

Departamento de Genética y Microbiología
UNIVERSIDAD DE MURCIA

**“Silenciamiento génico en *Mucor circinelloides*: análisis
estructural y funcional del gen *dicer-2*”**

Juan Pedro de Haro Hernández

Murcia, 2010

**“Silenciamiento génico en *Mucor circinelloides*: análisis
estructural y funcional del gen *dicer-2*”**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, para optar al grado de Doctor en Biología, por el Licenciado **Juan Pedro de Haro Hernández,**

Murcia, a 11 de Mayo de 2010

A mis padres, mi mujer y mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Soy plenamente consciente de que este trabajo no podría haberse realizado sin la formación que he recibido por parte de mi directora durante estos años. Es fácil trabajar sabiendo que cuentas con alguien que en las situaciones más difíciles, cuando parece que la única alternativa es el abandono, tiene el coraje suficiente para sacarlo todo adelante. Un alumno nunca logra saber dónde termina la influencia de sus mentores. Gracias por todo lo que me has enseñado, Rosa.

Quiero agradecer también a Santi y a Víctor todo su apoyo, sus consejos y sugerencias. Sólo una vez acabado el trabajo entiendo la enorme magnitud de sus aportaciones a mi formación como investigador y la de tantos otros estudiantes. No cabe duda de que la aportación de ambos ha enriquecido este trabajo.

Al Dr. Tamas Dalmay y su grupo de investigación les agradezco el ofrecerme la posibilidad de realizar un trabajo con el que he disfrutado enormemente.

Agradezco a mis compañeros de grupo el haber convertido mi estancia aquí en algo emocionante. De todos ellos he aprendido y a todos los echaré profundamente de menos. Ha sido un regalo trabajar al lado de Sebi, Curro, Jorge, María GV, Laura, Fátima, Silvia, Ascen, Amarilis y María. También de los que estuvieron al final: Sergio, Ana y Carmen. Y los que estuvieron muy al principio: Juanma y Lola. A aquellos que han pasado de forma efímera por el laboratorio pero de los que guardo un intenso recuerdo: Josefina, Víctor Tagua, Eugenio y Kishore.

A todos los miembros del Ala A de Genética. A Montse, Padhu, Paco Murillo, Marta, Carmen y Marisa. Poder trabajar entre gente mucho más inteligente que uno mismo es un lujo que no todo el mundo tiene la suerte de disfrutar. A Paco le agradezco el haber podido gozar de su amistad durante tantos años. Es un tipo brillante como pocos y seré enormemente afortunado si el futuro vuelve a cruzar nuestros caminos en algún momento. Mis agradecimientos también al resto de becarios: a Diana y Javi por todos los momentos felices que hemos compartido, a Juanma y a los que dejaron de ser becarios hace tiempo pero de los que aprendí mucho en mis comienzos, Mari Cruz (gracias por toda la ayuda de este último año), Gloria, José Juan, Marcos y María. Gracias a José Antonio, por ser un pilar fundamental de este departamento.

Quiero expresar mi agradecimiento más profundo y sincero a mi familia, por hacerme sentir siempre su apoyo y su amor. A mi hermana Lydia, a mis “titas”, Maruja y Juani, a mi abuela Mariquita y a mi abuelo Pedro, que me enseñó muy pronto que todos los problemas tenían solución.

A María Dolores, porque siento su amor todos los días de mi vida y sin ella nada sería posible. No me queda sino expresarle mi profundo amor y pedirle perdón por las incontables veces que no he imitado a Catulo, requiriéndole con igual desmesura todo lo que el poeta solicitó a su amada Lesbia. Espero terminar con sus esperas y conseguir que sean los astros los que envidien nuestra breve llama.

A Carmelo y Clara, porque son mi vida.

A mis padres, Andrés y Pepita, porque se han entregado por completo a sus hijos sin querer nada para sí mismos. Sin el recuerdo de mi padre y la certeza de que mi madre siempre estará a mi lado dudo que me fuera posible caminar cada día. Dedicarles este trabajo es poco regalo para agradecerles todo el amor que me han dado.

Finalmente, debo agradecer a la Fundación Séneca y a la Fundación Cajamurcia el haber financiado mis estudios para la realización de esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. <i>Mucor circinelloides</i>	3
I. 1. 1. Características generales	3
I. 1. 2. Ciclo de vida	3
I. 1. 3. <i>Mucor</i> como modelo de estudio	5
I. 2. Silenciamiento génico mediado por RNAs	6
I. 2. 1. Generalidades	7
I. 2. 2. Activación del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA. 10	10
I. 2. 3. Identificación de las dianas	12
I. 2. 4. Silenciamiento génico post-transcripcional	13
I. 2. 5. Silenciamiento génico transcripcional	14
I. 2. 6. Amplificación del silenciamiento	16
I. 2. 7. Nuevas clases de sRNAs endógenos identificadas mediante secuenciación masiva	18
I. 2. 8. Silenciamiento génico mediado por RNA en hongos filamentosos	21
I. 2. 8. 1. Silenciamiento génico mediado por RNA en <i>M. circinelloides</i>	24
I. 3. Las enzimas Dicer	28
I. 3. 1. Mecanismo de procesamiento del dsRNA por Dicer	30
I. 3. 2. Proteínas que interaccionan con Dicer	32
I. 4. Objetivos de este trabajo	33
II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados	37
II. 2. Medios y condiciones de crecimiento	40
II. 2. 1. <i>Escherichia coli</i>	40
II. 2. 2. <i>Mucor circinelloides</i>	40

II. 3. Tampones y reactivos	41
II. 4. Transformación de <i>E. coli</i>	47
II. 5. Transformación de <i>M. circinelloides</i>	47
II. 6. Integración de DNA exógeno en el genoma de <i>M. circinelloides</i> ..	48
II. 7. Mutagénesis con nitrosoguanidina y aislamiento de mutantes auxótrofos para uracilo	49
II. 8. Medida de la actividad OMP descarboxilasa	50
II. 9. Manipulación del DNA	51
II. 9. 1. Aislamiento de DNA de <i>M. circinelloides</i>	51
II. 9. 2. Aislamiento de DNA plasmídico	51
II. 9. 3. Tratamiento de DNA con enzimas	52
II. 9. 4. Técnicas electroforéticas	52
II. 9. 5. Amplificación de DNA por PCR	53
II. 9. 6. Marcado de fragmentos de DNA	53
II. 9. 7. Hibridación de DNA fijado a un soporte	55
II. 9. 8. Secuenciación del DNA	55
II. 10. Análisis de secuencias de DNA	56
II. 11. Manipulación del RNA	56
II. 11. 1. Aislamiento de RNA total de <i>M. circinelloides</i>	56
II. 11. 2. Aislamiento de RNA de bajo peso molecular de <i>Mucor</i> <i>circinelloides</i>	57
II. 11. 3. Amplificación de cDNAs	58
II. 11. 3. 1. RT-PCR	58
II. 11. 3. 2. 3' RACE	58
II. 11. 4. Hibridación de RNA total fijado a un soporte	59
II. 11. 5. Hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte	59

II. 11. 6. Marcado de ribosondas	60
II. 11. 7. Marcado de oligonucleótidos	62
II. 12. Manipulación de proteínas	63
II. 12. 1. Extracción de proteínas solubles de <i>E. coli</i>	63
II. 12. 2. Electroforesis de proteínas	64
II. 12. 3. Purificación de proteínas	64
II. 12. 4. Diálisis de proteínas purificadas	65
II. 13. Inmunodetección de proteínas	66
II. 13. 1. Transferencia de proteínas a membranas	66
II. 13. 2. Revelado de las membranas por inmunodetección	66
II. 14. Ensayo de actividad Dicer	67
II. 14. 1. Preparación de RNA de doble cadena marcado radiactivamente	67
II. 14. 2. Procesamiento de dsRNA por la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i>	68
II. 15. Rastreo de la genoteca de DNA genómico en el fago lambda	69
II. 15. 1. Titulación de la genoteca	69
II. 15. 2. Transferencia de los fagos a membranas de nailon	70
II. 15. 3. Aislamiento de clones positivos tras la hibridación	70
II. 15. 4. Aislamiento de DNA del fago lambda	71
III. RESULTADOS	73
III. 1. Clonación y caracterización del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	75
III. 1. 1. Amplificación de la región comprendida entre el dominio PAZ y los dominios RNasaIII del gen <i>dicer2</i> mediante cebadores degenerados	75
III. 1. 2. Clonación y secuenciación de la región genómica completa del gen <i>dicer2</i>	78
III. 1. 2. 1. Análisis de clones seleccionados tras hibridación en condiciones no restrictivas con una sonda del gen <i>dicer1</i>	78
III. 1. 2. 2. Clonación de la región genómica completa del gen <i>dicer2</i>	81

III. 1. 3. Análisis estructural del gen <i>dicer2</i>	87
III. 1. 3. 1. Determinación del extremo 3' del gen <i>dicer2</i>	87
III. 1. 3. 2. Localización de los intrones del gen <i>dicer2</i>	89
III. 1. 3. 3. Secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2	91
III. 1. 4. Análisis de la expresión del gen <i>dicer2</i>	94
III. 1. 4. 1. Expresión del gen <i>dicer2</i> en la estirpe silvestre	94
III. 1. 4. 2. Expresión del gen <i>dicer2</i> en individuos silenciados	94
III. 2. Análisis funcional del gen <i>dicer2</i>	95
III. 2. 1. Disrupción del gen <i>dicer2</i>	95
III. 2. 2. Análisis fenotípico del mutante <i>dicer2</i>'	101
III. 2. 2. 1. Silenciamiento génico	101
III. 2. 2. 2. Acumulación de siRNAs en los mutantes <i>dicer2</i> '	104
III. 2. 2. 3. Complementación del mutante <i>dicer2</i> '	106
III. 2. 2. 3. 1. Aislamiento de mutantes FOA ^R auxótrofos para uracilo	106
III. 2. 2. 3. 2. Medida de la actividad OMP descarboxilasa	107
III. 2. 2. 3. 3. Complementación de la mutación <i>pyrG</i> ' con el alelo <i>pyrG</i> ⁺	108
III. 2. 2. 3. 4. Transformación de las estirpes <i>dicer2</i> ' <i>pyrG</i> ' con alelos silvestres del gen <i>dicer2</i>	109
III. 2. 2. 3. 5. Silenciamiento génico en los mutantes <i>dicer2</i> ' complementados	110
III. 2. 2. 4. Obtención de estirpes <i>dicer1</i> ' <i>dicer2</i> '	112
III. 2. 2. 4. 1. Obtención de estirpes <i>dicer1</i> ' <i>dicer2</i> ' a partir de estirpes <i>dicer2</i> ' auxótrofas para uracilo	112
III. 2. 2. 4. 2. Obtención de estirpes <i>dicer1</i> ' <i>dicer2</i> ' a partir de la estirpe <i>dicer2</i> ' auxótrofa para leucina	116
III. 3. Expresión y ensayo de actividad de la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i>	119
III. 3. 1. Expresión de los dominios RNasaIII de Dicer2 en <i>Escherichia coli</i> y ensayo de su actividad enzimática	119
III. 3. 1. 1. Construcción del vector de expresión de la región C-terminal de la proteína Dicer2	119
III. 3. 1. 2. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-Dicer2	120
III. 3. 1. 3. Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de la proteína de fusión GST-Dicer2 ..	123

III. 3. 2. Expresión de la proteína Dicer2 completa en células de insecto y ensayo de su actividad enzimática	124
III. 3. 2. 1. Construcción del vector para la expresión de la proteína Dicer2 completa	125
III. 3. 2. 2. Expresión y purificación de la proteína Dicer2 completa	125
III. 3. 2. 3. Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de la proteína Dicer2 completa	126
III. 4. Análisis genómico de los siRNAs endógenos de	
<i>M. circinelloides</i>	127
III. 4. 1. Clonación y secuenciación de los sRNAs endógenos de	
<i>M. circinelloides</i>	128
III. 4. 2. Análisis bioinformático de sRNAs endógenos de <i>M. circinelloides</i>	130
III. 4. 3. Validación mediante Northern de las distintas clases de <i>loci</i>	
establecidas	132
III. 4. 3. 1. <i>Loci</i> con niveles reducidos de sRNAs en el mutante <i>dicer2</i>	133
III. 4. 3. 2. <i>Loci</i> con niveles similares de sRNAs en la estirpe silvestre y en los mutantes <i>dicer</i>	137
III. 4. 3. 3. Clases de <i>loci</i> minoritarias	139
IV. DISCUSIÓN	141
IV. 1. El gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	143
IV. 2. Actividad Dicer.....	152
IV. 3. siRNAs endógenos de <i>M. circinelloides</i>	159
V. CONCLUSIONES	167
VI. BIBLIOGRAFÍA	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i>	4
Figura 2. Esquema simplificado de las rutas de silenciamiento mediadas por miRNAs y siRNAs basado en el mecanismo de silenciamiento de <i>D. melanogaster</i>	8
Figura 3. Activación del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA	11
Figura 4. Rutas del silenciamiento génico transcripcional	15
Figura 5. Mecanismos de amplificación del silenciamiento génico	17
Figura 6. Modelo de ping-pong para la amplificación de los piRNAs	19
Figura 7. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras de la ruta de los endo-siRNAs	20
Figura 8. Mecanismos de qelling y de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) en <i>N. crassa</i>	23
Figura 9. Ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>M. circinelloides</i>	24
Figura 10. Silenciamiento génico mediado por RNA en <i>M. circinelloides</i>	25
Figura 11. Modelo del mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en <i>M. circinelloides</i>	27
Figura 12. Representación esquemática de la estructura de dominios de distintas enzimas de la familia RNasaIII	28
Figura 13. Disposición de los dominios de la proteína Dicer	31
Figura 14. Amplificación de un fragmento del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i> mediante cebadores degenerados	76
Figura 15. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas para los dos genes <i>dicer</i> de <i>R. oryzae</i> y el gen <i>dicer1</i> de <i>M. circinelloides</i> con el fragmento amplificado del gen <i>dicer2</i>	78
Figura 16. Identificación del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	79
Figura 17. Esquema de la clonación de la secuencia genómica completa del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	80
Figura 18. Análisis de los clones genómicos portadores del gen <i>dicer2</i> identificados en el segundo escrutinio de la genoteca de lambda de <i>M. circinelloides</i>	82
Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pMAT1220, que contiene el gen <i>dicer2</i> completo y las secuencias adyacentes	83
Figura 20. Secuencia genómica completa del gen <i>dicer2</i> y regiones adyacentes	84

Figura 21. Experimento de 3'-RACE para determinar el extremo 3' del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	88
Figura 22. Localización de intrones en la secuencia del gen <i>dicer2</i>	89
Figura 23. Secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i>	91
Figura 24. Esquema de la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i>	92
Figura 25. Expresión del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	94
Figura 26. Construcción del plásmido pMAT1218, portador del inserto empleado para la interrupción del gen <i>dicer2</i>	96
Figura 27. Análisis mediante PCR de los transformantes generados durante los experimentos para obtener mutantes <i>dicer2</i> '	98
Figura 28. Disrupción del gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	99
Figura 29. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen <i>dicer2</i> en el mutante <i>dicer2</i> '	100
Figura 30. Fenotipo de los descendientes de individuos completamente albinos transformados con el plásmido pMAT1253	103
Figura 31. Producción de siRNAs inducida por transgenes con repeticiones invertidas en el mutante <i>dicer2</i> '	105
Figura 32. Supervivencia de las esporas de la estirpe MU410 (<i>dicer2</i> ') al tratamiento con nitrosoguanidina	107
Figura 33. Análisis mediante Southern de la presencia de alelos silvestres del gen <i>dicer2</i> en un individuo silenciado de la estirpe MU422 (<i>dicer2</i> ' <i>pyrG</i> ') portador del plásmido pMAT1223 (<i>dicer2</i> ⁺ <i>pyrG</i> ⁺)	111
Figura 34. Obtención de mutantes <i>dicer1</i> ' <i>dicer2</i> ' a partir de derivados <i>pyrG</i> ' de la estirpe MU410 (<i>dicer2</i> ')	113
Figura 35. Construcción del plásmido pMAT1228, portador del inserto empleado para la interrupción del gen <i>dicer1</i>	114
Figura 36. Análisis mediante PCR de los transformantes generados para obtener mutantes <i>dicer1</i> ' <i>dicer2</i> '	116
Figura 37. Disrupción del gen <i>dicer1</i> en la estirpe MU410 (<i>dicer2</i> ')	118
Figura 38. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-Dicer2	121
Figura 39. Solubilización de la proteína de fusión GST-Dicer2 con el detergente aniónico sarcosil y purificación mediante cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa	122

Figura 40. Ensayo de actividad enzimática de la proteína de fusión GST-Dicer2	124
Figura 41. Purificación de la proteína Dicer2 completa a partir de células de insecto ..	126
Figura 42. Ensayo de actividad enzimática de la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i>	127
Figura 43. Distribución genómica de grupos de sRNAs solapantes en la estirpe silvestre (R7B) de <i>M. circinelloides</i> y en <i>A. thaliana</i>	129
Figura 44. <i>Loci</i> con niveles de acumulación similar de sRNAs en las estirpes R7B, MU406 y MU410	131
Figura 45. Distribución en clases de los sRNAs totales secuenciados en la estirpe silvestre y los mutantes <i>dicer1</i> ' y <i>dicer2</i> '	132
Figura 46. Distribución de los <i>loci</i> en cuatro clases según el nivel de acumulación de los sRNAs correspondientes en la estirpe silvestre R7B, el mutante <i>dicer1</i> ' (MU406) y el mutante <i>dicer2</i> ' (MU410)	133
Figura 47. Distintas clases de <i>loci</i> con niveles reducidos de sRNAs en el mutante <i>dicer2</i> '	135
Figura 48. <i>Loci</i> correspondientes a secuencias exónicas con niveles reducidos de sRNAs en el mutante <i>dicer2</i> '	136
Figura 49. <i>Locus</i> correspondiente a una región intergénica con niveles similares de sRNAs en la estirpe silvestre R7B, el mutante <i>dicer1</i> ' (MU406) y el mutante <i>dicer2</i> ' (MU410)	138
Figura 50. <i>Loci</i> correspondientes a regiones intergénicas con niveles reducidos de sRNAs en los mutantes <i>dicer</i>	139
Figura 51. Organización de las regiones genómicas que incluyen los genes <i>dicer</i> de los hongos cigomicetos <i>M. circinelloides</i> , <i>R. oryzae</i> y <i>P. blakesteeanus</i>	144
Figura 52. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en la unión de Dicer a proteínas de unión a dsRNA (dsRBP)	155
Figura 53. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en modificaciones del siRNA generado por Dicer durante la transferencia al complejo RISC	157
Figura 54. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en la actuación de distintas RdRPs	158
Figura 55. Ejemplos de regiones de 20 kb de <i>M. circinelloides</i> y <i>A. thaliana</i>	160
Figura 56. <i>Locus</i> correspondiente a la secuencia de un exón con niveles reducidos de sRNAs en el mutante <i>dicer2</i> '	164

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Maquinaria del RNAi	9
Tabla 2. Rutas de silenciamiento asociadas a las proteínas Dicer de distintos organismos	29
Tabla 3. Estirpes de <i>M. circinelloides</i> utilizadas en este trabajo	37
Tabla 4. Estirpes de <i>E.coli</i> utilizadas en este trabajo	38
Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo	39
Tabla 6. Oligonucleótidos específicos utilizados en los experimentos de PCR, RT-PCR, secuenciación y como marcadores de tamaño	54
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la síntesis de ribosondas utilizadas en el análisis de los sRNAs endógenos de <i>M. circinelloides</i>	61
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados como sonda y como marcadores de tamaño en los experimentos tipo Northern para el análisis de los sRNAs endógenos de <i>M. circinelloides</i>	62
Tabla 9. Cebadores degenerados utilizados para amplificar el gen <i>dicer2</i> de <i>M. circinelloides</i>	76
Tabla 10. Porcentaje de identidad de la proteína Dicer2 de <i>M. circinelloides</i> con otras proteínas Dicer	77
Tabla 11. Características de los cuatro intrones presentes en la secuencia del gen <i>dicer2</i>	90
Tabla 12. Similitud de la proteína Dicer2 de <i>Mucor circinelloides</i> con otras proteínas Dicer	93
Tabla 13. Silenciamiento génico en el mutante <i>dicer2</i> ⁻	102
Tabla 14. Estabilidad del silenciamiento en el mutante <i>dicer2</i> ⁻	104
Tabla 15. Actividad OMPdescarboxilasa de la estirpe MU410 (<i>dicer2</i> ⁻ <i>pyrG</i> ⁺) y de dos de los mutantes auxótrofos para uracilo	107
Tabla 16. Reversión de la mutación <i>pyrG</i> ⁻ en las estirpes MU421 y MU422	108
Tabla 17. Tasas de reversión espontánea de las mutaciones <i>pyrG</i> ⁻	109
Tabla 18. Porcentaje de núcleos transformados en individuos <i>pyrG</i> ⁺	110
Tabla 19. Complementación de la mutación <i>dicer2</i> ⁻	111
Tabla 20. Estadísticas de los sRNAs secuenciados de las estirpes R7B, MU406 y MU410	120

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. *Mucor circinelloides*.

I. 1. 1. Características generales.

Mucor circinelloides es un hongo filamentoso que presenta una amplia distribución, encontrándose en el suelo, sobre estiércol y sobre otros sustratos orgánicos en descomposición. Pertenece a la clase *Zygomycetes*, caracterizada por tener una reproducción sexual por fusión de gametangios, presentar un micelio generalmente cenocítico (en algunas especies pueden aparecer algunos septos), y producir esporas aflageladas e inmóviles.

Se incluye en el orden *Mucorales* porque las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena en estructuras que se conocen como esporangios, y en la familia *Mucoraceae* porque el esporangio aparece separado del resto del esporangióforo por un septo llamado columela. El género *Mucor*, que da nombre a la familia y al orden, presenta esporangióforos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos.

I. 1. 2. Ciclo de vida.

M. circinelloides es un hongo heterotálico, con dos tipos sexuales (+) y (-), idénticos morfológicamente. Presenta dos ciclos de vida (**Figura 1**):

- 1) Un **ciclo asexual o vegetativo**, que permite una rápida dispersión del organismo. Se inicia con la germinación de una espora vegetativa o esporangiospora, que suele ser multinucleada. Las esporas germinan hinchándose y produciendo uno o varios tubos germinativos. Las hifas crecen por el ápice, ramificándose abundantemente para formar el micelio y jamás se anastomosan. Normalmente, las hifas carecen de tabiques transversales, por lo que el micelio es cenocítico. Las hifas que crecen ramificándose sobre el sustrato se hacen aéreas en un momento dado, originando los esporangióforos, en cuyo extremo se desarrolla el esporangio, donde maduran las esporangiosporas, que pueden iniciar otro ciclo vegetativo (Gooday, 1973).
- 2) Un **ciclo de vida sexual**, que garantiza la recombinación del material genético de las estirpes que participan en él, asegurándose así la variabilidad genética de

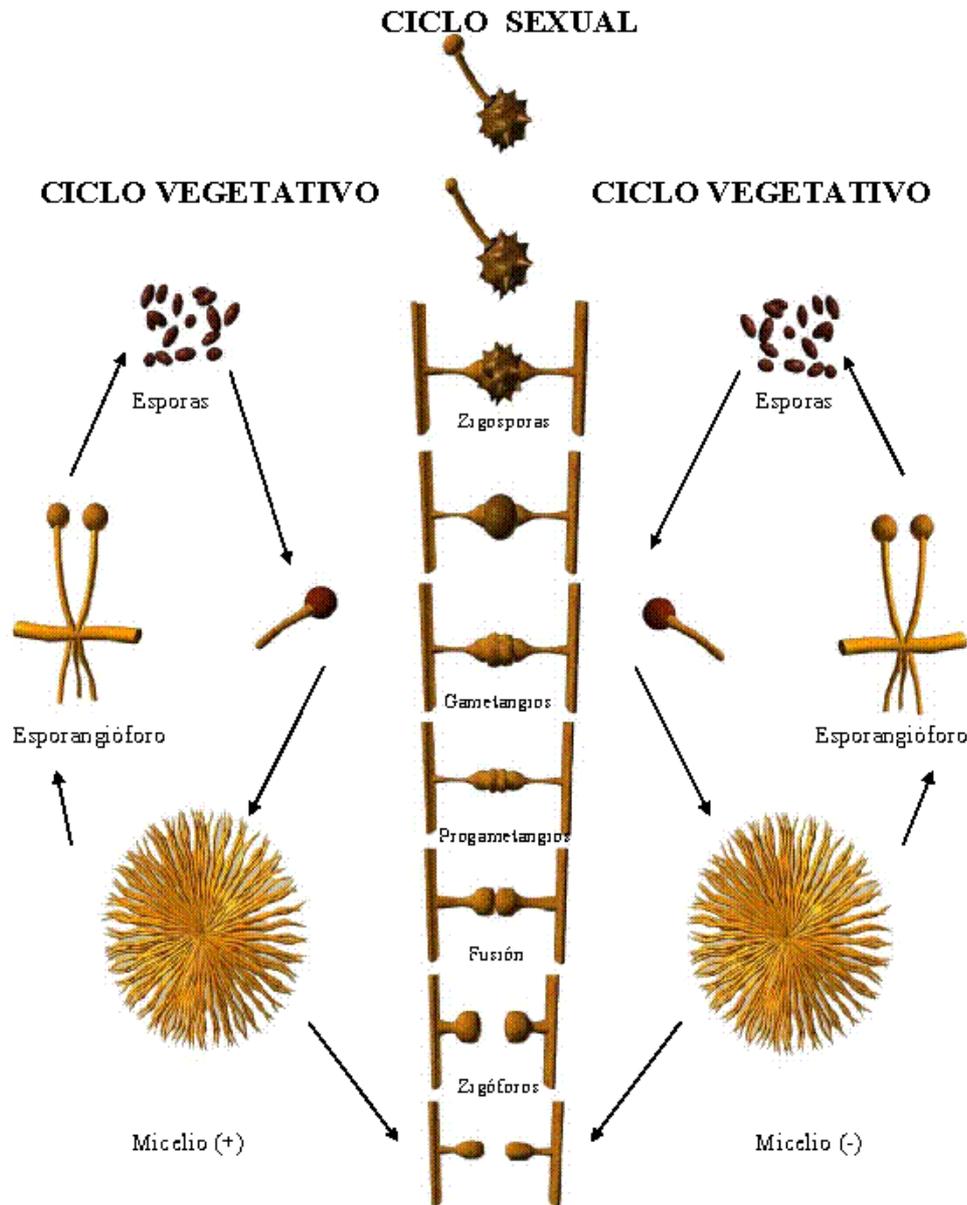


Figura 1. Ciclo de vida de *M. circinelloides*.

la especie. Tiene lugar cuando dos micelios de diferente tipo sexual crecen el uno junto al otro. La aproximación inhibe la formación de esporangióforos, induce la acumulación de β -caroteno y la diferenciación de unas hifas sexuales denominadas zigóforos. Los zigóforos se fusionan por pares, normalmente por sus ápices. La elongación de los mismos cesa una vez fusionados y se produce un hinchamiento en la zona de la fusión, apareciendo los progametangios. Los progametangios presentan un septo en posición subapical que los separa del resto de cada hifa sexual. Los dos gametangios presentan poros en la pared que

los separa. Esta pared sigue degenerando y se produce una mezcla de citoplasma de ambos gametangios por un fenómeno conocido como plasmogamia. Se forma una estructura rodeada por una pared gruesa y ornamentada en la que se depositan compuestos como la esporolenina, un polímero de carotenoides oxidados (Gooday *et al.*, 1973) y melanina, que actúan protegiendo a la zigospora. En la zigospora se produce la fusión de núcleos de distinto tipo sexual (cariogamia). La mayor parte de los núcleos englobados no se fusionan y degeneran. Sólo algunos se fusionan y de los cuatro posibles productos meióticos, sólo uno sobrevive. Tras un período de latencia, variable según la especie, la zigospora germina dando lugar a un germosporangio. Este germosporangio contiene los productos de la meiosis, las germosporas, que pueden iniciar un nuevo ciclo de crecimiento. En el caso de *M. circinelloides*, nunca se ha observado la germinación de la zigospora en laboratorio.

I. 1. 3. *Mucor* como modelo de estudio.

M. circinelloides es un organismo ideal para el estudio de distintos procesos biológicos, como la síntesis de metabolitos secundarios, respuestas a la luz, silenciamiento génico, síntesis de lípidos y dimorfismo. Contiene un genoma pequeño de 36.6 megabases (*M. circinelloides* CBS 277.49; <http://genome.jgi-psf.org/Muccil/Muccil.home.html>) y ofrece fácil manejo y rápido crecimiento en el laboratorio. Sin embargo, su principal ventaja es la existencia de un sistema eficaz de transformación genética, que permite la introducción de DNA dentro del hongo (van Heeswijk, 1984; van Heeswijk y Roncero, 1984). En este sentido, se han desarrollado distintos vectores para la introducción de DNA exógeno que complementan mutaciones auxotróficas presentes en distintas estirpes de *M. circinelloides* (Roncero *et al.*, 1989; Anaya y Roncero, 1991; Benito *et al.*, 1995). Estos vectores son autorreplicativos y requieren presión selectiva para su mantenimiento en el hongo. La capacidad de *M. circinelloides* para ser transformado también ha permitido el desarrollo de procedimientos para la integración, por recombinación homóloga, de fragmentos lineales de DNA en sus cromosomas, permitiendo la generación de mutantes nulos por reemplazamiento génico (Navarro *et al.*, 2001). Además, recientemente, se ha desarrollado una nueva estrategia para la integración de DNA exógeno en el genoma de

M. circinelloides basada en la transferencia de DNA mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Nyilasi *et al.*, 2005). Finalmente, el descubrimiento del fenómeno de silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003) ha supuesto la incorporación de una nueva herramienta molecular que permite el estudio de la función génica sin necesidad de generar mutantes nulos por reemplazamiento génico (Nicolás *et al.*, 2007), como tradicionalmente se ha venido haciendo.

El conjunto de herramientas moleculares descritas ha convertido a *M. circinelloides* en la especie, dentro de los Zygomycetes, con el mayor repertorio de recursos para analizar la función génica, a pesar de no haberse establecido las condiciones de laboratorio adecuadas para llevar a cabo cruzamientos genéticos. Esta característica, y sobre todo su posible utilización para la producción de biocarburantes, motivó que el Joint Genome Institute, dependiente del Departamento de Energía de Estados Unidos, aprobase en 2007 un proyecto liderado por nuestro grupo de investigación para secuenciar el genoma de *M. circinelloides*. La reciente disponibilidad de la secuencia del genoma ha acelerado las investigaciones en *M. circinelloides* al simplificar procedimientos experimentales que consumen mucho tiempo, como la clonación de genes, y ha abierto la posibilidad de nuevas aproximaciones experimentales basadas en técnicas de genómica, transcriptómica y proteómica.

I. 2. Silenciamiento génico mediado por RNA.

El silenciamiento génico mediado por RNA es un complejo mecanismo de regulación génica conservado en el mundo eucariota, con la notable excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que conduce a la supresión específica de la expresión génica mediada por pequeñas moléculas de RNA que inducen la destrucción del mRNA, impiden su traducción o inhiben su transcripción. Inicialmente descrito como un mecanismo de defensa molecular contra virus y transposones, en los últimos años se ha demostrado que este mecanismo también está implicado en la regulación de complejos procesos como la formación de heterocromatina, el desarrollo y la fisiología de los organismos. Además de revelar un nivel de regulación de la expresión génica hasta hace poco desconocido, el silenciamiento génico mediado por RNA se ha convertido en una herramienta fundamental en el estudio de la función de los genes, permitiendo incluso el desarrollo de nuevas disciplinas como la genómica funcional.

I. 2. 1. Generalidades.

El silenciamiento génico mediado por RNA se observó inicialmente en plantas, donde se denominó cosupresión o **silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)**, y en hongos, donde se denominó “**quelling**”. En ambos casos, la introducción de copias transgénicas de un gen con la intención de aumentar la expresión del mismo provocaba el efecto contrario, bloqueándose la expresión tanto de los transgenes como del gen endógeno homólogo (Napoli *et al.*, 1990; Romano y Macino, 1992; Cogoni *et al.*, 1996). En animales, el silenciamiento génico mediado por RNA se describió por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kemphues, 1995), donde más tarde se denominó **interferencia por RNA (RNAi)**. En este caso, la supresión de la expresión génica venía mediada por la introducción de moléculas de RNA sintetizadas *in vitro*, con sentido y antisentido, correspondientes a la secuencia de un gen endógeno. Posteriormente se demostró que el verdadero inductor del silenciamiento eran moléculas de **RNA de doble cadena (dsRNA)** generadas mediante la hibridación de las cadenas con sentido y antisentido sintetizadas *in vitro* (Fire *et al.*, 1998). La disección genética de los fenómenos de cosupresión, “quelling” e interferencia por RNA, particularmente en *Arabidopsis thaliana*, *Neurospora crassa* y *C. elegans*, así como el análisis bioquímico llevado a cabo fundamentalmente en *Drosophila melanogaster*, permitió establecer que todos estos fenómenos son manifestaciones del mismo proceso, que se conoce globalmente como silenciamiento génico mediado por RNA. Más recientemente se demostró que este mecanismo no sólo responde a la introducción de ácidos nucleicos exógenos, sino que también se induce en respuesta a la producción de moléculas de dsRNA de origen endógeno (Ketting *et al.*, 1999; Wu-Scharf *et al.*, 2000; Aravin *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002).

En el mecanismo de silenciamiento génico las moléculas de dsRNA son procesadas por una enzima con actividad ribonucleasa III (RNasaIII), denominada Dicer, en pequeñas moléculas de 21 a 27 nucleótidos que determinan la especificidad de la respuesta (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Estos **pequeños RNAs (sRNAs)** se pueden clasificar atendiendo al tipo de molécula precursora, estableciéndose dos categorías principales: los **pequeños RNAs interferentes (siRNAs)**, resultantes del procesamiento de largas moléculas de dsRNA exógenas generadas tras una infección viral o en respuesta a la presencia de transgenes y transposones; y los **microRNAs (miRNAs)**, que se originan mediante el procesamiento de

RNAs endógenos que adoptan estructuras en horquilla bicatenaria y que actúan regulando la expresión génica al promover la degradación de los mRNAs diana o la represión de su traducción (Figura 2). Ambas vías de silenciamiento génico comparten un conjunto de proteínas comunes encargadas de producir y amplificar dichos sRNAs. Al conjunto de proteínas implicadas en el silenciamiento mediado por RNA se le conoce como maquinaria del RNAi (Tabla 1) (revisado en Matzke y Birchler, 2005).

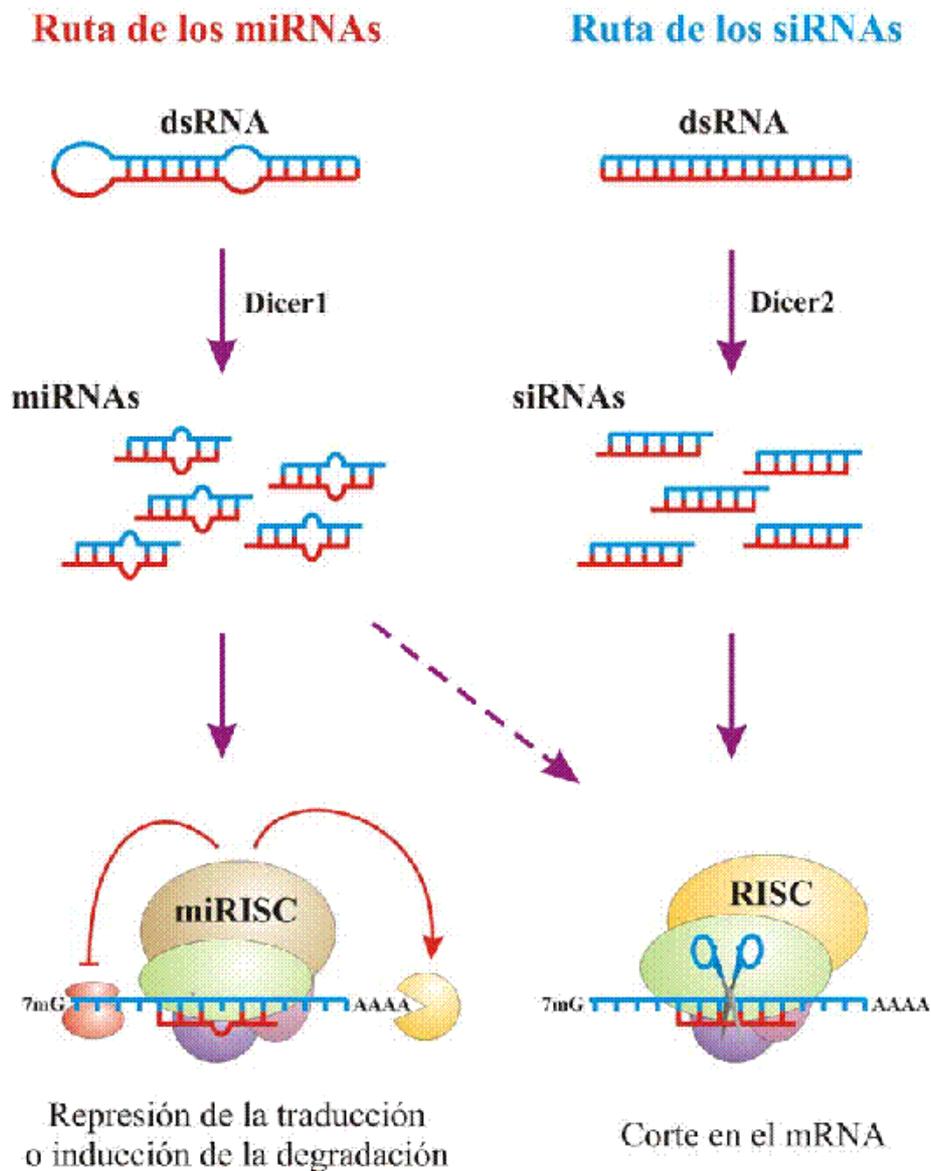


Figura 2. Esquema simplificado de las rutas de silenciamiento mediadas por miRNAs y siRNAs basado en el mecanismo de silenciamiento de *D. melanogaster*.

Proteína	Descripción
Dicer	Las proteínas de la familia Dicer son ribonucleasas tipo III que procesan el dsRNA para producir sRNAs de 21-27 nt, según los organismos. Existe una proteína Dicer en <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , dos en <i>N. crassa</i> , cuatro en <i>A. thaliana</i> , dos en <i>D. melanogaster</i> y una en <i>C. elegans</i> y en mamíferos.
Argonauta	Los miembros de esta familia son componentes esenciales de los complejos RISC, donde se unen a los sRNAs generados por Dicer para guiar al complejo hacia el mRNA. Existe una proteína Argonauta en <i>S. pombe</i> , dos en <i>N. crassa</i> , 10 en <i>A. thaliana</i> , 27 en <i>C. elegans</i> , 5 en <i>D. melanogaster</i> , 8 en ratón y 8 en humanos.
RdRP	Las polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP) sintetizan dsRNA a partir de moldes de RNA de cadena sencilla para iniciar o amplificar el proceso de silenciamiento. Existe una proteína RdRP en <i>S. pombe</i> , tres en <i>N. crassa</i> , seis en <i>A. thaliana</i> y cuatro en <i>C. elegans</i> . Sin embargo, no existe ninguna en <i>D. melanogaster</i> ni en mamíferos.

Tabla 1. Maquinaria del RNAi.

Los sRNAs (siRNAs y miRNAs) generados por la proteína Dicer se unen a los mRNAs diana en un proceso mediado por los complejos **RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA)**, que son los verdaderos efectores del silenciamiento (Hammond *et al.*, 2000). En estos complejos proteicos el componente principal es una proteína de la familia Argonauta, que utiliza la cadena antisentido de los pequeños RNAs como guía para identificar las secuencias complementarias en el mRNA diana. Dependiendo de la naturaleza de la proteína Argonauta presente en el complejo RISC y del grado de complementariedad entre los sRNAs y la secuencia diana, el resultado de esta interacción puede ser la represión de la traducción, la degradación de los mRNAs o la inducción de la formación de heterocromatina (revisado en Chapman y Carrington, 2007; Hutvagner y Simard, 2008). Por otra parte, la **polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP)** es la enzima encargada de amplificar la señal de silenciamiento (ver más adelante), además de jugar un papel esencial en la inducción del silenciamiento génico por transgenes en varios organismos (Cogoni y Macino, 1999a; Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000; Smardon *et al.*, 2000; Catalanotto *et al.*, 2002; Martens *et al.*, 2002). En organismos en los que existen varias proteínas de las familias génicas Dicer, Argonauta y RdRP, miembros específicos de cada familia participan en las distintas rutas de silenciamiento, produciendo específicamente miRNAs o siRNAs (Lee, Y.S. *et al.*, 2004;

Okamura *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004) y determinando la forma en la que se suprime la expresión génica.

Los recientes avances en las técnicas de secuenciación masiva han permitido la identificación de nuevas clases de sRNAs. Actualmente, existen tres sistemas comerciales de secuenciación masiva: el Roche 454 GS FLX Genome Analyzer, el Illumina Solexa Genome Analyzer y, más recientemente, el sistema SOLiD de Applied Biosystem (revisado en Rusk y Kiermer, 2008; Shendure y Ji, 2008). Su empleo ha permitido el descubrimiento de nuevas clases de sRNAs endógenos en plantas y animales, así como establecer perfiles de expresión a lo largo de distintas etapas del desarrollo o en distintos tejidos o condiciones de tratamiento. Entre los nuevos sRNAs identificados se encuentran los **siRNAs endógenos (endo-siRNAs)**, implicados, entre otros procesos, en el silenciamiento de transposones y regiones con repeticiones. Su biogénesis comparte elementos de las rutas de los siRNAs y los miRNAs, hasta el punto de haber sido propuestos como intermediarios evolutivos entre ambos tipos de sRNAs (revisado en Siomi y Siomi, 2009). Los nuevos avances muestran lo difusos que son los límites entre las clases de sRNAs establecidas y podrían exigir una nueva clasificación basada en la función biológica en lugar del origen.

I. 2. 2. Activación del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA.

El dsRNA es la molécula central en la activación del silenciamiento génico mediado por RNA, ya que es la molécula reconocida por la proteína Dicer para generar los sRNAs que actúan impidiendo la expresión de los genes diana. Así pues, la simple introducción de dsRNA es capaz de inducir el proceso de silenciamiento génico (Fire *et al.*, 1998). Sin embargo, existen otros activadores del mecanismo que actúan provocando la síntesis de dsRNA, quedando éste como un intermediario del proceso (**Figura 3**). Éste es el caso de moléculas de DNA exógeno como transgenes, transposones y virus que actúan como inductores en la ruta de los siRNAs. En estos casos, las moléculas de dsRNA se pueden generar como intermediarios en el mecanismo de replicación o como consecuencia de la transcripción de secuencias integradas en el genoma como repeticiones invertidas. Además, secuencias exógenas integradas en copia única también son capaces de inducir el silenciamiento generando dsRNA gracias a la actividad de la RdRP, que copia los

transcritos con sentido generados por el DNA exógeno en moléculas de dsRNA. El mecanismo por el cual la RdRP es capaz de distinguir entre los transcritos procedentes de DNA exógeno y los propios transcritos endógenos no se conoce en su totalidad. En plantas, RNAs con características aberrantes, entre las que se incluiría la falta de la cola de poli(A) o la caperuza de 7-metilguanósina, son convertidos a dsRNA por la RdRP y pasan a ser sustratos para Dicer, que a partir de ellos genera los siRNAs (revisado en Chapman y Carrington, 2007; Ghildiyal y Zamore, 2009). Evidencias recientes sugieren que algunas exonucleasas de mantenimiento compiten con las rutas de silenciamiento por los RNAs aberrantes. Los transgenes con altos niveles de expresión podrían sobrepasar el control de calidad normal, escapando a la destrucción por exonucleasas y sirviendo como sustrato a las RdRPs (Gazzani *et al.*, 2004; Gy *et al.*, 2007; revisado en Voinnet, 2008).

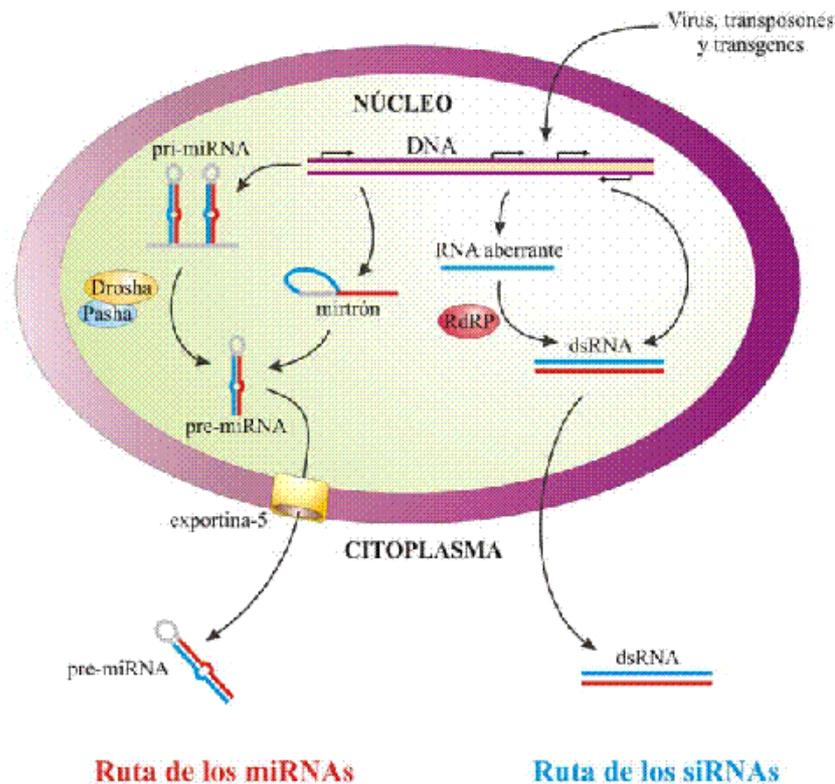


Figura 3. Activación del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA (esquema basado en las rutas de silenciamiento de *D. melanogaster*).

En el silenciamiento génico mediado por miRNAs, las moléculas de dsRNA activadoras de la ruta proceden de la transcripción regulada de secuencias endógenas. Estas secuencias, que se corresponden con tramos cortos de secuencias del gen diana, se expresan como transcritos primarios (**pri-miRNA**) que adoptan estructuras en horquilla en

el núcleo. En *D. melanogaster*, liberar un miRNA de 20-24 nt desde el pri-miRNA requiere la acción secuencial de dos endonucleasas con actividad RNasaIII, asistidas cada una de ellas por una **proteína con dos dominios de unión a dsRNA (dsRBP)**. El primer paso consiste en el procesamiento en el núcleo del pri-miRNA por la RNasa III Drosha (**Figura 3**) con la colaboración de la proteína Pasha (dsRBP), eliminándose los extremos de cadena sencilla de la horquilla (Lee, Y. *et al.*, 2003; Denli *et al.*, 2004; Landthaler *et al.*, 2004). El **precursor de miRNA (pre-miRNA)** resultante tiene un tamaño de 60-70 nt y mantiene la estructura en horquilla. Estos precursores son exportados al citoplasma por la exportina-5, donde una enzima Dicer, con ayuda de la dsRBP Loquacious (LOQS), los procesa para generar los miRNAs (Bernstein *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2003; Hutvagner *et al.*, 2001; Förstemann *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2005). En *D. melanogaster*, *C. elegans* y mamíferos, unos pocos pre-miRNAs son generados directamente por la maquinaria de procesamiento del RNA, sin necesitar la intervención de Drosha. Estos pre-miRNAs reciben el nombre de **mirtrones**, y son liberados en forma de lazo desde un mRNA precursor, como si de un intrón se tratase (**Figura 3**). La estructura en lazo es resuelta mediante acción enzimática y el resultado es un pre-miRNA que puede entrar en la ruta normal de los miRNAs (Berezikov *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007; Glazov *et al.*, 2008). En plantas, los miRNAs son generados directamente en el núcleo por la enzima nuclear Dicer1 (Kurihara y Watanabe, 2004).

I. 2. 3. Identificación de las dianas.

La estructura de los sRNAs generados por Dicer posee características que reflejan su producción mediante una enzima RNasaIII: dos cadenas complementarias de RNA de ~21 nt, cada una portando un grupo fosfato en su extremo 5' y un grupo hidroxilo en su extremo 3', emparejadas de forma que dejan dos nucleótidos libres en los extremos 3'. La enzima Dicer no se une eficientemente a los dúplices de sRNA que genera, por lo que éstos son momentáneamente liberados para ser recapturados a continuación por el **complejo de carga de RISC (RLC)**. El RLC está formado por la propia enzima Dicer y una proteína dsRBP asociada a ella (Liu *et al.*, 2006), indicando que la función de Dicer en el mecanismo de silenciamiento se extiende más allá de la producción de los siRNAs. La unión del RLC a los sRNAs sigue lo que se ha denominado "regla de asimetría"; el extremo termodinámicamente más estable se une a la dsRBP, mientras que la proteína

Dicer se une al menos estable. Posteriormente, tiene lugar la separación de las cadenas del dúplice de sRNA y la transferencia de una de ellas al complejo RISC, un proceso mediado por la interacción entre las proteínas Dicer y Argonauta (revisado en Hutvagner y Simard, 2008). La cadena transferida al complejo RISC, denominada cadena guía, es aquella que tiene unido su extremo 5' a la proteína Dicer del RLC. La cadena no incorporada se denomina cadena pasajera y es posteriormente destruida (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

La forma madura de RISC (**holo-RISC**), con la cadena guía unida a la proteína Argonauta, se encuentra lista para localizar a los mRNAs diana, que presentan secuencias complementarias a la cadena guía. La mayor parte de la energía de unión de RISC a su diana procede de las bases 2-8 contadas desde el extremo 5' de la cadena guía (Haley y Zamore, 2004; Ameres *et al.*, 2007). Por tanto, esta región es el primer determinante de la especificidad de los sRNAs, hasta el punto de que muchos miRNAs de moscas y mamíferos sólo aparecen con sus dianas en esa pequeña zona y, por tanto, pueden controlar la expresión de un gran número de genes (Lewis *et al.*, 2003; Lai, 2004; Brennecke *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

I. 2. 4. Silenciamiento génico post-transcripcional.

El modo en el que el complejo RISC lleva a cabo el silenciamiento de las dianas viene en gran medida determinado por la proteína Argonauta presente y por las proteínas asociadas a ella. Muchos organismos eucariotas expresan más de una proteína Argonauta (**Tabla 1**) pero todas ellas se unen al sRNA sin especificidad de secuencia. Al ser las proteínas efectoras, deben existir mecanismos para que determinados sRNAs se unan a las proteínas Argonauta adecuadas. Hasta donde se sabe, esto puede ocurrir por la presencia de modificaciones en el nucleótido del extremo 5' de la cadena guía, por reconocimiento de la identidad de ese nucleótido o porque la estructura del dúplice de sRNA le confiera especificidad por uno u otro RLC, que se asocie preferentemente con determinadas proteínas Argonauta (revisado en Siomi y Siomi, 2009).

En el silenciamiento génico mediado por siRNAs, la cadena guía complementa en toda su longitud con el mRNA diana. Esto permite que la proteína Argonauta corte el mRNA en el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos que están apareados con los nucleótidos 10 y 11 de la cadena guía, contados desde el extremo 5' (Elbashir *et al.*, 2001a;

Elbashir *et al.*, 2001b) (**Figura 2**). El corte del mRNA catalizado por Argonauta rinde un producto 5' con un grupo hidroxilo en el extremo 3', y un producto 3' con un grupo fosfato en su extremo 5' (Liu *et al.*, 2004; Martinez y Tuschl, 2004). El destino final de estos productos, tras ser liberados del complejo RISC, es su destrucción por enzimas endonucleolíticas y exonucleolíticas.

En la ruta de los miRNAs el silenciamiento de la expresión génica puede operar a través de tres mecanismos distintos: corte del mRNA, represión de la traducción y/o inducción de desadenilación con la consiguiente degradación del mRNA (revisado en Jackson y Standart, 2007) (**Figura 2**). En moscas y mamíferos, unos pocos miRNAs son casi completamente complementarios a sus mRNAs diana, y dirigen el corte endonucleolítico por la proteína Argonauta (Yekta *et al.*, 2004). Esta complementariedad es la norma en plantas, y el corte de la diana se considera el principal mecanismo de regulación por miRNAs en este grupo de organismos (Llave *et al.*, 2002; Rhoades *et al.*, 2002). En metazoos, sin embargo, la mayoría de los miRNAs hibridan perfectamente con sus dianas sólo a través de los nucleótidos 2 a 8 contados desde el extremo 5' del miRNA. Esto impide el corte del mRNA por la proteína Argonauta (los nucleótidos 10-11 no están apareados), por lo que muchas de estas proteínas carecen de función endonucleolítica en los citados organismos (revisado en Filipowicz *et al.*, 2008; Siomi y Siomi, 2009). En este caso, los miRNAs se unen a la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA, reprimiendo la traducción y/o dirigiendo la degradación de las dianas por mecanismos que aún no se conocen completamente (revisado en Filipowicz *et al.*, 2008).

Los sRNAs también pueden dirigir alteraciones epigenéticas en secuencias de DNA homólogas para inducir el silenciamiento transcripcional. Las dos rutas que operan de este modo son la **metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM)** y la formación de heterocromatina mediada por RNAi, que tienen como resultado la modificación covalente de citosinas del DNA o de histonas, respectivamente (revisado en Matzke y Birchler, 2005).

I. 2. 5. Silenciamiento génico transcripcional.

Como se ha descrito, la supresión de la expresión génica mediada por RNA puede ocurrir tanto por silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), dividido a su vez en las rutas de los siRNAs y de los miRNAs, como por **silenciamiento génico**

transcripcional (TGS), compartiendo ambos mecanismos elementos comunes de la maquinaria de silenciamiento mediado por RNA.

Uno de los mecanismos del TGS es la metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM), ampliamente estudiada en plantas (revisado en Zaratiegui *et al.*, 2007) y con algunas evidencias de su existencia en mamíferos (Morris *et al.*, 2004; Hawkins *et al.*, 2009). La secuencia mínima de DNA diana es de ~30 pb (Pélissier y Wassenegger, 2000), por lo que el grado de refinamiento de este mecanismo es muy alto, en comparación con la formación de heterocromatina. En plantas, el RdDM es activado por moléculas de dsRNA que dirigen la metilación de secuencias homólogas y el TGS en el caso de que la

Metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM)

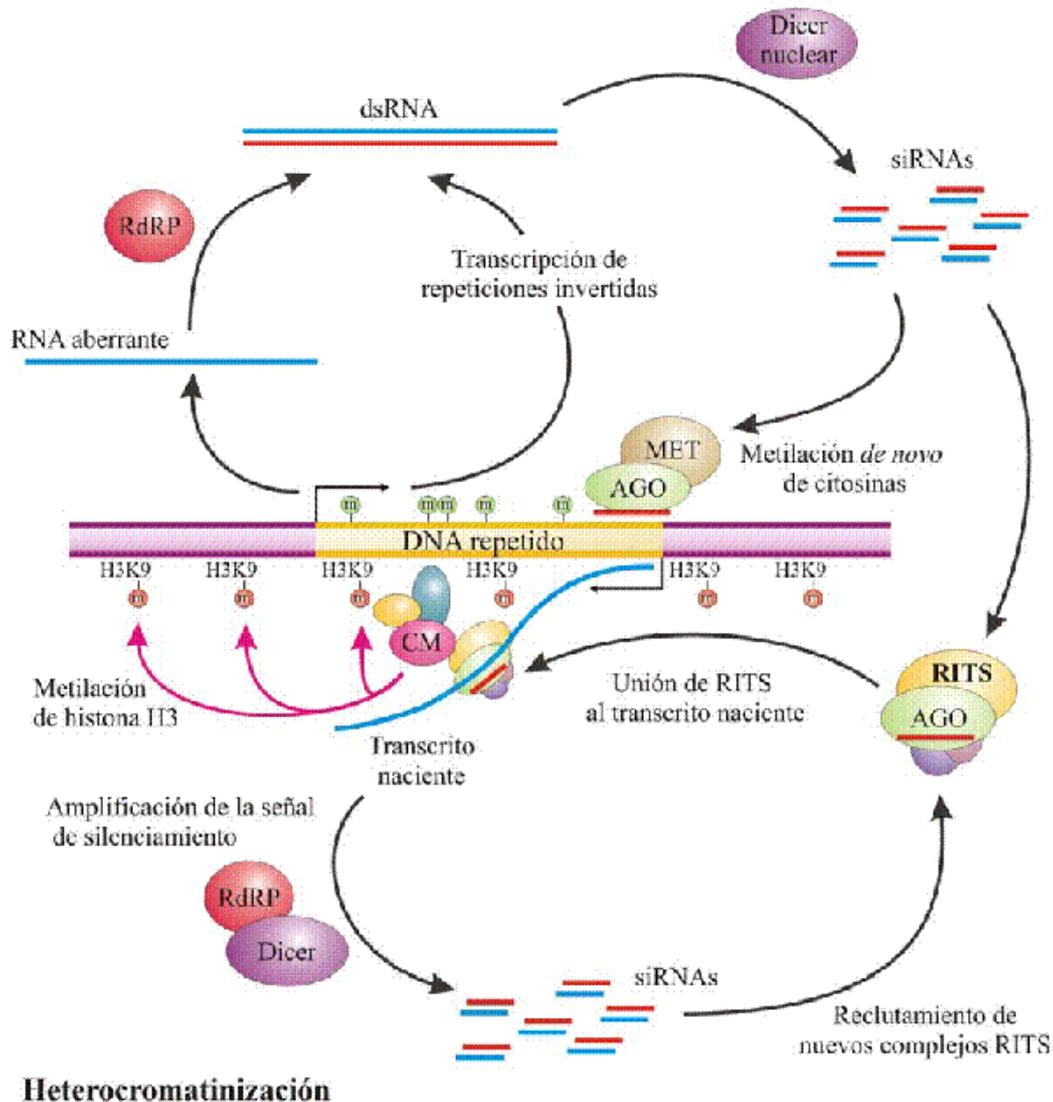


Figura 4. Rutas del silenciamiento génico transcripcional. Círculos verdes: citosinas metiladas. Círculos rojos: Histona H3 dimetilada o trimetilada en la lisina 9. MET: transferasas de metilo a citosinas del DNA. CM: Complejo Metiltransferasa de la Histona H3.

metilación afecte a secuencias promotoras (Mette *et al.*, 2000). El origen del dsRNA puede estar en la transcripción de secuencias endógenas o exógenas repetidas en orientación invertida, o en la transformación de RNAs aberrantes en moléculas de doble cadena mediante la acción de la RdRP, entre otros procesos (**Figura 4**). Una vez sintetizado, el dsRNA es procesado por una proteína Dicer nuclear que genera los sRNAs, los cuales, mediante su interacción con una proteína Argonauta unida a transferasas de metilo, dirigen la metilación *de novo* de citosinas del DNA con homología (Pélissier *et al.*, 1999).

El TGS también puede tener lugar mediante la regulación por la maquinaria del RNAi de la formación de heterocromatina, un estado asociado a la inactivación génica. Los estudios del silenciamiento por heterocromatinización de las regiones centroméricas de *S. pombe* y otros organismos sugieren que el acceso de los sRNAs al DNA sigue los pasos de lo que se ha denominado modelo del “transcrito naciente” (Bühler *et al.*, 2006). Según este modelo la transcripción de repeticiones centroméricas a partir de promotores antiparalelos generaría transcritos con capacidad para formar moléculas de dsRNA, que serían procesadas por una Dicer nuclear para generar los sRNAs (**Figura 4**). El **complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS)**, localizado en el núcleo, incorporaría las moléculas de sRNAs de cadena sencilla, que señalarían el DNA diana al interactuar con los transcritos nacientes de las repeticiones centroméricas. La interacción del complejo RITS con proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina provocaría la metilación de la histona H3 y la heterocromatinización (revisado en Moazed, 2009).

I. 2. 6. Amplificación del silenciamiento.

En la ruta de los siRNAs de hongos, plantas y algunos animales, una pequeña cantidad de la molécula inductora (dsRNA o, directamente, siRNAs) es capaz de activar eficazmente la maquinaria de silenciamiento debido a la existencia de un proceso de amplificación llevado a cabo por la enzima RdRP. Los siRNAs primarios, que son los generados por Dicer directamente a partir de las moléculas inductoras de dsRNA, son dirigidos a sus mRNAs diana mediante el complejo RISC. Utilizando como molde esos mRNA, la enzima RdRP genera nuevas moléculas de dsRNA, a partir de las cuales se originan, por distintos mecanismos, los llamados siRNAs secundarios (Sijen *et al.*, 2001; Sijen *et al.*, 2007; Pak y Fire, 2007).

En plantas, el corte del mRNA diana dirigido por los siRNAs primarios parece ser el evento que marca el reclutamiento de la enzima RdRP hacia los fragmentos 5' y 3' del mRNA cortado (**Figura 5**). La actuación de la polimerasa sobre estos fragmentos puede generar largas moléculas de dsRNA que a continuación son procesadas por la enzima Dicer para liberar los siRNAs secundarios. Aunque en algunos casos la polimerasa requiere utilizar los siRNAs primarios como cebadores para la síntesis del dsRNA, es más común que actúe de forma independiente de cebador. Como resultado de la actividad de la RdRP la producción de siRNAs secundarios se puede extender a lo largo de todo el mensajero diana, aunque la molécula transgénica que dispara el silenciamiento corresponda a una pequeña parte del mismo. Este proceso de propagación de la señal de silenciamiento a lo largo del mRNA diana se denomina silenciamiento transitivo (revisado en Chapman y Carrington, 2007; Ghildiyal y Zamore, 2009).

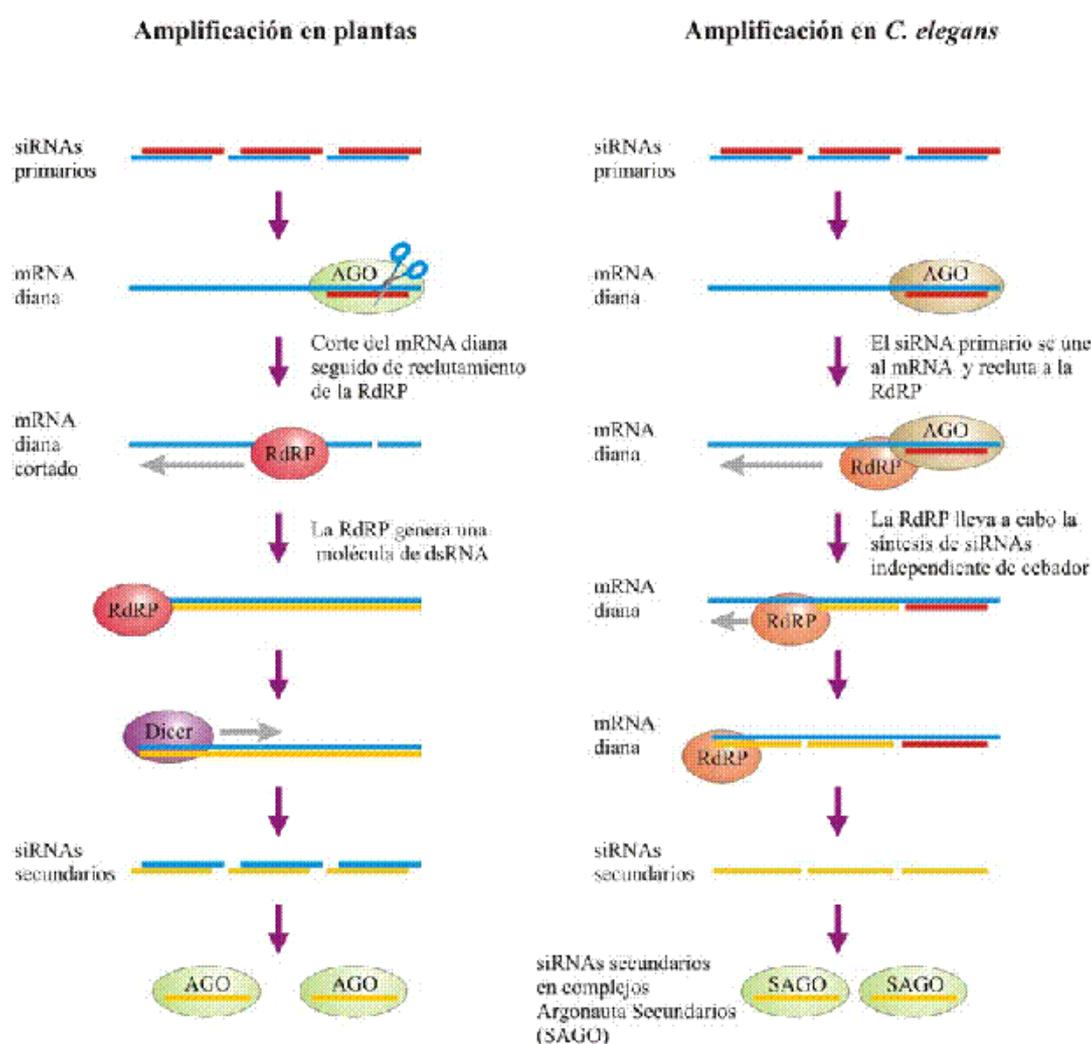


Figura 5. Mecanismos de amplificación del silenciamiento genético (basado en Ghildiyal y Zamore, 2009).

