, Ago1, RnhA y Qip, son

necesarias para su funcionamiento (Calo et al., 2017), confiriendo a *M. lusitanicus* la capacidad de adaptarse de forma rápida y reversible a estreses ambientales.

1.2.3.3. Mecanismo no canónico de silenciamiento y la regulación de las rutas de RNAi

La descripción de los ex-siRNA de clase III y IV sugería la existencia de una ruta diferente de silenciamiento (Nicolás et al., 2010) que se hizo patente con el posterior descubrimiento de R3B2 (Trieu et al., 2015). La identificación de los siRNA dependientes de RdRP e independientes de Dcl (*rdrp-dependent dicer-independent siRNAs* o rdRNA) en el doble mutante *dcl1/dcl2* llevó al descubrimiento de R3B2, una inusual RNasa de tipo III, involucrada en la degradación de mRNA. El mecanismo en el que participa recibió el nombre de NCRIP o ruta no canónica de silenciamiento (Figura 8) debido a la participación de RdRP1, RdRP2 y RdRP3, a las que posteriormente se añadiría RnhA, pero ninguna de las proteínas Dcl ni Ago1 (Calo et al., 2017; Trieu et al., 2015). Debido a que el aumento de la producción de rdRNA correlaciona con un descenso en la acumulación de los mRNA de los que proceden, el mecanismo constituye una ruta de silenciamiento capaz de regular la expresión de ciertos genes. Estos rdRNA, al igual que las clases III y IV de ex-siRNA, son mayoritariamente con sentido, presentando una distribución de tamaños aleatoria y la presencia de un uracilo en la penúltima posición del extremo 3'. De hecho, R3B2 es necesario para la producción de la mayoría de los ex-siRNA de las clases III y IV (Trieu et al., 2015). Por su parte, el análisis pormenorizado de los rdRNA indica un enriquecimiento de genes relacionados con el metabolismo, la respuesta al estrés oxidativo y la reproducción sexual entre los genes controlados por la NCRIP (Trieu et al., 2015) y los estudios más recientes también indican su participación de forma indirecta en la estabilidad del genoma y una relación directa con la virulencia (Pérez-Arques et al., 2020).

La existencia de estos tres mecanismos de silenciamiento en *M. lusitanicus* capaces de regular la expresión génica supone un gran nivel de complejidad que se ve acrecentado por la interrelación que muestran estas rutas. Varias investigaciones sobre estos mecanismos han puesto de manifiesto que la ausencia de una NCRIP funcional, ya sea por la ausencia de RdRP1 o R3B2, produce un considerable aumento en la producción de epimutantes (Calo et al., 2014, 2017). Se ha sugerido que existe una competición por el sustrato que dispara la actividad de las rutas, el aRNA, que en condiciones normales serían degradados por la NCRIP, pero ante un estímulo ambiental o un estrés serían derivados hacia la vía epimutacional. De igual manera, las últimas investigaciones indican que R3B2 regula negativamente la producción de siRNA derivados de transposones (Pérez-Arques et al., 2020), lo que supone todo un rompecabezas dada su necesidad para el correcto funcionamiento de la ruta canónica de RNAi.

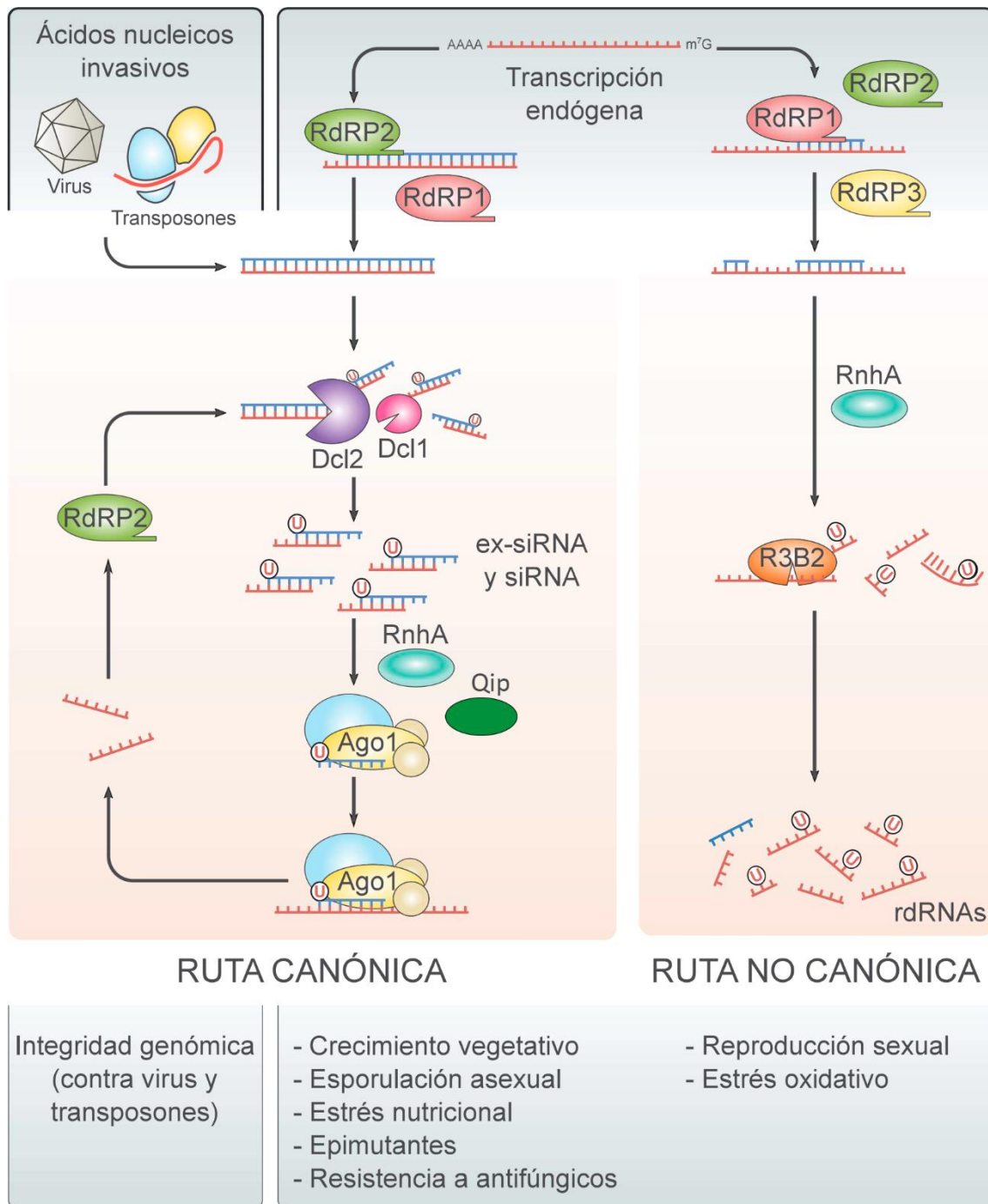


Figura 8. Mecanismos de silenciamiento génico descritos en *M. lusitanicus*.

El dsRNA exógeno o generado por la actuación de las RdRP sobre transcritos endógenos es derivado a la ruta canónica (izquierda) donde es procesado por las RNasas Dcl para producir los ex-siRNA que guiarán al complejo RISC en la degradación de los transcritos diana. Los productos de degradación de Ago1 pueden ser reciclados por RdRP2 para producir nuevos siRNA secundarios en un proceso que se conoce como retroalimentación o amplificación del silenciamiento. La actividad parcial de las RdRP sobre los transcritos endógenos puede derivarlos a la ruta no canónica o NCRIP (derecha) donde son degradados por la RNasa R3B2 dando lugar a los rdRNA que presentan un uracilo característico en el penúltimo nt de su extremo 3'. Se indica la hebra con sentido (rojo) y antisentido (azul). Figura modificada de Pérez-Arques (2020).

I.3. R3B2, la ribonucleasa del mecanismo no canónico de silenciamiento

El descubrimiento de R3B2 supuso un claro ejemplo de las ventajas que presenta *M. lusitanicus* como modelo de estudio. La descripción de los productos de degradación de esta ruta, los rdRNA, y la implicación de las RdRP, llevó a una búsqueda de genes que codifican RNasas III en el genoma de este hongo (Trieu et al., 2015). Gracias al desarrollo de las técnicas de mutagénesis dirigida se pudo determinar que, de las cuatro RNasas candidatas encontradas, R3B2 era la necesaria para el funcionamiento de la NCRIP. Ya desde su descubrimiento, R3B2 se consideró como una RNasa III inusual porque presenta una arquitectura de dominios solo vista en procariotas, hongos y algunas plantas (Aguado & TenOever, 2018; Court et al., 2013; Kiyota et al., 2011).

Las RNasas III son endoribonucleasas que presentan una actividad específica frente a dsRNA (Court et al., 2013). La familia de las RNasas de tipo III se divide actualmente en cuatro clases (Figura 9A) atendiendo a la arquitectura de dominios que presentan sus integrantes (Liang et al., 2014).

- 1) La clase I integra a las RNasas III procariotas y algunas eucariotas que, mayoritariamente, presentan una arquitectura simple con un dominio RIIID y un dominio dsRBD. La presencia de este único RIIID implica la homodimerización de este tipo de proteínas para generar el corte endonucleolítico en el dsRNA (Court et al., 2013). Entre los miembros procariotas mejor caracterizados de esta clase encontramos RNC de *Escherichia coli* y de *Aquifex aeolicus* (Gan et al., 2006), siendo esta última la primera RNasa III de la que se obtuvo la estructura tridimensional, lo que permitió desentrañar el funcionamiento de los dominios RIIID (Blaszczyk et al., 2001; Zamore, 2001). Las RNasas III de clase I son dependientes de magnesio y están implicadas principalmente en la maduración de RNA ribosómicos. Se incluye en esta clase también la Mini-III de *Bacillus subtilis*, que presenta únicamente un dominio RNasa III, lo que llevó a los autores a generar la antigua clase IV de RNasas III (Redko et al., 2008). La presencia de esta clase en eucariotas se limita a la proteína ribosómica mitocondrial L3 y RIRNC de Glomeromicetos, ambas probablemente procedentes de eventos de transferencia horizontal desde el ancestro de las mitocondrias (Greber & Ban, 2016) y desde una cianobacteria (Lee et al., 2018), respectivamente.
- 2) La clase II agrupa a las RNasas III de hongos y algunas plantas, que pueden presentar un dominio N-terminal (*N-terminal domain* o NTD), un dominio RNasa III y al menos un dominio dsRBD. Al igual que las RNasas III de Clase I bacterianas, estas enzimas homodimerizan para llevar a cabo el corte del dsRNA facilitado por el NTD. Pertenecen a esta clase las proteínas Rnt1p de *S. cerevisiae* (Liang et al., 2014; Song et al., 2017), Dcr1 de *Kluyveromyces polysporus* (Weinberg et al., 2011) y Dcr1 de *C. albicans* (Bernstein et al.,

2012). Las RNAsas III de Clase II también están involucradas en la maduración de RNA ribosómicos (*ribosomal RNAs* o rRNA), aunque adicionalmente se ha descrito la actuación de las Dcr1 de *K. polysporus* y *C. albicans* como enzimas Dicer no canónicas que participan en el RNAi de estos organismos (Court et al., 2013). También se han descrito algunos integrantes de esta clase tanto en *Arabidopsis thaliana* como en hongos Mucorales cuya arquitectura de dominios contiene un dsRBD adicional en la región C-terminal (Kiyota et al., 2011; Trieu et al., 2015).

- 3) La clase III agrupa a las RNAsas III eucarióticas similares a Drosha con una arquitectura de dominios que incluye una región N-terminal donde se puede encontrar regiones ricas en prolina o en arginina y serina, junto con una región C-terminal que contiene dos dominios RIIID y un dsRBD. Se trata de proteínas de gran tamaño relacionadas con el procesamiento inicial de los miRNA eucarióticos, la maduración de los ribosomas, la regulación de la transcripción y procesamiento del RNA y el mantenimiento de la integridad del genoma (Lee & Shin, 2018).
- 4) La clase IV está representada por las RNAsas III eucarióticas similares a Dicer con una arquitectura de dominios que presenta una región helicasa N-terminal, seguida de una región central con diversos dominios relacionados con la unión del RNA y una región C-terminal similar a la clase III. Al igual que la clase anterior, son proteínas de gran tamaño relacionadas con el procesamiento de los miRNA y los siRNA de las rutas de RNAi, donde regulan multitud de procesos en hongos (Nicolás et al., 2013), animales (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015) y plantas (Mukherjee et al., 2013).

Atendiendo a esta clasificación actual, la proteína R3B2 de *M. lusitanicus* se clasifica como una RNasa III de clase II, dado que su arquitectura presenta un dominio RIIID y dos dominios dsRBD. Esta arquitectura difiere de las descritas en levaduras de la misma clase debido a la ausencia de la región N-terminal. En este sentido, los análisis filogenéticos (Figura 9B) llevados a cabo pusieron de manifiesto que se trataba de una nueva familia de RNAsas III cuya distribución se limitaba al orden Mucorales (Trieu et al., 2015). La comparación de las secuencias de los residuos del centro catalítico del RIIID (Figura 9C) de esta nueva familia mostraba diversas sustituciones que ponían en duda su clasificación como una verdadera RNasa III y su actividad catalítica, ya que el efecto negativo de estas sustituciones había sido descrito anteriormente en la proteína RNC de *E. coli* (Sun et al., 2004). A nivel de secuencia la proteína R3B2 de *M. lusitanicus* y en general las integrantes de esta nueva familia presente en Mucorales difiere sustancialmente de las RNAsas III eucariotas. Esta característica, junto al hecho de que el dominio RIIID más parecido al de esta proteína se encuentre en las bacterias Burkholderiales, sugiere que la presencia de estas proteínas en los Mucorales se debe a un fenómeno de transferencia horizontal (Trieu et al., 2015).

En cuanto a su papel en las rutas de RNAi de *M. lusitanicus*, la naturaleza de los rdRNA mayoritariamente con sentido y la participación de las RdRP llevó a hipotetizar que R3B2 era capaz de degradar fragmentos de ssRNA marcados con pequeñas regiones de dsRNA (Figura 8) (Trieu et al., 2015). De la misma forma, pero actuando sobre los mRNA regulados también por las proteínas Dcl, se daría lugar a las clases III y IV de ex-siRNA. Esta controvertida hipótesis asignaba especificidad sobre el ssRNA a una RNasa III, una actividad que, si bien había sido descrita en el pasado (Dunn, 1976; Weinberg et al., 2011), se considera como residual o inespecífica para este tipo de RNasas.

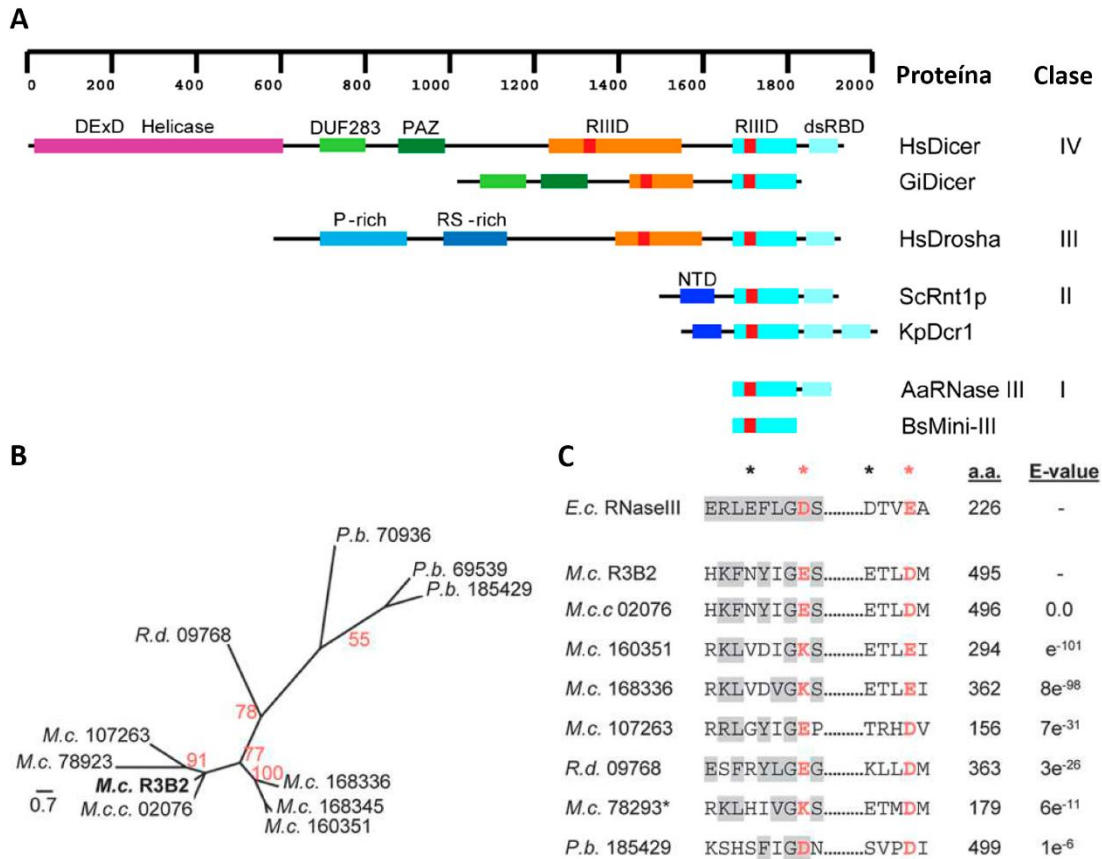


Figura 9. La familia de R3B2 en Mucorales.

A) Representación de las cuatro clases de RNasas III y su arquitectura de dominios básica. Se indica la longitud de las proteínas en aminoácidos. B) Relación filogenética de los integrantes de la familia de R3B2 en Mucorales. Los números en rojo indican los valores de bootstrap para 100 réplicas. C) Aminoácidos de la familia de R3B2 en regiones conservadas del RIID en comparación con el RIID de la proteína RNC de *E. coli*. El motivo característico de las RNasas III se indica en gris y los aminoácidos relacionados con la unión de metales se marcan con asteriscos, en rojo aquellos indispensables para la catálisis. Hs, *Homo sapiens*; Gi, *Giardia intestinalis*; Sc, *S. cerevisiae*; Kp, *K. polysporus*; Aa, *A. aeolicus*; Bs, *B. subtilis*; M.c., *M. lusitanicus*; M.c.c., *Mucor circinelloides*; R.d., *R. delemar*; P.b., *P. blackesleeanus*. Figura modificada de Liang et al. (2014) y Trieu et al. (2015).

II. Justificación y objetivos de la tesis

Casi dos décadas de estudio han puesto de manifiesto la existencia de una compleja red de regulación génica basada en la maquinaria de silenciamiento génico del hongo *M. lusitanicus*. La especialización de la maquinaria canónica de silenciamiento para ejercer un control refinado de la expresión génica, así como su capacidad para aportar plasticidad fenotípica ante situaciones de estrés, suponen una situación interesante con importantes implicaciones para el tratamiento de la mucormicosis. La existencia de un mecanismo no canónico o NCRIP, con un papel antagonista a la generación de epimutantes, sitúa el foco e interés en R3B2. El estudio de los productos de la NCRIP ha llevado a plantear que R3B2 posee una actividad catalítica que difiere del resto de RNasas de su familia. Este nuevo tipo de RNasa III sin caracterizar presenta un papel central en la NCRIP, por lo que tanto su modo de acción, como su interrelación con el resto de proteínas del RNAi suponen un nuevo campo de investigación que justifica la realización de esta tesis.

En base a estos antecedentes, el objetivo principal de esta tesis doctoral es caracterizar estructural y funcionalmente la RNasa III R3B2 con el fin de esclarecer su participación en las rutas de RNAi de *M. lusitanicus*. Este objetivo principal se ha dividido en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterización estructural de la proteína R3B2.
- 2) Análisis *in vitro* de actividad catalítica de R3B2.
- 3) Análisis de la interacción de R3B2 con otras proteínas del silenciamiento.
- 4) Estudio de la conservación funcional de la familia de proteínas de R3B2 en Mucorales.

III. Materiales y métodos

III.1. Estirpes utilizadas

III.1.1. Estirpes de *E. coli*

La Tabla 1 muestra las estirpes de *E. coli* utilizadas, su genotipo y su origen o referencia.

Tabla 1. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Referencia</i>
DH5 α	F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>edA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , λ .	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , λ DE3 (<i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7 gene 1</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i>)	(Studier & Moffatt, 1986)

La estirpe DH5 α se utilizó para la construcción y amplificación rutinaria de plásmidos bacterianos. Entre sus características destacan:

- 1) La mutación del gen *recA* favorece la estabilidad de los plásmidos al evitar su recombinación.
- 2) La mutación del gen *lacZ* permite la selección blanca/azul al ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente que llevan una copia de este gen con un sitio de clonación múltiple dentro de su secuencia.
- 3) La adquisición del estado competente es sencilla y puede mantenerse, congeladas a -80°C, durante largos periodos de tiempo.

La estirpe BL21(DE3) se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes etiquetadas con el motivo de 6 histidinas. Esta estirpe es deficiente en las proteasas Lon y OmpT, permitiendo el aislamiento de grandes cantidades de proteínas recombinantes intactas. La estirpe BL21(DE3) incorpora el gen de la polimerasa de RNA del fago T7 bajo el control del promotor del operón Lac. El plásmido pET-15b, utilizado como vector de expresión, lleva la región operadora del operón LacZ controlando un promotor dependiente de la polimerasa de RNA del fago T7 situado aguas arriba del sitio de clonación múltiple (*multiple cloning site* o MCS), de modo que el gen a expresar queda bajo la acción de ese promotor (Figura 10). La presencia de IPTG en el medio de cultivo de esta estirpe provoca la expresión de la polimerasa y la presencia de un plásmido derivado de pET-15b conduce a la obtención de la proteína de interés.

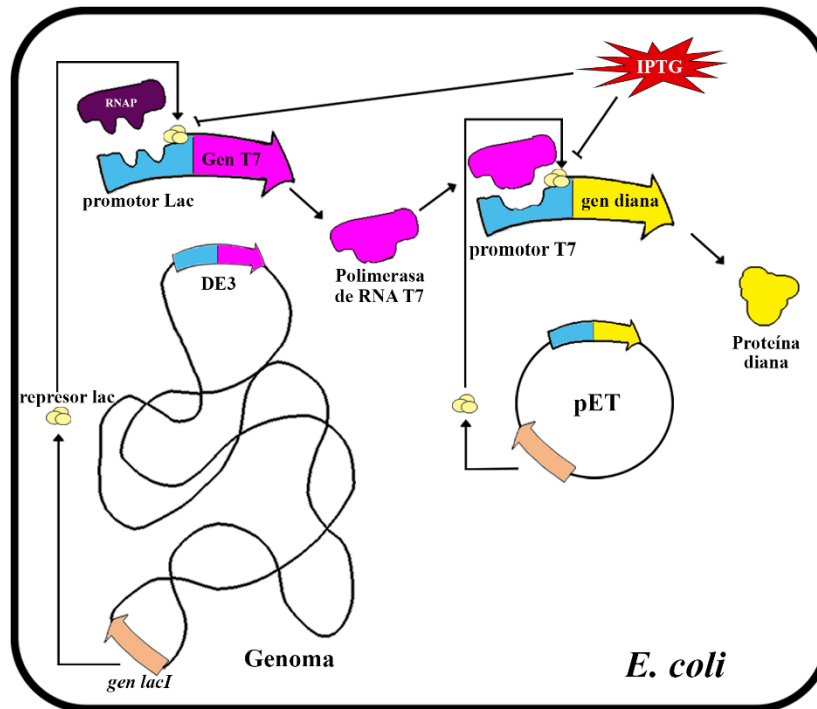


Figura 10. Representación del sistema de expresión de proteínas recombinantes en la estirpe BL21(DE3). La incorporación de IPTG al medio de un cultivo en fase exponencial de crecimiento provoca el desacoplamiento del represor lac del promotor que expresa la polimerasa T7 de RNA, integrada en el cassette DE3, y del promotor reconocido por dicha polimerasa en los vectores de la serie pET, permitiendo la expresión de los genes clonados aguas abajo.

III.1.2. Estirpes de *S. cerevisiae*

La Tabla 2 muestra las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas, su genotipo y su origen o referencia. Las nuevas estirpes portadoras de plásmidos derivadas de estas se indican en la sección III.2.3.

Tabla 2. Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
PJ69-4 α	MAT α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1-HIS3-GAL2-ADE2</i> , <i>met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al., 1996)
PJ69-4 α	MAT α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1-HIS3-GAL2-ADE2</i> , <i>met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al., 1996)

Las estirpes PJ69-4 de *S. cerevisiae* presentan un gran número de auxotrofías sobre las que radica su utilidad para el doble híbrido en levaduras (*yeast-two hybrid* o Y2H). Las auxotrofías a leucina y triptófano son complementadas por los vectores presa, como pACTII, y cebo, como pBD-Gal4, respectivamente, mientras que las auxotrofías a histidina, adenina y uracilo pueden ser utilizadas para analizar la interacción de proteínas que reconstituyen el factor GAL4, dado que estos genes se encuentran bajo el control de este factor de transcripción. Además, estas estirpes incorporan el gen *lacZ* bajo el control del mismo factor GAL4, permitiendo realizar ensayos cuantitativos a través de la actividad β -galactosidasa de estas estirpes.

III.1.3. Estirpes de hongos filamentosos

Las estirpes de *M. lusitanicus* empleadas y producidas en este trabajo se indican en la Tabla 3 junto con la sección en la que fueron producidas. Todas las estirpes con el prefijo MU han sido obtenidas en la Universidad de Murcia.

La estirpe R7B de *M. lusitanicus*, utilizada como control silvestre, deriva de la estirpe silvestre CBS277.49 (Schipper, 1976) y es auxótrofa para leucina. La estirpe MU402, utilizada como estirpe receptora de las construcciones que afectan al locus *r3b2*, deriva de la estirpe R7B y es auxótrofa para uridina y leucina. La estirpe MU412, utilizada para la integración de las versiones homólogas de *r3b2* en el locus *carRP*, lleva una delección de *r3b2* provocada por reemplazamiento de parte de este gen por el marcador *pyrG* en el fondo genético MU402.

Tabla 3. Estirpes de *M. lusitanicus* utilizadas en este trabajo.

<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Referencia u origen</i>
R7B	<i>leuA</i> ⁻	(Roncero, 1984)
MU402	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>pyrG</i> ⁻	(Nicolás et al., 2007)
MU412	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::pyrG</i>	(Trieu et al., 2015)
MU878	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::r3b2-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU879	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::r3b2-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU882	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::ΔH2-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU883	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::ΔH2-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU884	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::RBD2*-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU885	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::RBD2*-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU886	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::ΔCTF-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU887	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::ΔCTF-pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU888	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU889	<i>leuA</i> ⁻ ; <i>r3b2::pyrG</i>	Véase IV.2.3.1
MU1226	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::r3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1
MU1227	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::r3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1
MU1232	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::Lcr3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1
MU1233	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::Lcr3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1
MU1238	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::Rmr3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1
MU1239	<i>r3b2::pyrG</i> ; <i>carRP::Rmr3b2-leuA</i>	Véase IV.3.3.1

Las otras estirpes de hongos filamentosos utilizadas como fuente de RNA para la obtención del cDNA de las proteínas homólogas de R3B2 fueron sendas estirpes silvestres de *R. microsporus* (*R. microsporus* ATCC11559; van Tieghem, 1875) y *L. corymbifera* (*L. corymbifera* JMRC:FSU:9682; amablemente cedida por la Dra. Kerstin Voigt, *Leibniz Institute for Natural Product and Infection Biology*, Alemania).

III.2. Medios, condiciones de crecimiento y transformación

III.2.1. Medios de cultivo

a) Medios para *E. coli*

LB	g/l
- Triptona	10
- NaCl	10
- Extracto de levadura	5

El pH se ajusta a 7,3 con NaOH. La preparación del medio sólido se realizó añadiendo 20 g/l de agar. Los antibióticos ampicilina o cloranfenicol se añadieron, cuando fue necesario, tras autoclavar a una concentración final de 100 o 50 µg/ml, respectivamente.

b) Medios para *S. cerevisiae*

YPAD	g/l
- Glucosa	20
- Peptona	20
- Extracto de levadura	10
- Hemisulfato de adenina	0,3

Para la preparación del medio sólido se añadió 20 g/l de agar.

SD	g/l
- Glucosa	20
- Bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos y sulfato amónico	1,7
- Sulfato de amonio	5
- DO-X	Véase Tabla 4

Para la preparación del medio sólido se añadió 20 g/l de agar.

Mezcla Dropout (DO) de aminoácidos	g
- Arginina	2
- Isoleucina	3
- Lisina	3
- Metionina	2
- Fenilalanina	5
- Treonina	20
- Tirosina	3
- Valina	15

Se trituran los aminoácidos en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. A continuación, se añaden las cantidades indicadas en la Tabla 4 y se vuelve a triturar para obtener el SD sin el aminoácido (X) correspondiente.

Tabla 4. Suplementos de aminoácidos para la transformación de levaduras y estudios de interacción.

	SD-X				
	-L	-W	-WL	-WLH	-WLA
DO	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
Hemisulfato de adenina	0,6	0,6	0,6	0,6	
Histidina	0,2	0,2	0,2		0,2
Leucina		1			
Uracilo	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cantidad añadida a SD (g/l)	0,63	0,71	0,63	0,61	0,57

Todos los valores se muestran en gramos. El SD-L se suplementa con triptófano tras autoclavar a una concentración de 20 mg/l. Al SD-WLH se le añade 2,5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol antes de autoclavar.

c) Medios para *M. lusitanicus*, *R. microsporus* y *L. corymbifera*

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 3,2 o 4,5 para obtener un crecimiento colonial o micelial, respectivamente.

YPG	g/l
- Extracto de levadura	3
- Peptona	10
- Glucosa	20

Para la preparación del medio sólido se añadió 15 g/l de agar.

YNB	g/l
- Sulfato amónico	1,5
- Ácido glutámico	1,5
- Bases nitrogenadas de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio	0,5
- Glucosa	10

Para la preparación del medio sólido se añadió 20 g/l de agar. Para su uso con protoplastos en los experimentos de transformación, se añadió 91,05 g/l de sorbitol. Tras autoclavar se suplementó con 1 ml/l de tiamina (1 mg/ml) y niacina (1 mg/ml) y, cuando fue necesario, se suplementó con 2 ml de leucina (10 mg/ml) y/o 1 ml de uridina (200 mg/ml).

MMC	g/l
- Casaminoácidos	10
- Bases nitrogenadas de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio	0,5
- Glucosa	20

Para la preparación del medio sólido se añadió 15 g/l de agar. Para su uso con protoplastos la presión osmótica del medio se ajustó añadiendo 91,05 g/l de sorbitol. Tras autoclavar se añadió 1 ml/l de tiamina (1 mg/ml) y niacina (1 mg/ml) y, cuando fue necesario, se suplementó con 1 ml de uridina (200 mg/ml).

III.2.2. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se inició a partir de un cultivo líquido de 10 ml de LB incubado toda la noche a 37°C con agitación (250 r.p.m.). Se inoculó 30 ml de LB con 3 ml del cultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) entre 0,5 y 0,7. Una vez alcanzada esa densidad óptica todos los pasos del procedimiento se realizaron en frío, siendo el primero la centrifugación del cultivo durante 5 min a 6000 r.p.m. y 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se lavó el pellet celular con 15 ml de una solución fría de 100 mM $CaCl_2$, centrifugando en las mismas condiciones. Nuevamente, se resuspendió el pellet en 15 ml de la misma solución y se incubó en hielo entre 40 min y 3 h. Se centrifugaron las células en las mismas condiciones y tras descartar el sobrenadante se resuspendieron en un volumen final de 3 ml de la misma solución a la que se adicionó 690 μ l de 80% glicerol. Finalmente, se repartieron las células competentes en alícuotas de 100 μ l que fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* mediante choque térmico, las alícuotas se descongelaron en hielo y se les añadió al menos 1 ng de plásmido circular o 20 μ l de mezcla de ligación. Tras incubar durante 20 min en hielo, se sometió la preparación a un pulso de 2 min a 42°C en un termobloque, seguido de 2 min en hielo. A continuación, se añadió 900 μ l de LB y se dejó recuperar las células durante 1 h a 37°C. Se sembró una alícuota de 100 μ l en una placa de LB suplementado con el antibiótico adecuado y el resto se centrifugó durante 1 min a 13000 r.p.m. Finalmente se resuspendió el resto en 100 μ l de LB y se sembró en otra placa del mismo medio. Las células transformadas se incubaron durante 16-24 h a 37°C.

III.2.3. Transformación de levaduras y ensayo de doble híbrido en levaduras

Las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas para el Y2H fueron PJ69-4a, que recibió los vectores derivados de pACTII que expresan el dominio de activación de Gal4 (Gal4_{AD}), y PJ69-4a, que recibió los vectores derivados de pBD-Gal4 que expresan el dominio de unión a DNA de Gal4 (Gal4_{BD}) (James et al., 1996). Una vez obtenidos los transformantes haploides para cada vector se generó un *stock* de los mismos que puede ser almacenado a -80°C y utilizado repetidamente para la generación de nuevos diploides. Los medios de cultivo utilizados se detallan en III.2.1.

La transformación de levaduras se realizó siguiendo el método de PEG3350-acetato de litio (Gietz et al., 1995). Brevemente, a un cultivo de la estirpe correspondiente de levadura en YPAD de 2 ml crecido durante toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm)

se le añadió 8 ml de medio fresco y se incubó 5 h en las mismas condiciones. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 2300 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 ml de acetato de litio 100 mM, de los que se utilizaron 1,5 ml por cada nueve transformaciones. Una fracción de 1,5 ml se centrifugó durante 5 min a 2300 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El pellet de levaduras se resuspendió en la siguiente mezcla: 230 μ l 50% (p/v) PEG3350, 35 μ l acetato de litio 1 M, 46 μ l de agua bidestilada y 9 μ l de DNA de esperma de salmón (5 mg/ml) (Cat. D1626, Sigma) desnaturalizado 5 min a 100°C. A 32 μ l de la mezcla de levaduras anterior se le añadió 300-600 ng de plásmido en un volumen de 1-2 μ l, y se incubó en un termociclador durante 30 min a 30°C, 25 min a 42°C y 1 min a 30°C. Las levaduras transformadas del sexo α se sembraron en placas de SD-L (sin leucina) para seleccionar la incorporación de los vectores derivados de pACTII (*leu*⁺) y las del sexo **a** en SD-W (sin triptófano) para seleccionar la incorporación de los vectores derivados de pBD-Gal4 (*trp*⁺). Los transformantes se incubaron durante 3 días a 30°C.

Para la generación de los *stocks* de levaduras haploides que se conservaron a -80°C, se recolectaron los transformantes utilizando una punta amarilla de micropipeta doblada a modo de asa y se resuspendieron por duplicado en 0,7 ml del medio SD correspondiente con un 23% de glicerol. Los *stocks* se mezclaron concienzudamente y se almacenaron a -80°C. La Tabla 5 muestra los *stocks* generados a lo largo de este trabajo. Los plásmidos que contiene cada *stock* se describen en la sección III.3.2.

Los ensayos de Y2H comenzaron con la obtención de las estirpes diploides que portaban las combinaciones de vectores deseadas para cada interacción. Para la obtención de cada diploide, se depositaron 2 μ l de cada *stock* de sexo opuesto en el mismo punto de una placa de YPAD y se incubó durante 24 h a 30°C. Los diploides generados en la colonia resultante se seleccionaron en SD-WL. Para ello, la colonia se recolectó con un asa de siembra y se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril. A continuación, se sembró 4 μ l de la colonia resuspendida en SD-WL y se incubó durante 48 h a 30°C. Los diploides seleccionados se recolectaron de la misma forma y se volvieron a sembrar bien por extensión para seleccionar colonias individuales o bien poniendo gotas de 4 μ l en SD-WL, SD-WLH+3-AT y SD-WLA a modo de control de crecimiento y selección de interacciones débiles y fuertes, respectivamente. La selección de las interacciones se realizó a 30°C y el crecimiento fue analizado durante 2 semanas.

Tabla 5. Colección de levaduras haploides generadas en este trabajo.

ID	Sexo	Plásmido	Descripción
MU1Y	Mat α	pACTII	Control negativo que expresa Gal4 _{AD} .
MU2Y	Mat α	pMAT1966	Expresa Gal4 _{AD} -R3B2.
MU3Y	Mat α	pMAT1985	Expresa Gal4 _{AD} -Ago-1.
MU4Y	Mat α	pMAT1984	Expresa Gal4 _{AD} -Ago-2.
MU5Y	Mat α	pMAT1989	Expresa Gal4 _{AD} -Ago-3.
MU6Y	Mat α	pMAT1983	Expresa Gal4 _{AD} -Dicer-1.
MU7Y	Mat α	pMAT1990	Expresa Gal4 _{AD} -Dicer-2.

MU8Y	Mat α	pMAT1982	Expresa Gal4 _{AD} -Qip.
MU9Y	Mat α	pMAT1988	Expresa Gal4 _{AD} -RdRP-1.
MU10Y	Mat α	pMAT1993	Expresa Gal4 _{AD} -RdRP-2.
MU11Y	Mat α	pMAT1986	Expresa Gal4 _{AD} -RdRP-3.
MU12Y	Mat α	pMAT1987	Expresa Gal4 _{AD} -RnhA.
MU15Y	Mat a	pBD-Gal4	Control negativo que expresa Gal4 _{BD} .
MU16Y	Mat a	pMAT1979	Expresa Gal4 _{BD} -R3B2.
MU18Y	Mat a	pMAT1974	Expresa Gal4 _{BD} -F18.
MU19Y	Mat a	pMAT1976	Expresa Gal4 _{BD} -F14.
MU20Y	Mat a	pMAT1978	Expresa Gal4 _{AD} -CTF
MU21Y	Mat a	pMAT1994	Expresa Gal4 _{BD} -Ago-1.
MU22Y	Mat a	pMAT1995	Expresa Gal4 _{BD} -Ago-2.
MU23Y	Mat a	pMAT1998	Expresa Gal4 _{BD} -Ago-3.
MU24Y	Mat a	pMAT1996	Expresa Gal4 _{BD} -Dicer-1.
MU25Y	Mat a	pMAT1999	Expresa Gal4 _{BD} -Dicer-2.
MU26Y	Mat a	pMAT1511	Expresa Gal4 _{BD} -Qip.
MU27Y	Mat a	pMAT2000	Expresa Gal4 _{BD} -RdRP-1.
MU28Y	Mat a	pMAT1997	Expresa Gal4 _{BD} -RdRP-2.
MU29Y	Mat a	pMAT2032	Expresa Gal4 _{BD} -RdRP-3.
MU30Y	Mat a	pMAT2036	Expresa Gal4 _{BD} -RnhA.
MU32Y	Mat α	pMAT1973	Expresa Gal4 _{AD} -F18.
MU33Y	Mat α	pMAT1975	Expresa Gal4 _{AD} -F14.
MU34Y	Mat α	pMAT1977	Expresa Gal4 _{AD} -CTF.
MU35Y	Mat α	pMAT2203	Expresa Gal4 _{AD} - Δ CTF.
MU38Y	Mat a	pMAT2202	Expresa Gal4 _{BD} - Δ CTF.
MU40Y	Mat α	pMAT2252	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1.
MU41Y	Mat α	pMAT2251	Expresa Gal4 _{AD} -D1R2.
MU42Y	Mat α	pMAT2253	Expresa Gal4 _{AD} -D1R3.
MU50Y	Mat α	pMAT2254	Expresa Gal4 _{AD} -D1R2A.
MU51Y	Mat α	pMAT2255	Expresa Gal4 _{AD} -D1R2B.
MU52Y	Mat α	pMAT2256	Expresa Gal4 _{AD} -D1R2C.
MU53Y	Mat α	pMAT2259	Expresa Gal4 _{AD} -D12AB.
MU81Y	Mat α	pMAT2317	Expresa Gal4 _{AD} - Δ H2.
MU82Y	Mat α	pMAT2318	Expresa Gal4 _{AD} -F14_ Δ H2.
MU83Y	Mat α	pMAT2321	Expresa Gal4 _{AD} -RBD2*.
MU84Y	Mat α	pMAT2322	Expresa Gal4 _{AD} -CTF_RBD2*.
MU85Y	Mat α	pMAT2319	Expresa Gal4 _{AD} - Δ CTF_ Δ H2.
MU88Y	Mat a	pMAT2314	Expresa Gal4 _{BD} - Δ H2.
MU89Y	Mat a	pMAT2315	Expresa Gal4 _{BD} -F14_ Δ H2.
MU90Y	Mat a	pMAT2313	Expresa Gal4 _{BD} -RBD2*.
MU91Y	Mat a	pMAT2311	Expresa Gal4 _{BD} -CTF_RBD2*.
MU92Y	Mat a	pMAT2316	Expresa Gal4 _{BD} - Δ CTF_ Δ H2.
MU93Y	Mat α	pMAT2329	Expresa Gal4 _{AD} -PIR.
MU94Y	Mat α	pMAT2328	Expresa Gal4 _{AD} -dsRBD2.
MU95Y	Mat a	pMAT2334	Expresa Gal4 _{BD} -PIR
MU96Y	Mat a	pMAT2333	Expresa Gal4 _{BD} -dsRBD2.
MU98Y	Mat α	pMAT2326	Expresa Gal4 _{AD} -D1R2BC.
MU99Y	Mat α	pMAT2330	Expresa Gal4 _{AD} -D2R1.
MU100Y	Mat α	pMAT2331	Expresa Gal4 _{AD} -D2R2.

MU101Y	Mat α	pMAT2332	Expresa Gal4 _{AD} -D2R3.
MU103Y	Mat α	pMAT2337	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1A.
MU104Y	Mat α	pMAT2338	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1AB.
MU105Y	Mat α	pMAT2339	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1B.
MU106Y	Mat α	pMAT2340	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1BC.
MU107Y	Mat α	pMAT2341	Expresa Gal4 _{AD} -D1R1C.
MU108Y	Mat a	pMAT2342	Expresa Gal4 _{BD} -LcR3B2.
MU109Y	Mat a	pMAT2343	Expresa Gal4 _{BD} -LcF18.
MU110Y	Mat a	pMAT2344	Expresa Gal4 _{BD} -LcF14.
MU111Y	Mat a	pMAT2345	Expresa Gal4 _{BD} -LcPIR.
MU112Y	Mat a	pMAT2346	Expresa Gal4 _{BD} -LcRBD2
MU113Y	Mat a	pMAT2347	Expresa Gal4 _{BD} -LcCTF.

III.2.4. Transformación de *M. lusitanicus*

La transformación de *M. lusitanicus* se realizó mediante la electroporación del DNA en protoplastos (Gutiérrez et al., 2011) generados a partir de esporas pregerminadas. En el caso de transformación con plásmidos circulares, la siembra en medio selectivo permite el aislamiento de transformantes que mantienen extracromosómicamente el DNA plasmídico (van Heeswijk & Roncero, 1984), mientras que en el caso de transformación con fragmentos lineales de DNA, la siembra en medio selectivo permite recuperar transformantes en los que el DNA se ha integrado en el genoma del hongo, preferiblemente mediante recombinación homóloga (Navarro et al., 2001).

La generación de protoplastos de *M. lusitanicus* se realizó a partir de esporas de la estirpe de interés recién recolectadas de micelio crecido en placas de YPG pH 4,5. El día anterior al inicio del protocolo se preparó un cultivo de 25 ml de YPG con $12,5 \cdot 10^7$ esporas y se almacenó durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, el cultivo se incubó durante 3-4 h a 250 r.p.m. y 26°C en oscuridad hasta que la mayoría de las esporas mostraron las yemas de germinación. El cultivo se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó 5 min a 280 xg para eliminar el medio. El precipitado con las esporas se resuspendió en 5 ml de PS (0,5 M Sorbitol; 0,1 M Tampón fosfato pH 6,5) y se centrifugó en las mismas condiciones. Tras descartar el sobrenadante, las esporas se resuspendieron en un volumen final de 4 ml de PS y se les añadió 1 ml de PS con 5 mg de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Cat. L1412, Sigma) y 0,3 μ l ($4 \cdot 10^{-4}$ U) de quitosanasas de *Streptomyces sp.* (Cat. C0794, Sigma). La preparación con las esporas y las enzimas se incubó durante 90 min a 30°C y 60 r.p.m. para digerir las paredes fúngicas. La reacción se detuvo añadiendo 20 ml de sorbitol 0,5 M frío y las enzimas se retiraron realizando dos lavados, centrifugando 5 min a 200 xg, con 5 ml de sorbitol 0,5 M frío. Los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 μ l de sorbitol 0,5 M frío.

Las mezclas de transformación se realizaron con 100 μ l de protoplastos y 1-5 μ g de DNA en un volumen máximo de 10 μ l en agua bidestilada o de 20 μ l en sorbitol 0,5 M. Las mezclas de transformación se transfirieron a cubetas de electroporación de 2 mm (Cat. FB102, Fisher Scientific) pre-enfriadas y se sometieron a un pulso eléctrico de 0,8

kV, 25 μ F de capacidad y resistencia constante de 400 Ω en un electroporador Gene Pulser XCell (Bio-Rad) con los siguientes módulos: modulo principal (Cat. 1652666), modulo CE (Cat. 1652667), módulo PC (Cat. 1652668) y módulo de choque (Cat. 1652669). Inmediatamente tras el pulso, se añadió a cada cubeta 1 ml de YPG pH 4,5 con sorbitol 0,5 M frio y los protoplastos electroporados se recuperaron en tubos de 2 ml durante 1 h a 150 r.p.m. y 26°C. Los protoplastos transformados se centrifugaron a 110 xg durante 5 min y se resuspendieron a razón de 200 μ l de YNB pH 3,2 con sorbitol 0,5 M por cada placa que se pretendió sembrar. Los transformantes se sembraron en placas de MMC con sorbitol 0,5 M pH 3,2 cuando se estaba complementado la auxotrofia a uridina, o en placas de YNB con sorbitol 0,5 M pH 3,2 cuando se estaba complementando la auxotrofia a leucina. Las placas se incubaron al menos 3 días a 26°C en oscuridad hasta observar el crecimiento de los transformantes.

III.3. Manipulación de DNA

III.3.1. Amplificación de DNA mediante PCR

Todas las reacciones de amplificación de DNA se llevaron a cabo con la enzima Herculase II Fusion DNA polymerase (Cat. 600677, Agilent). Las mezclas de reacción se prepararon siguiendo las instrucciones del suministrador. En las amplificaciones cuyo molde fue DNA genómico de *M. lusitanicus* se añadió DMSO a una concentración final del 5%.

Salvo que se indique lo contrario, las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C de 3 min, cuando el molde era un fragmento de DNA lineal o un plásmido, o de 5 min, cuando el molde era DNA genómico. A continuación, se realizaron 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento a 58°C durante 20 s y extensión a razón de 30 s/kb de fragmento esperado a 72°C. Tras los ciclos, se realizó una extensión final a 72°C con una duración de 2 veces el tiempo de extensión de los ciclos.

Para la fusión de fragmentos con extremos solapantes (PCR de fusión), las reacciones de PCR se prepararon con 50-100 ng de cada uno de los moldes ajustados a una relación 1:1 molar. Las condiciones de amplificación incluían 10 ciclos para permitir la fusión de cadenas y la generación del molde (Figura 11A), y 25 ciclos adicionales para su amplificación (Figura 11B). Los primeros 10 ciclos consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida de 10 ciclos de 95°C durante 30 s, 70°C durante 1 s, una rampa de 0,3°C/s hasta la temperatura de alineamiento de las regiones solapantes, 30 s a la temperatura anterior, y una rampa de 0,3°C/s hasta los 68°C para extender las cadenas durante 2 min. A continuación, los 25 ciclos de amplificación consistían en una desnaturalización de 95°C durante 30 s, 70°C durante 1 s, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos menos 5°C durante 30 s, y una extensión de 30 s/kb a la que se sumaban 10 s por ciclo, a 68°C. Finalmente, se realizó una extensión final de 5 min a 68°C.

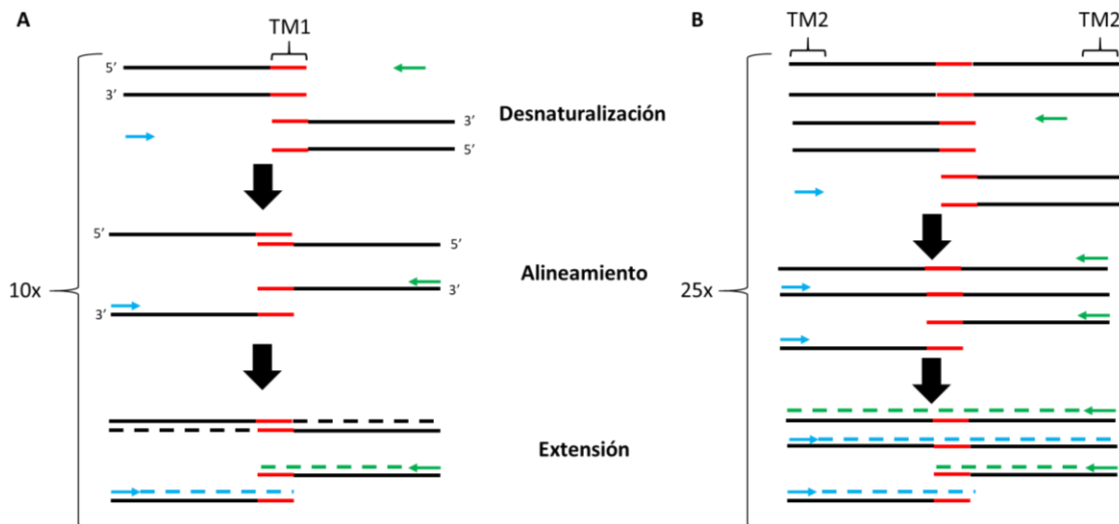


Figura 11. Representación de la PCR de fusión.

A) Los ciclos iniciales de la PCR están encaminados a facilitar el alineamiento de los moldes a través de su región solapante, programándose su temperatura de alineamiento (TM1), y su posterior extensión del extremo 3'-OH libre. Debido a la similitud de tamaños de las regiones solapantes respecto a los cebadores, es probable que también se produzca una extensión de cadenas que no pueden ser extendidas al solapar por sus extremos 5'. Cuando la TM1 es cercana a la TM2 puede producirse una amplificación de las últimas cadenas, regenerando en cada ciclo las que han solapado por su extremo 3'. B) Los ciclos posteriores están encaminados a amplificar el molde fusionado.

III.3.2. Construcción de plásmidos y oligonucleótidos utilizados

La Tabla 6 describe los plásmidos utilizados en este trabajo y resume su construcción o su origen, incluyendo en el primer caso el origen del inserto y los nucleótidos utilizados para su amplificación. Todos los plásmidos cuyo objetivo era la expresión de proteínas o RNA, *in vivo* o *in vitro*, se secuenciaron para asegurar la ausencia de mutaciones. La Tabla 7 describe los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la manipulación de DNA en los ensayos de PCR, construcción de plásmidos y comprobación de las ediciones genómicas. Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR se muestran en la Tabla 9.

Para generar la secuencia que codifica la variante RIII-, se utilizaron oligonucleótidos portadores de las mutaciones (Figura 12). La región 5' del cDNA de *r3b2* se amplificó hasta la región de las mutaciones utilizando los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y MutRev, mientras que la región 3' desde el punto de las mutaciones se amplificó con MutFow y R3B2-Rev2-XhoI. Ambos fragmentos fueron fusionados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Rev2-XhoI, y el producto de fusión resultante se clonó en pET-15b (Véase III.3.2) dando lugar a pMAT1965. La secuencia que codifica la variante RBD2* se generó de la misma forma (Figura 12) amplificando la región 5' con los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Mut-Rev2, y la región 3' con los oligonucleótidos R3B2-Mut-Fow2 y R3B2-Rev2-XhoI. El producto de fusión se generó con los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Rev2-XhoI y fue clonado de la misma forma (Véase III.3.2) dando lugar a pMAT1980. Para generar la variante Δ CTF, la región de *r3b2* hasta F14 se amplificó utilizando los

oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Rev5-XhoI, este último oligonucleótido incluía un codón de Stop y se clonó en pET-15b (Véase III.3.2) dando lugar a pMAT2040.

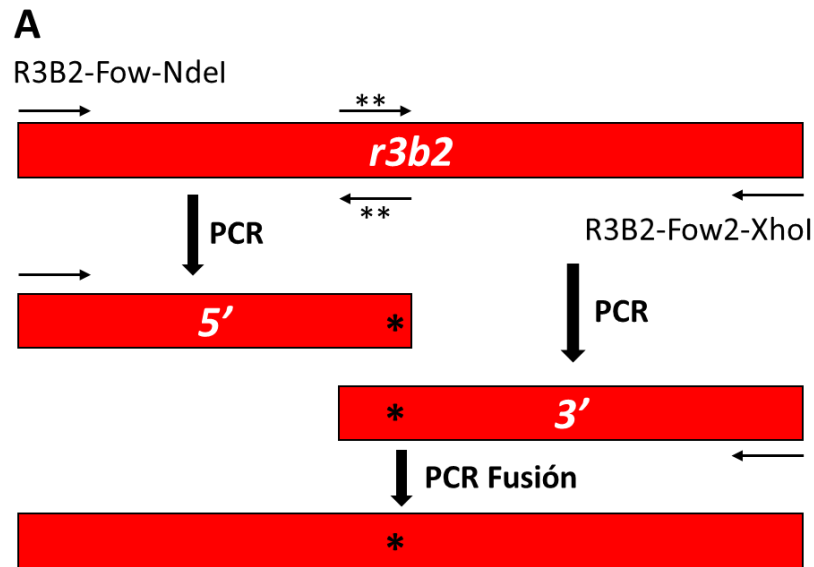


Figura 12. Obtención de alelos mutados de *r3b2* para su expresión en *E. coli*.

Las mutaciones (*) se introdujeron en los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región 5' y 3' del cDNA de manera que quedasen incorporadas a la secuencia. Posteriormente se realizó una PCR fusión de ambos fragmentos para obtener el cDNA mutado que fue clonado en pET-15b.

Para la obtención de RNB, la secuencia codificante del dominio RIIID de RNC se amplificó utilizando como molde 1 µl de una dilución 1000 de un cultivo líquido de la estirpe DH5α de *E. coli*. Los oligonucleótidos utilizados fueron Ecrnc-Fow1-NdeI y Ecrnc-Rev-R3B2, obteniéndose un fragmento de 444 pb. Este fragmento del gen *rnc* de *E. coli* junto con los últimos 1041pb del gen *r3b2*, que codifica los dos dsRBD de la proteína y que se amplificó en las mismas condiciones con los oligonucleótidos R3B2-Fow-rnc y R3B2-Rev2-XhoI, se unieron por PCR fusión utilizando los oligonucleótidos Ecrnc-Fow1-NdeI y R3B2-Rev2-XhoI. El fragmento de fusión obtenido se clonó utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI en pET-15b para generar el plásmido pMAT2072. Utilizando el DNA de DH5α se amplificó, con los oligonucleótidos Ecrnc-Fow1-NdeI y Ecrnc-Rev1-XhoI, y se clonó el gen *rnc* completo con las mismas enzimas de restricción anteriores en pET-15b, dando lugar al plásmido pMAT2071. Estos plásmidos se introdujeron en la estirpe BL21(DE3) de *E. coli* y se indujo la expresión de ambas proteínas (Véase III.5.2).

La construcción de los plásmidos que expresan los alelos de R3B2 con sustituciones en N52 y K84 se realizó mediante la introducción de mutaciones en los oligonucleótidos y PCR de fusión. El alelo que codificaba N52E se construyó a partir de dos fragmentos que incluían la mutación, amplificados respectivamente con los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-N52E-Rev, y R3B2-N52E-Fow y R3B2-Rev2-XhoI, que se utilizaron para hacer una PCR fusión con los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Rev2-XhoI. El fragmento fue clonado utilizando las enzimas de restricción NdeI-XhoI en el vector pET-15b dando lugar al plásmido pMAT2089. El alelo

que codificaba N52D se construyó de la misma forma, pero fusionando los fragmentos amplificados con R3B2-Fow-NdeI y R3B2-N52D-Rev, y R3B2-N52D-Fow y R3B2-Rev2-XhoI, para dar lugar al plásmido pMAT2090. El alelo K84A se construyó a partir de los fragmentos amplificados con R3B2-Fow-NdeI y R3B2-K84A-Rev, y R3B2-K84A-Fow y R3B2-Rev2-XhoI. El alelo K84E se construyó a partir de los fragmentos amplificados con R3B2-Fow-NdeI y R3B2-K84E-Rev, y R3B2-K84E-Fow y R3B2-Rev2-XhoI. El alelo K84Q se construyó a partir de los fragmentos amplificados con R3B2-Fow-NdeI y R3B2-K84Q-Rev, y R3B2-K84Q-Fow y R3B2-Rev2-XhoI. Los pares de fragmentos obtenidos para cada mutación se fusionaron por PCR utilizando los oligonucleótidos R3B2-Fow-NdeI y R3B2-Rev2-XhoI y, en todos los casos, se clonaron en los sitios NdeI-XhoI de pET-15b para dar lugar a los plásmidos pMAT2301, pMAT2302 y pMAT2303, respectivamente. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*.

La construcción de los fragmentos de reemplazamiento del locus *r3b2* se realizó sobre el plásmido pMAT1294 (Figura 13) (Trieu et al., 2015), que contiene el gen *r3b2* y sus regiones adyacentes (874 pb aguas arriba y 1029 pb aguas abajo) clonadas en los sitios XbaI-XhoI del vector pBluescript. Para la construcción del control positivo con la versión silvestre del gen *r3b2*, se amplificó un fragmento de 2 kb que contiene el gen *pyrG* de la estirpe R7B utilizando los oligonucleótidos PyrGFow2kb-NdeI y PyrGRev2kb-VspI, se digirió con NdeI y VspI y se clonó y orientó en el sitio NdeI de pMAT1294 para dar lugar al plásmido pMAT2065 (Figura 13). La clonación de los alelos mutados del gen *r3b2* se realizó sustituyendo la región NsiI-NdeI en pMAT2065, que contiene el gen *r3b2*, por la misma región conteniendo el producto de PCR fusión con los oligonucleótidos R3B2-F11 y R11 para generar cada alelo a partir de pMAT1294 (Figura 13). El alelo que codifica Δ H2 se generó por PCR fusión a partir de un fragmento de 1,6 kb amplificado con los oligonucleótidos R3B2-F11 y R3B2-Rev-Del2 y un segundo fragmento de 1,8 kb amplificado con R3B2-Fow-Del2 y R11. El alelo que codifica RBD2* se generó por PCR fusión a partir de un fragmento de 2,4 kb amplificado con los oligonucleótidos R3B2-F11 y R3B2-Mut-Rev2 y un segundo fragmento de 1,1 kb amplificado con R3B2-Mut-Fow2 y R11. El alelo que codifica Δ CTF se generó por PCR fusión a partir de un fragmento de 1,8 kb amplificado utilizando los oligonucleótidos R3B2-F11 y R3B2-Rev5-fterm y un segundo fragmento de 1 kb amplificado con R3B2-Fow8 y R11. La clonación de cada uno de estos fragmentos que contienen los alelos Δ H2, RBD2* y Δ CTF dio lugar a los plásmidos pMAT2067, pMAT2068 y pMAT2069, respectivamente (Figura 13). Para delecionar R3B2 se realizó una PCR reversa utilizando el plásmido pMAT2065 con los oligonucleótidos PyrGFow2kb-NdeI y R3B2-Rev10-NdeI, el producto de 6,5 kb resultante fue circularizado tras su digestión con NdeI para dar lugar al plásmido pMAT2070 (Figura 13). La digestión de los plásmidos pMAT2065, pMAT2067, pMAT2068, pMAT2069 y pMAT2070 con XbaI y XhoI permitió la obtención de los fragmentos lineales utilizados para el reemplazamiento en el locus *r3b2* de la estirpe MU402 de *M. lusitanicus*.

