

Identificación de posibles factores de virulencia regulados por el mecanismo de RNAi en *Mucor circinelloides*

C. Pérez-Arques¹, E. Navarro¹, S. Torres-Martínez¹, V. Garre¹

¹ Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Campus universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España. carlos.perez6@um.es

El silenciamiento génico mediado por RNA o RNA de interferencia (RNAi) es uno de los descubrimientos científicos más relevantes de los últimos años. Este mecanismo de regulación, conservado en la práctica totalidad de eucariotas, conduce a la supresión de la expresión génica a través de pequeñas moléculas de RNA no codificante (sRNAs), de 20 a 30 nucleótidos. Existen varias clases de sRNAs, siendo los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs) los más ampliamente representados. La biogénesis de ambos sRNAs requiere el mismo juego de proteínas (Figura 1): una proteína Dicer con actividad RNasa III encargada de procesar las moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), que desencadenan el proceso de silenciamiento, y la proteína Argonata (Ago), componente esencial del complejo RISC (RNA-induced Silencing Complex). Además, en algunos organismos se requiere el concurso de polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP) para generar las moléculas de dsRNA, o para amplificar la señal de silenciamiento (Carthew & Sontheimer, 2009). Aunque se pensaba que la función de los siRNAs era básicamente de defensa contra la invasión de material genético extraño como elementos genéticos móviles o virus, la identificación de siRNAs endógenos procedentes de genes en distintos eumetazoos puso de manifiesto una nueva función para estos siRNAs en el control de la expresión génica (Watanabe *et al.*, 2008). Estos pequeños RNAs endógenos no codificantes (esRNAs) actúan regulando procesos celulares esenciales, como la transcripción, estabilidad y procesamiento del RNA, traducción, silenciamiento de la cromatina, segregación cromosómica y defensa de la integridad del genoma (Ghildiyal & Zamore, 2009). El conocimiento cada vez mayor de la relevancia funcional de los esRNAs ha acelerado enormemente el interés por su caracterización en distintos organismos eucariotas. En hongos filamentosos se han descrito distintas clases de esRNAs reguladores pero, hasta el momento, su función permanece mayoritariamente sin caracterizar (Nicolás & Ruiz-Vázquez, 2013).

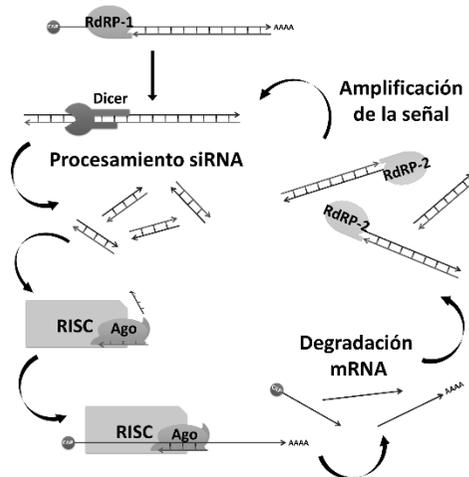


Figura 1. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides* y las proteínas principales implicadas en el proceso.

Mucor circinelloides es un hongo filamentosos basal que pertenece al orden Mucorales, utilizado como un excelente organismo modelo para el estudio de distintos procesos celulares conservados filogenéticamente en eucariotas, como las respuestas a la luz (Corrochano & Garre, 2010) y el silenciamiento génico (Garre *et al.*, 2014). Se trata de un organismo fácilmente manipulable, en parte gracias al amplio repertorio de

herramientas moleculares disponibles tales como transformación genética, sustitución de genes y RNAi (Torres-Martínez *et al.*, 2012); y a la secuenciación completa de su genoma. Desde el descubrimiento del mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003) se han identificado y caracterizado funcionalmente los principales genes implicados en la maquinaria de RNAi (Figura 1), obteniéndose mutantes en cada uno de ellos (Calo *et al.*, 2012, Cervantes *et al.*, 2013, Nicolás *et al.*, 2007, Nicolás *et al.*, 2010). Mediante análisis transcriptómicos de sRNAs se ha identificado un elevado número de regiones genómicas productoras de esRNAs, que corresponden mayoritariamente a exones (Nicolás *et al.*, 2010). La diversidad fenotípica observada en los distintos mutantes para la maquinaria de RNAi, con alteraciones en procesos esenciales relacionados con la fisiología y el desarrollo (esporulación, crecimiento vegetativo, interacción sexual y autólisis), indica que el silenciamiento génico debe jugar un papel importante en la regulación de funciones endógenas de este hongo, presumiblemente a través de los esRNAs (Nicolás *et al.*, 2015).