En *C. elegans*, los siRNAs primarios son amplificados en siRNAs secundarios por un mecanismo diferente (**Figura 5**). Una proteína Argonauta se une específicamente a los siRNAs primarios, guiándolos hasta sus dianas y atrayendo al mismo tiempo a la RdRP. Los siRNAs secundarios de *C. elegans* tienen todos un tamaño de ~22 nt, su orientación es antisentido respecto al mRNA diana y poseen un grupo 5' trifosfato. Estas características indican que son producidos directamente mediante la transcripción independiente de cebador llevada a cabo por la RdRP, sin que se requiera la participación de enzimas Dicer. Cómo se controla durante la síntesis la longitud de cada unidad de siRNAs es algo que aún se desconoce. Los siRNAs secundarios generados se unen específicamente a proteínas Argonauta secundarias (SAGOs), que llevan a cabo el corte del mRNA diana (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009; Siomi y Siomi, 2009). En *N. crassa* no se ha descrito la existencia de amplificación del silenciamiento, aunque una de las RdRPs puede transcribir *in vitro* pequeños RNAs de ~21 nt desde un molde de mRNA mucho más largo (Makeyev y Bamford, 2002), como ocurre en *C. elegans*.

En *C. elegans* y en hongos como *N. crassa* y *S. pombe*, algunos de los genes que codifican las RdRPs son esenciales para el silenciamiento (Cogoni y Macino 1999a; Smardon *et al.*, 2000; Sijen *et al.*, 2001; Volpe *et al.*, 2002). En plantas, la enzima RdRP es necesaria para el silenciamiento activado por RNA de cadena sencilla pero no para iniciar el silenciamiento por dsRNA (Dalmay *et al.*, 2000). En *Drosophila* y mamíferos no se han encontrado homólogos a la enzima RdRP, ni se ha podido detectar *in vivo* el proceso de extensión y amplificación del silenciamiento (Celotto y Graveley, 2002; Chiu y Rana, 2002; Roignant *et al.*, 2003). La falta de un proceso de amplificación mediado por proteínas RdRPs puede ser la razón por la que en estos organismos el silenciamiento génico es transitorio. En *Drosophila* y mamíferos el silenciamiento génico mediado por siRNAs se asemeja a la vía de los miRNAs de plantas, donde no es necesaria la presencia de proteínas RdRPs ni existe extensión del silenciamiento (Parizotto *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004).

I. 2. 7. Nuevas clases de sRNAs endógenos identificadas mediante secuenciación masiva.

El análisis de la biogénesis de los sRNAs, así como la identificación de sus dianas, se ha beneficiado de la aparición de las tecnologías de secuenciación masiva y de

sofisticados programas bioinformáticos (revisado en Mardis, 2008). Varias nuevas clases de sRNAs han sido identificadas utilizando esta aproximación, destacando entre ellas la de los RNAs que interactúan con PIWI (piRNAs) y la de los siRNAs endógenos (endo-siRNAs).

Los piRNAs se han encontrado exclusivamente en la línea germinal de *C. elegans*, *D. melanogaster*, peces y mamíferos, participando en el silenciamiento de transposones y elementos repetitivos (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Ruby *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2006; Vagin *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006; Houwing *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2008; Wang y Reinke, 2008). Su característica principal es que no tienen como precursores moléculas de dsRNA, por lo que las enzimas Dicer no están implicadas en su biogénesis. El nombre piRNA deriva de la habilidad de estas moléculas para unirse a una subfamilia de proteínas Argonata filogenéticamente relacionadas, denominada PIWI. Entre las características estructurales de los piRNAs cabe mencionar su tamaño (~24-31 nt), ligeramente superior al de los miRNAs, la tendencia a presentar uridina en su extremo 5' y la modificación del extremo 3' por la introducción de un grupo metilo (2'-O-metilo). Los estudios en moscas sugieren que los piRNAs provienen de RNAs de cadena sencilla y de gran longitud. Actualmente, el modelo que explica su biogénesis, denominado "amplificación ping-pong" (Figura 6), supone que proteínas de la familia Piwi unirían piRNAs antisentido que las guiarían hasta los mRNAs de transposones. Estas proteínas cortarían el mRNA entre los nucleótidos que están apareados con los nucleótidos 10 y 11 del piRNA, contados desde el extremo 5'. El fragmento 3' del mRNA cortado se uniría, a través de su extremo 5', a una proteína diferente de la familia Piwi, guiando el corte de una molécula de RNA

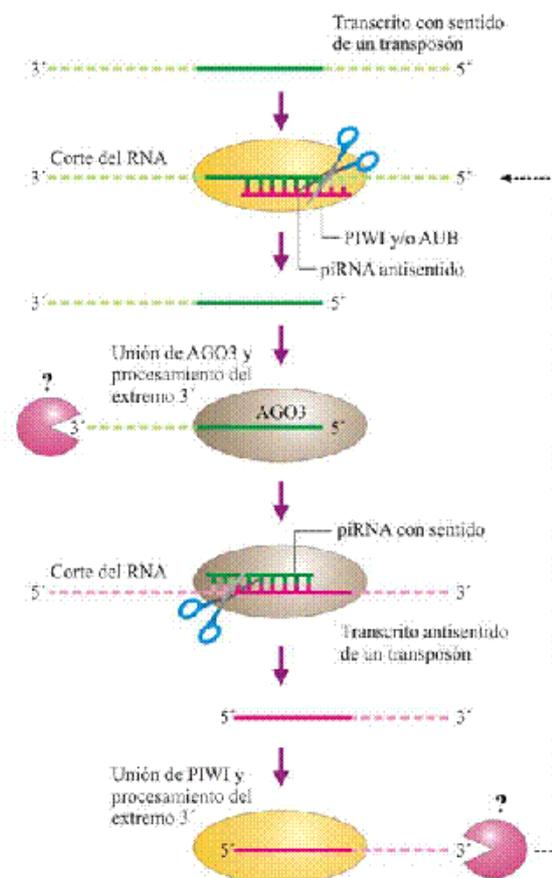


Figura 6. Modelo ping-pong para la amplificación de los piRNAs (basado en Jinek y Doudna, 2009). Piwi, AUB (Aubergine) y AGO3 son distintas proteínas de la familia Piwi.

antisentido generada a partir de la transcripción antisentido del transposón (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009). Así, en este ciclo de amplificación, los transposones serían al mismo tiempo el iniciador y la diana del mecanismo. Entre los aspectos no resueltos del modelo se encuentran la generación de los extremos 3' de los piRNAs y el reconocimiento de su orientación por parte de distintas proteínas de la familia Piwi.

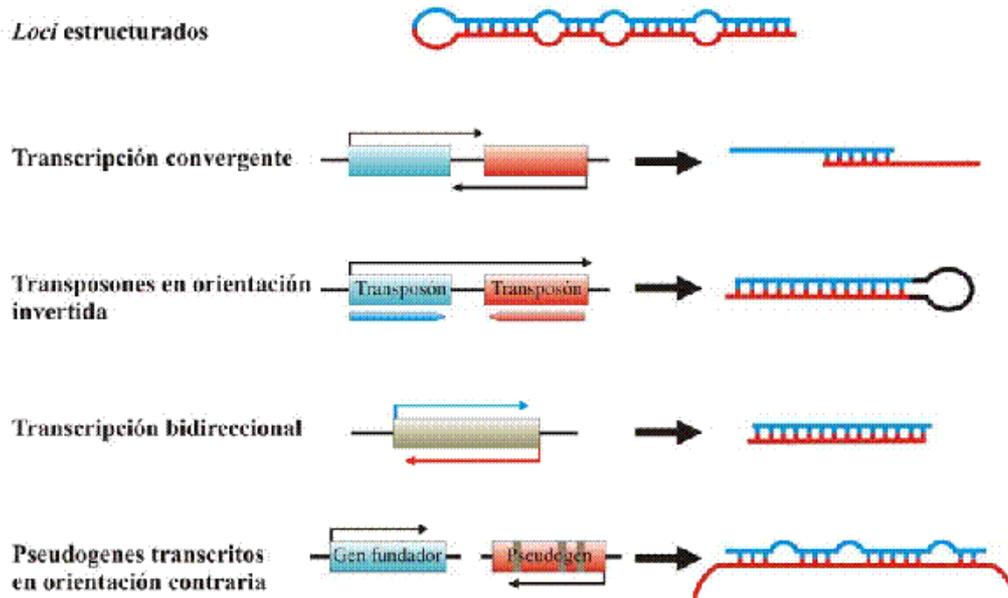


Figura 7. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras de la ruta de los endo-siRNAs (basado en Ghildiyal y Zamore, 2009). Los rectángulos marrones en el pseudogen indican regiones que presentan variaciones respecto a la secuencia del gen fundador.

Los endo-siRNAs han sido detectados en algas, plantas y animales (Ambros *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Yang y Kazazian, 2006; Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007). Derivan de moléculas de dsRNA precursoras que resultan de la transcripción de transposones adyacentes situados en orientaciones opuestas, regiones con transcripción convergente, zonas con transcripción bidireccional, pseudogenes que se transcriben en orientación contraria al gen codificante o *loci* que tienen estructuras cuya transcripción genera directamente una horquilla de dsRNA (Figura 7). En plantas se han identificado varias subfamilias de endo-siRNAs (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009): los siRNAs de actuación en cis (casRNAs), que dirigen la metilación del DNA y la heterocromatinización de *loci* con transposones y elementos repetidos; los siRNAs de actuación en trans (tasi-RNAs), que se originan a partir de

transcritos no codificantes cuyo corte inducido por miRNAs atrae a la RdRP, que genera un dsRNA que es procesado por Dicer; y los **siRNAs derivados de transcritos antisentido naturales (natsiRNAs)**, producidos en situaciones de estrés mediante el procesamiento por Dicer de una región de dsRNA originada en la zona de solapamiento de dos transcritos convergentes. La biogénesis de estos endo-siRNAs requiere todos los componentes principales de la maquinaria de silenciamiento (Dicer, Argonata y RdRP). En *D. melanogaster* se han detectado endo-siRNAs en células de la línea somática y de la línea germinal (Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008), que pueden distinguirse de los miRNAs y los piRNAs por presentar casi siempre una longitud de 21 nt, encontrarse en orientación con sentido y antisentido, tener un extremo 3' modificado, no presentar tendencia a contener uracilo en el extremo 5' y requerir la enzima Dicer para su biogénesis. Los endo-siRNAs también se han identificado en oocitos de ratón y, al igual que en *D. melanogaster*, se han relacionado con el silenciamiento de transposones (Watanabe *et al.*, 2006; Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008). No obstante, quedan por conocer algunas de sus funciones biológicas, especialmente las de aquellos endo-siRNAs que corresponden con mRNAs que codifican proteínas.

I. 2. 8. Silenciamiento génico mediado por RNA en hongos filamentosos.

En hongos filamentosos, el silenciamiento génico inducido por transgenes se describió inicialmente en el ascomiceto *N. crassa*, donde se denominó “quelling” (Romano y Macino, 1992). La contribución más relevante derivada del análisis del mecanismo de silenciamiento en este hongo fue la identificación de los primeros elementos genéticos implicados en este fenómeno, los genes *qde* (“quelling defective”) (Cogoni y Macino, 1997). El análisis genético de mutantes afectados en el silenciamiento permitió la identificación y posterior clonación de los genes *qde1* (Cogoni y Macino, 1999a), que codifica una RdRP, *qde2* (Catalanotto *et al.*, 2000), que cifra una proteína con los dominios Piwi-PAZ perteneciente a la familia de proteínas Argonata, y *qde3* (Cogoni y Macino, 1999b), que codifica una DNA helicasa RecQ, implicada en algún paso de la ruta de silenciamiento aún por determinar (revisado en Fulci y Macino, 2007). La identificación de genes homólogos en otros organismos, fundamentalmente *C. elegans* y *A. thaliana*, apoyó la idea de que la base molecular del silenciamiento génico mediado por RNA es similar en diferentes organismos. Posteriormente, se ha identificado una larga lista de

genes y proteínas implicadas en el mecanismo de silenciamiento en distintos organismos eucariotas.

Los siRNAs asociados a la actividad de la ribonucleasa Dicer están también presentes en los transformantes silenciados de *N. crassa* (Catalanotto *et al.*, 2002), poniendo de manifiesto que la actividad Dicer participa en la maquinaria de silenciamiento de este hongo. Se han identificado dos proteínas homólogas a Dicer en la secuencia genómica de *N. crassa*. El estudio funcional de estas dos proteínas mostró que tienen funciones redundantes en el mecanismo de silenciamiento, siendo necesaria la disrupción simultánea de los dos genes *dicer* para que se vea afectado dicho mecanismo (Catalanotto *et al.*, 2004). Así mismo, el estudio *in vitro* de la actividad Dicer en este organismo, medida por la capacidad de los extractos celulares para generar siRNAs de 25 nt a partir de dsRNA, demostró que sólo el doble mutante para los genes *dicer* carece de esta actividad (Catalanotto *et al.*, 2004). En otro ascomiceto, *Magnaporthe oryzae*, se han identificado también dos genes homólogos a Dicer en la secuencia genómica. Su inactivación demostró que, a diferencia de lo que ocurre en *N. crassa*, sólo el gen *dicer2* es esencial para el mecanismo de silenciamiento (Kadotani *et al.*, 2004).

Un fenómeno relacionado con el silenciamiento génico mediado por RNA identificado en *N. crassa* es el llamado **silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD)** (Shiu *et al.*, 2001). Durante el apareamiento de cromosomas homólogos que tiene lugar en la meiosis, el mecanismo de MSUD reprime la expresión de aquellos genes que sólo están presentes en uno de los cromosomas de la pareja y que por lo tanto generan una zona de DNA desapareado. El silenciamiento afecta no sólo a la copia del gen desapareado, sino a cualquier copia adicional presente en el genoma, aunque ésta se encuentre apareada (Aramayo y Metzzenberg, 1996). Los fenómenos de “quelling” y MSUD utilizan diferentes grupos de componentes de la maquinaria de silenciamiento (Shiu *et al.*, 2001; Lee, D.W. *et al.*, 2003), manteniendo dos rutas relacionadas pero separadas, de una forma similar a lo que ocurre en *D. melanogaster* con las rutas de los miRNAs y los siRNAs (revisado en Siomi y Siomi, 2009) (**Figura 8**). Un requerimiento del fenómeno de MSUD es que la secuencia desapareada sea transcrita durante la meiosis por una polimerasa de RNA dependiente de DNA aún sin identificar (Lee, D.W. *et al.*, 2004). El transcrito sería convertido en dsRNA por la RdRP Sad-1, el cual sería procesado por la proteína Dicer1. La incorporación de los siRNAs generados a un complejo RISC con la proteína Argonauta Sms-2, guiaría la degradación de los mRNAs homólogos (revisado

en Matzke y Birchler, 2005; Zaratiegui *et al.*, 2007). Recientemente, se ha identificado una nueva clase de sRNAs endógenos en *N. crassa*, los sRNAs que interaccionan con QDE-2 (qiRNAs) (Lee *et al.*, 2009), generados en respuesta a daños en el locus de DNA ribosomal repetitivo (rDNA), y que podrían actuar manteniendo la integridad de esa región genómica, evitando de alguna forma la recombinación entre las repeticiones (Cecere y Cogoni, 2009).

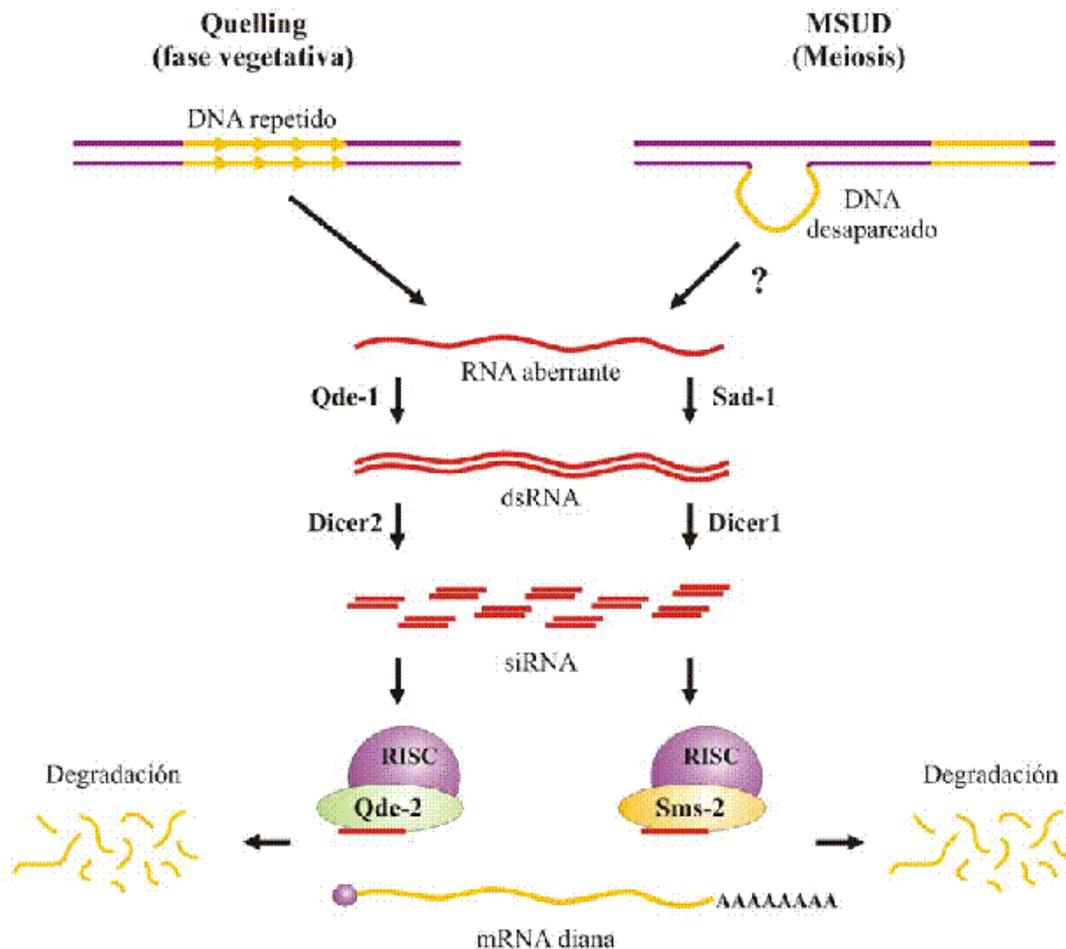


Figura 8. Mecanismos de quelling y de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) en *N. crassa* (basado en Nakayashiki, 2005). Qde-1 y Sad-1 son RdRPs. Qde-2 y Sms-2 son proteínas Argonauta.

Además de *N. crassa*, el silenciamiento génico post-transcripcional inducido por transgenes ha sido descrito en otros hongos filamentosos, como *Cladosporium fulvum* (Hamada y Spanu, 1998), *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003; Nicolás *et al.*, 2007; Nicolás *et al.*, 2009; de Haro *et al.*, 2009), *M. oryzae* (Kadotani *et al.*, 2003), *Aspergillus nidulans* (Hammond y Keller, 2005) o *Cryphonectria parasitica*, un organismo en el que el silenciamiento génico tiene una función de defensa frente a la infección por virus (Segers

et al., 2007). La búsqueda en las bases de datos genómicos permite identificar proteínas Dicer, RdRP y Argonauta en varios hongos pertenecientes a los grupos *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Zygomycota* (Nakayashiki *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos hongos filamentosos parecen carecer de la maquinaria de silenciamiento, como es el caso del basidiomiceto *Ustilago maydis*, aunque, curiosamente, dicha maquinaria sí está presente en *Ustilago hordei* (Laurie *et al.*, 2008), muy próximo evolutivamente al primero.

I. 2. 8. 1. Silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA en el cigomiceto *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003). La facilidad de manipulación de este organismo, la disponibilidad de herramientas moleculares y el hecho de que esté evolutivamente alejado de los ascomicetos *N. crassa* y *M. oryzae*, en los que se ha estudiado con más detalle el mecanismo de silenciamiento, han

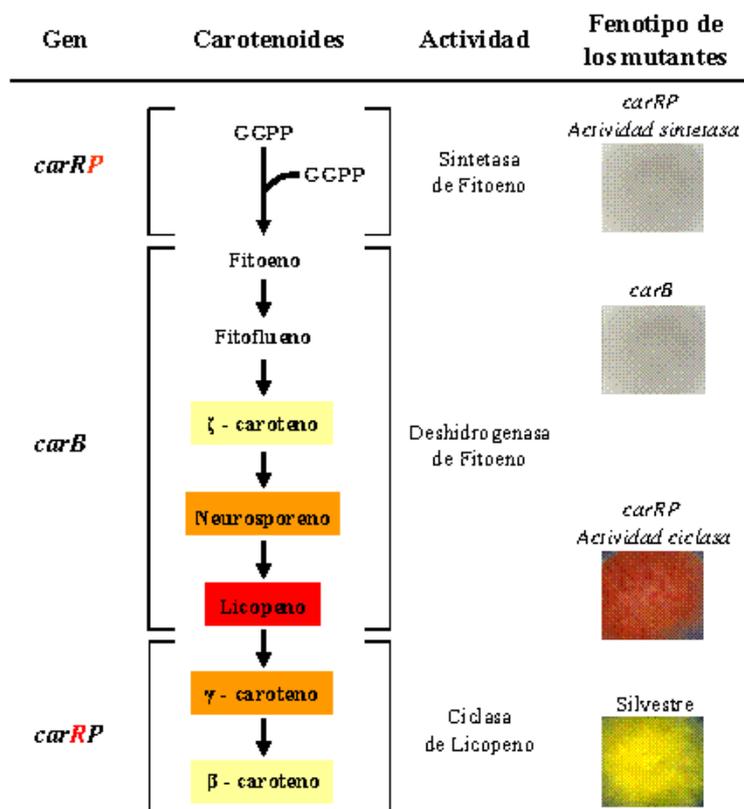


Figura 9. Ruta de biosíntesis de carotenoides en *M. circinelloides*. El gen bifuncional *carRP* es responsable de la actividad sintetasa de fitoeno, que genera el primer caroteno de la ruta a partir de la condensación de dos moléculas de geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno son llevadas a cabo por el producto del gen *carB*. La síntesis de β-caroteno se completa con el concurso de la actividad ciclaza de licopeno, presente en la enzima bifuncional CarRP. A la derecha se muestra el fenotipo de color de mutantes afectados en las distintas actividades de la ruta de síntesis de β-caroteno.

convertido a *M. circinelloides* en un referente dentro del grupo de los hongos filamentosos para estudios de silenciamiento génico. Para analizar el silenciamiento inducido por transgenes en *M. circinelloides* se ha utilizado como chivato un gen cuya falta de función da lugar a un fenotipo fácilmente identificable. En concreto, se ha empleado el gen *carB*, que cifra la enzima deshidrogenasa de fitoeno, implicada en la síntesis de carotenos coloreados (Figura 9). La síntesis de carotenos en *M. circinelloides* es inducida por la luz. Las estirpes silvestres muestran color amarillo intenso en condiciones de iluminación debido a la acumulación de β -caroteno, mientras que la falta de función del gen *carB* da lugar a un fenotipo albino tanto en oscuridad como en luz, acumulándose en estas estirpes el precursor no coloreado fitoeno. Así, la utilización del gen *carB* como gen chivato permite detectar el silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003), ya que la degradación del mensajero inducida por la introducción de copias transgénicas del gen *carB* conduce a la aparición del fenotipo albino, fácilmente distinguible del fenotipo silvestre.

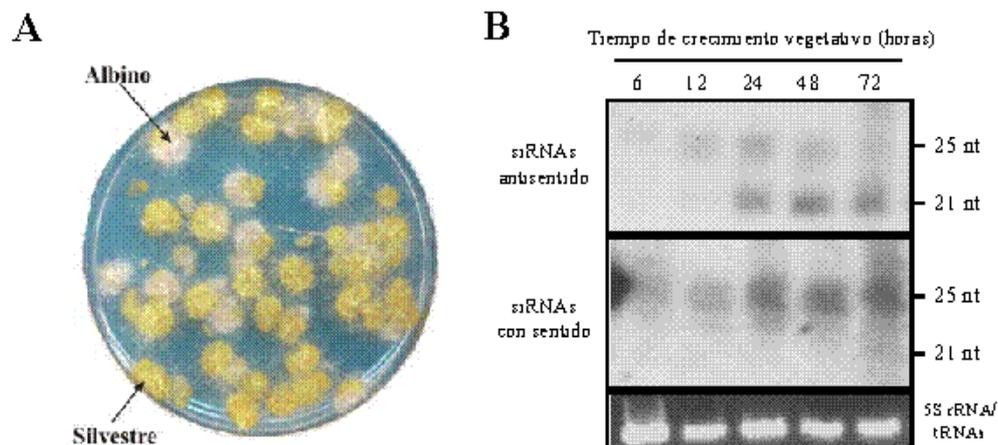


Figura 10. Silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*. (A) Silenciamiento de la expresión del gen *carB* (fenotipo albino) inducido por la introducción de transgenes con sentido. (B) Acumulación diferencial durante el crecimiento vegetativo de los siRNAs antisentido y con sentido en estirpes silenciadas (Nicolás *et al.*, 2003).

Una de las características singulares del silenciamiento génico en *M. circinelloides* es su inducción por transgenes presentes en plásmidos autorreplicativos que, al no integrarse en el genoma, no ven afectada su expresión por efectos de posición o secuencias reguladoras del huésped. Así, la introducción en la estirpe silvestre de plásmidos autorreplicativos portadores de copias silvestres o truncadas del gen *carB* causa el silenciamiento de dicho gen en el 3-10 % de los transformantes (Nicolás *et al.*, 2003)

(Figura 10A). La frecuencia de silenciamiento puede aumentar hasta el 85 % cuando se introducen transgenes con repeticiones invertidas, que al transcribirse generan directamente estructuras de RNA en horquilla (de Haro *et al.*, 2009). El fenotipo albino de los transformantes es resultado de la degradación específica del mRNA maduro del gen *carB*, indicando que el silenciamiento observado tiene lugar a nivel post-transcripcional (Nicolás *et al.*, 2003).

En *M. circinelloides*, los transformantes silenciados por la introducción de transgenes acumulan moléculas de siRNAs, con sentido y antisentido, correspondientes a secuencias del gen *carB*. El silenciamiento génico en *M. circinelloides* está asociado a dos clases distintas de siRNA antisentido, de 21-nt y 25-nt, si bien sólo se detectan siRNAs con sentido de 25-nt (Figura 10B), algo que contrasta con otros sistemas en los que los RNAs con sentido y antisentido presentan el mismo tamaño. De forma sorprendente, las dos clases de siRNAs antisentido se acumulan diferencialmente durante el crecimiento vegetativo de los transformantes silenciados, lo que constituye la característica más sobresaliente del silenciamiento génico en *M. circinelloides*.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha realizado un esfuerzo notable para diseccionar la ruta de los siRNAs en *M. circinelloides* (Figura 11), identificando los genes implicados y generando mutantes afectados en cada uno de ellos. Así, hemos identificado un gen *dicer1* que parece estar implicado en la regulación de funciones celulares endógenas, ya que los mutantes afectados en este gen presentan alteraciones en el crecimiento y la morfología de las hifas (Nicolás *et al.*, 2007). Sin embargo, los mutantes *dicer1* son capaces de silenciar la expresión génica en respuesta a la introducción de transgenes y producir las dos clases de siRNAs, de 21 y 25 nt, con el patrón de acumulación característico observado en la estirpe silvestre (Nicolás *et al.*, 2007), lo que demuestra que el gen *dicer1* no es esencial en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes. No obstante, no podemos descartar que *dicer1* participe en la ruta de los siRNAs, teniendo en este caso una función redundante con otros genes *dicer* que pudieran estar presentes en el genoma del hongo. También hemos identificado tres genes *argonauta*, *ago-1*, *ago-2* y *ago-3*. Sólo los mutantes en el gen *ago-1* están afectados en el silenciamiento inducido por transgenes, mientras que los mutantes nulos en el gen *ago-2* presentan deficiencias en la esporulación. No se ha demostrado aún ninguna función para el gen *ago-3* en el ciclo vegetativo (resultados no publicados de nuestro laboratorio).

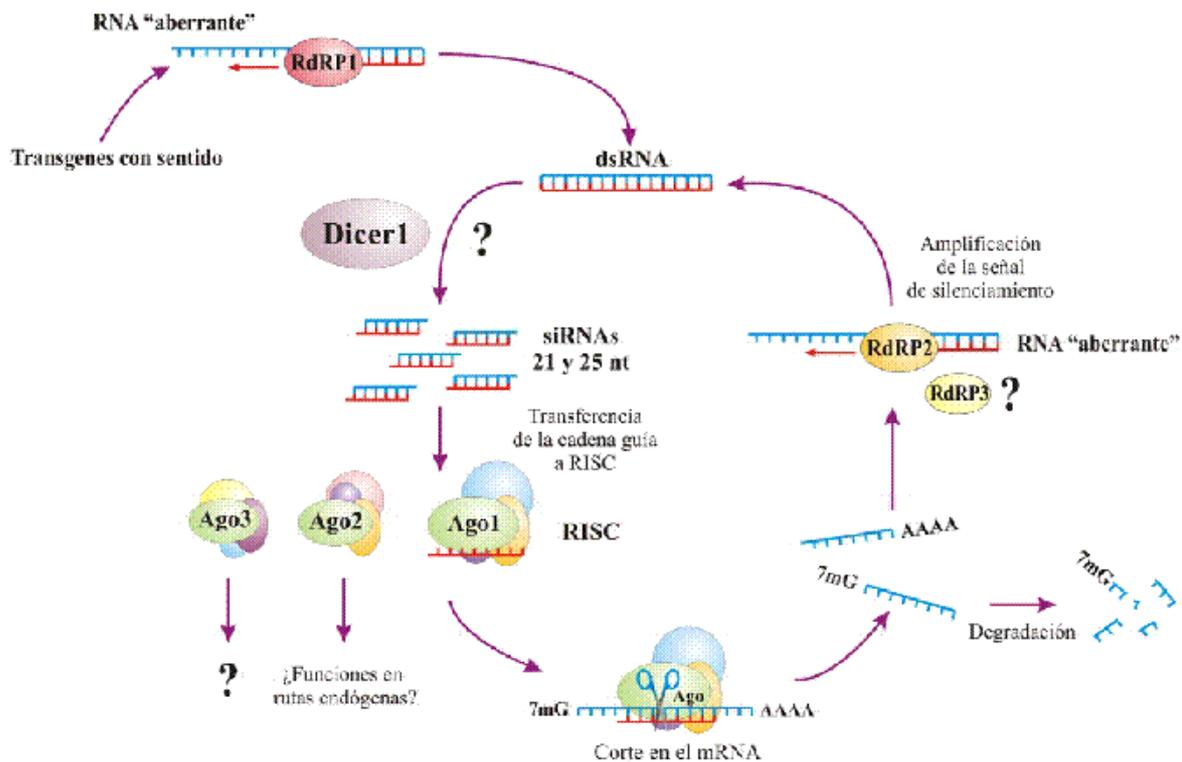


Figura 11. Modelo del mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en *M. circinelloides*.

Nuestro grupo también ha identificado y caracterizado tres genes que cifran RdRPs, *rdrp1*, *rdrp2* y *rdrp3*. La enzima RdRP1 se localiza en el núcleo y es esencial para la producción de moléculas de dsRNA a partir de transgenes con sentido, pero no parece tener un papel relevante en el proceso de amplificación del silenciamiento. La existencia de un proceso de amplificación de silenciamiento en *M. circinelloides* se demostró tras la identificación de siRNAs secundarios correspondientes a secuencias localizadas aguas abajo de la molécula inductora (Nicolás *et al.*, 2003). Las características de estas moléculas de siRNAs secundarios sugieren que las RdRPs implicadas en la amplificación del silenciamiento reconocen como aberrantes los fragmentos de los mRNAs que carecen de la caperuza de 7-metilguanosina, convirtiéndolos en dsRNAs que serán procesados por una enzima Dicer. La enzima citoplasmática RdRP2 parece ser la principal responsable de llevar a cabo el proceso de amplificación, si bien debe existir cierta redundancia funcional entre las RdRPs, pues los mutantes *rdrp2⁻*, aunque severamente afectados en su capacidad para silenciar, mantienen un cierto nivel de respuesta a la introducción de transgenes. En cuanto a la enzima RdRP3, aún se desconoce cuál es su posible función en el mecanismo de silenciamiento (resultados no publicados de nuestro laboratorio). Estos y otros datos sugieren la existencia de una especialización de los distintos miembros de las tres familias

génicas citadas, que podrían participar en distintas rutas de silenciamiento. Algunas proteínas estarían implicadas en la producción de los siRNAs a partir de transgenes y otras participarían en rutas de silenciamiento aún no identificadas que podrían controlar funciones endógenas.

I. 3. Las enzimas Dicer.

La proteína Dicer, cifrada por el gen *dicer*, es un componente central del mecanismo de silenciamiento mediado por RNA sobre el que convergen diferentes vías de silenciamiento. La proteína Dicer es una enzima del tipo RNasaIII, una familia de endorribonucleasas que cortan específicamente dsRNA generando dúplices cuyas cadenas presentan un grupo fosfato en el extremo 5' y un extremo 3' con dos nucleótidos protuberantes. Una clasificación reciente propuesta por Jaskiewicz y Filipowicz (2008) divide los ortólogos de la familia RNasaIII en dos clases: la clase I, que comprendería enzimas de bacterias y algunos hongos que contienen un único dominio RNasaIII y un **dominio de unión a dsRNA (dsRBD)**, y la clase II, que incluiría las proteínas Dicer y Drosha, las cuales presentan dos dominios catalíticos RNasaIII (**Figura 12**). Las proteínas Drosha generalmente contienen, además de los dominios propios de la clase II, una región variable N-terminal con motivos ricos en prolina y/o arginina/serina. La composición de dominios adicionales en las proteínas Dicer es muy variable, pudiendo aparecer dominios dsRBD, ATPasa/Helicasa, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) y DUF283 (dominio con posible función de unión a dsRNA, específico de las proteínas Dicer).

CLASE I

RNasaIII bacteriana 

CLASE II

Drosha Humana 

Dicer Humana 

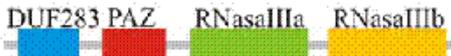
Dicer *Giardia intestinalis* 

Figura 12. Representación esquemática de la estructura de dominios de distintas enzimas de la familia RNasaIII.

En hongos, plantas y metazoos, la proteína Dicer contiene generalmente seis dominios estructurales diferentes: dos dominios RNasaIII (RIIIa y RIIIb), un dominio C-terminal dsRBD, un dominio amino terminal ATPasa/helicasa, un dominio DUF283 y un dominio PAZ (**Figura 12**). Otros grupos de eucariotas presentan con frecuencia proteínas Dicer con una organización de dominios menos compleja. Aunque la secuencia de las proteínas Dicer está muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, el número de proteínas Dicer presentes en distintos organismos, así como su implicación en una u otra ruta de silenciamiento, varía considerablemente (**Tabla 2**). En *C. elegans* y mamíferos aparece un único gen *dicer*, que procesa tanto precursores de los miRNA como las largas moléculas de dsRNA derivadas de transgenes y otras fuentes (revisado en Meister y Tuschl, 2005). En *D. melanogaster* hay dos proteínas Dicer; Dicer1 está implicada preferentemente en la ruta de los miRNAs, mientras que Dicer2 procesa precursores de dsRNA en moléculas de siRNAs (Lee, Y.S. *et al.*, 2004). Por otro lado, en *A. thaliana* se han identificado cuatro proteínas Dicer, las cuales están implicadas en procesar dsRNA de distintos orígenes. Dicer1 procesa precursores de miRNAs (Park *et al.*, 2002; Kurihara y Watanabe, 2004), Dicer2 se requiere para producir siRNAs asociados a la defensa antiviral (Xie *et al.*, 2004) y participa en la generación de los natsiRNAs junto con Dicer1 (Borsani

Organismo	Proteína	Ruta silenciamiento
Mamíferos	DICER1	miRNAs, siRNAs, endo-siRNAs
<i>Drosophila melanogaster</i>	DCR-1	miRNAs
	DCR-2	siRNAs, endo-siRNAs
<i>Caenorhabditis elegans</i>	DCR-1	miRNAs, siRNAs
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DCL1	natsiRNAs, miRNAs
	DCL2	natsiRNAs, siRNAs defensa antiviral
	DCL3	casiRNAs
	DCL4	tasiRNAs
<i>Neurospora crassa</i>	DCL1	siRNAs, MSUD, qiRNAs
	DCL2	siRNAs, qiRNAs
<i>Cryphonectria parasitica</i>	DCL-1	¿siRNAs?
	DCL-2	siRNAs defensa antiviral, ¿otras rutas?

Tabla 2. Rutas de silenciamiento asociadas a las proteínas Dicer de distintos organismos.

et al., 2005), Dicer3 está implicada en la producción de siRNAs que actúan en *cis*- para dirigir la modificación de la cromatina, los casiRNAs (Xie *et al.*, 2004), y Dicer4 genera, a partir de RNAs no codificantes, siRNAs endógenos de actuación en *trans*- (tasiRNAs) que regulan la expresión de los mRNAs diana (Gascioli *et al.*, 2005). La especificidad de cada una de estas proteínas Dicer por los distintos sustratos viene determinada, probablemente, por su interacción con distintos tipos de proteínas con dominios de unión a dsRNA.

En hongos, el número de genes *dicer* es muy variable (revisado en Nakayashiki y Nguyen, 2008), pudiéndose encontrar casos como el de *Puccinia graminis*, con cinco genes *dicer*, o el de la levadura *S. cerevisiae* que, aunque carece de los elementos típicos de la maquinaria de silenciamiento, éste se puede reconstituir mediante la introducción de los genes *dicer* y *argonata* de una especie filogenéticamente próxima, *S. castellii* (Drinnenberg *et al.*, 2009). En los ascomicetos *N. crassa* y *M. oryzae*, en los que se ha estudiado con detalle el mecanismo de silenciamiento, hay dos genes *dicer*. Como se ha comentado, en *N. crassa* los dos genes *dicer* tienen funciones redundantes en la producción de siRNAs, aunque *dcl-2* es el principal implicado en su generación (Catalanotto *et al.*, 2004) mientras que *dcl-1* se ha relacionado con el mecanismo de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) (Shiu *et al.*, 2001; Lee, D.W. *et al.*, 2003; Alexander *et al.*, 2008). En *M. oryzae* sólo uno de los genes *dicer*, *MDL-2* (*Magnaporthe* Dicer-like-2), está implicado en la formación de los siRNA, desconociéndose el papel que cumple el gen *MDL-1* (*Magnaporthe* Dicer-like-1).

I. 3. 1. Mecanismo de procesamiento del dsRNA por Dicer.

Se ha propuesto para la ribonucleasa Dicer un modelo similar al de las RNAsas tipo III de bacterias, que forman homodímeros con dos centros catalíticos independientes que cortarían cada una de las dos cadenas del dsRNA (Blaszczyk *et al.*, 2001). En el caso de Dicer se produciría una dimerización intramolecular de los dos dominios RNasaIII de la misma molécula Dicer, generando un complejo de procesamiento con dos sitios catalíticos independientes que cortarían las cadenas del dsRNA (Zhang *et al.*, 2004), (**Figura 13A**). El mecanismo de actuación ha sido estudiado principalmente en la enzima Dicer humana recombinante purificada de células de insectos. La actividad ribonucleasa de esta enzima requiere la presencia de iones Mg^{2+} en los centros catalíticos, pudiendo ser reemplazados en parte por iones Mn^{2+} o Co^{2+} (Zhang *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002a). El

procesamiento del dsRNA se inicia preferentemente a partir de los extremos del sustrato, aunque el corte interno también es posible, si bien con una eficacia mucho menor (Zhang *et al.*, 2002). La actividad de la enzima Dicer humana es independiente de la presencia de ATP, no habiéndose demostrado hasta el momento que esta proteína posea actividad ATPasa *in vitro* (Zhang *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002a), aunque sí se ha detectado la capacidad de hidrolizar ATP de un fragmento recombinante ATPasa/Helicasa (Obi, 2009). La función del dominio ATPasa/helicasa es desconocida, pero resulta esencial para la actividad *in vivo* de la proteína Dicer-2 de *D. melanogaster* (Lee, Y.S. *et al.*, 2004).

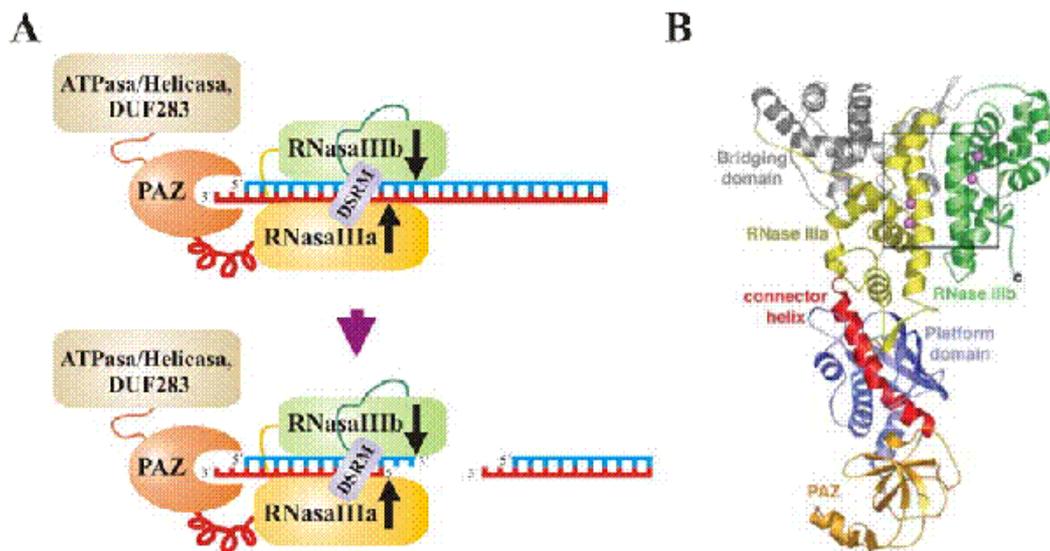


Figura 13. Disposición de los dominios de la proteína Dicer. (A) Mecanismo de acción de la proteína Dicer (Zhang *et al.*, 2004). (B) Estructura cristalográfica de la proteína Dicer de *G. intestinalis* (MacRae *et al.*, 2006).

A partir de la obtención de la estructura cristalográfica de la proteína Dicer del eucariota unicelular *Giardia intestinalis* se ha propuesto que la capacidad de las enzimas Dicer para producir fragmentos de dsRNA de un tamaño determinado se debe a una organización concreta del dominio PAZ y los dominios RNaseIII (MacRae *et al.*, 2006). El dímero intramolecular formado por los dominios RNaseIII queda conectado al dominio PAZ por una estructura en hélice, reforzada por el fragmento N-terminal con el dominio DUF283 de la proteína. Sobre esa región conectora descansaría el dsRNA, estableciendo uniones electrostáticas con residuos cargados positivamente (MacRae *et al.*, 2007) (Figura 13B). El dominio PAZ se une al extremo 3' protuberante de la molécula de dsRNA, siendo la distancia que separa esta región del dominio catalítico de 65 Å, lo que corresponde a la longitud de 25 nt de los dúplex de RNA generados en *G. intestinalis*.

Así, la arquitectura de Dicer sugiere que esta enzima funciona como una “regla molecular”, cortando el dsRNA a una distancia fija a partir del extremo unido al dominio PAZ. El principal determinante del tamaño de los siRNA sería por tanto la longitud de la hélice conectora, cuya escasa conservación explicaría las diferencias de tamaño observadas para los siRNAs en distintos organismos. La proteína Dicer de *G. intestinalis* sólo contiene los dominios DUF283, PAZ y RNasaIII (Figura 12), por lo que será necesario comprobar cómo el resto de dominios presentes en otras proteínas Dicer influyen en el mecanismo de corte.

I. 3. 2. Proteínas que interaccionan con Dicer.

Aunque las proteínas Dicer recombinantes son capaces de actuar como endorribonucleasas específicas de dsRNA *in vitro*, en las células generalmente funcionan en asociación con otras proteínas formando complejos multiproteicos. El corte de los pre-miRNAs y de los dsRNAs parece estar catalizado en todos los casos por una proteína Dicer asociada a una proteína dsRBP que actúa como cofactor. En *D. melanogaster*, las enzimas Dicer-1 y Dicer-2 se asocian con las dsRBP LOQS y R2D2, respectivamente (Liu *et al.*, 2003; Forstemann *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2005). El complejo Dicer-2/R2D2 dirige la incorporación específica de la cadena guía en el complejo RISC en la ruta de los siRNAs (Tomari *et al.*, 2004). Por otro lado, la eliminación de LOQS provoca la acumulación de pre-miRNAs (Forstemann *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2005), demostrando su papel esencial para el procesamiento adecuado de estos sustratos *in vivo* por Dicer-1. En células humanas, la eliminación de la dsRBP PACT provoca una reducción en los niveles de miRNAs maduros, probablemente porque esta proteína participe en la transferencia de la cadena guía al complejo RISC y en su ausencia se produzca la degradación de estas cadenas (Lee *et al.*, 2006). En plantas, los miembros de la familia de proteínas HYL/DRB han sido identificados como dsRBP que asisten a las enzimas Dicer (Hiraguri *et al.*, 2005). Se ha propuesto que las proteínas HYL/DRB se asocian a Dicer para dirigir los sRNAs generados a los complejos efectores apropiados (Margis *et al.*, 2006).

El otro gran grupo de proteínas que se asocian a Dicer es el de las proteínas Argonauta. La interacción entre ambas proteínas parece darse entre el dominio RNasaIII de la enzima Dicer y una subregión del dominio C-terminal Piwi de la proteína Argonauta (Tahbaz *et al.*, 2004). También se ha demostrado la interacción de Dicer con proteínas

relacionadas con helicasas de RNA (Tabara *et al.*, 2002), fosfatasas de RNA (Duchaine *et al.*, 2006), proteínas de unión a mRNA (Jin *et al.*, 2004) o proteínas asociadas a los cuerpos-P (Kotaja *et al.*, 2006), implicados en la degradación de mRNAs. Todas estas interacciones parecen indicar que las enzimas Dicer deben participar en numerosos complejos multiproteicos implicados en distintos procesos celulares.

I. 4. Objetivos de este trabajo.

Como se ha comentado, el silenciamiento en *M. circinelloides* está asociado a la presencia de moléculas de siRNAs antisentido y con sentido, de 21 y 25 nt, que se acumulan diferencialmente durante el crecimiento vegetativo del hongo (Nicolás *et al.*, 2003). El aislamiento del gen *dicer1* de *M. circinelloides*, el primer gen de esta familia identificado en la clase *Zygomycetes*, y el análisis fenotípico de los mutantes afectados en el mismo, permitieron determinar que su papel no es esencial para la biogénesis de las dos clases de siRNAs derivados de la introducción de transgenes (Nicolás *et al.*, 2007). Estos resultados implican que debe existir al menos un gen *dicer* adicional en *M. circinelloides*, responsable de la producción de los siRNAs asociados al silenciamiento génico. Este nuevo gen podría ser el único implicado en el mecanismo de silenciamiento, como ocurre en *M. oryzae* (Kadotani *et al.*, 2004) o tener funciones redundantes con *dicer1*, como sucede en *N. crassa* (Catalanotto *et al.*, 2004).

Con estos antecedentes, nos planteamos como objetivo global de este trabajo identificar nuevos genes *dicer* y averiguar el papel que desempeñan en el silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*. Este objetivo global se concreta en los siguientes objetivos particulares:

1. Clonación y caracterización del segundo gen *dicer* de *M. circinelloides*.
2. Obtención de estirpes mutantes en el gen *dicer2* y análisis de su fenotipo, estudiando su capacidad para generar las distintas clases de siRNAs.
3. Estudio de la actividad *in vitro* de las enzimas Dicer de *M. circinelloides*.
4. Análisis del papel que juegan los genes *dicer* en la producción de siRNAs endógenos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados.

Las estirpes de *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 3**. Todas las estirpes con el prefijo MU han sido obtenidas en la Universidad de Murcia y derivan de la estirpe R7B, silvestre para la carotenogénesis y auxótrofa para la leucina, obtenida mediante mutagénesis química a partir de la estirpe silvestre CBS 277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b; Schipper, 1976).

La estirpe MU241 se generó mediante sustitución del gen *leuA* mutado de la estirpe R7B por una copia silvestre de dicho gen. La estirpe MU402 se generó por mutagénesis química a partir de la estirpe R7B. La estirpe MU406 se generó por sustitución del gen *dicer1* de la estirpe MU402 por una copia silvestre del gen *pyrG* de *M. circinelloides*. La estirpe MU410 se generó por sustitución del gen *dicer2* de la estirpe MU402 por una copia silvestre del gen *pyrG*. La estirpe MU411 se generó por sustitución del gen *dicer1* de la estirpe MU410 por una copia silvestre del gen *leuA* de *M. circinelloides*.

Estirpes	Genotipo	Fenotipo	Origen o referencia
R7B	<i>leuA</i>	Leu ⁻ , Ura ⁺	Dra. M. I. G. Roncero, U. de Córdoba
MU241	<i>leuA</i> ⁺	Leu ⁺ , Ura ⁺	Silva <i>et al.</i> , 2008
MU402	<i>leuA</i> ⁻ <i>pyrG</i>	Leu ⁻ , Ura ⁻	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
MU406	<i>leuA</i> ⁻ <i>dicer1</i> :: <i>pyrG</i>	Leu ⁻ , Ura ⁺	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
MU410	<i>leuA</i> ⁻ <i>dicer2</i> :: <i>pyrG</i>	Leu ⁻ , Ura ⁺	Este trabajo
MU411	<i>dicer1</i> :: <i>leuA</i> , <i>dicer2</i> :: <i>pyrG</i>	Leu ⁺ , Ura ⁺	Este trabajo
MU421	<i>leuA</i> ⁻ <i>pyrG</i> <i>dicer2</i>	Leu ⁻ , Ura ⁻	Este trabajo
MU422	<i>leuA</i> ⁻ <i>pyrG</i> <i>dicer2</i>	Leu ⁻ , Ura ⁻	Este trabajo

Tabla 3. Estirpes de *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo. Se indica el fenotipo para los marcadores auxotróficos utilizados en los experimentos de transformación.

En la **Tabla 4** se muestran las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas, su genotipo y el origen o referencia.

Estirpes	Genotipo	Origen o referencia
DH5 α	F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</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
LE392	F ⁻ , <i>hsdR514</i> (r _k ⁻ , m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> , λ .	Promega
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 y Moffat, 1986

Tabla 4. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

La estirpe DH5 α se utilizó en los experimentos de clonación de plásmidos bacterianos. Sus características más significativas son:

- 1) No permite la recombinación debido a la mutación *recA*⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos.
- 2) Porta una mutación *lacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente.
- 3) Puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo.

La estirpe LE392 se utilizó para la propagación de la genoteca genómica de *M. circinelloides* en el fago Lambda. Esta estirpe carece del sistema K de restricción de *E. coli*, es *rec*⁺ y permisiva a la infección, posibilitando el crecimiento de los fagos parentales y recombinantes. Está especialmente recomendada para la amplificación de fagos recombinantes y para el rastreo de genotecas con sondas de ácidos nucleicos.

La estirpe BL21 (DE3) se utilizó para la expresión de la proteína de fusión GST-Dicer2. BL21 (DE3) permite la expresión de genes, mediante el uso de los promotores *trc*, *tac*, λ PL y *araD*, con mayor eficacia que otras estirpes de *E. coli* utilizadas en el laboratorio. Además, presenta deficiencias en dos proteasas clave, Lon y OmpT, lo que permite el aislamiento en grandes cantidades de proteínas recombinantes intactas.

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pGEM-T Easy	<i>Amp^R</i> (Clonación productos PCR)	Promega
pGEM-T	<i>Amp^R</i> (Clonación productos PCR)	Promega
pBluescript II SK +/-	<i>Amp^R</i>	Stratagene
pGEX-KG	<i>Amp^R</i> (vector de expresión en <i>E. coli</i> . Apartado III.4.1.1)	Amersham
pVL1393-6xHis	<i>Amp^R</i> (vector de expresión en sistemas de baculovirus. Apartado III.3.2.1)	ABGENT
pLEU4	<i>Amp^R</i> , <i>leuA</i>	Roncero <i>et al.</i> , 1989
pEPM1	<i>Amp^R</i> , <i>pyrG</i>	Benito <i>et al.</i> , 1992
pMAT647	<i>Amp^R</i> , <i>carB</i> , <i>leuA</i> (gen <i>carB</i> completo. Apartado III.2.2.1)	Nicolás <i>et al.</i> , 2003
pMAT652	<i>Amp^R</i> , <i>carB</i> (sonda para detectar siRNAs de <i>carB</i> . Apartado III.2.2.2)	Nicolás <i>et al.</i> , 2003
pMAT661	<i>Amp^R</i> , <i>dicer1</i> .. <i>pyrG</i> (disrupción gen <i>dicer1</i> . Apartado III.2.2.4.1)	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
pMAT679	<i>Amp^R</i> , <i>carB</i> (preparación dsRNA marcado radiactivamente. Apartado II.14.1)	Este laboratorio
pMAT688	<i>Amp^R</i> , <i>carB</i> (preparación dsRNA marcado radiactivamente. Apartado II.14.1)	"
pMAT1253	<i>Amp^R</i> , <i>carB</i> , <i>leuA</i> (repeticiones invertidas del gen <i>carB</i> . Apartado III.1.4.2)	"
pMAT1281	<i>Amp^R</i> , cDNA completo <i>dicer2</i> (amplificación de cDNA para clonarlo en pVL1393. Apartado III.3.2)	"
pMAT1203	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> (fragmento de 0.88 kb amplificado con cebadores degenerados. Apartado III.1.1)	Este trabajo
pMAT1208	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> (fragmento <i>EcoRI</i> de 5,5 kb con la mayor parte del gen <i>dicer2</i> clonado en pBluescript. Apartado III.1.2.1)	"
pMAT1214	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> (fragmento de 480 pb que contiene el extremo 3' del gen <i>dicer2</i> . Apartado III.1.3.1)	"
pMAT1216	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> (fragmento <i>EcoRI</i> de 5,5 kb con la mayor parte del gen <i>dicer2</i> clonado en pGEM-T Easy. Apartado III.2.1)	"
pMAT1218	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> .. <i>pyrG</i> (disrupción del gen <i>dicer2</i> . Apartado III.2.1)	"
pMAT1220	<i>Amp^R</i> , <i>dicer2</i> (contiene el gen <i>dicer2</i> completo Apartado III.1.2.2)	"
pMAT1223	<i>Amp^R</i> , <i>pyrG</i> , <i>dicer2</i> (complementación de la mutación <i>dicer2</i> . Apartado III.2.2.3.4)	"
pMAT1225	<i>Amp^R</i> , cDNA <i>dicer2</i> (clonado en pGEX-KG) (incluye dominios RNasaIIIa, RNasaIIIb y DSRM. Apartado III.4.1.1)	"
pMAT1226	<i>Amp^R</i> , <i>dicer1</i> (construcción pMAT1228. Apartado III.2.2.4.1)	"
pMAT1228	<i>Amp^R</i> , <i>dicer1</i> .. <i>leuA</i> (disrupción del gen <i>dicer1</i> . Apartado III.2.2.4.1)	"
pMAT1236	<i>Amp^R</i> , cDNA completo <i>dicer2</i> (expresión de la proteína en células de insecto. Apartado III.3.2.1)	"

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.

En la **Tabla 5** se presentan los plásmidos empleados en este trabajo, indicando su procedencia y sus características más sobresalientes.

II. 2. Medios y condiciones de crecimiento.

II. 2. 1. *Escherichia coli*.

E. coli se cultivó a 37°C con agitación en medio nutritivo Luria (LB) (Miller, 1972). Antes de esterilizar el medio en el autoclave, el pH fue ajustado a 7,2-7,4. Para medios sólidos se añadió 15 g/l de agar. Cuando fue necesario, tras autoclavar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

II. 2. 2. *Mucor circinelloides*.

M. circinelloides se cultivó a 26°C en medio mínimo YNB (Lasker y Borgia, 1980) o MMC (Nicolás *et al.*, 2007) o en medio nutritivo YPG (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). Cuando fue necesario, después de autoclavar, el medio mínimo YNB se suplementó con leucina (20 µg/ml) y los medios YNB, MMC e YPG con uridina (0,2 mg/ml). Para la selección de mutantes resistentes al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), después de autoclavar se añadieron 2-3 mg/ml de 5-FOA al medio YNB suplementado con uridina. En experimentos de transformación se añadió sorbitol a una concentración de 0,5 M para evitar que la diferencia de presión osmótica hiciese estallar los protoplastos. En todos los casos, al preparar medios sólidos el agar se autoclavó por separado para evitar que el pH ácido de los medios impidiese la correcta polimerización. El pH fue 4,5 cuando se requirió un crecimiento micelial normal y 3,0-3,2 para obtener un crecimiento colonial, que permita analizar un gran número de individuos por caja.

Para la obtención de esporas se obtuvieron micelios en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado, bien a partir de suspensiones de esporas, bien a partir de trocitos de micelio transplantados con pinzas estériles. Los micelios se incubaron durante 2-3 días bajo luz continua antes de recoger las esporas extendiendo unos 5 ml de agua destilada estéril con ayuda de un asa de siembra también estéril.

Las esporas de las distintas estirpes se conservaron en agua destilada estéril a 4°C cuando su uso fue continuado y a -20°C de forma permanente.

II. 3. Tampones y reactivos.

a) Manipulación del DNA:

TAE 50x

• Tris	2 M
• Ácido acético	5,71 %
• EDTA	0,05 M

Tampón de carga 10x (electroforesis)

• Azul de bromofenol	0,25 %
• Sacarosa	40 %

b) Manipulación del RNA:

Tampón MOPS

• MOPS pH 7,0	20 mM
• Acetato sódico	5 mM
• EDTA	1 mM

Tampón de ribonucleasas

• Tris-HCl pH 7,5	20 mM
• NaCl	60 mM
• EDTA pH 8	5 mM

Tampón alcalino

• Bicarbonato sódico	80 mM
• Carbonato sódico	120 mM

Los tampones utilizados en los experimentos con RNA se trataron con dietilpircarbonato (DEPC) al 0,1 % durante al menos 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las ribonucleasas. El DEPC se eliminó posteriormente mediante autoclavado durante 20 minutos. Las soluciones de Tris se prepararon con agua previamente tratada con DEPC.

c) Manipulación de proteínas:

Tampón de lisis

• Tris-HCl pH 7,5	50 mM
• NaCl	50 mM
• Nonidet P-40	0,1 %
• Glicerol	5 %
• β -mercaptoetanol	5 mM
• PMSF	1 mM
• Cóctel de inhibidores de proteasas Sigma®	1:100

Geles de poliacrilamida

-Gel separador (10 %)

• Tris-HCl pH 8,85	0,75 M
• SDS	0,1 %
• Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)	10 %
• APS	0,2 %
• TEMED	0,1 %

-Gel concentrador (6 %)

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

Tampón de carga 5x

• Tris-HCl pH 6,8	0,3 M
• Glicerol	50 %
• SDS	10 %
• Azul de bromofenol	0,01 %
• β -mercaptoetanol	25 %

Tampón de electroforesis

• Tris	50 mM
• Glicina	0,192 mM
• SDS	0,1 %
• Ajustar pH a 8,3	

Azul de Coomassie

• Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)	0,05 %
• Metanol	50 %
• Ácido acético	10 %
• Agua bidestilada	40 %

Tampón PBS

• NaCl	140 mM
• KCl	3,3 mM
• Na_2HPO_4	10 mM
• KH_2PO_4	1,8 mM

Tampón PBST

• Se obtiene adicionando 0,05 % de Tween-20 al tampón PBS.

STE

• Tris-HCl pH 8,0	10 mM
• NaCl	150 mM

- EDTA 1 mM

d) Transformación de *M. circinelloides*:

Tampón fosfato-sorbitol

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

Tampón MOPS-sorbitol

- Sorbitol 0,5 M
- MOPS pH 6,3 10 mM
- CaCl₂ 50 mM

Solución de PEG 4000

- PEG 4000 40 %
- Disuelto en tampón MOPS-sorbitol.

e) Mutagénesis de *M. circinelloides*:

Tampón citrato-fosfato

- Fosfato disódico 0,05 M

Añadir ácido cítrico 0,05 M al fosfato disódico hasta alcanzar pH 7,5.

f) Transferencia de ácidos nucleicos a membranas:

SSC 20x pH 7,0

- NaCl 3 M
- Citrato sódico 300 mM

g) Hibridaciones:

Solución de prehibridación NaCl

- NaCl 0,9 M
- SDS 1 %
- 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado.

Solución de hibridación NaCl

Se obtiene adicionando 0,1 g/ml de sulfato de dextrano a la solución de prehibridación.

Solución de prehibridación / hibridación con formamida

- Formamida 40 %
- Denhardt's 1x
- SDS 7 %
- Tampón fosfato pH 7 0,05 M
- NaCl 0,3 M
- 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado.

Denhardt's 50x

- BSA 1 % (P/V)
- Ficoll 400 1 % (P/V)
- Polivinilpirrolidona (PVP) 1 % (P/V)

h) Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Tampón de carga-formamida 2x

- Formamida desionizada 95 %
- Azul de bromofenol 0,025 %
- Cianol de xileno 0,025 %
- SDS 0,025 %

• EDTA pH 8 18 mM

TBE 10x

• Tris base 0,9 M

• Ácido bórico 0,9 M

• EDTA 20 mM

i) Extracción de DNA de *M. circinelloides*:

Solución de extracción de DNA de *M. circinelloides*

• Tris-HCl pH 8 200 mM

• EDTA pH 8 100 mM

• SDS 1 %

j) Extracción de RNA de *M. circinelloides*:

Solución de extracción de RNA

• Isotiocianato de guanidina 4 M

• Tris-HCl pH 7,5 50 mM

• EDTA pH 8 10 mM

• Sarcosil 2 %

Solución de CsCl

• Cloruro de Cesio 5,7 M

• EDTA pH 8 10 mM

k) Genoteca en lambda:

Tampón de fagos

• Tris-HCl pH 7,4 20 mM

• NaCl 100 mM

• MgSO ₄	10 mM
Tampón SM	
• Tris-HCl pH 7,5	50 mM
• NaCl	100 mM
• MgSO ₄	8 mM
Tampón de resuspensión	
• Tris-HCl pH 7,4	10 mM
• MgSO ₄	10 mM

II. 4. Transformación de *E. coli*.

Para introducir DNA desnudo en *E. coli* es preciso que las células se encuentren en un estado especial denominado de competencia. La obtención de células competentes de la estirpe DH5 α se realizó por el procedimiento del cloruro cálcico (Sambrook y Russell, 2001). Para la transformación se utilizó el procedimiento de choque térmico (Sambrook y Russell, 2001).

II. 5. Transformación de *M. circinelloides*.

La transformación se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijk y Roncero (1984), basado en la generación de protoplastos que, al carecer de pared celular, permiten la incorporación de DNA exógeno.