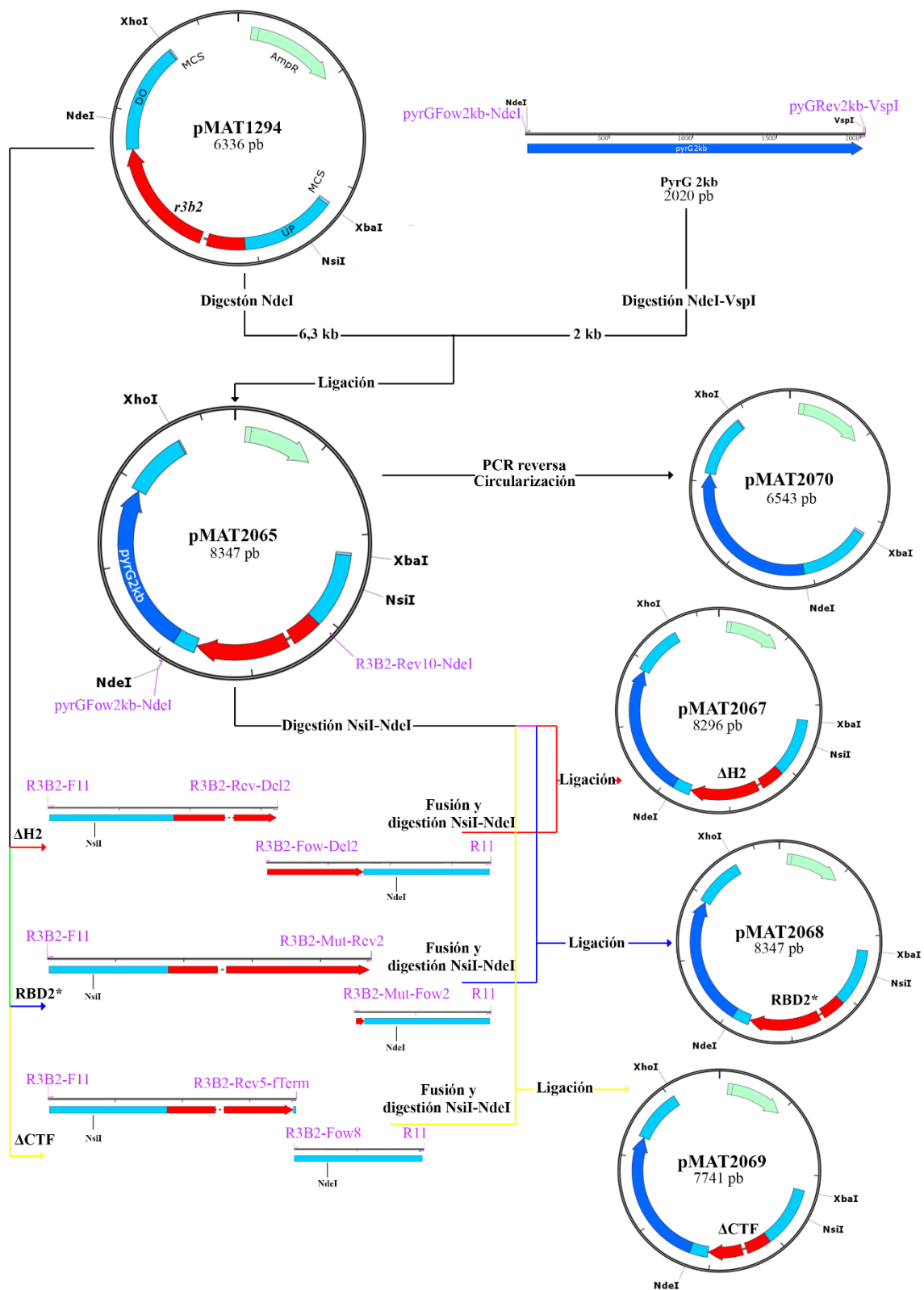


Figura 13. Construcción de los plásmidos que contienen los fragmentos de reemplazamiento del locus *r3b2*. Representación de la construcción a partir de pMAT1294 (Trieu et al., 2015) y el fragmento PyrG2kb. Los oligonucleótidos utilizados se indican en magenta. UP, región aguas arriba de *r3b2*; DO, región aguas abajo de *r3b2*.

Para la expresión y purificación de la variante $\Delta H2$ (Figura 34A) su cDNA se generó amplificando un fragmento de 0,7 kb con los oligonucleótidos R3B2-FowY-XhoI y R3B2-Rev-Del2 y un fragmento de 0,8 kb con los oligonucleótidos R3B2-Fow-Del2 y R3B2-Rev2-NsiI. Ambos fragmentos se fusionaron por PCR con los oligonucleótidos R3B2-FowY-XhoI y R3B2-Rev2-NsiI, se digirió el producto de la fusión con XhoI y NsiI y se clonó utilizando las mismas enzimas en pBD-Gal4 dando lugar al plásmido pMAT2314.

Para la construcción de los plásmidos que portan el fragmento de reemplazamiento del locus *carRP* en la complementación de *r3b2*, el locus *r3b2* amplificado con los oligonucleótidos R3B2-F11 y R3B2-Rev13-NheI, se digirió con NheI y XhoI y se clonó en los sitios NheI y XhoI del plásmido pMAT1472, que contiene el marcador de selección y las regiones adyacentes del locus *carRP*, dando lugar al plásmido pMAT2097. La construcción del fragmento de reemplazamiento que contiene el cDNA de *Lcr3b2* bajo el control del promotor de *Mr3b2* (Figura 47B) se realizó amplificando el cDNA, clonado anteriormente para su expresión en *E. coli* (Véase IV.3.2), con los oligonucleótidos LcR3B2-Fow1-XhoI y LcR3B2-Rev1-SacII y el promotor con los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y R3B2-Rev10-XhoI. Los fragmentos se digirieron con XhoI y SacII y NheI y XhoI, respectivamente, y se clonaron, en una ligación triple, en los sitios NheI y SacII de pMAT1472, para dar lugar al plásmido pMAT2307. Para la construcción del fragmento de reemplazamiento que contiene el cDNA de *Rmr3b2* bajo el control del promotor de *Mr3b2* (Figura 47B), el RNA extraído de un cultivo de 20 ml de YPG con 10^7 esporas de *R. microsporus* ATCC11559 incubado durante 16 h a 250 r.p.m. en condiciones de oscuridad, se retrotranscribió utilizando Expand™ Reverse Transcriptase (Cat. 11785826001; Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de 1 kb del gen *Rmr3b2* se amplificó a partir del cDNA total obtenido utilizando los oligonucleótidos RmR3B2-F1-NdeI y RmR3B2-R2-SacII y se digirió con NdeI y SacII. El promotor de *Mr3b2* se amplificó con los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y R3B2-Rev10-NdeI y se digirió con NheI y NdeI. Los dos fragmentos se clonaron simultáneamente en los sitios NheI y SacII de pMAT1472, para dar lugar al plásmido pMAT2327.

Para la construcción de estos plásmidos portadores del cDNA de los genes homólogos se introdujo un MCS en el plásmido pMAT1253 (De Haro et al., 2009), utilizado anteriormente para determinar la frecuencia de silenciamiento en las estirpes de *M. lusitanicus* que portaban versiones mutadas del gen *r3b2* (Véase IV.2.3.2). La introducción del MCS se realizó mediante la hibridación de los oligonucleótidos fosforilados MCS-ApaI y MCS-ApaI-compatible y su clonación en el sitio ApaI para dar lugar al plásmido pMAT2038 (Figura 14A), sobre el que se clonaron las diferentes construcciones. El locus completo de *Mr3b2* se amplificó con los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y R3B2-R11-NheI, se digirió con NheI y se clonó y orientó en el sitio NheI de pMAT2038 para dar lugar al plásmido pMAT2043, que fue utilizado como control positivo de la complementación. Con el fin de reducir el número de oligonucleótidos, las construcciones de *Lcr3b2* y *Rmr3b2* se fusionaron sin incorporar

secuencias solapantes en ambos fragmentos de manera que las secuencias de restricción que habían sido previamente incorporadas a los plásmidos para la integración en el genoma no se incorporasen al producto de amplificación (Figura 14B). En el caso del cDNA de *Lcr3b2*, se amplificó un fragmento de 2,5 kb, que contenía el promotor de *Mlr3b2* y el cDNA del gen de *L. corymbifera*, a partir del plásmido pMAT2307 utilizando los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y LcR3B2-Rev1-SacII y un fragmento de 1 kb que contenía la región 3'-UTR (*untranslated region* o UTR) del gen *Mlr3b2* utilizando los oligonucleótidos R3B2-Fow8-LcR3B2 y R3B2-R11-NheI. Ambos fragmentos fueron fusionados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y R3B2-R11-NheI, el fragmento de fusión se digirió con NheI y se clonó y orientó en el sitio NheI de pMAT2038 para dar lugar al plásmido pMAT2324. De la misma forma, el fragmento de 1,9 kb, con el promotor y el cDNA de *Rmr3b2*, se amplificó con los oligonucleótidos R3B2-F11-NheI y RmR3B2-R2-SacII a partir de pMAT2327, y la región 3'-UTR de *Mlr3b2* con los oligonucleótidos R3B2-Fow8-RmR3B2 y R3B2-R11-NheI. Ambos fragmentos fueron fusionados mediante PCR, clonados y orientados como en el caso anterior para dar lugar al plásmido pMAT2335.

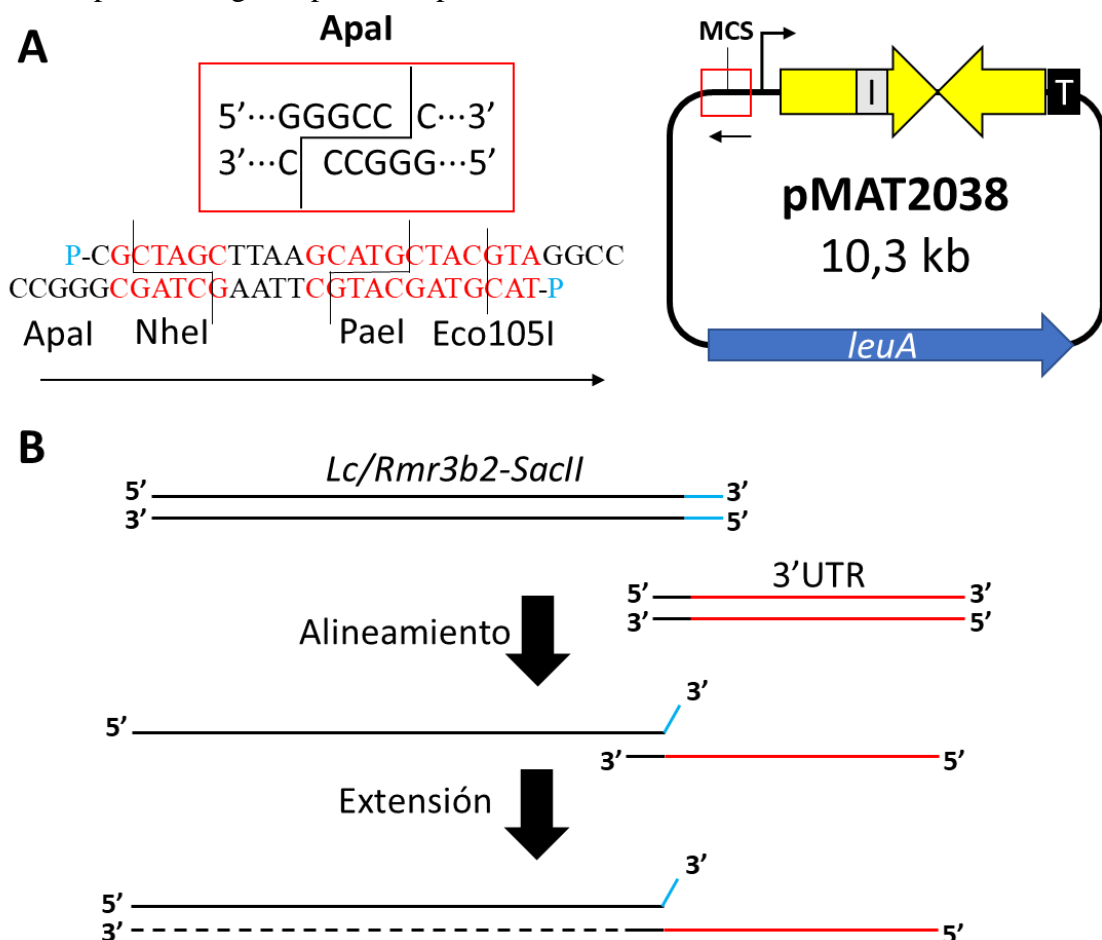


Figura 14. MCS insertado en pMAT2038 y fusión mediante PCR de fragmentos con extremos no solapantes.
 A) Representación de la secuencia que reconoce la enzima de restricción Apal y secuencia del MCS clonado a partir de oligonucleótidos fosforilados en 5' en el mismo sitio de pMAT1253 para dar lugar a pMAT2038 (Derecha). Se indica la dirección seleccionada del MCS con una flecha. I, intrón; T, secuencia de terminación de la transcripción. B) Representación de las cadenas de DNA para generación del molde amplificado de la fusión entre el cDNA de *Lcr3b2* o *Rmr3b2* utilizando fragmentos con solapamiento interno. Debido a que el extremo 3' libre del cDNA no puede hibridar en el fragmento 3'UTR no se produce la incorporación del extremo no solapante. Por el contrario, el

solapamiento interno del fragmento 3'UTR con el cDNA permite generar una cadena molde que posteriormente puede ser amplificada por los oligonucleótidos (no mostrados).

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características	Vector (punto de inserción)	Origen / Origen del inserto	Oligonucleótidos*
<i>pET-15b</i>	Amp ^R ; Vector de expresión en <i>E. coli</i> que contiene la etiqueta N-terminal 6xHis.	-	Novagen	-
<i>pUC18</i>	Amp ^R ; Vector utilizado para la clonación rutinaria de DNA.	-	(Norlander et al., 1983)	-
<i>pMAT679</i>	Amp ^R ; Obtención de molde para la síntesis de <i>carB</i> dsRNA.	-	Este laboratorio	-
<i>pMAT688</i>	Amp ^R ; Obtención de molde para la síntesis de <i>carB</i> ssRNA.	-	'	-
<i>pMAT1253</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Expresión <i>in vivo</i> de horquilla de RNA derivada de <i>carB</i> .	-	(De Haro et al., 2009)	-
<i>pMAT1294</i>	Amp ^R ; Locus completo del gen <i>r3b2</i> de <i>M. lusitanicus</i> .	-	(Trieu et al., 2015)	-
<i>pMAT1472</i>	Amp ^R ; Marcador <i>leuA</i> flanqueado por las regiones adyacentes al locus <i>carRP</i> . Idéntico a pMAT1476 con el marcador en orientación opuesta.	-	(Rodríguez-Frómata et al., 2012)	-
<i>pMAT1511</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; BD_Qip para Y2H.	-	Este laboratorio	-
<i>pMAT1603</i>	Amp ^R ; Expresión de <i>r3b2</i> con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	cDNA	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1961</i>	Amp ^R ; Igual a pMAT1603, pero con el uso de codones optimizado para <i>E. coli</i> .	-	GeneScript	-
<i>pMAT1965</i>	Amp ^R ; Expresión de RIII- con la etiqueta N-terminal de 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1966</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_R3B2 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1970</i>	Amp ^R ; Expresión de F18 con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev7-XhoI
<i>pMAT1971</i>	Amp ^R ; Expresión de F14 con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow2-NdeI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT1972</i>	Amp ^R ; Expresión de CTF con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow3-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1973</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_F18 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev7-XhoI
<i>pMAT1974</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_F18 para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1603	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev7-NsiI
<i>pMAT1975</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_F14 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow5-NcoI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT1976</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_F14 para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1603	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev5-NsiI

<i>pMAT1977</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_CTF para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow6-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1978</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_CTF para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1603	R3B2-Fow6-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT1979</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_R3B2 para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1603	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT1980</i>	Amp ^R ; Expresión de RBD2* con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT1982</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Qip para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1511	Qip-Fow1-NcoI Qip-STOP (XhoI)
<i>pMAT1983</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Dicer-1 para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	cDNA	Dicer1-Fow1-XmaI Dicer1-Rev1-Sall
<i>pMAT1984</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Ago-2 para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	cDNA	Ago2-Fow2-XmaI Ago2-Rev1-XhoI
<i>pMAT1985</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Ago-1 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	cDNA	Ago1-Fow1-BspHI Ago1-Rev1-XhoI
<i>pMAT1986</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_RdRP-3 para Y2H.	pACTII (NcoI-XmaI)	cDNA	Rdrp3-Fow1-BspHI Rdrp3-Rev1-XmaI
<i>pMAT1987</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_RnhA para Y2H.	pACTII (NcoI-XmaI)	cDNA	Rnha-Fow1-BspHI Rnha-Rev1-XmaI
<i>pMAT1988</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_RdRP-1 para Y2H.	pACTII (NcoI-XmaI)	cDNA	Rdrp1-Fow1-BamHI Rdrp1-Rev1-XmaI
<i>pMAT1989</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Ago-3 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	cDNA	Ago3-Fow2-NcoI Ago3-Rev1-XhoI
<i>pMAT1990</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_Dicer-2 para Y2H.	pACTII (XmaI**)	cDNA	Dicer1-Fow1-XmaI DicerBis3'BD (XmaI)
<i>pMAT1993</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_RdRP-2 para Y2H.	pACTII (BamHI- XhoI)	cDNA	Rdrp2-Fow1-BamHI Rdrp2-Rev1-XhoI
<i>pMAT1994</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_Ago-1 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI-Sall)	pMAT1985	Ago1-Fow1-XmaI Ago1-Rev1-XhoI
<i>pMAT1995</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_Ago-2 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI-Sall)	pMAT1984	Ago2-Fow3-XmaI Ago2-Rev1-XhoI
<i>pMAT1996</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_Dicer-1 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI-Sall)	pMAT1983	Dicer1-Fow2-XmaI Dicer1-Rev1-Sall
<i>pMAT1997</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_RdRP-2 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI-Sall)	pMAT1993	Rdrp2-Fow2-XmaI Rdrp2-Rev1-XhoI
<i>pMAT1998</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_Ago-3 para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT1989	Ago3-Fow4-EcoRI Ago3-Rev1-Sall
<i>pMAT1999</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_Dicer-2 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI**)	pMAT1990	DicerBis5'BD (XmaI) DicerBis3'BD (XmaI)
<i>pMAT2000</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_RdRP-1 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI**)	pMAT1988	Rdrp1-Fow2-XmaI Rdrp1-Rev1-XmaI
<i>pMAT2013</i>	Amp ^R ; Obtención de molde para la síntesis de <i>seq15</i> ssRNA.	-	Este laboratorio	-
<i>pMAT2032</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_RdRP-3 para Y2H.	pBD-GAL4 (XmaI**)	pMAT1986	Rdrp3-Fow2-XmaI Rdrp3-Rev1-XmaI
<i>pMAT2036</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_RnhA para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-XmaI)	pMAT1987	Rnha-Fow1-EcoRI Rnha-Rev1-XmaI

<i>pMAT2038</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Vector de expresión de horquilla de RNA derivada de <i>carB</i> con nuevo MCS.	pMAT1253 (ApaI)	Véase arriba	MCS-ApaI MCS-ApaI-compatible
<i>pMAT2040</i>	Amp ^R ; Expresión de ΔCTF con la etiqueta 6xHis (Véase arriba).	pET-15b (NdeI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT2043</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Expresión <i>in vivo</i> de la horquilla de RNA derivada de <i>carB</i> y el gen <i>r3b2</i> bajo su propio promotor.	pMAT2038 (NheI ^{**})	Véase arriba	R3B2-F11-NheI R3B2-R11-NheI
<i>pMAT2065</i>	Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; Integración de <i>r3b2</i> en su propio locus seguido del marcador de selección <i>pyrG</i> .	pMAT1294 (NdeI ^{**})	Véase arriba	PyrGFow2kb-NdeI PyrGRev2kb-VspI
<i>pMAT2067</i>	Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; Integración de la variante ΔH2 en el locus de <i>r3b2</i> seguido del marcador de selección <i>pyrG</i> .	pMAT2065 (NsiI-NdeI)	Véase arriba	R3B2-F11 R11
<i>pMAT2068</i>	Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; Integración de la variante RBD2* en el locus de <i>r3b2</i> seguido del marcador de selección <i>pyrG</i> .	pMAT2065 (NsiI-NdeI)	Véase arriba	R3B2-F11 R11
<i>pMAT2069</i>	Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; Integración de la variante ΔCTF en el locus de <i>r3b2</i> seguido del marcador de selección <i>pyrG</i> .	pMAT2065 (NsiI-NdeI)	Véase arriba	R3B2-F11 R11
<i>pMAT2070</i>	Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; Deleción de <i>r3b2</i> .	-	Véase arriba	PyrGFow2kb-NdeI R3B2-Rev10-NdeI
<i>pMAT2071</i>	Amp ^R ; Expresión de RNC de <i>E. coli</i> con la etiqueta 6xHis (Véase arriba).	pET-15b (NdeI-XhoI)	DNA	Ecrnc-Fow1-NdeI Ecrnc-Rev1-XhoI
<i>pMAT2072</i>	Amp ^R ; Expresión de RNB con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	Ecrnc-Fow1-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2089</i>	Amp ^R ; Expresión de R3B2_N52E con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2090</i>	Amp ^R ; Expresión de R3B2_N52D con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2093</i>	Amp ^R ; Expresión de PpR3B2 con uso de codones optimizado para <i>E. coli</i> y la etiqueta 6xHis.	-	GeneScript	-
<i>pMAT2094</i>	Amp ^R ; Expresión de LcR3B2 con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	cDNA	LcR3B2-Fow1-NdeI LcR3B2-Rev1-XhoI
<i>pMAT2095</i>	Amp ^R ; Expresión de RmR3B2 con uso de codones optimizado para <i>E. coli</i> y la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-BamHI)	IDT	-
<i>pMAT2097</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Integración de <i>r3b2</i> en el locus <i>carRP</i> .	pMAT1472 (XhoI-NheI)	Véase arriba	R3B2-F11 (XhoI) R3B2-Rev13-NheI
<i>pMAT2202</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD_ΔCTF para Y2H.	pBD-GAL4 (XhoI-NsiI)	pMAT1603	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev5-NsiI
<i>pMAT2203</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_ΔCTF para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT2251</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2 para Y2H.	pACTII	pMAT1983	DicR2FwBamHI

		(BamHI-SacI)		DicR2RvSacI
<i>pMAT2252</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1 para Y2H.	pACTII (BamHI-EcoRI)	pMAT1983	DicR1FwBamHI DicR1RvEcoRI
<i>pMAT2253</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R3 para Y2H.	pACTII (SmaI-SacI)	pMAT1983	DicR3FwSmaI DicR3RvSacI
<i>pMAT2254</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2A para Y2H.	pACTII (BamHI-SacI)	pMAT1983	DicR2FwBamHI Dic1RvR2ASacI
<i>pMAT2255</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2B para Y2H.	pACTII (BamHI-SacI)	pMAT1983	DicF2R2BBamHI Dic1RvR2BSacI
<i>pMAT2256</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2C para Y2H.	pACTII (BamHI-SacI)	pMAT1983	Dic1R2CBamHI DicR2RvSacI
<i>pMAT2259</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2AB para Y2H.	pACTII (BamHI-SacI)	pMAT1983	DicR2FwBamHI Dic1RvR2BSacI
<i>pMAT2301</i>	Amp ^R ; Expresión de R3B2_K84A con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow1-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2302</i>	Amp ^R ; Expresión de R3B2_K84E con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow1-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2303</i>	Amp ^R ; Expresión de R3B2_K84Q con la etiqueta 6xHis.	pET-15b (NdeI-XhoI)	Véase arriba	R3B2-Fow1-NdeI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2304</i>	Amp ^R ; Obtención de molde para la síntesis de <i>GAstair</i> ssRNA.	pUC18 (EcoRI-SalI)	Véase arriba	T7-GAstair-For T7-GAstair-Rev
<i>pMAT2307</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Integración de <i>Lcr3b2</i> en el locus <i>carRP</i> .	pMAT1472 (NheI-SacII)	Véase arriba	R3B2-F11-NheI R3B2-Rev10-XhoI LcR3B2-Fow1-XhoI LcR3B2-Rev1-SacII
<i>pMAT2311</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-CTF_RBD2* para Y2H.	pBD-GAL4 (SalI-PstI)	pMAT1980	R3B2-Fow6-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT2313</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-RBD2* para Y2H.	pBD-GAL4 (SalI-PstI)	pMAT1980	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT2314</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-ΔH2 para Y2H.	pBD-GAL4 (SalI-PstI)	Véase arriba	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT2315</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-F14_ΔH2 para Y2H.	pBD-GAL4 (SalI-PstI)	pMAT2314	R3B2-Fow5-XhoI R3B2-Rev5-NsiI
<i>pMAT2316</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-ΔCTF_ΔH2 para Y2H.	pBD-GAL4 (SalI-PstI)	pMAT2314	R3B2-FowY-XhoI R3B2-Rev5-NsiI
<i>pMAT2317</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD-ΔH2 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT2314	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2318</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD-F14_ΔH2 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT2314	R3B2-Fow5-NcoI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT2319</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD-ΔCTF_ΔH2 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT2314	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev5-XhoI
<i>pMAT2321</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD-RBD2* para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1980	R3B2-FowY-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2322</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD-CTF_RBD2* para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1980	R3B2-Fow6-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2324</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Expresión <i>in vivo</i> de la horquilla de RNA derivada de <i>carB</i> y el gen <i>Lcr3b2</i> bajo el promotor de <i>Mlr3b2</i> .	pMAT2038 (NheI**)	Véase arriba	R3B2-F11-NheI R3B2-R11-NheI

<i>pMAT2326</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R2BC para Y2H.	pACTII (BamHI-SacI)	pMAT1983	Dic1F2R2BBamHI DicR2RvSacI
<i>pMAT2327</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Integración de <i>Rmr3b2</i> en el locus <i>carRP</i> .	pMAT1472 (NheI-SacII)	Véase arriba	R3B2-F11-NheI R3B2-Rev10-NdeI RmR3B2-F1-NdeI RmR3B2-R2-SacII
<i>pMAT2328</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_dsRBD2 para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow7-NcoI R3B2-Rev2-XhoI
<i>pMAT2329</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_PIR para Y2H.	pACTII (NcoI-XhoI)	pMAT1603	R3B2-Fow14-NcoI R3B2-Rev14-XhoI
<i>pMAT2330</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D2R1 para Y2H.	pACTII (XmaI-EcoRI)	pMAT1990	Dicer2-Fow1-XmaI Dicer2-Rev1-EcoRI
<i>pMAT2331</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D2R2 para Y2H.	pACTII (XmaI-EcoRI)	pMAT1990	Dicer2-Fow2-XmaI Dic2R2RvEcoRI
<i>pMAT2332</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D2R3 para Y2H.	pACTII (XmaI-EcoRI)	pMAT1990	Dicer2-Fow3-XmaI Dicer2-Rev2-MunI
<i>pMAT2333</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-dsRBD2 para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1603	R3B2-Fow7-XhoI R3B2-Rev2-NsiI
<i>pMAT2334</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-PIR para Y2H.	pBD-GAL4 (Sall-PstI)	pMAT1983	R3B2-Fow14-XhoI R3B2-Rev14-NsiI
<i>pMAT2335</i>	Amp ^R ; <i>leuA</i> ; Expresión <i>in vivo</i> de la horquilla de RNA derivada de <i>carB</i> y el gen <i>Rmr3b2</i> bajo el promotor de <i>Mlr3b2</i> .	pMAT2038 (NheI**)	Véase arriba	R3B2-F11-NheI R3B2-R11-NheI
<i>pMAT2337</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1A para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	pMAT1983	Dicer1-Fow1-XmaI Dicer1-Rev3-Sall
<i>pMAT2338</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1AB para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	pMAT1983	Dicer1-Fow1-XmaI Dicer1-Rev4-Sall
<i>pMAT2339</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1B para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	pMAT1983	Dicer1-Fow3-XmaI Dicer-Rev4-Sall
<i>pMAT2340</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1BC para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	pMAT1983	Dicer1-Fow3-XmaI Dicer1-Rev5-Sall
<i>pMAT2341</i>	Amp ^R ; <i>leu</i> ; AD_D1R1C para Y2H.	pACTII (XmaI-XhoI)	pMAT1983	Dicer1-Fow4-XmaI Dicer1-Rev5-Sall
<i>pMAT2342</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcR3B2 para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow1-EcoRI LcR3B2-Rev1-Sall
<i>pMAT2343</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcF18 para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow1-EcoRI LcR3B2-Rev2-Sall
<i>pMAT2344</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcF4 para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow2-EcoRI LcR3B2-Rev3-Sall
<i>pMAT2345</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcPIR para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow4-EcoRI LcR3B2-Rev4-Sall
<i>pMAT2346</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcDsRBD2 para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow5-EcoRI LcR3B2-Rev1-Sall
<i>pMAT2347</i>	Cam ^R ; <i>Trp</i> ; BD-LcCTF para Y2H.	pBD-GAL4 (EcoRI-Sall)	pMAT2094	LcR3B2-Fow3-EcoRI LcR3B2-Rev1-Sall

* Las enzimas de restricción utilizadas para digerir el inserto se indican en los identificadores de los oligonucleótidos.

** La orientación del inserto se seleccionó mediante un análisis de fragmentos de restricción de los clones tras la clonación.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la manipulación de DNA.

Las secuencias diana de enzimas de restricción se indican en rojo, las modificaciones respecto a la secuencia molde subrayadas y los nucleótidos extra añadidos al extremo 5' de los sitios de restricción para facilitar la digestión en negrita.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
<i>Ibc3</i>	TTGTGCATTGTGGGACGTGGTATGGCCCGATTG
<i>Ago1-Fow1-BspHI</i>	AAATTTCATGATGTCTTTGGAACCTACTGAAC
<i>Ago1-Fow1-XmaI</i>	GTACCCCGGGATATGTCTTTGGAACCTACTGAAC
<i>Ago1-Rev1-XhoI</i>	AATGGCTCGAGTTACATAAAGTACATGACC
<i>Ago2-Fow2-XmaI</i>	GTATCCCGGGAAATGCTGTCTACAACATCCAGCCAG
<i>Ago2-Fow3-XmaI</i>	TATCCCGGGATATGCTGTCTACAACATCCAG
<i>Ago2-Rev1-XhoI</i>	CGTACCTCGAGCTACATGTAATACATGGAGTTG
<i>Ago3-Fow2-NcoI</i>	CGATACCATGGCTACACCTATGCTCACC
<i>Ago3-Fow4-EcoRI</i>	ACGCAGAATTCATGGCTACACCTATGCTCACC
<i>Ago3-Rev1-Sall</i>	ATCAGGTCGACTACATGAAATACATGCTGTCC
<i>CarB13</i>	GTTGTGCACGTCCAATTGAG
<i>carRP11</i>	CATACAAAGCACGAGTTTCC
<i>Dic1F2R2BBamHI</i>	GCACGTGGATCCTATTAATGGATTTGGCGG
<i>Dic1R2CBamHI</i>	GCATCGGGATCCCACCTCCTCGTTGATACAAG
<i>Dic1RvR2ASacI</i>	GTCGACGAGCTCTATACTCTGCGCTGTGTCTTGG
<i>Dic2R2RvEcoRI</i>	CGATGCGAATTCCTAGCTAGGCACTGTCCAGGTAGAC
<i>Dicer1-Fow1-XmaI</i>	TAGTACCCGGGAATGACCATCATCTACCTTGAC
<i>Dicer1-Fow2-XmaI</i>	TAGTACCCGGGAAATGACCATCATCTACCTTGAC
<i>Dicer1-Fow3-XmaI</i>	GGGGGCCCGGGATTGCAAAGCATTGTTTATACAGCCAAAAGCAC
<i>Dicer1-Fow4-XmaI</i>	GGGGGCCCGGGACCCAAAGCTAGAGTTTTGGTCG
<i>Dicer1-Rev1-Sall</i>	GGTTCGTCGACTTACAAGCAAGTGCATTTTGC
<i>Dicer1-Rev3-Sall</i>	GGGGGGTCGACTAACTCGTTTCCAGCGTGCTGATAC
<i>Dicer1-Rev4-Sall</i>	GGGGGGTCGACCTATGTAACTGACGTTTCGTTTCGTGAG
<i>Dicer1-Rev5-Sall</i>	GGGGGGTCGACCTACGATTCGATACAAAAGGCGTCTTGATG
<i>Dicer2-Fow1-XmaI</i>	TAGCTCCCGGGAATGAAGAAGCCCCAAGCCGGCG
<i>Dicer2-Fow2-XmaI</i>	GGGGGCCCGGGCATTTCAGACGAGGAAGAGAAC
<i>Dicer2-Fow3-XmaI</i>	GGGGGCCCGGGCGTGCCTAGCTTTTGTCAACGATTC
<i>Dicer2-Rev1-EcoRI</i>	GGGGGGAATTCAGTAATCCTCGTCAGAGTCGTAG
<i>Dicer2-Rev2-MunI</i>	GGGGGCAATTGCTAAGGGTCGTATTCATCATCATCCAG
<i>DicerBis3'BD</i>	GGGGGGCCCGGGCTCTAAGGGTCGTATTCATCATCATCC
<i>DicerBis5'BD</i>	CCCCCGCCCGGGCGAAGAAGCCCCAAGCCGGCG
<i>DicR1FwBamHI</i>	GTACGAGGATCCTGACCATCATCTACCTTGA
<i>DicR1RvEcoRI</i>	GTAGCTGAATTCCTAGTTGGATCGTGTGAGGAGAG
<i>DicR2FwBamHI</i>	GTCGCAAGGATCCGACAGGTGCTCTCCTCACACG
<i>DicR2RvSacI</i>	GATCGTGAGCTCTAGAGCAAGACAGCGTCAATGTGC
<i>DicR3FwSmaI</i>	GATCGTCCCGGGCGCTGTCTTGCTCATGCATGATGC
<i>DicR3RvSacI</i>	GTACGAGAGCTCTTACAAGCAAGTGCATTTTGC
<i>Ecrnc-Fow1-NdeI</i>	CCCCCATATGATGAACCCCATCGTAATTAATCG
<i>Ecrnc-Rev1-XhoI</i>	CCCCCTCGAGTCATTCCAGCTCCAGTTTTTTCAAC
<i>Ecrnc-Rev-R3B2</i>	GGCTTTTTGGGGCTGTTTGGCCTAATTTTCGTCCAGACGAG
<i>LcR3B2-Fow1-EcoRI</i>	GGGGGGAATTCATGCAATCCCTTCAAGAGTGC
<i>LcR3B2-Fow1-NdeI</i>	CGTCCATATGCAATCCCTTCAAGAGTGC
<i>LcR3B2-Fow1-XhoI</i>	CCCCCTCGAGATGCAATCCCTTCAAGAGTGC
<i>LcR3B2-Fow2-EcoRI</i>	GGGGGGAATTCCTACTTCTCCTACCAATGATG

<i>LcR3B2-Fow3-EcoRI</i>	GGGGGGAATTC CCATCACTGTATGCCATTACATTC
<i>LcR3B2-Fow4-EcoRI</i>	GGGGGGAATTC TACCATGAACCAACAGCAGTATC
<i>LcR3B2-Fow5-EcoRI</i>	GGGGGGAATTC CCTAGGCCATCGATTGATATCATCC
<i>LcR3B2-Rev1-SacII</i>	CCCC CCGCGG TCAATATTGGCCAATGTTTCG
<i>LcR3B2-Rev1-Sall</i>	GGGGG GTCGAC TCAATATTGGCCAATGTTTCG
<i>LcR3B2-Rev1-XhoI</i>	ATCACTCGAG TCAATATTGGCCAATGTTTCG
<i>LcR3B2-Rev2-Sall</i>	GGGGG GTCGAC CTAGCCAAGCGAGGTGCGTAATTTACGAG
<i>LcR3B2-Rev3-Sall</i>	GGGGG GTCGAC CTAGTCACCAGGGATCGGATTGTAC
<i>LcR3B2-Rev4-EcoRI</i>	GGGGG GTCGAC CTAAGGTTGACCATCATCATCTGTC
<i>MCS-ApaI</i>	[Phos] CGCTAGCTTAAAGCATGCTACGTA GGCC
<i>MCS-ApaI-compatible</i>	[Phos] TACGTAGCATGCTTAAAGCTAGC GGGCC
<i>Mcwc1b-F1</i>	TGACACACAAGAATATTCAC
<i>MutFow</i>	GAGG <u>CC</u> AAAGTTCAACTACATTG <u>CAGCG</u> TCTGCAGTGC
<i>MutRev</i>	AGAC <u>GCTG</u> CAATGTAGTTGAACTT <u>GGC</u> TCTGCCACCTC
<i>P1-Fow1</i>	CGAAGGTAAGGTTGCTACTC
<i>P1-Reverse</i>	ACGAGGCATGATGACTTCGATAAAAGTGC
<i>pMAT679-Rev1</i>	AACTAGTGGATCTCTGGAG
<i>pMAT688-Fow1</i>	TCTCCACCACAGTGACCTTG
<i>pMAT688-Rev1</i>	ATGTCCAAGAAACACATTG
<i>PyrGFow2kb-NdeI</i>	GGGGGCATATG TGCCTCAGCATTGGTACTTG
<i>PyrGRev2kb-VspI</i>	GGGGG ATTAAT GTACACTGGCCATGCTATCG
<i>QIP-Fow1-NcoI</i>	AGCTACCATGG AAATGGAAAAGGAGTACTGTCTTG
<i>QIP-STOP</i>	GGGCG GTCGAC TTAGATGTGCGCAGTGGTCATGGAC
<i>R11</i>	GGGGG CTCGAG CGTACTACTGCAAAACATAGCCTGAGCGGG
<i>R2D2-2</i>	AGACGTCTT GATCGCTGTGG
<i>R3B2-F11</i>	GGGGG CTCGAG TTGCTGAGGGAACATTGGACCTGGATGAGC
<i>R3B2-F11-NheI</i>	GGGGG GCTAGC TTGCTGAGGGAACATTGGACCTGGATG
<i>R3B2-Fow14-NcoI</i>	AAAAACCATGG CATGCCACCTCTTTGCTGAAACCAC
<i>R3B2-Fow14-XhoI</i>	AAAAACTCGAG CATGCCACCTCTTTGCTGAAACCAC
<i>R3B2-Fow5-NcoI</i>	CTTACCATGG CTAACCAAGCCGACAATCCAGTC
<i>R3B2-Fow5-XhoI</i>	CTTACTCGAG CTAACCAAGCCGACAATCCAGTC
<i>R3B2-Fow6-NcoI</i>	TCAATCCATGG CTACATCAAGCCACGAGGAGGC
<i>R3B2-Fow6-XhoI</i>	TCAATCTCGAG CTACATCAAGCCACGAGGAGGC
<i>R3B2-Fow7-NcoI</i>	AAAAACCATGG CAGGGCCCGTGGACGAGGCCAC
<i>R3B2-Fow7-XhoI</i>	AAAAACTCGAG CAGGGCCCGTGGACGAGGCCAC
<i>R3B2-Fow8</i>	TTTCTCTCTCTCAATACATGACTC
<i>R3B2-Fow8-LcR3B2</i>	<u>CATTGGCCAATATTGCATGATTTCTCTCTCTCAATACATGACTC</u>
<i>R3B2-Fow8-RmR3B2</i>	<u>TCAGTCGACCACAACAGTAGTTTCTCTCTCTCTCAATACATGACTC</u>
<i>R3B2-Fow-Del2</i>	<u>CACCAATGCCACCAACTACCCGGATGTG</u>
<i>R3B2-Fow-NdeI</i>	GCTATACATATG ACAGACACGGACACTGTAGAGCAG
<i>R3B2-Fow-rnc</i>	<u>CTCGTCTGGACGAAATTAGCGCAAACAGCCCCAAAAAGCC</u>
<i>R3B2-FowY-NcoI</i>	CGGCCCATGG CCATGACAGACACGGACACTG
<i>R3B2-FowY-XhoI</i>	CGGCCTCGAG CCATGACAGACACGGACACTG
<i>R3B2-K84A-Fow</i>	GCCATTGCAG <u>G</u> AAATACTGTGCCGCTG
<i>R3B2-K84A-Rev</i>	GCGGCACAGTGTATTT <u>CG</u> CTGCAATGGCTG
<i>R3B2-K84E-Fow</i>	GCCATTGCAG <u>AAAA</u> AATACTGTGCCGCTG
<i>R3B2-K84E-Rev</i>	GCGGCACAGTGTATTTTT <u>CT</u> GCAATGGCTG
<i>R3B2-K84Q-Fow</i>	GCCATTGCAG <u>A</u> AAATACTGTGCCGCTG
<i>R3B2-K84Q-Rev</i>	GCGGCACAGTGTATTT <u>CT</u> GCAATGGCTG
<i>R3B2-Mut-Fow2</i>	TGGAG <u>CAGCAGCGG</u> CGGATGCAGAGCAGCAGGCTTTC

<i>R3B2-Mut-Rev2</i>	CATCCG <u>CCGCTGCTGCTCC</u> ATGTCCTTCTGTCTTG
<i>R3B2-N52D-Fow</i>	CAAGTTCGACTACATTGGAGAGTCTGCAGTG
<i>R3B2-N52D-Rev</i>	TCTCCAATGTAGT <u>CGAACT</u> TGTGCTCTGCCACCTC
<i>R3B2-N52E-Fow</i>	CAAGTTCGA <u>A</u> TACATTGGAGAGTCTGCAGTG
<i>R3B2-N52E-Rev</i>	TCTCCAATGTAT <u>T</u> CGAACTTGTGCTCTGCCACCTC
<i>R3B2-R11-NheI</i>	GGGG GCTAGCCGTA <u>CTACT</u> GCAAAACATAGCCTGAG
<i>R3B2-Rev10-NdeI</i>	GGGGG CATATGGGCTATAGCACGCACACAGAAG
<i>R3B2-Rev10-XhoI</i>	GGGGG CTCGAGGCTATAGCACGCACACAGAAG
<i>R3B2-Rev13-NheI</i>	GGGGG GCTAGCTGTA <u>CTCC</u> ATAAACCAATAACAC
<i>R3B2-Rev14-NsiI</i>	AAAAAATGCATCATGTGGCCTCGTCCACGGGCCCTTC
<i>R3B2-Rev14-XhoI</i>	AAAAA <u>CTCGAG</u> TCATGTGGCCTCGTCCACGGGCCCTTC
<i>R3B2-Rev2-NsiI</i>	ACTCATGCATCAGATCAGATTGTTCCAGTTGGTG
<i>R3B2-Rev2-XhoI</i>	GAGAGACTCGAGTCAGATCAGATTGTTCCAGTTGGTGAC
<i>R3B2-Rev5-ferm</i>	TGTATTGAGAGAGAGAGAA <u>ACTA</u> ACTATCCCCACTCCAATC
<i>R3B2-Rev5-NsiI</i>	TGATGATGCATAATTCTAACTATCCCCACTCCAATC
<i>R3B2-Rev5-XhoI</i>	TGATGCTCGAGAAATTCTAACTATCCCCACTCCAATC
<i>R3B2-Rev9</i>	CTAGACGTCTATACAGTCCTG
<i>R3B2-Rev-Del2</i>	CCGGGTAGTTGGTGGCATTGGTGCGTGCCTG
<i>Race-T</i>	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>Rdrp1-Fow1-BspHI</i>	TACGATCATGATGTGCGACTTTGGATTGCGTC
<i>Rdrp1-Fow2-XmaI</i>	TAAGCCC <u>GGG</u> ATATGTGCGACTTTGGATTGCGTC
<i>Rdrp1-Rev1-XmaI</i>	CATGAC <u>CCC</u> GGGTTATTTTTGGCTATAAAATCCGTAG
<i>Rdrp2-Fow1-BamHI</i>	GATCGGGATCCAAATGAGTTACAACAGCAACAGCAAC
<i>Rdrp2-Fow2-XmaI</i>	TAGCCC <u>GGG</u> ATATGAGTTACAACAGCAACAGCAAC
<i>Rdrp2-Rev1-XhoI</i>	CAGTGCTCGAGTCAAGAGAGACCCAAGGTCTTC
<i>Rdrp3-Fow1-BspHI</i>	ACGTCTCATGATGTTCATTATCGTCCATCTC
<i>Rdrp3-Fow2-XmaI</i>	TAAGCCC <u>GGG</u> ATATGTGATTATCGTCCATCTC
<i>Rdrp3-Rev1-XmaI</i>	ATGCA <u>CCC</u> GGGTCACTTTAAATTCAACAAATCTGC
<i>RmR3B2-F1-NdeI</i>	GGGGG CATATGGATGTCGTAATGAGAAGCAG
<i>RmR3B2-R2-SacII</i>	GGGGG CCGCGGCTACTGTTGTTGGTTCGACTGAAG
<i>RnhA-Fow1-BspHI</i>	GATCATCATGATGTTTCATTTGTAGTGCTGGG
<i>RnhA-Fow1-EcoRI</i>	TAACGAATTCATGTTTCATTTGTAGTGCTGGG
<i>RnhA-Rev1-XmaI</i>	CATAT <u>CCC</u> GGTTCATCTAAGAGGGGCACCACA
<i>STU</i>	GTTGTAAAACGACGGCCAGT
<i>T7-GAstair-For</i>	GACTCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG T
<i>T7-GAstair-Rev</i>	TACTAGTCGACGATATCTCTCTCTCTCTCTCATCTCTCTCTCTCTCT CTCTACTCTCTCTCTCTCTCTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCA
<i>T7-mcwc1b-F1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGACACACAAGAATATTCAC
<i>T7-mcwc1b-R1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGCATTGTGGGACGTGGTATG
<i>T7-P1-Fow1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCGAAGGTAAGGTTGCTACTC
<i>T7-P1-Rev1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGACGAGGCATGATGACTTCGATAAAGTG C
<i>T7-pMAT688-Fow1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCTCCACCACAGTGACCTTG
<i>T7-pMAT688-Rev1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATGTCCAAGAAACACATTG

III.3.3. Extensión de oligonucleótidos

La construcción de pequeños fragmentos de DNA *de novo* se realizó mediante la extensión de oligonucleótidos largos que solapaban en su región 3'. El molde para la transcripción de GAstair (Véase IV.1.4) se produjo mediante la extensión de los oligonucleótidos T7-GAstair-For y T7-GAstair-Rev en las siguientes condiciones: desnaturalización de 3 min a 95°C seguida de un descenso de 1°C/s hasta una temperatura de hibridación de 65°C, que se mantuvo durante 30 s, para finalizar con una extensión de 2 min a 72°C.

III.3.4. Aislamiento de DNA de *M. lusitanicus*

El aislamiento de DNA genómico de *M. lusitanicus* se realizó siguiendo el protocolo implementado por Nicolás y colaboradores (Nicolás et al., 2018) con ligeras modificaciones. Brevemente, el extremo derretido de una punta de micropipeta de 1 ml se introdujo en bolas de zirconio/silicio de 0,5 mm (Cat. 11079105z, BioSpec) para que quedasen adheridas e inmediatamente se le dio forma de mortero en el fondo de un tubo de 1,5 ml. El micelio se trituró a temperatura ambiente en el fondo del tubo de 1,5 ml e inmediatamente se añadió 250 µl de solución de lisis. El lisado se centrifugó y se transfirió a un tubo de 2 ml al que se añadió 250 µl de tampón de unión con partículas de sílice. Tras la incubación para permitir la unión del DNA a las partículas, la mezcla se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las partículas de sílice con el DNA unido se resuspendieron en 700 µl de tampón de lavado y se transfirieron a la cámara superior de una punta de 1 ml con filtro, formada tras empujar el filtro 1 cm hacia abajo y cortar el extremo estrecho. Los lavados descritos en el procedimiento se realizaron sobre el filtro de la punta haciendo pasar el líquido con una jeringa. Tras secar las partículas de sílice con el DNA unido, la elución se realizó como se indica, pero añadiendo 30 µl de tampón de elución sobre el filtro con las partículas y centrifugando la punta en un tubo de 1,5 ml durante 1 min a 13000 r.p.m.

III.3.5. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento del DNA plasmídico para la obtención de fragmentos de DNA, digestión, ligación y análisis de clones se realizó mediante el procedimiento rápido de hervido (Holmes & Quigley, 1981). Cuando se necesitó mayor pureza para la secuenciación de los fragmentos clonados en los plásmidos o la preparación de moldes para la transcripción *in vitro* se utilizó el kit de purificación GenJET Plasmid miniprep (Cat. K0503, Thermo Scientific).

III.3.6. Tratamiento del DNA con enzimas

Los tratamientos enzimáticos más habituales de los fragmentos de DNA lineales o de los plásmidos fueron:

- Digestión con enzimas de restricción (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del suministrador.
- Desfosforilación de los extremos 5' de las cadenas de DNA con la enzima fosfatasa alcalina (Cat. EF0651, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del suministrador, para reducir la tasa de autoligación en los ensayos de ligación.
- Ligación de fragmentos de DNA con T4 DNA ligasa (Cat. EL0011, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del suministrador. La ligación se realizó en un volumen total de 20 µl a partir de fragmentos de DNA donde las enzimas de los tratamientos previos habían sido inactivadas térmicamente o retiradas mediante la purificación del DNA en gel con el kit GeneJET Gel extraction (Cat. K0691, Thermo Scientific). La cantidad de vector plasmídico digerido utilizado en las ligaciones fue 50-100 ng, ajustando la cantidad de inserto necesario para alcanzar una relación molar vector: inserto de 1:1.

III.3.7. Técnicas electroforéticas para el DNA

La caracterización de plásmidos, la separación de fragmentos de distinto tamaño derivados del tratamiento de plásmidos con enzimas de restricción, la comprobación de los productos de PCR, la purificación de fragmentos de DNA y su cuantificación se realizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa D1 (Cat. 8010, Condalab), usando 1x TAE (40 mM Tris; 20 mM Ácido acético; 1mM EDTA; pH 8,3) y una concentración de agarosa entre 0,7 % y 2 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para la visualización de los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta, se añadió Bromuro de Etidio al gel de agarosa a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Para la purificación de fragmentos de DNA tras su separación en geles de agarosa, las porciones de gel que contenían el fragmento de interés se recortaron y se purificaron con el kit GeneJET Gel extraction (Cat. K0691, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.4. Manipulación de RNA

III.4.1. Aislamiento de RNA total

El aislamiento de RNA de *M. lusitanicus*, *R. microsporus* o *L. corymbifera* se realizó a partir de 100 mg de micelio utilizando reactivos libres de RNasas. El micelio triturado en Nitrógeno líquido se transfirió a un tubo cónico tipo Falcon de 50 ml con el tapón perforado y una vez evaporado el Nitrógeno se añadió 1,5 ml de Trizol (Cat. 15596026, Invitrogen). El micelio se resuspendió con vórtex y la mezcla se transfirió a un tubo de 2 ml frío. La mezcla se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 r.p.m., y el sobrenadante se incubó en un nuevo tubo durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió 300 µl de Cloroformo y se agitó con vórtex durante 15 s. La mezcla

se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 4°C durante 15 min a 10000 r.p.m., para permitir la separación de las fases orgánica y acuosa. Esta última fase se recuperó y se pasó a un tubo de 1,5 ml, evitando arrastrar restos de la interfase, y se procedió a su precipitación alcohólica. La fase acuosa se mezcló por inversión con 1 volumen ($\approx 750 \mu\text{l}$) de isopropanol frío y se incubó al menos 15 min a -20°C para permitir la precipitación del RNA. Tras la incubación, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El precipitado formado se lavó con 1,5 ml de 70% Etanol y se centrifugó en las mismas condiciones durante 5 min. El sobrenadante se eliminó concienzudamente en su totalidad y el RNA se resuspendió en agua de biología molecular calentándolo hasta la completa disolución del precipitado a 65°C. Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación de RNA se realizó mediante espectrofotometría considerando que cada unidad de $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$ equivale a 40 μg de RNA. La determinación de las ratios de absorbancia $A_{260}/A_{280 \text{ nm}}$ y $A_{260}/A_{230 \text{ nm}}$ se utilizó como referencia de la calidad de las muestras de RNA obtenidas. La integridad de las muestras se determinó mediante la observación de los rRNA en geles de agarosa horizontales al 1,2 % sometidos a electroforesis en 1xTAE.

III.4.2. Síntesis de ssRNA y dsRNA marcado radiactivamente

La síntesis de RNA *in vitro* se realizó a partir de moldes de DNA lineales que contenían el promotor mínimo de la polimerasa de RNA del fago T7. Estos moldes se produjeron mediante la introducción del promotor en los oligonucleótidos utilizados para amplificar el molde o linealizando plásmidos con el molde clonado a continuación. En ambos casos, los moldes fueron purificados en geles de agarosa preparados en condiciones libres de RNasas, utilizando un kit de purificación (Véase III.3.6) reservado para este fin y material libre de RNasas. La Tabla 8 contiene todas las moléculas de RNA utilizadas en este trabajo y sus moldes de procedencia.

Los moldes que transcribían la hebra con sentido de cada uno de los genes se obtuvieron por amplificación por PCR con los oligonucleótidos T7-pMAT688-Fow1 y pMAT688-Rev1 para el fragmento derivado de *carB*, los oligonucleótidos T7-P1-Fow1 y P1-Reverse para el fragmento derivado de *P1* y los oligonucleótidos T7-mcwc1b-F1 y 1bc3 para el fragmento derivado de *mcwc-1b*. Los moldes que transcribían la hebra antisentido se obtuvieron por PCR utilizando los oligonucleótidos T7-pMAT688-Rev1 y pMAT688-Fow1 para el fragmento derivado de *carB*, los oligonucleótidos T7-P1-Rev1 y P1-Fow1 para el fragmento derivado de *P1*, y los oligonucleótidos T7-mcwc1b-R1 y Mcwc1b-F1 para el fragmento derivado de *mcwc-1b*. El molde de PCR para el ssRNA del gen *carB* se amplificó a partir del plásmido pMAT688 utilizando los oligonucleótidos STU y pMAT688-Rev1, mientras que para el dsRNA se añadió a este molde el amplificado a partir del plásmido pMAT679 con los oligonucleótidos STU y pMAT679-Rev1. Como molde para el ssRNA del gen *seq15* se utilizó el plásmido pMAT2013 linealizado con NsiI.

La transcripción de RNA *in vitro* se realizó utilizando el kit de transcripción MAXIscript T7 (Cat. AM1312, Invitrogen) sustituyendo el UTP por [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP de alta actividad específica (Cat. NEG507H250UC, PerkinElmer). Para la síntesis de ssRNA, se mezclaron 3 μl de 5x tampón de reacción de T7, 0,75 μl de 10 mM ATP, GTP y CTP, 0,5 μl de SUPERase-In (Cat. AM2694, Invitrogen) y 200-500 ng de DNA molde. Para la síntesis del dsRNA, se mezcló 5 μl de 5x tampón de reacción de T7, 1,25 μl de 10 mM ATP, GTP y CTP cada uno, 1 μl de SUPERase-In y 200-500 ng de cada DNA molde. Una vez realizadas las mezclas, se depositó 1 o 2 μl de polimerasa T7 en la pared del tubo, y se empujó hasta el fondo con 2,5 o 5 μl de ^{32}P -UTP para obtener un volumen total de 15 o 25 μl , respectivamente. Las reacciones de transcripción se incubaron durante 10 min a 37°C y, a continuación, se añadió 1 o 2 μl de Turbo DNase a la preparación de ssRNA y dsRNA, respectivamente, para degradar el molde de DNA. Las reacciones se incubaron 15 min a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 25 μl de H₂O de biología molecular.

Para retirar las sales de la transcripción y los nucleótidos libres, las reacciones se sometieron a cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna preparada con Sephadex G50-Fine (Cat. GE17-0042-01, Cytiva). La preparación de la columna se realizó con el Sephadex hidratado durante toda la noche en H₂O de biología molecular. Para el montaje de la columna, se perforó con una aguja el fondo de un tubo de 0,6 ml y se depositó 1 cm² de gasa estéril en el fondo. A continuación, el tubo se llenó con Sephadex hidratado y se introdujo en un tubo de 2 ml. La columna se centrifugó 2 min a 2000 r.p.m. para retirar el exceso de agua y se depositó en un tubo de 1,5 ml. La reacción de transcripción se depositó sobre esta columna y se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente descritas.

La retirada de las cadenas no hibridadas y los extremos protuberantes de ssRNA en las preparaciones de dsRNA se realizó mediante incubación con RNasas específicas de ssRNA. Para ello, a 40 μl del eluido de la transcripción de dsRNA se le añadieron 150 μl de 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 4 μl de RNase A/T1 mix (Cat. EN0551, Thermo Scientific), y la mezcla se incubó durante 30 min a 37°C.

La retirada de las proteínas de ambos tipos de reacciones se realizó mediante una extracción con trizol-cloroformo. Para ello, las mezclas de reacción se trataron con 750 μl de TRIzol reagent (Cat. 15596026, Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La precipitación del RNA contenido en la fase acuosa se realizó con 1 volumen de isopropanol y 52,5 μg de *coprecipitante Glycoblue* (Cat. AM9515, Invitrogen). El RNA se resuspendió en H₂O de biología molecular y se cuantificó mediante la medición directa de las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo (Hidex 300 SL).

Tabla 8. Moléculas de RNA sintetizadas en este trabajo, obtención del molde y características más relevantes.

Nombre	Molde	Características
<i>carB103 ssRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-pMAT688-Fow1 y pMAT688-Rev1 a partir del gen <i>carB</i> .	Fragmento de ssRNA natural de 103 nt que presenta una estructura mixta.
<i>carB100 dsRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-pMAT688-Rev1 y pMAT688-Fow1 a partir del gen <i>carB</i> , mezclado con el molde utilizado en <i>carB103</i> ssRNA.	Fragmento de dsRNA natural de 100 pb que presenta una estructura lineal.
<i>PI103 ssRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-P1-Fow1 y P1-reverse a partir del gen <i>PI</i> .	Fragmento de ssRNA natural de 103 nt que presenta una estructura mixta.
<i>PI100 dsRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-P1-Rev1 y P1-Fow1 a partir del gen <i>PI</i> , mezclado con el molde utilizado en <i>PI103</i> ssRNA.	Fragmento de dsRNA natural de 100 pb que presenta una estructura lineal.
<i>wc1b103 ssRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-mcwc1b-F1 y 1bc3 a partir del gen <i>mcwc-1b</i> .	Fragmento de ssRNA natural de 103 nt que presenta una estructura mixta.
<i>wc1b100 dsRNA</i>	Fragmento de 120 pb amplificado con los oligonucleótidos T7-mcwc1b-R1 y mcwc1b-F1 a partir del gen <i>mcwc-1b</i> , mezclado con el molde utilizado en <i>wc1b103</i> ssRNA.	Fragmento de dsRNA natural de 100 pb que presenta una estructura lineal.
<i>GAstair</i>	Plásmido pMAT2304 linealizado con EcoRV.	Fragmento sintético de ssRNA de 103 nt formado por repeticiones GA con 5 U intercalados diseñado para presentar una estructura lineal.
<i>carB ssRNA</i>	Fragmento de 606 pb amplificado con los oligonucleótidos STU y pMAT688-Rev1 a partir de pMAT688.	Fragmento de ssRNA natural de 563 nt que presenta una estructura mixta.
<i>carB dsRNA</i>	Fragmento de 662 pb amplificado con los oligonucleótidos STU y pMAT679-Rev1 a partir del plásmido pMAT679, mezclado con el molde utilizado en <i>carB</i> ssRNA.	Fragmento de dsRNA natural de 535 pb que presenta una estructura lineal.
<i>Seq15 ssRNA</i>	Plásmido pMAT2013 linealizado con NsiI.	Fragmento de ssRNA natural de 605 nt que presenta una estructura mixta.