M. circinelloides está recibiendo especial atención como modelo de estudio de la mucormicosis, una infección fúngica causada por distintos Mucorales. Esta infección rara, pero letal, afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos, siendo considerada como emergente porque su incidencia está aumentando entre la población inmunocompetente (Skiada *et al.*, 2011). Su uso como modelo ha contribuido a la identificación de nuevos factores de virulencia, entre los que destaca el dimorfismo de las esporas asexuales, de manera que las estirpes que producen esporas de gran tamaño son más virulentas que aquellas estirpes que generan esporas pequeñas. Muy recientemente, se ha descrito un mecanismo epigenético mediado por la maquinaria de RNAi que confiere al hongo una resistencia transitoria a un compuesto antifúngico en estirpes especialmente virulentas (Calo *et al.*, 2014). En este sentido, se ha demostrado un descenso significativo en la virulencia de mutantes afectados en genes clave del mecanismo de RNAi en la infección *in vivo* de ratones inmunosuprimidos (Dr. Josep Guarro, comunicación personal, 7 de septiembre de 2014), señalando el posible papel del mecanismo de silenciamiento en la regulación de la patogénesis. Además, estos ensayos de virulencia han permitido identificar una estirpe mutante completamente avirulenta, que carece de función para el gen *white collar-1a* de *M. circinelloides* (*mcwc-1a*). Los fotorreceptores White collar-1 están ampliamente distribuidos en la mayoría de hongos (Corrochano, 2011), y se han descrito como un factor de virulencia en distintos hongos patógenos (Idnurm & Heitman, 2005, Ruiz-Roldán *et al.*, 2008). En *M. circinelloides*, la familia génica *white collar-1-like* está compuesta por tres miembros: *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. Las respuestas a la luz reguladas por esta familia génica se han caracterizado exhaustivamente (Silva *et al.*, 2006), pero hasta ahora no se había puesto de manifiesto su posible papel en la patogénesis.

Teniendo en cuenta los antecedentes indicados, el objetivo principal de este trabajo es identificar nuevos factores de virulencia en la mucormicosis que estén regulados por la maquinaria de silenciamiento génico. Para ello, se secuenció y analizó el perfil de acumulación de esRNAs en dos estirpes avirulentas y una estirpe virulenta de *M. circinelloides* f. *lusitanicus*. Las estirpes avirulentas corresponden a un aislado natural, NRRL 3631, y a una estirpe mutante para el fotorreceptor *mcwc-1a*, perteneciente a la familia de fotorreceptores White Collar-1 ya descrita. Se identificaron regiones genómicas

que acumulasen esRNAs de manera diferencial entre las estirpes avirulentas y virulenta empleando herramientas bioinformáticas de manera secuencial. De estas regiones, los *loci* que contenían genes se seleccionaron como candidatos a ser factores de virulencia de la mucormicosis regulados por el mecanismo de RNAi. Por último, el perfil de acumulación de esRNAs y su efecto sobre los niveles de mRNA en estas regiones candidatas se validó mediante hibridación tipo *northern*.

El análisis del perfil de acumulación de esRNAs reveló 28 regiones genómicas que acumulaban esRNAs de manera diferencial en las dos estirpes avirulentas con respecto a la estirpe virulenta. De estas regiones, 26 se corresponden con regiones génicas, mientras que las otras dos no contienen ningún gen anotado (regiones intergénicas). Las características funcionales de estos genes muestran una diversidad de funciones biológicas que reflejan la complejidad de una infección multifactorial como la mucormicosis, y la importancia del mecanismo de silenciamiento endógeno en la regulación de procesos biológicos esenciales para el hongo. Destaca el elevado número de regiones génicas implicadas en modificaciones postraduccionales que, junto a funciones como transcripción, procesamiento de RNA y transducción de señales, apunta a que el control del mecanismo de RNAi endógeno sobre la patogénesis se ejerce sobre reguladores maestros que actúan aguas arriba en las cascadas de señalización.

En tres de estas regiones génicas se ha confirmado, mediante hibridación tipo *northern*, las diferencias en el perfil de acumulación de esRNAs entre las dos estirpes avirulentas y la estirpe virulenta. Además, este perfil de acumulación se correlaciona de manera inversa con los niveles de mRNA, indicando que estos esRNAs suprimen la expresión de los genes de los que provienen y, por tanto, que estas regiones están reguladas por el mecanismo de silenciamiento génico. Dos de estos genes, que están sobreexpresados en la estirpe virulenta, cifran proteínas cuya función no se ha descrito en ninguna base de datos, por lo que podrían tratarse de nuevos factores de virulencia regulados por el mecanismo de silenciamiento génico. El gen restante, reprimido en la estirpe virulenta respecto a las estirpes avirulentas, cifra una proteína con las características de una ribonucleasa, por lo que podría participar en el reconocimiento y procesamiento de otros RNAs, controlando la expresión génica al degradar moléculas de mRNA (Ibrahim *et al.*, 2008). Este resultado confirma que la expresión de esta proteína está regulada por el mecanismo de silenciamiento génico y que, debido a sus características de ribonucleasa, podría estar controlando la expresión de distintos factores de virulencia en el hongo. El equilibrio entre las distintas ribonucleasas es vital para mantener la estabilidad del transcriptoma, de manera que cualquier modificación en sus niveles de expresión podría alterar diversos factores de virulencia. Así ocurre en el hongo basidiomiceto *Cryptococcus neoformans*, un importante patógeno oportunista en el que la falta de función para White collar-1 también se ha relacionado con una pérdida de virulencia (Idnurm & Heitman, 2005). En este hongo se han relacionado distintas ribonucleasas con alteraciones en la patogenicidad y en la interacción sexual (Wollschlaeger *et al.*, 2014), siendo este último un proceso que también está afectado en mutantes para algunos genes clave del mecanismo de RNAi de *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2015).