Para obtener protoplastos transformables se inocularon 10^7 esporas/ml en 25 ml de medio líquido YPG pH 4,5 suplementado, cuando se requería, con 0,2 mg/ml de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente antes de incubarse toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación fuerte (300 r.p.m.) durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las esporas se precipitaron durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en tampón fosfato-sorbitol, para resuspenderse finalmente en este mismo tampón a razón de 5×10^7 esporas/ml. Para la

digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/ml de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (*Lysing Enzymes de Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0,15 mg/ml de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; USBiological). Las germinulas se incubaron a 30°C con agitación suave (60 r.p.m.) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de la envoltura refringente. Para parar la digestión se centrifugaron los protoplastos durante 5 minutos a 900 r.p.m. y se lavó una vez en tampón MOPS-sorbitol, resuspendiéndose después en 800 µl de este mismo tampón.

Para la transformación se mezclaron 200 µl de protoplastos con 1 µl de ácido aurintricarboxílico (ATA) 1M, 20 µl de una solución de polietilenglicol 4000 (PEG4000) al 40 % y hasta un máximo de 50 µl de DNA (20-30 µg). La mezcla de transformación se incubó durante 30 minutos en hielo y seguidamente se añadieron de forma sucesiva 0,5 ml, 0,5 ml y 1 ml de la solución de PEG4000, homogeneizando suavemente tras cada adición. Tras un período de incubación de 25 minutos a temperatura ambiente, se diluyó la suspensión añadiendo 10 ml de MOPS-sorbitol y se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m. El precipitado se resuspendió suavemente en 5 ml de YPG pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugó una vez más a 900 r.p.m. durante 5 minutos y los protoplastos se resuspendieron en 0,9 ml de YNB pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol. Esta solución se sembró cuidadosamente en cajas del medio adecuado para la selección de los transformantes.

II. 6. Integración de DNA exógeno en el genoma de *M. circinelloides*.

La transformación integrativa en el hongo *M. circinelloides* se realizó transformando protoplastos del hongo por el procedimiento descrito en el apartado anterior, pero empleando DNA linealizado en lugar de DNA circular. Para la integración en el locus *dicer2*, los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3,2 con 0,5 M de sorbitol. Para identificar los transformantes que habían integrado el DNA exógeno se determinó el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG* durante cuatro ciclos de crecimiento en medio selectivo. Para ello, se comparó el número de individuos resultantes de la siembra en medio selectivo (MMC pH 3,2) y no selectivo (MMC pH 3,2 con uridina). Los transformantes con un mayor porcentaje de esporas Ura⁺ se seleccionaron como presuntos portadores del DNA integrado. Para el aislamiento de

individuos con el DNA exógeno integrado en todos los núcleos (homocariontes) se realizaron de 5 a 6 pases en medio selectivo.

Para la integración en el locus *dicer1* empleando el marcador *pyrG* se utilizó el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Para la integración en el locus *dicer1* utilizando el marcador *leuA*, se sustituyó el medio MMC por YNB, suplementándose éste con leucina cuando fue necesario sembrar en medio no selectivo.

II. 7. Mutagénesis con nitrosoguanidina y aislamiento de mutantes auxótrofos para uracilo.

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Roncero *et al.* (1984). Se prepararon 4 tubos eppendorf con 2×10^6 esporas en 0,9 ml de tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 7,5. A tres de ellos se les añadió 0,1 ml de una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (1 mg/ml), y cada uno se incubó a temperatura ambiente durante un determinado periodo de tiempo: 15, 30 ó 45 minutos. Al cuarto tubo se le añadió 0,1 ml de tampón citrato-fosfato y fue utilizado como control de supervivencia. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m. y el precipitado de esporas se resuspendió en 1 ml de agua estéril. La operación se repitió tres veces, resuspendiéndose finalmente en 330 μ l de agua destilada estéril. Varias diluciones de cada tubo se sembraron en cajas de YNB pH 3,2 con leucina para determinar el porcentaje de supervivencia respecto al control sin tratamiento.

Las esporas de *M. circinelloides* son plurinucleadas, por lo que después del tratamiento con nitrosoguanidina las esporas supervivientes se sembraron en medio rico YPG pH 4,5 con uridina para que llevaran a cabo uno o dos ciclos vegetativos completos, permitiendo así la segregación de las posibles mutaciones recesivas de auxotrofia para uracilo. Las esporas recicladas se sembraron en cajas de medio mínimo YNB pH 3,2 suplementado con uridina y leucina, conteniendo 2,5 mg/ml de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). Las cajas se incubaron a 26°C en condiciones de oscuridad durante un período comprendido entre 10 y 20 días hasta la aparición de micelios resistentes a 5-FOA. Estos individuos se transplantaron al mismo medio para confirmar su fenotipo y finalmente se comprobó su auxotrofia para el uracilo comparando su crecimiento en cajas de medio YNB pH 3,2 con leucina y en cajas de YNB pH 3,2 con leucina y uridina.

II. 8. Medida de la actividad OMP descarboxilasa.

Para la obtención de extractos crudos de proteínas de *M. circinelloides* se inocularon 10^5 esporas/ml de las distintas estirpes a analizar en 50 ml de medio líquido YNB pH 4,5 (suplementado con 20 $\mu\text{g/ml}$ de leucina y con 0,2 mg/ml de uridina en el caso de los mutantes auxótrofos para uracilo), incubándose durante 48 horas a 26°C y 250 r.p.m. Los micelios así crecidos se filtraron en tela estéril, se lavaron con agua destilada y se procedió a la extracción de proteínas siguiendo el protocolo de Benito *et al.* (1995), con algunas modificaciones: 60 mg de micelio se pesaron y se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se resuspendió en 300 μl de Tris-HCl 50 mM pH 7,8. Se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 25 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que se utilizó inmediatamente para la determinación de la actividad OMP descarboxilasa (OMPdecase) y de las proteínas totales.

La concentración total de proteínas en el extracto se determinó siguiendo las instrucciones del sistema BIO-RAD Protein Assay, basado en el método de Bradford (1976). Para la cuantificación se utilizaron 2 μl del extracto, o de Tris-HCl 50 mM en el caso del blanco, diluidos en 798 μl de agua bidestilada (dilución 1:400).

Para medir la actividad OMPdecase de los mutantes auxótrofos para uracilo se siguió básicamente el método descrito por Lieberman *et al.* (1955). La medición de esta actividad se realiza valorando la disminución de absorbancia a 285 nm y 37°C del OMP (orotidina-5'-monofosfato), cuyo coeficiente de extinción molar es aproximadamente de 2461 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La valoración se realizó en cubetas de 1 ml donde se añadió una dilución de la muestra junto con OMP a una concentración final de 0,2 mM. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la descarboxilación de 1 μmol de OMP para dar uridina monofosfato (UMP) por minuto. La actividad específica se calcula refiriendo la actividad enzimática a la concentración de proteínas del extracto crudo utilizado:

$$\text{Actividad específica} = (\Delta A / \Delta t \cdot 6 \cdot 10^4) / (\epsilon \cdot \text{ml extracto} \cdot \text{mg proteína/ml})$$

donde:

$\Delta A / \Delta t$ = variación de absorbancia a 285 nm con el tiempo.

ϵ = coeficiente de extinción molar del OMP, con un valor de aproximadamente 2461 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

II. 9. Manipulación del DNA.

II. 9. 1. Aislamiento de DNA de *M. circinelloides*.

El DNA de *M. circinelloides* se aisló siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijk y Roncero (1984), con ligeras modificaciones. La extracción de DNA se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido a pH 4,5. Para ello, se realizaron transplantes sobre una lámina estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio sólido con el fin de facilitar la recogida del micelio.

Los micelios se incubaron durante 2 días a 26°C antes de ser recogidos y triturados en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. El micelio triturado se resuspendió en 800 µl de tampón de extracción de DNA. La mezcla se incubó con 30 µl de proteinasa K (2 mg/ml en TE) y 30 µl de RNasa (10 mg/ml) durante 3 horas a 37°C en un tubo eppendorf.

Tras este período de incubación se procedió a la extracción del DNA mediante un tratamiento con fenol y varios con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), hasta que no quedaron restos de proteínas en la interfase. Finalmente, se lavó con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa resultante se precipitó con un volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2. El precipitado se lavó con etanol al 70 % y, tras ser secado a 37°C, se resuspendió en 30-50 µl de agua bidestilada.

En el caso de las PCRs realizadas para comprobar la disrupción de los genes *dicer1* y *dicer2* se utilizaron directamente las esporas como fuente de DNA molde, a razón de 5×10^2 esporas/µl de volumen final de reacción.

II. 9. 2. Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de *E. coli* se aisló por el procedimiento rápido de hervido (Holmes y Quigley, 1981) cuando no se necesitaba gran pureza (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *M. circinelloides*, etc,...) o mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Applied Science) cuando se requería una gran pureza (secuenciación, PCR).

II. 9. 3. Tratamiento de DNA con enzimas.

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

Digestión con enzimas de restricción (Amersham Biosciences o Fermentas), que se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador.

Desfosforilación del extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) para evitar autoligación de vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.

Conversión de extremos 3' protuberantes en extremos romos. El DNA (50 ng) se incubó durante 5 minutos a 37°C con 0,5 unidades de la polimerasa de DNA del bacteriófago T4 (Boehringer Mannheim), tampón de la polimerasa (Boehringer Mannheim), BSA (100 µg/ml) y dNTPs (0,2 mM).

Ligación de fragmentos de DNA. Se realizó en volúmenes pequeños (20-30 µl) de tampón de ligación (Roche) y una unidad de la enzima ligasa de T4 (Roche). Las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante un mínimo de 2 horas. En general, la relación molar de vector:inserto usada fue de 1:1 ó 1:3.

Siempre que fue necesario, las enzimas se inactivaron por medio de calor, siguiendo las especificaciones del suministrador.

II. 9. 4. Técnicas electroforéticas.

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño generados en las digestiones con restrictasas o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el DNA se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó tampón TAE 1x y las concentraciones de agarosa variaron entre 0,7 % y 1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta se añadió Bromuro de Etidio a la agarosa a una concentración final de 0,5 µg/ ml.

La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en geles de agarosa. Las porciones del gel que contenían los fragmentos de interés se recortaron con un bisturí y el DNA se purificó con columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del suministrador. El tamaño y la

concentración de los plásmidos y fragmentos lineales purificados se calculó usando como referencia los marcadores λ DNA/*HindIII* (Fermentas) o GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

II. 9. 5. Amplificación de DNA por PCR.

El proceso de amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido (60 pmoles en el caso de cebadores degenerados) y las enzimas ECOTAQ DNA Polymerase (Ecogen), ECOTAQ PLUS DNA Polymerase (Ecogen) o PfuUltra™ Hotstart DNA Polymerase (Stratagene), siguiendo en cada caso las indicaciones del suministrador. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 94°C para la desnaturalización del DNA y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los cebadores, utilizando la fórmula $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C \%) - 650/\text{pb cebador}$) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. Dada la riqueza en pares G+C de *M. circinelloides*, en todos los casos se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 5 %. Los termocicladores utilizados fueron MiniCycler™ PTC-150 de MJ Research y Mastercycler® personal de Eppendorf. Los cebadores utilizados en los experimentos de PCR se muestran en la **Tabla 6**.

II. 9. 6. Marcado de fragmentos de DNA.

El DNA que se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación tipo Southern se marcó mediante la introducción del nucleótido dCTP marcado con fósforo-32 (^{32}P) en la posición α (Easytides® Deoxycytidine 5'-Triphosphate, [α - ^{32}P], Perkin Elmer) (Feinberg y Vogelstein, 1983; Feinberg y Vogelstein, 1984). El marcado se realizó con el kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham), siguiendo las instrucciones del suministrador.

Para detener la reacción de marcado y eliminar los nucleótidos no incorporados, se añadieron 100 μl de agua bidestilada a la reacción y a continuación se pasó toda la

solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 5 minutos a 2.000 r.p.m.

	Nombre	Secuencia	
<i>dicer2</i>	DB1	5' GACG TTCATAG TTCATCTCC 3'	
	DB2	5' ACGTCGTCATGGTCTGTATG 3'	
	DB3	5' GCATGCTCTTCCACATGCCG 3'	
	DB5	5' GCCCC CTAGA TCATACAGACCATGACGACG 3'	
	DB8	5' CTGATCACACTGGCCTGCTG 3'	
	DB9	5' TTGCCAAATGGTTCCTGCCC 3'	
	DB10	5' CAGGGGCGAGGCAGTGGGTG 3'	
	DB16	5' GATCTGCATCTGGGTATCTGGC 3'	
	DB17	5' CTTCAACCAACTCCATCAGC 3'	
	DB18	5' TTCAACCTGATTATGCGGGAG 3'	
	DB19	5' TTATTAGGCGGACTTACCCC 3'	
	DB20	5' TGTCGATGATCAAGCGAGGC 3'	
	DBshort5'	5' GGCCC CTAGA CCAAGCAACCATGATGATACCC 3'	
	DBlong5'	5' CGCCC CTAGA CATGAAGAAGCCCCAAGCCGG 3'	
	DBextremo3'	5' ACCCC CTAGA CCTAAGGGTCGTATTCATCATCATCC 3'	
	D2Sma5'	5' CCCCC CCCGG ATGAAGAAGCCCCAAGCCGGCG 3'	
	D2Not3'	5' GGCCC GCGGCCG GCAGGGTCGTATTCATCATCATCC 3'	
	<i>dicer1</i>	<i>dicer4</i>	5' GCTACTTCTGT(CT)(GC)T(CT)GA(AG)GA(AG)GG 3'
		<i>dicer14</i>	5' GAATGTAAGCAATGACCGTG 3'
		<i>dicer16</i>	5' CTCCAGGGCAGGTGTCAAGCTG 3'
<i>dicer19</i>		5' AGTTGCGCTTGTATCACAGAAGG 3'	
<i>dicer35</i>		5' TGGATCTTCGCCTCCGTTGCC 3'	
<i>dcl1250</i>		5' GGGG CTGCAG TGATATGCTCAACCTGCTCG 3'	
<i>dcl5950</i>		5' GCCC CTGCAG TCTACTCGGCAACATTGGGTC 3'	
<i>pyrG</i>	<i>pyrG3</i>	5' CAAAC GTTAAC ACTTACAAGACTTATAGC 3'	
	<i>pyrG9</i>	5' GCCATAGGATCCGCGGCCGACAATGATGATATCTCC 3'	
	<i>pyrG10</i>	5' GGCAGAAGGGAGGAGGCACACG 3'	
	<i>pyrGZ</i>	5' GGCATTGGGATGCTGTTGTC 3'	
<i>leuA carB</i>	<i>carB25</i>	5' CATTCCCTGTGTGGTTCTGGTTGCG 3'	
	<i>Ribc3</i>	5' CCGAATTC CCTGGAGAGATGGCACCTTAGC 3'	
	<i>leua-p2</i>	5' GTACGATTCTGGTCAACTCG 3'	

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos utilizados en los experimentos de PCR, RT-PCR, secuenciación y como marcadores de tamaño. Los nucleótidos marcados en rojo indican sitios de restricción añadidos en el extremo 5' de algunos oligonucleótidos. En negrita, nucleótidos añadidos en el extremo 5' de los sitios de restricción para facilitar la digestión. Entre paréntesis se indican sitios de degeneración.

II. 9. 7. Hibridación de DNA fijado a un soporte.

El DNA genómico (1 μ g) se digirió con las restrictasas adecuadas y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 20-25 minutos en una solución de ácido clorhídrico 0,4 N, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20-25 minutos en una solución de NaOH 0,4 N. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nailon (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0,4 N durante un mínimo de 2 horas (Sambrook y Russell, 2001). Una vez transferido, se secó el filtro a temperatura ambiente.

La hibridación se realizó en todos los casos con sondas marcadas radiactivamente. Cuando la hibridación se realizó en condiciones de alta homología, se prehibridó a 65°C un mínimo de 2 horas con 20 ml de solución de prehibridación NaCl y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche con 10 ml de solución de hibridación NaCl a la que se añadió la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C) y enfriada rápidamente en hielo. En casos de hibridación en condiciones de baja homología, para identificar el gen *dicer2* durante el rastreo de la genoteca utilizando un fragmento del gen *dicer1* como sonda, la temperatura de prehibridación e hibridación se bajó a 55°C.

Para hibridaciones con sondas homólogas, las condiciones de lavado fueron: un primer lavado con una solución 2x SSC con 0,1 % de SDS a temperatura ambiente durante 1-2 minutos para eliminar el exceso de radiactividad, un segundo lavado de 20 minutos a 65°C con esa misma solución, un tercer lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 1x SSC con 0,1 % de SDS y un cuarto lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,5x SSC con 0,1 % de SDS. Tras este lavado se chequearon las membranas para valorar la conveniencia de aplicar un último lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,1x SSC con 0,1 % de SDS. Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak® BioMaxTM MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a -70°C. En el caso de hibridaciones con sondas heterólogas, los lavados se realizaron a 55°C.

II. 9. 8. Secuenciación del DNA.

Los plásmidos portadores de los distintos fragmentos de DNA a secuenciar se purificaron con columnas High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science). La secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio de Biología Molecular del Servicio de

Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los cebadores utilizados en los experimentos de secuenciación se muestran en la **Tabla 6** (ver apartado II.9.5).

II. 10. Análisis de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este trabajo se analizaron en el servidor BCM Search Launcher, utilizando la aplicación “Sequence Utilities” para buscar la presencia de ORFs, secuencias repetidas, puntos de corte con enzimas, etc. Para el análisis de las secuencias de aminoácidos se utilizaron los servidores EMBL-EBI, NCBI y ExPasy. La búsqueda de proteínas homólogas a Dicer2 se llevó a cabo mediante el programa blastp del NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Las predicciones de dominios conservados se realizaron con los programas “InterProScan” (EMBL-EBI) y “Conserve Domain Database” (NCBI). Los análisis de comparación de secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW2 del EMBL-EBI (Larkin *et al.*, 2007). El peso molecular y el punto isoeléctrico de proteínas se determinó con el programa “Compute pI/Mw” (ExPasy) (Gasteiger *et al.*, 2005).

II. 11. Manipulación del RNA.

II. 11. 1. Aislamiento de RNA total de *M. circinelloides*.

El RNA de *M. circinelloides* se aisló por el método del cloruro de cesio (CsCl) descrito por Sambrook y Russell (2001), con algunas modificaciones. La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidos en medio líquido o en medio sólido sobre papel celofán. Se trituraron 150-300 mg de micelio en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf en hielo con 700 µl de solución de extracción de RNA y 6 µl de β-mercaptoetanol (Sigma). La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex hasta resuspender totalmente el micelio y se centrifugó durante 20 minutos a 9.000x g y 4°C. 575 µl del sobrenadante obtenido se añadieron cuidadosamente (evitando la mezcla) sobre un tubo de centrifuga de rotor TLA-55 (Beckman) que contenía 900 µl de solución de CsCl. El RNA se precipitó mediante centrifugación durante 15 horas a 50.000 r.p.m. y 20°C. Tras retirar con cuidado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, se pasó a un nuevo eppendorf y se mezcló con 0,1 volumen de acetato

sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100%, dejándose durante al menos 1 hora a 4°C. A continuación se centrifugó durante 20 minutos a 13.000x g a 4°C y el precipitado se lavó con etanol 80%. Tras secar el precipitado a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, se resuspendió en 30-50 µl de agua tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

II. 11. 2. Aislamiento de RNA de bajo peso molecular de *M. circinelloides*.

El RNA de bajo peso molecular se aisló a partir de micelios de la estirpe de interés crecidos sobre medio líquido o sólido bajo condiciones de luz continua, siguiendo el protocolo descrito por Catalanotto *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. Se trituraron micelios congelados (100 mg) en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, aislándose el RNA total por el método rápido del Trizol (Gibco-BRL), siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. El micelio triturado se pasó rápidamente a un tubo Falcon (50 ml) en hielo con 1,5 ml de Trizol y se agitó vigorosamente en un vórtex para resuspender completamente la muestra. La mezcla se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C. A continuación se recuperó el sobrenadante al que, tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se le añadieron 300 µl de cloroformo. Se agitó durante 15 segundos en un vórtex y se continuó la incubación a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C, recuperándose la fase acuosa y precipitándose el RNA con 750 µl de isopropanol, incubando 10 minutos en hielo y centrifugando 10 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70% y, tras secar a 37°C durante 15 minutos, se resuspendió en 300 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, calentando a 65°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 50 µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG8000 al 50%, se mezcló bien y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. Después de centrifugar durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C, los RNAs de bajo peso molecular permanecen en el sobrenadante. El mRNA, que queda en el precipitado, se resuspendió en 50 µl de formamida 50 % con el fin de utilizarlo como control del buen estado de las muestras de RNA obtenidas, para lo cual se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se verificó la ausencia de degradación. Los RNAs de bajo peso molecular se precipitaron añadiendo 3 volúmenes de etanol 100 %, manteniéndolos durante al menos 2 horas a -20°C

y centrifugando durante 30 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se lavó con etanol 80% y, tras secar a 37°C durante 15 minutos, se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

II. 11. 3. Amplificación de cDNAs.

II. 11. 3. 1. RT-PCR.

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1µg de RNA al que se le añadieron 50 pmoles del cebador complementario al RNA (volumen final de 10 µl). La mezcla se calentó 10 minutos a 65°C para desnaturalizar el RNA, se pasó a hielo y se le añadieron 2 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de Ditioneitol 100 mM (DTT) (Roche), 1 µl de RNA guard (Amersham Pharmacia Biotech), 4 µl de tampón Expand RT 5x (Roche) y 1 µl (50 U) de retrotranscriptasa (Expand Reverse Transcriptase, Roche) (volumen final de 20 µl). La mezcla se incubó 1 hora a 43°C, tras lo cual se pasó a hielo y se guardó a 4°C o se amplificó directamente. Para la amplificación mediante PCR se utilizaron 4 µl de la mezcla de retrotranscripción, un cebador complementario al RNA utilizado y otro cebador complementario al cDNA sintetizado, siguiendo el protocolo descrito en el **apartado II.9.5**. Los cebadores utilizados en los experimentos de RT-PCR se muestran en la **Tabla 6** (ver **apartado II.9.5**).

II. 11. 3. 2. 3'RACE.

Esta técnica se utilizó para determinar el extremo 3' del gen *dicer2*. Para la síntesis del cDNA se utilizó la retrotranscriptasa Expand Reverse Transcriptase (Roche) y el cebador RACE-T (Roche), que contiene una secuencia de poli(T) en su extremo 3' y una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' que coincide con la secuencia del cebador Race3'. Tras la retrotranscripción, se amplificó por PCR el extremo 3' del gen *dicer2* con el cebador específico DB10, complementario a la secuencia de *dicer2*, y el cebador Race3'. El producto de dicha reacción se utilizó como molde para una segunda amplificación con un cebador específico aguas abajo del primero, DB9, y el cebador Race3'. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo como se describe en el **apartado II.9.5**. Los productos generados se clonaron en el vector pGEM-T para su posterior secuenciación.

Secuencia de los cebadores RACE-T y Race3':

RaceT: 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T3'

Race3': 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'

La secuencia de los cebadores DB9 y DB10 se muestra en la **Tabla 6** (ver apartado **II.9.5**).

II. 11. 4. Hibridación de RNA total fijado a un soporte.

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 25 μ l conteniendo 20 μ g de RNA, 2,5 μ l de MOPS 10x, 4,4 μ l de formaldehído y 12,5 μ l de formamida. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA y posteriormente se dejó 5 minutos en hielo. Tras adicionar 2,5 μ l de tampón de carga, las muestras se cargaron en un gel de agarosa 1,2 % conteniendo 2,2 M de formaldehído y utilizando como tampón de electroforesis MOPS 1x con formaldehído 2,2 M. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó durante 1,5 horas con agua y se transfirió por capilaridad durante toda la noche a una membrana de nailon cargada positivamente (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) usando como tampón SSC 20x. El RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (0,120 J/cm²). La hibridación con la sonda marcada se realizó exactamente igual que en el caso de la hibridación de las membranas de DNA con sondas homólogas (ver apartado **II.9.7**).

II. 11. 5. Hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte.

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 20 μ l conteniendo 50-60 μ g de RNA de bajo peso molecular y 10 μ l de tampón de carga-formamida 2x. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA y a continuación se dejó 5 minutos en hielo. Las muestras se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% (19:1 acrilamida:bisacrilamida), conteniendo urea 7 M y TBE 0,5x, utilizando como tampón de electroforesis TBE 0,5x. Una vez finalizada la electroforesis, se transfirió el RNA a una membrana de nailon cargada positivamente (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) mediante electrotransferencia a 3 mA/cm² (Semi-Dry Electroblothing Unit, Sigma) durante 45 minutos, usando como

tampón de transferencia TBE 1x. El RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta ($0,120 \text{ J/cm}^2$). La hibridación con la ribsonda marcada se realizó con 20 ml de tampón de prehibridación/hibridación con formamida durante toda la noche y tras un periodo de 2-3 horas de prehibridación con el mismo tampón. Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron a 30°C .

El lavado de las membranas tras la hibridación se llevó a cabo a 50°C . Se realizaron tres lavados de 20 minutos con una solución SSC 2x con 0,2 % de SDS. Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak® BioMax™ MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a -70°C . Cuando fue necesario eliminar el exceso de sonda unida inespecíficamente a la membrana, ésta se sometió a un lavado durante 1 hora a 37°C con 0,81 kunits/ml de ribonucleasa A de páncreas bovino y 20 U/ml de ribonucleasa T1 de *Aspergillus oryzae* en un volumen de 20 ml de tampón de ribonucleasas. Por último, se eliminaron las ribonucleasas lavando vigorosamente las membranas con 2x SSC y 0,2% de SDS durante 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente.

Para detectar los sRNAs endógenos de *M. circinelloides*, que en algunos casos eran muy poco abundantes, se introdujeron variaciones en el proceso de hibridación descrito. Cuando se utilizaron ribosondas, la hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 40°C con 10 ml de tampón de hibridación ULTRAhyb® Ultrasensitive Hybridization Buffer (Applied Biosystems/Ambion). En el caso de oligonucleótidos marcados radiactivamente se hibridó durante toda la noche a 37°C con 10 ml de tampón ULTRAhyb®-Oligo Buffer (Applied Biosystems/Ambion). En ambos casos, la prehibridación se llevó a cabo durante 1 hora a la temperatura de hibridación y con el mismo tampón.

II. 11. 6. Marcado de ribosondas.

Las sondas de RNA utilizadas en los experimentos de hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte se marcaron mediante la introducción del nucleótido UTP marcado con fósforo-32 (Easytides® Uridine 5'-Triphosphate, [α - ^{32}P], Perkin Elmer). Las ribosondas específicas de RNA con sentido y antisentido se sintetizaron por transcripción *in vitro* de plásmidos portadores de los fragmentos adecuados, utilizando el kit comercial MAXIscript® T7 *in vitro* Transcription Kit (Ambion), siguiendo las recomendaciones del suministrador. Las ribosondas se trataron con DNaseI libre de

RNAsas para eliminar el DNA utilizado como molde para la transcripción. Posteriormente, las sondas marcadas se fragmentaron en pequeñas moléculas de aproximadamente 50 nt para facilitar la hibridación con los RNAs de bajo peso molecular. Este proceso se realizó mezclando 20 μ l de ribosonda con 300 μ l de tampón alcalino, incubando durante 3 horas a 60°C y deteniendo la reacción de hidrólisis con 20 μ l de acetato sódico 3M pH 5.0. Para eliminar los nucleótidos libres se pasó toda la solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. Como controles de tamaño y polaridad se cargó en el gel 1 pmol de oligonucleótidos correspondientes a secuencias con sentido (carB25) y antisentido (Ribo3) del gen *carB* (ver Tabla 6).

	Nombre	Secuencia
a	Riboloc 26 anti	5' GAGATCACCCACAACCTACCTCTGG 3'
	Riboloc 26 anti T7	5' TAATACGACTCACTATAGCGGAGAAAGCTTAAGTTCACGAGGAGC 3'
	Marcador 26 a	5' GAACAACGACGGTTACTGTATT 3'
a'	Riboloc 26	5' GAGAAGCTTAAGTTCACGAGGAGC 3'
	Riboloc 26 T7	5' TAATACGACTCACTATAGCGGAGATCACCCACAACCTACCTCTGG 3'
	Marcador 26 a'	5' AATACAGTAACCGTCGTTGTTC 3'
b	Riboloc 25 anti	5' GAACGTTTGATCGGTGATGCC 3'
	Riboloc 25 anti T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTCCTTGGTAATGTCTTCACCG 3'
	Marcador b	5' TTTGGACAAGAATGAAGGTGAGAA 3'
c	Riboloc 13	5' AGAACGTTACTCGCATCAAGG 3'
	Riboloc 13 T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTCCATTTGCTCTTCC 3'
	Marcador c	5' AAGAAGGGTATGGAGAACTTGTG 3'
d'	Riboloc 17 anti	5' CCTCGAGGCTGTAAGGTCTATCC 3'
	Riboloc 17 anti T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTACTCTTGGAGAGGAAGCCGTC 3'
	Marcador d'	Ver oligonucleótido d, Tabla 8
e'	Riboloc 18 anti	5' ATCGCAGCAGATCACCTCGTAGGC 3'
	Riboloc 18 anti T7	5' TAATACGACTCACTATAGCGAGAATTCACTGAGTAATCTATCC 3'
	Marcador e'	Ver oligonucleótido e, Tabla 8
f	Riboloc 6	5' AGAGTGGTGGACCTCGAGCAACGG 3'
	Riboloc 6 T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCAAACGAGGACATAGGG 3'
	Marcador f	5' ACCTCGAGCAACGGAATGACTATATAATGTAACCT 3'
f'	Riboloc 6 anti	5' GACGCAAACGAGGACATAGGG 3'
	Riboloc 6 anti T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGTGGACCTCGAGCAACGG 3'
	Marcador f'	5' AAGTTACATTATATAGTCATTCCGTTGCTCGAGGT 3'

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la síntesis de ribosondas utilizadas en el análisis de los sRNAs endógenos de *M. circinelloides*. Para cada una de las ribosondas se indican los dos cebadores utilizados en las reacciones de PCR para obtener los moldes de DNA utilizados en la transcripción *in vitro*, denominados Riboloc + nombre específico, y el oligonucleótido cargado en los geles para ser utilizado como marcador de tamaño y de polaridad, denominado marcador + nombre de la ribosonda con la que complementa. En negrita, secuencia del promotor T7 añadida al extremo 5' para permitir la transcripción *in vitro*.

Para el análisis de los sRNAs endógenos de *M. circinelloides*, las ribosondas marcadas radiactivamente se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* de fragmentos amplificados por PCR con oligonucleótidos que incluían en su secuencia el promotor T7. Una vez comprobada la ausencia de productos de amplificación inespecíficos mediante visualización en un gel de agarosa, se utilizaron entre 100 y 200 ng del producto de PCR sin purificar como molde para la transcripción. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR, así como los utilizados como marcadores de tamaño y polaridad para cada ribosonda se presentan en la **Tabla 7**.

II. 11. 7. Marcado de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos de DNA utilizados en los experimentos de hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte se marcaron en el extremo 5' con ATP

Nombre	Secuencia
Oligonucleótido a	5' GGTGTCTTCTGACAGTCTCGCAGAGGATGCCTCT 3'
Oligonucleótido a'	5' AGAGGCATCCTCTGCGAGACTGTCAGAAGACACC 3'
Oligonucleótido b	5' CTGTGCGTTGGCTGTCTCTGCCGACCCACTATGGC 3'
Oligonucleótido b'	5' GCCATAGTGGTTCGGCAGAGACAGCCAACGCACAG 3'
Oligonucleótido c	5' GATTTCCGTCAAGTGCTTCCGATCATTTCGTGGTG 3'
Oligonucleótido c'	5' CACCACGAATGATCGGAAGCACTTGACGGAAATC 3'
Oligonucleótido d	5' AGACGAGCCTATCTTCCTTGCCCTTGTA 3'
Oligonucleótido d'	5' TACAAGGCAAGGAAGATAGGCTCGTCT 3'
Oligonucleótido e	5' GTGAATCTATTGTATCGCCTCCCA 3'
Oligonucleótido e'	5' TGGGAGGCGATACAATAGATTAC 3'
Oligonucleótido f	5' TATCGCGTCTCTACCGTGGATACAA 3'
Oligonucleótido f'	5' TTGTATCCACGGTAGGACGGCGATA 3'
Oligonucleótido g	5' TCTAGCCACTTGTCCTCTGGTTCA 3'
Oligonucleótido g'	5' TGAACCAGAGGACAAGTGGCTAGA 3'
Oligonucleótido h	5' TGAGGACGGATTATCAGTAGAAGG 3'
Oligonucleótido h'	5' CCTTCTACTGATAATCCGTCCTCA 3'
Oligonucleótido i	5' GCGTTAACCCTCCGCCATATCTGC 3'
Oligonucleótido i'	5' GCAGATATGGCGGAGTGGTTAACGC 3'
Oligonucleótido j	5' GTCATTCCGTTGCTCGAGGTCCA 3'
Oligonucleótido j'	5' TGGACCTCGAGCAACGGAATGAC 3'

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados como sonda y como marcadores de tamaño en los experimentos tipo Northern para el análisis de los sRNAs endógenos de *M. circinelloides*. Los oligonucleótidos d' y e' son complementarios, respectivamente, a los oligonucleótidos d y e, y sólo fueron empleados como marcadores de tamaño.

(Easytides® Adenosine 5'-Triphosphate, [γ - 32 P], Perkin Elmer), utilizando T4 Polynucleotide Kinase (Promega), siguiendo las instrucciones del suministrador. Los nucleótidos libres se eliminaron haciendo pasar las sondas marcadas por una columna de Sephadex™ G-25 DNA Grade (GE Healthcare), centrifugando durante 5 minutos a 2.000 r.p.m.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados, que además de ser empleados como sonda se utilizaron como marcadores de tamaño y polaridad, se muestra en la **Tabla 8**.

II. 12. Manipulación de proteínas.

II. 12. 1. Extracción de proteínas solubles de *E. coli*.

Para preparar extractos de proteínas solubles de *E. coli* BL21, cultivos celulares obtenidos en las condiciones adecuadas se centrifugaron a 13.000 r.p.m. y 4°C durante 1 minuto para precipitar las células. Previamente, se separó una alícuota de 30 μ l para analizar proteínas totales. El precipitado se resuspendió en tampón de lisis a razón de 200 μ l de tampón por mililitro de cultivo. Las células se lisaron mediante sonicación en un sonicador automático Labsonic U (B. Braun), realizando 4 pulsos de sonicación de 15 segundos con intervalos de 15 segundos entre cada pulso y manteniendo las muestras en hielo. Finalmente, para precipitar los restos celulares y proteínas insolubles se centrifugó durante 15 minutos a 5.000 r.p.m. y 4°C, recuperándose la fase soluble.

Para ayudar a solubilizar proteínas insolubles con sarcosil se siguió básicamente el método de Frangioni y Neel (1993), con algunas modificaciones. El cultivo celular se centrifugó a 7.000 g durante 10 minutos. Previamente se separó una alícuota de 30 μ l para analizar proteínas totales. El precipitado se lavó con STE frío, resuspendiéndose en STE frío con lisozima (100 μ g/ml) recién preparada, a razón de 60 μ l de STE por cada mililitro de cultivo. La mezcla se mantuvo durante 15 minutos en hielo y a continuación se añadieron 2 μ l de cóctel de inhibidores de proteasas Sigma® por cada mililitro de mezcla, inhibidor de serinproteasas (PMSF 0,2 mM), un agente reductor (DTT 5 mM) y N-laurilsarcosina al 10 % en STE frío hasta una concentración final en la mezcla del 0,5 %. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex y las células se lisaron mediante sonicación. Finalmente, para precipitar los restos celulares y proteínas insolubles se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C, recuperándose la fase soluble.

II. 12. 2. Electroforesis de proteínas.

La separación en función del tamaño de las proteínas presentes en los extractos de *E. coli* se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida (Pronadisa) utilizando el equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) para geles de 1,0 mm de grosor. En todos los casos se realizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 6 % y un gel separador al 10 % de poliacrilamida, cuyas composiciones se pueden consultar en el apartado II.3.

Las muestras se prepararon en un volumen total de 30 µl, a los que se añadieron 7,5 µl de tampón de carga 5x. Tras 10 minutos de incubación a 100 °C, las muestras se mantuvieron 5 minutos en hielo y se cargaron en el gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 45 minutos a 200 V en tampón de electroforesis. Se utilizó el marcador de tamaño BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). Los geles se transfirieron a una membrana para realizar experimentos de Western o se tiñeron directamente con una solución de azul de Coomassie, eliminando el colorante mediante 3-4 lavados con una solución de metanol:acético:agua (30:10:60).

II. 12. 3. Purificación de proteínas.

La purificación del fragmento C-terminal de la proteína Dicer2 fusionado a GST se realizó en condiciones nativas mediante la utilización de la resina Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences), compuesta por bolas de sefarosa cubiertas de glutatión inmovilizado que presenta alta afinidad por la proteína GST, siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. Brevemente, el precipitado celular obtenido a partir de 250 ml de cultivo se lavó con NaCl frío al 0.9 %, se trituró en un mortero con alúmina (Sigma A-2039), a razón de 2 g de alumina por gramo de precipitado celular, y se resuspendió en una solución 1:4 de tampón de resuspensión (Sacarosa 2,4 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) : tampón de lisis (EDTA 1 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, Deoxicolato Sódico 0,1 %, PMSF 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas Sigma® 1:100, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), a razón de 6 ml por gramo de precipitado. Tras centrifugar 20 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C (Rotor JA-20, centrifuga Beckman J2-21), el sobrenadante se incubó con la resina de glutatión-sefarosa a razón de 200 µl de resina

(50% v/v en HEPES 10 Mm pH 8,0, DTT 1 mM) por cada 250 ml de cultivo celular. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 4°C con agitación suave.

La mezcla de unión se centrifugó 2 minutos a 1.500 r.p.m. y, tras eliminar el sobrenadante, la resina se sometió a tres lavados con tampón de lavado (glicerol 10 %, KCl 100 mM, MgCl₂ 5mM, ZnCl₂ 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, Nonidet P-40 0,1 %, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, pH 8) para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente, incubando durante 5 minutos a 4°C con agitación suave.

Finalmente, la proteína de fusión GST-Dicer2 se eluyó añadiendo a la resina 50 µl de tampón de elución (glicerol 10 %, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, glutatión reducido 10 mM, pH 9,0) incubando durante 10 minutos a 4°C con agitación suave. El sobrenadante se recuperó tras centrifugar 1 minuto a 5.000 r.p.m. y se conservó a -70°C. La matriz de glutatión-sefarosa con la proteína que no se había eluido se conservó en 0,5 volúmenes de tampón de almacenamiento (NaCl 150 mM, DTT 5 mM, Glicerol 10 %, HEPES 50 mM, pH 7,4) a -70°C.

Para purificar la proteína de fusión GST-Dicer2 solubilizada con sarcosil (ver **Apartado II.12.1**), se añadió a la fracción de proteínas solubles Triton® X-100 (Sigma) preparado al 10 % en STE frío hasta una concentración final en la mezcla del 2%. Los detergentes no iónicos como el Triton X-100 secuestran las moléculas de sarcosil mediante formación de micelas mixtas, posibilitando la unión de las proteínas de fusión a la matriz de glutatión-sefarosa. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex y se incubó con la resina de glutatión-sefarosa siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La única variación del proceso fue que, tanto para el equilibrado de la matriz de glutatión-sefarosa como para el lavado de proteínas unidas inespecíficamente, se utilizó PBS frío.

II. 12. 4. Diálisis de proteínas purificadas.

La proteína de fusión GST-Dicer2 purificada mediante cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa se dializó utilizando el sistema de diálisis para pequeños volúmenes *GeBAflex-tube* 2 ml cap (Gene Bio-Application), siguiendo las instrucciones del suministrador. Para el tampón de diálisis (KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, glicerol

20 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) se utilizó una composición similar a la del tampón de digestión empleado en los ensayos de actividad enzimática (ver **Apartado II.14.3**).

II. 13. Inmunodetección de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a un soporte sólido para ser detectadas por anticuerpos específicos mediante la técnica de "Western-blotting" (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981).

II. 13. 1. Transferencia de proteínas a membranas.

Las proteínas sometidas a electroforesis fueron electrotransferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN®, Whatman) mediante un sistema semi-seco utilizando el equipo Semi-Dry Electroblotting Unit (Sigma). La transferencia se realizó durante 45 minutos a 200 mA de intensidad, utilizando tampón de transferencia para proteínas (Glicina 39 mM, metanol 20 %, SDS 0,037 %, Tris 48 mM, pH 8,8).

II. 13. 2. Revelado de las membranas por inmunodetección.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante una noche en tampón PBST con un 5 % de leche desnatada como agente bloqueante. Al día siguiente, se eliminó la solución mediante un lavado de 10 minutos en tampón PBST y se incubó la membrana durante una hora en presencia del anticuerpo primario anti-GST (Sigma) a una dilución 1:4000 en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. Tras eliminar el exceso de anticuerpo con tres nuevos lavados de 10 minutos con PBST, se incubó la membrana durante 1 hora con una dilución 1:2500 de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Amersham Biosciencias) en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otros tres lavados con PBST. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave y constante.

Para el revelado se utilizó el sistema Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare). Tras añadir el reactivo que contiene el sustrato fluorescente para la peroxidasa unida al anticuerpo secundario, la membrana se expuso a una película Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) durante 2 - 5 minutos.

II. 14. Ensayo de actividad Dicer.

Para el análisis *in vitro* de la actividad ribonucleasa de la enzima Dicer2 de *M. circinelloides* se siguió básicamente el procedimiento de Ye y Liu (2008), con algunas modificaciones.

II. 14. 1. Preparación de RNA de doble cadena (dsRNA) marcado radiactivamente.

El RNA marcado radiactivamente se preparó mediante transcripción *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.11.6. En la reacción se incluyeron dos moldes de DNA, el plásmido pMAT679 y el plásmido pMAT688 linearizados mediante digestión con la enzima *XbaI*. Dichos plásmidos contienen la misma secuencia de 0,5 kb del extremo 5' del gen *carB* de *M. circinelloides* clonada en el plásmido pBluescript II SK (Stratagene) en las dos orientaciones posibles respecto al promotor T7. Tras la eliminación de los moldes con DNaseI, la reacción se detuvo adicionando 115 µl agua bidestilada tratada con DEPC, 15 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,2) e incubando a 90°C durante 1 minuto. Los 150 µl de mezcla se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que las cadenas de RNA con sentido y antisentido hibridasen entre sí. A continuación se añadieron 150 µl de fenol ácido/cloroformo a temperatura ambiente y se agitó vigorosamente en un vórtex durante 30 segundos. Después de centrifugar durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se repitió el proceso de extracción con fenol/cloroformo. El RNA de la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 3,5 µl de glicógeno (5 mg/ml) y 300 µl de etanol 100 %, incubación a -20°C durante 1 hora y centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada tratada con DEPC.

El dsRNA marcado con [α - 32 P] UTP se sometió a un tratamiento con RNasas para eliminar los fragmentos de cadena sencilla presentes en la mezcla. Para ello, se digirió con RNasa A y RNasa T1 siguiendo las instrucciones del kit RPA IIITM Ribonuclease Protection Assay (Ambion), excepto que el paso final de inactivación de las RNasas se sustituyó por una extracción con fenol ácido/cloroformo y precipitación con etanol 100 % y glicógeno. Finalmente, se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada tratada con DEPC.

1 μ l del dsRNA marcado radiactivamente se añadió a 1 ml de cóctel de centelleo OptiPhase HiSafe 3 (PerkinElmer) y se utilizó para determinar las cpm/ μ l con un contador de centelleo beta Wallac Winspectral 1414. Una alícuota del dsRNA se diluyó hasta 1×10^5 cpm/ μ l. 1 μ l de ese dsRNA se sometió a electroforesis no desnaturizante durante 15 minutos a 300 V en un gel al 6 % de poliacrilamida en TBE 0,5x. A continuación, el gel se puso en contacto con una película Kodak® BioMaxTM MS Film (alta sensibilidad) y se dejó exponiendo a 4°C durante 15 minutos. Tras ese tiempo se reveló la película y se comprobó que el dsRNA no había sufrido degradación a lo largo de todo el proceso. Alícuotas de la preparación de dsRNA se conservaron a -20°C durante 2-3 semanas, valorándose las cpm/ μ l del dsRNA marcado antes de cada uno de los ensayos de actividad.

II. 14. 2. Procesamiento de dsRNA por la proteína Dicer2 de *M. circinelloides* .

Los ensayos de actividad de las proteínas Dicer2 purificadas se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μ l conteniendo aproximadamente 100 ng de proteína Dicer2, ATP 1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y 1 μ l de dsRNA marcado radiactivamente (diluido hasta $1,5 \times 10^5$ cpm/ μ l). Para el ensayo con la proteína de fusión GST-Dicer2 dializada se aumentó el volumen hasta 40 μ l y se sustituyó el NaCl 100 mM por KCl 50 mM. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. También se ensayaron distintos tiempos de incubación (30 minutos y 1 hora), temperatura de incubación (30°C) y tampones de reacción (Ye y Liu, 2008). La digestión se detuvo mediante adición de 200 μ l de acetato sódico 0,3 M (pH 5,2). A continuación se hizo una extracción del RNA con 200 μ l de fenol/cloroformo. La fase acuosa se mezcló con 500 μ l de etanol 100 % y 3,5 μ l de glicógeno y se incubó a -20°C durante toda la noche, precipitándose el RNA tras centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70 % antes de dejarlo secar a temperatura ambiente

durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió en 5 μ l de tampón de carga-formamida 2x y se hirvió durante 5 minutos.

Las muestras de dsRNA incubadas con las proteínas Dicer se sometieron a electroforesis desnaturizante durante 2,5 - 3 horas a 300 V en geles del 16 % de poliacrilamida (19:1 acrilamida:bisacrilamida), conteniendo urea 7 M y TBE 0,5x, utilizando como tampón de electroforesis TBE 0,5x. Se utilizó el marcador de tamaño de RNA DecadeTM Marker System (Applied Biosystems/Ambion) marcado con [γ -³²P] ATP (Easytides[®] Adenosine 5'-Triphosphate, [γ -³²P], Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del suministrador. A continuación, el gel se puso en contacto con una película Kodak[®] BioMaxTM MS Film (alta sensibilidad) y se dejó exponiendo a 4°C durante 2-4 horas.

II. 15. Rastreo de la genoteca de DNA genómico en el fago lambda.

La genoteca genómica que se rastreó para la búsqueda del gen *dicer2* de *M. circinelloides* había sido construida previamente (Quiles-Rosillo, 2001) en el vector LambdaGEM[®]-11 (Promega), utilizando DNA de la estirpe de *M. circinelloides f. lusitanicus* CBS 277.49.

II. 15. 1. Titulación de la genoteca.

La estirpe LE392 de *E. coli* se infectó con la genoteca de DNA genómico de *M. circinelloides* siguiendo las recomendaciones del suministrador (Genomic Cloning Technical Manual, Promega) con ligeras modificaciones. Una colonia de la estirpe LE392 se inoculó en 1 ml de medio LB suplementado con 0,2 % de maltosa y MgSO₄ 10 mM, incubándose toda la noche a 37°C y 250 r.p.m. Al día siguiente, se inocularon 25 ml del mismo medio con 500 μ l del cultivo crecido toda la noche. Se incubó a 37°C y 250 r.p.m. hasta que alcanzó una D.O. a 600 nm de 0,6-0,8 (aproximadamente 2,5 horas). Las células se precipitaron mediante centrifugación a 2500 r.p.m. durante 3 minutos a 4°C, resuspendiéndose el precipitado en tampón de resuspensión. Las células así preparadas se infectaron inmediatamente.

Para la infección, se mezclaron 100 µl de la dilución apropiada de fagos en tampón de fagos con 100 µl de células LE392. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C para favorecer la adsorción del fago. Posteriormente, se sembró con agar de cobertera (0,7 % agarosa y MgSO₄ 10 mM) en cajas con LB. Una vez solidificado el agar de cobertera, se incubaron las cajas invertidas a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se estimó el número de unidades formadoras de placa por ml (u.f.p/ml).

II. 15. 2. Transferencia de los fagos a membranas de nailon.

Una vez conocido el título de la genoteca, se sembraron aproximadamente 10.000 u.f.p. repartidas en 3 cajas de 13,5 cm de diámetro con medio LB, como se describe en el apartado II.15.1. Tras una noche a 37°C, las cajas se incubaron a 4°C durante aproximadamente 1 hora, para endurecer el medio y así favorecer que la agarosa no se uniese a la membrana. A continuación se colocaron las membranas (Colony/Plaque ScreenTM de 132 mm, NENTM) sobre las calvas, señalando la orientación, y se dejó reposar durante 5 minutos para permitir la adhesión de los fagos a la membrana. Las membranas se secaron durante 10-20 minutos a temperatura ambiente y se sometieron a los siguientes tratamientos sucesivos para desnaturar y fijar el DNA: 10 minutos con 4 ml de solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH12), con la cara la membrana portadora de los fagos hacia arriba; 10 minutos con 4 ml de solución de neutralización (TrisHCl 1M pH 7,5, NaCl 1,5 M), y por último, 5 minutos con 4 ml de 2x SSC. Finalmente, los filtros se dejaron secar en papel Whatman y se incubaron durante 2 horas a 80°C para fijar el DNA. Las membranas se conservaron a 4°C hasta el momento de ser hibridadas con las distintas sondas, así como las cajas con los fagos, para poder recuperar aquellos que diesen señal positiva tras cada hibridación.

II. 15. 3. Aislamiento de clones positivos tras la hibridación.

Las membranas con el DNA de los fagos se hibridaron con sondas de DNA mediante la técnica descrita en el apartado II.9.7. Las calvas que contenían fagos cuyo DNA hibridó con las sondas utilizadas se recogieron de la caja de infección con ayuda del extremo ancho de una pipeta Pasteur. Para liberar los fagos del medio de cultivo, se añadieron 0,5 ml de tampón SM y 10 µl de cloroformo, incubándose la mezcla durante una

hora a 37°C y 250 r.p.m. A continuación, los fagos seleccionados se sometieron a una segunda ronda de hibridación para identificar los clones positivos. Para ello, células de *E. coli* LE392 se infectaron con diluciones apropiadas de cada una de las preparaciones de fagos seleccionados con objeto de obtener calvas aisladas. Calvas aisladas de cada clon positivo (30-40 calvas por clon) se transplantaron sobre un césped de *E. coli* LE392 con ayuda de palillos estériles y se incubaron a 37° durante toda la noche. A la mañana siguiente, los fagos se transfirieron a un filtro y se volvió a hibridar con la misma sonda. Los fagos que dieron señal positiva se recuperaron del medio de cultivo tal y como se ha descrito anteriormente.

II. 15. 4. Aislamiento de DNA del fago lambda.

Los fagos aislados en el rastreo se mezclaron con células de *E. coli* para permitir la adsorción del fago. Una colonia de la estirpe LE392 se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con 0,2 % de maltosa y MgSO₄ 10 mM, incubándose toda la noche a 37°C y 250 r.p.m. Al día siguiente se infectaron 500 µl del cultivo de *E. coli* con 100 µl de los fagos aislados, para lo que se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37°C. La mezcla de fagos y células se inoculó en 100 ml de LB conteniendo MgSO₄ 10mM en un matraz de 250 ml, incubándose a 37°C y 200 r.p.m. hasta observar el inicio de la lisis celular (de 5 a 7 horas).

Posteriormente, se completó la lisis de las bacterias mediante la adición de 1 ml de cloroformo, agitando durante 15 minutos a 37°C. Los restos celulares se eliminaron centrifugando 10 minutos a 8.000x g. El sobrenadante se recuperó en un tubo estéril y se almacenó a 4°C (hasta 6 meses). Como paso previo a la extracción del DNA del fago, se eliminaron el DNA y RNA bacterianos mediante la incubación con DNasa I (1µg/ml) (Roche) y RNasa A (1µg/ml) (Sigma) durante 30 minutos a 37°C. Los fagos se precipitaron mediante la adición de 5,8 g de NaCl y 9,3 g de PEG8000 e incubación durante 60 minutos en hielo o toda la noche a 4°C. El precipitado obtenido por centrifugación durante 20 minutos a 8.000 r.p.m. (Rotor JA-14, centrifuga Beckman J2-21) se resuspendió en 10 ml de tampón de fagos. A continuación se adicionaron 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0, incubando durante 15 minutos a 68°C. Tras la incubación, se precipitó el DNA añadiendo 10 ml de isopropanol y manteniendo la solución a -20°C durante al menos 2 horas. Después de centrifugar durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. a 4°C

y eliminar el sobrenadante, se añadió etanol al 70 % y se centrifugó durante 2 minutos a 6.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 1 ml de tampón de fagos con 10 µl de SDS 10 % y 10 µl de EDTA 0,5 M a pH 8,0. A continuación se realizó un tratamiento con fenol-cloroformo para eliminar restos de proteínas y el DNA se precipitó con isopropanol como se indica en el **apartado II.9.1**. El precipitado obtenido se resuspendió en 30-50 µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C.

III. RESULTADOS

III. 1. Clonación y caracterización del gen *dicer2* de *M. circinelloides*.

Estudios previos en nuestro laboratorio han revelado que el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes permanece intacto en los mutantes *dicer1* y que éstos continúan generando los siRNAs de 21 y 25 nt. Esto implica la existencia de, al menos, un gen *dicer* adicional. Así, el primer objetivo de este trabajo fue la identificación de un segundo gen *dicer* de *M. circinelloides* que fuera responsable de la biogénesis de los siRNAs en el mutante *dicer1*. La aproximación que se siguió consistió en realizar reacciones de PCR con cebadores diseñados a partir de secuencias conservadas de la proteínas Dicer de los hongos *S. pombe* y *N. crassa*, utilizando DNA genómico del mutante *dicer1* como molde. Las amplificaciones se hicieron con el cebador *dicer4*, diseñado en base a la secuencia del dominio helicasa, y el cebador *dicer5*, diseñado a partir del segundo dominio RNasaIII. Ambos cebadores presentaban una degeneración completa en su extremo 3'. El empleo de esta pareja de cebadores en condiciones de hibridación poco restrictivas (50°C) permitió, en su momento, amplificar la región central del gen *dicer1*. Sin embargo, las diversas reacciones de amplificación que se llevaron a cabo utilizando DNA genómico del mutante *dicer1* como molde no rindieron ningún fragmento con homología con genes *dicer*. La disponibilidad pública de la secuencia genómica de *R. oryzae* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/rhizopus_oryzae/Home.html), un hongo cigomiceto filogenéticamente muy próximo a *M. circinelloides*, permitió diseñar cebadores con los que iniciar de nuevo la búsqueda de un segundo gen *dicer*.

III. 1. 1. Amplificación de la región comprendida entre el dominio PAZ y los dominios RNasaIII del gen *dicer2* mediante cebadores degenerados.

La clonación del segundo gen *dicer* de *M. circinelloides* se abordó mediante el uso de cebadores degenerados diseñados a partir de regiones conservadas de uno de los genes *dicer* de *R. oryzae*. En el genoma de *R. oryzae* aparecen dos secuencias con elevada homología con el gen *dicer1* de *M. circinelloides*, una de ellas correspondiente a un gen *dicer* truncado en su extremo 5'. De estas dos secuencias, la proteína determinada por el gen completo (RO3G_15434.3) es la que mayor grado de identidad (39 %) comparte con el gen *dicer1* de *M. circinelloides*, por lo que el gen truncado de *R. oryzae* podría ser el posible homólogo de un segundo gen *dicer* de *M. circinelloides*. En base a la secuencia de aminoácidos deducida para el gen truncado de *R. oryzae* se diseñaron tres cebadores

degenerados: *dicertrunc1*, correspondiente a la región que conecta los dominios DUF283 y PAZ, y *dicertrunc2* y *dicertrunc3*, correspondientes al dominio PAZ (Figura 14A; Tabla 9). Si bien el dominio PAZ presenta muy poca homología entre las proteínas Dicer de diferentes organismos, no sucede lo mismo al considerar exclusivamente el grupo de los

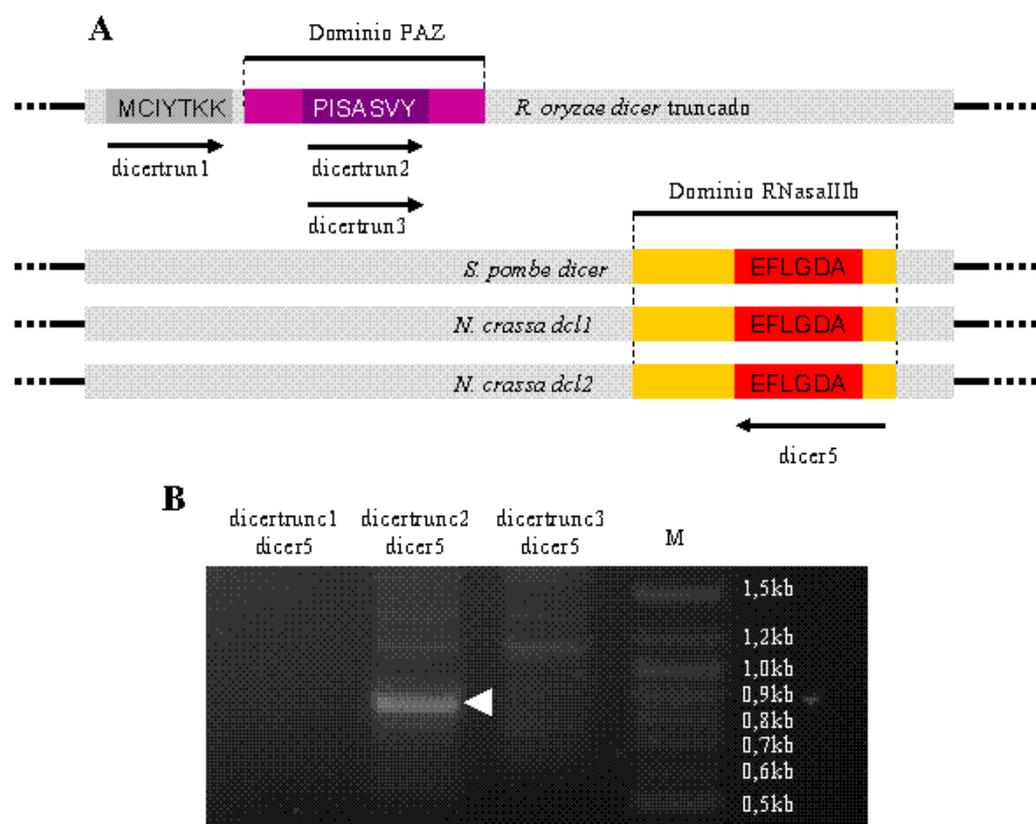


Figura 14. Amplificación de un fragmento del gen *dicer2* de *M. circinelloides* mediante cebadores degenerados. (A) Esquema de la estrategia seguida para el diseño de los cebadores degenerados utilizados en la reacción de amplificación. (B) Amplificación del gen *dicer2* de *M. circinelloides* (flecha blanca) con los cebadores *dicertrunc2* y *dicer5*. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

CEBADOR	SECUENCIA DEGENERADA
<i>dicertrunc1</i>	5' - ATGTG(CT)ATCTA(CT)AC(AGCT)AA(AG)AA(AG)CC - 3'
<i>dicertrunc2</i>	5' - CCAATAA(AG)(CT)GC(AGCT)AG(CT)GT(AGCT)TA - 3'
<i>dicertrunc3</i>	5' - CCAATAAG(CT)GC(AGCT)TC(AGCT)GT(AGCT)TA - 3'
<i>dicer5</i>	5' - TCGAAGAT(AG)GC(AG)TC(AG)CCGA(AG)(AG)AA(CT)TC - 3'

Tabla 9. Cebadores degenerados utilizados para amplificar el gen *dicer2* de *M. circinelloides*. Entre paréntesis se indican los sitios de degeneración.

hongos, en los que constituye un dominio bastante conservado; de ahí que se utilizase como patrón sobre el que diseñar los cebadores. Los tres cebadores se utilizaron en reacciones de amplificación independientes junto al cebador *dicer5*. El tamaño esperado del producto de PCR era aproximadamente de 1,5 kb para la pareja de cebadores *dicertrunc1-dicer5*, y de aproximadamente 0,9 kb para las parejas *dicertrunc2-dicer5* y *dicertrunc3-dicer5*. Utilizando DNA genómico de la estirpe MU406 (*dicer1*) de *M. circinelloides* como molde y una temperatura de hibridación de 52°C, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 0,88 kb en la reacción con los cebadores *dicertrunc2* y *dicer5* (Figura 14B). El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pGEM-T Easy y todos los clones resultantes que mostraron diferencias en cuanto al patrón de corte con distintas enzimas de restricción fueron secuenciados. La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas para cada clon con las depositadas en los bancos de datos reveló la elevada similitud de una de ellas con proteínas Dicer de varios organismos. Esta secuencia mostraba una identidad del 43 % y una similitud del 62 % con la secuencia de la proteína Dicer1 de *M. circinelloides* (WU-Blast2, $E=3.0e^{-48}$). Sin embargo, la secuencia con la que guarda mayor identidad (80 %) es con la de la proteína putativa Dicer completa de *R. oryzae* (WU-Blast2, $E=e^{-113}$) (Figura 15; Tabla 10). En base a estos datos se denominó *dicer2* al gen identificado en *M. circinelloides*. El plásmido portador del fragmento de 0,88 kb del gen *dicer2* se denominó pMAT1203.

	<i>M.c.</i> Dicer1	<i>M.c.</i> Dicer2	<i>R.o.</i> Dicer1 completo	<i>R.o.</i> Dicer truncado
<i>M. circinelloides</i> Dicer1	-	-	-	-
<i>M. circinelloides</i> Dicer2	43,3%	-	-	-
<i>R. oryzae</i> Dicer1 completo	41,0%	80,6%	-	-
<i>R. oryzae</i> Dicer truncado	41,8%	42,7%	40,7%	-

Tabla 10. Porcentaje de identidad de la proteína Dicer2 (fragmento amplificado) de *M. circinelloides* con otras proteínas Dicer (EMBOSS Align). En la comparación se han excluido los aminoácidos correspondientes a los cebadores degenerados. *M.c.*: *M. circinelloides*; *R.o.*: *R. oryzae*.

<i>M. c.</i> Dicer2	1	PISASVYQATMMIPSIMTRIDSILLCSAERYDLP--IDDRANMLEAATPSANMEMNYE
<i>R. o.</i> Dicer1	1	EVNASVYIAMLMIPISTIMTRIDSILLCYDSEARYDLP--IDDEYMLEAATMPSASMEMDYE
<i>M. c.</i> Dicer1	1	PISASVYQTLQVLPDMMHIDAVLLMIDAKKALGLSGRMKDYMLEAFTASSAGLEKDYQ
<i>R. o.</i> Dicertrunc	1	PISASVYQASQLIPDITLQIDAFLLIQQLKTVHNLQ-FIDDELMLEAETSPSANRKCQYE
<i>M. c.</i> Dicer2	59	RLEFLGDSLKLFIAIIRLYINFPFSNEGELHHLRIRVVCNRRALYRSARLKEFYRYVTSQA
<i>R. o.</i> Dicer1	59	RLEFLGDSLKLFIAIIRLYINFPFSNEGELHHLRIRVVCNRRALYRAAKRLKEFYRYVTSQA
<i>M. c.</i> Dicer1	61	RLEFLGDSVLKFFITSTYVEVTLPISTNEEELTESRRRMISSNTALFKSAIQLRLEVEYICSON
<i>R. o.</i> Dicertrunc	60	RLEFLGDAVLKFFIVSSYLYAKYPTYSEELTSLRQVMTSNKSFANIAKDLKLHRYTISQS
<i>M. c.</i> Dicer2	119	FNRRWRPPGFTSPADNCEITDGLRKYHKLSDKTLADIVEASLGAAAYLS-----NGL
<i>R. o.</i> Dicer1	119	FNRRWRPPHFTSTADNADTMSLKKHKLSDKTLADIVEASLGAAAYLS-----SGL
<i>M. c.</i> Dicer1	121	LPRRFRPPNYLCKDSDAEMIKSLTYHKLSDKTLADIVESLGAAYLSCLGDKKQGDQAL
<i>R. o.</i> Dicertrunc	120	TVRRFRPPHFQNVLDSENKIKHWLTHLVSNDTLADIESVGAAYLS-----QSI
<i>M. c.</i> Dicer2	170	EGSLHFAIQLOIPFDEIKTWDDFKPTFEESRKOVPARAEVFRALR---SIDLPKVKIVGR
<i>R. o.</i> Dicer1	170	EGCLHFAIQLOIPFDIEKWSDFNVAFEESRKAIVPPRAEVFRALR---MIDLPKIQVIVDR
<i>M. c.</i> Dicer1	181	NEALHTTQRLLVPMQKMEQWSDFTIIRERDRNKQLKMAAYDPLFDQRIDKPKVSRILGY
<i>R. o.</i> Dicertrunc	171	DGALYRATQLKPLGSIKQWSDLRHITPSPASATGQIN-----IDVIVVGEMLGY
<i>M. c.</i> Dicer2	227	EFKPLLVEALTHASLPNSTSPCYORLEFLGDAIF
<i>R. o.</i> Dicer1	227	EFNKPLLVEALTHASLPNSTSPCYORLEFLGDAIL
<i>M. c.</i> Dicer1	241	EFQNEALAEALTHASVINSVPCYORLEFLGDAIF
<i>R. o.</i> Dicertrunc	222	QFKNYLLVQEAALTHGSVMDSLVPCYERLEFLGDAIL

Figura 15. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas para los dos genes *dicer* de *R. oryzae* y el gen *dicer1* de *M. circinelloides* con el fragmento amplificado del gen *dicer2*. Sobre fondo negro aparecen los aminoácidos idénticos y sobre fondo gris los aminoácidos similares. Las líneas rojas indican las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados. *M. c.*: *M. circinelloides*; *R. o.*: *R. oryzae*.