III.4.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA para RT-qPCR se realizó sobre RNA tratado con DNasa. El tratamiento con DNasa Turbo (Cat. AM2238, Invitrogen) se realizó sobre 5 µg de RNA total en un volumen de 25 µl de reacción que contenía 1x tampón de DNasa Turbo, 10 U de SUPERase·In RNase Inhibitor (Cat. AM2694, Invitrogen) y 4 U de DNasa Turbo. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C. Para la inactivación de la DNasa, la temperatura se bajó a 4°C y se añadió 7,5 µl de 50 mM EDTA, incubándose durante 10 min a 75°C.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA tratado con DNasa utilizando el kit iScript cDNA synthesis (Cat. 1708890, Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones del suministrador. Para evitar la interferencia del EDTA añadido en el paso

anterior, las reacciones de retrotranscripción se suplementaron con una concentración final de 2,5 mM MgCl₂.

La presencia de cDNA se comprobó mediante una reacción de PCR convencional para amplificar un cDNA específico, utilizando la mezcla comercial PCR Megamix (Cat. 2MM-5, Microzone). Las reacciones de PCR contenían 9,3 µl de PCR Megamix, que incluía la enzima, 0,5 µ de oligonucleótidos (10 mM cada uno) y 0,2 µl de cDNA. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C seguida de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 s a 95°C, alineamiento y extensión de 1 min a 60°C. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 9.

III.4.4. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó por triplicado para cada muestra biológica utilizando el sistema QuantStudio TM5 flex (Applied Biosystems). Para asegurar la ausencia de amplificación inespecífica se incluyeron controles sin molde para cada pareja de oligonucleótidos y se determinó la curva de fusión. La Tabla 9 muestra los oligonucleótidos utilizados, el tamaño de su producto de amplificación, la eficiencia obtenida y la dilución de cDNA más adecuada para la amplificación, determinada empíricamente. Las condiciones de reacción fueron: 1x SYBR *green* PCR *master mix* (Cat. 4309155, Applied Biosystems), 300 mM de cada oligonucleótido y 2,5 µl de cDNA diluido, todo en un volumen total de 10 µl. Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo de 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La curva de fusión se determinó incluyendo un ciclo final de 90°C durante 15s, 60°C durante 1 min y una rampa a razón de 0,1°C/s hasta los 95°C durante 5 s.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Producto (pb)	Eficiencia (%)	cDNA *
<i>qPCR-P1-Fa</i>	TGTGGCAATACAGCAAGACC	108	100,7	10
<i>qPCR-P1-Ra</i>	CGAATTCGTCACGAGTAGCA			
<i>qPCR-P2-Fa</i>	ATCGTGCTGTTCATGCCTCA	177	98,6	10
<i>qPCR-P2-Ra</i>	ACCACCAACCTTCATCCACT			
<i>qPCR-P3-Fa</i>	AGCAACCTGAAGATGCCAGT	161	102,7	10
<i>qPCR-P3-Ra</i>	CAACATGGCAATGACCAAAG			
<i>qPCR-EF1-Fow</i>	GTCCGTGATATGCGTCAAACC	87	104,5	5, 10
<i>qPCR-EF1-Rev</i>	AGCGGCCTTGGTGACCTTAC			
<i>R3B2-qPCR-Fow4</i>	AACCAAGCCGACAATCCAGT	116	99,5	5
<i>R3B2-qPCR-Rev4</i>	GCCACAATCTTGACCTCCCA			
<i>18SRNAF</i>	CCGACTAGAGATTGGGCTTG	184	103	5, 10
<i>18SRNAR</i>	TCTGGACCTGGTGAGTTTCC			
<i>Rvt</i>	GCTCTAATCAACTGGCTATGGC	101	100	5, 10
<i>Rvt</i>	ATGAGCAGGTGAGGAGCATC			

* Dilución del cDNA más adecuada en relación a la expresión del gen que amplifica la pareja de oligonucleótidos determinada empíricamente.

Dado que las eficiencias de las diferentes parejas de cebadores fueron muy parecidas, la expresión génica relativa se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_t$,

normalizando los valores de Ct a partir de los controles endógenos *18S* (Pérez-Arques et al., 2019) o *ef-1* (Valle-Maldonado et al., 2015).

III.5. Manipulación de proteínas

III.5.1. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida desnaturizantes de 1 mm en el sistema Mini-protean® 3 Cell (Bio-Rad) o el sistema XCell SureLock™ Novex Mini-Cell (Invitrogen), para geles preparados manualmente o comerciales, respectivamente. Para la preparación manual de los geles de poliacrilamida, se añadió la cantidad correspondiente de 25% persulfato de amonio (APS) y N,N,NN-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Tabla 10) a la mezcla del gel separador inmediatamente antes de verterlo entre ambos cristales. Seguidamente, se depositó cuidadosamente una capa de agua destilada sobre el gel. Una vez que el gel había polimerizado, se retiró el agua y se repitió el procedimiento con la mezcla del gel condensador, seguida de la introducción del peine. La Tabla 10 muestra las cantidades necesarias para la preparación manual del gel separador y condensador utilizados en función del porcentaje de acrilamida.

Tabla 10. Mezclas para la preparación manual de geles de SDS-PAGE.

% de acrilamida	Gel separador			Gel condensador
	7%	10%	15%	6%
3 M Tris pH 8,85	1,5 ml			-
0,5 M Tris pH 6,8	-			0,75 ml
30 % solución de acrilamida – bis-acrilamida (37,5:1)	2,08 ml	2,1 ml	3 ml	0,6 ml
H ₂ O	3,92 ml	2,4 ml	1,5 ml	1,65 ml
10% SDS	60 µl			30 µl
25% APS	48 µl			24 µl
TEMED	6 µl			6 µl

Las muestras analizadas mediante geles comerciales se prepararon y sometieron a electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante para electroforesis desnaturizante. Las muestras analizadas en geles preparados de forma manual se trataron añadiéndole la cantidad correspondiente de 5x Tampón de carga de proteínas (300 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% glicerol; 0,5% azul de bromofenol; 25 % β-mercaptoetanol) e incubando 10 min a 100°C. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (50 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 0,1 % SDS; pH 8,3) entre 45-60 min a 200 V.

Para la visualización de las proteínas tras la electroforesis, los geles se tiñeron durante 30 min sumergiéndolos en una solución Coomassie (0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% metanol; 10% ácido acético; 40% agua bidestilada), seguidos de dos

lavados de 30 minutos en solución de desteñido (30% metanol; 10% ácido acético; 60% agua bidestilada).

III.5.2. Expresión de proteínas recombinantes

La expresión de proteínas recombinantes se realizó a partir de colonias de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* recién transformadas con el plásmido de expresión correspondiente (Figura 15). El procedimiento comenzó con la preparación de un cultivo iniciador en LB líquido (con el antibiótico necesario) crecido durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. A continuación, se realizó una dilución 1:25 del cultivo iniciador con un volumen total de 250 ml de LB con el mismo antibiótico y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD₆₀₀ comprendida entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada esa OD₆₀₀, se tomaron alícuotas del cultivo, que sirvieron como referencia, y se indujo la expresión de proteína recombinante mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM.

El cultivo inducido se incubó en las condiciones óptimas (tiempo y temperatura) para la expresión de la proteína de interés a 250 rpm, y a continuación se enfrió en hielo durante 5 minutos. Una vez frío, se tomaron alícuotas para su posterior análisis y se repartió en tubos cónicos tipo Falcon de 50 ml que se centrifugaron a 4°C durante 15 min y 3000 xg, para desechar el sobrenadante. Los pellets celulares y las alícuotas recolectadas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

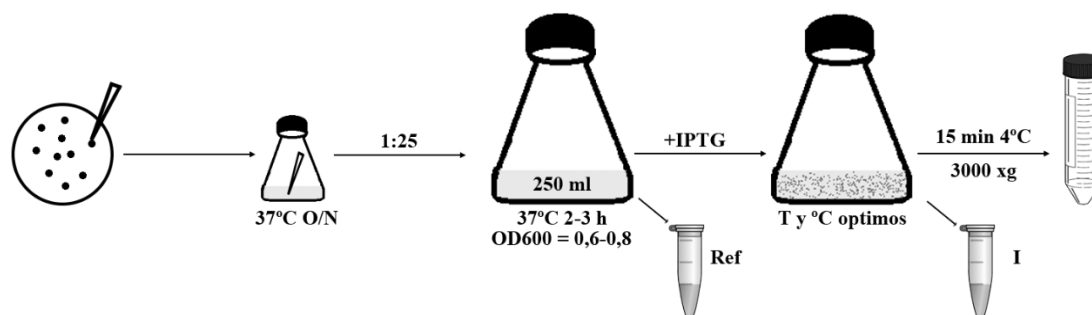


Figura 15. Representación gráfica del protocolo de expresión de proteínas recombinantes.

El protocolo comienza con la inoculación del cultivo iniciador a partir de una colonia de *E. coli* recientemente transformada (izq.). Tras la dilución del cultivo iniciador y una vez alcanzada la OD₆₀₀ se toma una alícuota de referencia (Ref) y se procede a la inducción mediante la adición de IPTG (cen.). Tras la incubación en las condiciones óptimas de tiempo (T) y temperatura (°C) se procede a tomar una alícuota del cultivo inducido (I) y se almacena el pellet celular tras centrifugar (der.).

III.5.3. Purificación de proteínas recombinantes mediante matrices de Ni-NTA

La purificación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se realizó mediante una resina de agarosa cargada con níquel (Ni-NTA) que presentan afinidad por las etiquetas de 6xHis, en este caso, fusionadas al extremo N-terminal de las proteínas. El protocolo de purificación se realizó con todos los tampones en frío y preparados con utensilios limpiados concienzudamente para minimizar la presencia de RNasas contaminantes. Se comenzó resuspendiendo con micropipeta el precipitado celular

almacenado a -80°C en 1 ml de tampón inicial (*Starting buffer* o STB) (50 mM Na_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 1 mM DTT; pH 8.0) por cada 10 ml de cultivo inducido. Se añadieron los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y benzamidina a una concentración final de 1 mM cada uno. A continuación, se lisaron las células en hielo con un sonicador automático Labsonic U (B. Braun), equipado con una punta 40T (Cat. 853811/5), mediante 6 pulsos de sonicación de 15 s con descansos de 30 s. Una vez obtenido el lisado, se precipitaron los restos celulares y proteínas insolubles centrifugando a 10000 xg durante 30 min a 4°C .

Para el equilibrado de la matriz de Ni-NTA (Cat. 30210, Quiagen) se depositaron 0,5 ml de resina concienzudamente resuspendida y 5 ml de STB en un tubo de 15 ml, realizándose dos lavados con STB. Para los lavados, se mezcló el STB con la matriz y a continuación se centrifugó durante 5 min a 700 xg en una centrífuga de rotor oscilante para finalmente desechar el sobrenadante con una pipeta. El sobrenadante del lisado conteniendo las proteínas solubles se transfirió al tubo con la matriz de Ni-NTA equilibrada y se incubó durante 1 h a 4°C en un agitador de noria para permitir la unión de la proteína. A continuación, se realizaron 3 lavados con 10 ml de STB y 3 lavados con STB al 5% de tampón de elución (*Elution buffer* o EB) (50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 1 mM DTT; 250 mM Imidazol; pH 8,0) dejando un volumen de 1 ml tras el último lavado. Se resuspendió la matriz Ni-NTA con la proteína unida en el volumen dejado de STB al 5% de EB y se transfirió a un tubo de 2 ml RNasa free. Se centrifugó a 4°C durante 1 min a 7000 xg y se desecharon cuidadosamente los restos del lavado.

La elución de la proteína recombinante se realizó mediante lavados con concentraciones crecientes de EB y centrifugaciones a 4°C durante 1 min a 7000 xg para recuperar el sobrenadante. En primer lugar, se realizaron 2 eluciones con 1 ml de STB al 20% de EB, donde suelen aparecer la mayoría de las proteínas con unión inespecífica a la columna. A continuación, se realizaron lavados con 1 ml STB al 40, 60, 80 y 100% de EB. Las alícuotas tomadas en cada punto del proceso se analizaron mediante SDS-PAGE y una vez determinadas las condiciones de elución más adecuadas, se estimó la presencia de la proteína recombinante mediante la medición de la $A_{280\text{ nm}}$.

Los eluidos que contenían la proteína purificada se sometieron a diálisis para retirar el imidazol antes de su congelación. Para ello, se cortó un cilindro de membrana de diálisis (Cat. 44145.01, Serva) del tamaño adecuado y se hirvió en agua bidestilada estéril para retirar los restos de metales pesados. El cilindro se pinzó en uno de sus extremos y se introdujo una pipeta de vidrio de 5 ml por el otro. Con una micropipeta se depositó el eluido por el extremo de la pipeta de vidrio y una vez dentro, se retiró la pipeta y se pinzó el extremo dejando una burbuja de aire en su interior para permitir su flotabilidad. El cilindro se introdujo en un recipiente adecuado con 200 ml de tampón de diálisis 8 (20 mM Tris-HCl; 1 mM DTT; 10% Glicerol; 1 mM EDTA; pH 8,0) y se incubó con agitación suave durante 2 h a 4°C . Se repitió la diálisis con otros 200 ml de tampón de diálisis 8 y finalmente, la solución con la proteína se dividió en alícuotas que se almacenaron a -80°C .

La cuantificación de las proteínas purificadas se realizó mediante un ensayo Bradford (Cat. 5000006, Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del suministrador.

Cuando fue necesario, el proceso de purificación a partir de 25 ml de cultivo inducido se adaptó para liberar las proteínas unidas a la matriz Ni-NTA mediante la digestión con Trombina. Una vez lavada la matriz con STB al 5% de EB, se realizó un lavado adicional con 10 ml de STB y se resuspendió la matriz con las proteínas unidas en 2,5 ml de STB. La matriz se trató con 10 U de Trombina (Cat. T4648, Sigma) y se incubó a temperatura ambiente con agitación en noria durante 20 h. Se tomaron alícuotas tras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 20 h del sobrenadante tras una breve centrifugación para visualizar la cantidad de proteína eluida. Además, se tomaron alícuotas a las 4, 5, 6 y 20 h sin centrifugar y se lavaron 2 veces con 50 volúmenes de STB para comprobar la proteína que seguía unida a la matriz (Figura 19C y 19D). Tras las 20 h, la reacción de digestión se centrifugó 5 min a 700 xg y se transfirió el sobrenadante a un tubo con 50 µl de matriz Benzamidina-sefarosa (Cat. GE17-5123-10, Cytiva), equilibrada mediante 2 lavados de 1,5 ml de STB, para retirar la Trombina incubando 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, la preparación se centrifugó 5 min a 7000 r.p.m. y el sobrenadante con la proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE.

III.5.4. Proteólisis limitada e identificación de fragmentos de R3B2

Para la proteólisis limitada, 50 µg de proteína purificada en 550 µl de tampón de reacción (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM β-mercaptoetanol) se digirieron con Subtilisina Carlsberg (Sigma-Aldrich) a 30°C (1:125 w/w proteasa:proteína) (2,8-6 U de proteasa). Se retiraron muestras de 15 µl a tiempo 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 min a las que se añadió benzamidina a una concentración final de 66 mM para detener la proteólisis. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE para analizar la degradación e identificar los fragmentos resistentes a la misma.

La determinación del peso molecular exacto de los fragmentos resistentes a subtilisina se analizó en una digestión a 30 min, sin centrifugar, que se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm y se sometió a espectrometría de masas en el servicio de biología molecular de la Universidad de Murcia (ACTI), utilizando un HPLC Agilent Serie 1100 equipado con una columna Supelco Discovery BioWide C5 (5 µm, 100 x 2,1 mm), acoplado a un espectrómetro de masas TOF Agilent 6100 con interfaz de electrospray (ESI).

Para la secuenciación N-terminal, una digestión completa a 30 min se sometió a SDS-PAGE y se transfirió a una membrana Immobilon PSQ (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se tiñó la membrana con Coomassie y se recortó cada una de las bandas. La secuenciación N-terminal de los fragmentos recortados se llevó a cabo en el Centro para la Investigación Biológica Margarita Salas (CIB-CSIC).

El análisis de huella peptídica de los fragmentos resistentes a subtilisina se realizó sometiendo a SDS-PAGE las digestiones que presentaban mayor cantidad de cada fragmento y tras la tinción con Coomassie se recortó cada una de las bandas. El análisis de huella peptídica se realizó en el servicio de biología molecular de la Universidad de Murcia (ACTI).

III.6. Retraso en gel (EMSA)

Las reacciones de unión entre las proteínas y los RNA marcados radiactivamente se realizaron en un volumen total de 10 μ l conteniendo 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 0,1 mM EDTA. Para evitar la adhesión de las moléculas de RNA a los tubos se añadió 0,01 mg/ml de BSA y se utilizaron tubos antiadherentes (Cat. EP0030108051, Eppendorf) cuando se indica. Tras incubar 30 min a temperatura ambiente, se añadieron 2 μ l de 5x tampón de carga EMSA (TCE) (5 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 25% (v/v) glicerol, 0,0005 % (w/v) azul de bromofenol, 0,0005% (w/v) xileno cianol) y se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta. Las muestras se cargaron en el fondo de los pocillos de un gel nativo 4% PAGE en 0,5x Tris-Borato-EDTA (TBE) (Cat. T4415, Sigma), pre-corrido durante 30 min a 200V para retirar los restos de APS y se sometieron a electroforesis durante 60 min a 200 V.

La preparación del gel 4% PAGE requirió al menos 16 h para una polimerización completa, por lo que tuvo que sellarse adecuadamente el soporte para impedir cualquier fuga de líquido. Una vez montado el soporte para la preparación de geles del sistema Protean II xi Cell (Bio-Rad), se retiró el casete y se vertió agarosa al 0,7% fundida entre ambos cristales a la altura de los espaciadores. Para evitar pérdidas de tampón de electroforesis de la cámara superior, se sellaron con la misma agarosa los recovecos superiores e inferiores de las pinzas. Una vez solidificada la agarosa entre los cristales, se procedió a su retirada mediante un movimiento seco hacia abajo. Para la preparación del gel se mezcló 32,7 ml de agua bidestilada, 5,3 ml de solución de acrilamida – bis-acrilamida (37,5:1) (Cat. EC8901LTR, National Diagnostics) y 2 ml de 10x TBE (Cat. T4415, Sigma). Inmediatamente antes de verter la solución entre ambos cristales se añadió 106 μ l de 25 % APS recién preparado y 20 μ l de TEMED. Los geles se dejaron polimerizar durante toda la noche a temperatura ambiente tapados con film transparente para evitar su desecación.

III.7. Ensayos de actividad RNasa *in vitro*

Los ensayos de actividad RNasa se realizaron incubando RNA marcados radiactivamente (Véase III.4.2) y las proteínas purificadas en un volumen total de 10 μ l conteniendo 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 0,1 mM EDTA. La incubación se realizó a 30°C durante toda la noche, en un termociclador Mastercycler personal 5332 (Cat. Z316091, Eppendorf) con la tapa ajustada a 45°C. Tras la incubación, se añadió 10 μ l de mezcla de parada (95% formamida; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,1% azul de bromofenol; 0,1% xileno cianol) y se desnaturalizaron las muestras al

menos 10 min a 65°C. La electroforesis se realizó en un gel desnaturalizante 16% PAGE y 7M Urea en 0,5x TBE a 300V entre 75 y 200 min.

El montaje y sellado del soporte para la preparación del gel se realizó como se ha descrito anteriormente (Véase III.6). Para la preparación del gel se mezcló 16,8 g de Urea con 10 ml de agua bidestilada caliente, 2 ml de 10x TBE y 16 ml de solución de acrilamida – bis-acrilamida (19:1) (Cat. EC8501LTR, National Diagnostics). La solución se dejó enfriar a 4°C e inmediatamente antes de verterla entre ambos cristales se añadieron 320 µl de 10 % APS recién preparado y 42,6 µl de TEMED. Tras la polimerización, se retiró rápidamente el peine con el soporte boca abajo y se retiraron los restos no polimerizados de los pocillos por capilaridad.

III.8. Infección de *Galleria mellonella* y determinación de supervivencia

El protocolo de infección de *G. mellonella* se realizó siguiendo las indicaciones de Binder y colaboradores (Ulrike Binder et al., 2016) y Maurer y colaboradores (Maurer et al., 2019) con ligeras modificaciones. Las esporas para las infecciones de *G. mellonella* se recolectaron en solución de esporas (0,9% NaCl; 0,01% Tween20) y se pasaron por un filtro de 40 µm (Cat. SKU 43-50040-51, pluriSelect) para eliminar restos de micelio. Las esporas filtradas se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 5 min y el pellet formado se resuspendió en 10 ml de IPS (150 mM NaCl; 5 mM KCl; 130 mM Tris-HCl; 13 mM EDTA; 18 mM Citrato de Sodio; pH 6,9) para su lavado. El lavado se repitió dos veces y el pellet de esporas se resuspendió finalmente en 0,5 ml de IPS al 10% de glicerol. Antes de su congelación a -20°C, las esporas se contaron y se prepararon alícuotas a 10⁸ esp/ml.

La infección se realizó en larvas de *G. mellonella* en el sexto estadio con un peso de 0,2-0,4 g. Cada larva se inoculó a través de su última propata con un volumen de 20 µl, utilizando una jeringa de insulina BD Micro-fine+ Demi de 0,3 ml y aguja de 8 mm (Cat. 324826, BD). Las larvas que tras la inyección liberaron hemocele a través de su propata fueron descartadas. Las infecciones se realizaron en grupos de 10 larvas infectadas con la misma jeringa, que fue desinfectada con etanol entre larva y larva. En cada ensayo de infección se incluyó un control de larvas no manipuladas y un control en el que se inyectó solo IPS para asegurar la calidad de las larvas y que la manipulación era correcta.

Las larvas infectadas se depositaron en una placa Petri con un papel de filtro en el fondo e incubaron a 30°C durante 6 días y su viabilidad fue analizada a diario. Para comprobar la viabilidad de las larvas, cada día se comprobaba la capacidad de movimiento de estas estimulándolas suavemente con unas pinzas planas. Las larvas que tras la estimulación no mostraron signos de movimiento fueron retiradas y contadas como inviábiles. La tasa de supervivencia de los ensayos de infección fue determinada mediante

un test de Mantel-Cox (log-rank) en relación a la estirpe virulenta, utilizado el software GraphPad Prism (Versión 6.01).

III.9. Análisis bioinformático

III.9.1. Predicción de la estructura de proteínas

La predicción de la estructura de las proteínas analizadas en este trabajo se realizó utilizando el algoritmo Alphafold2 (Jumper et al., 2021), implementado de forma libre a través del pipeline ColabFold (Mirdita et al., 2022). Para cada una de las predicciones, ColabFold se ejecutó en su configuración por defecto, donde el alineamiento de secuencias múltiple se realizó con MMseqs2 (Mirdita et al., 2019). Debido a las limitaciones del algoritmo, las proteínas o complejos mayores de 1000 aminoácidos fueron divididas y las predicciones de sus regiones se alinearon sobre proteínas homólogas disponibles en el Protein Data Bank (PDB) para generar un modelo completo mediante ChimeraX (Pettersen et al., 2021).

III.9.2. Análisis de los resultados de la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq)

Los datos brutos de RNA-seq utilizados para analizar la distribución de tamaños de los sRNA y la expresión relativa de los Grem-LINE1 en varias estirpes mutantes de la ruta de RNAi y en algunos epimutantes se obtuvieron de estudios previos (Véase III.9.3). La calidad de las lecturas de sRNA se comprobó utilizando FASTQC v0.11.9 antes y después de la eliminación de los adaptadores y otras secuencias contaminantes con Trim Galore! v0.6.7. Las lecturas con un valor de calidad Phred (Q) ≤ 20 o una longitud total ≤ 12 nt se excluyeron del análisis. Las secuencias de los adaptadores que solapaban ≥ 2 nt se eliminaron de las lecturas con una tasa de error máximo de 0,2. Las lecturas procesadas se alinearon con el genoma de *M. lusitanicus* MU402 v1.0 (Véase III.9.3) mediante el alineador Burrows-Wheeler (BWA) v0.7.17 (Li & Durbin, 2009). Las lecturas de sRNA alineadas se separaron de su mapa de alineamiento binario (BAM) con SAMtools v1.13 (H. Li et al., 2009) y se agruparon en aquellas que pertenecían a loci de genes anotados de MU402, que se corresponden mayoritariamente con genes codificantes de proteínas, y el resto del genoma, que pertenecían a regiones intergénicas, genes de RNA no codificante, elementos transponibles (*transposable element* o TE), incluidos los Grem-LINE1, y genes no anotados. Las lecturas de sRNA alineadas con genes codificantes de proteínas o con Grem-LINE1 se separaron en aquellas que pertenecían a la cadena con sentido o antisentido respecto a sus transcritos, filtrando su BAM respecto a su campo FLAG (0 para las lecturas con sentido, 16 para las lecturas antisentido y 4 para las no alineadas con el catálogo de genes que representan el resto del genoma). La distribución de tamaño de los sRNA se extrajo de los informes FASTQC de los archivos fastq obtenidos con SAMtools a partir de las lecturas separadas y se normalizó respecto al número de lecturas mapeadas en lecturas por millón (LPM). Para el cálculo del Logo de las secuencias, las lecturas de los sRNA del mismo tamaño se separaron de su

correspondiente BAM y se analizaron con Weblogo v3.5.0 (Crooks et al., 2004). Debido a los diferentes métodos de preparación de las genotecas de secuenciación de los sRNA solo se consideraron en el análisis los de 20-25 nt.

Los datos brutos de mRNA se procesaron como se ha descrito anteriormente (Pérez-Arques et al., 2020) y las lecturas se alinearon con el mismo genoma utilizando HISAT v2.2.1 (Kim et al., 2019). Los archivos BAM obtenidos se utilizaron para crear matrices de cuentas individuales con HTSeq v0.9.1 (Anders et al., 2015) y la correlación de los valores de expresión de los Grem-LINE1 (como log₂FC de las LPM) en relación a la estirpe silvestre se examinó mediante gráficos heatmap.

III.9.3. Disponibilidad de datos

Los identificadores de los genes están referidos al genoma de *M. lusitanicus* v2.0 (Corrochano et al., 2016), disponible en <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>. El ensamblado de *M. lusitanicus* MU402 v1.0 (Navarro-Mendoza et al., 2019) y el catálogo de transcritos está disponible en https://mycocosm.jgi.doe.gov/Muccir1_3/Muccir1_3.info.html. La anotación de los Grem-LINE1 se recuperó del trabajo realizado por Navarro-Mendoza et al. (2019). Los datos brutos de sRNA analizados en esta tesis procedentes de transcriptómicas a las 24 h de crecimiento en medio sólido YPG de la estirpe silvestre y *r3b2Δ* (tres réplicas de cada una) fueron amablemente cedidas por Ghizlane Tahiri (Universidad de Murcia), mientras que el resto se recuperaron del archivo de lecturas de secuenciación (*Sequence Read Archive* o SRA) bajo los identificadores SRR039123 (Silvestre 48h), SRR1576768 (*r3b2Δ* 48h), SRR039126 (*rdrp-1Δ* 48h), SRR039127 (*rdrp-2Δ* 48h), SRR039124 (*dicer-1Δ* 48h), SRR039125 (*dicer-2Δ* 48h), SRR039128 (*dicer-1/dicer-2Δ* 48h), SRR836082 (*ago-1Δ* 48h), (Parental de *rdrp-3Δ*), SRR7068271 (*rdrp-3Δ*). Los datos brutos de transcritos también se recuperaron del SRA bajo los identificadores SRR1611144 (Silvestre 48h), SRR1611173 (*rdrp-1Δ* 48h), SRR1611174 (*rdrp-2Δ* 48h), and SRR1611171 (*dicer-1/dicer-2Δ* 48h).

IV. Resultados

IV.1. Caracterización *in vitro* de la proteína R3B2

Desde el descubrimiento de la NCRIP hace más de un lustro (Trieu et al., 2015), diversos trabajos han puesto de manifiesto su relevancia en el control génico endógeno de *M. lusitanicus*. La NCRIP presenta un funcionamiento antagónico a la generación de epimutantes mediada por el mecanismo canónico de silenciamiento (Calo et al., 2017) y regula a este último en su papel como garante de la integridad genómica a través del silenciamiento de los transposones (Pérez-Arques et al., 2020). Además, tanto RdRP-1, como R3B2, los actores principales de la NCRIP, son necesarios para que *M. lusitanicus* infecte de manera adecuada a su huésped (Pérez-Arques et al., 2020). Todos estos datos provienen del estudio de las estirpes mutantes *r3b2* Δ , pero se tiene muy poca información de la función de esta RNasa III, cuya baja conservación de aminoácidos e inusual arquitectura de dominios la convierte en una candidata excelente para el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas. En este sentido, investigaciones previas hipotetizaban una actividad catalítica frente a ssRNA (Trieu et al., 2015), que difiere de la especificidad por el dsRNA descrito para las RNasas III (Court et al., 2013).

La primera parte de esta tesis se centró en la caracterización de la proteína R3B2 *in vitro* con el fin de obtener su estructura tridimensional y esclarecer su actividad catalítica.

IV.1.1. Clonación del cDNA, expresión y purificación de R3B2

El gen *r3b2* (IDv2 80729) de *M. lusitanicus* presenta un tamaño de 1546 pb y contiene un intrón anotado de 63 pb (361-423 nt) que impide su expresión en *E. coli*. Para eliminar este intrón se obtuvo el cDNA correspondiente y se clonó en el vector pET-15b para expresar la proteína fusionada en su extremo amino a una etiqueta de 6xHis (Figura 16).

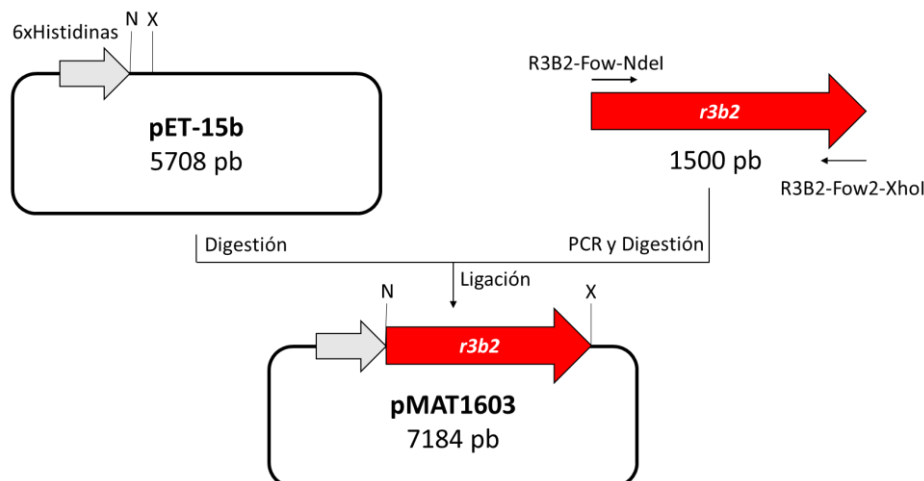


Figura 16. Construcción del plásmido pMAT1603 para la expresión en *E. coli* de la proteína R3B2.

La clonación del cDNA de *r3b2* en fase con la etiqueta de 6 His da como resultado final una proteína de fusión formada por las 6 His y R3B2. N, NdeI; X, XhoI.

La estirpe de *E. coli* utilizada para la expresión de la proteína fue BL21(DE3), que en combinación con el vector pET-15b, permite la expresión inducida por IPTG de proteínas recombinantes (Véase III.1.1). Para determinar las condiciones óptimas de expresión de R3B2 en este sistema heterólogo, los cultivos de la estirpe BL21 transformada se incubaron a 26, 30 y 37°C, y una vez alcanzada la OD₆₀₀ adecuada se tomaron alícuotas antes (0 h) y después de la inducción con IPTG tras 2, 4, 6, 9 y 24 h (Figura 17A). La proteína recombinante R3B2 presenta un peso molecular teórico de 59.7 kDa y su acumulación en los cultivos se determinó mediante el análisis de las alícuotas obtenidas, lisadas 10 min a 100°C, en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). La acumulación de proteína recombinante aumentaba con el tiempo tras la inducción y no se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteína R3B2 en las temperaturas probadas (Figura 17B). En un intento para aumentar la cantidad de proteína inducida se repitieron estos ensayos utilizando una versión del cDNA del gen *r3b2* con el uso de codones optimizado para *E. coli* contenida en pMAT1961, pero no se consiguió un mayor nivel de proteína recombinante acumulada. Dado que la temperatura óptima de crecimiento de *M. lusitanicus* es 26°C, se decidió realizar la expresión de proteína recombinante a esta temperatura tras 24 h de cultivo.

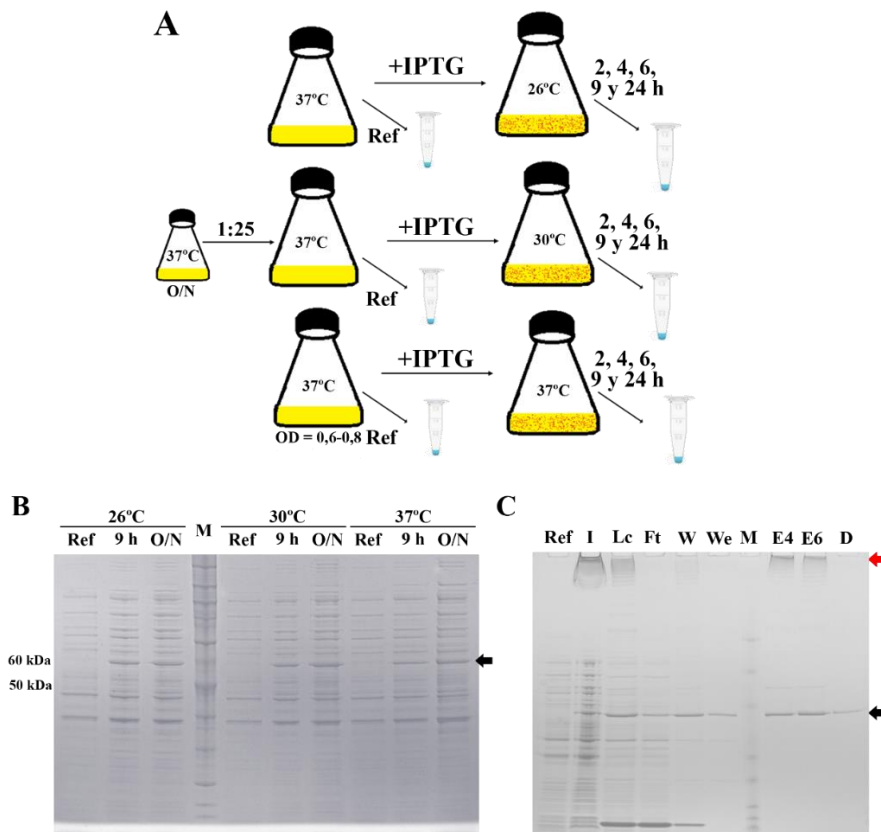


Figura 17. Clonación, expresión y purificación de R3B2.

A) Representación de los parámetros analizados en la optimización del tiempo y temperatura idóneos para la expresión de R3B2. B) Electroforesis desnaturalizante en gel 4-12% NuPAGE (Invitrogen) de las alícuotas representativas del ensayo de optimización de tiempo y temperatura obtenidas antes y después de la inducción con IPTG (Ref, 9 y 24 h). C) Electroforesis desnaturalizante en gel 10% SDS-PAGE de las alícuotas tomadas durante el proceso de purificación de R3B2 mediante una matriz Ni-NTA. Las flechas negras y roja indican la proteína R3B2 soluble y sus agregados, respectivamente. I, cultivo tras la inducción; Lc, precipitado celular lisado y centrifugado; Ft, proteínas no unidas a la la matriz Ni-NTA; W, lavado; We, lavado con 10% EB; M, BenchMark Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); E4, elución al 40% EB; E6, elución al 60% EB; D, proteína recombinante dializada.

La purificación de la proteína recombinante R3B2 en condiciones nativas se realizó mediante una matriz agarosa con níquel (Ni-NTA), que presenta afinidad por la etiqueta de 6xHis. El protocolo de purificación (Véase III.5.3) fue optimizado para la purificación a partir del lisado del precipitado celular producido por 50 ml de cultivo inducido (Figura 17C). Los eluidos finales con concentraciones crecientes de imidazol, un compuesto que presenta afinidad por los átomos de níquel de la matriz y es capaz de desplazar la etiqueta de 6xHis, fueron analizados mediante espectrofotometría ($A_{280\text{ nm}}$) y SDS-PAGE. Se determinó que aquellos eluidos con mayor $A_{280\text{ nm}}$ contenían la proteína R3B2 purificada, comprobándose que la proteína eluía con 40% y 60% de imidazol (Figura 17C). Una observación interesante fue que la carga de cantidades superiores a 200 ng de R3B2 por pocillo provocaba la aparición de agregados incapaces de penetrar en el gel en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 17C, calles E4 y E6). Los eluidos con 40% y 60% de imidazol fueron sometidos a diálisis (Véase III.5.3) para retirar este compuesto antes de su cuantificación y almacenamiento en alícuotas a -80°C .

IV.1.2. Caracterización de los dominios estructurados de la proteína R3B2

La proteína R3B2 es demasiado grande para determinar su estructura tridimensional mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y la cantidad de proteína que se podía purificar no era suficiente para su cristalización y la determinación de su estructura mediante difracción de rayos X. Por estos motivos se siguió una estrategia dirigida a identificar dominios discretos de la proteína que fuesen susceptibles de ser analizados mediante RMN. La caracterización de dominios estructurados de la proteína R3B2 se realizó mediante proteólisis limitada (Véase III.5.4). Esta técnica permite identificar los dominios globulares de las proteínas ya que estos son menos accesibles a la acción de proteasas de baja especificidad de secuencia que las regiones menos estructuradas (Carey, 2000). La digestión de R3B2 con subtilisina produjo fragmentos resistentes que se nombraron de acuerdo con su peso molecular aparente en kDa como F22, F19, F18 y F14 (Figura 18). Los fragmentos F18 y en menor medida F14 fueron los más resistentes al tratamiento con la proteasa.

Para determinar a qué regiones de R3B2 correspondían los fragmentos resistentes a la digestión por subtilisina, se determinó su peso molecular exacto, secuencia N-terminal y huella peptídica a partir de la digestión de 30 min. El análisis de los fragmentos mediante espectrometría de masas reveló que los fragmentos F22, F19, F18 y F14 tenían un peso molecular de 22486, 19516, 18583 y 14192 Da, respectivamente (Figura 18C). La secuenciación del extremo N-terminal de los péptidos determinó que sus secuencias eran (GT)(VL)(VP)(PL) para F19 y (QE)ADN para F14, pero no pudo obtener las secuencias del extremo N-terminal de los fragmentos F22 y F18. Finalmente, el análisis de huella peptídica concluyó que los fragmentos F22, F19 y F18 se localizaban en la región N-terminal de la proteína, mientras que F14 estaba asociado a la región central (Figura 18C).

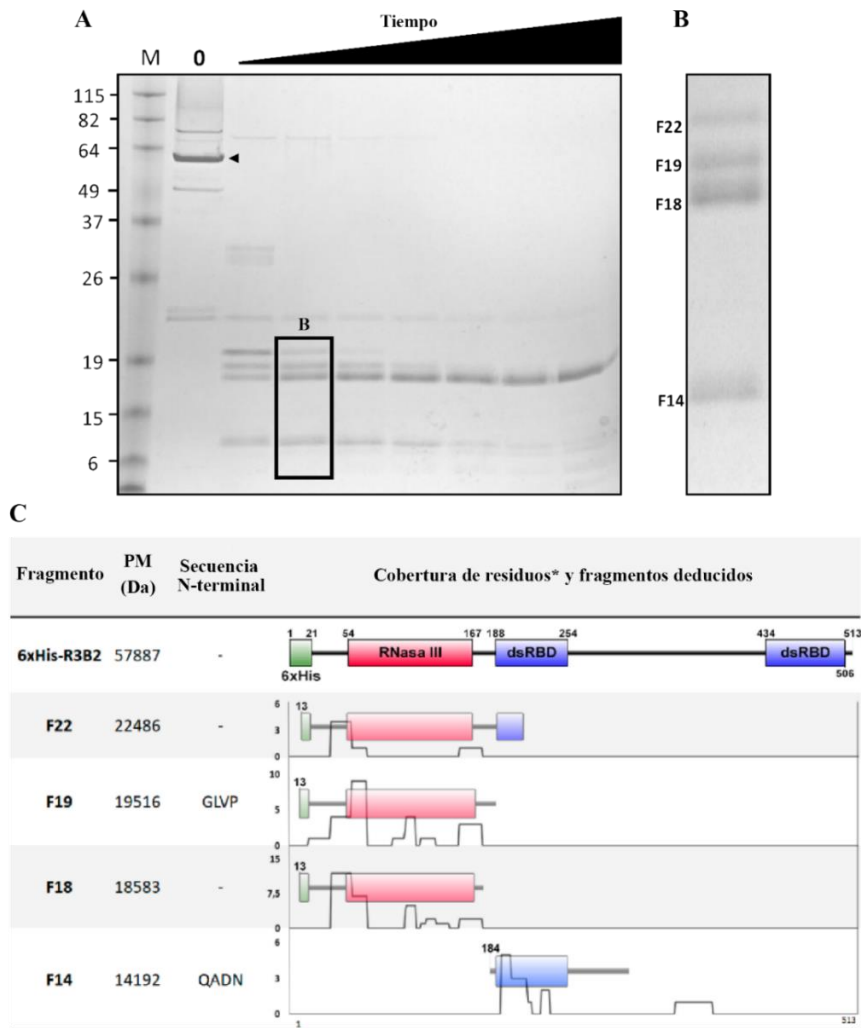


Figura 18. Caracterización de dominios estructurados en la proteína R3B2.

A) La proteína purificada R3B2 (flecha en línea 0) se trató con Subtilisina durante 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 min. M, BenchMark Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen). B) Detalle de los fragmentos derivados de R3B2 tras 30 min de digestión. C) Identificación de los fragmentos derivados de R3B2 de acuerdo con sus características. * Las secuencias obtenidas mediante huella peptídica se alinearon con la proteína completa y se representaron como la cobertura de residuos.

La combinación de la información de las secuencias N-terminales, el peso molecular y las huellas peptídicas permitieron asociar cada fragmento resistente a Subtilisina con su secuencia de aminoácidos concreta (Figura 18C). Así, se infirió que la secuencia N-terminal de F19 era GLVP, localizada en la etiqueta de histidinas fusionada a esta región, mientras que la de F14 era QADN. Estos resultados indicaron que F22 y F19 eran productos de degradación intermedios que daban lugar a F18, que contiene el dominio RIIID, mientras que F14 incluía el dsRBD1. Por tanto, ambos dominios, RIIID y dsRBD1, de R3B2 se encuentran altamente estructurados, a la vez que la ausencia de fragmentos estables, en estas condiciones, correspondientes a la región C-terminal de R3B2 sugiere una menor estructuración en esta parte de la proteína que contiene el dsRBD2.

Con objetivo indicado de determinar la estructura de la proteína R3B2, se decidió expresar en *E. coli* las secuencias que codifican los fragmentos F18 (aminoácidos 1-154)

y F14 (aminoácidos 165-291). Estos fragmentos cubren la región N-terminal de R3B2, pero dado que se pretendía caracterizar la proteína completa se decidió utilizar un fragmento adicional que comprendiera la región C-terminal de la proteína, al que se denominó CTF (*C-terminal fragment*) (aminoácidos 296-493) (Figura 19A).

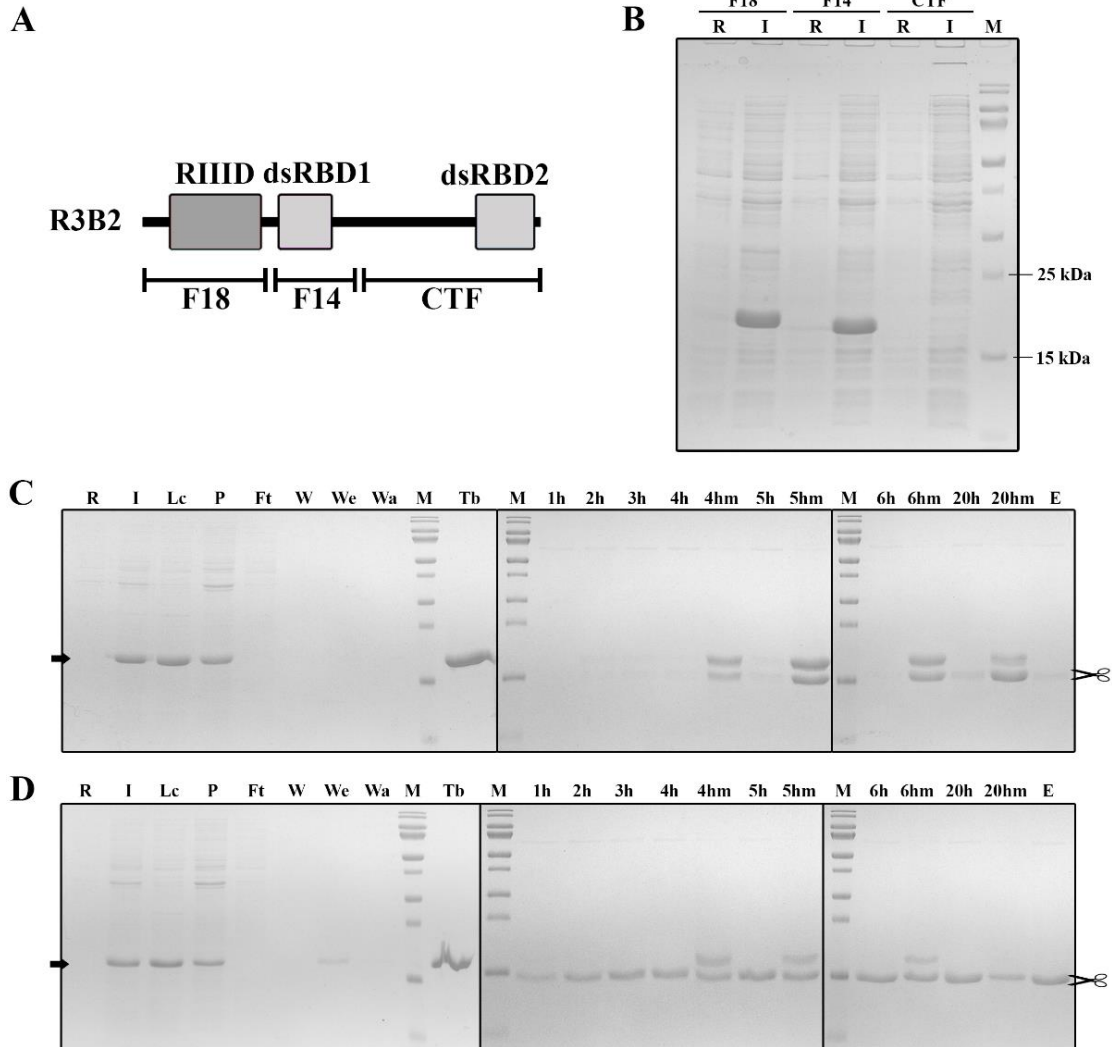


Figura 19. Expresión y purificación de fragmentos resistentes a Subtilisina.

A) Representación de la proteína R3B2 donde se indican las regiones en que se ha dividido la proteína. B) Electroforesis de extractos de proteínas de cultivos de *E. coli* expresando distintos fragmentos de R3B2 en gel al 15% SDS-PAGE. C) Alícuotas tomadas durante la purificación y elución con trombina de F18 en geles al 15% SDS-PAGE. D) Alícuotas tomadas durante la purificación y elución mediante trombina de F14 en geles al 15% SDS-PAGE. Las flechas indican la proteína con la etiqueta de His; las tijeras indican la proteína sin la etiqueta de His; R, referencia; I, cultivo inducido; M, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific); Lc, sobrenadante del lisado; P, precipitado del lisado; Ft, proteínas no unidas a la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% de EB; Wa, lavado adicional con STB; Tb, proteína unida a la matriz Ni-NTA; h, hora; hm, muestra de matriz lavada con STB al tiempo indicado; E, eluido tras pasar por matriz de benzamidina-sefarosa.

Las regiones del gen correspondientes a los fragmentos F18, F14 y CTF se amplificaron y clonaron en el vector de expresión pET-15b (Véase III.3.2), siguiendo una estrategia similar a la empleada para clonar el cDNA completo (Figura 16). Al igual que para la proteína completa, colonias de la estirpe BL21 recién transformadas con estos plásmidos se utilizaron para inducir la expresión de los péptidos fusionadas a la etiqueta de 6xHis, cuyo peso molecular esperado era de 19,8 kDa para F18, 16,6 kDa para F14 y

24,8 kDa para CTF. A diferencia de lo que ocurría con la proteína completa, los fragmentos F18 y F14 se acumulaban en gran cantidad y no aparecía la precipitación de la proteína en los pocillos del gel. Sin embargo, el tercer fragmento, CTF, no pudo detectarse en ninguna de las condiciones probadas (Figura 19B).

La etiqueta de 6xHis presente en pET-15b contiene un péptido reconocido por la trombina que permite eliminar la etiqueta de las proteínas recombinantes tras su purificación. Para obtener los fragmentos F18 y F14 sin etiqueta, la matriz Ni-NTA con los fragmentos unidos se incubó con trombina (Véase III.5.3) durante distintos tiempos. La elución de F18 de la matriz Ni-NTA con trombina reveló que a pesar de alcanzarse algo más del 60 % de proteína digerida al final del tratamiento (20 h), la mayoría de esta permanecía unida a la matriz Ni-NTA a pesar de carecer de la etiqueta de His (Figura 19C). Por el contrario, la elución de F14 de la matriz Ni-NTA se produjo a un mayor ritmo (Figura 19D), alcanzándose una digestión del 50 % de la proteína entre las 3 y 4 h, acompañada de la obtención de la proteína libre. En este caso, la proporción de proteína que quedó unida a la columna, aun estando completamente digerida, tras 20 h de incubación fue muy pequeña (Figura 19D, línea 20hm).

En resumen, de los tres fragmentos en que se dividió la proteína R3B2, solo F14 pudo purificarse en condiciones óptimas para someterlo a RMN, mientras que no fue posible la expresión de CTF y el fragmento F18 permaneció unido a la matriz durante su elución con trombina a pesar de que una parte importante perdía la etiqueta de 6xHis. Este último resultado sugirió que este fragmento, que contenía el dominio RIIID, podría dimerizar como ocurre con otras proteínas que tienen este dominio (Court et al., 2013) y de esta forma quedar retenido en la matriz Ni-NTA.

IV.1.3. Análisis de interacción de los dominios de la proteína R3B2

Los dominios RIIID de las RNasas III para llevar a cabo su acción catalítica forman dímeros intermoleculares, en el caso de las clases I y II (Court et al., 2013), o intramoleculares, en el caso de las clases III y IV (Paturi & Deshmukh, 2021). Dado que R3B2 es una RNasa de la misma naturaleza, es posible que la proteína forme un dímero estable a través de su RIIID cuyo tamaño impida su análisis mediante RMN. Por ese motivo, se procedió a analizar el patrón de interacción de los dominios de R3B2 mediante Y2H.

La secuencia que codificaba cada una de las regiones de R3B2 descritas anteriormente (Véase IV.1.2, Figura 19A), así como la proteína completa, se clonó en fase tanto con el dominio de activación (Gal4_{AD}) como con el de unión al DNA (Gal4_{BD}) del factor de transcripción de levaduras Gal4 presentes en los vectores del sistema de Y2H pACTII y pBD-Gal4, respectivamente (Véase III.3.2). Los plásmidos resultantes expresaban los fragmentos F18, F14, CTF y la proteína R3B2, respectivamente, fusionados a Gal4_{AD} o a Gal4_{BD}. La secuenciación de dichos plásmidos descartó la presencia de mutaciones en la secuencia de los fragmentos amplificados del gen *r3b2* y

permitió comprobar que la clonación había tenido lugar en la fase de lectura correcta. Los plásmidos que expresaban las fusiones con Gal4_{AD} se utilizaron para transformar la estirpe de levadura PJ69-4 (James et al., 1996) de sexo *a*, mientras que los que expresan las fusiones con Gal4_{BD} se introdujeron en la misma estirpe de sexo *a*. A continuación, se generaron diploides que contenían cada una de las posibles combinaciones de fragmentos de R3B2 y como control positivo de interacción se utilizó la proteína R3B2 completa. Los diploides se sembraron mediante estrías consecutivas en placas de diferentes medios que sirven para seleccionar interacciones fuertes e interacciones débiles y, finalmente, también en medio no selectivo como control de crecimiento. El crecimiento en los diferentes medios se siguió durante dos semanas, detectándose una interacción muy intensa entre los fragmentos F18 y una muy débil entre los fragmentos CTF (Figura 20). Este resultado sugirió que, al igual que el resto de RNasas III de clase I y II, R3B2 dimeriza a través de su dominio RIIID, lo que imposibilita su caracterización mediante RMN.

Gal4 _{AD} / Gal4 _{BD}	Control	Interacción débil	Interacción fuerte
- / -			
- / F18			
- / F14			
- / CTF			
F18 / -			
F14 / -			
CTF / -			
F18 / F18			
F18 / F14			
F18 / CTF			
F14 / F14			
F14 / F18			
F14 / CTF			
CTF / CTF			
CTF / F18			
CTF / F14			
R3B2 / R3B2			

Figura 20. Perfil de interacción de los dominios de la proteína R3B2.

Ensayo de Y2H de los dominios de la proteína R3B2 en el que tres colonias independientes se picaron en medio SD-WL (control), SD-WLH + 3AT (interacción débil) y SD-WLA (interacción fuerte), dejándose crecer 3 días a 30°C.

IV.1.4. Unión de RNA a la proteína R3B2

Las investigaciones previas sugerían que R3B2 es la RNasa encargada de la degradación de mRNA específicos marcados con pequeñas regiones de dsRNA en la NCRIP (Trieu et al., 2015), lo que requiere que la proteína sea capaz de unir RNA. Para probar dicha hipótesis se llevó a cabo una aproximación mediante ensayos de retraso en

gel (*Electrophoretic mobility shift assay* o EMSA) utilizando la proteína R3B2 purificada y RNA marcados con fósforo-32 (^{32}P) sintetizados *in vitro*.

La síntesis de RNA marcados se realizó a partir de la transcripción *in vitro* de moldes de DNA procedentes de los genes *carB* (IDv2 31317), *P1* (IDv2 155412) o *mcwc-1b* (IDv2 149173) de *M. lusitanicus* amplificados con oligonucleótidos que incorporaban la secuencia promotora reconocida por la polimerasa de RNA del fago T7 (Véase III.4.2). La síntesis de ssRNA se llevó a cabo utilizando los moldes con sentido de los tres genes que dan lugar a moléculas de ssRNA de 103 nt, denominada carB103 para el gen *carB*, mientras que para la síntesis de dsRNA se transcribieron en la misma reacción los moldes con sentido y antisentido de cada gen. Para eliminar las moléculas de ssRNA presentes en las muestras de dsRNA, las preparaciones se trataron con las RNasa A y T1, dando lugar a dsRNA de extremos romos con un tamaño de 100 pb, nombrado como carB100 para el gen *carB*.

Los primeros EMSA (Véase III.6) se realizaron utilizando concentraciones entre 50 y 450 nM de la proteína R3B2 frente a 100 nM del ssRNA o a 50 nM del dsRNA del gen *carB* (Figura 21A y 21B). El aumento de la concentración de R3B2 dio lugar a la aparición de dos bandas en ambos casos, con una movilidad electroforética intermedia y baja que sugerían la unión de varios dímeros de R3B2. El retraso completo de los fragmentos de RNA se observó cuando la ratio de dímeros/RNA era mayor de dos, sugiriendo que la banda de menor movilidad electroforética era el resultado de la unión de dos dímeros. Los EMSA realizados en las mismas condiciones junto con los ssRNA (Figura 21C) y dsRNA (Figura 21D) derivados de *P1* y *mcwc-1b* mostraron idénticos resultados, sugiriendo que la unión de R3B2 al RNA es independiente de secuencia.

Estos resultados indicaron que R3B2 es capaz de unir dsRNA, pero, debido a las probables estructuras secundarias que se producen en los ssRNA (Figura 21F, *carB* ssRNA), no se podía afirmar que esta RNasa fuese capaz de unir este tipo de moléculas. Para resolver esta incógnita, se diseñó, basadas en las predicciones del Vienna RNAfold server (Lorenz et al., 2011), el fragmento GAstair (Figura 21E) que consistía en repeticiones en tándem de GA, con 5 U intercalados para su marcaje radioactivo. El fragmento de 145 pb se generó mediante extensión de oligonucleótidos (Figura 21E, Véase 0) y se clonó en pUC18 (Véase III.3.2). La síntesis del RNA marcado se realizó a partir del plásmido linearizado con EcoRV, que había sido incluido en el molde para generar exactamente un fragmento de 103 nt sin incluir parte de la secuencia del MCS (Figura 21E). Los EMSA (Véase III.6) con el fragmento GAstair requirieron del uso de material de plástico antiadherente y albúmina de suero bobino (*bovin serum albumin* o BSA) para minimizar la adhesión del RNA a las superficies, seguramente por la tendencia de las bases desapareadas a interactuar con otras moléculas. Utilizando estas condiciones se realizaron los ensayos con el ssRNA de GAstair y se repitieron con los ssRNA y dsRNA derivados de *carB*. En todos los casos se detecta el retraso

electroforético indicando que R3B2 es capaz de unir tanto ssRNA como dsRNA (Figura 21G).

Para estudiar la contribución de cada dominio dsRBD a la unión del RNA se diseñaron alelos con mutaciones puntuales o truncaciones del gen *r3b2* (Figura 22A). El alelo *rIII-* presenta tres mutaciones puntuales en su RIIID (histidina por alanina, H49A, glutámico por alanina, G55A, y aspártico por alanina, E56A) cuyo efecto provoca una falta de función de la proteína *in vivo* (Trieu et al., 2015). El alelo *rbd2** presenta cuatro sustituciones en su dsRBD2 (arginina por alanina, R469A y R470A, y lisina por alanina, K471A y K472A) que afectan a un grupo de aminoácidos básicos relacionados con la unión al surco mayor del RNA en este tipo de dominios (Gleghorn & Maquat, 2014). El alelo Δ *ctf*, presenta la delección de la región CTF quedando la proteína integrada por F18 y F14 careciendo, por tanto, del dsRBD2.

Los plásmidos que expresaban R3B2, RIII-, RBD2* y Δ CTF, junto con el que expresa F18 (Véase IV.1.2) se utilizaron para transformar la estirpe BL21(DE3) de *E. coli* y, seguidamente, se procedió a inducir y purificar cada una de las variantes mediante matrices de Ni-NTA (Véase III.5.3). Las variantes RIII- y RBD2* mostraron unos rendimientos en la inducción y la purificación bajos (Figura 22B y 22C), de 0.04 mg por 25 ml de cultivo inducido, similar al de R3B2 silvestre (Figura 17E), mientras que las variantes truncadas Δ CTF y F18 pudieron ser purificadas en mayor cantidad (Figura 22D y 22E) presentando rendimientos superiores a 0,25 mg por 25 ml de cultivo inducido. Las diferentes variantes se dializaron y sometieron a EMSA (Véase III.6) frente a los RNA derivados del gen *carB* (Figura 22F y 22G). La variante RIII- no mostró grandes diferencias en el patrón de retraso frente a ssRNA o dsRNA, mientras que RBD2* sufrió una importante pérdida de afinidad por ambos tipos de RNA respecto a la versión silvestre. La unión de las variantes Δ CTF y F18 al RNA solo pudo ser analizada frente a dsRNA debido a una importante degradación de las moléculas de ssRNA. La ausencia del dsRBD2 en Δ CTF provocó un importante descenso en la afinidad por el dsRNA que se perdió completamente en ausencia de ambos dsRBD en F18. Estos resultados en conjunto sugirieron que los dos dsRBD de R3B2 son necesarios para la unión de moléculas de RNA, mientras que la integridad del centro catalítico de RIIID no es necesaria para unión al RNA.