La identificación de tres genes candidatos regulados por la maquinaria de RNAi, y que podrían jugar un papel importante en la virulencia de *M. circinelloides*, refuerza el papel de los esRNAs en la regulación de la expresión génica en hongos y apunta a una conexión con la patogénesis. Las futuras investigaciones deberán encaminarse a confirmar el papel de estos candidatos en la virulencia del hongo, para lo que se propone realizar ensayos de interacción patógeno-hospedador con mutantes afectados en estos genes. La caracterización de nuevos factores de virulencia contribuirá al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas sobre las que dirigir el desarrollo de nuevos antifúngicos para combatir la mucormicosis.

Referencias bibliográficas

- Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2012). *Molecular Microbiology* **83**, 379-394. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07939.x
- Calo, S., Shertz-Wall, C., Lee, S. C., Bastidas, R. J., Nicolás, F. E., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Cardenas, M. E. & Heitman, J. (2014). *Nature* **513**, 555-558. doi:10.1038/nature13575
- Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. (2009). *Cell* **136**, 642-655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Cervantes, M., Vila, A., Nicolás, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Dalmay, T., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). *PLoS One* **8**, e69283. doi:10.1371/journal.pone.0069283
- Corrochano, L. M. (2011). *IMA fungus* **2**, 25-28. doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.04
- Corrochano, L. M. & Garre, V. (2010). *Fungal Genetics and Biology* **47**, 893-899. doi:10.1016/j.fgb.2010.04.007
- Garre, V., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2014). *Fungal RNA Biology*, edited by A. Sesma & T. von der Haar, pp. 291-313: Springer International Publishing.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. (2009). *Nature Reviews Genetics* **10**, 94-108. doi:10.1038/nrg2504
- Ibrahim, H., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. (2008). *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* **1779**, 256-265. doi:10.1016/j.bbagr.2007.11.004
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005). *PLoS Biology* **3**, e95. doi:10.1371/journal.pbio.0030095
- Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). *Fungal Genetics and Biology* **44**, 504-516. doi:10.1016/j.fgb.2006.09.003
- 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). *Nucleic Acids Research* **38**, 5535-5541. doi:10.1093/nar/gkq301
- Nicolás, F. E. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 15348-15360. doi:10.3390/ijms140815348
- Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2003). *The EMBO Journal* **22**, 3983-3991. doi:10.1093/emboj/cdg384
- Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Cascales, M. D., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M. & Garre, V. (2015). *BMC Genomics* **16**, 237. doi:10.1186/s12864-015-1443-2
- Ruiz-Roldán, M. C., Garre, V., Guarro, J., Marine, M. & Roncero, M. I. (2008). *Eukaryotic Cell* **7**, 1227-1230. doi:10.1128/EC.00072-08
- Silva, F., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2006). *Molecular Microbiology* **61**, 1023-1037. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05291.x
- Skiada, A., Pagano, L., Groll, A., Zimmerli, S., Dupont, B., Lagrou, K., Lass-Flörl, C., Bouza, E., Klimko, N., Gaustad, P., Richardson, M., Hamal, P., Akova, M., Meis, J. F., Rodríguez-Tudela, J. L., Roilides, E., Mitrousia-Ziouva, A., Petrikos, G. & European Confederation of Medical Mycology Working Group on, Z. (2011).

- Clinical Microbiology and Infection* **17**, 1859-1867. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03456.x
- Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Garre, V., López-García, S., Navarro, E. & Vila, A. (2012). *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols*, edited by J. L. Barredo, pp. 85-107. Clifton: Humana Press.
- 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). *Nature* **453**, 539-543. doi:10.1038/nature06908
- Wollschlaeger, C., Trevijano-Contador, N., Wang, X., Legrand, M., Zaragoza, O., Heitman, J. & Janbon, G. (2014). *Fungal Genetics and Biology* **73**, 20-28. doi:10.1016/j.fgb.2014.09.007