III. 1. 2. Clonación y secuenciación de la región genómica completa del gen *dicer2*.

III. 1. 2. 1. Análisis de clones seleccionados tras hibridación en condiciones no restrictivas con una sonda del gen *dicer1*.

El primer paso en la clonación de la secuencia completa del gen *dicer2* consistió en el análisis de 27 clones (clones 1 a 27) del fago lambda que habían dado una señal positiva débil en el escrutinio, realizado con anterioridad a este trabajo, de una genoteca genómica de la estirpe silvestre de *M. circinelloides* en LambdaGEM[®]-11. El rastreo se llevó a cabo utilizando condiciones de hibridación poco restrictivas (55°C y concentración salina alta) y una sonda de 2,5 kb correspondiente a la región central del gen *dicer1* de *M. circinelloides*. Tras la selección de esos 27 clones, 20 calvas de cada clon inicial se sometieron a una

nueva hibridación empleando condiciones restrictivas (65°C y baja concentración salina) para asegurar la hibridación homóloga con el fragmento de 0,88 kb del gen *dicer2* aislado del plásmido pMAT1203 (ver Apartado III.1.1). En este nuevo análisis se obtuvo señal positiva para todas las calvas de uno (clon 20) de los 27 clones analizados.

El DNA de dos de las calvas del clon positivo se digirió con las restrictasas *EcoRI*, *XhoI*, *SalI*, *BamHI* y *SacI* de forma independiente. Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis y se hibridaron con el fragmento de 0,88 kb del gen *dicer2*. La digestión con *EcoRI* liberó dos fragmentos de aproximadamente 5,5 kb y al menos uno de ellos era el responsable de la señal observada tras la hibridación (Figura 16), si bien la secuencia del gen podía extenderse a lo largo de ambos, más allá de la región empleada como sonda. Así, se clonaron los dos fragmentos en el plásmido pBluescript, secuenciándose los extremos de ambos insertos. Se comprobó que sólo uno de ellos contenía la región homóloga al gen *dicer2*, a falta de su extremo 3'. El plásmido portador

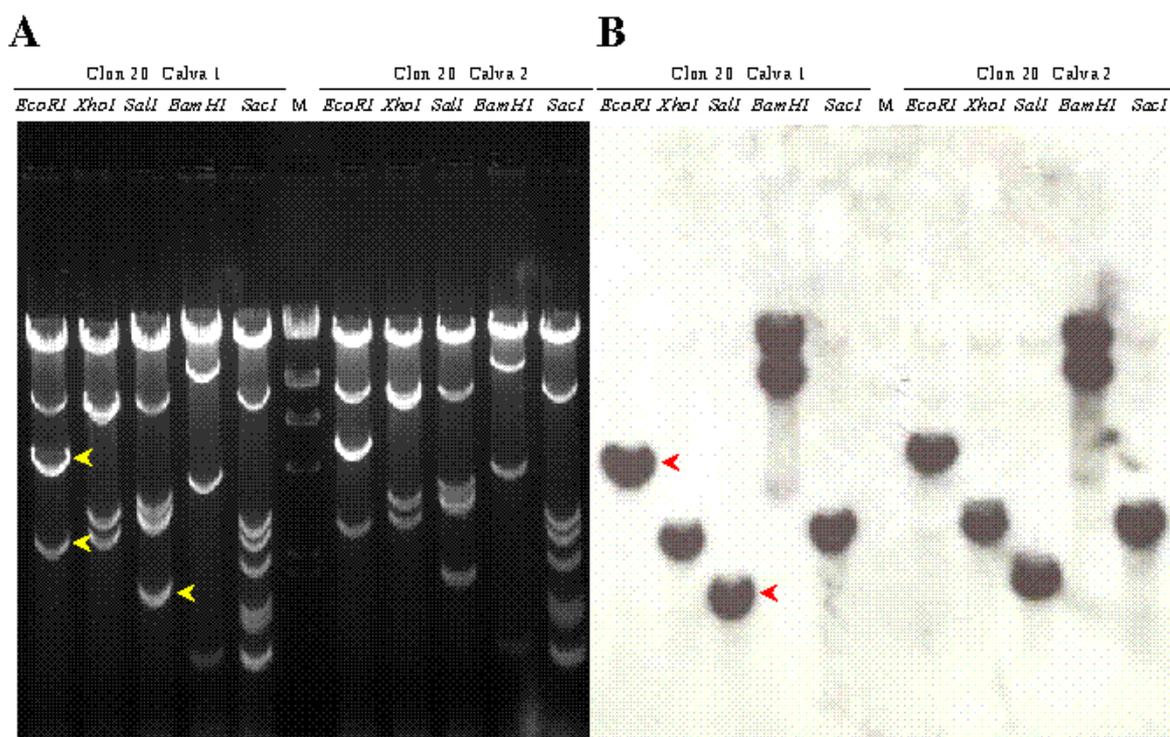


Figura 16. Identificación del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. Se muestra el análisis del clon genómico portador del gen *dicer2* identificado tras el estudio de 27 clones obtenidos en el escrutinio de la genoteca de lambda de *M. circinelloides* con una sonda del gen *dicer1*. (A) Patrones de restricción de dos calvas del clon 20 con las enzimas *EcoRI*, *XhoI*, *SalI*, *BamHI* y *SacI*. Las flechas amarillas señalan las dos bandas *EcoRI* de 5,5 kb, la banda *EcoRI* de 2,7 kb y la banda *SalI* de 1,9 kb que se clonaron para obtener la secuencia del gen *dicer2*. (B) Hibridación tipo Southern del gel presentado en A transferido a una membrana. Como sonda se empleó el fragmento de 0,88 kb del gen *dicer2* de *M. circinelloides* obtenido mediante amplificación con oligonucleótidos degenerados (sonda a, Figura 17). Las flechas rojas indican la banda *EcoRI* de 5,5 kb y la banda *SalI* de 1,9 kb. M: λ DNA/*HindIII* (Fermentas).

de este fragmento *EcoRI* de 5,5 kb se denominó pMAT1208. La clonación del tercer fragmento, de aproximadamente 2,7 kb, liberado con la digestión *EcoRI* de los brazos de lambda (Figura 16A), y la posterior secuenciación de sus extremos, descartó que la secuencia restante del gen *dicer2* estuviera contenida en esa zona y permitió deducir la disposición de todos los fragmentos de restricción obtenidos en el análisis inicial (Figura 17A).

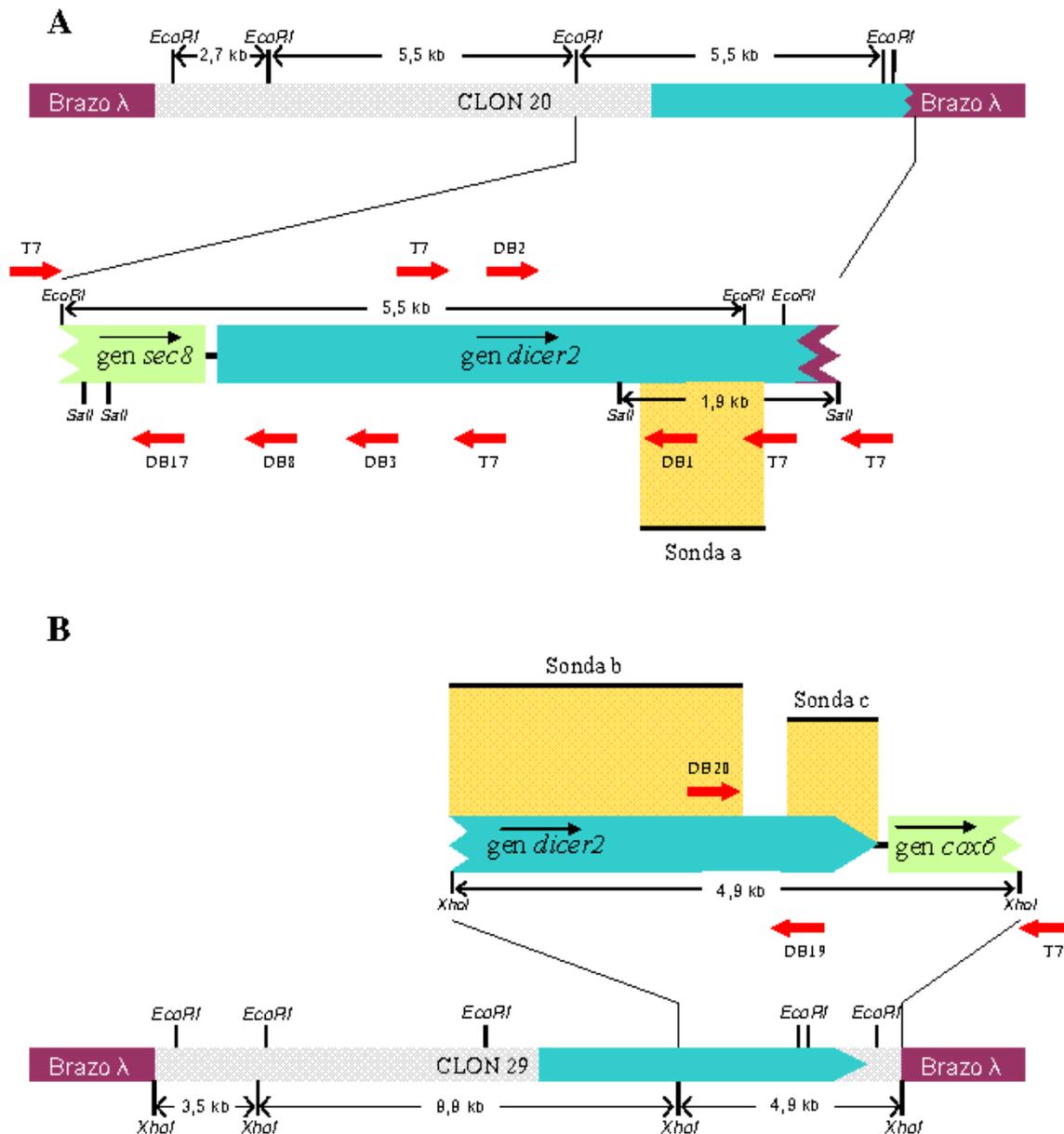


Figura 17. Esquema de la clonación de la secuencia genómica completa del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. (A) El clon 20 fue aislado junto a otros 26 clones utilizando como sonda un fragmento del gen *dicer1* (no mostrada) y fue seleccionado tras la hibridación con un fragmento del gen *dicer2* (sonda a) obtenido mediante PCR con cebadores degenerados. (B) El clon 29 se obtuvo en un rastreo *de novo* de la genoteca utilizando las sondas b y c. El clon 20 carece de los últimos 300 pb del gen *dicer2*; el clon 29 contiene el gen completo y las regiones genómicas adyacentes. Las flechas rojas indican los cebadores utilizados para la secuenciación.

Conociendo esa ordenación, resultó evidente que el extremo 3' del gen *dicer2* se encontraba adyacente a uno de los brazos de lambda. Si bien sólo las digestiones *XhoI* y *SacI* liberan completamente el inserto contenido entre los dos brazos del genoma del fago, la disposición del fragmento *SacI*, de aproximadamente 1,9 kb, que daba señal de hibridación en el Southern (Figura 16B) lo hacía candidato para contener el final del gen *dicer2*, en el caso de que éste se encontrase realmente en el clon de lambda aislado. La clonación y secuenciación del citado fragmento permitió ampliar la secuencia conocida del gen *dicer2*, si bien constató la ausencia del extremo 3' en el clon de lambda seleccionado y la necesidad de realizar un escrutinio de la genoteca *ab initio*, con el fin de conocer la región genómica completa.

III. 1. 2. 2. Clonación de la región genómica completa del gen *dicer2*.

El primer paso consistió en la titulación de la genoteca genómica de *M. circinelloides*, para lo que se infectó la estirpe de *E. coli* LE392 con diluciones seriadas de la misma, estableciéndose el título de dicha genoteca en $6,2 \times 10^3$ ufc/ μ l. A continuación se realizó una nueva infección que generó unas 10000 calvas repartidas en 3 cajas de 13,5 cm de diámetro (ver Materiales y Métodos). El escrutinio de la genoteca se llevó a cabo con una sonda de 2,5 kb del gen *dicer2* comprendida entre la región central y el extremo 3' (Figura 17B, sonda b). Se obtuvieron 16 calvas positivas (clones 28 al 43), cuya señal fue comparada con la obtenida en una nueva hibridación de los filtros con una sonda de 480 pb correspondiente a la región final del gen *dicer2* (Figura 17B, sonda c). Este fragmento, ausente en el clon obtenido en el primer rastreo, se obtuvo en un experimento de 3'RACE para determinar el extremo 3' del gen *dicer2* (ver Apartado III.1.3.1). Como resultado de la comparación de las señales de ambos rastreos se descartó uno de los 16 clones, cuyo DNA no había hibridado con la segunda sonda y por tanto debía carecer de la secuencia completa del gen *dicer2*. De las 15 calvas originales se aislaron 6 de forma individualizada (clones 28, 29, 34, 36, 40 y 41) mediante diluciones seriadas, con el fin de identificar los clones concretos responsables de la señal observada. Para ello, 35 calvas individuales de cada una de las 6 seleccionadas fueron sometidas a una nueva ronda de hibridación (ver Materiales y Métodos) con la sonda de 2,5 kb y en los 6 casos se obtuvo alguna calva que dio señal positiva. El DNA aislado de 5 de los clones positivos (clones 29, 34, 36, 40 y 41) se digirió de forma independiente con las enzimas *XhoI* y *SacI*,

y tras separar los productos de digestión mediante electroforesis, éstos se hibridaron con la sonda de 2,5 kb (Figura 18). Los resultados permiten concluir que el fragmento de aproximadamente 4,9 kb resultante de la digestión con *XhoI* del DNA del clon 29 debía contener el final del gen *dicer2* y la secuencia aguas abajo del mismo (Figura 17B). Este

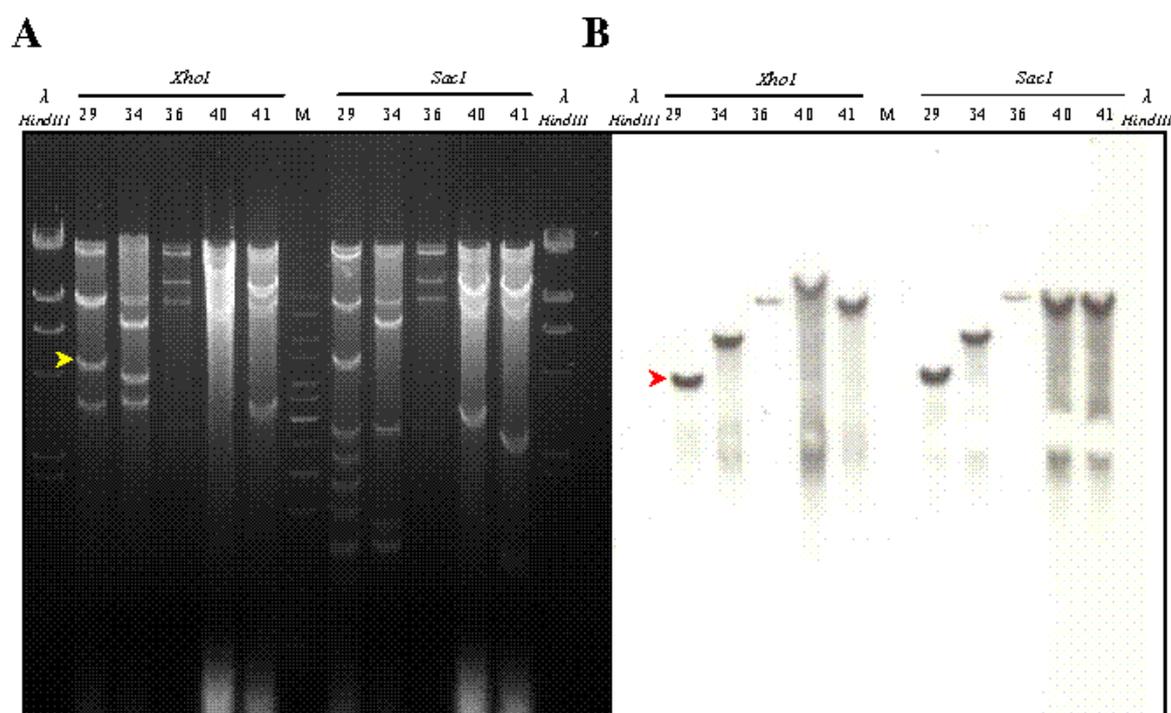


Figura 18. Análisis de los clones genómicos portadores del gen *dicer2* identificados en el segundo escrutinio de la genoteca de lambda de *M. circinelloides*. (A) Patrones de restricción de los clones 29, 34, 36, 40 y 41 con las enzimas *XhoI* y *SacI*. La flecha amarilla señala la banda *XhoI* de 4,9 kb que fue clonada para tener la secuencia completa del gen *dicer2* y la región genómica aguas abajo. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). (B) Hibridación tipo Southern del gel presentado en A transferido a una membrana. Como sonda se empleó un fragmento de 2,5 kb del gen *dicer2* que se extiende desde la región central del gen hacia su extremo 3' (sonda b, Figura 17B). La flecha roja indica la banda *XhoI* de 4,9 kb.

fragmento se clonó en el plásmido pMAT1208, que contenía el fragmento *EcoRI* de 5,5 kb con la mayor parte de la secuencia del gen *dicer2* y que fue construido durante la primera búsqueda del gen *dicer2*. La región de 4,9 kb comprendida entre los puntos *XhoI* sustituía ahora a la secuencia entre el punto *XhoI* que se encuentra en la región central del gen, y el punto *EcoRI* del extremo 3' (Figura 19). El plásmido resultante se denominó pMAT1220. La secuenciación del fragmento incluido en este plásmido con cebadores universales y específicos (Figura 17) permitió obtener un contiguo de 7941 pb que contiene el gen *dicer2* completo, incluyendo 5073 pb de la región estructural y las secuencias reguladoras (Figura 20). Aguas abajo del gen *dicer2* existe una pequeña región intergénica seguida de una nueva fase de lectura abierta que presenta una elevada similitud con genes *cox*. Esta familia de genes cifra distintas subunidades del complejo citocromo c oxidasa, el

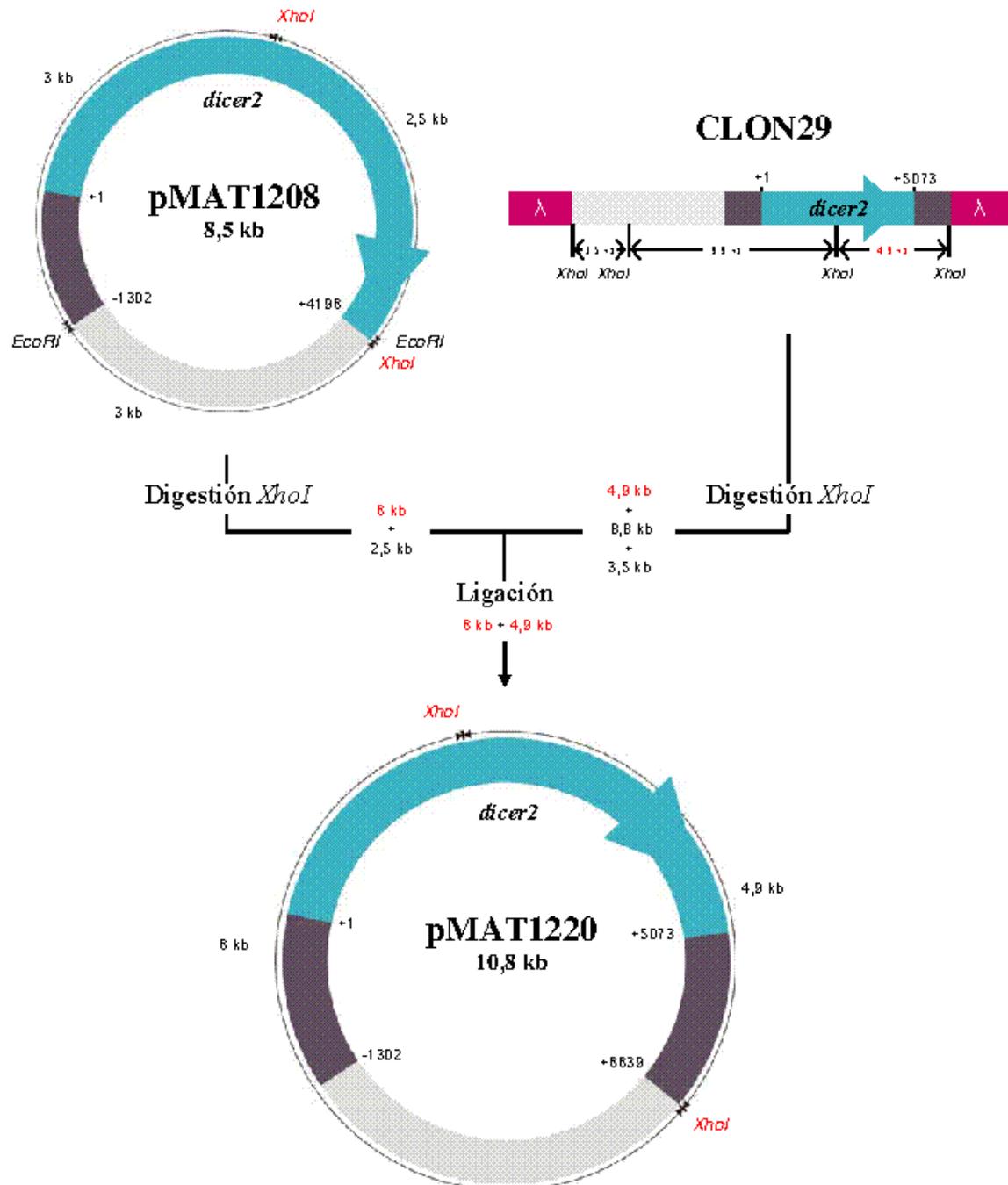


Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pMAT1220, que contiene el gen *dicer2* completo y las secuencias adyacentes. El fragmento *XhoI* de 4,9 kb del clon 29 se utilizó para sustituir el fragmento de 2,5 kb del plásmido pMAT1208, comprendido entre el punto *XhoI* localizado en el poli-linker y el punto *XhoI* presente en la secuencia del gen *dicer2*. En turquesa se indica la región codificadora del gen *dicer2* y en morado las regiones genómicas adyacentes. Los números indican posiciones de la secuencia del gen *dicer2*, siendo +1 la posición que corresponde al primer nucleótido del triplete de iniciación de la traducción.

componente terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Aguas arriba del gen *dicer2* y en la misma orientación que éste, se encuentra una nueva fase de lectura

abierta que presenta similitud con *sec8*, uno de los genes del complejo “exocyst” (Figura 20), responsable de que el proceso de exocitosis se lleve a cabo de forma asimétrica en las células eucariotas. En la región intergénica (334 pb) y aguas arriba del posible codón de inicio de la traducción del gen *dicer2*, se encuentran una región rica en pirimidinas de 52 pb y una secuencia CAAT (Figura 20), si bien carece de un motivo canónico TATAAA, algo que no es infrecuente en los promotores de hongos filamentosos (Kos *et al.*, 1988; May *et al.*, 1987).

Figura 20 (parte 1)

EcoRI
 ATC**GAATTC**ATCAAGGCGCTCAATCAATCTGTAAGCATTGTCGACTATGATGAGCTGCTGTACGCAGAAA
 CACTCAAACGTTTTTATAGGAAATCATCATGGAGCTGAAGCTCAAGAACGATCGCGTACTGGAATCCAGC
 GAGCTCATTTTTGACTCTAAAAAGCTGATTGCATTGGGCAGATTGTACCATACTCAAGTGGT TGTGC
 GAGAGATCTGGGATCTGCGTTCTGCGCACGTTCCACCTTCCATGATTACGTCGACACC CAAGCTCAATGC
 AGACAGAGATGACGAAGACTCCCCTGAAGTCAAGTACTCCAAGCGATGGTCGAGCGAAGAGACAAGACCT
 GCATTC AAGGAACCCCTGACAGCATCCAGCCTGTGCTTTACCCCTGAAAGGCGAGATTGCAAAGTAAG
 CCGTGTGGGGAGCGAGAGAGTATCACTTGTGGAAGTGTGGTTGTACTTATTTGTTGTGTAGACGTTTTGA
 TGC ACTCTTGACCACCTACCAGCAGCTTGCAGAGACGTGTTTGTTCACACTGAGATTGGAGGGACGTTGC
 CATACCATGTACTACTTGGAGATGGCTATCCGGGACGGAAACTACCACCTGGAAGACGAGACGT TTAGC
 CAGACCCATATGTGATTACACTCAATTCTGACTTGATGGAGCTGGATGATTGCATCAACGCATCCTTGCC
 GCCCAAAGACGAGCTGTTTGCATTTCGATGGATTACCAGGCCTCATTGTGCACATTTTGATTTTCAAGCG
 ACC TATATCAAGCGACTCAACAACAATGGCGTTCAAAGATGGCCAGAAACATCCTTGCCTGCAGCAGA
 ACCTCAGCAACTTTGTGCCTCTGTTCGCAATGCTCCATCATGGAGAGAGCAAGAGAGTACTACCAGCTGTA
 CAATCTGGGCAGCGAGGTGAGTAGCAGGACTTATGCTGTGTCACACATTATTGAT**TGA**TTTACACAATGT
 GCAGGGCATCATTAAATCCATCCAAGAAAACGGGCCCAAATTCACATTTGACGAATACCGCATCATGCTT
 GGCCTGATCCACGACATCAACCAGGAC CAGGACGACGAGCCAAAGAGCGCATTGGAGTCTGCCTCCTCCT
 CCAAGCTGGAGGAAAACCGAAAGAACAACAGCAATAAGTACAGTGAATGGCTGATGGAGTTGGT TGAAGT
 AATGGCAGACTATGAGAATTAAGCAACGCCTTTTTTTTGAATAAAAACCTTTTCTTGTTCCTTTTCTT
 TATACCCTTTTCTTTTCTTTTCTT**CAAT**TCAGCAAAA**ATG**AAGAAGCCCCAAGCCGGCGAAGGTG
 ATTTGGGCGACTATGTGGATCCACCGTCAAGTACGTTCCGTTGGAGCCTGT TCCCAACACCATGAACGA
 CATTGACCCTGCCATTTTGGCAAAGTACCTGGATCCTGAGTTCATTGATGCACAGCCGGATGAAAAGACC
 AAATTGATGGAGCAATTGGAGCTGGAAGCCAAAAGAGAGAA TGGACATAGACTTTGATT TAGACGACGATC
 TAGAGCAAGAAATCGAGGACGAGAAC TCAAAGCTGCCCGCTACAGCCGCGGAATACCAGTATGAACT
 ATTACCAAAGCGCTAGAGGAAAACATCATTGCGGTGCTT GACACAGGCTCAGGCAAAACGCTCATTTC
 ATCATGCTGATCAAGCAGATGGTGCTGCAAGAGCGACAAGAGCGACTGACAAGACGAGAG**GTA**AATGCGT
 INTRÓN I
AGCTTGCTTCCATTTCATGCCTGTTTATACTCAACTATCCAATCATAGACAAAACCTTGCTTTTCTTGGT
 GGATCGTGTGCCGCTGGTGTTCAGCAGGCCAGTGTGATCAGAGCCAATTGC GACGTCAATCTGGAGGAA

Figura 20 (parte 2)

ATTTGTGGAGAAATGGAAGTGGATGCCTGGTCCGAGAAGCGCTGGAAGCTGATCTTTGAGGAGAACGATG
 TGTGTGTCATGACAGCCAGATTTTTTTGGATACACTGCACCATGGATTTATCAGCTTGGAGAAGGTAGG
 INTRÓN 2
 GGGAGGGGTGAATGGACTCGGCA CGCATA CGCACGC CATT TTAAGGGGATATTAAACGCTATACCTGAC
 AGGCGCACCTCTTGATT TTCGAC GAATGCCATCATGCGACC AAAAAACACCCCT TCAACCTGATTATGCG
 GGAGT TCTATGACAGATGTCCGCTGGAACATCGGCC CAAAATCTTTGGCATGACCGCATCGCCCATGCAC
 GCTCGAACCACAGTGAACCGCAGTGTGCTCAGCTGAAAAGAACCTGCATGCCAGAGTCTACACGGCAA
 CCAACATGGAGAGCCTCAACATCAGCATCCCGAAACCAAGAGAAATCTCGATCCACTATGACCCGACGCC
 TCGCTACGAGGAGACAGAAATGTGAAAAAGATCAGAGAAAAGCTGGGGTCCATCGGGCGCTACAAACGC
 TGTTTTATCATCACACAAGACAT TCTGACTAGCCTTGGCCCGTGGTGCAGCGACCGCATGTGGAAGAGCA
 TGCTGTCTGAGCTGGAGCGAAAGATGACCAACATGACACAGGATTTGGAGCGAGACGCCCTGATTGACGA
 GGATCTCGCCCTGAAAGAAACGCACGAATACGTGGATCCAATCGAGTTTCCTCGCAATCCCGATATCTTT
 GACCAAAGTCTATTCTCTCCCAAGGTAGCCGAGCTGATTGCGCTACTGCAGTTCACATCAGAAAAGATAC
 CAGACTTTTGTGCATCATCTTTGTGGAACGAAGACACACAGCCAAAGCTCTCCAAACGCTGATCGCGTC
 ACTTGACAGGCTGAAGGATATCCGCTGCGAAAGTCTGACTGGCCACGGATCCACGGAAGAAGGCGATGTG
 CAAATGACATTTGGCGACCAAAACAAAATCATCCAAAAGTTTCAAGAGCGGCGAGCTCAACTTGCTGATTG
 CAACCAACGTAGCAGAA GAAGGTCTGGATA TCCAAC CCTGTAACGTTGCTTTTCTGCTTCGACTTTTTTCA
 TACCTGATTTT CGTATA TCCAAT ^{XhoI}CTCGAGGACGAGCACGCAAGGAGGGATCCAAATTCAT TATCCTGACA
 GAGGC CAACAATGCAGGTCAAGAAGACACA CTGGCAGAGTTTTCAAGGCTGGAGGCTGACATGAAGGCGT
 TTTGC CAGACAATGCCAGAGGAGCGAAACGTGGCCAGGAAATACGCCATTAGCATGGACGTGGACTACGA
 CTCTGACGAGGATTACATTTTCAGACGAGGAAGAGAACTTTTTGGCAGATGCATT TATTGTCCCTGAAACA
 GGCGCCACCATCACCAAACAGAA TGCGGTGCCCTTGATT CACAAGTACTGTAGT TCACTTCCCTCCGACA
 GTTTCTGTGTGCTAAAGCCCATCTTTGAAAACATTGTCACTGGAGAGGGCTACATCTGCAAACCTGACT
 GCCAAGCAACGCACCCTTCCAGGAGATGGAATCCACGCTCTGCGGCTCAAAGGACCTTGCAAGAGCATCC
 GTGGCGCTAAACGCATGCATTTCGTCTGCGCGAACTGGACGCC TTGGACAAGCATTTGCTGCCTCGTAATC
 TCAAGAGAGAAATCTGGGCGACATGGCGCCTCAGTACGATGAAAATGGCTATATCATTGGTAGTAGACG
 TCGTCATGGTCTGTATGAAAAGCGAACGCC CAAATTCTGGGAGAGGCC TCGCCTGAACGAGGAGGAG
 GAAGAAGAAGAGATTGGCGTGAAGATAAC CCGGATTTATTGAAAGCGCAAGTGCAAACACAGCCATCT
 CTGATAGAAAGCCACCGGTCCAACTCCAAATGAAGATGTGCTTATGGAAGAAGCCGCAGAACCAAGTCA
 AGATGTGCCCATGGAAGACGCCACAGAACCAAGTCAAGATGCAGTTGCTCCGCAAGTCAATGGTGTGCT
 CATGGCGAGGAATCGGCACAAGATCAACAGGCTGAAAGAAGAAATGGAA GAAGTGAAGAAGTGAAGAAG
 TGGACGAAGTGAAGAAGA ACTAGGCGAAGGTCTTTCTCTTGTATT TTACAGTATTCGAGGTGCAACT
 TCCAGACAACAAATTTGATCATATACCCCTCCGCTCGACTCTGTTTGATCTCAAAGAAACCCTCCCCACC
 TTATCCGACCTCAAGCTCTTTCAAAAAGCATGCCATTCTACGTCCACCTGCGCAACATTAGCACAGAAA
 TCATGTTTTGATCGCGAGAAGATTCTGCTGTATCAGAGTACATGAAGAAGCTGATGACAGCGCTAATCAA
 CAAAGTGTTCATTGCCCTATTGTGGAGAT TCCCTACTACAT TGTTCCCTGGTCAAACACTGCGAAAAC
 ACAGCATTGAGACATTAGCGCTCACAGACTTTGAAACACTGATCGATTGGGGCGAGATTGACAGAATCA
 TCGAATCCACATCAAGGCCATTACACTCGACGATTATGACCCACAGACAGTATCGTGGTAGATCAGTC
 AGACAACATGC GCCGTTACTTTGTGACCAACGTGAGAACAGACATGAGCCCGCTGAGTCCCGTGCC TGAT

Figura 20 (parte 3)

GGTGTCAAAATCCGAGAACTGGATACGCGTCTTTGCTGATTACTACAATGAAAAGAAATTTGTGGAAG
 AGTTGGATACCAGCCAACCGATGCTGGAAGTCAAGCGCTTGAAAAAGGTCATGAACTTTCTGTACCCAGG
 CAAACCGTGCAGAGTCAGATGAAGGGCCCAATGTCTACCTGGACAGTGCCTAGCTTTTGTCAACGATTC
 TTTATGAGTGCAAGCGTCTATCAAGCAACCATGATGATACCCCTCCATCATGACTCGCATCGATTCAATTC
 TGCATGTCGCCAATCTGCCGAGAGATACGATTGCCCCATTGATGATGCCAACATGCTGGAAGCCTATAC
 AACGCCGTCTGCAAAACATGGAGATGAACTATGAACGTCTTGAAACACTGGGTG**GTAAGTTGGCGCTGTGC**
INTRÓN 3
TTGGCCCATGTTCGCTTGGTTTACTCATATCCGCCCTGTAGATTCACTGCTCAAGTTATTGCGACGAT
 TCGTCTCTACATCAATTTCCCTTTTCCAGTAATGAAGGTGAACTGCATCACTTGCCTATCCGTGTCATTTGT
 AACAGAGCATTGTATCGATCCGCCAAGCGTCTCAAGTTCACAGATATGTCACCAGTCAAGCATTCAACC
 GTCGTTACTGGCGTCCGCCAGGATTCACGAGTCCAGCAGACAACCAAGAGACGATTGATGGCTTAAAATA
 CCACAAATTATCTGACAAGACACTCGCTGATATGTCGAAGCTTCTTTGGGTGCTGCCATCTCAGCAAT
 GGTCTGGAAGGTGGTCTTCATGCTGCTATTCAACTCCAAATTCCTTTGACGAGATCAAGACCTGGGACG
 ACTTTAAGCCTACCTTTGAAGAATCTCGAAAGCAAGTGCCTGCGCGTGCCGAGGTGAGAGCCCTACGTAG
 CTTGGATTTGCCCAAGGTGACAGAGATCGTGGGCCGC**EcoRI****GAATTC**CAAGACACCTTTGTTGATTGTGGAAGCA
 TTAACGCATGCCAGTTACCCAACTCCACATCACCTGTACCAACGTCTGGAATTTTGGGTGATGCTA
 TTCCTGATTCATGGTCATTCGCTATCTATTCCGCGATACCCAGATGCAGATCCAGGTATCATTACTGA
 TCTCAAAGATTCTTGGCTCAACAACCATATCTTGGGTATCGTCTGCATCGAAACTGGCTTGTATAGACAC
 ATTATTCATTAATCTGGCAAGTTGATCCGTGCCATC**EcoRI****GAATTC**TTTGTGAGCGAGGTCGAGGAAACCAAAG
 CCAGGGGCGAGGCAGTGGGTGAATACTGGGTGGATTTCAACATCCCAAGGTCTGTCTGATGTCGTGGA
 AAGTATGCTGGGTGCTACCTTTGTGGATGCTGGCTTCCGTCTGGAGGCTGTCGAAGAATTGTTTCCAAA
 TGGTTCCTGCCCATCTTGAATAACCACGTTACTCCTGAATTAATCAAGTTCCATCCAT**Final del clon 20**
 TCACTGATTGCAACGATTGGCTGTGATAGTTTCATGTTGAG**GTAAGATTGATATGATTGGCCCA**
INTRÓN 4
TAAACATGCACACTCATGTGTTGCCATAGAAACCACGGCTCTGGTGAACCTGGACCTGAGAGCCAG
 AAATGTGTAATCTTCTTGCACGACAAAACCTCTGGCTACCGGGTCCGACTGGAACATCAAGACGGCTCGTC
 GACACGCTGCCACTAAAGCGAGCCAAAGACTTGCAGATGAACCTGGTCTTTTGGAAATCATCTGTAACCTG
 CAGAGTGTCTGATGATCAAGCGAGGCTTGTGAAAGGACGATCGACTTCAGAAGAACCTGGATGATGATGAA
Fin de mensaje dicer2
 TACGACCCT**TAG**ACAGAAGAAGAGGCCATCTCATCACGTGCATTGTTAATGGCCGTCCCCGGTTTAAA
 TTTTGCCAGTTAA**AA TAAA**ATTTGTTTGTCTTTTCTCTTT**T**TTTCTCTGTATTTTATATAACACCCTCC
Inicio co.r6
 CCACTCGTCTTATTTATTATTATAAT**ATC**CTTCGTGCTGCTTTTACTGGTGCTGCTC**CCCGT**GTGCTG
 TTCGCTCAGCTGCTCCTGCTGCTCGTCCCATGGCCATTGGTAAAATTTTGTATATAGCTTTTGAATTTGGA
 TGTGTAGCAATTAACATTTGATGTTTCTGTCATTTTACATAGCTATGGGTAAGCGTTTATTCCGCCG
 GTCATGAGGATGAGAGCTTCGAATCTTCACTGAACGTTATGTCAAGTTTTTTCGATGGTGTAGAGGATCT
 TTTCGAACTTCAACGTGGTTTGAACAAAGCCTTTGCTTACGATCTTGTCCCCTCCTTCTGTTATTGAA
 GCTGCTCTCAAGGCCCTCGTCTGTCGATGATTTGCCACTGCCGTCCGTGCTTTGAAGGTCTCAAGG
 ATAAGGTTGAAAGCGACAAGCAATACAAGGAATACCTTGATGAATTGGCACCATTAGAAGTGAATTGGG
 TATCTTGACCAAGGAAGAATTGAGCCAGTAAATCGATAGTTTTTATACATGTAAAAAGGAAAAATAAAC
 GATATAAAGAAATACACAGATAAACGATCATGTTCCAGGGAAATGCTGCTTGAGAGTCTGCTGGATTTACT
 AGTAAACTTTGATATGAAGTACACATATTTGTCCTTCATCTACAGAGAGTGAGCTGATTTTTTCTTAATT

Figura 20 (parte 4)

TCTTCCTTGCCACATATTGCAACATTTTACGATTTTTGACAATGGGCCAATCTTGAGCTTTTCATCCGGG
 GTAAGTCCGCCAATAAAGTGACGTCGAGAACATTGCCAGGTTTGAAAGTGAGAGATGCGTAGTTGGCCT
 TATATAAGAAAAAGTTACCTGCTTTTTAACAGACACCTTTCTTTCATCAAGAATCAACATGTTGTCTCG
 TTTAGCTCAGGCCAGCAGCCGCAATGGTGTGCTGCTGTTTTCAGAGAAATGCAATGAGAGGACCTCTATTCAAC
 AGACTCAATCGCACCACATCTATCTTACGCAAAGACATTTCGCAAATACCTTTCTGACAAGGAGCCCCCAA
 AGAAGAAGGATGATGAACCATTCAATATCCCCAAGGGATTTCGAGAGTTTCTTTGGCAAACAGTCTGGAAA
 GCAAGCCAAGCAATCAGCCGAGGAAGCAGCATCCAAGCACTCAA^{EcoRI}GAATTCAGCTGATCAAATACCTAAA
 CCTCTCCCAAGGGCGGCAACAGCAACAATGGCGGAGGCAACAAGCCTCCAGAGGTCAATGTCAATATGA
 ACATGGTGTGGGTACTGCAGTAGGTACTTGGCTCTTGTGGAAGATGACTACACCAGCAGATTCATCCCG
 AGAAATCACTTGGCAAGGATTCCTGTACACAGTTATTAGACAAGGGACTCGTGGATAAGCTCGTCGTGCTC
 AATCGCAACAGAGTTTCGAGTGTATTTGAGATC^{Final del clon29}CTCGAG^{XhoI}

Figura 20. Secuencia genómica completa del gen *dicer2* y regiones adyacentes. Se indica el final de los clones 20 y 29. Naranja: secuencia del gen *sec8*. Rojo negrilla: sitios *XhoI* y *EcoRI*. Fondo rojo: codones de iniciación y fin de mensaje. Turquesa: posible región promotora con la secuencia rica en pirimidinas subrayada. Fondo amarillo: secuencia CAAT del promotor. Negro: secuencia del gen *dicer2*. Fondo violeta: secuencia de los intrones determinados mediante RT-PCR (**apartado III.1.3.2**). Fondo turquesa: secuencia de poliadenilación y sitio de poliadenilación. Verde: secuencia del gen *cox6*.

III. 1. 3. Análisis estructural del gen *dicer2*.

Una vez clonado el gen *dicer2* de *M. circinelloides*, se inició el análisis estructural del mismo, con objeto de determinar el final de la secuencia transcrita del gen (extremo 3'), identificar los intrones y establecer la secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2.

III. 1. 3. 1. Determinación del extremo 3' del gen *dicer2*.

La secuencia del gen *dicer2* presenta un sitio canónico de poliadenilación AAUAAA, 71 pb aguas abajo del presumible codón de fin de mensaje (Figura 20). Sin embargo, el sitio donde se añade la cola de poliA no se puede deducir de la secuencia del gen.

Para determinar el extremo final del gen se realizó un experimento de amplificación rápida del extremo 3' del cDNA (3'RACE). El cDNA se obtuvo por retrotranscripción con el oligonucleótido RACE-T (Roche) de RNA total procedente de cultivos de la estirpe

silvestre de *M. circinelloides* crecidos durante 24 horas en medio líquido. En una primera reacción de amplificación se utilizó el cebador específico DB10, situado a 562 pb aguas arriba de la secuencia de poliadenilación (Figura 21A). El producto obtenido se empleó como molde de una segunda amplificación en la que se utilizó el cebador interno DB9, localizado 431 pb aguas arriba de la secuencia de poliadenilación. Como resultado, se obtuvo un producto mayoritario de aproximadamente 480 pb (Figura 21B), que fue clonado en el plásmido pGEM-T para dar lugar al plásmido pMAT1214. La secuenciación del citado fragmento confirmó que pertenecía al extremo 3' del gen *dicer2*, y permitió establecer el sitio de poliadenilación 23 pb aguas abajo de la secuencia AAUAAA (Figura 21A).

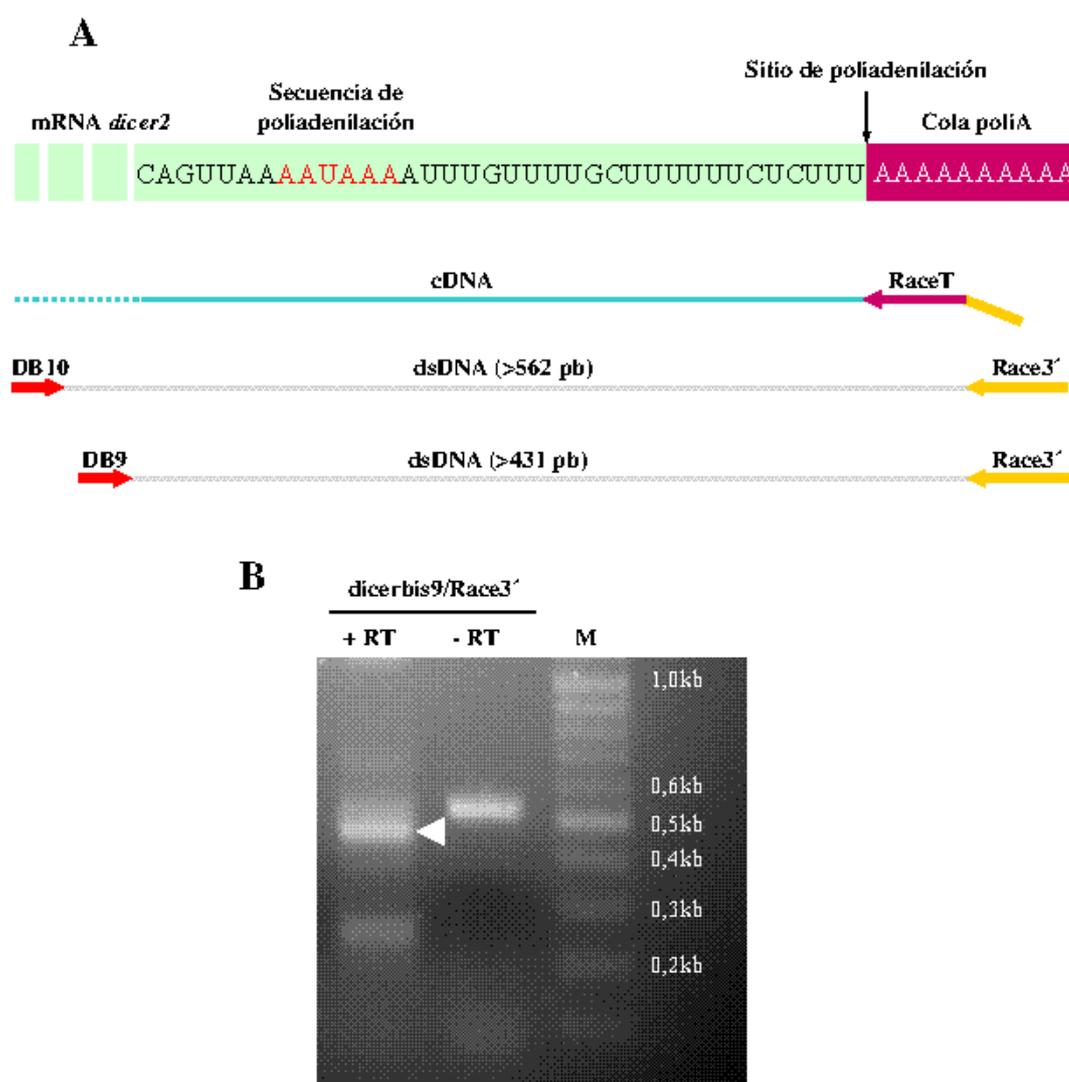


Figura 21. Experimento de 3'-RACE para determinar el extremo 3' del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. (A) Representación esquemática de la estrategia seguida para amplificar el extremo 3' del gen *dicer2*. (B) Fragmento de aproximadamente 480 pb amplificado con los cebadores DB9 y Race3'. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

III. 1. 3. 2. Localización de los intrones del gen *dicer2*.

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia genómica del gen *dicer2* con otras proteínas Dicer reveló la posible existencia de intrones en la secuencia, ya que existían varios marcos de lectura abierta, en distintas fases de lectura, que mostraban similitud a distintas regiones de las proteínas Dicer. El análisis detallado de la secuencia sugería la existencia de cuatro intrones (Figura 22A). Para confirmar la presencia de los intrones predichos, así como para determinar su localización exacta, se compararon distintas secuencias de cDNA obtenidas mediante RT-PCR con la secuencia genómica del gen *dicer2*.

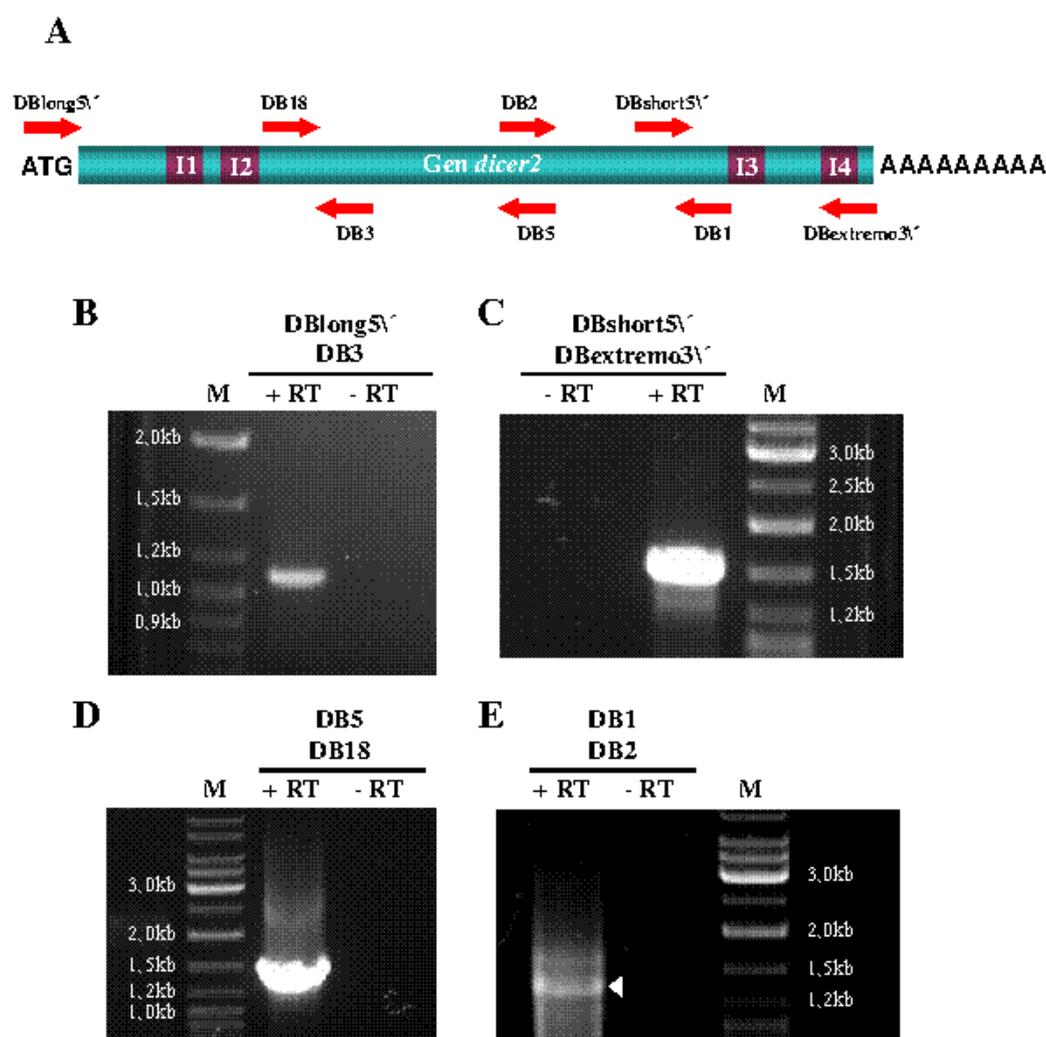


Figura 22. Localización de intrones en la secuencia del gen *dicer2*. (A) Posición de los cuatro intrones (rectángulos violeta) en la secuencia del gen *dicer2* y de los cebadores utilizados para su análisis (flechas rojas). (B) Producto obtenido en la RT-PCR para el análisis de los intrones 1 (I1) y 2 (I2). El fragmento de 1087 pb amplificado carece de los dos intrones. (C) Producto de RT-PCR obtenido en el análisis de los intrones 3 (I3) y 4 (I4). (D y E) Productos de la RT-PCR realizada para confirmar la ausencia de intrones adicionales en la región central del gen *dicer2*. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

La existencia de los dos primeros intrones (I1 e I2) se confirmó mediante una reacción de retrotranscripción con el cebador DB3 en la que se empleó como molde RNA total procedente de la estirpe silvestre crecida durante 24 horas en medio líquido. El producto obtenido se sometió a una amplificación con los cebadores DBlong5' y DB3, que rindió un fragmento de 1087 pb (Figura 22B). Tras la clonación y secuenciación de esta banda se comprobó la ausencia de los dos intrones, pudiéndose concretar su localización precisa (Figura 20).

La presencia del tercer y cuarto intrón (I3 e I4) quedó establecida a partir de una retrotranscripción con el cebador DBextremo3' y la amplificación posterior con los cebadores DBextremo3' y DBshort5'. El producto de esta RT-PCR fue una banda de 1482 pb (Figura 22C). La clonación y secuenciación del fragmento amplificado permitió localizar con precisión los dos intrones del gen *dicer2* en la secuencia genómica (Figura 20).

Una última reacción de retrotranscripción con el cebador DB1 permitió descartar la existencia de intrones adicionales en la región central del gen, que había quedado excluida en los análisis anteriores. La amplificación se llevó a cabo con los cebadores DB18 y DB1 pero, debido al bajo rendimiento de la reacción, el producto obtenido se utilizó como molde de dos nuevas amplificaciones con las parejas de cebadores DB18-DB5 (Figura 22D) y DB2-DB1 (Figura 22E). Los dos fragmentos amplificados, que abarcaban toda la región estudiada, fueron clonados y secuenciados, lo que permitió constatar la ausencia de intrones en la región central del gen *dicer2* (Figura 20).

Intrón	Tamaño	Extremo 5'	Extremo 3'	Secuencia interna
1	57	GTAAAT	TAG	TACTCAA
2	77	GTAGGG	CAG	-----
3	59	GTAAGT	TAG	TACTCAT
4	53	GTAAGA	TAG	CACTCAT
Consenso	-	GTANGT	PyAG	PyGCTAAC

Tabla 11. Características de los cuatro intrones presentes en la secuencia del gen *dicer2*. En rojo y en azul se muestran los nucleótidos altamente conservados en otros intrones de hongos filamentosos. Py: nucleótido de pirimidina.

Los intrones del gen *dicer2* presentan las secuencias 5', 3' y secuencia interna características de intrones de hongos filamentosos (Gurr *et al.*,1987) y que se encuentran también en otros genes del género *Mucor* (Benito *et al.*,1992) (Tabla 11).

III. 1. 3. 3. Secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2.

La secuencia completa de la proteína Dicer2, deducida de la secuencia de nucleótidos del gen, consta de 1608 aa (Figura 23), extendiéndose desde el codón ATG situado inmediatamente después de la posible secuencia promotora hasta el codón de fin de mensaje TAG situado 71 pb aguas arriba de la secuencia de poliadenilación (Figura 20).

```

MKKPQAGEGDLGDYVDPTVKYVPLEPVPNTMNDIDPAILAKYLOPEFIDAQPDEKTKLMEQLEL
EAKERMDIDFDLDDOLEQEIEDENLKAARLQPREYQYELFTKALEENIIAVLDTGSGKTLISIM
LIKQMVLOERQERLTRRETKLAFFLVDRVPLVFQQA SVIRANCDVNLEEICGEMEVDAAWSEKRW
KLIFEENDVCVMTAQIFLDTLHHGFI SLEKAHLLIFDECHHATKKHPFNLI MREFYDRCPLEHR
PKIFGMTASPMHARTTVERSVAQLEKNLHARVYTATNMESLNISIPKPREIS IHYDFTPRYEET
EMSKKIREKLGSI GRYKRCFIITQDILTS LGPWCSDRMWKSMLSELERKMTNMTQDLERDALID
EDLALKE THEYVDFIEFPRNPOIFDQSLFSPKVAELIRLLQFTSERIPDFCCIIFVERRHTAKA
LQTLIASLDRLKDIRCESLTGHGSTEEGDVQMTFGDQNKI IQKFRSGELNLLIATNVAEEGLDI
QPCNVVFRFDFFHTLISYIQSRGRARKEGSKFIILTEANNAGQEDTLAEFSRLEADMKAFQTM
PEERNVARKYAISMDVDYDSDEDI SDEEENFLADAFIVPETGATITKQNAVPLIHKYCSSLPS
DSFCVLKPIFENIVTGEGYICKLILP SNAPPQEMESHVCGSKDLARASVALNACIRLRELDALD
KHL LPRNLKREILGOMAPQYDENGYIIGSRRRHGLYEKRTPKFWRPRLNEEEEEEEIGVEDN
PDLLKAQVQNTAISDRKPPVPTPNE DVLMEEAAPSQOVME DATEPSQDAVAPQVNGVAHGEE
SAQDQQAEEEMEEVEVEVEVEVEVEEELGEGPFCYFTVEVQLPDKFDHIFLRR LCLISKKPF
PTLSDLKLFHKSMPFYVHLRNISTEIMFDREKILLSEYMKKLM TALINKVFHCPIVEIPYYIV
PLVKHCENTAFETLALTDFTLIDWGEIDRI IESTSRPFTLDDYDF TDSIVVDQSDNMRRYFVT
NVR TDMSP LSPVPDGVKIRETGYASFPADYNEKKFVEE LDTSQPMLEVKRLKKVMNFLYPGKPS
QAQMKGPMSTWTVPSFCQRFMSASVYQATMMIPSIMTRIDSILLCRQSAERYDLPIODANMLE
AYTTPSANMEMNYERLET LGDSL LKFIATIRLYINFPFSNEGELHHLRI RVICNRALYRSAKRL
KFYRYVTSQAFNRRYWRPPGFTSPADNQETIDGLKYHKLSDKTLADIVEASLGAA YLSNGLEGG
LHAAIQLQIPFDEIKTWDFKPTFEESRKQVPARAEVRLRSLDLPKVTEIVGREFKTPLLIVE
ALTHASLPNSTSPCYQRLEFLGDAILD F MVIRYLFARYPDADPGIITDLKDCVNNHILGIVCI
ETGLYRHHIIFYSGLIRAEFFVSEVEETKARGEAVGEYVDFNIPKVLSDVVESMLGATFVDA
GRLEAVEE LEAKWFLPILNNHVTP ELIKFHPLRKLITDLQRFGCDFMLRNHGSGETGPE SQ
CVIFLHDKPLATGSDWNIKTARRHAATKASQRLADEPGLLESICNCRVSMIKRGLMKDORLQKN
LDDDEYDF

```

Figura 23. Secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides*. Verde oliva: dominio DEXDc (DEXDc/DEAD/DEAH). Turquesa: dominio helicasa HELICc. Gris: dominio de unión a dsRNA, DUF283. Violeta: dominio PAZ. Rojo: dominios RNasaII. Amarillo: motivo DSRM.

El peso molecular estimado para la proteína Dicer2 es de 185 kDa, y su punto isoeléctrico 4,97. El análisis de la secuencia en la base de datos de dominios conservados del NCBI (Conserved Domain Database) y EMBL-EBI (InterProScan) pone de manifiesto la existencia de siete dominios conservados: dos dominios helicasa, DEXD_c con sitio de unión para ATP (SMART, $E=3.6e^{-22}$) y HELIC_c (PFAM, $E=4.2e^{-19}$), un dominio de unión a dsRNA, DUF283 (PFAM, $E=3.6e^{-18}$), un putativo dominio PAZ (PFAM, $E=0.11$), dos dominios RNasaIII (PFAM, $E=9.6e^{-34}$ y $E=3.3e^{-31}$) y un posible dominio DSRM (PFAM, $E=0.98$). La disposición de estos dominios en la estructura primaria de la proteína, así como la función de cada uno de ellos, quedan detallados en la Figura 24. El análisis

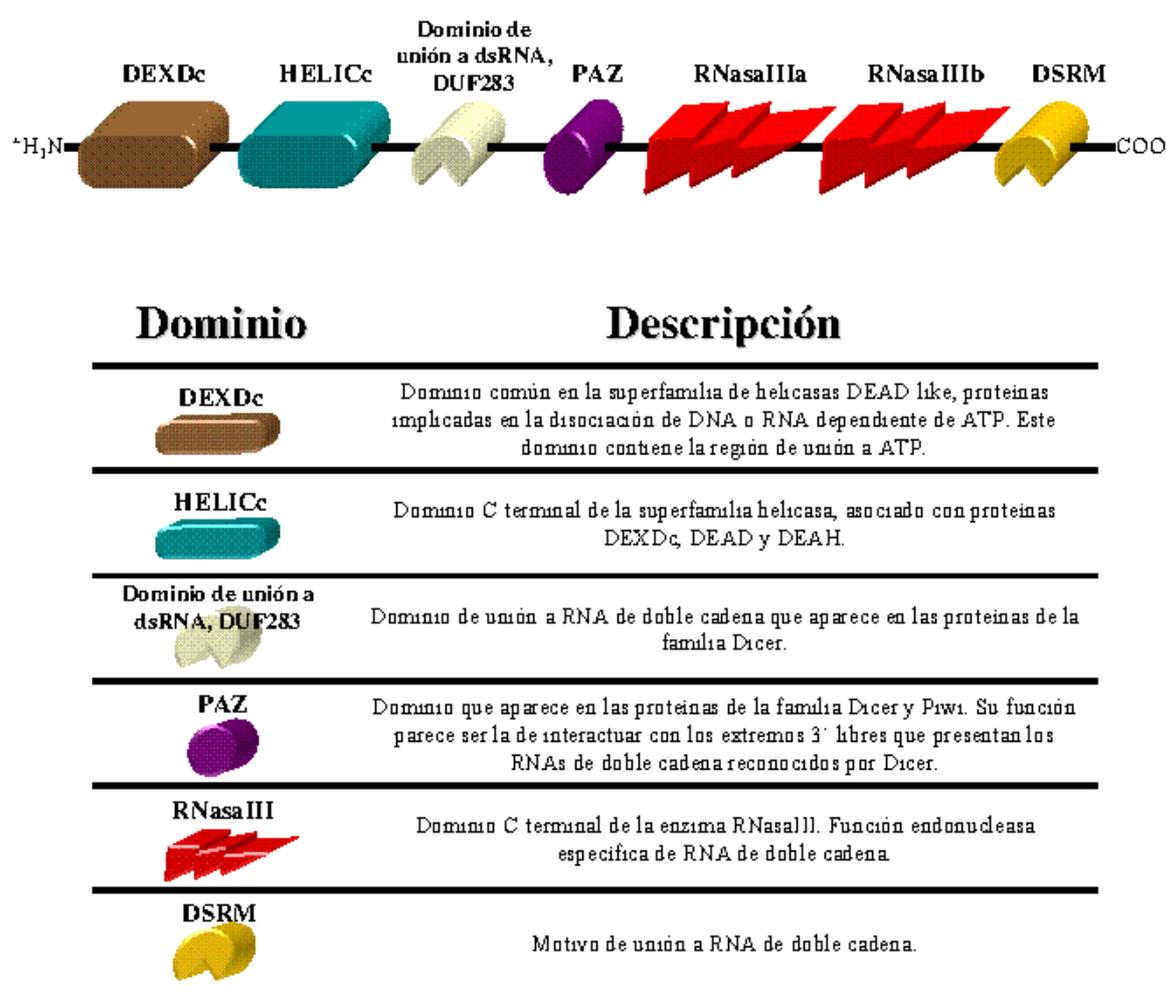


Figura 24. Esquema de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides*. La figura muestra todos los dominios presentes en la proteína Dicer2 y una breve descripción de cada uno de ellos.

mediante BLAST de la secuencia de aminoácidos derivada del gen *dicer2* de *M. circinelloides* revela una elevada similitud con las secuencias de proteínas Dicer de organismos pertenecientes a todos los reinos eucariotas (Tabla 12). Las proteínas Dicer de

otros hongos como *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Neurospora*, *Magnaporthe* y *Aspergillus* son las que presentan mayor similitud con la proteína Dicer2 de *M. circinelloides*, siendo la más próxima la proteína Dicer completa de *R. oryzae* (E=0.0).