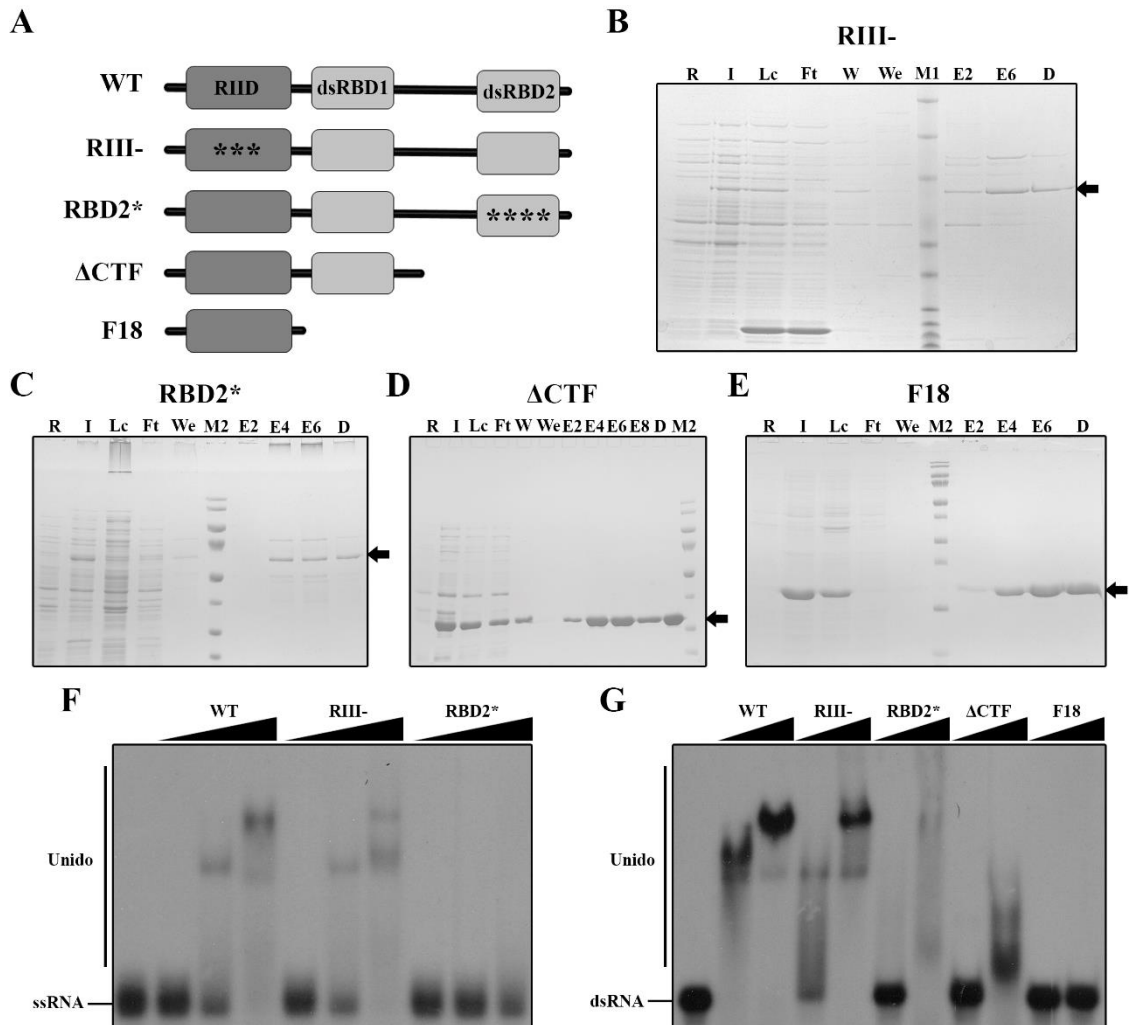


Figura 22. Contribución de los dsRBD de R3B2 a la unión de RNA.

A) Representación de las variantes utilizadas en los EMSA. B) Purificación de RIII- analizada en un gel 10% SDS-PAGE. C) Purificación de RBD2* analizada en un gel 10% SDS-PAGE. D) Purificación de ΔCTF analizada en un gel 10% SDS-PAGE. E) Purificación de F18 en un gel 15% SDS-PAGE. F) EMSA de las variantes de R3B2 frente a ssRNA (100 nM carB103 ssRNA; concentración de proteína: 50, 200 y 500 nM). G) EMSA de las variantes de R3B2 frente a dsRNA (50 nM carB100 dsRNA; concentración de proteína: 200 y 500 nM). Se indica la proteína de interés con una flecha; R, cultivo sin inducir; I, cultivo inducido; Lc, sobrenadante del lisado; Ft, proteínas no unidas a la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% EB; M1, BenchMark Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); E2-8, eluciones de la matriz Ni-NTA con STB al 20, 40, 60 y 80% de EB; D, proteína dializada; M2, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific).

IV.1.5. Caracterización de la actividad RNasa de la proteína R3B2

Dado que los rdRNA, los productos de la NCRIP, son sRNA derivados de los mRNA diana, se había propuesto que R3B2 sería capaz de cortar ssRNA (Trieu et al., 2015). Sin embargo, esta proteína presenta un dominio RIIID capaz de dimerizar, sugiriendo que podría cortar dsRNA. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que ese dominio RIIID presenta cambios en 4 aminoácidos conservados en este tipo de dominios, destacando el cambio de un residuo aspártico (D) que se requiere para la actividad catalítica *in vitro* por un glutámico (E) (Figura 9). Para determinar la actividad catalítica de R3B2, y resolver la cuestión sobre su molécula diana, se llevaron a cabo ensayos de actividad *in vitro* en los que la proteína purificada se incubó con moléculas de ssRNA o de dsRNA marcadas radiactivamente.

IV.1.5.1. Demostración de la especificidad por el ssRNA de R3B2

La síntesis de RNA (Véase III.4.2) se realizó de forma similar a la descrita en el apartado anterior, pero en este caso, se utilizaron moléculas de RNA de mayor tamaño, con aproximadamente 600 nt o 600 pb, de los genes *carB* y *seq15* (IDv2 104539), cuyos moldes estaban disponibles previamente en el grupo de investigación.

Las reacciones de actividad *in vitro* (Véase III.7) de R3B2 con ssRNA procedente del gen *carB* reveló que la RNasa era capaz de degradar fragmentos de RNA monocatenario similares a los mRNA dando lugar a un rastro de productos de degradación a lo largo de toda la calle (Figura 23A). Por el contrario, la variante RIII- con mutaciones puntuales en su dominio catalítico (Véase IV.1.4), no fue capaz de degradar el ssRNA (Figura 23A), demostrando que la actividad detectada se debía exclusivamente a R3B2 y dependía de su dominio RIIID. Estos resultados son coherentes con la producción de rdRNA detectada *in vivo* anteriormente (Trieu et al., 2015). La utilización de otras moléculas de ssRNA, como la derivada del gen *seq15* (Figura 23B) o el fragmento de ssRNA de 103 nt GAstair que se utilizó para el EMSA (Figura 23C), dio lugar a resultados similares sugiriendo que esta actividad catalítica no es específica de secuencia. Además, los ensayos de actividad *in vitro* utilizando un gradiente de concentraciones de magnesio revelaron que al igual que otras RNasas esta actividad dependía de magnesio, en este caso la mayor actividad se obtuvo con 0,5 mM (Figura 23D). Por el contrario, en ningún caso se detectó actividad RNasa frente a dsRNA (Figura 23E), sugiriendo que el RIIID de R3B2 ha perdido la capacidad de degradar moléculas de doble cadena.

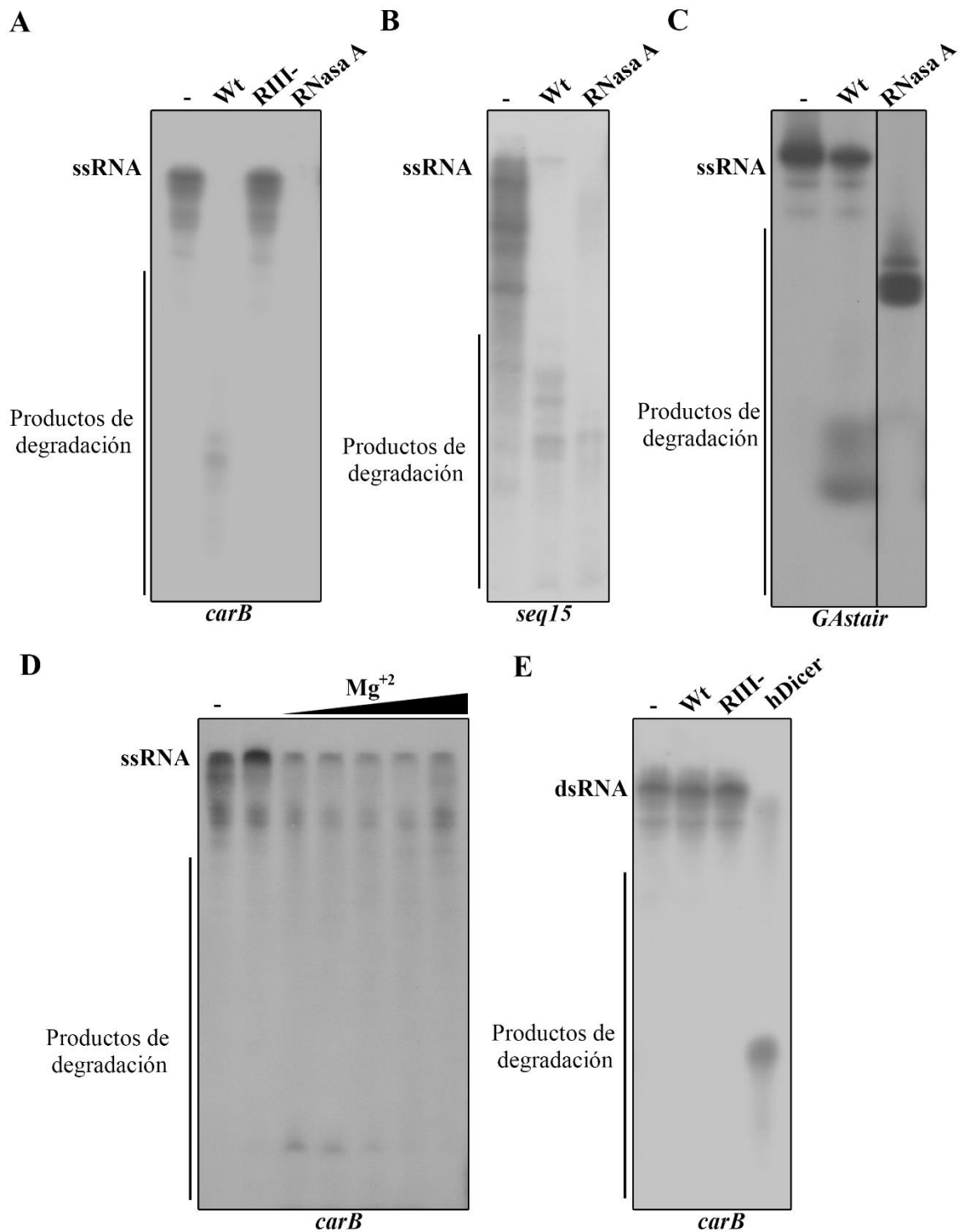


Figura 23. Caracterización de la actividad RNasa de R3B2 frente a ssRNA y dsRNA.

A) Actividad RNasa de R3B2 silvestre y la versión mutante RIII- frente al ssRNA del gen *carB* (50 nM *carB* ssRNA; 150 nM proteína). Como control positivo se incubó la misma cantidad del mismo ssRNA con 1U de RNasa A, una RNasa específica de ssRNA. B) Actividad RNasa de R3B2 frente al ssRNA del gen *seq15* (50 nM *seq15* ssRNA; 150 nM R3B2). Como control positivo se incubó la misma cantidad del mismo ssRNA con 1U de RNasa A (Cat. R6513, Sigma). C) Actividad RNasa de R3B2 frente a *GAstair* (850 nM *GAstair* ssRNA; 150nM R3B2). Como control positivo se incubó la misma cantidad del mismo ssRNA con 1U de RNasa A. D) Efecto de la concentración de magnesio sobre la actividad RNasa de R3B2 (50 nM *carB* ssRNA, 150 nM R3B2, Mg^{+2} : 0, 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 mM). E) Actividad RNasa de R3B2 silvestre y RIII- frente a dsRNA del gen *carB* (25 nM *carB* dsRNA; 150 nM proteína). Como control positivo se incubó la misma cantidad del mismo dsRNA con 0,5 U hDicer (Cat. T510002, Genlantis), una RNasa III específica de dsRNA; -, solo el RNA correspondiente; Wt, R3B2 silvestre.

IV.1.5.2. Efecto de las mutaciones de los dsRBD en la actividad de R3B2

Para determinar si la pérdida de capacidad para unir RNA afectaba a la actividad *in vitro* o a su especificidad por el ssRNA, se repitieron los ensayos de actividad incluyendo las variantes RBD2*, Δ CTF y F18, analizadas en el apartado IV.1.4 (Figura 22A). Tal y como parecían indicar los EMSA, las variantes Δ CTF, carente de dsRBD2, y F18, carente de los dos dominios dsRBD, mostraron un aumento de actividad comparadas con la proteína silvestre (Figura 24A), sugiriendo que los dominios dsRBD no son necesarios para la actividad catalítica de la proteína, pero sí parece que la regulan de alguna forma. En este sentido, la variante RBD2*, que presenta mutaciones puntuales que afectan a 4 aminoácidos básicos necesarios para la unión al RNA, mostró un importante descenso de la actividad catalítica (Figura 24A). Al contrario de lo que sucede con otras RNasas III de clase II (Weinberg et al., 2011), la pérdida de uno o de ambos dominios dsRBD en Δ CTF y F18, respectivamente, no alteró la especificidad del RIIID por ssRNA. Al analizar la actividad de estas últimas frente a dsRNA, ninguna de las dos variantes truncadas fue capaz de degradar el dsRNA (Figura 24B), sugiriendo que la especificidad de R3B2 es intrínseca a su inusual dominio RIIID.

IV.1.5.3. La especificidad de corte de R3B2 depende de su dominio RIIID

Para demostrar que la especificidad de corte de R3B2 por el ssRNA estaba determinada por los cambios en su dominio RIIID respecto a otras RNasas III, (Figura 9), se construyó la proteína quimérica RNB y se analizó su actividad *in vitro*. En esta proteína se sustituyó el dominio RIIID de R3B2 por el dominio canónico de la RNasa III RNC (Uniprot [P0A7Y0](#)) de *E. coli* (Figura 24C).

La proteína quimera RNB se expresó a unos niveles similares a los de la proteína R3B2 completa, mientras que RNC mostró altos niveles de expresión en las condiciones usadas (Figura 24D). La purificación de las proteínas recombinantes mediante matrices Ni-NTA (Véase III.5.3) se realizó a partir de 25 ml de cultivo en el caso de RNC (Figura 24E) y de 50 ml en el caso de RNB (Figura 24F), obteniéndose rendimientos de 0.2 mg y 0.025 mg por 25 ml de cultivo, respectivamente.

Los ensayos de actividad RNasa frente a dsRNA del gen *carB* mostraron que, al contrario que R3B2, tanto la proteína quimera RNB como la proteína RNC de *E. coli* eran capaces de degradar el dsRNA en estas condiciones (Figura 24G). Este resultado demostró que la especificidad por el ssRNA de R3B2 estaba determinada por su inusual dominio RIIID.

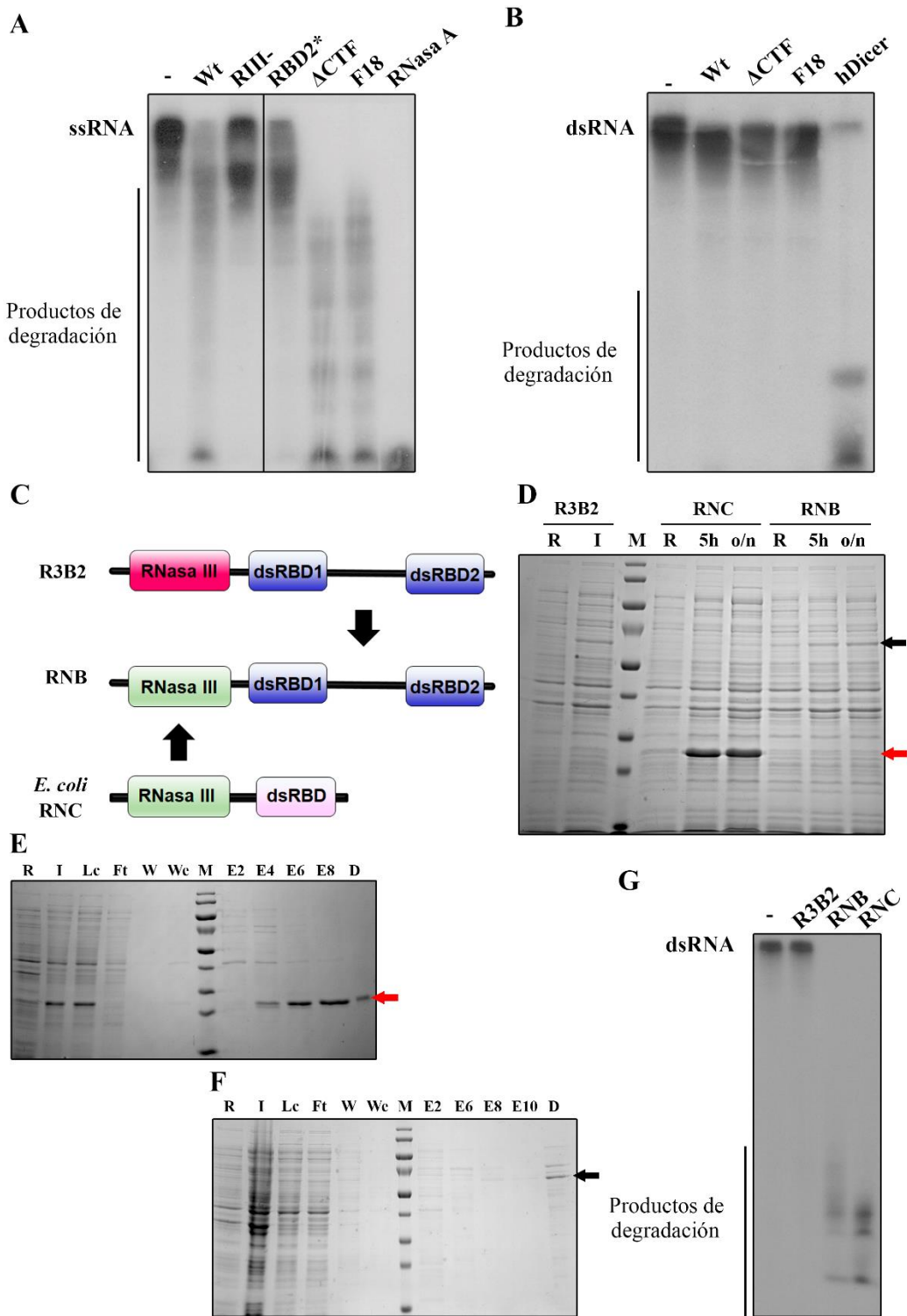


Figura 24. Caracterización de la actividad RNasa de las variantes de R3B2 y restauración de la capacidad para cortar dsRNA.

A) Actividad RNasa de las variantes de R3B2 descritas en la Figura 22A frente a ssRNA. (30 nM *carB* ssRNA, 150 nM proteína). B) Actividad RNasa de las variantes truncadas de R3B2 frente a dsRNA (30 nM *carB* dsRNA, 150 nM proteína). C) Representación de la constitución de dominios de la proteína quimérica RNB. D) Resultado de la inducción de RNC y RNB analizada en un gel 10% SDS-PAGE. E) Purificación de RNC analizada en un gel 10% SDS-PAGE. F) Purificación de RNB analizada en un gel 10% SDS-PAGE. G) Actividad RNasa de R3B2, RNB y RNC frente a dsRNA (30 nM *carB* dsRNA, 150 nM proteína). Las flechas negras y rojas indican la posición de la proteína R3B2 o RNB y RNC, respectivamente. R, cultivo sin inducir; I, cultivo inducido; Lc, lisado tras centrifugar; Ft, eluido de la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% EB; M, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific); E2-10, eluciones de la matriz Ni-NTA con STB al 20, 40, 60, 80 o 100% de EB; D, proteína dializada.

IV.1.6. Caracterización de la estructura del dominio RIIID de R3B2

La RNasa R3B2 presenta, como ya se ha mencionado, una baja conservación de residuos con otras RNasas III y una actividad catalítica inusual que radica en su dominio RIIID, ambas características acrecentaron nuestro interés por conocer la estructura de esta proteína. Debido a la dimerización de este dominio (Véase IV.1.3) y a la imposibilidad de expresar la región CTF de la proteína (Véase IV.1.2), se descartó la caracterización de la estructura de R3B2 basada en el uso de la RMN para determinar la estructura de cada uno de los dominios de la proteína. En cambio, el alto rendimiento obtenido en la purificación de la variante Δ CTF (Véase IV.1.4), que contiene los dominios RIIID y dsRBD1, propició la obtención de la cantidad suficiente de esta proteína para la generación de cristales que pudiesen ser analizados mediante difracción de rayos X.

IV.1.6.1. Descripción y comparación de la estructura del RIIID de R3B2

La obtención de la estructura tridimensional de la región N-terminal de R3B2 (aminoácidos 1-273) fue realizada en colaboración con el Dr. Sebastian Falk del departamento de Biología estructural y computacional de la Universidad de Viena. La cromatografía de exclusión molecular (*size exclusion chromatography* o SEC) y los análisis de dispersión estática de la luz (*static light scattering* o SLS) revelaron que este fragmento formaba un dímero en solución, lo que está en consonancia con los resultados de interacción del sistema de Y2H (Figura 25A). La estructura del dominio RIIID de R3B2 pudo ser resuelta satisfactoriamente (PDB [6ZDW](#)), pero no la del dsRBD1, probablemente debido a su flexibilidad en ausencia de RNA.

La comparación de la estructura del dominio RIIID de R3B2 con los de otras RNasas III bien caracterizadas, como las de *Aquifex aeolicus* (AaRIII) (Gan et al., 2008), *S. cerevisiae* (ScRNT1) (Song et al., 2017), *Homo sapiens* (HsDrosha) (Partin et al., 2020) y *Giardia intestinalis* (GiDicer) (MacRae et al., 2006), puso de manifiesto una arquitectura similar con las mayores diferencias en los conectores entre las hélices $\alpha 2/\alpha 3$ y $\alpha 5/\alpha 6$ (Figura 25B y 25C). Los miembros de la familia de las RNasas III presentan dos motivos de unión a RNA (*RNA-binding motif* o RBM) en sus centros catalíticos, denominados RBM3 y RBM4 (Gan et al., 2006). Las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman estos motivos establecen interacciones con el esqueleto de fosforibosa del RNA, facilitando su unión. El alineamiento estructural reveló que el RBM3 está bastante bien conservado en R3B2, salvo por una sustitución de glutamato por asparagina (N76) (Figura 25C). Por el contrario, el RBM4, situado en el conector entre las hélices $\alpha 5/\alpha 6$, se ha reducido sustancialmente desde los 11 residuos en AaRIII o 21 residuos en ScRNT1 a 3 residuos en R3B2 (Figura 25C). Los análisis de secuencia revelaron que esta región se ha conservado así de corta entre los Mucorales (Véase IV.3.1), manteniéndose solo una leucina (L102) y una valina (V106) que dan lugar a un giro acusado que conecta las hélices $\alpha 5/\alpha 6$ (Figura 25D).

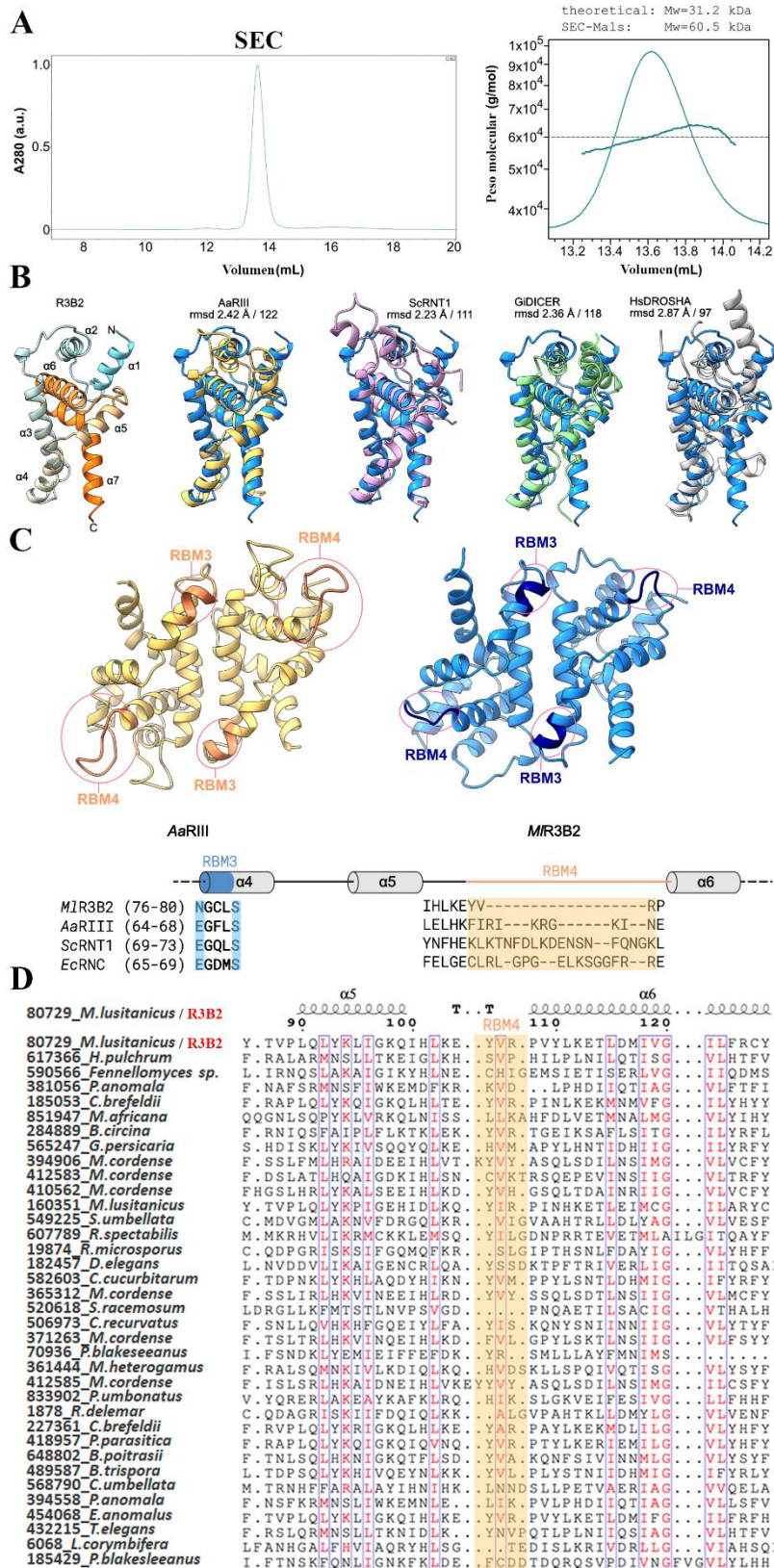


Figura 25. Análisis estructural del dímero formado por el RIID de R3B2.

A) Resultado de los análisis de cromatografía por exclusión molecular (SEC) y dispersión estática de la luz (SLS) de la región N-terminal de R3B2. B) Estructura del dominio RIID de R3B2 y comparación con los dominios RIID de otras RNasas III. En las comparaciones se indica el dominio RIID de R3B2 en azul superpuesto con los de las RNasas III con las que se compara. Los valores de RMSD y el número de residuos alineados están indicados. (PDB AaRII:2NUG; ScRNT1:5T16; GiDICER:2FFL; HsDROSHA:6V5B). C) Comparación de los RBM de R3B2 (estructura azul) y AaRIII (estructura naranja) a nivel de estructura y de secuencia. D) Alineamiento de la región del RBM4 de R3B2 en otros Mucorales. Se indica la estructura secundaria de MIR3B2 sobre el alineamiento.

Los elementos estructurales involucrados en la dimerización de los RIIID incluyen la mayor parte de las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$, el extremo C-terminal de la hélice $\alpha 6$ y el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 7$ (Figura 26). Las dos hélices $\alpha 3$ de las cadenas A y B son antiparalelas a lo largo de toda la superficie de dimerización, organizándose dos uniones de forma esférica en los extremos de dicha superficie. Las esferas las forman la cadena lateral de la lisina K50 de la molécula A (o B) y la cavidad donde encaja se forma por las cadenas laterales de la serina S72, tirosina Y74, arginina N76 y leucina L79 de la molécula B (o A).

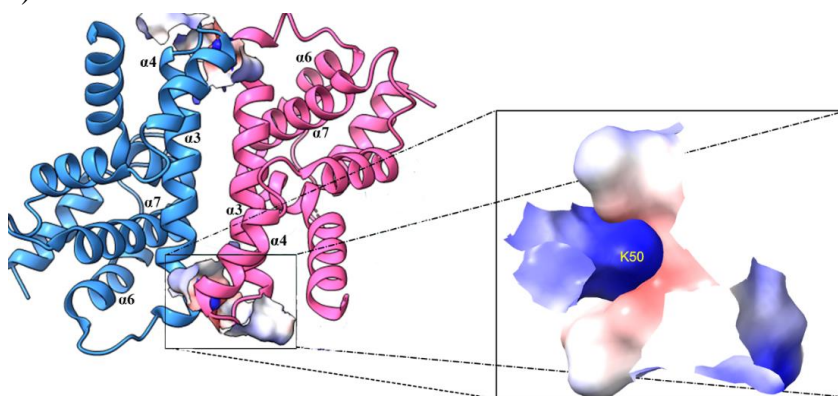


Figura 26. Dimerización del dominio RIIID de R3B2.

Se muestra la cadena A (rosa) y B (azul) que conforman el dímero del RIIID, con ampliación de una de las regiones de las cargas de la cavidad de interacción formada por los residuos S72, Y74, N76 y L79 donde se introduce la cadena lateral de K50.

IV.1.6.2. Mutación del centro catalítico de R3B2

En el centro catalítico, del dominio RIIID de *A. aeolicus* se encuentran cuatro residuos de carácter ácido, dos glutámicos, E40 y E110, y dos aspárticos, D44 y D107 conservados. Sin embargo, en el caso de R3B2 se observa una arquitectura del centro catalítico con tres residuos de carácter ácido también, pero en un orden diferente, E56, E113 y D116, y además existe una asparagina (N52) en lugar de un aspártico (Figura 27A). Aunque las posiciones están conservadas, los residuos de aspártico y glutámico están invertidos en comparación con *A. aeolicus* y otros centros catalíticos de RNAsas III (Gan et al., 2006; Song et al., 2017), pero su disposición relativa se mantiene exceptuando la presencia de N52 (Figura 27B). Debido a que estos cuatro residuos del centro catalítico de las RNAsas III establecen una coordinación con átomos de magnesio para llevar a cabo la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del esqueleto de fosforibosa del RNA, se consideró la posibilidad de que la sustitución N52 pudiese estar debilitando la coordinación y pudiera ser responsable de la incapacidad de R3B2 para cortar el dsRNA.

Para determinar si N52 era la responsable de la especificidad de R3B2 frente a ssRNA se construyeron las variantes N52E y N52D, que recuperaban el residuo de carácter ácido del centro catalítico canónico o el correspondiente a la disposición del centro catalítico de R3B2, respectivamente. La construcción de los alelos que expresaban estas variantes se realizó mediante la introducción de la mutación necesaria en los oligonucleótidos utilizados para su amplificación y la posterior PCR fusión de los fragmentos resultantes. Al igual que para la proteína R3B2 silvestre, la inducción y

purificación de estas dos nuevas variantes dio lugar a rendimientos bajos pero suficientes para analizar su actividad *in vitro* (Figura 27C y 26D).

Los ensayos de actividad RNasa de estas variantes no revelaron diferencias significativas respecto a la versión silvestre de R3B2 frente a ssRNA o dsRNA derivado del gen *carB* (Figura 27E). Así, las variantes seguían siendo capaces de degradar el ssRNA, pero no el dsRNA, indicando que el cambio N52 *per se* no es responsable de la inusual actividad catalítica de R3B2.

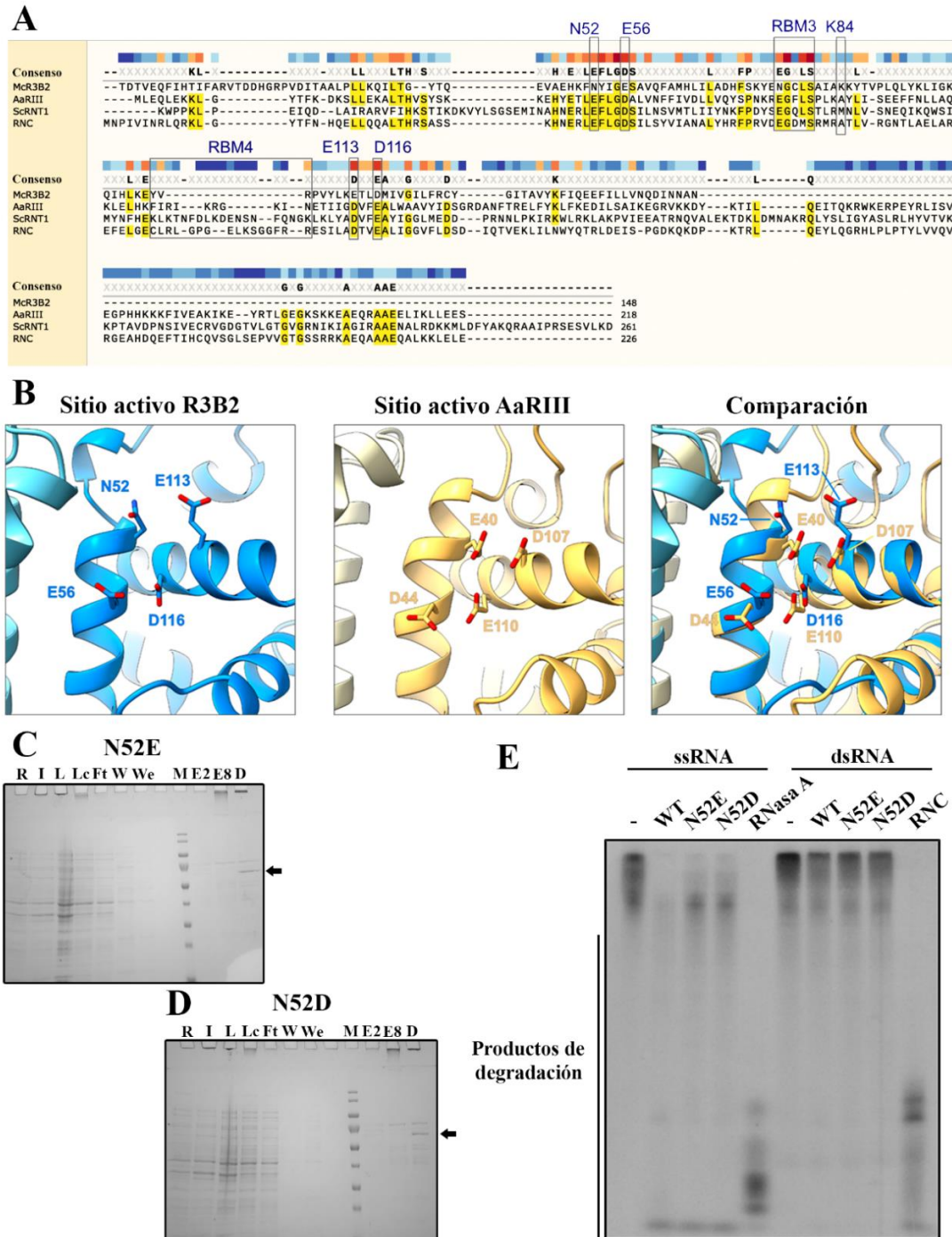


Figura 27. Caracterización de los residuos catalíticos de R3B2 y actividad *in vitro* de los mutantes N52.
 A) Alineamiento estructural del dominio catalítico de R3B2 en *M. lusitanicus* (MIR3B2) con los de las RNasas III de clase I de *A. aeolicus* (AaRIII) y de *E. coli* (EcRNC) y el de la RNasa III de clase II de *S. cerevisiae* (ScRNT1). B) Ampliación de los sitios activos de R3B2 (azul) y AaRIII (amarillo). Se muestran los aminoácidos importantes para la actividad. C) Purificación de la variante N52E analizada en un gel 10% SDS-PAGE. D) Purificación de la variante

N52E analizada en un gel 10% SDS-PAGE. E) Ensayo de actividad RNasa de R3B2 (WT) y las variantes purificadas en C y D frente a ssRNA y dsRNA (20 nM *carB* ssRNA; 10 nM *carB* dsRNA; concentración de proteína 150 nM). Se indican con flechas negras las proteínas producidas. R, cultivo sin inducir; I, cultivo inducido; L, lisado; Lc, lisado tras centrifugar; Ft, proteínas no unidas a la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% EB; M, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific); E2-8, eluciones de la matriz Ni-NTA con STB al 20% o al 80% de EB; D, proteína dializada.

IV.1.6.3. Mutación del canal de posicionamiento del RNA de R3B2

El hecho de que R3B2 sea capaz de unir tanto ssRNA como dsRNA (Véase IV.1.4), pero solo pueda cortar ssRNA (Véase IV.1.5) hizo que se analizara con detenimiento las estructuras de otras RNasas III unidas a dsRNA y que pueden cortar este tipo de molécula. La dimerización de los RIIID de este tipo de RNasas da lugar a un canal o hendidura que permite la entrada y posicionamiento del dsRNA en el centro catalítico (Figura 28A). La superposición del dímero del RIIID de R3B2 sobre los de *A. aeolicus* y *S. cerevisiae* reveló que, a diferencia de las RNasas III con actividad frente al dsRNA, la proteína de *M. lusitanicus* presentaba un canal más estrecho que podría impedir el posicionamiento del dsRNA en el mismo para su corte. Dicho estrechamiento no parecía deberse a la ausencia de sustrato durante la cristalización ya que, en el caso de *A. aeolicus*, la superficie de la hendidura se mantiene constante haya o no RNA unido (Figura 28B). El modelado del dsRNA sobre la estructura del dímero de R3B2 sugirió un impedimento estérico a la entrada de la molécula de doble cadena causada por las lisinas K84 de ambos monómeros, que sobresalen de la superficie de contacto con el RNA (Figura 28A). De hecho, esta posición mostraba una gran conservación en otros Mucorales, presentando aminoácidos cargados positivamente (lisina o arginina).

Al igual que en el caso de N52, se procedió a comprobar si K84 era la responsable de la especificidad de la actividad catalítica de R3B2 generando versiones mutantes donde se reemplazó por alanina (K84A), un aminoácido pequeño y polar, glutamato (K84E), un aminoácido con carga negativa, o glutamina (K84Q), que presenta una cadena lateral de tamaño similar a la lisina, pero sin carga. La construcción de los alelos que codificaban estas variantes se realizó mediante la introducción de mutaciones en los oligonucleótidos utilizados para su amplificación y la fusión de los fragmentos mutados por PCR. Los plásmidos que expresaban estas versiones mutantes de R3B2 fusionadas a la etiqueta 6xHis se utilizaron para transformar la estirpe BL21(DE3) de *E. coli* e inducir la expresión de las diferentes proteínas recombinantes. El rendimiento de la purificación fue similar al de la proteína silvestre en los tres casos, obteniéndose concentraciones suficientes para la determinación de la actividad *in vitro* (Figura 28C).

Las variantes en K84, junto con la proteína silvestre, se sometieron al ensayo de actividad RNasa frente a ssRNA y dsRNA derivados del gen *carB*. Al igual que en el caso de las variantes en el centro catalítico, la sustitución de K84 por alanina, glutámico o glutamina no provocó cambios en la actividad o especificidad de R3B2 (Figura 28D). Estos resultados sugieren que R3B2 podría unir el RNA de forma diferente a la observada en los casos de *AaRIII* y *ScRNT1* impidiendo la actuación de ambos centros catalíticos para cortar dsRNA, o que la unión del RNA podría inducir cambios conformacionales que afectan al centro catalítico de R3B2.

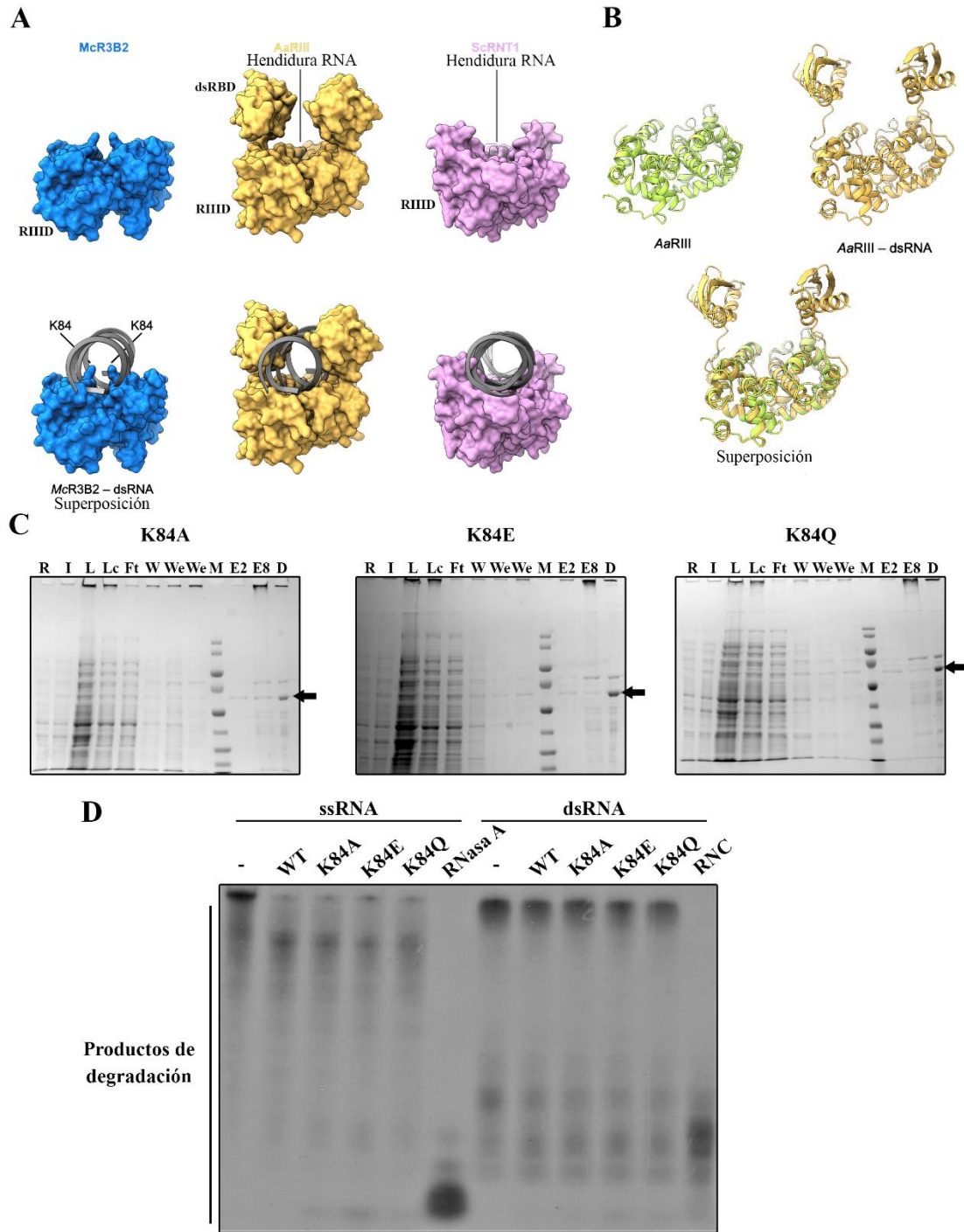


Figura 28. Análisis de unión de RNA al RIID de R3B2 y actividad *in vitro* de las variantes en K84.

A) Superficie del RIID dimerizado de R3B2 y comparación con el dímero de AaRIII (PDB: [2NUG](#)) y con el de ScRNT1 (PDB: [5T16](#)). Para simplificar no se muestran los dsRBD de ScRNT1. Arriba se muestran las estructuras con el RNA y abajo unidas al dsRNA que ha sido modelado en el sitio de R3B2. B) Superposición de la estructura de AaRIII en ausencia (verde; PDB [1I4S](#)) y presencia (amarillo) de dsRNA. C) Purificación de las variantes en K84 analizadas en geles 10% SDS-PAGE. Se indica con una flecha la proteína purificada en cada caso. D) Ensayo de actividad RNasa de las variantes en K84 frente a ssRNA y dsRNA (20 nM *carB* ssRNA; 10 nM *carB* dsRNA; concentración de proteína: 150 nM). Como control positivo se incubó la idéntica cantidad del mismo ssRNA con 1U de RNasa A (Cat. R6513, Sigma) o del mismo dsRNA con 150 nM de RNC de *E. coli*. R, cultivo sin inducir; I, cultivo inducido; L, lisado; Lc, lisado tras centrifugar; Ft, proteínas no unidas a la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% EB; M, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific); E2-8, eluciones de la matriz Ni-NTA con STB al 20% o al 80% de EB; D, proteína dializada.

IV.2. Caracterización *in vivo* de R3B2

El género al que pertenece el hongo *M. lusitanicus* es uno de los principales causantes de la mucormicosis (Cornely et al., 2019). La concienzuda investigación llevada a cabo sobre este hongo para diseccionar su maquinaria de RNAi y caracterizar su control sobre la expresión de genes endógenos, incluidos aquellos relacionados con la virulencia, supone la existencia de un gran modelo para el desarrollo de tratamientos efectivos contra la mucormicosis (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016). Los diferentes estudios realizados a lo largo del tiempo han puesto de manifiesto la existencia de una compleja interrelación de las tres rutas de RNAi presentes en este hongo. Así, mientras que la proteína R3B2 es necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta canónica de silenciamiento (Trieu et al., 2015), el funcionamiento de la NCRIP reprime la generación de epimutantes y la producción de siRNA derivados de transposones (Calo et al., 2014, 2017; Pérez-Arques et al., 2020). Estos resultados llevaron a plantear que la NCRIP compete por los aRNA con la ruta de generación de epimutantes (Calo et al., 2017) y que, al mismo tiempo, R3B2 participa de una forma desconocida en la ruta canónica de silenciamiento (Trieu et al., 2015).

La segunda parte de esta tesis se centró en la caracterización *in vivo* de la interconexión de las rutas de RNAi mediada por R3B2 y el papel de los dominios dsRBD de esta proteína en el funcionamiento de dichas rutas.

IV.2.1. Análisis de interacción de R3B2 con los componentes de RNAi

Las interacciones entre proteínas pueden regular o alterar las funciones de las mismas. Estas interacciones también se han descrito para las enzimas de tipo Dicer, encontrándose en la mayoría de organismos que estas proteínas se acompañan de, al menos, una proteína con dominios dsRBD. Es el caso de la interacción de Dicer con TRBP o PACT en humanos (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006), de las Dicer con HYL1/DRB1, DRB3 y DRB4 en *A. thaliana* (Hiraguri et al., 2005; Raja et al., 2014), de Dicer-1 con Loquacious y Dicer-2 con R2D2 en *Drosophila melanogaster* (Liu et al., 2003; Saito et al., 2005) y de Dicer con RDE-4 en *C. elegans* (Tabara et al., 2002). En *M. lusitanicus* nunca se habían estudiado las posibles interacciones entre las proteínas del RNAi ni se habían identificado acompañantes de las proteínas Dicer, por lo que se decidió realizar una aproximación de Y2H para identificar dichas interacciones y determinar su relación con la regulación de los diferentes mecanismos de silenciamiento génico.

Para obtener el cDNA de los genes que codifican las proteínas del silenciamiento de *M. lusitanicus* (Figura 7), el RNA extraído de la estirpe R7B fue retrotranscrito utilizando Expand™ Reverse Transcriptase (Cat. 11785826001; Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el cDNA resultante se realizó una primera PCR utilizando un oligonucleótido directo específico de la región 5' de cada gen (Véase III.3.2) y el oligonucleótido reverso Race-T común a los extremos 3' de los mRNA de todos los genes. Con cada uno de los productos obtenidos se realizó una segunda PCR con los

oligonucleótidos, directo y reverso, específicos en las regiones 5' y 3' de cada gen, diseñados para que cada gen sea clonado en pACTII en fase con Gal4_{AD}. Los genes analizados fueron *ago-1*, *dicer-1*, *dicer-2*, *qip*, *rdrp-1*, *rdrp-2*, *rdrp-3*, *r3b2* y *rnhA*, a los que se sumaron los genes *ago-2* y *ago-3*, aunque no se ha establecido una relación con los mecanismos de RNAi de *M. lusitanicus* (Cervantes et al., 2013). Los cDNA fueron clonados en pACTII y secuenciados (Véase III.3.2). La secuenciación del cDNA de *ago-2* reveló que, tal y como se había observado previamente, existe un codón sin sentido prematuro en el triplete 347 que interrumpe el marco de lectura abierto y el hipotético intrón anotado en el genoma entre los exones 4 y 5 no se procesa (Cervantes et al., 2013), por lo que los dos exones y el hipotético intrón forman en realidad un solo exón. La secuenciación del cDNA de *ago-3* reveló la presencia de una mutación sinónima que afecta al codón de la leucina 34, L34. La secuenciación del cDNA de *dicer-1* reveló la presencia de un intrón adicional que no afecta al marco de lectura, pero elimina 26 aminoácidos (del 1447 al 1472) tras el dominio RIIIDb, dando lugar a una proteína de 1503 aminoácidos. Este intrón adicional no había sido descrito previamente, pero está conservado evolutivamente en *R. oryzae* (Nicolás et al., 2007). La secuencia del cDNA de *rdrp-3* reveló que el hipotético intrón 3 anotado en el genoma no se procesa y forma parte junto con los exones 3 y 4 del mismo exón, junto con las primeras 84 pb del intrón 4 que es más corto de lo que está anotado en el genoma. Estos cambios dan lugar a una proteína de 1214 aminoácidos en lugar de los 1147 anotados o los 1210 descritos en la bibliografía (Calo et al., 2017). La secuencia del cDNA de *rnhA* reveló que el intrón 6 es más corto que el anotado en el genoma, formando parte del exón 7 sus últimas 84 pb. Esta incorporación da lugar a una proteína de 1259 aminoácidos con una inserción de 28 aminoácidos en su dominio de dedos de zinc NF-X1 de extremo carboxilo de la proteína. Cuando se quiso obtener la fusión de esas proteínas con el Gal4_{BD}, los diferentes cDNA se amplificaron a partir de los plásmidos anteriores y se clonaron en el vector pBD-Gal4 (Véase III.3.2).

Los plásmidos derivados de pACTII se utilizaron para transformar las levaduras de la estirpe PJ69-4 α y los derivados de pBD-Gal4 para la estirpe PJ69-4a. Con los *stocks* de levaduras generados se procedió a realizar el ensayo de Y2H (Véase III.2.3) llevando a cabo todas las combinaciones posibles de cebo y presa entre las proteínas del silenciamiento, incluyendo los *stocks* de R3B2 generados anteriormente (Véase IV.1.3). Gotas de las estirpes diploides resultado del cruzamiento en todas las posibles combinaciones, se depositaron en medio SD-WL (control), SD-WLH + 2,5 mM 3AT (interacción débil) y SD-WLA (interacción fuerte). El crecimiento en los diferentes medios selectivos se siguió durante dos semanas detectándose las interacciones fuertes de R3B2 consigo misma y de R3B2 con Dicer-1 (Figura 29). Adicionalmente se detectó una interacción débil que sugirió la dimerización de RdRP-1 y otra interacción débil en una sola combinación de cebo y presa de Dicer-2 y R3B2 (Figura 29).

Gal4 ^{AD} / Gal4 ^{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
- / -			
Ago-1 / -			
Ago-2 / -			
Ago-3 / -			
Dicer-1 / -			
Dicer -2 / -			
Qip / -			
R3B2 / -			
RdRP-1 / -			
RdRP-2 / -			
RdRP-3 / -			
RnhA / -			
- / Ago-1			
- / Ago-2			
- / Ago-3			
- / Dicer-1			
- / Dicer-2			
- / Qip			
- / R3B2			
- / RdRP-1			
- / RdRP-2			
- / RdRP-3			
- / RnhA			
Ago-1 / Ago-1			
Ago-1 / Ago-2			
Ago-1 / Ago-3			
Ago-1 / Dicer-1			
Ago-1 / Dicer-2			
Ago-1 / Qip			
Ago-1 / R3B2			
Ago-1 / RdRP-1			
Ago-1 / RdRP2			
Ago-1 / RdRP3			
Ago-1 / RnhA			
Ago-2 / Ago-1			
Ago-2 / Ago-2			

Gal4 ^{AD} / Gal4 ^{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
Ago-2 / Ago-3			
Ago-2 / Dicer-1			
Ago-2 / Dicer-2			
Ago-2 / Qip			
Ago-2 / R3B2			
Ago-2 / RdRP-1			
Ago-2 / RdRP-2			
Ago-2 / RdRP-3			
Ago-2 / RnhA			
Ago-3 / Ago-1			
Ago-3 / Ago-2			
Ago-3 / Ago-3			
Ago-3 / Dicer-1			
Ago-3 / Dicer-2			
Ago-3 / Qip			
Ago-3 / R3B2			
Ago-3 / RdRP-1			
Ago-3 / RdRP-2			
Ago-3 / RdRP-3			
Ago-3 / RnhA			
Dicer-1 / Ago-1			
Dicer-1 / Ago-2			
Dicer-1 / Ago-3			
Dicer-1 / Dicer-1			
Dicer-1 / Dicer-2			
Dicer-1 / Qip			
Dicer-1 / R3B2			
Dicer-1 / RdRP1			
Dicer-1 / RdRP2			
Dicer-1 / RdRP3			
Dicer-1 / RnhA			
Dicer-2 / Ago-1			
Dicer-2 / Ago-2			
Dicer-2 / Ago-3			
Dicer-2 / Dicer-1			
Dicer-2 / Dicer-2			

Gal4 ^{AD} / Gal4 ^{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
Dicer-2 / Qip			
Dicer-2 / R3B2			
Dicer-2 / RdRP-1			
Dicer-2 / RdRP-2			
Dicer-2 / RdRP-3			
Dicer-2 / RnhA			
Qip / Ago-1			
Qip / Ago-2			
Qip / Ago-3			
Qip / Dicer-1			
Qip / Dicer-2			
Qip / Qip			
Qip / R3B2			
Qip / RdRP-1			
Qip / RdRP-2			
Qip / RdRP-3			
Qip / RnhA			
R3B2 / Ago-1			
R3B2 / Ago-2			
R3B2 / Ago-3			
R3B2 / Dicer-1			
R3B2 / Dicer-2			
R3B2 / Qip			
R3B2 / R3B2			
R3B2 / RdRP-1			
R3B2 / RdRP-2			
R3B2 / RdRP-3			
R3B2 / RnhA			
RdRP-1 / Ago-1			
RdRP-1 / Ago-2			
RdRP-1 / Qip			
RdRP-1 / R3B2			
RdRP-1 / RdRP-1			
RdRP-1 / RdRP-2			
RdRP-1 / RdRP-3			
RdRP-1 / RnhA			

Gal4 ^{AD} / Gal4 ^{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
RdRP-1 / RdRP-2			
RdRP-1 / RdRP-3			
RdRP-1 / RnhA			
RdRP-2 / Ago-1			
RdRP-2 / Ago-2			
RdRP-2 / Ago-3			
RdRP-2 / Dicer-1			
RdRP-2 / Dicer-2			
RdRP-2 / Qip			
RdRP-2 / R3B2			
RdRP-2 / RdRP-1			
RdRP-2 / RdRP-2			
RdRP-2 / RdRP-3			
RdRP-2 / RnhA			
RdRP-3 / Ago-1			
RdRP-3 / Ago-2			
RdRP-3 / Ago-3			
RdRP-3 / Dicer-1			
RdRP-3 / Dicer-2			
RdRP-3 / Qip			
RdRP-3 / R3B2			
RdRP-3 / RdRP-1			
RdRP-3 / RdRP-2			
RdRP-3 / RdRP-3			
RdRP-3 / RnhA			
RnhA / Ago-1			
RnhA / Ago-2			
RnhA / Ago-3			
RnhA / Dicer-1			
RnhA / Dicer-2			
RnhA / Qip			
RnhA / R3B2			
RnhA / RdRP-1			
RnhA / RdRP-2			
RnhA / RdRP-3			
RnhA / RnhA			

Figura 29. Análisis de interacción de las proteínas conocidas de RNAi de *M. lusitanicus*.

Resultado del ensayo de Y2H con todas las combinaciones de presa y cebo posibles entre las proteínas del silenciamiento de *M. lusitanicus* mediante la siembra de gotas de estirpes diploides en medio control (SD-WL) y en medios para la selección de interacción débil (SD-WLH + 2,5 mM 3AT) y fuerte (SD-WLA) durante 15 días a 30°C. “-“ indica que se utilizó un vector vacío.

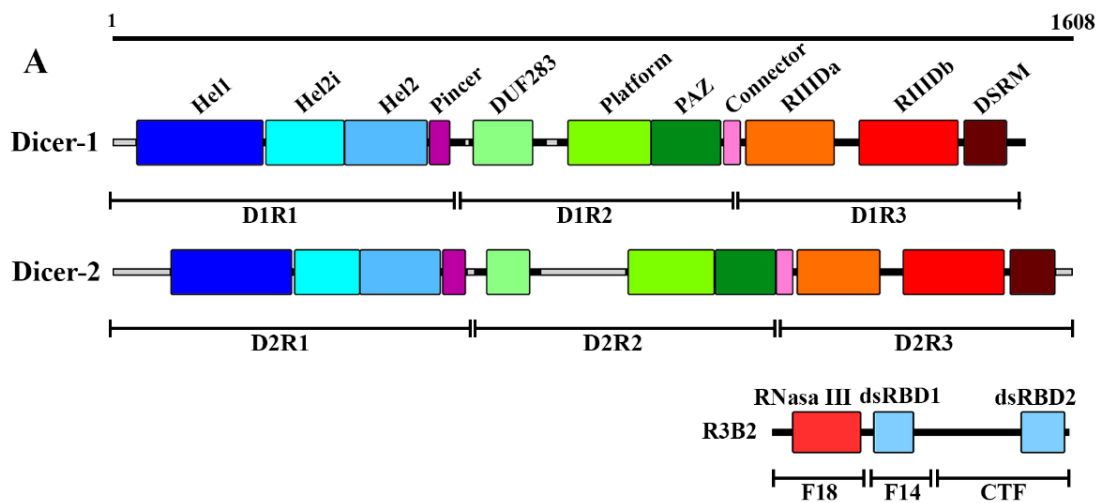
Aunque RdRP-1 muestra una interacción débil consigo misma en estas condiciones, la dimerización de este tipo de proteínas ha sido bien descrita en otros hongos como *N. crassa* (Salgado et al., 2006). Por otro lado, el hecho de que la interacción de R3B2 con Dicer-1 fuese fuerte, mientras que la detectada con Dicer-2 fuese más débil, sugirió que la naturaleza de esta interacción con ambas proteínas Dicer es diferente, posiblemente relacionada con sus diferentes funciones biológicas. Así, Dicer-2 es la proteína requerida para el silenciamiento inducido por transgenes de la RNAi canónica, donde R3B2 muestra un papel positivo (De Haro et al., 2009; Trieu et al., 2015), mientras que las dos Dicer

son necesarias para el funcionamiento de la ruta epimutacional, regulada negativamente por R3B2 (Calo et al., 2017). Estos datos sugieren que la interacción de R3B2 con Dicer-1 puede tener un carácter inhibitorio y supone la primera identificación de una proteína acompañante de Dicer con dominios dsRBD en *M. lusitanicus*.

IV.2.2. Caracterización de las interacciones de R3B2 y las proteínas Dicer

La detección de la interacción de R3B2 con Dicer-1 y Dicer-2 supuso la primera evidencia directa de una relación física entre la NCRIP y las rutas canónicas de RNAi. Para profundizar en dichas interacciones e intentar determinar el motivo de su diferente intensidad se procedió a caracterizar las regiones de cada miembro involucradas en las mismas. Las proteínas Dicer-1 y Dicer-2 se dividieron en base a su arquitectura de dominios en tres regiones (R1, R2 y R3) (Figura 30A). La R1 de Dicer-1 (D1R1, aminoácidos 1-606) contiene los tres dominios que forman la helicasa en la región N-terminal, la R2 (D1R2, aminoácidos 598-1045) contiene los dominios centrales DUF283, *platform* y PAZ y la R3 (D1R3, aminoácidos 1042-1503) contiene los dos dominios RNasa III y el dsRBD C-terminal (DSRM). La misma división se realizó en Dicer-2 (Figura 30A), obteniéndose la R1 (D2R1, aminoácidos 1-600), la R2 (D2R2, aminoácidos 601-1100) y la R3 (D2R3, aminoácidos 1101-1608).

Los fragmentos que producen cada una de estas regiones en los dos genes se amplificaron por PCR y se clonaron en fase con Gal4_{AD} en el vector del sistema de dos híbridos pACTII (Véase III.3.2). Los plásmidos que contenían las diferentes regiones de las proteínas Dicer se utilizaron para transformar la estirpe PJ69-4 α y se generaron los *Stocks* (Véase III.2.3). A continuación, se procedió a analizar la interacción de cada uno de estos fragmentos con las regiones de R3B2 (Figura 30A) caracterizadas previamente (Véase IV.1.2) mediante un ensayo de Y2H. La interacción de las regiones de R3B2 con las proteínas Dicer (Figura 30B) reveló que tanto F14, la región que contiene el dsRBD1, como CTF, la región que contiene el dsRBD2, son capaces de interactuar con Dicer-1 de forma débil e intensa, respectivamente. En cambio, solo se detectó una interacción débil entre la región CTF de R3B2 y Dicer-2. El ensayo recíproco, enfrentando las regiones de las Dicer a R3B2 (Figura 30C), reveló que la interacción con Dicer-1 se produce de forma débil a través de D1R1 y de forma intensa a través de D1R2. Por el contrario, no se detectó interacción de las regiones de Dicer-2 con R3B2 completa, sugiriendo que esta interacción podría involucrar a más de una región de Dicer-2 o que se trataba de una interacción demasiado débil para ser detectada en estas condiciones. Finalmente, los ensayos entre las regiones de R3B2 y Dicer-1 que habían mostrado resultados positivos (Figura 30D) revelaron que la interacción débil involucraba a F14 de R3B2 y a la D1R1 y la interacción fuerte a las regiones CTF de R3B2 y D1R2.



B

Gal4 _{AD} / Gal4 _{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
- / -			
- / F18			
- / F14			
- / CTF			
- / R3B2			
Dicer-1 / -			
Dicer-2 / -			
Dicer-1 / F18			
Dicer-1 / F14			
Dicer-1 / CTF			
Dicer-1 / R3B2			
Dicer-2 / F18			
Dicer-2 / F14			
Dicer-2 / CTF			
Dicer-2 / R3B2			

C

Gal4 _{AD} / Gal4 _{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
- / -			
D1R1 / -			
D1R2 / -			
D1R3 / -			
Dicer-1 / -			
D2R1 / -			
D2R2 / -			
D2R3 / -			
Dicer-2 / -			
- / R3B2			
D1R1 / R3B2			
D1R2 / R3B2			
D1R3 / R3B2			
Dicer-1 / R3B2			
D2R1 / R3B2			
D2R2 / R3B2			
D2R3 / R3B2			
Dicer-2 / R3B2			

D

Gal4 _{AD} / Gal4 _{BD}	Control	Interacción Débil	Interacción Fuerte
- / -			
D1R1 / -			
D1R2 / -			
Dicer-1 / -			
- / F14			
- / CTF			
- / R3B2			
D1R1 / F14			
D1R1 / CTF			
D1R2 / F14			
D1R2 / CTF			
Dicer-1 / R3B2			

Figura 30. Interacción entre R3B2 y las proteínas Dicer.

A) Representación de la arquitectura de dominios de las proteínas Dicer-1, Dicer-2 y R3B2, basada en su predicción estructural (Véase IV.2.5), donde se indican las regiones en las que han sido divididas para analizar su interacción. B) Ensayo de Y2H realizado con gotas de diploides para determinar las regiones de R3B2 que interaccionan con las proteínas Dicer tras dos semanas de crecimiento en SD-WL (control), SD-WLH + 3AT (Interacción débil) y SD-WLA (Interacción fuerte). C) Lo mismo que en B pero utilizando las regiones de las proteínas Dicer frente a R3B2. D) Lo mismo que en B pero enfrentado las regiones que interaccionan de Dicer-1 y R3B2.

IV.2.3. Papel de los dominios dsRBD de R3B2 en los mecanismos de RNAi

Las interacciones descritas en el apartado anterior junto con la consideración de que R3B2 no solo es la RNasa central de la NCRIP, sino que también tiene un papel importante en la maquinaria canónica de silenciamiento (Calo et al., 2017; Pérez-Arques et al., 2020; Trieu et al., 2015), sugerían que los dominios dsRBD de R3B2 podían ser importantes para su función en ambas rutas. Por este motivo, se comprobó el efecto *in vivo* de la mutación o delección de estos dominios previamente caracterizadas *in vitro* (Véase IV.1.4 y IV.1.5.2).

IV.2.3.1. Obtención de estirpes portadoras de alelos mutados de *r3b2*

La estirpe *r3b2* Δ , MU412, solo presenta un marcador de selección, *leuA*, para su manipulación genética (Trieu et al., 2015), por lo que no se puede realizar su edición genética y la posterior transformación con el vector que desencadena el silenciamiento mediado por transgenes para medir la frecuencia de silenciamiento génico porque faltaría un marcador de selección. Por otro lado la posibilidad de la integración de los alelos en el locus *carRP* (Nicolás et al., 2018), uno de los genes estructurales de la carotenogénesis, no es factible ya que impediría el estudio de la frecuencia de silenciamiento que está basada precisamente en la cuantificación de los transformantes con carotenogénesis defectuosa debido al silenciamiento del gen *carB* (De Haro et al., 2009). De modo que la introducción de los distintos alelos mutados de *r3b2* se realizó mediante reemplazamiento del alelo silvestre en su propio locus en la estirpe MU402. Esta estirpe presenta una doble auxotrofia, de modo que se puede utilizar el marcador seleccionable *pyrG*, que complementa la auxotrofia para uracilo, para realizar el reemplazamiento génico, y emplear el segundo marcador, *leuA*, en el vector que dispara el silenciamiento mediado por transgenes.

Para realizar este reemplazamiento génico se requiere la construcción de cada uno de los alelos de interés con el promotor de *r3b2*, la mutación correspondiente en cada caso, la región 3'-UTR y el marcador seleccionable (gen *pyrG*) flanqueados por las secuencias aguas arriba y aguas abajo del locus *r3b2*. La presencia de las secuencias flanqueantes en cada uno de los fragmentos obtenidos permite que, tras la recombinación homóloga, el gen *r3b2* sea sustituido por el correspondiente alelo silvestre o mutado seguido del marcador de selección (Figura 31A y 31B). El alelo silvestre de *r3b2* se sustituyó por el propio alelo silvestre seguido del marcador *pyrG*, que fue el control positivo, por el alelo Δ H2, un alelo mutado que produce una variante de R3B2 carente de la segunda hélice α del dsRBD1 (aminoácidos 219-235), por RBD2*, un alelo mutado que produce una R3B2 con mutaciones puntuales en los residuos de unión al RNA del dsRBD2 (Véase IV.1.4), por Δ CTF, un alelo mutado que produce una proteína sin la región C-terminal donde está el dsRBD2 y por *r3b2* Δ , un fragmento en el que la secuencia codificante se eliminó completamente dejando solo el marcador de selección a modo de control negativo (Figura 13 y 31A).

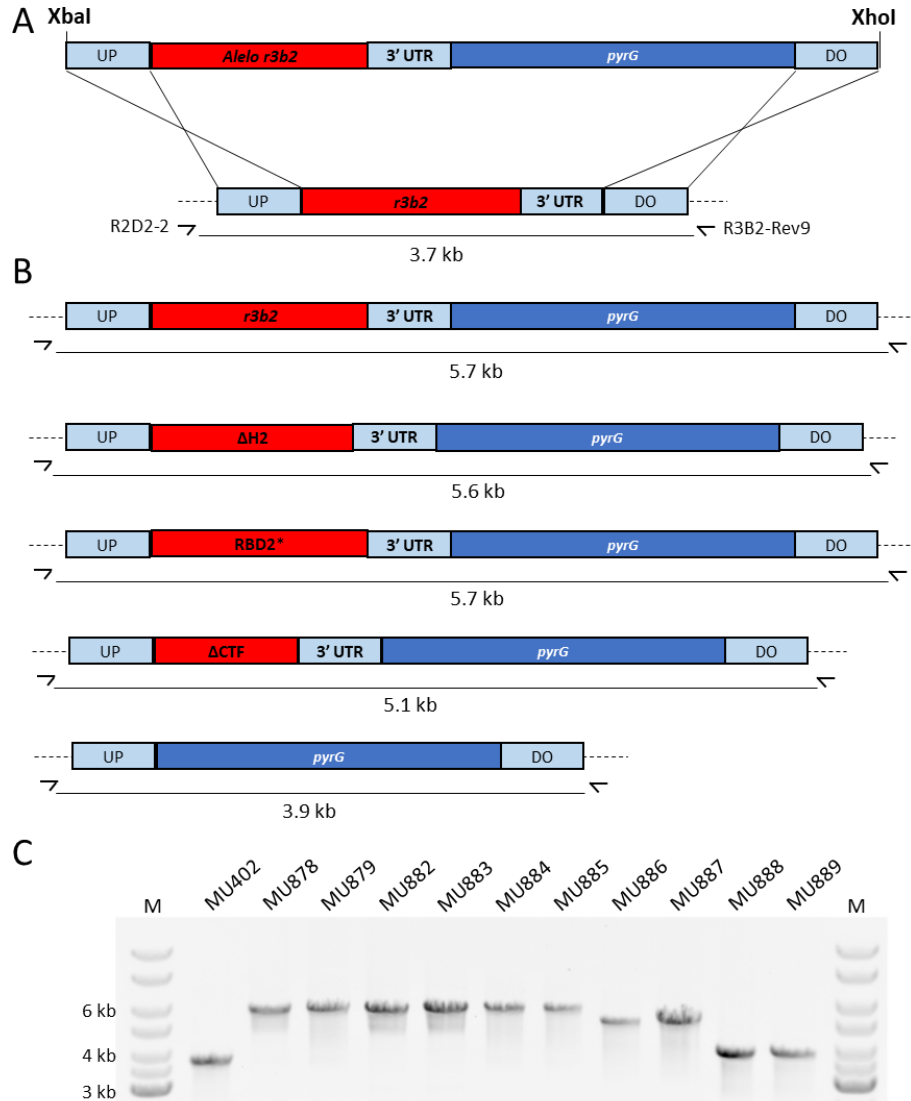


Figura 31. Obtención de estirpes recombinantes de *M. lusitanicus* en el locus *r3b2*.

A) Representación de la recombinación homóloga de los fragmentos de reemplazamiento (arriba) en el locus *r3b2* (abajo). B) Representación de los fragmentos de reemplazamiento utilizados para cada alelo de *r3b2* y producto de PCR esperado tras la integración en el locus *r3b2* utilizando los oligonucleótidos indicados en A (R2D2-2 y R3B2-Rev9). C) Productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos indicados en A para amplificar el locus *r3b2* en la estirpe parental y las mutantes generadas en este trabajo. M, GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

La transformación de la estirpe MU402 con cada uno de los fragmentos lineales produjo 23, 11, 118, 21 y 31 transformantes *pyrG*⁺ en medio mínimo MMC para los fragmentos que codifican R3B2 silvestre, ΔH , RBD2*, ΔCTF y el control negativo, respectivamente. Las esporas de *M. lusitanicus* son multinucleadas, por lo que los transformantes iniciales producen esporas con una mezcla de núcleos transformados y silvestres (heterocariontes). Para obtener individuos homocariontes con solo núcleos transformados es necesario someter a estos transformantes a sucesivos ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo (Navarro et al., 2001). Se seleccionaron 8 transformantes para cada construcción y se sometieron a 6 ciclos de crecimiento vegetativo tocando colonias esporuladas y sembrando las esporas recolectas por estría en una nueva placa de MMC. Tras el último ciclo, se extrajo DNA de cada uno de los transformantes (Véase III.3.4) y se analizó mediante PCR para determinar si se trataba de

estirpes homocariontes portadoras del reemplazamiento del locus *r3b2* (Figura 31A) para cada uno de los alelos que codifican las variantes mutadas de R3B2. Debido a que los alelos estaban dirigidos a su propio *locus*, el evento de recombinación en la región aguas arriba del marcador de selección, que incluye la región codificante del alelo, podía resultar en la incorporación o no de la mutación de interés. Para comprobar si se había integrado la mutación, se amplificó todo el locus con cebadores (R2D2-2 y R3B2-Rev9) que hibridaban en regiones fuera de los fragmentos de reemplazamiento. Estos cebadores amplificaban un fragmento de 3,7 kb en el caso del locus silvestre (Figura 31A) y fragmentos de 5,7 kb para la integración de la versión silvestre con el marcador en el sitio correcto por recombinación homóloga, 5,6 kb para la variante Δ H2, 5,7 kb para la variante RBD2*, 5,1 kb para la variante Δ CTF y 3,9 kb para el control negativo (Figura 31B). En base al resultado de la PCR se seleccionaron 2 transformantes que amplificaban solo un fragmento del tamaño esperado para cada construcción (Figura 31C), indicando que portaban la integración correcta en homocigosis. El locus *r3b2* de cada transformante se amplificó y se secuenció para confirmar que contenían las mutaciones deseadas. Las estirpes portadoras del alelo silvestre se denominaron MU878 y MU879, las portadoras del alelo que codifica Δ H2, MU882 y MU883, las portadoras del alelo que codifica RBD2*, MU884 y MU885, las portadoras del alelo que codifica Δ CTF, MU886 y MU887, y las portadoras de la delección de gen *r3b2*, MU888 y MU889 (Figura 31C).

IV.2.3.2. Papel de los dominios dsRBD en el silenciamiento génico

Para analizar la capacidad de las estirpes portadoras de versiones mutantes de R3B2 para llevar a cabo el silenciamiento génico inducido por transgenes, se transformaron las dos estirpes obtenidas para cada reemplazamiento génico, obtenidas en el apartado anterior, con el plásmido autoreplicativo pMAT1253 (De Haro et al., 2009). Este plásmido expresa una horquilla bicatenaria de RNA derivada del gen *carB* capaz de disparar el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en la estirpe silvestre. El gen *carB* se ha utilizado tradicionalmente como chivato para detectar el silenciamiento génico porque cifra una de las enzimas necesarias para la síntesis de β -caroteno, un pigmento amarillo que se acumula en la estirpe silvestre de *M. lusitanicus* (Calo et al., 2012; De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2003; Trieu et al., 2015). El silenciamiento de este gen provoca la aparición de colonias con parches albinos, de modo que puede estimarse el efecto de las mutaciones en R3B2 en el silenciamiento inducido por transgenes a través del análisis de la frecuencia de transformantes con sectores albinos. La transformación se realizó dos veces en las estirpes MU878, MU882, MU884, MU886 y MU888, y una vez en las estirpes MU879, MU883, MU885, MU887 y MU889. Los transformantes obtenidos se transfirieron a medio YNB pH 3,5 sólido y se incubaron durante 48-72 h a 26°C en condiciones de iluminación continua para cuantificar la proporción de transformantes con parches blancos.

La media ponderada de las frecuencias de silenciamiento obtenidas para las tres transformaciones de cada genotipo (Tabla 11) mostró que la estirpe que llevaba el alelo

silvestre del gen *r3b2* producía un 91,8 % de individuos con parches albinos, mientras que la delección del gen *r3b2* reducía la frecuencia de silenciamiento hasta el 53,1 %, confirmando que este gen es necesario para el correcto funcionamiento del silenciamiento mediado por transgenes (Trieu et al., 2015). De la misma forma, la delección de parte del dominio dsRBD1 practicada en $\Delta H2$ o de la región del dsRBD2 en ΔCTF , disminuyó la frecuencia de silenciamiento a niveles similares a los obtenidos para el mutante nulo con un 34,9 y 53,9 %, respectivamente. En cambio, las mutaciones en RBD2* no mostraron efecto sobre el funcionamiento de la ruta de silenciamiento inducida por transgenes ya que la frecuencia de silenciamiento permanecía por encima del 90%.

El hecho de que las delecciones en los dominios dsRBD1 y dsRBD2 afecten al silenciamiento y que estos dominios intervengan en las interacciones de R3B2 con las proteínas Dicer, sugiere que esas interacciones son necesarias para el correcto funcionamiento de la ruta de silenciamiento canónico mediada por transgenes.

Tabla 11. Frecuencia de silenciamiento inducida por pMAT1253 en las estirpes de *M. lusitanicus* portadoras de alelos mutados de *r3b2*.

Genotipo	Estirpe	Transformantes			Frecuencia de silenciamiento (%)	Media ponderada (%)*	SD** (%)
		Amarillos	Albinos	Total			
WT	MU878	2	115	117	98,3	91,8	6,2
	MU878	15	128	143	89,5		
	MU879	11	70	81	86,4		
$\Delta H2$	MU882	33	17	50	34,0	34,9	10,0
	MU882	96	37	133	27,8		
	MU883	41	37	78	47,4		
RBD2*	MU884	2	110	112	98,2	93,0	5,3
	MU884	12	136	148	91,9		
	MU885	10	71	81	87,7		
ΔCTF	MU886	40	86	126	68,3	53,9	16,1
	MU886	67	38	105	36,2		
	MU887	39	47	86	54,7		
<i>r3b2</i> Δ	MU888	34	38	72	52,8	53,1	2,0
	MU888	75	90	165	54,5		
	MU889	40	41	81	50,6		

* Se indica en negrita las estirpes que mostraron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$) en un ANOVA de una vía seguido de un test de diferencia significativa honesta (*honestly-significant-difference* o HSD) de Tukey.

** SD, desviación estándar.

IV.2.3.3. Papel de los dominios dsRBD en la NCRIP

La proteína R3B2 es la RNasa central de la NCRIP que regula la expresión génica a través de la degradación de mensajeros específicos (Trieu et al., 2015). El funcionamiento de esta ruta se ha medido mediante el empleo de técnicas de hibridación tipo *Northern* para estudiar la acumulación de mensajeros regulados por esta ruta (Calo et al., 2017; Trieu et al., 2015). Este tipo de técnicas requieren de un largo y laborioso

proceso de electroforesis, transferencia e hibridación con sondas marcadas radiactivamente que puede ser sustituido mediante la puesta a punto de la medición de los mensajeros por PCR cuantitativa en tiempo real (*real time quantitative PCR* o RT-qPCR).

La medición del funcionamiento de la NCRIP se realizó utilizando el gen *rvt* (IDv2 156292). Este es una diana directa de la NCRIP seleccionada a partir de un análisis transcriptómico que había sido previamente validado en nuestro laboratorio (Ghizlane Tahiri, comunicación personal). Las estirpes de *M. lusitanicus* que portaban cada uno de los diferentes alelos del gen *r3b2* (Figura 32A) se sembraron en cajas de medio YPG pH 4,5 a razón de $2,5 \cdot 10^5$ esporas por caja y se dejaron crecer durante 24 h en condiciones de iluminación continua para obtener un micelio joven y homogéneo que cubriese la superficie de cada caja.

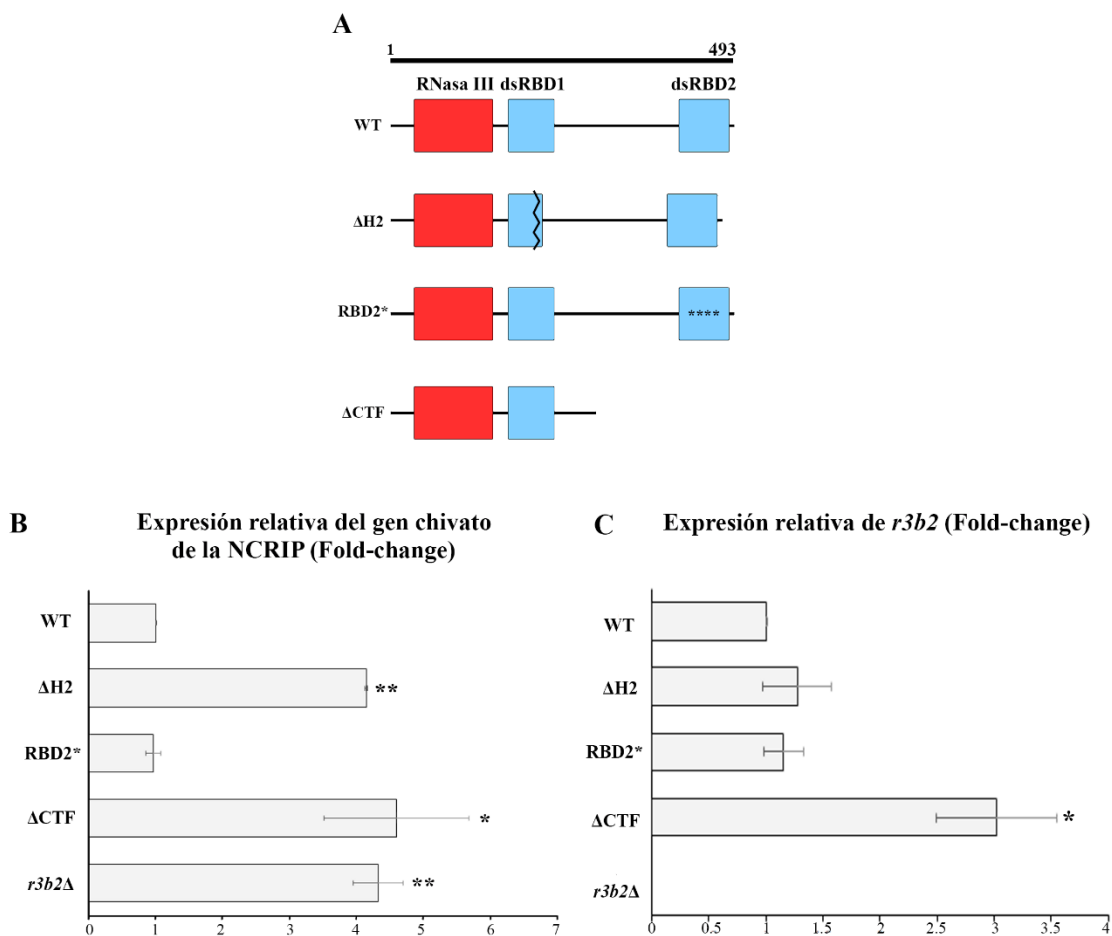


Figura 32. Funcionamiento de la NCRIP en las estirpes de *M. lusitanicus* portadoras de alelos mutados de *r3b2*. A) Representación de las variantes de R3B2 introducidas en las estirpes de *M. lusitanicus* analizadas en B y C. B) Expresión relativa del gen *rvt* como nuevo chivato de la NCRIP determinada mediante RT-qPCR y normalizados respecto al gen *ef-1*. C) Expresión relativa del gen *r3b2* determinada mediante RT-qPCR y normalizados respecto al gen *ef-1*. Los asteriscos indican diferencias de expresión significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$) en un ANOVA de una vía seguido de un test HSD de Tukey.

Al igual que sucedió para la frecuencia de silenciamiento (Véase IV.2.3.2), el análisis de la acumulación de mRNA del gen *rvt*, mediante RT-qPCR, reveló que las estirpes que expresaban la variante RBD2*, con mutaciones en los residuos que afectan a la unión del RNA del dsRBD2, se comportaban de manera similar a las portadoras de

la construcción silvestre, mientras que las portadoras de las variantes $\Delta H2$ y ΔCTF mostraban un aumento significativo de la acumulación del gen chivato, similar al de las estirpes $r3b2\Delta$ (Figura 32B). Estos resultados sugirieron que el dominio dsRBD1 y la región portadora del dsRBD2 son necesarios para el correcto funcionamiento de la NCRIP *in vivo*.

Para comprobar que los resultados obtenidos no se debían a diferencias en el nivel de expresión de los distintos alelos de $r3b2$, se midió esta expresión mediante RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos R3B2-qPCR-Fow4 y R3B2-qPCR-Rev4 que mostraron una eficiencia de 99,5 %. No se observaron variaciones significativas en la expresión de las diferentes versiones de R3B2, salvo en la versión de las estirpes ΔCTF , que mostraron un aumento de expresión de unas 3 veces respecto al resto (Figura 32C). Aun así, la sobreexpresión del alelo Δctf no fue capaz de rescatar el fenotipo $r3b2^-$.

IV.2.3.4. Estudio de la virulencia de las estirpes portadoras de alelos mutados de $r3b2$

Los estudios previos del grupo de investigación habían puesto de manifiesto la necesidad de una NCRIP funcional para la virulencia de *M. lusitanicus* (Pérez-Arques et al., 2020). Dado que las mutaciones practicadas en las regiones de R3B2, implicadas en las interacciones con las proteínas Dicer, mostraban un efecto negativo sobre los mecanismos de RNAi del hongo, se procedió a analizar sus consecuencias sobre la virulencia. El efecto sobre la virulencia de las mutaciones en R3B2 se midió en la especie *Galleria mellonella* que se ha utilizado de forma habitual para estudiar las infecciones fúngicas debido a su sencillez de manejo, bajo coste y coherencia con otros modelos animales más complejos (Maurer et al., 2019; Trieu et al., 2017).

En consonancia con los resultados de virulencia previamente analizados en ratón (Pérez-Arques et al., 2020), las larvas de *G. mellonella* infectadas con la estirpe $r3b2^-$ (MU412) mostraron un descenso significativo de la supervivencia de hasta el 45% respecto a las larvas no tratadas, pero inferior al encontrado cuando se utilizó la estirpe control R7B, cuya supervivencia fue del 6,6% (Figura 33). Las estirpes que expresaban la versión $\Delta H2$ (MU883) con la delección en el dsRBD1, la versión truncada ΔCTF (MU886) que carecía del dsRBD2 y la versión $\Delta r3b2$ (MU889) mostraron unas tasas de supervivencia de 48, 53 y 47%, respectivamente, similares a la estirpe que carece de $r3b2$. Por último, la estirpe RBD2* (MU884) presentó una tasa de supervivencia (23%) más próxima a la de la estirpe virulenta R7B⁻ (Figura 33). Estos resultados indicaron que las mutaciones de R3B2 que afectaron negativamente a la NCRIP también repercutían en la virulencia de *M. lusitanicus*, confirmando la necesidad de una NCRIP funcional para una capacidad infectiva completa y sugiriendo que el dsRBD1 y la región que contiene el dsRBD2 podrían ser buenas dianas para el desarrollo de compuestos antifúngicos.

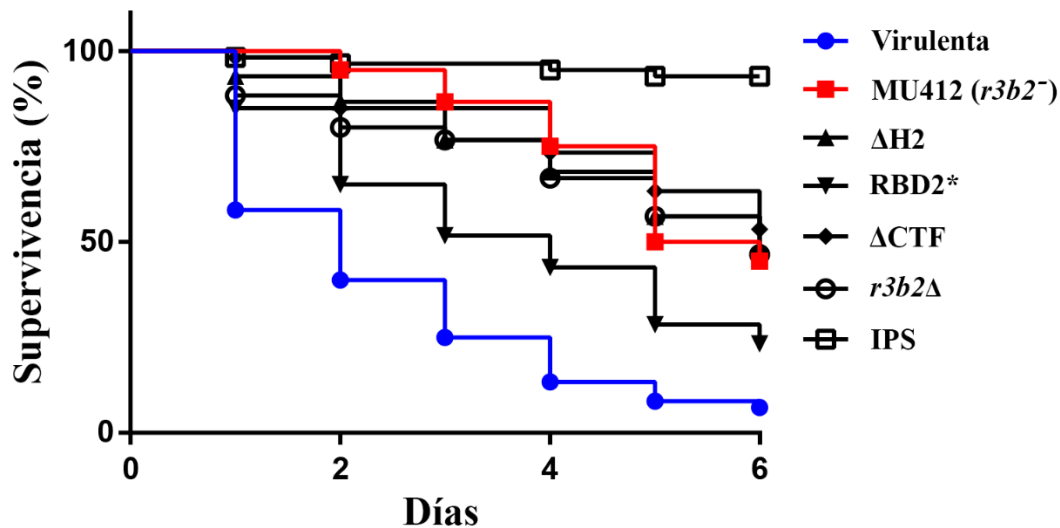


Figura 33. Supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con las estirpes de *M. lusitanicus* portadoras de alelos mutados de *r3b2*.

Ensayo de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con $2 \cdot 10^6$ esporas de las estirpes indicadas ($n = 20 \times 3$) donde todas muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a la estirpe virulenta (R7B) en un test de Mantel-Cox (log-rank). Se utilizó IPS como control negativo del procedimiento de infección.

IV.2.4. Efecto de las mutaciones en los dsRBD en la interacción de R3B2 con las proteínas Dicer

La delección de parte del dominio dsRBD1 o de la región CTF que contenía el dsRBD2 de R3B2 han mostrado un efecto negativo sobre la ruta canónica de RNAi inducida por transgenes (Véase IV.2.3.2), la NCRIP (Véase IV.2.3.3) y la virulencia (Véase IV.2.3.4) de *M. lusitanicus*. Por otro lado, los ensayos *in vitro* de EMSA y de actividad RNasa indicaron que los dsRBD eran necesarios para la unión de R3B2 al RNA (Véase IV.1.4) pero no para su actividad catalítica (Véase IV.1.5.2). Como estas regiones (F14 y CTF) son las que utiliza R3B2 para interactuar con las proteínas Dicer-1 y CTF para interactuar consigo misma y Dicer-2 (Véase IV.2.2), se procedió a comprobar si las mutaciones puntuales en el dsRBD2 y las delecciones que incluían a los dsRBD alteraban estas interacciones de la RNasa. Para ello, los cDNA de los alelos que codificaban las variantes, y que se habían utilizado para su expresión en *E. coli*, (Figura 34A), se amplificaron y clonaron en los vectores pACTII y pBD-Gal4, para analizar las interacciones en el sistema Y2H (Véase III.3.2). Además, para poder analizar el efecto individual de cada mutación sobre las interacciones, se amplificaron y clonaron tres nuevos fragmentos (Figura 34A) a partir de los plásmidos que contenían la correspondiente versión mutada de R3B2 (Véase III.3.2): el fragmento ΔCTF_ΔH2 que expresaba la versión truncada de R3B2 ΔCTF con la delección ΔH2 en su dsRBD1, el fragmento F14_ΔH que expresaba la región que contiene el dsRBD1 de R3B2 con la delección ΔH2 y el fragmento CTF_RBD2* que expresaba la región CTF (Véase IV.1.2) con las cuatro sustituciones a alanina (aminoácidos 469-472) en su dsRBD2.

El ensayo de Y2H para determinar el efecto de las mutaciones que afectan a los dominios dsRBD sobre la dimerización de R3B2 mostró que no tenían efecto al analizar la proteína completa (Figura 34B), probablemente debido a la fuerte interacción del

dominio RIIID consigo mismo (Véase IV.1.3). La variante $\Delta H2$ en fase con Gal4_{BD} fue capaz de permitir el crecimiento de las levaduras en las condiciones selectivas para la interacción (Figura 34B línea - / $\Delta H2$), por lo que no pudieron analizarse las interacciones que involucraban a esta variante. No obstante, no se esperaba una influencia en la dimerización al no estar implicado en la misma el fragmento F14. En cambio, la interacción débil que se detectó entre las regiones CTF desapareció completamente cuando se introdujo la mutación RBD2* (Figura 34B línea CTF_RBD2* / CTF_RBD2*). Estos resultados sugirieron que los residuos mutados del dsRBD2 están implicados en la dimerización de R3B2.

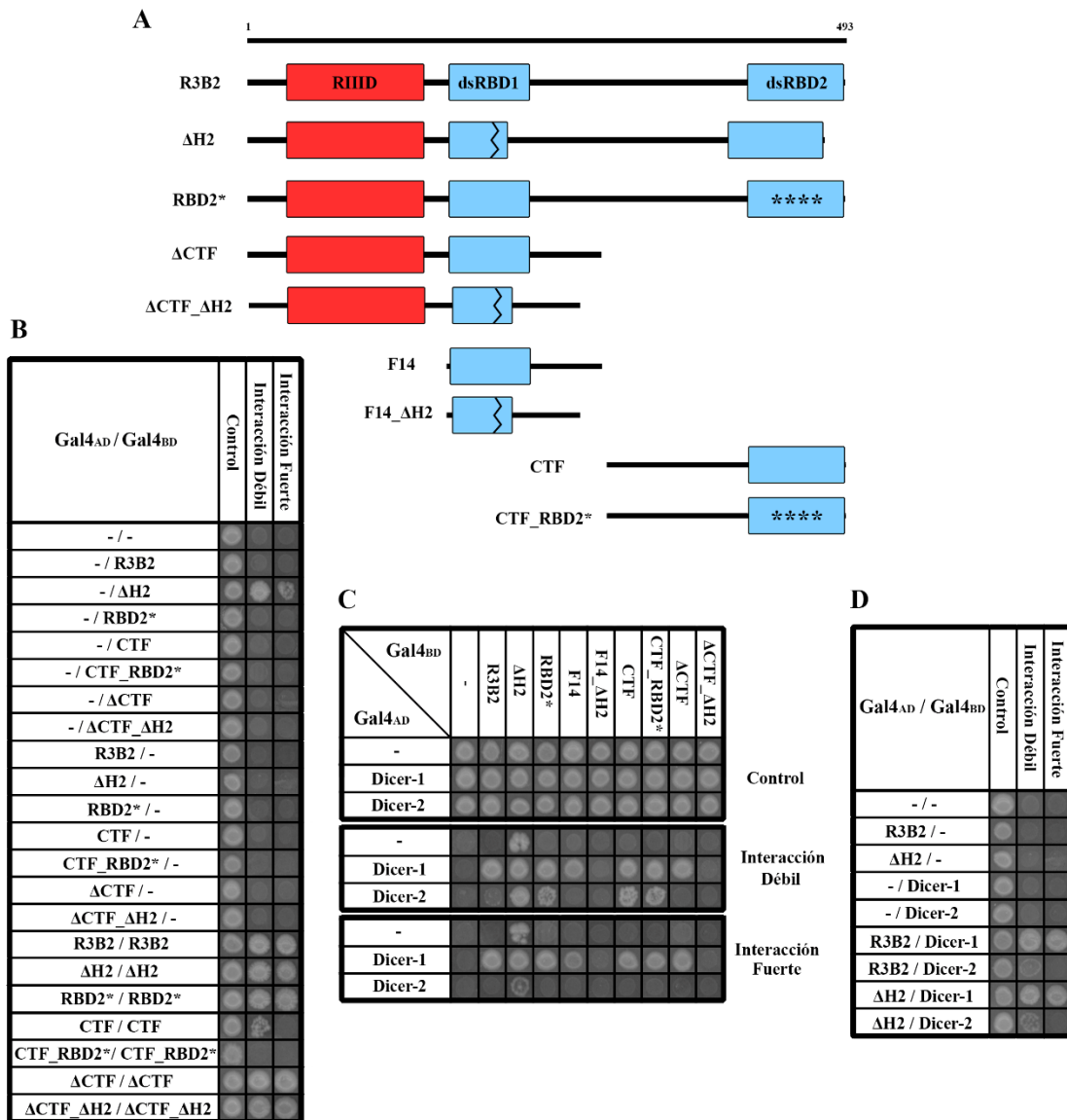


Figura 34. Efecto de las mutaciones en R3B2 sobre las interacciones en las que participa.

A) Representación de las variantes de R3B2 con mutaciones puntuales o deleciones junto con los fragmentos de dichas variantes que se han analizado. B) Ensayo de Y2H para determinar el efecto de las mutaciones sobre la dimerización de R3B2 mediante siembra de gotas de diploides e incubación durante dos semanas en SD-WL (control), SD-WLH + 3AT (Interacción débil) y SD-WLA (Interacción fuerte). C) Ensayo de Y2H para determinar el efecto de las mutaciones en R3B2 sobre la interacción con Dicer-1 y Dicer-2 en las mismas condiciones que en B. D) Ensayo de Y2H de las combinaciones recíprocas de la variante $\Delta H2$ en las mismas condiciones que en B.

Las mutaciones puntuales en dsRBD2 tanto en la proteína completa (RBD2*) como en el fragmento CTF (CTF_ RBD2*) no mostraron diferencias respecto a la proteína silvestre en los ensayos de interacción con las proteínas Dicer-1 o Dicer-2 (Figura 34C). Tampoco las mostró la variante Δ H2, que solo llevaba la mutación en el dominio dsRBD1 manteniendo el resto de la secuencia de la proteína R3B2 silvestre (Figura 34D). Por el contrario, la delección Δ H2 en el dsRBD1 eliminaba completamente la interacción de este dominio con Dicer-1 tanto al analizar la región F14 por separado, como en la versión de R3B2 que carecía de CTF (Figura 34C líneas F14_ Δ H2 y Δ CTF_ Δ H2).

IV.2.5. Bases estructurales de las interacciones de R3B2 y las proteínas Dicer

Los resultados anteriores indicaron que la mutación del dsRBD1 afecta a la interacción con Dicer-1 y que la delección de la región CTF, pero no el dsRBD2, afecta a la interacción con Dicer-1 y Dicer-2. Ambas mutaciones afectan tanto a la ruta canónica de silenciamiento como a la NCRIP, de modo que se postuló que la formación del complejo Dicer/R3B2 era necesaria para el correcto funcionamiento de ambas rutas de silenciamiento. La estructura de las proteínas Dicer de *M. lusitanicus* no se había caracterizado y la de resolución de la estructura cristalográfica de R3B2 solo había permitido la determinación del dominio RIIIID. Ante la carencia de estructuras de los dominios implicados en las interacciones entre las Dicer y R3B2, y en un intento por profundizar en las bases estructurales de estas interacciones, se procedió a la predicción y modelado de las proteínas utilizando los últimos avances basados en inteligencia artificial descritos en la literatura (Jumper et al., 2021) y las estructuras de las proteínas Dicer de otras especies resueltas mediante criomicroscopía electrónica (Liu et al., 2018; Sinha et al., 2018; Wei et al., 2021).

IV.2.5.1. Estructura predicha de las proteínas Dicer-1 y Dicer-2 de *M. lusitanicus*

Las predicciones de las estructuras de las proteínas Dicer se realizaron utilizando el algoritmo Alphafold2, basado en inteligencia artificial, pero debido a las limitaciones en el tamaño de las proteínas del algoritmo, ambas Dicer se dividieron en las tres regiones analizadas mediante Y2H y sus predicciones se alinearon sobre las estructuras de proteínas Dicer disponibles (Liu et al., 2018; Sinha et al., 2018; Wei et al., 2021) para obtener un modelo completo con sus dominios anotados (Figura 35A).

La estructura global de ambas proteínas Dicer (Figura 35B y 35C) es similar a una L con barra oblicua (L) donde los tres subdominios de la región N-terminal que conforman el dominio DExD/H-Box helicasa (Hel1, Hel2 y Hel2i) ocupan la base o brazo corto de la L, el dominio DUF283 se localiza en el contacto entre ambos brazos, los dominios Platform y PAZ ocupan el extremo del brazo largo y, finalmente, los dominios RNasa III de la región C-terminal forman un dímero intramolecular situado en el centro de la estructura. Las regiones Hel1 y Hel2 del dominio helicasa ocupan la parte interior del brazo corto, mientras que la región Hel2i se sitúa en el extremo presentando algunas diferencias entre ambas proteínas Dicer. Esta última región presenta en Dicer-1 un conec-

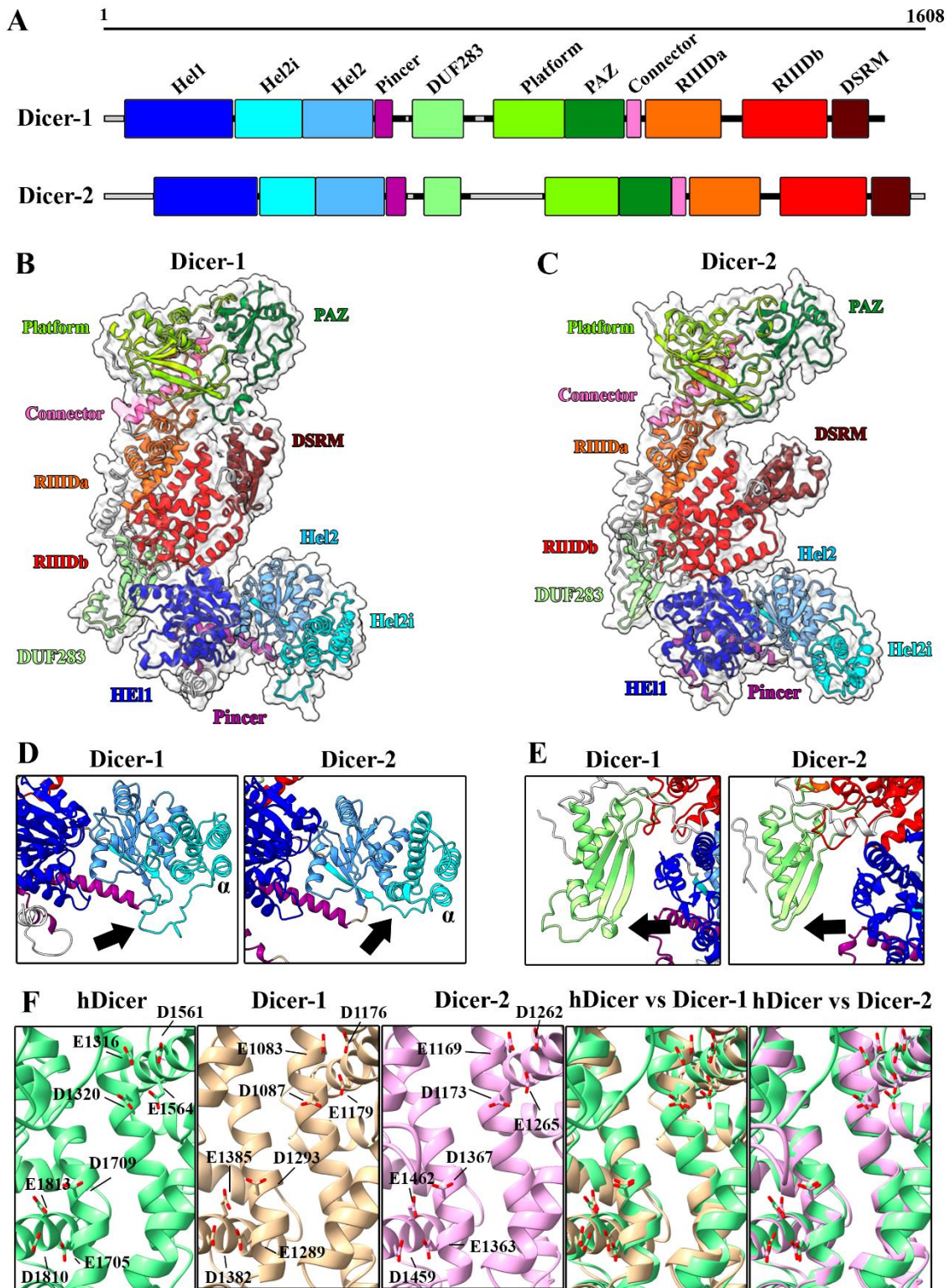


Figura 35. Estructura predicha de las proteínas Dicer de *M. lusitanicus*.

A) Representación de la arquitectura de dominios completa de las proteínas Dicer de *M. lusitanicus* donde se indican las regiones para las que no se predice estructura secundaria (barra gris). B) Estructura predicha de la proteína Dicer-1 con indicación de las posiciones de sus dominios. C) Estructura predicha de la proteína Dicer-2 con indicación de las posiciones de sus dominios. D) Comparación de las regiones Hel2i de Dicer-1 y Dicer-2 donde se muestra la primera hélice α del dominio y las diferencias con una flecha negra. E) Comparación de los dominios DUF283 de Dicer-1 y Dicer-2 donde se indican las diferencias con una flecha negra. F) Ampliación de la estructura de los centros catalíticos de la Dicer humana (hDicer, [SZAK](#)), las dos Dicer de *M. lusitanicus* y la superposición de las estructuras de cada una de las Dicer de *M. lusitanicus* con la de la hDicer.

tor de mayor tamaño antes de la formación de su primera hélice α (Figura 35D), una región que se caracteriza por su capacidad de interactuar con proteínas de unión a RNA (Liu et al., 2018; Su et al., 2021; Yamaguchi et al., 2021). Desde este extremo de las proteínas hasta la curva entre ambos brazos de la L se dispone una estructura en forma de V formada por dos hélices α (Pincer), que establece una conexión mecánica no resuelta entre el dominio helicasa y el DUF283. Este último dominio presenta un plegamiento $\alpha\beta\beta\alpha$, similar al de los dominios dsRBD, nuevamente con un conector entre dos de sus láminas β antiparalelas expandido en Dicer-1 con respecto a Dicer-2 (Figura 35E). El dominio DUF283 conecta con el extremo del brazo largo de la L donde se sitúa el dominio Platform a través de un conector de 105 aminoácidos en Dicer-1 y 164 aminoácidos en Dicer-2, del que no se puede conocer su estructura por la imposibilidad de predecir su estructura secundaria (Figura 35A). En el extremo del brazo largo de la L se encuentra el dominio PAZ, crítico para la unión del RNA, que está formado por un barril β central rodeado de pequeñas hélices α y bucles, que conecta con el dominio RIIIDa a través de una larga hélice α (*connector*), rodeada por el dominio Platform (Figura 35B y 35C). Los dominios RIIIDa y RIIIDb forman un dímero intramolecular que ocupa la posición central del brazo largo de la L, de forma similar a lo que ocurre en las proteínas Dicer de humanos (Liu et al., 2018), *A. thaliana* (Wei et al., 2021), *D. melanogaster* (Sinha et al., 2018) y *G. intestinalis* (MacRae et al., 2006). Los residuos catalíticos están conservados en ambos dominios RIIID y presentan una alineación perfecta con otras Dicer homólogas (Figura 35F), lo que indica que se trata de proteínas catalíticamente activas. Finalmente, el RIIIDb se continua con un dominio DSRM de unión a dsRNA, situado de forma diametralmente opuesta a los residuos catalíticos del dímero central (Figura 35B y 35C).

IV.2.5.2. Estructura de la proteína R3B2 y descripción de la posible región de interacción (PIR) en CTF

El menor tamaño de la proteína R3B2 permite la predicción de su estructura completa como dímero utilizando también el algoritmo Alphafold empleado con las proteínas Dicer (Figura 36A).

Estructuralmente, R3B2 contiene un dominio RIIID atípico y dos dominios dsRBD, como se ha indicado anteriormente (Figura 36A y 36C). La estructura cristalográfica del dominio RIIID reveló está constituido por siete hélices α que forman una estructura bien empaquetada en el homodímero de R3B2. El alineamiento estructural del homodímero predicho usando Alphafold y del cristalizado (Véase IV.1.6.1) básicamente coinciden, indicando que la predicción es coherente con los datos ya obtenidos (Figura 36B). Del RIIID parte un conector (Figura 36C) que enlaza con el primer dominio dsRBD, dsRBD1, que muestra su característico plegamiento $\alpha\beta\beta\alpha$, con dos hélices α que estos dominios utilizan para interactuar con el RNA y que se encuentran plegadas frente a una triple lámina β antiparalela (Figura 36A y 36C). Entre los residuos básicos que podrían estar involucrados en la unión de dsRNA destacan tres lisinas: K171, K220 y K222. Tras el dsRBD1 aparece un largo conector en el que no se predice una gran organización

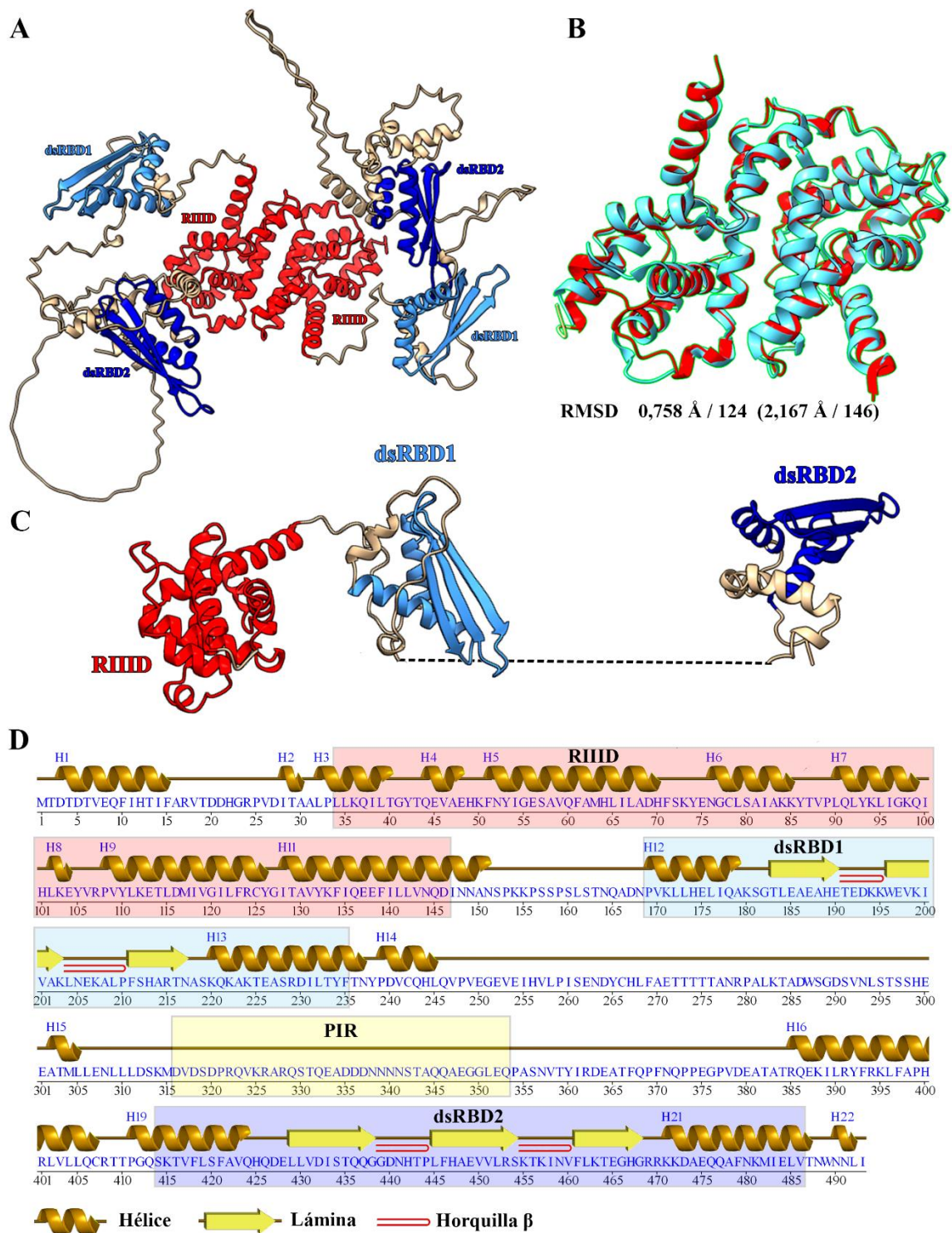


Figura 36. Estructura predicha de R3B2.

A) Predicción del dímero de R3B2, con un monómero a la derecha y otro a la izquierda, donde se indican los dominios RIIID (rojo), dsRBD1 (azul claro) y dsRBD2 (azul oscuro). B) Superposición del dímero RIIID de R3B2 obtenido mediante difracción de rayos X (azul; PDB [6ZDW](#)) y por predicción con el algoritmo AlphaFold2 (rojo). Se indica el valor RMSD y el número de aminoácidos con *trimming* y sin *trimming* entre paréntesis. C) Predicción de la estructura monomérica de R3B2. Se oculta la región conectora no estructurada por claridad (línea discontinua). D) Secuencia y estructura secundaria de la proteína R3B2. Se indican los dominios mediante recuadros coloreados.

(Figura 36C y 36D) y que presenta una zona especialmente llamativa rica en aminoácidos básicos y ácidos (entre los aminoácidos D316 y E333), continuada de una segunda zona con una gran abundancia de residuos polares (entre A334 y Q353). Esta zona está encuadrada en la región CTF de R3B2, que presentó una interacción fuerte con la región 2 de Dicer-1 y una interacción débil con Dicer-2 (Véase IV.2.2). Puesto que este tipo de regiones con gran número de cargas pueden estar involucradas en las interacciones proteína-proteína, se le denominó posible región de interacción (*possible interaction region* o PIR). Tras el conector, se localiza el segundo dominio de unión a dsRNA, dsRBD2, que al igual que el primero presenta el plegamiento característico $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ (Figura 36C y 36D), con los residuos K415, R469, R470, K471 y K472 presuntamente implicados en la interacción con el RNA.

IV.2.5.3. Interacción de la región PIR de R3B2 con las regiones de Dicer-1

Los ensayos de Y2H realizados con anterioridad (Véase IV.2.2) revelaron que la región 1, que incluye el dominio helicasa de Dicer-1, interacciona de forma débil con el F14 de R3B2, que contiene el dsRBD1, y que la región 2, con los dominios DUF2283, Platform y PAZ de Dicer-1, interacciona de forma intensa con CTF de R3B2, que contiene la región PIR y el dsRBD2. Diversas investigaciones en las que se ha caracterizado la interacción entre Dicer y proteínas con dominios de unión a dsRBD, muestran una interacción conservada de uno de los dsRBD con la región Hel2i de la proteína Dicer (Liu et al., 2018; Wilson et al., 2015; Yamaguchi et al., 2021). Con el fin de profundizar en la interacción entre Dicer-1 y R3B2, se procedió a dividir las regiones D1R1 y D1R2 de Dicer en cada uno de los dominios que se detectan en base a las predicciones estructurales y la región CTF de R3B2 en un fragmento con el conector que contiene PIR y otro con el dsRBD2 (Figura 37A).

Los fragmentos de R3B2 que codifican el conector que contiene PIR (aminoácidos 266-382) y el dsRBD2 (aminoácidos 376-493) se amplificaron y clonaron en pBD-GAL4 (Véase III.3.2). Cada una de las regiones D1R1 y D1R2 de Dicer-1 se dividieron en 5 nuevos fragmentos que fueron amplificados y clonados en pACTII (Véase III.3.2) para ensayar su interacción. La región D1R1 se dividió en los fragmentos D1R1A que codifica el Hel1, el fragmento D1R1B que codifica el Hel2i, el fragmento D1R1C que codifica el Hel2 y los fragmentos D1R1AB y D1R1BC que combinan D1R1A con D1R1B y este último con D1R1C, respetivamente. De la misma forma, la región D1R2 de Dicer-1 se dividió en D1R2A que codifica el dominio DUF283, D1R2B que codifica el dominio Platform, D1R2C que codifica el dominio PAZ y las combinaciones D1R2AB y D1R2BC.

Los nuevos plásmidos se utilizaron para transformar las levaduras y generar los nuevos *stocks* que se cruzaron con las estirpes ya disponibles en la colección para la realización de un nuevo ensayo de Y2H (Véase III.2.3). La interacción de R3B2 con los diferentes dominios de la región 1 de Dicer-1 mostró una interacción residual con el D1R1AB y una muy intensa con el D1R1BC, no detectándose interacción con ninguno

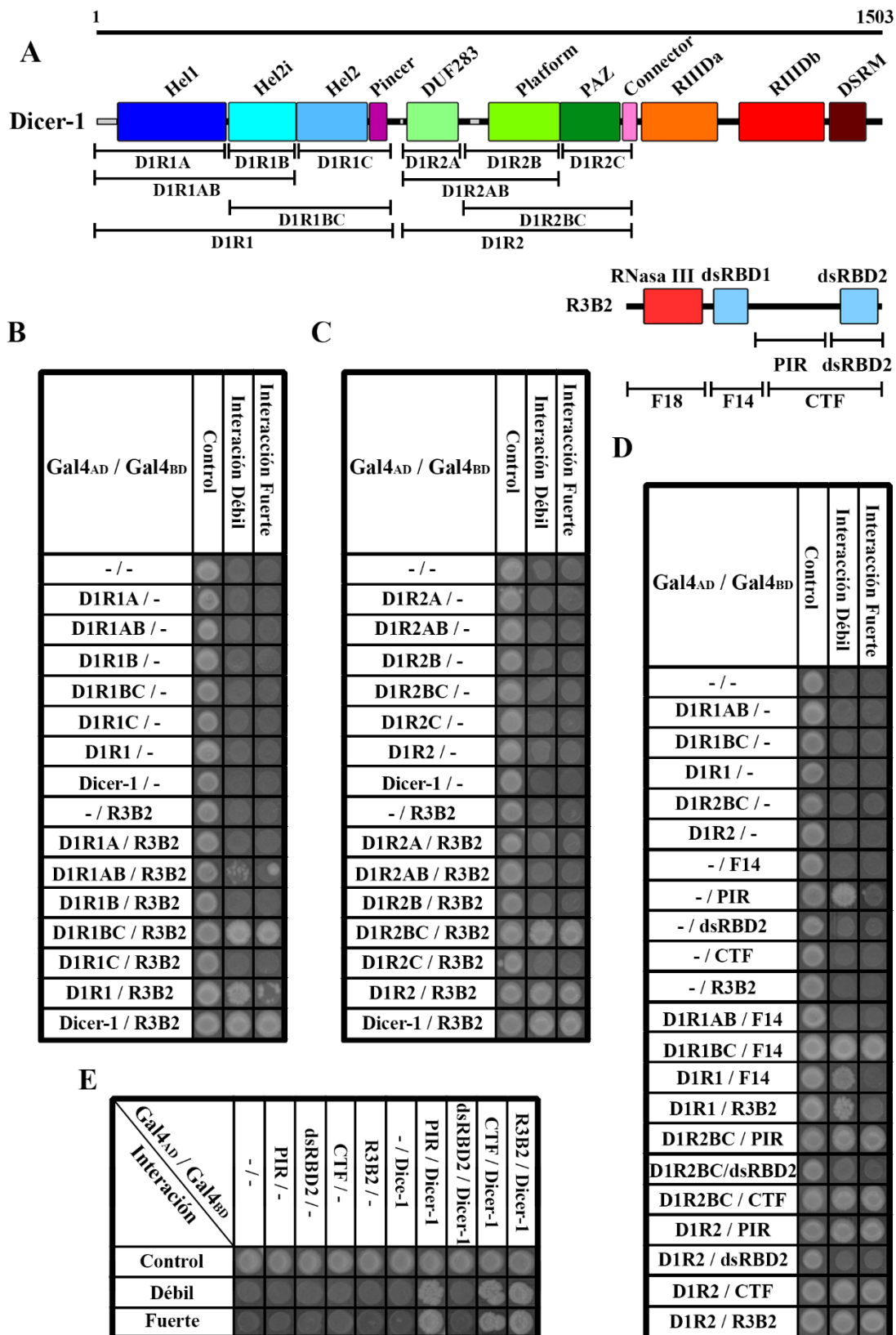


Figura 37. Determinación de los dominios de Dicer-1 y R3B2 involucrados en su interacción.