REINO	ORGANISMO	NOMBRE	AA	E	ID PROTEÍNA
FUNGI	<i>Rhizopus oryzae</i>	Proteína hipotética	1239	0.0	RO3G_15434.3 BROAD Institute
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	Proteína Dicer putativa	1569	0.0	85799 JGI
	<i>Neurospora crassa</i>	Dicer-like protein	1584	e^{-100}	UniProt Q7S8J7
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Dicer-like protein 1	1523	$3e^{-93}$	UniProt Q2U6C4
	<i>Magnaporthe grisea</i>	Dicer-like protein 1	1591	$1e^{-82}$	UniProt A4RKC3
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Proteína Dicer	1374	$5e^{-87}$	UniProt Q09884
PLANTAE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Homóloga a Dicer (CAF, DCL1)	1901	$1e^{-91}$	UniProt Q9SP32
	<i>Oryza sativa</i>	Homóloga a Dicer	1883	$9e^{-80}$	UniProt Q8LMR2
	<i>Oryza sativa</i>	Endorribonucleasa Homóloga a Dicer	1651	$1e^{-77}$	UniProt Q5N870
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dicer-like 4	1702	$6e^{-88}$	UniProt Q3SA53
	<i>Oryza sativa</i>	Dicer-like protein (DCL4)	1657	$2e^{-88}$	UniProt A7LFZ6
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dicer-like 2	1386	$5e^{-83}$	UniProt Q1KL58
ANIMALIA	<i>Homo sapiens</i>	Dicer1	1922	$5e^{-84}$	UniProt A7E2D3
	<i>Mus musculus</i>	Dicer1	1906	$3e^{-84}$	UniProt Q8R418
	<i>Gallus gallus</i>	Dicer1	1911	$3e^{-83}$	UniProt Q25BN1
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dicer-2	1714	$9e^{-51}$	UniProt Q2Q3V3
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Endorribonucleasa dcr-1	1845	$4e^{-49}$	UniProt P34529

Tabla 12. Similitud de la proteína Dicer2 de *Mucor circinelloides* con otras proteínas Dicer. La tabla muestra el análisis tipo BLAST realizado en las bases de datos UniProtKB, BROAD Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) y JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>).

III. 1. 4. Análisis de la expresión del gen *dicer2*.

III. 1. 4. 1. Expresión del gen *dicer2* en la estirpe silvestre.

Para establecer el patrón de expresión del gen *dicer2* a lo largo del crecimiento vegetativo, se obtuvieron muestras de RNA total de la estirpe silvestre de *M. circinelloides* incubada durante 14, 24, 48 y 72 horas en medio mínimo líquido en condiciones de luz continua. La abundancia de los transcritos del gen *dicer2* se determinó mediante experimentos de hibridación tipo Northern, empleando una sonda de 2,5 kb obtenida mediante digestión del plásmido pMAT1208 con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Figura 17B, sonda b). La hibridación permitió detectar un transcrito de 5 kb, que se ajusta al tamaño esperado para el mRNA del gen *dicer2* (Figura 25A). A lo largo del ciclo vegetativo de *M. circinelloides* se observa un incremento en la cantidad de transcritos del gen *dicer2*, con un máximo de acumulación a la 48 h de crecimiento, momento en el que los cultivos líquidos alcanzan el final de la fase exponencial.

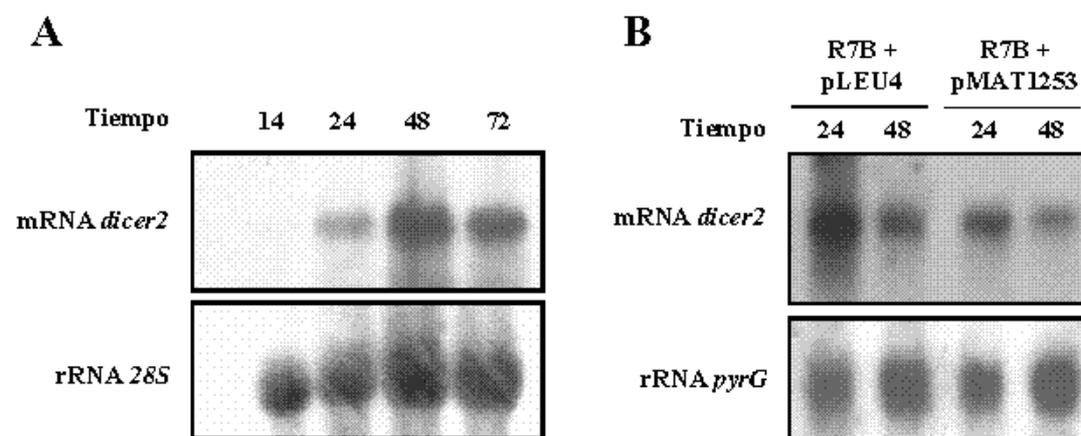


Figura 25. Expresión del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. (A) Muestras de RNA total (20 µg) procedentes de la estirpe silvestre, incubada durante distintos periodos de tiempo (horas) en medio mínimo líquido, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa y se hibridaron con una sonda del gen *dicer2* (sonda b, Figura 17B). Como control de cantidad se rehibridó la membrana con una sonda del rRNA 28S. (B) Hibridación tipo Northern de muestras de RNA total (20 µg) procedentes de un individuo de la estirpe R7B transformado con el plásmido control pLEU4 y de un individuo de la misma estirpe transformado con el plásmido pMAT1253 para silenciar el gen *carB*. Como control de cantidad se rehibridó la membrana con una sonda del gen *pyrG*.

III. 1. 4. 2. Expresión del gen *dicer2* en individuos silenciados.

Con el fin de determinar si la expresión del gen *dicer2* se induce en respuesta a la activación del mecanismo de silenciamiento, se realizó un experimento tipo Northern utilizando muestras de RNA total de la estirpe R7B (*leuA*) en la que se había inducido el

mecanismo de silenciamiento mediante la introducción del plásmido pMAT1253 (*leuA*⁺). Este plásmido está diseñado para silenciar la expresión del gen *carB* de *M. circinelloides*, implicado en la síntesis de carotenos (ver Apartado III.2.2.1). Contiene un transgen con repeticiones invertidas de una secuencia del gen *carB* que, una vez transcrito, genera una estructura de RNA en horquilla que activa el silenciamiento de *carB*, dando lugar a transformantes albinos como consecuencia del bloqueo de la ruta carotenogénica. Como control se utilizó RNA total de un transformante no silenciado portador del plásmido pLEU4, que complementa la mutación *leuA*⁻ de la estirpe R7B. Las muestras de RNA se obtuvieron de micelios crecidos durante 24 y 48 horas en medio mínimo sólido, condiciones que favorecen el mantenimiento de los plásmidos en niveles altos. Para la detección de los transcritos del gen *dicer2* se llevó a cabo la hibridación con la sonda b (Figura 17B), encontrándose niveles similares de expresión en la estirpe silvestre y en los transformantes silenciados (Figura 25B). Este resultado sugiere que no es necesaria la activación del mecanismo de silenciamiento para la expresión del gen *dicer2* en *M. circinelloides*.

III. 2. Análisis funcional del gen *dicer2*.

Los genes *dicer* juegan un papel central en el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. Sus productos génicos dan lugar a los siRNAs, implicados, entre otros procesos, en el silenciamiento inducido por transgenes, y a los miRNAs, que participan en complejos procesos de regulación de la expresión génica.

En este apartado se presentan los resultados del estudio de la función del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. La estrategia elegida ha sido la obtención de mutantes nulos para el gen *dicer2* y su posterior análisis fenotípico.

III. 2. 1. Disrupción del gen *dicer2*.

El primer paso de la estrategia seguida para el estudio de la función del gen *dicer2* fue la generación, mediante disrupción génica, de mutantes *dicer2*⁻. Para ello se empleó la estirpe MU402, auxótrofa para leucina y uracilo (Leu⁻, Ura⁻), y se utilizó como marcador seleccionable el gen *pyrG* de *M. circinelloides*, que complementa la auxotrofia para uracilo. Este tipo de aproximación requiere que el marcador seleccionable esté flanqueado

por fragmentos del gen *dicer2* de modo que, tras la recombinación homóloga, el gen quede interrumpido por el marcador. Los mutantes *dicer2*' obtenidos se transformarán con plásmidos portadores de transgenes capaces de inducir el silenciamiento de genes endógenos, lo que permitirá valorar cómo afecta la mutación del gen *dicer2* al mecanismo de silenciamiento (ver Apartado III.2.2.1). Para seleccionar los transformantes se utilizará el gen *leuA*, que complementa la auxotrofia para la leucina de las estirpes Leu⁻.

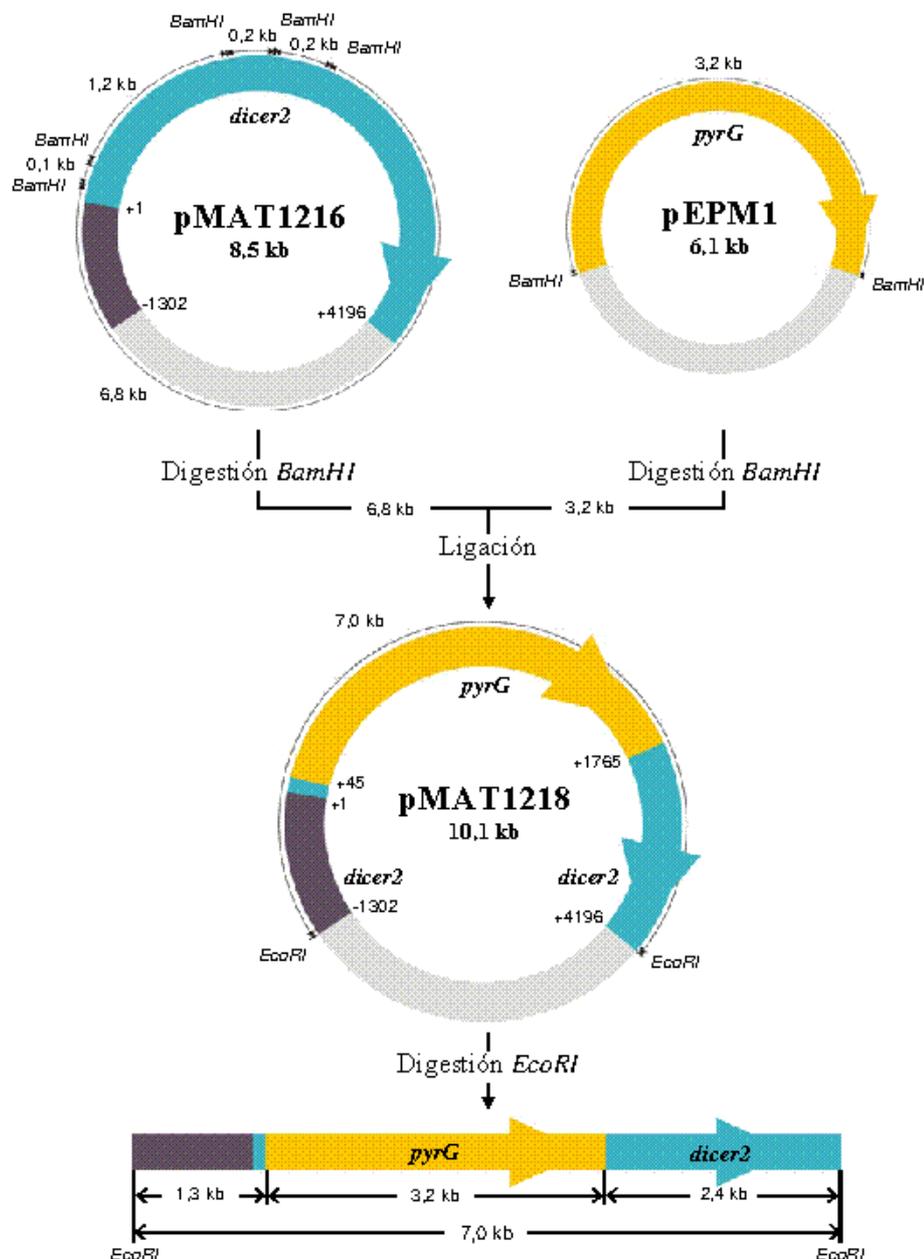


Figura 26. Construcción del plásmido pMAT1218, portador del inserto empleado para la interrupción del gen *dicer2*. La digestión de dicho plásmido con la restrictasa *EcoRI* libera un fragmento lineal de 7,0 kb que, mediante recombinación homóloga, permite sustituir 1,7 kb de la secuencia del gen *dicer2* por el marcador seleccionable *pyrG*. En turquesa se indica la región codificadora del gen *dicer2* y en gris oscuro la región genómica adyacente. Los números indican posiciones de la secuencia del gen *dicer2*, siendo +1 la posición que corresponde al primer nucleótido del triplete de iniciación de la traducción.

El fragmento utilizado para la disrupción del gen *dicer2* contiene el gen *pyrG* flanqueado, aguas arriba, por 1,3 kb adyacentes al gen *dicer2* y, aguas abajo, por 2,4 kb del mismo gen. Para realizar esta construcción, el plásmido pMAT1216, portador del fragmento *EcoRI* de 5,5 kb del gen *dicer2* clonado en pGEM-T Easy, se digirió con la enzima *BamHI* y se ligó con un fragmento de 3,2 kb que contiene el gen *pyrG*, obtenido mediante digestión del plásmido pEPM1 con la misma enzima (Figura 26). El plásmido resultante, en el que el fragmento que contiene el gen *pyrG* sustituye 1,7 kb de la región codificadora del gen *dicer2*, se denominó pMAT1218. Una digestión con la enzima *EcoRI* permite liberar el fragmento de 7,0 kb utilizado en la disrupción.

La transformación de la estirpe MU402 con el fragmento lineal de 7,0 kb permitió obtener 84 transformantes *pyrG*⁺ en medio mínimo MMC. Debido a que las esporas de *M. circinelloides* son multinucleadas, los transformantes son inicialmente heterocariontes (portadores de núcleos transformados y núcleos silvestres) y es necesario someterlos a sucesivos ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo para obtener individuos homocariontes (Navarro *et al.*, 2001; Quiles-Rosillo *et al.*, 2003). El grado en el que se incrementa la proporción de núcleos transformados se estima determinando el porcentaje de individuos *pyrG*⁺ derivados de cada transformante (Ver Materiales y Métodos). Los 84 transformantes fueron sometidos a cuatro ciclos de crecimiento vegetativo en medio MMC, valorándose tras cada ciclo la proporción de núcleos transformados. Setenta transformantes fueron desechados por presentar valores de núcleos transformados bajos, muy variables o sin tendencia a incrementarse tras sucesivos ciclos. Mediante amplificaciones por PCR se pudo averiguar si los 14 transformantes restantes habían experimentado recombinación homóloga en el locus *dicer2* o si, por el contrario, los altos porcentajes de núcleos *pyrG*⁺ observados en ellos eran el resultado de la integración ectópica del fragmento linearizado o del reemplazamiento génico de la mutación *pyrG*. Como fuente de DNA para la reacción de amplificación se utilizaron las propias esporas de los transformantes (ver Materiales y Métodos). La amplificación se llevó a cabo con el cebador *pyrG*10, que hibrida con la secuencia del marcador *pyrG*, y el cebador DB16, que hibrida con el gen *dicer2* fuera de la región de DNA presente en el inserto utilizado para la disrupción (Figura 27A). Esta pareja de cebadores permite obtener un producto de amplificación de 4 kb sólo en el caso de que la integración haya tenido lugar en el sitio esperado. De los 14 transformantes analizados sólo uno dio lugar al producto de PCR esperado para un mutante por disrupción del gen *dicer2* (Figura 27B). Dado que el

transformante seleccionado era aún heterocariote, fue sometido a un nuevo ciclo de crecimiento vegetativo bajo presión selectiva. Esto fue suficiente para conseguir una estirpe homocariote en la que todos los núcleos son portadores de la interrupción.

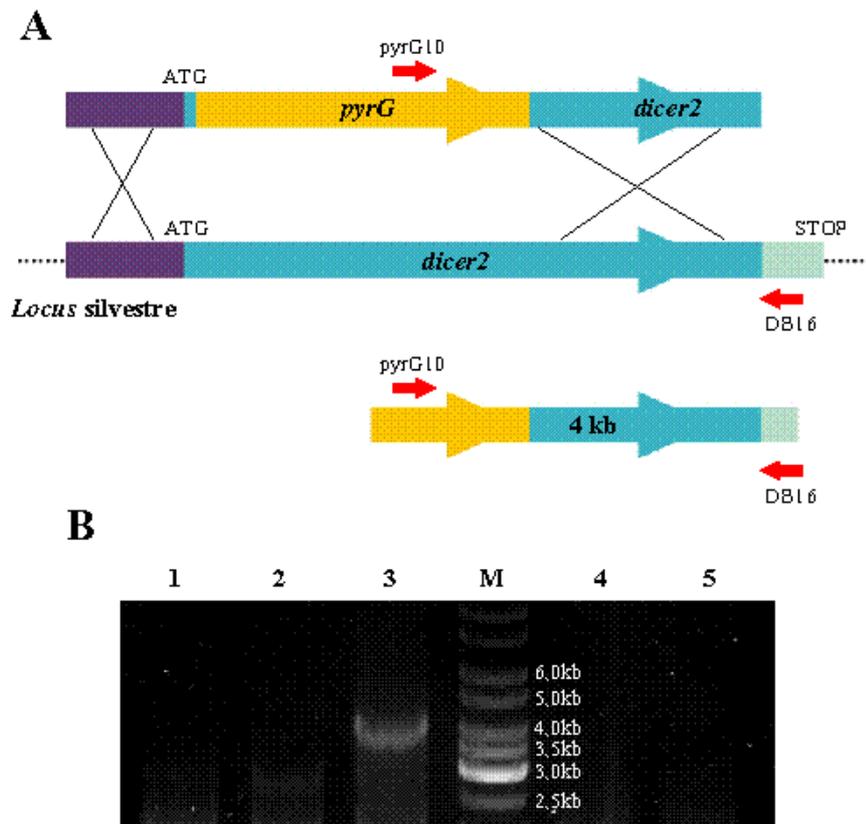


Figura 27. Análisis mediante PCR de los transformantes generados durante los experimentos para obtener mutantes *dicer2*. (A) La integración por recombinación homóloga del fragmento utilizado para la interrupción del gen *dicer2* genera una secuencia exclusiva de los mutantes. Dicha secuencia permite obtener un fragmento de 4 kb al utilizar los cebadores *pyrG10* y *DB16* en un experimento de PCR. En verde claro aparece la región codificadora del gen *dicer2* no incluida en el fragmento utilizado para la interrupción. (B) Productos de PCR de 5 de los 14 transformantes analizados. Sólo el 3 genera el fragmento de 4 kb esperado tras la interrupción del gen *dicer2*. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Para comprobar la correcta interrupción del gen *dicer2* y descartar la posible existencia de integraciones ectópicas adicionales, se llevó a cabo un experimento de hibridación tipo Southern. DNA de la estirpe mutante se digirió con la enzima de restricción *PstI*. Si el proceso de recombinación homóloga ocurrió correctamente, el patrón de bandas resultante de la digestión del DNA debe ser diferente en la estirpe silvestre R7B y en el mutante *dicer2* (Figura 28A). Los resultados obtenidos al hibridar la membrana con una sonda del gen *dicer2* que reconoce los alelos silvestre y mutante, pero puede discriminar entre ellos (Figura 28A, sonda d), revelan que la estirpe seleccionada presenta

el fragmento esperado de 7,5 kb y carece del fragmento de 3,6 kb, indicando que el alelo silvestre del gen *dicer2* había sido reemplazado con éxito (Figura 28B). La hibridación con una segunda sonda localizada en la región del gen *dicer2* delecionada en el fragmento utilizado para la disrupción (Figura 28A, sonda e), confirmó el reemplazamiento génico en la estirpe mutante, detectándose el fragmento de 1,9 kb sólo en la estirpe silvestre

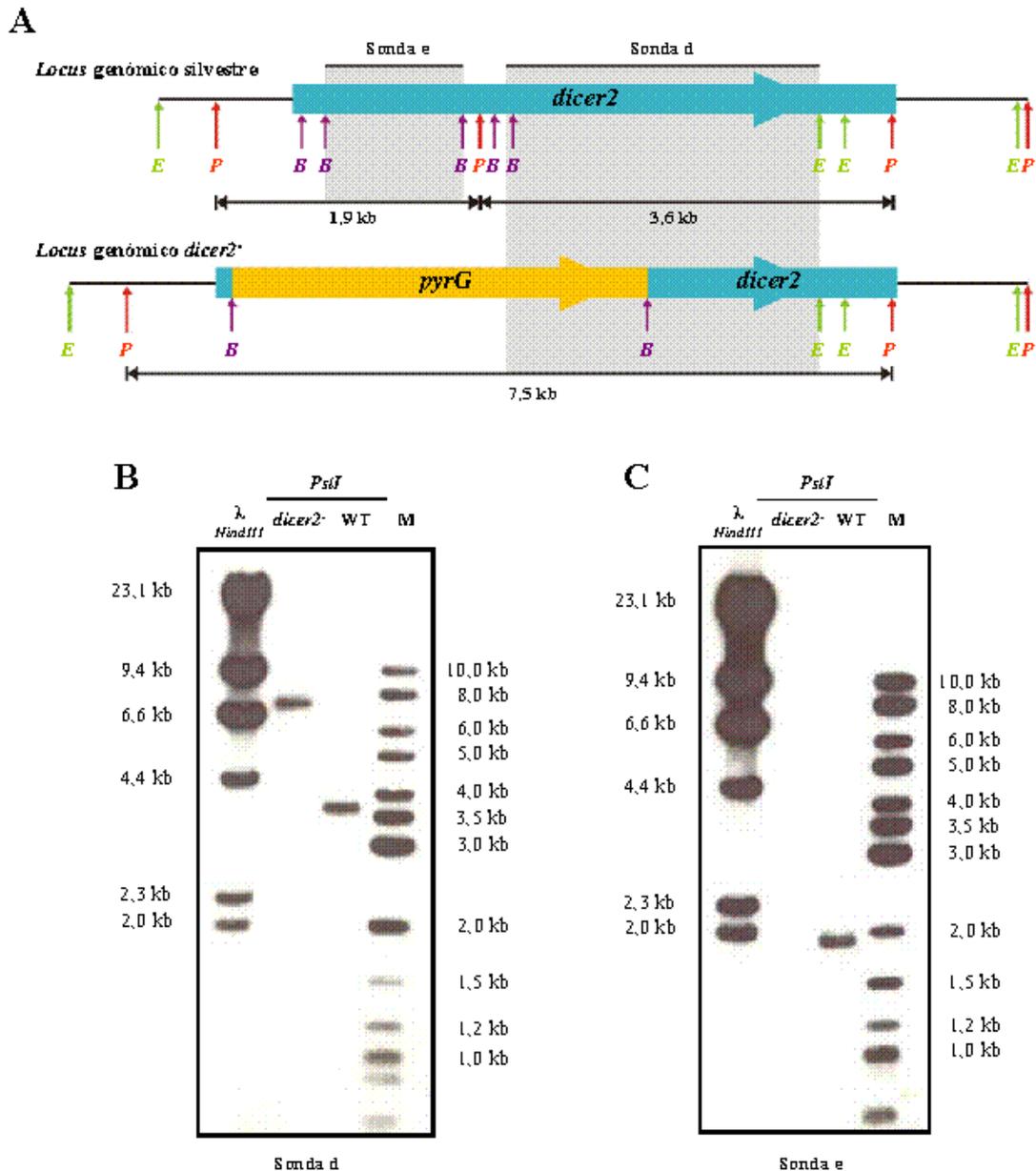


Figura 28. Disrupción del gen *dicer2* de *M. circinelloides*. (A) Representación esquemática de la región genómica del gen *dicer2* en la estirpe silvestre (R7B) y en el mutante obtenido por disrupción mediante recombinación homóloga. Se indican los puntos de corte para las enzimas *BamHI* (B), *EcoRI* (E) y *PstI* (P). (B) Resultado de la hibridación tipo Southern de DNA de la estirpe silvestre (WT) y del mutante *dicer2'* digerido con la enzima *PstI*. La membrana se hibridó con la sonda d, representada en A. (C) Resultado de la hibridación tipo Southern de DNA de la estirpe silvestre y del mutante *dicer2'* digerido con la enzima *PstI*. La membrana se hibridó con la sonda e, representada en A. Como marcadores de tamaño se utilizaron los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con *HindIII* y el marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Fermentas (M).

(Figura 28C). La sobreexposición de las películas permitió descartar la presencia de las bandas esperadas para el silvestre en las muestras de DNA del mutante, indicando que el mutante *dicer2*⁻ es realmente homocariote. Esta nueva estirpe se denominó MU410.

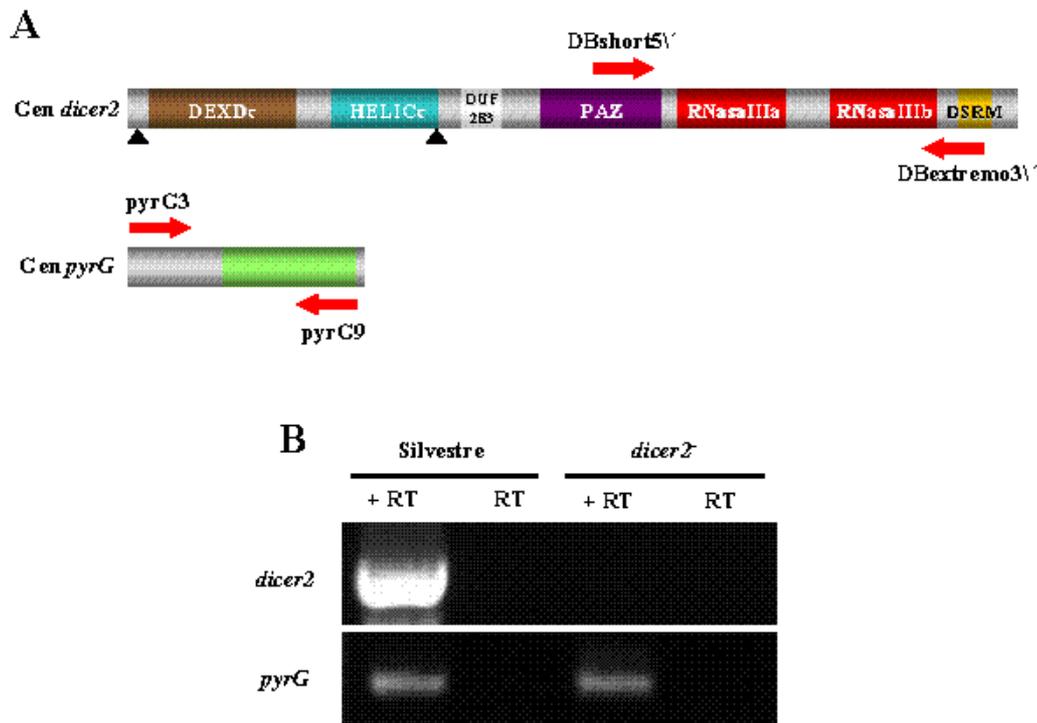


Figura 29. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen *dicer2* en el mutante *dicer2*⁻. (A) Posición de los cebadores utilizados en los experimentos de RT-PCR respecto a la secuencia de los dominios funcionales de los genes *dicer2* y *pyrG*. Las flechas negras acotan la región del gen *dicer2* eliminada en el mutante *dicer2*⁻. (B) RNA total de la estirpe silvestre MU241 y de la estirpe mutante *dicer2*⁻ se utilizó como molde para la retrotranscripción con un cebador específico del gen *dicer2* (DBextremo3') y la posterior amplificación con cebadores correspondientes a secuencias localizadas aguas abajo del sitio de inserción del gen *pyrG* (DBshort5' y DBextremo3'). Como control positivo se realizó una reacción de RT-PCR con cebadores específicos del gen *pyrG* (pyrG9 para la retrotranscripción y la pareja pyrG3-pyrG9 para la amplificación). RNA total no sometido a retrotranscripción (-RT) fue utilizado como control negativo.

Con el fin de confirmar que el mutante nulo es incapaz de sintetizar una proteína Dicer funcional, se diseñó un experimento de RT-PCR que permitiera descartar la existencia de transcritos de la secuencia que determina los dos dominios RNasaIII, ya que esta región no ha sido delecionada en el mutante *dicer2*⁻, si bien cabe presumir que no exista expresión por la ausencia de regiones reguladoras conocidas próximas. Empleando como molde RNA obtenido de micelio de las estirpes silvestre o mutante crecidas durante 24 h en medio mínimo líquido, se realizaron sendas reacciones de retrotranscripción con el

cebador DBextremo3'. El cDNA resultante se sometió a una reacción de amplificación en la que se empleó la pareja de cebadores DBshort5' y DBextremo3' (Figura 29A). Como control que asegurase el buen estado del RNA se realizó una retrotranscripción con el cebador pyrG9 y la subsiguiente PCR con la pareja de cebadores pyrG9 y pyrG3, que debe rendir un fragmento correspondiente al mRNA del gen *pyrG* tanto en el mutante *dicer2* como en el silvestre. Los resultados muestran que en el mutante *dicer2* no aparece ningún transcrito correspondiente a la región que determina los dos dominios RNasaIII (Figura 29B), descartando la posibilidad de que se pudiera estar generando un fragmento funcional de la enzima *Dicer2* y confirmando la falta de función del mutante *dicer2*.

III. 2. 2. Análisis fenotípico del mutante *dicer2*.

Una vez obtenido el mutante en el gen *dicer2*, se procedió a la caracterización fenotípica del mismo, analizándose en primer lugar la capacidad de este mutante para llevar a cabo silenciamiento génico post-transcripcional inducido por transgenes.

III. 2. 2. 1. Silenciamiento génico.

Para dilucidar el papel del gen *dicer2* de *M. circinelloides* en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes, se transformó la estirpe mutante MU410 con los plásmidos pMAT647 y pMAT1253, capaces de inducir dicho mecanismo en la estirpe silvestre. El plásmido pMAT647 contiene la versión genómica completa del gen *carB*, incluyendo su región promotora (transgen “con sentido”), y es capaz de silenciar la expresión de la secuencia endógena presente en el genoma de *M. circinelloides*. La introducción del plásmido en la estirpe silvestre genera transformantes silenciados de fenotipo albino con una frecuencia variable, que depende del número de copias de plásmido por núcleo (Nicolás *et al.*, 2003). El plásmido pMAT1253 contiene repeticiones invertidas de una secuencia de 840 pb del gen *carB* (trasngen “con repeticiones invertidas”), separadas por un fragmento de 303 pb que contiene el segundo intrón de dicho gen. Esta construcción se expresa de forma constitutiva generando un mRNA que adopta una estructura en horquilla bicatenaria, cuya alta eficacia en la inducción del mecanismo de silenciamiento permite obtener transformantes albinos con una frecuencia del 85 % en la estirpe silvestre (de Haro *et al.*, 2009). Los experimentos de transformación

con ambos plásmidos se realizaron con la estirpe mutante *dicer2*⁻ y la estirpe silvestre R7B (*leuA*), utilizada como control positivo. Como control negativo se empleó el plásmido pLEU4, que carece de secuencias del gen *carB* y que, al igual que los plásmidos pMAT647 y pMAT1253, contiene la versión silvestre del gen *leuA* de *M. circinelloides*, que complementa la auxotrofia para la leucina de la estirpe R7B y del mutante *dicer2*⁻. Los resultados presentados en la Tabla 13 indican que el mutante *dicer2*⁻ se encuentra severamente afectado en el mecanismo de silenciamiento génico, siendo incapaz de silenciar la expresión del gen *carB* cuando se utilizan transgenes con sentido como inductores del silenciamiento, y experimentando una drástica reducción en la frecuencia de silenciamiento cuando éste se induce por transgenes con repeticiones invertidas. En este último caso, la mayoría de las colonias albinas obtenidas (13 de 15) no mostraron un fenotipo uniforme, sino parches albinos (silenciados) y amarillos (silvestres).

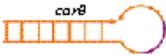
Plásmido	Estirpe	Transformantes		Total	Frecuencia de silenciamiento (%)
		Amarillos	Albinos		
 <p>pMAT1253</p>	WT	49	275	324	84,8
	<i>dicer2</i> ⁻	500	15	515	3,47
 <p>pMAT647</p>	WT	82	25	107	23,4
	<i>dicer2</i> ⁻	129	0	129	0
<p>pLEU4 (control)</p>	WT	80	0	80	0
	<i>dicer2</i> ⁻	130	0	130	0

Tabla 13. Silenciamiento génico en el mutante *dicer2*⁻. Se indica el fenotipo de los transformantes obtenidos tras la introducción en la estirpe silvestre R7B y en el mutante *dicer2*⁻ de plásmidos autorreplicativos que contienen el gen *carB* con su promotor (pMAT647), repeticiones invertidas del gen *carB* (pMAT1253) o sólo el marcador seleccionable *leuA* (pLEU4). El color de los transformantes se observó tras transplantar los transformantes originales a placas de medio mínimo YNB e incubarlas durante 48-72 horas en condiciones de iluminación continua. Se incluyen como silenciados aquellos transformantes que muestran parches de fenotipo albino.

El silenciamiento inducido por transgenes con repeticiones invertidas en la estirpe silvestre es muy estable, ya que más del 90% de los descendientes de los transformantes primarios silenciados mantiene el fenotipo albino tras un ciclo de crecimiento vegetativo.

Sin embargo, los trasplantes en medio mínimo YNB pH 2,8 de micelios albinos procedentes de individuos *dicer2*⁻ transformados con el plásmido pMAT1253 segregan rápidamente a fenotipo silvestre, tanto durante el crecimiento de la colonia como en las esporas germinadas de la siguiente generación (**Figura 30A**). En estas condiciones, que favorecen el crecimiento compacto, la estirpe silvestre es capaz de mantener el fenotipo

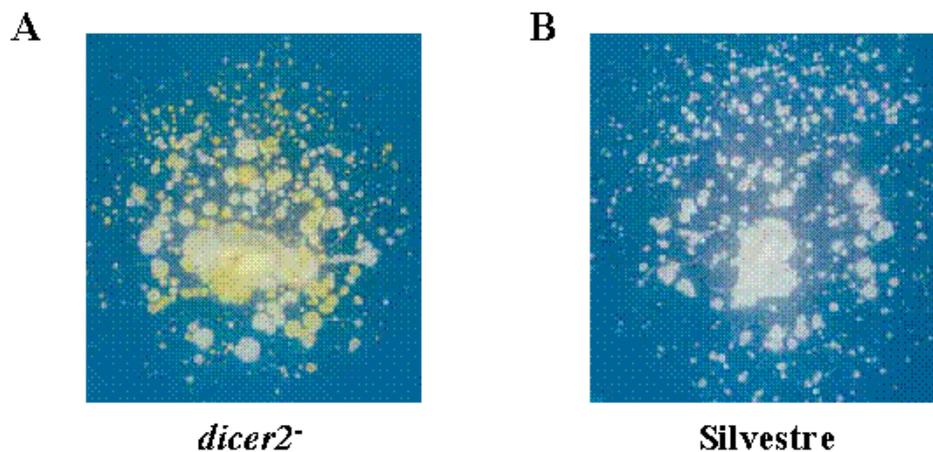


Figura 30. Fenotipo de los descendientes de individuos completamente albinos transformados con el plásmido pMAT1253. (A) El mutante *dicer2*⁻ segrega a fenotipo silvestre tras un único ciclo de crecimiento vegetativo. (B) La estirpe silvestre R7B mantiene el fenotipo albino durante varios ciclos de crecimiento vegetativo. La coloración de los individuos se observó tras 48-72 horas de crecimiento en medio mínimo a pH 2,8 en condiciones de iluminación continua.

albino durante varios ciclos de crecimiento vegetativo (**Figura 30B**). Para cuantificar la estabilidad del silenciamiento en las estirpes silvestre y mutante *dicer2*⁻, se recogieron esporas de individuos que, tras la introducción del transgen con las repeticiones invertidas, presentaban fenotipo albino en toda la colonia, sin parches amarillos. Las esporas se sembraron en medio mínimo YNB a pH 2,8, tras lo cual se valoró el porcentaje de individuos que continuaban presentando el fenotipo de la colonia parental tras un ciclo vegetativo. En el mutante *dicer2*⁻ los descendientes albinos representan el 9,6 % del total, aumentando esta frecuencia si se consideran aquellos que muestran algún parche blanco. Por el contrario, todos los descendientes de los individuos silvestres completamente albinos presentaban color blanco en toda la colonia (**Tabla 14**). Así, los datos revelan que la actividad de silenciamiento residual que muestra el mutante *dicer2*⁻ no es suficiente para mantener el fenotipo silenciado de forma estable y ponen de manifiesto el papel relevante del gen *dicer2* en el silenciamiento inducido por transgenes.

Parental	Descendientes			Total	% descendientes albinos
	Amarillos	Amarillos/ Albinos	Albinos		
Silvestre	0	0	221	221	100
<i>dicer2</i> ⁻	26	21	5	52	9,6 (50)

Tabla 14. Estabilidad del silenciamiento en el mutante *dicer2*⁻. Se muestra el fenotipo de los descendientes de individuos completamente albinos de la estirpe silvestre R7B y del mutante *dicer2*⁻ obtenidos con el plásmido pMAT1253. Entre paréntesis se indica el porcentaje de descendientes albinos en el mutante *dicer2*⁻ si se incluyen en esta categoría aquellos que presentan parches amarillos (silvestres) y albinos (silenciados).

III. 2. 2. 2. Acumulación de siRNAs en los mutantes *dicer2*⁻.

A diferencia de lo que sucede en los mutantes *dicer1*⁻, el mutante *dicer2*⁻ es incapaz de responder a la inducción del silenciamiento por transgenes con la eficacia observada en la estirpe silvestre. Puesto que los mutantes *dicer1*⁻ acumulan los dos tipos de siRNAs característicos del silenciamiento génico de *M. circinelloides*, se analizó si los escasos individuos silenciados obtenidos en el mutante *dicer2*⁻ muestran alguna diferencia en cuanto al tamaño de las moléculas de siRNAs generadas.

La detección de los siRNAs correspondientes a secuencias del gen *carB* en el mutante *dicer2*⁻ se realizó mediante hibridaciones tipo Northern. Se extrajeron muestras de RNA enriquecidas en moléculas de bajo peso molecular (ver **Materiales y Métodos**) procedentes de colonias silenciadas del mutante *dicer2*⁻ transformado con el plásmido pMAT1253. Debido a los problemas de estabilidad que presentan estos transformantes (ver **Apartado III.2.2.1**), el crecimiento en YNB líquido pH 4,5 favoreció la pérdida del fenotipo silenciado, no detectándose siRNAs en estas condiciones, que permiten, sin embargo, la detección de siRNAs en transformantes silenciados de la estirpe silvestre (**Figura 31B**, **calles 3 y 4**). Por ello, el RNA tuvo que aislarse a partir de micelio crecido durante 48 horas en medio YNB sólido a pH 3,2 y bajo luz continua. Si bien estas condiciones no son las idóneas para la detección de las dos clases de siRNAs, son las únicas en las que fue posible obtener suficiente cantidad de micelio albino de uno de los 15 transformantes silenciados del mutante *dicer2*⁻ para llevar a cabo el análisis. Como control positivo se utilizó una muestra de RNA de bajo peso molecular extraída de un transformante albino de la estirpe silvestre R7B transformada con el plásmido pMAT1253

y crecida en las mismas condiciones que el mutante. La membrana de RNA obtenida se hibridó con una ribosonda específica para el gen *carB*, capaz de detectar los siRNAs antisentido (Figura 31A, sonda f). Los resultados obtenidos indican que los individuos silenciados en fondo genético *dicer2*⁻ acumulan tanto el siRNA de 21-nt como el de 25-nt, si bien los niveles de este último son mayores que los detectados en la estirpe silvestre (Figura 31B, calles 5 y 6).

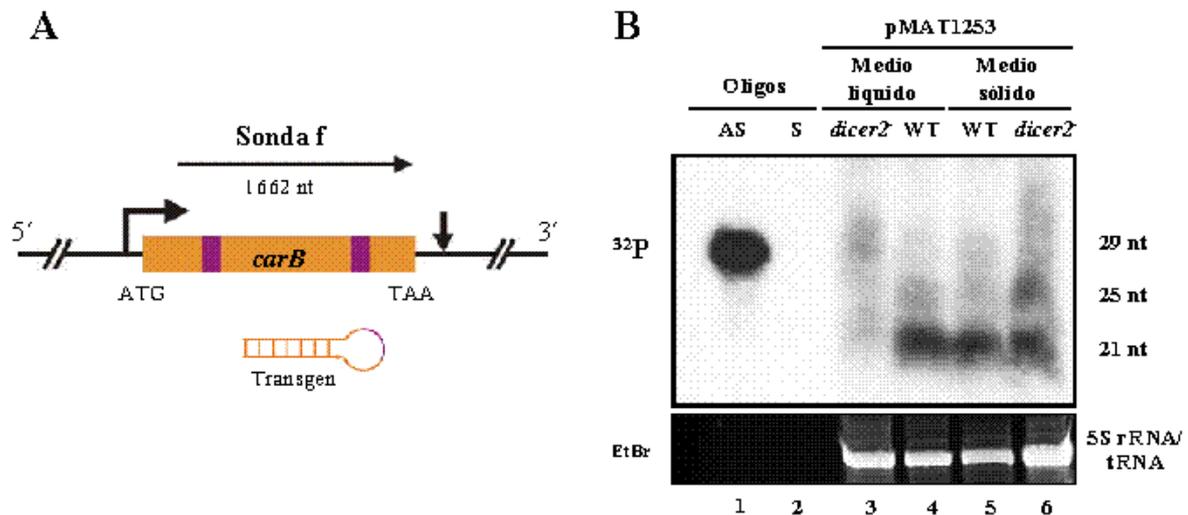


Figura 31. Producción de siRNAs inducida por transgenes con repeticiones invertidas en el mutante *dicer2*⁻. (A) Representación esquemática de la sonda de RNA del gen *carB* utilizada (sonda f). La sonda tiene la misma dirección de transcripción que el gen *carB*, por lo que hibrida y detecta los siRNAs antisentido. Procede de la transcripción *in vitro* del plásmido pMAT652 (Nicolás *et al.*, 2003). Las flechas en el gen *carB* indican el inicio de la transcripción y el sitio de poliadenilación de dicho gen. Los dos intrones del gen *carB* están representados por rectángulos morados. Se indica la región de *carB* presente en el transgen con repeticiones invertidas. (B) Hibridación tipo Northern de muestras de RNA de bajo peso molecular (50 µg) aisladas de individuos *dicer2*⁻ (calle 3) o silvestres (calle 4) transformados con el plásmido pMAT1253 e incubados en medio líquido YNB pH 4,5 durante 24 horas. Para detectar siRNAs en el mutante *dicer2*⁻ fue necesario utilizar RNA de bajo peso molecular extraído de parches albinos de un individuo transformado con el plásmido pMAT1253, crecido en medio mínimo sólido a pH 3,2 (calle 6). Como control positivo se utilizó un transformante albino de la estirpe silvestre (R7B) crecido en el mismo medio (calle 5). Como marcadores de tamaño y control de la especificidad de la hibridación se utilizó 1 pmol de un oligonucleótido de 29-mer en la orientación antisentido (AS, calle 1) y un oligonucleótido de 25-mer en la orientación con sentido (S, calle 2). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con EtBr.

El fenotipo del mutante *dicer2*⁻ pone de manifiesto que su función es clave en el mecanismo de silenciamiento inducido por transgenes y que la proteína Dicer2 es necesaria para la producción eficaz de los dos tipos de siRNAs. Estos resultados también indican que en el fondo genético *dicer2*⁻ hay una actividad Dicer residual, capaz de provocar cierto nivel de silenciamiento, aunque muy inestable. Esta actividad Dicer es, a su vez, capaz de generar los dos tipos de siRNAs, aunque con una dinámica probablemente diferente a la de la proteína Dicer2.

III. 2. 2. 3. Complementación del mutante *dicer2*⁻.

Para comprobar que los defectos en el silenciamiento observados en el mutante *dicer2*⁻ se debían exclusivamente a la interrupción de la versión silvestre del gen *dicer2*, se procedió a complementar el fenotipo mutante mediante la introducción del alelo silvestre de dicho gen. Uno de los dos marcadores seleccionables de la estirpe MU402 (Leu⁻, Ura⁻), el gen *pyrG*, se había utilizado ya para generar la estirpe mutante *dicer2*⁻. El segundo marcador, el gen *leuA*, es necesario para poder introducir plásmidos portadores de transgenes que permitan estudiar cómo ha afectado la mutación en el gen *dicer2* al mecanismo de silenciamiento génico (ver Apartado III.2.2.1). La introducción simultánea de copias silvestres del gen *dicer2* y de plásmidos portadores de transgenes en el mutante *dicer2*⁻ (Leu⁻, Ura⁻), requiere disponer de un nuevo marcador seleccionable. Una alternativa es recuperar mediante mutagénesis la auxotrofia para uracilo perdida en esta estirpe. Los mutantes *pyrG*⁻ son resistentes al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), un análogo tóxico del ácido orótico. Así, mediante mutagénesis al azar y posterior selección de individuos resistentes a 5-FOA, se generaron estirpes *dicer2*⁻ *leuA*⁻ *pyrG*⁻. La auxotrofia para uracilo en estos mutantes puede ser complementada mediante la introducción de copias del alelo silvestre del gen *pyrG* de *M. circinelloides* (Benito *et al.*, 1992).

III. 2. 2. 3. 1. Aislamiento de mutantes FOA^R auxótrofos para uracilo.

Los mutantes *dicer2*⁻ *leuA*⁻ *pyrG*⁻ se obtuvieron sometiendo la estirpe MU410 a mutagénesis con nitrosoguanidina. Para ello, 10⁶ esporas de esta estirpe se incubaron en presencia de 0,1 mg/ml de nitrosoguanidina durante 15, 30 y 45 minutos, determinándose en cada caso la supervivencia al tratamiento (Figura 32). Para aumentar la probabilidad de que se manifestara cualquier mutación recesiva, las esporas procedentes de tratamientos que provocan un índice de supervivencia entre el 3 y el 10 % se sembraron en cajas de medio rico suplementado con uridina hasta completar un ciclo vegetativo. Estas esporas “recicladas” se sembraron en medio mínimo selectivo con uridina y 2,5 mg/ml de 5-FOA, manteniéndose a lo largo de todo el proceso identificadas a las esporas recicladas procedentes de cada caja individual. Se seleccionaron 59 individuos FOA^R, que se transplantaron a cajas de medio mínimo con y sin uridina para comprobar la posible auxotrofia para este compuesto. Treinta y ocho de los individuos FOA^R eran además auxótrofos para uracilo, de los que, finalmente, se eligieron 2 que presentaban crecimiento

normal en distintos medios para someterlos a los experimentos de medida de la actividad OMP descarboxilasa.

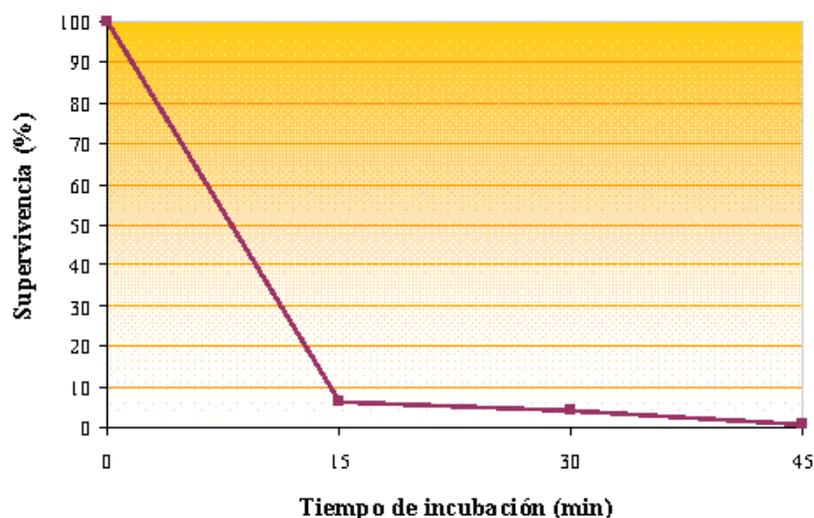


Figura 32. Supervivencia de las esporas de la estirpe MU410 (*dicer2*⁻) al tratamiento con nitrosoguanidina. Se mide como unidades formadoras de colonias tras cada tratamiento mutagénico.

III. 2. 2. 3. 2. Medida de la actividad OMP descarboxilasa.

La auxotrofia para uracilo y resistencia a 5-FOA puede deberse a mutaciones en los genes *pyrG* o *pyrF*. Para identificar los mutantes *pyrG* se determinó la actividad de la enzima descarboxilasa de orotidina-5'-monofosfato (OMPdecase), cifrada por el gen *pyrG* y encargada de catalizar el paso de orotidina-5'-monofosfato a uridina monofosfato dentro de la ruta de biosíntesis de pirimidinas. La **Tabla 15** muestra la actividad OMPdecase del mutante *dicer2*⁻ (MU410, control positivo) y de los 2 mutantes seleccionados por su auxotrofia para uracilo. Estos mutantes presentaron una actividad nula, demostrando que la mutación que confería resistencia a 5-FOA y fenotipo Ura^r afectaba al gen *pyrG*. Las estirpes mutantes *pyrG*⁻*dicer2*⁻ se utilizaron para los experimentos sucesivos y se denominaron MU421 y MU422.

Estirpe	Actividad específica (U/mg de proteína)
MU410	1,414
MU421	0
MU422	0

Tabla 15. Actividad OMPdescarboxilasa de la estirpe MU410 (*dicer2*⁻*pyrG*⁺) y de dos de los mutantes auxótrofos para uracilo.

III. 2. 2. 3. 3. Complementación de la mutación *pyrG*⁻ con el alelo *pyrG*⁺.

Una vez obtenidas las estirpes MU421 y MU422, se comprobó que la mutación *pyrG*⁻ que portan estas estirpes puede ser complementada con alelos *pyrG*⁺ presentes en plásmidos autorreplicativos. Los experimentos de transformación revelaron que ambas estirpes presentaban unas altas tasas de reversión espontánea de la mutación *pyrG*⁻, como se desprendía del hecho de que los controles negativos sin DNA plasmídico presentasen siempre individuos *pyrG*⁺, si bien en menor número respecto a los obtenidos tras transformar con los alelos silvestres del gen *pyrG* (Tabla 16). Para soslayar el problema

Estirpe	Individuos <i>pyrG</i> ⁺		% revertientes entre los transformantes
	Control sin DNA	Transformantes	
MU421	31	234	13,14
MU422	106	390	27,18

Tabla 16. Reversión de la mutación *pyrG*⁻ en las estirpes MU421 y MU422. Se muestra el porcentaje de individuos que son revertientes *pyrG*⁺ de entre los transformantes de las estirpes MU421 y MU422 obtenidos al introducir copias silvestres del gen *pyrG*. Se indican los números totales obtenidos en varios experimentos de transformación independientes.

de la reversión, se realizaron nuevas mutagénesis con nitrosoguanidina con el fin de obtener individuos independientes de los resultantes de la primera mutagénesis. Cinco individuos auxótrofos para uracilo y resistentes a 5-FOA, procedentes de cuatro experimentos de mutagénesis independientes, fueron transformados con alelos silvestres del gen *pyrG*. Todos presentaron la misma capacidad de revertir la mutación *pyrG*⁻ que las estirpes MU421 y MU422, diferenciándose únicamente en la frecuencia con la que se producía la reversión (Tabla 17).

A pesar de la imposibilidad de obtener mutantes *pyrG*⁻ estables a partir de la estirpe MU410 (*dicer2*⁻), las estirpes auxótrofas para uracilo resultantes de la mutagénesis eran capaces de ser complementadas por alelos silvestres del gen *pyrG*, aumentando de forma significativa la frecuencia de transformantes *pyrG*⁺ sobre la frecuencia de reversión espontánea. Por lo tanto, estas estirpes fueron sometidas a experimentos de transformación para complementar la mutación *dicer2*⁻ utilizando el gen *pyrG* como marcador seleccionable.

Estirpe	Tasa de Reversión
MU421	$0,86 \cdot 10^{-7}$
MU422	$1,46 \cdot 10^{-7}$
M1	$1,28 \cdot 10^{-7}$
M2	$4,68 \cdot 10^{-7}$
M3	$5,79 \cdot 10^{-7}$
M4	$1,35 \cdot 10^{-7}$
M5	$1,6 \cdot 10^{-7}$

Tabla 17. Tasas de reversión espontánea de las mutaciones *pyrG*⁻. Se muestran las frecuencias de reversión de las siete estirpes obtenidas mediante mutagénesis con nitrosoguanidina del mutante *dicer2*⁻. Los valores fueron calculados dividiendo el número de revertientes obtenidos en el control negativo sin DNA entre el número total de esporas sembradas. Dado que sólo una proporción de las esporas utilizadas en los experimentos de transformación dan lugar a protoplastos viables, las tasas reales de reversión son, probablemente, mayores que las mostradas.

III. 2. 2. 3. 4. Transformación de las estirpes *dicer2*⁻*pyrG*⁻ con alelos silvestres del gen *dicer2*.

La estirpe MU422 fue transformada con el plásmido pMAT1223, que contiene el marcador seleccionable *pyrG*⁺ y un fragmento de 7,1 kb que incluye la versión completa del gen *dicer2*. Como se ha comentado, la estirpe MU422 presenta mutaciones en el gen *pyrG* capaces de revertir con alta frecuencia, por lo que era necesario discriminar, entre los individuos *pyrG*⁺ obtenidos, los transformados con el plásmido pMAT1223 de aquellos que habían revertido la mutación *pyrG*⁻. Con tal fin, uno de los revertientes aparecidos en el control negativo de la transformación (sin plásmido), así como varios individuos de los obtenidos tras transformar con el plásmido pMAT1223, fueron sometidos a tres ciclos de crecimiento vegetativo en medio mínimo selectivo MMC. A continuación, se determinó el porcentaje de núcleos transformados que presentaba cada uno de ellos, mediante la comparación del número de esporas capaces de crecer en medio mínimo selectivo respecto a las que crecen en medio mínimo con uridina (ver **Materiales y Métodos**). La transformación de *M. circinelloides* con plásmidos autorreplicativos suele rendir valores

que varían entre un 10 y un 40 % de núcleos transformados, con variaciones tras cada ciclo vegetativo dentro de este rango. Por el contrario, la presencia de una reversión que restaurase la función del gen *pyrG* endógeno (genómico) se manifestará como un incremento en el porcentaje de núcleos transformados tras cada ciclo de crecimiento en medio selectivo, hasta alcanzar la homocariosis. Los datos obtenidos para cada uno de los individuos analizados revelaban que el individuo *pyrG*⁺ obtenido en el control negativo de la transformación era realmente un revertiente, mientras que en los cinco transformantes analizados la auxotrofia para uracilo estaba siendo complementada por el plásmido pMAT1223 (Tabla 18).

Transformante	Nº de colonias en MMC	Nº de colonias en MMC + uridina	% núcleos <i>pyrG</i> ⁺
Revertiente	60	71	84,5%
1	9	90	10%
2	8	77	10,4%
3	27	61	44,2%
4	87	215	40,46%
5	0	184	<0,5%

Tabla 18. Porcentaje de núcleos transformados en individuos *pyrG*⁺. Se indica el porcentaje de colonias Ura⁺ de un individuo revertiente y de cinco de los transformantes obtenidos con el plásmido pMAT1223 (*dicer2*⁺*pyrG*⁺).

III. 2. 2. 3. 5. Silenciamiento génico en los mutantes *dicer2*⁻ complementados.

Para analizar si la presencia del plásmido pMAT1223 (*dicer2*⁺*pyrG*⁺) restituía la capacidad de los individuos *dicer2*⁻ para silenciar el gen *carB*, se introdujo el plásmido pMAT1253 (ver Apartado III.2.2.1) en dos individuos complementados de la estirpe MU422. A estas estirpes las denominamos MU422.1 y MU422.2 (*dicer2*⁺*pyrG*⁺). La proporción de transformantes albinos obtenidos en estas estirpes (Tabla 19) es similar a la que se obtiene en la estirpe silvestre (ver Apartado III.2.2.1), indicando que los mutantes *dicer2*⁻ complementados con el alelo silvestre *dicer2*⁺ son capaces de inducir el silenciamiento del gen *carB*.

Estirpe	Transformantes		Total	Frecuencia de silenciamiento (%)
	Amarillos	Albinos		
MU422.1	40	130	170	76,5
MU422.2	60	150	210	71,4

Tabla 19. Complementación de la mutación *dicer2*⁻. Se muestra el fenotipo de los transformantes obtenidos tras la introducción en las estirpes MU422.1 y MU422.2, portadoras de alelos silvestres del gen *dicer2*, del plásmido pMAT1253, portador de un transgen con repeticiones invertidas del gen *carB*.

Debido a los problemas de reversión de la mutación *pyrG*⁻ que presenta la estirpe MU422, se realizó un experimento de Southern para confirmar que los individuos albinos silenciados contenían el plásmido pMAT1223, que complementa las mutaciones en los genes *pyrG* y *dicer2* (Figura 33). En efecto, los resultados obtenidos revelan la presencia del plásmido en los individuos silenciados y ponen de manifiesto que la ineficacia observada en el mecanismo de silenciamiento en los mutantes *dicer2*⁻ es debida exclusivamente a la falta de función de dicho gen.

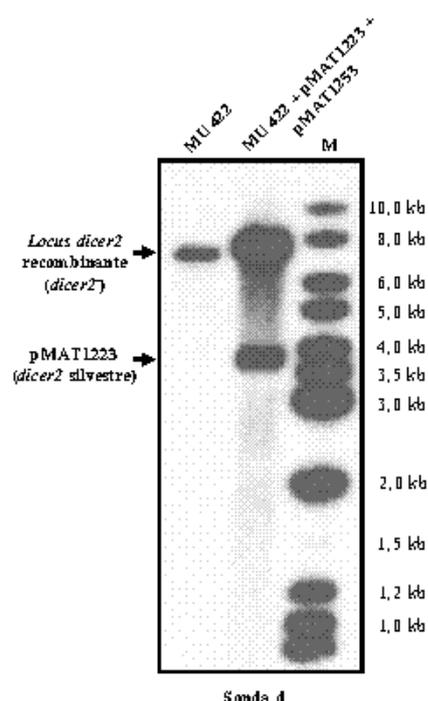


Figura 33. Análisis mediante Southern de la presencia de alelos silvestres del gen *dicer2* en un individuo silenciado de la estirpe MU422 (*dicer2*⁻*pyrG*⁻) portador del plásmido pMAT1223 (*dicer2*⁺*pyrG*⁺). DNA de la estirpe MU422 y de un individuo albino de esa misma estirpe portador de los plásmidos pMAT1223 y pMAT1253 (transgen *carB* “con repeticiones invertidas”) se digirió con la enzima *Pst*I y se hibridó con un fragmento de 2,5 kb del gen *dicer2* (Figura 28, sonda d). La hibridación permitió detectar en ambos individuos la banda de 7,5 kb correspondiente al locus *dicer2* recombinante (*dicer2*). La banda de 3,6 kb correspondiente al alelo *dicer2* silvestre sólo aparece en el individuo transformado con el plásmido pMAT1223. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Fermentas (M).

III. 2. 2. 4. Obtención de estirpes *dicer1*⁻*dicer2*⁻.

En *M. circinelloides*, los dos genes *dicer* identificados parecen presentar cierta redundancia funcional, si bien es el gen *dicer2* el que juega un papel crucial en la respuesta de silenciamiento a la introducción de transgenes. Con el fin de descartar la existencia de una actividad Dicer adicional que explicase la redundancia observada, se iniciaron los experimentos encaminados a generar mutantes dobles *dicer1*⁻*dicer2*⁻.

III. 2. 2. 4. 1. Obtención de estirpes *dicer1*⁻*dicer2*⁻ a partir de estirpes *dicer2*⁻ auxótrofas para uracilo.

La baja eficacia de obtención de mutantes *dicer2*⁻ (ver Apartado III.2.1) llevó a abordar la generación de los dobles mutantes *dicer1*⁻*dicer2*⁻ partiendo de la estirpe mutante *dicer2*⁻, sobre la que se llevaría a cabo la disrupción del gen *dicer1*. En la obtención del mutante MU410 (*dicer2*⁻*leuA*⁻) se empleó el marcador seleccionable *pyrG* para generar la disrupción, eliminando la auxotrofia para uracilo de la estirpe utilizada para ello (MU402). La generación de un doble mutante *dicer1*⁻*dicer2*⁻ exige el uso de un marcador seleccionable para la disrupción del gen *dicer1* y un segundo marcador que permita la introducción de plásmidos que induzcan el silenciamiento, a fin de dilucidar el grado en el que está afectado este mecanismo en los dobles mutantes.

Tres de las estirpes *pyrG* obtenidas independientemente mediante mutagénesis al azar del mutante *dicer2*⁻ fueron sometidas a experimentos de transformación para conseguir la disrupción del gen *dicer1*. Para ello, se empleó un fragmento de 5,8 kb que contiene el gen *pyrG* como marcador seleccionable, flanqueado aguas arriba por 1,8 kb del gen *dicer1*, y aguas abajo por 780 pb del mismo gen. Esta construcción se encuentra en el plásmido pMAT661 y puede liberarse mediante digestión con las enzimas de restricción *SpeI* y *PvuII* (Figura 34A).

Quince experimentos de transformación independientes con las tres estirpes *dicer2*⁻ *pyrG* permitieron obtener 277 transformantes *pyrG*⁺. Sin embargo, dado que la frecuencia de transformantes obtenidos por recombinación homóloga es similar a la frecuencia de reversión espontánea *pyrG*⁺ en las tres estirpes recipientes (ver Apartado III.2.2.3.3), sólo se estudiaron los individuos procedentes de aquellas transformaciones en las que los transformantes aparecidos superaban en número a los revertientes presentes en las placas

del control negativo. Tras dos ciclos de crecimiento vegetativo en medio MMC, esporas de 138 de los transformantes fueron analizadas mediante PCR (ver **Materiales y Métodos**) para comprobar si la pérdida de la auxotrofia para uracilo era fruto de la recombinación homóloga del fragmento para la disrupción en el locus *dicer1*.