A) Representación de las proteínas Dicer-1 y R3B2, derivadas de la predicción estructural, donde se indican las regiones analizadas mediante Y2H. B) Interacción de los dominios de la región D1R1 de Dicer-1 con R3B2. C) Interacción de los dominios de la región D1R2 de Dicer-1 con R3B2. D) Interacción de los dominios de Dicer-1 que ofrecieron un resultado positivo en B y C, frente a los fragmentos de R3B2 con los que interaccionan identificados en IV.2.2. E) Interacción de la región CTF dividida en PIR y dsRBD2 con Dicer-1, analizada utilizando las combinaciones recíprocas de los fragmentos con los dominios AD y BD de Gal4.

de los dominios por separado (Figura 37B). Por otro lado, cuando los fragmentos de la región D1R1 que habían dado positivo con la proteína R3B2 completa se enfrentaron sólo a la región F14 de R3B2, se detectó una interacción muy intensa únicamente con el dominio D1R1BC (Figura 37D). Estos datos sugirieron que la interacción entre el dsRBD1 de R3B2 y Dicer-1 debe de ser muy similar a las ya descritas para otras proteínas Dicer y sus proteínas acompañantes (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006; Liu et al., 2003), que está mediada por la región Hel2i. El motivo por el que esta interacción solo se detecte cuando se combinan los dominios Hel2 y Hel2i, en D1R1BC, podría deberse a la necesidad de la presencia del primero para un correcto ensamblaje del segundo que permita una interacción adecuada. Alternativamente, la interacción entre el dsRBD1 de R3B2 y la región helicasa de Dicer-1 podría estar produciéndose a través de una superficie que involucre a los dominios Hel2 y Hel2i.

Por otro lado, la interacción entre R3B2 y los dominios de la región D1R2 de Dicer-1 mostró que, en este caso, el contacto se produce de forma intensa exclusivamente a través del fragmento D1R2BC (Figura 37C). La subdivisión de la región CTF de R3B2, que interaccionaba con la región D1R2 de Dicer-1, reveló que el contacto se produce de forma intensa y exclusiva a través del conector que contiene la región PIR y no por medio de su dsRBD2 (Figura 37D). Estos mismos ensayos revelaron que PIR unido a GAL4_{BD} por sí solo es capaz de activar la transcripción de los genes chivatos en el ensayo Y2H en estas condiciones dando lugar a un falso positivo en condiciones de selección débil (Figura 37D, línea -/PIR).

Dado que la interacción entre D1R2BC y PIR supone la primera descripción de este tipo de regiones de interacción en Mucorales, se procedió a clonar PIR y dsRBD2 en las combinaciones opuestas con los dominios AD y BD del sistema de Y2H (Véase III.3.2). Se generaron nuevas *stocks* de levaduras (Véase III.2.3) portadoras de estas últimas construcciones y su enfrentamiento con las ya presentes en la colección puso de manifiesto que la interacción con Dicer-1, que involucra a la región C-terminal de R3B2, se produce exclusivamente a través del conector que contiene la región PIR (Figura 37E).

IV.2.6. Análisis del tamaño y polaridad de los siRNA en los mutantes de las proteínas implicadas en el RNAi de *M. lusitanicus*

El mecanismo de RNAi de *M. lusitanicus* está dividido en tres rutas teniendo en cuenta las proteínas involucradas. La mayoría de las proteínas participan en las tres rutas dando lugar a una compleja interconexión entre ellas. La caracterización inicial de R3B2 reveló que la producción de la mayoría de los ex-siRNA, aquellos que derivan de genes codificantes de proteínas, producidos por la ruta canónica de RNAi estaba reducida en el mutante en *r3b2* (Trieu et al., 2015). Esto sugiere que la actividad catalítica de R3B2 frente a ssRNA descrita en esta tesis (Véase IV.1.5.1) es necesaria para el correcto funcionamiento del mecanismo. Por el contrario, los resultados obtenidos en otras investigaciones han sugerido un efecto opuesto de la NCRIP sobre las rutas canónicas

dependientes de Dicer que permiten la generación de epimutantes (Calo et al., 2017; Chang et al., 2019) y el silenciamiento de los Grem-LINE1 (Pérez-Arques et al., 2020). La interacción de R3B2 con las proteínas Dicer descrita en las secciones anteriores podría explicar el efecto positivo y negativo de la proteína sobre la producción de siRNA. Las características de los siRNA producidos por las rutas canónicas de RNAi son: unos tamaños definidos (21, 23 y 24 nt), una polaridad tanto con sentido como antisentido respecto a su mRNA diana y la presencia de un U en sus extremos 5' (Nicolás et al., 2010). Por el contrario, los rdRNA producidos por la NCRIP presentan una distribución de tamaños aleatoria, una preferencia por la presencia de U en la penúltima posición de los extremos 3' y una polaridad principalmente con sentido en relación al transcrito del que derivan, por lo que se supone que se trata de productos de degradación (Trieu et al., 2015). Con el fin de determinar las implicaciones de las interacciones descritas en esta tesis sobre la conexión entre las tres rutas de RNAi, se procedió a analizar la distribución de tamaños y polaridad de los sRNA en mutantes de los genes que codifican proteínas del RNAi. Para este análisis se consideraron como productos exclusivos de la ruta canónica los sRNA antisentido al mRNA, ya que no pueden derivar de la degradación del mRNA, ya sea por la NCRIP u otro mecanismo celular distinto.

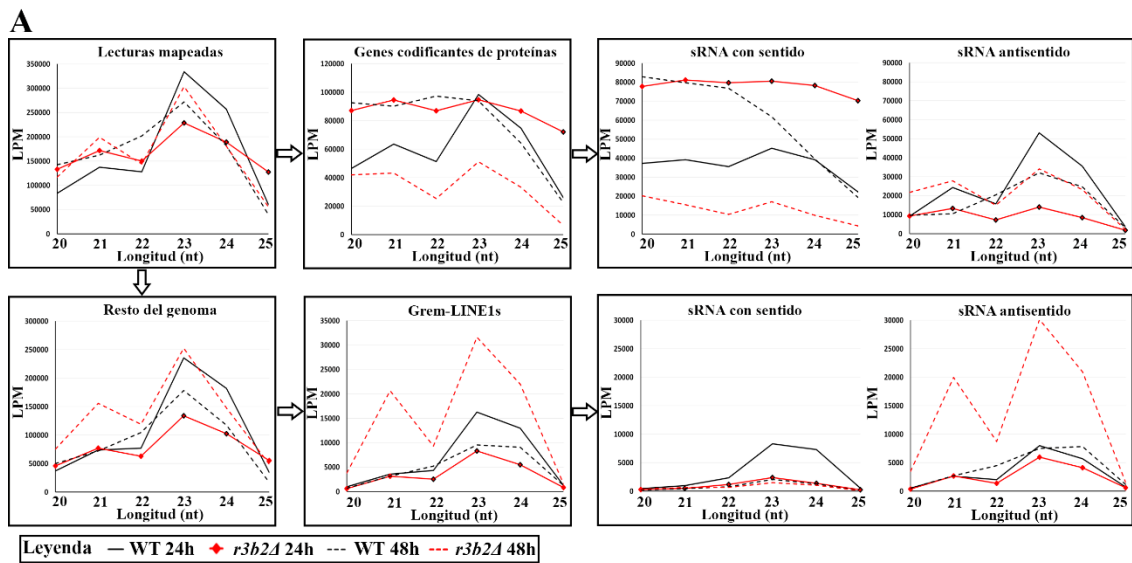
IV.2.6.1. Comparación de sRNA en el mutante en r3b2 durante el crecimiento activo y la fase estacionaria

La realización en nuestro laboratorio de nuevas transcriptómicas de sRNA del mutante en *r3b2* a las 24 h de crecimiento en medio rico permitió analizar la dinámica de distribución de tamaños y polaridad de los sRNA producidos y compararla con los estudios previos obtenidos en fase estacionaria (48 h de crecimiento en medio rico). Los resultados obtenidos revelaron dos situaciones sustancialmente diferentes relacionadas, por un lado, con la regulación génica por la ruta canónica de RNAi a través de los ex-siRNA antisentido y, por otro lado, con los siRNA procedentes de los Grem-LINE1. Durante el crecimiento activo (24h) la estirpe *r3b2Δ* mostró una reducción de la producción de ex-siRNA antisentido respecto al silvestre, mientras que el silenciamiento de los Grem-LINE1 parecía estar siendo más eficiente dada la menor acumulación de siRNA con sentido, que debían incluir los siRNA con sentido y los productos de degradación de los transcritos (Figura 38A). Este resultado es coherente con la participación de R3B2 en la producción de los ex-siRNA (Trieu et al., 2015) y simultáneamente indica un mejor del silenciamiento de los Grem-LINE1 en el mutante en *r3b2* tanto a 24h como a 48h (Pérez-Arques et al., 2020). En cambio, durante la fase estacionaria, los niveles de ex-siRNA antisentido recuperaron valores similares a la estirpe silvestre con un aumento de acumulación de ex-siRNA antisentido de 21 nt (Figura 38A). Debido a la ausencia de réplicas técnicas de las transcriptómicas durante la fase estacionaria no se pudo determinar si este aumento era significativo. En cualquier caso, acompañando a la recuperación de los niveles silvestres de ex-siRNA antisentido se observó una gran reducción en la acumulación de sRNA con sentido lo que sugiere un mejor silenciamiento de los genes codificantes de proteínas (Figura 38A). Este resultado

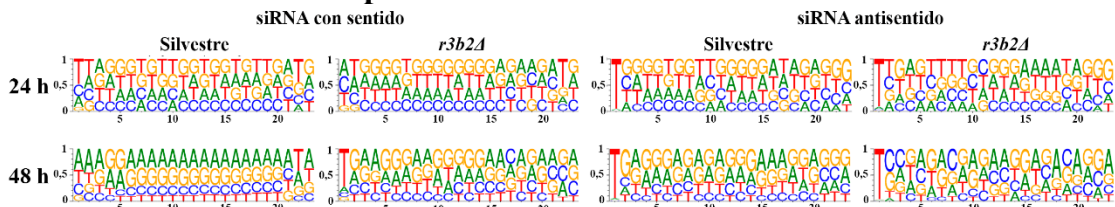
supone que la disminución de ex-siRNA descrita en el mutante *r3b2Δ* a las 48 h de crecimiento (Trieu et al., 2015) se debía probablemente a la menor acumulación de sRNA con sentido, es decir ex-siRNA con sentido y productos de degradación y no a una menor producción de ex-siRNA, entendidos como los siRNA antisentido (Figura 38A).

La suposición anterior se vio reforzada al analizar el logo de los siRNA 23 nt durante el crecimiento activo y la fase estacionaria. A las 24 h de crecimiento, los siRNA antisentido de la estirpe silvestre y el mutante *r3b2Δ* mostraron el característico U en 5', mientras que los sRNA con sentido presentaban unas características que probablemente son resultado de la suma de las características de siRNA, rDNA y otros productos de degradación, con solo un ligero enriquecimiento de U en 5', típico de siRNAs, y en la penúltima posición, típico de rDNAs (Figura 38B). Por el contrario, durante la fase estacionaria ambas estirpes mantuvieron las características de los ex-siRNA antisentido, mientras que sus siRNA con sentido revelaron un perfil mayoritario de rDNA con enriquecimiento de A y G en toda la secuencia y U en la penúltima posición en la estirpe silvestre, en contraposición a la acumulación de verdaderos ex-siRNA con sentido en el mutante *r3b2Δ* (Figura 38B). Estos resultados sugieren que el silenciamiento canónico mediado por ex-siRNA de genes codificantes está funcionando mucho mejor en el mutante *r3b2Δ* durante la fase estacionaria, limitando la necesidad de R3B2 para el correcto funcionamiento de la ruta canónica de RNAi al crecimiento activo, dada la menor producción de ex-siRNA a las 24 h (Figura 38A). Esta interpretación es coherente con el mantenimiento de los niveles de sRNA con sentido derivados de los Grem-LINE1 y la marcada acumulación de siRNA antisentido en relación a la estirpe silvestre durante la fase estacionaria (Figura 38A) que había sido descrita previamente (Pérez-Arques et al., 2020). Además, la conservación de la frecuencia de U en la penúltima posición durante el crecimiento activo en la estirpe carente de *r3b2* (Figura 38B) sugiere que podría existir otra proteína adicional que produzca el rDNA solo durante este periodo (Véase V.3).

El logo de los siRNA con sentido y antisentido derivados de Grem-LINE1 durante el crecimiento activo y la fase estacionaria reveló una diferencia fundamental respecto a los ex-siRNA, además del sugerido mejor funcionamiento del silenciamiento contra ellos. La mayoría de los sRNA con sentido derivados de estos TE parecen ser verdaderos siRNA con U en 5', no observándose una gran acumulación de productos de degradación de forma análoga a lo observado en el mutante en *r3b2* a las 48 h (Figura 38A y 38C). Estos resultados sugieren que la maquinaria canónica de silenciamiento podría llevar a cabo un control refinado de la acumulación de mRNA durante el crecimiento activo basado en la producción de ex-siRNA primarios, que dependerían de RdRP-1, mientras que la regulación de los Grem-LINE1, y probablemente otros TE, teniendo en cuenta la coincidencia del perfil de los primeros con el de las regiones genómicas no codificantes (Figura 39A), podría estar basada en el mecanismo de amplificación mediado por RdRP-2. Esto podría explicar la notable ausencia de productos de degradación diferentes de los que presentan tamaños compatibles con los siRNA de los Grem-LINE1.



B Genes codificantes de proteínas



C Grem-LINE1

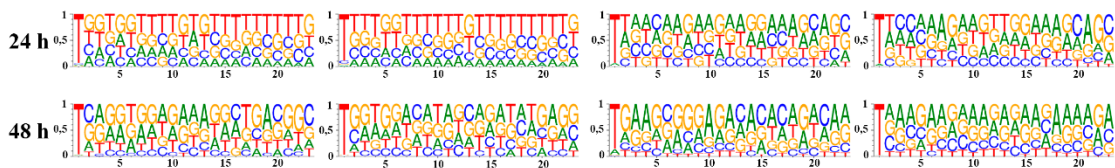


Figura 38. Comparación de las características de los sRNA de *M. lusitanicus* acumulados en el mutante *r3b2Δ*.

A) Distribución de tamaños y polaridad de los sRNA durante el crecimiento activo (24 h) y en fase estacionaria (48 h) separándose los pertenecientes a genes codificantes de proteínas o a Grem-LINE1. Los rombos negros en la distribución a 24 h indican diferencias significativas en relación a la estirpe silvestre ($p < 0,05$) tras una prueba T de student despareada de dos colas. LPM, lecturas por millón; WT, estirpe silvestre. B) Logo de las secuencias de 23 nt representativo de los siRNA de los genes codificantes de proteínas. C) Logo de las secuencias de 23 nt representativo de los siRNA derivados de los Grem-LINE1.

IV.2.6.2. Acumulación de sRNA con sentido y antisentido en los mutantes de las proteínas de RNAi

Con el objetivo de validar la hipótesis planteada en el apartado anterior, se realizó un análisis de los sRNA acumulados en los mutantes *rdrp-1Δ* y *rdrp-2Δ* a las 48 h, que sugirió que existen dos tipos diferentes de aRNA, primario y secundario, y que RdRP-2 no es capaz de reconocer el aRNA primario. En ausencia de la proteína RdRP-1, se observó una elevada acumulación de ex-siRNA antisentido de 23 y 24 nt (Figura 39A), que derivaban sorprendentemente en su mayor parte (93%) de 7 genes, correspondiendo el 80% de las lecturas a uno solo de ellos, el gen con ID 109224 (Figura 39B). Este resultado supuso que, en la práctica, no había una producción significativa de ex-siRNA antisentido del resto de genes regulados por las rutas de RNAi canónicas. Así, parece que

la menor acumulación de ex-siRNA descrita anteriormente (Nicolás et al., 2010; Trieu et al., 2015) en realidad representa la pérdida de producción de ex-siRNA con sentido en el mutante en *rdrp-1*. Esto último es coherente con la necesidad de RdRP-1 para la iniciación del silenciamiento canónico inducido por transgenes (Calo et al., 2012) y sugiere que RdRP-2, la RdRP responsable de la amplificación del silenciamiento, no puede inducir la maquinaria de RNAi canónica a partir de aRNA que no han entrado en contacto previamente con el RISC. Sin embargo, la acumulación de siRNA derivados de los Grem-LINE1 en el mutante en *rdrp-1* reveló un patrón similar al observado en el mutante en *r3b2* a las 48 h (Figura 38A y 39A). Este resultado está de acuerdo con la competición de la NCRIP y el mecanismo de RNAi canónico, del que depende la producción de epimutantes y control de los Grem-LINE1 (Calo et al., 2014, 2017; Pérez-Arques et al., 2020), sugiriendo el funcionamiento de otra RdRP o fuente alternativa de dsRNA para iniciar la maquinaria canónica de RNAi en estos casos.

Un dato destacable de los mutantes en *r3b2* y *rdrp-1*, los genes centrales de la NCRIP, es la extraordinaria acumulación de siRNA antisentido de 21 nt (Figura 38A y 39A). Estos siRNA se consideran los siRNA maduros de la ruta de RNAi canónica, ya que su acumulación es posterior a la de los siRNA de 23-24 nt (Nicolás et al., 2003). Este resultado sugiere que los siRNA antisentido de 21 nt se producen mayoritariamente por el mecanismo de amplificación del RNAi, que está de acuerdo con la reducida producción de este tipo de siRNA en el mutante en *rdrp-2* (Figura 39A).

Por otro lado, el patrón de distribución de los ex-siRNA antisentido del mutante *rdrp-2Δ* mostró un incremento de la producción de siRNA de 23 y 24 nt (Figura 39A), que en este caso no se debía a ningún *locus* sobrerrepresentado. Este resultado refleja el funcionamiento del silenciamiento canónico de genes codificantes de proteínas en ausencia de amplificación. El perfil obtenido resulta cuantitativamente muy similar al de la estirpe silvestre durante el crecimiento activo (Figura 38A y 39A) salvo por la reducción en los ex-siRNA antisentido de 21 nt, lo que sugiere que durante el crecimiento activo la regulación de los genes codificantes de proteínas depende mayoritariamente de RdRP-1 y, de nuevo, que la producción de siRNA de 21 nt se debe a RdRP-2.

Respecto a los Grem-LINE1 la acumulación de siRNA antisentido sufrió una gran reducción acompañada de un aumento de los siRNA consentido, lo que sugirió que el mutante en *rdrp-2* no es capaz de silenciar estos TE adecuadamente. Cuando se analizaron los mRNA en los Grem-LINE se detectó un aumento en el mutante *rdrp-1Δ* y no en el *rdrp-2Δ* ni en el doble mutante *dicer-1Δ/dicer-2Δ*, cuando se comparó con la estirpe silvestre, y estos niveles de mRNA se correlacionaban, de manera inversa, con las diferencias que presentaban estas estirpes en la acumulación de siRNA (Figura 39A y 39C).

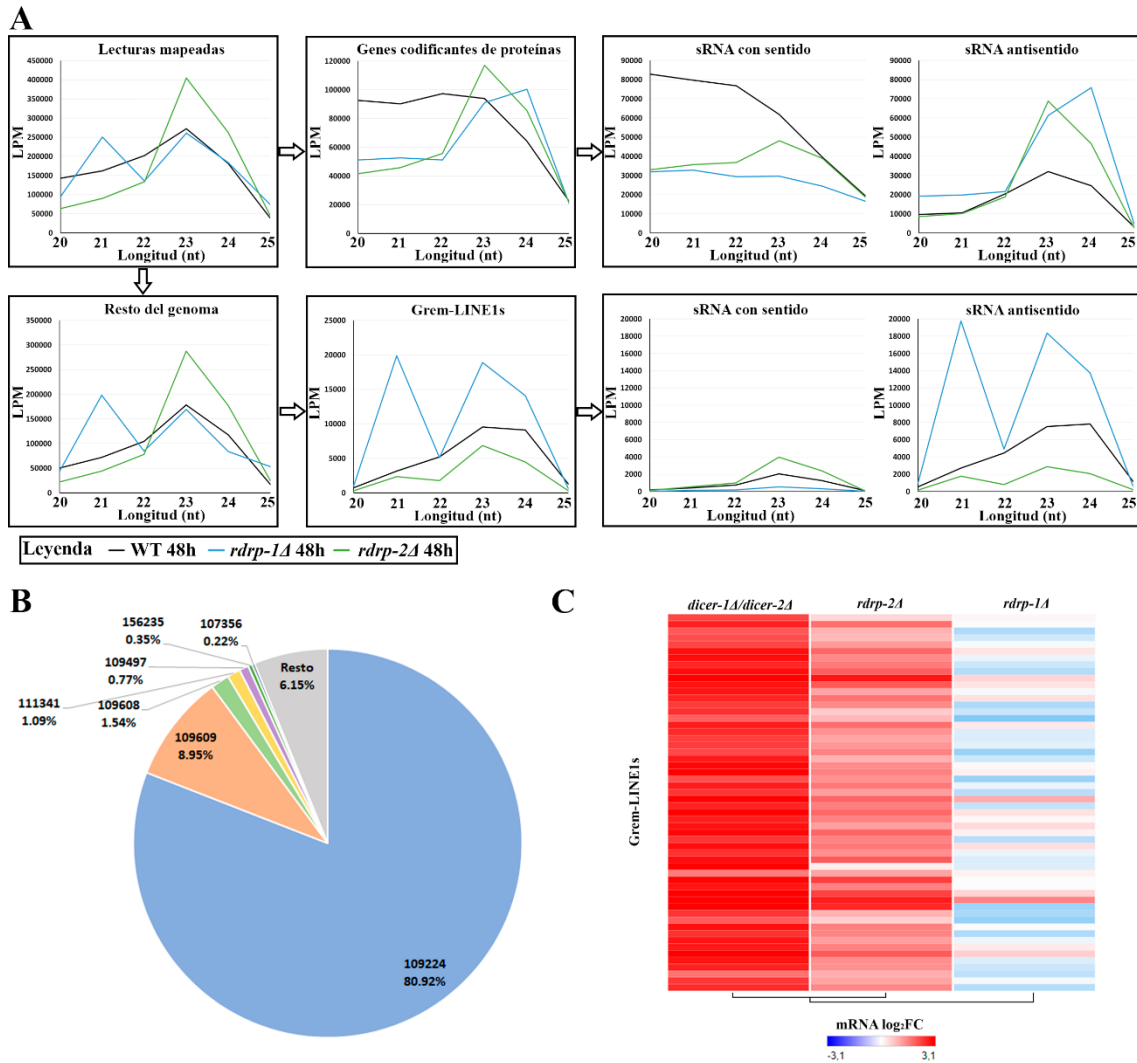


Figura 39. Funcionamiento de la ruta de RNAi canónica en los mutantes *rdrp-1Δ* y *rdrp-2Δ*.

A) Distribución de tamaños y polaridad de los sRNA en fase estacionaria (48 h) separándose los pertenecientes a genes codificantes de proteínas y a Grem-LINE1. LPM, lecturas por millón; WT, estirpe silvestre. B) Distribución porcentual de las lecturas de los sRNA antisentido de los genes codificantes de proteínas en el mutante *rdrp-1Δ* dependientes de Dicer ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$ en *dicer-1Δ/dicer-2Δ*) e independientes de RdRP-1 ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 0$ en *rdrp-1Δ*) que presentan una abundancia relativa ≥ 50 LPM en la estirpe silvestre. La categoría resto engloba a los sRNA antisentido independientes de Dicer, por lo que no estarían relacionados con el silenciamiento canónico. Los identificadores numéricos se refieren a la V2.0 del genoma de *M. lusitanicus*. LPM, lecturas por millón. C) Heatmap de la acumulación de mRNA de los Grem-LINE1 en las estirpes indicadas utilizando los valores de $\text{log}_2\text{FoldChange}$ (log_2FC) respecto a la estirpe silvestre teniendo en cuenta las LPM.

Aunque no existen datos de sRNA del mutante en *rdrp-3* en las mismas condiciones de cultivo que el resto de mutantes, sus sRNA se han estudiado en cultivo en medio mínimo (Chang et al., 2019). El mutante *rdrp-3* no mostró diferencias respecto a su parental silvestre en la distribución y polaridad de sus sRNA en estas condiciones de cultivo (Figura 40), sugiriendo un limitado papel de esta proteína en el mecanismo de RNAi canónico en concordancia con los estudios previos (Calo et al., 2017). Este resultado es coherente con lo expuesto anteriormente, ya que los estudios realizados descartan su papel en la iniciación del silenciamiento canónico (Calo et al., 2012) y en la amplificación (Calo et al., 2017), limitando su participación a la NCRIP.

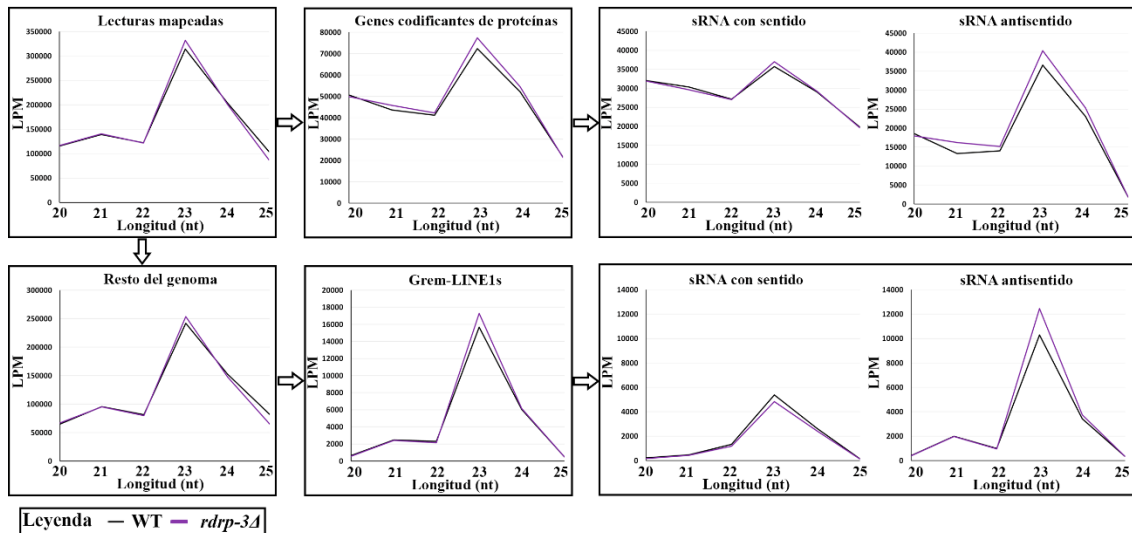


Figura 40. Funcionamiento de la ruta de RNAi canónica en el mutante *rdrp-3Δ*.

A) Distribución de tamaños y polaridad de los sRNA del mutante *rdrp-3Δ*. Se han separado los sRNA derivados de genes codificantes de los Grem-LINE1. LPM, lecturas por millón; WT, estirpe silvestre.

En relación al mutante en *dicer-1*, el patrón de acumulación de siRNA no mostró diferencias en comparación con la estirpe silvestre a las 48 h (Figura 41A) en concordancia con el papel menor que se le ha asignado a esta proteína en el mecanismo de RNAi canónico (Nicolás et al., 2007; Nicolás et al., 2010). Por el contrario, la producción de ex-siRNA de genes codificantes del mutante *dicer-2* mostró una extraordinaria bajada acompañada de un aumento de los fragmentos de degradación con sentido (Figura 41A). Los siRNA derivados de Grem-LINE1, tanto con sentido como antisentido, sufrieron un importante descenso (Figura 41A), observándose una pérdida total en el doble mutante *dicer-1Δ/dicer-2Δ*, que se tradujo en una mayor acumulación de mRNA de los Grem-LINE1 (Navarro-Mendoza et al., 2019), que concretamente supuso un aumento promedio de 8 veces en la acumulación de transcritos de estos TE (Figura 39C). La ausencia de productos de degradación observada en este doble mutante sugiere que su RNA debe estar mayoritariamente en forma de dsRNA y, por lo tanto, impracticable para la maquinaria de degradación de mRNA endógena en un mutante que carece de actividad RNasa III.

Finalmente, el patrón general de los sRNA de la estirpe *ago-1Δ* se asemeja a una distribución aleatoria de productos de degradación del RNA sin picos específicos y con niveles más bajos que la estirpe silvestre (Figura 42A). A pesar de que el silenciamiento canónico no está funcionando en este mutante, la acumulación de siRNA antisentido sugiere que el dsRNA se sigue produciendo por las RdRP y procesándose por las proteínas Dicer, pero sin observarse un enriquecimiento importante de los siRNA dada la imposibilidad de estabilizarse por la unión a Ago-1 (Figura 42). Sorprendentemente, esta estirpe también carece de rDNA entre sus productos de degradación con sentido, ya que se ha perdido su característica U en penúltima posición (Figura 42B), sugiriendo que el funcionamiento del silenciamiento canónico es esencial para el funcionamiento de la NCRIP. Es en esta última estirpe donde se observó por primera vez la aparición de productos de degradación sin características de siRNA derivados de los Grem-LINE1

(Figura 42C), sugiriendo que estos TE se encuentran exclusivamente regulados por la maquinaria canónica de RNAi de *M. lusitanicus*.

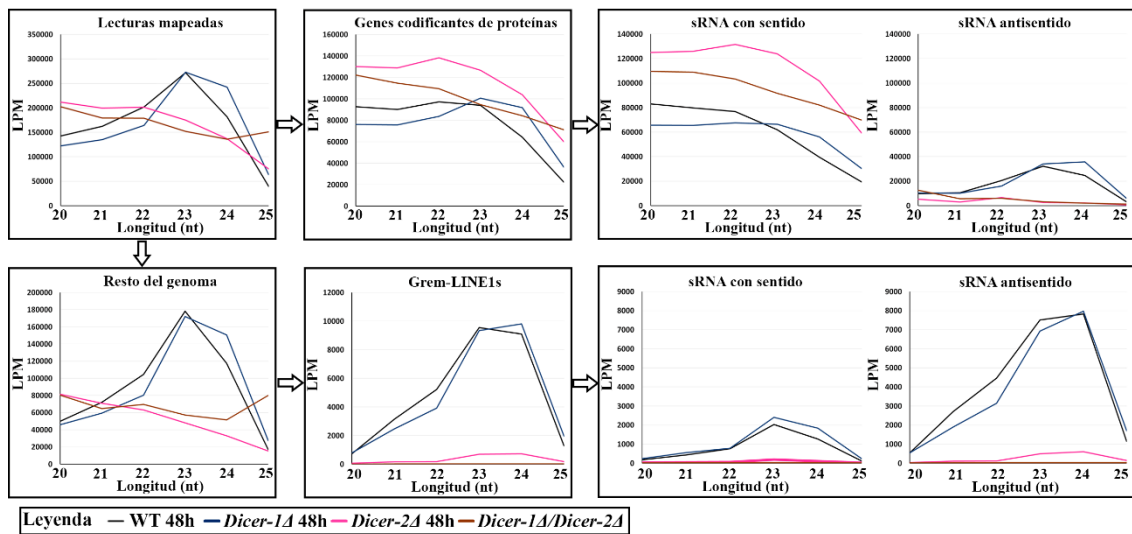
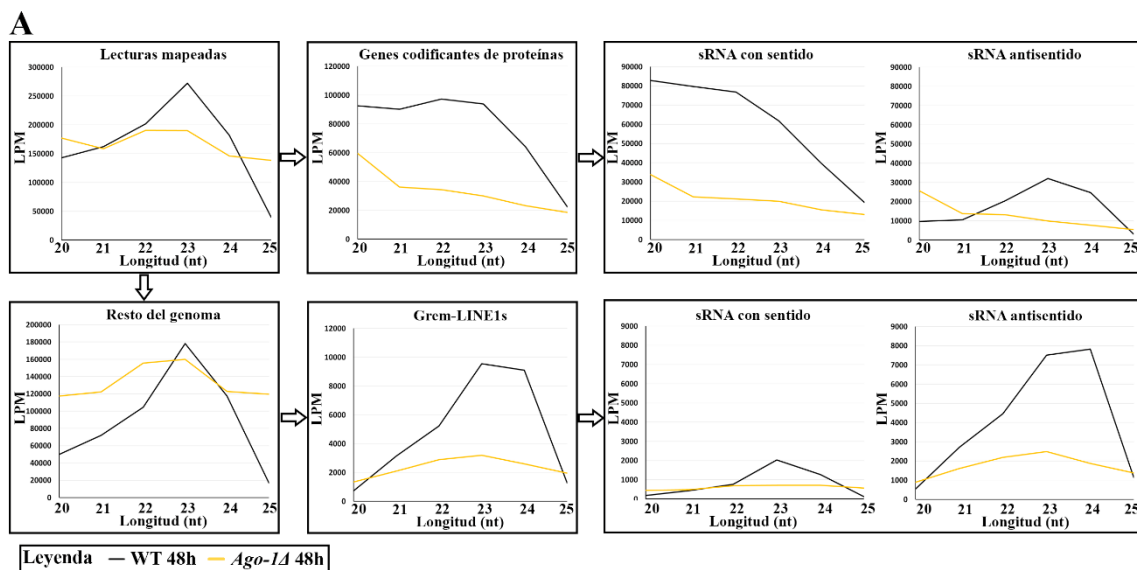
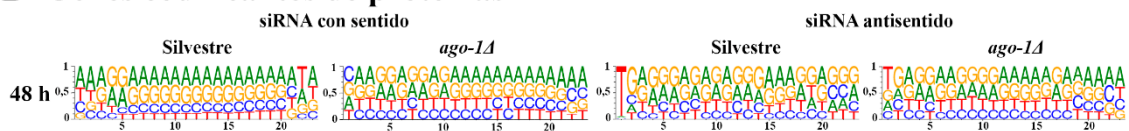


Figura 41. Acumulación de sRNA en los mutantes en *dicer*. Distribución de tamaños y polaridad de los sRNA de los mutantes *dicer-1Δ*, *dicer-2Δ* y *dicer-1Δ/dicer-2Δ* en fase estacionaria (48 h) separándose los pertenecientes a genes codificantes de proteínas o a Grem-LINE1. LPM, lecturas por millón; WT, estirpe silvestre.



B Genes codificantes de proteínas



C Grem-LINE1

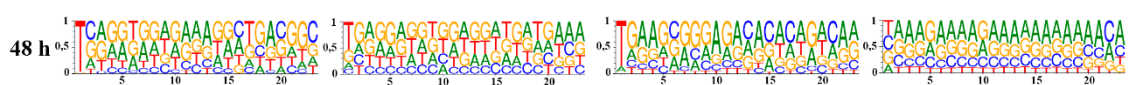


Figura 42. Acumulación de sRNA en el mutante *ago-1Δ*.

A) Distribución de tamaños y polaridad de los sRNA en fase estacionaria (48 h) separándose los pertenecientes a genes codificantes de proteínas o a Grem-LINE1. LPM, lecturas por millón; WT, estirpe silvestre. B) Logo de las secuencias de 23 nt representativo de los siRNA de los genes codificantes de proteínas. C) Logo de las secuencias de 23 nt representativo de los siRNA derivados de los Grem-LINE1.

IV.3. Determinación de la conservación funcional de la proteína R3B2 en Mucorales

Estudios previos realizados en el grupo de investigación habían puesto de manifiesto que la proteína R3B2 estaba exclusivamente distribuida en el orden Mucorales (Trieu et al., 2015). Debido al sustancial aumento en el número de genomas disponibles durante la realización de esta tesis, se procedió a realizar un nuevo análisis filogenético sobre el filo Mucoromycota con el fin de evaluar la conservación de R3B2 tanto a nivel de secuencia como funcional.

IV.3.1. Análisis filogenético de la proteína R3B2

La proteína R3B2 presenta una arquitectura de dominios con un dominio RIIID y dos dominios dsRBD, que es similar a la arquitectura de las RNasas III bacterianas y de levaduras, que tienen un dominio RIIID y un dsRBD, pero además también está presente en la proteína ribosomal MRPL3. Esta proteína ribosomal está conservada en todos los eucariotas y se ha relacionado con la producción de un tipo de miRNA independientes de Dicer en *N. crassa* (Lee et al., 2010).

Para determinar si R3B2 es un homólogo de MRPL3 o, por el contrario, se trata de dos familias de proteínas diferentes, las secuencias de R3B2 y del homólogo de MRPL3 (IDv2 110239) de *M. lusitanicus* se utilizaron en un BLAST frente a los genomas de los Mucoromicetos. La búsqueda de proteínas frente a los 86 genomas presentes en MycoCosm (<https://mycoCosm.jgi.doe.gov/>) (Grigoriev et al., 2014) permitió la identificación de 71 proteínas similares a R3B2 y 88 proteínas similares a MRPL3 utilizando un valor esperado (valor e) inferior a 10^{-3} . No se encontraron nuevos homólogos utilizando condiciones menos restrictivas. Las proteínas similares a R3B2 se filtraron manualmente para retirar las duplicadas procedentes de diferentes estirpes de la misma especie y las que carecían del dominio RIIID o de ambos dsRBD. Se obtuvo así un listado de 36 posibles homólogos de la proteína R3B2 que estaban exclusivamente presentes en Mucorales. Respecto a la proteína MRPL3 se encontró en todos los genomas estudiados, por lo que se seleccionaron 31 posibles homólogos que representasen la diversidad de estas proteínas en el filo de los Mucoromicetos.

Las secuencias de las proteínas encontradas se alinearon y la inferencia filogenética se realizó mediante PhyML, escogiendo el mejor modelo con 1000 réplicas bootstrap. En estos análisis se incluyeron las RNasas III bacterianas, RNC, de *E. coli* (P0A7Y0) y de *A. aeolicus* (O67082), así como las RNasas III nucleares de *S. cerevisiae* (Q02555), *Schizosaccharomyces pombe* (P22192), *N. crassa* (V51Q18), *A. niger* (G3XLX0), *C. neoformans* (Q5KEY8) y *C. albicans* (A0A1D8PM79; A0A1D8PM62). El árbol filogenético, utilizando las proteínas bacterianas como grupo externo, agrupó todas las proteínas de la familia R3B2 con una gran confianza (997/1000) y claramente separadas de los homólogos de MRPL3 y las RNasas III de clase II fúngicas (Figura 43).

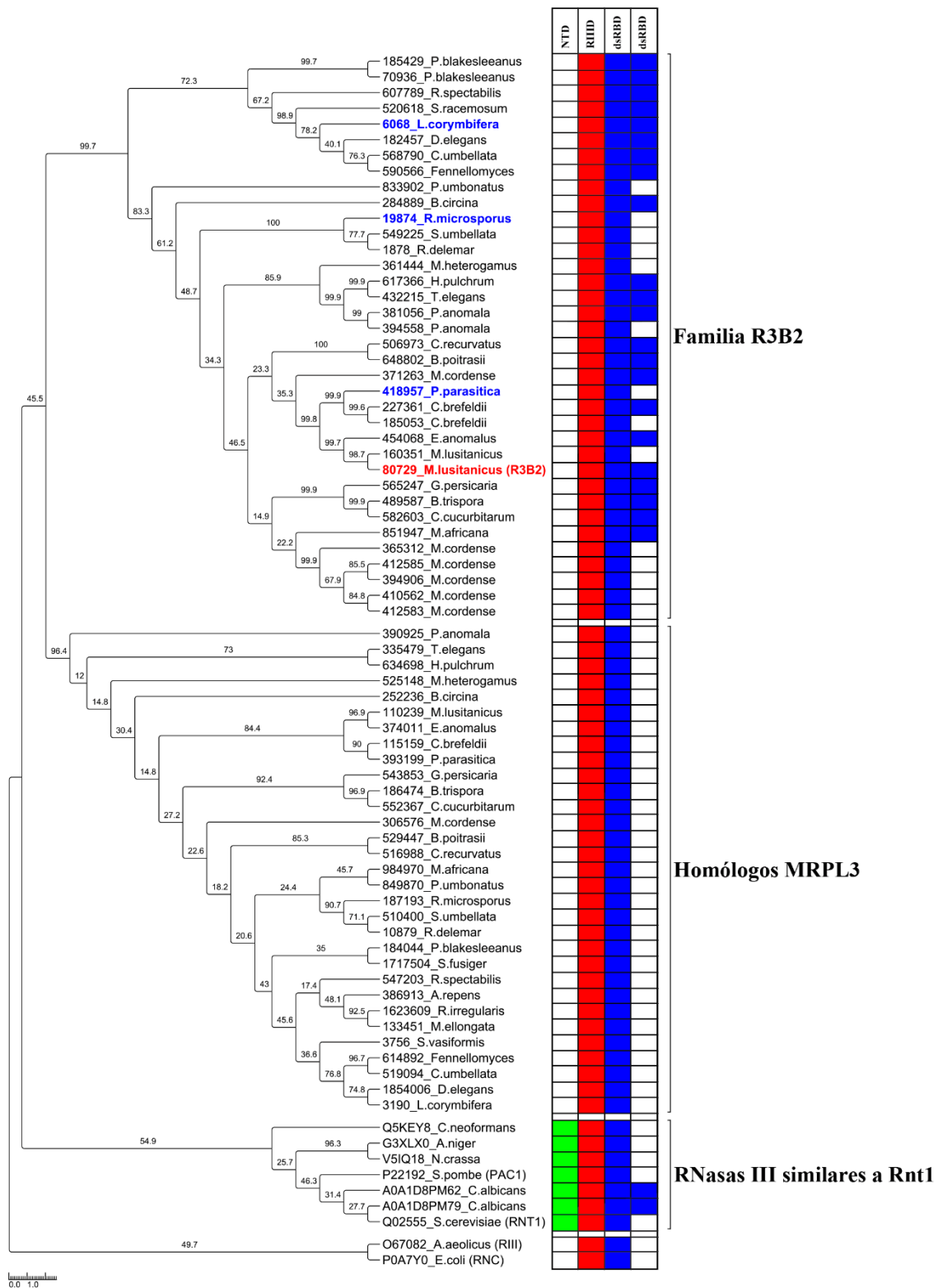


Figura 43. Conservación filogenética de la proteína R3B2.

Máxima verosimilitud de las secuencias de aminoácidos analizadas con el modelo filogenético LG+G+I+F (con cuatro categorías gamma distintas), que mostró el menor criterio de información de Akaike (*Akaike information criterion* o AIC). El árbol se enraizó con las RNasas III de clase I de bacterias (*A. aeolicus* y *E. coli*). La proteína R3B2 de *M. lusitanicus* se indica en rojo y en azul otras RNasas cuya actividad *in vitro* se ha analizado en este trabajo (Véase IV.3.2). Los números de las ramas se corresponden con el valor de bootstrap. Se indica la arquitectura de dominios de las RNasas III analizadas en base a los alineamientos de secuencia. La lista con los identificadores y el enlace a cada secuencia del JGI puede consultarse en la sección VIII.1. NTD, dominio N-terminal; RIII, dominio RNasa III; dsRBD, dominio de unión a dsRNA.

La familia de R3B2 incluye RNasas III con uno o dos dominios dsRBD, presentando la mayoría de las especies dos genes homólogos que producen una R3B2 completa y una versión truncada de la proteína (Figura 43), salvo en *Pilobolus umbonatus*, *R. microsporus*, *Sporodiniella umbellata* y *R. delemar* pertenecientes a la familia *Rhizopodaceae* y en *Mucor heterogamus* y *Parasitella parasitica* de la familia *Mucoraceae*. Este hecho sugiere que la adquisición de R3B2 por el ancestro de los Mucorales fue anterior a la duplicación del genoma sufrida por estos hongos (Corrochano et al., 2016) y que la proteína ancestral contaba con dos dsRBD. Llama la atención el caso de *M. cordense*, que presenta una copia homóloga de R3B2 completa y 5 copias adicionales truncadas y más distantes filogenéticamente de lo que se encuentran el resto de pares de genes completos y truncados (Figura 43).

Por otro lado, en *M. heterogamus* y *P. parasitica*, la sintenia alrededor del locus de R3B2 indica que se ha producido una deleción del dsRBD2 (Figura 44) y se ha perdido la proteína homóloga a la R3B2 truncada de *M. lusitanicus* (IDv2 160351). Por el contrario, el homólogo de R3B2 de la familia *Rhizopodaceae* se sitúa en regiones no conservadas con *M. lusitanicus* como se puede observar en *R. microsporus* (Figura 44). Estos datos sugieren que en la familia *Rhizopodaceae* no solo se ha perdido una copia de R3B2, sino que además el locus ha sido reorganizado con la pérdida del dsRBD2.

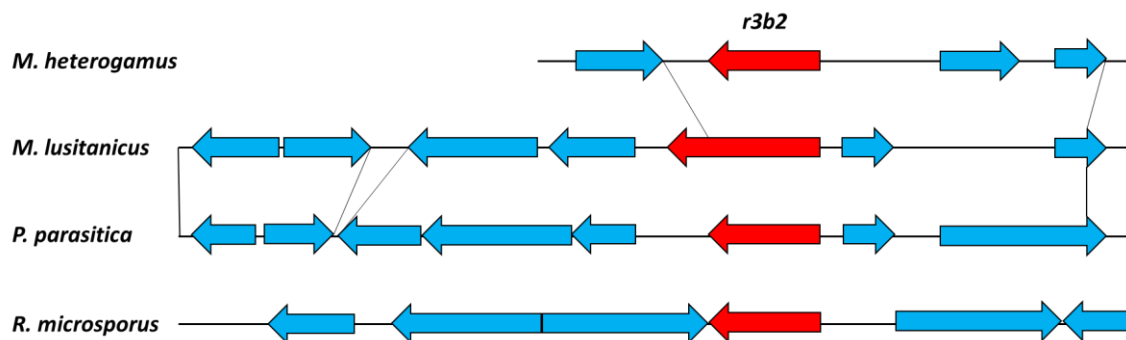


Figura 44. Posición relativa del locus *r3b2* en *M. heterogamus*, *M. lusitanicus*, *P. parasitica* y *R. microsporus*.

Representación de la arquitectura de genes observada con la herramienta Synteny (Mycocosm) centrada sobre el locus *r3b2*. La detección de sintenia se indica con líneas negras respecto al genoma de *M. lusitanicus*. Las flechas azules indican genes anotados y su dirección de transcripción.

IV.3.2. Análisis de la actividad RNasa *in vitro* de proteínas homólogas de R3B2

Las proteínas de la familia R3B2 presentan un gran número de sustituciones en los aminoácidos catalíticos del RIID con respecto a las RNasas III canónicas de procariontes y eucariotas. Los residuos en las posiciones del centro catalítico de R3B2 están muy poco conservados en las proteínas similares de los Mucorales sugiriendo que, al igual que la RNasa de *M. lusitanicus*, los homólogos encontrados no son capaces de degradar el dsRNA. Por ello, se seleccionaron tres proteínas homólogas para proceder a su expresión y purificación con el objetivo de determinar su actividad catalítica, al igual que se había hecho con R3B2 de *M. lusitanicus* (MIR3B2). En base al análisis filogenético descrito en el apartado anterior se seleccionó la proteína homóloga de *P. parasitica* (PpR3B2) porque

es una de las más cercanas filogenéticamente y las homólogas de *R. microsporus* (RmR3B2) y *L. corymbifera* (LcR3B2) porque se encuentran filogenéticamente más distantes, cubriendo la mayor parte de la familia y, además, son los otros dos Mucorales con mayor incidencia en la mucormicosis de humanos. El alineamiento de las secuencias del dominio RNasa III (Figura 45A) y su predicción estructural formando un homodímero (Figura 45B) mostraba la poca conservación de los residuos catalíticos en relación a las RNasas III canónicas. La proteína PpR3B2 presenta un solo dominio dsRBD y, a diferencia de MIR3B2, presenta 4 residuos de carácter ácido en lugar de 3, conservándose solo el E116 respecto a *E. coli* (Figura 45A). La proteína RmR3B2 también presenta un solo dominio dsRBD y solo conserva 2 residuos ácidos respecto a R3B2 en su centro catalítico (E59 y D119). Por último, la proteína LcR3B2 presenta los dos dsRBD, pero solo conserva 2 residuos ácidos en su centro catalítico (E52 y D112).

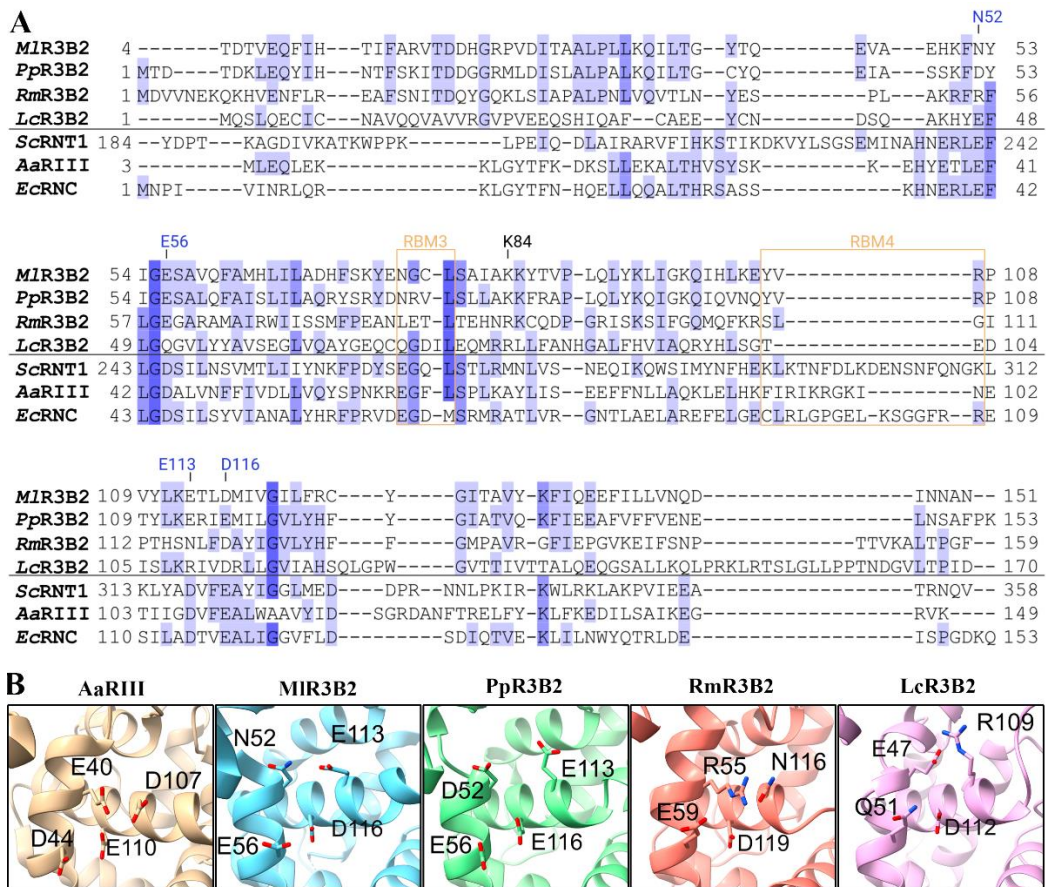


Figura 45. Comparación de los dominios RIIRD de Mucorales con los de las RNasas III canónicas.

A) Alineamiento de secuencia múltiple del dominio catalítico de R3B2 en *M. lusitanicus* (MIR3B2), *P. parasítica* (PpR3B2), *R. microsporus* (RmR3B2) y *L. corymbifera* (LcR3B2) en comparación con otras RNasas III de clase I de *A. aeolicus* (AaRIII) y de *E. coli* (EcRNC) y de clase II de *S. cerevisiae* (ScRNT1). B) Ampliación de los residuos catalíticos en AaRIII (PDB 1RC5), MIR3B2 (Véase IV.1.6) y las predicciones estructurales obtenidas mediante Alphafold2 de PpR3B2, RmR3B2 y LcR3B2.

Para la expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a la etiqueta de histidinas, los cDNA de los genes *Ppr3b2*, *Rmr3b2* y *Lcr3b2* se clonaron en el vector pET15-b (Véase III.3.2). El cDNA de los genes que codifican PpR3B2 y LcR3B2, se sintetizaron por la empresa GeneScript e IDT, respectivamente, con el uso de codones optimizado para *E. coli*. La amplificación del gen que codifica LcR3B2 se realizó a partir

de cDNA de *L. corymbifera*, retrotranscrito utilizando Expand™ Reverse Transcriptase (Cat. 11785826001; Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas recombinantes PpR3B2, RmR3B2 y LcR3B2, de 42,3, 40 y 60,7 kDa, respectivamente, se expresaron en *E. coli* en las mismas condiciones de MIR3B2. La purificación de las proteínas con matrices de níquel (Ni-NTA) dio lugar a un rendimiento de 0,15 mg por cada 25 ml de cultivo para la proteína PpR3B2 (Figura 46A) y de 0,1 mg por cada 25 ml de cultivo para las proteínas RmR3B2 y LcR3B2 (Figura 46B y 46C).

Los ensayos de actividad *in vitro* frente a las moléculas de RNA derivadas del gen *carB* revelaron que, a pesar de las diferencias de las proteínas homólogas en su centro catalítico respecto a MIR3B2, su especificidad por el ssRNA está conservada (Figura 46D). La degradación del ssRNA por parte de las RNasas homólogas produjo un patrón de productos similar a los producidos por la proteína MIR3B2 sugiriendo que su función está conservada en los Mucorales. Todas carecían de actividad sobre el dsRNA.

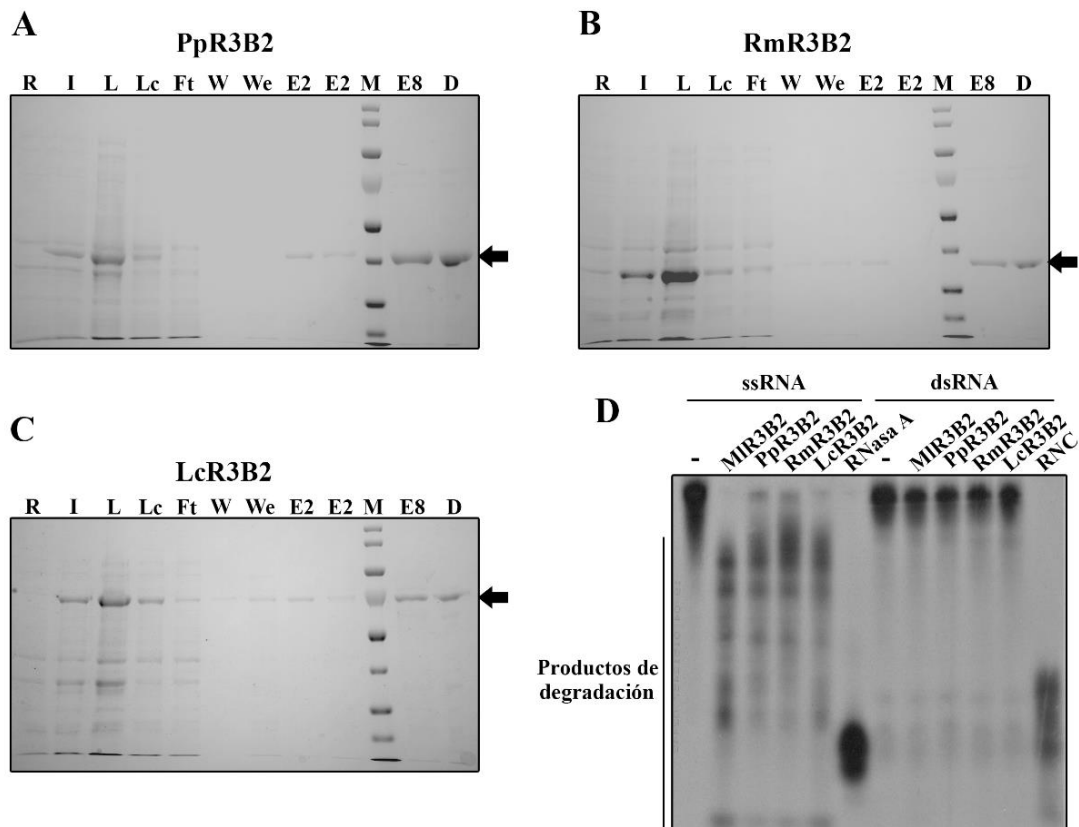


Figura 46. Caracterización de la actividad *in vitro* de las proteínas homólogas de R3B2 en Mucorales.

A) Purificación de la proteína R3B2 de *P. parasitica* (PpR3B2) analizada en un gel 10% SDS-PAGE. B) Purificación de la proteína R3B2 de *R. microsporus* (RmR3B2) analizada en un gel al 10% SDS-PAGE. C) Purificación de la proteína R3B2 de *M. lusitanicus* (MIR3B2) y las proteínas homólogas purificadas en A, B y C frente a ssRNA y dsRNA (20 nM *carB* ssRNA; 10 nM *carB* dsRNA; concentración de proteína 300 nM). Se indica con flechas negras las proteínas purificadas. R, cultivo sin inducir; I, cultivo inducido; L, lisado; Lc, lisado tras centrifugar; Ft, proteínas no unidas a la matriz Ni-NTA; W, lavado con STB; We, lavado con STB al 5% EB; M, PageRuler prestained protein Ladder (Thermo Scientific); E2-8, eluciones de la matriz Ni-NTA con STB al 20% u 80% de EB; D, proteína dializada.

IV.3.3. Complementación funcional con proteínas homólogas a R3B2 en *M. lusitanicus*

Las RNAsas III homólogas de MIR3B2 analizadas, aunque parece que tienen diferencias importantes a nivel de secuencia, conservan su especificidad por el ssRNA *in vitro*. Como conservan la misma actividad catalítica se planteó el objetivo de comprobar si estas RNAsas además son capaces de complementar el fenotipo de la estirpe *r3b2Δ* de *M. lusitanicus*. Para este experimento de complementación se seleccionaron los genes *r3b2* de los Mucorales patógenos *R. microsporus* y *L. corymbifera*.

IV.3.3.1. Complementación del defecto en la NCRIP del mutante en *r3b2* de *M. lusitanicus*

Para analizar la complementación de la NCRIP se procedió a la integración del cDNA que codifica cada una de las proteínas homólogas bajo el control del promotor del gen de *M. lusitanicus*, P_{Mlr3b2} , en el locus *carRP* de la estirpe *r3b2Δ* (MU412) (Figura 47A), seleccionándose las colonias albinas tras una serie de pases de las esporas por medio selectivo. La integración en este locus ha sido ampliamente utilizada por el grupo de investigación (Calo et al., 2017; Rodríguez-Frómata et al., 2012; Trieu et al., 2015) y permite el rápido aislamiento de estirpes homocariontes portadoras del fragmento de reemplazamiento, gracias a la selección de colonias albinas derivadas de la interrupción del gen estructural de la carotenogénesis *carRP*. Los fragmentos de reemplazamiento contenían cada uno de los genes *r3b2*, incluyendo el gen de *M. lusitanicus* como control, bajo el control del promotor del gen de *M. lusitanicus* y el marcador de selección *leuA*, ambos flanqueados por las regiones adyacentes del locus *carRP* (Figura 47B).

Los fragmentos de reemplazamiento liberados de sus respectivos plásmidos mediante su digestión con *SmaI* se utilizaron para transformar la estirpe MU412, obteniéndose 14, 12 y 12 transformantes para las construcciones con *Mlr3b2*, *Lcr3b2* y *Rmr3b2*, respectivamente. Tras varios ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo YNB, los transformantes que habían adquirido el fenotipo albino, indicativo de la integración en el locus *carRP*, se analizaron mediante PCR para confirmar la integración del fragmento completo (Figura 47C). Los oligonucleótidos CarB13 y carRP11 hibridan fuera de las regiones adyacentes del gen *carRP*, dando lugar a un fragmento de 4,4 kb para el locus silvestre, mientras que las integraciones de *Mlr3b2*, *Lcr3b2* y *Rmr3b2* daban lugar a fragmentos de 9,5 kb, 9,2 kb y 8,7 kb, respectivamente. Todos los transformantes analizados mostraban los fragmentos esperados y la ausencia del fragmento de 4,4 kb, indicando que llevaban la integración correcta en homocigosis (Figura 47C). En base a estos resultados, se seleccionaron las estirpes MU1226 y MU1227 que portaban el gen *Mlr3b2*, las estirpes MU1232 y MU1233 que portaban el gen *Lcr3b2* y las estirpes MU1238 y MU1239 que portaban el gen *Rmr3b2*.