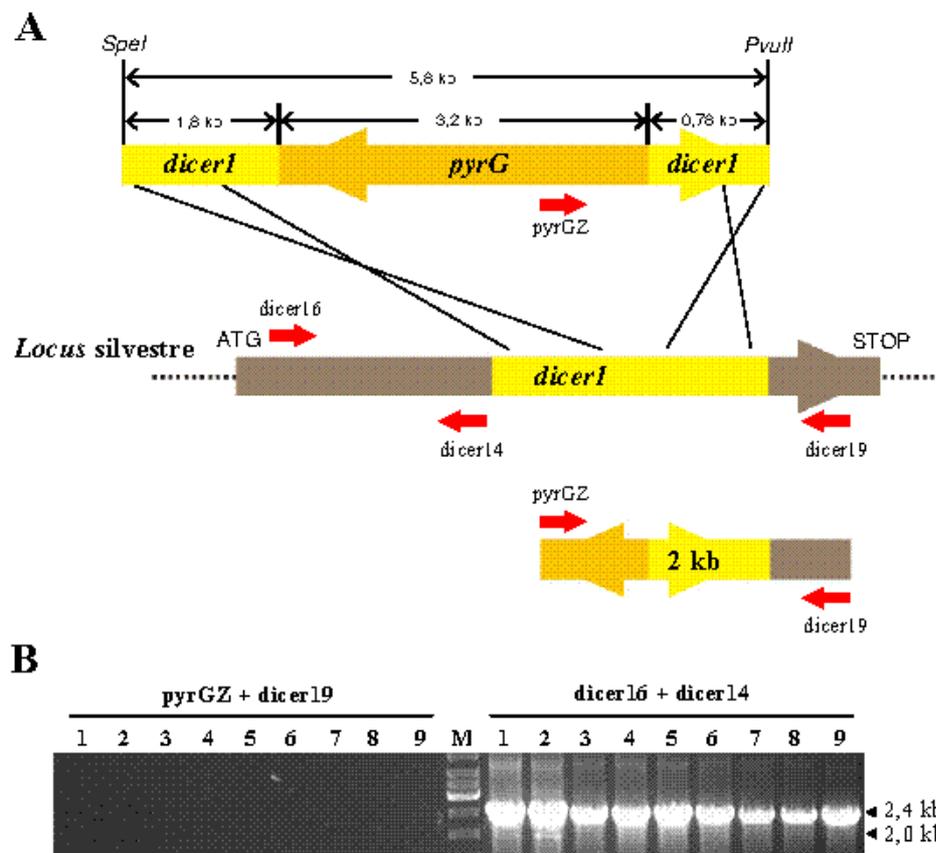


Figura 34. Obtención de mutantes *dicer1* *dicer2* a partir de derivados *pyrG* de la estirpe MU410 (*dicer2*). (A) La integración por recombinación homóloga del fragmento utilizado para la disrupción del gen *dicer1* permitiría amplificar un fragmento de 2 kb con la pareja de cebadores *pyrGZ* y *dicer19*. En marrón aparece la región codificadora del gen *dicer1* no incluida en el fragmento utilizado para la disrupción. (B) Productos de PCR de 9 de los 138 transformantes analizados. En ningún caso se obtuvo la banda de 2 kb esperada para los disruptantes por recombinación homóloga del fragmento de 5,8 kb. Las reacciones con la pareja de cebadores *dicer16*-*dicer14*, utilizadas como control del buen estado del DNA, siempre rindieron la banda de 2,4 kb que cabía esperar en este caso. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con el cebador *pyrGZ*, que hibrida con el marcador *pyrG*, y el cebador *dicer19*, que hibrida con el gen *dicer1* fuera de la región de DNA presente en el inserto utilizado para la disrupción (**Figura 34A**). El producto de amplificación que resultaría de este experimento sólo se podría obtener en los individuos en los que la integración haya tenido lugar en el sitio esperado. De los 138 transformantes analizados, ninguno presentaba la mutación en el gen *dicer1* (**Figura 34B**).

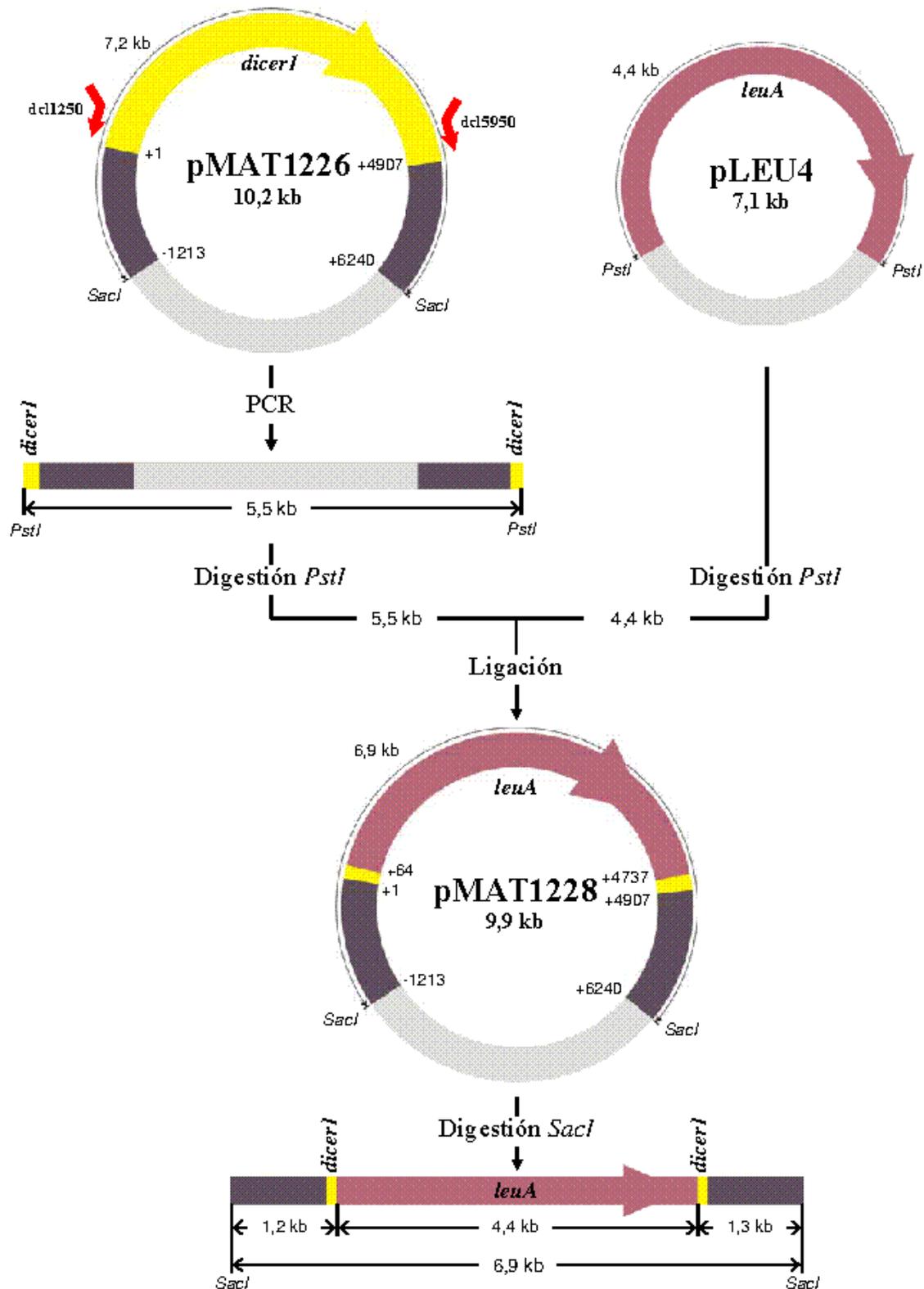


Figura 35. Construcción del plásmido pMAT1228, portador del inserto empleado para la interrupción del gen *dicer1*. La digestión del plásmido pMAT1228 con *SacI* libera un fragmento de 6,9 kb utilizado en los experimentos de interrupción génica. En amarillo se indica la región codificadora del gen *dicer1* y en morado la región genómica adyacente. Los números indican posiciones de la secuencia del gen *dicer1*, siendo +1 la posición que corresponde al primer nucleótido del triplete de iniciación de la traducción.

El fracaso a la hora de obtener individuos mutantes en los dos genes *dicer* podría deberse a que este genotipo resultase letal en *M. circinelloides*, incluso con bajos porcentajes de núcleos transformados. Para comprobar esta posibilidad se repitieron los experimentos de disrupción empleando esta vez como recipiente la estirpe MU422.1 (*dicer2⁻pyrG⁻leuA⁻* complementada con alelos silvestres de los genes *dicer2* y *pyrG*) (ver Apartado III.2.2.3.4). En estos experimentos el fragmento empleado para la disrupción del gen *dicer1* contenía el marcador seleccionable *leuA*, flanqueado aguas arriba por 1,2 kb del locus *dicer1*, y aguas abajo por 1,3 kb del mismo locus. Para realizar esta construcción, el plásmido pMAT1226, portador de un fragmento que contiene el gen *dicer1* completo y parte de la secuencia genómica flanqueante, se empleó como molde en una reacción de PCR inversa con los cebadores del1250 y del15950, ambos orientados hacia los extremos del gen (Figura 35). El producto de amplificación es un fragmento lineal de 5,5 kb que ha perdido 4,7 kb de la secuencia codificadora del gen *dicer1* y que presenta dos puntos de corte para la enzima *PstI* incluidos en la secuencia de los cebadores. Tras la digestión con esta restrictasa, el producto resultante se ligó con un fragmento de 4,4 kb que contiene el gen *leuA* de *M. circinelloides*, obtenido mediante digestión del plásmido pLEU4 con *PstI* (Figura 35). El plásmido resultante, en el que el gen *leuA* se encuentra en la misma orientación que el gen *dicer1*, se denominó pMAT1228. Una digestión con la enzima *SacI* permite liberar el fragmento de 6,9 kb utilizado en la disrupción.

Las transformaciones de la estirpe MU422.1 (*dicer2⁺pyrG⁺*) con este fragmento rindieron 33 transformantes *Leu⁺*, que fueron sometidos a cinco ciclos de crecimiento vegetativo en medio YNB antes de ser analizados mediante PCR. La reacción se llevó a cabo con el cebador *dicer35*, que hibrida con el gen *dicer1* fuera de la región de DNA presente en el inserto utilizado para la disrupción, y el cebador *leua-p2*, que hibrida con el marcador *leuA* (Figura 36A). En ningún caso se obtuvo la banda de 1,9 kb esperada en los individuos que presentasen la integración en el locus *dicer1*, si bien en todas las reacciones el control con los cebadores del15950 y *dicer35*, para comprobar la calidad del DNA aislado, dio resultados positivos (Figura 36B).

Estos datos sugieren que la imposibilidad de obtener un mutante de *M. circinelloides* con los dos genes *dicer* afectados no parece deberse a un problema de letalidad provocado por la doble mutación, pues a pesar de la presencia de alelos silvestres del gen *dicer2* en las estirpes sometidas a los experimentos de transformación, no se ha conseguido la disrupción del gen *dicer1*.

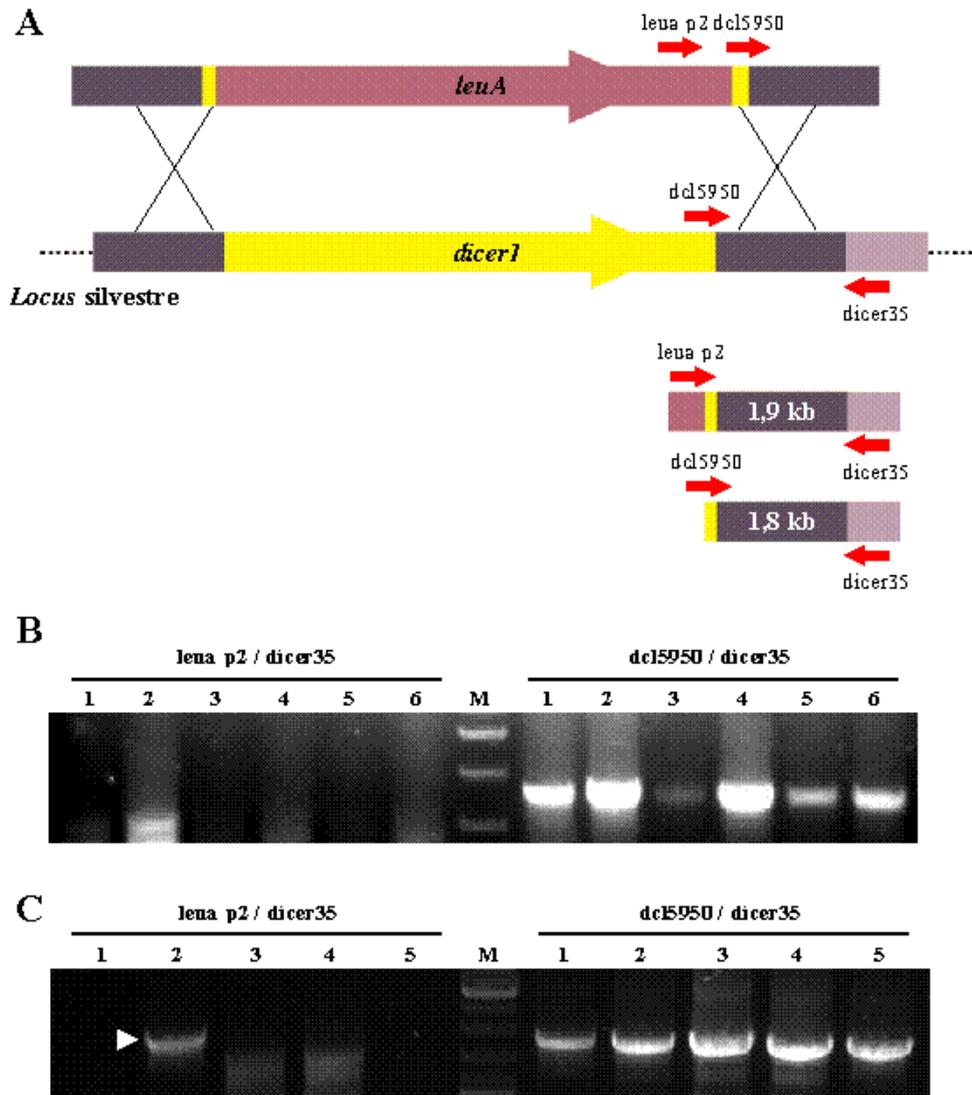


Figura 36. Análisis mediante PCR de los transformantes generados para obtener mutantes *dicer1 dicer2*⁻. (A) La recombinación homóloga del fragmento utilizado para la interrupción del gen *dicer1* permite amplificar un fragmento de 1,9 kb con los cebadores leuA-p2 y dicer35. Como control positivo de las reacciones de PCR se utilizó la pareja de cebadores dcl5950 y dicer35, capaces de amplificar 1,8 kb tanto a partir del locus silvestre como del locus *dicer1*. (B) Productos de PCR de 6 de los individuos obtenidos en la transformación de la estirpe MU422.1 (*dicer2*⁺*pyrG*⁺) con el fragmento para la interrupción del gen *dicer1*. Ninguno de los 33 individuos analizados portaba la mutación en el gen *dicer1*. (C) Productos de PCR de 5 individuos obtenidos en la transformación de la estirpe MU410 (*dicer2*⁻) con el fragmento para la interrupción del gen *dicer1*. Sólo el transformante número 2 genera el fragmento de 1,9 kb (flecha blanca) esperado tras la interrupción del gen *dicer1*. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

III. 2. 2. 4. 2. Obtención de estirpes *dicer1 dicer2*⁻ a partir de la estirpe *dicer2*⁻ auxótrofa para leucina.

Puesto que todas las estirpes *pyrG* derivadas de la mutagénesis del mutante *dicer2*⁻ son capaces de revertir la mutación que confiere la auxotrofia para uracilo (ver Apartado III.2.2.3.3) y ninguna ha resultado útil a la hora de obtener mutantes *dicer1 dicer2*⁻, se

abordó la generación de los dobles mutantes a partir de la estirpe original MU410 (*dicer2⁻pyrG⁺leuA⁻*). Los posibles mutantes que se obtengan no podrán ser transformados con plásmidos que induzcan el silenciamiento, a menos que se vuelva a generar la auxotrofia para uracilo por mutación.

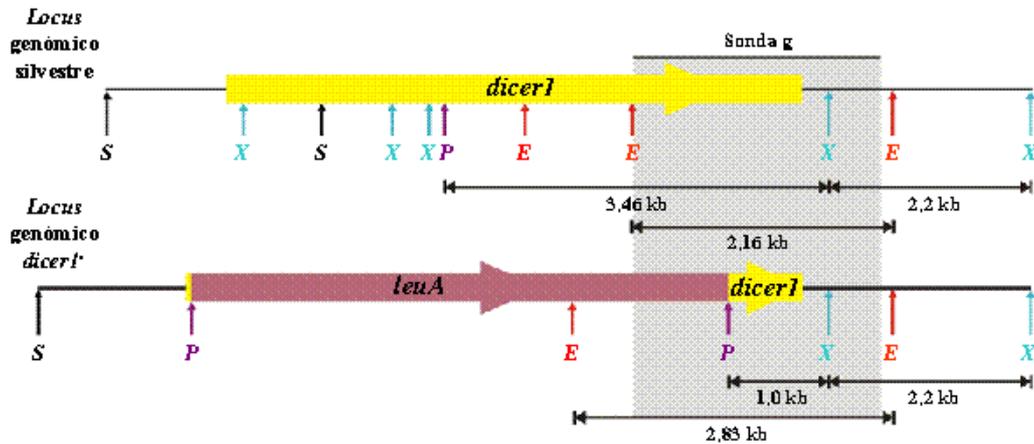
Para llevar a cabo la interrupción del gen *dicer1*, la estirpe MU410 fue transformada con el fragmento lineal de 6,9 kb obtenido mediante digestión del plásmido pMAT1228 con la enzima *SacI* (ver Apartado III.2.2.4.1 y Figura 35). La recombinación homóloga de este fragmento en el locus *dicer1* permitiría sustituir la mayor parte del gen por el marcador *leuA*, complementando la auxotrofia para leucina del mutante MU410.

Los experimentos de transformación permitieron obtener 27 individuos *Leu⁺* que fueron sometidos a tres ciclos de crecimiento vegetativo en medio mínimo selectivo YNB, tras lo cual se valoró la proporción de núcleos transformados para conocer el grado de homocariosis (ver Apartado III.2.1). Sólo cinco de los transformantes mostraron porcentajes de esporas *Leu⁺* por encima del 35 % y fueron analizados mediante PCR para detectar si la recombinación homóloga había tenido lugar en el sitio esperado. La amplificación se llevó a cabo con la pareja de cebadores *dicer35* y *leua-p2* (Figura 36A). Una de las cinco reacciones generó la banda de 1,9 kb que cabía esperar sólo si la integración había ocurrido en el locus *dicer1* (Figura 36C). Dado que el posible disruptante presentaba un 80 % de núcleos transformados, fue sometido a dos nuevos ciclos de crecimiento vegetativo en medio mínimo selectivo que permitieron obtener una estirpe homocariote.

La correcta interrupción del gen *dicer1* fue confirmada mediante un experimento de hibridación tipo Southern. DNA genómico de la estirpe silvestre y del disruptante fue sometido a una digestión doble con las enzimas de restricción *PstI* y *XhoI*, y a una digestión simple con la enzima *EcoRI*. El patrón de bandas generado en cada una de estas digestiones debía presentar diferencias entre las dos estirpes en el caso de que se hubiese producido recombinación en el locus *dicer1* (Figura 37A). La hibridación con una sonda del gen *dicer1* (Figura 37A, sonda g) mostró todos los fragmentos esperados, lo que corrobora los datos obtenidos en la PCR y permite descartar la existencia de integraciones ectópicas. Estos resultados demuestran que la estirpe obtenida, denominada MU411, presenta mutaciones en los dos genes *dicer* de *M. circinelloides* y descarta que este genotipo esté asociado a letalidad.

Como se ha indicado anteriormente, el análisis del silenciamiento en la estirpe mutante en los dos genes *dicer* requiere generar de nuevo una mutación *pyrG*. Esto ha sido realizado en nuestro laboratorio por la Dra. María Cervantes Martínez, que ha podido demostrar la incapacidad de esta estirpe para llevar a cabo el silenciamiento inducido por transgenes.

A



B

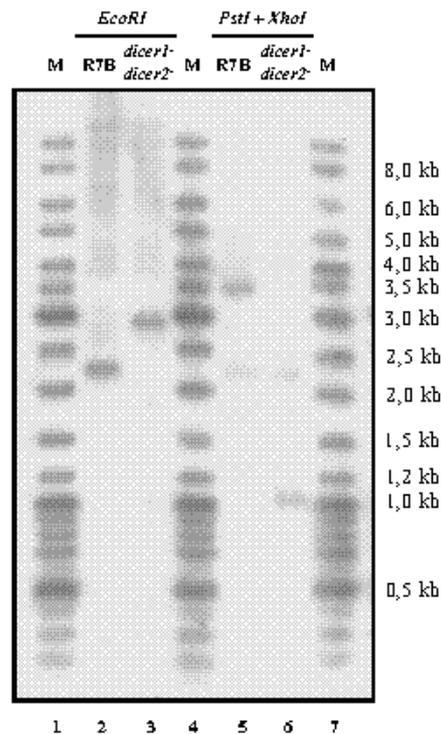


Figura 37. Disrupción del gen *dicer1* en la estirpe MU410 (*dicer2*). (A) Representación esquemática de la región genómica del gen *dicer1* en la estirpe silvestre (R7B) y en el mutante obtenido por disrupción mediante recombinación homóloga. Se indican los puntos de corte para las enzimas *EcoRI* (E), *PstI* (P), *SacI* (S) y *XhoI* (X). (B) Resultado de la hibridación tipo Southern de DNA de la estirpe silvestre (R7B) y del mutante *dicer1 dicer2* digerido con la enzima *EcoRI* (calles 2 y 3) y con las enzimas *PstI* y *XhoI* (calles 5 y 6). La membrana se hibridó con la sonda g, representada en A. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Fermentas (M).

III. 3. Expresión y ensayo de actividad de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides*.

Las enzimas Dicer contienen dos dominios catalíticos con función endonucleasa que actúan como un homodímero intramolecular y son los responsables de generar RNAs de entre 21 y 27 nt de longitud, según los organismos. En *M. circinelloides*, las dos enzimas Dicer parecen compartir un mismo mecanismo de acción, que genera siRNAs de dos tamaños a partir del RNA de doble cadena. Con el fin de conocer en detalle el proceso enzimático que da como resultado los siRNAs de 21 y 25 nt, nos propusimos iniciar los experimentos encaminados a estudiar la actividad Dicer de *M. circinelloides in vitro*.

Puesto que el gen *dicer2* es el principal responsable del mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides*, nos centramos en el estudio de la actividad de la enzima Dicer2. En este apartado se presenta la expresión de distintos fragmentos de la enzima en sistemas heterólogos, así como los ensayos de actividad *in vitro* realizados con las proteínas purificadas.

III. 3. 1. Expresión de los dos dominios RNasaIII de Dicer2 en *Escherichia coli* y ensayo de su actividad enzimática.

El elevado peso molecular (185 kDa) de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides* dificulta su purificación en forma soluble a partir de *E. coli*. La región C-terminal de la proteína Dicer de *S. pombe*, que contiene los dos dominios RNasaIII, ha sido purificada con éxito en *E. coli*, mostrando capacidad de digerir dsRNA en productos de 22-nt (Quian *et al.*, 2005). Este hecho nos llevó a abordar el estudio de la actividad enzimática de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides* partiendo de un fragmento similar al expresado de *S. pombe*.

III. 3. 1. 1. Construcción del vector de expresión de la región C-terminal de la proteína Dicer2.

Para expresar en *E. coli* la región de la enzima Dicer2 con los dos dominios RNasaIII y el motivo DSRM se utilizó el vector de expresión pGEX-KG (Amersham Pharmacia Biotech), que permite generar una fusión de la proteína de interés con la enzima

transferasa S de glutatión (GST) del platelminto *Schistosoma japonicum*. La fusión generada, GST-Dicer2, contiene la proteína GST unida al extremo amino del fragmento Dicer2. La unión a GST dota de estabilidad a la proteína fusionada y permite su purificación mediante cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa.

El cDNA obtenido mediante RT-PCR con la pareja de cebadores DBshort5' y DBextremo3' (ver Apartado III.1.3.2 y Figura 22) se digirió con la restrictasa *XbaI* (que corta en el extremo 5' de los cebadores) y se ligó con el plásmido pGEX-KG digerido con la misma enzima. La incorporación del inserto en la misma orientación que el gen GST se verificó mediante digestión con distintas restrictasas, denominándose al plásmido portador de la construcción correcta pMAT1225. La secuenciación de dicho plásmido descartó la presencia de errores en la secuencia del fragmento amplificado del gen *dicer2* y permitió comprobar que la integración había tenido lugar en la fase de lectura correcta.

III. 3. 1. 2. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-Dicer2.

La expresión de las fusiones con GST en el vector pGEX-KG queda bajo el control del promotor *tac*, que se induce por el análogo de la lactosa isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Los vectores pGEX incluyen también un gen *lacI*, cuyo producto es una proteína represora que se une a la región operadora del promotor *tac* en ausencia de IPTG. Este sistema de control de la expresión génica reduce los posibles efectos tóxicos provocados por la acumulación de una proteína heteróloga en *E. coli*.

Para expresar la fusión GST-Dicer2 en *E. coli* se utilizó la estirpe BL21, deficiente en la proteasa Lon, que degrada proteínas anormales, y la proteasa OmpT, que degrada proteínas extracelulares. Estas características favorecen la purificación de proteínas recombinantes intactas a partir de BL21. Para obtener cantidades aceptables de la proteína GST-Dicer2 en forma soluble (ver Materiales y Métodos), transformantes de BL21 portadores del plásmido pMAT1225 se cultivaron hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,7. A continuación, se indujo la síntesis de la proteína de fusión mediante la adición de 1mM de IPTG al medio e incubación durante 90 minutos a 37°C. Tras el periodo de inducción se analizó la presencia de la fusión en extractos crudos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y posterior tinción con azul de Coomassie (Figura 38A). Como control se utilizó un extracto proteico de BL21 transformada con el plásmido pGEX-KG e incubada en las mismas condiciones. A pesar de que en estas condiciones la

mayoría de la fusión GST-Dicer2 aparece en forma no soluble, probablemente en cuerpos de inclusión (Figura 38B), la fracción soluble presentaba las mayores cantidades de proteína de cuantas condiciones de crecimiento e inducción fueron ensayadas.

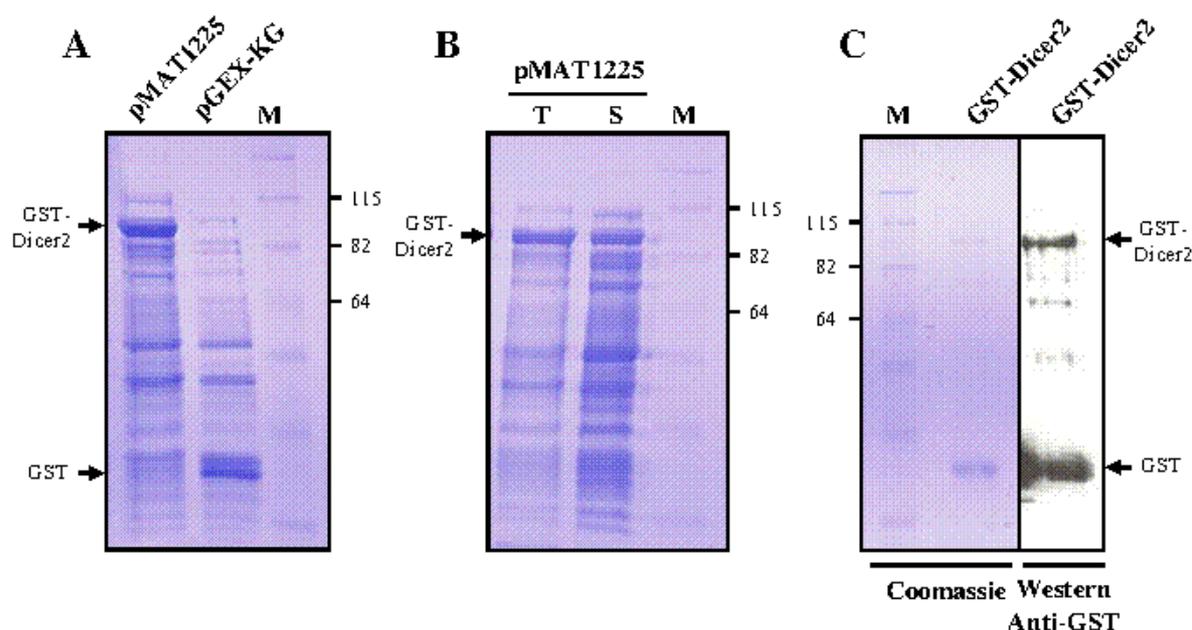


Figura 38. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-Dicer2. (A) Proteínas totales (30 μ l) de la estirpe de *E. coli* BL21 portadora del plásmido pMAT1225 o del plásmido pGEX-KG, extraídas tras 90 minutos de inducción con IPTG a 37°C, fueron separadas mediante electroforesis desnaturante en un gel del 10% de poliacrilamida. La tinción con azul de Coomassie muestra la fusión GST-Dicer2 en las células portadoras del plásmido pMAT1225 pero no en las que llevan el plásmido pGEX-KG, que expresan sólo la proteína GST. (B) Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie de la solubilidad de la fusión GST-Dicer2. En cada calle se cargaron 30 μ l del extracto de proteínas de *E. coli* (T) o de la fracción soluble concentrada cinco veces (S). (C) Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteína de fusión GST-Dicer2 purificada mediante cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa. La tinción con azul de Coomassie muestra las proteínas eluidas de la matriz de glutatión-sefarosa (5 μ l). La inmunodetección con anticuerpos anti-GST identifica la proteína de fusión GST-Dicer2 y distintos fragmentos resultado de su degradación, incluyendo un fragmento mayoritario del tamaño de la proteína GST. M: marcador de tamaño en kDa BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen).

La proteína GST-Dicer2 presente en la fracción soluble de los extractos de proteínas se purificó mediante cromatografía de afinidad a glutatión unido a sefarosa, utilizando condiciones nativas (ver Materiales y Métodos). La proteína GST-Dicer2 retenida en la matriz de glutatión-sefarosa se eluyó por competencia con glutatión reducido y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie (Figura 38C). Tras la purificación, además de la proteína GST-Dicer2, se observaron otras bandas que podrían corresponder a degradaciones de la fusión GST-Dicer2 o a fragmentos que conservaban la porción GST intacta resultantes de una parada prematura durante su traducción. Para comprobar que la proteína purificada a partir del

transformante portador del plásmido pMAT1225 correspondía a GST-Dicer2 se llevó a cabo un experimento tipo Western, utilizando como sonda anticuerpos monoclonales contra GST. Los resultados mostrados en la Figura 38C confirman que las proteínas observadas en la tinción con azul de Coomassie corresponden a la proteína de fusión GST-Dicer2 y a fragmentos de la misma de menor tamaño, probables productos de su degradación o incompleta traducción.

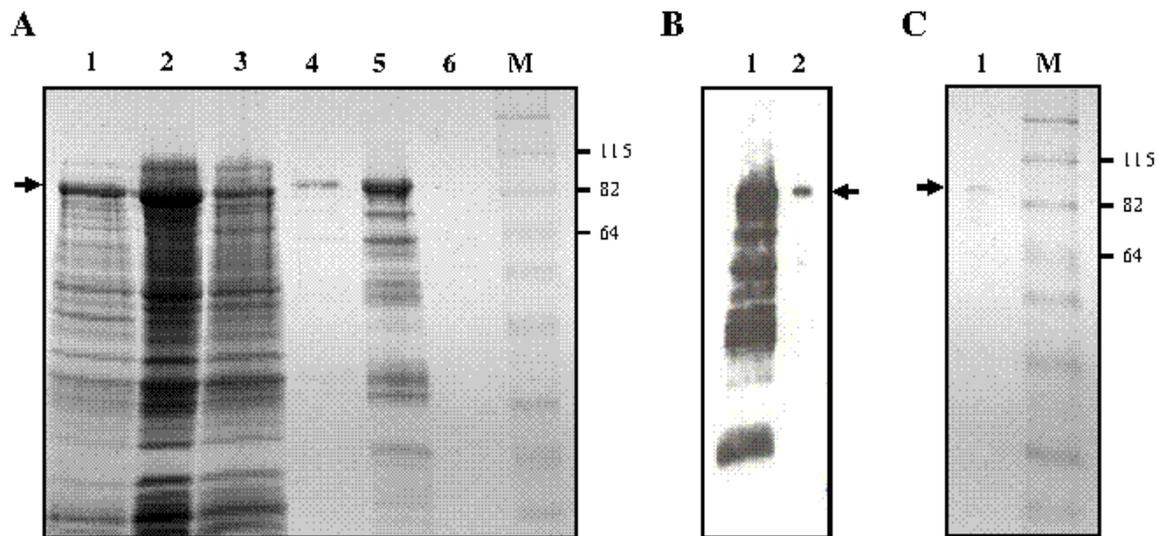


Figura 39. Solubilización de la proteína de fusión GST-Dicer2 con el detergente aniónico sarcosil y purificación mediante cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa. (A) Análisis mediante electroforesis desnaturante en gel del 10 % de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie de fracciones obtenidas en distintos pasos de la solubilización, purificación y diálisis de la proteína de fusión GST-Dicer2. Calle 1, extracto de proteínas totales de *E. coli* (30 μ l). Calle 2, proteínas solubilizadas con sarcosil al 0,5 % nueve veces concentradas (16 μ l). Calle 3, proteínas no unidas a la matriz de glutatión-sefarosa (16 μ l). Calle 4, 5 μ l de proteína purificada eluida de la matriz de glutatión sefarosa por competencia con glutatión reducido. Calle 5, proteína retenida en la matriz de glutatión sefarosa tras la elución (10 μ l). Calle 6, proteína dializada tras la elución (16 μ l). (B) Inmuno-detección con anticuerpos anti-GST de la proteína de fusión GST- Dicer2 retenida en la matriz de glutatión-sefarosa tras la elución (calle 1) y de la proteína dializada (calle 2). (C) Electroforesis en gel de poliacrilamida de 30 μ l de proteína GST-Dicer2 dializada tras la purificación (calle 1). M: marcador de tamaño en kDa BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). La flecha negra indica la posición de la proteína GST-Dicer2.

A pesar de haber obtenido proteína de fusión GST-Dicer2 en forma soluble, el rendimiento de la purificación fue muy bajo. Con el fin de obtener mayores cantidades de proteína soluble, la lisis de las bacterias que expresaban la proteína GST-Dicer2 se llevó a cabo utilizando el detergente aniónico sarcosil en lugar del detergente no iónico Nonidet P40 (ver Materiales y Métodos). Esta variación en el proceso de extracción permite solubilizar muchas proteínas de fusión con GST que son total o parcialmente insolubles y tiende a minimizar la aparición de productos de degradación durante la purificación (Frangioni y Neel, 1993). En efecto, el uso de sarcosil al 0,5 % permitió

obtener proteína soluble más concentrada y estable (Figura 39A), aunque la mayor parte de la proteína permaneció unida a la matriz de glutatión-sefarosa tras repetidas eluciones. La necesidad de dializar la proteína purificada para poder ensayar su actividad provocó finalmente la pérdida de la mayor parte de la misma (Figura 39B).

Aunque los métodos empleados presentan una baja eficacia de purificación de la proteína de fusión GST-*Dicer2*, la purificación a partir de 500 ml de cultivo permitió obtener suficiente cantidad de proteína como para estudiar su actividad *in vitro* (Figura 39C).

III. 3. 1. 3. Ensayo de actividad *in vitro* de la proteína de fusión GST-*Dicer2*.

Para analizar la actividad de la proteína de fusión GST-*Dicer2* se incubaron varias de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación con un sustrato de dsRNA de 0,5 kb marcado radiactivamente (ver **Materiales y Métodos**). Los ensayos se llevaron a cabo bajo distintas condiciones de reacción, todas ellas similares a las descritas para proteínas Dicer recombinantes de humanos (Kawasaki *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002a), *D. melanogaster* (Liu *et al.*, 2003; Haley *et al.*, 2003) y *S. pombe* (Quian *et al.*, 2005) (ver **Materiales y Métodos**). Tras incubar durante toda la noche a 37°C, los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida y posterior autorradiografía. Como control positivo se utilizó la proteína Dicer humana recombinante (Gene Therapy Systems), que genera fragmentos de ~22 pb a partir del dsRNA. Una muestra de dsRNA marcado radiactivamente al que no se le adicionó enzima Dicer alguna se empleó para verificar que el sustrato no había sufrido degradación durante todo el proceso. Los resultados de la Figura 40 muestran que la proteína de fusión obtenida mediante solubilización con sarcosil (calles 2 a 4) no presenta actividad ribonucleasa en las condiciones ensayadas, mientras que la enzima Dicer humana es capaz convertir todo el sustrato en productos de dsRNA de ~22 pb. Ensayos realizados utilizando distintas condiciones de temperatura, tiempo de incubación, tampones y cantidad de proteína dieron los mismos resultados negativos. Asimismo, también dieron resultados negativos los ensayos realizados con proteínas GST-*Dicer2* purificadas sin el tratamiento de solubilización con sarcosil (resultados no mostrados).

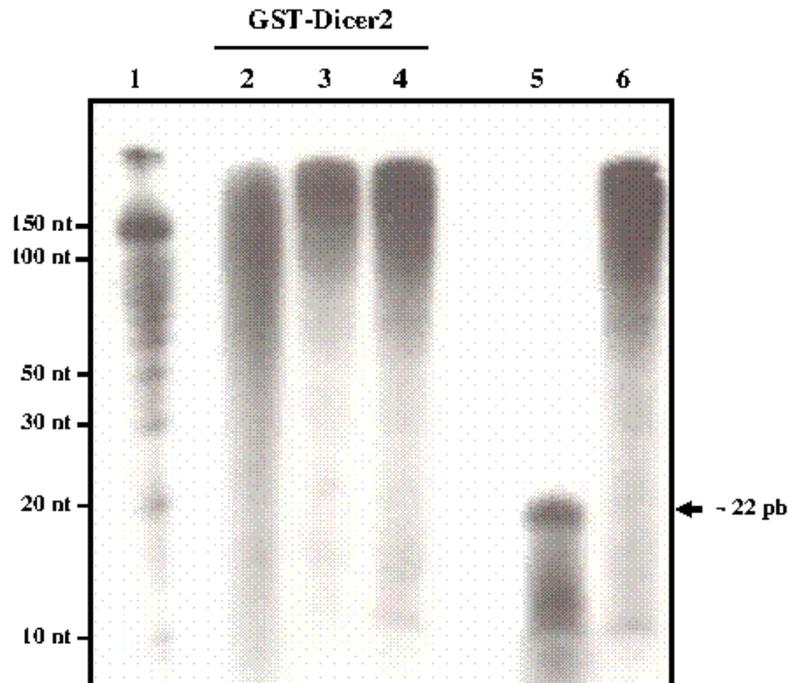


Figura 40. Ensayo de actividad enzimática de la proteína de fusión GST-Dicer2. $1,5 \times 10^5$ cpm de dsRNA de 0,5 kb marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ fue incubado durante toda la noche con varias de las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína GST-Dicer2 expresada en *E. coli* BL21, utilizando sarcosil para la solubilización. Los productos de digestión se separaron en un gel desnaturalizante del 16% de poliacrilamida y se visualizaron mediante autorradiografía. Calle 1, marcador de tamaño de RNA Decade™ Marker System (Applied Biosystems/Ambion). Calle 2, dsRNA incubado con 10 μl de la matriz de glutatión-sefarosa con la proteína GST-Dicer2 unida (Figura 39A, calle 5). Calle 3, dsRNA incubado con 5 μl (125 ng) de proteína de fusión eluida de la matriz de glutatión-sefarosa (Figura 39A, calle 4). Calle 4, dsRNA incubado con 30 μl (100 ng) de proteína de fusión dializada (Figura 39B, calle 2). Calle 5, dsRNA incubado con 0,5 U de enzima Dicer humana recombinante (Gene Therapy Systems). Calle 6, dsRNA incubado sin enzima.

III. 3. 2. Expresión de la proteína Dicer2 completa en células de insecto y ensayo de su actividad enzimática.

La ausencia de actividad ribonucleasa III de la proteína de fusión GST-Dicer2 purificada de *E. coli* podría ser consecuencia de la necesidad de modificaciones post-traduccionales o de que los dominios no incluidos en el fragmento expresado fuesen necesarios para el correcto plegamiento de la proteína, entre otras cosas. Para solventar estos posibles problemas se construyó un vector que permitiera la expresión de la proteína completa en células de insecto mediante un sistema de baculovirus. El vector fue enviado a ABGENT Envision Proteomics, que llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína Dicer2 con la que se realizaron nuevos ensayos de actividad enzimática.

III. 3. 2. 1. Construcción del vector para la expresión de la proteína Dicer2 completa.

La expresión de la proteína Dicer2 completa en células de insecto se basó en un sistema de baculovirus. El primer paso fue la obtención de un cDNA con la secuencia completa del gen *dicer2* mediante amplificación de un inserto presente en el plásmido pMAT1281, que contiene la secuencia del gen *dicer2* sin intrones. El fragmento de 4850 pb obtenido en una reacción de PCR utilizando la pareja de cebadores D2Sma5' y D2Not3' (Tabla 6), que incluyen las señales de inicio y terminación de la traducción de *dicer2* y presentan puntos de corte para las enzimas *SmaI* y *NotI* respectivamente, fue digerido con dichas enzimas y ligado con el vector pVL1393-6xHis digerido con las mismas restrictasas. El plásmido resultante contiene el gen *dicer2* flanqueado por secuencias del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* y se denominó pMAT1236. Mediante secuenciación se comprobó que el gen *dicer2* se encontraba en la fase de lectura correcta para permitir la adición de 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. También se determinó la presencia de un único error de copia que supone un cambio del ácido aspártico de la posición 853 de la proteína por ácido glutámico. Este error estaba presente en la secuencia del plásmido original pMAT1281 y se asumió que este cambio, probablemente, no afectaría a la actividad enzimática, por tratarse de aminoácidos similares y no afectar a ninguno de los dominios de la proteína.

III. 3. 2. 2. Expresión y purificación de la proteína Dicer2 completa.

La co-transfección de la línea celular Sf9 de insecto con el plásmido pMAT1236 y el DNA del baculovirus de la polihedrosis nuclear permitió obtener, por recombinación homóloga, baculovirus con el gen *dicer2* insertado en su genoma. Uno de los clones recombinantes obtenidos se utilizó para volver a transfectar células de insecto y purificar la proteína Dicer2 en condiciones nativas, mediante cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones eluidas con Imidazol 40 mM y 80 mM en PBS contenían la proteína Dicer2 completa a una concentración de 30 ng/ μ l (Dicer2a) y 25 ng/ μ l (Dicer2b), respectivamente (Figura 41). Todo el proceso de expresión y purificación fue realizado por ABGENT Envision Proteomics.

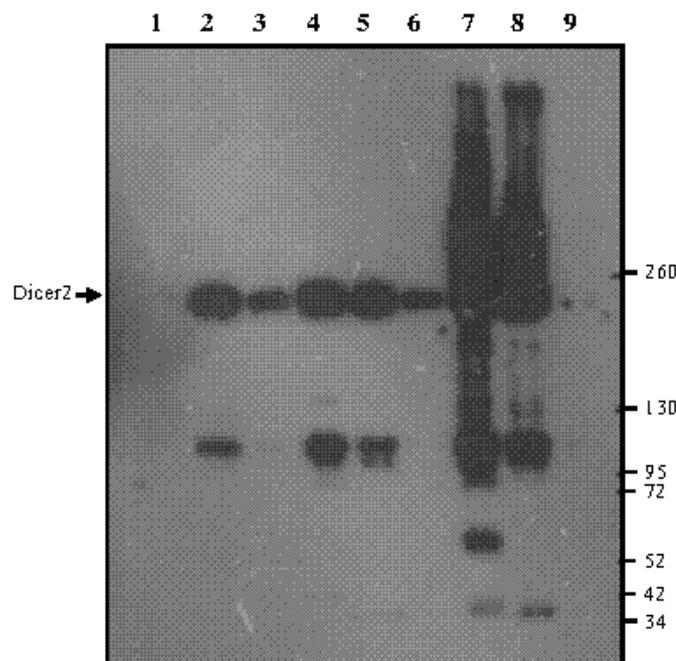


Figura 41. Purificación de la proteína Dicer2 completa a partir de células de insecto. Uno de los clones celulares se utilizó para purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel. Distintas fracciones proteicas obtenidas en diferentes pasos de la purificación se analizaron mediante un experimento tipo Western. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos dirigidos contra el epítipo de histidinas añadido al extremo C-terminal de la proteína Dicer2. Calle 1, fracción de proteínas insolubles. Calle 2, fracción de proteínas solubles. Calle 3, fracción de proteínas no unidas a la columna. Calle 4, proteína eluída con Imidazol 40 mM. Calle 5, proteína eluída con Imidazol 80 mM. Calle 6, proteína eluída con Imidazol 250 mM. Calle 7, proteína eluída con Imidazol 40 mM en PBS (Dicer2a). Calle 8, proteína eluída con Imidazol 80 mM en PBS (Dicer2b). Calle 9, proteína eluída con Imidazol 250 mM en PBS. A la derecha se indica el tamaño en kDa de distintas bandas del marcador (no mostrado).

III. 3. 2. 3. Ensayo de actividad *in vitro* de la proteína Dicer2 completa.

Los ensayos se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas en el **Apartado III.3.1.3.** Entre 100 y 150 ng de proteína Dicer2 procedente de las dos fracciones eluidas durante la purificación se incubaron con el sustrato de dsRNA marcado radiactivamente. Como se observa en la **Figura 42** (calles 4 y 5), la proteína Dicer2 de *M. circinelloides* no genera siRNAs en las condiciones ensayadas. Repeticiones del ensayo en distintas condiciones y con distintas cantidades de proteína dieron los mismos resultados negativos. La incapacidad de detectar actividad enzimática de la proteína Dicer2 podría ser debida a problemas de plegamiento en las células de insecto. Alternativamente, podría sugerir la necesidad de interactuar con otras proteínas de *M. circinelloides*. Estas posibilidades serán consideradas en la **Discusión**.

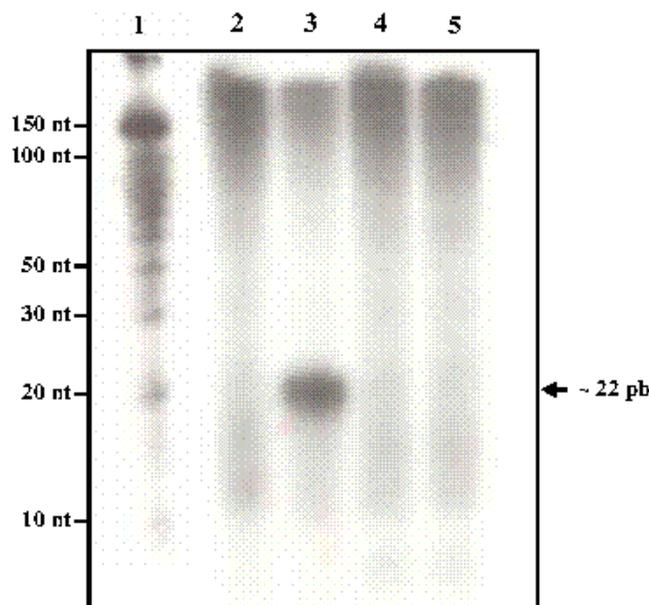


Figura 42. Ensayo de actividad enzimática de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides*. $1,5 \times 10^5$ cpm de dsRNA de 0,5 kb marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ fue incubado durante toda la noche con las dos fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína (Figura 41, calles 7 y 8). Los productos de digestión se separaron en un gel desnaturante del 16% de poliacrilamida y se visualizaron mediante autorradiografía. Calle 1, marcador de tamaño de RNA Decade™ Marker System (Applied Biosystems/Ambion). Calle 2, dsRNA incubado sin enzima. Calle 3, dsRNA incubado con 0,5 U de enzima Dicer humana recombinante (Gene Therapy Systems). Calle 4, dsRNA incubado con 120 ng de proteína Dicer2a. Calle 5, dsRNA incubado con 100 ng de proteína Dicer2b.

III. 4. Análisis genómico de los siRNAs endógenos de *M. circinelloides*.

Aunque la existencia de un mecanismo de silenciamiento que responde a la introducción de transgenes ha sido demostrada en hongos, son pocos los datos acerca de la función endógena que cumple dicho mecanismo en este grupo de organismos. Para determinar si esta función existe en *M. circinelloides* se procedió, en colaboración con el grupo del Dr. Tamas Dalmay (*School of Biological Sciences, University of East Anglia*), a la clonación, secuenciación y caracterización de pequeños RNAs acumulados endógenamente en *M. circinelloides*.

La utilización de la tecnología de secuenciación masiva Solexa® (Illumina) y la comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia genómica de *M. circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci1/Mucci1.home.html>), disponible recientemente, nos ha permitido determinar el alto nivel de transcripción del genoma de *M. circinelloides*, así como la presencia de un elevado número de pequeños RNAs (sRNAs) correspondientes tanto a exones, como a secuencias repetidas y transposones. La comparación de los perfiles

genómicos de los pequeños RNAs acumulados en la estirpe silvestre y en los distintos mutantes en los genes *dicer* nos ha permitido, además, determinar la ruta de silenciamiento que ha generado cada uno de los pequeños RNAs.

En este apartado se presenta la validación, mediante experimentos de Northern, de los resultados obtenidos en el análisis genómico y bioinformático de las secuencias de sRNAs clonadas.

III. 4. 1. Clonación y secuenciación de sRNAs endógenos de *M. circinelloides*.

El primer paso en el análisis de los sRNAs acumulados endógenamente en *M. circinelloides* fue la construcción de librerías de sRNAs de las estirpes R7B (silvestre), MU406 (*dicer1*⁻) y MU410 (*dicer2*⁻). Para ello, micelio crecido en medio YPG sólido pH 4,5 durante 48 horas en condiciones de iluminación continua se utilizó para extraer sRNAs y, tras su separación electroforética, clonar los fragmentos de tamaños comprendidos entre 14 y 28 nt (F. E. Nicolás, *University of East Anglia*). La secuenciación de los sRNAs clonados rindió las lecturas presentadas en la **Tabla 20**, en

	R7B	MU406 (<i>dicer1</i> ⁻)	MU410 (<i>dicer2</i> ⁻)
Lecturas totales	4.317.874	3.619.529	3.912.401
Lecturas únicas	777.409	808.650	890.709
Lecturas totales filtradas	2.913.736	2.581.230	1.415.699

Tabla 20. Estadísticas de los sRNAs secuenciados de las estirpes R7B, MU406 y MU410. Se muestran las lecturas totales que coinciden con la secuencia genómica de *M. circinelloides* y las lecturas únicas, en las que se omiten las secuencias redundantes. Asimismo, se indican las lecturas totales filtradas una vez eliminados los sRNAs correspondientes a productos de degradación de los mRNAs (**Apartado III. 4. 2**).

la que se indica el número total de secuencias obtenidas y el número de secuencias únicas en cada una de las estirpes. Una vez localizadas las secuencias de los sRNAs en la secuencia genómica de *M. circinelloides* y con el objetivo de caracterizar las regiones genómicas correspondientes a los sRNAs clonados, se establecieron grupos de sRNAs cuyas secuencias solapaban en al menos 1 nt. A continuación, se determinó el número de

pb que separaba a cada grupo del situado inmediatamente aguas abajo. Como se muestra en los histogramas de la **Figura 43**, en *M. circinelloides* las regiones de más de 2 kb sin presencia de sRNAs, aunque existen, son muy poco frecuentes (S. Moxon, *University of East Anglia*). Este hecho contrasta con los datos obtenidos en plantas (*A. thaliana*), en las que aparecen con más frecuencia grandes regiones genómicas en las que no se detectan sRNAs, si bien la distribución de los grupos separados por distancias de 2 kb o menores son muy similares en ambos organismos. Así, los sRNAs endógenos producidos en *M. circinelloides* parecen cubrir el genoma casi por completo, lo que indica la transcripción de la mayor parte del mismo.

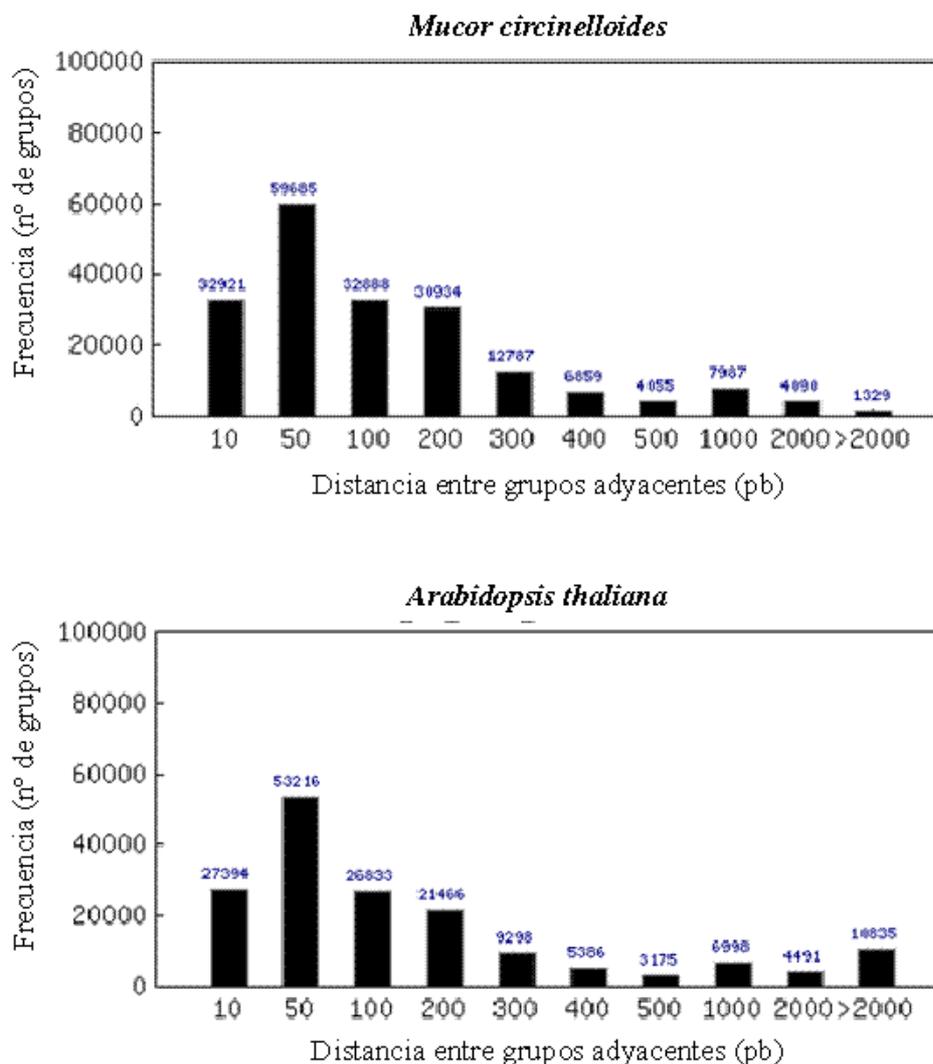


Figura 43. Distribución genómica de grupos de sRNAs solapantes en la estirpe silvestre (R7B) de *M. circinelloides* y en *A. thaliana*. Los histogramas muestran el número de grupos de sRNAs separados del siguiente grupo por el intervalo de distancia indicado.

III. 4. 2. Análisis bioinformático de sRNAs endógenos de *M. circinelloides*.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas incluyó, como primer paso, la agrupación de los sRNAs en *loci*. Para ello se siguió un criterio arbitrario basado en la distancia que separaba en el genoma a los distintos sRNAs. Así, un grupo de sRNAs se consideraba perteneciente al mismo *locus* si no existía entre ellos una distancia mayor de 200 pb.

Una vez eliminados los *loci* correspondiente a secuencias de tRNA y rRNA, que representan entre el 2,4 y el 3,7 % de las secuencias obtenidas, el siguiente paso fue establecer categorías de *loci* en función de la orientación de los sRNAs (con sentido, antisentido, o ambos) y de su abundancia en cada una de las estirpes analizadas. Esto permitió identificar un grupo de *loci* caracterizado por presentar los mismos niveles de acumulación de sRNAs en las estirpes R7B, MU406 y MU410 y que, en su mayoría, únicamente generan sRNAs con sentido que se corresponden con secuencias exónicas (Figura 44A), lo que sugería que las secuencias clonadas fuesen productos de degradación de mRNAs. Para confirmar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos tipo Northern (ver Materiales y Métodos) en los que se analizó la presencia de estos sRNAs en las tres estirpes estudiadas. La disponibilidad de la estirpe MU411 (*dicer1 dicer2*) en el momento en que se iniciaron las validaciones mediante Northern permitió incluirla en los ensayos. Los resultados de la Figura 44B, C, D y E muestran que en los tres *loci* estudiados se detecta degradación del mRNA correspondiente, pero en ningún caso se identifican sRNAs de tamaño discreto generados por la maquinaria de silenciamiento. Como cabía esperar en base a los resultados de la clonación, secuenciación y análisis bioinformático tampoco se detectaron sRNAs antisentido en ninguno de estos *loci*.

Los *loci* con un nivel de acumulación de sRNAs similar en las tres estirpes y que exclusivamente generan sRNAs con sentido correspondientes a exones representan alrededor del 40 % de las lecturas totales de sRNAs obtenidas en la estirpe silvestre y el mutante *dicer1* y un 63 % en el mutante *dicer2* (Tabla 20). Como se ha demostrado, estos sRNAs son productos resultantes de la degradación de mRNAs por mecanismos independientes del silenciamiento génico. Por este motivo, los sRNAs de la citada categoría fueron excluidos de los análisis posteriores. Los sRNAs restantes se clasificaron según sus secuencias correspondiesen a exones, regiones intergénicas y transposones o

secuencias repetidas, indicándose su distribución en cada una de las estirpes en la Figura 45.

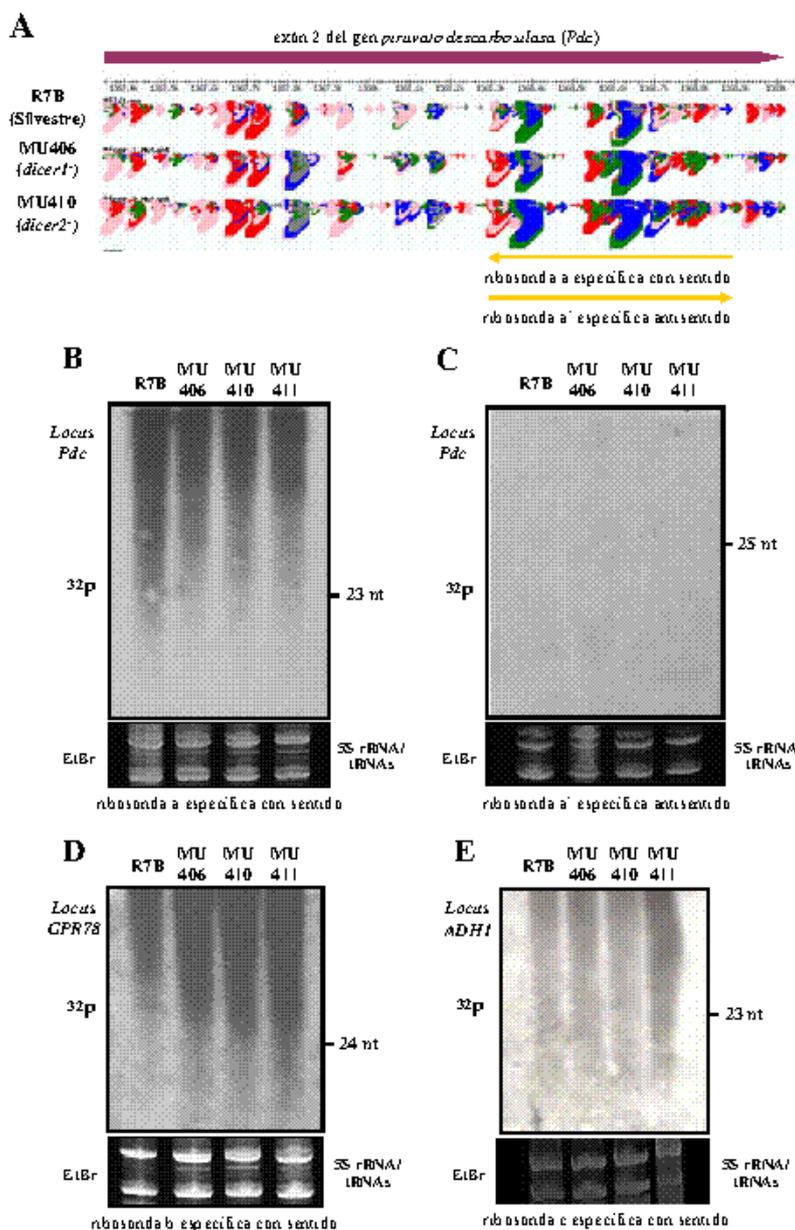


Figura 44. *Loci* con niveles de acumulación similar de sRNAs en las estirpes R7B, MU406 y MU410. (A) Ejemplo de *locus* caracterizado por generar exclusivamente sRNAs con sentido respecto al mRNA del gen de la piruvato descarboxilasa (*Pdc*) de *M. circinelloides*. Las secuencias de sRNAs clonados de cada estirpe se presentan como flechas de distintos colores (Rosa: 15-19 nt; Rojo: 20-21 nt; Verde: 22-23 nt; Azul: 24-25 nt; Gris: otros). El grosor de la flecha representa la abundancia de esa secuencia concreta. La dirección de cada flecha se corresponde con la secuencia del sRNA leída en sentido 5' → 3'. Las flechas amarillas indican la dirección y posición de las ribosondas utilizadas para detectar sRNAs con sentido (ribosonda específica con sentido) o antisentido (ribosonda específica antisentido). (B) Hibridación tipo Northern de muestras de RNA de bajo peso molecular (50 µg) aisladas de las estirpes R7B, MU406 (*dicer1*), MU410 (*dicer2*) y MU411 (*dicer1' dicer2*). La hibridación se llevó a cabo con la ribosonda específica con sentido indicada en (A). (C) Igual que en B pero empleando la ribosonda específica antisentido del gen *Pdc*. (D) Igual que en B pero empleando una ribosonda específica con sentido del gen *GRP78* (ribosonda b). (E) Igual que en B pero empleando una ribosonda específica con sentido del gen *ADH1* (ribosonda c). Oligonucleótidos de DNA con sentido o antisentido respecto a las sondas utilizadas se utilizaron como marcadores de tamaño (no mostrados en las figuras). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con Bromuro de Etidio (EtBr).

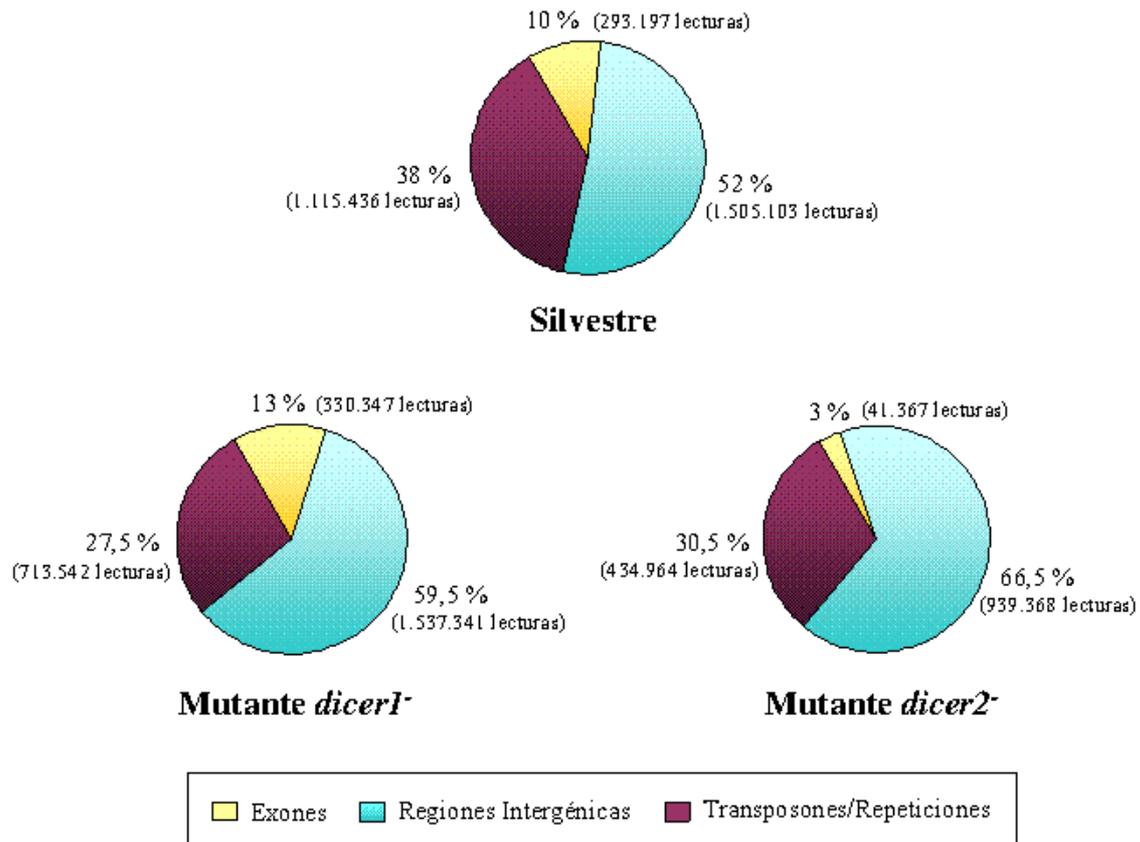


Figura 45. Distribución en clases de los sRNAs totales secuenciados en la estirpe silvestre y los mutantes *dicer1*⁻ y *dicer2*⁻. Se han descartado las lecturas correspondientes a los *loci* que sólo presentan sRNAs con sentido que coinciden con exones.

III. 4. 3. Validación mediante Northern de las distintas clases de *loci* establecidas.

Para identificar *loci* cuyos sRNAs fuesen dependientes del mecanismo de silenciamiento génico, se seleccionaron aquellos que mostraron una disminución de al menos cuatro veces en el número de lecturas normalizadas en los mutantes *dicer1*⁻ o *dicer2*⁻ comparado con la estirpe silvestre. Utilizando este criterio, los *loci* se clasificaron en cuatro categorías en función de la acumulación diferencial de los sRNAs en las distintas estirpes: menor acumulación en los mutantes *dicer1*⁻ y *dicer2*⁻ respecto de la estirpe silvestre, menor acumulación sólo en el mutante *dicer1*⁻, menor acumulación sólo en el mutante *dicer2*⁻ y sRNAs acumulados por igual en las tres estirpes pero correspondientes a las dos orientaciones o únicamente a la orientación antisentido (en el caso de secuencias exónicas). Dentro de cada clase se identificó el número de *loci* correspondientes a

transposones o repeticiones, regiones intergénicas y exones. En la Figura 46 queda detallada esta distribución. Las cuatro clases de *loci* establecidas fueron sometidas a validación mediante experimentos tipo Northern.

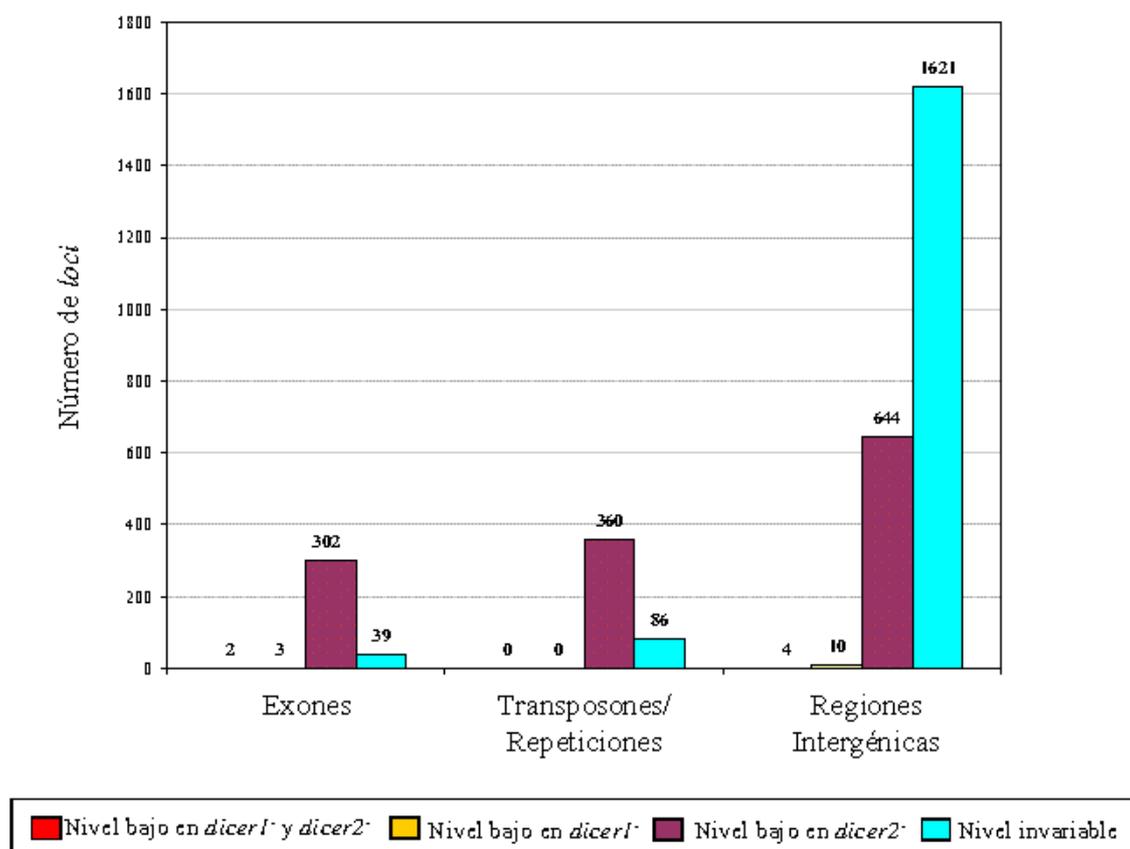
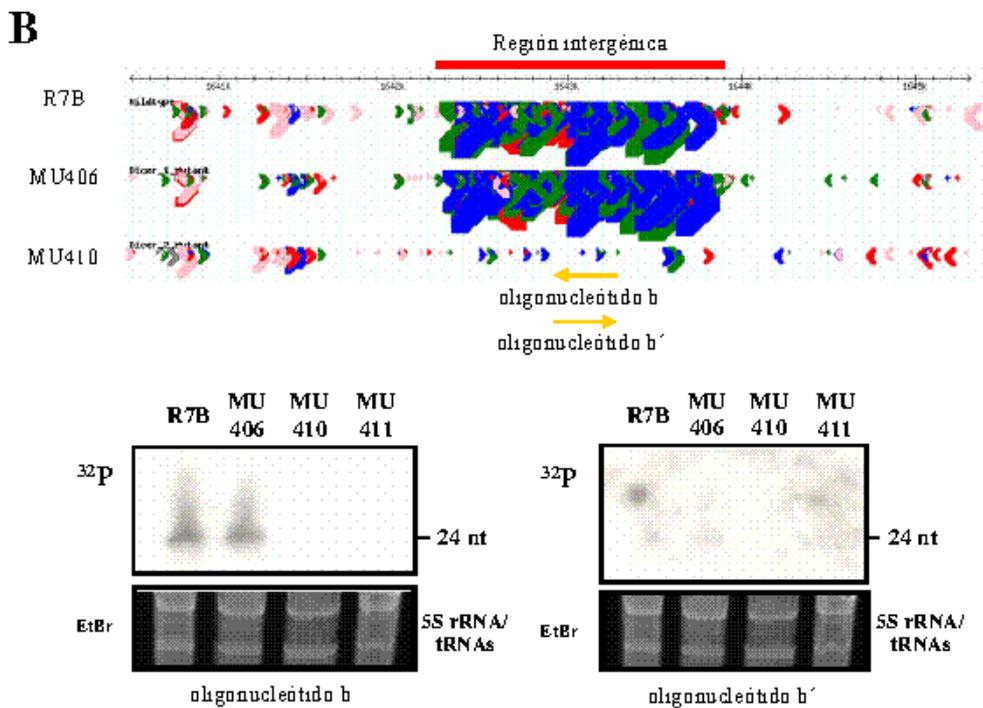
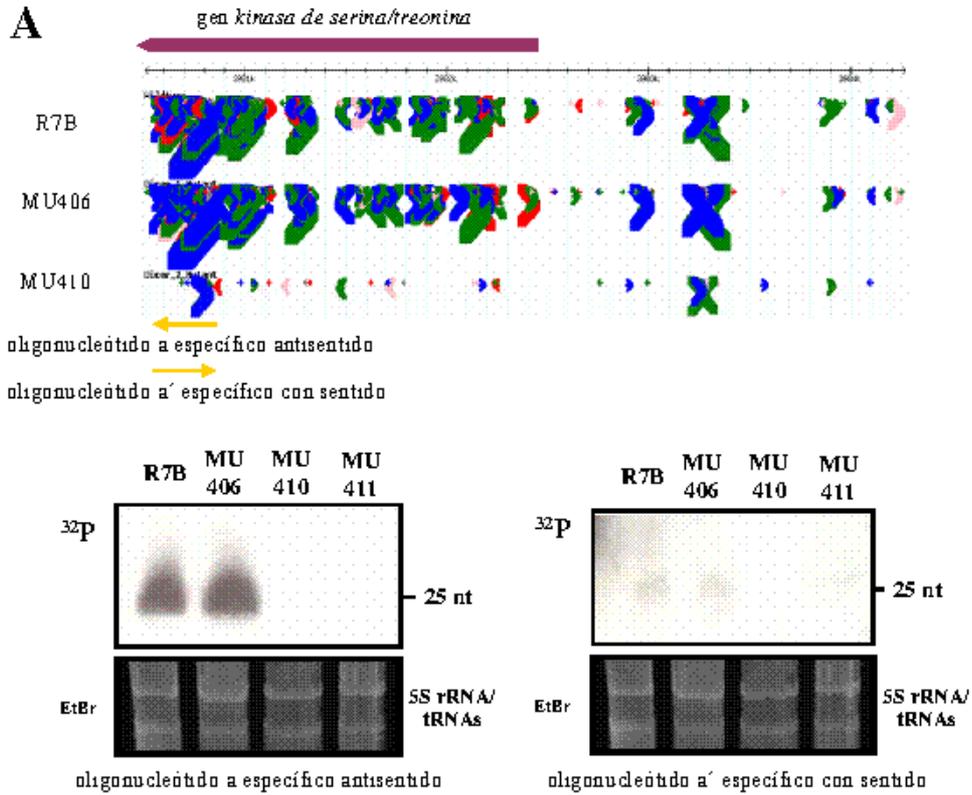


Figura 46. Distribución de los *loci* en cuatro clases según el nivel de acumulación de los sRNAs correspondientes en la estirpe silvestre R7B, el mutante *dicer1*⁻ (MU406) y el mutante *dicer2*⁻ (MU410). Los datos de cada una de las clases aparecen desglosados de forma que se muestran los *loci* que se corresponden con exones, los que coinciden con transposones o repeticiones y los que se localizan en regiones intergénicas. Sobre cada una de las barras se muestra el número de *loci* de esa categoría.

III. 4. 3. 1. *Loci* con niveles reducidos de sRNAs en el mutante *dicer2*⁻.

Una de las clases más representativas corresponde a *loci* cuyos sRNAs presentan un nivel de acumulación muy reducido en el mutante *dicer2*⁻, perteneciendo a ella 1306 *loci* de los 3096 establecidos. En esta clase encontramos 302 *loci* con sRNAs que coinciden con exones, 360 *loci* localizados en regiones con transposones y secuencias repetidas y 644 *loci* que se corresponden con regiones intergénicas. Representantes de estas tres categorías se sometieron a validación mediante hibridación con oligonucleótidos marcados radiactivamente (ver Materiales y Métodos). Los resultados de la Figura 47 indican que

los datos obtenidos en la secuenciación y análisis bioinformático se corresponden con lo observado experimentalmente, detectándose sRNAs con sentido y antisentido para cada uno de los *loci* analizados en la estirpe silvestre y el mutante *dicer1*, no siendo detectados estos sRNAs en el mutante *dicer2* ni en el doble mutante *dicer1 dicer2*.



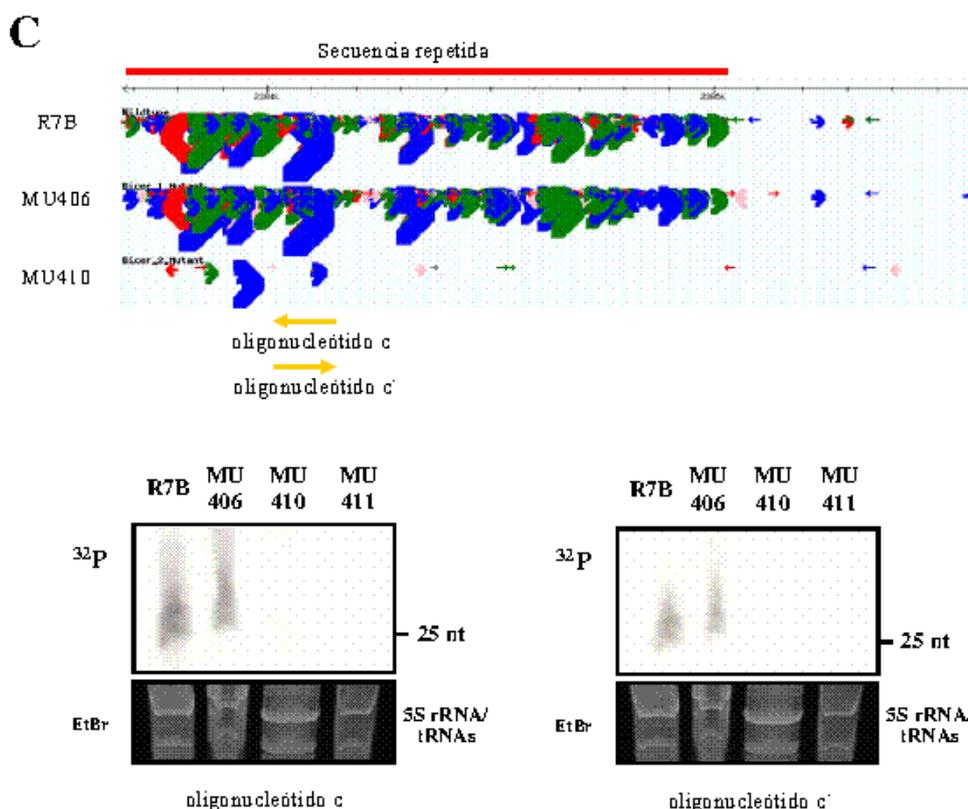


Figura 47. Distintas clases de *loci* con niveles reducidos de sRNAs en el mutante *dicer2*⁻. (A) *Locus* con sRNAs con sentido y antisentido respecto al mRNA del gen de una kinasa de serina/treonina de *M. circinelloides*. Las secuencias de sRNAs clonados de cada estirpe se presentan como flechas de distintos colores (Rosa: 15-19 nt; Rojo: 20-21 nt; Verde: 22-23 nt; Azul: 24-25 nt; Gris: otros). El grosor de la flecha representa la abundancia de esa secuencia concreta. La dirección de cada flecha se corresponde con la secuencia del sRNA leída en sentido 5'→3'. Las flechas amarillas indican la dirección y posición de los oligonucleótidos utilizados como sonda para detectar los sRNAs. Para la hibridación tipo Northern, muestras de RNA de bajo peso molecular (50 µg) aisladas de individuos de las estirpes R7B, MU406 (*dicer1*⁻), MU410 (*dicer2*⁻) y MU411 (*dicer1*⁻ *dicer2*⁻) fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana. Oligonucleótidos de DNA en orientación con sentido o antisentido respecto a las sondas utilizadas fueron utilizados como marcadores de tamaño (no mostrados en las figuras). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con EtBr. (B) Igual que en A pero para un *locus* con sRNAs generados a partir de una región intergénica (C) Igual que en A pero para un *locus* con sRNAs generados a partir de secuencias repetidas.

Las regiones intergénicas son las candidatas principales para producir miRNAs. Sin embargo, ninguno de los 644 *loci* correspondientes a estas regiones que muestran una menor acumulación de sRNAs en el mutante *dicer2*⁻ era capaz de adoptar la estructura en horquilla característica de los *loci* de miRNAs (Nicolás *et al.*, 2010). Tampoco se identificaron presumbibles *loci* de miRNAs cuando el análisis se extendió a todos los *loci* identificados, incluyendo aquellos que no mostraron variación en los mutantes *dicer*. Estos datos sugieren, por tanto, que *M. circinelloides* no produce miRNAs.

Debido a su localización poco habitual, los sRNAs que coinciden con secuencias exónicas son los más interesantes. Para analizar con más detalle los *loci* correspondientes a estos sRNAs se dividieron en tres subcategorías: *loci* que presentan mayoritariamente

sRNAs antisentido, *loci* con una mayor proporción de sRNAs con sentido y *loci* con una abundancia similar de sRNAs con sentido y antisentido. Los resultados de las hibridaciones utilizando ribosondas y oligonucleótidos marcados radiactivamente se presentan en la Figura 48. Los resultados experimentales validan mayoritariamente los datos derivados del análisis genómico y bioinformático de las secuencias de sRNAs. Sólo algunos de los *loci* que presentan exclusivamente sRNAs con sentido no fueron validados experimentalmente, no detectándose sRNAs en ninguna de las estirpes analizadas.

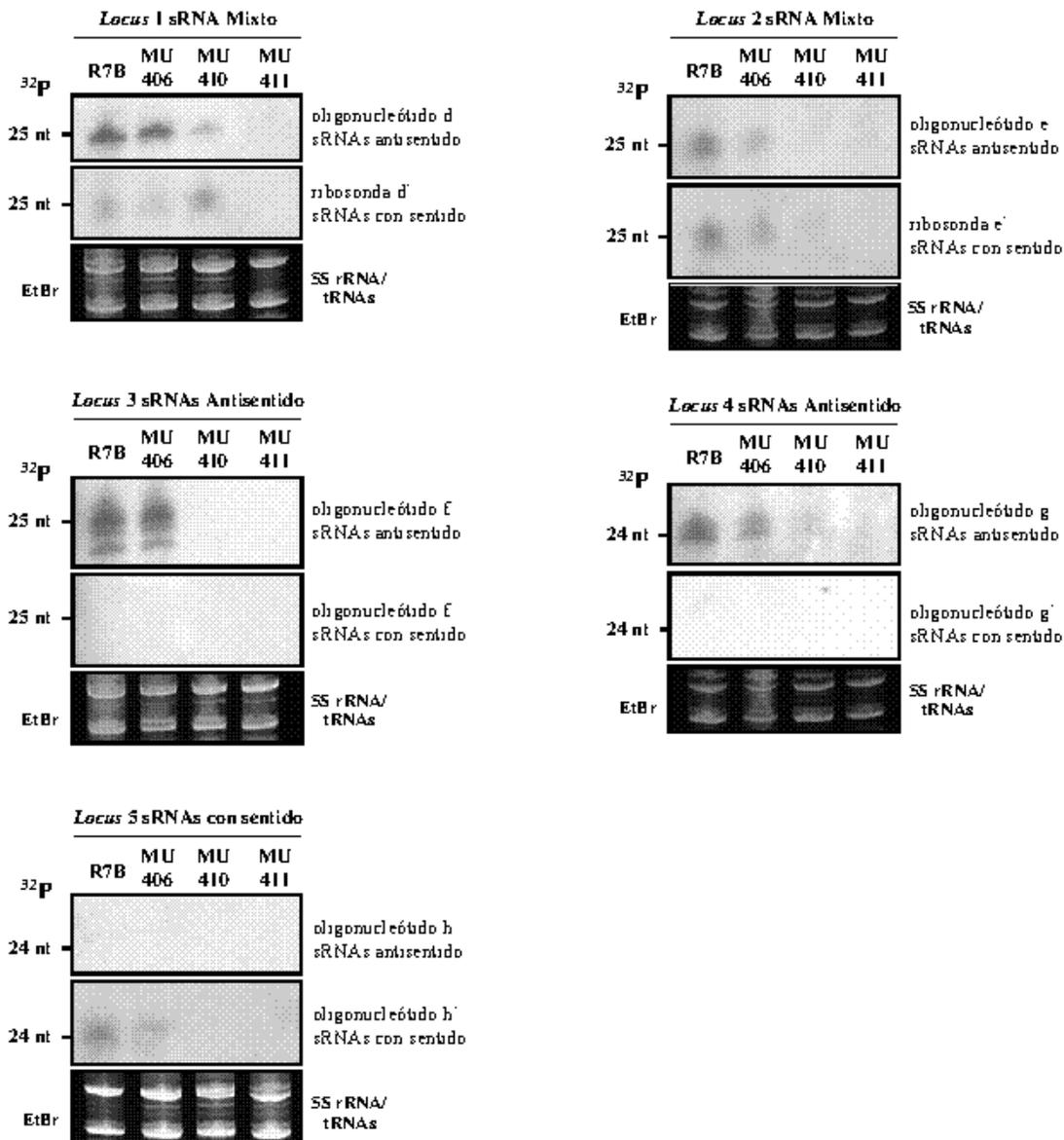


Figura 48. *Loci* correspondientes a secuencias exónicas con niveles reducidos de sRNAs en el mutante *dicer2*. El análisis bioinformático indica que los *loci* 1 y 2 generan sRNAs de ambas polaridades a niveles similares. Los *loci* 3 y 4 presentan mayoritariamente sRNAs antisentido. El *locus* 5 presenta mayoritariamente sRNAs con sentido. A la derecha de cada imagen se indican las sondas utilizadas para detectar, en experimentos tipo Northern, los sRNAs con sentido y antisentido y validar experimentalmente los datos bioinformáticos. Oligonucleótidos de DNA en orientación con sentido o antisentido respecto a las sondas utilizadas fueron utilizados como marcadores de tamaño (no mostrados en las figuras). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con EtBr.

Los resultados obtenidos confirman que estos sRNAs están generados por la maquinaria de silenciamiento, ya que el mutante *dicer2*⁻, esencial en este mecanismo, es incapaz de generar sRNAs con la misma eficacia que la estirpe silvestre. Muestran, además, que en el doble mutante *dicer1*⁻ *dicer2*⁻ la maquinaria de silenciamiento está completamente afectada, indicando que los pequeños niveles de sRNAs generados en el mutante *dicer2*⁻ son debidos a una actividad residual de la proteína Dicer1. El análisis detallado de los *loci* correspondientes a esta categoría debe aportar información esencial sobre el papel endógeno del mecanismo de silenciamiento en *M. circinelloides*.

III. 4. 3. 2. *Locí* con niveles similares de sRNAs en la estirpe silvestre y en los mutantes *dicer*.

Esta es la clase de *loci* mayoritaria, englobando 1746 *loci* que corresponden, en la gran mayoría de los casos (1621 *loci*) a regiones intergénicas (Figura 46). Una gran parte de estos *loci* generan exclusivamente sRNAs de una de las dos orientaciones posibles. Sin embargo, al corresponder a secuencias anotadas como regiones intergénicas y no tener asignadas, por tanto, dirección de transcripción, no se pueden someter al filtrado que elimina los productos de degradación de los posibles RNAs transcritos de estas regiones cromosómicas. De hecho, la validación mediante experimentos tipo Northern muestra que la biogénesis de estos sRNAs, al menos en algunos casos, podría no estar relacionada con la maquinaria de silenciamiento. Así, en el *locus* analizado en la Figura 49 se detecta una banda discreta de un tamaño aproximado de 35-37 nt, superior al de los sRNAs, en todas las estirpes estudiadas. La detección de sRNAs de entre 19 y 26 nt al sobreexponer la película podría indicar que los sRNAs clonados proceden de la degradación del fragmento de 35-37 nt o de algún fragmento de tamaño mayor. En la mayoría de los casos analizados, sin embargo, no se detectó ninguna señal positiva en los experimentos de Northern en ninguna de las estirpes estudiadas (datos no mostrados).

En cuanto a los sRNAs localizados en exones cuya expresión no varía en las tres estirpes, son 39 los *loci* en los que se agrupan, y generan únicamente sRNAs antisentido. Ninguno de los que se ha intentado validar mediante experimentos tipo Northern ha dado resultados positivos, no detectándose señal en ninguna de las estirpes. Probablemente, la ausencia de señal en la hibridación esté determinada por el bajo nivel de expresión (bajo

número de secuencias clonadas para cada uno de estos *loci*) y la dispersión de los sRNAs a lo largo del *locus*, una característica común a casi todos estos *loci*.

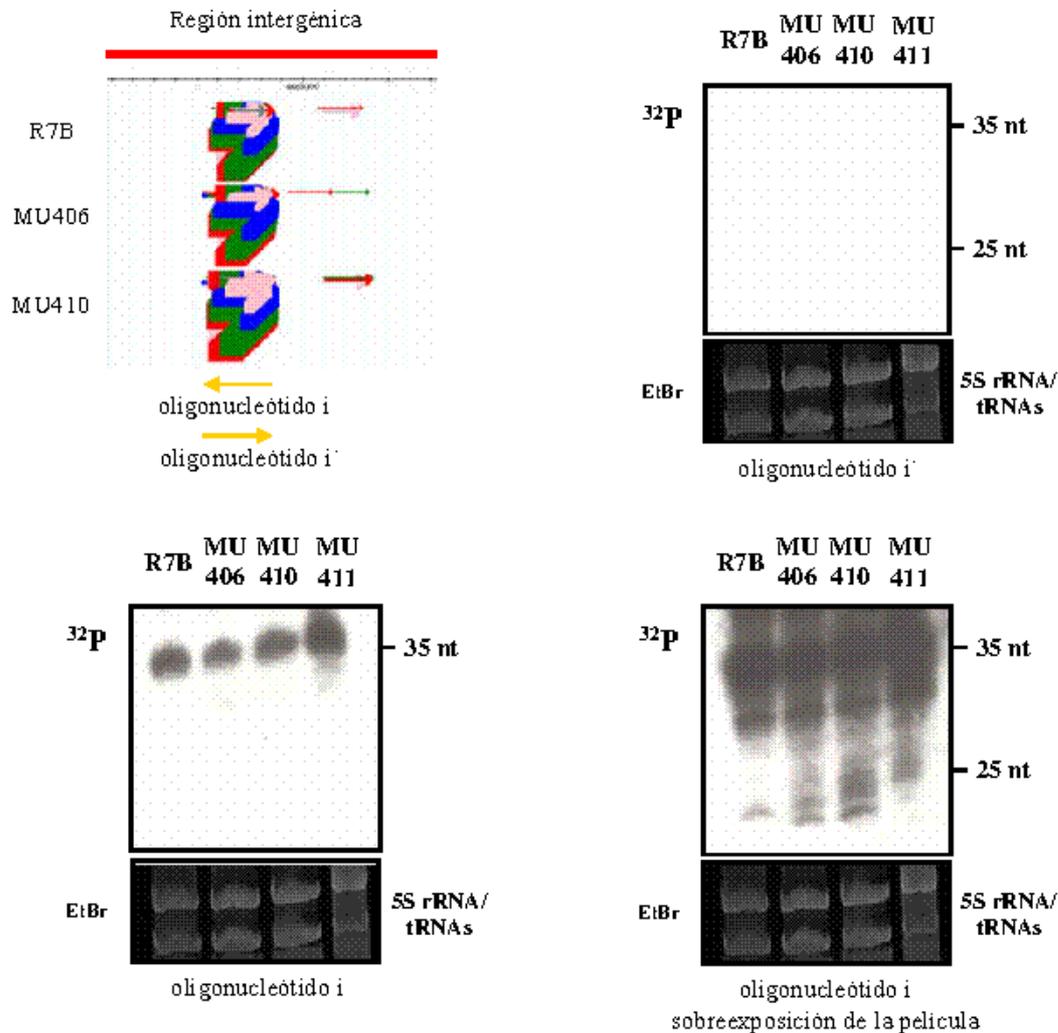


Figura 49. *Locus* correspondiente a una región intergénica con niveles similares de sRNAs en la estirpe silvestre R7B, el mutante *dicer1* (MU406) y el mutante *dicer2* (MU410). Las flechas amarillas indican la dirección y posición de los oligonucleótidos utilizados como sonda para detectar los sRNAs. La hibridación tipo Northern con una sonda que detecta los sRNAs secuenciados (oligonucleótido i) permite identificar un fragmento de unos 35-37 nt (panel inferior de la figura). Cuando se sobreexpone la película se observan fragmentos que coinciden en tamaño con los sRNAs clonados. El uso de una sonda complementaria a la anterior (oligonucleótido i') no da señal de hibridación (panel superior de la figura). Oligonucleótidos de DNA en orientación con sentido o antisentido respecto a las sondas utilizadas fueron utilizados como marcadores de tamaño (no mostrados en las figuras). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con EtBr.

En conjunto, no se ha podido validar ningún *loci* perteneciente a esta clase. Sin embargo, dado su elevado número, no podemos descartar que algunos de estos *loci* generen sRNAs reales. En tal caso, su presencia en cantidades similares tanto en la estirpe silvestre como en los mutantes *dicer1* o *dicer2* indicaría que ambas enzimas tendrían funciones completamente redundantes en la producción de esta clase de sRNAs.

III. 4. 3. 3. Clases de *loci* minoritarias.

Además de las clases mayoritarias ya citadas, aparecen otras dos clases con un escaso número de representantes. Por un lado, encontramos *loci* cuyos niveles de expresión están reducidos únicamente en el mutante *dicer1*. De un total de 13 *loci*, 10 se encuentran localizados en regiones intergénicas y 3 coinciden con exones. Ninguno de los intentos de validación ha dado resultados positivos, no detectándose ningún tipo de sRNAs en las estirpes estudiadas. El bajo nivel de expresión de estos *loci* puede ser responsable de estos resultados. No obstante, los datos indican que el gen *dicer1* no parece cumplir un papel relevante en la producción de sRNAs endógenos, al menos en las condiciones estudiadas, tal como ocurre en el silenciamiento génico inducido por transgenes.

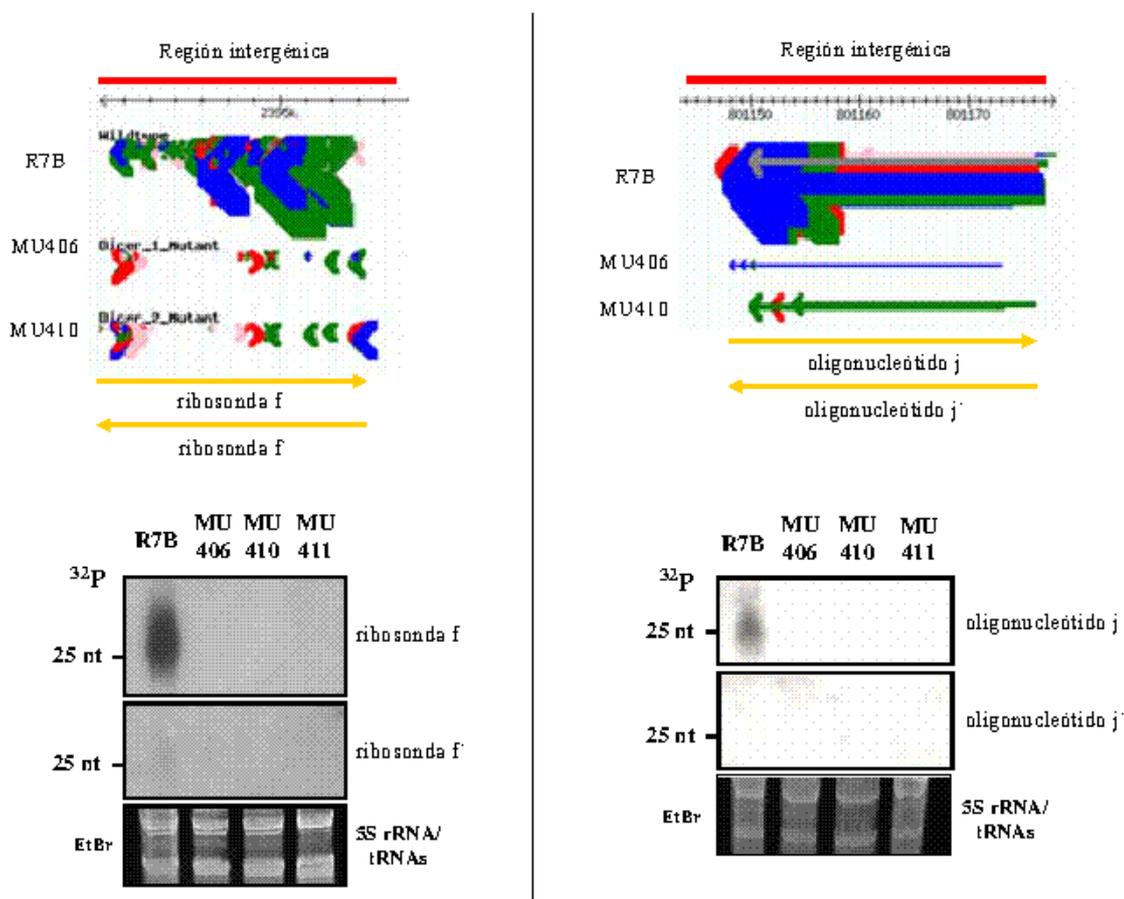


Figura 50. *Loc*i correspondientes a regiones intergénicas con niveles reducidos de sRNAs en los mutantes *dicer*. Las flechas amarillas indican la dirección y posición de las ribosondas y oligonucleótidos utilizados para detectar los sRNAs en las hibridaciones tipo Northern. Oligonucleótidos de DNA en orientación con sentido o antisentido respecto a las sondas utilizadas fueron utilizados como marcadores de tamaño (no mostrados en las figuras). Como control de carga se tiñeron los tRNAs y el 5S rRNA con EtBr.

La segunda clase minoritaria la componen seis *loci* que muestran niveles de sRNAs reducidos en los dos mutantes *dicer*. Dos de ellos corresponden a exones y cuatro a

regiones intergénicas. El bajo número de secuencias clonadas de los dos *loci* correspondientes a secuencias exónicas hacía que no fuese posible su estudio por no alcanzar la capacidad resolutive de las técnicas empleadas. Los cuatro *loci* correspondientes a regiones intergénicas fueron sometidos a validación, y en dos de los casos, los resultados experimentales confirmaron las predicciones, detectándose sRNAs únicamente en la estirpe silvestre (Figura 50). En los restantes casos no se detectó ninguna señal positiva, posiblemente debido al bajo nivel de acumulación de estos sRNAs en la estirpe silvestre. La característica peculiar de estos *loci*, en los que se requiere la colaboración de las proteínas Dicer1 y Dicer2 para generar los sRNAs, merecerá un análisis más detallado en un futuro próximo.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que, a pesar de la redundancia funcional entre *dicer1* y *dicer2*, la proteína Dicer2 es la responsable de producir la mayoría de los sRNAs endógenos en *M. circinelloides*, aunque un pequeño número de genes podría requerir a Dicer1 o incluso a las dos proteínas para producir los sRNAs.

IV. DISCUSIÓN

IV. 1. El gen *dicer2* de *M. circinelloides*.

El silenciamiento génico mediado por RNA actúa mediante mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales para suprimir, de forma específica, la expresión de los genes diana. Desde hongos hasta mamíferos, este mecanismo controla una amplia variedad de procesos biológicos mediante pequeñas moléculas de RNA que son generadas a partir de precursores de dsRNA por la ribonucleasa III Dicer. En el hongo *M. circinelloides* el silenciamiento génico post-transcripcional está asociado a la presencia de moléculas de siRNAs antisentido y con sentido, con tamaños de 21 y 25 nt (Nicolás *et al.*, 2003). La disrupción del gen *dicer1*, el primer gen de esta familia identificado en *M. circinelloides*, permitió determinar que la enzima Dicer1 no es esencial para generar las dos clases de siRNAs derivadas de la introducción de transgenes (Nicolás *et al.*, 2007). Ello nos llevó a plantear, como objetivo fundamental de esta Tesis, la identificación de nuevos genes *dicer* y el análisis del papel que desempeñan en el silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*.

El uso de oligonucleótidos degenerados, correspondientes a dominios conservados de las proteínas Dicer identificadas en varios hongos, permitió clonar un fragmento del gen *dicer2* de *M. circinelloides*, que se utilizó como sonda para rastrear una genoteca genómica de dicho hongo. Mediante esta aproximación se consiguió aislar un contiguo de 7941 pb que contiene el gen *dicer2* completo. Dicho gen se encuentra flanqueado en su extremo 3' por una secuencia que presenta elevada similitud con *cox6* (Figura 20), un gen que determina la subunidad VI del complejo citocromo c oxidasa, componente terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Flanqueando el extremo 5' del gen *dicer2* y en la misma orientación que éste, se encuentra una fase de lectura abierta que presenta similitud con el gen *sec8*, que determina uno de los ocho componentes del complejo "exocyst", responsable de que el proceso de exocitosis se lleve a cabo de forma polarizada en las células eucariotas. El mismo patrón de organización génica se encuentra en la región del genoma de *R. oryzae* donde se localiza el gen *dicer* completo, con los genes *cox6* y *sec8* conservando la misma disposición que en *M. circinelloides* (Figura 51). El alto grado de sintenia en esta región es un indicador más de la proximidad filogenética de ambos organismos. En *P. blakesleeanus*, otro hongo zigomiceto, sólo el gen *cox6* conserva la posición y orientación respecto al único gen *dicer* presente en su genoma.

Aguas arriba del posible codón de inicio de la traducción del gen *dicer2* se encuentran dos elementos característicos de promotores de hongos filamentosos, una

región rica en pirimidinas y una secuencia CAAT (Figura 20) (Gurr *et al.*, 1987). No existe sin embargo un motivo canónico TATAAA, aunque esto no es infrecuente en genes de hongos filamentosos (May *et al.*, 1987; Kos *et al.*, 1988). Es más, su ausencia se relaciona con la presencia de secuencias ricas en pirimidinas especialmente largas (Gurr *et al.*, 1987), regiones que han sido implicadas en la correcta iniciación de la transcripción en algunos promotores de *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1990). El extremo 3' del gen *dicer2* se identificó mediante experimentos de 3'RACE, estableciéndose el sitio de poliadenilación 23 pb aguas abajo de la secuencia AAUAAA, localizada 71 pb aguas abajo del codón de fin de mensaje (Figura 20).

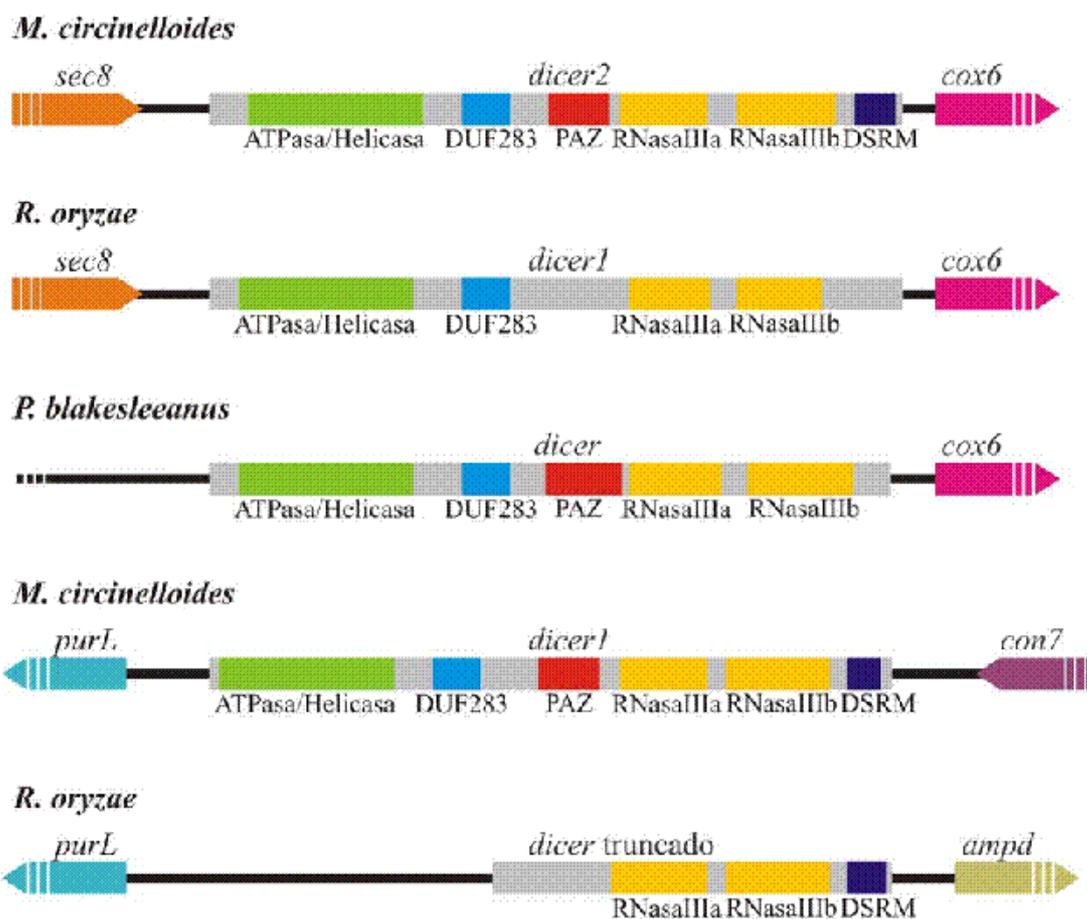


Figura 51. Organización de las regiones genómicas que incluyen los genes *dicer* de los hongos cigomicetos *M. circinelloides*, *R. oryzae* y *P. blakesleeanus*.

El análisis de la secuencia genómica del gen *dicer2* y su comparación con la de los cDNAs obtenidos por RT-PCR permitió localizar con exactitud los cuatro intrones presentes en la secuencia del gen *dicer2* (Figura 20). La eliminación de estos cuatro

intrones genera una única fase de lectura abierta de 4824 pb, que se ajusta al tamaño del mRNA detectado en los experimentos de Northern y que cifra una proteína de 1608 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 185 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína Dicer2, deducida de la secuencia de nucleótidos del gen, presenta los seis dominios característicos de las proteínas de la familia Dicer: el dominio DEXDc, el dominio helicasa HELICc, el dominio DUF283, el dominio PAZ, los dos dominios RNasaIII y el dominio DSRM (Figura 23). La combinación de los dominios DEXDc y HELICc se ha denominado ATPasa/RNA Helicasa (Filipowicz *et al.*, 2005) y aunque aún no se conocen con detalle las funciones que desempeña, resulta esencial para la actividad *in vivo* de la proteína Dicer-2 de *D. melanogaster* (Lee, Y.S. *et al.*, 2004). Estos dominios no aparecen en todas las proteínas de la familia Dicer, como es el caso de las enzimas de *Dictyostelium discoideum* (Martens *et al.*, 2002), *Trypanosoma brucei* (Shi *et al.*, 2006) o *G. intestinalis*, si bien se ha demostrado que esta última puede suplir la función de la enzima Dicer de *S. pombe*, que sí contiene los citados dominios (MacRae *et al.*, 2006). Entre las funciones propuestas para este dominio ATPasa/RNA Helicasa se encuentran la de participar en el alineamiento de secuencias de RNA complementarias (Obi, 2009) y la de restar procesividad a la propia enzima Dicer, manteniéndola en una conformación poco eficiente para el corte del dsRNA mientras no se asocia a otras proteínas que revierten esta autoinhibición (Ma *et al.*, 2008). El dominio DUF283 ha sido propuesto como un dominio de unión a dsRNA en base a su estructura secundaria y su homología con proteínas de unión a dsRNA (Dlakić, 2006). Entre las funciones que podría desempeñar se encuentran la de permitir la unión de Dicer a otras proteínas (Dlakić, 2006) y servir de región conectora entre los dominios PAZ y RNAasaIII en la estructura terciaria de la proteína, estableciendo al mismo tiempo interacciones electrostáticas con el dsRNA unido a Dicer (MacRae *et al.*, 2006; MacRae *et al.*, 2007). El dominio PAZ, también presente en las proteínas Argonauta, se une específicamente a los dos nucleótidos protuberantes presentes en el extremo 3' del dsRNA unido a Dicer (Song *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004). Los dominios RNasaIII, además de su función catalítica, también participan en la interacción de Dicer con las proteínas Argonauta (Tabbaz *et al.*, 2004). Finalmente, el dominio de unión a dsRNA DSRM de la proteína Dicer2 presenta, al contrario que el identificado en Dicer1, una baja homología con la secuencia consenso. En la enzima Dicer humana, este dominio no parece intervenir en la unión al dsRNA sino en su procesamiento (Ma *et al.*, 2008).

La proteína Dicer2 de *M. circinelloides* presenta una elevada similitud con las proteínas Dicer de otros organismos, principalmente con las identificadas en hongos y plantas (Tabla 12). El mayor grado de similitud se obtiene al comparar con proteínas Dicer de otros cigomicetos, como la proteína completa codificada en el genoma de *R. oryzae* (77,6 %) y la única enzima Dicer de *P. blakesleeanus* (69,5 %), ambas más similares a Dicer2 que la proteína paróloga Dicer1 de *M. circinelloides* (52,2 %). Un resultado similar a este último se obtiene al comparar con la proteína Dicer truncada de *R. oryzae* (51,6 %), que carece del dominio ATPasa/RNA Helicasa y que se ha propuesto como ortólogo de la proteína Dicer1 de *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2007). Dentro de los cigomicetos, sólo en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003; Nicolás *et al.*, 2007; de Haro *et al.*, 2009) y *Mortierella alpina* (Takeno *et al.*, 2005) se han obtenido datos experimentales sobre la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes. Sin embargo, la similitud de las secuencias de las proteínas Dicer de *M. circinelloides* y *R. oryzae*, así como la organización de las regiones génicas en las que se localizan los genes correspondientes, sugieren que el gen *dicer1* de *M. circinelloides* se corresponde con el gen truncado de *R. oryzae* y el gen *dicer2* con la versión completa (Figura 51). Si las funciones que cumplen estos genes en ambos organismos son también similares es algo que requerirá una investigación más profunda.

El análisis de la expresión del gen *dicer2* en la estirpe silvestre revela que los niveles de mensajero son muy bajos al inicio del ciclo vegetativo y se incrementan considerablemente durante la fase exponencial (Figura 25A), a diferencia de lo que ocurre con el gen *dicer1*, que se expresa constitutivamente durante todo el crecimiento vegetativo a niveles muy reducidos (Nicolás *et al.*, 2007). No se han detectado mensajeros de distintos tamaños que evidencien la existencia de un procesamiento alternativo de los transcritos primarios, algo que sí ha sido descrito en el caso del gen *dicer1* (Nicolás *et al.*, 2007).

En *N. crassa* la expresión de los genes implicados en el silenciamiento génico inducido por transgenes, incluyendo el gen *dicer*, se activa en respuesta a la presencia de moléculas de dsRNA (Choudhary *et al.*, 2007). En *M. circinelloides* el nivel de expresión del gen *dicer2* no cambia en las estirpes silenciadas con respecto a las no silenciadas (Figura 25B), lo que indica que la inducción del mecanismo de silenciamiento por transgenes con repeticiones invertidas no es necesaria para activar la expresión del gen *dicer2*, una característica que es compartida por el gen *dicer1* (Nicolás *et al.*, 2007). Esto podría explicarse si la expresión constitutiva del gen *dicer2* estuviera relacionada con su

papel en el control de funciones celulares endógenas. De hecho, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los mutantes *dicer2* muestran una reducción significativa en la producción de esporas asexuales (de Haro *et al.*, 2009), un complejo proceso de desarrollo en el que están implicados muchos genes distintos. También en otros hongos, mutaciones en los genes *dicer* provocan alteraciones fenotípicas. Así, los mutantes *dcl-1* de *N. crassa*, afectados en el mecanismo de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) son estériles (Alexander *et al.*, 2008) y las mutaciones en el gen *MDL-1* de *M. oryzae* provocan malformaciones en las esporas (Kadotani *et al.*, 2004). Los mutantes en el gen *dicer1* de *M. circinelloides* no presentan ninguna alteración en su capacidad de silenciar en respuesta a la introducción de transgenes, siendo además capaces de producir las dos clases de siRNAs identificadas en este organismo. Sin embargo, sí manifiestan una reducción en la tasa de crecimiento vegetativo, así como la alteración de la morfología de las hifas de los extremos de la colonia (Nicolás *et al.*, 2007).

Con objeto de determinar el papel del gen *dicer2* de *M. circinelloides* en el proceso de silenciamiento génico, se construyó un mutante nulo en dicho gen y se analizó su capacidad para silenciar la expresión génica en respuesta a la introducción de transgenes con sentido o transgenes con repeticiones invertidas. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia de silenciamiento se encuentra severamente reducida respecto a la que presenta la estirpe silvestre (Tabla 13), demostrando que el gen *dicer2* es esencial para que el proceso de silenciamiento sea eficaz. Asimismo, la estabilidad del silenciamiento se encuentra afectada en el mutante *dicer2*, ya que los escasos individuos silenciados recuperan el fenotipo silvestre tras un solo ciclo de crecimiento vegetativo (Tabla 14 y Figura 30). Esto parece indicar que la enzima Dicer2 interviene tanto en el procesamiento de las moléculas de dsRNA generadas a partir de los transgenes introducidos, como en el de las nuevas moléculas de dsRNA sintetizadas por las RdRPs en el proceso de amplificación. Esta amplificación de la señal inductora, dependiente de la enzima RdRP2, es esencial para que el silenciamiento se mantenga de forma estable en *M. circinelloides* (resultados de nuestro laboratorio pendientes de publicación).

La mayoría de los transformantes *dicer2* portadores de transgenes con repeticiones invertidas no muestran fenotipo silenciado y no acumulan ninguno de los dos tipos de siRNAs antisentido, de 21 y 25 nt, lo que sugiere que ambos siRNAs son generados por la actividad Dicer2. Esto también ocurre en el ascomiceto *M. oryzae*, donde se ha determinado que sólo uno de los genes *dicer* es responsable de la producción de siRNAs de

distintos tamaños (Kadotani *et al.*, 2004). Incluso en el pequeño número de transformantes *dicer2* que muestran un fenotipo parcialmente silenciado la detección de los siRNAs sólo fue posible cuando se extrajo el RNA de parches albinos de varias colonias silenciadas cultivadas en medio sólido (Figura 31B). En estas condiciones se detectan pequeñas cantidades de las dos clases de siRNAs, si bien la dinámica de acumulación es distinta, detectándose mayor cantidad del siRNA de 25 nt que en la estirpe silvestre. Esta actividad residual presente en el mutante *dicer2* es muy probablemente debida a la enzima Dicer1, ya que en la secuencia genómica de *M. circinelloides* no se identifican genes *dicer* adicionales. La presumible capacidad de las enzimas Dicer para producir dos clases distintas de siRNAs antisentido contrasta con lo descrito en otros organismos, como en plantas, donde distintas enzimas Dicer son responsables de la generación de siRNAs de distintos tamaños (Xie *et al.*, 2004).

El gen *dicer1* no está normalmente implicado en el silenciamiento inducido por la presencia de dsRNA exógeno procedente de transgenes (Nicolás *et al.*, 2007). Sin embargo, en un fondo genético *dicer2*, la enzima Dicer1 puede compensar, parcialmente, la falta de función Dicer2. La capacidad de las enzimas Dicer de intervenir en otras rutas de silenciamiento distintas a aquellas de las que son las responsables primarias es frecuente en otros organismos. En el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* la ausencia de la enzima Dicer1, que genera los siRNAs mayoritarios, de 28 nt, provoca un aumento en la abundancia de siRNA de 24 nt, difíciles de detectar en el silvestre, y que son generados por alguna de las otras dos enzimas Dicer que posee este organismo (Mochizuki y Gorovsky, 2004). En *A. thaliana* los casiRNAs generados por la enzima Dicer3 pueden ser producidos, en su ausencia, por Dicer2 y Dicer4, y los tasiRNAs, de cuya generación se encarga normalmente Dicer4, pueden ser generados en los mutantes *dicer4* por Dicer2, Dicer3 y probablemente Dicer1. Esta redundancia parcial no se da en todos los casos, como ocurre con la enzima Dicer1 de *A. thaliana*, que es la única responsable de generar los miRNAs (Gascioli *et al.*, 2005).

Es probable que la capacidad de las ribonucleasas Dicer de intervenir en distintas rutas esté limitada en una situación normal por la disponibilidad de los sustratos, al bloquear la principal enzima responsable de cada ruta el acceso a sus sustratos al resto de posibles competidores. De ser así, sólo en ausencia de la enzima principal el resto de proteínas Dicer tendrían acceso a moléculas de dsRNA con un origen distinto al de las que normalmente reconocen. En *D. melanogaster*, el reconocimiento del origen de los dsRNAs

se basa en el grado de complementariedad de sus cadenas. Si ésta es perfecta, son reconocidas por el complejo Dicer2/R2D2 y se incorporan a la ruta de los siRNAs (Liu *et al.*, 2003). En caso de existir bucles formados por bases desapareadas, es el complejo Dicer1/LOQS el responsable de procesar estas moléculas y dirigir las hacia la ruta de los miRNAs (Förstemann *et al.*, 2005). A pesar de la preferencia de las enzimas Dicer por uno u otro tipo de moléculas pueden reconocer, aunque con muy baja eficacia, dsRNAs que por su estructura no son su sustrato natural (Lee, Y.S. *et al.*, 2004, revisado en Siomi y Siomi, 2009), presentando un nivel de redundancia similar al observado en el mutante *dicer2* de *M. circinelloides*.

En *M. circinelloides* se desconoce el papel que desempeña la enzima Dicer1 en el mecanismo de silenciamiento (Nicolás *et al.*, 2007). Las alteraciones en la tasa de crecimiento y la morfología de las hifas de los mutantes *dicer1* no se observan en el mutante *dicer2*, lo que sugiere que ambos genes deben intervenir en rutas distintas, procesando moléculas de dsRNA de diferentes orígenes. A pesar de los defectos durante el desarrollo que se han descrito para algunos mutantes en los genes *dicer* en hongos filamentosos (Kadotani *et al.*, 2004; Nicolás *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2008), no se han identificado miRNAs en estos organismos. No obstante, el mecanismo de MSUD se ha propuesto como una ruta de hongos filamentosos que ha evolucionado a partir de la misma maquinaria de silenciamiento que en eucariotas superiores ha dado lugar a la ruta de los miRNAs (revisado en Nakayashiki, 2005). En *D. melanogaster* la enzima Dicer1, que genera los miRNAs, carece de un dominio ATPasa/RNA helicasa funcional (Lee, Y.S. *et al.*, 2003), como sucede con el producto del gen truncado de *R. oryzae*, ortólogo del gen *dicer1* de *M. circinelloides*. Es posible que los genes *dicer1* de *M. circinelloides* y *dicer* truncado de *R. oryzae* participen, junto con proteínas Argonauta y RdRP específicas, en una ruta similar a la del MSUD, de forma análoga a lo que ocurre en *N. crassa*. En este organismo, las proteínas Sad-1 (RdRP), Sms-3 (Dicer) y Sms-2 (Argonauta) son las responsables del funcionamiento de este mecanismo, mientras que las proteínas Qde-1 (RdRP), Del-2 (Dicer) y Qde-2 (Argonauta) participan en la ruta de los siRNAs (revisado en Nakayashiki, 2005) (Figura 8). En *M. circinelloides* no es posible estudiar el proceso de MSUD, ya que las esporas sexuales no son capaces de germinar en las condiciones de laboratorio. Sin embargo, una diversificación de rutas de silenciamiento como la descrita en *N. crassa* se ve apoyada por el hecho de que sólo una de las tres proteínas Argonauta de *M. circinelloides* tiene un papel relevante en el silenciamiento inducido por transgenes

(resultados de nuestro laboratorio pendientes de publicación). El reconocimiento por parte de las enzimas Dicer1 y Dicer2 de los dsRNA derivados de secuencias desapareadas de DNA o de transgenes, respectivamente, podría hacerse a través de la interacción de Dicer con proteínas que se unan al dsRNA durante su generación e identifiquen así hacia qué ruta debe derivarse esa molécula.

La confirmación de que la actividad residual de silenciamiento observada en el mutante *dicer2*⁻ se debía a la acción de la enzima Dicer1, requería la construcción de un doble mutante *dicer1*⁻ *dicer2*⁻ partiendo del mutante simple *dicer2*⁻. Esta tarea llevó asociada grandes dificultades, motivadas por la escasa disponibilidad de marcadores seleccionables en *M. circinelloides*. La necesidad de que el doble mutante dispusiera de un marcador que permitiese analizar el silenciamiento mediante la introducción de copias transgénicas del gen *carB*, requirió la obtención de derivados *pyrG*⁻ del mutante simple *dicer2*⁻. De este modo, se podría utilizar el mismo marcador *pyrG* para generar la mutación *dicer1*⁻. Esto se llevó a cabo mediante mutagénesis al azar con nitrosoguanidina, un procedimiento que ha demostrado su éxito a la hora de obtener mutantes *pyrG*⁻ de *M. circinelloides* (Benito *et al.*, 1995) y que ha sido utilizado ampliamente en nuestro laboratorio (Navarro *et al.*, 2001; Quiles-Rosillo *et al.*, 2003; Nicolás *et al.*, 2007). Sin embargo, los intentos de generar el doble mutante mediante esta estrategia se vieron entorpecidos por la alta frecuencia de reversión espontánea al fenotipo Ura⁺ en los derivados *pyrG*⁻ del mutante *dicer2*⁻. Siete mutantes *pyrG*⁻ obtenidos a partir de la estirpe mutante *dicer2*⁻ en cinco experimentos de mutagénesis independientes mostraron el mismo comportamiento, encontrándose una frecuencia de reversión espontánea de entre $0,86 \times 10^{-7}$ y $5,79 \times 10^{-7}$ (Tabla 17). Puesto que es altamente improbable que las mutaciones que conducen a la pérdida de función del gen *pyrG* en estas estirpes coincidan, la reversión es probablemente consecuencia de eventos de conversión génica que tienen lugar entre las dos copias mutadas de la secuencia *pyrG*, una presente en el *locus* endógeno y la otra en el *locus dicer2*. La existencia de estas dos copias mutadas en la estirpe tratada constituye la diferencia fundamental entre estos experimentos y otros intentos de generar mutantes *pyrG*⁻ en nuestro laboratorio, que no han mostrado problemas de reversión. De hecho, estudios llevados a cabo en el hongo zigomiceto *R. oryzae* demuestran que la conversión génica entre secuencias homólogas no ligadas es unas 10 veces más frecuente que la recombinación homóloga (Skory, 2004). Esto apoya la idea de que el evento que marca la aparición de un revertiente a partir de un derivado *pyrG*⁻ del mutante *dicer2*⁻ es la

reparación de una de las copias no funcionales del gen *pyrG* por conversión génica. No obstante, cualquiera que sea el origen del fenómeno de reversión, el análisis por PCR de 138 transformantes Ura⁺ obtenidos en distintos experimentos diseñados para interrumpir el gen *dicer1* indicó que en ningún caso existió integración del gen *pyrG* en el locus *dicer1*.

Una de las ventajas de *M. circinelloides* como modelo de estudio es que se pueden obtener mutantes en genes esenciales debido a que los transformantes obtenidos no son inicialmente homocarióticos. En estos casos, sucesivos ciclos de crecimiento vegetativo conducen a un porcentaje determinado de núcleos transformados a partir del cual comienza a manifestarse la letalidad de la mutación generada. Para descartar que la imposibilidad de obtener un doble mutante *dicer1*⁻ *dicer2*⁻ se debiera a la letalidad de esta condición, incluso a bajos porcentajes de núcleos transformados, se intentó una aproximación diferente en la que se perdían los dos marcadores seleccionables disponibles en *M. circinelloides* (ver Apartado III.2.2.4). La obtención de una estirpe doble mutante por este método descartó la existencia de efectos letales asociados a la doble mutación y sugiere que los fenómenos relacionados con la reversión de las mutaciones *pyrG* reducen, de algún modo, la posibilidad de integración de una tercera copia de dicho gen en el genoma de *M. circinelloides*.

El análisis del silenciamiento en la estirpe mutante *dicer1*⁻ *dicer2*⁻ requiere generar de nuevo un derivado *pyrG*, algo que ya se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio (de Haro *et al.*, 2009). Como cabía esperar, las estirpes *pyrG* generadas mostraron también problemas de reversión. Sin embargo, como demuestran los experimentos de complementación de la mutación *dicer2*⁻, el número de transformantes obtenidos al introducir plásmidos circulares autorreplicativos supera ampliamente al número de revertientes espontáneos (Tabla 16), lo que permite analizar el fenotipo de transformantes portadores de plásmidos con el marcador *pyrG* (Figura 33). La transformación de los derivados *pyrG* del mutante *dicer1*⁻ *dicer2*⁻ con transgenes con repeticiones invertidas del gen *carB* mostró que ninguno de los individuos obtenidos presenta un fenotipo silenciado, indicando que el mecanismo de silenciamiento está completamente afectado (de Haro *et al.*, 2009). Asimismo, estos resultados confirman que el gen *dicer1* es responsable del nivel residual de silenciamiento observado en el mutante *dicer2*⁻, así como que el silenciamiento observado en los mutantes *dicer1*⁻ es exclusivamente debido al gen *dicer2*.

IV. 2. Actividad Dicer.

La estructura cristalográfica obtenida para la enzima Dicer de *G. intestinalis* sugiere que la particular organización estructural de los dominios PAZ y RNasaIII le otorga a esta clase de ribonucleasas la capacidad de actuar como “reglas moleculares”, definiendo la longitud de los siRNAs generados mediante el anclaje del extremo 3' protuberante del dsRNA sustrato al dominio PAZ y el corte a una distancia fija de ese extremo (MacRae *et al.*, 2006). En la estructura terciaria de la proteína, la distancia entre los dominios PAZ y RNasaIII vendría dada por una larga hélice α conectora, cuya longitud determinaría el tamaño de los siRNAs producidos por una enzima Dicer concreta (Figura 13B). Los resultados obtenidos con los mutantes *dicer* simples de *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2007; esta tesis) apuntan la posibilidad de que cada una de las enzimas Dicer, de forma independiente, es capaz de generar *in vivo* las dos clases de siRNAs antisentido, de 21 y 25 nt. Para caracterizar la actividad *in vitro* de la ribonucleasa Dicer2, purificamos inicialmente un fragmento de esta enzima en un sistema heterólogo como es *E. coli*, una aproximación que ha dado buenos resultados en la purificación de un fragmento funcional con los dominios RNasaIII de la enzima Dicer de *S. pombe* (Qian *et al.*, 2005) y un fragmento similar de la enzima Dicer de ratón (Du *et al.*, 2008), aún cuando ambos carecen del dominio PAZ.

A pesar de que el modelo propuesto para explicar el tamaño de los siRNAs generados por las distintas enzimas Dicer se basa en la unión del dsRNA al dominio PAZ, no todas las enzimas Dicer contienen este dominio. Así, está ausente en las ribonucleasas Dicer de la levadura *S. pombe*, que *in vitro* genera siRNAs de ~22 nt (Provost *et al.*, 2002b; Qian *et al.*, 2005); el protozoo parásito *Trypanosoma brucei*, que genera siRNAs de 24-26 nt *in vivo* (Djikeng *et al.*, 2001) e *in vitro* (Shi *et al.*, 2006) y en las tres Dicer del ciliado *Tetrahymena thermophila*, que *in vivo* producen siRNAs de 28 y 24 nt, según la enzima (Mochizuki y Gorovsky, 2004). En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, una de las tres enzimas Dicer que posee genera siRNAs de ~21 nt y carece de PAZ (Casas-Mollano *et al.*, 2008), como la enzima Dicer-2 de *D. melanogaster*, capaz de producir *in vitro* siRNAs de ~22 nt, tanto en extractos celulares (Lee, Y.S. *et al.*, 2004) como purificada (Ye y Liu, 2008). En todos estos casos no se conoce qué regiones de las proteínas actúan como “regla molecular” para determinar el tamaño de los siRNAs, aunque es posible que otros dominios no caracterizados cumplan esta función.

Las condiciones del ensayo de actividad Dicer descritas en la literatura son muy variadas. En general, estos ensayos se llevan a cabo en presencia de ATP, que resulta indispensable para el procesamiento del dsRNA cuando se utilizan extractos celulares de *N. crassa* (Catalanotto *et al.*, 2004) y *C. elegans* (Ketting *et al.*, 2001) y en altas concentraciones aumenta la velocidad a la que lisados embrionarios de *D. melanogaster* generan siRNAs (Zamore *et al.*, 2000). En ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes, el ATP es requerido por la enzima Dicer-2 de *D. melanogaster* (Ye y Liu, 2008), pero su ausencia no tiene efecto alguno en la actividad de la enzima Dicer-1 de este organismo (Ye y Liu, 2008), de la enzima Dicer humana (Provost *et al.*, 2002a, Zhang *et al.*, 2002) o del fragmento con los dominios RNasaIII de la enzima Dicer de *S. pombe* (Qian *et al.*, 2005). Por otro lado, el Mg^{2+} es indispensable para la actividad de algunas enzimas Dicer, como la humana (Provost *et al.*, 2002a), el fragmento Dicer de *S. pombe* (Qian *et al.*, 2005) y la enzima de *G. intestinalis* (MacRae *et al.*, 2006). Los tiempos de incubación pueden variar desde 30-60 minutos, que resultan efectivos para los ensayos con las enzimas de *D. melanogaster* (Ye y Liu, 2008) y *G. intestinalis* (MacRae *et al.*, 2006), hasta las 14-16 horas requeridas por enzimas recombinantes, que son más ineficientes *in vitro*, como es el caso de la enzima recombinante humana completa (www.ambion.com/techlib/tn/103/6.html) o un fragmento con los dominios RNasaIII de la enzima de ratón (Du *et al.*, 2008). Aunque la mayoría de ensayos con proteínas Dicer se llevan a cabo a 30 °C, los ensayos con la enzima recombinante humana demuestran que ésta presenta niveles superiores de actividad a 37°C (Provost *et al.*, 2002a). Todas estas condiciones fueron ensayadas con la enzima Dicer2 de *M. circinelloides*. Tanto en el ensayo enzimático como en la purificación del sustrato de dsRNA se evitó el uso de EDTA, pues se ha demostrado su efecto inhibitorio sobre la enzima Dicer humana (Zhang *et al.*, 2002). Como sustrato se empleó dsRNA de aproximadamente 500 pb, ya que sustratos de un tamaño similar son digeridos mucho más eficientemente que fragmentos más pequeños (Ketting *et al.*, 2001).