El análisis del funcionamiento de la NCRIP se realizó como se ha descrito anteriormente a través de la medición de la expresión del gen *rvt* mediante RT-qPCR (Véase IV.2.3.3). Los niveles del gen chivato fueron 5 veces superiores en la estirpe parental *r3b2Δ* (MU412) comparados con los de las estirpes que portaban la versión silvestre de *Mlr3b2* en el locus *carRP* (Figura 48), indicando la complementación de la mutación. De igual forma, las estirpes que portaban el cDNA de *Lcr3b2* mostraron niveles de expresión similares a las estirpes con la versión de *M. lusitanicus* (Figura 48),

indicando que la proteína homóloga de *L. corymbifera* es capaz de complementar la función de MIR3B2 en la NCRIP. Por el contrario, los niveles de *rvt* en las estirpes que portaban el cDNA de *Rmr3b2* no eran estadísticamente diferentes a la estirpe recipiente y, por tanto, reflejaron la falta de complementación (Figura 48). La RT-PCR del mRNA de las estirpes que portaban el gen *Rmr3b2*, utilizando oligonucleótidos específicos para este gen (RmR3B2-F1-NdeI y RmR3B2-R2-SacII), no produjo amplificación, sugiriendo que la falta de complementación se debía a que el gen no se estaba expresando.

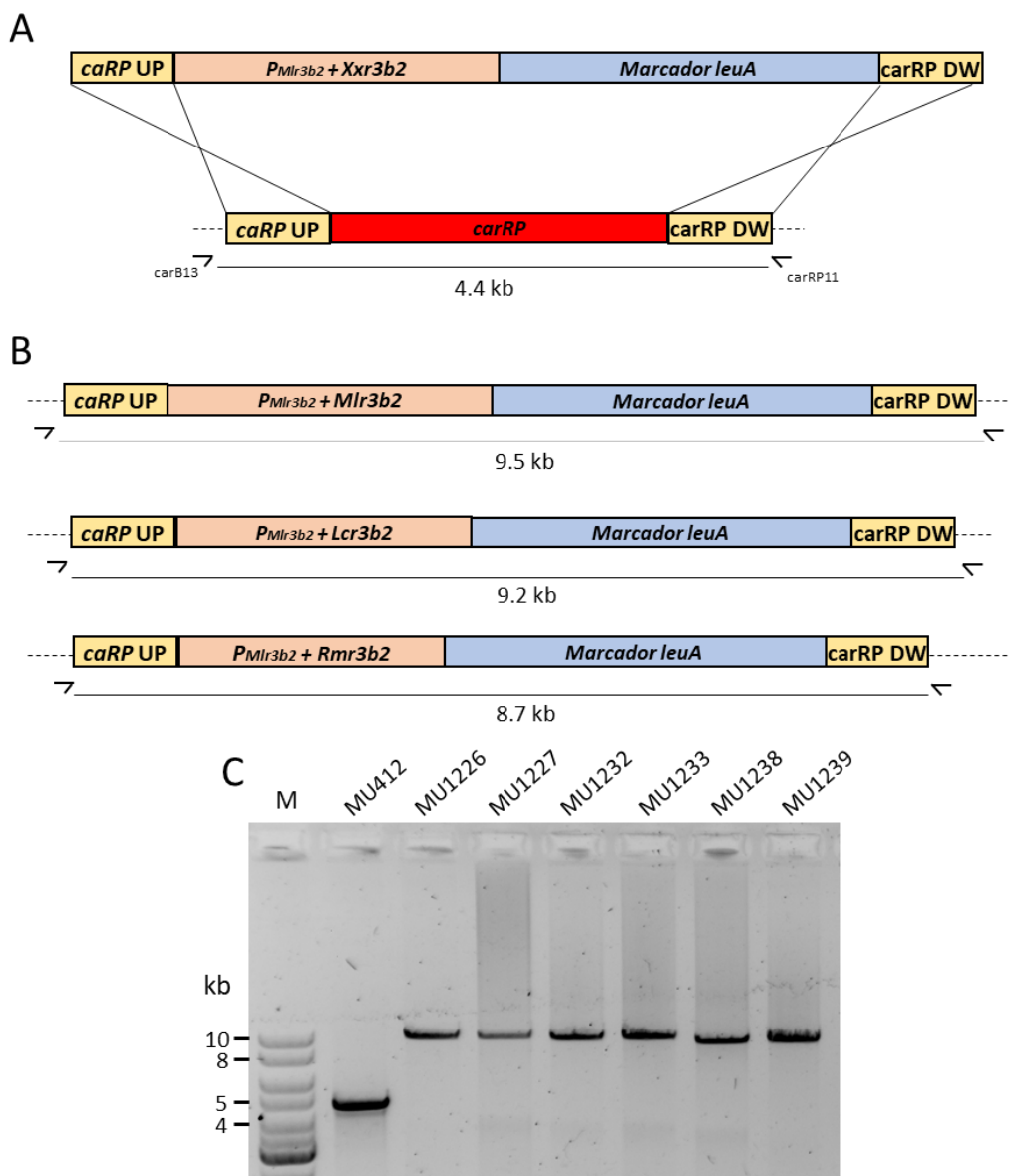


Figura 47. Obtención de estirpes de *M. lusitanicus* portadoras de los posibles ortólogos de *r3b2* en el locus *carRP*.

A) Representación de la recombinación homóloga de los fragmentos de reemplazamiento (arriba) en el locus *carRP* (abajo). B) Representación de los fragmentos de reemplazamiento generados para cada homólogo de *r3b2* y tamaño del producto de PCR esperado tras la integración en el locus *carRP*. C) Productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos *carB13* y *carRP11* para amplificar el locus *carRP* en la estirpe parental y las estirpes mutantes generadas en este trabajo. *P_{Mir3b2}*, promotor de *Mir3b2*; M, GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

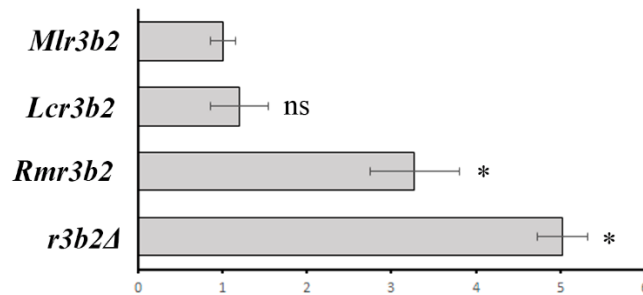


Figura 48. Funcionamiento de la NCRIP en las estirpes de *M. lusitanicus* portadoras de los homólogos de *r3b2*. Expresión relativa del gen *rvt* como chivato del funcionamiento de la NCRIP medida mediante qPCR y normalizada frente al gen *ef-1*. Los asteriscos indican diferencias de expresión significativas respecto *Mlr3b2* (*, $P < 0,01$) en un ANOVA de una vía seguido de un test HSD de Tukey.

IV.3.3.2. Complementación del defecto en la ruta canónica de RNAi del mutante en *r3b2* de *M. lusitanicus*

Debido a la limitación de marcadores de selección en la estirpe *r3b2Δ*, MU412, el análisis de la frecuencia de silenciamiento se realizó mediante la transformación de esta estirpe con plásmidos capaces de expresar simultáneamente el gen *r3b2* de las diferentes especies (*Mlr3b2*, *Lcr3b2* y *Rmr3b2*), bajo el control del promotor del gen de *M. lusitanicus*, y la horquilla de RNA del gen *carB*, cuyo silenciamiento produce (De Haro et al., 2009). Como control, la estirpe MU412 también se transformó con el plásmido que solo expresa la horquilla, pMAT2038. Los transformantes obtenidos se transfirieron a medio selectivo (YNB pH 3,5) y se incubaron durante 48-72 h a 26°C en condiciones de iluminación continua. La frecuencia de silenciamiento se determinó a través del número de colonias que presentaron parches albinos, indicativos del silenciamiento del gen *carB*. Las frecuencias obtenidas fueron más bajas que las medidas anteriormente (Véase IV.2.3.2), probablemente por una menor eficiencia durante la transformación que redujo el número de plásmidos en los transformantes. Como se ha descrito anteriormente, un bajo número de copias afecta negativamente a la capacidad del hongo para desencadenar el silenciamiento inducido por transgenes (Nicolás et al., 2003). La transformación con los plásmidos que portan *Mlr3b2* o *Lcr3b2* mostraron una frecuencia de silenciamiento de alrededor del 12% (Tabla 12), indicando que, al igual que para la NCRIP, el gen homólogo de *L. corymbifera* es capaz de complementar la función de *Mlr3b2* también en el mecanismo canónico de silenciamiento inducido por transgenes de *M. lusitanicus*. Por el contrario, la frecuencia de silenciamiento del plásmido que expresaba *Rmr3b2* (Tabla 12) fue del mismo rango que la observada con el plásmido control, sugiriendo que, al igual que con la integración de este gen en el locus *carRP* realizada en el apartado anterior, la clonación de este gen en un plásmido tampoco permite su expresión en *M. lusitanicus*.

Tabla 12. Frecuencia de silenciamiento de la estirpe MU412 de *M. lusitanicus* transformada con plásmidos que expresan la horquilla de RNA del gen *carB* y los genes homólogos de *r3b2*.

Gen (plásmido)	Transformantes		Total	Frecuencia de silenciamiento (%)
	Amarillos	Albinos		
<i>r3b2Δ</i> (pMAT2038)	140	4	144	2,8
<i>Mlr3b2</i> (pMAT2043)	157	22	179	12,3
<i>Lcr3b2</i> (pMAT2324)	119	16	135	11,9
<i>Rmr3b2</i> (pMAT2335)	80	0	80	0

V. Discusión

V.1. La proteína R3B2 de *M. lusitanicus*

La familia de las RNasas III presenta miembros con una variada arquitectura de dominios, desde las proteínas más simples de procariotas y levaduras (Clases I y II) hasta las grandes proteínas del tipo Drosha y Dicer (Clases III y IV). A pesar de sus diferencias en cuanto a tamaño, complejidad y mecanismos catalíticos utilizados, todas comparten la especificidad por el dsRNA que se puede formar mediante estructuras secundarias intramoleculares en un ssRNA o mediante la hibridación de dos moléculas de ssRNA complementarias (Court et al., 2013). Así, la hipótesis de una actividad catalítica frente a ssRNA en la ruta NCRIP planteada en trabajos previos a esta tesis doctoral (Trieu et al., 2015) justificó su ejecución ya que, de ser cierta, supondría una diferencia fundamental en la función de la proteína R3B2 de *M. lusitanicus* frente al resto de RNasas III descritas en eucariotas. Por otro lado, como ya se ha mencionado, los Mucorales son hongos causantes de una enfermedad humana denominada mucormicosis y la proteína R3B2 está implicada en el nivel de virulencia de *M. lusitanicus* (Pérez-Arques et al., 2020). Debido a la alta conservación de los mecanismos fisiológicos que rigen el metabolismo de hongos y animales, la identificación de características propias de hongos supone la base para el desarrollo de terapias antifúngicas específicas que permitan un tratamiento seguro y eficaz frente a este tipo de patógenos. De modo que la caracterización detallada de esta RNasaIII, única conocida con actividad sobre ssRNA y específica de Mucorales, podría abrir la posibilidad del descubrimiento de nuevos antifúngicos, necesarios debido a que los existentes son poco eficaces contra estos hongos (Garre, 2022).

La estrategia inicial para la caracterización estructural de R3B2 fue aislar dominios estructurados de un tamaño máximo de 200 aminoácidos para su determinar su estructura mediante RMN. Así, la proteína completa purificada se sometió a un tratamiento de proteólisis parcial con la endoproteasa Subtilisina que produjo 4 péptidos denominados, en base a su peso molecular aparente, como F22, F19, F18 y F14 (Figura 18). La posterior caracterización de los péptidos mediante espectrometría de masas, secuenciación N-terminal y huella peptídica demostró que F22 y F19 son productos de degradación intermedia de F18 y que este último fragmento contiene el dominio RIIID de R3B2, mientras que F14 contiene el dsRBD1 (Figura 18). El segundo dominio de unión a RNA, dsRBD2, que se encuentra en la región C-terminal, denominada CTF, de la proteína no se identificó en ninguno de los péptidos producidos por la proteólisis, probablemente debido a que está poco estructurado, asunción que está apoyada por la menor resistencia a la proteólisis del fragmento que incluye el dsRBD1 (F14) con respecto al que contiene RIIID (F18). Finalmente, la caracterización estructural de R3B2 mediante RMN se descartó debido a que el fragmento CTF no se consiguió expresar eficientemente en *E. coli*, ni tampoco un fragmento de menor tamaño que solo contenía el dsRBD2, y que el fragmento F18 dimerizaba (Figura 19), resultando en un péptido de más de 200 aminoácidos. La dimerización de R3B2 a través de RIIID se confirmó mediante un ensayo de Y2H, que también reveló una dimerización débil adicional que involucra a la región CTF de la proteína (Figura 20), así como mediante cromatografía de exclusión molecular,

análisis de dispersión estática de la luz y resolución de un cristal de un péptido de R3B2 que carecía de la región CTF (fragmento Δ CTF).

Para que R3B2 pueda llevar a cabo su función en la ruta NCRIP (Trieu et al., 2015) es necesario que pueda unirse directa o indirectamente al RNA. El análisis de la capacidad de unión de R3B2 a moléculas de RNA mediante ensayos de tipo EMSA reveló que la proteína es capaz de unirse, de manera independiente de secuencia, tanto a moléculas bicatenarias como a moléculas de naturaleza monocatenaria con estructuras secundarias naturales (Figura 21). Estos resultados sugieren que la degradación específica *in vivo* de ciertos mRNA mediada por la NCRIP está determinada por otros elementos como las RdRP ya que, al menos *in vitro*, R3B2 no parece mostrar restricciones en la unión al sustrato. Estos mismos ensayos muestran que la unión al RNA requiere de ambos dominios dsRBD, ya que cuando se mutan se desestabiliza la formación del complejo resultando en uniones lábiles que requieren mayores concentraciones de proteína para que se puedan detectar (Figura 22).

Los ensayos de actividad *in vitro* revelan que R3B2 es una RNasa específica de ssRNA (Figura 23), tal y como se planteó a raíz de las características de los rdRNA (Trieu et al., 2015), y a pesar de presentar un dominio RNasa III. Al igual que lo observado en el ensayo EMSA, R3B2 no muestra especificidad aparente por un sustrato concreto de ssRNA, siendo capaz de actuar sobre cualquiera de las secuencias que se utilizaron en los ensayos de actividad. Como el resto de RNasas III (Court et al., 2013), la actividad catalítica es dependiente de Mg^{+2} , con un óptimo entre 0.5-1 mM y una fuerte inhibición con concentraciones mayores de 5 mM. Curiosamente, la eliminación del dsRBD2 o de ambos dsRBD provoca un aumento de actividad catalítica que se reduce cuando se mutan los posibles residuos de interacción con el RNA del dsRBD2 (Figura 24). Estos resultados sugieren que no es necesaria una unión estable al ssRNA para ser degradado por el dominio RNasa III de R3B2, pero que de alguna forma el dsRBD2 está implicado en la regulación de esta acción catalítica. El excelente trabajo de caracterización realizado por Weinberg et al. (2011) sobre la proteína Dcr1 de la levadura *K. polysporus*, una RNasa III de clase II, indica que la eliminación de ambos dominios dsRBD provoca la pérdida de especificidad de la RNasa por el dsRNA. Este resultado sugiere que, al menos, las RNasas III de clase II son capaces de degradar ssRNA, estando determinada su especificidad por los dsRBD. Este no es el caso de R3B2, puesto que corta solo ssRNA tanto en ausencia como en presencia de los dominios dsRBD, sugiriendo que la especificidad de sustrato está completamente determinada por el dominio RIIID (Figura 24), hipótesis que se confirmó cuando se substituyó el dominio catalítico de R3B2 por el de RNC, una RNase III típica de *E. coli*, y se comprobó que la proteína quimérica era capaz de degradar el dsRNA (Figura 24).

La expresión y purificación del fragmento Δ CTF de R3B2, que contiene el RIIID y el dsRBD1, permitió obtener la suficiente cantidad de proteína necesaria para su cristalización y posterior determinación de su estructura tridimensional mediante

difracción de rayos X. Los cristales obtenidos solo permitieron resolver la estructura cristalográfica del dímero formado por el RIIID, sugiriendo que en ausencia de sustrato la flexibilidad del dsRBD1 impide su observación. La estructura del RIIID obtenida no varía sustancialmente de la de otros dominios de este tipo de proteínas tanto de procariotas como de eucariotas. La comparación con los datos cristalográficos obtenidos previamente indica una gran coherencia del modelo, especialmente en las regiones que alojan el centro catalítico. El centro catalítico de R3B2, tal y como sugerían los alineamientos de secuencia, presenta 3 de los cuatro residuos ácidos encargados de la coordinación de Mg^{+2} , pero con una disposición invertida respecto a los RIIID canónicos. El cuarto residuo es una asparagina (N52) que sustituye a un aspártico presente en los RIIID canónicos y podría ser responsable de la inusual especificidad de sustrato de R3B2, aunque esta hipótesis se descartó al comprobar que la sustitución tanto a aspártico (N52D) como a glutámico (N52E) de esa asparagina no tiene un efecto patente sobre la actividad catalítica de la proteína (Figura 27). De modo que esta asparagina parece que no está involucrada en la especificidad del ssRNA como sustrato de R3B2. El mismo resultado se obtuvo al sustituir un residuo de lisina (K84) que se dispone de forma prominente sobre el canal en el que se sitúa el dsRNA en los RIIID canónicos. Entre las diferencias estructurales más relevantes del RIIID de R3B2, destaca también el acortamiento o desaparición del conector situado entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (Figura 25C), respecto a los RIIID cristalizados, que estas RNAsas utilizan para interactuar con el surco mayor del dsRNA formando el denominado RBM4 (Gan et al., 2006).

Los numerosos intentos basados en las observaciones de la estructura para esclarecer el motivo de la especificidad de sustrato de R3B2 no aportaron resultados positivos, sugiriendo la existencia o carencia de motivos adicionales para poder explicar la incapacidad de R3B2 para cortar dsRNA. Entre estos motivos se puede mencionar que la falta del RBM4 podría estar impidiendo el correcto posicionamiento de la doble hebra de RNA sobre ambos centros catalíticos o, alternativamente, que el estrechamiento de la superficie de contacto con el RNA entre ambos monómeros podría impedir la entrada del dsRNA. Desde un punto de vista estructural, la presencia de un centro catalítico en cada uno de los monómeros que conforman el dímero supone que de ser uno activo el otro también debería serlo, independientemente de la inversión de los residuos ácidos. La distancia entre ambos centros catalíticos en los dímeros intra o intermoleculares del RIIID de las RNAsas III determinan un corte asimétrico del dsRNA dando lugar a los dos nucleótidos protuberantes característicos de los siRNA (Court et al., 2013). Se ha descartado la participación de la asparagina (N52) en la actividad catalítica de R3B2 (Figura 27), mientras que entre las mutaciones de la versión RIII- (H49A, G55A y E56A), que muestra una actividad reducida (Figura 24), se incluye un residuo de glutámico del centro catalítico (E56). La distancia entre estos residuos de glutámico en el dímero es de unos 17 Å lo que supone 4-5 nt de una cadena de RNA extendida (Figura 49B). Dada la naturaleza monocatenaria del sustrato procesable por R3B2, la acción de ambos centros catalíticos simultáneamente sobre un ssRNA extendido tendría como resultado la

producción de fragmentos de 4-5 nt. Como no se han podido observar estos fragmentos *in vitro* parece que lo más probable es que la hebra de ssRNA solo se sitúe adecuadamente en uno de los centros catalíticos.

En cambio, sí que se ha observado una periodicidad en el logo de secuencia de los rdRNA (Trieu et al., 2015). La secuenciación de sRNA reveló que los rdRNA entre 18 y 23 nt no solo presentan una U en la penúltima posición antes del corte en el extremo 3', sino que además 2 nucleótidos aguas arriba de su extremo 5' también se observa una probabilidad similar de U (Figura 49A). Estos resultados sugieren que el extremo 5' de un rdRNA es el punto de corte de otro rdRNA en su extremo 3' y supone que R3B2 puede recorrer la cadena de ssRNA cortando eventualmente un nucleótido tras una U, ya que de estar separándose de la cadena y uniéndose en otro punto tras el corte, la preferencia de U en la penúltima posición aguas arriba del extremo 5' de un rdRNA no se mantendría. En este sentido, el canal estrecho de RNA que forma el dímero de R3B2 presenta la anchura adecuada para alojar una sola cadena de RNA (Figura 49B), que además encontraría la resistencia de la cadena lateral protuberante de K84 (Figura 49C) forzando al RNA a desplazarse a través de dicho canal sin poder abandonarlo. La naturaleza básica de las K84 en el dímero de R3B2 sugiere una explicación a la preferencia por el corte un nucleótido aguas abajo de U ya que de posicionarse un U entre ambas asparaginas (N52), pero no otro nucleótido, permitiría una interacción electrostática a través de ambos grupos carbonilo de esta base nitrogenada que estabilizaría a R3B2 sobre el RNA. Esta última suposición sitúa el enlace fosfodiéster en 3' del nucleótido posterior al uracilo en las inmediaciones de uno de los centros catalíticos (Figura 49B), sugiriendo una explicación estructural a la preferencia de corte tras un U en penúltima posición.

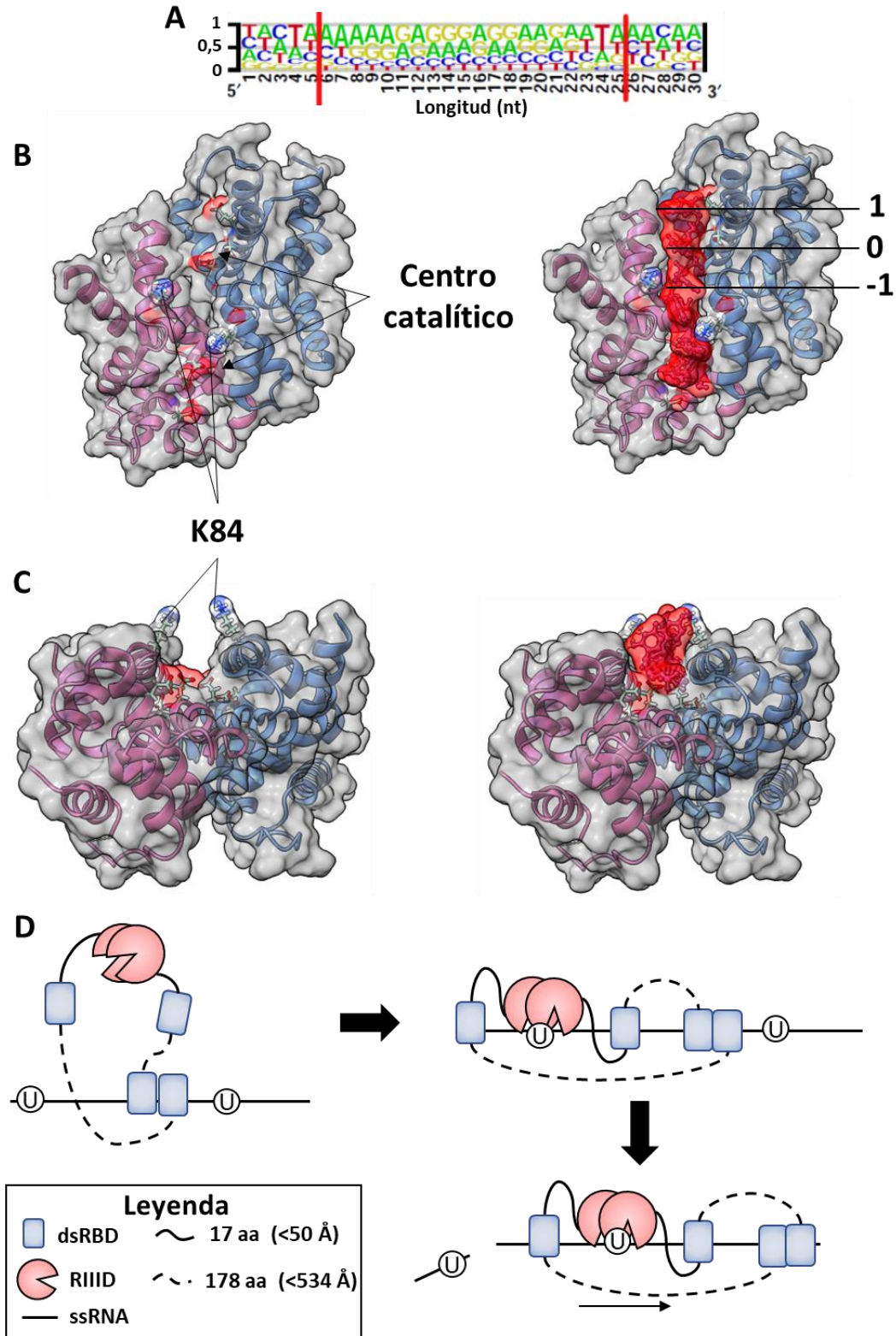


Figura 49. Modelo de actuación de la proteína R3B2.

A) Logo de secuencia de un rDNA de 20 nt mostrando los 5 nt aguas arriba y abajo donde se aprecia la presencia de U en las penúltimas posiciones (Trieu et al., 2015). B) Canal de ssRNA del dímero R3B2 visto desde arriba sin y con la presencia de una molécula de ssRNA de 6 nt donde se indica con 0 el nucleótido cuyo enlace fosfodiéster queda sobre el centro catalítico (con las zonas de carga negativa indicadas en rojo) y con 1 y -1 las posiciones posteriores y anteriores al sitio de corte. Se muestra la estructura de los monómeros del RIIID que forman parte del dímero con lazos violetas o azules, y la superficie molecular en gris. C) Canal de ssRNA de R3B2 visto de frente con y sin la molécula de ssRNA. D) Representación de la unión de R3B2 a una cadena de ssRNA y su desplazamiento sobre ella para generar los rDNA de forma que se da lugar a la preferencia de corte de U en la penúltima posición al final del rDNA y en el rDNA precedente.

V.2. El papel de R3B2 en el complejo con las proteínas Dicer de *M. lusitanicus*

En *M. lusitanicus* se ha descrito una compleja red de rutas de silenciamiento génico capaces de controlar la acumulación de mRNA endógenos, proteger la estabilidad del genoma y regular procesos fundamentales del hongo (Pérez-Arques et al., 2020; revisado en Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016). Por un lado, existen los mecanismos canónicos en los que participan las enzimas Dicer y Argonauta, que se encargan de la defensa del hongo ante ácidos nucleicos exógenos y se utilizan para generar una capa de regulación de la expresión génica endógena adicional, conocida como PTGS. El funcionamiento de este mecanismo es el que también permite a *M. lusitanicus* silenciar transitoriamente genes diana de compuestos antifúngicos y evadir su efecto, en un proceso conocido como epimutación (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019). Por otro lado, la NCRIP actúa como un mecanismo de degradación de mRNA específicos independiente de la generación de siRNA (Calo et al., 2017; Trieu et al., 2015). En este último caso, la única RNasa relacionada con la generación de los productos de degradación de la ruta o rdRNA es R3B2 (Trieu et al., 2015). Pero un creciente número de evidencias experimentales apuntan a interacciones entre las rutas canónicas de RNAi y la NCRIP de *M. lusitanicus*. Por un lado, se ha demostrado que R3B2 es necesaria para un correcto funcionamiento del silenciamiento génico mediado por transgenes dependiente de la ruta canónica (Trieu et al., 2015). Además, los análisis realizados con anterioridad a esta tesis pusieron de manifiesto que R3B2 era necesaria para la producción de la mayoría de los siRNA derivados de la ruta canónica de silenciamiento (Nicolás et al., 2010; Trieu et al., 2015). Mientras que estos dos estudios sugieren la necesidad de R3B2 para el correcto funcionamiento de las rutas de RNAi canónicas, investigaciones posteriores revelaron que la NCRIP regula negativamente el silenciamiento de los Grem-LINE1 (Pérez-Arques et al., 2020) y la producción de epimutantes (Calo et al., 2017).

Con el objetivo de esclarecer la interrelación de las rutas de RNAi se procedió a analizar las posibles interacciones entre las proteínas implicadas mediante Y2H. Las interacciones de las proteínas del silenciamiento han sido ampliamente documentadas en eucariotas. Así, se ha descrito la dimerización de la proteína QDE-1 (RdRP) en *N. crassa* a través de su cristalización (Salgado et al., 2006). En este mismo hongo, la purificación mediante matrices de Níquel y posterior inmunoprecipitación de QDE-2 (Ago), permitió la identificación de Qip, indicando una interacción estable entre ambas proteínas (Maiti et al., 2007), mientras que en humanos las proteínas Dicer, TRBP y Ago-2 forman un complejo macromolecular conocido como complejo de carga del RISC (*RISC loading complex* o RLC) (Chendrimada et al., 2005). Además de TRBP, la proteína Dicer humana interacciona con otra cuya arquitectura de dominios también incluye tres dominios dsRBD, denominada PACT (Lee et al., 2006). Sorprendentemente los ensayos de Y2H utilizando todas las proteínas implicadas en el silenciamiento mediado por RNAi conocidas de *M. lusitanicus* solo pusieron de manifiesto 4 interacciones (Figura 29). En

primer lugar, se detecta la dimerización débil de la proteína RdRP-1, no observándose dimerización en los casos de RdRP-2, ni de RdRP-3, tampoco se observa interacciones entre las 3 RdRP. En segundo lugar, la dimerización de R3B2 descrita anteriormente, una interacción intensa entre R3B2 y Dicer-1 y una débil de R3B2 con Dicer-2. Esta última interacción solo se observa cuando la proteína R3B2 se encuentra fusionada al dominio Gal4_{BD}, probablemente debido a la toxicidad y consiguiente retraso en el crecimiento que se aprecia cuando se fusiona con Gal4_{AD}, que junto con la debilidad de la interacción impide su detección.

La interacción de las proteínas Dicer con otras que presentan numerosos dominios de unión a dsRNA es un elemento recurrente en la naturaleza. Además de la mencionada interacción de la proteína humana con TRBP y PACT (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006), dos proteínas que presentan tres dsRBD, este tipo de interacciones se ha observado en otras especies como *D. melanogaster*, con los complejos Dicer-1/Loquacious y Dicer-2/R2D2 (Liu et al., 2003; Saito et al., 2005), y *C. elegans*, con los complejos Dicer/RDE-4 (Tabara et al., 2002). De igual forma, en plantas se ha identificado la interacción de las Dicer de *A. thaliana* con las proteínas HYL1 (DRB1), DRB3 y DRB4 (Hiraguri et al., 2005; Raja et al., 2014), todas ellas con dos dsRBD. Por el contrario, este tipo de interacciones no se habían visto previamente en hongos, representado las descritas en esta tesis como el primer ejemplo en este grupo de organismos.

Para identificar qué elementos estructurales están implicados en la interacción de R3B2 con las dos proteínas Dicer de *M. lusitanicus*, se fragmentaron las tres proteínas para intentar acotar las regiones que intervienen en los contactos. Así, las proteínas Dicer se dividieron en una región que incluye los tres dominios helicasa, otra con los dominios DUF283, *platform* y PAZ y una tercera con los dos RIIID y el DSRM C-terminal y R3B2 en los dominios estructurales identificados previamente. De este modo se comprobó que Dicer-1 y R3B2 interacciona por dos puntos (Figura 30): la región helicasa de Dicer-1 interacciona con el dsRBD1 de R3B2 y la región intermedia de Dicer-1 lo hace con la región C-terminal de R3B2. Desafortunadamente, la debilidad de la interacción con Dicer-2 impidió la obtención de resultados concluyentes, determinándose únicamente que la región C-terminal de R3B2 es necesaria para dicho contacto (Figura 34). La citada interacción de las proteínas Dicer con las proteínas con dominios dsRBD difiere en animales y plantas, de modo que mientras en animales la interacción involucra la región helicasa de Dicer con uno de los dsRBD de la otra proteína (Liu et al., 2018; Wilson et al., 2015; Yamaguchi et al., 2021), en plantas esta interacción se produce entre el DUF283 de Dicer y uno de los dsRBD de la otra proteína (Qin et al., 2010). Curiosamente, la interacción de R3B2 con Dicer-1 de *M. lusitanicus* parece involucrar ambos puntos de contacto, tanto el descrito en plantas como el de animales.

Dado que las regiones en las que se dividió Dicer-1 presentaban una gran densidad de dominios pobremente anotados, cuando se puso a disposición pública el *software* de

AlphaFold2, se procedió a modelar las proteínas Dicer de *M. lusitanicus* con el objetivo de desentrañar las bases estructurales de las interacciones detectadas. La predicción de las estructuras revela una buena conservación de la arquitectura de las Dicer de *M. lusitanicus* (Figura 35) respecto a las estructuras conocidas de la Dicer humana (Liu et al., 2018), la Dicer-2 de *D. melanogaster* (Sinha et al., 2018) y la Dicer-1 de *A. thaliana* (Wei et al., 2021). De hecho, los cuatro residuos ácidos presentes en cada uno de los dos centros catalíticos del dímero intramolecular de los RIID están conservados (Figura 35), sugiriendo que ambas proteínas Dicer de *M. lusitanicus* son capaces de procesar dsRNA. El mismo *software* ha permitido la obtención de una aproximación a la estructura completa de la proteína R3B2, que muestra un correcto plegamiento de ambos dsRBD separados por un conector que incluye una región con dos hélices α , una rica en aminoácidos cargados y otra en aminoácidos polares, que se denominó PIR (*possible interaction region*) porque es característica de regiones de interacción proteína-proteína.

En base a la predicción estructural, cada una de las regiones de Dicer-1 implicadas en su interacción presenta tres dominios que se analizaron por separado y por parejas en la interacción con los dominios de R3B2. La región C-terminal de la proteína R3B2 fue dividida en dos nuevos fragmentos: la región conectora que incluía PIR y dsRBD2. Los nuevos ensayos de Y2H revelaron que la interacción entre el dsRBD1 de R3B2 y la región helicasa de Dicer-1 involucra a sus subdominios Hel2i y Hel2, sugiriendo una interacción semejante a la descrita en la interacción de las Dicer de animales (Figura 37). Respecto a la segunda interacción, el resultado mostró que la interacción está mediada por los dominios *platform* y PAZ de Dicer-1 y, exclusivamente, por el conector que contiene PIR de R3B2 (Figura 37). Esta última interacción supone, por tanto, la descripción de un nuevo dominio exclusivo de estas RNasas III específicas de Mucorales para la interacción con las proteínas Dicer.

Aunque la caracterización del efecto *in vivo* de las mutaciones en los dominios dsRBD de R3B2 fue anterior a la identificación de la interacción a través del conector que contiene PIR, la inclusión en los diferentes experimentos de la versión Δ CTF, que solo contiene el RIID y el dsRBD1, hizo posible estimar el efecto de la falta de esta región de interacción. La introducción en el hongo de plásmidos capaces de expresar una horquilla de RNA procedente del gen *carB* (De Haro et al., 2009), permitió evaluar el funcionamiento de la ruta canónica de silenciamiento inducida por transgenes en presencia de diferentes variantes de R3B2 mutadas. Los resultados obtenidos indican que las estirpes portadoras de la versión truncada carente del conector y dsRBD2 presentan una frecuencia de silenciamiento similar a la estirpe que carece de *r3b2* (Tabla 11), a pesar de que en esta situación la interacción con Dicer-1 a través del dsRBD1 se mantiene (Figura 37). Este resultado sugiere que ambas interacciones son necesarias para el correcto funcionamiento de la ruta canónica de RNAi. Alternativamente, puede que sea la presencia del dsRBD2 y no la interacción del conector con Dicer, la responsable del correcto funcionamiento de la ruta. Sin embargo, la mutación de los residuos básicos involucrados en la unión al RNA de R3B2 (Figura 22) que elimina la dimerización del

dominio (Figura 34), no provoca ningún efecto sobre el funcionamiento de la maquinaria canónica de RNAi (Tabla 11). Por tanto, parece que el dominio dsRBD2 no está jugando un papel relevante en la unión de RNA por parte de R3B2 en el complejo Dicer/R3B2 que resulte en un impacto significativo sobre el funcionamiento de la ruta. Por el contrario, la delección de parte del dsRBD1, que conlleva la pérdida de la interacción solo con la región helicasa (Figura 37), provoca un descenso acusado de la frecuencia de silenciamiento (Tabla 11), superior al observado en la estirpe que carece de *r3b2*, sugiriendo que la interacción de R3B2 con las proteínas Dicer a través del conector que contiene PIR conlleva un efecto muy negativo sobre la actividad catalítica de estas proteínas.

En conjunto, estos resultados sugieren que la interacción de R3B2 con las proteínas Dicer es necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta canónica de silenciamiento, apuntando a una regulación negativa de estas proteínas a través de la interacción que afecta a la región *platform*-PAZ. Considerando la arquitectura de las proteínas Dicer (Figura 35) la región *platform*-PAZ es la encargada de alojar los extremos con dos nucleótidos protuberantes del dsRNA. Un primer bolsillo situado en PAZ es el encargado de interactuar con el extremo 3' protuberante del dsRNA, mientras que el dominio *platform* contiene un segundo bolsillo que interactúa con el fosfato en 5' de la hebra de dsRNA (Tian et al., 2014). De esta manera, las dos cadenas de RNA quedan posicionadas sobre los centros catalíticos del dímero RIID de Dicer y se produce el corte dando lugar a un siRNA cuya longitud está determinada por la separación entre la región de *platform*-PAZ y los centros activos (MacRae et al., 2007). La interacción de la región conectora de R3B2 con la región *platform*-PAZ de Dicer-1 podría suponer un impedimento estérico para la entrada del dsRNA hasta estos dominios y el consiguiente posicionamiento de las dos hebras de RNA sobre el centro catalítico de la proteína (Figura 50A). Aunque esta interacción con Dicer-2 no se ha confirmado, la implicación de la región C-terminal de R3B2 en la interacción con Dicer-2, que es la principal encargada de la producción de los ex-siRNA y el silenciamiento mediado por transgenes, lleva a hipotetizar que podría tratarse de una interacción de naturaleza similar. De esta manera, en ausencia de la interacción del dsRBD1 de R3B2 con las proteínas Dicer, el contacto exclusivo a través de la región C-terminal estaría bloqueando la correcta producción de siRNA (Figura 50A y 50B) y, por consiguiente, provocaría la disminución de la frecuencia de silenciamiento observada en el mutante $\Delta H2$ (Tabla 11).

La hipótesis planteada en el párrafo anterior ofrece una explicación a la regulación negativa ejercida por R3B2 sobre la producción de epimutantes (Calo et al., 2017) y el silenciamiento de los Grem-LINE1 (Pérez-Arques et al., 2020), ya que sugiere una regulación negativa de la actividad Dicer como resultado del bloqueo de la unión del dsRNA a los dominios *platform* y PAZ. Sin embargo no explica la necesidad de R3B2 para el correcto funcionamiento de las rutas de RNAi canónicas a la hora de producir los ex-siRNA y la disminución de la frecuencia de silenciamiento mediada por transgenes en el mutante *r3b2Δ* (Trieu et al., 2015). La falta de función del mutante ΔCTF , es decir,

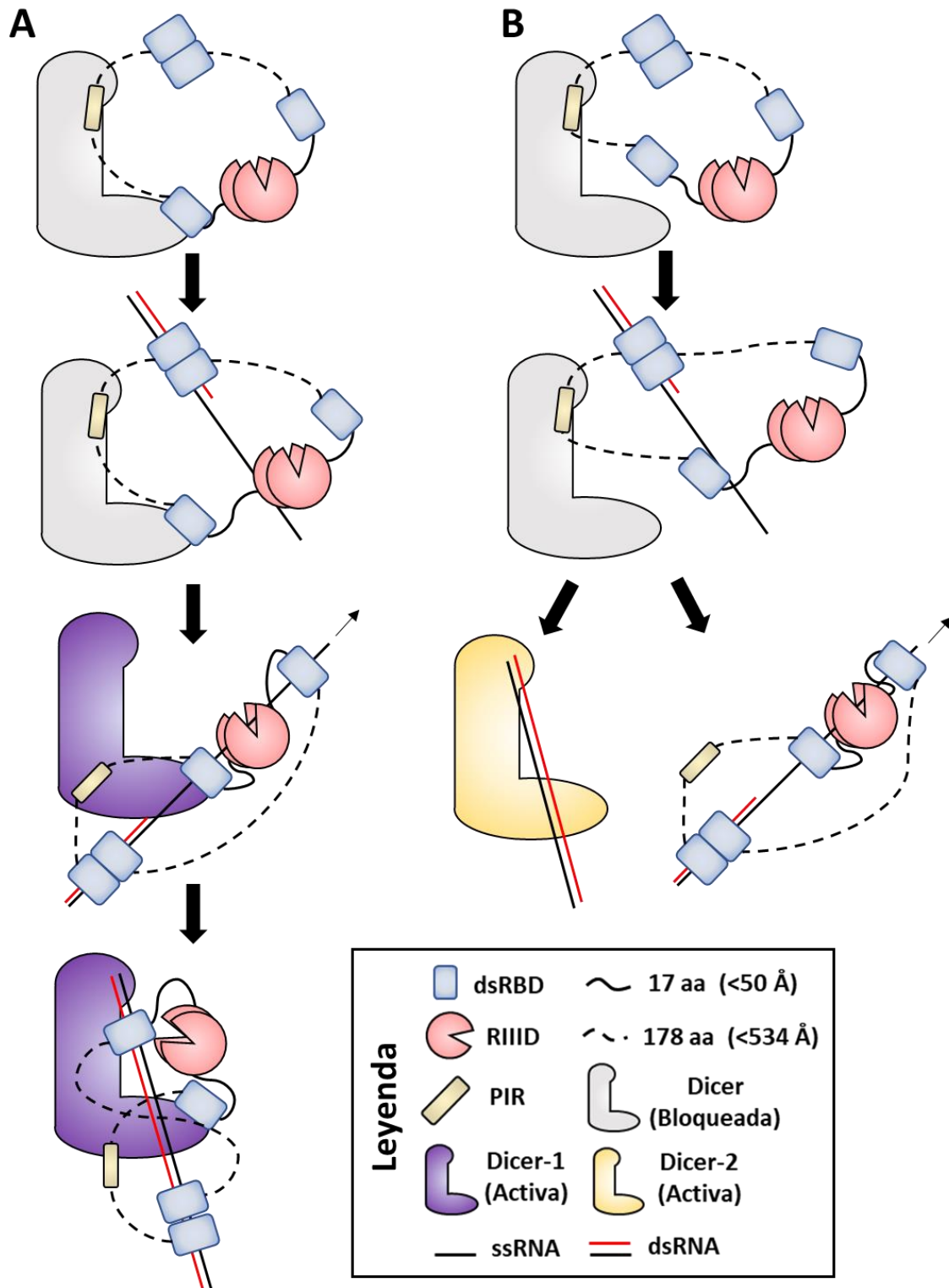


Figura 50. Modelo de actuación de la proteína R3B2 en el complejo con Dicer.

A) Representación de la inhibición de Dicer-1 debido a la unión del conector a la región que contiene el PAZ. La unión de R3B2 al sustrato provocaría el desplazamiento del conector, permitiendo la actividad Dicer, y la degradación del ssRNA realizada por R3B2, generando los extremos requeridos para la producción de siRNA. Cuando R3B2 progresa hasta una región de dsRNA liberaría el sustrato de su centro catalítico al no poder introducirlo en su canal de RNA, quedando así disponible para Dicer-1. B) Representación de la inhibición de Dicer-2 considerando que la interacción es más débil y solo involucra a la región conectora de R3B2. La unión de R3B2 a un sustrato procesable o la debilidad de la interacción facilitarían que eventualmente Dicer-2 pueda liberarse y producir siRNA.

aquel en el que se ha deleciónado la región que presuntamente regula negativamente la actividad Dicer, sugiere que la interacción mediada a través del dsRBD1 no es lo suficientemente estable para permitir a R3B2 realizar su papel en el complejo con Dicer. En este sentido, los ensayos de Y2H indican que la interacción del dsRBD1 con la región helicasa de Dicer-1 es más débil en comparación con la detectada a través del conector que contiene PIR (Figura 30).

La interacción de las proteínas Dicer de animales a través de su dominio helicasa ha sido ampliamente estudiada a nivel estructural y bioquímico. Los trabajos iniciales sobre la proteína Dicer humana del equipo de la Dra. Doudna, recientemente galardonada con el premio nobel de química, pusieron de manifiesto que la región helicasa de la proteína regulaba negativamente el procesamiento de los miRNA (Ma et al., 2008). Además, los ensayos con la proteína Dicer humana realizados en este mismo trabajo indicaron que la reconstitución del complejo Dicer/TRBP era capaz de revertir dicha inhibición, sugiriendo que la interacción mediada por la región helicasa facilitaba la producción de los miRNA. Los miRNA son transcritos como precursores que adquieren una estructura en horquilla o pri-miRNA y cuyos extremos de ssRNA son eliminados por las proteínas del complejo Drosha/Pasha en animales, dando lugar a los pre-miRNA que son procesados por Dicer (Kim et al., 2009). Pero la región helicasa de las proteínas Dicer se ha relacionado con la forma en la que estas RNasas III procesan sus sustratos de dsRNA. El papel de esta región en la actividad de las proteínas Dicer comenzó a aflorar con el descubrimiento de un modo de producción de siRNA dependiente o independiente de ATP en *D. melanogaster* y *C. elegans*, relacionado con sustratos de dsRNA que presentaban extremos romos o con dos nucleótidos protuberantes en el extremo 3', respectivamente (Welker et al., 2011). Las bases moleculares de estos dos modos de acción se determinaron mediante la obtención de imágenes de criomicroscopía electrónica (Sinha et al., 2018). Las moléculas de dsRNA que presentan extremos romos son parcialmente separadas por la región helicasa mediante la hidrólisis de ATP en un proceso conocido como enhebrado o "threading" que genera los extremos que pueden introducirse en el PAZ de Dicer. Este fenómeno conlleva un cambio conformacional que estrecha el canal de la región helicasa, encerrando la larga molécula de dsRNA, y fuerza un procesamiento del RNA completo dependiente de ATP. En cambio, las moléculas de dsRNA que presentan 2 nucleótidos protuberantes en 3' pueden posicionarse directamente en el PAZ y ser cortadas sin la mediación de la región helicasa en un mecanismo independiente de ATP. Este segundo modo de acción conlleva que debido a la ausencia del cambio conformacional de la región helicasa, tras el corte, el sustrato de dsRNA y el siRNA generado son liberados, siendo coherente con la mayor actividad detectada al eliminar la región helicasa de la Dicer humana ya que supone un obstáculo a la entrada del dsRNA (Ma et al., 2008). Estos estudios basados en las proteínas Dicer de animales no han determinado el efecto de la presencia de largos extremos protuberantes de ssRNA porque, aunque de forma mucho menos eficiente, las proteínas Dicer pueden realizar cortes internos en los largos dsRNA y, a continuación, procesar el resto de la

molécula desde el extremo generado (Zhang et al., 2002). Pero el propio procesamiento de los pri-miRNA realizado por Drosha/Pasha para eliminar los extremos de ssRNA de la horquilla sugiere que este tipo de sustratos no es eficientemente procesado por Dicer. En este sentido, en *M. lusitanicus* se ha hipotetizado que la actividad de RdRP-1, la que produce el dsRNA primario que dispara el mecanismo canónico de RNAi, no debe generar una larga molécula de dsRNA completa (Calo et al., 2012). Según esta hipótesis, RdRP-1 daría lugar a mRNA con regiones de dsRNA y ssRNA que permiten la producción de un número limitado de siRNA, mientras que la acción de RdRP-2 generaría moléculas de dsRNA más largas, amplificando el silenciamiento (Calo et al., 2012; Trieu et al., 2015). En consecuencia, los productos de esta segunda RdRP darían lugar a un mayor número de siRNA, estabilizando el silenciamiento sobre el mRNA diana. Considerando la especificidad de corte de R3B2 por el ssRNA, la necesidad del RIIIID de R3B2 funcional para el silenciamiento canónico (Trieu et al., 2015) y su interacción con las proteínas Dicer, se puede hipotetizar que R3B2 cortaría el ssRNA para generar extremos romos o con dos nucleótidos protuberantes en 3' para facilitar la actividad de las Dicer (Figura 50A y 50B) sobre los sustratos primarios de forma similar a como el complejo Drosha/Pasha madura los pri-miRNA. Debido a la naturaleza antiparalela del dímero R3B2, la unión al mRNA con regiones de dsRNA podría conllevar el desplazamiento de la región conectora (Figura 50A), que contiene el punto de interacción a continuación del dsRBD1, liberando la región *platform*-PAZ de Dicer y permitiendo el procesamiento del sustrato inicial. En cambio, muchos de los sustratos procedentes de la amplificación no serían procesables por R3B2, no ocasionando el cambio conformacional y por consiguiente bloqueando casi totalmente a Dicer-1 (Figura 50A), con quien interacciona intensamente, y parcialmente a Dicer-2 (Figura 50B), con quien muestra una interacción más débil. De esta forma podría explicarse simultáneamente el efecto positivo y negativo de R3B2 sobre los mecanismos de RNAi canónicos, ya que su presencia en el complejo Dicer sería beneficiosa inicialmente, pero con efectos negativos una vez que la producción de siRNA secundarios hubiese comenzado o en el mecanismo por el que se producen dsRNA por transcripción convergente y solapada.

V.3. El papel de R3B2 en los mecanismos de RNAi de *M. lusitanicus*

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis permiten proponer un nuevo modelo de equilibrio dinámico para la regulación génica mediada por RNAi en *M. lusitanicus* (Figura 51). Al igual que se ha planteado en plantas (Hung & Slotkin, 2021), la regulación de los genes codificantes mediada por ex-siRNA sugiere un equilibrio entre procesos de degradación conservados en eucariotas (Houseley & Tollervey, 2009) y los mecanismos de RNAi. Los transcritos eucarióticos habituales presentan una caperuza en su extremo 5', una región 5' UTR, una región codificante, una región 3'UTR y una cola de poliadenina o poli(A). La degradación de un transcrito de un gen codificante de proteínas se induce mayoritariamente por su desadenilación y consiguiente entrada en la

degradación en dirección 5' -> 3', mediada por XRN1, o en dirección 3' -> 5', a través del exosoma (Garneau et al., 2007). Pero los sistemas de control de calidad del RNA no están limitados por la desadenilación, pudiendo degradar los transcritos aberrantes que carecen de alguna de las características descritas. La utilización de la maquinaria de RNAi para regular la acumulación de transcritos endógenos presenta la ventaja de producir una degradación selectiva mediada por la complementariedad de los ex-siRNA. Pero, al mismo tiempo, conlleva la necesidad de un estricto control que evite la entrada al mecanismo de transcritos que no deben ser silenciados o la capacidad de detener su acción una vez que se requiera revertir el silenciamiento. No se conocen exactamente los motivos por los que unos genes determinados entran a la regulación mediada por RNAi, pero su silenciamiento está propiciado por altos niveles de expresión y/o la acumulación de aRNA, que carecen de caperuza o cola poli(A) (Elmayan & Vaucheret, 1996; Gazzani et al., 2004; Hung & Slotkin, 2021). Existe un consenso sobre el reconocimiento de los aRNA por parte de las RdRP cuando estos comienzan a acumularse, ya sean provocados por un factor de estrés, una terminación y poliadenilación ineficiente, o por la propia saturación de los sistemas de control de calidad del RNA (Hung & Slotkin, 2021).

En *M. lusitanicus* la entrada del aRNA derivado de genes codificantes de proteínas a los mecanismos de RNAi podría estar determinada por RdRP1 y en menor medida por RdRP-3. La proteína RdRP-3 es la única cuyo papel solo parece necesario para la regulación de los genes codificantes que son degradados por R3B2 en la ruta de degradación de mRNA o NCRIP (Calo et al., 2017). Si consideramos la incapacidad de los mutantes *rdrp-1* para iniciar el silenciamiento (Calo et al., 2012), la coherente desaparición de los ex-siRNA en estos mutantes (Figura 39) y el perfil silvestre de siRNA en el mutante *rdrp-3* (Figura 40), parece claro que la síntesis de pequeñas regiones de dsRNA sobre el aRNA por parte de RdRP-3 debe ser mínima o de muy pequeño tamaño. Estas pequeñas regiones, incapaces de ser procesadas por las proteínas Dicer, serían las encargadas de derivar el aRNA hacia la degradación dependiente de R3B2, disminuyendo la acumulación de aRNA disponible para ser reconocido inicialmente por RdRP-1 (Figura 51). De esta forma, la ruta NCRIP estaría regulando genes cuyos niveles de aRNA no superan el umbral para disparar la iniciación del RNAi canónico, dando lugar a los rdRNAs, es decir, los productos de degradación de la NCRIP (Trieu et al., 2015). Cabe mencionar que la inducción de la expresión de *r3b2* en respuesta a la escasez de uracilo (resultados del grupo no publicados), junto con la preferencia de este mismo nucleótido en la penúltima posición de los rdRNAs (Nicolás et al., 2010; Trieu et al., 2015) sugiere que la NCRIP podría estar inducida al reducirse la ratio de uracilo disponible para la síntesis de RNA, aumentando la degradación de aRNA para generar rdRNAs. Así, las exonucleasas endógenas dispondrían de un mayor número de extremos degradables, permitiendo un mayor reciclaje de uracilo. Resulta inusual que la preferencia por uracilo en la penúltima posición de los rdRNAs pueda observarse al analizar todo el conjunto de los sRNA con sentido de *loci* codificantes en las estirpes silvestres de *M. lusitanicus* (Figura 38). Este resultado sugiere a nivel global una gran proporción de RNAs

procesados por la NCRIP, dando lugar a una abundancia de rdRNA similar o superior a los fragmentos de degradación que puedan derivarse del propio reciclaje de transcritos. Las investigaciones futuras deberán encaminarse a esclarecer el patrón de expresión de RdRP-3 y la relación de R3B2 con el metabolismo de uracilo.

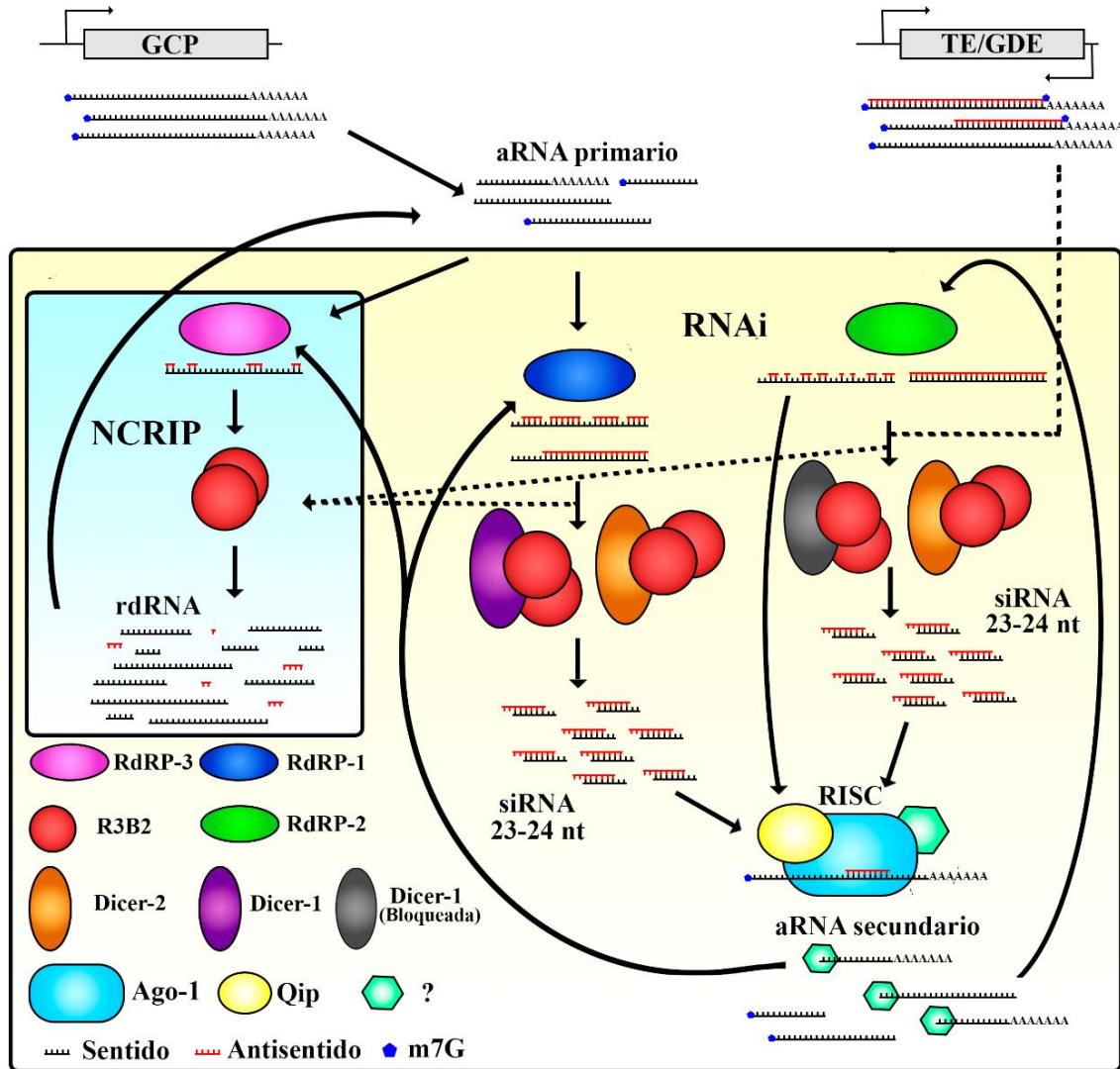


Figura 51. Modelo de funcionamiento de RNAi sobre la regulación de transcritos endógenos.

La producción de aRNA primario de los genes codificantes de proteínas (GCP) haría que este fuese reconocido por la proteína RdRP-3 e introducido en la ruta NCRIP para su degradación por R3B2 mediante pequeñas marcas de dsRNA, que no serían reconocidas por Dicer, para producir los rdRNA (Calo et al., 2017; Trieu et al., 2015). La acumulación de aRNA primario de un GCP concreto aumentaría la probabilidad de que sea reconocido por RdRP-1 e inicie la síntesis de RNA con mayores regiones de dsRNA que sí podrían ser procesadas por Dicer (Calo et al., 2012). El producto de RdRP-1 no sería procesado eficientemente por las proteínas Dicer y requeriría de la proteína R3B2 para degradar las regiones de ssRNA y facilitar su procesamiento posterior por Dicer para dar lugar a los siRNA de 23-24 nt, cuya cadena pasajera sería degradada por Qip, una vez cargados en Ago-1 en el RISC (Calo et al., 2017; Cervantes et al., 2013; De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2010). La región 3' de los transcritos cortados por RISC quedaría marcada por un factor desconocido que dificultaría su degradación por los mecanismos endógenos de control de calidad del mRNA (aumentaría su estabilidad) posibilitando que sean reconocidos por RdRP-2, además de RdRP-3 y RdRP-1. La actividad de RdRP-2 generaría largas moléculas de dsRNA, con el potencial de producir mayor número de siRNA y pequeñas regiones antisentido de hasta 21 nt que serían eficientemente procesadas y cargadas en el RISC para producir más aRNA secundarios y provocar un silenciamiento completo del transcrito diana. Una gran parte de los TE y los genes diana de la producción de epimutantes (GDE) producirían transcritos antisentido naturales de gran estabilidad que podrían ser procesados directamente por las proteínas Dicer, cuya actividad no estaría bloqueada por R3B2, e iniciaría la amplificación dependiente de aRNA secundario mediada por RdRP-2 (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019; Pérez-Arques et al., 2020).