A pesar de que las condiciones del ensayo enzimático utilizadas satisfacen los requerimientos de las enzimas Dicer de otros organismos, como lo demuestra el procesamiento del dsRNA por la enzima Dicer humana utilizada como control, el fragmento purificado de la enzima Dicer2 de *M. circinelloides* no mostró actividad RNasaIII en ningún caso (Figura 40). Las causas de esta falta de función pueden ser varias. La purificación a partir de *E. coli* elimina la posibilidad de que se lleven a cabo

modificaciones post-traduccionales, que podrían ser necesarias para que la enzima Dicer2 sea funcional. Además, los elevados niveles de proteína insoluble que se obtienen en los cultivos inducidos indican que es posible que la proteína no se pliegue de forma correcta. Alternativamente, puede que alguno de los dominios ausentes en el fragmento utilizado sea indispensable para que la enzima procese el dsRNA. En este sentido, hay que destacar que un fragmento de la enzima Dicer humana con sólo los dominios RNAsaIII y DSRM no es capaz de generar siRNAs *in vitro* (Zhang *et al.*, 2004), aunque sí lo hace un fragmento similar de la enzima Dicer de ratón, con el que la enzima humana guarda un 98 % de identidad (Du *et al.*, 2008). La eliminación del dominio PAZ de la enzima Dicer de *G. intestinalis* no altera su capacidad para procesar el dsRNA, pero los sRNAs generados poseen longitudes muy variables (MacRae *et al.*, 2007), en consonancia con el modelo propuesto en base a la estructura cristalográfica de esta enzima. Los intentos de expresar en *E. coli* un fragmento de la enzima Dicer2 de *M. circinelloides* que incluyese el dominio PAZ y los dominios RNAsaIII no dieron resultados positivos, aparentemente por problemas relacionados con la toxicidad de los plásmidos utilizados para la transformación (resultados no mostrados).

Para intentar solventar los problemas mencionados se expresó la enzima Dicer2 completa en células de insecto, un método que ha sido empleado para purificar las dos enzimas Dicer de *D. melanogaster* (Ye y Liu, 2008) y la enzima Dicer humana (Zhang *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002), todas ellas activas *in vitro*. Sin embargo, las fracciones de proteína obtenidas mediante este procedimiento carecen igualmente de actividad ribonucleasa (Figura 42). También en el caso de células de insecto, sólo una pequeña parte de la proteína expresada se pudo obtener en forma soluble, acumulándose el resto de la proteína en cuerpos de inclusión. Esto podría indicar que, incluso en un sistema eucariótico como las células de insecto, el plegamiento de la enzima no es el adecuado para que sea funcional. Es posible también que las condiciones del ensayo, aunque similares a las que resultan efectivas con otras enzimas Dicer, no sean las apropiadas para que la enzima de *M. circinelloides* lleve a cabo el procesamiento del dsRNA. No se puede descartar tampoco la posibilidad de que la unión de otras proteínas constituya un requerimiento para que la enzima sea activa. Aunque varias enzimas Dicer recombinantes son activas como endonucleasas específicas de dsRNA *in vitro*, *in vivo* actúan en asociación con otras proteínas formando complejos (revisado en Jaskiewicz y Filipowicz, 2008). La proteína Drosha de humanos que, como las enzimas Dicer, pertenece a la clase II de la familia

RNasaIII (revisado en Jaskiewicz y Filipowicz, 2008), es incapaz de procesar *in vitro* un pri-miRNA en pre-miRNAs por sí misma. Sin embargo, la adición de la proteína DGCR8, con la cual Drosha se encuentra asociada *in vivo*, es suficiente para generar pre-miRNAs de 63 nt a partir del pri-miRNA empleado como sustrato (Gregory *et al.*, 2004). Una situación similar podría ser la causante de la falta de actividad observada en los ensayos con la enzima Dicer2 recombinante de *M. circinelloides*,

A pesar de la imposibilidad de caracterizar la actividad Dicer2 *in vitro*, los resultados obtenidos en *M. circinelloides* y datos de otros organismos permiten especular sobre cómo se pueden estar generando las dos clases de siRNAs detectadas. Asumiendo que el procesamiento del dsRNA por las enzimas Dicer de *M. circinelloides* puede seguir el modelo propuesto para la enzima de *G. intestinalis* (MacRae *et al.*, 2006), es posible que la longitud que separa los dominios PAZ y RNasaIII se vea afectada por la interacción de las enzimas Dicer con proteínas de unión a dsRNA (dsRBP) (Figura 52). En *A. thaliana*, donde se han detectado distintas clases de siRNAs (Hamilton *et al.*, 2002), cada uno de los tamaños se ha asociado con una enzima Dicer concreta (Reinhart *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a la redundancia funcional que presentan estas proteínas, una enzima Dicer concreta, Dicer3, puede generar siRNAs de un tamaño distinto al habitual

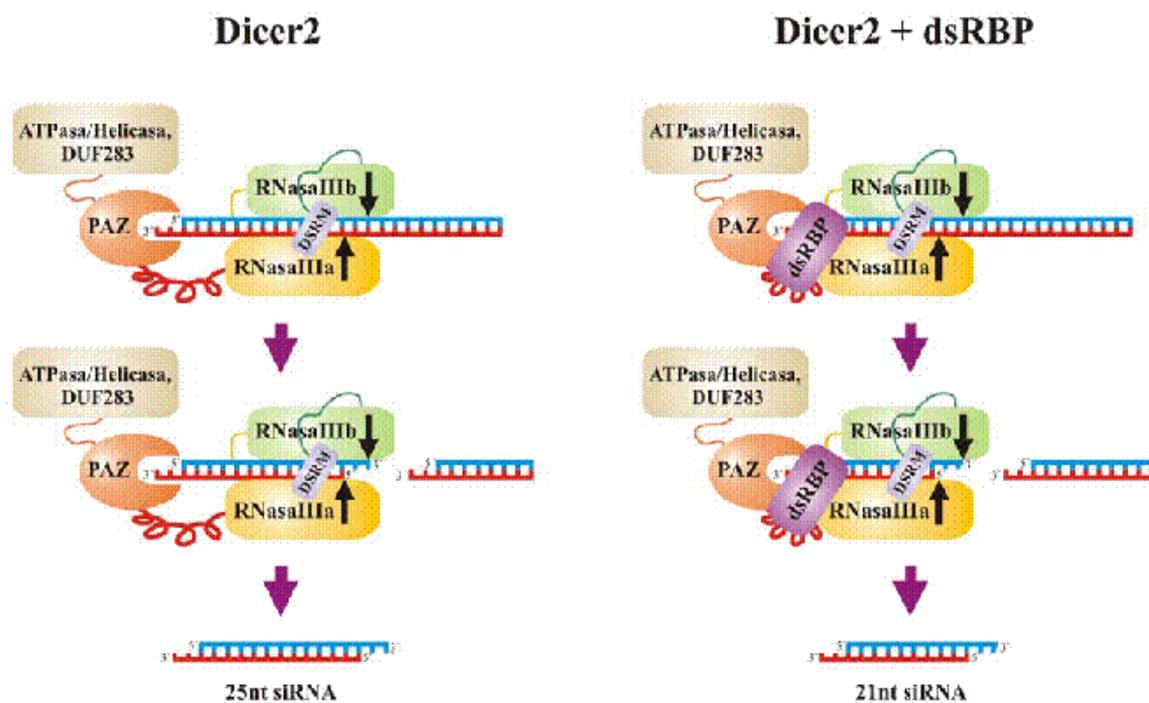


Figura 52. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en la unión de Dicer a proteínas de unión a dsRNA (dsRBP). Monómeros de Dicer2 procesarían el dsRNA en moléculas de siRNAs de 25 nt. La interacción de Dicer2 con una dsRBP alteraría la distancia entre los dominios PAZ y RNasaIII, dando lugar a la producción de las moléculas de siRNAs de 21 nt.

cuando suple la función de la proteína Dicer4 en el correspondiente mutante. Se ha propuesto que, en ausencia de la enzima Dicer4, la proteína dsRBP que se asocia a ella quedaría libre para interactuar con Dicer3 y esa asociación determinaría la longitud de los siRNAs generados (Gascioli *et al.*, 2005). La asociación de las enzimas Dicer con proteínas dsRBP diferencialmente expresadas a lo largo del crecimiento vegetativo de *M. circinelloides* podría explicar tanto la existencia de dos tamaños de siRNAs, como las diferencias en la dinámica de acumulación de ambos (Figura 52). De hecho, en *M. circinelloides* se ha identificado una proteína dsRBP homóloga a la R2D2 de *D. melanogaster*. Los mutantes afectados en el gen correspondiente muestran una disminución en la frecuencia de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre, similar a la observada en el mutante *dicer2*⁻, señalando que proteínas de este tipo también juegan un papel esencial en el silenciamiento génico en *M. circinelloides* (resultados de nuestro laboratorio pendientes de publicación).

Al considerar distintos modelos para explicar la producción de los dos tipos diferentes de siRNAs en *M. circinelloides* hay que tener presente que sólo se ha detectado la cadena con sentido del siRNA de 25 nt y no la de 21 nt (Nicolás *et al.*, 2003). Esto podría sugerir que este último siRNA no se origina a partir de un precursor de dsRNA por la acción de una proteína Dicer. Por tanto, cabe la posibilidad de que las enzimas Dicer de *M. circinelloides* generen solamente dúplexes de siRNA de 25 nt y que la transferencia de una de las cadenas al complejo RISC, para lo que se requiere la asociación con la proteína dsRBP, lleve asociada la eliminación de 4 nucleótidos. Ello daría lugar a complejos RISC activos cargados con cadenas de siRNA antisentido de 21 nt (Figura 53). Este procesamiento inusual requeriría proteínas Dicer muy específicas, y probablemente componentes adicionales del complejo RISC como la exonucleasa QIP de *N. crassa*, que convierte el dúplex de siRNA en RNA de cadena sencilla mediante la eliminación de la cadena pasajera (Maiti *et al.*, 2007). Puesto que RISC es un complejo con una composición dinámica (revisado en Tomari y Zamore, 2005), la entrada de esos componentes en un momento del crecimiento vegetativo sería el evento que marcaría el inicio de la producción de los siRNAs de 21 nt.

Cabe también la posibilidad de que la biogénesis de los siRNAs de 21 nt antisentido no implique la participación de enzima Dicer alguna. En *C. elegans*, los siRNAs secundarios son exclusivamente antisentido (Sijen *et al.*, 2001) y poseen un extremo 5' trifosfato (Pak y Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007), una característica que indica

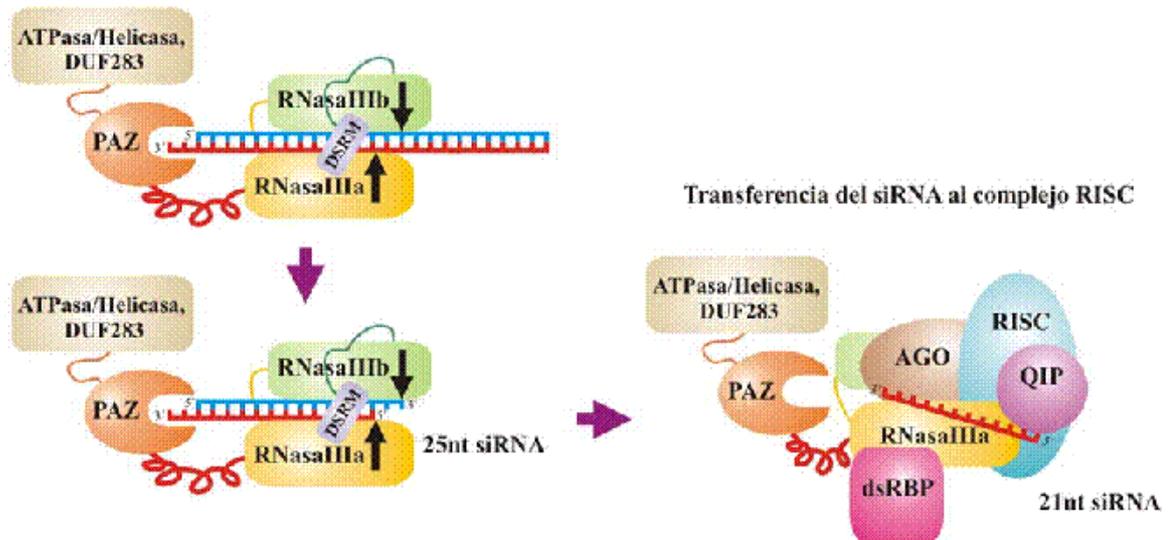


Figura 53. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en modificaciones del siRNA generado por Dicer durante la transferencia al complejo RISC. La transferencia de los siRNAs de 25 nt generados por Dicer al complejo RISC llevaría asociada la eliminación de cuatro nucleótidos de la cadena guía, dando lugar a los siRNAs antisentido de 21 nt.

que son directamente producidos por las RdRPs a partir de los moldes de RNA, sin que medie corte por enzimas Dicer. El mejor molde para la producción de estos siRNAs por la RdRP lo constituyen RNAs con características aberrantes, como la ausencia de cola de poliA. Una vez sintetizados, los siRNAs secundarios antisentido son transferidos a proteínas Argonauta específicas, que muestran preferencia por siRNAs con un extremo 5' trifosfato y que inducen la degradación de los mRNAs diana con gran eficacia (Aoki *et al.*, 2007). Sin embargo, experimentos *in vivo* indican que, en *M. circinelloides*, las dos clases de siRNAs antisentido, de 21 y 25 nt, están asociadas con la amplificación dependiente de las RdRPs, identificándose siRNAs secundarios con sentido y antisentido de 25 nt y siRNAs exclusivamente antisentido de 21 nt (Nicolás *et al.*, 2003). De hecho, las moléculas de siRNAs detectadas normalmente en los transformantes silenciados corresponden, en su mayoría, a siRNAs secundarios producidos por la amplificación a partir del mRNA diana (Nicolás *et al.*, 2003). No se puede, por tanto, establecer una correspondencia entre los siRNAs primarios, producidos por Dicer, y los siRNAs secundarios, independientes de Dicer, con los tamaños de 25 y 21 nt, respectivamente.

No obstante, sí se puede sugerir que cada tipo de siRNA secundario podría ser generado por una enzima RdRP distinta, ya que se han identificado tres genes *rdrp* en el genoma de *M. circinelloides* y al menos dos de ellos están implicados en el silenciamiento

inducido por transgenes (resultados de nuestro laboratorio pendientes de publicación). Una de estas enzimas podría generar moléculas de dsRNA a partir de los mRNAs aberrantes, que serían procesados Dicer en siRNAs de 25 nt, mientras otra podría actuar de forma similar a la RdRP de *C. elegans*, generando directamente siRNAs antisentido de 21 nt. Al igual que ocurre en *C. elegans* estas moléculas serían preferentemente incorporadas en los complejos RISC (Figura 54). De hecho, la sobreacumulación de la clase de 21 nt se ha asociado con un aumento en la eficacia y estabilidad del silenciamiento (Nicolás *et al.*, 2009), mientras que no se ha asignado un papel específico a los siRNAs de 25 nt. La acumulación de siRNAs en mutantes afectados en los genes *rdrp* podría ayudar a establecer la idoneidad de esta hipótesis, aunque la redundancia funcional parcial que presentan las distintas enzimas RdRPs dificulta esta tarea.

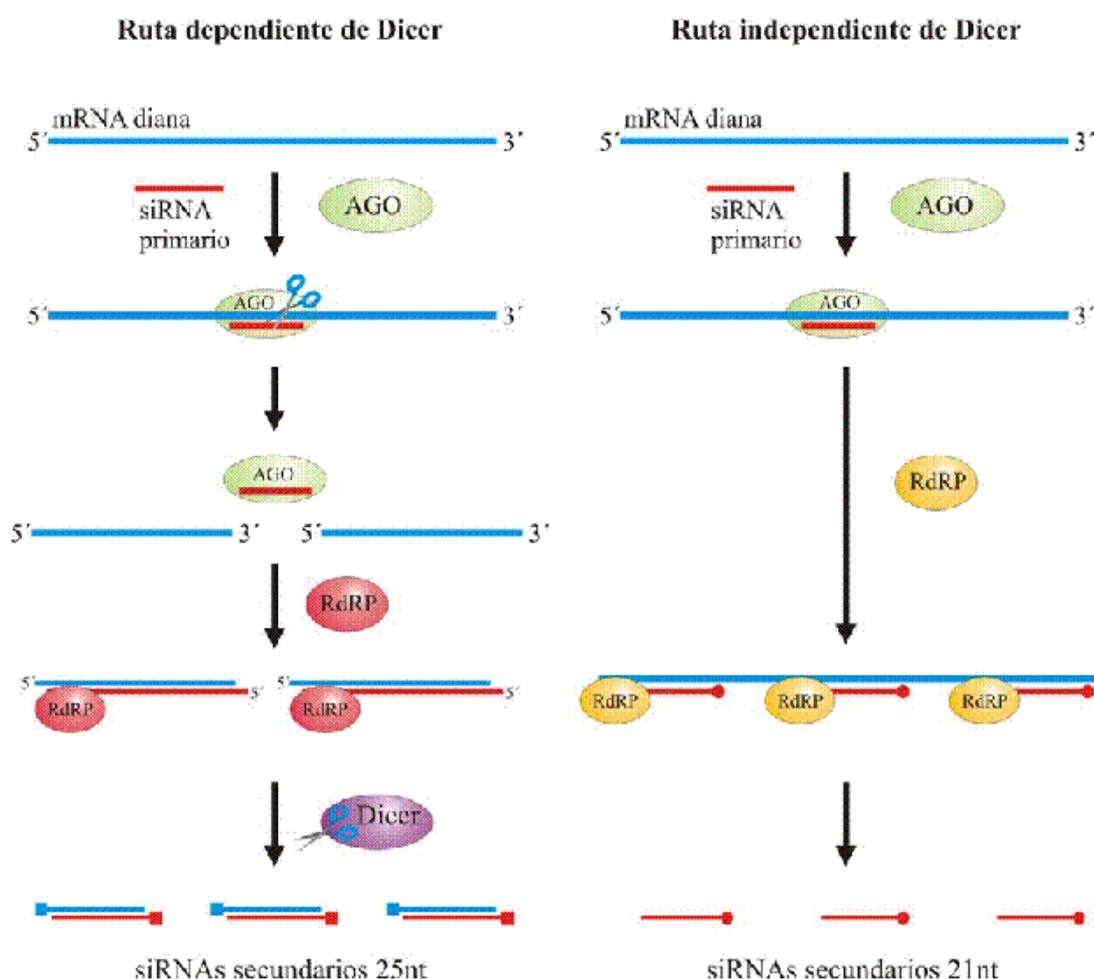


Figura 54. Modelo para explicar la producción de las dos clases de siRNAs basado en la actuación de distintas RdRPs. Los siRNAs de 25 nt serían producidos por la actividad de la proteína Dicer2 sobre las moléculas de dsRNA generadas por una RdRP en el proceso de amplificación. Los siRNAs antisentido de 21 nt serían producidos directamente a partir de los mRNAs diana por una RdRP diferente, sin la participación de la proteína Dicer. Cuadrados: extremos 5'-mono fosfato; círculos: extremos 5'-tri fosfato.

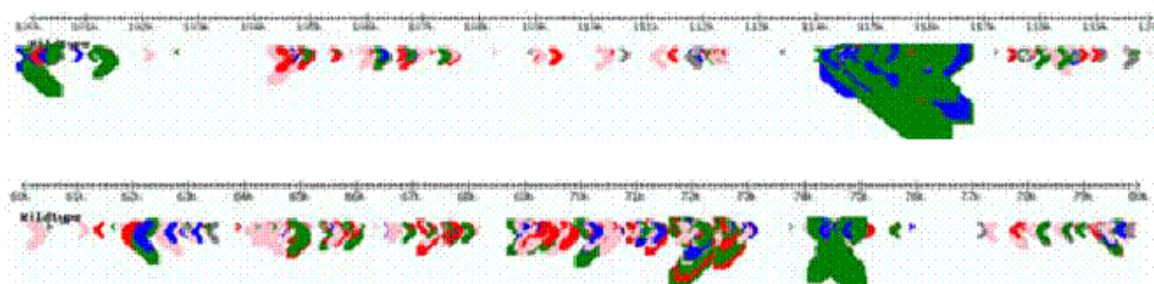
Finalmente, es posible que la actuación de dos RdRPs distintas en el proceso de amplificación genere sustratos de dsRNA con características diferentes, que sean procesados diferencialmente por las enzimas Dicer. Ensayos *in vitro* han demostrado que distintos tipos de sustratos son procesados en siRNAs de distintos tamaños por la misma enzima (Provost *et al.*, 2002; MacRae *et al.*, 2007), en algunos casos provocando, además, una selección no igualitaria de la cadena guía (Elbashir *et al.*, 2001a). Es posible, por tanto, que sea la cadena antisentido respecto al mRNA utilizado como molde por una RdRP la que se transfiera preferencialmente al complejo RISC para, de esa manera, dirigir eficazmente la destrucción de los mRNA diana. La caracterización bioquímica de los siRNAs antisentido de 21 nt nos permitirá dilucidar si son productos del procesamiento de una molécula de dsRNA o de la síntesis *de novo* por una enzima RdRP.

IV. 3. siRNAs endógenos de *M. circinelloides*.

En los organismos eucariotas se han identificado varios tipos de sRNAs endógenos que participan en distintos procesos celulares, como la defensa frente a virus, el silenciamiento de transposones y elementos repetidos, la eliminación de DNA, la formación de heterocromatina y el silenciamiento génico post-transcripcional (revisado en Matzke y Birchler, 2005; Ghildiyal y Zamore, 2009; Siomi y Siomi, 2009). Sin embargo, los sRNAs endógenos de hongos han sido muy poco estudiados en comparación con los de plantas y animales, y no está claro cuáles son las clases de sRNAs endógenos presentes en este grupo de organismos, ni si regulan la expresión de genes que determinan proteínas. La secuenciación masiva de sRNAs endógenos de la estirpe silvestre de *M. circinelloides* y de mutantes *dicer* nos ha permitido profundizar en el conocimiento de las funciones endógenas que cumple el mecanismo de silenciamiento en hongos y el papel que desempeñan las enzimas Dicer en tales procesos.

La localización de los sRNAs secuenciados en el genoma de *M. circinelloides* ha demostrado que este hongo presenta un genoma transcripcionalmente muy activo, algo que contrasta con las observaciones en otros organismos, como *A. thaliana*, en los que existen grandes regiones transcripcionalmente inactivas (Figura 55). La organización de los sRNAs secuenciados en *loci* permitió identificar un total de 24.111 *loci* distribuidos a lo largo del genoma de *M. circinelloides* y para cada uno de ellos se comparó la abundancia y orientación de las secuencias en las estirpes silvestre, *dicer1* y *dicer2*. Los sRNAs de

Regiones de 20 kb típicas de *M. circinelloides*



Regiones de 20 kb típicas de *A. thaliana*:

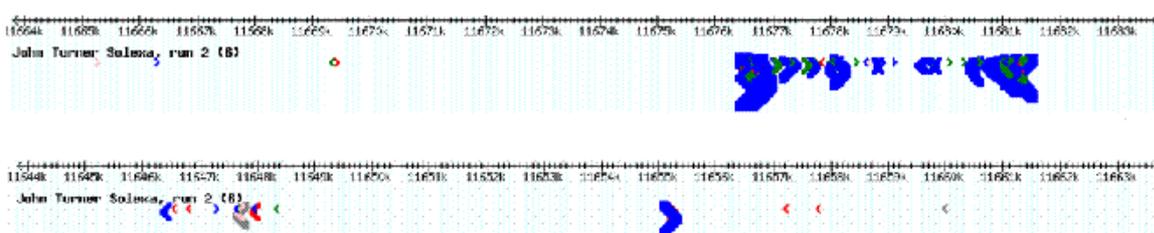


Figura 55. Ejemplos de regiones de 20 kb de *M. circinelloides* y *A. thaliana*. Las flechas de colores indican la localización genómica de las lecturas obtenidas tras la secuenciación masiva de sRNAs endógenos de ambos organismos (datos aportados por el Dr. Tamas Dalmay, *School of Biological Sciences, University of East Anglia*).

muchos de estos *loci* correspondieron a productos de degradación de los mRNAs, como se demostró en experimentos de Northern (Figura 44) y fueron descartados de los análisis posteriores. También se descartaron las secuencias correspondientes a rRNAs y tRNAs por considerarse productos de degradación de estas moléculas. Las propias células presentan mecanismos para evitar que los productos resultantes de la degradación de los mRNAs se incorporen a la ruta de silenciamiento, por ejemplo, acoplando el corte por Dicer a la transferencia al complejo RISC, reconociendo los extremos característicos de los sRNAs generados por Dicer o asegurando que la amplificación del silenciamiento sólo se lleve a cabo a partir de los mRNAs diana (revisado en Siomi y Siomi, 2009).

Los productos de degradación de mRNAs representaron un 40 % de las secuencias totales de sRNAs obtenidas para la estirpe silvestre. En el mutante *dicer1* el valor fue similar, pero no así en el caso del mutante *dicer2*, en el que el 63 % de las lecturas totales se corresponden con productos de degradación. El aumento no se debe a que el nivel de degradación de mRNAs sea superior en esta estirpe, sino a que la cantidad de lecturas correspondientes a sRNAs endógenos auténticos está muy reducida con respecto a las estirpes silvestre y *dicer1* (Tabla 20). En efecto, la comparación de los resultados

obtenidos en la estirpe silvestre y los mutantes *dicer* sugiere que es la enzima Dicer2 la que juega un papel fundamental en la producción de sRNAs endógenos, viéndose muy reducida la acumulación de éstas moléculas en el mutante *dicer2*. Sin embargo, las diferencias entre estirpes son sólo cuantitativas, ya que cuando se analizan las lecturas no redundantes filtradas su número es similar y también lo es su distribución en el genoma. Estos datos indican que en el mutante *dicer2* se continúan generando sRNAs endógenos a partir de los mismos *loci*, pero su abundancia es mucho menor que en presencia de un gen funcional.

Tras el filtrado inicial de información, los sRNAs se agruparon en base a la anotación de cada *locus*, encontrándose distribuidos entre regiones intergénicas, secuencias exónicas y regiones con transposones y repeticiones (Figura 45). Este análisis pone de manifiesto que, en el caso del mutante *dicer2*, la reducción en la abundancia de sRNAs endógenos es especialmente severa en aquellos que se localizan en las regiones codificadoras de genes, lo que podría indicar que la enzima Dicer2 no sólo participa en el control de la estabilidad del genoma sino que también juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes endógenos.

Los sRNAs endógenos que tienen como diana transposones parecen ser los que primero aparecieron en la línea evolutiva de los eucariotas, ya que se han encontrado en hongos, plantas y animales (Vaucheret, 2006; Aravin *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2007; Okamura y Lai, 2008; Drinnenberg *et al.*, 2009). Los miRNAs están presentes en plantas y animales, aunque no se ha encontrado ningún miRNAs conservado en ambos grupos. Esto, junto al hecho de no haberse detectado miRNAs en hongos, hace pensar en la ausencia de estas moléculas en el ancestro común de las distintas líneas de eucariotas y en su aparición independiente al menos dos veces en la evolución (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009). Dada la enorme diversidad de los hongos y que sólo se ha analizado el contenido de sRNAs endógenos en unas pocas familias (Drinnenberg *et al.*, 2009), cabe la posibilidad de que algunos hongos produzcan miRNAs. Para comprobar si los cigomicetos generan miRNAs se analizaron todos los *loci* de *M. circinelloides* en los que se habían detectado sRNAs endógenos. En ningún caso se encontró una secuencia capaz de plegarse con la forma característica de la horquilla de los precursores de miRNAs. Así, aunque no se puede descartar que se puedan identificar miRNAs en otras clases de hongos, su ausencia en *M. circinelloides* apoya la hipótesis de su aparición tras la diversificación de los grandes grupos de eucariotas.

La comparación de los datos de las tres estirpes estudiadas permitió establecer cuatro categorías de *loci* en base a la abundancia de sRNAs endógenos en las distintas estirpes (Figura 46). El grupo más interesante es el que presenta bajos niveles de acumulación en el mutante *dicer2*⁻, tanto por el número de *loci* que engloba como porque es el gen *dicer2* el que juega el papel fundamental en la inducción del silenciamiento por transgenes. Los *loci* de este grupo se distribuyen entre regiones codificantes, regiones intergénicas y zonas con repeticiones y transposones. El gran número de *loci* que corresponden a transposones y repeticiones pone de manifiesto que una posible función de Dicer2 sería controlar el salto de los elementos transponibles. En *S. pombe*, *S. castellii* y *Candida albicans* los sRNAs endógenos producidos a partir de repeticiones y transposones representan el grupo mayoritario (Verdel *et al.*, 2004; Drinnenberg *et al.*, 2009). Sin embargo, en *M. circinelloides* la mayoría de sRNAs endógenos identificados se localizan en regiones intergénicas (Figura 45 y Figura 46). No se debe descartar la posibilidad de que este resultado se deba a deficiencias en la anotación del genoma de *M. circinelloides*, cuyo primer análisis genómico global llevado a cabo es el que se presenta en esta tesis. Así, muchos de estos *loci* podrían corresponder a exones de genes que determinan proteínas. En cualquier caso, sRNAs endógenos procedentes de *loci* representantes de las distintas regiones genómicas han sido detectados mediante Northern (Figura 47), demostrando la participación de Dicer2 en su biogénesis.

Entre los *loci* validados que muestran diferencias en el mutante *dicer2*⁻ destacan aquellos con sRNAs endógenos que coinciden con exones. En animales sólo se han detectado este tipo de sRNAs en *C. elegans* (Ruby *et al.*, 2006) y en *D. melanogaster* (Ghildiyal *et al.*, 2008) mediante técnicas de secuenciación masiva. El análisis de estos datos sugiere que los sRNAs localizados en regiones codificantes se generan directamente por una RdRP sin la participación de una enzima Dicer o a partir de estructuras de dsRNA formadas por el solapamiento de las secuencias de dos transcritos distintos, respectivamente. Si estas moléculas son funcionales *in vivo* es algo que no se ha comprobado. En plantas, los natsiRNAs también son producidos por la transcripción convergente de dos genes situados en orientaciones opuestas pero, mientras que uno de los mRNAs se expresa constitutivamente, la presencia del transcrito complementario se restringe a situaciones de estrés (Borsani *et al.*, 2005; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). En *M. circinelloides*, la gran mayoría de siRNAs procedentes de exones que requieren la función Dicer2 para su producción también requieren la actividad de la enzima RdRP1,

implicada en la producción de dsRNA a partir de transcritos aberrantes de los transgenes (Nicolás *et al.*, 2010). La ruta de los siRNAs endógenos de *M. circinelloides* utiliza, por tanto, elementos comunes a plantas y animales pero en una combinación novedosa y única. El análisis de los sRNAs endógenos de *M. circinelloides* se ha llevado a cabo en condiciones óptimas de crecimiento por lo que, además de los cerca de 300 genes que podrían estar regulados por sRNAs endógenos, es posible que la expresión de otros muchos genes esté también regulada en situaciones de respuesta a diferentes señales ambientales. Así, la desregulación de algunos genes podría explicar los defectos en la producción de esporas asexuales que presenta el mutante *dicer2* (de Haro *et al.*, 2009).

Los *loci* que corresponden a exones con niveles reducidos de siRNAs en el mutante *dicer2* pueden dividirse en tres subclases, en función de la polaridad de las cadenas de siRNA producidas (Figura 48). Los sRNAs antisentido producidos por muchos *loci*, ya sea de forma mayoritaria o a niveles similares a las cadenas con sentido, tienen un claro papel regulador, según la forma de operar del mecanismo de silenciamiento. Sin embargo, en el caso de los *loci* que producen sRNAs mayoritariamente con sentido, la funcionalidad de estas moléculas no está tan clara. El único *locus* de esta subclase que ha sido validado mediante Northern (Figura 48, *locus* 5) se corresponde con uno de los dos exones de un gen, detectándose en el otro exón tanto sRNAs con sentido como antisentido, por lo que, al menos en este caso, la presencia mayoritaria de sRNAs con sentido podría responder simplemente a que las cadenas antisentido de esa región son más inestables. Esto parece ocurrir también en otros *loci* pertenecientes a esta misma clase, en los que otros exones del gen producen sRNAs de las dos polaridades, aunque en estos casos no han sido validados experimentalmente. En general, los sRNAs con orientación antisentido y con sentido de un determinado *locus* tienden a solapar poco en sus secuencias (Figura 56). Este hecho concuerda con que la cadena guía de los dúplices de sRNAs sea seleccionada siguiendo la regla de asimetría (Tomari *et al.*, 2004) (ver Apartado I.2.3), siendo degradada dentro del complejo RISC la cadena pasajera. Así, los sRNAs que estarían siendo detectados son aquellos que, al actuar como cadenas guía en el complejo RISC, presentan una alta estabilidad.

Es necesario apuntar que la acumulación de sRNAs endógenos que se localizan en regiones exónicas no necesariamente implica que estas moléculas sean funcionales. En *A. thaliana*, algunos miRNAs detectados carecen de mRNAs diana (Fahlgren *et al.*, 2007). Para determinar si esta clase de sRNAs endógenos afecta a la expresión de los genes diana

Locus 2 (ver Figura 48)

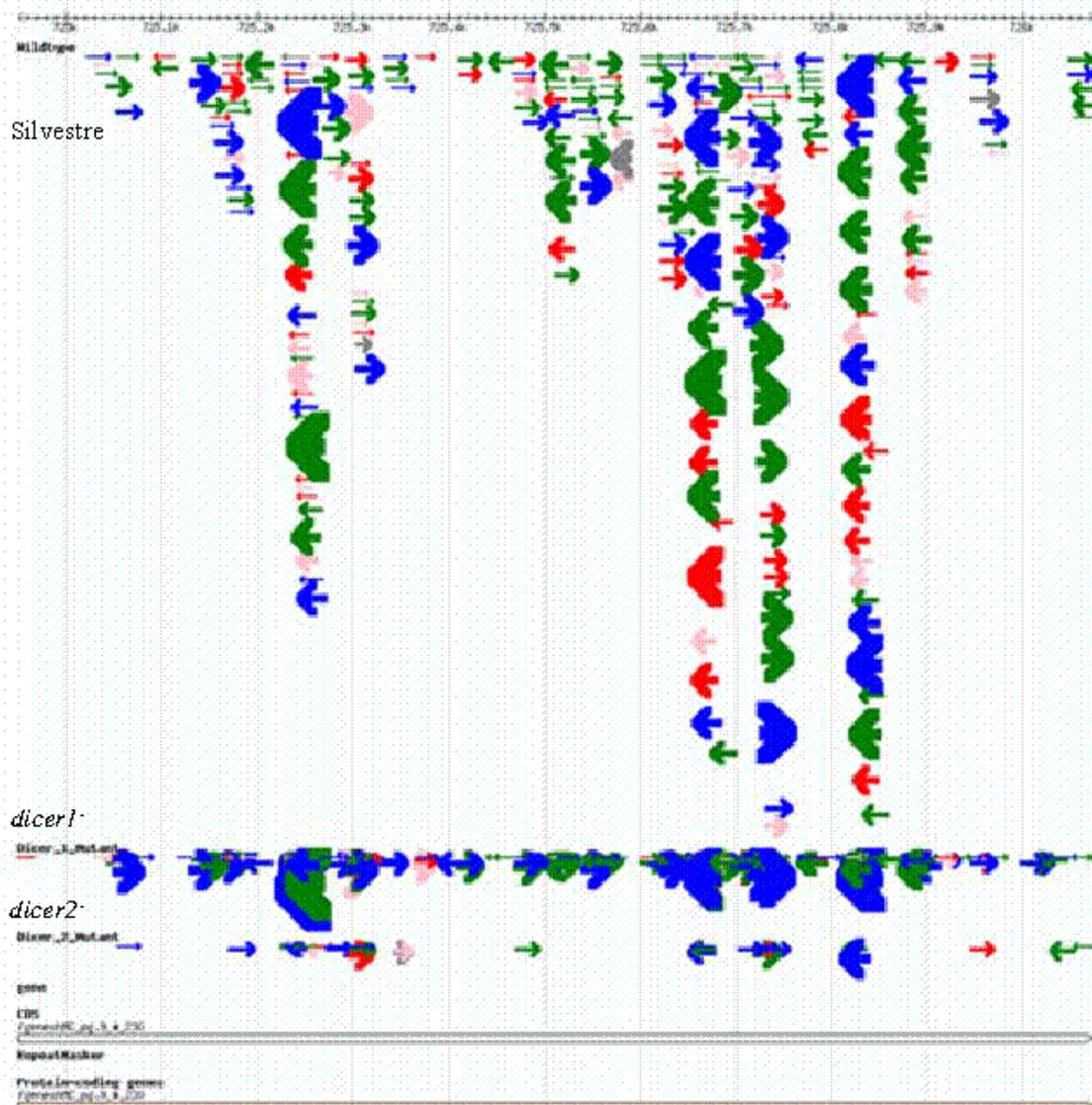


Figura 56. Locus correspondiente a la secuencia de un exón con niveles reducidos de sRNAs en el mutante *dicer2*. En este locus se detectan niveles similares de sRNAs antisentido y con sentido respecto al mRNA. En la primera fila, correspondiente a las lecturas obtenidas para la estirpe silvestre, se han desplegado los datos de los sRNAs secuenciados, observándose la tendencia a que una secuencia concreta del locus esté representada por sRNAs antisentido o con sentido, con poco solapamiento entre ambos. La segunda fila corresponde a las lecturas obtenidas para el mutante *dicer1* y la tercera fila a las obtenidas para el mutante *dicer2*.

se ha analizado la acumulación de los mRNAs correspondientes en la estirpe silvestre y los mutantes *dicer*, mediante experimentos de Northern. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de sRNAs en los mutantes se relaciona con niveles más elevados de los mRNAs diana, demostrando la funcionalidad de los sRNAs identificados (Nicolás *et al.*, 2010). Estos sRNAs probablemente actúen a nivel post-transcripcional pues, al igual que ocurre en el ascomiceto *M. oryzae* (Kadotani *et al.*, 2003), en *M. circinelloides* no se ha detectado metilación del DNA dirigida por RNA (Nicolás *et al.*, 2003).

Existe un pequeño número de *loci* en los que los niveles de acumulación de sRNAs están reducidos sólo en el mutante *dicer1*, correspondiendo 3 de ellos a genes que codifican proteínas. La implicación de Dicer1 en la regulación de la expresión de ciertos genes que participan en el desarrollo vegetativo de *M. circinelloides* podría explicar la reducción en la tasa de crecimiento vegetativo y la alteración de la morfología de las hifas observadas en los mutantes *dicer1* (Nicolás *et al.*, 2007). En este sentido, cabe destacar que uno de los genes presumiblemente regulados por Dicer1 cifra una proteína conservada que en otros hongos, como levaduras, co-localiza en sitios de crecimiento polarizado (Nicolás *et al.*, 2010). Esto, junto con el hecho de que los otros genes cifran proteínas implicadas en el metabolismo mitocondrial y la función ribosómica, puede ayudar a entender el fenotipo del mutante *dicer1*. Sin embargo, los datos de secuenciación obtenidos para esta categoría de *loci* no han podido ser validados experimentalmente, probablemente debido al bajo nivel de acumulación de sRNAs en estos *loci*, como se refleja en el bajo número de lecturas obtenidas para cada uno de ellos.

Finalmente, la validación experimental de los resultados de la secuenciación confirma la existencia de sRNAs endógenos en cuya biogénesis participan las dos enzimas Dicer (Figura 50). Será necesario el análisis genómico del pequeño número de *loci* que manifiesta este comportamiento y el estudio de sus niveles de expresión para conocer las características que deben tener las moléculas de dsRNA generadas a partir de estos *loci*, que requieren la acción conjunta o secuencial de las dos enzimas Dicer.

A pesar de la redundancia existente entre los dos genes *dicer* de *M. circinelloides*, los resultados indican que la enzima Dicer2 es la principal responsable de generar los sRNAs endógenos en este organismo, existiendo un reducido número de *loci* para los que la biogénesis de los sRNAs depende principalmente de Dicer1. Así, ambas enzimas mantienen la misma jerarquía que en la ruta de silenciamiento inducida por la introducción de transgenes donde, como se demuestra en este trabajo, Dicer2 juega el papel principal.

V. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. Se ha clonado y caracterizado a nivel estructural el gen *dicer2* de *M. circinelloides*, que cifra una proteína con todos los dominios estructurales característicos de las enzimas Dicer. La expresión de este gen se incrementa a lo largo del crecimiento vegetativo y no requiere para ello la activación del mecanismo de silenciamiento en respuesta a la introducción de transgenes.
2. El análisis funcional de un mutante nulo para el gen *dicer2* indica que dicho gen es esencial para el eficaz silenciamiento de la expresión génica mediada por RNA en *M. circinelloides*. Tanto la inducción del silenciamiento por la introducción de transgenes como la estabilidad del silenciamiento tras sucesivos ciclos de crecimiento vegetativo se encuentran severamente afectados en el mutante *dicer2*⁻.
3. La mayoría de los individuos *dicer2*⁻ portadores de vectores de silenciamiento no muestran fenotipo silenciado y no acumulan ninguna de las dos clases de siRNAs antisentido, de 21 y 25 nt, indicando que ambos siRNAs son generados, directa o indirectamente, por la actividad Dicer2.
4. Los escasos individuos *dicer2*⁻ silenciados pueden generar, en condiciones forzadas, los dos tipos de siRNAs, de 21 y 25 nt. Estos siRNAs son probablemente producidos por la actividad residual de la proteína Dicer1 presente en un fondo genético mutante para *dicer2*.
5. La conversión génica entre dos copias mutadas del marcador seleccionable ocurre en *M. circinelloides* con una frecuencia mayor que la integración de un fragmento por recombinación homóloga, lo que ha dificultado la obtención de dobles mutantes *dicer1*⁻ *dicer2*⁻. No obstante, la obtención de esta estirpe por métodos alternativos descarta la existencia de efectos letales asociados a la doble mutación.
6. Se han expresado distintas versiones de la proteína Dicer2 de *M. circinelloides* en sistemas procarióticos y eucarióticos. En ningún caso se ha podido demostrar actividad RNasaIII *in vitro*, probablemente debido al mal plegamiento y posterior degradación de la enzima o al requerimiento de otras proteínas.

7. *M. circinelloides* acumula sRNAs endógenos generados a partir de regiones que se corresponden con secuencias repetidas y transposones, exones y regiones intergénicas. En la biogénesis de estos sRNAs está implicada la maquinaria de silenciamiento.
8. Ninguno de los *loci* que generan sRNAs es capaz de adoptar la estructura en horquilla bicatenaria característica de los pre-miRNAs, lo que indica que, al menos en las condiciones de crecimiento utilizadas, *M. circinelloides* no presenta miRNAs.
9. A pesar de cierta redundancia funcional, el gen *dicer2* cumple el papel principal en la producción de sRNAs endógenos, viéndose muy reducida su acumulación en los mutantes *dicer2* y anulada en el doble mutante. Sólo para un grupo pequeño de sRNAs endógenos se requiere la acción conjunta o secuencial de las dos enzimas Dicer.
10. Una proporción importante de los sRNAs endógenos que requieren para su biogénesis la proteína Dicer2 corresponden a exones, lo que indica que el gen *dicer2* juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes endógenos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, W.G., Raju, N.B., Xiao, H., Hammond, T.M., Perdue, T.D., Metzenberg, R.L., Pukkila, P.J. & Shiu, P.K. (2008).** DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (5): 719-27.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389-402.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. & Jewell, D. (2003).** MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*, 13 (10): 807-18.
- Ameres, S.L., Martínez, J. & Schroeder, R. (2007).** Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130 (1): 101-12.
- Anaya, N. & Roncero, M.I. (1991).** Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Molecular & General Genetics*, 230 (3): 449-55.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K. & Tabara, H. (2007).** In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *The EMBO Journal*, 26 (24): 5007-19.
- Aramayo, R. & Metzenberg, R.L. (1996).** Meiotic transvection in fungi. *Cell*, 86 (1): 103-13.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M. & Gvozdev, V.A. (2001).** Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*, 11 (13): 1017-27.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M. & Tuschl, T. (2006).**

- A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442 (7099): 203-7.
- Aravin, A., Hannon, G.J. & Brennecke, J. (2007).** The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 318 (5851): 761-4.
- Batista, P.J., Ruby, J.G., Claycomb, J.M., Chiang, R., Fahlgren, N., Kasschau, K.D., Chaves, D.A., Gu, W., Vasale, J.J., Duan, S., Conte, D. Jr., Luo, S., Schroth, G.P., Carrington, J.C., Bartel, D.P. & Mello, C.C. (2008).** PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*. *Molecular Cell*, 31 (1): 67-78.
- Benito, E.P., Díaz-Minguez, J.M., Iturriaga, E.A., Campuzano, V. & Eslava, A.P. (1992).** Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*, 116, 59-67.
- Benito, E.P., Campuzano, V., Lopez-Matas, M.A., De Vicente, J.I. & Eslava, A.P. (1995).** Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Molecular and General Genetics*, 248 (2): 126-35.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E.C. (2007).** Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell*, 28 (2): 328-36.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. (2001).** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409 (6818): 363-6.
- 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): 1225-36.

- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. & Zhu, J.K. (2005).** Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123 (7): 1279-91.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M. (2005).** Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3 (3): e85.
- Bühler, M., Verdel, A. & Moazed, D. (2006).** Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. *Cell*, 125 (5): 873-86.
- Burnette, W.N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112 (2): 195-203.
- Casas-Mollano, J.A., Rohr, J., Kim, E.J., Balassa, E., van Dijk, K. & Cerutti, H. (2008).** Diversification of the core RNA interference machinery in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of DCL1 in transposon silencing. *Genetics*, 179 (1): 69-81.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. & Cogoni, C. (2000).** Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, 404 (6775): 245.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. & Cogoni, C. (2002).** Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 16 (7): 790-5.
- Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G. & Cogoni, C. (2004).** Redundancy of the two *dicer* genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (6): 2536-45.

- Cecere, G. & Cogoni, C. (2009).** Quelling targets the rDNA locus and functions in rDNA copy number control. *BMC Microbiology*, 9: 44.
- Celotto, A.M. & Graveley, B.R. (2002).** Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA*, 8 (6): 718-24.
- Chapman, E.J. & Carrington, J.C. (2007).** Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, 8 (11): 884-96.
- Chiu, Y.L. & Rana, T.M. (2002).** RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular Cell*, 10 (3): 549-61.
- Choudhary, S., Lee, H.C., Maiti, M., He, Q., Cheng, P., Liu, Q. & Liu, Y. (2007).** A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (11): 3995-4005.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. & Macino, G. (1996).** Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO Journal*, 15 (12): 3153-63.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1997).** Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94 (19): 10233-8.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999a).** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399 (6732): 166-9.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999b).** Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*, 286 (5448): 2342-4.
- Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. &**

- Brennecke, J. (2008).** An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 453 (7196): 798-802.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe, D.C. (2000).** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101 (5): 543-53.
- De Haro, J.P., Calo, S., Cervantes, M., Nicolás, F.E., Torres-Martínez, 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): 1486-97.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. & Hannon, G.J. (2004).** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432 (7014): 231-5.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E. (2001).** RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, 7 (11): 1522-30.
- Dlakić, M. (2006).** DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics*, 22 (22): 2711-4.
- Drinneberg, 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*, 326 (5952): 544-50.
- Du, Z., Lee, J.K., Tjhen, R., Stroud, R.M. & James, T.L. (2008).** Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 (7): 2391-6.
- Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D. Jr., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., Yates, J.R. 3rd & Mello, C.C. (2006).** Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell*, 124 (2): 343-54.

- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001a).** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15 (2): 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001b).** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20 (23): 6877-88.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., Law, T.F., Grant, S.R., Dangel, J.L. & Carrington, J.C. (2007).** High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One*, 2 (2): e219.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132 (1): 6-13.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984).** Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 137 (1): 266-7.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A. & Pillai, R.S. (2005).** Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15 (3): 331-41.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N. (2008).** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9 (2): 102-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669): 806-11.
- Förstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E. & Zamore, P.D. (2005).** Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biology*, 3 (7): e236.

- Frangioni, J.V. & Neel, B.G. (1993).** Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry*, 210 (1): 179-87.
- Fulci, V. & Macino, G. (2007).** Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Current Opinion in Microbiology*, 10 (2): 199-203.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Vaucheret, H. (2005).** Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology*, 15 (16): 1494-500.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005).** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R. (2004).** A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science*, 306 (5698): 1046-8.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. & Carmell, M.A. (2006).** A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442 (7099): 199-202.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z. & Zamore, P.D. (2008).** Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 320 (5879): 1077-81.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. (2009).** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10 (2): 94-108.
- Glazov, E.A., Cottee, P.A., Barris, W.C., Moore, R.J., Dalrymple, B.P. & Tizard, M.L. (2008).** A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Research*, 18 (6): 957-64.

- Gooday, G.W. (1973).** Differentiation in the Mucorales. *Symposium of the Society of General Microbiology*, 23, 269-293.
- Gooday, G.W., Fawcett, P., Green, D. & Shaw, G. (1973).** The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of *Mucor mucedo*: a role for the sexual carotenogenesis in the Mucorales. *Journal of General Microbiology*, 74, 233-239.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. & Shiekhattar, R. (2004).** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432 (7014): 235-40.
- Guo, S. & Kemphues, K.J. (1995).** *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81 (4): 611-20.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. & Kinghorn J.R. (1987).** The structure and organization of nuclear genes in filamentous fungi. *Soc. Gen. Microbiol. Special publication 32: Gene structure in eukaryotic microbes*. Ed. J.R. Kinghorn. IRL Press, Oxford. 93-139.
- Gy, L., Gascioli, V., Laureessergues, D., Morel, J.B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. & Mallory, A.C. (2007).** *Arabidopsis* FIER Y1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *The Plant Cell*, 19 (11): 3451-61.
- Haley, B., Tang, G. & Zamore, P.D. (2003).** In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, 30 (4): 330-6.
- Haley, B. & Zamore, P.D. (2004).** Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11 (7): 599-606.
- Hamada, W. & Spanu, P.D. (1998).** Co-suppression of the hydrophobin gene HCF-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.*, 259 (6): 630-8.

- Hamilton, A. & Baulcombe, D. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286 (5441): 950-2.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21 (17): 4671-9.
- 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): 293-6.
- Hammond, T.M. & Keller, N.P. (2005).** RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics*, 169 (2): 607-17.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 66 (4): 557-80.
- Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V. & Morris, K.V. (2009).** Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Research*, 37 (9): 2984-95.
- 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): 173-88.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114 (1): 193-7.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., Plasterk, R.H., Hannon, G.J., Draper, B.W. & Ketting, R.F. (2007).** A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, 129 (1): 69-82.

- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D. (2001).** A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293 (5531): 834-8.
- Hutvagner, G. & Simard, M.J. (2008).** Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9 (1): 22-32.
- Jackson, R.J. & Standart, N. (2007).** How do microRNAs regulate gene expression? *Science's STKE*, 2007 (367): re1.
- Jaskiewicz, L. & Filipowicz, W. (2008).** Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 320 : 77-97.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K. & Warren, S.T. (2004).** Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nature Neuroscience*, 7 (2): 113-7.
- Jinek, M. & Doudna, J.A. (2009).** A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457 (7228): 405-12.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S. (2003).** RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 16 (9): 769-76.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S. (2004).** One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (43): 44467-74.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A.Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. & Jin, H. (2006).** A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103 (47): 18002-7.

- Kawasaki, H., Suyama, E., Iyo, M. & Taira, K. (2003).** siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Research*, 31 (3): 981-7.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. & Plasterk, R.H. (1999).** Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, 99 (2): 133-41.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. & Plasterk, R.H. (2001).** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, 15 (20): 2654-9.
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. (2003).** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115 (2): 209-16.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W. & Sassone-Corsi, P. (2006).** The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103 (8): 2647-52.
- Kos, T., Kuijvenhoven, A., Hessing, H.G., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C.A. (1988).** Nucleotide sequence of the *Aspergillus niger trpC* gene: structural relationship with analogous genes of other organisms. *Curr Genet.*, 13 (2): 137-44.
- Kurihara, Y. & Watanabe, Y. (2004).** *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 101 (34): 12753-8.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-5.
- Lai, E.C. (2004).** Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biology*, 5 (9): 115.

- Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. (2004).** The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology*, 14 (23): 2162-7.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-8.
- Lasker, B.A. & Borgia, P.T. (1980).** High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 141 (2): 565-9.
- Laurie, J.D., Linning, R. & Bakkeren, G. (2008).** Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 53 (1): 49-58.
- Lee, D.W., Pratt, R.J., McLaughlin, M. & Aramayo, R. (2003).** An Argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics*, 164 (2): 821-8.
- Lee, D.W., Seong, K.Y., Pratt, R.J., Baker, K. & Aramayo, R. (2004).** Properties of unpaired DNA required for efficient silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 167 (1): 131-50.
- 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): 274-7.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V.N. (2003).** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425 (6956): 415-9.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R. & Kim, V.N. (2006).** The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 5 (3): 522-32.

- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. & Carthew, R.W. (2004).** Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117 (1): 69-81.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. (2003).** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115 (7): 787-98.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P. (2005).** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120 (1): 15-20.
- Lieberman, I., Kornberg, A. & Simms, E.S. (1955).** Enzymatic synthesis of pyrimidine nucleotides; orotidine-5'-phosphate and uridine-5'-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 215 (1): 403-51.
- 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): 1921-5.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. & Hannon, G.J. (2004).** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305 (5689): 1437-41.
- Liu, X., Jiang, F., Kalidas, S., Smith, D. & Liu, Q. (2006).** Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA*, 12 (8): 1514-20.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. & Carrington, J.C. (2002).** Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell*, 14 (7): 1605-19.
- Ma, J.B., Ye, K. & Patel, D.J. (2004).** Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429 (6989): 318-22.

- 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): 237-43.
- 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): 195-8.
- MacRae, I.J., Zhou, K. & Doudna, J.A. (2007).** Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14 (10): 934-40.
- 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.
- 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): 1417-27.
- May, G.S., Tsang, M.L., Smith, H., Field, F. & Morris, N. (1987).** *Aspergillus nidulans* beta-tubulin genes are unusually divergent. *Gene*, 55 (2-3): 231-43.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. & Waterhouse, P.M. (2006).** *Aspergillus nidulans* beta-tubulin genes are unusually divergent. *FEBS Letters*, 580 (10): 2442-50.
- Mardis, E.R. (2008).** The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24 (3): 133-41.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P. & Nellen, W. (2002).** RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell.*, 13 (2): 445-53.
- Martinez, J. & Tuschl, T. (2004).** RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & Development*, 18 (9): 975-80.

- Matzke, M.A. & Birchler, J.A. (2005).** RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics*, 6 (1): 24-35.
- 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): 1417-27.
- Meister, G. & Tuschl, T. (2004).** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431 (7006): 343-9.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. & Matzke, A.J. (2000).** Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal*, 19 (19): 5194-201.
- Miller, J.H. (1972).** *Experiments in Molecular Genetics*. (pp. 325-355). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Moazed, D. (2009).** Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 457 (7228): 413-20.
- Mochizuki, K. & Gorovsky, M.A. (2004).** Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14 (2): 181-7.
- Morris, K.V., Chan, S.W., Jacobsen, S.E. & Looney, D.J. (2004).** Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305 (5688): 1289-92.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H. (2000).** *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101 (5): 533-42.
- 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 Acid Research*, 35 (18): 5987-94.
- Nakayashiki, H. (2005).** RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS letters*, 579 (26): 5950-7.
- Nakayashiki, H., Kadotani, N. & Shigeyuki, M. (2006).** Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 63 (1): 127-35.
- Nakayashiki, H. & Nguyen, Q.B. (2008).** RNA interference: roles in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11 (6): 494-502.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990).** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, 2 (4): 279-289.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J.M., Quiles-Rosillo, M.D., Nicolás, F.E., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M. (2001).** A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266 (3): 463-70.
- Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R.M. (2003).** Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO Journal*, 22 (15): 3983-91.
- Nicolás, F.E., de Haro, J.P., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R.M. (2007).** Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics Biol.*, 44 (6): 504-16.
- Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R.M. (2009).** Transcriptional activation increases RNA silencing efficiency and stability in the fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of Biotechnology*, 142 (2): 123-6.

- Nicolás, F.E., Moxon, S., de Haro, J.P., Calo, S., Grigoriev, I.V, Torres-Martínez, S., Moulton, V., Ruiz-Vázquez, R.M. & Dalmay, T. (2010).** Endogenous short RNAs generated by Dicer2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acid Research*, doi:10.1093/nar/gkq301
- Nyilasi, I., Acs, K., Papp, T., Nagy, E. & Vágvölgyi, C. (2005).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiologica*, 50 (5): 415-20.
- Obi, I. (2009).** Functional investigation of the ATPase/Helicase domain of human Dicer. *PhD Thesis. University of Hamburg.*
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2004).** Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18 (14): 1655-66.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. & Lai, E.C. (2007).** The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130 (1): 89-100.
- Okamura, K., Chung, W.J., Ruby, J.G., Guo, H., Bartel, D.P. & Lai, E.C. (2008).** The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, 453 (7196): 803-6.
- Okamura, K., & Lai, E.C. (2008).** Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9 (9): 673-8.
- Pak, J. & Fire, A. (2007).** Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315 (5809): 241-4.
- Parizotto, E.A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. & Voinnet, O. (2004).** In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes & Development*, 18 (18): 2237-42.

- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X. (2002).** CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12 (17): 1484-95.
- Pélissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sängler, H.L. & Wassenecker, M. (1999).** Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 27 (7): 1625-34.
- Pélissier, T. & Wassenecker, M. (2000).** A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA*, 6 (1): 55-65.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B. & Rådmark, O. (2002a).** Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO Journal*, 21 (21): 5864-74.
- Provost, P., Silverstein, R.A., Dishart, D., Walfridsson, J., Djupedal, I., Kniola, B., Wright, A., Samuelsson, B., Rådmark, O. & Ekwall, K. (2002b).** Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 (26): 16648-53.
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Kuyvenhoven, A., Soede, R.D., Pourwels, P.H. & van den Hondel, C.A. (1990).** Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93 (1): 101-9.
- Qian, Z., Xuan, B., Hong, J., Hao, Z., Wang, L. & Huang, W. (2005).** Expression and purification of the carboxyl terminus domain of *Schizosaccharomyces pombe* Dicer in *Escherichia coli*. *Protein and Peptide Letters*, 12 (4) :311-4.
- Quiles-Rosillo, M.D. (2001).** Genes de *Mucor circinelloides* regulados por *crgA*, un gen regulador de la carotenogénesis. *Tesis Doctoral. Universidad de Murcia*.
- Quiles-Rosillo, M.D., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2003).** *cigA*, a light-inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crgA*. *Fungal Genetics and Biology*, 38 (1): 122-32.

- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002).** MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16 (13): 1616-26.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002).** Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110 (4): 513-20.
- Roignant, J.Y., Carré, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.A. & Antoniewski, C. (2003).** Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 9 (3): 299-308.
- Roncero, M.I., Zabala, C. & Cerdá-Olmedo, E. (1984).** Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutation Research*, 125 (2): 195-204.
- Romano, N. & Macino, G. (1992).** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6 (22): 3343-53.
- Roncero, M.I., Jepsen, L.P., Strøman, P. & van Heeswijk, R. (1989).** Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84 (2): 335-43.
- Ruby, J.G., Jan, C., Player, C., Axtell, M.J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H. & Bartel, D.P. (2006).** Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, 127 (6): 1193-207.
- Ruby, J.G., Jan, C.H. & Bartel, D.P. (2007).** Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448 (7149): 83-6.
- Rusk, N. & Kiermer, V. (2008).** Primer: Sequencing-the next generation. *Nature Methods*, 5 (1): 15.
- 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): e235.

- Saito, K., Nishida, K.M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2006).** Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes & Development*, 20 (16): 2214-22.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Schipper, M.A.A. (1976).** On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies of Mycology*, 12, 1-40.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P.D. (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115 (2): 199-208.
- Segers, G.C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q., & Nuss, D.L. (2007).** Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (31): 12902-6.
- Shendure, J. & Ji, H. (2008).** Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26 (10): 1135-45.
- Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E. (2006).** An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, 12 (12): 2063-72.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D. & Metzberg, R.L. (2001).** Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, 107 (7): 905-16.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. & Fire, A. (2001).** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107 (4): 465-76.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L. & Plasterk, R.H. (2007).** Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, 315 (5809): 244-7.

- Siomi, H. & Siomi, M.C. (2009).** On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457 (7228): 396-404.
- Skory, C.D. (2004).** Repair of plasmid DNA used for transformation of *Rhizopus oryzae* by gene conversion. *Current Genetics*, 45 (5): 302-10.
- Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. & Maine, E.M. (2000).** EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Current Biology*, 10 (4): 169-78.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. (2003).** The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural Biology*, 10 (12): 1026-32.
- 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): 113-30.
- 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): 861-71.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. & Hobman, T.C. (2004).** Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Reports*, 5 (2): 189-94.
- Takeno, S., Sakuradani, E., Tomi, A., Inohara-Ochiai, M., Kawashima, H., Ashikari, T. & Shimizu, S. (2005).** Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with delta12-desaturase gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (9): 5124-8.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P.D. (2004).** A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306 (5700): 1377-80.

- Tomari, Y. & Zamore, P.D. (2005).** Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19 (5): 517-29.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76 (9): 4350-4.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V. & Zamore, P.D. (2006).** A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313 (5785): 320-4.
- Van Heeswijck, R. (1984).** The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49, 433-443.
- Van Heeswijck, R. & Roncero, M.I. (1984).** High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications*, 49, 597-609.
- Vaucheret, H. (2006).** Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, 20 (7): 759-7.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. & Moazed, D. (2004).** RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 303 (5658): 672-6.
- Voinnet, O. (2008).** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science*, 13 (7): 317-28.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. & Martienssen, R.A. (2002).** Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297 (5588): 1833-7.
- Wang, G. & Reinke, V. (2008).** A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Current Biology*, 18 (12): 861-7.

- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N. & Imai, H. (2006).** Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & Development*, 20 (13): 1732-43.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M.A., Sakaki, Y. & Sasaki, H. (2008).** Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453 (7194): 539-43.
- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. & Cerutti, H. (2000).** Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*, 290 (5494): 1159-62.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. & Carrington, J.C. (2004).** Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2 (5): E104.
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S. & Kellis, M. (2005).** Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434 (7031): 338-45.
- Yang, N. & Kazazian, H.H.Jr. (2006).** L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13 (9): 763-71.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. & Zhou, M.M. (2003).** Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426 (6965): 468-74.
- Ye, X. & Liu, Q. (2008).** Expression, purification, and analysis of recombinant *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 enzymes. *Methods in Molecular Biology*, 442: 11-27.
- Yekta, S., Shih, I.H. & Bartel, D.P. (2004).** MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 304 (5670): 594-6.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. (2003).** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17 (24): 3011-6.
- 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.
- Zaratiegui, M., Irvine, D.V. & Martienssen, R.A. (2007).** Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell*, 128 (4): 763-76.
- 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. *The EMBO Journal*, 21 (21): 5875-85.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. & Filipowicz, W. (2004).** Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118 (1): 57-68.
- Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G.J., Wang, X.J. & Qi, Y. (2007).** A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & Development*, 21 (10): 1190-203.