El modelo propuesto plantea que el dsRNA primario generado por RdRP-1 no sería procesado eficientemente por las proteínas Dicer y requeriría de la actuación de R3B2, como sugiere el hecho que los mutantes *r3b2Δ* están severamente afectados en la iniciación del silenciamiento, ya sea inducido por la expresión de aRNA o por una horquilla de dsRNA (Calo, 2010). Aunque las horquillas de dsRNA aumentan la eficacia de silenciamiento, siguen requiriendo de R3B2 debido probablemente a que consisten en un largo dsRNA primario que presenta en un extremo largas cadenas de ssRNA, junto con la cola poli(A) y un bucle de ssRNA en el extremo opuesto (Figura 51). El papel de R3B2 en la iniciación del silenciamiento se ve reforzado por el hecho de que los transformantes derivados de mutantes que carecen de *r3b2* que conseguían iniciar el mecanismo de RNAi presentaban valores de estabilidad similares a la estirpe silvestre (Calo, 2010), sugiriendo que una vez iniciada la amplificación mediada por RdRP-2 la necesidad de R3B2 desaparece.

En concordancia con la hipótesis de una baja producción de siRNA a partir del dsRNA primario derivado de RdRP-1, se puede observar una gran acumulación de RNA antisentido producido por esta RdRP en las estirpes mutantes en *rdrp-2* cuando se induce el silenciamiento mediante un transgén que expresa aRNA (Calo et al., 2012). El requerimiento de RdRP-1 y la independencia de las proteínas Dicer de los genes regulados por la NCRIP también sugiere que parte del dsRNA primario de RdRP-1 debe ser derivado a la degradación por R3B2 en la NCRIP antes de generar gran cantidad de siRNA capaces de disparar la amplificación del silenciamiento. Considerando la actividad catalítica de R3B2, no parece que RdRP-1 genere de forma habitual dsRNA de cadena larga, ya que este sustrato no podría ser procesado por R3B2 en la NCRIP. En cualquier caso, el dsRNA primario eventualmente es procesado por el complejo Dicer/R3B2 generando en última instancia los siRNA de 23-24 nt que son cargados en Ago-1. A continuación y teniendo en cuenta los estudios realizados sobre las mismas proteínas de *N. crassa* (Maiti et al., 2007), la proteína Ago-1 realizaría un corte sobre la cadena pasajera del siRNA, que sería inmediatamente degradada por la exonucleasa Qip para inducir el estado activo del complejo RISC. Finalmente, los complejos RISC producen un corte endonucleolítico al localizar un transcrito complementario que genera dos nuevos aRNA, uno sin cola poli(A) en su extremo 3' y otro sin capucha en su extremo 5'.

Se ha sugerido que el desplazamiento de los siRNA hacia la región 3' de los transcritos regulados mediante RNAi se debe a una baja procesividad de RdRP-2 a la hora de generar el dsRNA secundario durante la amplificación del silenciamiento (Calo et al., 2012; Nicolás et al., 2003). Esta hipótesis no concuerda con el hecho de que el aRNA secundario, generado por el corte de argonauta, debe representar tanto la región 5' como la 3' en dos moléculas diferentes generadas en las mismas proporciones cuando se silencian transcritos completos. Ello sugiere que, o RdRP-2 requiere la presencia de alguna de las proteínas unidas a la cola poli(A) de los transcritos para iniciar la síntesis de dsRNA, o la rápida acumulación de ribosomas en un contexto de traducción activa protege a la región 5' de la síntesis de dsRNA, encaminándola a la degradación de

transcritos sin codón de stop (*Nonstop decay* o NSD) (Frischmeyer et al., 2002; Garneau et al., 2007). La caracterización de la actividad *in vitro* realizada sobre QDE-1 de *N. crassa*, que al igual que RdRP-2, realiza una síntesis *de novo* del dsRNA a partir de ssRNA sugiere que la presencia de la cola poliadenilada no es necesaria para la actividad de estas proteínas (Calo et al., 2012; Makeyev & Bamford, 2002), mientras que la cooperación de las rutas de RNAi y la NSD ya ha sido observada en plantas (Szádeczky-Kardoss et al., 2018). En cualquier caso, la falta de iniciación en los mutantes en *rdrp-1* (Calo et al., 2012) y su consecuente ablación de ex-siRNA derivados de genes codificantes controlados por el silenciamiento canónico (Figura 39), sugiere que la acción del RISC para regenerar el aRNA secundario debe identificarlo de alguna forma para que sea reconocido por RdRP-2 (Figura 51). Así, la ausencia de esta marca en el aRNA primario, que no ha entrado en contacto con el RISC, limita su procesamiento a RdRP-1 o RdRP-3. Nuevamente en plantas, el corte del complejo RISC inducido por los miRNA o siRNA primarios marca el aRNA mediante la proteína SGS3 que queda unida a la región 3' del transcrito cortado, protegiéndola de la rápida degradación exonucleolítica del control de calidad del RNA (Hung & Slotkin, 2021). El blast de la proteína SGS3 de *A. thaliana* contra el catálogo de proteínas de *M. lusitanicus* revela la presencia de, al menos, una proteína con homología limitada en su región C-terminal. Aunque, la relación de esta proteína con el silenciamiento canónico no ha sido estudiada, la gran similitud de su estructura predicha con SGS3 de *A. thaliana* (Figura 52) sugiere que podría tratarse de un verdadero homólogo, por lo que futuras investigaciones podrían demostrar su implicación en la amplificación del silenciamiento y resolver el motivo por el que aparentemente RdRP-2 no es capaz de reconocer el aRNA primario.

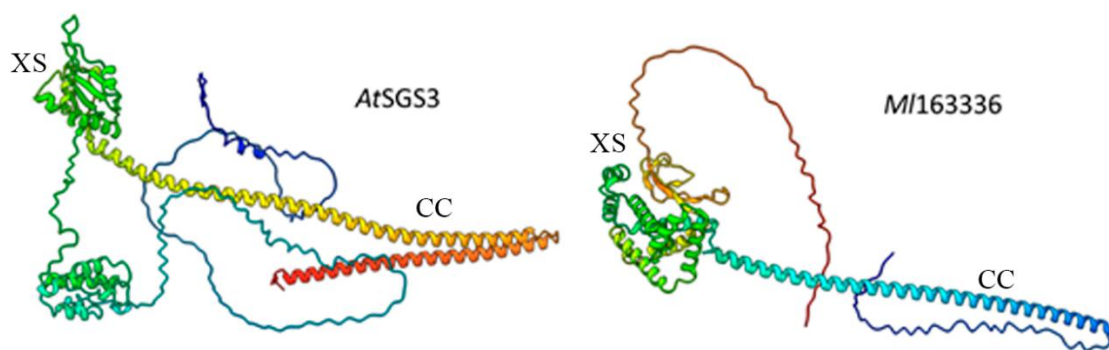


Figura 52. Predicciones estructurales de la proteína SGS3 de *A. thaliana* y el posible homólogo de *M. lusitanicus*.

Las predicciones estructurales revelan la presencia en el posible homólogo de parte del largo coiled-coil (CC) que caracteriza a estas proteínas y del inusual dominio XS que presenta un atípico plegamiento de láminas β antiparalelas que recuerdan a un dominio de unión a RNA.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la iniciación del silenciamiento canónico es un paso limitante relevante para la regulación de genes codificantes endógenos mediada por RNAi. De hecho, gran parte del aRNA secundario generado tras el corte del complejo RISC también debe ser degradado por la NCRIP para dar lugar a

los ex-siRNA de clase III y IV (Nicolás et al., 2010; Trieu et al., 2015) ya que a diferencia de los rdRNA, estos ex-siRNA son dependientes de las proteínas Dicer pero presentan la distribución de tamaños, la polaridad y la presencia de U en la penúltima posición de los rdRNA. Además, estos ex-siRNA de clase III y IV parecen ser los más abundantes y responsables de la observación del logo de U en penúltima posición en los sRNA con sentido, ya que en ausencia de Ago-1 esta característica desaparece (Figura 42). Por tanto, el nuevo modelo de equilibrio dinámico sitúa a la ruta NCRIP como un importante freno capaz de degradar los productos de aRNA primarios y secundarios que permiten el funcionamiento de la ruta canónica de RNAi y en consecuencia explicando su papel antagónico a las rutas de silenciamiento canónicas (Figura 51). Al mismo tiempo sugiere una explicación a la necesidad de R3B2 para iniciar el mecanismo y dar lugar a los ex-siRNA de clase II que representan la mayor proporción de loci productores de siRNA. Pero el silenciamiento canónico requiere de una amplificación estable dependiente de RdRP-2 para un adecuado silenciamiento mediado por transgenes (Calo et al., 2012), la generación de epimutantes (Calo et al., 2014) y el silenciamiento de los Grem-LINE1 (Figura 39). Anteriormente se ha discutido sobre el posible mecanismo de interacción de R3B2 con las proteínas Dicer-1 y Dicer-2 y sus implicaciones en el complejo con las proteínas Dicer a la hora de procesar los sustratos derivados de RdRP-1 o RdRP-2. El análisis de la distribución de los siRNA ha revelado que la mayor acumulación de sRNA antisentido de 21 nt parece relacionada con la amplificación del silenciamiento y por tanto con RdRP-2 (Figura 38 y 39). En este sentido, la caracterización *in vitro* de QDE-1 de *N. crassa* puso de manifiesto que, esta RdRP además de generar dsRNA completos a partir de moldes de ssRNA, daba lugar a una gran cantidad de pequeños RNA antisentido de 9-21 nt distribuidos aleatoriamente (Makeyev & Bamford, 2002). Dado que en *M. lusitanicus* los ex-siRNA antisentido de 21 nt aparecen de forma tardía, están relacionados con los procesos que requieren de amplificación del silenciamiento y carecen del correspondiente sRNA con sentido de 21 nt (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019; Nicolás et al., 2003), parece probable que RdRP-2, al igual que QDE-1, genere este tipo de siRNA, siendo los de 21 nt con un uracilo en 5' directamente reconocidos por Ago-1 sobre su transcrito de origen. Así, la amplificación del silenciamiento no solo se ve inducida por el procesamiento del dsRNA secundario por parte de las proteínas Dicer, sino que además esta potenciada por la acumulación de estos productos resultantes de la actividad RdRP-2.

La identificación por parte de RdRP-2 de un aRNA secundario en condiciones normales también debe ser muy limitada, dado que los ex-siRNA de clase I y II no muestran variaciones significativas en su acumulación en los mutantes en *rdrp-2* (Nicolás et al., 2010) y, por consiguiente, la amplificación debe estar jugando un papel minoritario en su regulación. De hecho, el trabajo citado muestra mediante hibridación tipo *northern* la acumulación de ex-siRNA en 6 *loci* codificantes donde solo uno de ellos acumula, y de forma minoritaria, sRNA antisentido de 21 nt en relación a los sRNA con sentido de 23-24 nt siendo el primero la especie mayoritaria cuando se dispara el silenciamiento

mediado por transgenes (Calo et al., 2012; De Haro et al., 2009; Nicolás et al., 2003). Aun así, RdRP-2 debe de tener un cierto papel en el procesamiento de algunos transcritos, ya que la acumulación de rdRNA derivados de una veintena de exones dependen exclusivamente de esta RdRP y de R3B2 (Trieu et al., 2015).

Considerando estos resultados, resulta interesante plantear que el silenciamiento completo de un gen esté mediado por la amplificación dependiente de RdRP-2, mientras que el control refinado de la acumulación de su transcrito dependa de RdRP-1. En coherencia con esta hipótesis los procesos dependientes de la amplificación del silenciamiento se producen en un contexto de gran número de aRNA, pero los resultados expuestos en esta tesis sugieren que difieren del control habitual de genes codificantes endógenos en la procedencia del dsRNA antisentido. El silenciamiento disparado por transgenes es dependiente de la iniciación por RdRP-1 y de la amplificación de RdRP-2, pero mientras que RdRP-1 se expresa de forma constitutiva, la presencia de dsRNA induce un rápido y marcado aumento de la expresión de RdRP-2 (Calo et al., 2012). Este matiz aporta el carácter dinámico al modelo de equilibrio planteado. En el contexto de este modelo, los datos sugieren que la producción de dsRNA primarios por parte de RdRP-1 y su limitado procesamiento por las proteínas Dicer, producen una acumulación de dsRNA que induce una mayor expresión de RdRP-2. Así, aunque ambas proteínas deben estar compitiendo por el aRNA secundario (Véase más abajo), el incremento de RdRP-2 deriva un mayor número de aRNA a la amplificación. Como se ha comentado anteriormente, esta acumulación de dsRNA producto de la actividad de RdRP-1, que no se correlaciona con una mayor acumulación de siRNA, ha sido observada en los mutantes en *rdrp-2* a pesar de que estos presentan un complejo Dicer/R3B2 funcional (Calo et al., 2012). Por el contrario, la regulación de los Grem-LINE1, y probablemente otros TE, así como la producción de epimutantes está regulada negativamente o compete con la NCRIP y la producción de dsRNA primario descrita anteriormente (Figura 51) en concordancia con los estudios publicados sobre estos procesos (Calo et al., 2017; Chang et al., 2019; Navarro-Mendoza et al., 2019; Pérez-Arques et al., 2020).

No se ha descrito que la epimutación activa de un gen tenga efectos sobre los perfiles de acumulación de sRNA generales (Chang et al., 2019). La única RdRP cuya ausencia bloquea la generación de epimutantes es RdRP-2, mientras que la ausencia de RdRP-1 o RdRP-3 tiene efectos positivos sobre este proceso (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019). Así, en ausencia de estas dos últimas RdRP no se produce una derivación de aRNA a la producción de dsRNA primario o la NCRIP, respectivamente. Esta hipótesis también es coherente con la mayor frecuencia de epimutantes en el mutante en *r3b2* (Calo et al., 2014) ya que, como se ha expuesto anteriormente, buena parte de los aRNA que entran en el mecanismo de RNAi deben ser degradados por la RNasa antes de ser convertidos en siRNA. Resulta sorprendente que, en ausencia de iniciación del silenciamiento, se produzca un desequilibrio de la maquinaria que dé lugar al efecto contrario al esperado. En otras palabras, si el dsRNA que dispara el mecanismo estuviese producido por RdRP-2 supondría que en *M. lusitanicus* existe una proteína capaz de

identificar exclusivamente el aRNA de la diana a epimutar y facilitárselo también exclusivamente a esta RdRP, que aparentemente es incapaz de reconocer el aRNA que no ha entrado en contacto con el RISC (Véase arriba). Se ha detectado una gran cantidad de RNA antisentido en las estirpes silvestres que no están en proceso de epimutación activo contra el gen *fkba* (Calo et al., 2014, 2017). Debido a que dicho RNA antisentido es complementario al transcrito maduro del gen se asumió que debe estar producido por una RdRP a partir del mRNA, pero su acumulación no se ve afectada en los mutantes simples en *rdrp-1*, *rdrp-2* o *rdrp-3*, lo que condujo a concluir que debía producirse un papel redundante de las RdRP en su síntesis (Calo et al., 2014, 2017). Sin embargo la presencia en este transcrito antisentido de la caperuza en el extremo 5' y cola poli(A) en 3' (Calo et al., 2014), sugiere que se trata de un transcrito antisentido natural (*natural antisense transcrip* o NAT) producido por la polimerasa de RNA dependiente de DNA II (RNAPII). De hecho, la región 5' del gen presenta numerosas secuencias compatibles con la existencia de señales de poliadenilación alternativa específicamente conservadas en levaduras (Graber et al., 1999) y hongos filamentosos (Tanaka et al., 2011). No se ha identificado ninguna interacción de las RdRP eucarióticas con los complejos proteicos que median la adición de la caperuza del extremo 5' del transcrito o la poliadenilación de la región 3'. La situación más cercana se puede encontrar en la recientemente descrita producción de dsRNA mediado por el acoplamiento de RdR2, una RdRP, a la polimerasa de RNA dependiente de DNA IV (RNAPIV) en plantas (Huang et al., 2021). El complejo RNAPIV/RdR2 es capaz de acoplar la transcripción del RNA con su transformación en dsRNA transfiriendo el transcrito, una vez que ha finalizado la síntesis, directamente a la proteína RdR2. Pero nuevamente, este proceso impide que el transcrito original sea poliadenilado o encapuchado, derivándolo directamente a las proteínas Dicer para mediar la posterior metilación dirigida por RNAi del DNA (Zhou & Law, 2015). Así, parece más probable que la expresión de NAT del gen *fkba* sea lo que posibilita la generación de epimutantes debido a la presencia de un promotor críptico aguas abajo del gen. En el mismo sentido, la arquitectura del *locus pyrG* de *M. lusitanicus*, otro de los genes codificantes que se ha demostrado que puede ser diana de la epimutación (Chang et al., 2019), presenta un gen con transcripción convergente en su región 3' que posibilita la generación de NAT por solapamiento de transcritos.. Considerando los descubrimientos puestos de manifiesto por el consorcio FANTOM y posteriormente por GENCODE y ENCODE sobre los RNA no codificantes entre los que se encuentran los NAT (Khorkova et al., 2014), no parece descabellado considerar que la producción de estos transcritos naturales en situaciones de estrés pueda disparar la maquinaria canónica de RNAi contra genes específicos con una frecuencia directamente proporcional a la tasa de transcripción del RNA antisentido explicando las diferencias observadas en la producción de epimutantes de *fkba*, *pyrG* y *pyrF* (Calo et al., 2014, 2017; Chang et al., 2019) De hecho, la implicación de los NAT en diversos procesos relacionados con el RNAi en hongos se ha descrito en numerosas ocasiones (Donaldson & Saville, 2012). Futuras investigaciones deben determinar la existencia de una fuente alternativa de dsRNA primario independiente de RdRP-1, que posibilite el inicio de la amplificación del silenciamiento

contra dianas que en condiciones normales no están reguladas por los mecanismos de silenciamiento de *M. lusitanicus*.

La producción de dsRNA que entra directamente al mecanismo de amplificación del silenciamiento mediado por RdRP-2 parece más clara en la regulación de los Grem-LINE1. Estos TE son degradados activamente por la maquinaria de silenciamiento canónico (Pérez-Arques et al., 2020) y la ausencia de *r3b2* y *rdrp-1* producen un aumento de la acumulación de siRNA antisentido, que por el contrario, disminuye sustancialmente en la estirpe *rdrp-2Δ* (Figura 39). Este resultado sugiere un silenciamiento más eficiente en estos mutantes que, de forma similar a la producción de epimutantes, es contrario al esperado de una estirpe defectiva para la iniciación del silenciamiento. Así, la existencia de NAT contra los Grem-LINE les permitiría evitar la limitación de la iniciación y ser directamente transformados en siRNA. Esto redundaría en una producción de los siRNA primarios independientes de RdRP-1 que posibilitan el subsiguiente marcado del aRNA secundario y su procesamiento por RdRP-2. Este proceso se produce, al igual que la inducción del silenciamiento mediada por transgenes, en un contexto de numerosas copias con gran similitud de secuencia, por lo que, una vez iniciado el mecanismo de amplificación, debe ser muy eficiente a raíz de la falta de productos de degradación de los Grem-LINE1 distintos de los siRNA (Figura 38). En este sentido, los Grem-LINE1 son TE que forman mayoritariamente parte de las regiones pericentroméricas de *M. lusitanicus* (Navarro-Mendoza et al., 2019) suponiendo una situación muy parecida a las repeticiones centroméricas de *S. pombe*. En esta levadura, la RNAPII expresa NAT de las regiones repetidas centroméricas que al hibridar con los transcritos de estas repeticiones desencadenan un bucle de silenciamiento que conlleva la heterocromatinización de la región mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina (Holoach & Moazed, 2015). Dado que la expresión del NAT conduce a la represión transcripcional y no a una situación de PTGS, este proceso se conoce como silenciamiento transcripcional y supone un ejemplo cercano de la existencia de NAT relacionada con las repeticiones centroméricas.

Finalmente, el hecho de que el aumento en la acumulación de siRNA antisentido contra los Grem-LINE1 solo se aprecie durante el proceso de epimutación activa en la estirpe *rdrp-3Δ* parece relacionada con la mencionada ausencia de productos de degradación derivados de estos TE (Figura 40). Este resultado, junto a la discreta distribución de los siRNA de los Grem-LINE1 observada en todas las estirpes, salvo en la *ago-1Δ*, sugiere que la mayor parte de sus transcritos se encuentra en forma de dsRNA, lo que limitaría su entrada a la NCRIP, al contrario de lo que sucede durante el proceso de epimutación. Así, la mayor producción de siRNA contra los Grem-LINE1 en los mutantes *rdrp-1Δ* y *r3b2Δ*, no parece relacionada con la NCRIP, sino con el papel que juegan estas dos proteínas en la ruta canónica de RNAi, es decir, una menor eficiencia de procesamiento de productos de RdRP-1 y el bloqueo de la actividad Dicer, discutido al inicio, durante la amplificación del silenciamiento.

Este nuevo modelo de equilibrio dinámico (Figura 51) para explicar el funcionamiento de la NCRIP y el silenciamiento canónico en *M. lusitanicus* unifica las diferentes vías de silenciamiento descritas para la producción de ex-siRNA, siRNA y rdRNA, integrando los resultados obtenidos durante más de 20 años de investigación desde el descubrimiento del silenciamiento inducido por transgenes en este hongo. La aplicación de este modelo no solo ofrece una explicación válida a los fenómenos relacionados con el silenciamiento, además, aporta nuevas vías de investigación encaminadas a confirmar o revisar esta hipótesis sobre el funcionamiento de los mecanismos de RNAi en el hongo *M. lusitanicus*.

V.4. Conservación funcional de la proteína R3B2 en Mucorales

Los mecanismos de RNAi han sido ampliamente caracterizados en *M. lusitanicus*, pero se sabe muy poco de ellos en el resto de hongos basales. La creciente disponibilidad de genomas de este grupo de hongos revela que la mayoría de las proteínas de RNAi están conservadas lo que sugiere que en estos hongos también puede existir una regulación de la expresión génica endógena mediada por el silenciamiento génico, al igual que se ha descrito en otros hongos, plantas y animales (Ghildiyal & Zamore, 2009). A diferencia de los mecanismos descritos en los grupos anteriores, la maquinaria de RNAi de *M. lusitanicus* presenta la peculiaridad de la participación de la inusual RNasa III R3B2. El estudio que identificó el papel de R3B2 en la NCRIP, también reveló que se trataba de una proteína limitada al orden Mucorales (Trieu et al., 2015). La posterior implicación de esta proteína en la virulencia de *M. lusitanicus* (Pérez-Arques et al., 2020) y su limitada distribución filogenética llevo a estudiar si existía una conservación funcional de los posibles homólogos de R3B2, abriendo la puerta a la posibilidad de desarrollar nuevas terapias antifúngicas contra la mucormicosis basadas en el uso de R3B2 como diana terapéutica.

El análisis filogenético reveló la presencia de al menos 71 posibles homólogos de la proteína R3B2 de *M. lusitanicus*, distribuidos en 27 especies de Mucorales (Figura 43). Entre los posibles homólogos se identificaron genes que codifican proteínas con uno o dos dominios dsRBD. Las especies que tienen genes que cifran proteínas con un solo dominio dsRBD también presentan, en la mayoría de los casos, un gen que codifica una versión completa de R3B2 (Figura 43). Estos datos sugieren que la adquisición de R3B2 por parte del ancestro de los Mucorales, propuesta a través de un evento de transferencia horizontal (Trieu et al., 2015), se habría producido con anterioridad a la duplicación del genoma (Corrochano et al., 2016) que afectó a este grupo de hongos y que la proteína R3B2 ancestral presentaba dos dominios dsRBD.

La confirmación de que las proteínas con similitud a R3B2 de otras especies eran realmente homólogas se obtuvo a través del análisis de su actividad catalítica. Para ello, se seleccionaron tres homólogos filogenéticamente alejados que incluían: uno de *P.*

parasítica (PcR3B2) con alta similitud a proteína de *M. lusitanicus* (MIR3B2), pero que carecía de la región CTF; otro de *L. corymbifera* (LcR3B2), cuya similitud de secuencia era mínima, pero presentaba dos dominios dsRBD; y un tercero de *R. microsporus* (RmR3B2) que también presentaba baja similitud de secuencia y un solo dominio dsRBD. Los ensayos de actividad RNasa *in vitro* revelaron que a pesar de la baja conservación de los residuos catalíticos (Figura 45), estas RNasas, al igual que la proteína de *M. lusitanicus*, degradan específicamente ssRNA (Figura 46). Este resultado indica que se tratan de verdaderos ortólogos que derivaban de una proteína R3B2 ancestral que ya tenía específica frente al ssRNA.

Los resultados anteriores sugirieron que, al igual que en *M. lusitanicus*, los ortólogos de MIR3B2 podrían estar jugando un papel relevante en el silenciamiento génico en estos hongos. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la capacidad de complementación del defecto en la ruta canónica inducida por transgenes y la NCRIP de los mutantes en el gen *r3b2* de *M. lusitanicus* con los genes de *L. corymbifera* y *R. microsporus*, dos hongos causantes de la mucormicosis. Desafortunadamente, los repetidos intentos para analizar la complementación con la proteína RmR3B2 no arrojaron resultados concluyentes debido a la falta de expresión en las construcciones utilizadas para la complementación. Por el contrario, la proteína LcR3B2 fue capaz de complementar el funcionamiento de la NCRIP y la ruta de RNAi canónica de *M. lusitanicus*. Este resultado sugiere, que al menos en *L. corymbifera* puede existir una maquinaria de RNAi semejante a la de *M. lusitanicus* y, por consiguiente, también implicada en la virulencia.

En conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han afianzado el conocimiento sobre el papel de R3B2 en la maquinaria de RNAi de *M. lusitanicus* y han demostrado que su peculiar actividad catalítica está conservada en los Mucorales de mayor impacto sobre la salud humana. Aunque solo se ha podido demostrar la complementación *in vivo* de un ortólogo de R3B2 de *M. lusitanicus*, la conservación de la actividad catalítica en otros hongos apunta a una conservación de las rutas de RNAi de estos hongos y su función en virulencia, convirtiendo a R3B2 en una posible diana terapéutica para desarrollar fármacos específicos contra la mucormicosis en futuras investigaciones.

VI. Conclusiones en inglés

The results obtained during the execution of this thesis led to the following conclusions:

1. The RNase III domain (RIIID) of R3B2 forms a head-tail homodimer in solution similar to that described for the bacterial class I and eukaryotic class II RNases.
2. The R3B2 protein is able to bind ssRNA, RNA with natural dsRNA structures, and full dsRNA. This binding depends on both double stranded RNA binding domains (dsRBD) and is independent of the sequence.
3. The R3B2 protein is a RNase III protein that cleaves ssRNA and this specific catalytic activity is determined by its RIIID because the substitution of the domain with other from a canonical RNase III restores the ability of the protein to degrade dsRNA. However, this activity is independent of the dsRBD domains because mutant variants without both dsRBD retain the RNase activity.
4. The crystal structure of R3B2 RIIID resembles canonical RIIIDs, despite the low sequence conservation. However, the groove that accommodates dsRNA in canonical RNases III is narrower in the R3B2 homodimer, suggesting that this feature could be responsible for the cleavage specificity for ssRNA.
5. The R3B2 protein interacts with Dicer-1 and Dicer-2 proteins of the canonical RNAi mechanism. The interaction with Dicer-1 protein involves the Hel2 y Hel2i regions of its helicase and the dsRBD1 of R3B2, and its PAZ-platform domains and the linker that contains PIR of R3B2. The interaction with Dicer-2 is at least mediated by the C-terminal region of R3B2 that comprises the linker and the dsRBD2.
6. The dsRBD1 and the C-terminal region of R3B2 are necessary for a correct functioning of the RNAi mechanisms because mutations of these regions affect the canonical RNAi and the NCRIP, and hence the virulence of the fungus.
7. The size and polarity distribution of the sRNA in the *r3b2* Δ strain reveals a positive role for the production of ex-siRNA during vegetative growth together with a negative role during the stationary phase.
8. The analysis of the antisense ex-siRNA-producing loci in the *rdrp-1* Δ strain reveals that RdRP-1 is essential for the ex-siRNA production but not for Grem-LINE1 silencing.
9. The size and polarity distribution of the sRNAs in the *rdpr-2* Δ strain reveals that the RdRP-2-dependent amplification of the RNAi is essential for Grem-LINE1 silencing but not for ex-siRNA production.
10. The specific activity to cleave ssRNA is conserved in putative R3B2 homologs from three phylogenetically distant Mucorales species, suggesting evolutionary conservation in this fungal order.
11. The R3B2 from *L. corymbifera* is able to complement the defects in the canonical RNAi pathway and the NCRIP caused by the loss of *r3b2* in *M. lusitanicus*.

VII. Bibliografía

- Aguado, L. C., & TenOever, B. R. (2018). RNase III Nucleases and the Evolution of Antiviral Systems. *BioEssays*, *40*(2), 1–6. <https://doi.org/10.1002/bies.201700173>
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* *2004* *431*:7006, *431*(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638>
- Bai, Y., Lan, F., Yang, W., Zhang, F., Yang, K., Li, Z., Gao, P., & Wang, S. (2015). sRNA profiling in *Aspergillus flavus* reveals differentially expressed miRNA-like RNAs response to water activity and temperature. *Fungal Genetics and Biology*, *81*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2015.03.004>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Benny, G. L., Humber, R. A., & Morton, J. B. (2001). Zygomycota: Zygomycetes. *Systematics and Evolution*, 113–146. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10376-0_6
- Bernstein, D. A., Vyas, V. K., Weinberg, D. E., Drinnenberg, I. A., Bartel, D. P., & Fink, G. R. (2012). *Candida albicans* Dicer (CaDcr1) is required for efficient ribosomal and spliceosomal RNA maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2), 523–528. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1118859109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- 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* *2001* *409*:6818, *409*(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis - from the pathogens to the disease. In *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12566>
- Binder, Ulrike, Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2016). *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology*, *120*(2), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.002>
- Blaszczyk, J., Tropea, J. E., Bubunencko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, *9*(12), 1225–1236. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00685-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00685-2)
- Bruch, A., Kelani, A. A., & Blango, M. G. (2021). RNA-based therapeutics to treat human fungal infections. *Trends in Microbiology*, *0*(0). <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.09.007>
- Calo, S. (2010). *Polimerasas de RNA y su papel en el silenciamiento génico mediado por RNA en Mucor circinelloides*. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Murcia.
- Calo, S., Nicolás, F. E., Lee, S. C., Vila, A., Cervantes, M., Torres-Martinez, S., Ruiz-Vazquez, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006686>
- 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*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07939.x>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature13575>
- Carey, J. (2000). [30] A systematic and general proteolytic method for defining structural and functional domains of proteins. *Methods in Enzymology*, 328(1998), 499–514. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)28415-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)28415-2)
- Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C., & Herrera-Estrella, A. (2013). The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 96–112. <https://doi.org/10.1111/MMI.12261>
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5), 503–512. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2001.TB00588.X>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069283>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007957>
- 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). https://doi.org/10.1128/MBIO.02579-19/SUPPL_FILE/MBIO.02579-19-ST002.PDF
- Chen, R., Jiang, N., Jiang, Q., Sun, X., Wang, Y., Zhang, H., & Hu, Z. (2014). Exploring MicroRNA-Like Small RNAs in the Filamentous Fungus *Fusarium oxysporum*. *PLOS ONE*, 9(8), e104956. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104956>
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- 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. <https://doi.org/10.1128/MCB.00186-07/ASSET/539C546B-BE0B-4E76-8743-A1470ED60368/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0110767860006.JPEG>

- Claycomb, J. M. (2014). Ancient Endo-siRNA Pathways Reveal New Tricks. *Current Biology*, 24(15), R703–R715. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.06.009>
- Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S., & Zanetti, F. (2001). γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of Mucorales strains on cereals. *Bioresource Technology*, 76(3), 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00097-3)
- Cornely, O. A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S. C. A., Dannaoui, E., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Jensen, H. E., Lagrou, K., Lewis, R. E., Mellinghoff, S. C., Mer, M., Pana, Z. D., Seidel, D., Sheppard, D. C., Wahba, R., Akova, M., Alanio, A., Al-Hatmi, A. M. S., ... Chakrabarti, A. (2019). *Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium*. 19(12), e405–e421. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3)
- Corrochano, L. M., & Garre, V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 47(11), 893–899. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2010.04.007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.04.038>
- Court, D. L., Gan, J., Liang, Y.-H., Shaw, G. X., Tropea, J. E., Costantino, N., Waugh, D. S., & Ji, X. (2013). RNase III: Genetics and Function; Structure and Mechanism. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155618>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/GR.849004>
- Curtis, H., & Barnes, S. N. (2003). Capítulo 29. Los hongos. In *Biología* (6th ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Dahlmann, T. A., & Kück, U. (2015). Dicer-Dependent Biogenesis of Small RNAs and Evidence for MicroRNA-Like RNAs in the Penicillin Producing Fungus *Penicillium chrysogenum*. *PLOS ONE*, 10(5), e0125989. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125989>
- 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. <https://doi.org/10.1128/EC.00191-09>

- Donaldson, M. E., & Saville, B. J. (2012). Natural antisense transcripts in fungi. *Molecular Microbiology*, 85(3), 405–417. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2012.08125.X>
- Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 544. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1176945>
- Dunn, J. J. (1976). RNase III cleavage of single stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *Journal of Biological Chemistry*.
- Elmayan, T., & Vaucheret, H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal*, 9(6), 787–797. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1996.9060787.X>
- 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. <https://doi.org/10.1242/DEV.113.2.503>
- 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* 1998 391:6669, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Flynt, A. S., & Lai, E. C. (2008). Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature Reviews. Genetics*, 9(11), 831–842. <https://doi.org/10.1038/NRG2455>
- Forrest, E. C., Cogoni, C., & Macino, G. (2004). The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 32(7), 2123–2128. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH530>
- Frater, J. L., Hall, G. S., & Procop, G. W. (2001). Histologic Features of Zygomycosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125(3), 375–378. <https://doi.org/10.5858/2001-125-0375-hfoz>
- Frischmeyer, P. A., Van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrierio, A. L., Parker, R., & Dietz, H. C. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science*, 295(5563), 2258–2261. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067338>
- Gan, J., Shaw, G., Tropea, J. E., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2008). A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Molecular Microbiology*, 67(1), 143–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06032.x>
- Gan, J., Tropea, J. E., Austin, B. P., Court, D. L., Waugh, D. S., & Ji, X. (2006). Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell*, 124(2), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.034>
- Garneau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:2, 8(2), 113–126. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>

- Garre, V. (2022). Recent Advances and Future Directions in the Understanding of Mucormycosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 175. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.850581/BIBTEX>
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., & Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science*, *306*(5698), 1046–1048. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1101092/SUPPL_FILE/GAZZANI.SOM.DISTILLED.PDF
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* *2009 10:2*, *10*(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- 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. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Gladyshev, E. (2017). Repeat-Induced Point Mutation and Other Genome Defense Mechanisms in Fungi. *Microbiology Spectrum*, *5*(4). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0042-2017>
- Gleghorn, M. L., & Maquat, L. E. (2014). “Black sheep” that don’t leave the double-stranded RNA-binding domain fold. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(7), 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.003>
- Graber, J. H., Cantor, C. R., Mohr, S. C., & Smith, T. F. (1999). Genomic detection of new yeast pre-mRNA 3-end-processing signals. *Nucleic Acids Research*, *27*(3), 888–894.
- Greber, B. J., & Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Biochem-060815-014343>, *85*, 103–132. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014343>
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(3), 454–500. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.454/ASSET/46BE0CF9-EC50-4FF1-9070-976386AB18C3/ASSETS/GRAPHIC/CM0390024T10.JPG>
- Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5’ end formation in Drosophila. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5818), 1587–1590. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1140494>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.002>
- Halder, L. D., Babych, S., Palme, D. I., Mansouri-Ghahnavieh, E., Ivanov, L., Ashonibare, V., Langenhorst, D., Prusty, B., Rambach, G., Wich, M., Trinks, N.,

- Blango, M. G., Kornitzer, D., Terpitz, U., Speth, C., Jungnickel, B., Beyersdorf, N., Zipfel, P. F., Brakhage, A. A., & Skerka, C. (2022). *Candida albicans* Induces Cross-Kingdom miRNA Trafficking in Human Monocytes To Promote Fungal Growth. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/MBIO.03563-21>
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, *404*(6775), 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, *293*(5532), 1146–1150. <https://doi.org/10.1126/science.1064023>
- Hammond, T. M., Xiao, H., Boone, E. C., Perdue, T. D., Pukkila, P. J., & Shiu, P. K. T. (2011). SAD-3, a putative helicase required for meiotic silencing by unpaired DNA, interacts with other components of the silencing machinery. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *1*(5), 369–376. <https://doi.org/10.1534/G3.111.000570/-/DC1/FIGURES2.PDF>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hassan, M. I. A., & Voigt, K. (2019). Pathogenicity patterns of mucormycosis: Epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Medical Mycology*, *57*(Supplement_2), S245–S256. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz011>
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., & Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *57*(2), 173–188. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6853-5>
- 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: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, *30*, 57–76. <https://doi.org/10.3767/003158513X666259>
- Holmes, D. S., & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, *114*(1), 193–197. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90473-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5)
- Holoch, D., & Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics* *2015* *16*:2, *16*(2), 71–84. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>
- Houseley, J., & Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, *136*(4), 763–776. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.019>
- Huang, K., Wu, X. X., Fang, C. L., Xu, Z. G., Zhang, H. W., Gao, J., Zhou, C. M., You, L. L., Gu, Z. X., Mu, W. H., Feng, Y., Wang, J. W., & Zhang, Y. (2021). Pol IV and RDR2: A two-RNA-polymerase machine that produces double-stranded RNA. *Science*, *374*(6575), 1579–1586.

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABJ9184/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABJ9184_MOVIES_S1_TO_S5.ZIP

- Hung, Y. H., & Slotkin, R. K. (2021). The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *61*, 102014. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102014>
- Hutvágner, G., & Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development*, *12*(2), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00290-3)
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, *144*, 1425–1436.
sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/protein_interactions/Y2H/james_craig_1996_highly_effic_y2h.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/7451F8BC-316E-4094-AD8D-4052177EB949
- Jeong, W., Keighley, C., Wolfe, R., Lee, W. L., Slavin, M. A., Kong, D. C. M., & Chen, S. C. A. (2019). The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2018.07.011/ATTACHMENT/2F3801A7-B565-43CD-93D1-6878BF5CD903/MMC1.DOCX>
- Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J., & Zhu, X. (2012). Identification and Functional Demonstration of miRNAs in the Fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLOS ONE*, *7*(12), e52734. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052734>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* *2021* *596*:7873, *596*(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, K., Zhong, J., Jiang, L., Liu, G., Gou, C. Y., Wu, Q., Wang, Y., Luo, J., & Gou, D. (2013). Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. *PLOS ONE*, *8*(10), e76288. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076288>
- Kaur, S., & Dhillon, G. S. (2014). The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical Reviews in Microbiology*, *40*(2), 155–175. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770385>
- Khorkova, O., Myers, A. J., Hsiao, J., & Wahlestedt, C. (2014). Natural antisense transcripts. *Human Molecular Genetics*, *23*(R1), R54–R63. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU207>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology* *2019* *37*:8, *37*(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- Kiyota, E., Okada, R., Kondo, N., Hiraguri, A., Moriyama, H., & Fukuhara, T. (2011). An Arabidopsis RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA in vitro. *Journal of Plant Research*, *124*(3), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s10265-010-0382-x>
- Kurzynska-Kokorniak, A., Koralewska, N., Pokornowska, M., Urbanowicz, A., Tworak, A., Mickiewicz, A., & Figlerowicz, M. (2015). The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Research*, *43*(9), 4365–4380. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV328>
- Kuzina, V., & Cerdá-Olmedo, E. (2007). Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *76*(5), 991–999. <https://doi.org/10.1007/S00253-007-1069-7>
- Lax, C., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Navarro, E., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2021). Stable and reproducible homologous recombination enables CRISPR-based engineering in the fungus *Rhizopus microsporus*. *Cell Reports Methods*, *1*(8), 100124. <https://doi.org/10.1016/J.CRMETH.2021.100124>
- Lax, C., Pérez-arques, C., Navarro-mendoza, M. I., Cánovas-márquez, J. T., Tahiri, G., Pérez-ruiz, J. A., Osorio-concepción, M., Murcia-flores, L., Navarro, E., Garre, V., & Nicolás, F. E. (2020). Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of mucorales. *Genes*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/genes11030317>
- Lee, D., & Shin, C. (2018). Emerging roles of DROSHA beyond primary microRNA processing. *RNA Biology*, *15*(2), 186. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1405210>
- Lee, D. W., Millimaki, R., & Aramayo, R. (2010). QIP, a Component of the Vegetative RNA Silencing Pathway, Is Essential for Meiosis and Suppresses Meiotic Silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics*, *186*(1), 127–133. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.110.118422>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature08041>
- Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z. A., Freitag, M., Selker, E. U., Mello, C. C., & Liu, Y. (2010). Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. *Molecular Cell*, *38*(6), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.005>
- Lee, S.-J., Kong, M., Harrison, P., & Hijri, M. (2018). Conserved Proteins of the RNA Interference System in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizoglyphus irregularis* Provide New Insight into the Evolutionary History of Glomeromycota. *Genome Biology and Evolution*, *10*(1), 328–343. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy002>
- Lee, S. C., & Idnurm, A. (2017). Fungal Sex: The Mucoromycota. *Microbiology*

- Spectrum*, 5(2), 177–191. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0041-2017>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>
- Lee, Y., Hur, I., Park, S. Y., Kim, Y. K., Mi, R. S., & Kim, V. N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO Journal*, 25(3), 522–532. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600942>
- Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, 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. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002086>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP352>
- Liang, Y. H., Lavoie, M., Comeau, M. A., Elela, S. A., & Ji, X. (2014). Structure of a Eukaryotic RNase III Postcleavage Complex Reveals a Double-Ruler Mechanism for Substrate Selection. *Molecular Cell*, 54(3), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.006>
- Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H. E., Smith, D. P., & Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301(5641), 1921–1925. <https://doi.org/10.1126/science.1088710>
- Liu, Y., Lee, H. C., Aalto, A. P., Yang, Q., Chang, S. S., Huang, G., Fisher, D., Cha, J., Poranen, M. M., & Bamford, D. H. (2010). The DNA/RNA-dependent RNA polymerase QDE-1 generates aberrant RNA and dsRNA for RNAi in a process requiring replication protein a and a DNA helicase. *PLoS Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000496>
- Liu, Z., Wang, J., Cheng, H., Ke, X., Sun, L., Zhang, Q. C., & Wang, H. W. (2018). Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell*, 173(5), 1191–1203.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.080>
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2017). *Rhizopus oryzae* - Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110–127. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.06.012>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology: AMB*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>

- Lucas, K. J., Myles, K. M., & Raikhel, A. S. (2013). Small RNAs: A new frontier in mosquito biology. *Trends in Parasitology*, 29(6), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.003>
- Ma, E., MacRae, I. J., Kirsch, J. F., & Doudna, J. A. (2008). Autoinhibition of Human Dicer by Its Internal Helicase Domain. *Journal of Molecular Biology*, 380(1), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.005>
- MacRae, I. J., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:10, 14(10), 934–940. <https://doi.org/10.1038/nsmb1293>
- MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., & Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 311(5758), 195–198. <https://doi.org/10.1126/science.1121638>
- 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 & Development*, 21(5), 590–600. <https://doi.org/10.1101/GAD.1497607>
- Makeyev, E. V., & Bamford, D. H. (2002). Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Molecular Cell*, 10(6), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00780-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00780-3)
- Maurer, E., Hörtnagl, C., Lackner, M., Grässle, D., Naschberger, V., Moser, P., Segal, E., Semis, M., Lass-Flörl, C., & Binder, U. (2019). Galleria mellonella as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. *Medical Mycology*, 57(3), 351–362. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy042>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold - Making protein folding accessible to all. *BioRxiv*, 2021.08.15.456425. <https://doi.org/10.1101/2021.08.15.456425>
- Mirdita, M., Steinegger, M., & Söding, J. (2019). MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches. *Bioinformatics*, 35(16), 2856–2858. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY1057>
- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., & Baulcombe, D. C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii. *Nature* 2007 447:7148, 447(7148), 1126–1129. <https://doi.org/10.1038/nature05903>
- Mukherjee, K., Campos, H., & Kolaczowski, B. (2013). Evolution of Animal and Plant Dicers: Early Parallel Duplications and Recurrent Adaptation of Antiviral RNA Binding in Plants. *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), 627–641. <https://academic.oup.com/mbe/article/30/3/627/1040565>
- Murata, T., Kadotani, N., Yamaguchi, M., Tosa, Y., Mayama, S., & Nakayashiki, H. (2007). siRNA-dependent and -independent post-transcriptional cosuppression of the LTR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus Magnaporthe oryzae. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 5987–5994.

<https://doi.org/10.1093/NAR/GKM646>

- 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. <https://doi.org/10.1105/TPC.2.4.279>
- Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Panchal, S., Nicolás, F. E., Mondo, S. J., Ganguly, P., Pangilinan, J., Grigoriev, I. V., Heitman, J., Sanyal, K., & Garre, V. (2019). Early Diverging Fungus *Mucor circinelloides* Lacks Centromeric Histone CENP-A and Displays a Mosaic of Point and Regional Centromeres. *Current Biology*, 29(22), 3791–3802.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.024>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s004380100558>
- Navarro, Eusebio, Ruiz-Pérez, V. L., & Torres-Martínez, S. (2000). Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 800–807. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01058.x>
- Nicolás, Francisco 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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.003>
- Nicolás, Francisco 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 *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1852, pp. 221–237). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_13
- Nicolás, Francisco 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg384>
- Nicolás, Francisco E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). Loss and Retention of RNA Interference in Fungi and Parasites. *PLOS Pathogens*, 9(1), e1003089. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003089>
- Nicolás, Francisco 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, 237. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1443-2>
- Nicolás, Francisco Esteban, 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq301>

- Nolan, T., Braccini, L., Azzalin, G., De Toni, A., Macino, G., & Cogoni, C. (2005). The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, *33*(5), 1564–1573. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI300>
- Norlander, J., Kempe, T., & Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, *26*(1), 101–106. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90040-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90040-9)
- Orlowski, M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews*, *55*(2), 234. <https://doi.org/10.1128/membr.55.2.234-258.1991>
- Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O'Carroll, D., & Zamore, P. D. (2018). PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics* *20*:2, *20*(2), 89–108. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(11), 1060–1070. <https://doi.org/10.1002/EJLT.200700169>
- Partin, A. C., Zhang, K., Jeong, B. C., Herrell, E., Li, S., Chiu, W., & Nam, Y. (2020). Cryo-EM structures of human Drosha and DGCR8 in complex with primary microRNA. *Molecular Cell*, *78*(3), 411–422.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.016>
- Paturi, S., & Deshmukh, M. V. (2021). A Glimpse of “Dicer Biology” Through the Structural and Functional Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*(May). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.643657>
- Pedersen, I., & David, M. (2008). MicroRNAs in the Immune Response. *Cytokine*, *43*(3), 391. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.07.016>
- Pérez-Arques, C. (2020). *El silenciamiento génico de Mucor circinelloides regula la cromatina centromérica y la virulencia* [Universidad de Murcia]. <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/97261>
- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02765-18>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008611>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, *30*(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>
- Prakash, H., & Chakrabarti, A. (2019). Global epidemiology of mucormycosis. *Journal of Fungi*, *5*(1). <https://doi.org/10.3390/jof5010026>

- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., & Yuan, Y. A. (2010). Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein - Protein interaction. *Rna*, *16*(3), 474–481. <https://doi.org/10.1261/rna.1965310>
- Qutob, D., Patrick Chapman, B., & Gijzen, M. (2013). Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS2354>
- Raja, P., Jackel, J. N., Li, S., Heard, I. M., & Bisaro, D. M. (2014). *Arabidopsis* Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, *88*(5), 2611–2622. <https://doi.org/10.1128/jvi.02305-13>
- Redko, Y., Bechhofer, D. H., & Condon, C. (2008). Mini-III, an unusual member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA maturation in *B. subtilis*. *Molecular Microbiology*, *68*(5), 1096–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06207.x>
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, *16*(13), 1616. <https://doi.org/10.1101/GAD.1004402>
- Richardson, M. (2009). The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*(SUPPL. 5), 2–9. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2009.02972.X>
- Rodrigues Reis, C. E., Bento, H. B. S., Carvalho, A. K. F., Rajendran, A., Hu, B., & De Castro, H. F. (2019). Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592104>, *39*(4), 555–570. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592104>
- 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* *2012* *97*:7, *97*(7), 3063–3072. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4432-2>
- 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. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1992.TB02202.X>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/BF02907499>
- 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*. *Advances in Genetics*, *91*, 55–102. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.07.002>
- RuYong, Z., & Hong, J. (1995). *Rhizomucor endophyticus* sp.nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. *Mycotaxon*, *56*, 455–466.

- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2005). Processing of Pre-microRNAs by the Dicer-1–Loquacious Complex in *Drosophila* Cells. *PLoS Biology*, *3*(7), 1202–1212. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0030235>
- Salgado, P. S., Koivunen, M. R. L., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., Stuart, D. I., & Grimes, J. M. (2006). The Structure of an RNAi Polymerase Links RNA Silencing and Transcription. *PLoS Biology*, *4*(12), 2274–2281. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040434>
- Satari, B., & Karimi, K. (2018). Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(3), 1097–1117. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8691-9>
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S. M., & Peter, M. E. (2008). MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* *2008* *27*:45, *27*(45), 5959–5974. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.274>
- Schwarz, P., Cornely, O. A., & Dannaoui, E. (2019). Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective. *Mycoses*, *62*(9), 746–760. <https://doi.org/10.1111/MYC.12909>
- Shiu, P. K. T., Raju, N. B., Zickler, D., & Metzberg, R. L. (2001). Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, *107*(7), 905–916. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00609-2/ATTACHMENT/3B788EC7-774C-4FAD-A75A-66A746824081/MMC2.DOC](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00609-2/ATTACHMENT/3B788EC7-774C-4FAD-A75A-66A746824081/MMC2.DOC)
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. A., & Fire, A. (2001). On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. *Cell*, *107*(4), 465–476. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00576-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00576-1)
- Sijen, T., Steiner, F. A., Thijssen, K. L., & Plasterk, R. H. A. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, *315*(5809), 244–247. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1136699/SUPPL_FILE/SIJEN.SOM.PDF
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05291.x>
- 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 and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, *15*(4), 102146. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.05.019>
- Sinha, N. K., Iwasa, J., Shen, P. S., & Bass, B. L. (2018). Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini. *Science*, *359*(6373), 329–334. <https://doi.org/10.1126/science.aag0921>
- Skiada, A., Lanternier, F., Groll, A. H., Pagano, L., Zimmerli, S., Herbrecht, R., Lortholary, O., & Petrikos, G. L. (2013). Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica*, *98*(4), 492.

<https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.065110>

- Son, H., Park, A. R., Lim, J. Y., Shin, C., & Lee, Y. W. (2017). Genome-wide exonic small interference RNA-mediated gene silencing regulates sexual reproduction in the homothallic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Genetics*, *13*(2), e1006595. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006595>
- Song, H., Fang, X., Jin, L., Shaw, G. X., Wang, Y. X., & Ji, X. (2017). The Functional Cycle of Rnt1p: Five Consecutive Steps of Double-Stranded RNA Processing by a Eukaryotic RNase III. *Structure*, *25*(2), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.013>
- 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. In *The Fungal Kingdom* (pp. 1–34). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch1>
- 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. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Su, S., Wang, J., Wang, H. W., & Ma, J. (2021). RCSB PDB - 7W0B: Dicer2-LoqsPD complex at apo status. RCSB PDB. <https://doi.org/10.2210/pdb7W0B/pdb>
- Sun, W., Li, G., & Nicholson, A. W. (2004). Mutational analysis of the nuclease domain of *Escherichia coli* ribonuclease III. Identification of conserved acidic residues that are important for catalytic function in vitro. *Biochemistry*, *43*(41), 13054–13062. <https://doi.org/10.1021/bi049258i>
- Szádeczky-Kardoss, I., Csorba, T., Auber, A., Schamberger, A., Nyikó, T., Taller, J., Orbán, T. I., Burgyán, J., & Silhavy, D. (2018). The nonstop decay and the RNA silencing systems operate cooperatively in plants. *Nucleic Acids Research*, *46*(9), 4632–4648. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY279>
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., & Mello, C. C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-Box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, *109*(7), 861–871. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00793-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00793-6)
- Talbot, P. H. B. (1971). Fungi with Sporangia: Eumycota Subdivisions Mastigomycotina and Zygomycotina. In *Principles of Fungal Taxonomy* (pp. 109–132). Macmillan Education UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-15432-6_9
- Tanaka, M., Sakai, Y., Yamada, O., Shintani, T., & Gomi, K. (2011). In silico Analysis of 3'-End-Processing Signals in *Aspergillus oryzae* Using Expressed Sequence Tags and Genomic Sequencing Data. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, *18*(3), 189.

<https://doi.org/10.1093/DNARES/DSR011>

- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, *346*(6213).
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1256688/SUPPL_FILE/TEDERSOO-SM.PDF
- Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J. B., Park, J. E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Molecular Cell*, *53*(4), 606–616.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.01.003/ATTACHMENT/F0692EA9-B9D3-474E-B375-813A5D60F1AF/MMC1.PDF>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.006>
- 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), 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005168>
- Trieu, T. A., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Sanchis, M., Capilla, J., Navarro-Rodríguez, P., Lopez-Fernandez, L., Torres-Martínez, S., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M., & Nicolás, F. E. (2017). RNAi-Based Functional Genomics Identifies New Virulence Determinants in Mucormycosis. *PLoS Pathogens*, *13*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006150>
- Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Gutiérrez-Corona, F., Ramírez-Díaz, M. I., Campos-García, J., & Meza-Carmen, V. (2015). Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete Mucor circinelloides. *Molecular Biology Reports*, *42*(3), 705–711. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3818-x>
- van Heeswijk, R., & Roncero, M. I. G. (1984). High frequency transformation of Mucor with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications*, *49*(7), 691–702. <https://doi.org/10.1007/BF02907500>
- Velayos, A., Blasco, J. L., Alvarez, M. I., Iturriaga, E. A., & Eslava, A. P. (2000). Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (carB) gene expression in Mucor circinelloides. *Planta*, *210*(6), 938–946. <https://doi.org/10.1007/s004250050701>
- Vicente, G., Bautista, L. F., Gutiérrez, F. J., Rodríguez, R., Martínez, V., Rodríguez-Frómata, R. A., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2010). Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into Biodiesel. *Energy and Fuels*, *24*(5), 3173–3178. <https://doi.org/10.1021/EF9015872>
- Wagner, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartz, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2020). A new species concept for the clinically relevant Mucor circinelloides complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *44*, 67.

<https://doi.org/10.3767/PERSONIA.2020.44.03>

- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/jof5040106>
- Wang, M., Weiberg, A., Dellota, E., Yamane, D., & Jin, H. (2017). Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology*, 14(4), 421–428. https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112/SUPPL_FILE/KRNB_A_1291112_SM1847.DOCX
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. Da, & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* 2016 2:10, 2(10), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- 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 & Development*, 24(22), 2566–2582. <https://doi.org/10.1101/GAD.1970910>
- Wei, X., Ke, H., Wen, A., Gao, B., Shi, J., & Feng, Y. (2021). Structural basis of microRNA processing by Dicer-like 1. *Nature Plants* 2021 7:10, 7(10), 1389–1396. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01000-1>
- Weinberg, D. E., Nakanishi, K., Patel, D. J., & Bartel, D. P. (2011). The inside-out mechanism of dicers from budding yeasts. *Cell*, 146(2), 262–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.021>
- Welker, N. C., Maity, T. S., Ye, X., Aruscavage, P. J., Krauchuk, A. A., Liu, Q., & Bass, B. L. (2011). Dicer's Helicase Domain Discriminates dsRNA Termini to Promote an Altered Reaction Mode. *Molecular Cell*, 41(5), 589–599. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.02.005/ATTACHMENT/B922485E-A1B4-4193-8118-C426FA204591/MMC1.PDF>
- Wijayawardene, N. N., Pawłowska, J., Letcher, P. M., Kirk, P. M., Humber, R. A., Schüßler, A., Wrzosek, M., Muszewska, A., Okraśińska, A., Istel, Ł., Gęsiorska, A., Mungai, P., Lateef, A. A., Rajeshkumar, K. C., Singh, R. V., Radek, R., Walther, G., Wagner, L., Walker, C., ... Hyde, K. D. (2018). Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). *Fungal Diversity* 2018 92:1, 92(1), 43–129. <https://doi.org/10.1007/S13225-018-0409-5>
- Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer–TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular Cell*, 57(3), 397. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.11.030>
- Yamaguchi, S., Nishizawa, T., Kusakizako, T., Yamashita, K., Tomita, A., Hirano, H., Nishimasu, H., & Nureki, O. (2021). 7V6B: Structure of the Dicer-2-R2D2

heterodimer. RCSB PDB. <https://doi.org/10.2210/pdb7V6B/pdb>

Zamore, P. D. (2001). Thirty-three years later, a glimpse at the ribonuclease III active site. *Molecular Cell*, 8(6), 1158–1160. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00418-X)

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)

Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., & Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO Journal*, 21(21), 5875–5885. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf582>

Zhou, M., & Law, J. A. (2015). RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 154–164. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2015.07.005>

VIII. Anexos

VIII.1. Proteínas utilizadas para el análisis filogenético

Organismo	ID del gen
<i>Aquifex aeolicus</i>	O67082
<i>Aspergillus niger</i>	G3XLX0
<i>Absidia repens</i>	386913
<i>Benjaminella poitrasii</i>	529447 648802
<i>Backusella circina</i>	252236 284889
<i>Blakeslea trispora</i>	186474 489587
<i>Candida albicans</i>	A0A1D8PM62 A0A1D8PM79
<i>Chaetocladium brefeldii</i>	185053 227361 115159
<i>Choanephora cucurbitarum</i>	582603 552367
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Q5KEY8
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	506973 516988
<i>Circinella umbellata</i>	519094 568790
<i>Dichotomocladium elegans</i>	182457 1854006
<i>Escherichia coli</i>	P0A7Y0
<i>Ellisomyces anomalus</i>	374011 454068
<i>Fennellomyces sp.</i>	590566 614892
<i>Gilbertella persicaria</i>	543853 565247
<i>Helicostylum pulchrum</i>	617366 634698
<i>Lichthemia corymbifera</i>	3190 6068
<i>Mycotypha africana</i>	851947 984970
<i>Mucor lusitanicus</i>	80729 160351 110239

	306576
	365312
	371263
<i>Mucor cordense</i>	394906
	410562
	412583
	412585
<i>Mortierella elongata</i>	133451
	361444
<i>Mucor heterogamus</i>	525148
<i>Neurospora crassa</i>	V5IQ18
	381056
<i>Pilaria anomala</i>	390925
	394558
	70936
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	184044
	185429
	393199
<i>Parasitella parasitica</i>	418957
	833902
<i>Pilobolus umbonatus</i>	849870
	1878
<i>Rhizopus delemar</i>	10879
<i>Rhizophagus irregularis</i>	1623609
	19874
<i>Rhizopus microsporus</i>	187193
	547203
<i>Radiomyces spectabilis</i>	607789
	Q02555
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1717504
<i>Spinellus fusiger</i>	P22192
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	520618
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	510400
	549225
<i>Sporodiniella umbellata</i>	3756
<i>Saksenaea vasiformis</i>	335479
	432215
<i>Thamnidium elegans</i>	

